



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI  
CAMPUS MINISTRO PETRÔNIO PORTELA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
TECNOLOGIAS APLICADAS A ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL

JAMILLY ÉRICA SOUSA CAMPELO

**TOXICIDADE AGUDA E EFEITO CICATRIZANTE DO ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO ELÁGICO E  
ASSOCIAÇÃO EM FORMULAÇÃO DE USO TÓPICO**

JAMILLY ÉRICA SOUSA CAMPELO

**TOXICIDADE AGUDA E EFEITO CICATRIZANTE DO ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO ELÁGICO E ASSOCIAÇÃO EM FORMULAÇÃO DE USO TÓPICO**

Tese submetida ao Programa de Pós- Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor (a) em Medicina Veterinária.

**Orientador:** Amilton Paulo Raposo Costa

TERESINA, PI

2023

## FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial CCA  
Serviço de Representação da Informação

C193t Campelo, Jamilly Érica Sousa.  
Toxicidade aguda e efeito cicatrizante do ácido gálico, ácido elágico e associação em formulação de uso tópico / Jamilly Érica Sousa Campelo. -- 2023.  
78 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional - Teresina, 2023.  
“Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Rapouso Costa.”

1. Poloxamer. 2. Segurança farmacológica. 3. Lesão de pele. 4. Toxicidade. 5. Cicatrização - feridas. I. Costa, Amilton Paulo Rapouso. II. Título.

CDD 615.1

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

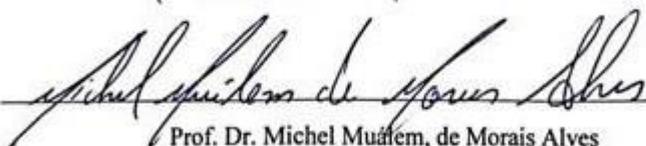
**TOXICIDADE AGUDA E EFEITO CICATRIZANTE DO ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO ELÁGICO E ASSOCIAÇÃO EM FORMULAÇÃO DE USO TÓPICO**

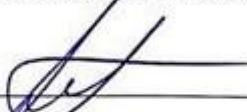
Tese aprovada em: 01/08/2023

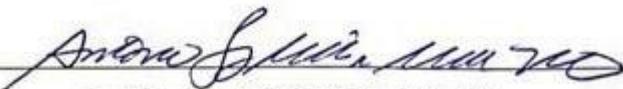
JAMILLY ERICA SOUSA CAMPELO

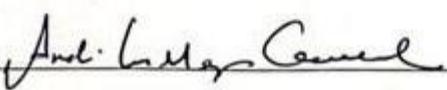
BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa  
(Presidente / Orientador) / DMV/ CCA / UFPI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Michel Muafem, de Morais Alves  
(Examinador interno) // DMV/ CCA / UFPI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Francisco, das Chagas Araújo Sousa  
(Examinador externo / UESPI)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antonio Luis Martins Maia Filho  
(Examinador externo) UESPI

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho  
(Examinador externo) UESPI

## AGRADECIMENTOS

*Quero começar meus agradecimentos dizendo que não foi fácil; o caminho foi longo e com bastante desafios. No entanto, também quero dizer que durante essa caminhada eu tive apoio de todas as formas. Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me dar força a cada oração realizada. À minha querida mãe, Maria das Dores de Sousa Campelo, a quem amo tanto e que sempre me apoiou e deu forças para alcançar meus objetivos. Se eu conseguir ser um décimo do que é essa mulher é, estarei feliz. Ao meu querido pai, José Adaide Campelo da Silva (in memoriam), que mesmo não estando presente fisicamente, sei que de onde estiver, está torcendo por mim. Aos meus irmãos, Jakelinne e Jardson, por sempre vibrarem a cada conquista minha, e aos meus sobrinhos Alcides, Sophia e Ana Alice, que também são minha afilhada, e ao José que nos deixa ansiosos esperando a sua chegada. Como vocês me deixam alegre, amo vocês. Quero agradecer aos meus amigos, mas, em especial, ao Tiago e à Lisiane por todo carinho e apoio. Sou grata pela amizade de vocês, amo vocês. Ao meu noivo Vinicius, sempre que me animava e não me deixava fraquejar durante essa jornada, amo você. Ao professor Amilton Paulo Raposo Costa, que me acompanhou por longos anos acadêmicos e me ensinou a ter mais paciência e saber lidar com as situações de maneira mais serena. Obrigada, professor, por todos os ensinamentos. Ao professor Michel Muálem de Moraes Alves, por me mostrar uma luz no fim do túnel, e ao professor André Luis Menezes Carvalho por me apoiar no desenvolvimento da nossa formulação. Aprendi muito com vocês. A toda equipe do LADERMO, em especial ao Matheus, que me ajudou bastante durante essa etapa. A toda a equipe do LAFMOL, meu muito obrigada. À Silvéria, que sempre me ajudou quando mais precisei, e à Sara por sua colaboração. Vocês foram muito importantes e se tornaram amigos. Ao professor Antônio Luiz Martins Maia Filho, pela parceria e às alunas de IC da UESPI, Vitória e Érica. Agradeço ao meu amor de quatro patas, meu Ralf, que me deu muito apoio emocional, e a Alice e Marley. Amo vocês. Aos animais de laboratório que contribuíram para que nossa pesquisa fosse finalizada. Em fim, agradeço a mim por não ter desistido, por ter lutado e vencido a cada desafio que surgia. Obrigada!*

*"Lembre-se sempre: você é mais corajoso do que acredita, mais forte do que parece e mais inteligente do que pensa."*

Christopher Robin (personagem de A.A. Milne)

CAMPELO, J.; E.; S. **TOXICIDADE AGUDA E EFEITO CICATRIZANTE DO ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO ELÁGICO E ASSOCIAÇÃO EM FORMULAÇÃO DE USO TÓPICO**. 2023.78f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas à Animais de Interesse Regional, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2023.

## RESUMO

O ácido gálico (AG) e o ácido elágico (AE) têm despertado grande interesse para a pesquisa, devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, o que os torna candidatos promissores no desenvolvimento de terapias para acelerar a cicatrização cutânea. Para avaliar essa possibilidade, foram desenvolvidas formulações de uso tópico, em que foi usado o gel de Poloxamer 407®. Visando avaliar, além dos efeitos individuais, o efeito de associação foram preparados géis com AG, AE e AG+AE. Foram então avaliadas as propriedades dos géis, incluindo os efeitos do ciclo gelo-degelo, que revelou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do pH, na maioria das amostras, incluindo o veículo (gel sem fármaco) e o gel contendo os dois fármacos, no entanto, nenhuma amostra apresentou variação fora da faixa de pH normal para a pele, com valores variando de 4,8 a 6,0. Quanto à condutividade elétrica, as formulações AG, AE e AG+AE apresentaram redução ( $p < 0,05$ ) após o ciclo de congelamento-descongelamento. Em relação ao teor, a quantidade de fármaco nas formulações variou após o ciclo de congelamento-descongelamento ( $p < 0,05$ ), nas seguintes percentagens de 95,86% a 101,35% inicialmente, passou para 91,30% a 101,51%. No teste de liberação dos fármacos, o ácido gálico (3%) – liberou 92,58% em apenas 1,5 hora; ácido elágico a 3% – liberou 51,60% após 6 horas; ácido gálico (na associação ao elágico) (1,5%) – liberou 99,91% em apenas 2 horas; ácido elágico (associado ao gálico) (1,5%) – liberou 57,06% após 6 horas. O ácido gálico apresentou a maior quantidade liberada, seguido pela associação de ácido gálico e ácido elágico, e por último, o ácido elágico em 6 horas. Na avaliação da toxicidade aguda, foram utilizadas larvas de *Zophobas morio* na avaliação da dose letal para 50% dos animais (DL 50), foi observado, para o AG, uma DL50 de 2191,51 mg/Kg em 48 horas, quanto ao percentual de sobrevivência, foi observado que o grupo tratado com AG apresentou uma menor taxa de sobrevivência das larvas (40%), na formulação a 3000 mg/Kg. Na avaliação dos biomarcadores, não houve alteração nas concentrações de glutatona e catalase, porém observou-se redução significativa na melanina nos grupos tratados com as concentrações de 30 mg/Kg do AG, 3mg/Kg do AE e 3, 300,3000 mg/Kg do AG+AE dos fármacos puros, assim como nas concentrações de 300 e 3000 mg/Kg de AG+AE incorporados ao gel, além das concentrações de 3 e 30mg/Kg de AG+AE. Quanto ao efeito cicatrizante, com base na avaliação por fotogrametria digital, verificou-se uma aceleração significativa na cicatrização em grupos tratados com ácido elágico (AE 3%) e ácido gálico associado ao ácido elágico (AG 1,5%+AE1,5%). Ao longo do tratamento, houve uma regressão progressiva das

