

SANDRA MÁRCIA MAZUTTI DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO
DERIVADOS DE *Eugenia dysenterica* DC.

BRASÍLIA, 2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

SANDRA MÁRCIA MAZUTTI DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO
DERIVADOS DE *Eugenia dysenterica* DC.

Tese apresentada como requisito
parcial para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de
Brasília

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

BRASÍLIA

2018

SANDRA MÁRCIA MAZUTTI DA SILVA

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS CONTENDO
DERIVADOS DE *Eugenia dysenterica* DC

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Aprovado em 27 de março de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista (Presidente)
Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Claudia Masrouah Jamal
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Christopher William Fagg
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dra. Damaris Silveira
Universidade de Brasília (UnB)

Dedico este trabalho...

À minha família e a equipe de parceiros que tanto me inspiram.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que além de pai é minha inspiração e razão maior da existência da vida, por ser a fortaleza e conforto presente em todos os dias do meu viver. Senhor meu pai, meu muitíssimo obrigado por estes caminhos percorridos e pessoas que nele deparei-me, que com esta convivência me iluminou e proporcionou a chance de participar de sua obra.

À UnB, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

À FIOCRUZ - Rio de Janeiro, por ter fornecido as cepas ATCC para o experimento.

À CAPES pelo apoio financeiro recebido.

À Bonasa Alimentos pela doação dos ovos férteis e da pele de orelha de porco.

À minha orientadora, Professora Dr^a Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista, agente transformadora do meu conhecimento, pela possibilidade do meu desenvolvimento pessoal e profissional por intermédio da concretização deste passo adiante, meus sinceros agradecimentos pelo seu diferencial que foi propiciar-me constantemente uma sensação de acolhimento da qual pude desfrutar.

À Professora Dr^a Dâmaris da Silveira do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos - UnB, que com sua cordial atenção e amizade me ajudou, colaborou e contribuiu com seus ensinamentos para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Professora Dr^a Yris Maria Fonseca-Basso do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos - UnB, pela colaboração, pela valiosa amizade e sugestões.

À equipe do LTMAC agradeço pela amizade, acolhimento e por todos os ensinamentos e disponibilidade para me ajudar sempre que precisei.

À Professora Dr^a Aline Pic Taylor e demais colaboradores do Departamento de Genética e Morfologia, pela disponibilização da estrutura para os ensaios *in vivo*, colaboração, pela valiosa amizade e sugestões.

À equipe de Professores e organizadores do doutorado em Ciências da Saúde da Faculdade de Saúde - UnB, pela dedicação e pelos ensinamentos.

Aos colegas Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos - UnB, pelas contribuições, cooperação, gentilezas e amizade em todos os momentos que compartilhamos, somando ou dividindo esforços nesta caminhada.

À toda equipe da Secretaria do Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde pela colaboração prestada.

À minha educadora, Vilma, meu maior exemplo de vivências em prol do empoderamento proposto pelo ilustríssimo e consagrado Paulo Freire, além de ser alguém que inspira-me imenso orgulho.

Ao Magela, meu amado esposo, ser especial que consignou sua vida a minha, preenchendo plenamente de amor e sabedoria no nosso cotidiano e cujo companheirismo tem me inspirado e fortalecido.

Às minhas filhas, Fabyanne e Giovana, que são a luz e a razão do meu viver.

Os meus irmãos Antônio, Sarita, Marita, Nádia, Robson e Joffer, queridos companheiros nesta caminhada de vida permeada de união, carinho, experiências vivenciadas e conhecimentos.

Aos meus sobrinhos Alice e Gabriel; Jeter Filho, João Pedro e Felipe; João Vitor, Francielle, Gabriele, Diego, Roberta, Rafaela e Rebeca.

Aos meus cunhados por serem pessoas que aliaram-se a minha família e fazem a diferença no nosso viver.

Aos demais componentes do grupo familiar, o meu apreço.

À querida e companheira Edinalva, pelo auxílio e compreensão.

A todos, que me ajudaram nesta jornada o meu carinho, reconhecimento e agradecimentos eternos.

*"Todo conhecimento tem
princípio nos sentimentos"*

Leonardo da Vinci

Resumo

O presente estudo teve como objetivo analisar a etapa de controle da qualidade da droga e dos derivados vegetais, extrato aquoso (EBA) e óleo essencial (oEd) de folhas de *Eugenia dysenterica* Mart. DC., e realizar o desenvolvimento de formulações contendo esses derivados vegetais para tratamento de lesões cutâneas. A atividade antimicrobiana *in vitro* do EBA e do oEd por meio da técnica de difusão em disco, poço e microdiluição foi avaliada frente ao microrganismo *Staphylococcus aureus*, observando-se que EBA inibiu o crescimento microbiano com concentração bactericida $\geq 156,25 \mu\text{g/mL}$. A citotoxicidade celular foi determinada empregando-se o método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio (MTT) avaliando EBA, oEd e alfa-humuleno para as linhagens HaCat, L929 e RAW 264.7, sendo observado que estes não foram citotóxicos. A atividade anti-inflamatória foi investigada *in vitro* usando macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos e tratados com EBA, oEd e alfa-humuleno, os quais exibiram inibição da produção de óxido nítrico $\geq 49,87\%$. O potencial do EBA, oEd e alfa-humuleno em promover a migração celular foi analisado com HaCat e L929, destacando-se o óleo essencial, o qual promoveu o fechamento das feridas em 12 horas a menos em relação ao controle. Adicionalmente, para verificar a segurança de EBA, oEd e das formulações foram realizados *in vivo* o ensaio usando a membrana cório-alantóide do ovo embrionado de galinha (HET-CAM), ficando constatado que estes compostos não são irritantes. Ainda utilizando o ensaio HET-CAM foi verificado o potencial angiogênico de EBA, oEd e das formulações, os quais demonstraram ação semelhante ao controle de estimulação (Regederm). Micropartículas contendo EBA, obtidas por *spray drying* utilizando o biopolímero quitosana foram então obtidas e caracterizadas quanto à morfologia, rendimento (31,25%), diâmetro ($19,69 \mu\text{m}$) e potencial zeta ($41,1 \pm 4,26 \text{mV}$). As micropartículas obtidas apresentaram eficiência de encapsulação de 70,13% e características apropriadas para uso cutâneo. A veiculação de EBA em emulsão manteve a estabilidade do sistema por até 60 dias sob $\leq 8^\circ\text{C}$. A liberação da catequina procedeu de maneira progressiva por 24 horas. O teste de permeação cutânea demonstrou que a emulsão promoveu a penetração de catequina ($13,56 \mu\text{g/cm}^2$) na camada da epiderme viável, demonstrando atingir o sítio alvo, sendo possível afirmar que a emulsão modula a penetração de catequina. Os estudos de estabilidade revelaram

que o armazenamento da emulsão sob refrigeração aumenta o tempo de validade do produto, pois indicaram resguardar o teor de catequina neste tipo de forma farmacêutica. Portanto, a emulsão com micropátículas contendo EBA é uma candidata para ser empregada para auxiliar o processo de tratamento antimicrobiano, enquanto o óleo demonstrou melhores resultados como anti-inflamatório, promotor de reepitelização e atividade angiogênica, sendo um composto potencial candidato para cicatrização de feridas, além de caracterizada por não promover efeitos irritativos. As formas avaliadas visam à recuperação de pacientes com conforto e conseqüentemente maior adesão ao tratamento, ademais, podem promover a epitelização do tecido por intermédio da ação antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante, além de ser uma proposta inovadora e genuinamente brasileira.

Palavras-chave: *Eugenia dysenterica*; medicamento fitoterápico; antibacteriano; cicatrizante; anti-inflamatório; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

This study has as objective to analyze the quality control stage of the drug and its plant derivatives, namely the aqueous extract (EBA) and the essential oil (oEd) of the leaves of *Eugenia dysenterica* Mart. DC., and to develop formulations containing these plant derivatives for treatment of skin lesions. The *in vitro* antimicrobial activity of EBA and oEd was evaluated against the *Staphylococcus aureus* using disk diffusion, well and microdilution techniques. It was observed that EBA inhibited microbial growth in bactericidal concentration $\geq 156.25\mu\text{g/mL}$. The cellular cytotoxicity of EBA, oEd and alpha-humuleno for the lineages HaCat, L929 and RAW 264.7 was determined by employing the colorimetric method 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and no cytotoxicity was observed. Inflammatory activity was investigated *in vitro* by using lipopolysaccharides stimulated macrophages treated with EBA, oEd and alpha-humuleno; all of them exhibited inhibition of nitric oxide production at least 49.87%. The potential of EBA, oEd and alpha-humuleno in promoting cellular migration was analyzed with the lineages HaCat and L929, with emphasis to the essential oil, which promoted the wounds closure 12 hours earlier compared to control. Moreover, for safety purposes, EBA, oEd and formulations were tested *in vivo* using the Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM), concluding those compounds have not jeopardized the chorioallantoic membrane. The HET-CAM assay also verified the EBA, oEd and formulations angiogenic potential, which demonstrated similar action compared to control (Regederm). EBA containing microparticles, that were obtained by spray drying using the chitosan biopolymer, were characterized according to morphology, yield (31.25%), diameter ($19.69\mu\text{m}$) and Zeta potential ($41,1\pm 4,26\text{mV}$). Those microparticles presented 70.13% encapsulation efficiency and also characteristics suitable for dermatologic use. The emulsion carried EBA maintained the system stability for up to 60 days while under 8°C . The catechin release proceeded progressively for 24 hours. Cutaneous permeation test demonstrated that the emulsion promoted the catechin penetration ($13,56\mu\text{g/cm}^2$) into the viable epidermis layer and it is possible to say that the emulsion increases the catechin penetration. Stability studies have shown that the emulsion refrigeration increases the product durability, because they indicated the preservation of catechin content. Therefore, emulsion with EBA containing microparticles may be an alternative option to assist

the antimicrobial treatment; while the oil demonstrated better results as anti-inflammatory, reepithelialization promoter and pro-angiogenic, being a potential compound for wound healing, while not promoting irritating effects. The evaluated formulations focus on comfortable patients recovery, leading to better treatment adherence. Furthermore, those formulations can promote the tissue epithelialization throughout the antimicrobial, inflammatory and healing action. It is an innovative and genuinely Brazilian proposal.

Key words: *Eugenia dysenterica*; herbal medicine; antibacterial; healing; anti-inflammatory; *Staphylococcus aureus*.

Lista de Figuras

Figura 1. Partes aéreas de <i>Eugenia dysenterica</i> Mart. DC. (A) folhas e frutos. (B) folhas.....	49
Figura 2. Estrutura molecular da catequina.....	50
Figura 3. Célula de difusão do tipo Franz montada com a pele de orelha suína separando o meio doador do meio receptor.....	94
Figura 4. Folhas jovens de <i>E. dysenterica</i> (A). Folhas maduras de <i>E. dysenterica</i> (B).....	97
Figura 5. Concentração de metais pesados e elementos minerais da folha pulverizada e do extrato aquoso liofilizado de <i>E. dysenterica</i>	99
Figura 6. Folhas pulverizadas de <i>E. dysenterica</i> (A). Derivado vegetal das folhas de <i>E. dysenterica</i> (B).	103
Figura 7. Perfil cromatográfico do extrato aquoso das folhas de <i>E. dysenterica</i>	108
Figura 8. Cromatograma do óleo essencial de folhas de <i>E. dysenterica</i> obtido por CG-EM, beta-cariofileno (2) e alfa-humuleno (4).....	109
Figura 9. Viabilidade celular <i>in vitro</i> do EBA e do óleo de folhas de <i>E. dysenterica</i> para linhagem de fibroblasto (L929) por ensaio de MTT. (A) EBA. (B) óleo essencial e alfa-humuleno.....	115
Figura 10. Viabilidade celular <i>in vitro</i> do EBA e do óleo de folhas de <i>E. dysenterica</i> para linhagem de queratinócito (HaCat) por ensaio de MTT. (A) EBA. (B) óleo essencial e alfa-humuleno.....	116
Figura 11. Viabilidade celular <i>in vitro</i> do EBA e do óleo de folhas de <i>E. dysenterica</i> para linhagem de macrófago (RAW 264.7) por ensaio de MTT. (A) EBA. (B) óleo essencial e alfa-humuleno.....	116
Figura 12. Níveis de produção de óxido nítrico no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 incubados com EBA nas diferentes concentrações e estimulados com 1µg/mL de LPS, durante 48 horas, em três experimentos foram calculados por ONE WAY	

ANOVA, seguidamente com o Teste Comparativo Múltiplo de Bonferroni ($^*p < 0,05$ vs LPS).....119

Figura 13. Efeitos do óleo essencial das folhas *E. dysenterica* sobre a produção de ON induzido por LPS em RAW 264.7 usando o ensaio de Griess. Os macrófagos foram incubados na presença de óleo, alfa-humuleno ou dexametasona em combinação com LPS 1µg/mL durante 48 horas. As diferenças significativas relacionadas aos valores de concentração de óleo essencial (oEd); alfa-humuleno (α -humu) e a dexametasona (Dexa) e da produção da inibição de óxido nítrico em células estimuladas com LPS em três experimentos foram calculados por ONE WAY ANOVA, seguidamente com o Teste Comparativo Múltiplo de Bonferroni ($^ap = 0,05$ vs Dexa 125. $^bp < 0,05$ vs Dexa 62,5 . $^cp < 0,05$ vs LPS).....120

Figura 14. Efeito do óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* na migração e proliferação de fibroblastos usando ensaio de *scratch* depois de 24 horas de incubação com DMEM (controle) ou 542,2µg/ml de óleo. Os dados estão expressos em porcentagem de área da ferida com tratamento e sem tratamento de três experimentos.....124

Figura 15. Imagem do microscópio para avaliar a cicatrização da ferida *in vitro* do óleo essencial de *E. dysenterica* no ensaio de *scratch* utilizando uma monocamada confluyente de fibroblastos. Migração de células para a ferida foi observada em resposta a uma lesão artificial. Uma única área representativa é apresentada imediatamente após o ferimento (0 h) representando o controle sem e com tratamento; bem como o efeito na migração e proliferação após 24 h incubação ..124

Figura 16. Efeito do alfa-humuleno puro na migração e proliferação de fibroblastos usando ensaio de *scratch* depois de 24 horas de incubação com DMEM (controle) ou 577,4µg/ml do padrão. Os dados estão expressos em porcentagem de área da ferida com tratamento e sem tratamento de três experimentos.....125

Figura 17. Imagem do microscópio para avaliar a cicatrização da ferida *in vitro* do alfa-humuleno no ensaio de *scratch* utilizando uma monocamada confluyente de fibroblastos. Migração de células para a ferida foi observada em resposta a uma lesão artificial. Uma única área representativa é apresentada imediatamente após o

ferimento (0 h) representando o controle sem e com tratamento; bem como o efeito na migração e proliferação após 24h incubação.....	126
Figura 18. Efeito do óleo essencial das folhas de <i>E. dysenterica</i> na migração e proliferação de queratinócitos usando ensaio de <i>scratch</i> depois de 84 horas de incubação com DMEM (controle) ou 399,2µg/ml de óleo. Os dados estão expressos em porcentagem de área da ferida com tratamento e sem tratamento de três experimentos.....	126
Figura 19. Imagem do microscópio para avaliar a cicatrização da ferida <i>in vitro</i> no ensaio de <i>scratch</i> utilizando uma monocamada confluyente de queratinócitos. Migração de células para a ferida foi observada em resposta a uma lesão artificial. Uma única área representativa é apresentada imediatamente após o ferimento (0 h) representando o controle sem e com tratamento; bem como o efeito na migração e proliferação após 84 h incubação	127
Figura 20. MEV das micropartículas produzidas por <i>spray-drying</i> contendo somente quitosana, micropartículas vazias visualizadas em X 2000 (A) e X 4000 (B).....	131
Figura 21. MEV das micropartículas produzidas por <i>spray-drying</i> contendo quitosana e EBA, micropartículas vazias visualizadas em X 2000 (A) e X 4000 (B).....	132
Figura 22. Emulsão com micropartículas fase inicial (A) e fase final (B)	135
Figura 23. Teor de catequina na emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de <i>E. dysenterica</i> em temperatura ambiente e refrigeração por até 60 dias e nas micropartículas em similar período e estocagem.....	138
Figura 24. Perfil cromatográfico por CLAE da emulsão com micropartículas de quitosana carregadas de EBA.....	138
Figura 25. Perfil de liberação <i>in vitro</i> de catequina contida no extrato bruto EBA, MP QS Ext (micropartículas sólidas) e emulsão com micropartículas contendo EBA p<0,0001 usando Two way Anova.....	141

Figura 26. Catequina recuperada da pele suína após 24 h de experimento de permeação *in vitro* a partir de três amostras: extrato seco bruto EBA, MP QS Ext (micropartículas sólidas) e Emulsão com micropartícula contendo EBA, $p < 0,0001$ usando Two way Anova.....142

Figura 27. Imagens do ensaio HET-CAM. Representando a membrana após 300 segundos de exposição ao NaOH (0.1N) controle positivo (A), NaCl (0.9%) e azeite, controles negativos (B e C), óleo 1168µg/mL (D) veículo: emulsão base (E); EBA 500µg/mL (F); emulsão óleo 1168µg/mL (G) e emulsão EBA 500µg/mL (H). As imagens representam (n=5/substâncias analisadas).....145

Figura 28. Atividade angiogênica dos derivados vegetais obtidos das folhas de *E. dysenterica*. Controles negativos: azeite, água estéril e emulsão base. Controle inibidor: dexametasona 80 µg/disco. Controle indutor: Regederm 20mg/disco. Amostras avaliadas: extrato bruto aquoso (EBA) 125µg/disco; óleo essencial 292µg/disco; emulsão com micropartículas 125µg/disco e emulsão com óleo essencial 292µg/disco. A avaliação das MCA após 72h de exposição aos tratamentos mostraram uma resposta pró-angiogênica por pontuação semiquantitativa macroscópica. As imagens ilustram exemplos representativos das diferentes respostas (pontuação variando de 0 a 5) como observado sob uma luz de microscópio Axiovert com o auxílio do software AxioVision 100 - Zeiss, Alemanha, na ampliação de 0,5x1,25.....147

Figura 29. Determinação do pH das nanoemulsões armazenadas por até 60 dias em temperatura ambiente ou refrigerada.....151

Figura 30. Determinação do potencial zeta das nanoemulsões em função do tempo e temperatura.....152

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Plantas utilizadas para doenças de pele.....	32
Tabela 2 – Formulações disponibilizadas comercialmente para tratamento de tecidos epiteliais lesionados.....	34
Tabela 3 – Compostos identificados nas folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> e nos derivados vegetais das mesmas.....	51
Tabela 4 – Concentrações das amostras usadas no ensaio.....	78
Tabela 5 – Medicamentos utilizados no tratamento de feridas.....	95
Tabela 6 – Halos de inibição (mm) produzidos por EBA contra <i>S. aureus</i> 25923 por difusão em disco ou poço.....	110
Tabela 7 – Halos de inibição (mm) produzidos por EBA contra <i>S. aureus</i> 29213 por difusão em disco ou poço.....	111
Tabela 8 – Concentração inibitória mínima CIM ($\mu\text{g/mL}$) produzida pelos derivados vegetais e substâncias padrão por microdiluição contra bactérias Gram-positivas de relevância clínica.....	112
Tabela 9 – Valores de IC_{50} para as linhagens celulares de fibroblasto (L929), queratinócito (HaCat) e macrófago (RAW 264.7).....	117
Tabela 10 – Resultados obtidos para o tempo de estabilidade das amostras para avaliação do pH na emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de <i>E. dysenterica</i> e no placebo.....	135
Tabela 11 – Características organolépticas observadas para o tempo de estabilidade das amostras de emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de <i>E. dysenterica</i> e no placebo.....	136

Lista de Quadros

Quadro 1 – Formulação em base creme	87
Quadro 2 – Formulações em base creme com micropartículas carregadas de extrato aquoso ou óleo essencial das folhas de <i>E. dysenterica</i>	88
Quadro 3 – Nanoemulsão base.....	88
Quadro 4 – Nanoemulsão preparada com óleo essencial obtido das folhas de <i>E. dysenterica</i>	89

Lista de Abreviaturas e Siglas

AINEs – Anti-inflamatório não esteroidal
AMH - Ágar Mueller Hinton
AMP – Ampicilina
AMOX - Amoxicilina
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A-O – Água em óleo
BHT – Hidroxitolueno Butilado
BPF – Boas Práticas de Fabricação
CBM – Concentração bactericida mínima
Cd – Cádmio
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
CIM – Concentração Inibitória mínima
CMH – Caldo Mueller Hinton
COFID – Consolidado de Normas da Coordenação de Medicamentos Fitoterápicos e Dinamizados
COX2 – Ciclooxygenase-2
DCB – Denominação Comum Brasileira
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPPH – 2,2 difenil-1-picril-hidrozil
CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Performance
CQ – Controle de Qualidade
EBA – Extrato Bruto Aquoso
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ERO – Espécie Reativa de Oxigênio
ERN – Espécie Intermediária de Nitrogênio
FB – Farmacopeia Brasileira
FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz
GMQE – Gel com Micropartículas de Quitosana contendo EBA
GMQV – Gel com Micropartículas de Quitosana Vazias
HET-CAM – Membrana cório-alantóide do ovo embrionado de galinha

IC₅₀ – Concentração inibitória de 50%

IFAV – Insumo Farmacêutico Ativo Vegetal

IN – Instrução Normativa

iNOS – Óxido nítrico sintetase induzível

IPNI – International Plant Name Index

LACEN - DF – Laboratório Central de Saúde do Distrito Federal

LPS – Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

LTMAC – Laboratório de Tecnologia em Medicamentos e Cosméticos

MCA – Membrana cório alantóica

MEV – Microscópio de Varredura

MQE – Micropartículas de Quitosana contendo EBA

MQV – Micropartículas de Quitosana Vazias

MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

NEED – N-1-naftil-ethylendiamide-dicloridrato

NF-κB – Fator nuclear kappa B

O-A – Óleo em água

oEd – Óleo essencial

OMS – Organização Mundial da Saúde

ON – Óxido nítrico

OXA – Oxacilina

Pb – Chumbo

PBS – Solução salina tamponada

PDI – Índice de polidispersão

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

PUC Campinas – Pontifícia Universidade Católica de Campinas

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

RE – Resolução

SFB – Soro bovino fetal

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF – α – Fator de necrose tumoral alfa

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UnB – Universidade de Brasília

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

UR – Umidade relativa

UVA – Raio ultravioleta

VEGF – Fator de crescimento endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1 CONTROLE DA QUALIDADE DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	29
2.2 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E PERSPECTIVAS MERCADOLÓGICAS.....	31
2.3 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO.....	35
2.3.1 Microencapsulação.....	36
2.3.2 Microencapsulação e Sistemas de Liberação.....	36
2.4 A PELE.....	40
2.4.1 Inflamação e Cicatrização.....	42
2.4.2 Doenças da Pele.....	44
2.4.3 Metabólitos Secundários no Restabelecimento do Tecido Epitelial.....	46
2.5 <i>EUGENIA DYSENTERICA</i>	49
2.5.1 Atividades farmacológicas.....	52
2.5.2 Estudos toxicológicos.....	55
3 OBJETIVOS.....	57
3.1 OBJETIVO GERAL.....	57
3.1.2 Objetivos Específicos.....	57
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	59
4.1 PARÂMETROS DE CONTROLE DA QUALIDADE DA DROGA VEGETAL.....	59
4.1.1 Detalhes da Coleta.....	59
4.1.2 Identificação do Material Botânico.....	59
4.1.3 Caracterização Organoléptica.....	59
4.1.4 Secagem e Conservação.....	60
4.1.5 Testes de Pureza e Integridade.....	60
4.1.5.1 Determinação de Matérias Estranhas.....	60
4.1.5.2 Determinação de Água.....	60
4.1.5.3 Determinação de Cinzas Totais.....	61
4.1.5.4 Determinação de Contaminantes Microbiológicos.....	61
4.2 PARÂMETROS DE CONTROLE DA QUALIDADE DOS DERIVADOS VEGETAIS.....	63
4.2.1 Solvente e Método Utilizado na Extração dos Derivados Vegetais.....	63

4.2.2 Relação Aproximada de Droga Vegetal:Derivado Vegetal.....	63
4.2.3 Testes de Pureza e Integridade.....	63
4.2.3.1 Determinação de Metais Pesados.....	63
4.2.3.2 Determinação de Contaminantes Microbiológicos.....	64
4.2.4 Caracterização Físico-Química.....	65
4.2.4.1 Caracterização Físico-Química do Extrato seco.....	65
4.2.4.1.1 <i>Granulometria</i>	65
4.2.4.1.2 <i>Determinação de água</i>	66
4.2.4.1.3 <i>Determinação de Resíduo Seco</i>	66
4.2.4.1.4 <i>Determinação da Solubilidade</i>	66
4.2.4.1.5 <i>Determinação da Densidade Aparente</i>	66
4.2.4.1.6 <i>Determinação de Substâncias Extraíveis por Etanol</i>	67
4.2.4.2 Caracterização Físico-Química do Óleo Essencial.....	67
4.2.4.2.1 <i>Determinação da densidade</i>	67
4.2.4.2.2 <i>Determinação do Índice de refração</i>	67
4.2.4.2.3 <i>Rotação óptica</i>	67
4.2.5 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador.....	68
4.2.5.1 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador no Extrato Aquoso das Folhas de <i>Eugenia dysenterica</i>	68
4.2.5.2 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador no Óleo Essencial de Folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> por Cromatografia de Gases Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).....	68
4.3 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS DERIVADOS VEGETAIS DAS FOLHAS DE <i>Eugenia dysenterica in vitro</i>.....	69
4.3.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	69
4.3.1.1 Método de Difusão em Agar.....	73
4.3.1.2 Método de Microdiluição em Caldo.....	74
4.3.1.3 Concentração Bactericida Mínima.....	75
4.3.2 Avaliação da viabilidade celular.....	75
4.3.3 Atividade Anti-inflamatória – Dosagem de Óxido Nítrico.....	77
4.3.4 Avaliação de Fechamento de Lesão em Monocamada (<i>Scratch assay</i>)....	77
4.4 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS DERIVADOS VEGETAIS DAS FOLHAS DE <i>EUGENIA DYSENTERICA in vivo</i>.....	80

4.4.1 Avaliação do Potential de Irritação na Membrana Coriolantóica de Ovo Embrionado de Galinha – MCA (Hen’s Egg Test—Chorioallantoic Membrane - HET-CAM).....	80
4.4.2 Avaliação da Atividade Angiogênica na Membrana Corioalantóica do ovo Embrionado de Galinha.....	81
4.5 DESENVOLVIMENTO DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES CONTENDO EXTRATO AQUOSO BRUTO OU ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Eugenia dysenterica</i>	82
4.5.1 Gel contendo extrato aquoso das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i>.....	83
4.5.2 Preparo das Micropartículas de Quitosana.....	83
4.5.2.1 Caracterização das Micropartículas.....	84
4.5.2.1.1 <i>Rendimento</i>	84
4.5.2.1.2 <i>Eficiência de Encapsulação</i>	85
4.5.2.1.3 <i>Granulometria</i>	85
4.5.2.1.4 <i>Morfologia das Micropartículas</i>	85
4.5.2.1.5 <i>Potencial Zeta</i>	86
4.5.3 Gel Contendo Extrato Aquoso das Folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> Microencapsulado	86
4.5.4 Preparo da Emulsão.....	86
4.5.5 Preparo da Nanoemulsão.....	88
4.5.5.1 Tamanho da Gotícula, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta da Nanoemulsão com Óleo.....	89
4.6 CONTROLE DA QUALIDADE DO PRODUTO ACABADO.....	89
4.6.1 Características organolépticas.....	90
4.6.2 Determinação do potencial hidrogeniônico.....	90
4.6.3 Análise Quantitativa do Teor de Catequina para <i>Eugenia dysenterica</i>.....	90
4.6.4 Determinação de Contaminantes Microbiológicos.....	91
4.7 ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE LIBERAÇÃO DA CATEQUINA DA EMULSÃO COM MICROPARTÍCULAS CARREGADAS COM EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE <i>EUGENIA DYSENTERICA</i>	92
4.8 <i>ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO</i> DA CATEQUINA DA EMULSÃO COM MICROPARTÍCULAS CARREGADAS COM EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE <i>Eugenia dysenterica</i>	93
4.9 ESTUDO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FORMULAÇÃO....	94

4.10 ANÁLISE DOS DADOS.....	95
4.11 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	95
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
5.1 PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE DA DROGA VEGETAL.....	96
5.1.2 Identificação do Material Botânico.....	96
5.1.3 Caracterização Organoléptica da Droga Vegetal.....	96
5.1.4 Secagem e Armazenamento.....	97
5.1.5 Testes de Pureza e Integridade.....	97
5.1.5.1 Determinação de Matérias Estranhas.....	97
5.1.5.2 Determinação de Água.....	98
5.1.5.3 Determinação de Cinzas Totais.....	98
5.1.5.4 Determinação de Metais Pesados.....	99
5.1.5.5 Determinação de Contaminantes Microbiológicos.....	101
5.2 PARÂMETROS DE CONTROLE DA QUALIDADE DOS DERIVADOS VEGETAIS.....	102
5.2.1 Relação Aproximada de Droga Vegetal : Derivado Vegetal.....	102
5.2.2 Testes de Pureza e Integridade.....	103
5.2.2.1 Determinação de Metais Pesados.....	103
5.2.2.2 Determinação de Contaminantes Microbiológicos.....	104
5.2.3 Caracterização Físico-Química dos Derivados Vegetais.....	104
5.2.3.1 Caracterização Físico-Química do Extrato Aquoso de Folhas de <i>E. dysenterica</i>	104
5.2.3.1.1 <i>Granulometria</i>	104
5.2.3.1.2 <i>Determinação de Água</i>	104
5.2.3.1.3 <i>Determinação de Resíduo Seco</i>	105
5.2.3.1.4 <i>Determinação da Solubilidade</i>	105
5.2.3.1.5 <i>Determinação da Densidade Aparente</i>	105
5.2.3.1.6 <i>Determinação de Substâncias Extraíveis por Etanol</i>	105
5.2.3.2 Caracterização Físico-Química do Óleo Essencial.....	106
5.2.3.2.1 <i>Determinação da densidade</i>	106
5.2.3.2.2 <i>Determinação do Índice de Refração</i>	106
5.2.4 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador nos Derivados Vegetais de <i>Eugenia dysenterica</i>.....	106

5.2.4.1 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador no Extrato Aquoso de <i>Eugenia dysenterica</i>	106
5.2.4.2 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador no óleo essencial das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i>	108
5.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS DERIVADOS VEGETAIS DAS FOLHAS DE <i>Eugenia dysenterica</i>	109
5.3.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana e Concentração Bactericida Mínima.....	109
5.3.2 Avaliação da Viabilidade celular.....	114
5.3.3 Atividade Anti-inflamatória – Dosagem de Óxido Nítrico.....	118
5.3.4 Avaliação do Fechamento de Feridas – Ação cicatrizante.....	123
5.4 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO EXTRATO AQUOSO SECO DE <i>EUGENIA DYSENTERICA</i>	128
5.4.1 Desenvolvimento das Formulações.....	129
5.4.1.1 Caracterização das Micropartículas.....	130
5.4.1.1.1 <i>Rendimento</i>	130
5.4.1.1.2 <i>Eficiência de Encapsulação</i>	130
5.4.1.1.3 <i>Granulometria</i>	131
5.4.1.1.4 <i>Morfologia</i>	131
5.4.1.1.5 <i>Potencial Zeta</i>	132
5.4.2 Desenvolvimento da Formulação Semi-sólida – Emulsão com Micropartículas de Quitosana e Extrato Bruto Aquoso (EBA).....	133
5.4.2.1 Controle da Qualidade do Produto Acabado – Estudo de estabilidade.....	134
5.4.2.2 Avaliação do Potencial Irritante dos Derivados Vegetais das Folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> Usando Membrana Corio Alanatoide (MCA).....	144
5.4.2.3 Avaliação da Atividade Angiogênica dos Derivados Vegetais das Folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> Usando Membrana Cório Alanatoide (MCA).....	146
5.4.3 Desenvolvimento das Formulações Semi-sólidas – Emulsão com Óleo Essencial.....	150
5.4.4 Desenvolvimento das Formulações – Nanoemulsão com Óleo Essencial das Folhas de <i>E. dysenterica</i>.....	151
6 CONCLUSÃO.....	156
ANEXO 1.....	157
REFERÊNCIAS.....	158

1 INTRODUÇÃO

Atualmente é descrita uma grande variedade de metabólitos secundários produzidos pelas plantas que atuam na primeira linha de suas defesas, tendo-se revelado responsáveis por amplo espectro de atividades biológicas fundamentais para o ser humano (1). Inúmeras destas moléculas já tiveram suas atividades biológicas comprovadas, incluindo os flavonoides e terpenos, dos quais a grande maioria apresenta atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante associadas à melhora de lesões cutâneas (2-5).

O interesse no uso de plantas medicinais como recurso terapêutico está registrado na história. Esta prática terapêutica é documentada mundialmente, reconhecida e valorizada a sua aplicação para manutenção da saúde (6-9). Desde então, esforços têm sido realizados para que estas moléculas bioativas sejam exploradas de forma segura e eficaz, e assim, possibilitar a solidificação ao acesso a este recurso terapêutico de maneira coerente, além de atender as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e às políticas públicas de uso de fitoterápicos brasileiras: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (10-14).

Visando contribuir com a busca de plantas com potencial terapêutico a espécie *Eugenia dysenterica* Mart. DC. (Myrtaceae) é uma importante planta nativa do Cerrado e de amplo uso tradicional, principalmente para fins medicinal e alimentício, esta planta é popularmente conhecida como cagaita ou cagaiteira (15). Na medicina tradicional as folhas são usadas para ação antidiarreica e os frutos têm propriedades laxativas (16). Nas folhas deste representante do gênero *Eugenia*, já foram identificadas diversas classes de compostos, como taninos, flavanoides, saponinas, terpenos, cumarinas e suas atividades farmacológicas podem ser atribuídas a estes compostos, sendo assim, a composição mostra elevado potencial para produzir novas formulações (16-18). A presença destes metabólitos pode estar associada aos efeitos farmacológicos como antimicrobiano, antioxidante, modulador de resposta imune dentre outros.

Estudos biológicos apontam para o potencial de fontes de ativos advindos de *E. dysenterica* comporem um possível agente de uso dermatológico elaborado a

partir das folhas desta espécie. Moreira et al. (2017) avaliaram o extrato hidroalcolico e observaram potencial regeneração de células epiteliais após exposição a raios ultravioletas (UVA) que penetram mais profundamente na pele, além de considerável inibição das enzimas tirosinase, elastase e colagenase, atribuindo estas ações a atividade antioxidante (19). Além disso, a atuação sobre a inibição de tirosinase está bem documentada, corroborando a indicação acima relatada (20). E mais, o extrato aquoso das folhas exibiu atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, microrganismo comumente relacionado com afecções cutâneas (21).

A lacuna a ser preenchida com o estudo, é aliar o excelente potencial destas classes de biomoléculas com propriedades terapêuticas e o futuro desenvolvimento de medicamentos, pois estas apresentam limitada estabilidade e permeação na pele (22, 23). Formulações desenvolvidas com sistemas de liberação têm como função: (a) manutenção da estabilidade de ativos; (b) facilitar a aplicação; (c) modular a absorção se alcançar a taxa de liberação sustentada do ativo a uma camada ou mais da pele (24).

As micropartículas poliméricas têm sido amplamente empregadas no desenvolvimento de fármacos, representando uma significativa estratégia terapêutica (25). Nessa perspectiva, a microencapsulação vem sendo utilizada como uma estratégia interessante para a veiculação de fármacos para administração de terapias dermatológicas. Em vista do exposto, a microencapsulação pode viabilizar benefícios estéticos e funcionais à formulação, em razão de proporcionar maior estabilidade, modular a taxa de liberação e permeação (24, 26, 27).

Além disso, o interesse em encontrar compostos naturais para o emprego em produtos farmacêuticos de uso tópico tem aumentado consideravelmente, com o intuito de prover alternativas aos corticosteroides, os quais têm sido restringidos devido aos seus efeitos adversos mais impactantes: a ação imunossupressora que conseqüentemente favorece a susceptibilidade para infecções bacterianas e fúngicas, bem como pelas comprovadas reações adversas tal como hipersensibilidade e atrofia cutânea (28, 29).

Formulações contendo derivados vegetais compõem uma parcela considerável do mercado de medicamentos e são muito explorados mundialmente (30). Este mercado apresenta ascensão, o segmento dos medicamentos à base de compostos de plantas, mundialmente representou uma receita de cerca de 26

bilhões de dólares em 2011 e, atualmente o mercado global esta movimentando mais de 80 bilhões de dólares e com perspectivas de crescimento (22, 31). No Brasil este nicho de mercado movimenta aproximadamente 1 bilhão de reais anualmente (32, 33).

Além de valer-se dos requisitos primordiais preconizados para fitoterápicos é recomendado considerar as necessidades epidemiológicas da população e a demanda de novos tratamentos para as carências medicamentosas somando-se a uma opção alternativa de tratamento, pontos importantes que estão relacionados às profundas mudanças ao longo das últimas décadas em função da emergência e das resistências de patógenos, obesidade e diabetes, as quais constituem problema de saúde global com altos custos econômicos (34-36). Com isso, há um aumento de indivíduos acometidos por inflamações e por conseguinte a qualidade de vida destes é afetada (37-39).

A inflamação epitelial principia quando ocorre um dano, seja por agentes endógenos ou exógenos abrindo-se precedente para o desencadeamento do processo inflamatório (40). A recuperação da pele é o resultado de um processo complexo que envolve várias etapas e o tratamento envolve a administração de substâncias que estimulem o processo de cicatrização e por vezes com atividade antimicrobiana (41-43).

Avanços nas pesquisas com derivados vegetais estão em ascensão, pelo fato de possibilitarem aliar a estes produtos o desenvolvimento tecnológico e despertarem o interesse da indústria farmacêutica. O emprego de novas tecnologias usando biopolímeros, como quitosana, permitem uma gama mais ampla de alternativas terapêuticas para estarem disponíveis para tratamentos principalmente de lesões de pele uma vez que este polímero é biocompatível (44). A concepção e utilização de sistemas de liberação de fármacos somam vantagens à forma farmacêutica, como otimização da biodisponibilidade e estabilidade de constituintes derivados de vegetais são umas das aplicações (45).

No presente trabalho as análises foram conduzidas com as folhas de *E. dysenterica* para a obtenção dos derivados vegetais empregados na detecção da atividade cicatrizante e antimicrobiana. Para isso inicialmente foi abordada as informações sobre o controle de qualidade da matéria-prima vegetal, estabelecidos pela legislação, por meio de técnicas fundamentadas na FB. O controle de qualidade agregou a caracterização botânica, a prospecção fitoquímica, testes de

autenticidade e pureza, ensaios microbiológicos, biofarmacológicos e toxicológicos. Além disso, objetivou-se estabelecer e caracterizar uma forma farmacêutica tópica composta por derivados vegetal de *E. dysenterica*, com a proposta de elaboração de um produto fitoterápico que atenda os critérios legais somado à aplicabilidade farmacológica para tratamento de lesões epiteliais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Considerando que nas últimas décadas mundialmente têm-se observado uma enorme demanda de uso das plantas medicinais, a OMS (2014-2023) atualizou as estratégias sobre medicina tradicional alicerçada nas anteriormente propostas, este incremento objetiva melhorias como: prestar apoio aos Estados Membros para que aproveitem a possível contribuição da medicina tradicional complementar a saúde, bem estar e a atenção centrada nas pessoas, e promover a utilização segura e eficaz desta prática terapêutica mediante a regulamentação de produtos, práticas e profissionais (11, 46). Assim, atenção tem sido dispendida sobre segurança e regulamentações sobre plantas medicinais com potencial farmacológico (47).

Neste sentido, assegurar a disponibilidade de matéria-prima vegetal de qualidade é imprescindível. Para isso, enfoque deve ser dispensado às diversas etapas envolvidas na elaboração de um medicamento fitoterápico que permitem certificar sua qualidade, estas compreendem desde uma das mais primordiais que é a forma de obtenção da matéria-prima e identificação botânica, somados as análises fitoquímicas, farmacológicas e toxicológicas, transpondo as etapas de boas práticas de produção que visam comprovar a ausência de contaminantes que possam causar danos à saúde e finalmente, resultando em um produto de qualidade e seguro (1, 48).

Outro aspecto importante no desenvolvimento de fitoterápicos é a padronização, pois diversos são os fatores que influenciam a uniformidade de uma matéria-prima vegetal como edafo-climáticos, genéticos, estágio fenológico e procedimentos pós-colheita (48). Para isso, técnicas como cromatografia líquida e gasosa são utilizadas buscando determinar alguns compostos determinados como marcadores (analítico ou ativo), que servem como parâmetros para determinar o teor

em derivados vegetais e formulações, ou seja, estando o teor do marcador em quantidade validada pode-se presumir que as demais substâncias estarão presentes igualmente (49). Tal pré-requisito endossa os efeitos terapêuticos alegados e, conseqüentemente proporciona segurança ao usuário.

Medicamentos fitoterápicos são regulamentados pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 26/2014, norma que se aplica ao registro deste tipo de medicamento bem como pelo Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico (48, 49).

Ainda buscando a obtenção de um produto dentro das normas requeridas a produção desta categoria de medicamento segue a RDC nº 17/2010 sobre boas práticas de fabricação seguindo os Requisitos de Controle da Qualidade (CQ) e Controle do Insumo Farmacêutico Ativo Vegetal (IFAV), assim como a RDC nº 69/2014 a qual dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumo Farmacêutico Ativo (50, 51).

Conforme especificado na RDC nº 26/2014, os estudos de estabilidade dos medicamentos fitoterápicos semelhante aos alopáticos devem ser conduzidos conforme preconizado na RE Nº 01/2005, que propõe que seja feito estudo acelerado de 6 meses ou de longa duração de 12 meses, para medicamentos com validade de 12 e 24 meses, respectivamente, nestes períodos a variação do marcador deve ser menor ou igual a 5,0%, porém, os critérios para aceitação de variação do marcador serão aqueles estabelecidos no Guia, ou seja, será aprovado o lote que apresentar variação do marcador de 20% ou menos do teor de análise em relação ao tempo inicial e após 6 meses, o qual precisa ser demonstrado pelo perfil cromatográfico. Outros critérios que também necessitam ser aprovados são o aspecto e contaminantes microbiológicos. Esta mesma resolução também abrange as especificações para estudos de estabilidade de acompanhamento e de longa duração (48, 52).

Os estudos de estabilidade compreendem ensaios que possibilitam a análise e obtenção de informações para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar as condições de armazenamento do fitoterápico na validade esperada por meio da verificação das características físicas, microbiológicas, químicas e/ou biológicas, análises imprescindíveis para assegurar os efeitos terapêuticos (52).

Portanto, o imenso potencial das plantas e o valor comercial de um medicamento fitoterápico seguro, eficaz e de qualidade são preocupações

constantes da agência reguladora (32). Primar por atender os parâmetros de controle de qualidade em todas as etapas empregadas no desenvolvimento do processamento até a obtenção de formulação é essencial. Nesta esfera, devem ser considerados todos os fatores que podem influenciar de alguma forma tanto no processo produtivo como no produto final. As diretrizes descritas pelas regulamentações vigentes principiam pela confirmação da identidade e determinação da qualidade e pureza da droga vegetal, visando detectar possível adulteração da matéria-prima vegetal, portanto, a autenticação e caracterização podem garantir a reprodutibilidade do produto final disponibilizado em conformidade.

2.2 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS E PERSPECTIVAS MERCADOLÓGICAS

A diversidade de metabólitos secundários ofertados pelas plantas medicinais tem proporcionado inúmeras possibilidades terapêuticas para doenças imunológicas, inflamatórias, cardiológicas e principalmente para as infecciosas e oncológicas, esta potencialidade advém da diversidade química elaborada naturalmente pelos vegetais em prol de sua própria capacidade de defesa e a partir desta maquinaria busca-se moléculas que sejam ativas para doenças humanas (53). Entre as plantas que são fontes de biomoléculas de uso tópico para enfermidades cutâneas, inúmeras destacam-se (Tabela 1).

Tabela 1 - Plantas utilizadas para doenças da pele

Nome científico	Família	Alegação	Classe/Composto	Ref.
<i>Psorelea corylifolia</i>	Leguminosae	Psoríase/vitiligo	Cumarina/psoralem	(54)
<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f.	Xanthorrhoeaceae	Cicatrizante	Polissacarídeos e triterpenos	(55)
<i>Calendula officinalis</i> L.	Asteraceae	Anti-inflamatório, cicatrizante e antisséptico	Óleo essencial, carotenoides, triterpenos, esteroides, saponinas, ácidos fenólicos, flavonoides e antocianinas	(55)
<i>Lippia sidoides</i> Cham.	Verbenaceae	Anti-inflamatório, antisséptico da cavidade oral, afecções da pele e couro cabeludo. Antisséptico tópico, antimicótico e escabicida	Óleo essencial (timol, carvacrol), triterpenoides, naftoquinonas, taninos e flavonoides	(55)
<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	Leguminosae	Cicatrizante	Taninos, proantocianidinas, ácidos fenólicos e flavonoides	(55)

Neste contexto, o Brasil destaca-se em razão da magnitude da biodiversidade florística abarcada pelos seus biomas e suas potencialidades para contribuir com esta lacuna (56). Esta copiosa diversidade vegetal está intimamente aliada pelo histórico da constituição do país, que abrange etnias ricas culturalmente em conhecimentos acerca do uso de plantas para fins medicinais (57). No entanto, apesar do país possuir uma rica flora, contando com um número superior a 55 mil espécies descritas, há relatos que apenas 0,4% desta diversidade tenha sido investigada quanto ao seu potencial medicinal (58). Portanto, este tema é de amplo interesse das mais diversas classes, pois a multidisciplinariedade que perfaz esta questão propicia a elucidação acerca das carências deste setor tão importante.

