



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DANIELLE CRAVEIRO SILVA

**Desenvolvimento e avaliação do potencial cicatrizante do gel
cremoso a base das cascas do fruto de *Punica granatum* L.**

Macapá
2017

DANIELLE CRAVEIRO SILVA

Desenvolvimento e avaliação do potencial cicatrizante do gel cremoso a base das cascas do fruto de *Punica granatum* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Jocivânia Oliveira da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa

**Macapá
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

615.321

S586d Silva, Danielle Craveiro.

1.1.1. Avaliação do efeito cicatrizante do extrato hidroetanólico e do gel cremoso produzidos à partir das cascas do fruto de *Punica granatum* L. / Danielle Craveiro Silva; orientadora, Jocivânia Oliveira da Silva; coorientador, Francisco Fábio Oliveira de Sousa – Macapá, 2017.

101 f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Plantas medicinais. 2. Cicatrização. 3. *Punica granatum* L. I. Silva, Jocivânia Oliveira da, orientador. II. Sousa, Francisco Fábio Oliveira de, coorientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Danielle Craveiro Silva

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Jocivânia Oliveira da Silva

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa



**Prof^ª. Dr^ª. Jocivânia Oliveira da Silva
Presidente**

Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

**Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Azevedo do Nascimento
Membro Titular**

Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

**Prof^ª. Dr^ª. Belmira Silva Faria e Souza
Membro Titular**

Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá, IEPA

Data:18/12/2017

Dedico este trabalho

Ao meu Misericordioso Deus, pela força e coragem sobrenatural que me concedestes para mais uma conquista.

Aos meus amados Pais José de Ribamar (in memorian) e Lúcia, que foram meus idealizadores, me ensinado a lutar pelos meus objetivos e sempre perseverar. Amo vocês!

Às minhas amadas filhas, Jhulie Vitória, Annah Valentina e Mariah Clara, pelos sorrisos, carinhos, amor, compreensão de tamanha ausência (plena infância). Meu amor por vocês é Fundamental e Incondicional.

Ao meu querido esposo Jean Rogério por sempre sonhar comigo. Esta conquista é tão sua quanto minha. Te amo!

Meu Misericordioso Deus.

Aos meus queridos Pais pelo incentivo e amor.

Às minha filhas pelo amor que transcende diariamente por vocês.

Ao meu amado esposo pela compreensão da ausência e atribuições que adquiriu neste período, tornando-se Pai e Mãe de nossas filhas.

Aos meus queridos irmãos Luciano e Lanna. Amo vocês!

À minha querida orientadora Jocivânia Oliveira que me acolheu quando mais precisei, sem medir esforços para que minha dissertação se desenvolvesse da melhor forma possível. À você meu singelo agradecimento.

*Ao Prof^o. Dr^o. Francisco Fábio de Oliveira que cedeu o extrato de *Punica granatum* L., com o qual desenvolvi meu trabalho.*

Aos meus amigos do Laboratório de Toxicologia: Adolfo Bittencourt, Carolina Miranda, Dayse Sá, Mayara Telles e Nathália Danielly, por me incentivarem, auxiliarem, conduzirem e me fortalecerem, o meu singelo obrigada.

Aos meus amigos da turma de mestrandos 2015: Gabryelle, Albenise, Rosany, Uriel, Antônio, Jaderson, Ivagner, Brenda, Danilo, Patrício, Rangel, Mário Omar e Hina, que tornaram meus dias mais alegres e divertidos.

À Gisele Custódio que abdicou de momentos valiosos para me ajudar.

Ao queridíssimo Dr^o. Patrick Cantuária que não mediu esforços para colaborar com minha dissertação.

Aos queridos Prof. Dr^o. Washington Luiz Assunção Pereira, Prof. Dr^o. Milton Nascimento da Silva, Prof^a. Dr^a. Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva, Abraão de Jesus Barbosa Muribeca, Prof^o. Msc. Tonny Medeiros por colaborar com meu projeto de dissertação, se empenhando para o sucesso do meu trabalho.

Ao estimado Prof^o. Msc. Robson Gama pelo carinho e atenção nos envios de muitos artigos que corroboraram com minha dissertação e por demonstrar tanto amor e carinho na arte de ensinar.

À Tia Catarina Moutinho pela orientação e correção do meu trabalho.

Ao amigo Hélison Oliveira, que me ajudou a superar o medo da estatística.

À coordenação do Mestrado na pessoa do Édson Junior, pelo apoio quando precisei.

Aos meus queridos amigos por me incentivarem sempre.

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	19
1.2	<i>Punica granatum</i> L. (Romã).....	20
1.3	PELE.....	23
1.4	FERIDAS.....	26
1.4.1	Tipos de feridas.....	27
1.5	CICATRIZAÇÃO.....	27
1.5.1	Classificação quanto ao tipo de cicatrização.....	28
1.5.1.1	Primeira intenção.....	28
1.5.1.2	Segunda intenção.....	29
1.5.1.3	Terceira intenção.....	29
1.5.2	Classificação quanto às fases de cicatrização.....	30
1.5.2.1	Fase inflamatória ou exsudativa.....	30
1.5.2.2	Fase proliferativa ou de tecido de granulação.....	31
1.5.2.3	Fase de maturação ou remodelamento.....	32
1.6	GEL CREMOSO.....	33
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3	MATÉRIAL E MÉTODO(S).....	37
3.1	TIPO DE ESTUDO.....	37
3.2	ASPÉCTOS ÉTICOS.....	37
3.3	AMOSTRA.....	37
3.3.1	Animais.....	37
3.4	COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	38
3.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO.....	39
3.6	ELUCIDAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NO EHE DE <i>Punica granatum</i> L.....	41
3.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	42
3.7.1	Microrganismos.....	42
3.7.2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) do EHE de <i>P. granatum</i>	

	pelo método da microdiluição em placas.....	43
3.8	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES ESTUDADAS.....	44
3.9	ESTUDO DA PRÉ-ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS.....	45
3.10	ESTUDO DA ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS.....	46
3.11	CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DAS FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS.....	47
3.11.1	Contagem de microrganismos viáveis totais e pesquisa de patógenos nas formulações contendo <i>Punica granatum</i> Linn a 0,5% e 1,0%.....	47
3.11.2	Pesquisa e Identificação de microrganismos patogênicos nas formulações (<i>Salmonelas sp</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosas</i> e <i>Staphylococcus auerus</i>).....	48
3.11.2.1	Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	49
3.11.2.2	Identificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
3.11.2.3	Identificação de <i>Escherichia coli</i>	49
3.11.2.4	Identificação de <i>Salmonella sp</i>	49
3.12	TESTE DE TOXICIDADE CUTÂNEA AGUDA E AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS MODELOS EXPERIMENTAIS.....	50
3.13	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS FITOTERÁPICAS DESENVOLVIDAS UTILIZANDO UM MODELO EXPERIMENTAL COM CAMUNDONGOS.....	51
3.13.1	Anestesia.....	51
3.13.2	Tricotomia e produção da ferida cutânea.....	51
3.13.3	Delineamento do estudo da atividade cicatrizante.....	52
3.14	CICLO DE EUTANÁSIA.....	53
3.15	PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS DOS ESPÉCIMES.....	53
3.16	AVALIAÇÃO DAS FERIDAS.....	54
3.16.1	Avaliação macroscópica das feridas.....	54
3.16.2	Determinação do índice de retração (IR) clínica das feridas.....	55
3.17	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1	ELUCIDAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NO EHE DE <i>Punica granatum</i> L.....	56

4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EHE DE <i>Punica granatum</i> L.....	60
4.2.1	Determinação da MIC e MBC.....	60
4.3	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS.....	62
4.4	ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA.....	63
4.5	CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DAS FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS.....	66
4.6	TESTE DE TOXICIDADE CUTÂNEA AGUDA E AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL.....	70
4.7	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS FERIDAS.....	71
4.8	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS FERIDAS.....	73
4.9	ÍNDICE DE RETRAÇÃO (IR) CLÍNICA DAS FERIDAS.....	80
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87
	ANEXOS.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Soluções testes e seus respectivos volumes (μL) utilizados no teste de microdiluição em caldo.....	44
Tabela 2	Constituintes em gramas (g) das formulações utilizadas nos ensaios <i>in vivo</i> nos animais experimentais.....	45
Tabela 3	Constituintes em gramas (g) das formulas utilizadas no estudo de pré-estabilidade (teste realizado em triplicata).....	45
Tabela 4	Constituintes em gramas (g) das formulas utilizadas no estudo de estabilidade acelerada.....	45
Tabela 5	Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos nos ensaios de atividade cicatrizante.....	52
Tabela 6	Valores de massa/carga (m/z) obtidos em ensaio de HPLC-HRMS (ESI) para a amostra de <i>Punica granatum</i> L.....	57
Tabela 7	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) em UFC x 10^5 do EHE de <i>Punica granatum</i> L. sobre <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	61
Tabela 8	Determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC) em UFC x 10^5 do EHE de <i>P. granatum</i> L. sobre <i>S. aureus</i> e <i>P. aruginosa</i>	61
Tabela 9	Parâmetros avaliados no estudo de toxicidade cutânea aguda em camundongos tratados com Gel cremoso contendo EHE das cascas dos frutos de <i>Punica granatum</i> L. a 10%.....	71
Tabela 10	Índice de retração do fermento (%) de camundongos tratados com EHE e gel cremoso de <i>Punica.granatum</i> L. durante 7 dias.....	80
Tabela 11	Índice de retração do fermento (%) de camundongos tratados com EHE e gel cremoso de <i>Punica.granatum</i> L. durante 14 dias.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Punica granatum</i> L. (A), folhas verde-brilhantes (B), flores vermelho-alaranjadas (C), fruto <i>in natura</i> da romã (balaústia) (D).....	22
Figura 2	Representação esquemática da pele com suas respectivas camadas e apêndices.....	24
Figura 3	Representação esquemática da derme (ampliada).....	26
Figura 4	Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.....	28
Figura 5	Feridas e tipos de cicatrização.....	29
Figura 6	Fase inflamatória do processo de cicatrização.....	31
Figura 7	Divisão e migração das células basais através da fase de granulação da ferida.....	32
Figura 8	Fase de maturação do processo cicatricial.....	33
Figura 9	Fotografia do Registro Científico (Excicata) nº 18777 da amostra de <i>Punica granatum</i> Linn estudada (Campos, M.B. 001. 09/09/2014).....	39
Figura 10	Árvore da <i>Punica granatum</i> Linn (a), flor da amostra (b), registro científico – Excicata nº 18777 (c), seleção dos frutos <i>in natura</i> da <i>Punica granatum</i> (romã) (d), despulpamento / cascas do fruto (e), cascas fragmentadas do fruto (f), maceração em EHE. 70% (g e h), extrato Et. Aquoso 1% (i), Controle de qualidade (j), GPg 0,5% (k), GPg 1,0% (l).....	41
Figura 11	Gel cremoso contendo extrato hidroetanólico das cascas de <i>P. granatum</i> (GPg 0,5%) (1), Gel cremoso contendo extrato hidroetanólico das cascas <i>P. granatum</i> (GPg 1,0%) (2).....	47
Figura 12	Formulações utilizadas nos experimentos de cicatrização cutânea – GPg 0,5% (1), GPg 1,0% (2), SPg 0,5% (3) e SPg 1,0% (4).....	53
Figura 13	Estrutura molecular dos compostos tânicos majoritários da casca do fruto de <i>Punica granatum</i> L. do ácido elágico – Ácido Hidroxibenzóico (a), ácido gálico - Ácido Hidroxibenzóico (b), punicalagina - Elagitaninos (c).....	59
Figura 14	Gel cremoso contendo extrato de <i>P. granatum</i> (GPg 0,5%) (1), Gel cremoso contendo extrato <i>P. granatum</i> (GPg 1,0%) (2).....	63

Figura 15	Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> proveniente das amostras do GPg 0,5% e 1,0%, em meio Ágar Sal Manitol.....	67
Figura 16	Identificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> proveniente das amostras do GPg 0,5% e 1,0%, em meio Ágar Cetrimide.....	67
Figura 17	Identificação de <i>Escherichia coli</i> proveniente das amostras do GPg 0,5% e 1,0%, em meio Ágar MacConkey.....	68
Figura 18	Identificação de <i>Salmonella sp</i> proveniente das amostras do GPg 0,5% e 1,0%, em meio Ágar verde Brilhante.....	69
Figura 19	Aspectos macroscópicos das feridas nos dias 0 (1), 7 (2) e 14 (3).....	73
Figura 20	Fotomicrografia de um animal tratado com EHE das cascas dos frutos de <i>P. granatum</i> L. a 0,5% (0-7 dias).....	74
Figura 21	Fotomicrografia de um animal tratado com EHE das cascas dos frutos de <i>P. granatum</i> L. a 0,5% (8-14 dias).....	75
Figura 22	Fotomicrografia de um animal tratado com EHE das cascas dos frutos de <i>P. granatum</i> L. a 1,0% (0-7 dias).....	75
Figura 23	Fotomicrografia de um animal tratado com EHE das cascas dos frutos de <i>P. granatum</i> L. a 1,0% (8-14 dias).....	77
Figura 24	Fotomicrografia de um animal tratado com gel cremoso contendo EHE das cascas dos frutos de <i>P. granatum</i> L. a 0,5% (0-7 dias).....	78
Figura 25	Fotomicrografia de um animal tratado com gel cremoso contendo EHE das cascas dos frutos de <i>P. granatum</i> L. a 1,0% (a) (0-7 dias), (b) (8-14 dias).....	79
Figura 26	Evolução da área do ferimento (mm ³) de camundongos tratados com EHE das cascas dos frutos e gel cremoso de <i>Punica granatum</i> L., durante 7 dias.....	81
Figura 27	Evolução da área do ferimento (mm ³) de camundongos tratados com diferentes doses do EHE das cascas dos frutos de <i>Punica granatum</i> L., durante 14 dias.....	83
Figura 28	Evolução da área do ferimento (mm ³) de camundongos tratados com Gel cremoso contendo EHE das cascas dos frutos de <i>Punica granatum</i> L. em diferentes doses durante 14 dias.....	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Microrganismos testados nos ensaios de atividade antimicrobiana....	43
Quadro 2	Avaliação física e físico-química da formulação CNGC durante o teste de estabilidade acelerada.....	64
Quadro 3	Avaliação física e físico-química da formulação GPg 0,5% durante o teste de estabilidade acelerado.....	64
Quadro 4	Avaliação física e físico-química da formulação GPg 1,0% durante o teste de estabilidade acelerado.....	65

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	Relação Nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS – RENUSUS.....	97
ANEXO 2	Protocolo de Produção da Base Gel Cremoso.....	99
ANEXO 3	Certificado do Comitê de Ética no uso de animais.....	100
ANEXO 4	Tabela de Monitoramento de cicatrização por animal.....	101

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

CN	Caldo Nutritivo
CHX	Cloridrato de Clorexidina
MBC	Concentração Bactericida Mínima
MIC	Concentração Inibitória Mínima
CNGC	Controle Negativo Gel Cremoso
CPCHX	Controle Positivo de Clorexidina
Eq	Equação
LC-MC	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
EHE	Extrato Hidroetanólico
EHEPG	Extrato Hidroetanólico <i>Punica granatum</i>
FIB	Fibrinase
GPg	Gel <i>Punica granatum</i> L.
IR	Índice de Retração
<i>m/z</i>	Massa/carga
SPg	Solução <i>Punica granatum</i> L.
UFC	Unidade Formadora de Colônia

Avaliação do efeito cicatrizante do extrato hidroetanólico e do gel cremoso produzidos à partir das cascas do fruto de *Punica granatum* L.

Introdução: A incorporação de extratos vegetais com atividade biológica tem se apresentado como uma alternativa relevante na melhoria do processo cicatricial, tendo a *P. granatum* já sido utilizada como fitoterápico nas lesões de pele. **Objetivo:** O presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar a atividade cicatrizante do extrato hidroetanólico e do gel cremoso à base das cascas do fruto de *P. granatum* L., utilizando um modelo experimental *in vivo*. **Resultados e discussões:** A elucidação dos compostos presentes no EHE das cascas do fruto de *P. granatum* através de LC-MS revelou 18 fitocomplexos, dentre eles, o ácido gálico, ácido elágico e punicalagina. O extrato hidroetanólico da romã (*P. granatum* L.) produziu uma significativa atividade antibacteriana (bacteriostática e bactericida) *in vitro* sobre as linhagens estudadas de *S. aureus* (ATCC6538P) e *P. aeruginosa* (ATCC9027). Os géis cremosos contendo o EHE de *P. granatum* L., nas concentrações de 0,5 e 1,0 %, apresentaram alterações consideradas aceitáveis nos ensaios de pré-estabilidade e de estabilidade acelerada. As formulações incorporadas com EHE de *P. granatum*, em estudo *in vitro*, apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Salmonella sp* nas concentrações estabelecidas, assim como inibiram o crescimento de fungos e bolores e bactérias aeróbias. Quanto à toxicidade aguda cutânea, nenhuma alteração foi constatada nos aspectos comportamentais dos animais submetidos ao teste. A aplicação tópica do extrato hidroetanólico e do gel cremoso de *Punica granatum* L. a 1% sobre feridas excisionais induzidas experimentalmente aceleraram o processo cicatricial no período de 7 dias, modulando a resposta inflamatória e a colageneização do tecido. **Conclusão:** O extrato hidroetanólico e o gel cremoso contendo o EHE de *Punica granatum* L a 1% apresentaram os resultados mais promissores na cicatrização de feridas cutâneas, principalmente durante a fase exsudativa.

Palavras chave: *Punica granatum* L. LC-MS. Formulação em gel cremoso. Cicatrização.

Agradecimentos: LABCROL, LABOPAT.

EVALUATION OF THE HEALING EFFECT OF THE HIDROETHANOLIC EXTRACT AND THE CREAM GEL PRODUCED FROM THE HUSKS OF THE FRUIT OF *Punica granatum* L.

Introduction: The incorporation of plant extracts with biological activity has been presented as a relevant alternative in the improvement of the scarring process, with *P. granatum* already been used as herbal in skin lesions. **Objective:** This study aimed to develop and evaluate the healing activity of the extract hidroethanolic and the cream gel based on the husk of the fruit of *P. granatum*, using an experimental model in vivo. **Results and discussions:** the elucidation of the compounds present in the EHE of the husks of the fruit of *P. granatum* through LC-MS revealed 18 phytocomplexes, among them, gallic acid, ellagic acid and punicalagine. The pomegranate extract hidroethanolic of *P. granatum* produced a significant antibacterial activity (bacteriostatic and bactericide) in vitro on the studied lineages of *Staphylococcus aureus* (ATCC6538P) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027). The cream gels containing the EHE of *P. granatum*, at the concentrations of 0.5 and 1.0%, presented amendments considered acceptable in stability and accelerated stability tests. The formulations incorporated with EHE of *P. granatum*, in vitro study, presented microbial activity in front of the strains of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. in the established concentrations, as well as inhibited the growth of fungi and moulds and aerobic bacteria. As for acute cutaneous toxicity, no change has been found in the behavioral aspects of the animals subjected to the test. Topical application of the hidroethanolic extract and cream of *P. granatum* To 1% on excisionais-induced wounds experimentally accelerated the scarring process over the period of 7 days, modulating the inflammatory response and the colageneization of the tissue. **Conclusion:** The extract hidroethanolic and the cream gel containing the EHE of *P. granatum* to 1% presented the most promising results in the healing of cutaneous wounds, especially during the exudate phase.

Keywords: Creamy gel formulation. Healing. LC-MS. *Punica granatum* L.

Acknowledgements: LABCROL, LABOPAT.

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais com fins terapêuticos pela humanidade é descrito a milhares de anos, em obras como Pen T'Sao Ching (2.700 a. C), Papiro de Ebers (1.500 a.C) e na Bíblia. Essas publicações apresentam inúmeros relatos sobre as plantas e outros produtos, tanto de origem vegetal quanto animal, com propriedades terapêuticas (CHAST, 2008).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas medicinais ou preparações destas para tratar a saúde (OLIVEIRA; SIMOES; SASSI, 2006).

O Brasil é o País de maior biodiversidade do planeta, que associada a uma rica diversidade étnica e cultural detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tendo o potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2016).

Compreende-se, que as plantas medicinais são espécies vegetais usadas com a finalidade de prevenir, aliviar ou tratar sintomas e doenças. O uso descomedido desses espécimes vegetais, cultivadas e consumidas pela população brasileira, poderá ser controlado e transformado em uso sustentável passando a ser uma opção que agregará valores às matérias primas disponíveis nas regiões do Brasil, melhorando a saúde das pessoas, contribuindo nas rendas das comunidades rurais, favorecendo a conservação das espécies nativas e, além de aumentar a oferta no mercado (PINTO, 2008).

Os fitoterápicos representam uma classe de medicamentos largamente utilizada no país e constituem um mercado em expansão. Segundo Scopel (2005), muitos estudos farmacológicos se fundamentam em estudos etnofarmacológicos, ou seja, partem do uso tradicional e do conhecimento popular sobre as propriedades farmacológicas, como anti-

inflamatória, analgésica, antiespasmódica, antimicrobiana, entre outras, de certas drogas vegetais.

Nesse sentido, a biodiversidade das florestas tropicais serve como foco para descoberta de plantas medicinais promissoras para a cura de doenças e agravo à saúde. A interação de plantas tropicais e seus predadores naturais podem ser usados como suporte para a descoberta de substâncias ativas e, conseqüentemente como forma de orientar as investigações farmacológicas (BRAZ-FILHO, 2010).

Para a produção de um medicamento fitoterápico é necessário conhecimento da droga vegetal com relação aos seus constituintes químicos e atividades biológicas. Além disso, o controle de qualidade da matéria-prima vegetal, envolvendo análises físico-químicas e microbiológicas, é etapa fundamental para alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento (BARA et al., 2006).

Um estudo realizado pelo RENISUS – Relação Nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS (ANEXO A), divulgada pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF do Ministério da Saúde teve como objetivo orientar a elaboração de uma relação de fitoterápicos disponíveis para o uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinadas doenças. Neste estudo foram listadas 71 espécies de plantas medicinais e dentre elas, encontra-se o romã, *P. granatum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

1.2 *Punica granatum* L. (Romã)

O gênero *Punica* é representado apenas por duas espécies, a *Punica protopunica*, que vive apenas na ilha de Socrota, encontrando-se em extinção e a *P. granatum* popularmente conhecida como romã, espécie com bastante interesse econômico. Pertence a família Lythraceae, sendo um arbusto lenhoso, ramificado que atinge de 4 a 7 metros de altura, com folhas simples, cartáceas, dispostas em grupos de 2 ou 3, de 4-8 cm de comprimento. Contém flores isoladas ou em grupos de 2-3 nas extremidades dos ramos, constituídas de corola vermelho-alaranjada e um cálice esverdeado, duro e coriáceo. Frutos do tipo baga, globóides, medindo até 12 cm, com numerosas sementes envolvidas por um arilo róseo polposo, cheio de um líquido doce ligeiramente ácido (Figura 1). Provavelmente, originária da Ásia ocidental e oriental e toda costa do Mediterrâneo, sendo cultivada no mundo, e bem adaptada no Brasil (LORENZI; MATOS,

2008), tendo preferência terras úmidas e com maior cultivo no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do sul (BRAGA, 1961; MOREIRA, 1985; SANGIRARD, 1991).

A árvore da *P. granatum*, possui uma extensa narrativa ethnomedical e apresenta um amplo potencial fitoquímico de valor frutífera e medicinal, sendo dividida em partes para estudo das atividades farmacológicas: raiz, caule, folhas, flores, frutos (casca, suco e semente), que são estudados pelas suas propriedades medicinais sendo considerada sagrada pelas principais religiões do mundo por apresentar potencial de tratamento de grande variedade de doenças (LANGLEY, 2000).