**CAMPELO, J.; E.; S. TOXICIDADE AGUDA E EFEITO CICATRIZANTE DO ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO ELÁGICO E ASSOCIAÇÃO EM FORMULAÇÃO DE USO TÓPICO.** 2023.78f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas à Animais de Interesse Regional, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2023.

feridas nos grupos tratados com AE e AG+AE, sendo que, aos 21 dias, a associação dos ácidos demonstrou ser mais eficaz na promoção da regressão das feridas. Assim, os géis tópicos contendo ácido gálico, ácido elágico e sua associação demonstram uma notável capacidade de liberação dos fármacos, efeito protetor contra o estresse celular e efeito cicatrizante significativo. Portanto, esses compostos mostram-se como importantes princípios ativos para o desenvolvimento de terapias tópicas voltadas à cicatrização de feridas.

Palavras-chave: Efeito de associação, formulação tópica, Poloxamer, uso tópico, lesão de pele, segurança farmacológica, estudo experimental.

CAMPELO, J.; E.; S. **TOXICIDADE AGUDA E EFEITO CICATRIZANTE DO ÁCIDO GÁLICO, ÁCIDO ELÁGICO E ASSOCIAÇÃO EM FORMULAÇÃO DE USO TÓPICO**. 2023.78f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas à Animais de Interesse Regional, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2023.

### ABSTRACT

Gallic acid (GA) and ellagic acid (EA) have attracted great interest in research, due to their antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties, which make them promising candidates in the development of therapies to accelerate skin healing. To evaluate this possibility, formulations for topical use were developed, in which Poloxamer 407® gel was used. To evaluate, in addition to the individual effects, the association effect, gels were prepared with AG, AE and AG+AE. The properties of the gels were then evaluated, including the effects of the freeze-thaw cycle, which revealed a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in pH in most samples, including the vehicle (gel without drug) and the gel containing the two drugs, however, no sample showed variation outside the normal pH range for the skin, with values ranging from 4.8 to 6.0. Regarding electrical conductivity, the AG, AE and AG+AE formulations showed a reduction ( $p < 0.05$ ) after the freezing-thawing cycle. Regarding the content, the amount of drug in the formulations varied after the freeze-thaw cycle ( $p < 0.05$ ), in the following percentages from 95.86% to 101.35% initially, increasing to 91.30% to 101.51%. In the drug release test, gallic acid (3%) – released 92.58% in just 1.5 hours; 3% ellagic acid – released 51.60% after 6 hours; gallic acid (in combination with ellagic) (1.5%) – released 99.91% in just 2 hours; ellagic acid (associated with gallic) (1.5%) – released 57.06% after 6 hours. Gallic acid showed the highest amount released, followed by the association of gallic acid and ellagic acid, and finally, ellagic acid in 6 hours. In the evaluation of acute toxicity, larvae of *Zophobas morio* were used to evaluate the lethal dose for 50% of animals (LD 50), an LD50 of 2191.51 mg/Kg in 48 hours was observed for AG, as Regarding the percentage of survival, it was observed that the group treated with AG had a lower survival rate of the larvae (40%), in the formulation at 3000 mg/Kg. In the evaluation of biomarkers, there was no change in the concentrations of glutathione and catalase, however, a significant reduction in melanin was observed in the groups treated with concentrations of 30 mg/Kg of GA, 3mg/Kg of AE and 3, 300.3000 mg/ Kg of AG+AE from pure drugs, as well as concentrations of 300 and 3000 mg/Kg of AG+AE incorporated into the gel, in addition to concentrations of 3 and 30 mg/Kg of AG+AE. Regarding the healing effect, based on evaluation by digital photogrammetry, there was a significant acceleration in healing in groups treated with ellagic acid (EA 3%) and gallic acid associated with ellagic acid (AG 1.5%+EA1.5% ). Throughout the treatment, there was a progressive regression of the wounds in the groups treated with AE and AG+AE, and, at 21 days, the combination of acids proved to be more effective in promoting the regression of the wounds. Thus, topical gels containing gallic acid, ellagic acid and their combination demonstrate a remarkable drug release capacity, protective effect against cellular stress and significant healing effect. Therefore, these compounds are important active principles for the development of topical therapies aimed at wound healing.

Keywords: Association effect, topical formulation, Poloxamer, topical use, skin injury, pharmacological safety, experimental study.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

<b>Figura 1.</b> Estrutura do ácido gálico .....	21
<b>Figura 2.</b> Estrutura do ácido elágico. ....	21
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do ácido oleico.....	23
<b>Figura 4.</b> Estrutura química do Poloxamer .....	25
<b>Figura 5.</b> Estágios da vida de <i>Zophobas morio</i> , de ovo a adulto: (A) ovos, (B) larvas, (C) pupa e (D) adulto. ....	28
<b>Figura 6.</b> Fases do processo de cicatrização de feridas cutâneas. ....	29

### CAPÍTULO 01

<b>Figura 1.</b> pH médio das formulações de gel, antes e após o ciclo de congelamento-descongelamento.....	41
<b>Figura 2.</b> Condutividade média das formulações de gel, antes e após o ciclo de congelamento-descongelamento.....	42
<b>Figura 3.</b> Teor das formulações de gel, antes e após o ciclo de congelamento-descongelamento.....	42
<b>Figura 4.</b> Perfis de liberação <i>in vitro</i> de gel tópico de AG, AE e AG+AE .....	43
<b>Figura 5.</b> Percentual de sobrevivência dos grupos tratados com fármacos em sua forma isolada .....	44
<b>Figura 6.</b> Percentual de sobrevivência dos grupos tratados com fármacos incorporados ao gel de Poloxamer .....	45
<b>Figura 07 (a e b).</b> Avaliação da melanina em larvas de <i>Zophobas morio</i> para diferentes grupos de tratamento. (a) fármacos isolados e (B) fármacos incorporados ao gel. ....	46
<b>Figura 08 (a/b).</b> Concentração de Glutathione Reduzida em larvas de <i>Zophobas morio</i> para diferentes grupos de tratamento. (a) fármacos isolados e (B) fármacos incorporados ao gel. ....	47

<b>Figura 09 (a/b).</b> Avaliação da atividade da catalase em larvas de <i>Zophobas morio</i> para diferentes grupos de tratamento. (a) fármacos isolados e (b) fármacos incorporados ao gel. .....	47
--	----

## **CAPITULO 02**

<b>Figura 01-</b> Ilustração das três feridas dermatológicas.....	61
---	----

<b>Figura 02-</b> Lesões induzidas para avaliação da cicatrização durante os períodos experimentais, com Ácido Gálico (AG), Ácido Elágico (AE), AG+AE, gel (veículo) e colagenase 1,2U (controle positivo).....	63
---	----

<b>Figura 03 -</b> Avaliação da regressão de feridas nos primeiros 7 dias, comparando as lesões tratadas com ácido gálico (AG), ácido elágico (AE), ácido gálico associado ao ácido elágico (AG+AE), controle positivo (Colagenase 1,2 U) e controle negativo (gel). .....	64
---	----

<b>Figura 04 -</b> Avaliação da regressão de feridas aos 14 dias, comparando as lesões tratadas com ácido gálico (AG), ácido elágico (AE), ácido gálico associado ao ácido elágico (AG+AE), controle positivo (Colagenase 1,2 U) e controle negativo (gel). .....	64
--	----