No Brasil, para dar suporte a esta lacuna, foi aprovado, em 2006, a PNPIC e a PNPMF, a primeira contempla a implantação, adequação de ações e a inserção de serviços relacionados a plantas medicinais e demais alternativas de medicina tradicional ou complementar no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) com ênfase na saúde básica, e a segunda tem por objetivo regular sobre as diretrizes para garantir à população o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, almejando a promoção do uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (12, 13). E atualmente,

para dar suporte ao modo de utilização desta demanda foi elaborado o Memento Fitoterápico (55).

Alicerçado pelo Projeto Farmácia Viva, idealizado no estado do Ceará, pelo então Professor Francisco José de Abreu Matos, tem-se concebido a implantação de programas de fitoterapia direcionado para a atenção primária básica da saúde pública, com a finalidade de possibilitar alternativas de tratamento para suprir carências medicamentosas. Em virtude da diversidade cultural, geográfica e dos biomas que o Brasil dispõe, cada ente da federação delinea seu programa de ações e serviços com base nas plantas medicinais disponíveis para a região, portanto, pode haver diferenciações quanto aos produtos disponibilizados (59). No Distrito Federal, a experiência já vem de longa data, são quase três décadas de serviços prestados, fornecendo formas farmacêuticas líquidas e semissólidas, dentre as últimas, destacam-se os géis de Alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham) e o de babosa (*Aloe vera* (L.) Burm. f) e as pomadas de confrei (*Symphytum officinale* L.) e a de erva baleeira (*Cordia verbenacea*), todas de uso externo e com indicações como antimicrobiana, cicatrizante e/ou anti-inflamatória.

Conjectura-se que, cerca de 25% dos medicamentos existentes são resultantes direta ou indiretamente de plantas medicinais (58). Globalmente, o setor de medicamentos fitoterápicos movimenta um montante de aproximadamente 44 bilhões de dólares por ano, no caso do mercado brasileiro estima-se que esse mercado consuma entorno de 350 e 550 milhões de dólares (59). Este nicho de mercado no Brasil está em ascensão, pois tem crescido acima de 15% ao ano, contra 4% das vendas dos medicamentos sintéticos (32).

A expansão do mercado de fitoterápicos mundial avança rápida e expressivamente. Desta forma, esta classe de medicamento tem sido explorada nas mais diversas formas de apresentação, como xaropes, cápsulas, pomadas, gel, entre outras. Assim, para um futuro registro de um determinado fitoterápico faz necessário apresentar todos os testes de controle de qualidade imprescindíveis para a comprovação de qualidade do derivado vegetal utilizado, conforme preconizado no artigo 15 da RDC nº 26/2014, enquanto que os artigos 13 e 14 da mesma RDC estabelecem os requisitos mínimos para avaliação da qualidade da droga vegetal e o 16 do produto e no Guia de orientação para registro de medicamentos fitoterápicos e registro e notificação de produto tradicional fitoterápico (48, 49).

Já no âmbito do mercado de fitoterápicos genuinamente nacionais é notável a significância de fármacos como Giamebil®, Acheflan®, Fitoscar®, Kronel® e outros que tanto alavancam o desenvolvimento deste segmento e impulsionam prósperas pesquisas (60).

Em relação às formulações aprovadas de uso tópico para lesões cutâneas disponíveis no mercado, encontram-se alguns exemplos (Tabela 2).

Tabela 2 - Formulações disponibilizadas comercialmente para tratamento de tecidos epiteliais lesionados

Planta	Produto	Indicação	Constituinte bioativo	Vendas Laboratório	Ref.
<i>Camellia</i> <i>sinsensis</i> Kuntze (Theaceae)	Veregen® pomada	Verrugas genitais externas e perianais	Catequinas	4,5 milhões de dólares	(61)
<i>Chamomilla</i> <i>recutita</i> (Asteraceae)	Kamillosan®	Eczema, irritação e reepitelização de feridas	Terpenos (bisabolol e azuleno) e flavonoides		(62)
<i>Stryphnodendron</i> <i>adstringens</i> (Mart.) Coville (Leguminosae)	Fitoscar® pomada	Cicatrizante	Fenóis totais e taninos totais	1.775.000 reais Apsen	(60)
<i>Piptadenia</i> <i>colubrina</i> , <i>Schinus</i> <i>therebentifolius</i> , <i>Physalis</i> <i>angulata</i> , Linné e <i>Cereus</i> <i>peruvianus</i> , Miller	Sanativo® elixir spray e sabonete	Cicatrizante, anti-inflamatório	Taninos e flavonoides	Laperli	(63)
<i>Hevea</i> <i>brasiliensis</i> (Euphorbiaceae)	Regederm® Gel-creme	Cicatrizante	Proteína do latex	Pele Nova Biotecnologia	(64)

2.3 DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO

Com a tendência dos medicamentos fitoterápicos desempenharem um papel cada vez mais marcante na assistência à saúde, aqui no Brasil o registro destes foi estabelecido pela RDC nº 26/2014, sendo estes elaborados exclusivamente com matérias-primas ativas vegetais (extrato, tintura, óleo, exsudado, etc), porém, não é permitido serem constituídos de substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem mesmo da junção destas com derivados de drogas vegetais, tendo como finalidade profilática, curativa ou paliativa e cuja segurança e eficácia sejam embasadas em evidências clínicas, somando-se a reprodutibilidade e constância de sua qualidade (48).

No desenvolvimento da formulação farmacêutica fitoterápica exigências legais são pré-requisitos de ratificação da qualidade mediante o controle do teor do marcador, instruções da RE Nº 01/2005 e da qualidade do processo de manufaturamento (50, 52). Quanto à eficácia e a segurança podem ser validadas através de estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos, bem como pela comprovação da inexistência de contaminantes (49, 65).

O desenvolvimento de formas farmacêuticas contendo derivados vegetais associados a sistemas de liberação agrega um valor tecnológico na preparação do medicamento fitoterápico, para isso estratégias terapêuticas utilizando sistemas de liberação têm sido empregadas visando maximizar vantagens à formulação como melhoria da biodisponibilidade, proteção contra toxicidade, melhoria da atividade farmacológica, maior estabilidade, proteção contra degradação física e química, entrega sustentada e ação no sítio alvo (45).

Diversos tipos de sistemas, tendo como objetivo condicionar todas as vantagens anteriormente citadas estão disponíveis na área farmacêutica. Entre estes sistemas encontram-se os lipossomas, micropartículas, emulsão, nanoemulsões dentre outros (25, 45).

A aplicação de sistemas matriciais constituídos por polímeros é uma opção relevante na administração de fármacos, sendo um método que controla a liberação do ativo envolta por uma estrutura e proporciona biodisponibilidade de derivados vegetais para vias de administração dérmica, a pele é uma via de entrega

amplamente utilizada para medicamentos tópicos e é potencialmente um meio para uso de sistemas de liberação como micropartículas (25).

2.3.1 Microencapsulação

Com a metodologia da microencapsulação são formadas micropartículas por meio do englobamento dos compostos no interior de uma matriz envoltória, o que promove uma proteção contra alguns danos que possam ocasionar instabilidade do material aprisionado. Com esta técnica há o empacotamento, ou seja, o composto é envolvido completamente pela matriz (66).

Micropartículas constituem sistemas reservatório, onde o empacotamento do agente ativo dá-se no núcleo, então, a substância ativa está envolta por uma camada protetora do agente encapsulante, que faz com que o composto não esteja exposto ao meio externo e geralmente variam de tamanho entre 1 até 1000 μ m (67).

A microencapsulação teve seus primórdios na década de 1930, a partir da inspiração com a semelhança ao modelo de estrutura celular e tem sido investigada e empregada com progresso nas mais diversas áreas como a farmacêutica, alimentícia, cosmética, agrícola dentre outras (68, 69). A tecnologia de revestimento pode ser descrita como o empacotamento de partículas sólidas, líquidos ou dispersões, com uma matriz polimérica. A microencapsulação tem proporcionado a minimização de limitações no emprego de substâncias como compostos fenólicos que são instáveis e facilmente oxidáveis tornando imprescindível a mitigação de condições adversas como a presença de oxigênio e luz, então esta técnica apresenta funções como a proteção do composto ativo favorecendo a sua estabilidade e conseqüentemente a viabilidade (70).

2.3.2 Microencapsulação e Sistemas de Liberação

A aplicação desta modalidade tecnológica propicia modificar substancialmente a liberação de fármacos (67). O vasto emprego de sistemas de liberação utilizando microencapsulação para veiculação de fármacos é devido às vantagens, pois além de proteção do agente ativo e conseqüentemente de sua estabilidade, a capacidade de modificar a liberação do fármaco de maneira

sustentada e controlada em determinado sítio de ação confere ao produto características de interesse marcante (26).

O uso e o desenvolvimento de sistemas com micropartículas para administração de substâncias ativas na pele têm progredido e constituem alvo de eminente interesse.

A quitosana é um exemplo de carreador com características para compor revestimento de micropartículas, em razão de ser um polímero natural, tem relevante interesse por terem muitas vantagens como a capacidade de permear o tecido epitelial e promover mucoadesividade, biocompatíveis, estabilidade, por ser não imunogênica e atóxica, propiciar direcionamento do ativo para o sítio de ação pela capacidade de adsorção e absorção na pele, além de baixo custo e biodegradabilidade (26, 27, 71).

As micropartículas poliméricas têm sido amplamente empregadas no desenvolvimento de fármacos, representando uma significativa estratégia terapêutica (25). A incorporação de ativos em formulações dependendo da composição do agente muitas das vezes é dificultada, parte por conta da multiplicidade da constituição e conseqüentemente da sustentação da estabilidade, além disso, ao planejar-se uma formulação, esta necessita atender parâmetros para se alcançar a taxa de liberação sustentada do ativo a uma camada ou mais da pele e também é desejável que minimize os efeitos indesejáveis (24).

Nessa perspectiva, a microencapsulação vem sendo utilizada como uma estratégia interessante para a veiculação de fármacos para administração de terapias dermatológicas. Em vista do exposto, a microencapsulação pode viabilizar benefícios estéticos e funcionais à formulação, em razão de proporcionar maior estabilidade, modular a taxa de liberação e minimizar incompatibilidades entre os compostos constituintes da forma farmacêutica (24, 26, 27).

No processo de obtenção de micropartículas diversos carreadores podem ser utilizados como matrizes, alguns exemplo, são os polímeros naturais como a gelatina, a goma arábica, alginato e os derivados celulósicos, e dentre estes polímeros naturais destacamos a quitosana que tem sido alvo de muitos estudos (26, 27).

Certamente, o superior interesse que atrai o maior uso da quitosana, na composição de aplicações farmacêuticas para tratamentos via tecido cutâneo, sem dúvida alguma é sua potencial interação com a pele (26). Esta vantagem da

quitosana é devido este polímero possuir carga positiva (catiônica), o que confere à mesma a capacidade de mucoadesividade à pele, que tem carga negativa (aniônica), então, o ativo pode estar biodisponível por mais tempo (26, 44).

Atualmente, a quitosana é um dos polímeros mais utilizados para a produção de micropartículas para apresentações farmacêuticas (25). Micropartículas de quitosana contendo os mais diversos agentes ativos para liberação tópica destes compostos tem sido descrito na literatura. Os autores relatam que prepararam micropartículas de quitosana como excipiente para veicular com sucesso minoxidil, antioxidantes naturais, polifenóis (25, 26, 72-74).

A quitosana, um polímero hidrofílico natural, resultante da N-desacetilação básica da quitina, que é um abundante polissacarídeo de cadeia linear que compõe o exoesqueleto da fauna marinha de crustáceos principalmente, constituído de D-glicosamina e N-acetil-D-glicosamina (44). Por tratar-se de um polímero de carga positiva, sua solubilidade está intimamente ligada ao número de grupamentos aminos na cadeia polimérica, conseqüentemente do seu grau de desacetilação, da proporção entre as unidades D-glicosamina acetiladas e não acetiladas, desta forma ela é insolúvel em água. No entanto, em soluções ácidas com pH abaixo de 6 ela é solúvel. Solução de ácido acético entre 1 e 3% são comumente utilizadas para solubilizar a quitosana (44).

Muitos processos para produção de micropartículas são descritos na literatura, dentre estes, um dos mais usados é o método físico de secagem por aspersão denominada *spray drying* quando se trata de derivados vegetais a serem encapsulados (44, 75, 76). O vasto uso deste processo deve-se às vantagens que ele proporciona, tais como: rapidez, alta reprodutibilidade, uniformidade, controle das propriedades das micropartículas, permite produção contínua e transposição de escala, baixo custo, além de, pouco agressivo, característica esta que torna esta tecnologia conveniente para ativos termossensíveis (75).

O processo usando o aparelho *spray drying* é baseado na secagem de uma solução por uma corrente de ar quente e envolve alguns estágios: para isso primeiramente a quitosana é dissolvida em uma solução aquosa ácida, posteriormente o ativo é então disperso nesta solução e, em seguida procede-se a atomização (aspersão) do líquido formando pequenas gotículas, o contato do líquido com um leito de ar quente, a evaporação instantânea do solvente e a separação do produto em pó do ar de secagem que são as micropartículas originadas (75). A

atomização é iniciada quando ocorre a passagem da solução a ser secada, pelo bico atomizador o qual gera uma pulverização desta dentro de uma câmara onde passa ar quente, neste momento há a remoção do solvente e formação das micropartículas, as quais são conduzidas até um ciclone separador, onde são capturadas (44).

Outro material extensamente empregado na área farmacêutica é o Poloxamer 407[®], um copolímero geleificante, constituído de polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno, que apresenta propriedades termoreversíveis e bioadesividade, sendo amplamente aplicado em preparações para administração por diversas vias, dentre estas a tópica por prover uma liberação prolongada do agente terapêutico por ser biocompatível, pouca toxicidade e imunogenicidade, portanto, este tem sido usado para melhorar a disponibilidade de preparações farmacêuticas como antimicrobianos, anti-inflamatórios, analgésicos, anestésicos e outros (77). Recentemente, um estudo reportou que micropartículas de quitosana contendo catequina são promissores carreadores deste ativo para permeação cutânea (23). Também, é possível a combinação de Poloxamer com outros excipientes como micropartículas (78, 79). Assim como, a quitosana, o Poloxamer também já foi explorado conjuntamente com derivado vegetal, no caso, o ácido ricinoleico de sementes de mamona e com extrato de *Zingiber Officinale* Roscoe (80, 81).

Pelo fato dos derivados vegetais terem em sua composição numerosos compostos, isso pode favorecer instabilidade a formulações (82). Uma alternativa para resolução desta limitação é o uso de novas formas de incorporação, como por exemplo, as microencapsulação em esferas biodegradáveis feitas de polímeros de quitosana, que podem ser carregadas com materiais como extrato de planta (83).

Inovações tecnológicas têm sido empregadas no desenvolvimento de produtos buscando a melhoria tanto da eficácia, quanto de estabilidade, além de novas maneiras de atingir o sítio alvo (84).

Desafios tecnológicos têm sido vistos em compostos bioativos. Compostos fenólicos como taninos são altamente oxidáveis e, conseqüentemente, apresentam baixa tolerância ao contato com o ar, o que faz com que estes sofram degradação, então, uma proteção contra condições ambientais adversas que afetem seus efeitos, como presença de oxigênio é iminente (82, 83). Assim, torna-se notável a necessidade de desenvolver sistemas para proteger e liberar estes compostos. Logo, uma maneira para driblar este intercorrente, de modo a prolongar sua

estabilidade, bem como dos compostos ativos, como no armazenamento e, por conseguinte salvaguardar sua atividade baseia-se em algumas opções como a técnica de microencapsulação (83).

Os sistemas emulsionantes consistem da junção de dois líquidos imiscíveis, geralmente água e óleo, onde a fase dispersa ou interna é constituída por pequenas gotículas de líquido distribuídas no veículo. De acordo com a afinidade do dispersante por água ou óleo, classificam-se os sistemas em: óleo em água (O/A), onde o óleo é a fase interna ou água em óleo (A/O), onde a água é a fase interna. Os tensoativos fazem o papel de estabilizar o sistema prevenindo possíveis fenômenos de instabilidade, como por exemplo, a separação de fases. As emulsões podem ser classificadas como macroemulsões e microemulsões ou nanoemulsões, o que difere é o tamanho da gotícula. Macroemulsões compreendem gotículas entre 100 até 100.000nm, enquanto, nanoemulsões de 10 até 200nm e são transparentes (85-87).

Portanto, medicamentos elaborados com derivados vegetais têm faculdades terapêuticas relevantes, e quando aliados a sistemas de liberação são conhecidas às vantagens oportunas a serem exploradas com sucesso na delineação de uma forma farmacêutica. A importância da exploração destes mecanismos reside, entre outras vantagens, na possibilidade de modulação e de controle mais eficaz da liberação de fitoconstituintes como flavonoides, taninos, terpenoides serem pouco absorvidos em função do tamanho ou da solubilidade, limitando seu transporte em membranas biológicas ricas em lipídeos, o que limita a biodisponibilidade destes compostos naturais, por esta razão microesferas, emulsões, lipossomas e sistemas de liberação estão sendo usados para administração de medicamentos contendo derivados vegetais (25, 45).

2.4 A PELE

A pele é o maior órgão do corpo humano em termos de área, pois ela abarca cerca de $1,9\text{m}^2$ em um adulto de porte mediano, sua espessura é de aproximadamente 1,5mm e seu peso pode variar de 3 a 3,5kg. Ela é composta por diferentes estruturas e tipos celulares, que ao mesmo tempo em que atua como uma barreira de proteção, termorregulação, absorção, controle de evaporação e sensibilidade, também é este tegumento exterior que incumbe-se do papel de

interface entre o indivíduo e o ambiente para sua proteção, prevenindo contra abrasões e a invasão de microrganismos ou partículas, mas ao mesmo tempo comporta uma infinidade destes habitantes que são limitados pelo pH ácido, variando entre 5 e 6 (88). A pele está constituída por duas camadas principais, a epiderme e a derme que está abaixo da epiderme, enquanto a hipoderme é uma camada subjacente e não faz parte da pele (89, 90).

A epiderme é uma camada com espessura entre 0,04mm nas áreas das pálpebras e de 1,5mm nas regiões glabras (palmas e planta), compõe-se de duas parcelas compreendidas entre a epiderme viável, parte mais interna na qual queratinócitos se proliferam, sofrem alterações e dão origem aos corneócitos que formam o estrato córneo, a região mais superficial desta camada, Esta camada do tecido epitelial assim como o estrato córneo não é vascularizada, sendo nutrida pela derme (89, 90).

O estrato córneo faz o papel de barreira do tecido epitelial, ou seja, de suma relevância no que diz respeito à estudos de permeação, pois, com esta função o estrato córneo constitui um obstáculo na translocação de fármacos administrados cutâneamente, sendo que esta entrega pode ocorrer por três vias: intercelular, transcelular e transfolicular (apêndices) (91). Para uma substância ativa ultrapassar o estrato córneo via intercelular este difunde-se ao redor dos corneócitos, permanecendo constantemente dentro da matriz lipídica; já pela via transcelular, o fármaco passa diretamente através dos corneócitos e da matriz lipídica intercelular intermediária; enquanto que pela via apêndices os fármacos podem ser absorvidos pelo folículo piloso, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas (92).

A derme é a área mais interna da pele, constituída por tecido conjuntivo e infiltrada por vasos sanguíneos, pelos anexos cutâneos como os folículos pilosos, ductos das glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas, além de participarem desta estrutura células importantes para o processo de cicatrização como os fibroblastos e as células migratórias (macrófagos e linfócitos), dentre outras. A derme é ricamente constituída de matriz extracelular composta por fibras de colágeno e de elastina que conferem sustentação à pele (89, 90). As condições inflamatórias que acometem a pele ocorrem na derme (93).

A hipoderme é composta por tecido adiposo, reserva esta utilizada para desempenho da função de fomentar nutrientes e energia ao organismo e serve de sustentação e conexão (90).

A pele é colonizada por uma microbiota composta prioritariamente por agentes comensais (não patogênicos) e também por alguns que são transientes (residentes temporários). No entanto, caso o organismo encontre-se exposto a circunstâncias que predispõe a penetração de patógenos e ao desenvolvimento de doenças infecciosas, como a imunidade debilitada, estilo de vida, modos de higiene, este mesmo microrganismo que está habitando a pele em associação comensal, pode tornar-se um potencial agente patogênico apto a ocasionar anormalidades importantes nas funções fisiológicas e até mesmo morte, caso invadam tecidos sistêmicos produzindo doenças fatais (94, 95).

Uma análise revelou que a diversidade da microbiota da pele humana é superior em relação a outros locais que também são habitados por microrganismos como o intestino e a cavidade oral (96). Esta composição microbiana variada depende da topografia corpórea e está associada a características fisiológicas de cada área (97). *Staphylococcus aureus*, uma bactéria Gram-positiva provoca infecções na pele e é efetivamente a causa da vulnerabilidade de infecções nosocomiais, e é uma das que prevalecem na pele (89, 90).

Então, a pele destaca-se como uma via de administração de medicamentos para tratamento de lesões do tecido epitelial, entretanto, esta via apresenta limitações impostas pelo estrato córneo, o que torna a penetração cutânea restringida (90).

2.4.1 Inflamação e Cicatrização

O corpo ao entrar em contato com a potencial ameaça dos agentes patogênicos é capaz de lançar um arsenal para confrontar diferentes agentes invasores infectante, sendo esta função exercida principalmente por leucócitos (glóbulos brancos), mais precisamente monócitos que se transformam em macrófagos teciduais que são a primeira linha de defesa contra a infecção e os neutrófilos que são a segunda linha de defesa (94).

A inflamação é mediada pelas respostas imunológicas inata e adquirida e também auxiliada por mediadores buscando abolir o processo inflamatório agudo, mas caso esta função não alcance êxito é necessário lançar mão de recursos terapêuticos (95).

Lesões na pele após a exposição a agentes que danificam o tecido cutâneo primeiramente levam a uma resposta inflamatória, pois, assim que a barreira córnea sofre algum tipo de agressão seja por ferimento, agentes químicos, queimadura, agentes invasores, doenças crônicas ou outros agentes, esta resposta caracteriza-se por alguns fenômenos que são os sinais cardinais da inflamação, representados pela vermelhidão, inchaço, calor e dor, que em último caso pode resultar em perda da função (95). Células especializadas como macrófagos, são recrutados para fagocitarem os agentes patogênicos invasores, bem como os tecidos destruídos (90, 94).

Dentre todos os tecidos que constituem o corpo humano, o tecido cutâneo sem dúvida alguma é o que está mais exposto a diversos agentes químicos, físicos e microbiológicos, muitos destes são originadores de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies intermediárias de nitrogênio (ERN), tais como óxido nítrico (ON), que geram um estado pró-oxidante, conduzindo ao estresse oxidativo, como resultado podendo desencadear danos. Dentre os diversos fatores que podem provocar alterações no equilíbrio redox da pele, a exposição a agentes patogênicos é um dos fatores mais agravantes, por seu efeito inflamatório (98).

O progresso da reconstituição da pele quando ocorre perda da integridade por uma agressão física, química ou por agentes patogênicos que, em alguns casos, causam doenças é a cicatrização, este evento repara e remodela a área danificada dando origem a uma nova epiderme e tecido conjuntivo que compõe a derme, para isso esta resposta dá-se por dois modos: cicatrização de primeira e de segunda intenção (90).

Na cicatrização de primeira intenção a reconstituição ocorre quando as bordas da lesão se unem naturalmente ou com o auxílio de sutura. Na cicatrização de segunda intenção, por se tratar de um dano mais extenso há um distanciamento entre as margens do ferimento e considerável perda de substâncias, então exige-se um processo mais complexo para atingir a reconstituição da epiderme e da derme. O processo engloba a migração de queratinócitos que forma uma lâmina epidérmica com somente uma camada de células e proliferação de queratinócitos, enquanto na derme promove-se a germinação de tecido conjuntivo que irá recompor o tecido com propagação de fibroblastos que sintetizam fibras de colágeno e glicosaminoglicanos (90).

Independente se o rompimento da pele adveio de ação mecânica ou da ação de microrganismo, a pele é afetada quando o agente patogênico a infiltra ou ela perde a integridade. Logo, muitos tratamentos atuam auxiliando o restabelecimento do tecido epidérmico, dentre estes alguns são elaborados com derivados vegetais. Parte do esforço empreendido na busca de desenvolver medicamentos para tratamento tópicos constituídos por produtos oriundos da flora já estão presentes entre outros ofertados aos consumidores, tais como a pomada Fitoscar (60).

Atualmente, são inúmeras as opções farmacológicas para tratamento de infecções cutâneas. Algumas classes terapêuticas incluem os fármacos que são anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) como propionato, fenamato, paracetamol, salicilato e glicocorticoides (dexametasona, prednisolona). Porém, o uso de AINEs está associado com o aumento do risco de eventos adversos renais, gastrointestinais, cutâneos dentre outros; e de glicocorticoides com ulceração péptica e a cicatrização da pele pode ser desfavorecida (95, 99). Estes dados reforçam a necessidade de estudos para o desenvolvimento de novas opções medicamentosas para promover a cura de infecções em pacientes com restrições. Portanto, produtos que não apresentem impactos negativos podem ampliar as possibilidades de tratamento de saúde.

Na literatura, encontram estudos abordando o uso tópico de anti-inflamatórios adivindos de plantas medicinais ricas em sesquiterpenos (100-102).

2.4.2 Doenças da Pele

O corpo humano comporta múltiplos microrganismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e outros (89, 94). Estes podem ser encontrados colonizando diferentes áreas, dentre elas a pele. A variabilidade topográfica deste órgão oportuniza que certas doenças dermatológicas manifestam-se em sítios específicos, como no caso de dermatite atópica (eczema) que apresenta sinais clínicos sobre a curvatura interna do cotovelo e a psoríase no exterior deste (97). Porém, esta característica por vezes, não prevalece para espécies de *Staphylococcus*, uma vez que foi reportada a presença destes tanto em áreas com umidade ou não (97).

Alguns fatores que cooperam para a alteração da microbiota da pele são o uso excessivo de antimicrobianos, hábitos de higiene e comportamento, estes

consequentemente podem colaborar para o aumento de doenças dermatológicas (97).

Doenças infecciosas cutâneas causadas por microrganismos são extremamente prevalentes na população, uma vez que, quase 20% da população são carreadores do principal agente que provoca infecções de pele, a bactéria piogênica *Staphylococcus aureus* (103). Sua alta prevalência deve ser considerada devido à diversos fatores tais como ambientais, individuais, produção de enzimas invasivas e toxinas que cooperam para a progressão da doença (89). Em geral, doenças infecciosas representam uma importante causa de morbidade e mortalidade principalmente em localidades menos favorecidas (104).

O *Staphylococcus aureus*, pode vir a tornar-se patogênico em condições como nas que ocorrem dano que comprometem a integridade da barreira cutânea, com a pele rompida, a ferida constitui num potencial para que este microrganismo progrida para agente etiológico mais comum das infecções de pele. Pois, este agente patogênico ao difundir-se nos tecidos libera toxinas celulares letais, resultando em um processo vertiginoso inflamatório que irá isolar a região danificada dos demais tecidos circunvizinhos, ou seja, muito rapidamente os macrófagos estão prontamente presentes para a defesa contra a infecção (94).

Outras afecções bacterianas causadas pelo agente causal, o *S. aureus* são as foliculites, os furúnculos, impetigo e acne (105, 106).

As patologias de pele relacionadas à perda da integridade anatômica deste tecido resultam em uma sequência de complicações para o indivíduo, principalmente com o prolongamento da expectativa de vida da população tem sido associada a maior incidência de úlceras correlacionadas a situações incapacitantes e ao diabetes, além de outras lesões não menos significantes como as queimaduras e as provocadas por microrganismos. Neste contexto, é expressivo o desafio para a ampliação do desenvolvimento de produtos para tratamento tópico, uma vez que outros fatores psicossociais e fisiológicos estão envolvidos nestas situações, além de longos períodos de tratamento e altos custos para o sistema de saúde (107).

Como há uma lacuna terapêutica representada pelos pacientes que apresentam efeitos adversos às terapias convencionais, então, esta conjuntura fomenta o nicho farmacêutico na esfera da pesquisa de novas matérias-primas e no desenvolvimento tecnológico de formulações oriundas de produtos naturais, e a terapia com produtos elaborados com derivados vegetais tem ganhado destaque

nesses casos. Estes agentes tópicos podem ser administrados para prevenção como hidratantes, pela aceleração da cicatrização ou até mesmo melhorando a inflamação de lesões. Atualmente, fazem parte do elenco da lista de monografias do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira formulações para uso tópico como as a base de *Aloe vera* L. (cicatrizante), *Arnica montana* L. (anti-inflamatória), *Caesalpinia férrea* Mart. (cicatrizante e antisséptico), *Calendula officinallis* L. (antisséptico, anti-inflamatório e cicatrizante) e *Schinus terebinthifolia* Raddi que apresenta atividade anti-inflamatória e cicatrizante (108).

2.4.3 Metabólitos Secundários no Restabelecimento do Tecido Epitelial

Pesquisas por substâncias com potencial atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante têm sido expandidas rumo às possibilidades que as plantas oportunizam. As plantas são capazes de prover extraordinários compostos com atividades terapêuticas, os quais são representados pelos metabólitos secundários, princípios ativos que são substancialmente promissores para o desenvolvimento de medicamentos (30). É considerável enfatizar que, a produção destes metabólitos pelas plantas está relacionada a processos adaptativos em resposta a fatores como diferenças climáticas, nível de stress, disponibilidade hídrica, incidência luminosa, temperatura, nutrientes disponíveis, poluição e predação (109). Portanto, é importante ponderar estes aspectos, pois estes podem influenciar na taxa de princípio ativo, ou seja, na constância de composição que afeta o controle da qualidade, e conseqüentemente na qualidade e no valor terapêutico de produtos fitoterápicos.

Os metabólitos secundários são amplamente distribuídos no reino Plantae e têm sido associados a inúmeros efeitos biológicos tanto em favor da sanidade vegetal, quanto dispõe de atividades que beneficiam a saúde humana. Dentre esta variedade de compostos destacam-se os taninos, os terpenoides, os alcaloides e os flavonoides que apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante (2, 110).

Derivados vegetais, por conservarem inúmeros compostos bioativos, são de relevante valor, especialmente para fins terapêuticos. A camomila (*Matricaria recutita* L.), por exemplo, possui várias atividades medicinais e cosméticas, por isso ela é usada desde outrora até os dias atuais, pois seus compostos bioativos promovem

inúmeros benefícios, principalmente para o tecido cutâneo, sendo reportado que esta planta prove melhora de inflamações, de eczema e na cicatrização de feridas, atividades estas atribuídas a presença em sua composição de compostos fenólicos em especial os flavonoides, dentre eles a apigenina e a quercetina (62).

Compostos fenólicos advindos de plantas detêm potencial atividade antioxidante como o carvacrol, timol e principalmente o flavonoide catequina e quercetina que excepcionalmente tem maior ação de inibição até mesmo do que a vitamina C (111, 112). Vários compostos polifenólicos como flavonóides, lignanas, quinonas e outros exibem significativa atividade anti-inflamatória *in vivo* assim como *in vitro* e também terpenoides (107, 113).

Em muitas Myrtaceae os principais constituintes são compostos fenólicos, assim estes compostos são bem reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (114-117).

Especificamente, referindo-se a família Myrtaceae, pesquisas com membros desta família tem demonstrado atividade anti-inflamatória. Siani et al. (2013) avaliaram a ação anti-inflamatória de óleos essenciais de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e de *Psidium guajava* L. *in vivo*. Esse grupo computou esta ação à presença de limoneno, α -pineno e cariofileno (113). Da mesma forma, a ação antimicrobiana destas espécies foi relatada como potencial para tratar doenças infecciosas provocadas por *S. aureus* (115, 118). *Psidium guineense* Sw., conhecida como araçá, também é uma espécie promissora, e seu potencial de inibição foi atribuído aos taninos que encontra-se majoritariamente nesta espécie (119). Assim como, em *Syzygium jambos* (L.) Alston (120).

Além das plantas anteriormente comentadas pelo seu poder antimicrobiano, também é reportado que as plantas que apresentam predomínio de compostos fenólicos como as da família Lamiaceae como *Thymus vulgaris* L., *Melissa officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* Linn e *Salvia officinalis* L. tem sido reportadas como promissoras fontes para a busca de compostos com boa atividade antimicrobiana (121).

Investigações sobre o modo de ação dos taninos aventam que eles agem sobre os microrganismos ligando-se a proteínas e adesinas, inibindo enzimas bacterianas, rompendo a membrana celular e privação do substrato microbiano por formar um complexo tanino-proteína ou com polissacarídeo, inviabilizando o crescimento de microrganismos (1, 122, 123).

A atividade anti-inflamatória de plantas encontradas no Brasil, que são amplamente usadas para tratar injúrias da pele, tem sido avaliada, como da *Lychnophora trichocarpa* Spreng. (arnica) e da *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. (ucuúba) e tem sido verificada em estudos (124, 125).

Os metabólitos secundários estão sendo averiguados cada vez mais no tratamento de algumas condições médicas como o medicamento Veregen a base de catequina contida no extrato de chá verde (*Camellia sinensis*), o qual vem sendo empregado para tratamento de verrugas genitais, o uso do óleo de *Syzygium aromaticum* Spreng. (cravo) na prevenção de cáries (31, 126). Relacionado com as doenças de pele, algumas plantas são utilizadas no tratamento da psoríase, uma infecção de pele que acomete cerca de 1 a 3% da população mundial (127). A aplicação tópica veiculada em várias formas de *Triticum vulgare* Vill para tratar úlceras venosas (128). Além destas atividades, as plantas são promissoras para suprimir o processo inflamatório (129).

As plantas produzem compostos químicos que podem auxiliar na cura de inflamações, com atividade antimicrobiana e conjuntamente apresentar ação antioxidante (130-132). Compostos fenólicos como taninos e salicilatos já estão bem documentados para administração tópica (132). Uma forma de proteger a pele dos danos provocados pelo estresse oxidativo ocasionado por inúmeras fontes causadoras, como os agentes patogênicos e raios ultra-violeta tem sido a utilização de produtos oriundos da flora. O uso deste tipo de tratamento tem tido êxito para patologias causadas por estresse oxidativo (133).

Neste contexto, estudos apontam que a associação destes compostos naturais com efeito para doenças da pele aliados as tecnologias têm tido êxito. Zokti et al. (2016), reportaram que a microencapsulação de extratos de *Camellia sinensis* forneceu proteção para as catequinas presentes nesta planta, ou seja, maior estabilidade (134). Wisuitiprot et al. (2011), demonstraram que micropartículas elaboradas com quitosana impediram degradação enzimática das catequinas, indicando este biopolímero como promissor transportador da permeação deste ativo para o tecido epitelial (23). Assim, mecanismos de liberação podem ser usados como potenciais carreadores para liberação de ativos vegetais para alvos específicos, como o tecido epitelial.

2.5 EUGENIA DYSENTERICA

A família Myrtaceae abrange numerosas espécies usadas na medicina popular e destas algumas estão reconhecidamente citadas em farmacopeias pelas suas virtudes farmacológicas como o *Eucalyptus globulus* Labill, a *Eugenia caryophyllata* L. Merr. & Perry e a *Eugenia uniflora* L. (135-137). Na indústria de cosméticos a *E. uniflora* é utilizada pelas suas propriedades adstringentes (138).

A *E. dysenterica* (syn. *Stenocalyx dysentericus* DC.O. Berg., *Myrtus dysenterica* Mart.) é uma árvore frutífera nativa do Cerrado que compõe a família Myrtaceae e pertence ao gênero *Eugenia* (15, 139, 140). Comumente é conhecida como cagaíta (141). Diversos naturalistas que exploraram as terras brasileiras dentre os quais St. Hilaire, Burton, Castelnau, D'Orbigny, Spis & Martius já haviam se interessado por esta planta, pois há apontamentos destes em relação a cagaiteira (15, 142).

Eugenia dysenterica é conhecida popularmente como cagaiteira, trata-se de uma árvore perene, decídua (perde as folhas antes da floração), tronco tortuoso, casca com ampla espessura de cortiça, porte mediano, podendo chegar até cerca de 10 metros de altura, as folhas são semi-coriáceas, verdes na maturidade e avermelhadas quando jovens, glabras (Figura 1) (139, 143).



Figura 1 - Partes aéreas de *Eugenia dysenterica* Mart. DC. (A) folhas e frutos. (B) folhas.

No Cerrado brasileiro, *E. dysenterica* ocorre naturalmente, dispersando-se em vários estados do país (Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, São Paulo, Tocantins) e seus frutos são consumidos *in natura* ou processados para produção de geleias, sucos, sorvetes, licores (15).

Palhares et al. (2003) descrevem, além da caracterização macro e microscópicas, a presença de flavanoides, taninos e mucilagens nas folhas de cagaita (16). Vários compostos têm sido identificados nas folhas da espécie *E. dysenterica* (Tabela 3, destacando-se a catequina, um metabólito secundário pertencente a classe dos flavonoides Figura 2.

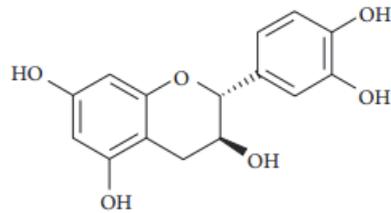


Figura 2 - Estrutura molecular da catequina

Tabela 3 - Compostos identificados nas folhas de *Eugenia dysenterica* e nos derivados vegetais das mesmas

Compostos	Material	Referência
Flavonoides, taninos, saponinas espumídicas, catequina, antraquinonas e ácidos orgânicos	Extrato hidroalcoólico	(144)
Flavonoides e taninos	Extrato hidroalcoólico	(145)
Flavonoides, taninos, terpenos e saponina	Extrato etanólico	(17)
Flavonoides	Extrato metanólico	(146)
Taninos	Droga vegetal	(16)
Flavonoides, taninos, terpenos, saponinas	Pó	(147)
Taninos (prociandinas e catequina)	Extrato aquoso	(148)
Catequina	Extrato aquoso	(149)
Catequina	Extrato aquoso	(150)
Catequina e quercetina	Extrato aquoso	(151)
Compostos fenólicos totais	Infusão	(152)
Triterpenos (α -amirina, β -amirina, neolupenol, gammacer-16-en-3 β -ol e taraxerol)	Extrato hexânico	(153)
Sesquiterpenos	Óleo	(140)
Sesquiterpenos (β -cariofileno e α - humuleno), monoterpenos (limonene e α -tujene) e os principais mono e sesquiterpenos oxigenados (α -terpineol e oxido β - cariofileno)	Óleo	(18)
Oxido de cariofileno	Óleo	(154)
(E)-cariofileno	Óleo	(155)
Sesquiterpenos	Óleo	(156)

2.5.1 Atividades farmacológicas

Estudos biológicos referentes a esta planta estão reportados na literatura. Segundo informações etnobotânicas, as folhas são utilizadas no tratamento de diarreia e os frutos se consumidos em excesso ou após exposição ao sol podem provocar diarreia (15, 157, 158).

Estudos *in vitro*

Entre as atividades farmacológicas relatadas na literatura, pode-se destacar a ação anti-colinesterase do extrato aquoso das folhas com concentração inibitória de 50% (IC₅₀) de 155,20 ± 2,09mg/ml (151). Outro derivado vegetal, o óleo essencial desta mesma parte da planta também foi avaliado para determinar o efeito anti-colinesterase, e observou-se uma ação com IC₅₀ de 0,92µg/ml, enquanto que o óxido de cariofileno isolado mostrou IC₅₀ de 0,31µg/ml (154).

O óleo essencial das folhas proveu ação contra *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes imunodeprimidos em função de HIV, com concentração de 125 e 250µg/mL (18).

Cecílio et al. (2012) observaram potente efeito do extrato etanólico com 500 µg/mL contra rotavírus (17).

Feitosa et al. (2017) avaliaram, mediante a capacidade de inibição da peroxidação lipídica, a atividade antioxidante do óleo essencial de folhas de *E. dysenterica* nas concentrações de IC₅₀ de 1,2µg/mL, neste mesmo estudo verificou-se que o potencial sequestrante do radical hidroxila com IC₅₀ de 5,814µg/mL, muito similar ao ácido ascórbico e também da ação de proteção contra a formação de óxido nítrico a partir da decomposição do sal nitroprussiato de sódio com IC₅₀ de 0.1684µg/mL (154).

A atividade antioxidante das folhas de cagaiteira foi avaliada em outro estudo, o qual relatou um IC₅₀ de 6,83µg/mL (152). Além deste, outros autores também avaliaram esta propriedade das folhas ao tratarem macrófagos alveolares murinos, estes demonstraram que o extrato hidroalcolico propiciou ação antioxidante com IC₅₀ de 4,73±1,15µg/mL usando o ensaio de 2,2 difenil-1-picril hidrazil (DPPH), resultado semelhante ao do ácido ascórbico 4,93±0,25µg/mL, neste mesmo estudo, foi utilizado o método para determinar a atividade antioxidante através da co-oxidação de ácido linoleico e β-caroteno, onde o IC₅₀ de 0,91±0,25µg/mL revelou

forte ação antioxidante (145). Adicionalmente, estudos confirmam a extraordinária ação antioxidante do extrato etanólico da semente de cagaita, IC₅₀ de 14,15µg/mL e da polpa comercial (159, 160). Prado *et al.*, (2014) avaliaram o potencial antioxidante do extrato aquoso das folhas e observaram um IC₅₀ de 3,97µg/mL, bem aproximado do encontrado para o ácido ascórbico, IC₅₀ de 2,09µg/mL (148).

Ávila *et al.*, (2016), averiguaram a presença intracelular de ERO em células AMJ2-C11 (macrófagos alveolares murinos) expostas ao cromo, nesta linhagem após tratamento por 1 hora com o extrato hidroalcolico de folhas e após ao metal pelo mesmo período, sendo posteriormente lavadas e incubadas com acetato 2,7-diclorofluoresceína (DCFH-CA), observaram o efeito quimioprotetor do extrato. Bem como foi observado que, este extrato não promoveu a geração deste radical livre quando a linhagem foi colocada em contato com o mesmo, porém, o metal com 250 e 500µM aumentou e, quando o tratamento foi empregado concomitantemente, o metabólito secundário preservou as células da produção de ERO, principalmente na dose de 80µg/mL de extrato e 500µM de cromo (145).

Em relação ao conteúdo nutricional, a polpa de cagaita apresenta altos teores nutricionais como proteínas, carboidratos, fibras, carotenoides e ácido ascórbico, sendo um excelente aporte de substâncias essenciais, principalmente de vitamina C e com reduzido valor calórico (161, 162).

Estudos previamente realizados sugerem que o extrato etanólico de folhas de *E. dysenterica* apresentam significativa inibição da enzima tirosinase, IC₅₀ de 11,88 µg/mL, semelhante a ação do ácido kójico, IC₅₀ de 13,14µg/mL (20). Outro estudo, deste mesmo grupo, demonstrou que o extrato aquoso de folhas desta planta potencialmente inibiram as enzimas α-amylase e α-glucosidase com IC₅₀ de 14,93 e 0,46µg/mL, respectivamente (163). Similar ação de inibição das enzimas α-amylase e α-glucosidase, entretanto, usou a polpa comercial de cagaita foi reportado (160).

Estudos *in vivo*

Estudos de Lima et al. (2010), apontam promissora oportunidade para o desenvolvimento de um novo medicamento de ação laxativa, trata-se de uma proteína isolada de frutos da cagaiteira, observações que renderam inclusive um pedido de patente (157).

Ao avaliar o efeito do óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* em ratos Swiss, foi demonstrado que a administração oral do óleo nas doses 30-300mg/kg foi

capaz de inibir diarreia em função da inibição da secreção intestinal e do aumento da absorção intestinal (155).

Ávila et al. (2016), ao avaliarem o efeito quimioprotetor do extrato hidroalcólico de folhas da cagaiteira usaram ratos Swiss expostos ao cromo, observaram que a administração oral do extrato hidroalcólico de folhas, nas doses de 50-500mg/kg, durante 10 dias e no dia posterior os animais receberam intraperitonealmente uma dose letal de cromo (50mg/kg), foi verificado que os animais que receberam somente dose com metal morreram após 24 horas e os que foram tratados com 125mg/kg do derivado vegetal sobreviveram cerca de 80%, sem apresentarem sequer algum efeito citotóxico, segundo os autores, esta elevada taxa de sobrevivência aponta o potencial deste extrato para o desenvolvimento de produtos terapêuticos para precaver danos nefrotóxicos e hepatotóxicos advindos da toxicidade de metais (145).

A avaliação do efeito laxativo de um peptídeo isolado da polpa de frutos de cagaiteira foi testado em *Rattus norvegicus* Wistar, esta proteína provocou alteração no trânsito intestinal de 20,8% e da secreção, porém, sem efeitos tóxicos tanto para o fígado, quanto para o intestino, sendo um potencial candidato para o desenvolvimento de nova opção terapêutica para tratamento de constipação e síndrome do intestino irritável (157).

A administração oral de diferentes derivados de folhas de cagaiteira, para verificar o efeito antidiarreico e na motilidade gastrintestinal, foram analisados usando óleo de rícino para induzir diarreia em *Rattus norvegicus*. Nesta análise, foi observado que, o extrato etanólico de folhas de *E. dysenterica* diminuiu 24% a motilidade intestinal dos ratos, enquanto que, a infusão e o extrato aquoso não interferiram. Todos os derivados provocaram processo inflamatório em algum grau, mais pronunciado foi relatado para a infusão. Entre outros efeitos colaterais foi verificado que o extrato etanólico provocou congestão, distúrbios no balanço de íons (cloreto, magnésio e fósforo) e mudança morfológica das células do intestino delgado e mucosa, o extrato aquoso causou ulceração e intensa inflamação sendo o dano maior que o provocado pelo óleo de rícino, enquanto que a infusão acarretou congestão, mudança morfológica e até hemorragia. No fígado dos animais, foi observado que o extrato etanólico e o aquoso produziram toxicidade. Mas no geral, os autores aventam que a planta tem potencial para o desenvolvimento de um

antidiarreico, devido sua ação inibitória da motilidade intestinal, apesar dos seus efeitos tóxicos (158).