De acordo com Longtin (2003), as propriedades farmacológicas da *P. granatum* têm sido descritas extensivamente, resultando na sua indicação para usos diversos, incluindo: imunomodulação, arteriosclerose, infecção bacteriana, infecção fúngica, infecção parasitária e doença periodontal. Esses dados são corroborados pelos estudos de Claisse (1989), Caribé e Campos (1991), Almeida (1993), Matos (1994), Longuefosse e Nossin (1996) e Navarro et al. (1996) que afirmam que as cascas do fruto, do caule, da raiz e as flores são indicadas e usadas para o tratamento de um grande número de doenças inflamatórias e infecciosas, estando incluídas lesões e abscessos de pele e mucosas, aftas, amidalites, faringites, estomatite, gengivite, glossite, afecções febris, diarreias de origem bacteriana e parasitária, infecções das vias urinárias, vômitos e escabiose.

Outro estudo preliminar acerca da atividade imunomodulatória de romã, demonstrou que o pó da casca do fruto de *P. granatum* em doses orais de 100 mg/kg como suspensão aquosa, apresenta atividade estimulante para os componentes humoral e celular do sistema imune em coelhos (Gracious, Selvasubramanian e Jayasundar, 2001).

Em outro estudo, Noda et al. (2002) comprovaram que as antocianidinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina) presentes no extrato de romã (*P. granatum*) apresentam atividade antioxidante.

A produção do fruto da *P. granatum* se dá no período de setembro a fevereiro (MARTINS, 1995). Compõe-se de uma gaba globosa, do tamanho de uma laranja pequena, de casca coriácea, amarela ou avermelhada, manchada de escuro, multilocular, com inúmeras sementes angulosas, coberta por tegumento espesso, polposos, de sabor doce ligeiramente ácido (GOMES, 2007).

Os frutos (pericarpo) da romã são fontes de carboidratos, minerais, fibras brutas e composição ativa, biologicamente variada, de vitamina C (ácido ascórbico e cítrico) e

taninos hidrolisáveis como a punicalagina, punicalina e ácido elágico e, que são conhecidos como antioxidantes naturais e também contém antocianosídeos, como 3-glucosídeos e 3-5, digluconosídeos de delphinidina, cianidina e pelargonidina (ZAOUAY; MENA; VIGUERA, 2012). Os componentes bioativos e as ações farmacológicas de *P. granatum* indicam uma gama de aplicações clínicas para o tratamento e prevenção de doenças (LANSKY; NEWMAN, 2007).

Figura 1 *P. granatum* L.(A), folhas verde-brilhantes (B), flores vermelho-alaranjadas (C), fruto *in natura* da romã (balaústia) (D).



Fonte: serralves.ubiprism.pt. (2017).

De acordo com Fetrow (2000), dentre os constituintes presentes no fruto da *P. granatum* 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. 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-aL(5).

Conforme Lorenzi e Matos (2008), a análise fitoquímica da romãzeira registra a presença de até 28% de taninos gálicos na casca do caule e dos frutos e, em menor quantidade, nas folhas. Nas sementes 7% de um óleo essencial, que entre seus ácidos graxos está principalmente o ácido puníco. Noda et. al. (2002), afirma que na parte comestível da fruta estão presentes compostos fenólicos como: antocianinas (delfinidina, cianidina e pelargonidina), quercetina, ácidos fenólicos (caféico, catequínico, clorogênico, *orto* e *para* cumárico, elágico, gálico e quínico) e taninos (punicalagina).

Ross et. al. (2001), demonstra que compostos fenólicos da romã modulam as respostas antiinflamatórias. Ajaikumar et. al. (2005), confirma que estes compostos modulam a ação de enzimas do sistema de defesa antioxidante endógeno (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase).

Segundo Adiga et al. (2010), a utilização de extratos aquosos de *P. granatum*, administrados oralmente na dose de 100mg/Kg, promovem aceleração da reação de granulação, aumento significativo na resistência mecânica do tecido cicatricial, epitelização, contração da ferida e no teor de hidroxiprolina do colágeno em feridas dérmicas abertas no modelo roedor, sugerindo um efeito cicatrizante potente do extrato de *P. granatum*, nessa dosagem em feridas abertas.

Frações aquosas preparadas da casca do fruto e o óleo de sementes de *P. granatum* foram avaliados quanto aos efeitos sobre a função de queratinócitos na epiderme e de fibroblastos na derme humana. Este estudo revelou que o mesmo óleo de sementes que estimulou a proliferação de queratinócitos não exerceu nenhum efeito na função dos fibroblastos. Em contraste, o extrato aquoso tem um potente efeito sobre a derme, estimulando a produção de fibroblastos e a síntese de colágeno, sem, no entanto estimular a produção de queratinócitos (ASLAN, 2006).

1.3 PELE

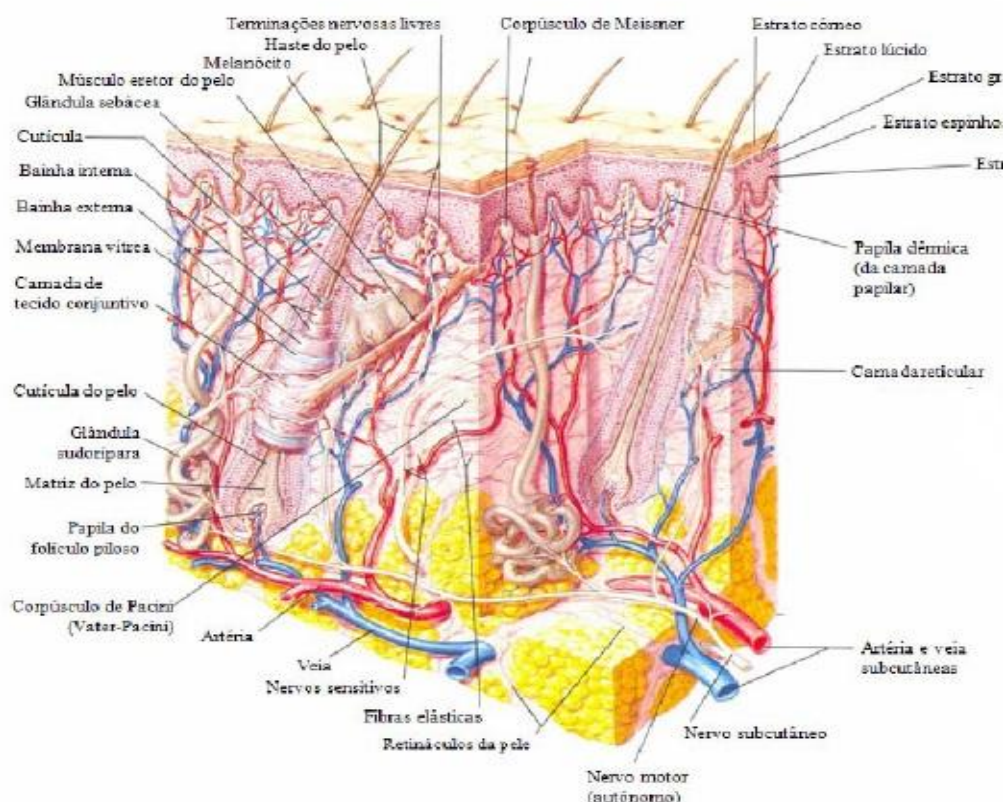
A pele é uma membrana de camada dupla que envolve toda a superfície exterior do corpo, estendendo-se pelos vários orifícios naturais por meio das membranas mucosas que revestem estes orifícios (HARRIS, 2005). No organismo existem em essência dois tipos diferentes de pele: a pele glabra, lisa e sem pelos com espessa camada ceratínica (palma das mãos e planta dos pés) e a pele pilificada, mais fina, que apresenta sulcos e pregas características (resto do organismo). Estas estruturas e células diferenciadas trabalham em harmonia, garantindo assim proteção mecânica às partes abaixo desse

tecido e serve de barreira contra traumas externos e invasão de microrganismos patógenos, também exercendo função de percepção, proteção contra raios ultravioletas, perda de água por evaporação, proteção imunológica, elasticidade e síntese de vitamina D₃ ou colecalciferol, excreção de sais, atuação como órgão sensorial e sinalização sexual (HARRIS, 2005).

As diferentes áreas do organismo são recobertas por peles com características diversificadas, observando-se variações na espessura das camadas, na quantidade e no tipo de anexos cutâneos na região. Portanto, podemos dividir fisiologicamente a pele em epiderme, derme e hipoderme (Figura 2).

A epiderme é a camada que protege a pele contra o ambiente externo, evitando a entrada de substâncias estranhas ao organismo, e ao mesmo tempo, retendo o conteúdo interno, principalmente água, eletrólitos e nutrientes. Possui uma espessura variável entre 1,3 mm (palma da mão) até 0,06 mm (face) (HARRIS, 2005).

Figura 2 Representação esquemática da pele com suas respectivas camadas e apêndices.



Fonte: Esquema de corte histológico da pele, adaptada de Cochard et al. (2003).

Em sua superfície epitelial externa está presente o estrato córneo, que é uma camada de células mortas, queratinosas e que funciona como uma barreira eficaz contra microrganismos patogênicos, além de controlar a permeação de componentes da pele, sendo, na verdade, o estrato córneo considerado a principal barreira à permeação dos fármacos através da pele (CHORILLI et al., 2007; GIL et al., 2009), que por sua vez é constituída de células eosinófilas anucleadas com grande quantidade de filamentos, principalmente a queratina.

Apresenta em sua constituição as células da camada basal, caracterizada pela presença de células tronco e células proliferativas; o estrato espinhoso, composto por células espinhosas e poligonais; e o estrato granuloso que é rico de grânulos de queratina nas células. A epiderme não conta com sistema de irrigação sanguínea direta, já que os nutrientes são transportados por ela via difusão capilar (HARRIS, 2005).

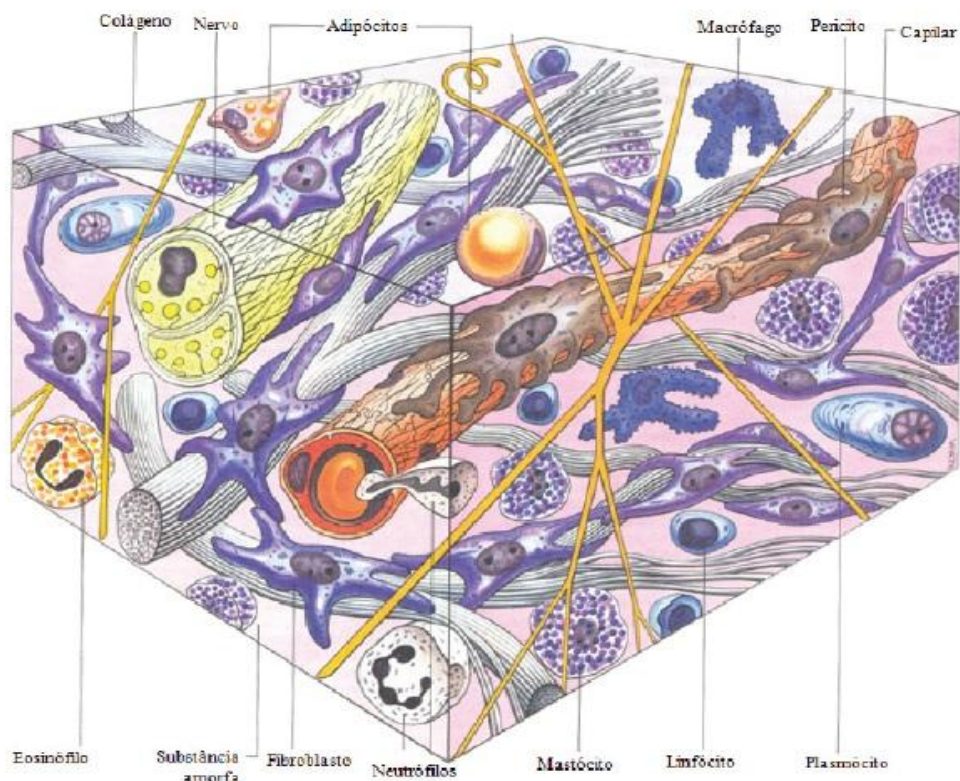
A derme (Figura 3) é a camada da pele que fica logo abaixo da epiderme, formando a parte estrutural do tegumento do corpo (HARRIS, 2005). Nela encontram-se, além dos apêndices da epiderme (pelos e glândulas sudoríparas e sebáceas), há também vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, e componentes celulares contendo células matrizes, fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos (KIERSZEMBAUM, 2004; JUNQUEIRA, 2008).

De acordo com Junqueira e Carneiro, 1999, a principal célula componente da derme é o fibroblasto.

A hipoderme, ou camada subcutânea da pele, é a porção mais profunda da derme. Consiste em tecido conjuntivo frouxo e células adiposas, os quais formam uma camada de espessura variável, dependendo da sua localização no corpo, rica em nervos e vasos sanguíneos (KIERSZEMBAUM, 2004; GARTNER, 2007).

Em cada estrutura, camada ou anexos cutâneos há propriedades distintas e específicas que conferem saúde à aparência cutânea, podendo considerar também que, do ponto de vista estético, a aceitação das características da pele pelos demais componentes de seu grupo social promove saúde psicossocial, considerando que um indivíduo é dependente da sua aparência externa e da aceitação do meio que pertence.

Figura 3 Representação esquemática da derme (ampliada).



Fonte: adaptada de Gray et al. (1995).

1.4 FERIDAS

As feridas são lesões caracterizadas pela descontinuidade cutânea causada por qualquer tipo de agressão externa que altere as condições morfofuncionais da pele, principalmente as que acometem a camada dérmica (ARAÚJO, 2010; BLANES, 2004). Estas lesões promovem condições adequadas à proliferação de microrganismos, pela presença de condições favoráveis, como o exsudato rico em nutrientes e uma temperatura apropriada (MIYAZAKI et al., 2012).

Após o rompimento tecidual nos animais vertebrados, imediatamente se inicia o processo de reparo, que compreende uma sequência de eventos moleculares objetivando a restauração do tecido lesado. Durante a fase fetal o reparo de lesões ocorre sem a formação de cicatriz, havendo a perfeita restauração do tecido lesionado. Após o nascimento, o organismo falha neste processo, formando uma cicatriz após o seu reparo (MCCALLION, 1996; MARTIN, 2005).

1.4.1 Tipos de feridas

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

Quando a ferida envolve a derme parcialmente e ocorre depois de repetidas agressões à pele, esta é considerada ferida de espessura parcial. Porém, quando acomete a derme completamente ou é estendida no tecido celular subcutâneo necessitando da formação de um novo tecido, é classificada como ferida de espessura total (MANDELBAUM; DI SANTIS; MADELBAUM, 2003).

1.5 CICATRIZAÇÃO

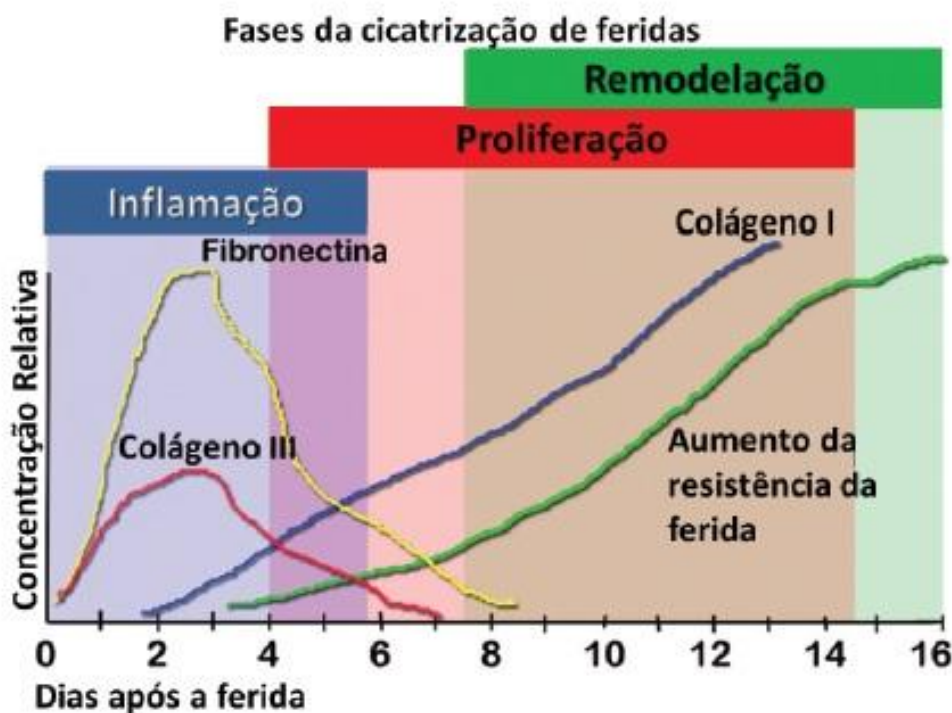
A palavra cicatrização é utilizada para definir um processo em que um tecido lesado é substituído por um tecido conjuntivo vascularizado. Este processo compreende uma sequência de eventos moleculares e celulares que interagem para que ocorra a restauração do tecido lesado. Desde o extravasamento de plasma, com a coagulação e agregação plaquetária até a reepitalização e remodelagem do tecido lesado o organismo age tentando restaurar a funcionalidade tecidual. O objetivo final destes fenômenos complexos e coordenados será a formação de um tecido de estrutura e funções semelhantes às da pele íntegra, embora a sua regeneração seja infrequente. Os custos dos tratamentos de patologias relacionadas à deficiência cicatricial aumentam a importância dos estudos em busca de medicamentos e curativos capazes de interagir com o tecido lesado, tendo como objetivo acelerar o processo de cicatrização.

Clark (1993) dividiu o processo de cicatrização de feridas em três fases que se superpõem: inflamatória, proliferativa e de remodelação (Figura 4). Segundo ele, estas não são mutuamente excludentes, mas sobrepostas no tempo.

O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas que têm os leucócitos como um de seus mais importantes protagonistas. Essas células, além de suas conhecidas atividades imunes, estão intimamente envolvidas com as reações catabólicas de degradação de tecidos pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e também com as reações anabólicas de formação de tecidos pela produção de fatores de crescimento

(Riches, 1996), responsáveis pela recomposição da celularidade regional ou restabelecimento da sua homeostasia pela formação da cicatriz.

Figura 4 Fases da cicatrização e a deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.



Fonte: Adaptado de Broughton et al. (2006).

1.5.1 Classificação quanto ao tipo de cicatrização

O fechamento das feridas ocorre de maneiras distintas, a depender das características e origem da lesão, classificando-se o tipo de fechamento em primeira, segunda ou terceira intenção (MANDELBAUM et al., 2003).

1.5.1.1 Primeira intenção

Neste processo ocorre à união primária das bordas da ferida com a possível aproximação dos bordos da lesão por suturas, havendo perda tecidual mínima, redução do potencial de infecção e do edema intersticial. Nesta etapa o tecido de granulação não é visualizado (IGNÁCIO, 2009).

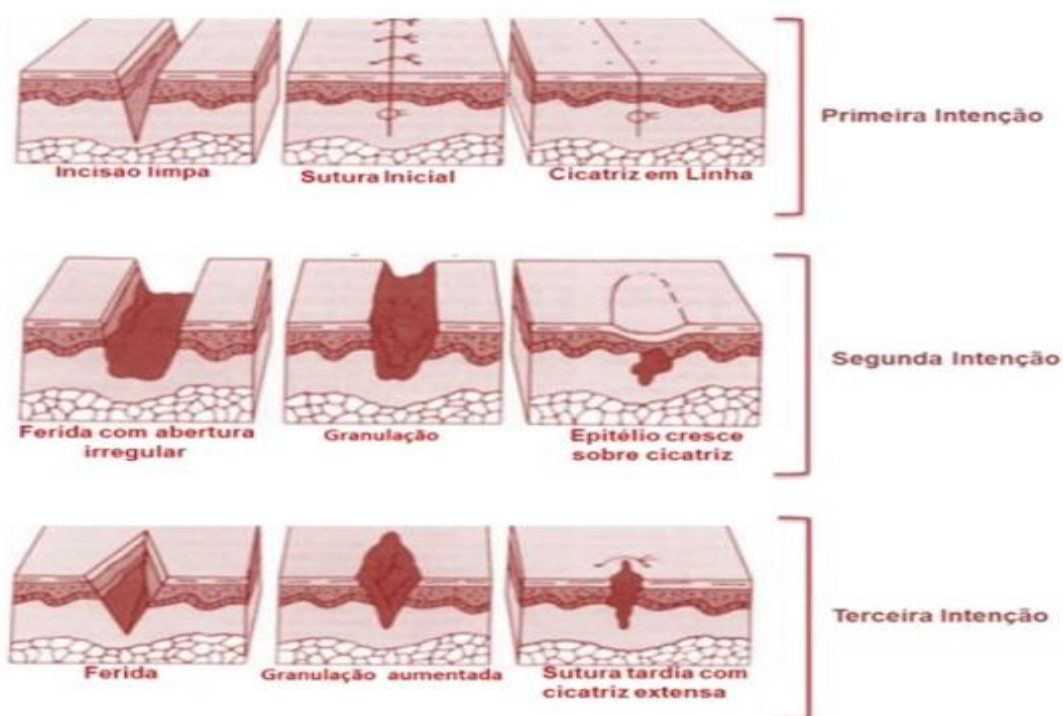
1.5.1.2 Segunda intenção

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

1.5.1.3 Terceira intenção

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

Figura 5 Feridas e tipos de cicatrização.



Fonte: Mandelbaum et al., 2003.

1.5.2 Classificação quanto às fases de cicatrização

O processo de reparação de feridas tem sido convenientemente dividido em três fases que se sobrepõem de forma contínua e temporal: fase inflamatória ou exsudativa, fase proliferativa ou de tecido de granulação e fase de maturação ou remodelagem (CLARK, 1996).

1.5.2.1 Fase inflamatória ou exsudativa

Inicia-se no exato momento da lesão, pois o sangramento traz consigo plaquetas, hemácias e fibrinas, selando as bordas da ferida. O coágulo formado estabelece uma barreira impermeabilizante que protege da contaminação. Nesse tecido lesado, há liberação local de histamina e serotonina (mediadores bioquímicos de ação curta), leucotaxina, bradicinina e prostaglandinas (mediador bioquímico de ação longa) causando uma vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo no local, assim como sinais inflamatórios como calor e rubor. Ocorre o aumento da permeabilidade capilar, causando extravasamento de líquidos para o espaço extracelular, e conseqüentemente o edema. A prostaglandina é um dos mediadores mais importantes no processo de cicatrização, pois além de favorecer a exsudação vascular, estimula a mitose celular e a quimiotaxia dos leucócitos (MENDONÇA; NETTO, 2009).

Os sinais cardinais de inflamação podem durar geralmente entre 24 a 48 horas, podendo persistir em alguns casos até duas semanas. A alteração no perfil de infiltração leucocitária é determinada pela redução nos sinais quimiotáticos com diminuição gradativa do influxo de neutrófilos e substituição destes leucócitos por linfócitos e macrófagos (NUNES et al., 2011). Este processo tem importante relevância, pois as células plaquetárias secretam grande quantidade de fatores de crescimento responsáveis por uma cadeia de eventos proliferativos indispensáveis à formação do tecido cicatricial (DIEGELMANN; EVANS, 2004).

Figura 6 Fase inflamatória do processo de cicatrização.