<b>Figura 05 -</b> Avaliação da regressão de feridas aos 21 dias, comparando as lesões tratadas com ácido gálico (AG), ácido elágico (AE), ácido gálico associado ao ácido elágico (AG+AE), controle positivo (Colagenase 1,2 U) e controle negativo (gel). .....	65
--	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Avaliação das características organolépticas de gel tópico de AG, AE e AG+AE .....	41
<b>Tabela 2.</b> Avaliação da dose letal (DL50) em larvas de <i>Zophobas morio</i> de acordo com as concentrações 3,30,300 e 3000 mg/Kg de AG, AE, AG+AE puros e incorporados ao gel em 48 horas após administração .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

AE – Ácido elágico

AG – Ácido gálico

ANOVA – Análise de variância

ATA – Ácido tricloroacético

CAT – Catalase

CL50 – Concentração Letal 50

EDTA – Etilenodiaminotetracético

EPCR – Extrato padronizado de casca de romã

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

EtOH – Etanol

F AE – Formulação de ácido elágico

FAG – Formulação de ácido gálico

FDA – Food and Drug Administration

GSH – Glutathiona reduzida

HHDP – Hexahidroxidifênico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio

MMPs – Metaloproteinases de matrix

MPO – Mieloperoxidase

NLCs – Nanopartículas lipídicas

PC – Peso corporal

P407 – Poloxamer407®

PMN – Polimorfonucleares

POE – Polioxietileno

POP – Polioxipropileno

SOD – Superóxido desmutase

TEN – Tenoxicam

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 Organização do trabalho. ....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	20
2.1 Objeto Geral.....	20
2.2 Objetivo Específico.....	20
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
3.1 Ácido gálico (AG) e Ácido elágico (AE).....	21
3.2 Associação de princípios ativos: uma abordagem sinérgica para otimização de tratamentos.....	22
3.3 Explorando o potencial do Ácido oleico (AO) como agente promotor em formulações Tópicas.....	23
3.4 Formulações tópicas de gel Poloxamer 407: Avanços e aplicações terapêuticas .....	23
3.5 Toxicidade aguda - efeitos potenciais toxicológicos. ....	25
3.6 Modelos alternativos em toxicologia: O potencial dos invertebrados como organismos de estudos.....	27
3.7 Cicatrização de feridas cutâneas: mecanismo e estratégias terapêuticas. ....	29
<b>CAPÍTULO 01</b> .....	<b>32</b>
<b>4 INTRODUÇÃO</b> .....	35
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
5.1 Substâncias utilizadas. ....	36
5.2 Obtenção e avaliação da estabilidade do gel tópico de ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e a combinação de ambos (AG+AE). ....	36
5.3 Cinética de liberação <i>in vitro</i> de gel tópico de ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e a combinação de ambos (AG+AE) .....	37

5.4 Modelo alternativo invertebrado – <i>Zophobas morio</i> .....	38
5.5 Avaliação de toxicidade aguda em larvas de <i>Z. morio</i> .....	38
5.6 Dose Letal (DL50) .....	38
5.7 Protocolo experimentais ex vivo.....	39
5.7.1 Efeitos bioquímicos em larvas de <i>Zophobas morio</i> e Atividade das enzimas antioxidantes .....	39
5.8 Análises Estatísticas .....	40
6 RESULTADOS.....	40
7 DISCUSSÃO .....	48
8 CONCLUSÃO .....	51
9 REFERÊNCIAS.....	51
<b>CAPÍTULO 02 .....</b>	<b>55</b>
10 INTRODUÇÃO .....	58
11 MATERIAL E MÉTODOS. ....	59
11.1 Substâncias utilizadas .....	59
11.2 Caracterização do gel tópico de ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e associação de AG+AE .....	59
11.3 Drogas e produtos químicos.....	60
11.4 Animais .....	60
11.5 Indução da ferida.....	60
11.6 Agrupamento e tratamento tópico.....	61
11.7 Fotogrametria digital - análise macroscópica .....	61
11.8 Análises estatísticas .....	62
12 RESULTADOS.....	62
13 DISCUSSÃO .....	65

14 CONCLUSÃO .....	68
15 REFERÊNCIAS.....	68
16 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	71
17 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS .....	72
18 ANEXOS.....	78

## 1. INTRODUÇÃO

Os taninos são produtos do metabolismo secundário dos vegetais, originados do metabolismo do carbono, são polifenóis, que apresentam alto peso molecular e podem ser classificados de acordo com sua estrutura química, em hidrolisáveis e condensados, no primeiro grupo existe os taninos derivados do ácido gálico e do ácido elágico (ROCHA,2018).O ácido gálico (AG), também conhecido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (FIGURA 01), é um metabólito secundário natural e amplamente isolado de várias frutas, plantas e nozes. Nos últimos anos, o AG tem recebido crescente atenção por suas poderosas propriedades anti-inflamatórias. Entre muitos polifenóis, o AG é um composto trifenólico de baixo peso molecular com excelentes atividades anti-inflamatórias e antioxidantes. Além disso também tem vários efeitos farmacológicos evidentes, incluindo antidiabetes, antiobesidade, anti-isquemia miocárdica, além de poderosas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, antimicrobianas e anticancerígenas. (BAI et al.,2020).

Quanto à toxicidade, AG tem um status USFDA GRAS (geralmente reconhecido como seguro), exibindo toxicidade sistêmica e mortalidade bastante baixa associada em doses agudas em muitos modelos experimentais. Apesar dos benefícios antienvhecimento da pele obtidos com formulações de AG relativamente seguras, poucos casos de alergia cutânea induzida por galato foram relatados em humanos (KHAN, et al.,2018).

Em trabalho realizado avaliando a combinação de 4% de niacinamida + 1% de ácido gálico + 1% de ácido láurico no tratamento de acne vulgaris em humanos, foi observado que o AG com suas propriedades antioxidantes, citotóxicas e anti-inflamatórias, pode ser usada como um tratamento tópico alternativo para acne vulgar, para prevenir a resistência a antibióticos tópicos e os efeitos colaterais de alguns outros tratamentos (KOZAN et al.,2020).

O ácido elágico (AE) é um composto polifenólico cujo consumo alimentar está associado principalmente à ingestão de frutas vermelhas, incluindo romãs, morangos, amoras, groselhas negras, framboesas, uvas ou frutas secas, como nozes e amêndoas. Estruturalmente, o AE é uma dilactona de ácido hexahidroxidifênico (HHDP), um derivado dimérico do ácido gálico, produzido principalmente pela hidrólise de elagitaninos, um grupo amplamente distribuído de metabólitos secundários (FIGURA 2) (SHARIFI-RAD et al., 2022). Durante a digestão, os elagitaninos são convertidos em ácido elágico, que é posteriormente metabolizado pela microbiota intestinal em vários derivados dibenzo[b,d]piran-6-ona, denominados urolitinas (DJEDJIBEGOVIC et al.,2020).

Vários estudos indicam que o AE exerce efeitos benéficos à saúde contra várias patologias crônicas associadas a danos oxidativos, incluindo diferentes tipos de câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Além disso, o AE possui propriedades cicatrizantes, efeitos antibacterianos e antivirais e atua como antioxidante sistêmico. No entanto, as

aplicações clínicas deste polifenol têm sido dificultadas e impedidas por sua baixa solubilidade em água ( $9,7 \pm 3,2 \mu\text{g ml}^{-1}$  em água) e perfil farmacocinético (taxa de absorção limitada e meia-vida plasmática  $< 1$  h após a ingestão de suco de romã), propriedades devido à natureza química do composto orgânico heterotetracíclico (CECI et al., 2020).

Quanto ao efeito de associação de AG e AE, em estudos realizados com extratos da planta de *Libidibia ferrea* foi evidenciado que os principais componentes encontrados na análise química dos extratos foram ácidos gálico e elágico, além de galato de metila. Tais elementos reduziram a liberação e migração de citocinas pró-inflamatórias e mediadores como serotonina, bradicinina, histamina e protaglandina, o que confere atividade antiinflamatória e antioxidante (da SILVA OLIVEIRA et al., 2022).