Contraditoriamente, a atividade gastroprotetora do extrato aquoso de folhas contra danos induzidos por etanol/ácido clorídrico foi investigada em ratos Swiss, obtendo-se resposta positiva e, possivelmente em função da vasta quantidade de taninos condensados presentes neste derivado (148).

Recentemente, Donado-Pestana et al. (2018), demonstraram que o extrato preparado de polpa de cagaita contém abundante quantidade de taninos (elagitaninos e pro-antocianidinas), flavonoides (quercetina e campferol) e também ácido elágico, compostos que segundo os autores estão associados a melhora da homeostase da glicose (dislipidemia, hiperglicemia de jejum, e intolerância à glicose). Neste estudo, ratos-C57BL/6J obesos que receberam administração oral deste derivado de cagaita, demonstram uma diminuição considerável nos níveis da gliconeogênese e da inflamação hepática, além de contribuir para evitar o ganho de peso (164).

2.5.2 Estudos toxicológicos

Estudos *in vitro*

A citotoxicidade do extrato etanólico de sementes de *E. dysenterica* foi avaliada usando fibroblastos BALB/C 3T3 e o método *Neutral Red Uptake* (NRU), modelo muito utilizado para prever a teste de toxicidade aguda e assim prever a dose que mata 50% dos animais. Então, neste estudo prévio, foi observado um IC₅₀ acima de 300µg/mL, pois não foi observado qualquer sintoma e nem tão pouco de fototoxicidade nesta concentração (159). Outro estudo, avaliou o extrato etanólico das folhas desta espécie em células de rim de macaco (MA-104), não sendo verificado danos na viabilidade com 500µg/mL, porém, com 5000µg/mL houve interferência (17).

Outra linhagem na qual foi avaliada a viabilidade celular do extrato aquoso das folhas a SH-SY5Y, a qual demonstrou que concentrações acima de 7,8µg/mL afetam a proliferação destes neuroblastomas humanos (151).

Vitek et al. (2017), avaliaram o potencial antileucêmico do flavonoide isolado das folhas de cagaita (*O*-galloyl), mediante ensaios de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais (CCRF-CEM e Kasumi-1) e observaram que este

composto apresentou atividade antileucêmica com IC_{50} de 40,3 e 36,7 μ M respectivamente (146).

Ávila et al. (2016), avaliaram a exposição de células AMJ2-C11 (macrófagos alveolares murinos) ao cromo (100, 250 e 500 μ M) e tratadas com extrato hidroalcólico de folhas (20, 40 e 80 μ g/mL), nesta avaliação observaram a maior viabilidade quando foi aplicado 80 μ g/mL do extrato e 100 μ M de cromo, onde foi verificado 80% de sobrevivência e, o efeito quimioprotetor dose dependente, com a maior dose do derivado vegetal obteve-se 48% aliada com a máxima dose de metal usada (145).

Estudos *in vivo*

A administração oral de diferentes derivados de folhas de cagaiteira, para verificar o efeito antidiarreico e na motilidade intestinal foram analisados usando óleo de rícino para induzir diarreia em *Rattus norvegicus*. Nesta análise, foi observado que o extrato etanólico de folhas de *E. dysenterica* diminuiu 24% a motilidade intestinal dos ratos, enquanto que, a infusão e o extrato aquoso não interferiram. Todos os derivados provocaram processo inflamatório em algum grau, mais pronunciado foi relatado para a infusão. Entre outros efeitos colaterais foi verificado que o extrato etanólico provocou congestão, distúrbios no balanço de íons (cloreto, magnésio e fósforo) e mudança morfológica das células do intestino delgado e mucosa, o extrato aquoso causou ulceração e intensa inflamação sendo o dano maior que o provocado pelo óleo de rícino, enquanto que a infusão acarretou congestão, mudança morfológica e até hemorragia. No fígado dos animais foi observado que o extrato etanólico e o aquoso produziram toxicidade (158).

A avaliação do efeito laxativo de um peptídeo isolado da polpa de frutos de cagaiteira foi testado em *Rattus norvegicus* Wistar, esta proteína provocou alteração no trânsito intestinal de 20,8% e da secreção, porém, sem efeitos tóxicos tanto para o fígado quanto para o intestino (157).

O extrato aquoso de sementes de cinco espécies que predominam no Cerrado, dentre estas a cagaita (araticum, mangaba, cagaita, jatobá e tucumã) foram avaliados quanto ao efeito tóxico para *Artemia salina*, e dentre estas espécies, a cagaiteira foi a que exibiu a DL_{50} (dose letal) menos tóxica, com um valor de 57,0 \pm 3,31mg/mL (165).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar a segurança e a eficácia de formulação fitoterápica de uso tópico contendo derivados vegetais de folhas de *Eugenia dysenterica* DC., buscando uma opção terapêutica para feridas cutâneas.

3.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar o material botânico de *E. dysenterica* DC. por meio de ensaios físico-químicos;
- ✓ Obter os derivados vegetais das folhas de *E. dysenterica* (extrato bruto aquoso de folhas e óleo essencial) e caracterizá-los por meio de ensaios físico-químicos;
- ✓ Avaliar os derivados vegetais quanto ao potencial antimicrobiano frente a isolados de importância clínica por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM);
- ✓ Avaliar *in vitro* a viabilidade celular do extrato bruto aquoso de folhas e óleo essencial;
- ✓ Identificar o perfil fitoquímico do óleo essencial;
- ✓ Avaliar o potencial anti-inflamatório do extrato aquoso e do óleo essencial em modelo celular inflamatório *in vitro*, através da produção de óxido nítrico (ON);
- ✓ Avaliar o potencial de proliferação e migração de células de tecido epitelial, após tratamento com extrato aquoso e óleo essencial;
- ✓ Obter micropartículas de quitosana carregadas de extrato aquoso bruto;
- ✓ Caracterizar as micropartículas quanto ao rendimento, tamanho, potencial zeta, morfologia e eficiência de encapsulação;
- ✓ Desenvolver formulações contendo o extrato bruto aquoso com e sem micropartículas ou óleo essencial de folhas de *E. dysenterica*;

- ✓ Avaliar parâmetros da qualidade das formulações durante o estudo de estabilidade;
- ✓ Determinar o perfil de liberação da formulação contendo micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso;
- ✓ Avaliar a permeação cutânea *in vitro* do extrato bruto a partir da formulação desenvolvida com extrato de folhas de *E. dysenterica*;
- ✓ Avaliar o potencial irritante e angiogênico *in vivo* dos derivados vegetais e formulações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PARÂMETROS DE CONTROLE DA QUALIDADE DA DROGA VEGETAL

4.1.1 Detalhes da Coleta

A coleta foi extrativista, uma vez que se trata de uma espécie nativa. A droga vegetal foi coletada manualmente, no período matutino do mês de agosto de 2014, por volta das dez horas em áreas de Cerrado, no campus da Universidade de Brasília, em Brasília, Distrito Federal, Brasil. A planta é de ocorrência espontânea e esta localizada nas seguintes coordenadas 15° 46' 18" S e 47° 51' 60" O. As condições climáticas neste período eram de alta incidência de raios solares e temperatura e umidade de aproximadamente 27°C e 34% respectivamente. Foram recolhidas manualmente 5.509,7 g de folhas frescas de *E. dysenterica* de uma única árvore no período matutino, por volta das 6 horas da manhã.

4.1.2 Identificação do Material Botânico

Não existe Denominação Comum Brasileira (DCB) relacionada à *E. dysenterica* na lista emitida na RDC nº 1/2015, conforme requerido pela RDC 26/2014 para a espécie vegetal constituinte do fitoterápico e partes da espécie vegetal utilizada, sendo assim foi realizada uma busca em bases de dados para a compilação da nomenclatura botânica, recorrendo-se ao International Plant Name Index (IPNI) e Tropicos® (49, 166). A identificação foi feita por um profissional habilitado e depositado um voucher no Herbário da Universidade de Brasília-UnB. As folhas de *E. dysenterica* foram identificadas pela Professora Dr^a Sueli Maria Gomes do Instituto de Biologia da UnB. Uma exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário da Universidade de Brasília sob a catalogação (UB 914).

4.1.3 Caracterização Organoléptica

Estes parâmetros foram avaliados por meio de inspeção visual e do uso do olfato, para verificação de particularidades relevantes para identificação como

coloração e odor, bem como de semelhanças com dados relatados na literatura (21, 167).

4.1.4 Secagem e Conservação

As folhas da planta foram desidratadas usando estufa com circulação e renovação de ar (SL – 102 Solab, Brasil), a qual foi preenchida com uma distribuição uniforme das folhas, a uma temperatura de 40°C, por um período de 3 dias. Após a secagem a droga vegetal foi pulverizada em moinho de facas (tipo Croton MA-580 Marconi, Brasil) utilizando um mesh 20 e após foi armazenada em frascos de vidro e protegidas da luz até a preparação do extrato aquoso bruto. Para a extração do óleo essencial, as folhas foram utilizadas ainda frescas logo após a coleta.

4.1.5 Testes de Pureza e Integridade

4.1.5.1 Determinação de Matérias Estranhas

Para determinar os elementos estranhos que por ventura possam estar contidos juntamente com as folhas de *E. dysenterica*, foram pesados 500g de folhas, distribuídas de forma a obter-se uma camada delgada sobre uma superfície plana. Seguidamente, realizou-se a catação de materiais estranhos. Após a separação o material foi pesado e determinado o percentual de contaminantes (168). Após foram depositadas em bandejas, espalhando-se em camadas de maneira uniforme e colocadas na estufa de secagem.

4.1.5.2 Determinação de Água

O ensaio para detecção de eliminação de umidade foi realizado, para determinação da quantidade de água presente e detectada através da perda por dessecação em analisador de umidade por infravermelho (Geraka IV 2000, São Paulo, Brasil), segundo a FB. Pesou-se 1g de folhas, que foram rasuradas e distribuídas uniformemente em um prato de alumínio específico para determinação de perda de água. A análise de secagem, foi feita à 105°C, por um minuto e em

triplicata, sendo aferida a umidade em percentual tanto das folhas frescas quanto das secas (168).

4.1.5.3 Determinação de Cinzas Totais

Para a determinação do resíduo inorgânico na droga vegetal pela incineração das cinzas fisiológicas (constituintes minerais e dos organo-metálicos) e das não-fisiológicas (provenientes de materiais estranhos) que compõem as cinzas totais conduziu-se o seguinte procedimento descrito na FB (168). Para este procedimento, cadinhos de porcelana foram previamente secos em estufa à 105°C, durante 4 horas, resfriados em dessecador e tiveram as respectivas massas determinadas em balança analítica. Foram pesados 3,0g da droga vegetal pulverizada e transferidos para os cadinhos onde foram distribuídas uniformemente e incinerados aumentando-se gradativamente a temperatura até 600°C ± 25 em mufla (Etil, São Paulo, Brasil), até à calcinação, ou seja, a eliminação do carvão. Para isso, foi utilizado um gradiente de temperatura (30 minutos à 200°C, 60 minutos à 400°C e 90 minutos à 600°C). Em seguida, deixou-se arrefecer em dessecador e procedeu-se à determinação da massa do conjunto. Esta operação foi repetida até a obtenção de valores de massa constantes. Calculou-se a porcentagem das cinzas totais em relação à massa da droga seca ao ar. A análise foi realizada em triplicata.

4.1.5.4 Determinação de Contaminantes Microbiológicos

Preparo do Caldo neutralizante DEY-ENGLEY:

Foram pesados os componentes abaixo relacionados, seguidamente estes foram dissolvidos com 1000mL de água destilada e com constante agitação. Ajustou-se o pH para 7,6 ± 0,2. Procedeu-se a esterilização em autoclave.

Componentes do Caldo:

Caseína enzimática hidrolisada.....	5,0g
Púrpura Bromocresol.....	20,0mg
Extrato de Levedura.....	2,50g
Tiosulfato de Sódio.....	6,00g
Tioglicolato de Sódio.....	1,0g

Bissulfito de sódio.....	2,50g
Polissorbato 80.....	5,00g
Dextrose.....	10,0g
Lecitina.....	7,0g
Água.....	1000mL

Preparo da amostra teste com caldo neutralizante DEY-ENGLEY:

A inibição do efeito antimicrobiano de metabólitos secundários presentes na amostra, foi neutralizada da maneira a seguir. Em ambiente asséptico, foi misturado 1g de amostra de folhas pulverizadas à 9ml de caldo neutralizante, e seguidamente realizadas diluições decimais sucessivas com o água destilada estéril.

Contagem do número total de microrganismos mesófilos

Foi verificada a possível existência de bactérias mesófilas e fungos nas folhas pulverizadas de *E. dysenterica*, para isso, foi empregado o método de contagem em placa com semeadura de superfície (168). Este teste, consiste na contagem do número de microrganismos que apresentam crescimento visível, em até 5 dias, em ágar caseína-soja (Himedia Laboratories, Índia) a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, para avaliação da presença de bactérias e em até uma semana, em ágar sabouraud-dextrose (Himedia Laboratories, Índia) a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$, para detectar o desenvolvimento de fungos.

Assim, 0,1mL das amostras preparadas como descrito anteriormente, foi dispensado na superfície de placa de petri estéril contendo 20mL de ágar apropriado para a análise. As placas foram semeadas em varredura. As placas, após o semeio, foram incubadas nas temperaturas apropriadas citadas anteriormente. Para cada diluição testada (1:10; 1:100 e 1:1000) foram usadas duas placas para cada meio de cultura correspondente.

O registro do resultado para determinação do número de microrganismos foi calculado a partir da média aritmética das placas de cada meio e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou mL do produto e assim, determinar se o produto satisfaz às exigências microbiológicas farmacopeicas para o fim que se propõe (168).

4.2 PARÂMETROS DE CONTROLE DA QUALIDADE DOS DERIVADOS VEGETAIS

4.2.1 Solvente e Método Utilizado na Extração dos Derivados Vegetais

Após a matéria-prima ser seca e pulverizada produziu-se o extrato aquoso que foi obtido por infusão do material botânico (100g) em água destilada (500mL) a aproximadamente 70°C, conforme descrito por Zorzini (1999). A mistura foi deixada arrefecer até aproximadamente 40°C, sendo então submetida à filtração. A solução extrativa resultante foi mantida a -30°C e submetida ao processo de liofilização (Advantage Plus XL-70, SP Scientific). O extrato bruto aquoso (EBA) obtido foi conservado em baixa temperatura (-30°C).

Para a obtenção do óleo essencial, foram utilizadas folhas frescas, as quais após a verificação da pureza e integridade foram submetidas a hidrodestilação para extração do óleo, através da técnica de arraste a vapor utilizando um aparato Clevenger. As folhas frescas foram pesadas 250g, que após terem sido fragmentados, foram inseridos num balão volumétrico com 4000mL de água destilada. Em seguida, procedeu-se a extração por um período de 4 horas.

4.2.2 Relação Aproximada de Droga Vegetal : Derivado Vegetal

Para obtenção de extrato bruto aquoso, foram empregados 100g da droga vegetal pulverizada e posteriormente ao processo de infusão e liofilização foi calculado o rendimento de EBA, que foi elaborado neste estudo. O rendimento do óleo essencial extraído das folhas frescas (250g) foi calculado com base na matéria úmida.

4.2.3 Testes de Pureza e Integridade

4.2.3.1 Determinação de Metais Pesados

A determinação de metais pesados foi realizada no Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas da Embrapa Cerrados. A metodologia adotada foi a técnica de digestão: irradiação por micro-ondas, com mistura nitroperóxido (3:1) e posterior análise por espectrometria de emissão óptica em Plasma Indutivamente

Acoplado iCP-OES 6300 Duo (Thermo Cientific) descrita no Manual de Laboratórios da Embrapa, este teste foi realizado somente para o extrato seco EBA (170).

4.2.3.2 Determinação de Contaminantes Microbiológicos

Foi avaliada a presença de bactérias, bolores e leveduras para a determinação de carga microbiana total de microrganismos mesófilos que possa estar contida no extrato EBA. Para tanto, foi utilizada a técnica de contagem em placa em superfície descrita na FB, a qual é recomendada para contagem de microrganismos viáveis em produtos que não há exigência de estarem estéreis. Este ensaio consiste na possibilitação da contagem da população total de bactérias mesófilas e fungos que apresentam crescimento detectável em até 5 dias, em ágar caseína-soja a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ e em até 7 dias, em ágar sabouraud-dextrose a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ (168).

Para este procedimento primeiramente foi preparado o caldo neutralizante *DEY-ENGLEY* conforme descrito na FB e no item 4.1.5.4. Pois, é preconizado na FB que se a amostra possui atividade antimicrobiana, essa deve ser adequadamente neutralizada ou removida, anteriormente à análise microbiológica (168). O extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* tem mostrado atividade antimicrobiana contra microrganismos, tais como *S. aureus*, portanto, daí a necessidade deste procedimento (21).

Então, foram preparadas placas de petri contendo 20mL de ágar caseína soja (Himedia, Índia) para análise de bactérias e sabouraud-dextrose (Himedia, Índia) para análise de bolores e leveduras, os quais foram elaborados conforme instrução do fabricante, esterilizado e vertidos nas placas.

Preparo das amostras de extrato seco

Foram pesados 1g de EBA e diluídos em 9mL de caldo *DEY-ENGLEY*. Em seguida, diluições decimais foram preparadas com o água destilada estéril. Assim, a inibição da atividade antimicrobiana produzida por metabólitos secundários foi convenientemente realizada. Em seguida, 0,1mL da amostra preparada como descrito acima, foi dispensado nas placas contendo ágar. As placas, após receberem as amostras, foram mantidas a $32,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por até 5 dias para ágar caseína-soja e a $22,5^{\circ}\text{C} \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ por até 7 dias para ágar sabouraud-dextrose. Para

cada diluição avaliada foram utilizadas duas placas para cada meio de cultura. Decorrido o prazo para desenvolvimento de microrganismos foi calculada a média aritmética das placas de cada meio e o número de UFC/mL foi obtido. Assim, matérias-primas não estéreis, como é o caso de extrato seco, é aplicado este teste para determinar se o produto satisfaz às exigências microbiológicas farmacopeica, bem como as regulamentações sanitárias. Este teste foi realizado somente para o extrato seco EBA.

4.2.4 Caracterização Físico-Química

4.2.4.1 Caracterização Físico-Química do Extrato seco

4.2.4.1.1 *Granulometria*

A determinação da granulometria foi realizada seguindo a metodologia prevista na FB (168). Amostras de 25g do derivado vegetal liofilizado foram submetidas à passagem forçada por vibração, através de um conjunto de peneiras, série Tyler, com abertura de malha correspondentes (1,00; 0,59mm e 355, 150, 75 µm) usando-se um tamisador (Bertel), onde as amostras foram distribuídas uniformemente na primeira peneira e agitadas durante 20 minutos. O tamanho das partículas foi avaliado pela quantificação percentual de retenção do pó de acordo com a fórmula abaixo para determinar a homogeneidade do pó e classificá-lo quanto ao tamanho: pó grosso, pó moderadamente grosso, semifino, pó fino ou finíssimo de acordo com a FB (168). Este procedimento foi repetido três vezes com três amostras distintas.

$$\% \text{ Retida no tamis} = (P1/P2) * 100$$

onde:

P1= Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas);

P2= Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas);

100 = Fator de porcentagem.

4.2.4.1.2 Determinação de Água

Foi realizada da mesma maneira descrita no item 4.1.5.2, onde, após a liofilização do EBA, o seu teor de umidade foi avaliado segundo o método gravimétrico seguindo a FB (168).

4.2.4.1.3 Determinação de Resíduo Seco

Procedeu-se, pesando uma amostra de 0,50g de extrato seco, em placa de petri de 50x30mm. A dessecação foi em estufa à 105 °C, durante 3 horas. E posteriormente, deixou-se esfriar em dessecador e pesou-se. O valor do resíduo seco foi calculado em porcentagem sobre a massa a partir da média da triplicata (168).

4.2.4.1.4 Determinação da Solubilidade

A solubilidade do extrato aquoso seco de *E. dysenterica* em água foi definida pesando-se 1g de amostra e adicionando, conforme a FB, as partes do solvente, no caso, água à 70°C (168). Também foi realizado teste com metanol com mesma quantidade de amostra.

4.2.4.1.5 Determinação da Densidade Aparente

A avaliação da densidade de EBA compreende a razão de sua massa em relação ao volume que ocupa (168). Para este procedimento uma proveta de 100mL foi previamente pesada e, posteriormente, preenchida com o derivado vegetal até atingir 50mL a 20°C. A densidade aparente da amostra foi determinada com os dados, de acordo com os seguintes cálculos:

$$p_a = M_{pc} - M_{pv} / V_p$$

Em que: p_a =densidade aparente; M_{pv} = massa da proveta vazia; M_{pc} = massa da proveta cheia; V_p = volume da proveta.

As análises das amostras de EBA foram realizadas em triplicada e a média destes valores foi utilizada para apresentação dos resultados.

4.2.4.1.6 Determinação de Substâncias Extraíveis por Etanol

O teste para determinar substâncias extraíveis por etanol foi realizado pelo método de extração com Soxhlet, descrito na FB (168). Para isso, foram pesados 2g do derivado vegetal e transferido para cartucho do extrator de Soxhlet, previamente tarado e seco. Foi colocado no balão do extrator 0,2g de hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e 150mL de etanol absoluto (Tedia, USA). Extraíu-se por 5 horas com aquecimento, retirou-se o cartucho com o resíduo e este foi seco em estufa a 105 °C por 30 minutos. Pesou-se o resíduo seco e o teor de substâncias extraíveis por etanol foi calculado pela diferença entre o peso da amostra e o peso do resíduo seco.

4.2.4.2 Caracterização Físico-Química do Óleo Essencial

4.2.4.2.1 Determinação da densidade

A densidade do óleo essencial foi determinada em função da razão de sua massa por seu volume usando balança analítica (168). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4.2.2 Determinação do índice de refração

O índice de refração foi determinado em refratômetro, marca Biobrix à 20 °C (168). As amostras de óleo foram inseridas sobre o prisma do refratômetro e as análises foram realizadas em triplicata.

4.2.4.2.3 Rotação óptica

Esta avaliação não foi possível em função da quantidade demandada de óleo essencial necessária para realização do experimento.

4.2.5 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador

4.2.5.1 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador no Extrato Aquoso das Folhas de *Eugenia dysenterica*

Este parâmetro foi avaliado por metodologia validada por Ferreira-Nunes et al. (2017). A validação do método analítico foi realizada no Laboratório de Tecnologia em Medicamentos e Cosméticos da Universidade de Brasília (LTMAC-UnB), sendo descrita a metodologia obtida com sucesso para quantificação de catequina (150).

4.2.5.2 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador no Óleo Essencial de Folhas de *Eugenia dysenterica* por Cromatografia de Gases Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A análise fitoquímica do óleo essencial para identificação dos constituintes desse derivado vegetal foi feita utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). A análise foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas modelo QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão), equipado com um amostrador com injeção automática AOC-20i. As condições de análise foram as seguintes: coluna capilar de sílica fundida Rtx®-5MS Restek (5%-difenil-95%-dimetilpolisiloxano- fase estacionária) 30 x 0,25mm de diâmetro interno x 0,25µm de espessura de filme, o gás de arraste foi hélio, em um fluxo constante de 1,0mL/min. A temperatura de injeção foi 280°C. A amostra (1,0µL de uma solução em clorofórmio, contendo 10 mg/mL) foi injetada com uma razão de split de 1:30. A programação de temperatura do forno iniciou a partir de 50°C (isotérmica durante 1,5 min), com um aumento de 4 °C/min até 200 °C; em seguida, incrementos de 10 °C/min até 300°C, permanecendo por 5 min. A energia de ionização utilizada foi 70 eV. Os fragmentos foram analisados por um sistema quadrupolar programado para filtrar fragmentos/íons com m/z na ordem de 40 a 500 Da e detectados por um multiplicador de elétrons. O processamento de dados foi realizado com software CGMS Postrun Analysis (Labsolutions- Shimadzu). A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (171).

4.3 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS DERIVADOS VEGETAIS DAS FOLHAS DE *Eugenia dysenterica in vitro*

4.3.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada por meio de três metodologias com algumas modificações, a de difusão em disco, poço e a de microdiluição. A primeira e a segunda fornecem resultados qualitativos, enquanto a terceira fornece resultados (172).

Microrganismos avaliados

A atividade antimicrobiana do extrato aquoso bruto e do óleo essencial de folhas de *E.dysenterica* foi investigado contra dois agentes patogênicos de relevância clínica: as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 produtor de β -lactamase e *S. aureus subsp. aureus* ATCC 25923 obtida de isolamento clínico, os quais foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ – BRASIL, adicionalmente foram avaliadas as formulações elaboradas e substâncias padrão como controle positivo.

Preparo das soluções

Para o preparo das soluções utilizadas nos discos

✓ Inicialmente, o extrato EBA foi diluído com água destilada esterelizada a 50mg/mL. O óleo essencial foi dispensado diretamente nos discos.

Preparo dos discos

Discos de papel estéril (Wattman), com 6,0mm de diâmetro foram impregnados com as preparações abaixo descritas e a secagem dos discos deu-se dentro de placas de petri (150X15), estéreis e em temperatura ambiente por 24 horas. Quando utilizado o óleo essencial, estes discos foram utilizados em seguida ao seu preparo.

✓ Da solução do extrato bruto EBA, foram dispensados 20 μ L com uma pipeta em cada disco, a fim de obter as seguintes concentrações: 62,5, 125, 250, 500 e 1000 μ g/disco.

- ✓ O óleo essencial foi dispensado diretamente nos discos, depositando-se 2 (1672µg); 1 (836µg) e 0,5µL (418µg).
- ✓ Os discos embebidos com 20µl do solvente, no caso, água ou água com dimetilsulfóxido (DMSO), foram utilizados como controle negativo.
- ✓ Discos preparados comercialmente, contendo 10µg de ampicilina (AMP) e também de Amoxicilina (AMOX) (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) foram utilizados como controle positivo.

Para o preparo das soluções utilizadas nos poços

- ✓ O extrato foi avaliado por meio da distribuição de 100µL de uma solução de 10000µg/mL, portanto, cada poço continha 1000µg de extrato.
- ✓ Sulfadiazina de prata, União Química (10mg/g), cada poço recebeu 100mg diretamente que contém teoricamente 1000µg do agente.
- ✓ Pesou-se 800mg da emulsão COM micropartículas contendo extrato e dissolveu-se com 2000µL de H₂O, sendo que da formulação foi avaliada a concentração de 1000µg por poço nas placas com ágar (ou 10.000µg/mL), usando 100µL da amostra.
- ✓ Pesou-se 800mg da emulsão SEM micropartículas e dissolveu-se com 2000µL de H₂O, sendo que da formulação foi avaliada na concentração de 40.000µg de massa da formulação por poço, usando 100µL da amostra.
- ✓ Para as amostras de micropartículas contendo extrato pesou-se 20mg e diluiu-se com 2000µL de H₂O e foram testados 500µg de extrato por poço (ou 5000 µg/mL).
- ✓ Das amostras de micropartículas vazias e quitosana, pesou-se 20mg e diluiu-se com 4000µL de H₂O com 1% de ácido acético e foram testados 500µg por poço (ou 5000µg/mL).

Para o preparo das soluções utilizadas para o teste de microdiluição em caldo

- ✓ O extrato EBA foi diluído com água destilada esterilizada de forma a obter uma solução mãe de 10mg/mL e analisadas as concentrações de 39,06 até 5000 µg/mL.

✓ Do óleo essencial foi diluído 40µL com 1mL de água destilada esterilizada adicionada de 1% de DMSO, e analisadas as concentrações de 0,16 até 20µL/mL, que correspondem a 130,63 e 16720µg/mL.

✓ Já para a substância padrão – catequina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) esta foi diluída com água destilada esterilizada obtendo-se uma solução inicial de 1500µg/mL e testadas as concentrações de 5,86 até 750µg/mL.

✓ Sulfadiazina de prata, União Química (10 mg/g), e na microdiluição pesou-se 1g e diluiu-se com 2000µL de água, obtendo-se uma solução com 5000 µg/mL do ativo e testadas as concentrações de 19,53 até 2500µg/mL.

✓ Pesou-se 800mg da emulsão COM micropartículas contendo extrato e dissolveu-se com 2000µL de H₂O, sendo que desta formulação foram avaliadas as concentrações de 5000; 2500; 1250; 625; 312,5; 156,25; 78,13 e 39,06µg/mL de extrato.

✓ Pesou-se 800mg da emulsão SEM micropartículas e dissolveu-se com 2000µL de H₂O, sendo que da formulação foram testadas as concentrações de 20000; 10000; 5000; 2500; 1250; 625; 312,5 e 156,25µg/mL.

✓ Para as amostras de micropartículas contendo extrato pesou-se 20mg e diluiu-se com 2000µL de H₂O e foram testadas as concentrações de 2500; 1250; 625; 312,5; 156,25; 78,13; 39,06 e 19,53µg/mL.

✓ Das amostras de micropartículas vazias e quitosana, pesou-se 20mg e diluiu-se com 4000µL de H₂O com 1% de ácido acético e foram testadas as concentrações de 2500; 1250; 625; 312,5; 156,25; 78,13; 39,06 e 19,53µg/mL. Também foi avaliada a água acidificada sozinha. E estas mesmas amostras foram avaliadas dissolvidas também somente com água desta mesma forma.

Para o teste de microdiluição em caldo foram usados 100µL de cada amostra conforme descrito acima e procedeu-se diluições seriadas (1:1).

Preparo das soluções dos agentes antimicrobianos

✓ A solução estoque de ampicilina (AMP) (Sigma-Aldrich) foi preparada com 2500µg do pó antimicrobiano, o qual foi homogeneizado com 1mL de água, sendo obtida uma concentração de 2500µg/mL.

✓ A solução estoque de oxacilina (OXA) (Sigma-Aldrich) foi preparada com 5120µg do pó antimicrobiano, o qual foi homogeneizado com 10mL de água

destilada estéril, sendo obtida uma concentração de 512µg/mL e testado concentrações de 2 até 256µg/mL.

Preparo das soluções salina

Uma solução de cloreto de sódio (NaCl) na concentração de 9g/L (0,9%) foi preparada com água destilada estéril. Essa solução foi utilizada para a padronização do inóculo bacteriano.

Preparo da solução de resazurina 0,01%

Para o preparo desta solução, 1mg do reagente Resazurina (Sigma-Aldrich) foi adicionado a 10mL de água Milli-Q estéril.

Preparo do Inóculo por Suspensão Direta de Colônias e Padronização

No preparo da cultura do inóculo bacteriano, para a reativação de *S. aureus* utilizou-se caldo Mueller Hinton (CMH) (Himedia, Mumbai, Índia), pH 7,2 ±0,2 e incubação à 35°C por 24 horas. Decorrido o período de ativação, foi feita cultura em meio inclinado usando tubos de ensaio contendo em ágar Mueller Hinton (AMH), Acumedia, Neogen, Lansing, MI, USA), e incubando-se por 24 horas à 35°C novamente. Então, foi feita uma suspensão direta de colônias com uma solução salina 0,9% estéril, seguida da padronização no espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão) à 625nm até alcançar turbidez equivalente a suspensão de 0,5 McFarland 0,5 (1×10^8 UFC/mL). Foi realizada uma diluição 1:10 para obter, assim, a suspensão de trabalho a 1×10^7 UFC/mL, que após aplicar-se 100µL desta suspensão no ágar, a concentração de bactérias da técnica de disco e de poços por difusão em ágar foi de cerca de 1×10^6 por placa (173). Para o teste de microdiluição, além da diluição 1:10 outra diluição 1:100 foi feita para atingir uma suspensão de trabalho de 1×10^5 , que produziu neste teste aproximadamente 5×10^4 /poço, e por fim revelada com 30µL Resazurina (174).

4.3.1.1 Método de Difusão em Ágar

Esta metodologia de difusão em ágar permite ser explorada através das técnicas de disco e do poço (175).

A atividade antimicrobiana do extrato EBA foi testada nas linhagens de *S. aureus*, pelo método de difusão em disco, recomendado pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), em que a CIM foi definida como a menor concentração detectada visualmente que inibiu o crescimento do microrganismo (173). Quanto ao óleo essencial, este foi também foi testado *S. aureus*.

Como controle positivo para os ensaios, foram empregados discos das substâncias padrão AMP e AMOX 10µg/disco (Laborclin, Brasil). Como controle negativo, foram utilizados discos impregnados com o solvente usado na diluição dos extratos que foi a água.

Para a técnica de poços por difusão foi feito poços com auxílio de uma ponteira de 7mm no meio de cultura sólido e inoculado com o microrganismo (*S. aureus*), e a partir da difusão do composto depositado diretamente no poço, que apresente ação antimicrobiana ocorre a formação de um halo, demonstrando que não houve crescimento do microrganismo avaliado. Esta técnica foi empregada para EBA, óleo essencial e para as formulações.

De cada suspensão padronizada de microrganismo, foi inoculado 100µL sobre 20mL de meio de cultura sólido por meio de espalhamento em placas de petri de 90x15mm de diâmetro preparadas previamente, esperando-se a completa secagem do inóculo sobre o ágar, após dispensou-se os discos contendo as substâncias teste tomando o cuidado para uma vez depositados não movê-los mais, pois a difusão pode ser instantânea. Assim, as placas contendo bactérias receberam cerca de 1×10^6 UFC/mL. Em seguida, as placas foram invertidas e incubadas à 35°C para as bactérias durante 24 ou até 3 dias para permitir o crescimento. Decorrido o período de incubação, o diâmetro das zonas de inibição foi mensurado em milímetros com um paquímetro. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. Os resultados foram calculados pela média acrescido do desvio padrão dos halos produzidos pelas amostras testadas. Foi considerada como CIM, a menor concentração dos extratos que inibiram o crescimento dos microrganismos avaliados pela observação da presença de halos de inibição, considerando-se sensível (S) quando houve desenvolvimento de halo $\geq 10,0$ mm (176).

4.3.1.2 Método de Microdiluição em Caldo

Este método é considerado apropriado para monitorar quantitativamente o potencial de produtos naturais como extratos contra bactérias e fungos (177, 178).

Para o teste de microdiluição em caldo, o extrato EBA foi diluído com água destilada esterilizada, de forma a obter uma solução padrão de 10mg/mL, a qual foi diluída em série com concentrações finais do extrato no meio de cultura em cada poço variando de 39,1 até 5000µg/mL. Para o óleo essencial foram avaliadas concentrações de 0,156 até 20µL/mL.

O perfil de susceptibilidade dos derivados vegetais foi verificado utilizando-se microplacas com 96 poços, com volume de 100µL de meio de cultura líquido contendo o inóculo padronizado 2x concentrado ao qual foi adicionado 100µL dos extratos avaliados procedendo-se uma diluição seriada e obtendo-se assim concentrações decrescentes das amostras avaliadas.

Para este ensaio os inóculos bacterianos constituíram-se de cerca de 5×10^4 UFC/mL conforme recomendado para esta metodologia de avaliação da sensibilidade deste tipo de microrganismo (179).

Poços contendo apenas meio de cultura líquido e o inóculo foram preparados para possibilitar o controle da viabilidade dos microrganismos. Além destes, também foram acrescentados poços de controle positivo com inóculo e substâncias padrão AMP nas concentrações de $\leq 512 \mu\text{g/mL}$. Controle de esterilidade também foi incluído, sendo utilizados poços contendo apenas o meio de cultura estéril.

As placas foram incubadas por 24 horas em estufa à 35°C. Cumprido o período de incubação, aos poços foram adicionados 30µL de Resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% e, após 4h de reincubação, foi realizada leitura visualmente. A presença ou ausência de crescimento microbiano foi revelada por meio deste ensaio colorimétrico com Resazurina; sendo demonstrada resposta positiva de atividade por meio da coloração azul, que indica a ausência de células viáveis, e resposta negativa de atividade por meio da coloração rosa, que indica presença de células viáveis, enquanto que a cor roxa pode ser considerada inibição parcial. Para cada teste foram realizados ensaios em triplicata. Este indicador é reduzido a resofurina, que ao reagir promove coloração rosa demonstrando que há viabilidade celular e quando não ocorre reação permanece azul indicando inexistência de metabolismo celular (180). Além disso, este método colorimétrico tem a vantagem de permitir

leitura diretamente visual, além de ser um método de baixo custo, fácil e reproduzível (181).

4.3.1.3 Concentração Bactericida Mínima

A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi baseada nos resultados do teste de CIM, sendo definida como a menor concentração de uma substância que não permite o crescimento visível na subcultura. Após a incubação e leitura da CIM, alíquotas de 20µL foram retiradas de cada poço que mostrou inibição do crescimento bacteriano, estas foram subcultivadas em uma nova placa de ágar incubadas a 35° C durante 24 horas, em duplicata. A ausência de crescimento bacteriano no meio de cultura foi a indicação da CBM e que houve atividade bactericida.

4.3.2 Avaliação da viabilidade celular

Cultura das linhagens celulares avaliadas

Para a realização do ensaio de citotoxicidade celular foram avaliadas 3 linhagens celulares: L929 (fibroblasto) e HaCat (queratinócito) ambas adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e a RAW 264.7 (macrófago) *American Type Culture Collection* (ATCC® TIB71™), obtida do Banco de Células do Instituto Adolf Lutz.

As duas primeiras linhagens (L929 e HaCat) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium pH 7,0 (DMEM, Thermo Fisher Scientific®) estéril enriquecido com 10% soro fetal bovino (Thermo Fisher Scientific®), 3,7g/L de bicarbonato de sódio (Sigma®), 100UI/mL penicilina (Sigma®) e 100µg/mL estreptomicina (Sigma®), denominado DMEM completo.

A enzima tripsina foi utilizada para dissociar as células de fibroblastos e queratinocitos. Após a remoção do meio antigo, foi adicionado 8mL de solução salina tamponada (PBS) com fosfato pH 7 sobre as células contidas em frasco de 75 cm² para retirada de resíduos celulares remanescentes. Depois de remover a solução salina, foram adicionados 4mL solução de tripsina 0,5% e foram incubadas por 2 minutos. Em seguida, 8mL de meio de cultivo celular DMEM completo foram adicionados. As células foram homogeneizadas e centrifugadas por 5 minutos a

2500rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensionado com DMEM completo, frações dessa solução foram transferidas para garrafas de cultura 75cm² para subcultivo.

As células de macrófagos foram cultivadas em meio DMEM completo, contendo glicose 4500mg/L, 110mg de Piruvato de Sódio e 2mM L-glutamina (Sigma-Aldrich, Life Science, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Invitrogen), 100U/mL de penicilina-estreptomicina (SIGMA-Aldrich), 1% aminoácidos não-essenciais (SIGMA-Aldrich) e 25mM de HEPES (Ácido Etanosulfônico 4-2-Hidroetil Piperazina-1, Sigma-Aldrich). Para a dissociação desta linhagem celular foi retirado o meio contido no frasco e adicionada 6mL do mesmo meio de cultivo e utilizando o aparato Cell Scalper (rodinho) estas foram despregadas do frasco e ressuspensionadas.

Após atingir confluência superior a 90%, subcultivos celulares foram realizados e estas células foram usadas para os ensaios depois de três passagens após descongelamento. A contagem das células foi realizada na câmara de Neubauer. As células foram cultivadas após o plaqueamento por 24 horas antes dos tratamentos em incubadora (Panasonic®) a 37°C em estufa com 5% CO₂ por 24 horas. Em capela de fluxo laminar vertical (ESCO®) foi realizado todos os passos deste ensaio.

Avaliação de citotoxicidade

A citotoxicidade dos derivados vegetais foi determinada empregando-se o método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio, *Methyl-Thiazolyl-Tetrazolium* (MTT – SIGMA-ALDRICH®), buscando determinar a viabilidade celular igual ou superior a 50%. O ensaio de MTT visa determinar a viabilidade celular por meio da redução do MTT o qual é baseado na capacidade da enzima mitocondrial desidrogenase (nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase - NADH) (182), presente somente em células viáveis, em clivar os cristais de formazan produzidos metabolicamente e que apresentam difícil solubilidade, sendo então necessário o uso de ácido clorídrico 0,04M para solubilizá-los, portanto, considera-se que a quantidade de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de formazan produzida (183).

Em capela de fluxo laminar as células L929 e HaCat foram semeadas, 15.000 células por poço, enquanto que a Raw foram 20.000; exceto o controle do reagente

MTT (branco), em meio de cultivo DMEM completo apresentando volume total final de 200µL/poço em placa de 96 poços. Após 24 horas em incubação a 37°C/5% CO₂ foi retirado o meio de cultura e adicionado o tratamento, derivados vegetais e substâncias padrão, em meio de cultura DMEM completo em concentrações relacionadas a verificar a viabilidade de $\geq 50\%$ das linhagens avaliadas, com volume total final de 200 µL/poço. O controle negativo foi constituído de meio DMEM completo e 1% de DMSO (veículo usado para solubilização do óleo e do alfa-humuleno) das amostras teste. Os demais compostos foram solubilizados com o próprio meio de cultivo. Após os tratamentos, as placas foram novamente incubadas nas mesmas condições descritas.

Após 24 horas, o meio foi descartado e adicionados 50µL de solução MTT 1 mg/mL (Sigma-Aldrich®) dissolvida em DMEM incolor (sem fenol vermelho - Gibco®) e as placas foram reincubadas por 4 horas. Ao final, 150µL de solução de isopropanol acidificado (ácido clorídrico 0,04M) foram utilizadas como solvente diluidor dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placas (Beckman Coulter® DTX 800) a 570nm.

Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis tratadas pelo derivado vegetal avaliado ou substância padrão em relação ao controle positivo (100%) e descontada a coloração interferente do reagente MTT (branco).

4.3.3 Atividade Anti-inflamatória – Dosagem de Óxido Nítrico

Para avaliar o efeito inibitório dos derivados vegetais e das substâncias padrão sobre a produção do mediador inflamatório óxido nítrico (ON) foi utilizada a linhagem celular RAW 264.7, que são macrófagos murinos e apresentam crescimento aderente e a capacidade de produzir óxido nítrico quando estimuladas com o lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (*Lipopolysaccharides from Escherichia coli* 055: B5 - LPS) (Sigma-Aldrich®, Life sciences, St. Louis, EUA).

A atividade anti-inflamatória do EBA, óleo essencial, alfa-humuleno (Sigma-Aldrich) e dexametasona (Sigma-Aldrich), foram avaliadas por meio do pré-tratamento da cultura de células com as concentrações estipuladas em relação ao IC₅₀ e demonstrado na Tabela 4. Para os ensaios de dosagem da produção de ON *in vitro*, em ambiente estéril as células foram suspensas em meio DMEM completo. A contagem das células foi realizada na câmara de Neubauer e foram semeadas 0,3 X

10⁶ células por poço usando microplacas de 12 poços. As células foram cultivadas após o plaqueamento por 24 horas antes do tratamento e incubadas a 37°C em estufa com 5% CO₂ por 24 horas.

Tabela 4 – Concentrações das amostras usadas no ensaio

Amostra avaliada	Concentrações usadas
EBA	62,5 e 125µg
Óleo essencial	292 e 146 µg/mL ou 0,35 e 0,18µL/mL
Alfa-humuleno	311,15 e 155.58µg/mL ou 0,35 e 0,18µL/mL
Dexametasona	125 e 62,5µg

Decorrido o período de 24 horas, o meio DMEM completo foi descartado, e adicionado DMEM com 5% de SFB e feito os tratamentos com as amostras. Após 3 horas de tratamento com as amostras, as células foram estimuladas com 1µg/mL de endotoxina de *Escherichia coli* e foram usados poços com somente células e LPS, em seguida as placas foram reincubadas por 24 horas. Como controle negativo, foram utilizadas células em cultura sem tratamento. Passadas 48 horas 100µL dos sobrenadantes foram coletados e vertidos em microplaca de 96 poços adicionando igual volume de reagente de Griess para ser quantificado o ON acumulado no meio.

Para a dosagem de ON, foi utilizado o método de Reação de Griess, pela adição de 100µL de reagente de Griess (1% [w/v] sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% e 0,1% [w/v] de N-1-naftil-ethylendiamide-dicloridrato (NEED) em água), todos os reagentes adquiridos da Sigma-Aldrich (184). As amostras de sobrenadantes das culturas foram analisadas em leitora de microplacas (540nm), e os resultados expressos em porcentagem em relação a obtida pelas células que expressaram produção de ON. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.4 Avaliação de Fechamento de Lesão em Monocamada (*Scratch assay*)

Este ensaio de *scratch* (fechamento de ferida) permite avaliar o efeito proliferativo e migratório de células sem a necessidade do uso de agentes quimiotáticos que podem influenciar os resultados. O resultado esperado é a migração celular observada pelo fechamento de uma lesão, por um dado período de tempo.

Para o ensaio foram utilizadas as linhagens celulares imortalizadas de fibroblastos de camundongo (L929) e queratinócitos humanos (HaCaT). Para verificar a capacidade de fechamento da lesão e potencial de migração celular pós realização de ferida (*scratch*), as células foram plaqueadas em placas de 6 poços, previamente revestidas com 10µg/mL de fibronectina (*Sigma Aldrich*, St Louis, EUA) e mantidas por 12 horas até a confluência das células, na concentração de 1×10^6 células por poço, e meio DMEM a 10% de SFB.

Após 24 horas as células foram lavadas com PBS e fez-se uma ferida (*scratch*) manualmente com ponteira de pipeta de plástico amarelo (200µL) sobre a monocamada de células. Foram novamente lavadas com PBS e tratadas com a solução de derivado vegetal ou com a de controle, ambos mantidos em meio de cultura DMEM a 2% de SFB para reduzir a possibilidade de viés de proliferação, uma vez que o SFB pode interferir nos ligantes dos receptores de interesse (185).