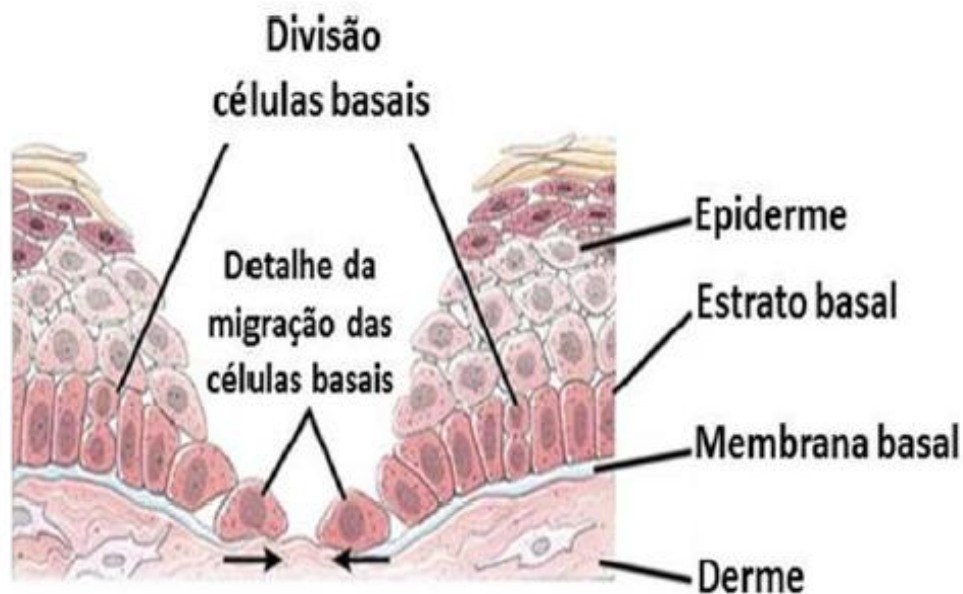
Fonte: Modificado de Gantwerker e Hom, 2012.

1.5.2.2 Fase proliferativa ou de tecido de granulação

A proliferação é a fase responsável pelo fechamento da lesão propriamente dita. Compreende a reepitelização, que se inicia após a lesão, com a movimentação de células epiteliais oriundas, tanto da margem como de apêndices epidérmicos localizados no centro da lesão; fibroplasia e angiogênese, que compõem o chamado tecido de granulação, responsável pela ocupação do tecido lesionado, ocorrendo cerca de quatro dias após a lesão. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (SINGER, 1999).

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

Figura 7 Divisão e migração das células basais através da fase de granulação da ferida.

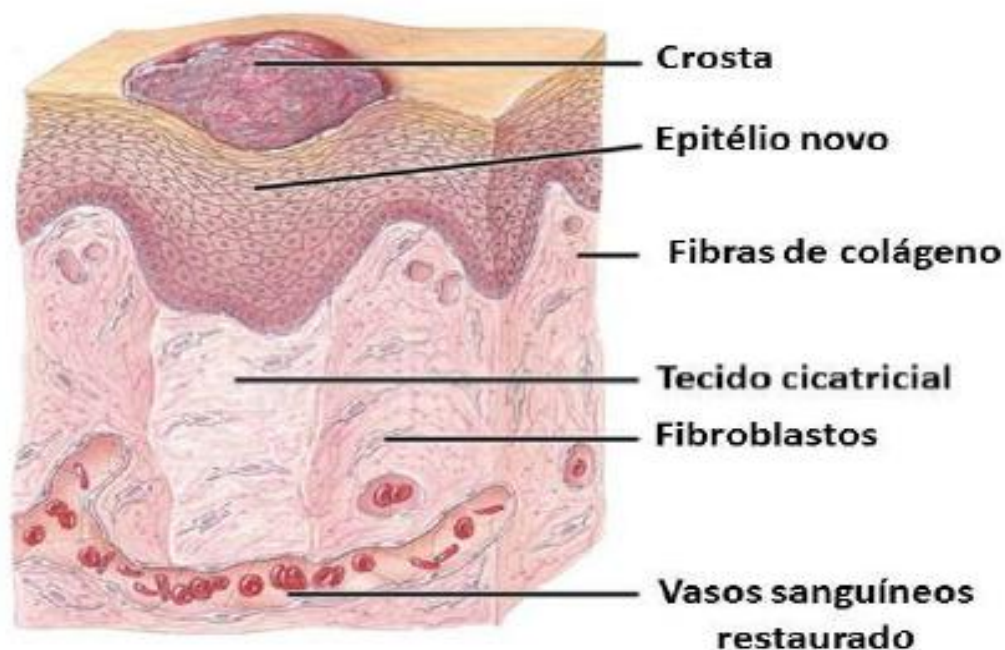


Fonte: Modificado de Gantwerker e Hom (2012).

1.5.2.3 Fase de maturação ou remodelamento

Nesta fase do processo de cicatrização ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. Esta fase é marcada pela maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorre o depósito de proteoglicanas e colágeno. Posteriormente, acontece a fibroplasia e a formação da matriz extracelular, fatores importantes no processo de formação do tecido de granulação (IGNACIO, 2009), incluindo novas cadeias de colágeno que são depositadas de maneira a promover melhor entrelaçamento arquitetural das fibras, de maneira semelhante àquela observada na derme normal (NUNES et al., 2011).

Figura 8 Fase de maturação do processo cicatricial.



Fonte: Modificado de Gantwerker e Hom (2012).

1.6 GEL CREMOSO

O gel cremoso é um veículo que pode ser utilizado para todos os tipos de pele. Apresentam baixa oclusão e, portanto pode ser utilizado para incorporação de diversos ativos, dentre eles antimicrobianos, antiinflamatórios e outros princípios ativos. São constituídos primordialmente por uma base aquosa e por esta razão, são pouco absorvidos pela pele quando comparados às preparações com constituição gordurosa (LOURENÇO, 2013).

Quando ocorre a incorporação de constituintes lipídicos com baixa emoliência a esta base, forma-se o gel cremoso e torna a aplicação mais ampla, atrelando o efeito sensorial do gel a capacidade de permeação melhorada pelos constituintes graxos. Sendo assim, os extratos incorporados terão sua ação terapêutica nas camadas mais profundas da pele, em que o efeito farmacológico seja necessário.

O gel cremoso (ANEXO B) está descrito no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (2012), e é constituído por:

- a) Polyacrylamide-C13-14 Isoparaffin-Laureth-7 (SEPIGEL®) - polímero espessante líquido e estabilizante aniônico (autoemulsificante), pré-neutralizado e com elevada estabilidade;

- b) Metil e Propilparabeno – formam a solução de conservantes antimicrobianos empregadas na formulação;
- c) Propilenoglicol – umectante, espessante, solvente;

O Sepigel® é um polímero que, quando há adição de água ao produto, ocorre à inversão da emulsão, promovendo o inchamento do polímero e formando, instantaneamente, uma rede polimérica que irá promover o espessamento do meio e se estabilizar em poucos segundos. Esse tipo de polímero permite a produção de emulsões a frio com agitação moderada, simplificando o processo de produção (SEPIGEL, 2015).

As emulsões preparadas com Sepigel® apresentam uma textura delicada, leve e agradável de espalhar sob a pele, penetra rapidamente e deixa a pele macia, sem pegajosidade ou residual oleoso. Apresentam diversas vantagens, tais como:

- a) Facilmente removíveis;
- b) Propriedades emolientes leves;
- c) Incorporação de ativos/extratos com manutenção da viscosidade dentro de uma ampla faixa de concentração;
- d) Hidrossolubilidade;
- e) Aspecto agradável;
- f) Secagem rápida;
- g) Fácil aplicação e remoção;
- h) Capacidade de receber ativos hidro ou lipofílicos;
- i) Pouco oclusivos;
- j) Modo de preparo simples;
- k) Refrescância;
- l) Baixo material residual;
- m) Baixo custo;

Finalmente, com relação ao seu perfil reológico os produtos formulados com Sepigel® apresentam características que facilitam sua utilização:

- a) Não-tixotrópico, recupera sua viscosidade instantaneamente quando se interrompe o processo de agitação;
- b) Tem bom perfil de escoamento, sendo fácil de ser envasado e retirado das suas embalagens;

- c) Tem boa resistência às variações de temperatura e à agitação, o que permite flexibilidade de adaptação do processo e garante a estabilidade da formulação durante o armazenamento e transporte;
- d) Não ocorrem mudanças de pH com produtos formulados e mantem a viscosidade na faixa de pH variando de 2 a 12.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito cicatrizante *in vivo* do extrato hidroetanólico e gel cremoso à base de cascas do fruto de *P. granatum* sobre o processo cicatricial por segunda intenção.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato hidroetanólico (EHE) das cascas do fruto de *P. granatum* e elucidar seus compostos químicos através da Cromatografia líquida de Ultrapformance acoplado a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (LC-MS);
- Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) do EHE de *P. granatum* sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*;
- Realizar ensaios de pré.estabilidade, estabilidade acelerada e controle de qualidade microbiológico das formulações na forma de gel cremoso contendo o extrato vegetal estudado;
- Avaliar a toxicidade cutânea aguda, *in vivo*, do gel cremoso de *P. granatum* a 10%;
- Verificar o efeito do EHE e do gel cremoso preparados à partir das cascas do fruto de *P. granatum* L., nas concentrações de 0,5% e 1,0%, sobre o processo de cicatrização dérmica em modelo experimental *in vivo*.

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo, de natureza experimental, desenvolveu e avaliou quanti e qualitativa o potencial cicatrizante *in vivo* do EHE de *P. granatum*. O mesmo foi realizado nos Laboratório de Pesquisa em Fármacos, do departamento de Ciências Biológicas e da Saúde e Laboratórios de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica, Bromatologia e Controle de qualidade e Toxicologia do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP).

3.2 ASPÉCTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), com registro nº 0015/2015 – ANEXO C, e realizado de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em concordância com a Lei Federal nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para uso científico de animais.

3.3 AMOSTRA

3.3.1 Animais

Para os ensaios *in vivo* do teste de toxicidade e cicatrização cutânea utilizou-se 66 camundongos da linhagem Albino (*Swiss*), adultos, de ambos sexos e com peso entre 40 e 45 g, provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas. Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$; Umidade Relativa de 40-60%) sendo fornecida ração sólida tipo pellets (LABINA) e água *ad libitum*, sendo distribuídos nos diferentes grupos experimentais, ao acaso e com ciclos de claro/escuro alternados de 12 horas, em ambiente controlado no Laboratório de Toxicologia do Curso de Farmácia da UNIFAP.

Os animais foram distribuídos e mantidos em caixas de polipropileno, contendo no máximo dois camundongos por ambiente, com tampa de grade metálica, onde se dispunha a mamadeira de água e a ração. Para evitar contaminação das feridas nos testes de cicatrização e toxicidade, não se utilizou maravalha no experimento, sendo esta substituída por papel toalha auto-clavado; havendo ainda o cuidado de limpar os recipientes onde ficaram alojados diariamente com sabão, água corrente e álcool 70 °C. Os animais foram cuidadosa e diariamente analisados e as observações tomadas em uma planilha para verificar o estado geral e intercorrências.

3.4 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

A coleta dos frutos de *P. granatum*, foi realizada no Município de Almeirim, no estado do Pará, (latitude: 1°31'43.8" S e longitude: 52°34'22.1" W) marcada por um medidor de posição global (GPS modelo *Garmin nuvi 40*). Foram coletados, além dos frutos utilizados para a preparação do extrato, ramos com folhas, um ramo florido e uma amostra do fruto para a identificação botânica. A identificação do material vegetal está depositada no Herbário Amapaense (HAMAB) do Instituto de Estudos e Pesquisas do Estado do Amapá (IEPA) sob o número de registro 18777, para fins de comprovação científica da planta (Figura 9).

Figura 9 Fotografia do Registro Científico (Excicata) nº 18777 da amostra de *Punica granatum* Linn estudada (Campos, M.B. 001. 09/09/2014).



3.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO HIDROETANÓLICO

Após a coleta, os frutos foram lavados com água corrente e sabão. Despolpou-se as cascas fragmentando-as em pedaços pequenos (1x1 cm), levado-as para secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 40 °C por 72 horas. Posteriormente o material seco foi triturado em moinho de facas (Moinho Universal, modelo 060M007), onde obteve-se uma massa de 58g do pó das cascas e submeteu-se a maceração por 7 dias com etanol a 70% (20% P/V) em temperatura ambiente (25 °C), realizando-se 2 trocas do solvente extrator, seguido de filtração. Em seguida a amostra foi submetida a um processo de evaporação deste solvente até a obtenção de solução hidroetanólico a 70%. O extrato foi acondicionado em um frasco âmbar e preservado a 4 °C até o início das análises.

Foi considerada a perda de umidade através do processo de dessecação através da seguinte equação (1):

(Eq.1)

$$\% \text{ de água no fruto} = \frac{M_i - M_f}{M_i \times 100}$$

Onde: M_i (Massa inicial da droga em g); M_f (Massa final da droga após o processo de dessecação em g).

De acordo com a FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010, determinou-se o teor de sólidos totais no extrato através de dessecação até peso constante, realizado em triplicata, sendo transferido 1mL do extrato para um bécker e em seguida levado a estufa, à temperatura de 105 °C, obedecendo as seguintes equações (2 e 3):

(Eq.2)

$$\text{Massa de água no extrato (g)} = \frac{(\text{massa (em g) de 1ml do extrato} - \text{massa (em g) do extrato evaporado em peso constante})}{\text{massa (em g) do extrato evaporado em peso constante}}$$

(Eq.3)

$$\text{Teor de sólidos totais} = \frac{(\text{massa (em g) de 1mL do extrato} - \text{massa (em g) de água no extrato})}{\text{massa (em g) de água no extrato}}$$

Figura 10 Árvore de *P. granatum* (a), flor da amostra (b), registro científico – Exsicata nº 18777 (c), seleção dos frutos *in natura* de *P. granatum* (romã) (d), despolpamento / cascas do fruto (e), cascas fragmentadas do fruto (f), maceração em EHE. 70% (g e h), extrato aquoso 1% (i), Controle de qualidade (j), GPg 0,5% (k), GPg 1,0% (l).



Fonte: Figuras c,d,f,g,h,i,j,k, l - autor e figuras a, b, e – serralves.ubiiprism.pt. (2017).

3.6 ELUCIDAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NO EHE DE *P. granatum* L

A análise do extrato EHE das cascas de *P. granatum* por LC-MS foi realizada no Laboratório de Cromatografia Líquida (LABCROL) vinculado ao Departamento de Química da Universidade Federal do Pará, sob a orientação da Dra. Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva.

A amostra (10 mg) do EHE de *P. granatum* foi solubilizada em metanol. Após dissolução completa filtrou-se em filtro de seringa hidrofóbico em politetrafluoretileno

(PTFE), com poros de 0,2 µm para remoção de partículas finas e diluídas a 2 mL em uma mistura de água:metanol 70:30 v/v.

A análise de LC-MS foi realizada em um espectrômetro de massas Xevo G2-S QToF (Waters Corp., Milford, MA, USA) equipado com uma fonte de eletrospray na qual foi introduzido um composto de referência (leucina-encefalina) simultaneamente ao analito a fim de obter medidas de massa com elevada exatidão.

Os compostos foram separados em uma coluna Acquity UPLC® BEH C18 (Waters) de 50 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno e partículas de 1,7 µm. Como fase móvel foi utilizado água (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados a 0,1% em ácido fórmico. A temperatura da coluna foi mantida constante a 40 °C.

A eluição em gradiente foi realizada em um fluxo de 0,3 mL/minuto, indo de 5% a 95% de B em 10 minutos, permanecendo em 95% de B pelos próximos 2 minutos, seguidos por mais dois minutos em 5% de B para manutenção do equilíbrio antes da próxima análise. O volume de amostra injetado foi de 5 µL. A análise foi realizada em modo positivo em ampla faixa de massas: de *m/z* 50 a 1200 com um tempo de escaneamento de 0,3 segundo. A temperatura da fonte foi estabelecida em 150 °C, o fluxo de gás no cone foi de 30 L/h, enquanto que do gás de dessolvatação foi estabelecido em 450 L/h à temperatura de 450 °C. A voltagem do capilar foi fixada em 2,0 kV, enquanto a voltagem do cone em 40 V.

A aquisição dos dados por LC-MS da amostra cedida, bem como suas análises foram realizadas utilizando-se a interface do software Masslynx versão 4.1.

3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.7.1 Microorganismos

As cepas requeridas para este estudo foram obtidas da Coleção de Culturas de Micro-organismos do Laboratório de Saúde Pública do Amapá (LACEN) e Laboratório de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), sendo elas: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (American Type Culture Collection - ATCC) – (ATCC 6538P e ATCC 9027, respectivamente), mantidas e cultivadas conforme as especificações do laboratório fornecedor.

Após o isolamento em ágar BHI (Brain-Heart infusion), foram retiradas três a quatro colônias da cepa, sendo as mesmas diluídas em caldo BHI. Para tanto, utilizou-se como referência a escala Mac-Farland, comparando-se a turbidez observada com o tubo 0,5 da

referida escala, o qual contém aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) (ANDRADE et al, 2011). Posteriormente, as cepas foram mantidas em geladeira por no máximo 24 horas antes de cada cultivo.

Quadro 1 - Microrganismos testados nos ensaios de atividade antimicrobiana.

Microrganismo	Característica
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538P)	Bactérias Gram positiva, agente responsável por várias infecções.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	Bactéria Gram-negativa, agente de infecções nosocomiais e resistente a uma grande variedade de antimicrobianos.

Fonte: Orlanda (2011).

Para o teste de micro diluição em placas (96 poços) adicionou-se 0,1 mL da amostra contendo 10^6 UFC/mL, a 0,9 mL de solução fisiológica, diluindo-se o inóculo, a aproximadamente 10^5 UFC/mL, conforme Clinical Laboratory Standardization Instituto (CLSI) 2006.

3.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) do EHE de *P. granatum* pelo método da microdiluição em placas.

A atividade antibacteriana foi determinada através da Concentração Inibitória Mínima (MIC), que corresponde à concentração bacteriostática capaz de inibir o crescimento dos microrganismos nos poços (NCCLS, 2006). Também foi verificada a Concentração Bactericida Mínima (MBC), correspondente a concentração capaz de causar a morte de 99,9% dos microrganismos presentes nos poços (BRUSTEIN et al., 2012), sendo referência para definir a susceptibilidade de um microrganismo à determinada substância (LEVISON; LEVISON, 2013).

Para a realização do ensaio foi utilizada microplaca de poliestireno, estéril, com 96 poços, sendo inseridos 90 μ L de caldo nutriente em cada poço. Em seguida, foram preparadas diluições geométricas na placa, adicionando-se 100 μ L da suspensão do extrato de *P. granatum* a partir da concentração inicial de 37,8 mg/mL. Posteriormente, 10 μ L do inóculo, previamente padronizado, foram inseridos em cada poço, totalizando um volume final de 200 μ L em cada poço. O caldo nutriente contendo o inóculo e a solução

de digluconato de clorhexidina 0,12% foram empregados como controle negativo e positivo, respectivamente, e todos os testes foram realizados em triplicata.

Em seguida, a microplaca foi devidamente tampada e mantida em estufa por 24 horas a 37°C. Após a incubação, o crescimento do microrganismo foi determinado pela leitura visual direta de turvação nos poços, sendo determinada assim a MIC. Na determinação do MBC, foram plaqueados em ágar BHI 10 µL do conteúdo do poço correspondente ao MIC e os dois anteriores a este, sendo este estabelecido como a amostra correspondente a menor concentração na qual não se observou qualquer crescimento no plaqueamento. As microplacas foram incubadas a 37°C por 48h e posteriormente fez-se a leitura. Nos controles foram observadas a presença de halo de inibição no controle positivo e ausência de halo de inibição no controle negativo para que o ensaio fosse considerado válido, sendo que foi considerado positivo quando observado halo de inibição em torno das frações dos extratos e negativo na ausência de halo.

Tabela 1 - Soluções testes e seus respectivos volumes (µL) utilizados no teste de microdiluição em caldo.

Soluções testes	Soluções diluídas (µL)	SF (µL)	CHX (µL)	CN (µL)	Inóculo (µL)
EHEPG	100	-	-	90	10
CPCHX	-	-	100	90	10
CNCN	-	100	-	90	10

Legenda: EHEPG: extrato hidroetanólico de *P. granatum*; CPCHX: controle positivo clorexidina; CNCN: controle negativo caldo nutriente.

3.8 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES ESTUDADAS

O gel base utilizado para incorporação dos extratos foi o gel cremoso (FNFB, 2012).

A composição das soluções extrativas utilizadas partiu da seguinte fórmula base:

Solução conservante de parabenos.....0,2 g
 Extratos vegetais liofilizados.....0,5 g ou 1 g
 Água destilada.....qsp.....50 mL

Com exceção da **Fibrinase®**, as demais formulações aplicadas no experimento foram desenvolvidas no Laboratório de Toxicologia do Curso de Farmácia da UNIFAP.

Segundo a bula do produto **Fibrinase®** (LOTE:15086150), cada grama contém:

- ✓ O equivalente a 666 U de desoxirribonuclease, 1 U (Loomis) de fibrinolisa e 10 mg de cloranfenicol;
- ✓ Excipiente: Petrolato base;

Para as demais composições a descrição está detalhada nas tabelas 2,3 e 4.

Tabela 2 - Constituintes em gramas (g) das formulações utilizadas nos ensaios *in vivo* nos animais experimentais.

Composição	CNGC	SPg 0,5%	SPg 1,0%	GPg 0,5%	GPg 1,0%
Sepigel	1,2 g	-	-	1,2 g	1,2 g
Solução Parabenos	0,12 g	0,12 g	0,12 g	0,12 g	0,12 g
Extrato liofilizado	-	0,15 mL	0,3 mL	0,15 mL	0,3 mL
Água destilada	28,68 mL	29,61 mL	29,58 mL	28,53 mL	28,38 mL

Legenda: Controle negativo Gel Cremoso (CNGC), Gel cremoso contendo extrato hidroetanólico das cascas de *P. granatum* (GPg 0,5% e 1,0%), Extrato hidroetanólico das cascas de *P. granatum* (SPg 0,5% e SPg 1,0%).

Tabelas 3 - Constituintes em gramas (g) das formulações utilizadas no estudo de pré-estabilidade (teste realizado em triplicata).

Composição	CNGC	GPg 0,5%	GPg 1,0%
Sepigel	3,6g	3,6g	3,6g
Sol. Parabenos	0,36g	0,36g	0,36g
Ext. liofilizado	-	0,45mL	0,9mL
Água destilada	86,04mL	85,59mL	85,14mL

Legenda: Controle negativo Gel Cremoso (CNGC), Gel cremoso contendo extrato hidroetanólico das cascas de *P. granatum* (GPg 0,5% e 1,0%).

Tabela 4 - Constituintes em gramas (g) das formulações utilizadas no estudo de estabilidade acelerada.

Composição	GPg 0,5%	GPg 1,0%
Sepigel	24g	24g
Solução Parabenos	2,4g	2,4g
Extrato liofilizado	3mL	6mL
Água destilada	570,60mL	567,60mL

Legenda: Gel cremoso contendo extrato hidroetanólico das cascas de *P. granatum* (GPg 0,5% e 1,0%).

3.9 ESTUDO DA PRÉ-ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS

O desenvolvimento de um novo medicamento requer estudos de pré-formulação. Esta fase de desenvolvimento é caracterizada pela avaliação das propriedades físico-químicas do fármaco isolado ou associado a diversos adjuvantes (ARAÚJO, 2003).

As amostras do CNGC, GPg 0,5% e GPg 1,0% foram submetidas a realização do estudo de estabilidade preliminar descritos no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), realizado em triplicata para cada amostra (10g).

Primeiramente foram levadas a condições extremas de temperatura em banho-maria (BENFER), sofrendo aumento de temperatura (40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C) a cada 30 minutos, com objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes, além da observação do surgimento de sinais que devem ser analisados conforme as características iniciais de cada formulação.

Posteriormente, submeteu-se as amostras ao teste de centrifugação com velocidade de rotação de 1.000 rpm, 2.500 rpm e 3.500 rpm (FANEM) por 15 minutos cada. E por fim, cada amostra foi submetida ao ciclo gelo-degelo, por um período de 12 dias, que corresponde a 6 ciclos, onde ocorreu o armazenamento destas em condições distintas de temperaturas, alternadas em um intervalo de tempo de 24 horas.

Os valores adotados de temperaturas foram 5 °C $\pm$ 2 °C e 40 °C $\pm$ 2 °C em cada ciclo, sendo feita análise dos caracteres organolépticos e físico-químicos de cada amostra no primeiro e último dia.