Quanto aos mecanismos do efeito cicatrizante, foi demonstrada importância do efeito anti-inflamatório, em estudo com extrato obtido das cascas do caule de *Caesalpinia ferrea*. (TPL-Cf, que acelerou a cicatrização de feridas, via modulação de mediadores inflamatórios (NO, PGE<sub>2</sub>, IL-1, MPO, MDA, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ ) em um modelo de úlcera cutânea excisional em ratos (PEREIRA et al, 2016)

Em face dos efeitos benéficos observados, são necessárias abordagens para melhorar a biodisponibilidade e biodegradabilidade deste composto fenólico pouco solúvel em água e não biodegradável (KHAN et al., 2018). Soluções poliméricas aquosas termossensíveis que se transformam em géis com o aumento da temperatura têm desempenhado um papel importante no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos. As vantagens de tais sistemas aquosos são a falta de solvente tóxico, a prevenção de efeitos colaterais sistêmicos e a capacidade de entregar a droga diretamente aos locais/cavidades do corpo desejados e sustentar a liberação do agente bioativo (BOONLAI et al., 2018).

Os taninos, como o ácido gálico e o ácido elágico, demonstraram possuir propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e cicatrizantes, o que sugere seu potencial para terapias médicas. Contudo, as limitações de solubilidade e biodisponibilidade precisam ser superadas, e a segurança desses compostos deve ser avaliada. Além disso, a pesquisa sobre sua associação e aplicação na cicatrização de feridas é crucial para o desenvolvimento de tratamentos eficazes.

O uso de medicamentos por via tópica é um aspecto importante a ser considerado, especialmente quando se trata da administração de drogas nos olhos, pele e feridas. A via tópica é frequentemente a preferida devido à sua capacidade de proporcionar uma maior eficácia terapêutica e melhorar a adesão do paciente ao tratamento. A pele possui uma estrutura complexa que proporciona inúmeras barreiras fisiológicas à entrada de substâncias exógenas. A localização do medicamento é um aspecto importante de algumas doenças dérmicas e requer a entrega direcionada da substância ativa às células doentes, que é um desafio com as

abordagens atuais (KOPPA RAGHU et al.,2020). Achados de estudos realizados avaliando efeito antifúngico do extrato de *Commiphora leptophloeos* sugerem que foi potencializado quando carregado no hidrogel à base de quitosana e poloxâmero, demonstrando a importância do uso de hidrogéis como estratégia para melhorar o potencial farmacológico (DANTAS-MEDEIROS et al.,2023).

Determinar a toxicidade de substâncias candidatas a potenciais formulações farmacêuticas, é crucial para garantir a segurança desses produtos. Existem modelos alternativos que são bastante utilizados para verificar a toxicidade e genotoxicidade de substâncias, apresentando vantagens para a realização desses estudos como ciclo de vida curto, baixo custo de manutenção e similaridade com humanos em relação a seus aspectos fisiológicos e características neurológicas (MACÊDO et al.,2022).

Este estudo teve como objetivo principal investigar o potencial terapêutico dos compostos ácido gálico e ácido elágico, isoladamente e em associação, para a cicatrização de feridas cutâneas. Pretendeu-se desenvolver uma forma farmacêutica semi-sólida incorporando esses compostos a um gel para uso tópico. A avaliação dessa formulação envolveu aspectos físicos, compatibilidade com a pele, possíveis efeitos tóxicos e eficácia cicatrizante. Além disso, foram realizadas investigações quanto à avaliação de biomarcadores, assim como a determinação de suas concentrações letais em modelos alternativos. A associação dos compostos com o gel de Poloxamer® também foi explorada para avaliar possíveis benefícios adicionais. Além disso, foi relevante estudar o efeito cicatrizante do ácido gálico e elágico bem como sua associação quando incorporados a um gel de Poloxamer® em ratos.

A pesquisa visou aprimorar a aplicação clínica do ácido gálico e ácido elágico, superando suas limitações de solubilidade e biodisponibilidade, e fornecendo uma base científica sólida para o desenvolvimento de terapias de cicatrização de feridas eficazes. A associação desses compostos com um gel tópico oferece uma abordagem promissora para maximizar seus benefícios. Com base nisso, esse estudo buscou contribuir para o avanço das terapias médicas e proporcionar melhorias na saúde e bem-estar dos pacientes.

## **1.1. ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO DE TESE**

Esta tese contém uma abordagem geral no seu resumo, introdução, objetivos e revisão de literatura e o conteúdo mais específico da pesquisa está organizado em dois capítulos. O capítulo 1 é intitulado “Avaliação da toxicidade aguda do ácido elágico e ácido gálico incorporado ao gel com Poloxamer407®, em larvas de *Zophobas morio*” e o capítulo 2 tem como título “Potencial terapêutico do ácido gálico, ácido elágico e sua associação incorporados ao gel de Poloxamer 407 na cicatrização de feridas em ratos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Desenvolver uma forma farmacêutica semi-sólida do ácido elágico, ácido gálico e associação incorporado ao gel com Poloxamer 407® para uso tópico, com atividade cicatrizante

### 2.2. Objetivos Específicos

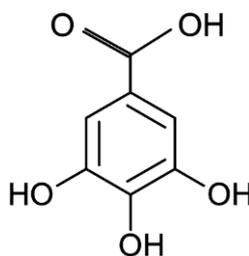
- Obter formas farmacêuticas resultantes da incorporação de ácido gálico, ácido elágico e associação de AG+AE ao gel com Poloxamer407®;
- Avaliar a estabilidade termodinâmica do gel preparado;
- Avaliar a liberação in vitro do fármaco nas formulações desenvolvidas, utilizando células de difusão do tipo Franz;
- Determinar a toxicidade dos fármacos sobre larvas de *Zophobas morio* (invertebrado);
- Avaliar a atividade da melanina e das enzimas glutatona reduzida e catalase;
- Avaliar o efeito cicatrizante através de modelos farmacológicos, em ratos machos (*Rattus norvegicus*), da variedade Wistar.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. Ácido gálico(AG) e Ácido elágico(AE)

Os efeitos benéficos à saúde dos compostos fenólicos são atribuídos principalmente aos seus metabólitos. Nesse sentido, os compostos fenólicos devem estar biodisponíveis para exercer sua bioatividade, sendo que a biodisponibilidade é influenciada por processos como digestão, absorção e metabolismo, além de fatores como concentração no alimento, liberação na matriz alimentar, estrutura química, conjugação com outros compostos, tamanho molecular, grau de polimerização e solubilidade (de ARAÚJO et al., 2020).

Entre os diversos polifenóis, o ácido gálico (AG) (Figura 01) se destaca como um composto trifenólico de baixo peso molecular, apresentando notáveis atividades anti-inflamatórias e antioxidantes. Além dessas propriedades, o AG demonstra diversos efeitos farmacológicos significativos, tais como ação antitumoral, atividade antibacteriana, efeitos benéficos no controle da diabetes, potencial na redução da obesidade, atividade antimicrobiana e proteção contra a isquemia miocárdica. Essa ampla gama de efeitos farmacológicos confere ao AG um grande potencial terapêutico e o torna objeto de estudo em diversas áreas de pesquisa (BAI et al., 2021).

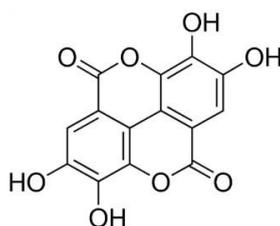
**Figura 01.** Estrutura do ácido gálico

**Fonte:** Adaptado de Silva, 2015.

O estudo realizado por Gobin et al. (2022) evidencia o efeito erradicante de soluções contendo ácido gálico e carvacrol sobre biofilmes maduros de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, tanto em biofilmes de uma única espécie como em biofilmes de espécies duplas. A combinação dessas duas moléculas demonstrou um forte efeito sinérgico na erradicação dos biofilmes maduros. Esses resultados confirmam o potencial das abordagens combinadas para combater biofilmes maduros, o que oferece novas e promissoras alternativas no tratamento e cura de feridas crônicas infectadas

De acordo com os resultados de estudo com camundongos, a aplicação tópica de ácido gálico (AG) demonstrou inibir a iniciação do tumor de pele e as fases de progressão do processo carcinogênico cutâneo em um modelo de carcinogênese de pele in vivo de dois estágios. Esse efeito foi atribuído à modulação do sistema de enzimas antioxidantes e das metaloproteinases de matriz (MMPs), mais especificamente as MMPs-2 e -9, presentes no tecido da pele de camundongos utilizados no experimento (SUBRAMANIAN et al.,2014).