Da *E. dysenterica* foi utilizado para o tratamento o extrato aquoso e o óleo essencial das folhas e também o padrão alfa-humuleno. Para as células L929 foram utilizados o tratamento com 200µg/mL do extrato, 542,2µg/mL de óleo e 577,4 µg/mL de alfa-humuleno. Para o tratamento das células HaCaT foram utilizados as concentrações de 125µg/mL do extrato, 399,2µg/mL de óleo e 625,6µg/mL de alfa-humuleno, concentrações previamente estipuladas a partir do ensaio de MTT.

A partir do tratamento foi feito o acompanhamento fotográfico da evolução do fechamento da ferida, proporcionado pela migração celular, em intervalos periódicos nos tempos de 0 a 82 horas em um microscópio de luz invertida (Zeiss Primo Vert, Göttingen, Alemanha), equipado com câmera digital (Zeiss ERC 5s, Göttingen, Alemanha) em objetiva de 10x. As taxas relativas de fechamento das feridas foram medidas e expressas em porcentagem da área inicial no momento zero do tratamento com os tratamentos em comparação com o controle. Para essa medida foram utilizadas áreas de 3 poços independentes para cada tratamento.

4.4 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS DERIVADOS VEGETAIS DAS FOLHAS DE *EUGENIA DYSENTERICA* *in vivo*

4.4.1 Avaliação do Potential de Irritação na Membrana Coriolantóica de Ovo Embrionado de Galinha – MCA (Hen’s Egg Test—Chorioallantoic Membrane - HET-CAM)

Neste estudo foi usado o ensaio na membrana corioalantóica do ovo embrionado de galinha MCA (Hen’s Egg Test—Chorioallantoic Membrane - HET-CAM) proposto por Luepke (1985) (186).

Os ovos de galinha fertilizados foram utilizados para estudar o potencial de irritação dos derivados vegetais EBA e óleo essencial; bem como da emulsão com micropartículas, emulsão com óleo e somente a emulsão placebo. Para este teste *in vivo*, foram obtidos ovos de galinha fertilizados (Leghorn) doados pela indústria de alimentos Bonasa, Brasil. Os ovos embrionados foram incubados em estufa automática (Premium Ecologica) durante 10 dias a temperatura de $38,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a umidade relativa foi mantida a aproximadamente 60-70% e deslocados lateralmente a cada 15 minutos. No décimo dia de incubação foi realizada, na casca do ovo, uma abertura circular (2,0cm de diâmetro) em sua base maior (onde está localizada a câmara de ar) com auxílio de tesouras e pinças.

Após a realização da abertura na casca do ovo, utilizando-se seringa e solução salina foi depositada uma alíquota (NaCl 0,9%) sobre a MCA já vascularizada de forma a auxiliar na retirada da membrana da casca. Em seguida, uma alíquota de 300 μL de cada amostra com diferentes concentrações foi aplicada em cinco ovos fertilizados para os diferentes grupos analisados. Após 20 segundos de contato, a amostra foi removida lavando-se a membrana com NaCl 0,9%. As reações perceptíveis na MCA foram observadas durante 300 segundos. A 0,5, 2 e 5 minutos, as seguintes observações foram feitas: hiperplasia, hemorragia e coagulação pontuando-se um valor máximo de 21 (score); no que diz respeito à pontuação de irritação de 0-0,9 não representa irritação, 1-4,9 representa uma ligeira irritação, 5-8,9 representa irritação moderada e 9-21 representa irritação grave(186).

A membrana foi examinada durante um período de cinco minutos e todas as reações observadas foram marcadas de acordo com o tempo de aparência e foram analisadas quanto à hemorragia, lise e coagulação dos vasos sanguíneos, os

produtos foram classificados de acordo com seu potencial irritação usando o teste HET-CAM e a classificação final. O resultado final foi expresso como um valor da média das cinco MCA. Os controles positivos foram NaOH 0,1M. O controle negativo foi NaCl 0,9% e azeite. O teste HET-CAM foi realizado utilizando 5 ovos por amostra.

4.4.2 Avaliação da Atividade Angiogênica na Membrana Corioalantóica do ovo Embrionado de Galinha

Para testar o potencial angiogênico dos derivados vegetais EBA e óleo essencial, bem como da emulsão com micropartículas, emulsão com óleo e somente a emulsão placebo foi explorada a potencialidade de usar este modelo *in vivo* para verificar a vascularização promovida na MCA de ovos embrionados de galinha, para isso utilizamos o protocolo estabelecido por Melo Reis et al (2010) (187).

Grupos contendo cinco ovos embrionados foram incubados a 37°C em atmosfera humidificada (60-70% de humidade relativa) com rotação apropriada. No quinto dia do desenvolvimento, dentro de uma câmara de fluxo laminar, os ovos fertilizados foram abertos da mesma maneira como no item 4.4.1 e exposta MCA. A abertura visa possibilitar a observação da viabilidade e crescimento embrionário, a qual foi selada com fita adesiva transparente logo após o procedimento. Os ovos novamente retornaram a incubação, porém, sem agitação periódica e com a base aberta voltada para cima.

No décimo terceiro dia de incubação, usando ambiente estéril para manipulação, discos de papel de filtro estéreis, veiculando 20µL das amostras a serem avaliadas e com os controles (negativos, indutores, inibidores), foram inseridos diretamente sobre a membrana de forma que não a danificasse. Para o controle de indução de angiogênese foi utilizado Regederm® (Pele nova Biotecnologia, Valeant Farmacêutica do Brasil Ltda) 20µL de uma solução aquosa de 1000mg/mL (20mg/disco), negativo (20µL de azeite) e inibidor (80µg/disco de dexametasona - Sigma). A abertura foi então novamente selada com fita adesiva para prevenir a desidratação e contaminação. Retornando os ovos a incubadora por mais 72 horas.

No décimo sétimo dia, a resposta angiogênica foi avaliada, a MCA foi fotografada com o auxílio de um estereomicroscópio (Zeiss, Alemanha) usando a ampliação de 0,5 X 1,25 para a posterior quantificação dos vasos sanguíneos.

Os vasos sanguíneos foram quantificados por meio de uma avaliação macroscópica da resposta angiogênica empregando as variações de análise na distribuição e densidade dos vasos da MCA ao redor do local de inserção dos discos, baseado no método para a pontuação semiquantitativa por proposta por Ribatti et al. (2006) (188).

De acordo com Ribatti et al. (2006), através de uma escala arbitrária dos valores de 0-5 pode verificar a resposta dos efeitos angiogênico usando pontuações: onde 0 descreve uma condição da rede vascular que é inalterada em relação ao tempo de enxerto; 1 marca um ligeiro incremento na densidade do vaso associado a mudanças ocasionais no decurso dos vasos que convergem para o local de inserto; 2, 3, 4 e 5 correspondem a um aumento gradual da densidade do vaso associado ao aumento da irregularidade no curso; uma classificação de 5 também destaca forte hiperemia (188).

4.5 DESENVOLVIMENTO DAS DIFERENTES FORMULAÇÕES CONTENDO EXTRATO AQUOSO BRUTO OU ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Eugenia dysenterica*

As formulações foram desenvolvidas para incorporação do extrato aquoso ou do óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* na estrutura do Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LTMAC).

Inicialmente foram preparados dois hidrogéis: gel com EBA e gel com micropartículas de quitosana contendo EBA. Estas formulações foram envasadas em frascos de vidro semipermeáveis e foram avaliadas quanto a estabilidade acelerada seguindo o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade - RE 1/2005.

Foram também preparadas mais três formulações; uma emulsão não-iônica composta por micropartículas de quitosana contendo extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* 5%; uma emulsão não-iônica contendo o óleo essencial 0,04% e uma nanoemulsão contendo o óleo essencial 0,04%. Estas formulações foram envasadas em frascos de plástico semipermeáveis e também foram avaliados quanto a

estabilidade acelerada seguindo o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade - RE 1/2005 (52).

4.5.1 Gel contendo extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica*

A primeira formulação um gel de polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno - Poloxamer® (Sigma-Aldrich, USA) a 16%, contendo 1% quitosana e 5% de extrato bruto de *E. dysenterica* que foi denominado de GQEF1, amostra que foi armazenada à 40°C e 75% de umidade (UR) e GQEF2 amostra armazenada à 25°C.

As formulações em base gel Poloxamer, foram preparadas a partir de uma mistura composta pela quitosana diluída em água acidificada a 1% com ácido acético. Posteriormente à homogeneização, juntou-se os conservantes e o umectante e por fim pulverizou-se o polímero sobre esta solução, levando-se por 24 horas à 2 – 8°C. Decorrido o período foi incorporado o extrato e novamente armazenado à 2 – 8°C por 48 horas.

Formulação da base gel de Poloxamer:

- Poloxamer.....16%
- Hidroxitolueno butilado (BHT).....0,1%
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).....0,1%
- Nipagin..... 0,1%
- Glicerina.....3%
- Ácido acético.....0,3%
- Quitosana.....1%
- Água.....qsp.7,9 g
- Adicionar ao final 5% do extrato aquoso bruto

4.5.2 Preparo das Micropartículas de Quitosana

As micropartículas de quitosana vazias (MQV) compostas somente pelo polímero quitosana foram preparadas a partir da dissolução de 10g de quitosana de médio peso molecular em uma solução de ácido acético a 1% (v/v), pH 4.0, ambos adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Após aproximadamente 24 horas de agitação magnética a 300rpm em agitador digital (Ika RW 20), em

temperatura ambiente. A solução foi seca por atomização utilizando um equipamento *spray-drying* LabMaa, modelo MSD 1.0, Labmaa, Brasil) partindo-se de metodologia descrita por Gelfuso et al. (2011) (26). O aparelho operou com a seguinte configuração: a solução passou por um bico atomizador pressurizado de número 2 (1.0mm) a uma vazão de alimentação de 6mL/min. A temperatura de entrada foi mantida a 135°C e a de saída foi aproximadamente 80°C. A taxa do fluxo de ar quente de atomização para secagem foi de 6 m³/min. Após a preparação, as micropartículas foram armazenadas em frasco de vidro, em temperatura ambiente e protegidas da luz até o momento de serem incorporadas nas bases do gel e emulsão. As micropartículas contendo extrato foram preparadas de maneira semelhante, a não ser pela dissolução de 10g do extrato juntamente à quitosana na solução ácida. Todas as micropartículas foram caracterizadas segundo metodologia apresentada a seguir.

As micropartículas obtidas foram então caracterizadas de acordo com o rendimento do processo de obtenção, a eficiência de encapsulação do extrato, distribuição de tamanho de partícula, morfologia e potencial Zeta.

4.5.2.1 Caracterização das Micropartículas

4.5.2.1.1 Rendimento

Ao final do processo de secagem através de pulverização em *spray drying* as micropartículas obtidas foram pesadas, e o rendimento do processo produtivo foi calculado em porcentagem em relação à quantidade de sólidos adicionados na fase inicial da solução preparada, conforme a equação (A) (26).

$$R\% = \left(\frac{Q_f}{Q_i} \right) \times 100, \quad \text{equação A}$$

Onde o R% representa o rendimento, Q_i é a quantidade total de sólidos (quitosana + extrato) adicionada na solução inicialmente preparada de micropartículas e Q_f é a quantidade de micropartículas coletadas do aparelho ao final do processo de *spray drying*.

4.5.2.1.2 Eficiência de Encapsulação

Para avaliar a capacidade das micropartículas de quitosana se associarem ao EBA, foi pesada uma porção de 10mg de micropartículas que foram dispersas em 5mL de metanol e deixada sob agitação a 500rpm durante 1 hora. Seguidamente, a dispersão foi filtrada e analisada o seu conteúdo de catequina por CLAE conforme método descrito por Ferreira-Nunes *et al.*, (150). Esta análise foi realizada com as micropartículas armazenadas em temperatura ambiente e em geladeira comum e em diferentes períodos (0; 7; 15; 30 e 60 dias). O ensaio foi realizado em triplicata. A eficiência de encapsulação foi calculada por meio da equação (B).

$$EE\% = \left(\frac{Q_{obtida}}{Q_{teórica}} \right) \times 100, \quad \boxed{\text{equação B}}$$

Onde: EE% é a eficiência de encapsulação do extrato pelas micropartículas de quitosana, *Q_{obtida}* é a quantidade de catequina extraída a partir das micropartículas de quitosana, e *Q_{teórica}* é a quantidade proporcional de catequina inicialmente adicionada no preparo das micropartículas de quitosana contendo EBA.

4.5.2.1.3 Granulometria

A distribuição de tamanho das micropartículas foi determinado por difração a laser em um aparelho difratômetro Beckman Coulter LS 13 320. Para a determinação, 1mg das micropartículas foi suspenso em 2mL de etanol e esta dispersão foi gotejada no difratômetro utilizado para a medição.

4.5.2.1.4 Morfologia das Micropartículas

A morfologia das micropartículas preparadas foi verificada por análise em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (JEOL, JMS-7000 IF, Tokyo, Japan). Uma fina camada de cada amostra de micropartículas foi depositada sobre suportes metálicos e, revestidas com ouro em um equipamento Balzers SCD 050.

A amostra foi então levada ao MEV, que foi operado com aumentos de 700 à 4000 vezes (189).

4.5.2.1.5 Potencial Zeta

O potencial zeta das formulações foi analisado por meio da determinação da mobilidade eletroforética das gotículas. Para isso, foram pesados 15mg das micropartículas e dispersos em 5mL de água Milli-Q. Na sequência, essa solução permaneceu em agitação magnética por 10 minutos a 500rpm. A amostra foi levada ao equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA).

4.5.3 Gel Contendo Extrato Aquoso das Folhas de *Eugenia dysenterica* Microencapsulado

Para a elaboração da base gel hidrofílica foram adicionados 1,6g de copolímero não iônico de Poloxamer 407, lote BCBN8763V, Sigma-Aldrich, USA) à uma solução aquosa contendo 0,3g de glicerina (Dinâmica, Brasil), 0,03g de ácido acético, 0,01g do preservante metil parabeno (Nipagin) (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), 0,01g do estabilizante EDTA (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), 0,01g do antioxidante BHT (Vetec, Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil) e 7,9g de água. A mistura foi deixada em repouso à 8°C por 24 horas e homogeneizada até que se formasse o gel hidrofílico contendo 16% de polímero. Após, adicionou-se 10% de micropartículas (1g) contendo EBA para a formulações carreadoras do ativo e para o placebo foi utilizada a base gel com (1g) de micropartículas vazias.

Nesta segunda formulação, um gel de Poloxamer® 16% com incorporação de 1g de micropartículas de quitosana contendo 5% de extrato bruto de *E. dysenterica* que foi denominado de GMQEA, amostra que armazenada à 40°C e 75% UR e GMQEB amostra armazenada à 25°C. As formulações foram envasadas em frascos de vidro com tampa plástica e recobertos por papel alumínio. Para cada formulação foi elaborado um placebo, contendo em sua composição componentes semelhantes, porém, sem adição de derivado vegetal.

4.5.4 Preparo das Emulsões

Foram preparados sistemas emulsionados de natureza não iônica. A formulação em base Polawax® (cera auto emulsioante não iônica) foi elaborada de acordo com a composição descrita no Quadro 1.

Quadro 1 – Formulação em base creme

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (%)	FUNÇÃO
FASE OLEOSA		
Polawax	10,0	Cera auto emulsioante não iônica
Vaselina líquida	3,0	Emoliente
Butilhidroxitolueno	0,05	Antioxidante
FASE AQUOSA		
EDTA-dissódico	0,1	Quelante
Metilparabeno	0,15	Conservante
Propilparabeno	0,05	Conservante
Glicerina	3,0	Umectante
Água destilada	q.s.p 100,0	Veículo

Para o preparo, cada uma das fases (aquosa e oleosa) foram aquecidos separadamente à 70°C. Ao alcançar a temperatura de 70°C, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa sob agitação constante. A agitação foi mantida até atingir a temperatura de 40°C. Por fim, a formulação resultante foi envasada em pote plástico.

O Quadro 2 mostra a composição desta emulsão com micropartículas carregadas de extrato aquoso de *E. dysenterica* incorporadas e que foram armazenadas sob 2 à 8°C ou em temperatura ambiente. Para esta forma, foram pesados separadamente cada componente da formulação e homogeneizados, sob agitação constante, as micropartículas com a emulsão até completa dispersão do pó. Seguidamente, esta foi submetida à análise de estabilidade. Da mesma forma foi preparada a emulsão com esta base e o óleo essencial 0,04%, assim em um gral, adicionou-se 40 µL do óleo em 100 g de emulsão base não iônica. Seguidamente, esta foi submetida à análise de estabilidade.

Quadro 2 – Formulações em base creme com micropartículas carregadas de extrato aquoso ou óleo essencial das folhas de *E. dysenterica*

EMULSÃO + MICROPARTÍCULAS COM EXTRATO DE <i>E. dysenterica</i> DC		
COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (%)	FUNÇÃO
Micropartículas com extrato de <i>E. dysenterica</i> DC	5,0	Ativo
Emulsão não iônica	q.s.p 100,0	Veículo
EMULSÃO + ÓLEO DE <i>E. dysenterica</i> DC		
COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (%)	FUNÇÃO
Óleo de <i>E. dysenterica</i> DC	0,04	Ativo
Emulsão não iônica	q.s.p 100,0	Veículo

4.5.5 Preparo da Nanoemulsão

O Quadro 3 traz a composição da nanoemulsão base. Para esta forma farmacêutica foram pesados separadamente cada componente da formulação. Homogeneizou-se o Oleato de etila associado com o Labrasol:Plurol (4:1); por fim adicionou-se, lentamente, a água sob a mistura em agitação constante.

Quadro 3 – Nanoemulsão base

NANOEMULSÃO BASE

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (%)	FUNÇÃO
Oleato de etila	6,0	Emoliente
Labrasol:Plurol (4:1)	43,5	Tensoativos
Água Milli-Q	50,5	Veículo

O Quadro 4 representa a nanoemulsão com óleo essencial obtido de folhas de *E. dysenterica* que foram armazenadas sob 2 à 8°C ou em temperatura ambiente.

Quadro 4 – Nanoemulsão preparada com óleo essencial obtido das folhas de *E. dysenterica*

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (%)	FUNÇÃO
Óleo de <i>E. dysenterica</i> DC	4,5	Ativo
Oleato de etila	1,5	Emoliente
Labrasol:Plurol (4:1)	43,5	Tensoativos
Água Milli-Q	50,5	Veículo

4.5.5.1 TAMANHO DE GOTÍCULA, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E POTENCIAL ZETA DA NANOEMULSÃO COM ÓLEO

O diâmetro hidrodinâmico das gotículas e o índice de polidispersão (PDI) foi analisado por meio do espalhamento de luz dinâmico. Para isso, foi preparado uma diluição aquosa da formulação na proporção de 1:100 (v/v). Em seguida, a análise foi realizada pelo equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA).

4.6 CONTROLE DA QUALIDADE DO PRODUTO ACABADO

Foram efetuados os testes de controle da qualidade do produto acabado de acordo com a Resolução (RE) nº 1/2005 (49, 52). Nesta fase busca-se realizar averiguações que irão estabelecer ou confirmar o prazo de validade e também as condições de armazenamento do produto. Para isso análises das características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas são essenciais.

As formulações preparadas foram submetidas à temperaturas de 25°C ± 2°C; 40 °C e 75% de umidade e 2°C a 8°C por, no mínimo, 60 dias e foram analisadas nos tempos 1, 7, 15, 30 e 60 dias, de acordo com os ensaios descritos a seguir.

4.6.1 Características Organolépticas

As características organolépticas das formulações foram determinadas realizando procedimento visual, inalatório e palpável. Para esse fim, foram considerados os seguintes itens: aspecto, cor, odor, sensação de tato e processos de instabilidade como cremação e separação de fases nos tempos determinados.

4.6.2 Determinação do Potencial Hidrogeniônico

O potencial hidrogeniônico (pH) das formulações foi aferido pela inserção de eletrodo de vidro diretamente sobre as amostras. As análises foram feitas utilizando um pHmetro digital da marca Digimed, modelo DM-22, previamente calibrado à temperatura ambiente.

4.6.3 Análise Quantitativa do Teor de Catequina para *Eugenia dysenterica*

A RDC 26/2014 e a Instrução Normativa (IN) 04/2014 reconhecem o uso do perfil cromatográfico como uma ferramenta que identifica a identidade da matéria-prima (48, 49). O doseamento para estudo de estabilidade acelerado admite uma variação entre 5,1% e 10% para liberar a validade do produto que será de 12 meses, mas estes valores se aplicam para produtos farmacêuticos (52). Todavia, para medicamentos fitoterápicos, se o marcador for ativo 15%, caso analítico 20% (190).

Na avaliação da constância do marcador analítico, o qual assegura a qualidade e a identidade do produto contendo micropartículas de quitosana, o padrão cromatográfico dos componentes característicos do extrato aquoso para comparação com o marcador analítico catequina foi obtido em condições semelhantes às descritas por Ferreira Nunes et al. (2017) (150). O método para doseamento da catequina presente na emulsão foi realizado por meio de um CLAE, modelo Shimadzu LC 20-AD. Equipamento composto por duas bombas (LC 20-AT), um injetor automático (9SIL-20AD) e forno (CTO-20AS), os quais estão acoplados a um detector espectrofotométrico (SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica *Shimadzu LC Solution*. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (300 mm x 3,9 mm; 10 µm; Waters®) e

fase móvel composta por uma mistura de ácido fosfórico 0,01 M: metanol (85:15) (v/v). A vazão da fase móvel foi de 0,8 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 5 µL; o forno foi utilizado à 40°C, a detecção foi feita em 230 nm. O período de análise de cada amostra foi de 13 minutos. Para tal análise 100 mg de cada emulsão foi diluída em balão volumétrico com capacidade para 10mL com 5mL de metanol grau CLAE. Em seguida, essa solução foi filtrada em filtro com porosidade 0,22µm e, para a quantificação de catequina nas formulações, utilizou-se o método cromatográfico validado citado acima. O mesmo procedimento foi realizado para as micropartículas de quitosana contendo extrato aquoso, porém foi pesado 10mg e diluídas com a mesma quantidade de solvente, além disso, a solução permaneceu em agitação constante por 1 hora.

4.6.4 Determinação de Contaminantes Microbiológicos

Foi avaliada a presença de bactérias, bolores e leveduras para a determinação de carga microbiana que possa estar contida no produto elaborado com EBA. Para tanto, foi utilizada a técnica de contagem em placa em superfície descrita na FB, a qual é recomendada para contagem de microrganismos viáveis em produtos em que não há exigência de estarem estéreis. Este ensaio consiste na possibilitação da contagem da população total de bactérias mesófilas e fungos que apresentam crescimento detectável em até 5 dias, em ágar caseína-soja a 32,5°C ±2,5°C e em até 7 dias, em ágar sabouraud-dextrose a 22,5°C ±2,5°C (168).

Para este procedimento, primeiramente foi preparado o caldo neutralizante *DEY-ENGLEY* conforme descrito na FB e no item 4.1.5.4.

Também foram preparadas placas de petri contendo 20mL de ágar caseína soja para análise de bactérias e sabouraud-dextrose para análise de bolores e leveduras, os quais foram elaborados conforme instrução do fabricante, esterilizado e vertidos nas placas.

Preparo da amostra teste com caldo neutralizante DEY-ENGLEY:

A inibição do efeito antimicrobiano de metabólitos secundários presentes na amostra foi neutralizado como descrito a seguir. Em ambiente asséptico, foi

misturado 1g de amostra das formulações preparadas à 9ml de caldo neutralizante, e seguidamente realizadas diluições decimais sucessivas com água destilada estéril.

Contagem do número total de microrganismos mesófilos

Foi verificada a existência de bactérias mesófilas e fungos nas formulações preparadas com EBA e também para o placebo. Para isso, foi empregado o método de contagem em placa com semeadura de superfície (168). Este teste consiste na contagem do número de microrganismos que apresentam crescimento visível, em até 5 dias, em ágar caseína-soja à 32,5°C \pm 2,5°C, para avaliação da presença de bactérias e em até uma semana, em ágar sabouraud-dextrose à 22,5°C \pm 2,5°C, para detectar o desenvolvimento de fungos.

O registro do resultado para determinação do número de microrganismos foi calculado a partir da média aritmética das placas de cada meio e o número de UFC por grama ou mL do produto e assim, determinar se o produto satisfaz às exigências microbiológicas farmacopeicas para o fim que se propõe (168).

4.7 ESTUDO *IN VITRO* DE LIBERAÇÃO DA CATEQUINA DA EMULSÃO COM MICROPARTÍCULAS CARREGADAS COM EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *EUGENIA DYSENTERICA*

Para o ensaio de liberação foi utilizado células de difusão de Franz (área de difusão =1.85cm²) modificadas e membranas sintéticas hidrofílicas de acetato de celulose (PM 12000 a 4000 Da, Fisherbrand, Leicestershire, UK) para separar o compartimento doador do receptor de cada célula.

No compartimento doador foram adicionadas as amostras (extrato de *E. dysenterica*, micropartícula + extrato de *E. dysenterica* e emulsão + micropartícula). A solução receptora contida no compartimento inferior da célula foi um tampão fosfato pH 7,40 mantido a temperatura ambiente durante todo o tempo do experimento. Essa solução foi sendo repostada ao compartimento receptor à medida que, de 1 hora em 1 hora, foram coletadas para análise de 1mL de solução receptora ao longo de 24 hora de experimento.

A quantidade de fármaco liberada foi determinada por CLAE pela análise das amostras coletadas após a filtração em membranas acopladas à seringas de porosidade de 0,22µm usando a mesma metodologia validada por Ferreira Nunes et

al. (2017) (150). O perfil de liberação da catequina a partir das formulações foi determinado correlacionando-se a quantidade de catequina liberada (μg) em função do tempo (h).

Para se determinar a quantidade de fármaco liberado que se difunde através da membrana hidrofílica em cada intervalo de tempo foi necessário realizar um cálculo de acordo com a seguinte equação:

$$Q_{\text{realt}} = C_{\text{mensurado}} \times V_r + V_a \times \sum^{n-1} C_a \text{ (Equação 1)}$$

onde: Q_{realt} é a quantidade liberada acumulada de catequina no tempo t ; $C_{\text{mensurado}}$ é a concentração mensurada de catequina da coleta no tempo t ; V_r é o volume do compartimento receptor da célula de difusão; V_a é o volume de amostra removido na coleta; e C_a é a concentração de catequina na amostra removida.

4.8 ESTUDOS DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA IN VITRO DA CATEQUINA DA EMULSÃO COM MICROPARTÍCULAS CARREGADAS COM EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Eugenia dysenterica*

Para a realização dos experimentos de permeação cutânea, as peles de orelha de suínos foram doadas pela Bonasa Alimentos (Brasil). As células de difusão vertical do tipo Franz modificadas foram montadas usando pele de orelha de porco para separar o meio doador do receptor Figura 3.

Inicialmente as células de difusão de Franz foram montadas utilizando a pele de orelha de suíno separando o meio doador do meio receptor. O compartimento receptor foi preenchido com solução tampão pH 7,40. Em seguida, as células montadas foram colocadas em banho de aquecimento a 32°C e deixadas por 30 minutos. No compartimento doador foram adicionados 0,5g de cada formulação, micropartículas contendo EBA ou somente EBA. A solução receptora foi mantida sob agitação constante (600rpm) durante todo o período do experimento (24 horas).

Ao final dos experimentos de permeação cutânea, foi quantificado a catequina que permaneceu retida no estrato córneo na pele remanescente. Utilizou-se para tal a técnica denominada *tape stripping*.

A pele de suíno foi retirada da célula de difusão, limpa com água Milli-Q e seca com papel toalha. Em seguida ela foi esticada e fixa sob um suporte de isopor.

Um *template* de plástico com área de 1cm² foi colocado sob a pele para deixar exposto somente a área que permaneceu em contato com a formulação. O estrato córneo foi totalmente removido com o auxílio de 10 fitas adesivas 3M. Em seguida, tanto as fitas adesivas quanto a pele remanescente picotada com auxílio de uma tesoura individualmente foram colocadas em frascos de vidro âmbar, de onde se extraiu a catequina pela adição de 5 mL de tampão pH 3,0. Os frascos foram colocados em Ultra-turrax (IKA T18) por 5 minutos à 6000rpm para extração da catequina das amostras. Após este processo, as amostras foram centrifugada à 4000rpm por 30 minutos em centrífuga (TDL 80-2B). O sobrenadante das amostras foi filtrado em membrana com porosidade de 0,22µm e quantificado por CLAE (150).



Figura 3 - Célula de difusão do tipo Franz montada com a pele de orelha de suíno separando o meio doador do meio receptor.

4.9 ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FORMULAÇÃO

Para este ensaio foi analisada somente a emulsão com micropartículas com extrato aquoso contra *S. aureus* (ATCC 25923) e *S. aureus* (ATCC 29213) similarmente ao item 4.2.3.2 e 4.3.1. Neste ensaio ao invés de discos, foram confeccionados poços no ágar e depositados 100mg de amostra em cada poço e decorridas 24 horas fez-se a aferição dos halos comparando-se a 3 medicamentos disponíveis no mercado para uso tópico no tratamento de feridas, sendo 2 sintéticos e 1 fitoterápico (Tabela 5).

Tabela 5 - Medicamentos utilizados no tratamento de feridas

Medicamentos	Concentração	Forma farmacêutica	Fabricante
Sulfato de Neomicina	5 mg/g	pomada	Cifarma
Sulfadiazina de prata	10 mg/g	creme	União Química
Fitoscar	60 mg/g	pomada	Apsen

4.10 ANÁLISE DOS DADOS

Todos os dados são representados pela média e desvio padrão dos resultados de pelo menos três experimentos independentes. Significâncias estatísticas foram calculadas com o GraphPad Prism Version 5.0, usando testes One Way Anova para os testes de estabilidade e *scratch* e Bonferroni para testes de múltiplas comparações. O nível de diferenças com significância estatística foi definido como $p < 0.05$.

4.11 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O presente estudo envolveu o uso animal com aprovação pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília, sob o Protocolo de número: 77/2017, o qual aprovou a utilização de ovos embrionados de White leghorn (235), conforme Anexo 1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade de um medicamento fitoterápico seguramente está aliada ao controle da qualidade todas as etapas de sua produção. Estudos visando comprovar a qualidade da matéria-prima vegetal, a atividade farmacológica, a capacidade toxicológica e a biodisponibilidade em seu sítio de ação podem ser o princípio para nortear uma investigação e introduzir no mercado de medicamentos uma nova opção terapêutica.

5.1 PARÂMETROS DE CONTROLE DA QUALIDADE DA DROGA VEGETAL

Direcionando-se pelos parâmetros exigidos pela RDC nº 26/2014, que versa sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos e pela RDC nº 17/2010 que estabelece as BPF, (49, 50, 190), foi avaliado o perfil farmacognóstico da droga vegetal de *E. dysenterica*. A análise farmacognóstica apresentou parâmetros de qualidade que favorecem a obtenção de novas informações sobre a espécie vegetal.

5.1.2 Identificação do Material Botânico

Apesar da espécie em estudo não estar referida na lista das DCBs, esta poderá vir a compor a relação desta lista, assim como *Aloe vera* (L.) Burm. F. e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville que são amplamente empregadas em produtos de uso tópico (166). Nas bases de dados pesquisadas a espécie está em concordância com *Eugenia dysenterica* DC., pertencente ao gênero *Eugenia* e à família Myrtaceae (143, 191).

5.1.3 Caracterização Organoléptica da Droga Vegetal

As folhas exalam aroma característico, são avermelhadas quando jovens e esverdeadas e com brilho quando na maturidade, características que podem contribuir para a sua identificação, assim como descritas por estudos anteriores (Figura 4 A e B) (21, 167, 192).



Figura 4 - Folhas jovens de *E. dysenterica* (A). Folhas maduras de *E. dysenterica* (B)

5.1.4 Secagem e Armazenamento

A matéria-prima vegetal coletada foi desidratada em estufa com circulação de ar artificial. Após o processo de secagem artificial pesou 3.448,3g e seguidamente pulverizada 3.379,3g, diferença esta que se atribui as perdas ao longo do processo. O material vegetal pulverizado obtido foi armazenado em frasco de vidro e recoberto com papel alumínio objetivando-se a proteção da luz até a utilização nos ensaios.

5.1.5 Testes de Pureza e Integridade

5.1.5.1 Determinação de Matérias Estranhas

A matéria-prima vegetal que foi usada para obtenção de extratos necessita ser avaliada quanto ao seu conteúdo de elementos incomuns à sua constituição. Com base nas amostras analisadas, após a separação do material foram obtidos 4g de sujidades, o que representa um percentual de 1,2% de material estranho, sendo assim a matéria-prima coletada apresentou quantidades de impurezas que atendem as exigências da FB que considera para uma amostra de folhas de *Eugenia uniflora* L. em conformidade quando esta contém $\leq 2\%$ de material estranho (168). Assim como na monografia para casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) o valor máximo permitido de material estranho também é de 2% e para capítulos florais de *Arnica montana* L. (Asteraceae) que está estabelecido que não deve haver mais do que 5% de caules, (135). O percentual de contaminantes da droga vegetal examinada está em conformidade com os parâmetros farmacopeicos,

que de maneira geral estipulam um máximo de 2% de tolerância para material estranho (190).

5.1.5.2 Determinação de Água

Um fator determinante para a qualidade e segurança da droga vegetal é o seu teor de umidade, pois a presença de água favorece o desenvolvimento de microrganismos e a hidrólise de princípios ativos (193).

A taxa de umidade das folhas frescas foi de $36,63\% \pm 0,212$, após receberem o tratamento de desidratação em estufa, apresentaram porcentagem de água dentro dos limites estabelecidos pela FB que estipula entre 6 e 15% nas múltiplas monografias e com estudos anteriores que avaliaram o pó das folhas desta espécie onde foi verificado uma umidade de 8,1% (147, 168). Algumas monografias como a de folhas de *Peumus boldus* Molina (Monimiaceae) é de 10,0% e para *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek (Celastraceae) o teor máximo é de 12% (135). Os resultados de umidade demonstram que o processamento está adequado para a espécie, pois foi observada uma taxa de $8,73\% \pm 0,503$ de umidade.

5.1.5.3 Determinação de Cinzas Totais

Na determinação de cinzas totais a amostra da droga vegetal depois de seca e pulverizada foi incinerada e conseqüentemente toda a sua matéria orgânica transformada em CO₂, em seguida seu conteúdo inorgânico, tanto de origem fisiológica (carbonatos, fosfatos, cloretos, óxidos) ou não fisiológica (areia, pedra, gesso, terra) foi incinerado, restando apenas compostos minerais na forma de cinzas, apresentando 7,02% de resíduo. O teor apresentado pela espécie está próximo ao designado para a espécie *Eugenia uniflora* L. que está descrito em sua monografia 11%, que assim como a *E. dysenterica* fazem parte da família Myrtaceae (135). Bem como, aproximado do conteúdo de cinzas totais alcançado por estudo realizado com o pó das folhas de *E. dysenterica*, que foi reportado um percentual de 2,9% (147). A quantidade máxima aceita pela FB situa-se entre 2 e 20% segundo descrito em suas monografias (135).

O conteúdo de cinzas totais serve como parâmetro para uma determinada matéria-prima vegetal, indicando a presença de impurezas que podem estar

presentes como contaminantes como terra ou adulterantes, portanto a amostra analisada está de acordo com o percentual apresentado por outra espécie do mesmo gênero e atende aos parâmetros exigidos pela FB.

5.1.5.4 Determinação de Metais Pesados

Está previsto na RDC nº 26/2014 a determinação de metais pesados para plantas medicinais uma vez que estes elementos contaminantes podem estar contidos em amostras de tecidos vegetais em virtude da poluição ambiental e resíduo de agrotóxicos (49, 194). A OMS preconiza a determinação de chumbo e cádmio em plantas de uso medicinal (195).

A análise para quantificação por espectrometria possibilitou a determinação de dezessete elementos encontrados na amostra da parte aérea foliar da espécie entre estes os metais pesados e elementos minerais essenciais Figura 5.

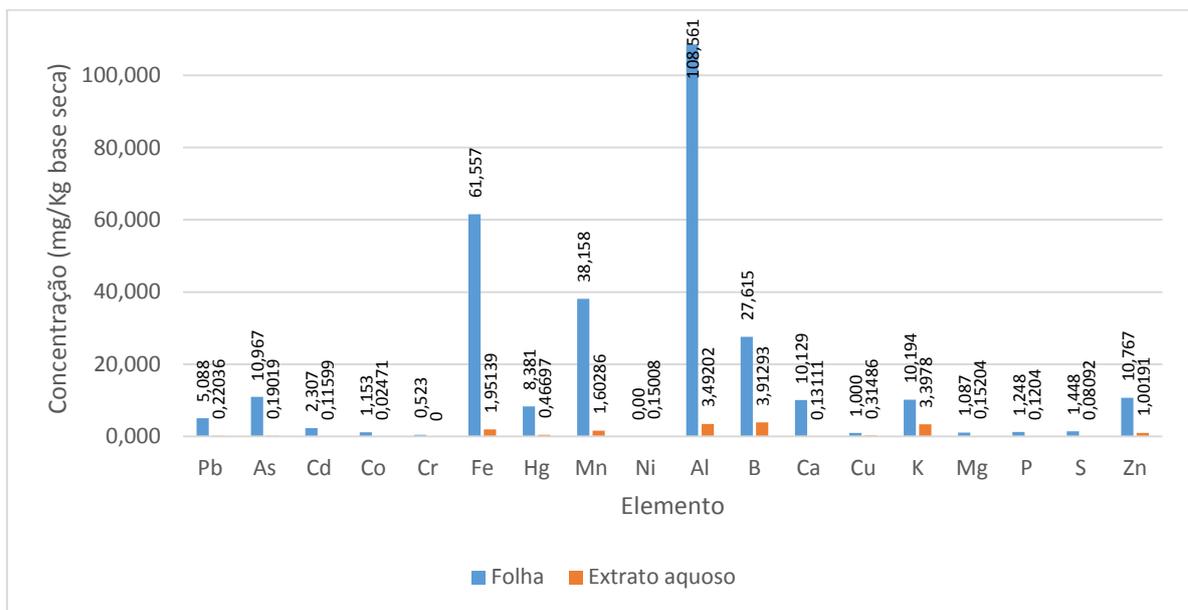


Figura 5 - Concentração de metais pesados e elementos minerais da folha pulverizada e do extrato aquoso liofilizado de *Eugenia dysenterica*

Em relação à determinação quantitativa dos elementos minerais essenciais das folhas de *E. dysenterica* encontra-se o potássio (10,194mg/kg), seguido pelo cálcio (10,129mg/kg), enxofre (1,448mg/kg), fósforo (1,248mg/kg) e magnésio (1,087mg/kg). Para os metais sobressaiu-se o alumínio (108,561mg/kg). Esta quantidade de alumínio pode ser atribuída ao reconhecido predomínio de elevada

concentração deste elemento nos solos do cerrado e que algumas plantas como *Miconia ferruginata* (DC.) Cogn., *Miconia pohliana* Cogn. (Melastomataceae); *Palicourea rigida* H. B. K. (Rubiaceae); *Qualea grandiflora* Mart., *Qualea multiflora* Mart., *Qualea parviflora* Mart. (Vochysiaceae); *Vochysia elliptica* (Spr.) Mart., and *Vochysia thyrsoidea* Pohl (Vochysiaceae) que ocorrem nesta região acumulam este mineral em suas folhas (196, 197).

Recente, estudo avaliou plantas de *E. dysenterica* povoando áreas degradadas e contaminadas com metal pesado, neste tipo de solo foi reportado que a espécie foi mais sensível ao cádmio (Cd) e promoveu maior translocação. Nas partes aéreas (folhas e caule) foram computados $6,51\text{mg/kg}^{-1}$ de Cd e $383,51\text{mg/kg}^{-1}$ de zinco (Zn), consideravelmente maior quantidade do que a mensurada nesta avaliação que foi de $2,307\text{mg/kg}$ e $10,767\text{mg/kg}$ respectivamente (198). De forma semelhante Caldas e Machado (2004), relataram altas concentrações de metais pesados em plantas nacionais ou de outras regiões geográficas, superior concentração de cádmio foi encontrada em plantas medicinais brasileiras, além de chumbo (Pb) (199). Alarmantes foram os dados obtidos para extratos de castanheira-da-Índia (*Aesculus hippocastanum*) oriundos de importação (França e Alemanha), em que foi detectado Pb em uma taxa de 1.480 mg/g , cerca de 440% acima da dose admitida que é de 10 mg/kg (199).

Outro estudo, avaliou a presença de Pb e Cd em plantas em 11 plantas medicinais Iranianas e destas 10 excederam a concentração aceitável de Pb e no caso do Cd foram 7 (200). Na espécie *Solanum melongena* L. (berinjela), foi encontrado Pb, Zn, Cd e níquel (Ni), sendo sua presença imputada ao solo onde esta se desenvolveu, pois neste há remanescentes destes elementos advindo da indústria metalúrgica, principalmente Pb e Cd que podem acarretar danos à saúde humana quanto a de outros organismos (201).

A OMS delimita para plantas medicinais e produtos até 10mg/kg de Pb e $0,3\text{ mg/kg}$ de Cd (195). Quanto ao Pb, a amostra encontra-se dentro dos padrões, porém, em relação ao Cd foi constatado valor acima, o que pode ser justificado pela susceptibilidade que a espécie tem para translocar este elemento (198). Outro estudo relata que existem plantas que têm a capacidade de acumular estes elementos (202). Já em relação ao Hg ($0,467\text{mg/kg}$) o derivado vegetal atende o requisito máximo que é de 1mg/K (203).

Portanto, faz-se expressiva a necessidade de enfatizar recomendações para que as autoridades devam fazer cumprir regulamentos para estudos de segurança para produtos à base de plantas, a fim de proteger o saúde do público, haja visto que metais pesados são tóxicos (204, 205).

Plantas medicinais estão sujeitas a contaminações físico-químicas (metais tóxicos, agrotóxicos, solventes) e biológicas (fungos, bactérias, parasitas, insetos), sendo que os elementos contaminantes devem ser evitados e controlados por meio de medidas que garantam a qualidade da droga vegetal (195).

Frente aos resultados obtidos e seguindo-se as BPF, as medidas tomadas para a garantia de qualidade foram eficientes, assegurando que o produto está em conformidade para seu uso (50).

5.1.5.5 Determinação de Contaminantes Microbiológicos

Considerando-se que produtos vegetais estão em contato direto com o ambiente, logo, estão passíveis de serem portadores de contaminantes como esporos fúngicos, bactérias e até mesmo de pequenos seres vivos, então, devido a estes fatos é de suma relevância o controle microbiológico de plantas medicinais (206). A natureza desta contaminação pode provocar deterioração da matéria-prima e causar o desenvolvimento de doenças nos usuários. Assim, torna-se necessário garantir a qualidade e segurança desta forma de produto desde a coleta, armazenamento, manipulação até o do produto acabado (207).

Deste modo, uma etapa crucial para a garantia da qualidade é o controle das BPF, com isso visa-se garantir que o produto cumpra as especificações preconizadas, ou seja, que atendam aos limites aceitáveis de microrganismos presentes na amostra, considerando-se o tipo mais provável de contaminante conforme o produto, sendo assim, os limites oficiais são de 10^7 UFC/g de bactérias e de 10^4 UFC/mL de fungos para drogas vegetais submetidas a processos extrativos a quente (168).

Este ensaio foi realizado visando examinar a existência de contaminação microbiana na droga vegetal de *E. dysenterica*, para detectar a presença de bactérias e fungos nesta matéria-prima que foi utilizada para o preparo do derivado vegetal e posteriormente das formulações.

Na contagem do número total de microrganismos mesófilos nas folhas pulverizadas de *E. dysenterica*, não foi observado crescimento de bactérias e $2,3 \times 10^3$ UFC/g de fungos. A ausência de desenvolvimento bacteriano em qualquer das repetições pode ser atribuído ao produto estar isento de contaminação bacteriana. Em relação à presença de fungos, os resultados da contagem estão de acordo com os limites estabelecidos oficialmente, pois foi observado $\leq 10^4$ UFC/mL.

5.2 PARÂMETROS DE CONTROLE DA QUALIDADE DOS DERIVADOS VEGETAIS

Semelhantemente à droga vegetal o derivado também deve estar em concordância com os parâmetros exigidos pela RDC nº 26/2014, RDC nº 17/2010 (49, 50, 190). Análises de controle da qualidade do derivado vegetal são imprescindíveis para contribuir para a qualidade do medicamento.

5.2.1 Relação Aproximada de Droga Vegetal: Derivado Vegetal

Com o processo empregado (infusão) o rendimento do EBA foi de 9,27% (Figura 6 A e B), o que está em concordância com o encontrado ao manufacturar-se este mesmo tipo de extrato, como o elaborado por Zorzini (2014), o qual rendeu 7% (169). Assim como em outra extração que utilizou 100mL a mais de solvente e obteve-se um rendimento de 10% e em outros estudos, variando o rendimento entre 7 e 15,8% (169, 208, 209). Alves et al. (2011), avaliaram a influência da sazonalidade sobre o rendimento do extrato hidroalcolico seco elaborado com folhas coletadas na estação chuvosa e seca e verificaram que os extratos de *E. dysenterica* em ambas estações exibiram um produto similar, sendo encontrado para o período chuvoso e seco, 15,1 e 15,8% respectivamente (209). A variação do rendimento em relação ao encontrado pelos estudos anteriores pode ser em função da granulometria utilizada, pois quanto menor a partícula, maior contato entre estas e o solvente extrator e conseqüentemente superior rendimento.