3.10 ESTUDO DA ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS

As amostras do CNGC, GPg 0,5% e GPg 1,0% foram submetidas à estudos de estabilidade acelerada de acordo com os procedimentos descritos no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004).

Os testes foram realizados em triplicata e as amostras armazenadas em condições que acelerem mudanças possíveis de ocorrer durante o prazo de validade e mostre indícios quanto sua estabilidade.

O teste de centrifugação foi executado nas amostras segundo Anchisi et al. (2001), em uma rotação de 3.000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente para análise de estabilidade das formulações, descartando qualquer sinal de instabilidade das mesmas.

Posteriormente, efetuou-se o teste de estabilidade acelerada, no qual as amostras foram acondicionadas em potes de polipropileno (PP) de boca larga e fundo duplo e

armazenadas em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$); geladeira ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e estufa ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), onde avaliou-se os seguintes aspectos: cor, odor, pH, viscosidade, espalhabilidade e densidade em tempo zero, 24 horas, 30°, 60° e 90° dias. Todas as informações foram inseridas individualmente em tabelas.

Após o fim do teste verificou-se a qualidade microbiológica das amostras. Para cada condição testada, foi utilizada uma amostra de cada formulação, contendo aproximadamente 50 gramas.

Figura 11 Gel cremoso contendo extrato hidroetanólico das cascas de *P. granatum* (GPg 0,5%) (1), Gel cremoso contendo extrato hidroetanólico das cascas *P. granatum* (GPg 1,0%) (2).



Fonte: Autora.

3.11 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DAS FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS

3.11.1 Contagem de microrganismos viáveis totais e pesquisa de patógenos nas formulações contendo *P. granatum* a 0,5% e 1,0%

A qualidade microbiológica foi avaliada por meio da contagem em placa de microrganismos viáveis totais (bactérias, fungos e leveduras) e pesquisa de patógenos específicos (*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*), conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira, 5ª edição (2010).

Para quantificação dos microrganismos, retirou-se uma alíquota de 10 mL de cada amostra estudada adicionando-as em recipientes contendo 90 mL de Caldo caseína-

peptonada, e fez-se a homogeneização. As análises foram realizadas pela técnica de semeadura em profundidade (*Pour Plate*) recomendada pela Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010) nas seguintes diluições 1:10, 1:100 e 1:1000, empregando-se o mesmo diluente, no meio I: Ágar Triptona de Soja (TSA) e meio II: Ágar Sabouraud-dextrose para contagem de bactérias e fungos, respectivamente.

Os meios de cultura utilizados para contagem de bactérias e fungos foram preparados conforme especificação do fabricante e autoclavados a 121 °C por 15 minutos. As análises foram realizadas em capela de fluxo laminar e cada amostra foi acompanhada de uma placa controle negativo de cada meios de cultura utilizados.

Retirou-se uma alíquota de 1 mL de cada diluição e transferidas, para placas de Petri vazias, estéreis, e identificadas com o meio utilizado e as suas diluições, posteriormente foram adicionados aproximadamente 20 mL de Ágar Triptona de Soja ou Ágar Sabouraud Dextrose.

As alíquotas e o meio utilizado foram homogeneizados nas placas através de movimentos rotatórios ou 8 a 10 vezes no sentido horário e 8 a 10 vezes no sentido anti-horário. Após solidificar, as placas foram invertidas e incubadas a 30-35 °C por 2-5 dias para pesquisa de bactérias e a 20-25 °C por 5-7 dias para pesquisa de fungos.

3.11.2 Pesquisa e Identificação de microrganismos patogênicos nas formulações (*Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*)

O método de pesquisa e identificação de microrganismos patogênicos foi realizado conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 5ªed., (2010). Em primeiro lugar foi realizado o enriquecimento não seletivo nas amostras que obtiveram crescimento no meio Ágar Triptona de Soja – TSA. Todos os procedimentos foram feitos em duplicata.

A quantidade de 1 g de cada amostra das formulações de gel cremoso contendo *P. granatum* foi transferida, de forma asséptica, para tubo contendo 9 mL de caldo Lactose, para a pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* sp., com incubação em estufa bacteriológica, por 48 horas a $32,5 \pm 2,5$ °C.

O mesmo procedimento acima foi utilizado empregando-se como meio de enriquecimento não seletivo o caldo Triptona de soja, para a pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3.11.2.1 Identificação de *Staphylococcus aureus*

Após incubação de 48 horas das amostras no meio caldo Triptona de soja, as mesmas foram homogenizadas e alíquotas foram transferidas, com auxílio de alça bacteriológica (10 μ), para placa de Petri contendo 20 mL de meio de cultura seletivo Ágar sal Manitol (vermelho de fenol) para identificação de *Staphylococcus aureus*, empregando-se a técnica por esgotamento em superfície. A incubação foi por intervalo de tempo entre 24 – 48 horas a $32,5 \pm 2,5$ °C.

A interpretação do resultado – O crescimento de colônias amarelas, lista de consistências untuosas e circundadas por zona diferentes, de cor amarelada forte indica presença provável de *Staphylococcus aureus*.

3.11.2.2 Identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Para identificação de *Pseudomonas aeruginosa*, foi transferida uma alçada do meio enriquecido em Caldo Tiptona de soja, para placa de Petri contendo 20 mL de Ágar Cetrimide, empregando-se técnica de semeadura por esgotamento. A incubação ocorreu no intervalo de tempo entre 24 – 48 horas a $32,5 \pm 2,5$ °C.

A interpretação do resultado - O crescimento de colônias indica presença provável de *Pseudomonas aeruginosa* por apresentar colônias muito variadas de verde a verde azulada.

3.11.2.3 Identificação de *Escherichia coli*

O material enriquecido em Caldo Lactose foi transferido com auxílio da alça bacteriológica para placa de Petri contendo Ágar MacConkey, para identificação de *E. coli*. Após incubação por 24 - 48 horas $32,5 \pm 2,5$ C°.

A Interpretação do resultado – A placa de petri contendo ágar MacConkey, em presença de *Escherichia coli*, após incubação, observa-se o crescimento de colônias de coloração vermelho tijolo circundadas por halo de precipitação e geralmente não mucosas.

3.11.2.4 Identificação de *Salmonella* sp.

A partir do material enriquecido em Caldo Lactose, foi transferido com auxílio da alça bacteriológica para placa de Petri contendo o meio Ágar verde Brilhante, e foi

empregado a técnica de semeadura por esgotamento para identificação de *Salmonella* sp. As placas foram incubadas por 24–48 a $32,5 \pm 2,5$ C°.

A Interpretação dos resultados – A placa de Petri contendo ágar verde brilhante, em presença de *Salmonella* sp., após incubação, observa-se o crescimento de colônias pequenas, esbranquiçadas, ou rosa frequentemente circundada por zona verde brilhante.

3.12 TESTE DE TOXICIDADE CUTÂNEA AGUDA E AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL DOS MODELOS EXPERIMENTAIS

O ensaio foi realizado em 6 camundongos, seguindo metodologia preconizada pela Organization for Economic Cooperation and Development – OECD (OECD nº 402, 1987 e OECD nº 404, 2002), sendo 3 fêmeas e 3 machos, para o teste limite na dose de 2000 mg/kg de peso corporal, onde foi aplicada uma camada uniforme de gel creme a 10% de *P. granatum*, sobre uma área de aproximadamente 10% da superfície total do corpo e mantida por 24 horas, protegida por gazes porosas e uma fita não irritante pelo período de exposição. Esta proteção se fez necessário para manter o produto em contato com a pele do animal e garantir que eles não pudessem ingerir o gel creme, que após o período de exposição, foi removido com auxílio de gazes embebido com digluconato de clorexidina 2%.

Observações comportamentais sistemáticas foram realizadas a fim de avaliar o screening hipocrático objetivando a análise geral da toxicidade da *P. granatum* sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo (MALONE; ROBICHAUD, 1983). Os parâmetros (ingestão de alimentos, prostração, motilidade, letargia, sono, coma, esquivar-se a estímulos, guardar parte do corpo, automutilação, lambear patas, coçar focinho, morder cauda, tremor da cauda, respiração, frequência cardíaca, mudança nos olhos, eritema, edema, alteração das mucosas, sangramento, diarreia, salivação, alteração na aparência, vocalização, cianose, palidez, hiperemia, alteração no volume urinário e morte) foram avaliados, individualmente, nos tempos de 15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 6 horas e a partir de então diariamente, sempre no mesmo horário, até o décimo quarto dia.

O controle diário de consumo de água (mL) e de ração em forma de pellets (g) se deu para analisar se houve a redução de ingesta destes, desde 24º hora até o 14º dia após a administração da dose. A ração foi colocada diariamente, e no dia posterior foi contabilizado o peso consumido dela, bem como consumo de água, em que foram

colocadas mamadeiras com volume graduado em 250 mL, e no dia seguinte registrado o volume ingerido. Os animais foram pesados nos dias 0, 7, 14 para verificação de possíveis efeitos tardios de toxicidade e para analisar o ganho ou perda de peso corporal. Avaliou-se o estado de disposição geral e consciência, tônus muscular, reflexo, coordenação motora e a atividade do sistema nervoso autônomo. Estes parâmetros foram anotados e tabulados como ausente, raro, pouco, moderado e intenso (ARAUJO et al., 1994).

3.13 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS FITOTERÁPICAS DESENVOLVIDAS UTILIZANDO UM MODELO EXPERIMENTAL COM CAMUNDONGOS

3.13.1 Anestesia

Foram utilizados um total de 60 camundongos da linhagem Albino (Swiss) de ambos os sexos ($40\text{ g} \pm 5\text{ g}$), subdivididos em 6 grupos de 10 animais separados em gaiolas com 2 animais em cada e utilizando cama de papel toalha autoclavado, trocadas diariamente e prévia identificação de acordo com os tratamentos que foram aplicados. Efetivaram-se os cálculos para o processo de anestesia geral. Posteriormente preparou-se uma solução contendo Ketamina (50 mg/mL) e Xilazina (20 mg/mL), e realizou-se cálculos para as doses individuais dos animais, obedecendo à proporção de 0,2 mL da referida mistura para cada 100 g de peso animal. A administração da anestesia foi realizada por via intraperioteneal.

Após um período de latência, em torno de sete minutos, foi avaliada a prostração completa de cada animal, confirmada pela diurese espontânea comumente apresentada, respiração superficial e acelerada, e abolição total de reflexos palpebrais.

3.13.2 Tricotomia e produção da ferida cutânea

Os animais já anestesiados foram mantidos em decúbito ventral, e em seguida, realizado a tricotomia manual do dorso com a ajuda de um aparelho elétrico de depilação em uma área retangular de aproximadamente 3x5 cm. Para a antisepsia da região da tricotomia utilizou-se o digluconato de clorexidina a 2%, posteriormente, em um campo cirúrgico realizou-se duas excisões cutâneas circulares por “*punch*” metálico (Kolplast ci Ltda) de 6 mm de diâmetro. Com animal em decúbito lateral removeu-se o segmento

circular de pele, expondo as fáscias musculares. As feridas cutâneas foram produzidas através de excisão cirúrgica do fragmento de pele, por meio de uma tesoura de *Metzenbaum* e com o auxílio de uma pinça cirúrgica, padronizou-se desta forma a ferida, e tomando-se o cuidado devido para que todas as camadas fossem removidas, restando apenas a musculatura subjacente, garantindo a uniformidade entre grupos estudados. A ferida obtida foi mantida sem suturas (aberta) e sem curativos e mensuradas diariamente até o 7º ou 14º dia de tratamento, com o auxílio de um paquímetro digital (JOMARCA). Exceto as drogas em estudo, nenhuma terapia local ou sistêmica foi fornecida aos animais.

3.13.3 Delineamento do estudo da atividade cicatrizante

O extrato hidroetanólico das cascas de *P. granatum* e a formulação do gel cremoso contendo o referido extrato, em duas concentrações diferentes (0,5 ou 1,0 %), a pomada cicatrizante padrão (**Fibrinase®** - controle positivo) e o gel cremoso sem extrato de *P. granatum* (controle negativo) foram aplicados topicamente nos animais, de 12 em 12 horas (Tabela 5), durante 7 ou 14 dias, de acordo com o protocolo experimental (ANEXO D). O tratamento foi iniciado imediatamente após o ato operatório.

Tabela 5 – Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos nos ensaios de atividade cicatrizante.

Grupo	Tratamento
FIB	1 g
CNGC	1 g
SPg 0,5%	6 mg/kg
SPg 1,0%	12 mg/kg
GPg 0,5%	6 mg/kg
GPg 1,0%	12 mg/kg

Legenda: FIB – Controle positivo (Fibrinase®); CNGC – Controle negativo (Gel cremoso base); SPg 0,5% – Solução aquosa de *P. granatum* 0,5% (V=15 µL); SPg 1,0% – Solução aquosa de *P. granatum* 1% (V=15 µL); GPg 0,5% – Gel cremoso de *P. granatum* 0,5%; GPg 1,0% – Gel cremoso de *P. granatum* 1%. O tratamento foi realizado com aplicação tópica de 12 em 12 h, durante 7 ou 14 dias. N=5.

Figura 12 Formulações utilizadas nos experimentos de cicatrização cutânea – GPg 0,5% (1), GPg 1,0% (2), SPg 0,5% (3) e SPg 1,0% (4).



Fonte: Autora.

3.14 CICLO DE EUTANÁSIA

Após 7 e 14 dias a partir da produção da ferida cutânea, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados em câmara de dióxido de carbono do Laboratório de Fármacos da Universidade Federal do Amapá, onde receberam um fluxo de ar contendo 100% de CO₂, durante 10 minutos. Posteriormente, as carcaças dos animais foram descartadas com os resíduos biológicos da UNIFAP através da empresa de coleta especializada (TRATALIX) para posterior incineração.

3.15 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS DOS ESPÉCIMES

Os fragmentos de pele, dos animais de experimentação foram obtidos por biópsia e processados de acordo com o método histológico convencional descrito por Luna (1968).

As amostras foram desidratadas por imersão em séries crescentes de etanol de 50, 70, 90 e 100%, diafanizadas em xilol e depois incluídas em blocos de parafina, que foram cortados em um micrótomo rotativo utilizando navalhas descartáveis a uma espessura de 5µm. Em seguida os cortes em lâminas foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina e na montagem das lâminas com lamínulas empregou-se a resina acrílica Entellan®. Procedeu-se a leitura histológica das lâminas em microscópio óptico, nas objetivas de 10x e 40x.

O preparo e análises histopatológicas foram realizados conforme protocolo do Laboratório de Patologia Animal (LABOPAT), da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) – Belém-PA.

A análise microscópica foi realizada avaliando a reepitelização e determinando os seguintes parâmetros: formação de colágeno, formação de vasos sanguíneos, fibroblastos e epitelização. Cura completa foi avaliada determinando o grau de formação de cicatrizes, organização de colágeno e inervação nos dias 7 e 14 dias após a incisão cirúrgica (PEREIRA et al., 2012).

3.16 AVALIAÇÃO DAS FERIDAS

3.16.1 Avaliação macroscópica das feridas

As feridas cutâneas foram analisadas, macroscopicamente, quanto às características da lesão (infecção, hiperemia em torno da ferida, crostas, necrose em torno da ferida, fundo sangrante), que foram classificadas de acordo com as seguintes pontuações: 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderada) e 3 (intensa).

Diariamente, realizou-se a medição das feridas nos animais, utilizando-se um paquímetro digital. Com esses valores, calculou-se a área da ferida, conforme a equação formulada por Prata et al. (1988).

Também foi realizado um registro fotográfico utilizando-se uma câmera digital da Marca SONY Lens, acoplada a um tripé fixado perpendicularmente ao plano horizontal e mantida a uma altura fixa de 20 cm desse plano, com zoom de 1,3 de aproximação para comparação dos resultados de forma mais precisa. Estas imagens foram realizadas imediatamente após o processo cirúrgico e diariamente até o 7º ou 14º dia de tratamento.

$$A = \pi \cdot R \cdot r$$

Onde,

A - área (cm²);

R - raio maior

r – raio menor

π – 3,14

3.16.2 Determinação do índice de retração (IR) clínica das feridas

A avaliação da cicatrização foi realizada em todos os animais mediante a mensuração da área de retração do ferimento medindo-se o diâmetro horizontal e vertical e tomando a posição dorsal como referência, tendo assim a medida do maior e menor diâmetro para cálculo da área total da ferida inicial (imediatamente após a cirurgia - t_0) e nos períodos de 7 (t_7) e 14 (t_{14}) dias do processo de cicatrização. O valor obtido da área serviu de base para porcentagem de contração da ferida através da equação abaixo (TEO e NAYLOR, 1995):

$$Ai - Af / Ai \times 100$$

Onde,

Ai – Área inicial da ferida

Af - Área final da ferida

3.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos nos ensaios foi expressa como média $\pm$ desvio ou erro padrão da média, utilizando múltiplas comparações entre os grupos experimentais sendo submetidos ao teste de variância (ANOVA) seguido do teste de Turkey. Foi utilizado o nível de significância mínimo permitido de $p < 0,05$. Os programas estatísticos utilizados foram GraphPad InStat e Prism (versão 5.03).

4.1 ELUCIDAÇÃO DOS COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES NO EHE DE *P. granatum*

A elucidação dos compostos presentes no EHE das cascas do fruto de *P. granatum* foi realizada através da Cromatografia Líquida de Ultrapformance acoplado a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (LC-MS). Este método é utilizado para confirmar a presença de flavonoides e ácidos fenólicos que se fez através da comparação dos tempos de retenção dos ativos e espectro de massas com os padrões comerciais usando suas respectivas proporções m/z . O LC-MS é considerado um dos métodos mais eficaz no desenvolvimento de medicamentos usando plantas medicinais (ARUN et.al., 2012; VLASE et. al., 2013).

Com os resultados obtidos no experimento supracitado foi possível identificar 18 compostos (Tabela 6) presentes no EHE da casca da *P. granatum*, tendo como maior foco os fitocomplexos: ácido elágico, ácido gálico, punicalagina (Figura 13).

A casca do fruto possui atividade antioxidante, rica em flavonoides e taninos (MONEIM, 2012). Dentre os fitoconstituintes presentes na planta, destacam-se flavonóides (apigenina e narigenina), antocianinas, taninos (ácidos gálico e elágico), alcalóides, ácido ascórbico, ácidos graxos conjugados (ácido púnico) e o ácido ursólico (LANSKY; NEWMANN, 2007).

A punicalagina é um tanino hidrolisável (elagitanino), com atividades antioxidante, anti-fungico, antibacteriano e anti-inflamatória reconhecidas, se destacando como uma promissora molécula multifuncional (GONZÁLEZ-MOLINA et al., 2009). Na romã, ela se concentra em maior parte na casca e no mesocarpo do fruto (FISCHER et al., 2011). Neste estudo foi identificado no EHE isômeros de punicalagina que é corroborado pelos estudos de Gil et al. (2000), que dentre os diversos compostos fenólicos presentes na casca de romã, encontraram resultados semelhantes, identificando os isômeros da punicalagina.

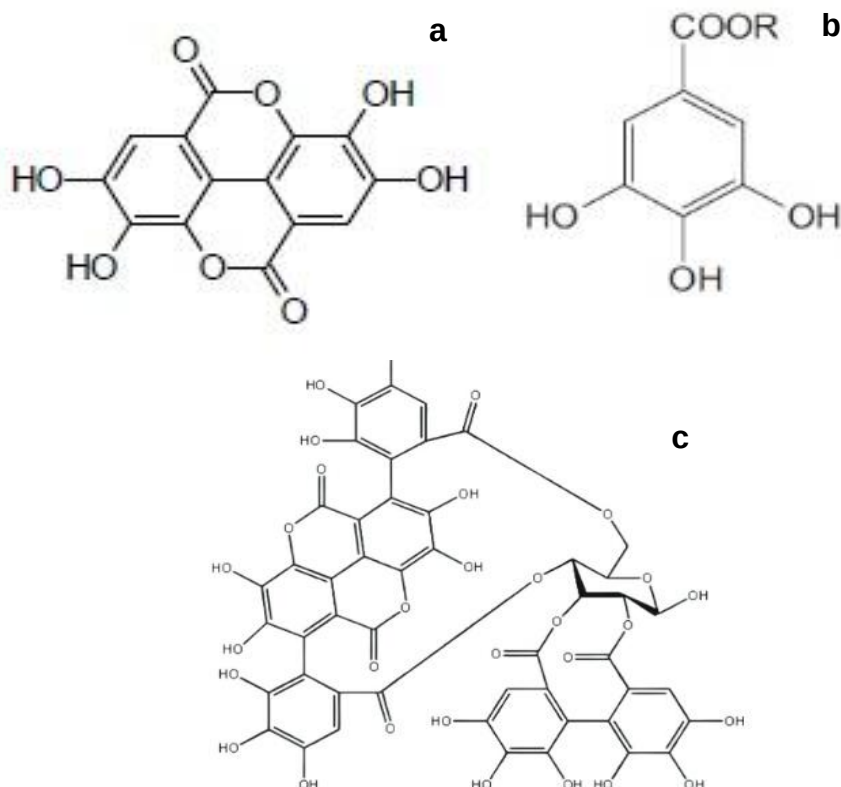
Tabela 6 - Valores de massa/carga (m/z) obtidos em ensaio de HPLC-HRMS (ESI) para a amostra de *Punica granatum* L.

Compostos	Fórmula molecular calculada	[M-H] ⁻ calculado	[M-H] ⁻ observado (t_r em minutos)	Erro (ppm)
Ácido elágico	C ₁₄ H ₆ O ₈	301,----	301,0341?	
Ácido málico	C ₄ H ₆ O ₅	133,00137	133,0136 (0,4)	
Ácido gálico	C ₇ H ₆ O ₅	169,0137	169,0128 (0,6)	
Aldeído sirínico	C ₉ H ₁₀ O ₄	181,0501	181,0516	
Ácido sirínico	C ₉ H ₁₀ O ₅	197,0450	197,0444 (2,2)	
Floretina	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	273,0763	273,0764	
Ácido punícico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	277,2168		
Catequina e epicatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	289,0712	289,0709	
Galocatequina	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0661	305,0677	
Dihidromiricetina	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	319,0454	319,0450	
Punicaflavonol	C ₁₆ H ₁₄ O ₁₀	365,0509	365,0502	1,9
Ácido elágico pentosídeo	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	433,0407	433,0399	1,8
Floretina hexosídeo	C ₂₈ H ₃₆ O ₄	435,2535	435,2495	9,2

Corilagina	$C_{27}H_{22}O_{18}$	633,0728	633,0703 (0,7; 0,9; 1,4 e 1,7)	3,9
Punicalinas isômeros	$C_{34}H_{22}O_{22}$	781,0524	781,0511 (0,6)	1,7
Pedunculaginas isômeros	$C_{34}H_{24}O_{22}$	783,0681	783,0674 (1,0; 1,2)	0,9
Punicalaginas isômeros	$C_{48}H_{28}O_{30}$	1083,0587	1083,0568 (1,0; 1,2)	1,8
Punicalagina-like	$C_{48}H_{30}O_{31}$	1101,0693	-	

Identificação confirmada usando padrões comerciais

Figura 13 Estrutura molecular dos compostos tânicos presentes na casca do fruto de *P. granatum* do ácido elágico – Ácido Hidroxibenzoico (a), ácido gálico - Ácido Hidroxibenzoico (b), punicalagina - Elagitaninos (c).



Fonte: Modificado de Amakura et al. (2000).

Segundo Cerda et al. (2003), a punicalagina é o composto responsável pela alta atividade antioxidante da *P. granatum*. Ao realizarem um estudo sobre a biodisponibilidade e metabolismo da punicalagina em ratos, estes autores observaram que apenas 3-6% da punicalagina ingerida foi detectada como metabolitos na urina e fezes, entretanto a maioria dos elagitaninos foram convertidos em metabólitos indetectáveis.