O ácido elágico (Figura 02) é um metabólito comum presente em muitas plantas e vegetais medicinais. Está presente na forma livre ou como parte de moléculas mais complexas (elagitaninos), que podem ser metabolizadas para liberar ácido elágico e vários de seus metabólitos, incluindo urolitinas, é um dos principais antioxidantes, juntamente com as conhecidas vitaminas ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocofero. Suas propriedades antioxidantes intrínsecas foram atribuídas à sua atividade de eliminação de radicais livres, que foi proposta como semelhante à das vitaminas essenciais, a presença de quatro hidroxilas e dois grupos funcionais de lactonas permite que o ácido elágico separe uma ampla variedade de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (RÍOS et al.,2018).

**Figura 02** – Estrutura do ácido elágico

**Fonte:** Sigmaaldrich.

Em um estudo de pesquisa realizado com ácido elágico em condições *in vitro*, concentrações de 5 a 20  $\mu\text{M}$  demonstraram exercer um efeito benéfico na disfunção endotelial induzida por LDL oxidada. O ácido elágico mostrou suprimir a montagem da membrana do complexo NADPH oxidase, resultando em uma redução significativa na superprodução de radicais superóxidos. Esse efeito é importante, uma vez que os radicais superóxidos estão associados a danos celulares (LEE et al.,2010). De acordo com os estudos de Hallan et al., (2020), a inclusão de ácido elágico (EA) em nanopartículas lipídicas (NLCs) demonstrou melhorar a solubilidade em água e permitir uma redução da dosagem. Além disso, foi evidenciada a manutenção de alto efeito antioxidante e baixa toxicidade, sendo que o NLC- EA1 pareceu ser mais eficaz que o NLC-EA2 (SINGH et al.,2020).

No estudo conduzido por Mo et al., (2014) foi realizado uma avaliação do potencial de cicatrização de feridas em ratos utilizando um extrato padronizado de casca de romã (EPCR) e seu principal constituinte antioxidante, o ácido elágico (AE, 13%, p/p). Os resultados demonstraram que a aplicação tópica tanto do EPCR quanto do AE acelerou significativamente o processo de cicatrização de feridas cutâneas em modelos de incisão, excisão e queimadura em ratos. Esses achados ressaltam o potencial terapêutico desses compostos na promoção da regeneração de tecidos e fornecem evidências encorajadoras para o seu uso no tratamento de feridas cutâneas.

### **3.2. Associação de princípios ativos: uma abordagem sinérgica para otimização de tratamentos**

O uso de substâncias associadas para avaliar seus efeitos pode resultar em diferentes interações, classificadas como aditivas, indiferentes, antagônicas ou sinérgicas. Na interação aditiva, a combinação das substâncias produz um efeito igual à soma dos resultados individuais. Na interação indiferente, o efeito da combinação não difere do efeito da substância mais efetiva isoladamente. Já na interação antagônica, o efeito da combinação é menor do que o esperado pela resposta aditiva. Por outro lado, a interação sinérgica ocorre quando a combinação resulta em uma atividade maior do que o efeito aditivo esperado para cada substância individualmente, ou seja, há um aumento no efeito observado na combinação das substâncias (PIRES, 2022).

As interações medicamentosas são divididas em farmacodinâmicas e farmacocinéticas. As interações farmacodinâmicas podem acontecer devido ao princípio ativo ou por seus metabolitos, podendo se apresentar como uma sinergia ou antagonismo. Já as interações farmacocinéticas estão relacionadas a alterações na absorção ou transformação metabólica dos ativos (SILVA et al.,2021).

As combinações de drogas têm surgido como uma estratégia promissora para contornar os mecanismos compensatórios e minimizar os efeitos indesejados fora do alvo, que muitas vezes limitam a eficácia de diversas substâncias terapêuticas (LEHÁR et al., 2009). No nosso experimento, estaremos avaliando o potencial terapêutico da associação do ácido elágico e

ácido gálico. Nossa pesquisa tem como objetivo comprovar os efeitos sinérgicos e possíveis benefícios clínicos dessa combinação, buscando oferecer uma abordagem terapêutica mais eficaz e com menor incidência de efeitos colaterais indesejados.

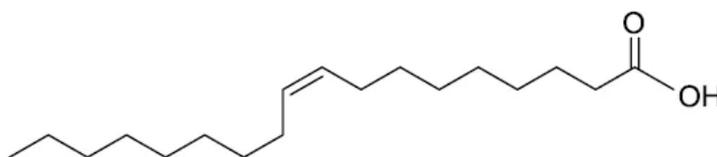
### 3.3. Explorando o potencial do Ácido oleico (AO) como agente promotor em formulações Tópicas

Nos últimos anos, houve um progresso significativo nos sistemas de administração tópica de fármacos, mas ainda há uma busca por potenciadores que possam melhorar a absorção de substâncias ativas (ALOMRANI et al.,2018). Um dos principais critérios para uma formulação farmacêutica bem-sucedida é entregar a substância terapêutica ao local-alvo em níveis terapeuticamente aceitáveis, com o mínimo de danos e/ou efeitos colaterais aos pacientes (SCHAFER et al.,2023).

O aumento na penetração de fármaco pode ser alcançado variando a composição do veículo farmacêutico ou alterando a permeabilidade da pele. Assim, várias estratégias podem ser utilizadas, como modificações químicas na estrutura do fármaco, modificações da forma farmacêutica, técnica físicas como a iontoforese e o ultrassom e o uso de promotores de absorção(SOUSA et al.,2021).

Ácido oleico (AO) um conhecido promotor de permeação de moléculas, é um ácido graxo insaturado (Figura 03), utilizado como um agente emulsionante na indústria alimentícia e em formulações farmacêuticas tópicas. Esse ácido graxo, também pode ser utilizado como agente promotor de permeação de fármacos em formulações transdérmicas, melhorando a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água (SILVA,2015). A relevância do ácido oleico nesse contexto ressalta sua capacidade de desempenhar um papel crucial no avanço das terapias tópicas ao melhorar a absorção e eficácia dos princípios ativos.

**Figura 03.** Fórmula estrutural do ácido oleico



Fonte: <https://experimentoteca.com.br/>

Nesse contexto, o ácido oleico emerge como uma peça-chave, destacando-se como um notável promotor de permeação. Sua capacidade de aprimorar a biodisponibilidade de fármacos insolúveis em água, tanto em formulações tópicas quanto transdérmicas, confirma seu potencial em revolucionar o campo das terapias cutâneas. Ao impulsionar a entrega eficaz de substâncias

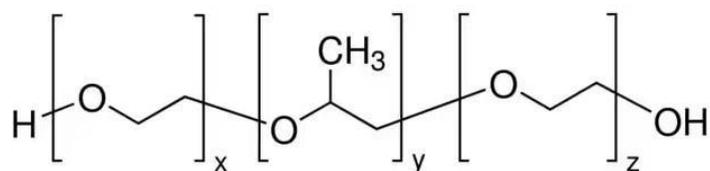
terapêuticas ao local-alvo, o ácido oleico demonstra ser uma ferramenta valiosa na criação de formulações farmacêuticas bem-sucedidas e eficazes, avançando a fronteira do cuidado dermatológico e proporcionando resultados benéficos para os pacientes.

### **3.4 . Formulações tópicas de gel Poloxamer 407: avanços e aplicações terapêuticas**

A administração tópica de drogas é amplamente preferida para alcançar maior eficácia e melhorar a adesão do paciente, especialmente quando se trata de aplicações nos olhos, na pele e em feridas. A pele, por sua vez, apresenta uma estrutura complexa que atua como uma barreira fisiológica contra a penetração de substâncias exógenas. A localização precisa do medicamento é um fator crucial em algumas doenças dermatológicas, exigindo a entrega direcionada da substância ativa às células afetadas. No entanto, esse objetivo representa um desafio significativo com as abordagens terapêuticas atuais (KOPPA RAGHU et al.,2020).