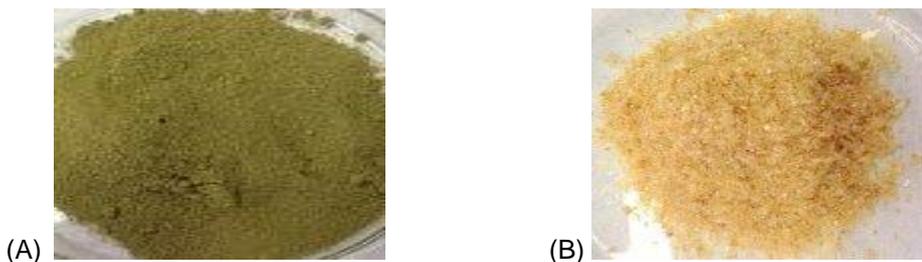


Figura 6 - Folhas pulverizadas de *E. dysenterica* (A). Derivado vegetal das folhas de *E. dysenterica* (B)

Neste estudo, a hidrodestilação das folhas de *E. dysenterica* produziu um óleo essencial claro, com um rendimento de 0,18%. Um estudo precedente obteve rendimentos aproximados do encontrado neste estudo 0,15%, por outro lado, noutro estudo foi obtido 0,34%; v/w, para a respectiva espécie (18, 155). Outra espécie da família Myrtaceae, a *Eugenia platysema* 0, 0039% (210). O óleo de dois membros da família Myrtaceae, *Eugenia uniflora* e *Plinia trunciflora* apresentaram rendimento de 0,1% e 0, 2% (w/w), respectivamente (211).

5.2.2 Testes de Pureza e Integridade

5.2.2.1 Determinação de Metais Pesados

A concentração de metais pesados quantificada por espectrometria possibilitou a determinação de elementos na amostra do derivado vegetal proveniente da parte aérea foliar da espécie (Figura 5). O derivado vegetal está em conformidade, pois exibiu concentrações de Pb e Cd que atendem as preconizadas pela OMS, por conseguinte a amostra do derivado vegetal apresenta ser segura para uso humano semelhante a um estudo que avaliou a infusão de *Camellia sinensis* (195, 212).

Contudo, a variação de metais pesados em relação à droga vegetal e ao derivado vegetal podem ser devido ao processo e ao solvente utilizado na obtenção do derivado vegetal, pois na literatura encontram-se relatos que no processo de extração por infusão normalmente não são extraídos metais pesados e quando a extração utiliza meio ácido este promove aumento na disponibilização destes como foi utilizado neste ensaio (212, 213).

5.2.2.2 Determinação de Contaminantes Microbiológicos

No extrato seco de folhas de *E. dysenterica* não foram contabilizadas nenhuma colônia de bactéria e $1,98 \times 10^2$ UFC/g de fungos, com características filamentosas. A FB admite até 10^4 UFC/mL para bactérias e 10^3 UFC/mL de fungos para derivado vegetal, no caso de extrato seco (168). Pela observação das características dos fungos, presume-se que sejam fungos endofíticos característicos da espécie, pois em nosso grupo de estudo, tem sido isolado microrganismos idêntico para esta espécie (214).

5.2.3 Caracterização Físico-Química dos Derivados Vegetais

A caracterização dos derivados vegetais desempenha um papel importante para o controle da qualidade, a partir do estabelecimento de especificações dos parâmetros da qualidade essenciais quando visa-se a produção comercial de produtos à base de plantas.

5.2.3.1 Caracterização Físico-Química do Extrato Aquoso de Folhas de *E. dysenterica*

5.2.3.1.1 Granulometria

Os resultados da avaliação da granulometria do extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* permitiram caracterizá-lo segundo a FB, pois suas partículas não passaram totalmente pelo tamis com abertura de $355\mu\text{m}$ o que o caracteriza como um pó semifino (168).

5.2.3.1.2 Determinação de Água

O percentual de umidade do extrato liofilizado foi analisado em analisador por infravermelho. Assim, foi obtido um percentual de água de 6,3% o que está próximo ao relatado por outro estudo com extrato semelhante, onde foi citada uma umidade entre > 4 e $< 6\%$ (169). O resultado de umidade demonstra que o processamento está adequado para a espécie.

5.2.3.1.3 Determinação de Resíduo Seco

Após o processo de extração e da liofilização o extrato apresentou 96,25% de resíduo seco, correspondendo ao percentual indicado na FB que é de \geq a 95% (168).

5.2.3.1.4 Determinação da Solubilidade

O extrato aquoso de *E. dysenterica* apresentou solubilidade em água a temperatura de 70°C, na relação de uma parte de amostra para 10 partes de solvente (1:10), o que o classifica como uma substância facilmente solúvel conforme a FB (168). Característica igualmente observada com metanol.

Um estudo avaliou o extrato seco de folhas de *Aloe ferox* Mill., *Aloe africana* Mill. e de *Aloe spicata* L.f. (Xanthorrhocaceae), que apresentaram solubilidade parcial em água fervente (135).

5.2.3.1.5 Determinação da Densidade Aparente

A densidade aparente média do extrato aquoso das folhas pulverizadas de *E. dysenterica* encontrada foi de 0,15g/mL, que pode ser considerada aceitável. Valor aproximado ao encontrado foi relatado para o pó das folhas de *Montrichardia linifera* (arruda) Schott (Araceae) para o qual foi relatada uma densidade de 0,32g/mL usando o mesmo método (215).

5.2.3.1.6 Determinação de Substâncias Extraíveis por Etanol

O teor de extração com etanol pode ser considerado efetivo, foi encontrado um percentual de 34,5% de substâncias extraídas, pois o resultado encontrado foi semelhante ao encontrado para o pó das folhas da mesma espécie, que foi de 34,9% (147). O quantitativo de extrativos demonstrou uma porcentagem de extração relevante, considerando o rendimento de extrato/massa de droga vegetal, dado que indica a viabilização da sua utilização.

5.2.3.2 Caracterização Físico-Química do Óleo Essencial

5.2.3.2.1 Determinação da densidade

A densidade relativa é um parâmetro de suma importância nas verificações da pureza e qualidade de um óleo essencial, sendo um fator indicador de fraudes neste tipo de derivado vegetal. O óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* apresentou densidade de 0,836g/mL, esses valores são bem próximos dos relatados para o óleo de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., (capim limão) que relatou para este óleo uma densidade de 0,892g/mL (216). Outros resultados similares foram relatados para o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. e *Baccharis uncinella* DC., que apresentaram uma densidade relativa de 0,915 e 0,915 (217).

5.2.3.2.2 Determinação do Índice de Refração

O óleo essencial de folhas de *E. dysenterica* apresentou índice de refração de 1,492, valores similares foram relatados para o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* e *Baccharis uncinella*, que apresentaram um índice de refração de 1,459 e 1,460 (217).

5.2.4 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador nos Derivados Vegetais de *Eugenia dysenterica*

5.2.4.1 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador no Extrato Aquoso de *Eugenia dysenterica*

O perfil cromatográfico, segundo a RDC nº 26/2014, é utilizado para auxiliar a identificação química do material vegetal, sendo critério de exigência para derivado vegetal que pleiteia-se incorporá-lo na manipulação de um produto fitoterápico acabado, principalmente a título de requerimento de um futuro registro junto a agência reguladora, ANVISA (49).

O emprego da técnica de CLAE é uma das mais utilizadas, este método permite a separação e o isolamento de substâncias de um extrativo vegetal qualitativamente e quantitativamente, permitindo tanto o conhecimento da composição química, quanto o potencial princípio ativo, como também para a

determinação de uma substância, ou grupo de substâncias, que sirva como marcadora da espécie. No que diz respeito ao controle qualitativo e quantitativo do derivado vegetal, esta técnica é útil por possibilitar a separação de misturas complexas como às presentes em extratos e, assim propiciando a padronização do material vegetal e produtos relacionados. Além de, auxiliar na identificação de espécies e possíveis adulterações ao oportunizar a comparação de amostras com um padrão ou outra amostra genuína (218, 219).

A análise da proporção do marcador químico no derivado vegetal é uma etapa substancial para garantir sua segurança e eficácia de sua utilização. A metodologia por CLAE desenvolvida por Ferreira- Nunes et al. (2017) é eficiente para estabelecer o controle de qualidade químico do extrato aquoso elaborado com as folhas da espécie nativa do Cerrado, podendo ser utilizado como uma metodologia para assegurar a autenticidade tanto da matéria-prima vegetal quanto de fitoterápicos produzidos a partir desta espécie (Figura 7) (150).

De acordo com Gil et al. (2007), este tipo de análise é possível para esta finalidade graças ao sistema de detecção por ultravioleta (UV), com arranjos de diodos (DAD), onde os espectros no UV, obtidos por meio desta técnica geram informações a respeito das classes de marcadores químicos presentes nas drogas vegetais, além de permitir discriminar misturas complexas como as dos extratos vegetais (219).

Esta metodologia alicerçada na quantificação por CLAE tem sido empregada mundialmente, inclusive para aferir o teor de catequina (149, 220). Esta técnica foi empregada com este fim para *Camellia sinensis* (221). Este método é descrito na FB para doseamento de ácido gálico e galocatequina em *Stryphnodendron adstrigens* (Mart.) Covile (barbatimão) e de epicatequina em *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek conforme se constata em suas monografias (135).

O extrato EBA apresenta em sua composição a prevalência de catequina, o que justifica em partes as atividades farmacológicas evidenciadas como cicatrizante, anti-inflamatória e antimicrobiana descrita neste estudo.

Estudo conduzido com o extrato etanólico de folhas de cagaita para determinar a composição fitoquímica deste derivado vegetal que foi analisado por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), o qual indicou a presença de taninos, flavonoides, terpenos e saponinas (18).

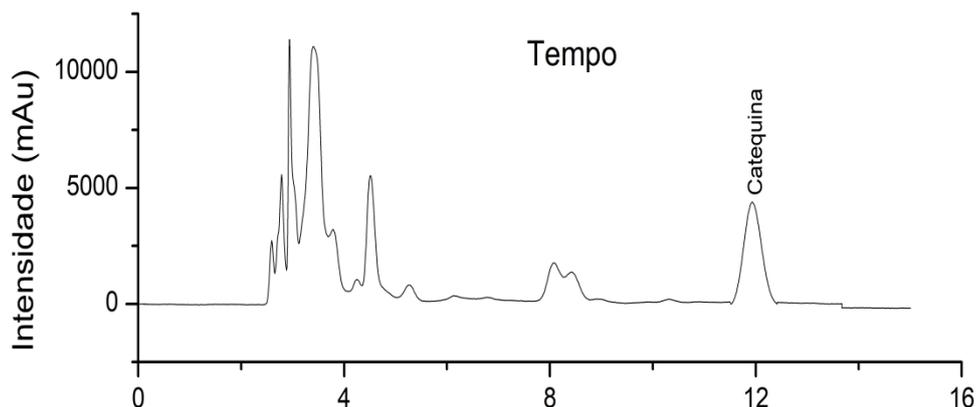


Figura 7 - Perfil cromatográfico do extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* (150)

5.2.4.2 Perfil Cromatográfico e Análise Quantitativa do Marcador no óleo essencial das folhas de *Eugenia dysenterica*

O óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* contém principalmente sesquiterpenos e monoterpenos (18, 155). Os sesquiterpenos compõem normalmente até 60% do óleo de *E. dysenterica*, obtido por hidrodestilação, segundo a literatura, sendo observado a presença de sesquiterpenos numa proporção de 14,8% de beta cariofileno e 10,9% de alfa humuleno (18). A presença de beta cariofileno e alfa humuleno em percentuais de 15,36 e 8,07%, respectivamente, foram reportadas em um estudo recente (155).

A análise por CG-EM mostrou que o óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* contém, em sua composição, vários sesquiterpenos, dos quais beta-cariofileno e alfa-humuleno representam 43,39% da amostra analisada sendo 24,36% de beta-cariofileno e 19,3% de alfa-humuleno, além de uma expressiva quantidade de δ -selinene pico 5 (24,75%).

Neste estudo, o perfil cromatográfico do óleo essencial de folhas de *E. dysenterica* e analisado por meio de CG-EM, revelou a presença de picos com tempos de retenção entre 10 e 30 minutos, incluindo beta cariofileno e alfa humuleno (picos 2 e 4) respectivamente, sendo o primeiro o predominante (24,36%), corroborando os dados já relatados na literatura (Figura 8) (154-156). Outros óleos essenciais obtidos de espécies de Myrtaceae apresentam também altas concentrações de terpenos (117, 222, 223).

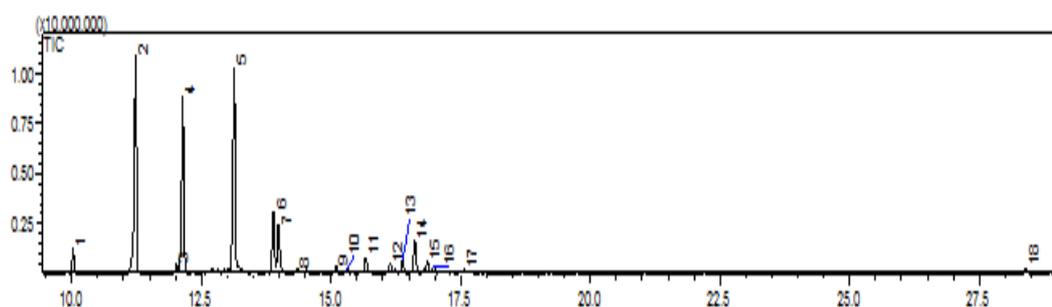


Figura 8 - Cromatograma do óleo essencial de folhas de *E. dysenterica* obtido por CG-EM, beta-cariofileno (2) e alfa-humuleno (4)

Estudos prévios tem revelado que há variabilidade na composição de óleo essencial oriundo de folhas de *E. dysenterica* em relação a influência sazonal (temperatura, umidade, composição do solo, latitude) ou por fatores genéticos (140, 156). No entanto, os resultados deste estudo não diferiram dos demais encontrados na literatura.

5.3 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS DERIVADOS VEGETAIS DAS FOLHAS DE *Eugenia dysenterica*

5.3.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana e Concentração Bactericida Mínima

A atividade antimicrobiana de EBA foi investigada contra bactérias Gram-positivas usando os métodos de difusão e microdiluição. O método de difusão em permite fazer uma triagem prévia para constatar o perfil de sensibilidade de microrganismos, enquanto o método de microdiluição quantifica o potencial inibitório (172).

Conforme preconizado por alguns autores para este tipo de análise, os extratos que exibem uma CIM inferior a 100ug/mL podem ser classificados com uma a atividade é boa atividade antimicrobiana; CIM de 100 a 500ug/mL a atividade antimicrobiana é classificada como moderada atividade e de 500 a 1000ug/mL a atividade antimicrobiana é considerada fraca. Acima desta concentração o extrato pode ser considerado inativo (224). Porém, segundo Aligiannis et al. (2001), a

eficácia antimicrobiana abaixo de 500µg/mL é forte, de 600 até 1500µg/mL é moderada e acima de 1600µg/mL é fraca (225).

De acordo com ensaios realizados por meio de difusão com discos, poços e microdiluição, as linhagens bacterianas foram sensível ao extrato EBA que promoveu halos de inibição, assim como foram ativos a CIM moderada. A sensibilização das cepas de *S. aureus* por meio de discos produzira halos límpidos e de 10mm ou mais com concentrações $\geq 62,5\mu\text{g}/\text{disco}$ para a cepa sensível (25923) a AMP, ao passo que a cepa produtora de beta lactamase foi susceptível a concentrações $\geq 500\mu\text{g}/\text{disco}$ (Tabela 6 e 7). A partir desta reposta inibitória satisfatória para estes microrganismos procedeu-se o teste de microdiluição para definir a CIM.

Tabela 6. Halos de inibição (mm) produzidos por EBA contra *S. aureus* 25923 por difusão em disco ou poço

Amostra	Concentrações µg/disco/poço											
	1000		500		250		125		62,5		10	
	disco	poço	disco	poço	disco	poço	disco	poço	disco	poço	disco	poço
EBA	16,02	23,72	14,41	21,68	12,18	19,68	10,03	18,64	$\leq 10,0$	15,55	-	-
	$\pm 0,02$	$\pm 0,06$	$\pm 0,20$	$\pm 1,42$	$\pm 0,05$	$\pm 0,10$	$\pm 0,15$	$\pm 0,88$	0	$\pm 0,25$		
AMP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	36,74
												$\pm 0,31$
AMOX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,02
												$\pm 0,38$

Tabela 7. Halos de inibição (mm) produzidos por EBA contra *S. aureus* 29213 por difusão em disco ou poço

Amostra	Concentrações µg/disco/poço											
	1000		500		250		125		62,5		10	
	disco	poço	disco	poço	disco	poço	disco	poço	disco	poço	disco	
EBA	13,26	15,97	-	14,48	NI	12,99	NI	NI	NI	NI	-	
	±0,25	±0,11		±0,82		±0,61						
AMP	-		-		-		-				26,49	
											±0,08	
AMOX	-		-		-		-		-		18,35	
											±0,01	

NI= Não inibiu

Nos resultados do teste de difusão em disco para a cepa ATCC 25923 e a 29213, a zona produzida por AMP para 29213 (26,49mm) já era esperada, porque trata-se uma cepa produtora de β -lactamase e o espectro de atividade desta penicilina não é eficaz para cepas que produzem esta enzima. De acordo com CLSI M 100 cepas que apresentam halos ≤ 28 mm são resistentes ao agente antimicrobiano AMP, e ≥ 29 mm são sensíveis, além disso, a presença de colônias dentro da zona do halo também é indicativa de resistência o que também foi observado neste estudo (226).

Os agentes antimicrobianos AMP e AMOX em disco foram ativos contra a cepa padrão para o teste de difusão em disco, estando em concordância com a norma do NCCLS que considera que com disco contendo 10µg de AMP frente a cepa ATCC 25923 este produzindo um halo de ≥ 29 mm a cepa é sensível ao agente e que halos ≤ 28 mm demonstram resistência, assim como, na microdiluição (173).

Comparando-se EBA na concentração de 1000µg/poço com o medicamento composto por sulfadiazina de prata utilizado como controle positivo, estas amostras promoveram halos $\geq 23,0$ mm, ou seja, valores estes próximos entre si.

Quanto ao óleo essencial, este apresentou efeito antimicrobiano com 1672 µg/disco e halo ≤ 10 mm para a cepa 25923, portanto, não teve eficácia de inibição.

Pela avaliação por microdilição pode-se observar que o extrato EBA foi ativo em cepas de importância clínica com concentrações consideradas moderadas (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentração inibitória mínima - CIM ($\mu\text{g/mL}$) produzida pelos derivados vegetais e substâncias padrão por microdilição contra bactérias Gram-positivas de relevância clínica

Amostras	<i>S. aureus</i> 25923	<i>S. aureus</i> 29213
EBA	$\geq 156,25$	$\geq 312,5$
Óleo	NI	NI
Catequina	NI	NI
Sulfadiazina	$\geq 78,13$	$\geq 156,25$
AMP	≤ 2 sensível	≥ 256
OXA	≤ 2 sensível	≥ 256

NI= Não inibiu

Quando avaliada a atividade antimicrobiana do composto majoritário de EBA, observou-se que a catequina isolada (padrão de referência) não inibiu o crescimento microbiano. Este resultado pode ser justificado pelo fato de que compostos isolados necessariamente não são responsáveis pela ação farmacológica estudada. O que nos leva a sugerir que este composto possa constituir um fitocomplexo e este possui um efeito sinérgico, ou seja, a ação antimicrobiana pode ser resultante da contribuição conjunta de outros grupos químicos que juntos são eficazes (227, 228). Tem sido reportado o reparo de feridas também em função do efeito sinérgico de moléculas bioativas que compõem os metabólitos secundários (229).

Betts et al. (2015), testaram galato de epigallocatequina e quercetina sozinhos e em conjunto contra *S. aureus* e foi observado que quando os compostos foram unidos a atividade antimicrobiana foi superior, além de relatarem que estes polifenóis apresentam potencial ação antimicrobiana e são promissores para tratamento de infecções tópicas, fato que corrobora com a atividade antimicrobiana observada em nosso estudo (230).

Estudos anteriores indicam a presença majoritária de catequina e derivados no extrato aquoso de folhas de *E. dysenterica* (149, 231). Além disso, a presença de abundante acúmulo de taninos, tanto no mesófilo quanto no floema da nervura

primária das folhas desta espécie pode estar associado a este perfil de sensibilização, corroborando a sua atividade antimicrobiana (16). Assim como outros estudos descrevem que flavonoides como quercetina têm atividade antimicrobiana importante (228, 232, 233).

Estudo prévio demonstrou que o extrato hidroalcoólico de *C. sinensis* promoveu halos de 22mm e CIM de 350µg/mL muito semelhante a este estudo (234).

Estudos com extrato de plantas que apresentam compostos como flavonoides, taninos, saponinas e compostos fenólicos podem exibir atividade antimicrobiana (235).

Segundo a literatura o óleo essencial obtido das folhas de *E. dysenterica* foi capaz de inibir diferentes cepas de *Cryptococcus neoformans* com concentrações entre 125µg/mL e 250µg/mL, mas não teve atividade contra espécies de *Candida* com concentração de até 1000µg/mL (18). No entanto, em nosso estudo este derivado vegetal não foi ativo satisfatoriamente para bactérias Gram-positivas. Recentemente, Daza et al. (2017) avaliaram a ação antimicrobiana da polpa de cagaita contra *S. aureus* e observaram potente atividade antimicrobiana (236).

Victoria et al. (2012), também avaliaram a atividade antimicrobiana por meio de difusão em disco e microdiluição do óleo essencial de folhas de *E. uniflora* L. contra bactérias e fungos, neste estudo, o CIM para *S. aureus* foi de 0,8mg/mL (126). Magina et al. (2009), extraíram óleo essencial de folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. e verificaram que este possui forte ação inibitória para *S. aureus* 25923 com CIM igual a 156,2µg/mL idêntica a que foi observada neste estudo. Já o óleo de *Eugenia umbelliflora* O. Berg demonstrou forte ação contra *S. aureus* com CIM de 119,2µg/mL (137).

Usando a técnica de microdiluição, Pessini et al. (2003), testaram o extrato hidroetanólico de folhas de *E. uniflora*, o qual apresentou CIM de 250µg/mL frente *S. aureus* (237).

Um screening avaliou plantas que são empregadas na medicina tradicional para tratamento de doenças infecciosas, dentre estas o extrato hidroetanólico de *E. uniflora* L. e *Psidium guava* L. que, assim como *E. dysenterica* pertencem a família Myrtaceae, encontrando por microdiluição uma CIM de 250µg/mL para ambas as espécies contra a cepa ATCC 25923 de *S. aureus* (224).

Estudos anteriores já evidenciaram que espécies do gênero *Eugenia* apresentam atividade antibacteriana, como por exemplo, o óleo essencial de *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S.G. Harrison, que promoveu inibição do crescimento de *E. coli* e *S. aureus* (238). A atividade antibacteriana da espécie *Eugenia umbelliflora* O. Berg também já foi descrita na literatura, sendo reportado que folhas e frutos destas espécies mostraram promissora atividade contra microorganismos Gram-positivos, como *S. aureus* (239).

Além das plantas do gênero anteriormente comentada pelo seu poder antimicrobiano, também é reportado que as plantas que apresentam predomínio de compostos fenólicos como as da família Lamiaceae como *Thymus vulgaris*, *Melissa officinalis*, *Rosmarinus officinalis* e *Salvia officinalis* tem sido reportadas como promissoras fontes para a busca de compostos com boa atividade antimicrobiana, pois foi encontrada zonas de inibição de 12-19 mm com CIM de 0,125-0,5 mg/mL contra *S. aureus* assim como aqui reportado (121).

Os metabólitos secundários advindos de vegetais promovem sensibilização antimicrobiana de diversas maneiras: os fenóis e ácidos fenólicos inibem enzimas, enquanto flavonoides formam complexos com proteínas o que leva a ruptura da membrana do microrganismo (110). Taninos são metabólitos efetivos contra microrganismos, eles agem inativando a capacidade de adesão microbiana, o transporte de enzimas na membrana celular e também formam complexos com polissacarídeos (6, 110).

Em geral as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis a compostos provenientes de plantas, esta superior sensibilidade deriva da diferença estrutural apresentada por estas bactérias (173, 224, 240, 241).

Em relação à performance bactericida (CBM) de EBA foi de 312,5 e 1250 µg/mL para *S. aureus* 25923 e 29213, nesta ordem. Enquanto, a sulfadiazina foi de 156,25 e 321,5µg/mL para as respectivas cepas. E o padrão AMP foi de 625µg/mL para a cepa 29213. O que demonstra que a atividade antimicrobiana é moderada.

5.3.2 Avaliação da Viabilidade celular

Esta avaliação em cultura de células fornece uma importante ferramenta para estudo da citotoxicidade de compostos, visto que, este ensaio permite definir o potencial de degeneração ou morte celular provocado pelos compostos analisados.

Assim, o ensaio de viabilidade celular demonstra o quão nocivas substâncias podem ser, além de auxiliar na precaução de reações que posteriormente podem advir do contato destes com o usuário.

Considerando a necessidade de avaliar se os derivados vegetais apresentam citotoxicidade e buscando-se parâmetros de segurança na utilização destes compostos, no presente estudo foi realizada a avaliação do EBA, óleo essencial e o alfa-humuleno frente a 3 linhagens celulares: L929 (fibroblasto), HaCat (queratinócito) e RAW 264.7 (macrófago) por 24 de exposição. Neste teste, onde observou-se a concentração inibitória letal de 50% da viabilidade celular das linhagens citadas acima (Figuras 9 A e B, 10 A e B e 11 A e B).

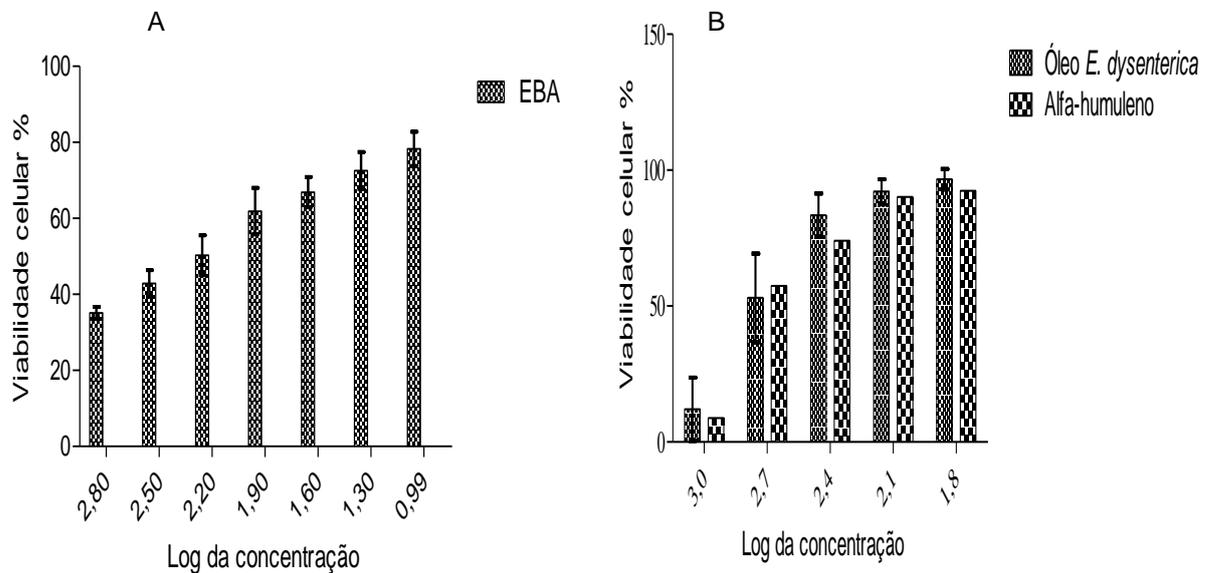


Figura 9 - Viabilidade celular *in vitro* do EBA e do óleo de folhas de *E. dysenterica* para a linhagem de fibroblasto (L929) por ensaio de MTT. (A) EBA. (B) óleo essencial e alfa-humuleno

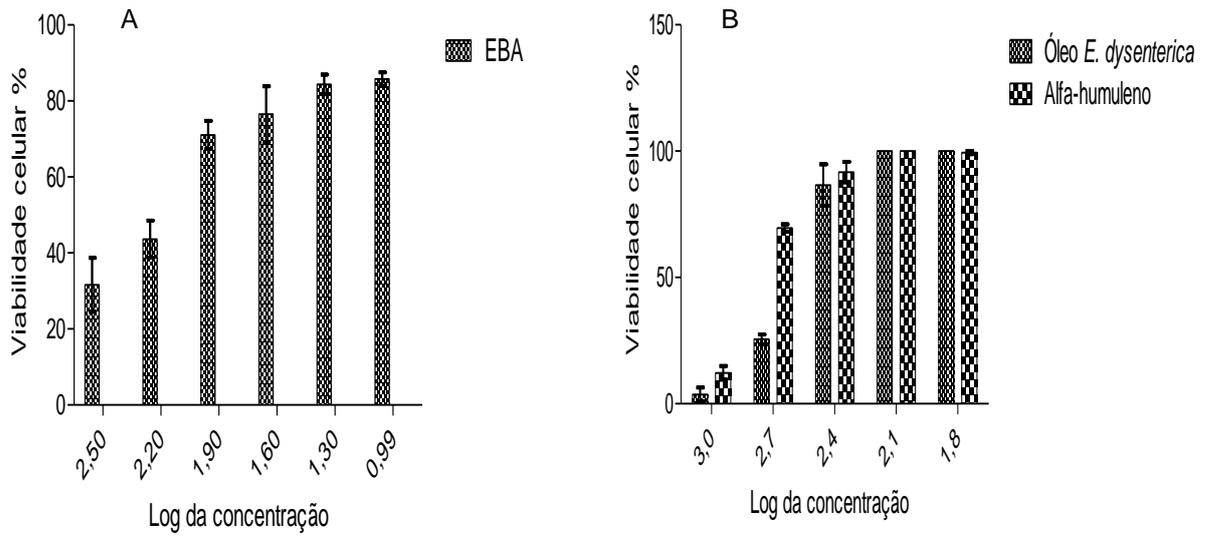


Figura 10 - Viabilidade celular *in vitro* do EBA e do óleo de folhas de *E. dysenterica* para a linhagem de queratinócito (HaCat) por ensaio de MTT. (A) EBA. (B) óleo essencial e alfa-humuleno

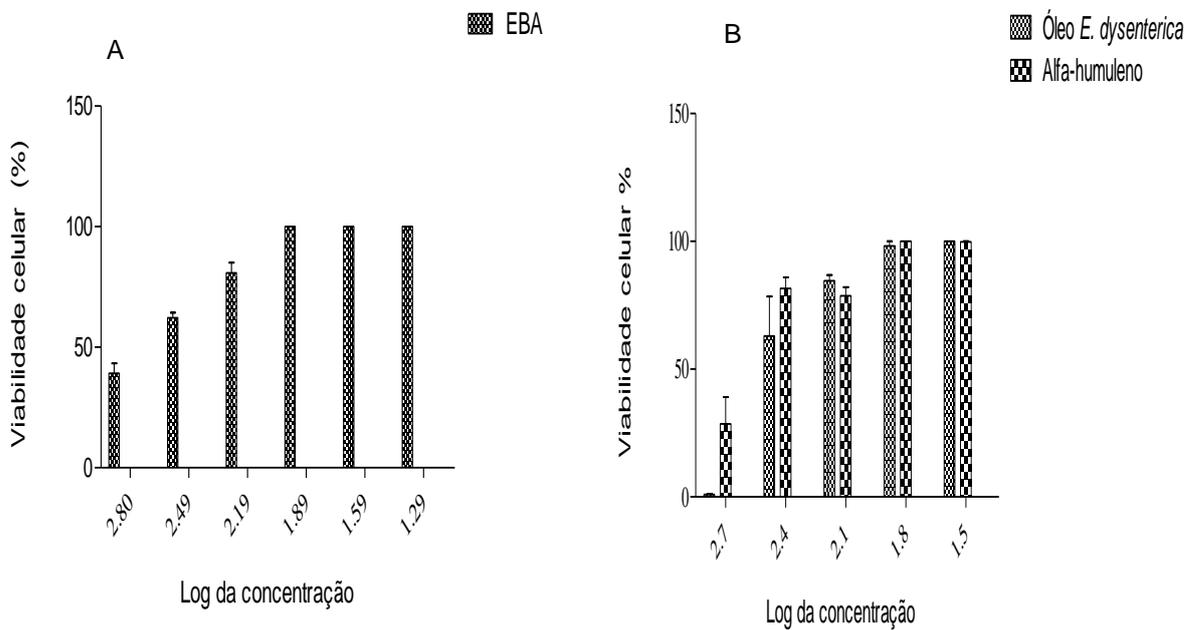


Figura 11 - Viabilidade celular *in vitro* do EBA e do óleo de folhas de *E. dysenterica* para a linhagem de macrófago (RAW 264.7) por ensaio de MTT. (A) EBA. (B) óleo essencial e alfa-humuleno

A Tabela 9 mostra que os valores de IC₅₀ (concentração inibitória letal de 50%) das linhagens celulares avaliadas. Em geral, as linhagens celulares

apresentaram-se tolerantes aos compostos analisados. A linhagem de queratinócito foi mais sensível ao EBA do que a de fibroblasto e macrófagos. Em relação ao óleo essencial, macrófagos foram mais sensíveis do que as demais linhagens avaliadas, assim como para o padrão isolado alfa-humuleno. O menor valor encontrado para IC₅₀ testado foi de 123,5µg/mL para o EBA frente a queratinócitos.

Tabela 9 – Valores de IC₅₀ para as linhagens celulares de (L929) fibroblasto, queratinócito (HaCat) e macrófago (RAW 264.7)

Linhagem celular	L929	HaCat	RAW 264.7
Amostra	IC ₅₀ µg/mL	IC ₅₀ µg/mL	IC ₅₀ µg/mL
EBA	170,3	123,5	286,1
Óleo	542,2	399,5	292
Alfa-humuleno	577,4	625,6	311,15

Outros estudos avaliaram *in vitro* o efeito de derivados vegetais oriundos da *E. dysenterica*, incluindo linhagens de fibroblastos e macrófagos. Usando o extrato etanólico de sementes e hidroalcólico obtido a partir das folhas, a avaliação revelou uma viabilidade de 48% dos macrófagos (AMJ2-C11) com 80µg/mL (145, 159). Outro estudo relevante foi o realizado com células de rim de macacos (MA-104), no qual avaliou-se o extrato etanólico de folhas de cagaita, observando-se que até com 500µg/mL este derivado não foi tóxico, corroborando os dados demonstrados neste trabalho (17). No entanto, a atividade citotóxica do extrato aquoso de folhas desta espécie em células neurais (SH-SY5Y) foi avaliada por Gasca et al. (2017) e apresentou IC₅₀ de 7,8µg/mL (151). Em relação ao óleo, não foi encontrada nenhuma avaliação, portanto, sendo esta a primeira.

Em relação ao óleo essencial de folhas de *E. dysenterica*, não foi encontrada nenhuma avaliação na literatura para citotoxicidade *in vitro*, portanto, sendo este o primeiro relato em relação as linhagens celulares aqui descritas.

Outro dado que corrobora a inocuidade dos derivados vegetais analisados são os critérios estabelecidos pelo National Cancer Institute (NCI, USA), o qual estipula para extratos o valor de IC₅₀ de no máximo 30 µg/mL para considerar-se uma atividade citotóxica em potencial (242).

5.3.3 Atividade Anti-inflamatória – Dosagem de Óxido Nítrico

O óxido nítrico (ON) é gerado por meio da ação da enzima óxido nítrico sintetase que causa a deaminação da L-arginina, e atua como um mediador de várias ações biológicas como vasodilatação, neurotransmissão, inibição da aderência e agregação de plaquetas, além disso intercede a ação de macrófagos na eliminação de patógenos. Espécies reativas de oxigênio podem ter papéis positivos e negativos, pois a produção excessiva de ON, um potente mediador pró-inflamatório; resulta em danos citotóxicos em processos patológicos, agindo particularmente em doenças inflamatórias (243).

A inflamação é um mecanismo fundamental de defesa contra danos teciduais ou invasão de patógenos. Este complexo processo é regulado por citocinas que induzem muitos pró-inflamatórios. Fator nuclear kappa B (NF- κ B), que tem sido envolvido na patogênese de muitas doenças, incluindo doenças inflamatórias, desempenha papéis regulatórios nas transcrições de mediadores pró-inflamatórios, tais como sobre a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2). iNOS e COX-2 são conhecidas por produzirem mediadores pró-inflamatórios, como o óxido nítrico e prostaglandinas em locais inflamatórios (95).

Macrófagos, que são amplamente distribuídos no corpo, desempenham um papel fundamental nos processos inflamatórios, fornecendo uma defesa imediata contra agentes exógenos como: lipolissacarídeos, interleucina 1 β (IL-1 β) e interferon- γ (IFN- γ) pela ligação com o receptor toll-like receptor-4 (TLR-4) que por sua vez, ativam a sinalização inflamatória via NF- κ B. Isto estimula posteriormente a liberação de numerosos mediadores pró-inflamatórios como o óxido nítrico, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). A endotoxina bacteriana (LPS) desencadeia a produção de mediadores inflamatórios, como iNOS, COX-2, factor de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucinas (ILs) em macrófagos estimulados por LPS (95). Portanto, farmacologicamente a redução dos mediadores inflamatórios induzíveis pelo LPS é considerada como uma estratégia terapêutica eficaz para aliviar uma variedade de distúrbios, incluindo condições inflamatórias causada pela ativação de macrófagos.

Para avaliar os efeitos de EBA, do óleo essencial, do alfa-humuleno e da dexametasona na produção de ON, a quantidade deste foi mensurada no sobrenadante da cultura, utilizando o reagente de Griess (184). O presente estudo

demostra que os derivados vegetais e o padrão isolado são capazes de suprimir a produção de ON em macrófagos RAW 264.7 estimulados por 1µg/mL de LPS. Para determinar que a inibição do ON não resulta da morte celular os valores de IC₅₀ obtidos do ensaio de MTT descritos acima, foram empregados neste ensaio e adicionalmente subconcentrações, o que comprova que o efeito não decorre da redução do número de células. De fato, o EBA e o óleo marcadamente foram responsáveis pela inibição da produção de óxido nítrico. Ambos derivados, EBA e óleo mostraram efetiva ação $\geq 49,87\%$ sobre inibição deste mediador inflamatório. Houve uma grande diminuição na produção de óxido nítrico após o tratamento com EBA na concentração de 100µg/mL, e redução menos acentuada foi observada na subsequente diluição testada (Figura 12). Na concentração 100µg/mL de EBA a inibição de ON foi de 49,87%, maior que os 43,43% inibidos pelo controle positivo dexametasona 125µg/mL, porém, não teve diferença estatística. Quanto a capacidade de 100µg/mL de EBA supimir a produção de ON comparado ao indutor LPS, seu efeito foi significativo.

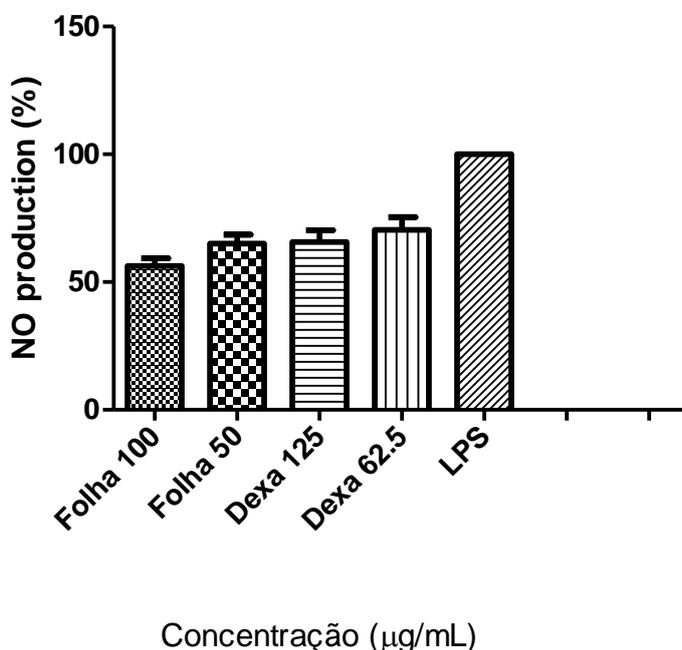


Figura 12 - Níveis de produção de óxido nítrico no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7 incubados com EBA nas diferentes concentrações e estimulados com 1µg/mL de LPS, durante 48 horas, em três experimentos foram calculados por ONE WAY ANOVA, seguidamente com o Teste Comparativo Múltiplo de Bonferroni ($p < 0,05$ vs LPS)

De maneira geral, os dados observados, revelam que o extrato aquoso de folhas de *E. dysenterica* apresenta atividade anti-inflamatória sobre as células RAW 264.7, reduzindo a produção de ON quando comparado ao controle que recebeu o estímulo com LPS. Em parte a atividade anti-inflamatória apresentada pela espécie pode ser atribuída à forte propriedade antioxidante propiciada pela presença de flavonoides em suas folhas e anteriormente já ressaltada e reportada tanto *in vitro* como *in vivo* (145, 150, 152). Além disso, o efeito anti-inflamatório de catequinas já foi observado e este deu-se por meio da inibição da enzima ciclooxigenase 2 (COX2) (244).

Quanto ao óleo essencial, foi analisada sua capacidade de neutralizar a produção de ON. Conforme apresentado na (Figura 13), em células RAW 264.7 após tratamento com óleo e alfa-humuleno quando estimuladas por LPS foi observado que a produção de ON no meio diminuiu significativamente quando comparado a dexametazona (controle positivo de inibição) ($p < 0,05$). Esses achados indicam que os compostos estão correlacionados com a eficácia farmacológica anti-inflamatória.

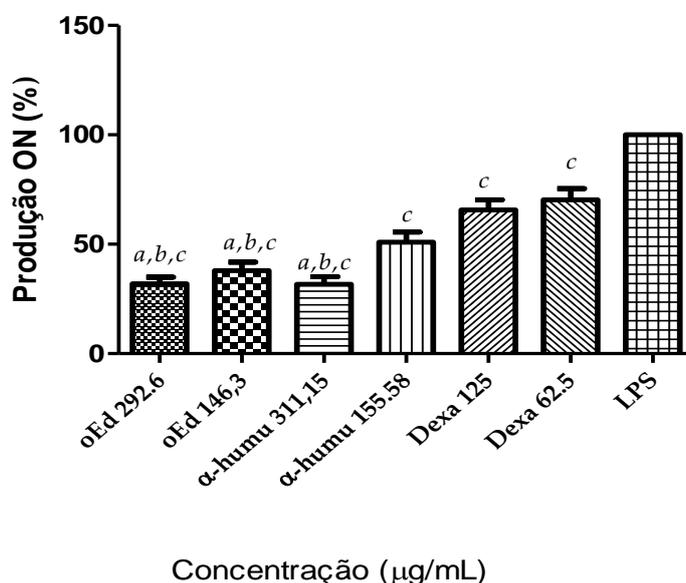


Figura 13 - Efeitos do óleo essencial das folhas *E. dysenterica* sobre a produção de ON induzido por LPS em RAW 264.7 usando o ensaio de Griess. Os macrófagos foram incubados na presença de óleo, alfa-humuleno ou dexametazona em combinação com LPS 1µg/mL durante 48 horas. As diferenças significativas relacionadas aos valores de concentração de óleo essencial (oEd); alfa-humuleno (α-humu) e a dexametazona (Dexa) e da produção da inibição de óxido nítrico em células estimuladas com LPS em três experimentos foram calculados por ONE WAY ANOVA, seguidamente com o Teste Comparativo Múltiplo de Bonferroni (^a $p = 0,05$ vs Dexa 125. ^b $p < 0,05$ vs Dexa 62,5. ^c $p < 0,05$ vs LPS)

O óleo essencial inibiu o mediador pró-inflamatório ON possivelmente porque este derivado vegetal das folhas de *E. dysenterica* e composto majoritariamente por alfa-humuleno e beta-cariofileno, estes possuem propriedades anti-inflamatórias que podem estar associadas a esta elevada concentração de sesquiterpenos observados na espécie aqui estudada. Nossos achados são consistentes com os de estudos anteriores que reportam que estes compostos exibiram ação farmacológica baseada na inibição da interleucina IL- β 1 (citocina pró-inflamatória associada a resistência a insulina), histamina e TNF- α (potente citocina pró-inflamatória na geração de stress oxidativo) e outros mediadores pró-inflamatória (245-247).

O estresse oxidativo e a inflamação são características comuns de muitas doenças inflamatórias e suas complicações e, também foram associadas a processos em doenças inflamatórias de pele. Estudos anteriores mostraram que as plantas têm propriedades importantes para serem exploradas como fonte de medicamentos, proporcionando a identificação de novos agentes anti-inflamatórios (243).

Fernandes et al. 2007, relataram que ambos os compostos reduziram a produção de prostaglandina E₂ e também a indução de expressão de óxido nítrico e ciclooxigenase (COX-2) *in vivo*, sugerindo ação muito similar à dexametasona (247). Semelhantemente, Medeiros et al (2007), observaram que a administração de alfa-humuleno inibiu o nível de TNF- α em 100% e de L-1 β em 50% e estes também compararam com dexametasona e obtiveram ação muito aproximada, 100% e 88% para estas citocinas (246). Outra possibilidade de ação anti-inflamatória pode estar ligada à capacidade do beta-cariofileno ser como um ligante funcional do receptor CB₂, um ligante anti-inflamatório, o qual age reduzindo os níveis de citocinas em uma cultura de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (248-250). Muitos compostos de plantas medicinais demonstraram efeito de inibição da expressão da enzima óxido nítrico sintetase, dentre estes sesquiterpenos e flavonoides (243).

As observações, quanto ao potencial de inibição da produção de nitrito por parte do óleo essencial, corrobora recentes estudos que também avaliaram este derivado vegetal através da metodologia de inibição do óxido nítrico gerado espontaneamente pela decomposição do nitroprussiato de sódio, um composto químico que serve como fonte de obtenção deste medidor. Neste estudo foi observado a ação de concentrações de 0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 μ g/mL, as quais foram

capazes de remover ON em 44,62; 43,45; 48,97; 51,09 e 47,05%, semelhantemente ao ácido ascórbico (36.73%) utilizado como controle positivo, além disso, a capacidade antioxidante foi analisada e observado o efeito sobre a prevenção da lipoperoxidação com IC₅₀ de 1,2µg/mL, similarmente ao ácido ascórbico, corroborando o presente estudo (154).