Os taninos são compostos hidrossolúveis de alto peso molecular. Apresentam-se divididos em duas classes: taninos hidrolisáveis que compreendem polímeros de ácido gálico (galotaninos) ou elágico (elagitaninos), encontrados em frutas como romã, morango, amora e nas nozes; e os taninos condensados (proantocianidinas), polímeros de catequina ou epicatequina, universais em Angiospermas (RIEDL; HAGERMAN, 2001; TOMÁS-BARBERÁN; CLIFFORD, 2000).

Li et al., 2011 e Kobayashi et al., 2015 atribuíram a atividade cicatrizante à presença de taninos em plantas medicinais, visto que a atividade bacteriana e a capacidade de ligação desses compostos com o tecido lesionado são fatores que contribuem na aceleração do processo de cicatrização.

Os ácidos hidroxibenzoicos são encontrados principalmente em frutas vermelhas, cebola e casca de batata (CLIFFORD; SCALBERT, 2000). O ácido elágico é comumente encontrado em morango, romã, castanhas, amora silvestre e framboesa, se destacando por apresentar atividade antioxidante e quimioprotetora (HERBER, 2008; ADAMS et. al., 2006; LOSSO et. al., 2004).

Kawaii e Lansky (2004) estudaram a atividade de extratos de *P. granatum* na promoção da diferenciação em células leucêmicas humanas HL-60 promielocíticas. Frações de polifenóis de *P. granatum* ricas em flavonóides exercem ação antiproliferativa, anti-invasiva, anti-eicosanoide e pró-apoptótica em células cancerígenas de mama e próstata e atividade anti-angiogênica *in vitro* e *in vivo*. Os extratos proporcionaram efeitos inibitórios sobre a proliferação de células HL-60.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EHE DE *Punica granatum* L.

4.2.1 Determinação da MIC e MBC

Neste estudo, verificou-se a atividade antimicrobiana *in vitro* da *Punica granatum* L. sobre as espécies *Staphylococcus aureus* e *P. aeruginosa*. Os resultados demonstraram que as duas linhagens foram sensíveis ao EHE da casca de *Punica granatum* L.

No teste de microdiluição em caldo foram encontrados resultados característicos de atividade antimicrobiana na diluição 1:64 (1,56 %) do EHE da casca de *Punica granatum* L. sendo a MIC, portanto de 0,59 mg/mL para *Staphylococcus aureus*.

Nos ensaios utilizando-se o micro-organismo *P. aeruginosa*, a *Punica granatum* L. apresentou atividade nas duas primeiras diluições (50% e 25%), apresentando uma MIC de 25% (9,44 mg/mL) (Tabela 7).

Tabela 7 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em UFC x 10⁵ do EHE de *P. granatum* sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Concentração do EHE (mg/ml)

Linhagens	EL	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
								8	6
<i>S. aureus</i>	37,8	18,9	9,44	4,72	2,36	1,18	0,59	0,30	0,15
							*		
<i>P. aeruginosa</i>	37,8	18,9	9,44	4,72	2,36	1,18	0,59	0,30	0,15
			*						

Legenda: * = CIM. Este experimento foi realizado em triplicata. EL = extrato liofilizado.

Em estudo realizado por Catão et al., (2006), observou-se que a MIC do extrato etanólico de *P. granatum* foi de 10 %, contra cepas de *S. aureus* de origem ambulatorial. Essa diferença pode ocorrer devido às técnicas de extração não terem a mesma eficácia ou também porque as cepas de origem ambulatorial tem maior possibilidade de sofrer mutação e adquirir resistência em comparação às cepas padrão ATCC, o que pode ocorrer também com os outros extratos.

Não existe um consenso sobre a concentração aceitável para produtos naturais comparados com antibióticos conhecidos. De acordo com Aligianis et al. (2001) uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados do MIC, pode ser considerado como forte inibição com valores até 0,50 mg/mL; inibição moderada ente 0,60 e 1,50 mg/mL e com fraca inibição MIC acima de 1,60 mg/mL.

Naqvi, Khan e Vohora (1991), citados por Pereira et al. (2006), avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato de *P. granatum* sobre microrganismos Gram positivos e leveduras, confirmando a presença de princípios ativos antimicrobianos na casca do fruto.

O MBC obtido do EHE da casca de *P. granatum* (Tabela 8) mostrou também atividade bactericida entre as concentrações crescentes 1,18 (1:32) e 18,9 (1:2) sobre os microorganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa* respectivamente.

Tabela 8 - Determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC) em UFC x 10⁵ do extrato hidroetanólico de *P. granatum* sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Concentração do EHE (mg/ml)		
Linhagens	MBC (diluição do extrato)	MBC
<i>S. aureus</i>	0,59	1,18*
<i>P. aeruginosa</i>	9,45	18,9*

Legenda: * = MBC. Este experimento foi realizado em triplicata.

A romã é basicamente composta quimicamente por taninos (substâncias polifenólicas) e alcalóides que são substâncias dotadas de ação antimicrobiana. Segundo

Haslam (1996) os compostos fenólicos agem inespecificamente sobre os microrganismos, rompendo a parede celular bacteriana, inibindo os sistemas enzimáticos e diminuindo os lipossacarídeos e as proteínas do biofilme dental.

Segundo Simões (2002), a atividade antimicrobiana dessa planta medicinal está associada à ação dos taninos. Entre as hipóteses sobre os mecanismos da ação antimicrobiana destes fitoconstituintes, destaca-se a inibição de enzimas, a modificação do metabolismo celular pela atuação sobre as membranas e a complexação com íons metálicos com consequente diminuição da sua disponibilidade para o metabolismo dos microrganismos.

De acordo com Anesini e Perez (1993), foram avaliados 132 extratos de plantas usadas na medicina popular na Argentina em atividades antimicrobianas e observaram que o pericarpo do fruto de *P. granatum* produziu extratos ativos que inibiram o crescimento de *S. aureus* (amostras resistentes à penicilina G), *E. coli* e *Aspergillus niger*.

Estudos realizados por Nimri et al. (1999) demonstraram que a ação do extratos etanólicos da casca da *P. granatum*, foram considerados de amplo espectro de atividade antibacteriana, inibindo todas as espécies bacterianas testadas, tanto Gram + (*B. cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*) quanto Gram - (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. dysenteriae*, *Y. enterocolitica*).

4.3 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DAS FORMULAÇÕES DESENVOLVIDAS

As análises das características organolépticas, incluindo coloração, odor, aspecto visual (homogeneidade e consistência) foram realizados através da inspeção visual e percepção direta da amostra, verificando-se a ocorrência de modificações em relação ao padrão estabelecido.

Após a preparação do gel cremoso, a formulação apresentou aspecto brilhoso na cor branco gelo e quando adicionado o extrato tomou-se coloração levemente amarelada, esta mudança se deve a coloração castanho-amarelada do Extrato aquoso da romã (figura 14). Sua consistência ficou adequada para uma formulação de gel creme, apresentando característica não oleosa para todas as formulações e praticamente inodoras para CNGC e para as formulações com *P. granatum* um odor levemente cítrico, característico deste extrato.

Figura 14 Gel cremoso contendo extrato de *P. granatum* (GPg 0,5%) (1), Gel cremoso contendo extrato *P. granatum* (GPg 1,0%) (2).



Fonte: Autora.

4.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE ACELERADA

As formulações foram analisadas de acordo com Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), correlacionando a forma galênica em análise com as condições a que as formulações foram expostas durante estudo.

Antes de iniciar o estudo propriamente dito, as formulações foram submetidas ao teste preliminar de centrifugação, estresse térmico (banho-maria e ciclo gelo-degelo) e análise das características organolépticas possibilitando observar que não houve separação de fases, cremeação, floculação ou qualquer outro tipo de instabilidade, estando aptas para iniciar o teste de estabilidade acelerada. Os resultados correspondentes ao pH, não apresentaram alterações significativas, mantendo-se constante entre 4,3~4,5. As características organolépticas observadas não apresentaram qualquer instabilidade, mantendo-se estável até última análise; correspondente ao tempo final da estabilidade preliminar.

Ainda em relação às características organolépticas na estabilidade preliminar as formulações apresentaram-se aparentemente homogêneas, com coloração branco gelo, brilhosa e odor forte com característica cítrica com aspecto normal em todo o período de estudo correspondente a estabilidade preliminar (banho-maria e ciclo gelo-degelo). Os resultados obtidos foram satisfatórios, estando adequada ao que é preconizado no Guia de Estabilidade da ANVISA (2004).

Posteriormente à realização da estabilidade preliminar, realizou-se os ensaios de estabilidade acelerada, que corresponde ao período de até 90 dias. Neste protocolo, foram analisados os mesmos itens da estabilidade preliminar, utilizando-se temperaturas padronizadas em certo período de tempo de acordo com o Guia da ANVISA.

Os quadros 2, 3 e 4 mostram as amostras CNGC, GPg 0,5% e GPg 1,0% respectivamente, em relação as características físicas e físico-químicas (aspecto e cor) e valores de pH inicialmente e após exposição às condições de teste em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$); geladeira ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e estufa ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Quadro 2 - Avaliação física e físico-química da formulação CNGC durante o teste de estabilidade acelerada.

Condições de Armazenamento													
		GEL				T.A				E			
t. arm/dias variáveis	t ₀	t ₂₄	30	60	90	t ₂₄	30	60	90	t ₂₄	30	60	90
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	BG	BG	BG	BG	BG	BG	BG	BG	BG	BG	BG	BG	BG
pH	6,9	6,7	6,6	7,2	6,8	7,0	7,2	7,1	7,5	7,3	6,6	6,7	6,7

Legenda: t. arm/dias: tempo de armazenamento em dias; t₀: após o preparo da formulação; t₂₄: 24 horas após o preparo da formulação; **GEL**: geladeira ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$); **T.A**: temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$); **E**: estufa ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). **Aspecto**: **N** – normal, sem alteração; **LM** – levemente modificado; **IM** – intensamente modificado. **Cor**: **N** – normal, sem alteração; **LM** – levemente modificado; **BG** – branco gelo; **A** – amarelo; **IA** – intensamente amarelado.

Quadro 3 - Avaliação física e físico-química da formulação GPg 0,5% durante o teste de estabilidade acelerado.

Condições de Armazenamento													
		GEL				T.A				E			
t. arm/dias variáveis	t ₀	t ₂₄	30	60	90	t ₂₄	30	60	90	t ₂₄	30	60	90
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Cor	BG	BG	BG	BG	BG	BG	BG	BG	LA	BG	BG	LA	LA
pH	4,5	4,3	4,4	4,3	4,2	4,3	4,2	4,3	4,3	4,5	4,5	4,4	4,5

Legenda: t. arm/dias: tempo de armazenamento em dias; t₀: após o preparo da formulação; t₂₄: 24 horas após o preparo da formulação; **GEL**: geladeira ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$); **T.A**: temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$); **E**: estufa ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). **Aspecto**: **N** – normal, sem alteração; **LM** – levemente modificado; **IM** – intensamente modificado. **Cor**: **N** – normal, sem alteração; **LM** – levemente modificado; **BG** – branco gelo; **LA** – levemente amarelo; **IA** – intensamente amarelado.

Quadro 4 - Avaliação física e físico-química da formulação GPg 1,0% durante o teste de estabilidade acelerado.

Condições de Armazenamento

		GEL				T.A				E			
t. arm/dias variáveis	t ₀	t ₂₄	30	60	90	t ₂₄	30	60	90	t ₂₄	30	60	90
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	IM	-
Cor	LA	LA	LA	LA	LA	LA	LA	LA	LA	LA	LA	IA	-
pH	4,5	4,5	4,4	4,5	4,3	4,5	4,2	4,2	4,5	4,5	4,3	4,2	-

Legenda: **t. arm/dias:** tempo de armazenamento em dias; **t₀:** após o preparo da formulação; **t₂₄:** 24 horas após o preparo da formulação; **GEL:** geladeira (5 °C ± 2 °C); **T.A:** temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C); **E:** estufa (40 °C ± 2 °C). **Aspecto:** **N** – normal, sem alteração; **LM** – levemente modificado; **IM** – intensamente modificado. **Cor:** **N** – normal, sem alteração; **LM** – levemente modificado; **BG** – branco gelo; **LA** – levemente amarelo; **IA** – intensamente amarelado.
(-): excluído do estudo por apresentar instabilidade.

De acordo com o guia de estabilidade de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2004), são aceitáveis leves alterações organolépticas em temperaturas elevadas em formulações fitoterápicas. Para a avaliação da aparência o produto deve manter-se íntegro durante todo o teste de estabilidade mantendo seu aspecto inicial em todas as condições de estresse que são submetidos, porém em temperaturas elevadas, freezer ou ciclos de alternâncias de temperatura são aceitáveis estas alterações.

A determinação e o controle do pH das formulações desenvolvidas são de extrema utilidade para que se evite a utilização de produtos tópicos inadequados, evitando reações indesejáveis da pele ao produto, como irritação, vermelhidão, prurido e outros (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002). O pH do gel creme apresentou-se dentro do escopo estipulado do produto mantendo-se nas faixas 6,7~7,5. Nas amostras contendo as duas concentrações do extrato aquoso pode-se notar que o pH diminuiu, mantendo-se em torno de 4,2~4,5 até o final do experimento, ficando dentro do pH fisiológico da pele que é levemente ácido (4,6~5,8) e que contribui para proteção de bactérias e fungos em sua superfície.

Pode-se levar em consideração os constituintes químicos como taninos condensados e flavonoides como principais responsáveis pelo pH ácido, além do tempo em condições de armazenamento indicadas, demonstrando que esta variação de pH pode indicar reações de degradação ou processos oxidativos, ocasionando um aumento ou diminuição desta variável (ANVISA, 2004). Todas as formulações apresentaram variação de pH aceitável.

Os aspectos organolépticos determinam os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor. A análise destas características tem como propósito verificar a

ocorrência de quaisquer alterações que comprometam a homogeneidade do sistema e alterem o padrão desejado da formulação, tanto no tocante aos seus aspectos de estética quanto às suas propriedades levando este produto a reprovação.

As características organolépticas mantiveram-se inalteradas quanto à cor e aspecto no CNGC, mantendo-se estável até a última análise, correspondendo ao tempo final da estabilidade acelerada. A formulação GPg 0,5% apresentou uma alteração na cor que passou de branco gelo para levemente amarelada a partir do 60º dia no armazenamento da estufa e 90º dia no armazenamento em temperatura ambiente, o que pode ter ocorrido por processos oxidativos durante este período.

Na formulação GPg 1,0% houve uma mudança de coloração no 60º dia do armazenamento em estufa chegando a um intenso amarelado. Este fato se deve, provavelmente, a uma maior propensão aos processos oxidativos, agregando cor ao produto final, por tanto na variável cor, esta formulação foi considerada reprovada. Isso pode ser justificado pelas reações de decomposição que ocorrem quando formulações são expostas a altas temperaturas, formando também a base de *Schiff* citada em literatura (SCHUELLER & ROMANOWSKI, 2005).

Não foi verificada turbidez em nenhuma das amostras dos géis cremes, o que demonstra a boa homogeneização e aparência do produto e mostra a importância da incorporação dos extratos de *Punica granatum* Linn de forma efetiva e adequada.

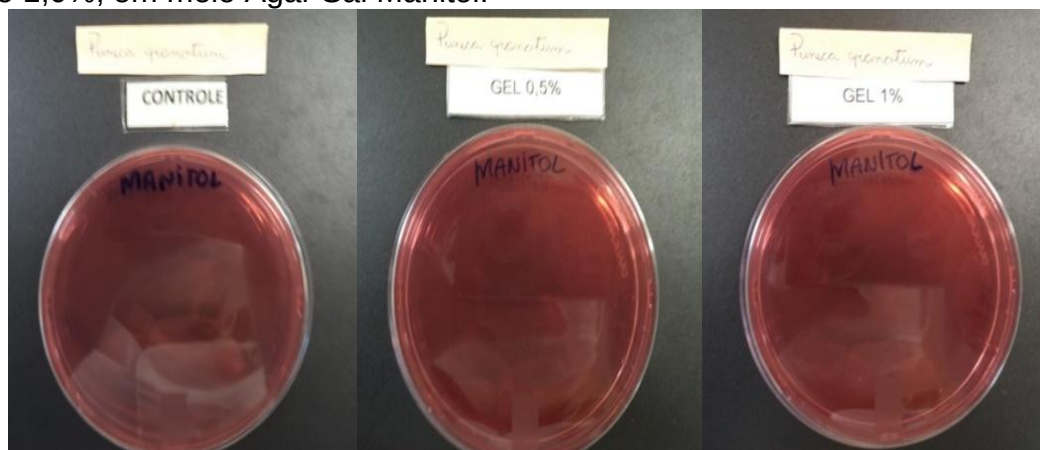
4.5 CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO DAS FORMULAÇÕES SEMI-SÓLIDAS

A análise microbiológica das formulações mostrou ausência de crescimento bacteriano, estando de acordo com os parâmetros preconizados na Farmacopeia Brasileira 5º ed. (BRASIL,2010).

Não foi observado o crescimento de colônias amarelas, lista de consistência untuosa e circundada por zonas diferentes, de cor amarelada forte, indicando a ausência de *S. aureus* (Figura 15) e não ocorreu o crescimento de colônias variadas de verde a verde azulada, evidenciando a ausência de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 16).

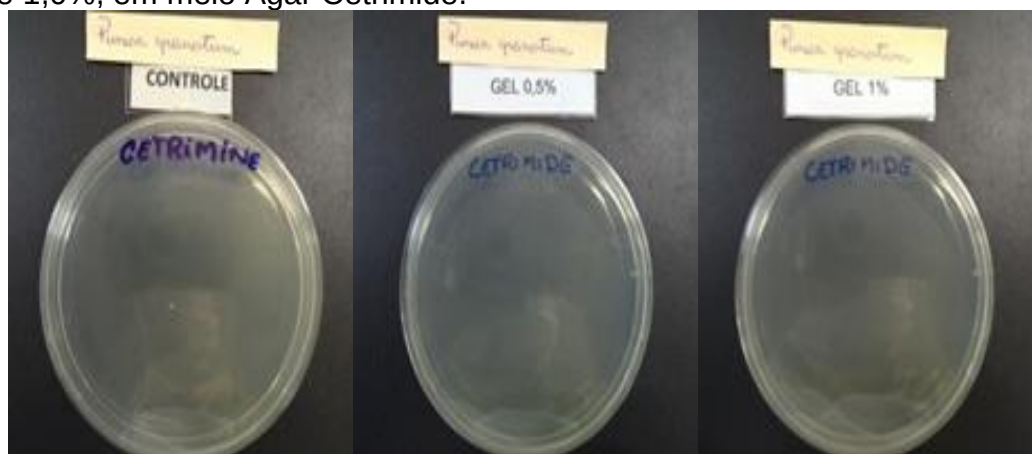
De acordo com DINIZ et. al., 1997, NASCIMENTO et. al., 2000; HOLETZ et. al., 2002; VASCONCELOS et. al., 2003, este fato deve-se a presença de taninos granatinas A e B, punicalagina e punicalina, sendo estes os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana.

Figura 15 Identificação de *Staphylococcus aureus* proveniente das amostras do GPg 0,5% e 1,0%, em meio Ágar Sal Manitol.



Fonte: Autora.

Figura 16 Identificação de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente das amostras do GPg 0,5% e 1,0%, em meio Ágar Cetrímide.



Fonte: Autora.

Este resultado é corroborado com os estudos de Nascimento et al., (2000), que avaliou a atividade microbiana de extratos vegetais e fitofármacos frente à micro-organismos sensíveis e resistentes a antibióticos, bem como o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos e extratos vegetais. O mesmo relatou que o extrato de *Punica granatum* apresentou atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Segundo Menezes et al., (2008), a romã se mostra efetiva na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas, especificamente de *S.aureus*, agente etiológico de diversas doenças que vem apresentando um aumento significativo de resistência aos antibióticos convencionais. No presente estudo, as formulações GPg 0,5% e 1,0% foram efetivas na inibição do crescimento de *S.aureus*.

Machado et al. (2003), relatou que a punicalagina, um tanino elágico, derivado do fruto da romãzeira, é provavelmente um dos principais constituintes antimicrobianos desta fruta.

Em 2005 foi publicado um estudo sobre a atividade antimicrobiana da *Punica granatum* L. que demonstrou a inibição do crescimento de cepas de *E.coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27583.

Estudo realizado por Navarro et. al, (1996) mostrou que a *Punica granatum* possui um efeito antimicrobiano contra todas as linhagens microbianas testadas, como *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* em concentrações iguais ou inferiores 10mg/mL. Os resultados de Navarro et al. (1996) corroboram com o presente estudo, tendo em vista que não houve o crescimento de *E. coli* (Figura 17).

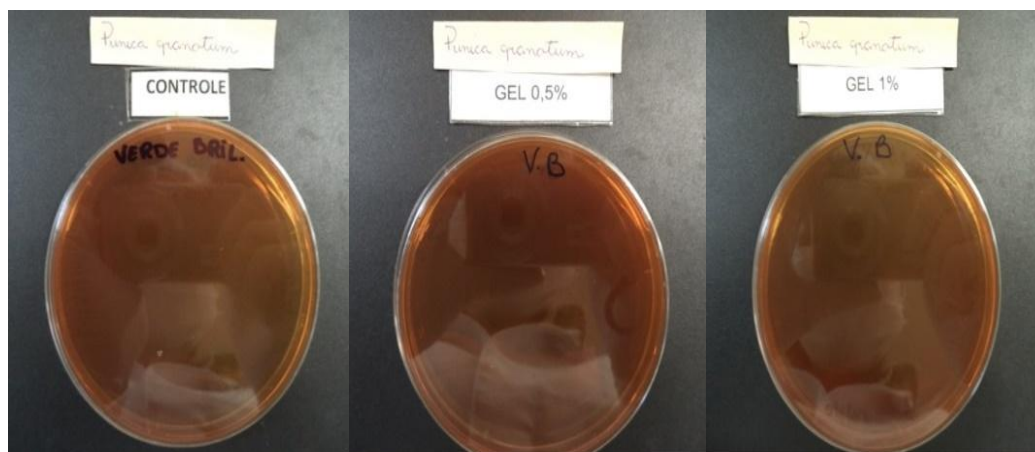
Figura 17 Identificação de *Escherichia coli* proveniente das amostras do GPg 0,5% e 1,0%, em meio Ágar MacConkey.



Fonte: Autora.

Em relação à presença de *Salmonella sp*, as amostras analisadas não demonstraram crescimento no meio Ágar verde brilhante com colônias opacas ou esbranquiçadas conforme figura 18.

Figura 18 Identificação de *Salmonella sp* proveniente das amostras do GPg 0,5% e 1,0%, em meio Ágar verde Brilhante.



Fonte: Autora

Vários estudos evidenciam altos índices de contaminação microbiana em matérias-primas vegetais, com presença de microrganismos patogênicos (VERDI et al., 2013). O controle de qualidade microbiológico de matéria-prima e formulações farmacêuticas se faz necessário para certificar que a carga microbiana presente nestas não prejudique a qualidade final do produto ou a segurança do paciente. Além disso, as contaminações por fungos e bactérias podem comprometer a eficácia das substâncias ativas do material vegetal levando a degradação ou alteração de suas ações, ou ainda proporcionar a produção de toxinas (VERDI et al., 2013) representando risco ao paciente que pode adquirir um quadro clínico infeccioso.

A contaminação de formulações fitoterápicas pode ocorrer durante o processo de manipulação do medicamento, por isso é necessário seguir a Resolução nº 17, de 16 de abril de 2010 que aborda as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos para que o risco de contaminação fique dentro do limiar permitido por esta legislação.