A seleção cuidadosa de um veículo adequado em formulações tópicas semi-sólidas é de suma importância, uma vez que a composição e a microestrutura do veículo podem influenciar as interações fármaco-veículo e veículo-pele, bem como afetar a liberação do fármaco e sua subsequente permeação na pele (MANIAN et al., 2022). Uma abordagem estratégica para otimizar tratamentos terapêuticos tópicos consiste na incorporação de sistemas de entrega de drogas, como etossomas, transfersomas e niossomas, na formulação de hidrogel à base de poloxâmero. Esses sistemas de entrega proporcionam benefícios adicionais, como aumento da solubilidade de substâncias lipofílicas, melhora da permeação cutânea e maior estabilidade do fármaco. Ao combinar essas estratégias, é possível obter formulações de poloxâmero de hidrogel altamente eficazes e promissoras para diversas aplicações terapêuticas tópicas (CRISTIANO et al., 2020).

Poloxamer 407, também conhecido pela marca Pluronic<sup>®</sup>F127, é um copolímero tribloco não iônico, solúvel em água, formado por um resíduo hidrofóbico de polioxipropileno (POP) entre as duas unidades hidrofílicas de polioxietileno (POE) (FIGURA 3). Os hidrogéis à base de Poloxamer 407 exibem uma interessante característica térmica reversível. Ou seja, são líquidos à temperatura ambiente,mas assumem a forma de gel quando administrados à temperatura corporal, o que os torna candidatos atraentes como carreadores de fármacos farmacêuticos. É usado por sua boa capacidade de solubilização, baixa toxicidade, boas características de liberação de drogas e sua compatibilidade com inúmeras biomoléculas e excipientes químicos, todas essas características o tornam um composto útil para o desenvolvimento de várias formulações farmacêuticas (GIULIANO et al.,2018).

**Figura 04.** Estrutura química do Poloxamer

As letras x e y representam cadeiras hidrofílicas e hidrofóbicas, respectivamente.

**Fonte:** sigmaaldrich.

Nos últimos anos, têm sido conduzidos diversos estudos com o objetivo de explorar as formulações contendo Poloxamer 407, visando melhorar a solubilização de fármacos com baixa solubilidade em água e proporcionar um perfil de liberação prolongada para diversas aplicações farmacêuticas, como formulações orais, retais, tópicas, oftálmicas, nasais e injetáveis. Embora o uso isolado do Poloxamer 407 não tenha demonstrado vantagens relevantes, descobertas revelam propriedades imunomoduladoras e citotóxicas promissoras para esse polímero. Essas evidências despertam um interesse farmacológico significativo, abrindo possibilidades para sua utilização em terapias avançadas e desenvolvimento de novos medicamentos (DUMORTIER et al.,2006).

### 3.5.Toxicidade aguda- efeitos potenciais toxicológicos

Apesar de suas propriedades benéficas para a manutenção da saúde, muitos estudos apontam que os compostos fenólicos ingeridos em altas concentrações podem atuar como pró-oxidantes e, assim, causar efeitos toxicológicos . Estas atividades podem ser atribuídas à produção de espécies reativas de oxigênio como consequência da possível perturbação destes compostos para as células, porém sua natureza pró-oxidativa não pode ser simplesmente definida como nociva, e os riscos e benefícios dependem da situação e da concentração usado (de ARAÚJO et al.,2020).

Os testes convencionais de toxicidade do desenvolvimento envolvem o uso de modelos animais in vivo para coleta de dados (LI e XIA, 2019).Esses estudos são necessários pelas agências reguladoras como requisito para avaliar a segurança de um medicamento antes que os ensaios clínicos possam ser realizados. Por meio de modelos animais, são conduzidos estudos in vivo que fornecem informações cruciais sobre os efeitos do medicamento no organismo. Essas pesquisas permitem uma compreensão mais aprofundada da toxicidade e dos possíveis efeitos adversos antes da administração do medicamento em seres humanos (SON et al.,2020). Por outro lado, os testes de toxicidade aguda têm como objetivo determinar a quantidade ou concentração de uma substância tóxica capaz de produzir uma resposta específica e mensurável em um organismo-teste ou população dentro de um curto período de tempo, geralmente entre

24 e 96 horas. Esses testes desempenham um papel importante na avaliação dos potenciais riscos associados à exposição aguda a agentes tóxicos, fornecendo uma estimativa da toxicidade imediata da substância em questão (GHERARDI-GOLDSTEIN et al.,1990).

O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), derivadas do oxigênio molecular e nitrogênio, respectivamente, pode resultar em um fenômeno conhecido como estresse oxidativo. Em condições normais, a geração de EROS é cuidadosamente regulada em diferentes células e compartimentos celulares. No entanto, qualquer desequilíbrio entre a produção de EROS e o sistema antioxidante celular pode levar ao estresse oxidativo (MOOLI et al.,2022).

As espécies reativas de oxigênio (EROS) acumuladas na ferida podem desencadear respostas inflamatórias intensas, tornando a ferida mais vulnerável e inibindo a função das células-tronco endógenas e dos macrófagos, prejudicando assim a regeneração do tecido da ferida. Diante desse cenário, a pesquisa e o desenvolvimento de materiais funcionais que sejam capazes de remover as EROS, além de possuírem propriedades anti-inflamatórias e bacteriostáticas, têm se mostrado de suma importância para regular o microambiente da ferida de forma efetiva. Esses materiais são capazes de criar um microambiente propício à cicatrização de feridas, e, portanto, constituem um tópico de grande relevância no campo do tratamento de feridas atualmente (CHEN et al., 2022).

Nos estudos com biomarcadores, é atribuído um grande destaque ao desenvolvimento de ensaios que visam quantificar a atividade de enzimas que desempenham um papel-chave em processos fisiológicos, como a neurotransmissão, a desintoxicação, a respiração e a resposta antioxidante. Essas enzimas desempenham funções essenciais no organismo e suas atividades podem ser medidas como indicadores importantes para avaliar a saúde e a toxicidade de substâncias em estudo. A quantificação da atividade dessas enzimas em testes de toxicidade fornece informações valiosas sobre os efeitos das substâncias em diferentes processos biológicos e ajuda a compreender os mecanismos envolvidos nas respostas do organismo (OLIVEIRA, 2014).

As principais enzimas utilizadas como biomarcadores oxidativos são a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD). A catalase é uma enzima contendo porfirina tetramérica encontrada em quase todos os organismos vivos expostos ao oxigênio. Sua localização principal ocorre nos peroxissomos e sua função é a oxidação do peróxido de hidrogênio, além de poder catalisar a oxidação de diversos metabólitos e toxinas. Por sua vez, a superóxido dismutase (SOD) é um grupo de enzimas que desempenham um papel crucial na defesa antioxidante contra os radicais superóxidos altamente reativos. Essas enzimas realizam a dismutação desses radicais, convertendo-os em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigênio (O<sub>2</sub>) (TEJCHMAN et al.,2021). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima derivada de leucócitos que é liberada por neutrófilos e monócitos ativados. Sua produção ocorre como

resultado da resposta inflamatória e do estresse oxidativo. Já a melanina é o pigmento responsável por proteger a pele de raios ultravioleta, formadores de espécies reativas de oxigênio (EROS) (BRAGA, 2021). A avaliação do nitrito como biomarcador do estresse oxidativo é de extrema importância, uma vez que sua quantificação e determinação permitem identificar sua presença em diferentes contextos. O nitrito não apenas pode atuar como um potencial agente poluidor, mas também está relacionado a problemas de saúde (FERREIRA et al.,2022).

### **3.6. Modelos alternativos em toxicologia: o potencial dos invertebrados como organismos de estudo**

Os métodos alternativos são considerados como qualquer abordagem que possa substituir, reduzir ou aprimorar o uso de experimentos com animais na pesquisa biomédica, ensaios ou ensino. Segundo a Lei Arouca (Lei 11.794/2008), é proibido realizar experimentos em animais, mesmo para fins educacionais ou científicos, quando existirem recursos alternativos disponíveis (FIOCRUZ, 2011). O princípio dos 3Rs estabeleceu a expectativa de eliminar o uso de modelos animais (substituição), mas, considerando que isso não era viável, toda pesquisa deveria buscar proporcionar o mínimo de sofrimento possível, reduzindo (redução) o número de animais utilizados e aprimorando (refinamento) as técnicas de manejo e intervenção. Ao mesmo tempo, em 1978, a UNESCO publicou a Declaração Universal dos Direitos dos Animais, da qual o Brasil é signatário, com o objetivo de estabelecer parâmetros jurídicos para a utilização e convivência harmoniosa com os animais (FURLAN & FISCHER, 2020).