Neste sentido, compostos com efeitos anti-inflamatórios contribuem neste processo. Encontra-se reportado que os metabólitos secundários beta-cariofileno e alfa-humuleno demonstraram *in vivo* inibir histamina com ação equivalente a dexametasona (247). Além disso, beta-cariofileno inibiu tanto a interleucina IL-2 e IL-10, ambas citocinas pró-inflamatórias, sugerindo que compostos terpenoides também têm um potencial anti-inflamatório através da inibição das respostas imunes da T-Cell ratificando o potencial imunomodulador deste composto (251).

Beta-cariofileno tem mostrado ser um ligante para o subtipo CB₂ um receptor canabinoide, assim este composto pode estar envolvido no efeito anti-inflamatório do óleo essencial *E. dysenterica*, através da ativação CB₂, este sesquiterpeno poderia potencialmente modular a continuação da inflamação através do sistema endocanabinoide (248). Beta-cariofileno, um composto majoritário do óleo essencial *E. dysenterica*, para o qual foi demonstrado que é um ligante seletivo e agonista dos receptores canabinoides CB₂ descrito na literatura, cociliado a estas ações e, conseqüentemente apresentando-se como uma potencial estratégia no tratamento do processo inflamatório (248, 252). Estudos anteriores relatam que este sesquiterpeno é um anti-inflamatório não esteroide, acrescido de características como: antialérgico, citoprotetor e não irritante para a pele (253).

Então, no caso de lesões ou por conta da liberação de mediadores inflamatórios, como por exemplo: interleucinas, fator de necrose tumoral, proteases inflamatórias, e histamina, os quais são liberados após ativação de mastócitos. O composto beta-cariofileno tem sido proposto como regulador da ativação destas células, pois, trata-se de um ligante seletivo e agonista dos receptores canabinoide CB₂, apresentando-se como uma potencial estratégia para tratamento de inflamação e dor (248). O papel destes metabólito secundário advêm do efeito inibitório de células microgliais, linfócitos, bem como de citocinas pró-inflamtórias (254). A perspectiva do emprego na intervenção de processos inflamatórios por ligante agonista canabinoide de receptores CB₂ endógeno como o beta-cariofileno ampliam as possibilidades terapêuticas para tratamentos tópicos cutâneos (255).

Recentemente, Han & Parker (2017), relataram atividades anti-inflamatória, imuno-modulação e remodelação de tecidos pelo óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*, imputando a inibição de citocinas pró-inflamatórias usando fibroblastos e possível favorecimento na melhora de doença da pele humana (256). Atividade antiinflamatória de óleos essenciais de *Syzygium cumini* e *Psidium guajava*, outras espécies da família Myrtaceae também foram observadas (113). Revisão atual sobre as atividades biológicas de vários óleos essenciais, incluindo estudos clínicos reportou a ação de óleos essenciais (257).

Sendo assim, EBA e o óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* expressaram capacidade de proteger contra a ação do óxido nítrico possivelmente por meio da supressão da indução da enzima óxido nítrico sintetase mediada por lipolissacarídeos.

5.3.4 Avaliação do Fechamento de Feridas – Ação cicatrizante

Na fase de re-epitelização, os fibroblastos são importantes no reparo da derme ferida, estas células proliferam e migraram na área da ferida, sintetizando nova matriz extracelular (MEC) (258).

Neste estudo, buscou-se averiguar a capacidade do EBA, do óleo essencial de folhas de cagaita e do padrão isolado alfa-humuleno na re-epitelização de tecidos lesionados, para isso após a abertura da ferida na monocamada de células foram feitos os tratamentos e o acompanhamento fotográfico da evolução do fechamento da ferida, proporcionado pela migração celular.

O teste de fechamento de ferida em monocamada demonstrou que o tratamento com EBA não favoreceu a migração celular para ambas as linhagens avaliadas, no entanto, o óleo essencial de *E. dysenterica* influenciou no processo de migração celular. As células L929 e HaCaT tratadas com óleo demonstraram um fechamento da ferida mais rápido.

No grupo L929, tratado com óleo essencial, o fechamento completo da ferida foi observado após 12 horas de tratamento, enquanto no grupo controle esse fechamento completo só foi observado após 24 horas (Figura 14 e 15).

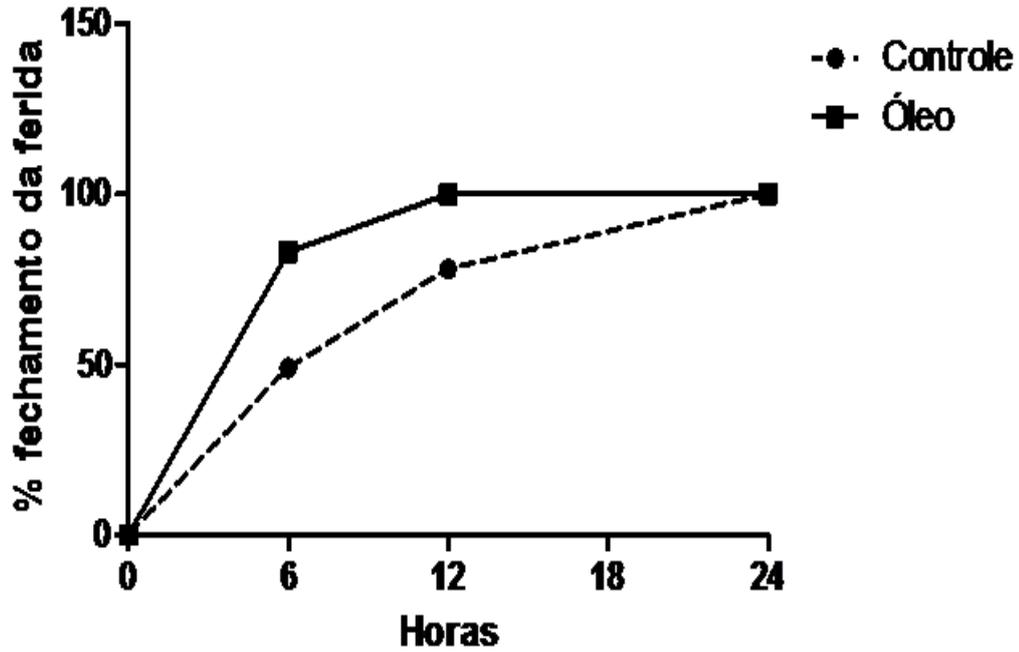


Figura 14 - Efeito do óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* na migração e proliferação de fibroblastos usando ensaio de *scratch* depois de 24 horas de incubação com DMEM (controle) ou 542,2 μ g/ml de óleo. Os dados estão expressos em porcentagem de área da ferida com tratamento e sem tratamento de três experimentos

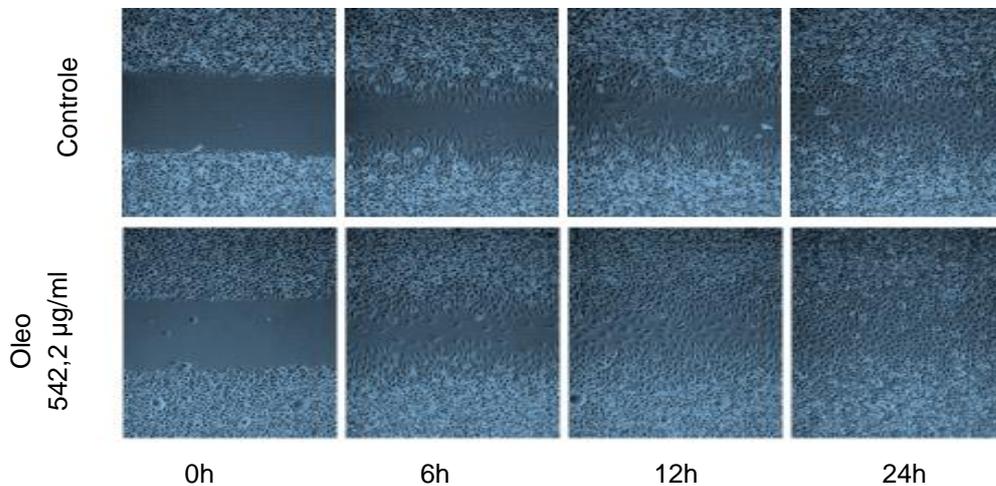


Figura 15 - Imagem do microscópio para avaliar a cicatrização da ferida *in vitro* do óleo essencial de *E. dysenterica* no ensaio de *scratch* utilizando uma monocamada confluyente de fibroblastos. Migração de células para a ferida foi observada em resposta a uma lesão artificial. Uma única área representativa é apresentada imediatamente após o ferimento (0 h) representando o controle sem e com tratamento; bem como o efeito na migração e proliferação após 24 h incubação

Os resultados indicaram que o óleo essencial de *E. dysenterica* promoveu a migração celular de feridas induzidas mecanicamente em células epiteliais (fibroblastos (L929) quando testadas com a dose de 542,2 μ g/mL, demonstrando

efeito pronunciado nos fibroblastos em comparação com o controle. Conseqüentemente, estes resultados demonstram a segurança de *E. dysenterica*, ou seja, deste ativo para tratar feridas da pele. De acordo com a literatura, os compostos alfa-humuleno e beta-cariofileno presentes no óleo de essencial de *E. dysenterica*, corroboram esta atividade farmacológica agindo em sinergia, o que justifica os resultados obtidos neste trabalho (259). Curiosamente, alfa-humuleno puro não foi significativamente capaz de aumentar a taxa de migração celular (Figura 16 e 17). O resultado foi estatisticamente significativo entre os grupos de controle e óleo para L929. O teste estatístico considerou um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), nos grupos tratados em comparação com os controles houve significância estatística utilizando Two-way ANOVA e o teste de múltiplas comparações Turke's.

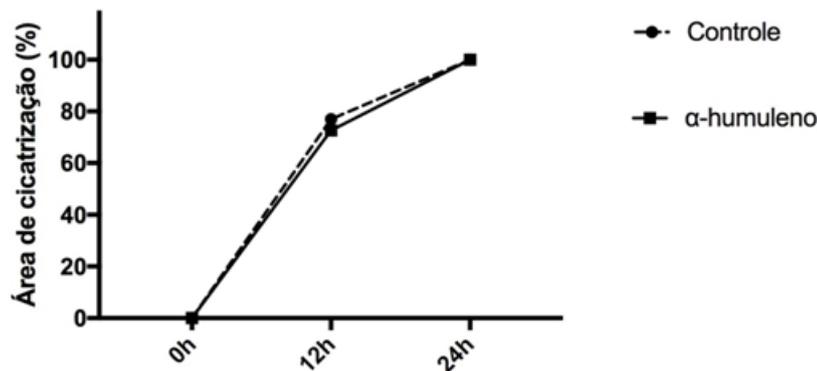


Figura 16 - Efeito do alfa-humuleno puro na migração e proliferação de fibroblastos usando ensaio de *scratch* depois de 24 horas de incubação com DMEM (controle) ou 577,4 μ g/ml do padrão. Os dados estão expressos em porcentagem de área da ferida com tratamento e sem tratamento de três experimentos

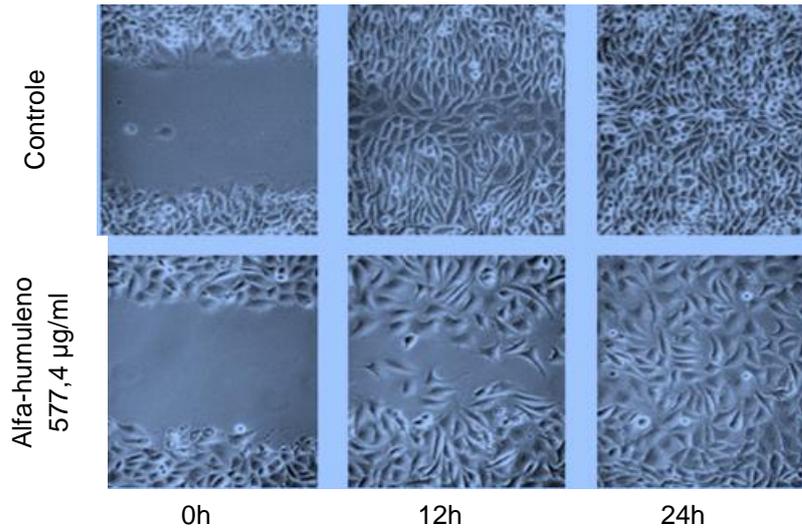


Figura 17 - Imagem do microscópio para avaliar a cicatrização da ferida *in vitro* do alfa-humuleno no ensaio de *scratch* utilizando uma monocamada conflente de fibroblastos. Migração de células para a ferida foi observada em resposta a uma lesão artificial. Uma única área representativa é apresentada imediatamente após o ferimento (0 h) representando o controle sem e com tratamento; bem como o efeito na migração e proliferação após 24 h incubação

No grupo HaCat, tratado com o óleo essencial, podemos observar que em 24 horas o fechamento da ferida do grupo controle foi de 76% enquanto que o grupo tratado com óleo apresentou uma cicatrização com fechamento de 80% da ferida, mas não foi significativa (Figura 18 e 19).

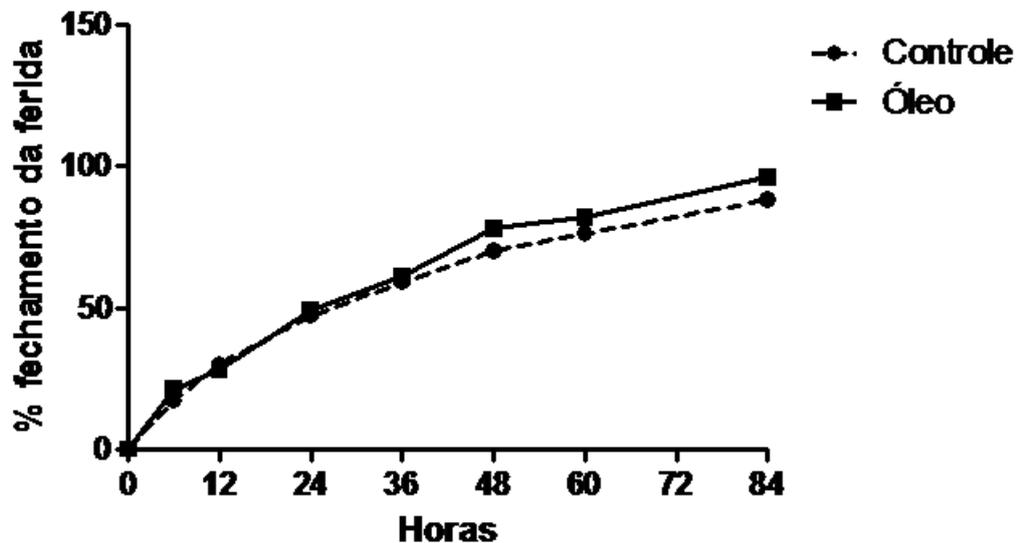


Figura 18 - Efeito do óleo essencial das folhas de *E. dysenterica* na migração e proliferação de queratinócitos usando ensaio de *scratch* depois de 84 horas de incubação com DMEM (controle) ou 399,2µg/ml de óleo. Os dados estão expressos em porcentagem de área da ferida com tratamento e sem tratamento de três experimentos

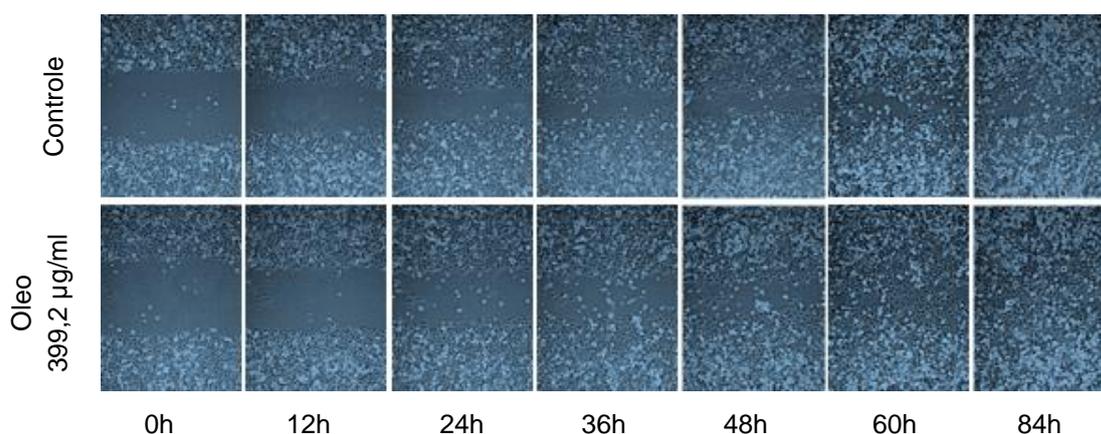


Figura 19 - Imagem do microscópio para avaliar a cicatrização da ferida *in vitro* no ensaio de *scratch* utilizando uma monocamada confluyente de queratinócitos. Migração de células para a ferida foi observada em resposta a uma lesão artificial. Uma única área representativa é apresentada imediatamente após o ferimento (0 h) representando o controle sem e com tratamento; bem como o efeito na migração e proliferação após 84 h incubação

Corroborando estes achados, Moreira et al. (2017) mostraram que o extrato hidroalcoólico de folha *E. dysenterica* promoveram regeneração usando a célula HFF-1 (fibroblastos) após exposição a radiação ultra-violeta (19). Extratos de *Calêndula officinalis*, estimularam a proliferação e a migração de fibroblastos utilizando o ensaio de *scratch* com fibroblastos 3T3, assim como neste estudo (260).

A fase inflamatória ocorre 1-5 dias após o ferimento e inicia a cascata de cura da ferida, o fator do crescimento que estimule a produção do fibroblasto e promove a síntese do colágeno e a segunda fase da cura. A formação do tecido de granulação envolve a proliferação de fibroblastos, a deposição de colágeno e o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. Moléculas estruturais da matriz extracelular que estão se formando, como fibronectina e colágeno, contribuem para a formação de tecidos de granulação. Os principais eventos durante a fase de proliferação são a reepitelização, angiogênese e tensão do tecido cutâneo lesionado, isto é, fibroplasia, nesta fase os fibroblastos desempenham um papel para restaurar a cicatrização da ferida, ou seja, a área ferida retornando ao seu estado anterior (261).

Um estudo destacou os efeitos de cura de feridas de alguns metabólitos secundários que estimulam os fibroblastos, neste o óleo essencial de *Plectranthus tenuiflorus* estimulou o crescimento dos fibroblastos *in vitro*, similarmente a este estudo (262). Resultados podem reafirmar que os terpenos presentes no óleo de folha de *E. dysenterica* podem ser responsáveis para promover a atividade cura da

ferida atuando na epitelização, pois sesquiterpenos são relatados facilitando a cicatrização. Estudo sobre a ação anti-inflamatório *in vivo* do óleo essencial de *Cordia verbenacea* relatam a atividade dos compostos alfa-humuleno e beta-cariofileno agindo contra a citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral (TNF- α), esta citocina esta envolvida na indução de inflamação e muitas doenças cutâneas e inflamatórias sistêmicas (245).

Camellia sinensis (Theaceae) é outra planta com dados cientificamente evidentes para seu potencial antibacteriano, antiséptico, antioxidante, usado para feridas, queimaduras, coceiras, erupções em função dos taninos e flavonoides contidos nesta espécie (263). Os constituintes de *C. sinensis* são apontados como promissores para uso tópico para a promoção da regeneração da pele, cicatrização de feridas, além de ser útil para tratar úlceras, psoríase, rosácea e queratose actínica, pois foi evidenciado que metabólitos presentes no chá verde estimularam queratinócitos o que propicia a reconstrução epitelial (264).

Tsala *et al.* (2013) reportou que vários extratos brutos e compostos purificados tem sido analisados e demonstrados seus efeitos na migração e proliferação de células epiteliais, entre estes foi descrito que os terpenoides aceleram a re-epitelização e fibrose em feridas cirúrgicas dérmicas artificiais e sugerem a possibilidade do uso destes como agentes moduladores tópicos para células de pele como: fibroblastos e queratinócitos (265).

5.4 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES CONTENDO EXTRATO AQUOSO SECO OU ÓLEO ESSENCIAL DE *EUGENIA DYSENTERICA*

Este estudo procurou realizar o desenvolvimento de formulações a base de extrato aquoso (EBA) ou óleo de folhas de *E. dysenterica* na perspectiva de rastrear a escolha da forma farmacêutica tópica inovadora e mais adequada para veiculação destes derivados vegetais e assim proporcionar os efeitos terapêuticos preconizados, visto que sistemas de liberação de ativos podem penetrar até a derme, região da pele onde acontecem as manifestações inerentes da inflamação e cicatrização (266). Recentemente, foi relatado que a técnica de encapsulação modula a liberação e favorece a validade de produtos, com destaque para ser empregada na aplicação de óleos essenciais e extratos (267).

A seleção do polímero que veiculará o composto ativo depende da ligação estreita atribuída à qualidade e depende da finalidade, devendo promover a liberação controlada da substância ativa no meio desejado, manter a hidratação da pele e ser biocompatível com este tecido, além de prover estabilidade (268).

Considerando-se a possibilidade do uso tópico de derivados vegetais oriundos de folhas de *E. dysenterica*, visando suas atividades farmacológicas mencionadas (anti-inflamatória, cicatrizante, antimicrobiana), sistemas foram desenvolvidos incorporando extrato bruto aquoso 5% ou óleo essencial 0,04% de folhas de *E. dysenterica*.

5.4.1 Desenvolvimento das Formulações

A lacuna a ser preenchida com o estudo, é aliar o excelente potencial dos produtos naturais com propriedades terapêuticas e o futuro desenvolvimento de medicamentos, pois estas apresentam limitada estabilidade e permeação na pele (22, 23). Uma das principais desvantagens do uso de extratos contendo catequinas estão relacionadas com a sua instabilidade, principalmente em relação a temperatura (134). Esta peculiaridade restringe seu uso e então, requer estratégias de formulação. Por essa razão, uma alternativa para mitigar tal problema e oferecer maior durabilidade, tem sido o uso de diferentes sistemas, tais como o empregado neste estudo.

Inicialmente, foram manipuladas formulações em base gel de poloxamer. No entanto, estas formulações apresentaram mudanças da consistência em menos de sete dias. De fato quando o extrato foi incorporado a um gel bioadesivo de poloxamer e quitosana, ele foi instável por menos de sete dias, apresentando incossistência e coloração escurecida o que pode indicar uma incompatibilidade entre os compostos e também a oxidação de taninos devido a quantidade de água na composição da formulação. Sendo assim, estas amostras foram descartadas devido à impossibilidade de prosseguimento dos estudos sugeridos.

Taninos catéquicos são susceptíveis à oxidação, então em função disso, propôs-se a encapsulação do extrato aquoso bruto (EBA) em micropartículas poliméricas de quitosana com objetivo de melhorar a estabilidade do extrato em formulação (269). Compostos vegetais tem sido veiculados por meio desta tecnologia, por exemplo, rutina, quercetina e extrato de *Cynara scolymus* (45, 270).

Wisuitiprot *et al.*, (2011), também encapsularam derivado de *Camellia sinensis* e obtiveram sucesso no processamento (23).

Inicialmente, as micropartículas de quitosana contendo o fármaco foram preparadas e caracterizadas quanto ao rendimento, eficiência de encapsulação, diâmetro, morfologia e potencial zeta.

Sistemas de liberação de fármacos, tais como micropartículas poliméricas, representam uma importante estratégia terapêutica para uso tópico (25). Então, analisou-se primeiramente a micropartícula obtida por aspersão antes de preparar a emulsão com EBA. Sendo assim, foi proposto o desenvolvimento de emulsões e nanoemulsões visando a efetividade de produtos naturais.

5.4.1.1 Caracterização das Micropartículas

5.4.1.1.1 Rendimento

Processamento por *spray drying* para obtenção das micropartículas, foi obtido um rendimento de 31,25%, semelhante ao conseguido por Gelfuso *et al.* (2011) que utilizou do mesmo polímero e condições e equipamento idêntico para se obter micropartículas para encapsular minoxidil (26). O rendimento pode ser atribuído à adesão de parte da solução pulverizada à parede do aparelho de secagem, como reportado na literatura (271).

5.4.1.1.2 Eficiência de Encapsulação

A avaliação da quantidade de catequina contida no EBA associada às micropartículas de quitosana foi determinada por CLAE e foi observado teor de 70,13% de catequina contida nas micropartículas, demonstrando a eficiência de encapsulação do EBA por *spray-drying*.

Ong *et al.* (2017), encapsularam própolis com quitosana, buscando desenvolver formulação para tratamento de feridas, e verificaram um percentual bem aproximado do visto neste estudo, entre 77 e 88% o que mostra que o carreador foi eficiente para o propósito (272). Outro estudo, conseguiu um percentual semelhante ao encapsular extrato de folhas de *Camellia sinensis*, rico em catequinas (134).

5.4.1.1.3 Granulometria

O diâmetro das micropartículas examinadas indica que 90% (D 90) das micropartículas contendo EBA têm diâmetro menor que $19,69\mu\text{m}$ e as que só continham o polímero, diâmetro menores que $10,25\mu\text{m}$. Populações monodispersas de micropartículas foram obtidas com quitosana, característica que confere homogeneidade ao sistema. Além disso, o tamanho reduzido confere maior comodidade na aplicação tópica. De acordo com a literatura micropartículas, obtidas com quitosana que apresentaram tamanho menor que $60\mu\text{m}$ são adequadas para uso tópico (25).

5.4.1.1.4 Morfologia

A visualização das micropartículas em MEV para análise de sua estrutura morfológica revelou que estas são em sua maioria esféricas e com a superfície rugosa nas que só continham quitosana (Figura 20 A e B). As que englobaram EBA são majoritariamente globulares e rugosas (Figura 21 A e B).

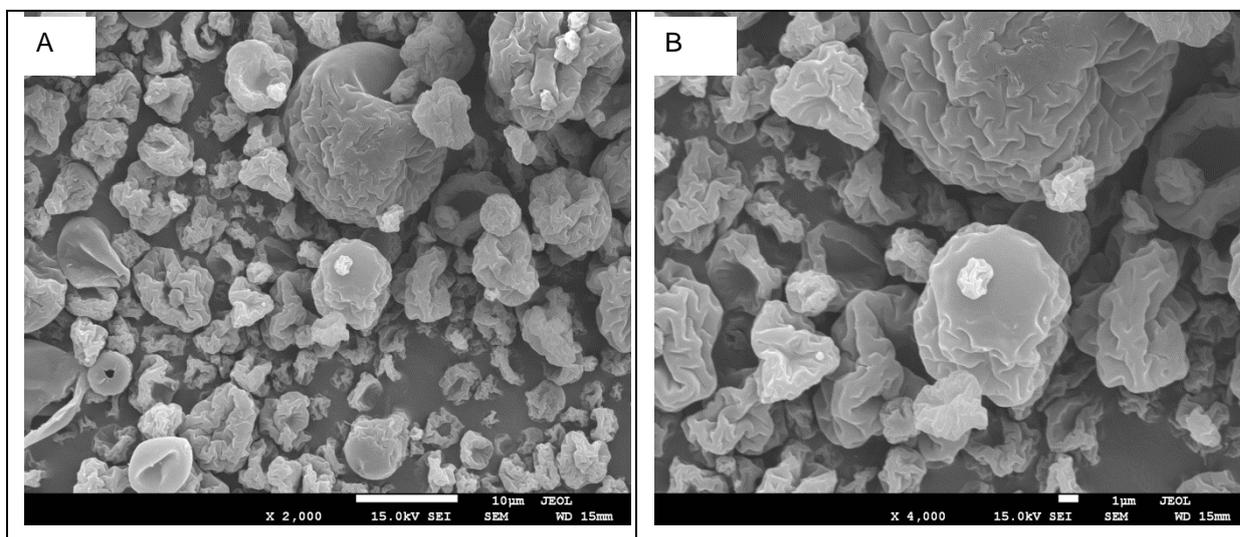


Figura 20 - MEV das micropartículas produzidas por *spray-drying* contendo somente quitosana, micropartículas visualizadas em x 2000 (A) e x 4000 (B)

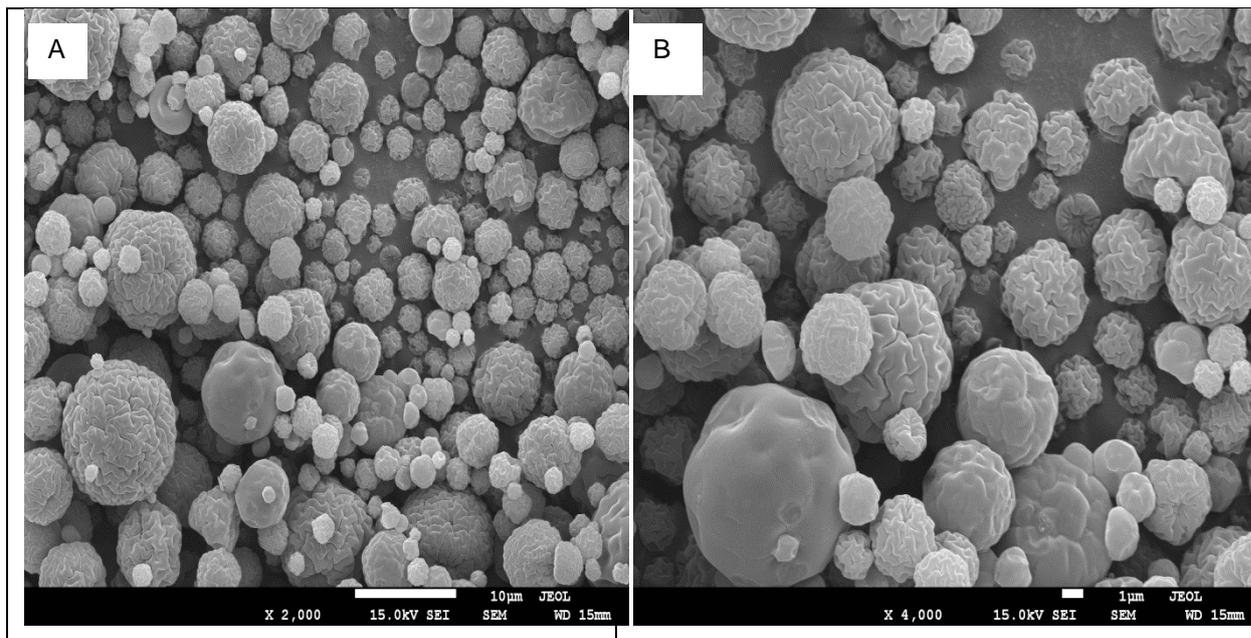


Figura 21 - MEV das micropartículas produzidas por *spray-drying* contendo quitosana e EBA, micropartículas visualizadas em x 2000 (A) e x 4000 (B)

Pereira et al. (2014) ressaltam que a forma das micropartículas assegura maior efetividade da cicatrização de feridas e esta pode ser uma característica vantajoso para o restabelecimento do tecido epitelial, pois, a configuração rugosa mimetiza uma matriz extracelular (25). Huang e Fu (2010), avaliaram o comportamento de queratinócitos e fibroblastos humanos em contato com micropartículas com diferentes superfícies morfológicas e, corroboraram com a afirmação anterior, pois as micropartículas com superfície irregular foram ser favorável para o crescimento celular e cicatrização do tecido devido à sua similaridade estrutural com a matriz extracelular (273).

Logo, as micropartículas elaboradas neste estudo possuem características positivas para uso tópico.

5.4.1.1.5 Potencial Zeta

O valor do potencial zeta obtidos para a micropartícula em uma dispersão em água foi de $41,1 \pm 4,26\text{mV}$ para as micropartículas carreadoras de EBA e de $45,1 \pm 7,04\text{mV}$ para as micropartículas vazias, mas não foi diferente significativamente. Um potencial zeta alto ($>30\text{mV}$) assegura a estabilidade física de partículas em suspensão, pois evita a aglomeração. Além disso, a carga positiva conferida pelo

polímero confere bioadesão ao sistema uma vez que a pele tem carga negativa em pH fisiológico.

A avaliação das micropartículas de quitosana contendo EBA revelou que estas são positivas, considerando-se esta carga, quando em contato com a via de administração que é o tecido cutâneo o qual apresenta carga negativa, isso pode ser vantajoso, pois a carga da superfície da micropartícula e da superfície da pele são correlacionadas à favorecer a penetração do ativo (274).

Esse potencial está de acordo com o resultado relatado na literatura para partículas com o mesmo polímero preparado por método semelhante. Acosta et al. (2015), obtiveram micropartículas de quitosana contendo extrato de folhas de oliveira, por este mesmo processo empregado neste estudo e também encontraram uma carga positiva para as microesferas produzidas. Os autores relataram um potencial zeta de $47,58 \pm 1,48\text{mV}$ e que esta característica promove a mucoadesividade, melhoria da absorção, além de, estabilidade (72).

Portanto, espera-se que as micropartículas com carga positiva que indica potencial para mucoadesividade, propriedade esta relativa à bioadesão apresentada pelas micropartículas elaboradas neste trabalho, apresentam características atrativas para o desenvolvimento de sistemas para a administração por via tópica.

5.4.2 Desenvolvimento da Formulação Semi-sólida – Emulsão com Micropartículas de Quitosana e Extrato Bruto Aquoso (EBA)

As formulações elaboradas em base creme com característica não-iônica e contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de *E. dysenterica* apresentaram uma tonalidade levemente creme, homogênea e brilhosa, aspecto liso ao toque e odor agradável, caracteristicamente herbal. E o placebo coloração branca, homogênea e brilhosa, aspecto sedoso ao toque e odor agradável. Inicialmente o pH foi de $5,24 \pm 0,03$ para a emulsão com micropartículas e de $3,95 \pm 0,02$ para o placebo. Destas formulações foram armazenadas amostras em temperatura ambiente e também sob refrigeração (2-8 graus) por 7, 15, 30 e 60 dias, períodos em que foi avaliado o pH, as características organolépticas, teor de catequina e determinação de contaminantes mesófilos e patogênicos conforme requerido pela legislação vigente, em consonância com o controle de qualidade do produto acabado (Item 5.4.2.1). Além disso, foi avaliada a a

liberação e a permeação desta formulação em creme contendo micropartículas com extrato.

5.4.2.1 Controle da Qualidade do Produto Acabado – Estudo de estabilidade

Visando investigar e assegurar a autenticidade da matéria-prima vegetal, foram feitas para a droga vegetal as análises preliminares na primeira etapa para identificação botânica, dados de coleta e determinação do grau de pureza englobando sua integridade, caracteres organolépticos, umidade, cinzas, presença de material estranho e metais pesados. Na segunda, foram informados o solvente utilizado, o método de extração, rendimento e testes físico-químicos incluindo: determinação de água, solubilidade e densidade aparente, além do perfil cromatográfico, procedimentos que visam alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento fitoterápico e garantir o seu uso seguro e eficaz e por fim o estudo do produto acabado.

O estudo de estabilidade do medicamento é primordial tanto quanto o controle da qualidade, com a finalidade de estabelecer a vida útil do produto, além de nortear as condições de armazenamento por meio da ratificação das características físicas, microbiológicas, químicas e biológicas (48, 275).

Buscando determinar o tempo de validade da emulsão com micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto de folhas de *E. dysenterica* e a melhor condição de armazenamento, a Tabela 10 mostra os resultados observados em relação aos períodos avalidos para o tempo de estabilidade das amostras em relação ao pH. Quanto a este parâmetro não foi observado mudanças relevantes tanto em relação ao tempo, quanto em relação ao local de estocagem e portanto, manteve um pH compatível com o da pele.

Os resultados obtidos por potenciometria correspondentes desde o tempo inicial até o tempo 60 dias não apresentaram variações demasiadas, como pode-se observar na Tabela 10. Estes valores podem ser considerados passíveis de serem previstos.

Formulações que serão administradas topicamente requerem um pH similar ao comumente encontrado no tecido cutâneo, que varia entre 5 e 6, com isso previne-se reações adversas como irritabilidade e problemas de intolerância (72).

Portanto, os valores de pH evidenciados para as formulações avaliadas (Tabela 10) encontram-se dentro da faixa ideal para a aplicação tópica.

Tabela 10 – Resultados obtidos para o tempo de estabilidade das amostras para avaliação do pH na emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de *E. dysenterica* e no placebo

Períodos/dias	Emulsão + micropartículas		Emulsão placebo	
	25±1°C	4±1°C	25±1°C	4±1°C
0	5,24±0,03	5,24±0,03	3,95±0,02	3,95±0,02
7	5,1±0,04	5,12±0,02	3,73±0,01	3,72±0,01
15	5,17±0,03	5,14±0,04	3,83±0,02	3,85±0,02
30	5,06±0,04	5,08±0,03	3,77±0,01	3,79±0,07
60	4,77±0,01	5,0±0,01	3,57±0,02	3,52±0,01

Quanto aos parâmetros organolépticos aspecto, cor, odor e sensação de tato acompanhados durante os períodos estipulados, algumas modificações foram visualizadas principalmente para as amostras de emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de *E. dysenterica* armazenadas em temperatura ambiente, que logo no sétimo dia sofreu modificação físicas no aspecto e, mais acentuado no décimo quinto dia, pois além do aspecto a cor também sofreu escurecimento Tabela 11. E sendo assim, pelo que foi verificado é recomendável que esta formulação seja armazenada sob refrigeração por até 60 dias, período em que mantém as características inerentes de uma formulação tópica desejável (Figura 22).



Figura 22 - Emulsão com micropartículas fase inicial (A) e fase final (60 dias) (B)

Tabela 11 – Características organolépticas observadas para o tempo de estabilidade das amostras de emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de *E. dysenterica* e no placebo

EMULSÃO + micropartículas Ambiente					
Parâmetros	Tempo em dias				
	0	7	15	30	60
Aspecto	Homogêneo	Levemente modificado	Levemente modificado	Levemente modificado	Levemente modificado
	Brilho	Brilho	O paco	O paco	O paco
Cor	Característico	Levemente modificado	Modificado	Modificado	Modificado
Odor	Característico	Característico	Modificado	Modificado	Modificado
Sensação de tato	Liso	Liso	Liso	Liso	Liso
EMULSÃO + micropartículas Geladeira					
Parâmetros	Tempo em dias				
	0	7	15	30	60
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Levemente modificado
	Brilho	Brilho	Brilho	Brilho	Brilho
Cor	Característico	Característico	Característico	Característico	Levemente Modificado
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
Sensação de tato	Liso	Liso	Liso	Liso	Liso
EMULSÃO Ambiente					
Parâmetros	Tempo em dias				
	0	7	15	30	60
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
	Brilho	Brilho	Brilho	Brilho	Brilho
Cor	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
Sensação de tato	Liso	Liso	Liso	Liso	Liso

....continuação

EMULSÃO Geladeira					
Parâmetros	Tempo em dias				
	0	7	15	30	60
Aspecto	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo	Homogêneo
	Brilho	Brilho	Brilho	Brilho	Brilho
Cor	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
Odor	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico
Sensação de tato	Liso	Liso	Liso	Liso	Liso

Para assegurar a qualidade da emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de *E. dysenterica* a aferição do teor do marcador selecionado, no caso, a catequina foi verificado por CLAE conforme recomendado pela RDC 26/2014 (49).

Por meio de metodologia validada, foi verificado o teor de catequina, a substância utilizada como referência no controle da qualidade para verificação durante os períodos de estocagem da emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de *E. dysenterica* e abrigada em temperatura ambiente e sob refrigeração (150). Inicialmente a formulação apresentou 20,63µg/mL de catequina, considerado 100% para a formulação. Este acompanhamento assegura que o ativo esteja presente por tal período e, infere-se que a atividade farmacológica assim também seja assegurada. Foi verificado que, quando mantida a emulsão com micropartículas em condições de temperatura ambiente esta apresentou degradação química do marcador analítico abaixo da faixa de concentração aprovada para o derivado vegetal no sétimo dia (75,28%), a qual é permitida penas 20% de variação, e mais pronunciado no trigésimo dia (17,61%) (Figura 23) (190).

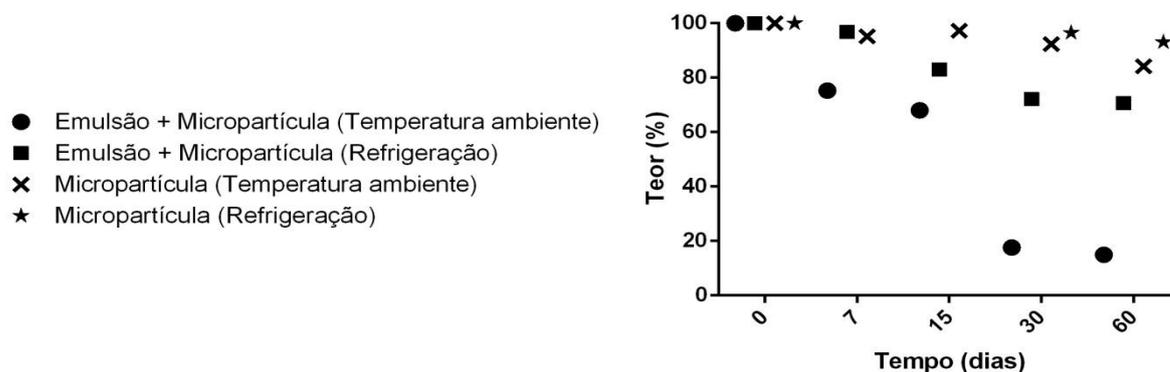


Figura 23 - Teor de catequina na emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carregando extrato aquoso bruto das folhas de *E. dysenterica* em temperatura ambiente e refrigeração por até 60 dias e nas micropartículas em similar período e estocagem

Quando mantida a formulação sob refrigeração, o marcador permaneceu dentro da faixa de concentração aprovada para o derivado vegetal até o décimo quinto dia (83,26%), porém, a degradação observada nos demais dias não foi abrupta como a anteriormente citada, pois até 60 dias havia 70,72% de catequina presente na formulação (Figura 23).

No décimo quinto dia as que foram armazenadas em temperatura ambiente começaram a decair o percentual de EBA, enquanto que as mantidas resfriadas mantiveram o ativo. Mas ao final de dois meses, ambas demonstraram decaimento, porém, sempre mais pronunciado nas mantidas em temperatura mais elevada, o que sugere que o armazenamento em temperatura entre 2 e 8 graus é mais favorável para este derivado vegetal. Além disso, para atestar a eficácia da formulação o perfil cromatográfico corrobora a presença de catequina contida na emulsão com micropartículas de quitosana carregadas de EBA, sendo assim se este marcador analítico está presente seguramente os demais também assim estão Figura 24.

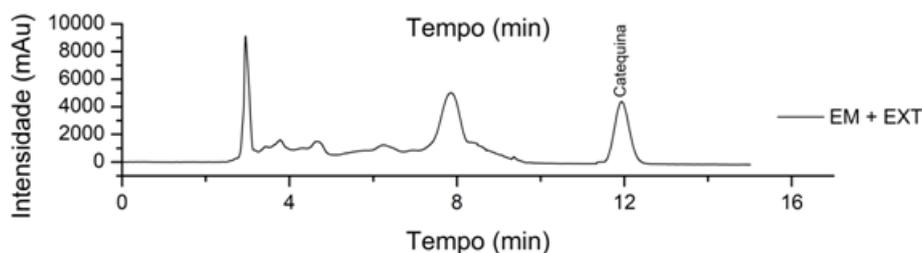


Figura 24 - Perfil cromatográfico por CLAE da emulsão com micropartículas de quitosana carregadas de EBA

Estudos reportam que catequinas apresentam problemas associados com sua estabilidade, principalmente em relação a temperatura. Com relação a esta degradação da catequina foi relatado que o seu teor decaiu pelo menos 50% durante o primeiro mês de armazenamento à temperatura ambiente (276). Um estudo recente, analisou a estabilidade de micropartículas contendo extrato da infusão de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, sendo verificado que o teor de catequina não diminuiu significativamente quando armazenadas em temperaturas abaixo de 4 graus, além disso, estes autores também recomendam o armazenamento sob refrigeração, o que corrobora os resultados verificados neste estudo (134).

Foi mencionado que uma formulação com micropartículas de quitosana contendo derivado vegetal de folhas de *Olea europaea* L. apresentou uma estabilidade superior à outras que foram mantidas em temperaturas mais elevadas (72).

Além disso, segundo um estudo atual é a melhor técnica para aumentar a durabilidade tanto de extratos como de óleos essenciais (267).

Como o Brasil encontra-se localizado na zona IV, as especificações para estudos de estabilidade para formas farmacêuticas semi-sólidas de base aquosa, envasadas em embalagens semipermeáveis que serão armazenadas entre 15 e 30°C são conduzidos à 40°C e umidade de 75% de umidade (52). Contudo, não foi possível a realização deste em função da susceptibilidade a degradação do marcador analítico adotado.

O controle da qualidade é o conjunto de atividades destinadas a verificar e assegurar um produto antes deste ser disponibilizado para uso, atestando que este cumpre com a qualidade preestabelecida.

No que se refere à contaminação microbiana ao proceder-se o controle microbiológico para as emulsão contendo micropartículas, os resultados observados são relevantes, uma vez que não foi encontrado nenhum microrganismo mesófilo ou patogênico, resultados estes provavelmente por conta das boas práticas de coleta e manipulação da matéria-prima vegetal. Os limites microbianos estabelecidos são de 10^2 UFC/g para bactérias e 10^1 UFC/g para fungos mesófilos e ausência de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* para formas farmacêuticas de uso tópico (168). Além disso, os resultados sugerem a ausência de interferência do efeito antimicrobiano na determinação da qualidade de manufatura do produto

acabado uma vez que ao proceder-se uma comparação entre a droga vegetal, o derivado vegetal e o produto elaborado, empregando micropartículas obtidas por aspersão contendo EBA, revelaram que o processo aliado a BPF afetaram a carga microbiana, chegando à ausência deste no produto final.