No presente estudo foram seguidos os parâmetros preconizados na Farmacopeia Brasileira 5ª edição, em que para formulações em géis os limites são (BRASIL, 2010):

1. Bactéria aeróbia (contagem em placas): $< 2.10^2$ UFC/mL.
2. Bolores e leveduras (contagem em placas): $< 2.10^1$ UFC/mL.
3. *Pseudomonas aeruginosa*: ausência em 1 mL.
4. *Staphylococcus aureus*: ausência em 1 mL.

O estudo de contaminação por fungos nas formulações farmacêuticas de uso tópico também faz-se necessário, pois independente do nível de contaminação, estes micro-organismos produzem toxinas que podem ser prejudiciais à saúde. Estas toxinas podem ser termo-resistentes (MATOS, 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008) e

permanecerem ativas em todo o processo do estudo de pré-estabilidade e estabilidade acelerada, onde as formulações são expostas a altas temperaturas.

Em relação à contagem de bolor e leveduras das amostras deste estudo, estas não apresentaram contaminação. Isso pode ter ocorrido devido alguns microrganismos serem sensíveis à temperatura de 44-46°C (teste de pré-estabilidade – banho-maria) podendo ter seu crescimento reduzido e ficarem impossibilitados de formar colônias (DOMINGUES et al. 2007).

Para a pesquisa de bactérias patogênicas os ensaios foram qualitativos, indicando apenas a presença desses microrganismos. De acordo com as exigências estabelecidas pela Farmacopeia Brasileira 5ed. (BRASIL, 2010), quanto aos produtos não estéreis contendo matérias prima de origem vegetal, para produtos de uso tópico devem estar ausentes de *P.aeruginosa* e *S. aureus*.

4.6 TESTE DE TOXICIDADE CUTÂNEA AGUDA E AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL

Para a avaliação da toxicidade aguda cutânea, foi aplicado topicamente, na região dorsal de camundongos machos e fêmeas, 2000 mg/kg de EHE de *Punica granatum* a 10%. Durante o período de 24 horas, não foi observada nenhuma alteração das variáveis analisadas neste estudo (ingestão de alimentos, prostração, motilidade, letargia, sono, coma, esquivar-se a estímulos, guardar parte do corpo, auto-mutilação, lamber patas, coçar focinho morder cauda, tremor da cauda, respiração, frequência cardíaca, mudança nos olhos, eritema, edema, alteração das mucosas, sangramento, diarreia, salivação, alteração na aparência, vocalização, cianose, palidez, hiperemia, alteração no volume urinário e morte).

Não houve também nenhuma alteração morfológica na pele dos animais e não ocorreu mudança na evolução ponderal de ambos os sexos tratados topicamente com gel cremoso contendo EHE das cascas dos frutos de *Punica granatum* a 10%, conforme resultados descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros avaliados no estudo de toxicidade cutânea aguda em camundongos tratados com Gel cremoso contendo EHE das cascas dos frutos de *Punica granatum* L. a 10%.

Parâmetros	Fêmeas		Machos	
	Vi	Vf	Vi	Vf
Consumo ração (g)	5.33±1.52	4.0±1.08	4.30±2.51	5.32±1.15
Consumo água (mL)	9.33±4.16	10.66±4.16	6.0±3.80	10.66±1.18
Peso corporal (g)	43.33±1.52	42.66±2.08	45.66±3.51	47.0±6.55

Legenda: Vi= Valor inicial, Vf= valor Final. Valores representam a média ± DP (n=3/grupo).

Os resultados de toxicidade aguda cutânea demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os animais machos e fêmeas, em relação aos parâmetros analisados, pois o valor de p foi superior ao estipulado neste estudo ($p < 0.05$).

Efeitos adversos, incluindo dermatite temporária até choque anafilático, podem estar relacionados com o uso de plantas medicinais. Portanto, a padronização, a fim de garantir a autenticidade da droga e a qualidade do fitoterápico, é fundamental (VEIGA, 2005).

Testes preliminares de toxicidade realizado em roedores têm demonstrado que a romã apresenta baixa toxicidade em altas doses (VIDAL, 2003).

4.7 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DAS FERIDAS

A avaliação macroscópica de cada lesão durou até o 7º ou 14º dia do pós-operatório (Figura 19), sendo realizada duas vezes ao dia no momento de aplicação do tratamento de cada grupo.

O *punch* metálico cortante permitiu que se realizasse a excisão da peça em toda sua espessura em todos os animais sem ocorrência de sangramento expressivo, com a presença de hiperemia e edema em todos os grupos no 1º dia do pós-operatório. Após o procedimento cirúrgico os camundongos apresentaram comportamento característico de dor como: postura encurvada, piloereção, relutância em interagir, diminuição da excreção de urina e fezes. Os animais de todos os grupos apresentaram as feridas limpas e não ocorreu nenhum óbito, estando todos em bom estado de saúde.

A região da lesão mostrou reepitelização exibindo um epitélio bem diferenciado, apresentando papilas, queratinizado com número de camadas normais e pequena área de fibrose.

Após o 3º-4º dia houve a diminuição da hiperemia e não se observou mais o exsudato, ocorrendo aparecimento de crostas de aspecto granulação no espaço tecidual. No 5º dia foi possível verificar que a resposta aguda das inflamações começaram a ceder, com redução do edema e do rubor dos tecidos lesionados.

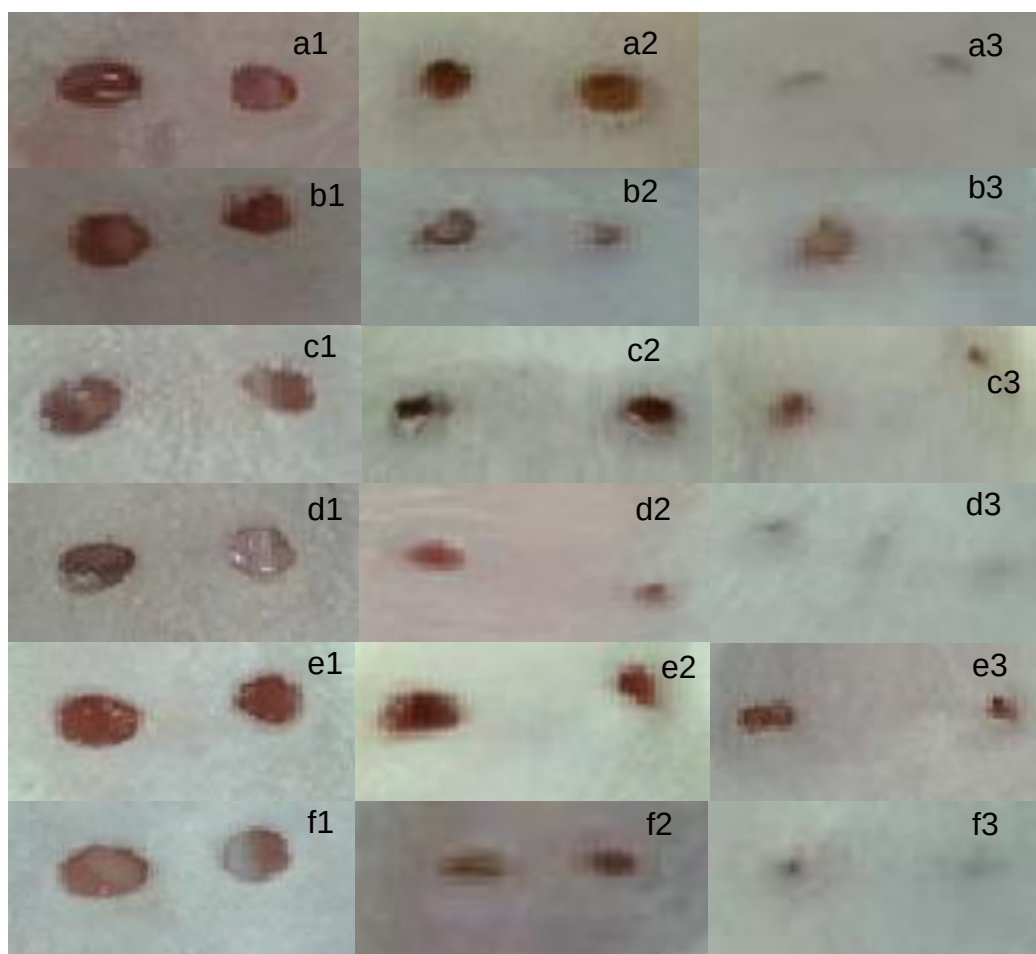
Apenas um animal do grupo SPg 0,5% do tratamento de 7 dias apresentou crostas de grau 3 nas feridas, os outros animais deste grupo apresentaram cicatrização com bom aspecto e sem secreção e/ou aparecimento de crostas.

Nos animais do dia 14, apenas um do grupo SPg 1,0 % apresentou no 13º dia a persistência de ferida com crosta nº 3, com elevação da mesma e coloração azulada ao redor, os demais camundongos tiveram uma excelente cicatrização. Nos animais do GPg 1% houve cicatrização completa no 14º dia e no grupo GPg 0,5% apenas um animal não exibiu cicatrização completa no 14º dia, evidenciando uma crosta sem cicatrização total.

A proliferação é a fase em que ocorre o fechamento da ferida. Nesta etapa se inicia a reepitalização, que consiste na migração de queratinócitos não danificados das bordas dos anexos epiteliais pela extensão da ferida; ocorre também a formação de tecido de granulação, processo chamado de fibroplasia e a etapa chamada de angiogênese que é o transporte de suprimento de oxigênio e nutrientes para região afetada (MANDELBAUM, 2003).

Diferentes extratos de *Punica granatum* veiculados em outras formulações são capazes de melhorar a cicatrização de feridas (HAYOUNI et al., 2011). Este fato pode ser corroborado pela presença do ácido gálico e elágico presente nesta planta. Estakhr e Javdan (2011) afirmam que plantas ricas em compostos antioxidantes têm sido indicadas para melhorar a contração de feridas.

Figura 19 Aspectos macroscópicos das feridas nos dias 0 (1), 7 (2) e 14 (3).



Legenda: tratamentos FIB (a), CNGC (b), SPg 0,5% (c), SPg 1,0% (d), GPg 0,5% (e) e GPg 1,0% (f) nos dias 0, 7 e 14 respectivamente.

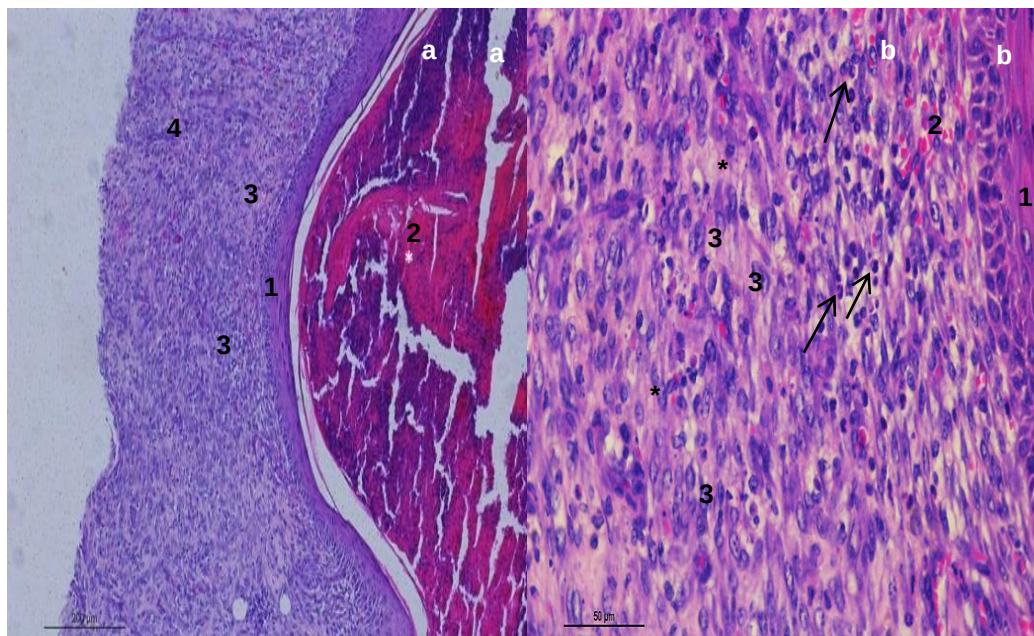
4.8 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS FERIDAS

Na análise histológica das lesões das feridas coletadas após o 7º dia de tratamento do grupo SPg 0,5% (Figura 20 a/b) observou-se crosta superficial de debris e queratina, sobre um epitélio estratificado integro (epitelização excelente e em modelação). Houve a formação de vasos (angiogênese), sobretudo, no derma papilar (padrão de tecido de granulação). O conjuntivo dérmico mostrou fibroblastos volumosos e ativos onde já se evidencia filamentos de colágeno pouco desenvolvido. Neutrófilos aleatórios presentes principalmente no derma papilar e reticular superficial. Nesse sentido pode-se considerar um processo inflamatório de grau leve (+). Portanto a cicatrização está dentro de parâmetros adequados, sem evidências de infecção.

Pelo processo de 2ª intenção a cicatrização acontece de baixo para cima e, portanto, o padrão cicatricial está de acordo com o esperado e desejado. Neste primeiro

período da cicatrização que corresponde ao estágio inflamatório, apresentou-se estável em um processo em segunda intenção de forma eficaz.

Figura 20 Fotomicrografia de um animal tratado com EHE das cascas dos frutos de *P. granatum* L. a 0,5% (0-7 dias).

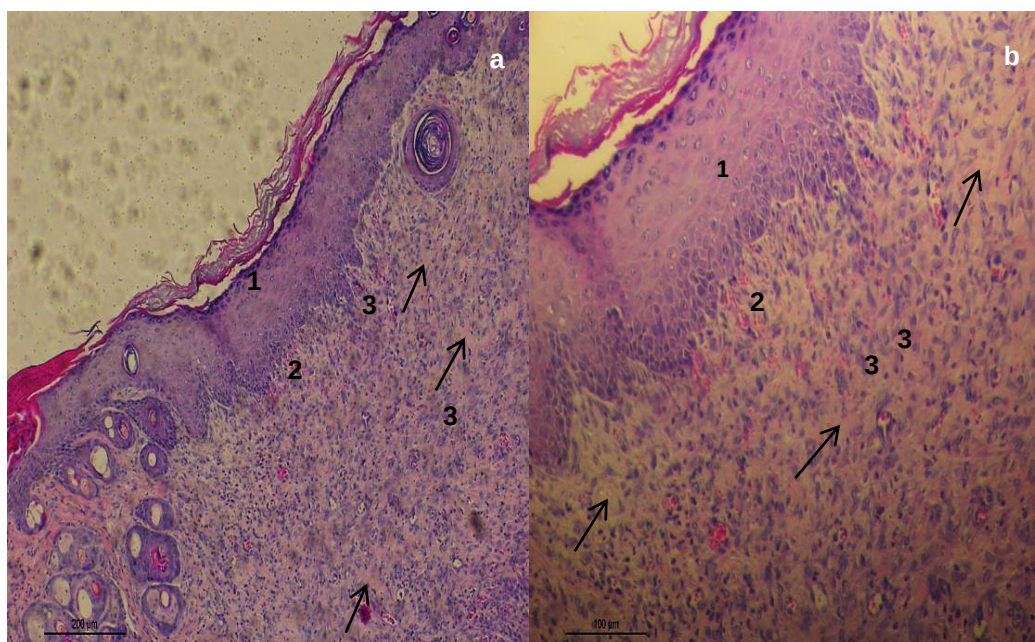


Legenda: a) Fotomicrografia descreve epitelização (epitélio estratificado) (1), com crosta superficial de debris e queratina (2). No derma região cicatricial formação mais recente e mais vascularizada (angiogênese), sobretudo, no derma papilar (padrão de tecido de granulação) (3). O conjuntivo dérmico mostra fibroblastos volumosos e ativos onde já se evidencia filamentos de colágeno pouco desenvolvido (modelação inicial-intermediária). Neutrófilos aleatórios presentes principalmente no derma papilar e reticular superficial (4) (processo inflamatório de grau leve). HE. Barra= 200µm.

b) Epitélio estratificado (1). No derma região cicatricial formação mais recente mais vascularizada (angiogênese), sobretudo, no derma papilar (padrão de tecido de granulação) (2). O conjuntivo dérmico mostra fibroblastos volumosos e ativos (3) onde já se evidencia filamentos de colágeno pouco desenvolvido e mais frouxo (*). Neutrófilos aleatórios presentes principalmente no derma papilar e reticular superficial (setas) (processo inflamatório de grau leve). HE. Barra= 50µm.

Nos animais do grupo SPg 0,5% observados no período de 14 dias (Figura 21 a/b) evidenciou-se área de cicatrização com epitelização completa e discreta angiogênese. Os fibroblastos mostraram-se volumosos com colágeno mais desenvolvido, observando-se um processo inflamatório de grau leve (+). Portanto, a cicatrização neste grupo apresentou-se completa ainda em remodelação e sem infecção.

Figura 21 Fotomicrografia de um animal tratado com EHE das cascas dos frutos de *P. granatum* L. a 0,5% (8-14 dias).

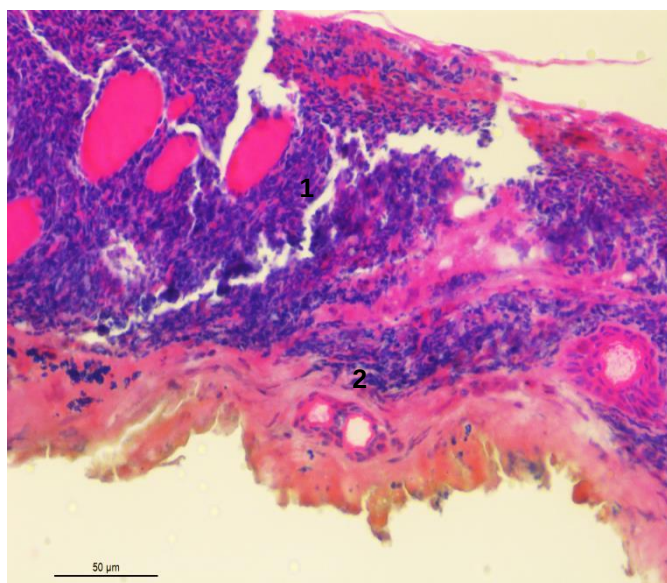


Legenda: a) Fotomicrografia descreve área de cicatrização com epitelização completa (1) e discreta angiogenese (2), os fibroblastos mostram-se volumosos (3) e a presença de um colágeno mais desenvolvido (setas). Observou processo inflamatório de grau leve (+). HE. Barra= 200µm.

b) Área de cicatrização com epitelização completa (1) e discreta angiogenese (2), os fibroblastos mostram-se volumosos (3) e um colágeno mais desenvolvido e denso (setas). Observou processo inflamatório de grau leve (+). HE. Barra= 100µm.

No grupo SPg 1,0% do 7º dia observou-se expressiva crosta superficial, com debris, piócitos, incluindo colônias de bactérias. Houve epitelização completa e na área dérmica pôde-se observar a formação de tecido cicatricial em modelação e inflamação de grau leve (+) (Figura 22).

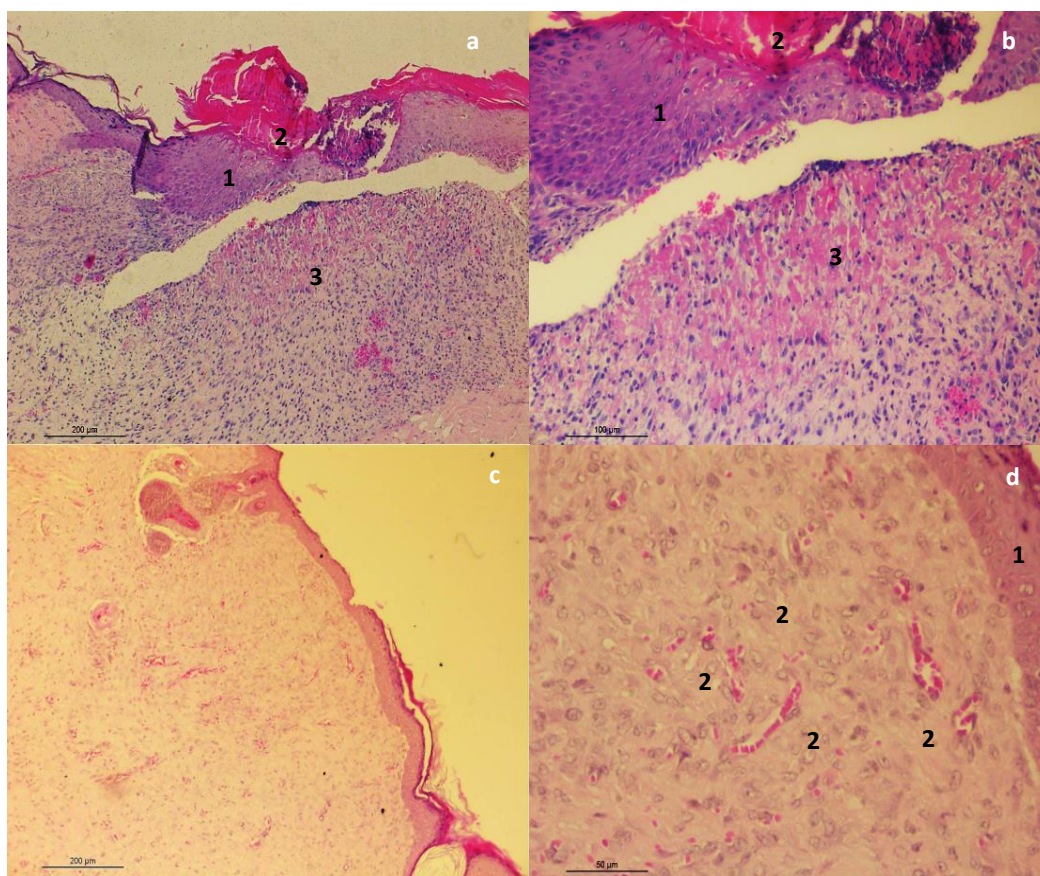
Figura 22 Fotomicrografia de um animal tratado com EHE das cascas dos frutos de *P. granatum* L. a 1,0% (0-7 dias).



Legenda: Fotomicrografia mostra expressiva crosta superficial, com debris, piócitos (1). Área sem epitelização (2) e na área dérmica pode-se observar a formação de tecido cicatricial em modelação e inflamação de grau leve (+). HE. Barra= 50μm.

Nos animais tratados com SPg 1,0% por 14 dias, observou-se cicatrização adequada com epitelização, já na fase de modelação do conjuntivo (alguns fibroblastos ainda ativos e o colágeno menos denso e sem inflamação) e presença de seroma (Figura 23 a, b, c, d).

Figura 23 Fotomicrografia de um animal tratado com EHE das cascas dos frutos de *P. granatum* L. a 1,0% (8-14 dias).