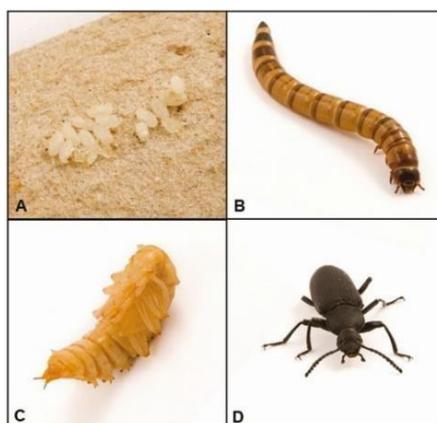
*Daphnia magna* (Straus), um zooplâncton de água doce da ordem Cladocera, tem se destacado como um modelo alternativo invertebrado em pesquisas ecotoxicológicas. Sua escolha como espécie teste padrão baseia-se em várias vantagens, incluindo sua facilidade de manuseio em laboratório e sua alta sensibilidade a uma ampla gama de substâncias tóxicas. Outro modelo alternativo invertebrado amplamente utilizado em ecotoxicologia é a *Artemia salina*, uma espécie de artêmia da ordem Anostraca. Sua escolha como organismo teste é baseada em sua confiabilidade, viabilidade e custo-benefício dos testes realizados. A *Artemia salina* é conhecida por sua adaptabilidade a diferentes condições ambientais e sua capacidade de responder a diversos tóxicos de maneira semelhante a outros organismos aquáticos (SEREMET et al.,2018).

A utilização de insetos como modelos alternativos apresenta diversas vantagens em relação aos modelos tradicionais de mamíferos. Uma das principais vantagens é a ausência de restrições éticas, tornando-os uma opção mais ética e acessível para a pesquisa científica. Além disso, a criação de insetos é relativamente barata e de fácil manutenção, não exigindo a necessidade de um laboratório sofisticado. Outro aspecto favorável é o curto ciclo de vida dos

insetos, o que possibilita a realização de experimentos em larga escala em um curto período de tempo. Isso é especialmente vantajoso para estudos que requerem análises em diferentes estágios de desenvolvimento ou avaliações de longo prazo. Dentre os insetos utilizados como modelos alternativos, destacam-se a mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster*, bem como algumas espécies de *Lepidoptera* (borboletas e mariposas) e os besouros da ordem *Coleoptera* também são modelos alternativos relevantes, com destaque para as larvas de *Tenebrio molitor*, conhecidas como larvas de farinha (de SOUZA et al., 2018).

O modelo alternativo escolhido para a pesquisa é o *Zophobas morio*, que pertence à grande família de besouros conhecidos como Tenebrionidae. O ciclo de vida desse inseto é composto por estágios distintos, incluindo ovos, larvas, pupa e estágio adulto, como ilustrado na Figura 4 (Rumbos & Athanassiou, 2021). Dentro da ordem *Coleoptera*, que abrange os besouros, essa espécie específica é conhecida como besouros escuros. É importante ressaltar que a fase larval do *Zophobas morio* é a mais utilizada para análises em pesquisas (ANDRADE et al., 2021).

**Figura 05.** Estágios da vida de *Zophobas morio*, de ovo a adulto: (A) ovos, (B) larvas, (C) pupa e (D) adulto.



**Fonte:** Adptado de Rumbos & Athanassiou, 2021.

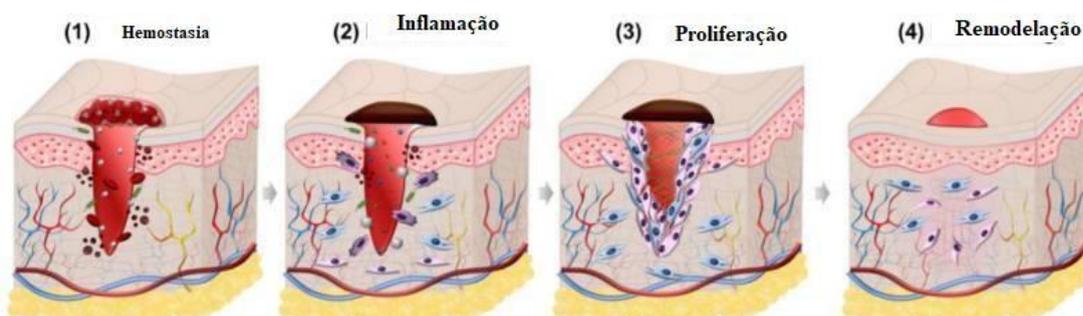
Devido às preocupações éticas e à pressão social, os pesquisadores têm adotado cada vez mais modelos alternativos aos vertebrados em suas investigações científicas. Esses modelos permitem a realização de avaliações diversas, como toxicologia, dose-dependência e efeitos antimicrobianos, antes mesmo de serem extrapoladas para estudos em animais. O uso de invertebrados em fases iniciais da pesquisa, ou quando o objetivo é a avaliação preliminar dos efeitos farmacológicos e tóxicos de um composto ou planta medicinal, possibilita uma abordagem mais racionalizada em relação ao uso de animais. Essa abordagem contribui para minimizar o número de animais utilizados nos experimentos, ao mesmo tempo em que fornece informações valiosas para o desenvolvimento de novos medicamentos e terapias (PRIMO et al., 2021).

### 3.7. Cicatrização de Feridas Cutâneas: mecanismos e estratégias terapêuticas

A cicatrização de feridas cutâneas é um processo fundamental para a regeneração da pele danificada. Essa complexa sequência de eventos pode ser dividida em quatro fases distintas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (Figura 05) (SHEDOEVA et al., 2019). Cada fase desempenha um papel crucial na restauração da integridade da pele. A capacidade de regenerar e reparar o tecido lesado é essencial para a manutenção da vida humana e animal. Assim como em outros órgãos, a cicatrização de feridas cutâneas é um processo dinâmico que envolve respostas adaptativas do tecido a diferentes tipos de agressões (GHAHARY e GHAFARI, 2007).

Após uma lesão cutânea aguda, ocorre a hemostasia, seguida de uma resposta inflamatória que envolve a ativação e recrutamento de células do sistema imune, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, para o local da lesão. Essas células desempenham um papel crítico na modulação da proliferação e migração de queratinócitos durante o processo de epitelização (PASTAR et al., 2014a). Os neutrófilos removem principalmente as bactérias, seguidos pelos monócitos que se diferenciam ainda mais em macrófagos que exercem funções pró-inflamatórias precoces e anti-inflamatórias tardias durante o processo de cicatrização. Segue-se a deposição da matriz de fibrina recém-sintetizada e a formação de tecido de granulação, estes são subsequentemente substituídos por colágeno e tecido cicatricial durante os estágios finais da cicatrização da ferida. A fase proliferativa da cicatrização de feridas é caracterizada por reepitelização, neovascularização e deposição de matriz extracelular (PASTAR et al., 2021b).

**Figura 06.** Fases do processo de cicatrização de feridas cutâneas



Fonte: Adaptado de TRINH et al., 2022.

As feridas representam um desafio significativo para a saúde, especialmente em países em desenvolvimento, onde os recursos são escassos e o financiamento é limitado. A pesquisa sobre agentes de cicatrização de feridas tem sido uma área em crescimento nas ciências biomédicas, e vários estudos têm sido conduzidos utilizando diferentes modelos de cicatrização. No entanto, apesar dos avanços na indústria farmacêutica, a disponibilidade de

medicamentos capazes de estimular efetivamente o processo de reparo de feridas ainda é limitada (OGUNTIBEJU, 2019).

A ocorrência de uma ferida resulta em uma perturbação na integridade celular, anatômica e funcional da pele devido a diversos tipos de danos, como físicos, químicos, térmicos, microbianos ou imunológicos, levando à ruptura da estrutura e função do tecido normal subjacente (KUMAR et al., 2007). Durante o processo de cicatrização, é essencial remover os produtos inflamatórios que são gerados como parte do mecanismo de defesa contra patógenos invasores (OSO et al., 2018). Nesse contexto, o objetivo do tratamento de feridas é acelerar a cicatrização e reduzir os riscos de complicações indesejáveis (MEKONNEN et al., 2013).