Os resultados sobre a presença de microrganismos reforçam que os procedimentos usados estão adequados, além de determinar se o produto satisfaz às exigências microbiológicas preconizadas na FB, bem como as regulamentações sanitárias.

Plantas medicinais estão sujeitas a contaminações físico-químicas (metais tóxicos, agrotóxicos, solventes) e biológicas (fungos, bactérias, parasitas, insetos), sendo que os elementos contaminantes devem ser evitados e controlados por meio de medidas que garantam a qualidade da droga vegetal (195). Frente aos resultados obtidos e seguindo-se as boas práticas de fabricação, as medidas tomadas para a garantia de qualidade foram eficientes, assegurando que o produto foi produzido de maneira pertinente para seu uso (50).

No presente estudo, as condições empregadas contribuíram para a qualidade tanto da matéria-prima quanto do produto acabado (168).

Estudo de liberação da emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de *E. dysenterica*

O perfil de liberação da catequina a partir da emulsão contendo micropartículas carregadas com EBA foi investigado *in vitro*, assim como a partir do EBA e das micropartículas carregadas com EBA (80% em 2 horas). A catequina a partir do EBA se difundiu rapidamente através do meio aquoso. Quando o EBA estava encapsulado, conforme o esperado, essa liberação de catequina foi sustentada, onde que somente 20% foram liberados em um dia. Já a incorporação das micropartículas em emulsão acelerou sutilmente essa liberação, de forma que 30% de catequina foram liberados em um dia de experimento (Figura 25). A liberação progressiva de uma micropartícula que deve ser biodesiva prolonga o efeito da formulação após aplicação na pele.

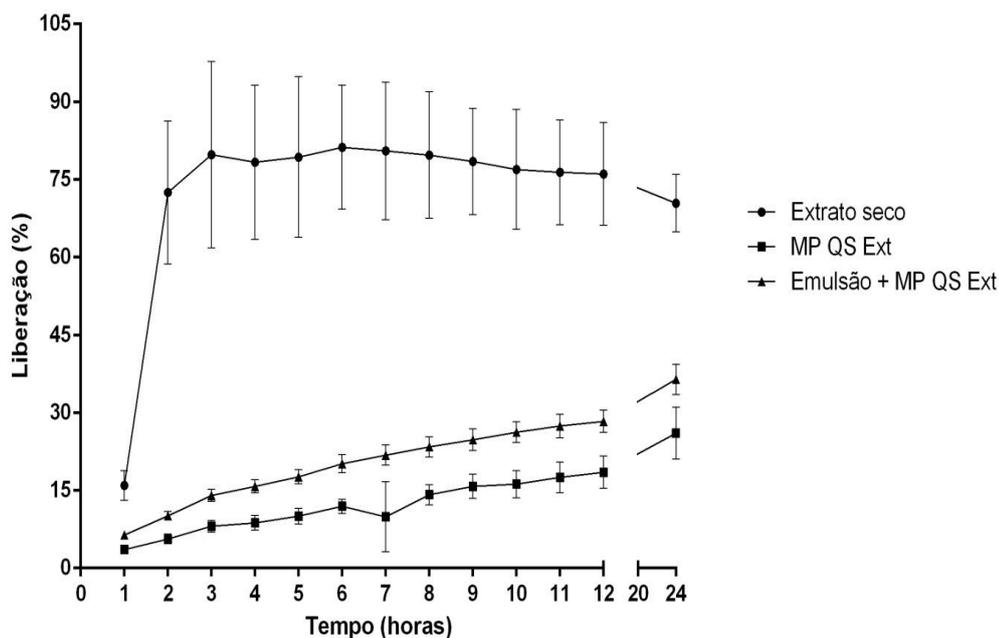


Figura 25 – Perfil de liberação *in vitro* de catequina contida no extrato bruto EBA, MP QS Ext (micropartículas sólidas) e emulsão com micropartículas contendo EBA

Este resultado também pode ser corroborado por outro estudo no qual observaram que a encapsulação de extrato de folhas de oliveira por secagem com *spray drying*, no qual confirmam a liberação progressiva dos compostos polifenólicos da amostra (72).

As vantagens que uma forma farmacêutica de liberação controlada apresenta superam as demais formulações que não são desenvolvidas com esta tecnologia. Então, a liberação controlada de flavonoide observada neste estudo ressalta a importância de estratégias moduladora de entrega de fármacos, destacando-se os matriciais como os microencapsulados.

Estudo de permeação da emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de *E. dysenterica*

Os estudos de permeação *in vitro* da emulsão com micropartículas e dos controles extrato bruto e das micropartículas, utilizando pele de orelha suína foram realizados, por um período de 24 h. Ao término do experimento, os resultados obtidos referentes ao marcador analítico (catequina) recuperado do extrato córneo ou da epiderme das três amostras avaliadas foram quantificados.

O extrato seco, apesar de não restringir a liberação da catequina (Figura 26), promove uma retenção do ativo na pele em concentração comparável às

micropartículas que retardam a liberação do fármaco. Todas as formulações mantiveram a mesma quantidade de catequina no estrato córneo. Já a emulsão conseguiu um aumento significativo de aproximadamente três vezes na quantidade de catequina que penetrou para camadas mais profundas da pele. As camadas mais internas do tecido cutâneo são o sítio alvo de ação terapêutica para tratamentos dermatológicos. Formulação que apresenta alta taxa de permeação na pele promove maior hidratação e conseqüentemente mais efeito protetor.

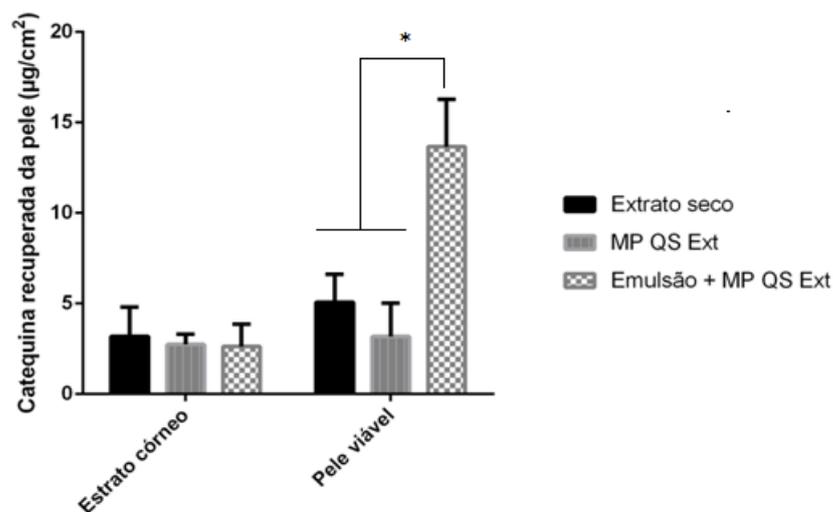


Figura 26 - Catequina recuperada da pele suína após 24 h de experimento de permeação *in vitro* a partir de três amostras: extrato seco bruto EBA, MP QS Ext (micropartículas sólidas) e Emulsão com micropartícula contendo EBA, $p < 0,0001$ usando Two way Anova

O estrato córneo representa a principal barreira física da pele, de modo que, uma substância que permeia esta camada da pele, apresenta a capacidade de transpor limitações que impeçam que o ativo chegue a camadas como a epiderme. Sendo assim, este ensaio determina a localização e a distribuição do composto no estrato córneo e na epiderme, demonstrando a penetração no tecido epitelial. Segundo estudos, esta capacidade de transpor o estrato córneo pode ser atribuída a hidrofobicidade da catequina (23).

Wisuitiprot *et al.* (2011), desenvolveram micropartículas de quitosana contendo catequina de *Camellia sinensis* e, avaliaram a permeação na pele humana, pois sabe-se que este flavonoide não penetra facilmente no tecido cutâneo, e verificaram percentuais de 66,37% para epicatequina (23). Além disso, neste estudo

foi afirmado que a quitosana mostrou ser um excelente veículo para facilitar a permeação de catequinas, pois segundo os autores este polímero inibe a degradação deste ativo pelas enzimas presentes na pele. Fato que ratifica o que foi observado neste estudo e com isso possivelmente a ação proposta para a formulação atinge o alvo terapêutico.

Estudo de atividade antimicrobiana da emulsão contendo 5% de micropartículas de quitosana carreando extrato aquoso bruto das folhas de E. dysenterica

A emulsão com micropartículas não se difundiu no ágar, portanto não foi ativa. Porém, na microdiluição esta formulação apresentou efeito semelhante ao do extrato EBA e concentração inibitória mínima de 321,5µg/mL para a cepa 25923 e de 625µg/mL para 29213, demonstrando que esta ação perdura por 7 dias sem distinção de ambiente de armazenamento, e por fim, após 20 dias ela começa a sofrer alterações.

Portanto, a formulação otimizada com EBA, consistiu de uma emulsão não iônica com características importantes. Apresentou acentuada permeabilidade, liberação controlada e atóxica. Além disso, foi a que apresentou maior tempo de validade. Todos estes atributos estão associados à tecnologia de microencapsulação, pois a mucoadesividade da quitosana usada como instrumento para entrega de ativos é relevante, uma vez que esta propriedade aumenta o tempo de retenção do fármaco no local de absorção provocando um gradiente de concentração que melhora a absorção do ativo. Ademais, considerando as características vantajosas da aplicação desta emulsão, que se reflete principalmente em biodisponibilidade aumentada do princípio ativo e o consequente aumento de sua capacidade terapêutica para feridas cutâneas.

Emulsões ricas em catequinas foram desenvolvidas e apresentaram ser estáveis por até 28 dias, também neste estudo demonstraram em humanos que formulações contendo 3% de extrato de *Camellia sinensis* foram benéficas para tratamento de pele como acne e reportam que pode ser a atividade anti-inflamatória que promove a melhora (277).

Sendo assim, a emulsão composta por EBA demonstrou potencial para atingir concentrações notáveis até a epiderme viável, ultrapassando o estrato córneo que é a barreira biológica da pele com isso aumenta-se a biodisponibilidade do ativo, além

de outras vantagens como: melhor estabilidade, compatibilidade de pH, promoção da angiogênese, inibição de microrganismos e atóxica.

5.4.2.2 Avaliação do Potencial Irritante dos Derivados Vegetais das Folhas de *Eugenia dysenterica* Usando Membrana Corio Alanatoide (MCA)

O potencial irritante de produtos para a pele representa um requisito fundamental a ser apresentado para demonstrar a segurança e a eficácia.

Assim sendo, o ensaio HET-CAM (Hens Egg Test- Chorion Allantoide Membrane) foi usado para a avaliação da segurança, visando estimar os riscos ao usuário, levando em conta as características do agente a ser testado, sendo ele o ingrediente ou o produto acabado. Para cada amostra de derivado vegetal ou formulação testada, foram utilizados cinco ovos embrionados, nos quais foram observados os efeitos vasculares e estes classificadas de acordo com os critérios descritos no método de ensaio (186, 278). O ensaio HET-CAM para avaliar os danos na membrana cório-alantóide é um método validado e reconhecido (279).

As pontuações para o HET-CAM mostraram que os derivados vegetais (óleo e EBA) as formulações (Emulsão com micropartículas e Emulsão com óleo) juntamente com os controles negativos (NaCl 0,9% e azeite) todas foram classificadas como não irritantes. Porém, NaOH foi classificado como irritante severo.

Em relação aos parâmetros analisados (hemorragia, coagulação e lise de vasos) e os "scores" obtidos tanto para as amostras e os padrões foi verificado que: a membrana exposta a NaOH (0.1N) demonstrou severos danos vasculares com score de irritação 21, sendo classificado como um irritante severo. Ao contrário, as amostras de derivados vegetais e as formulações, assim como os controles negativos não provocaram nenhum sinal de dano a membrana, sendo assim, estes compostos receberam score zero, os quais similarmente foram classificados como não irritantes (Figura 27).

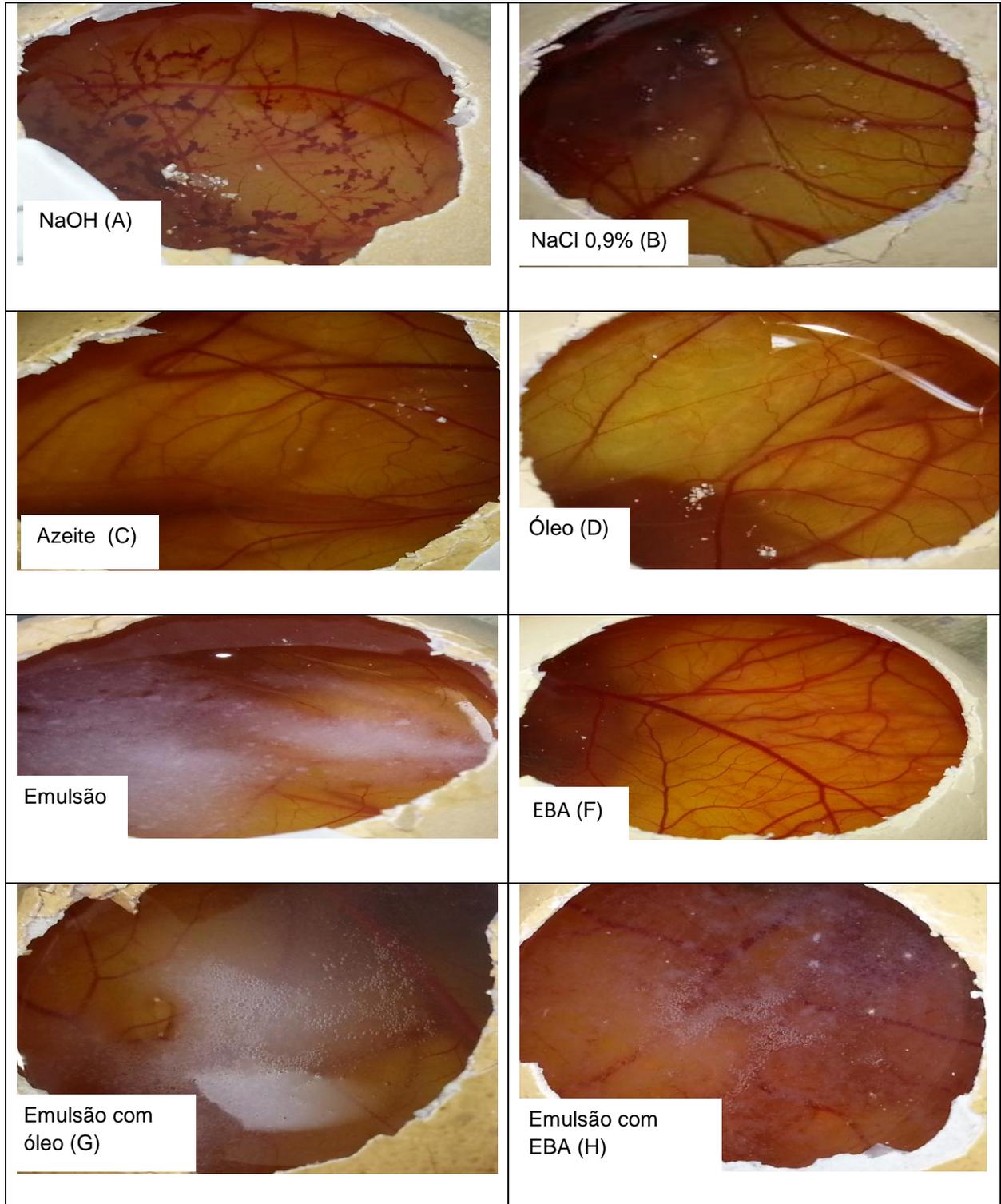


Figura 27 - Imagens do ensaio HET-CAM. Representando a membrana após 300 segundos de exposição ao NaOH (0.1N) controle positivo (A), NaCl (0.9%) e azeite, controles negativos (B e C), óleo 1168 μ g/mL (D) veiculo: emulsão base (E); EBA 500 μ g/mL (F); emulsão óleo 1168 μ g/mL (G) e emulsão EBA 500 μ g/mL (H). As imagens representam (n=5/substâncias analisadas)

Previamente, corroborando estes achados, Moreira et al. (2017) avaliaram o extrato hidroalcoólico de folhas de *E. dysenterica* usando o teste de opacidade de

corne bovina e observou que este derivado não tem potencial irritante, sendo considerado seguro (19). Costa et al. (2015) avaliaram micropartículas de quitosana e estas demonstraram ser seguras pelo comportamento não irritante também verificado (280).

Recentemente, foi avaliada a tolerância dérmica de nanocápsulas contendo quitosana e, estas também apresentaram-se seguras para uso tópico, confirmando o observado por este estudo (281).

5.4.2.3 Avaliação da Atividade Angiogênica dos Derivados Vegetais das Folhas de *Eugenia dysenterica* Usando Membrana Cório Alanatoide (MCA)

Uma diversidade de derivados vegetais tem sido reportado estimulando angiogênese em membrana alantoide (282). Entre estes inclui-se *Hancornia speciosa* Gomes (64) e *Aloe vera* L., uma espécie muito utilizada para aplicação tópica (283).

Neste estudo, analisou-se o possível efeito do óleo essencial de *E. dysenterica* na concentração de 292µg/disco, utilizando como modelo experimental a membrana corioalantoide do ovo embrionado de galinha (MCA). As redes vasculares das membranas foram analisadas no 16º dia do experimento após o tratamento com esta e as demais substâncias analisadas: EBA (125µg/disco); emulsão com óleo (292µg/disco); emulsão com micropartículas (125µg/disco); base da emulsão; controle negativos (azeite e água estéril); controle inibidor (dexametasona 80 µg/disco) e controle de indução de angiogênese (Regederm 20mg/disco). As redes vasculares das membranas foram quantificadas por meio de uma avaliação macroscópica da resposta angiogênica semiquantitativamente, empregando scores para as variações de análise na distribuição e densidade dos vasos da MCA ao redor do local de inserção dos discos, baseado no método para a pontuação semiquantitativa proposta por Ribatti et al. (2006) (188). Foram analisados três parâmetros: comprimento dos vasos sanguíneos, calibre dos vasos sanguíneos e número de junções.

Os resultados da membrana cório alantoide revelaram que o tratamento com óleo essencial promoveu crescimento e ramificações dos vasos em múltiplas junções e calibres mais robustos. Por pontuação semiquantitativa, todos os nossos resultados na presente análise sugerem que os derivados vegetais promoveram o

processo angiogênico para todos os tratamentos com pontuação 3, equivalente ao controle positivo Regederm (pontuação 3) em comparação com o controle negativo (pontuação 0) e o agente inibidor também atribuída pontuação zero (0). No grupo dexametasona, a presença de vasos era escassa, pois a capacidade antiinflamatória eficaz do glicocorticoide é devido ao fato de que o medicamento diminui a angiogênese associada a uma diminuição significativa do índice de prostaglandina E_2 e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Figura 28). Este ensaio sugere que as substâncias avaliadas tem potencial para serem ativas na indução do crescimento de novos vasos.

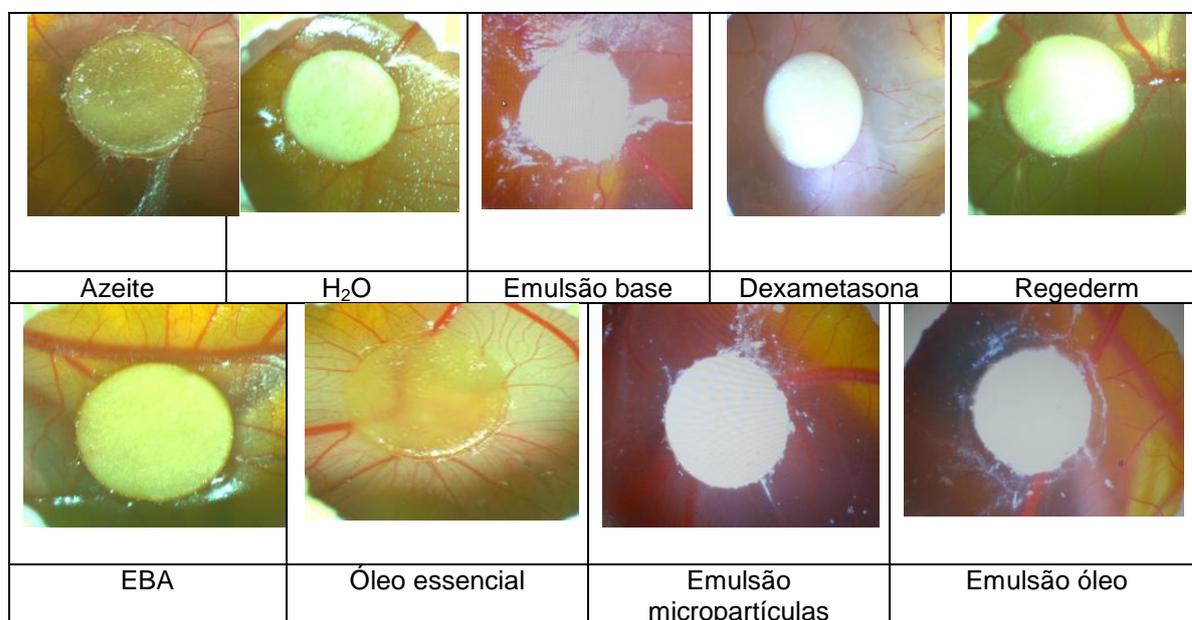


Figura 28 - Atividade angiogênica dos derivados vegetais obtidos das folhas de *E. dysenterica*. Controles negativos: azeite, água estéril e emulsão base. Controle inibidor: dexametasona 80 $\mu\text{g}/\text{disco}$. Controle indutor: Regederm 20mg/disco. Amostras avaliadas: extrato bruto aquoso (EBA) 125 $\mu\text{g}/\text{disco}$; óleo essencial 292 $\mu\text{g}/\text{disco}$; emulsão com micropartículas 125 $\mu\text{g}/\text{disco}$ e emulsão com óleo essencial 292 $\mu\text{g}/\text{disco}$. A avaliação das MCA após 72h de exposição aos tratamentos mostraram uma resposta pró-angiogênica por pontuação semiquantitativa macroscópica. As imagens ilustram exemplos representativos das diferentes respostas (pontuação variando de 0 a 5) como observado sob uma luz de microscópio Axiovert com o auxílio do software AxioVision 100 - Zeiss, Alemanha, na ampliação de 0,5x1,25

O reparo de tecidos compreende muitos eventos celulares, incluindo coagulação, inflamação, epitelização, formação de tecido de granulação, um processo complexo caracterizado por angiogênese e remodelação tecidual (284). Buscando novas opções terapêuticas, nos últimos anos, compostos naturais estão sendo empregados para a terapia de lesões epiteliais, em função do potencial destas substâncias. Os produtos naturais servem como coagulantes, combatem a

infecção e aceleram a cicatrização de feridas. Esses agentes bioativos normalmente modulam uma ou mais fases do processo de cicatrização (82).

Na literatura vários estudos reportam o uso da MCA para avaliação do processo angiogênico, inclusive para produtos farmacêuticos como micropartículas, géis, nanopartículas e outros usados para administração tópica ou outras vias (285, 286).

Segundo Rojo *et al.*, (2014), propriedades curativas de feridas do óleo de amêndoas de *Pouteria lucuma* R. and Pav. var. La Molina mostraram atividade modulando a inflamação com diminuição significativa na concentração de óxido nítrico, além de estimular a migração celular e crescimento de vasos sanguíneos (287). Estudo farmacológico indicou recentemente, que flavonoides (quercetina e rutina) da espécie *Abelmoschus manihot* (L.) medik, podem ser os responsáveis pela ação angiogênica observada usando MCA (288). Outra espécie, a *Aloe vera* pode ter potenciais aplicações farmacêuticas para o tratamento de feridas, porque estimulam a expressão de VEGF e outros fatores relacionados à cicatrização de feridas (283). Da mesma forma, estudos indicaram que um extrato aquoso de *Angelica sinensis* promove a angiogênese (289, 290).

Park *et al.*, (2017) avaliaram a atividade cicatrizante do fermentado de *Ginseng* em feridas de ratos e em seus resultados verificou-se que essa atividade pode ser devido a aceleração do processo de fechamento das injúrias em função do significativo potencial angiogênico (291).

Recentemente, a avaliação *in vivo* de Acheflan® mostrou que este produto acelera a cicatrização de feridas e esse efeito pode ser atribuído ao composto alfa-humuleno, que revelou importante ação anti-inflamatória, além de eficácia tópica provavelmente devido à seu envolvimento com o aumento da angiogênese e remodelação dérmica imputada ao alfa-humuleno e ativação do fator de crescimento endotelial vascular e (292, 293).

Inúmeros fatores angiogênicos, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TNF, IL-6 e IL-8, são ativados por células inflamatórias, os membros da família VEGF são os principais mediadores da maquinaria reguladora que controla a angiogênese durante o desenvolvimento e em condições patológicas (294). Além disso, a disseminação generalizada de agonistas canabinoides de receptores presentes em células (macrófagos e queratinócitos) e anexos de pele (folículos e glândulas), aos quais têm sido conferido potencial terapêutico anti-inflamatório, anti-

noniceptivo, portanto, provavelmente propiciam restabelecimento de tecidos, uma vez que, beta-cariofileno, um composto majoritário de cagaita, para o qual foi demonstrado que é um ligante seletivo e agonista dos receptores canabinoides CB2, descrito na literatura cociliado a estas ações fisiológicas, e conseqüentemente apresentando-se como uma potencial estratégia no tratamento do processo inflamatório e conseqüentemente a cicatrização (248, 252).

A cicatrização de feridas é um processo complexo e o efeito de cura de lesões é multifatorial. Esses resultados demonstram um efeito positivo do óleo essencial no processo de cicatrização de feridas na linhagem celular de fibroblastos L929, provavelmente devido a inibições de ON e está associado ao aumento nas atividades de processo angiogênico exibido por fitoquímicos presentes no óleo essencial de folhas de *E. dysenterica*.

Com base nas bioatividades relatadas acima, pode ser parcialmente explicado o efeito do óleo anti-inflamatório nos macrófagos RAW246.7 estimulados pelo LPS e as feridas induzidas no ensaio de *scratch*. Nossos resultados sugerem que a espécie nativa brasileira é capaz de neutralizar citocinas, apresentou boa atividade antiinflamatória *in vitro*, fato que parece estar relacionado à modulação de mediadores pelo compostos presentes nas folhas da espécie. As análises mostraram que esta espécie contém altas concentrações de compostos sesquiterpenicos bioativos, como beta-cariofileno e alfa-humuleno, sugerindo que esses compostos podem ser responsáveis por suas atividades. Os resultados indicam que o EBA e o óleo essencial da *E. dysenterica* podem ser utilizados no futuro como uma alternativa à aplicação potencial na cicatrização de feridas.

Assim, os resultados da presente pesquisa são importantes, pois a comprovação da atividade angiogênica do extrato aquoso e do óleo essencial *E. dysenterica* possibilitam o planejamento do delineamento de produtos com finalidade terapêutica. De fato, desenvolver um produto que favoreça a angiogênese, colabora também a cicatrização de feridas, e regeneração de órgãos e tecidos. Quanto a esta natureza, faz-se necessário ressaltar que indivíduos acometidos pelo diabetes seriam contemplados, pois sabe-se que feridas em portadores desta doença metabólica sofrem com a falta de vascularização. Sendo assim, metabólitos advindos desta espécie, favorecem o processo da angiogênese, etapa esta importante na fase de cicatrização de feridas, pois através da formação de novos vasos sanguíneos

ocorre o transporte de nutrientes e oxigênio até a lesão, conseqüentemente o processo cicatricial será completado em um período menor.

5.4.3 Desenvolvimento das Formulações Semi-sólidas – Emulsão com Óleo Essencial

A emulsão desenvolvida com o óleo essencial foi analisada somente quanto aos aspectos organolépticos e pH, pois demais análises não foram passíveis de serem realizadas em função do tempo e serão analisadas nos próximos passos deste estudo. Estas análises foram realizadas nos tempos 0, 7, 15, 30 e 60 dias, com amostras armazenadas em temperatura ambiente e em geladeira.

Quanto às características organolépticas, esta formulação apresentou aspecto homogêneo e brilhoso, cor característica (branca), odor característico e muito agradável, além de toque com sensação lisa. Sendo estas características conservadas tanto em relação ao período de estocagem, como local em que foram abrigadas. Fato que demonstra que são estáveis quanto a estes quesitos, porém, a quantificação e identificação de um marcador necessita ser avaliada para reforçar estas observações e os efeitos farmacológicos.

Em relação ao pH, as amostras mostraram comportamento similares inicialmente ($3,9 \pm 0,02$ pH), conservando valores aproximados até o final, onde foi observado pH com pouca alteração, $3,52 \pm 0,02$ para ambiente e $3,55 \pm 0,02$ para geladeira. Dados que sustentam a afirmação de sua estabilidade.

Uma das principais desvantagens do uso de extratos contendo catequinas estão relacionadas com a sua instabilidade, principalmente em relação a temperatura (134). Esta peculiaridade restringe seu uso, e então, requer estratégias de formulação. Por essa razão, uma alternativa para mitigar tal problema e oferecer maior durabilidade, tem sido o uso de diferentes sistemas, tais como os empregados neste estudo.

5.4.4 Desenvolvimento das Formulações – Nanoemulsão com Óleo Essencial das Folhas de *E. dysenterica*

A nanoemulsão obtida neste estudo foi caracterizada quanto às características organolépticas, ao pH, índice de polidispersão e potencial zeta.

Quanto às características organolépticas, esta formulação apresentou aspecto homogêneo e brilhoso, cor característica (translúcida), odor característico e muito agradável, além de toque com sensação lisa. Sendo estas características conservadas independentes do período de estocagem, como do local em que foram abrigadas. Portanto, as nanoemulsões preservaram os aspectos organolépticos. Fato que demonstra que são estáveis quanto a estes quesitos, porém, a quantificação e identificação de um marcador necessita ser avaliada para reforçar estas observações e garantir seus efeitos farmacológicos.

Em relação ao pH, as amostras mostraram comportamento muito similares inicialmente $3,65 \pm 0,06$ para a nanoemulsão sem óleo e $3,55 \pm 0,11$ para a com óleo essencial. No final do período das análises, foi observado pH com leve decaimento para todas as amostras, mas sempre bem semelhantes para temperatura ambiente e para a de geladeira (Figura 29).

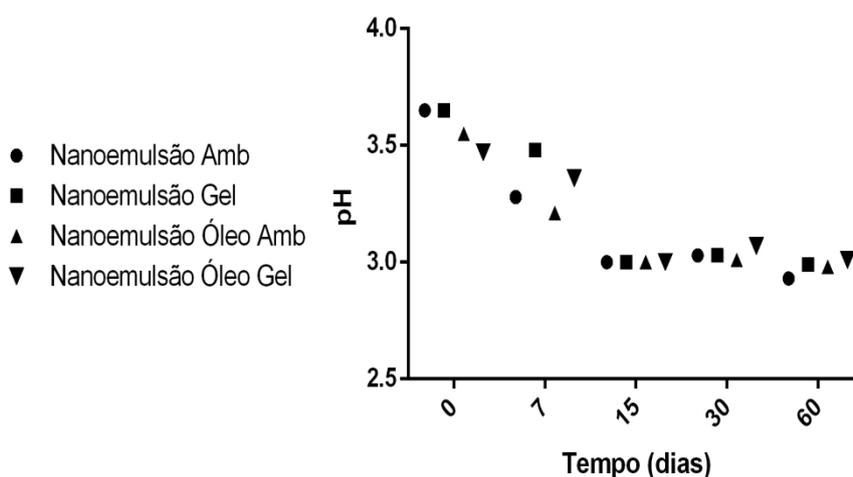


Figura 29 - Determinação do pH das nanoemulsões armazenadas por até 60 dias em temperatura ambiente ou refrigerada

Segundo a literatura a diminuição do pH está diretamente ligado a informações sobre a estabilidade do sistema, pois sua redução pode indicar a presença de uma

oxidação da fase oleosa com formação de hidroperóxidos ou ácidos graxos livres na formulação, provenientes da hidrólise do sistema tensoativo (295).

As nanoemulsões visualmente são transparentes, apresentam-se como sistemas termodinamicamente estáveis (87).

A determinação do potencial zeta tem um papel importante na delimitação da estabilidade (296). As nanoemulsões apresentaram potencial zeta na faixa de 21mV indicando que a interface com carga positiva e independentemente do tempo ou temperatura mantiveram-se praticamente constante, o que é favorável para a estabilidade da nanoemulsão, (Figura 30). O potencial zeta tem um relevante papel, pois, de acordo com a literatura, este parâmetro está ligado à estabilidade, sendo considerados valores acima de +20mV indicativos de estabilidade (297)

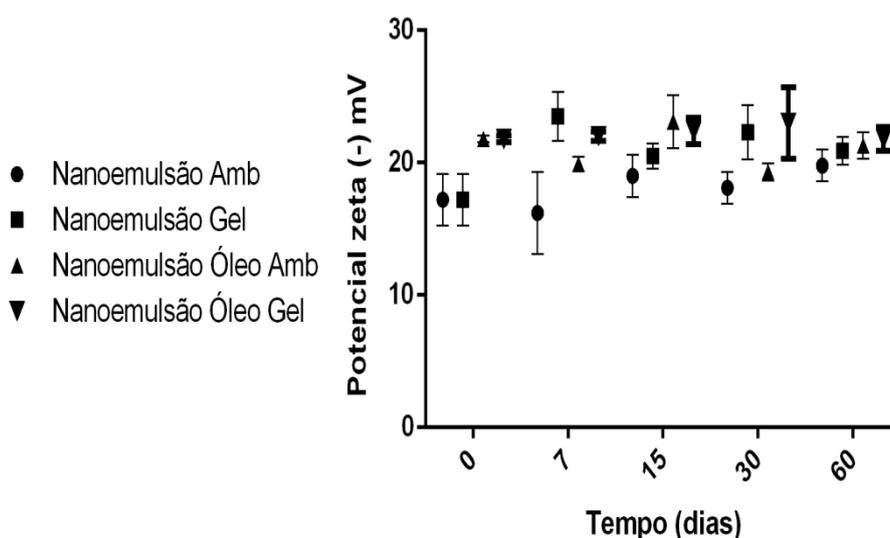


Figura 30 - Determinação do potencial zeta das nanoemulsão em função do tempo e temperatura

O índice de polidispersão foi de $0,248 \pm 0,03$ no início da avaliação, estando em conformidade para se inferir que as partículas estão homogêneas, porém, sofreram elevação após 7 e 15 dias e, posteriormente decaíram para a faixa de $0,123 \pm 0,01$ a $0,235 \pm 0,1$, valor este mantido em 30 e 60 dias. Segundo a literatura, valores aproximados desta faixa encontrada indicam homogeneidade (298).

Portanto, a urgente necessidade de identificação de novos fármacos é uma preocupação global para que novas estratégias terapêuticas para o tratamento de inúmeras patologias.

Com a implantação e a implementação em 2006 de políticas de caráter nacional, que incluem a fitoterapia como uma das opções de ação e de serviços no Sistema Único de Saúde (SUS), com o objetivo de garantir a prevenção de agravos, a promoção e a recuperação da saúde com ênfase na atenção básica à saúde e com isso têm-se visto um amplo progresso. No entanto, a questão de produção de fitoterápicos é bem mais complexa na prática e envolve diversos fatores, dentre estes as exigências regulatórias.

O desenvolvimento de um medicamento fitoterápico a partir de uma planta deve priorizar a preservação da integridade química dos princípios ativos e conseqüentemente, a ação farmacológica, garantindo a constância da ação biológica desejada. Para atingir esses objetivos, etapas imprescindíveis na produção como: estudos prévios relativos aos aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e de desenvolvimento com qualidade são fases importantes que irão compilar para a obtenção de produtos com qualidade, segurança e eficácia (219).

Avanços nas pesquisas com derivados vegetais estão em ascensão, pelo fato de oportunizarem aliar a estes produtos o desenvolvimento tecnológico. Novas tecnologias empregando biopolímeros permitem uma gama mais ampla de alternativas terapêuticas para estarem disponíveis para tratamentos principalmente de infecções de pele uma vez que estes polímeros são biocompatíveis, além de que englobam outras características que são favoráveis para a recuperação do tecido cutâneo (26).

Atualmente, doenças como diabetes e obesidade afetam uma parcela significativa de pessoas globalmente, e as conseqüências destas doenças refletem em complicações como pé diabético e morbidades que resultam em úlceras, estas patologias são de substancial relevância uma vez que a população mundial direciona-se a um crescimento exponencial de indivíduos idosos ano a ano, então estes fatores implicam em altos custos para os sistemas de saúde e importante problema de saúde pública (39). Assim, tem sido crescente a preocupação e o empenho na busca de opções para tratamento e alívio de lesões cutâneas, pois cerca de 7% da população do Brasil é acometida por lesões primárias de pele e cerca de 7,6% dos indivíduos deste país são acometidos por diabetes (299, 300). E o uso de plantas medicinais tem sido considerado como uma abordagem alternativa e complementar para este tipo de injúria comparável a sulfadiazina de prata (301).

Viswanathan *et al.*, (2011) prepararam um creme contendo *Glycyrrhiza glabra* L., *Musa paradisiaca* L., *Curcuma longa* L., *Pandanus odoratissimus* L., *Aloe vera* e óleo de *Cocos nucifera* L., os autores reportaram que pacientes que sofrem de úlceras de pé diabético podem se beneficiar desta formulação (302).

Um outro exemplo, vem do nosso próprio país, trata-se de um medicamento fitoterápico de uso tópico, o Acheflan, um anti-inflamatório obtido a partir de óleo essencial de *Cordia verbenacea* (Boraginaceae), espécie que se encontra em compêndios oficiais, este fitoterápico apresenta ascensão, pois, estudo tem reportado seu uso como potencial cicatrizante, e esta propriedade possivelmente deve-se aos compostos alfa-humuleno e beta-cariofileno (246, 247).

O estudo de compostos naturais, com possíveis efeitos anti-inflamatórios, cicatrizante e antimicrobiano para patologias dermatológicas que apresentam resposta positiva face esta estratégia terapêutica é de considerável importância em saúde pública. Marinho *et al.* (2013), ressaltam a importância da intervenção na cura de feridas com produtos naturais, reforçando a necessidade de estudos como este (303).

Considerando o uso etnobotânico de *E. dysenterica*, somados a abundância de compostos fenólicos com potenciais terapêuticos, esta espécie é promissora para desenvolvimento de formulações (139, 149, 232, 304).

Desta forma, uma formulação com propósito da cura adequada de feridas, se associar a ação antimicrobiana, ausência de efeito negativo no crescimento e favorecimento da migração de células fibroblásticas, esta engloba importantes propriedades para um produto para administração tópica. Esta capacidade de restituir ferimentos do extrato aquoso, e mais pronunciado pelo óleo essencial pode estar relacionado aos seus componentes como flavonoides e terpenos que podem ser os responsáveis. Estes compostos podem ser favorecer o fechamento de feridas através eliminação de microrganismos em especial *S. aureus*, do aumento da angiogênese e suprimindo radicais livres. Somando-se a estes atributos, a preparação de produtos com substâncias naturais como a quitosana, que auxilia na liberação do fármaco, e com isso, sendo visível que pode ser melhor do que a aplicação direta, devido à liberação controlada e a permeação até o sítio alvo. Ademais, facilita a terapia local. A permeação atingindo a epiderme e a liberação controlada de flavonoide destaca a importância de estratégias de entrega de fármacos, como os microencapsulados.

Estima-se que milhares de pessoas sofrem com feridas cutâneas crônicas, as mais comuns são: úlcera de pressão, causada por diabetes, estase venosa, feridas cirúrgicas e ferimentos traumáticos (305). Numerosos processos fisiológicos e bioquímicos do corpo humano, como nos casos de lesões epiteliais podem produzir espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio como metabólitos, e quando há uma superprodução destes radicais danifica biomoléculas e conseqüentemente desencadeando condições inflamatórias e seus sintomas como dor, rubor, febre (306). O stress oxidativo acarreta na patogênese de uma ampla variedade de distúrbios inflamatórios, incluindo feridas dérmicas (307).

Nosso grupo mostrou potente atividade inibitória de tirosinase *in vitro* a partir de extrato de etanol de folha de *E. dysenterica* em comparação com o ácido kójico, exibindo o valor IC₅₀ de 11,88 e 13,14mg/mL, respectivamente (20). Além disso, suas folhas mostraram expressiva propriedade antioxidante em função da presença de metabólitos secundários como flavonoides (151, 155, 308). Este status indica que os derivados vegetais de *E. dysenterica* são constituintes promissores de produtos farmacêuticos para a cura da pele (19, 20).

Considerando os resultados obtidos neste estudo, observou-se a possibilidade de incorporar o extrato de cagaita em uma formulação tópica em emulsão, uma vez que esta demonstrou-se estável. A formulação demonstrou consistência e pH adequados para a aplicação no tecido epitelial. As próximas etapas deste estudo devem abranger o aprimoramento das formulações, e a aplicação em feridas com testes realizados *in vivo*.

6 CONCLUSÃO

Dentre as medidas requeridas para âmbito de registro de um medicamento fitoterápico, o controle da qualidade demonstrou para a droga e derivados obtidos neste estudo que em todas as etapas averiguadas as matérias-primas atendem os requisitos. As características farmacobotânicas descritas para *E. dysenterica* podem dar suporte para a sua identificação e são uma contribuição para o controle da qualidade da droga vegetal e derivados desta espécie.

O extrato aquoso demonstrou potencial para inibir o crescimento de *S. aureus*. Quanto à viabilidade celular, tanto EBA como o óleo essencial não foram citotóxicos, demonstrando sua aplicabilidade tópica. Na composição do óleo essencial predominou beta-cariofileno e alfa-humuleno e a presença destes metabólitos confere ação anti-inflamatória. Quanto ao EBA pode-se atribuir este efeito ao marcador catequina. Além disso, o óleo estimulou a migração de fibroblastos e angiogênese, processos que favorecem a cura de feridas. Quanto a segurança, similarmente os derivados vegetais e as formulações não apresentaram efeito irritante.

Na elaboração das formulações, primeiramente as micropartículas obtidas apresentaram características compatíveis para uso tópico. Diante do exposto, no presente estudo foram desenvolvidas formulações dentre estas com destaque para as emulsões contendo extrato aquoso ou óleo de *E. dysenterica* para a administração tópica, visando o tratamento de lesões cutâneas e preparados em concordância com a legislação vigente para registro de medicamentos fitoterápicos.

As formulações obtidas podem ser consideradas um avanço, visto que conseguiu-se demonstrar a potencial liberação e permeação da catequina para o tecido epitelial viável, a atoxicidade e estabilidade das formulações, além de características desejáveis para uso tópico, com o possível benefício terapêutico dos derivados vegetais de *E. dysenterica*.

Pelos estudos realizados, foi demonstrado que derivados vegetais provenientes de folhas de *E. dysenterica* têm atividades importantes, porém mais investigações são necessárias. Pois, é importante não só conhecer a ação *in vitro*, mas também estudar os mecanismos envolvidos nessas atividades biológicas. Sendo assim, estes derivados atuarão como agente cicatrizante no tratamento de lesões do tecido epitelial.



Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 09 de agosto de 2017.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO DE USO TÓPICO CONTENDO EXTRATO DE EUGENIA DYSENTERICA DC (MYRTACEAE)**", Protocolo n.º 77/2017, sob responsabilidade da Professora Pérola Oliveira Magalhães Dias Batista foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: White Leghorn (235). A presente aprovação é válida pelo período de: 1º/9/2017 a 31/12/2017.



Prof. Paula Diniz Galera

Prof. Dra. Paula Diniz Galera
 Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

REFERÊNCIAS

1. Simões CMOS, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed. UFSC: Ed, editor. Santa Catarina 2004.
2. Orhan DD, Özçelik B, Özgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological research*. 2010;165(6):496-504.
3. Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 2008;15(8):639-52.
4. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 2012;23:174-81.
5. Hammer K. Treatment of acne with tea tree oil (melaleuca) products: A review of efficacy, tolerability and potential modes of action. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;45(2):106-10.
6. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(4):564-82.
7. Chevallier A. The encyclopedia of medicinal plants. London: Dorling Kindersley 336p ISBN. 1996;751303143.
8. Haraguchi LMM, Carvalho OBd. Plantas medicinais: do curso de plantas medicinais. Plantas medicinais: do curso de plantas medicinais: Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente; 2010.
9. Gilbert B. Monografia de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas: Abifito; 2005.
10. WHO. World Health Organization. Declaration of Alma Ata: Report of the international conference on primary health care. Alma Atta, USSR 1978.
11. WHO. World Health Organization. Traditional medicine strategy 2002-2005. Geneva.
12. BRASIL 2006. Ministério da Saúde. Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS PNPIC. Brasília, 04 de maio de 2006.
13. BRASIL 2006. Ministério da Saúde. Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasília, de 23 de junho de 2006.
14. BRASIL 1967. Ministério da Saúde. Portaria nº 22 de 30 de outubro de 1967. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas, de 30 de outubro de 1967.