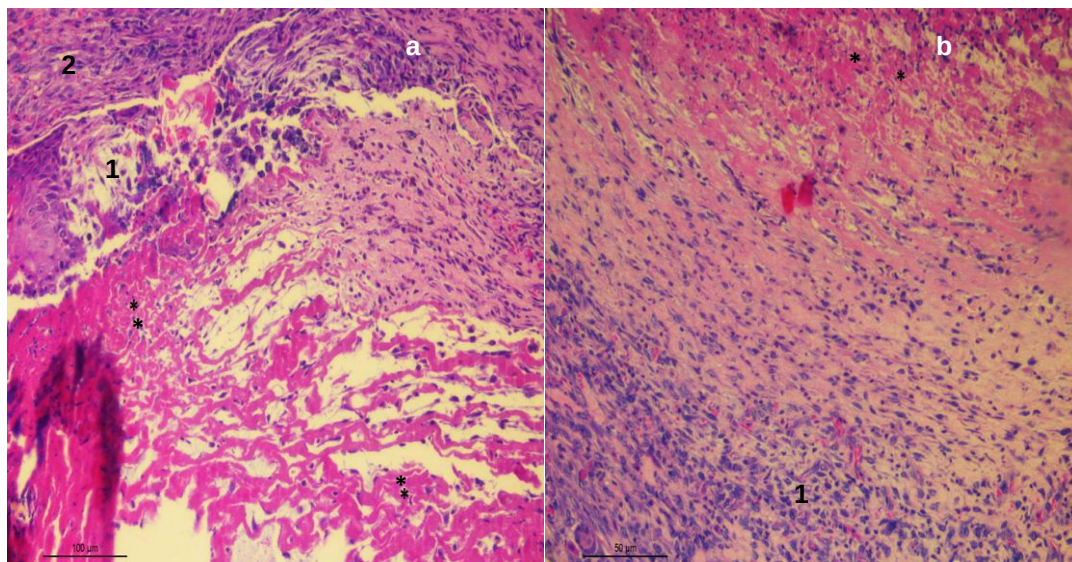
Legenda: a) Fotomicrografia mostra área cicatricial com epitelização (1) com pequena crosta queratínica (2). A proliferação conjuntiva esta presente e em modelação. Entretanto no centro da ferida o derma superficial apresenta uma coleção de substância acidofílica (seroma) sem inflamação (3). HE. Barra= 200µm. b) área cicatricial com epitelização (1) com pequena crosta queratínica (2). A proliferação conjuntiva esta presente e em modelação. Entretanto no centro da ferida o derma superficial apresenta uma coleção de substância acidofílica (seroma) sem inflamação (3). HE. Barra= 100µm. c) Fotomicrografia mostra Cicatrização adequada com epitelização, já na fase de modelação do conjuntivo (alguns fibroblastos ainda ativos e o colágeno menos denso e sem inflamação). HE. Barra= 200µm. d) cicatrização adequada com epitelização (1), já na fase de modelação do conjuntivo (alguns fibroblastos ainda ativos e o colágeno menos denso (2) e sem inflamação. HE. Barra= 50µm.

No tratamento GPg 0,5% de 7 dias visualizou-se epitelização com crosta queratínica e tecido cicatricial em desenvolvimento. No entanto, na derma a maior parte da área está ocupada por um grande seroma (Figura 24 a/b).

No dia 14 do GPg 0,5% houve a presença de epitelização, reparação fibro-vascular dérmica e pequena retenção de líquido (seroma). Também estão presentes macrófagos

com pigmento basifílico granular. Conclui-se que houve reparação cicatricial próximo dos parâmetros de qualidade.

Figura 24 Fotomicrografia de um animal tratado com gel cremoso contendo EHE das cascas dos frutos de *P. granatum* L. a 0,5% (0-7 dias).

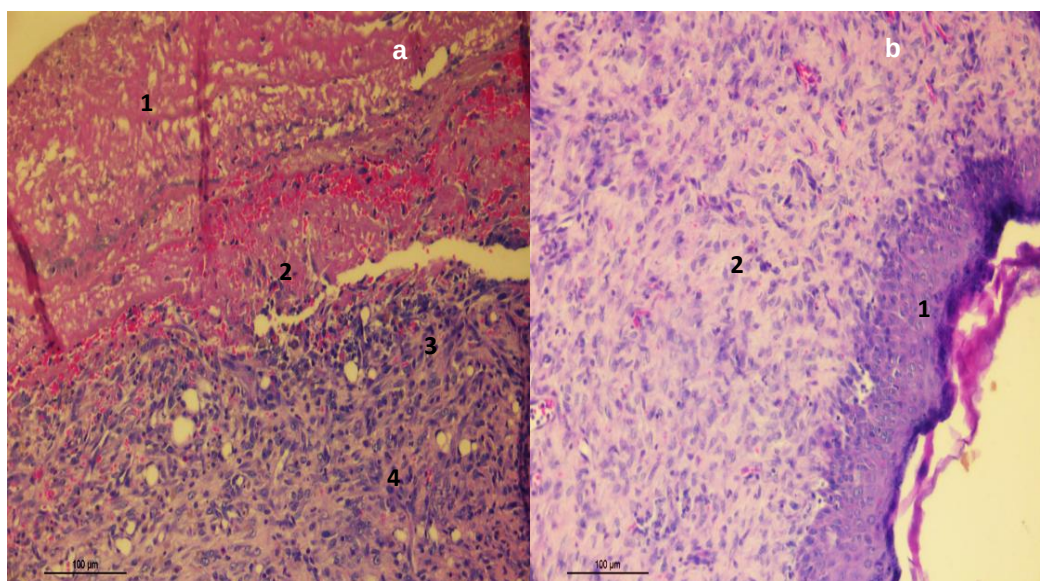


Legenda: a) Fotomicrografia mostra ausência epiteliação (1), crosta queratínica e no derma área ocupada por um grande seroma (*). HE. Barra= 100µm. b) Fotomicrografia mostra no derma área ocupada por um grande seroma (*). No derma mais profundo tecido cicatricial em desenvolvimento (1). HE. Barra= 50µm.

Na avaliação do histopatológico do 7º dia do GPg 1,0% (Figura 25 a) houve expressiva crosta superficial e presença de uma substância amorfa basofílica (produto utilizado no experimento), sem epiteliação. A biópsia não demonstrou área de cicatrização, estando presente um grande seroma plasmático e áreas de inflama o com piócitos.

Na fase proliferativa (Figura 25 b) visualizou-se a presença de epitelia o e forma o conjuntiva vascular dérmica em modela o, não sendo visto uma fase de granula o. Na hipoderme, muscular esquelética e nas margens cicatriciais observou-se abundantes macrófagos (limpeza tecidual), alguns como hemossider fagos e outros com pigmento granular basofílico. Portanto, a cicatriza o foi boa ocorrendo um pequeno retardo no processo de cicatriza o pela presença destacada de macrófagos.

Figura 25 Fotomicrografia de um animal tratado com gel cremoso contendo EHE das cascas dos frutos de *P. granatum* L. a 1,0% (a) (0-7 dias), (b) (8-14 dias).



Legenda: a) Fotomicrografia mostra expressiva crosta superficial (1), estando presente um grande seroma plasmático (2) e áreas de inflamação com piócitos (3). A biópsia demonstra área de cicatrização (4). HE. Barra= 100µm. b) Fotomicrografia mostra epitelização (1) e formação conjuntiva vascular dérmica em modelação (2), não sendo visto uma fase de granulação. HE. Barra= 100µm.

Neste estudo, verificou-se que os grupos tratados com o EHE das cascas dos frutos de *P. granatum* L. e com o gel-cremoso contendo o EHE das cascas dos frutos de *Punica granatum* L. apresentaram um desenvolvimento acelerado de tecido de granulação quando comparados com parâmetros histológicos. Houve também nestes grupos um rearranjo mais regular das fibras de colágeno, favorecendo a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno.

Adiga et al. (2010) demonstraram em seu estudo que o tratamento tópico utilizando o extrato de *Punica granatum* possibilitou o aumento significativo de tecido de granulação, através do surgimento de crostas e da força de ruptura, bem como dos níveis de hidroxiprolina, indicando taxas de aumento e estabilização das fibras de colágeno.

A aplicação tópica do extrato etanólico de *Punica granatum* (PIRBALOUTI et al. 2010), demonstrou a aceleração do processo de cicatrização por segunda intenção, modulando o processo inflamatório, de reepitelização e collagenização da ferida.

Em seu estudo experimental *in vivo*, Hayouni et al. (2011) notaram que em quatro dias houve um aumento do infiltrado celular em animais tratados com extrato de *Punica granatum*, período em que não foi observado regeneração epidérmica. Já no 12º dia houve uma organização tecidual avançada, sendo possível observar tecido de granulação

e epitelização em grupos tratados com pomada de *Punica granatum* quando comparado com o grupo controle.

4.9 ÍNDICE DE RETRAÇÃO (IR) CLÍNICA DAS FERIDAS

A determinação do IR das feridas demonstra a evolução do processo de cicatrização das lesões dos animais em estudo, no respectivo tempo (dias) de retirada do espécime.

No que diz respeito ao processo de fechamento da lesão, foi possível observar que os animais tratados durante 7 dias com SPg 1,0% apresentaram um percentual de contração de 79,93%, resultados superiores aos encontrados com o tratamento CNGC, no mesmo período ($p<0.001$).

Os animais dos grupos tratados com SPg 0,5% (74,08%) ($p<0.01$), GPg 1,0% (71,16%) ($p<0.05$) também demonstraram um aumento do percentual de contração quando comparados ao grupo controle negativo. O grupo GPg 0,5% (65,12%) apesar de ter apresentado uma cicatrização maior do que o CNGC não foi estatisticamente diferente do CNGC. Estes resultados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Índice de retração do ferimento (%) de camundongos tratados com EHE e gel cremoso de *Punica granatum* L. durante 7 dias.

Grupos	Contração (%)
CNGC	51,06±10,76
FIB	85,9±10,67***
SPg 0.5%	74,08±11,29**
SPg 1%	79,93±9,16***
GPg 0.5%	65,12±8,63
GPg 1%	71,16±5,914*

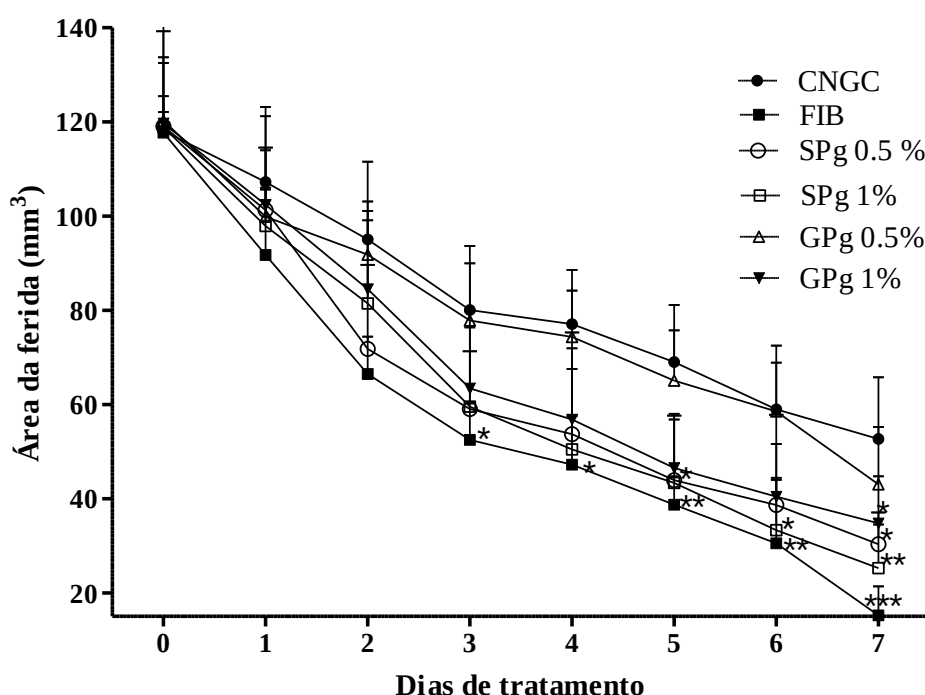
Legenda: Valores representam a média±DP, sendo que *($p<0.05$), **($p<0.01$) e ***($p<0.001$) representam resultados estatisticamente significativo comparado com grupo Controle Gel. N=5.

Quanto o processo de contração das feridas, o grupo tratado com SPg 1% apresentou diferença estatística a partir do 5º dia de tratamento ($p<0.05$) e se manteve até o final do tratamento, demonstrando maior diminuição da área da ferida quando comparada aos outros grupos, principalmente ao CNGC (Figura 26).

Observou-se também que o grupo SPg 0,5% apresentou diminuição da área da ferimento no quinto dia ($p<0.05$). O grupo tratado com GPg 1% apresentou diferença

estatística apenas no último dia de análise quando comparado aos outros grupos. Já o tratamento com GPg 0.5% não apresentou diferença estatística no decorrer do período de mensuração do ferimento. Pode-se sugerir que o EHE das cascas do fruto de *Punica granatum* a 5% apresentou melhor eficácia no fechamento da ferida em relação aos outros grupos.

Figura 26 Evolução da área do ferimento (mm^3) de camundongos tratados com EHE das cascas dos frutos e gel cremoso de *Punica granatum* L., durante 7 dias.



Legenda: Valores representam a média $\pm$ DP (n=5/grupo), sendo que *(p<0.05), **(p<0.01) e *** (0.001) representam resultados estatisticamente significativo comparado com grupo Controle Gel.

Quanto ao índice de retração do ferimento em camundongos tratados durante 14 dias com gel cremoso e EHE de *Punica granatum* L. em diferentes concentrações (tabela 11), não se observou diferença estatística entre os tratamentos, pois houve contração de 100 % dos ferimentos em todos os grupos, indicando assim, que até o 14º dia, o processo cicatricial apresenta-se com contração completa.

Tabela 11 – Índice de retração do ferimento (%) de camundongos tratados com EHE e gel cremoso de *Punica granatum* L. durante 14 dias.

Grupos	Contração (%)
CNGC	97,88±0,04
FIB	98,65±0,03
SPg 0.5%	100.0±0.00
SPg 1%	100.0±0.00
GPg 0.5%	98,48±0,02
GPg 1%	100.0±0.00

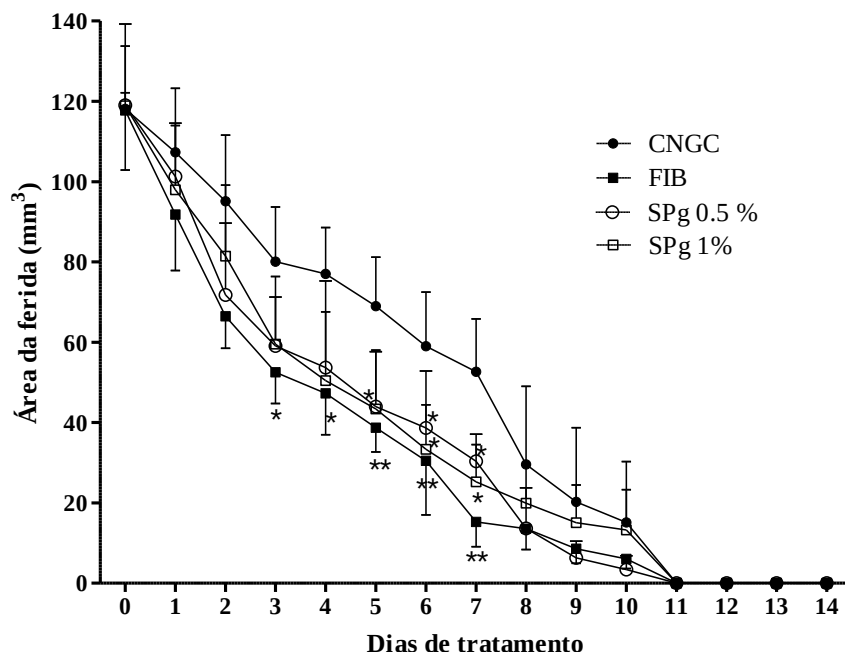
Legenda: Valores representam a média±DP (n=5/grupo).

O resultado do teste de cicatrização em camundongos tratados durante 14 dias com extrato hidroetanólico das cascas dos frutos de *Punica granatum* L. em diferentes concentrações (Figura 27), apresentaram diferença estatística a partir do 5º dia de tratamento ($p<0.05$) permanecendo até o sétimo dia.

O grupo tratado com GPg 1,0% (Figura 28), apresentou diferença estatística apenas do 5º ao 7º dia com significância de $p<0.05$. O tratamento com GPg 0,5% não demonstrou diferença estatística no decorrer do período de mensuração do ferimento, e a partir do sétimo dia, não observou-se diferença estatística entre os grupos.

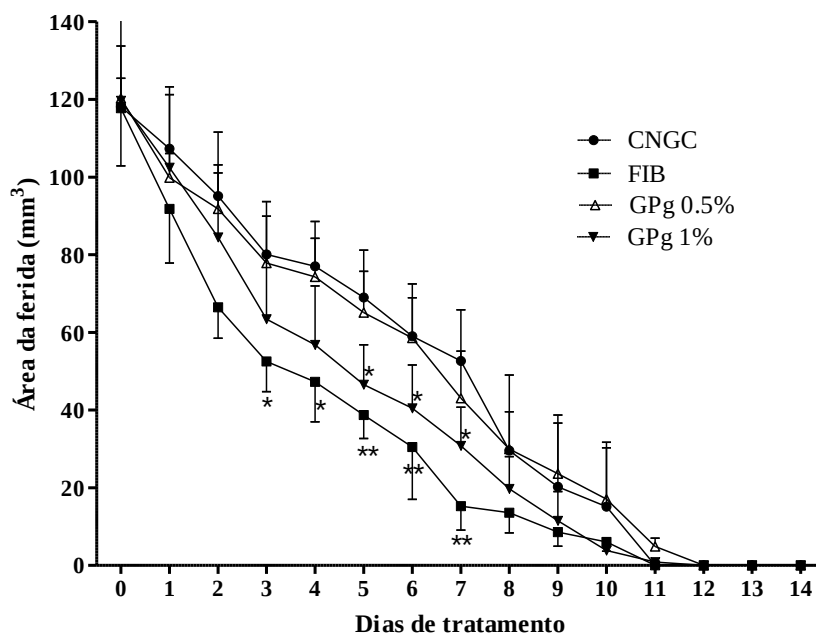
Em relação à evolução da área do ferimento, o grupo FIB apresentou diferença estatística ($p<0.05$) a partir do 3º dia de tratamento comparando-se ao grupo CNGC.

Figura 27 Evolução da área do ferimento (mm^3) de camundongos tratados com diferentes doses do EHE das cascas dos frutos de *Punica granatum* L., durante 14 dias.



Legenda: Valores representam a média $\pm$ DP (n=5/grupo), sendo que *(p<0.05), **(p<0.01) e *** (0.001) representam resultados estatisticamente significativo comparado com grupo Controle Gel.

Figura 28 Evolução da área do ferimento (mm^3) de camundongos tratados com Gel cremoso contendo EHE das cascas dos frutos de *Punica granatum* L. em diferentes doses, durante 14 dias.



Legenda: Valores representam a média $\pm$ DP (n=5/grupo), sendo que *(p<0.05), **(p<0.01) e *** (0.001) representam resultados estatisticamente significativo comparado com grupo Controle Gel.

O processo de cicatrização das feridas leva à restauração da integridade física do tecido lesionado e compreende interações envolvendo células do parênquima, matriz extracelular, células do sangue e mediadores inflamatórios. Há três fases envolvidas na cicatrização de feridas podendo ser nitidamente observadas: A fase inflamatória, proliferativa e a fase de remodelação tecidual (ISAAC et al., 2010).

Em estudos de cicatrização, é de grande importância a observação do processo cicatricial na fase proliferativa, que é responsável pelo fechamento da ferida, uma vez que pode-se mensurar o potencial cicatrizante do agente no decorrer do tratamento. Geralmente esta fase inicia-se no quarto dia do ferimento e pode persistir até o decimo quarto. (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998).

O exsudado é um líquido translúcido que extravasa dos vasos sanguíneos para a camada mais superficial da ferida, esse processo é fundamental inicialmente para a cicatrização, visto que favorece a migração de células inflamatórias para o local da lesão. Em feridas, a presença de exsudato é normal durante as primeiras horas, a predominância de exsudação durante um longo período pode promover o atraso neste processo, fato que pode explicar a cicatrização reduzida observada no grupo tratado com GPg 0,5%, uma vez que a persistência da exsudação pode favorecer a infecção e dificultar o desenvolvimento de tecido de granulação e conseqüentemente reduzir o processo cicatricial (CHADWICK; MCCARDLE, 2015).

Em seguida ao processo de exsudação e migração de células inflamatórias, inicia-se a fase de contração da ferida, onde células epiteliais entram em intensa proliferação estimulada pelo crescimento de fatores liberados principalmente pelos macrófagos infiltrados na ferida. A contração da área da ferida ocorre devido ao movimento migratório das células basais da borda em direção ao centro, a fim de reparar toda a região lesionada (NARDI et al., 2004).

Diversos estudos vêm demonstrando o potencial de espécies vegetais no tratamento da cicatrização de feridas. No estudo realizado por Barros et al., (2017), demonstrou a ação cicatrizante do extrato e gel de *Portulaca pilosa*, sendo que os resultados apresentaram um percentual de contração de 56% e 41% para o extrato e gel, respectivamente. Em paralelo ao nosso estudo, estes resultados corroboram com nossos achados, pois foi possível observar que extratos vegetais são mais efetivos no processo cicatricial que os géis contendo extrato vegetal. Em outro estudo realizado por Pawar et al., (2013) utilizando o extrato da espécie *Sida cordifolia* foi demonstrado um elevado percentual de contração da ferida com 88.44%, valor bastante próximo do observado em nosso trabalho para o extrato vegetal, e apresentando nótoria ação cicatrizante.

Em estudo realizado com extrato de *Passiflora edulis* em cicatrização de ratos, foi demonstrado que há uma diferença significativa quando comparados períodos de 7 e 14 dias de tratamentos. No 14º dia verificou-se um grande percentual de redução da área da ferida (GARROS et al., 2006), fato que também pode ser observado em nossos estudos, pois na evolução dos ferimentos os grupos tratados demonstraram valores de 100% da redução da área do ferimento.

Eurides et al. (1996), demonstraram aspectos morfológicos e morfométricos da evolução cicatricial de feridas cutâneas em camundongos tratados com extrato aquoso de *Stryphnodendron barbatiman* Mart. Os resultados revelaram que o extrato apresentou eficiência significativa no auxílio da reparação cicatricial de feridas cutâneas de camundongos com grande redução da área das feridas.

Estudo realizado por Cross et al. (1995), até o terceiro dia ocorre o processo inflamatório agudo, seguido da diminuição contínua da área da ferida, que progressivamente declina em direção ao 10º ou 12º dia. Posterior a este período, aproxima-se a fase final de cicatrização, tornando-se difícil a mensuração da área da ferida que evolui para o fechamento total.

A casca da romã é rica em polifenóis, os quais têm apresentado um forte efeito antisséptico e também atividade antibacteriana contra gram-negativas e gram-positivas (Negi & Jayaprakasha, 2003). Estes polifenóis presentes na casca podem ser responsáveis pela atividade de cicatrização de feridas (Murthy et al., 2004; Pirbalouti et al., 2010).

De acordo com este estudo, o grupo SPg 1,0% apresentou maior diferença significativa em relação à contração das feridas entre os grupos de tratamento e nos aspectos clínicos das lesões, assim como grupo GPg 1,0% também apresentou significância no processo de cicatrização, ambos até o 7º dia de tratamento, podendo assim indicar interferência do extrato e gel cremoso contendo *Punica granatum* Linn sobre as células presentes nesta região assim como nos mediadores químicos da inflamação.

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

- A) A elucidação dos compostos presentes no EHE das cascas do fruto de *P. granatum* através de LC-MS revelou 18 fitocomplexos, dentre eles, o ácido gálico, ácido elágico e punicalagina.
- B) O extrato hidroetanólico da romã (*P. granatum* L.) produziu uma significativa atividade antibacteriana (bacteriostática e bactericida) *in vitro* sobre as linhagens estudadas de *S. aureus* (ATCC6538P) e *P. aeruginosa* (ATCC9027).
- C) Os géis cremosos contendo o EHE de *P. granatum* L., nas concentrações de 0,5 e 1,0 %, apresentaram alterações consideradas aceitáveis nos ensaios de pré-estabilidade e de estabilidade acelerada.
- D) As formulações incorporadas com EHE de *P. granatum*, em estudo *in vitro*, apresentaram atividade anti-microbiana frente às cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Salmonella sp* nas concentrações estabelecidas, assim como inibiram o crescimento de fungos e bolores e bactérias aeróbias.
- E) Quanto à toxicidade aguda cutânea, nenhuma alteração foi constatada nos aspectos comportamentais dos animais submetidos ao teste.
- F) A aplicação tópica do extrato hidroetanólico e do gel cremoso de *Punica granatum* L. a 1% sobre feridas excisionais induzidas experimentalmente aceleraram o processo cicatricial no período de 7 dias, modulando a resposta inflamatória e a colageneização do tecido.