15. Almeida Sd, Proença CEB, Sano SM, Ribeiro JF. Cerrado: espécies vegetais úteis 1998.
16. Palhares D. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae Jussieu). *Revista Lecta*. 2003;21(1/2):29-36.
17. Cecílio AB, de Faria DB, de Carvalho Oliveira P, Caldas S, de Oliveira DA, Sobral MEG, et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of ethnopharmacology*. 2012;141(3):975-81.
18. Costa TR, Fernandes OF, Santos SC, Oliveira CM, Liao LM, Ferri PH, et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;72(1):111-7.
19. Moreira LC, de Ávila RI, Veloso DFMC, Pedrosa TN, Lima ES, do Couto RO, et al. In vitro safety and efficacy evaluations of a complex botanical mixture of *Eugenia dysenterica* DC.(Myrtaceae): Prospects for developing a new dermocosmetic product. *Toxicology in Vitro*. 2017;45(3):397-408.
20. Souza PM, Elias ST, Simeoni LA, de Paula JE, Gomes SM, Guerra ENS, et al. Plants from Brazilian Cerrado with Potent Tyrosinase Inhibitory Activity. *PLoS ONE*. 2012;7(11):e48589.
21. SILVA SMM, SILVA CAG, FONSECA-BAZZO YM, MAGALHÃES PO, SILVEIRA D. *Eugenia dysenterica* Mart. Ex DC.(cagaita): planta brasileira com potencial terapêutico. *Infarma Ciências Farmacêuticas*. 2015;27(1):49-95.
22. Bilia AR, Piazzini V, Guccione C, Risaliti L, Asprea M, Capecchi G, et al. Improving on Nature: The Role of Nanomedicine in the Development of Clinical Natural Drugs. *Planta Medica*. 2017;83(5):366-81.
23. Wisuitiprot W, Somsiri A, Ingkaninan K, Waranuch N. In vitro human skin permeation and cutaneous metabolism of catechins from green tea extract and green tea extract-loaded chitosan microparticles. *International Journal of cosmetic science*. 2011;33(6):572-9.
24. Patravale V, Mandawgade S. Novel cosmetic delivery systems: an application update. *International Journal of Cosmetic Science*. 2008;30:19-33.
25. Pereira GG, Santos-Oliveira R, Albernaz MS, Canema D, Weismüller G, Barros EB, et al. Microparticles of Aloe vera/vitamin E/chitosan: Microscopic, a nuclear imaging and an in vivo test analysis for burn treatment. *burns*. 2014;15:292-300.
26. Gelfuso GM, Gratieri T, Simao PS, de Freitas LAP, Lopez RFV. Chitosan microparticles for sustaining the topical delivery of minoxidil sulphate. *Journal of microencapsulation*. 2011;28(7):650-8.
27. Bowey K, Neufeld RJ. Systemic and mucosal delivery of drugs within polymeric microparticles produced by spray drying. *BioDrugs*. 2010;24(6):359-77.

28. Saravanakumar R. Study of prescribing pattern of topical corticosteroids in the department of dermatology of a multispecialty tertiary care teaching hospital in south India. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 2016;3(4):685-7.
29. Schoepe S, Schäcke H, May E, Asadullah K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Experimental dermatology*. 2006;15(6):406-20.
30. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*. 2012;75(3):311-35.
31. Saklani A, Kutty SK. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*. 2008;13(3/4):161-71.
32. Carvalho AC, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JP. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18(2).
33. Manfio JL, Junior LB. DESAFIOS DO DESENVOLVIMENTO DOS DOSSIÊS DE REGISTRO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*. 2017;21(1):47-52.
34. Hellström A, Nilsson C, Nilsson A, Fagerström C. Leg ulcers in older people: a national study addressing variation in diagnosis, pain and sleep disturbance. *BMC geriatrics*. 2016;16(25):1-9.
35. Monteiro-Soares M, Boyko E, Ribeiro J, Ribeiro I, Dinis-Ribeiro M. Risk stratification systems for diabetic foot ulcers: a systematic review. *Diabetologia*. 2011;54(5):1190-9.
36. Rodgers A, Ezzati M, Vander Hoorn S, Lopez AD, Lin R-B, Murray CJ. Distribution of Major Health Risks: Findings from the Global Burden of Disease Study. *Plos Medicine*. 2004;1(1):e27.
37. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444:860-7.
38. Canello R, Clement K. Review article: Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2006;113(10):1141-7.
39. Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(6):2111-7.
40. Kasper DL, Fauci AS. *Doenças Infecciosas de Harrison*. 2ª ed. AMGH, editor. Porto Alegre-RS. 2015.
41. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75-81.

42. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews*. 2003;83(3):835-70.
43. Epstein FH, Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*. 1999;341(10):738-46.
44. Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery B. *Journal of Controlled Release*. 2004;100:5-28.
45. Saraf S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*. 2010;81(7):680-9.
46. WHO. WHO. World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023. 2014.
47. George P. Concerns regarding the safety and toxicity of medicinal plants-An overview. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2011;1(6):40-4.
48. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 4, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. *Diário Oficial da União (DOU)*, Brasília, 20 de maio de (2014).
49. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 26 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. *Diário Oficial da União (DOU)*, Brasília, 14 de maio de (2014).
50. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 17 de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. *Diário Oficial da União (DOU)*, Brasília, 19 de abr 2010 Brasília, 2010.
51. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 69 de 08 de dezembro de 2014. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos. *Diário Oficial da União (DOU)*, Brasília, 09 de dez de 2014.
- .
52. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 1 de 29 de julho de 2005. Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. *Diário Oficial da União (DOU)*, Brasília, 01 de agosto de 2005. Brasília; 2005.
53. Mishra BB, Tiwari VK. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European journal of medicinal chemistry*. 2011;46(10):4769-807.

54. Nabi NG, Shrivastava M. Endangered Medicinal Plant *Psoralea corylifolia*: Traditional, Phytochemical, Therapeutic Properties and Micropropagation. UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences. 2017;5(1):40-6.
55. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Memento Fitoterápico. Farmacopéia Brasileira. 1. ed. Brasília, DF: . In: ANVISA, editor. 2016. p. 115.
56. Mittermeier RA, Myers N, Thomsen JB, Da Fonseca GA, Olivieri S. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. Conservation biology. 1998;12(3):516-20.
57. Panizza S, Veiga RdS, Almeida Md. Uso tradicional de plantas medicinais e fitoterápicos 2012.
58. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine. 2006;27:1-93.
59. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2012. p. 156.
60. Marques LC, Souza CM. Pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos: relatos de experiência em indústria farmacêutica nacional. Revista Fitos Eletrônica. 2013;7(01):50-66.
61. Ahn K. The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. BMB Rep. 2017;50(3):111-6.
62. Srivastava JK, Shankar E, Gupta S. Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future (Review). Molecular medicine reports. 2010;3(6):895-901.
63. R de Lima C, Silva JH, Lyra M, Araújo AV, Arruda VM, Dimech GS, et al. Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico sanativo®. Acta Farmacéutica Bonaerense. 2006;25(4):544-9.
64. Almeida L, Floriano J, Ribeiro T, Magno L, da Mota L, Peixoto N, et al. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. Journal of materials science Materials in medicine. 2014;25(9):2153.
65. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Guia para a condução de estudos não-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2. . Brasília-DF. 2013.
66. Estevinho BN, Rocha F, Santos L, Alves A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications—A review. Trends in Food Science & Technology. 2013;31(2):138-55.
67. Andreo Filho N, de Oliveira AG. Sistemas de Micro/Nanoencapsulação de fármacos. Infarma-Ciências Farmacêuticas. 1999;9(1/5):18-21.

68. Suave J, Dall'Agnol E, Pezzin A, Silva D, Meier M, Soldi V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal*. 2006;7(2):12-20.
69. Ahmed TA, Aljaeid BM. Preparation, characterization, and potential application of chitosan, chitosan derivatives, and chitosan metal nanoparticles in pharmaceutical drug delivery. *Drug design, development and therapy*. 2016;10:483-507.
70. Quirós-Sauceda AE, Ayala-Zavala JF, Olivas GI, González-Aguilar GA. Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. *Journal of food science and technology*. 2014;51(9):1674-85.
71. Sinha V, Singla A, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004;274:1-33.
72. Acosta N, Sánchez E, Calderón L, Cordoba-Diaz M, Cordoba-Diaz D, Dom S, et al. Physical Stability Studies of Semi-Solid Formulations from Natural Compounds Loaded with Chitosan Microspheres. *Mar Drugs*. 2015;13:5901-19.
73. Fang Z, Bhandari B. Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2010;21(10):510-23.
74. Harris R, Lecumberri E, Mateos-Aparicio I, Mengíbar M, Heras A. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*. 2011;84(2):803-6.
75. Oliveira OW, Petrovick PR. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista brasileira de farmacognosia* 2010;20(4):641-50.
76. Martín Á, Varona S, Navarrete A, Cocero MJ. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. *The Open Chemical Engineering Journal*. 2010;4(1):31-41.
77. Akash MSH, Rehman K, Sun H, Chen S. Assessment of release kinetics, stability and polymer interaction of poloxamer 407-based thermosensitive gel of interleukin-1 receptor antagonist. *Pharm Dev Technol*. 2014;19(3):278-84.
78. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharmaceutical research*. 2006;23(12):2709-28.
79. Ricci E, Lunardi L, Nanclares D, Marchetti J. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;288(2):235-44.
80. Boddu SH, Alsaab H, Umar S, Bonam SP, Gupta H, Ahmed S. Anti-inflammatory effects of a novel ricinoleic acid poloxamer gel system for transdermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;479:207-11.

81. Chitra K, Manikandan A, Arul Antony S. Effect of Poloxamer on Zingiber Officinale Extracted Green Synthesis and Antibacterial Studies of Silver Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2016;16(1):758-64.
82. Thakur L, Ghodasra U, Patel N, Dabhi M. Novel approaches for stability improvement in natural medicines. *Pharmacognosy reviews*. 2011;5(9):48.
83. Devi VK, Jain N, Valli KS. Importance of novel drug delivery systems in herbal medicines. *Pharmacognosy reviews*. 2010;4(7):27.
84. Schmaltz C, Guterres SS. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade deste pequeno grande recurso. *Infarma Ciências Farmacêuticas*. 2005;16(13-14):80-5.
85. de Oliveira AG, Scarpa MV, Correa MA, Cera LFR, Formariz TP. MICROEMULSÕES: ESTRUTURA E APLICAÇÕES COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS. *Quim Nova*. 2004;27(1):131-8.
86. Gutiérrez J, González C, Maestro A, Solè I, Pey C, Nolla J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2008;13:245-51.
87. Kaji M, Fujiwara S, Sakai K, Sakai H. Characterization of O/W Emulsions Prepared by PEG-Diisostearate Amphiphilic Random Copolymer. *Journal of oleo science*. 2017;66(10):1121-8.
88. Segre JA. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *The Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(5):1150-8.
89. TORTORA GRF, BERDELL. R.; CASE, CHRISTINE. L. *Microbiologia*. 8ª ed. Artmed, editor. Porto Alegre, 2005.
90. Peyrefitte G, Martini M-C, Chivot M, de Souza Cruz JRA. *Estética-cosmética: cosmetologia, biologia geral, biologia da pele*. Andrei, editor. São Paulo: Organização Andrei; 1998. 507 p.
91. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. *Drug Target Insights*. 2007;2:147-57.
92. Gratieri T, Gelfuso GM, Lopez RFV. PRINCÍPIOS BÁSICOS E APLICAÇÃO DA IONTOFORESE NA PENETRAÇÃO CUTÂNEA DE FÁRMACOS. *Quim Nova*. 2008;31(6):1490-8.
93. Jain A, Jain P, Kurmi J, Jain D, Jain R, Chandel S, et al. Novel Strategies for Effective Transdermal Drug Delivery: A Review. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2014;31(3):219-72.
94. Guyton AC, Hall JE, Guyton AC. *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil; 2006.

95. Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R. *Farmacologia*. 6ª edição. Rio de Janeiro 2007. 829 p.
96. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science* (New York, NY). 2009;326(5960):1694.
97. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science*. 2009;324(5931):1190-2.
98. Maity N, Nema NK, Sarkar BK, Mukherjee PK. Standardized *Clitoria ternatea* leaf extract as hyaluronidase, elastase and matrix-metalloproteinase-1 inhibitor. *Indian journal of pharmacology*. 2012;44(5):584-7.
99. Luo JC, Shin VY, Liu ES, Yi NY, Wu WK, So WH, et al. Dexamethasone delays ulcer healing by inhibition of angiogenesis in rat stomachs. *European journal of pharmacology*. 2004;485(1):275-81.
100. Veras HN, Araruna MK, Costa JG, Coutinho HD, Kerntopf MR, Botelho MA, et al. Topical Antiinflammatory Activity of Essential Oil of *Lippia sidoides* Cham: Possible Mechanism of Action. *PHYTOTHERAPY RESEARCH*. 2013;27(2):179-85.
101. Oliveira RB, Chagas-Paula DA, Secatto A, Gasparoto TH, Faccioli LH, Campanelli AP, et al. Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2013;23(3):497-505.
102. Morikawa T, Matsuda H, Yoshikawa M. A Review of Anti-inflammatory Terpenoids from the Incense Gum Resins Frankincense and Myrrh. *J Oleo Sci*. 2017;66(8):805-14.
103. Findley K, Grice E. The Skin Microbiome: A Focus on Pathogens. *Plos Pathogens*. 2014;10(11):1-3.
104. Silva N, Fernandes Júnior A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2010;16(3):403.
105. Charde Y, Sharma P, Choudhary N, Avari J. Development and Evaluation of Herbal Formulation for the Treatment of Acne. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2014;5(6):2250.
106. Augustin M, Goepel L, Jacobi A, Bosse B, Mueller S, Hopp M. Efficacy and tolerability of liposomal polyvinylpyrrolidone-iodine hydrogel for the localized treatment of chronic infective, inflammatory, dermatoses: an uncontrolled pilot study. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2017;22(10):373-84.
107. Gautam R, Jachak SM. Recent developments in antiinflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*. 2009;29:767-820.

108. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.

126p.

109. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*. 2007;30(2):374.

110. Patel Manish A, Patel Paras K, Chate Bharat S. HERBAL PLANTS: AS SOURCE OF ANTI-MICROBIAL COMPOUNDS. *PharmacologyOnline*. 2010;2:401-11.

111. Velasco V, Williams P. Improving meat quality through natural antioxidants. *Chilean journal of agricultural research*. 2011;71(2):313-22.

112. Ramyaa P, Padma VV. Quercetin modulates OTA-induced oxidative stress and redox signalling in HepG2 cells—up regulation of Nrf2 expression and down regulation of NF- κ B and COX-2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2014;1840(1):681-92.

113. Siani AC, Souza MC, Henriques MG, Ramos MF. Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava*. *Pharmaceutical Biology*. 2013:1-7.

114. Bhuiyan MNI, Begum J, Nandi NC, Akter F. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzygium caryophyllatum* (L.) Alston). *African Journal of Plant Science*. 2010;4(11):451-4.

115. Gowri SS, Vasantha K. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.)(Myrtaceae) leaves extracts. *International Journal of PharmTech Research*. 2010;2(2):1569-73.

116. Ogunwande I, Olawore N, Ekundayo O, Walker T, Schmidt J, Setzer W. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *International journal of Aromatherapy*. 2005;15(3):147-52.

117. Jabri M, Marzouki L, Sebai H. Ethnobotanical, phytochemical and therapeutic effects of *Myrtus communis* L. berries seeds on gastrointestinal tract diseases: a review. *Archives of physiology and biochemistry*. 2018;5:1-7.

118. Betoni JEC, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Junior AF. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2006;101(4):387-90.

119. Rodrigues CG, Ferreira PRB, Oliveira CS, Mendes RRJ, Valériol HM, Brandi IV, et al. Antibacterial activity of tannins from *Psidium guineense* Sw.(Myrtaceae). *Journal of Medicinal Plant Research*. 2014;8(35):1095.

120. Djipa CD, Delmée M, Quetin-Leclercq J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2000;71(1):307-13.

121. KOZŁOWSKA M, Laudy AE, PRZYBYŁ J, ZIARNO M, Majewska E. CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SOME MEDICINAL PLANTS FROM LAMIACEAE FAMILY. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014;72(4):757-67.
122. Haslam E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J Nat Prod*. 1996;59:205-15.
123. SCALBERT A. ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF TANNINS. *Phychemistry*. 1991;12(30):3875-83.
124. Carvalho AA, Galdino PM, Nascimento MV, Kato MJ, Valadares MC, Cunha LC, et al. Antinociceptive and Antiinflammatory Activities of Grandisin extracted from *Virola surinamensis*. *Phytother Res*. 2010;24:113-8.
125. Guzzo LS, Saúde-Guimarães D, Silva A, Lombardi J, Guimarães H, Grabe-Guimarães A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. *Journal of ethnopharmacology*. 2008;116(1):120-4.
126. Victoria FN, Lenardão EJ, Savegnago L, Perin G, Jacob RG, Alves D, et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. *Food and chemical toxicology*. 2012;50(8):2668-74.
127. Bader A, Martini F, Schinella GR, Rios JL, Prieto JM. Modulation of Cox-1, 5-, 12-and 15-Lox by Popular Herbal Remedies Used in Southern Italy Against Psoriasis and Other Skin Diseases. *Phytotherapy Research*. 2014;29(1):108-13.
128. Romanelli M, Macchia M, Panduri S, Paggi B, Saponati G, Dini V. Clinical evaluation of the efficacy and safety of a medical device in various forms containing *Triticum vulgare* for the treatment of venous leg ulcers—a randomized pilot study. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:2787.
129. Kim B-H, Oh I, Kim J-H, Jeon J-e, Jeon B, Shin J, et al. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Astragalus sinicus* L. in cytokine-induced keratinocytes and skin. *Experimental & Molecular Medicine*. 2014;46:e87.
130. Locher C, Burch M, Mower H, Berestecky J, Davis H, Van Poel B, et al. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*. 1995;49(1):23-32.
131. Wölfle U, Seelinger G, Schempp CM. Topical application of St. John's wort. *Planta Med*. 2014;80:109-20.
132. Reuter J, Merfort I, Wölfle U, Seelinger G, Schempp CM. Botanicals in Dermatology and Skin Health. *Botanical Medicine* 2009:33-65
133. Patwardhan J, Bhatt P. Ultraviolet-B protective effect of flavonoids from *Eugenia caryophyllata* on human dermal fibroblast cells. *Pharmacognosy Magazine*. 2015;11(44):397.

134. Zokti JA, Sham Baharin B, Mohammed AS, Abas F. Green tea leaves extract: microencapsulation, physicochemical and storage stability study. *Molecules*. 2016;21(8):940-.
135. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Farmacopeia Brasileira: monografias. Fundação Oswaldo Cruz. Brasília, 2010.
136. WHO - World Health Organization
monographs on selected medicinal plants. Geneva: World Health Organization, v.2. 2002.
137. Magina MD, Dalmarco EM, Wisniewski Jr A, Simionatto EL, Dalmarco JB, Pizzolatti MG, et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. *Journal of natural medicines*. 2009;63(3):345-50.
138. Amorim ACL, Lima CKF, Hovell AMC, Miranda ALP, Rezende CM. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L.(Brazilian Pitanga). *Phytomedicine*. 2009;16(10):923-8.
139. Brito MAd, Pereira EBC, Pereira AV, Ribeiro JF. Cagaita: Biologia e manejo. Agropecuária-EMBRAPA-CPAC EBdP, editor. Planaltina-DF2003.
140. Duarte AR, Naves RR, Santos SC, Seraphinc JC, Ferri PH. Seasonal Influence on the Essential Oil Variability of *Eugenia dysenterica*. *J Braz Chem Soc*. 2009;20(5):967-74.
141. Almeida S, Silva J, Ribeiro J. Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá. EMBRAPA-CPAC EBdPA, editor. Planaltina-DF1987.
142. Oliveira VB, Yamada LT, Fagg CW, Brandão MG. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Research International*. 2012;48(1):170-9.
143. TROPICOS. Missouri Botanical Garden. *Eugenia dysenterica*. Disponível em: <http://tropicos.org/> . Acesso em: 17/04/2015
144. Godinho CS, da Silva MC, Mendes CSO, Ferreira PRB, de Oliveira DA. Estudo fitoquímico de espécies arbóreas do cerrado. *Revista Multitexto*. 2015;3(2):64-70.
145. Ávila RId, Mattos Alvarenga CB, Ávila PHMd, Moreira RC, Arruda AF, Fernandes TdO, et al. *Eugenia dysenterica* DC.(Myrtaceae) exerts chemopreventive effects against hexavalent chromium-induced damage in vitro and in vivo. *Pharmaceutical biology*. 2016;54(11):2652-63.
146. Vitek R, de Novais L, Torquato H, Paredes-Gamero E, de Carvalho M, de Sousa Jr P, et al. Chemical constituents and antileukemic activity of *Eugenia dysenterica*. *Natural product research*. 2017;31(16):1930-4.

147. Couto RO, Valgas AV, Bara MTF, Paula JR. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* dc.(Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2009;6(3):59-69.
148. Prado L, Silva D, de Oliveira-Silva G, Hiraki K, Canabrava H, Bispo-da-Silva L. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2014;37(5):722.
149. Zorzin F, Silva S, Freitas M, Coppini R, Souza P, Silveira D, et al. VALIDATION OF THE ANALYTICAL METHOD BY HPLC FOR DETERMINATION OF CATECHIN IN *EUGENIA DYSENTERICA* DC. DRY AQUEOUS EXTRACT: A BRAZILIAN SAVANNAH NATIVE PLANT. *PharmacologyOnLine*. 2015;2:100-7.
150. Ferreira-Nunes R, Angelo T, Silva SMM, Magalhães PO, Gratieri T, Cunha-Filho MSS, et al. Versatile chromatographic method for catechin determination in development of topical formulations containing natural extracts. *Biomedical Chromatography*. 2017.
151. Gasca CA, Castillo WO, Takahashi CS, Fagg CW, Magalhães PO, Fonseca-Bazzo YM, et al. Assessment of anti-cholinesterase activity and cytotoxicity of cagaita (*Eugenia dysenterica*) leaves. *Food and Chemical Toxicology*. 2017;109(2):996-1002.
152. Takaoa L, Imatomib M, Gualtieria S. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). *Braz J Biol*. 2015;75(4):948-52.
153. Gasca CA, Chaves M, Fagg CW, e Magalhães PdO, Fonseca-Bazzo YM, Silveira D. Pentacyclic triterpenes from leaves of Cagaita (*Eugenia dysenterica*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 2017;7(07):051-4.
154. Feitosa CM, dos Reis Barbosa A, de Melo CHS, Freitas RM, do Nascimento Fontes JE, Costa EV, et al. Antioxidant and anticholinesterase activities of the essential oil of *Eugenia dysenterica* DC. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2017;11(19):241-9.
155. Galheigo MRU, Prado LCdS, Mundin AMM, Gomes DO, Chang R, Lima AMC, et al. Antidiarrhoeic effect of *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaf essential oil. *Natural product research*. 2016;30(10):1182-5.
156. Vilela EC, Carvalho TC, Duarte AR, Naves RR, Santos SC, Seraphinc JC, et al. Spatial Structure of *Eugenia dysenterica* Based on Essential Oil Chemovariations and Implications for Conservation and Management of the Genetic Diversity of its Populations. *J Braz Chem Soc*. 2012;23(10):1776-82.
157. Lima T, Silva O, Oliveira J, Vasconcelos I, Scalabrin F, Rocha T, et al. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: A novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. *Peptides*. 2010;31:1426-33.

158. Lima T, Silva O, Silva L, Rocha T, Grossi-de-Sá M, Franco O, et al. In Vivo Effects of Cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) Leaf Extracts on Diarrhea Treatment. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*. 2011;2011:10.
159. Roesler R, Lorencini M, Pastore G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2010;30(3):814-21.
160. Gonçalves AEdSS, Lajolo FM. Chemical Composition and Antioxidant/Antidiabetic Potential of Brazilian Native Fruits and Commercial Frozen Pulps. *J Agric Food Chem*. 2010;58(8):4666-74.
161. de Moraes Cardoso L, Martino HSD, Moreira AVB, Ribeiro SMR, Pinheiro-Sant'Ana HM. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. *Food research international*. 2011;44(7):2151-4.
162. Roesler R, Gomes MALTA L, Carrasco LC, Barata HOLANDA R, Socorro SOUSA CA, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2007;27:56-60.
163. Souza PMd, Sales PMd, Simeoni LA, Silva EC, Silveira D, Magalhães PO. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. *Planta medica*. 2012;78(4):393-9.
164. Donado-Pestana CM, dos Santos-Donado PR, Daza LD, Belchior T, Festuccia WT, Genovese MI. Cagaita fruit (*Eugenia dysenterica* DC.) and obesity: Role of polyphenols on already established obesity. *Food Research International*. 2018;103:40-7.
165. Fonseca RC, Souza NAd, Correa TCL, Garcia LF, Reis LGVd, Rodriguez AG. Assessment of toxic potential of Cerrado fruit seeds using *Artemia salina* bioassay. *Food Science and Technology (Campinas)*. 2013;33(2):251-6.
166. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 1, de 19 de janeiro de 2015. Dispõe sobre a alteração da RDC 64/2012, pela inclusão e retificação de Denominações Comuns Brasileiras - DBC, na lista completa das DBC da Anvisa. *Diário Oficial da União (DOU)*, Brasília, 20 de jan de (2015).
167. Oliveira DL. Viabilidade Econômica de Algumas Espécies Medicinais Nativas do Cerrado. *Estudos*. 2011;38(2):301-32.
168. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. *Farmacopeia Brasileira: Métodos Gerais*. Fundação Oswaldo Cruz. 5ª ed. Brasília, 2010.
169. Zorzini FM. Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica*. Brasília-DF: Universidade de Brasília; 2014.

170. Nogueira A, ; Souza, G. B. Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos. São Carlos. Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 334 p.

171. Adams R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th ed ed. Allured: Carol Stream.2007.

172. Rossi F, Andreazzi DB. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu; 2005.

173. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003., (2003).

174. NCCLS. NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. 2003.

175. Alves EG, Vinholis AHC, Casemiro LA. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. Quim Nova. 2008;31(5):1224-9.

176. Aguiar JS, Costa MC, Nascimento SC, Sena KX. Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia. 2008;18(3):436-40.

177. Eloff J. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta medica. 1998;64(8):711-3.

178. Zgoda J, Porter J. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. Pharmaceutical Biology. 2001;39(3):221-5.

179. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory

Standards Institute.

, (2012).

180. Stoppa MA, Casemiro LA, Vinholis AHC, Cunha WR, Silva MLA, Martins CHG, et al. Comparative study of the recommended methodologies by CLSI and EUCAST for activity evaluation antifungal. Química Nova. 2009;32(2):498-502.

181. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. Journal of Ethnopharmacology. 2006;106:290-302.

182. Hansen M, Nielsen S, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods*. 1989;119(2):203.
183. Berridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*. 1996;4(14):9.
184. Green LC, De Luzuriaga KR, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981;78(12):7764-8.
185. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature protocols*. 2007;2(2):329-33.
186. Luepke N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology*. 1985;23(2):287-91.
187. Melo-Reis P, Andrade L, Silva C, Araújo L, Pereira M, Mrue F, et al. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. *Braz J Biol*. 2010;70(1):189-94.
188. Ribatti D, Nico B, Vacca A, Presta M. The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay. *Nature Protocols*. 2006;1(1):891.
189. Amarin M, Paula JPd, Silva RZd, Farago PV, Budel JM. Pharmacobotanical study of the leaf and stem of *Mikania lanuginosa* for its quality control. *Rev bras farmacogn*. 2014;24(5):531-7.
190. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Consolidado de normas da COFID (Versão V). In: (Anvisa). ANdVS, editor. Brasília. 2015.
191. INPI - International Plant Name Index. *Eugenia dysenterica*. Disponível em: <http://www.ipni.org/> . Acesso em: 17/04/2015.
192. Martinotto C, Paiva R, Soares F, Santos B, Nogueira R. Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.)2008. 1-21 p.
193. Esau K. Anatomia das plantas com sementes. Blucher E, editor. São Paulo1974.
194. Ernst E. Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;289:1545-52.
195. WHO. Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. Organization WH, editor. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2007.

196. Klink CA, Machado RB. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*. 2005;1(1):1-9.
197. Haridasan M. Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. *Plant and Soil*. 1982;65(2):265-73.
198. França ACMd. Levantamento florístico e características anatômicas de espécies nativas do cerrado em solos contaminados por metais pesados. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2011.
199. Caldas E, Machado L. Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil. *Food and chemical toxicology*. 2004;42(4):599-603.
200. Mousavi Z, Ziarati P, Dehaghi ME, Qomi M. Heavy Metals (Lead and Cadmium) in some Medicinal Herbal Products in Iranian Market. *Iranian Journal of Toxicology Volume*. 2014;8(24):1004-10.
201. Dospatliev L, Kostadinov K, Mihaylova G, Katrandzhiev N. Determination of heavy metals (Pb, Zn, Cd and Ni) in eggplant. *Trakia Journal of Sciences*. 2012;10(2):31-5.
202. MEMON AR, AKTOPRAKLIGİL D, ÖZDEMİR A, VERTII A. Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants. *Turkish Journal of Botany*. 2001;25(3):111-21.
203. Junior VFV, Pinto AC, Maciel MAM. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? *Quim Nova*. 2005;28(3):519-28.
204. Lione A. The prophylactic reduction of aluminium intake. *Food and Chemical Toxicology*. 1983;21(1):103-9.
205. Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisciplinary toxicology*. 2012;5(2):47-58.
206. Souza-Moreira TM, Salgado HR, Pietro RC. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2010;20(3):435-40.
207. Kneifel W, Czech E, Kopp B. Microbial Contamination of Medicinal Plants-A Review. *Planta Medica*. 2002;68(01):5-15.
208. Sreelatha S, Padma P. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant foods for human nutrition*. 2009;64(4):303-11.
209. Alves MM, Pereira AMS, Pereira PS, França SC, Bertoni BW. Caracterização química qualitativa de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada comparativa. *Scientia Plena*. 2011;7(12):1-8.
210. Tenfen A, Siebert DA, Yamanaka CN, Mendes de Córdova CM, Scharf DR, Simionatto EL, et al. Chemical composition and evaluation of the antimicrobial

activity of the essential oil from leaves of *Eugenia platysema*. Natural product research. 2016;30(17):2007-11.

211. Lago JHG, Souza ED, Mariane B, Pascon R, Vallim MA, Martins RCC, et al. Chemical and Biological Evaluation of Essential Oils from Two Species of Myrtaceae—*Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. *Molecules*. 2011;16:9827-37.

212. Salahinejad M, Aflaki F. Toxic and Essential Mineral Elements Content of Black Tea Leaves and Their Tea Infusions Consumed in Iran. *Biol Trace Elem Res*. 2010;134:109-17.

213. Jeszka-Skowron M, Krawczyk M, Zgoła-Grzeskowiak A. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015;40:70-7.

214. Almeida RPCd. Avaliação da produção de L-Asparaginase por fungos isolados do bioma Cerrado. Brasília: Universidade de Brasília; 2015.

215. Costa ES, Dolabela MF, Póvoa MM, Oliveira DJ, Müller AH. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2009;19:834-8.

216. Lima AEF, Castro EA, Ferreira DA, Abreu CMWS, Coelho EL, Sá DMAT. Rendimento, caracterização química e antibacteriana do óleo essencial de capim limão coletado em diferentes horários. *MAGISTRA*. 2017;28(3/4):369-78.

217. Fabiane KC, Ferronato R, dos Santos AC, Onofre SB. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2008;18(2):197-203.

218. Liu M, Li Y, Chou G, Cheng X, Zhang M, Wang Z. Extraction and ultra-performance liquid chromatography of hydrophilic and lipophilic bioactive components in a Chinese herb *Radix Salviae Miltiorrhizae*. *Journal of Chromatography A*. 2007;1157(1):51-5.

219. Gil EdS, Orlando R, Matias R, Serrano S. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. São Paulo-Brasil2007.

220. Li D, Martini N, Wu Z, Wen J. Development of an isocratic HPLC method for catechin quantification and its application to formulation studies. *Fitoterapia*. 2012;83(7):1267-74.

221. Zuo YC, Hao; Deng, Yiwei. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu—erh teas using HPLC with a photodiode array detector. *Talanta*. 2002;57:307-16.

222. Larayetan RA, Okoh OO, Sadimenko A, Okoh AI. Terpene constituents of the aerial parts, phenolic content, antibacterial potential, free radical scavenging and

antioxidant activity of *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels (Myrtaceae) from Eastern Cape Province of South Africa. *BMC complementary and alternative medicine*. 2017;17(1):292.

223. da Silva JKR, Andrade EHA, Barreto LH, da Silva NCF, Ribeiro AF, Montenegro RC, et al. Chemical Composition of Four Essential Oils of *Eugenia* from the Brazilian Amazon and Their Cytotoxic and Antioxidant Activity. 4. 2017;3(51).

224. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2002;97(7):1027-31.

225. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(9):4168-70.

226. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24 (ISBN 1-56238-897-5 [Print]; ISBN 1-56238-898-3 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2014., (2014).

227. de Pinhol L, Macedo PNSSE, de Almeida Ernane SAC, Martins R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Ciência Rural*. 2012;42(2):326-31.

228. Abd-Allah WE, Awad HM, AbdelMohsen MM. HPLC Analysis of Quercetin and Antimicrobial Activity of Comparative Methanol Extracts of *Shinus molle* L. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2015;4(11):550-8.

229. Gupta A, Upadhyay NK, Sawhney R, Kumar R. A poly-herbal formulation accelerates normal and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair and Regeneration*. 2008;16(6):784-90.

230. Betts JW, Sharili AS, Phee LM, Wareham DW. In Vitro Activity of Epigallocatechin Gallate and Quercetin Alone and in Combination versus Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *J Nat Prod*. 2015;78:2145-8.

231. SILVA CAG. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Eugenia dysenterica* Mart. ex. DC. Berg (Myrtaceae). Brasília-DF: Universidade de Brasília; 2016.

232. Cushnie TT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*. 2005;26(5):343-56.

233. Cushnie TT, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*. 2011;38(2):99-107.

234. Thakur P, Chawla R. Antibacterial activity of aquo-alcoholic extract of *camellia sinensis* against isolates of carbapenem resistant *Escherichia coli* and food borne

pathogens. *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*.6(8):606-16.

235. Jaberian H, Piri K, Nazari J. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. *Food chemistry*. 2013;136(1):237-44.

236. Daza LD, Fujita A, Granato D, Fávoro-Trindade CS, Genovese MI. Functional properties of encapsulated Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) fruit extract. *Food Bioscience*. 2017;18:15-21.

237. Pessini G, Holetz F, Sanches N, Cortez D, Dias Filho B, Nakamura C. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2003;13:21-4.

238. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*. 2007;18(5):414-20.

239. Machado K, Filho VC, Tessarolo M, Mallmann R, Meyre-Silva C, Bella Cruz A. Potent Antibacterial Activity of *Eugenia umbelliflora*. *Pharmaceutical biology*. 2005;43(7):636-9.

240. Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Sarker SD, Moore JE, Rao JR, et al. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *LWT-Food Science and Technology*. 2011;44(119):9e1206.

241. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005;99:69-73.

242. Costa-Lotufo L, Khan M, Ather A, Wilke D, Jimenez P, Pessoa C, et al. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of ethnopharmacology*. 2005;99(1):21-30.

243. YANG E-J, YIM E-Y, SONG G, KIM G-O, HYUN C-G. Inhibition of nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by Jeju plant extracts. *Interdisc Toxicol*. 2009;2(4):245-9.

244. Hong J, Smith T, Ho C, August D, Yang C. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase-and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochemical pharmacology*. 2001;62(9):1175-83.

245. Passos GF, Fernandes ES, da Cunha FM, Ferreira J, Pianowski LF, Campos MM, et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;110(2):323-33.

246. Medeiros R, Passos G, Vitor C, Koepp J, Mazzuco T, Pianowski L, et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the

acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology*. 2007;151:618-27.

247. Fernandes E, Passos G, Medeiros R, da Cunha F, Ferreira J, Campos M, et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European journal of pharmacology*. 2007;569(3):228-36.

248. Gertsch J, Leonti M, Raduner S, Racz I, Chen J-Z, Xie X-Q, et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(26):9099-104.

249. Cho JY, Kim HY, Kim S-K, Park JHY, Lee HJ, Chun HS. β -Caryophyllene attenuates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via modulation of gene expression associated mainly with colon inflammation. *Toxicology Reports*. 2015;2:1039-45.

250. Bento AF, Marcon R, Dutra RC, Claudino RF, Cola M, Leite DFP, et al. β -Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPAR γ pathway. *The American journal of pathology*. 2011;178(3):1153-66.

251. Ku C-M, Lin J-Y. Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using murine primary splenocytes. *Food chemistry*. 2013;141(2):1104-13.

252. Ständer S, Schmelz M, Metze D, Luger T, Rukwied R. Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. *Journal of dermatological science*. 2005;38(3):177-88.

253. Tambe Y, Tsujiuchi H, Honda G, Ikeshiro Y, Tanaka S. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, β -caryophyllene. *Planta medica*. 1996;62(05):469-70.

254. Alberti TB, Barbosa WLR, Vieira JLF, Raposo NRB, Dutra RC. Phytocannabinoid, Suppresses Motor Paralysis and Neuroinflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18:691.

255. Nam G, Jeong SK, Park BM, Lee SH, Kim HJ, Hong S-P, et al. Selective Cannabinoid Receptor-1 Agonists Regulate Mast Cell Activation in an Oxazolone-Induced Atopic Dermatitis Model. *Annals of Dermatology*. 2016;28(1):22-9.

256. Han X, Parker TL. Anti-inflammatory activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) essential oil in human dermal fibroblasts. *Pharmaceutical Biology*. 2017;55(1):1619-22.

257. Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, et al. Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules*. 2017;22(1).

258. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453(7193):314-21.

259. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46:446-75.
260. Fronza M, Heinzmann B, Hamburger M, Laufer S, Merfort I. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;126:463-7.
261. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in Dermatology*. 2007;25:9-18.
262. Khorshid F, Ali SS, Alsofyani T, Albar H. *Plectranthus tenuiflorus* (Shara) Promotes Wound Healing: In vitro and in vivo Studies. *International Journal of Botany*. 2010;6(2):69-80.
263. Sharangi A. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.)—A review. *Food Research International*. 2009;42:529-35.
264. Hsu S, Bollag WB, Lewis J, Huang Q, Singh B, Sharawy M, et al. Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003;306(1):29-34.
265. Tsala DE, Amadou D, Habtemariam S. Natural wound healing and bioactive natural products. *Phytopharmacology*. 2013;4(3):532-60.
266. Prow T, Grice J, Lin L, Faye R, Butler M, Becker W, et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*. 2011;63(6):470-91.
267. Ghayempour S, Montazer M, Mahmoudi RM. Encapsulation of Aloe Vera extract into natural Tragacanth Gum as a novel green wound healing product. *International journal of biological macromolecules*. 2016;93(Pt A):344-9.
268. Wang W, Wat E, Hui PC, Chan B, Ng FS, Kan C-W, et al. Dual-functional transdermal drug delivery system with controllable drug loading based on thermosensitive poloxamer hydrogel for atopic dermatitis treatment. *Scientific reports*. 2016;6:1-10.
269. Bongiovani MC, Konradt-Moraes LC, Bergamasco R, Lourenço BSS, Tavares CRG. Os benefícios da utilização de coagulantes naturais para a obtenção de água potável. *Acta Scientiarum Technology*. 2010;32(2):167-70.
270. Kesarwani K, Gupta R. Bioavailability enhancers of herbal origin: An overview. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2013;3(4):253-66.
271. Cevher E, Orhan Z, Mülazımoğlu L, Sensoy D, Alper M, Yıldız A, et al. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with prepared microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;317:127-35.

272. Ong TH, Chitra E, Ramamurthy S, Siddalingam RP, Yuen KH, Ambu SP, et al. Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. *PLoS ONE*. 2017;12(3):1-22.
273. Huang S, Fu X. Cell behavior on microparticles with different surface morphology. *Journal of Alloys and Compounds*. 2010;493(1):246-51.
274. Coulman SA, Anstey A, Gateley C, Morrissey A, McLoughlin P, Allender C, et al. Microneedle mediated delivery of nanoparticles into human skin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;366(190):11.
275. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 138 de 29 de maio de 2003. Estabelece a lista de grupos e indicações terapêuticas. *Diário Oficial da União (DOU)*, Brasília, 06 de janeiro de 2004. Brasília, 2003.
276. Su YL, Leung LK, Huang Y, Chen Z-Y. Stability of tea theaflavins and catechins. *Food Chemistry*. 2003;83(2):189-95.
277. Mahmood T, Akhtar N, Khan BA, Khan HMS, Saeed T. OUTCOMES OF 3% GREEN TEA EMULSION ON SKIN SEBUM PRODUCTION IN MALE VOLUNTEERS. *BOSNIAN JOURNAL OF BASIC MEDICAL SCIENCES*. 2010;10(3):260-4.
278. Scheel J, Heppenheimer A, Lehringer E, Kreutz J, Poth A, Ammann H, et al. Classification and labeling of industrial products with extreme pH by making use of in vitro methods for the assessment of skin and eye irritation and corrosion in a weight of evidence approach. *Toxicology in Vitro*. 2011;25:1435-47.
279. WILSON S, AHEARNE M, HOPKINSON A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology*. 2014;327:32-46.
280. Marques Costa C, Coli Louvise de Abreu L, Pereira dos Santos E, Augusto Franca Presgrave O, Trindade Rocha Pierucci AP, Rangel Rodrigues C, et al. Preparation and evaluation of chitosan submicroparticles containing pilocarpine for glaucoma therapy. *Current drug delivery*. 2015;12(5):491-503.
281. Contri R, Fiel L, Alnasif N, Pohlmann A, Guterres S, Schäfer-Korting M. Skin penetration and dermal tolerability of acrylic nanocapsules: influence of the surface charge and a chitosan gel used as vehicle. *International journal of pharmaceutics*. 2016;507(1):12-20.
282. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mechanisms of development*. 2016;141:70-7.
283. Atiba A, Ueno H, Uzuka Y. The effect of aloe vera oral administration on cutaneous wound healing in type 2 diabetic rats. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2011;73(5):583-9.
284. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko M, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration: official*

publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2008;16(5):585-601.

285. Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(11):1162-76.

286. Valdes T, Kreutzer D, Moussy F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *J Biomed Mater Res*. 2002;62:273-82.

287. Rojo LE, Villano CM, Joseph G, Schmidt B, Shulaev V, Shuman JL, et al. Original Contribution: Wound-healing properties of nut oil from *Pouteria lucuma*. *Journal of cosmetic dermatology*. 2010;9(3):185-95.

288. Tang L, Pan W, Zhu G, Liu Z, Lv D, Jiang M. Total flavones of *abelmoschus manihot* enhances angiogenic ability both in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2017;8(41):69768-78.

289. Meng H, Guo J, Sun J-Y, Pei J-M, Wang Y-M, Zhu M-Z, et al. Angiogenic effects of the extracts from Chinese herbs: *Angelica* and *Chuanxiong*. *The American journal of Chinese medicine*. 2008;36(03):541-54.

290. Lam HW, Lin HC, Lao SC, Gao JL, Hong SJ, Leong CW, et al. The angiogenic effects of *Angelica sinensis* extract on HUVEC in vitro and zebrafish in vivo. *Journal of cellular biochemistry*. 2008;103(1):195-211.

291. Park JY, Lee D-S, Kim C-E, Shin M-S, Seo C-S, Shin H-K, et al. Effects of fermented black ginseng on wound healing mediated by angiogenesis through the mitogen-activated protein kinase pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of Ginseng Research*. 2017:1-8.

292. Perini JA, Angeli-Gamba T, Alessandra-Perini J, Ferreira LC, Nasciutti LE, Machado DE. Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2015;15(203):1-8.

293. Chaves JS, Leal PC, Pianowisky L, Calixto JB. Pharmacokinetics and tissue distribution of the sesquiterpene α -humulene in mice. *Planta medica*. 2008;74(14):1678-83.

294. Qing C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese Journal of Traumatology*. 2017;20:189e93.

295. Masmoudi H, Le Dréau Y, Piccerelle P, Kister J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *International journal of pharmaceutics*. 2005;289(1-2):117-31.

296. Khan J, Alexander A, Saraf S, Saraf S. Recent advances and future prospects of phyto-phospholipid complexation technique for improving pharmacokinetic profile of plant actives. *Journal of controlled release*. 2013;168(1):50-60.

297. Lorevice MV, Moura MRd, Mattoso LH. Nanocomposite of papaya puree and chitosan nanoparticles for application in packaging. *Química Nova*. 2014;37(6):931-6.
298. Coneac G, Vlaia V, Olariu I, Muț AM, Anghel DF, Ilie C, et al. Development and Evaluation of New Microemulsion-Based Hydrogel Formulations for Topical Delivery of Fluconazole. *AAPS PharmSciTech*. 2015;16(4):889-904.
299. Pires CA, Santos MALd, Oliveira BFd, Souza CRd, Belarmino LNM, Martins MF. Infecções bacterianas primárias da pele: perfil dos casos atendidos em um serviço de dermatologia na Região Amazônica, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 2015;6(2):45-50.
300. SILVA L, LOPES P, MONTEIRO M, MACEDO H. Importância do uso de plantas medicinais nos processos de xerose, fissuras e cicatrização na diabetes mellitus. *Rev bras plantas med*. 2015;17(4, supl. 1):827-35.
301. Papanas N, Maltezos E. Polyherbal formulation as a therapeutic option to improve wound healing in the diabetic foot. *The Indian journal of medical research*. 2011;134(2):146.
302. Viswanathan V, Kesavan R, Kavitha K, Kumpatla S. A pilot study on the effects of a polyherbal formulation cream on diabetic foot ulcers. *Indian J Med Res*. 2011;134:168-73.
303. Marinho PC, Neto-Ferreira R, José de Carvalho J. Evaluation of therapeutic intervention with a natural product in Cutaneous wound healing: The use of capybara oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013:10.
304. LIMA TB. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DA CAGAITA (*EUGENIA DYSENTERICA*, DC) PARA COMPOSTOS LAXATIVOS E ANTIDIARRÉICOS: Universidade Católica de Brasília; 2007.
305. Sen C, Gordillo G, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt T, et al. Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*. 2009;17(6):763-71.
306. Eming S, Wynn T, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science (New York, NY)*. 2017;356(6342):1026-30.
307. Demyanenko IA, Zakharova VV, Ilyinskaya OP, Vasilieva TV, Fedorov AV, Manskikh VN, et al. Mitochondria-Targeted Antioxidant SkQ1 Improves Dermal Wound Healing in Genetically Diabetic Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:10.
308. Clementino SE, Garcia RS, Moreira C, Pagliarini BA, Cabral RB, Silveira D, et al. Voltammetric and spectrophotometric determination of antioxidant activity of *Eugenia dysenterica* DC leaves extracts. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2016;29(2):535-40.