- ADAMS, L. S. et al. Pomegranate juice, total pomegranate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in cólon câncer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54: 980-985, 2006.
- ADIGA, S. K. et al. Preimplantation diagnosis of genetic diseases. **J.Postgrad. Med.**, 56(4): 317-320, 2010.
- AJAIKUMAR, K. B. et al. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum*, L. (pomegranate) methanolic extract. **J. Ethnopharmacol.**, 96(1-2): 171-176, 2005.
- ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C. et al. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. **International Journal of Morphology**, 27(4): 1105-1110, 2009.
- ALIGIANIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(9): 4.168-4.170, 2001.
- ALMEIDA, E. R. Plantas medicinais brasileiras. São Paulo: Hemus Ltda., 1993.
- AMAKURA, Y. et al. Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 891: 183-188, 2000.
- AMORIN, P. C. **A Técnica de diafribólise percutânea no tratamento de aderências e cicatrizes**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Fisioterapia) – Universidade Severino Sombra, Rio de Janeiro, 2005.
- ANCHISI, C. et al. Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents. **Farmaco.**, 56(5-7): 427-431, 2001.
- ANDRADE, I. P. et al. Concentração inibitória mínima de antissépticos bucais em microorganismos da cavidade oral. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, 13(3): 10-16, 2011.
- ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 39: 119-28, 1993.
- ARAÚJO, A. A. S. **Análise térmica e determinação dos parâmetros cinéticos de preparações farmacêuticas e novas especialidades de zidovudina**. 2003. 225 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas–USP, São Paulo, 2003.
- ARAÚJO, A. K. L. **Aspectos morfológicos do processo de cicatrização induzido por *Ouratea* sp.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual da Ceará, Ceará, 2010.

ARAÚJO, M. G. et al. Atividade antioxidante da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-da-praia). In: REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA, 1996, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. **Resumos...** Rio Grande do Norte, 1996.

ARUN, R.; SRAVYA, R. B.; ROJA, C. A review on standardisation of herbal formulation. **Inter. J. Phytother.** 2: 74-88, 2012.

ASLAM, M. N.; LANSKY, E. P.; 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**, 103: 311-318, 2006.

BAGRI, P. et al. Evalution of anti-inflammatory and analgesic activity of *Punica granatum* Linn. **International Journal of Drug Development & Research.** 2(4): 698-702, 2010.

BARA, M. T. F. et al. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 16(2): 211-215, 2006.

BARROS, A. S. A. et al. Study of the non-clinical healing activities of the extract and gel of *Portulaca pilosa* L. in skin wounds in wistar rats: A preliminary study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 96: 182-190, 2017.

BLANES, L. **Tratamento de feridas e cirurgia vascular**: guia ilustrado. São Paulo: BAPTISTA-SILVA, J. C. C. editor [online], 2004. Disponível em: <<http://www.baptista.com>>. Acesso em: 15 de out. 2012.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 4. ed. Natal: Editora Universitária / UFRN, 1961.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerencia Geral de Cosméticos. **Guia de guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília. Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília, DF, v.1, 2010a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da diretoria colegiada** - RDC nº 17, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira**. 2. ed. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2016.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, 33(1): 229-239, 2010.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The basic science of wound healing. **Plast Reconstr Surg.**, 117(7 Suppl): 12S-34S, 2006.

BRUSTEIN, V. P. et al. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. **Inflammopharmacol**, 20: 315-322, 2012.

CARIBÉ, J.; CAMPOS, J. M. **Plantas que ajudam o homem**: guia prático para a época atual. São Paulo: Pensamento Ltda., 1991.

CATÃO, R. M. R. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn. (romã) sobre isolados ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 38(2): 111-114, 2006.

CERDA, B. et al. Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. **Eur. J. Nutr.**, 42: 18-28, 2003.

CHADWICK, P.; MCCARDLE, J. Exudate management using a gelling fibre dressing. **The Diabet. Foot J.**, 18: 43-48, 2015.

CHAST, F. A. Brief History of drugs: from plant extracts to DNA technology. In: WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. London: Academic Press, 2008. p. 3-28.

CHORILLI, M. et al. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Farm.**, 88(1): 7-13, 2007.

CLAISSE, R. Drogues de la pharmacopée traditionnelle de la region de Rabat-Salé II. Dicotylédones. **Plantas Médicinales el Phytothérapie**, 4: 315-331, 1989.

CLARK, R. A. F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. **Invest. Dermatol.**, 11: 647-661, 1993.

_____. **The molecular and cellular biology wound repair**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1996.

CLIFFORD, M. N; SCALBERT, A. Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of Science oh Food and Agriculture**. 80: 1118-1125, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M07-A8- methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-eighth edition**. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

COCHARD, L. R. et al. **Atlas de embriologia humana de Netter**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CUNHA, N. A. **Sistematização da assistência de enfermagem no tratamento de feridas crônicas**. Olinda /PE, 2006. Disponível em:
<http://www.abenpe.com.br/diversos/sae_tfc.pdf>. Acesso em: 10 de out. 2012.

CROSS, D. A. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase. **B. Nature**, 378: 785-789, 1995.

DANTAS, S. R. P. E.; JORGE, S. A. **Feridas e Estomas**. Campinas: Edição do Autor, 2005. 110 p.

DIEGELMANN, R. F.; EVANS, C. M. Wound healing an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**. 9(1): 283-89, 2004.

DINIZ, M. F. F. M. et al. **Memento fitoterápico**: as plantas como alternativa terapêutica; conhecimentos populares e científicos. João Pessoa: Editora Universitária, 1997.

DOMINGUES, V. O. et al. Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: Comparação entre duas metodologias. **Saúde**, 33(1): 15-19, 2007.

ESTAKHR, J.; JAVDAN, N. Changes in the spermatogenesis and Camp-Responsive Element Modulator (CREM) gene expression in rat treated with *Salvia hypoleuca*. **Pharmacol.**, 2: 853-858, 2011.

EURIDES, D. et al. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão. **Ver. Fac. Zootec. Vet. Agro.**, 2/3(1): 35-40, 1996.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa para o profissional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2000.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD ESI/MS. **Food Chemistry**, 127(2): 807-821, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Clin. Plastic Surg.**, 39: 85-97, 2012.

GARROS, I. C. et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Suplemento 3, 21: 1-5, 2006.

GARTNER, L. P. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

GIL, M. I. et al. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48(10): 4581-4589, 2000.

GILL, H. S. et al. Selective removal of stratum corneum by microdermabrasion to increase skin permeability. **Eur. J. Pharm. Sci.**, 38(2): 95-103, 2009.

GOMES, P. **Fruticultura brasileira**. São Paulo: Nobel, 2007. 446 p.

GONÇALVES, G.; PARIZOTTO, N. A. Fisiopatologia da reparação cutânea: atuação da fisioterapia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, 3(1): 5-13, 1998.

GONZÁLEZ-MOLINA, E.; MORENO, D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. A new drink rich in bioactives combining lemon and pomegranate juices. **Food Chemistry**, 115(4): 1364-1372, 2009.

GRACIOUS, R. R.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits - a preliminary study. **J. Ethnopharmacol.**, 78(1): 85-87, 2001.

GRAY, H. et al. **Gray's anatomy**: the anatomical basis of medicine and surgery. New York: Churchill Livingstone, 1995. 76 p.

HAYOUNI, E. A. et al. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. **Phytomedicine**, in press, 2011.

HARRIS, M. I. N. **Pele**: estrutura, propriedades e envelhecimento. 2. ed. rev. ampl. São Paulo: SENAC, 2005.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, 59: 205-215, 1996.

HERBER, D. Multitargeted therapy of câncer by ellagitannins. **Cancer Letters**, 249: 262-268, 2008.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Oswaldo Cruz**, 97: 1027-1031, 2002.

IGNÁCIO, C. **Desenvolvimento de curativos para cicatrização de feridas por segunda intenção baseados em biomateriais capazes de promoverem resposta celular controlada via estímulo externo**. Tese (Doutorado) –Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, 2009.

ISAAC, C. et al. Papel do queratinócito na contração da ferida: avaliação de impacto usando um modelo de matriz de colágeno povoada por fibroblastos, **Rev. Bras. Cirurgia Plást.**, 26(3): 402-406, 2011.

JUNQUEIRA L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 303 p.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Colágeno: A molécula de múltiplas funções**. São Paulo: Laboratório de biopatologia celular/Faculdade de Medicina/Universidade de São Paulo, 2008.

KAWAI, S.; LANSKY, E. P. Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promye-locytic leukemia cells. **Journal of Medicinal Food**, 7: 13-18, 2004.

KIERSZENBAUM, A. L. Polycystins: what polyeystic disease tells us about sperm. **Mol. Reprod. Dev.**, 67: 385-388, 2004.

KOBAYASHI, Y. T. S. et al. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 52(1): 34-40, 2015.

LANGLEY, P. Why a pomegranate? **British of Medicine Journal**, 321(4): 1153-1154, 2000.

LANSKY, E. P.; NEWMANN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, 109: 177-206, 2007.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Rev. Inv. Cl., Ep., Lab. e Ter.**, 77(5): 563-569, 2002.

LEVISON, M. E.; LEVISON, J. H. Improving vancomycin prescription in critical illness through a drug use evaluation process: a weight-based dosing intervention study. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 39: 69-72, 2012.

LI, S. et al. Prospective randomized controlled study of a Chinese herbal medicine compound Tangzu Yuyang Ointment for chronic diabetic foot ulcers: a preliminar report. **Journal of Ethnopharmacology**, 133(2): 543-550, 2011.

LONGUEFOSSE, J. L.; NOSSIN, E. Medical ethnobotany survey in Martinique. **Journal of Ethnopharmacology**, 53(3): 117-142, 1996.

LONGTIN, R. The pomegranate: nature's power fruit? **Journal of the National Cancer Institute**, 95: 346-348, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2008.

LOSSO, J. N. et al. In vitro antiproliferative activities of ellagic acid. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 15(11): 672-678, 2004.

LOURENÇO, A. R. N. **Administração tópica de fármacos: das restrições aos desafios**. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

LUNA, L. G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology**. 3. ed. New York: McGraw Hill, 1968. 258 p.

MACHADO, T. B. et al. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Anti-Microb. Agents**, 21: 279- 284, 2003.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. The pharmacological evaluation of natura products - general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J. Ethnopharmacol.**, 8: 127-147, 1983.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Na. Bras. Dermatol.**, 78(4): 393-410, 2003.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol.**, 15: 599-607, 2005.

MARTINS, E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1995.

MARTINS, N. L. P. et al. Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, 21(3): 66-75, 2006.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 2. ed. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1994. 179 p.

_____. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3. ed. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2007. 394 p.

MCCALLION, R. L. F. Fetal wound healing and development of antiscarring therapies for adult wound healing. In: CLARK, R. A. (Ed.) **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1996. p. 561-590.

MENEZES, S. M. S. et al. Atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Medicina**, 65(11): 388-91, 2008.

MIYAZAKI, H. et al. An ultrathin poly (L-lactic acid) nanosheet as a burn wound dressing for protection against bacterial infection. **Wound Repair and Regeneration**, 20: 573-579, 2012.

MONEIM, A. E. A. Antioxidant activities of *Punica granatum* (pomegranate) peel extract on brain of rats. **Journal of Medicinal Plants Research.**, 6(2): 195-199, 2012.

MOREIRA, F. As plantas que curam. São Paulo: Hemus Editora Ltda., 1985.

MURTHY, K. N. et al. Study on wound activity of *Punica granatum* peel. **Journal of Medicinal Food**, 7: 256-259, 2004.

NARDI, A. B. D. et al. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos, vitamina A e E, lecitina de soja e iodo polivinilpirrolidona em cães. **Arch. of vet. Sci.**, 9: 1-16, 2004.

NASCIMENTO, G. G. F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **J. Bras. Microbiol.**, 31(4): 247-56, 2000.

NAQVI, S. A. H.; KHAN, M. S. Y; VOHORA, S. B. Anti-bacterial, anti-fungal and anti-helminthic investigations on indian medical plants. **Rev. Fitoterapia**, 62: 221-228, 1991.

NAVARRO, V. et al. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, 53: 143-147, 1996.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 7. ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

NEGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. **Journal of Food Science**, 68: 1473-1477, 2003.

NIMRI, L. F.; MEQDAM, M. M.; ALKOFABI, A. Antibacterial activity of Jordanian medicinal plants. **Pharmaceutical Biology**, 37(3): 196-201, 1999.

NODA, Y. et al. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin and pelargonidin. **J. Agric. Food Chem.**, 50(1): 166-171, 2002.

NUNES, P. S. et al. Collagen-based films containing liposome-loaded usnic acid as dressing for dermal burn healing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 2011: 1-9, 2011.

OECD/OCDE – Acute dermal irritation/corrosion. In: **Guideline for the Testing of Chemicals nº 402**. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, França, 1987.

OECD/OCDE – Acute dermal irritation/corrosion. In: **Guideline for the Testing of Chemicals nº 404**. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, França, 2002.

OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, E. C.; SASSI, C. R. R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Público (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Plantas Med.**, 8(2): 39-41, 2006.

ORLANDA, J. F. F. O. **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (Rutaceae)**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2011.

PAWAR, R. S. et al. Wound healing activity of *Sida cordifolia* Linn. in rats, Indian. **J. Pharmacol.**, 45: 474-478, 2013.

PEREIRA, D. S. T. et al. Development of animal model for studying deep second-degree thermal burns. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, ID 460841, 7 p., 2012.

PEREIRA, J. V. et al. Efeito antibacteriano e antiaderente in vitro do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(1): 301-307, 2006.

PINTO, L. N. **Plantas medicinais utilizadas em comunidades do município de Igarapé-Miri, Pará**: etnofarmácia do município de Igarapé-Miri – Pa. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

PRATA, M., HADDAD, C.; GOLDENBERG, S. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em rato. **Acta Cirurgica Brasileira**, 3: 43-48, 1988.

PRAKASH, C.; SAI, V.; PRAKASH, I. Bioactive chemical constituents from pomegranate (*Punica granatum*) juice, seed and peel-a review. **International Journal of Research in Chemistry and Environment**, 1(1): 1-18, 2011.

PIRBALOUTI, A. G.; KOOHPAYEH, A.; KARIMI, I. The wound healing activity of flower extracts of *Punica granatum* and *Achillea kellalensis* in wistar rats. **Acta Poloniae Pharmaceutica** - Drug Research, 67(1): 107-110, 2010.

RICHERS, D. W. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R. A. F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2. ed. New York: Plenum, 1996, p. 143-168.

RIEDL, K. M.; HAGERMAN, A. E. Tannin-protein complexes as radical scavengers and radical sinks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49: 4917-4923, 2001.

ROSS, R. G.; SELVASUBRAMANIAN, S.; JAYASUNDAR, S. Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits – a preliminary study. **J. Ethnopharmacol.**, 78(1): 85-87, 2001.

SAMPAIO, F. C.; BRANDÃO, A. A. H.; RODE, S. M. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). **Rev. Bras. Pl. Med.**, 10(3): 104-111, 2008.

SANGIRARD, J. **Plantas eróticas**. São Paulo: Nórdica, 1991.

SCOPEL, M. **Análise botânica, química e biológica comparativa entre flores das espécies *Sambucus nigra* L. e *Sambucus australis* Cham. & Schldl.** - avaliação preliminar da estabilidade. 2005. 227 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, 2005.

SEPIGEL. Polyacrylamide (and) C13-14, isoparaffin (and) laureth-7. Dossiê técnico do fabricante. **Fagron**, 2015.

SERRALVES. ***Punica granatum* L.** Disponível em: <serralves.ubiprism.pt/documentos/especie/1303/download>. Acesso em: 09 de nov de 2017.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Editora Universitária / UFRGS / UFSC, 2002.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, 341: 738-746, 1999.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. A essência das composições aromáticas. **Cosméticos & Toiletries**, 17(6): 50-55, 2005.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. In: SIMPÓSIO FUNDAMENTOS EM CLÍNICA CIRÚRGICA, 2008, Ribeirão Preto. **Anais...** Capítulo II, 41(3): 259-264, Ribeirão Preto, 2008.

TEO, T. C.; NAYLOR, I. L. Modifications to the rate of wound contraction by allopurinol, British. **Journal of Plastic Surgery**, 48: 198-202, 1995.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; CLIFFORD, M. N. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden. **Journal of Science oh Food and Agriculture**, 80: 1024-1032, 2000.

- VASCONCELOS, L. C. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. **Mycoses**, 46: 192-196, 2003.
- VEIGA, J. V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, 28(3): 519-28, 2005.
- VERDI, S.; YOUNES, S.; C. D. BERTON. Avaliação da qualidade microbiológica de chás de plantas utilizadas na assistência ao tratamento da obesidade. **Rev. Bras. Pl. Med.**, 15(4): 494-502, 2013.
- VIDAL, A. et al. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 89: 295-300, 2003.
- VLASE, L. et al. Chemical constituents of three *Allium* species from Romania. **Molecules**, 18: 114-127, 2013.
- WANG, C. et al. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. **Industrial Crops and Products**, 42: 587-594, 2013.
- ZAOUAY, F. et al. Antioxidant activity and physico-chemical properties of Tunisian grown pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. **Ind. Crops. Prod.**, 40: 81-89, 2012.

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS			
Espécies vegetais			
1	<i>Achillea millefolium</i>	37	<i>Lippia sidoides</i>
2	<i>Allium sativum</i>	38	<i>Malva sylvestris</i>
3	<i>Aloe</i> spp* (<i>A. vera</i> ou <i>A. barbadensis</i>)	39	<i>Maytenus</i> spp* (<i>M. aquifolium</i> ou <i>M. ilicifolia</i>)
4	<i>Alpinia</i> spp* (<i>A. zerumbet</i> ou <i>A. speciosa</i>)	40	<i>Mentha pulegium</i>
5	<i>Anacardium occidentale</i>	41	<i>Mentha</i> spp* (<i>M. crispata</i> , <i>M. piperita</i> ou <i>M. villosa</i>)
6	<i>Ananas comosus</i>	42	<i>Mikania</i> spp* (<i>M. glomerata</i> ou <i>M. laevigata</i>)
7	<i>Apuleia ferrea</i> = <i>Caesalpinia ferrea</i> *	43	<i>Momordica charantia</i>
8	<i>Arrabidaea chica</i>	44	<i>Morus</i> sp*
9	<i>Artemisia absinthium</i>	45	<i>Ocimum gratissimum</i>
10	<i>Baccharis trimera</i>	46	<i>Orbignya speciosa</i>
11	<i>Bauhinia</i> spp* (<i>B. affinis</i> , <i>B. forficata</i> ou <i>B. variegata</i>)	47	<i>Passiflora</i> spp* (<i>P. alata</i> , <i>P. edulis</i> ou <i>P. incarnata</i>)
12	<i>Bidens pilosa</i>	48	<i>Persea</i> spp* (<i>P. gratissima</i> ou <i>P. americana</i>)
13	<i>Calendula officinalis</i>	49	<i>Petroselinum sativum</i>
14	<i>Carapa guianensis</i>	50	<i>Phyllanthus</i> spp* (<i>P. amarus</i> , <i>P. niruri</i> , <i>P. tenellus</i> e <i>P. urinaria</i>)
15	<i>Casearia sylvestris</i>	51	<i>Plantago major</i>
16	<i>Chamomilla recutita</i> = <i>Matricaria chamomilla</i> = <i>Matricaria recutita</i>	52	<i>Plectranthus barbatus</i> = <i>Coleus barbatus</i>
17	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	53	<i>Polygonum</i> spp* (<i>P. acre</i> ou <i>P. hydropiperoides</i>)
18	<i>Copaifera</i> spp*	54	<i>Portulaca pilosa</i>
19	<i>Cordia</i> spp* (<i>C. curassavica</i> ou <i>C. verbenacea</i>)*	55	<i>Psidium guajava</i>
20	<i>Costus</i> spp* (<i>C. scaber</i> ou <i>C. spicatus</i>)	56	<i>Punica granatum</i>
21	<i>Croton</i> spp (<i>C. cajucara</i> ou <i>C. zehntneri</i>)	57	<i>Rhamnus purshiana</i>
22	<i>Curcuma longa</i>	58	<i>Ruta graveolens</i>
23	<i>Cynara scolymus</i>	59	<i>Salix alba</i>
24	<i>Dalbergia subcymosa</i>	60	<i>Schinus terebinthifolius</i> = <i>Schinus molle</i>

DAF/SCTIE/MS – RENISUS - fev/2009

25	<i>Eleutherine plicata</i>	61	<i>Solanum paniculatum</i>
26	<i>Equisetum arvense</i>	62	<i>Solidago microglossa</i>
27	<i>Erythrina mulungu</i>	63	<i>Stryphnodendron adstringens</i> = <i>Stryphnodendron barbatiman</i>
28	<i>Eucalyptus globulus</i>	64	<i>Syzygium</i> spp* (<i>S. jambolanum</i> ou <i>S. cumini</i>)
29	<i>Eugenia uniflora</i> ou <i>Myrtus brasilliana</i> *	65	<i>Tabebuia avellanedae</i>
30	<i>Foeniculum vulgare</i>	66	<i>Tagetes minuta</i>
31	<i>Glycine max</i>	67	<i>Trifolium pratense</i>
32	<i>Harpagophytum procumbens</i>	68	<i>Uncaria tomentosa</i>
33	<i>Jatropha gossypifolia</i>	69	<i>Vernonia condensata</i>
34	<i>Justicia pectoralis</i>	70	<i>Vernonia</i> spp* (<i>V. ruficoma</i> ou <i>V. polyanthes</i>)
35	<i>Kalanchoe pinnata</i> = <i>Bryophyllum calycinum</i> *	71	<i>Zingiber officinale</i>
36	<i>Lamium album</i>		

* definir a(s) espécie(s) com cultivo, estudos e indicação de uso

GEL CREMOSO**PROPRIEDADES E APLICAÇÃO**

Gel cremoso não iônico, indicado para todos os tipos de pele. Não altera a viscosidade em presença de álcool etílico e glicóis.

FÓRMULA

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
poliacrilamida, isoalcanos C13-14 e álcool laurílico etoxilado 7 OE	4 g
<i>solução conservante de parabenos</i>	3,3 g
<i>solução conservante de imidazolidinilureia a 50%</i>	0,6 g
água purificada qsp	100 g

ORIENTAÇÕES PARA O PREPARO

Em recipiente adequado, dispersar o composto de poliacrilamida na água e adicionar os demais componentes, sob agitação.

EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Em recipiente adequado, de plástico opaco ao abrigo da luz e à temperatura ambiente.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU (*ad referendum*)**, na reunião de 24 de junho de 2015, o parecer referente ao protocolo no. **0015/2015** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Potencial terapêutico de formulações fitoterápicas no tratamento de lesões cutâneas**" coordenado por **Jocivânia Oliveira da Silva**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED (*ad referendum*)** at the meeting of 24 June 2015, the final decision about the Protocol **0015/2015** and certify that the research project entitled "**Potencial terapêutico de formulações fitoterápicas no tratamento de lesões cutâneas**" coordinated by **Jocivânia Oliveira da Silva**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 24 de junho de 2015


Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Grupo tratamento: _____

Nº animal: _____

Dias	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Infecção															
Hiperemia em torno da ferida															
Crostas															
Necrose em torno da ferida															
Fundo sangrante															
Medidas com Paquímetro (0-150mm)															
R: raio>															
r: raio<															
Área= $\pi.R.r$															
Média da área (no término)															
Desvio Padrão da área (no término)															
Consumo de ração:															
Consumo de água:															
Área inicial da ferida (W0)															
Área da ferida (dia da biópsia) (W1)															
% de contração da ferida= $\frac{W0 - W1}{W1} \times 100$															

Ausente: 0 Leve: 1 Moderada: 2 Intensa:3

Nome executor:

OBS: Realizar a média e o desvio padrão da % de contração da ferida dos animais po55r grupo