As fases de cicatrização de feridas normalmente seguem um curso previsível e oportuno, porém, em alguns casos, podem ocorrer desvios que levam a condições crônicas, como úlceras venosas, ou a formação de cicatrizes patológicas, como cicatrizes queloides (THAKUR et al., 2011). O processo natural de cicatrização de feridas (aguda) ocorre por meio de diversas fases sobrepostas, que incluem uma resposta inflamatória, migração celular, proliferação, deposição de matriz e remodelação tecidual. A interrupção ou desregulação de uma ou mais dessas fases pode resultar em feridas que não cicatrizam de forma adequada (crônicas) (EMING et al., 2014).

Após a lesão, as plaquetas aderem ao colágeno tipo 1 exposto e tornam-se ativadas, secretando glicoproteínas que levam à agregação plaquetária. O complexo secreta fatores que interagem entre si para estimular a cascata de coagulação intrínseca por meio da produção de trombina, a trombina, por sua vez, estimula a formação de fibrina a partir do fibrinogênio. A malha de fibrina, juntamente com as plaquetas, se agrega em um tampão hemostático estável (OGUNTIBEJU, 2019). As plaquetas retidas no coágulo desempenham um papel crucial não apenas na hemostasia, mas também fornecem uma fonte de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias que medeiam o recrutamento de células inflamatórias e fibroblastos para o local da ferida. A fase inicial inflamatória do processo de cicatrização é caracterizada pela ativação local do sistema imunológico inato, resultando em um influxo precoce de leucócitos polimorfonucleares, seguido pela invasão de monócitos sanguíneos, que se diferenciam em macrófagos teciduais (EMING et al., 2009a).

Em feridas crônicas, a inflamação pode ser prolongada, sugerindo que essas feridas podem estar presas em um estado inflamatório crônico que não progride adequadamente. Estudos recentes em tecidos e fluidos de feridas crônicas indicam uma competição constante entre sinais inflamatórios e anti-inflamatórios, resultando em um ambiente desequilibrado para a cicatrização adequada da ferida (EMING et al., 2014b).

Durante a fase de formação do tecido, várias células, como células endoteliais

invasoras, macrófagos e fibroblastos atuam na neoformação do tecido de granulação, preenchendo e cobrindo a área da ferida. A reepitelização também ocorre nessa fase, visando restaurar a integridade do tecido (EMING et al., 2009). Na fase de proliferação, além da reepitelização, há a formação de novos vasos sanguíneos por meio da angiogênese e a síntese de colágeno para a formação da nova matriz extracelular (BEKESCHUS et al., 2021). Após a conclusão da reepitelização, a proliferação celular e a neovascularização diminuem, e a ferida entra na fase de maturação, que pode durar vários meses (EMING et al., 2009). Durante essa fase, ocorre o remodelamento do colágeno e da vasculatura.

Diversos tipos de células estão envolvidos no processo de cicatrização. Os fibroblastos, juntamente com os queratinócitos, são essenciais para a deposição da matriz extracelular e a remodelação do tecido, garantindo o fechamento adequado da ferida. A migração sequencial de neutrófilos, macrófagos e linfócitos desempenha um papel fundamental na erradicação de agentes infecciosos, na montagem de respostas imunes antimicrobianas, na regulação da inflamação e na orquestração das fases de cicatrização de feridas e migração celular (BEKESCHUS et al., 2021).

## CAPÍTULO 1

**Avaliação da toxicidade aguda do ácido elágico e ácido gálico incorporado ao gel com Poloxamer407®, em larvas de *Zophobas morio***

**Evaluation of the acute toxicity and antioxidant activity of elagic acid and gallic acid incorporated in the gel with Poloxamer 407®, in larvae of *Zophobas morio***

**Avaliação da toxicidade aguda do ácido elágico e ácido gálico incorporado ao gel com Poloxamer407®, em larvas de *Zophobas morio***

*Evaluation of the acute toxicity and antioxidant activity of elagic acid and gallic acid incorporated in the gel with Poloxamer 407®, in larvae of Zophobas morio*

Campelo, J.; E.; S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

jamilly\_erica@hotmail.com

### **Resumo**

O ácido gálico (AG) possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, enquanto o ácido elágico (AE) demonstra atividade anticancerígena, antiviral e fotoprotetora. Neste estudo, foi testada a combinação dessas substâncias incorporadas ao gel poloxamer buscando verificar o efeito individual das substâncias, além de aproveitar um provável efeito associado, visando proporcionar benefícios terapêuticos adicionais, como cicatrização. Como resultado da incorporação, obteve-se formulações contendo AG, AE e AG+AE, que foram avaliadas quanto aos efeitos do ciclo gelo-degelo sobre o pH, que revelou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na maioria das amostras, incluindo o veículo (sem fármaco) e o gel contendo os dois fármacos. Nenhuma amostra apresentou variação fora da faixa de pH normal para a pele, com valores variando de 4,8 a 6,0. Quanto à condutividade, as formulações AG, AE e AG+AE mostraram redução ( $p < 0,05$ ) após o ciclo de gelo-degelo. O teor de fármacos nas formulações variou de 95,86% a 101,35% inicialmente, para 91,30% a 101,51%, após o ciclo de gelo-degelo. Quanto à liberação dos fármacos, os resultados revelaram os seguintes percentuais acumulados: AG-3% - 92,58% após 1,5 hora; AE-3% - 51,60% após 6 horas; AG+AE (1,5%=1,5%) - 99,91% após 2 horas; AG+AE-(1,5%=1,5%) liberou 57,06%, após 6 horas. Quanto à toxicidade aguda, foi observado que o grupo tratado com AG apresentou uma menor taxa de sobrevivência das larvas (40%) na dose 3000 mg/Kg na formulação. Seguindo a mesma tendência, no teste da concentração dose letal aguda (DL50) realizada nas larvas de *Zophobas morio*, foi observado, para o AG, uma DL50 de 2191,51 mg/Kg em 48 horas. A análise da melanina demonstrou diminuição nas concentrações 30 mg/Kg no grupo AG, 3mg/Kg do AE e 3, 300, 3000 mg/Kg do AG+AE, dos fármacos puros. Nos grupos com os fármacos incorporados ao gel, observou-se diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) da melanina no veículo (gel), nas concentrações de 300 e 3000 mg/Kg do AG e AE. Já na associação de AG+AE foi observado redução nas concentrações de 3 e 30mg/Kg quando comparado ao grupo controle. Assim, a formulação apresentou boa qualidade como formulação farmacêutica de uso tópico e efeito protetor contra o estresse oxidativo, sendo promissor para uso em terapias cutâneas.

Palavras-chave: Bioensaio, modelo alternativo, ensaio toxicológico, associação de substâncias ativas.

**Avaliação da toxicidade aguda do ácido elágico e ácido gálico incorporado ao gel com Poloxamer407®, em larvas de *Zophobas morio***

*Evaluation of the acute toxicity and antioxidant activity of elagic acid and gallic acid incorporated in the gel with Poloxamer 407®, in larvae of *Zophobas morio**

Campelo, J.; E.; S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.  
jamilly\_ericahotmail.com

Abstract

Gallic acid (GA) has antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties, while ellagic acid (EA) demonstrates anticancer, antiviral and photoprotective activity. In this study, the combination of these substances incorporated into the poloxamer gel was tested, seeking to verify the individual effect of the substances, in addition to taking advantage of a probable associated effect, aiming to provide additional therapeutic benefits, such as healing. As a result of the incorporation, formulations containing AG, EA and AG+AE were obtained, which were evaluated for the effects of the freeze-thaw cycle on pH, which revealed a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in most samples, including the vehicle (without drug) and the gel containing the two drugs. No sample showed variation outside the normal pH range for the skin, with values ranging from 4.8 to 6.0. As for conductivity, the AG, EA and AG+AE formulations showed a reduction ( $p < 0.05$ ) after the freeze-thaw cycle. The drug content in the formulations ranged from 95.86% to 101.35% initially to 91.30% to 101.51% after the freeze-thaw cycle. As for drug release, the results revealed the following accumulated percentages: AG-3% - 92.58% after 1.5 hours; AE-3% - 51.60% after 6 hours; AG+AE (1.5%=1.5%) - 99.91% after 2 hours; AG+AE-(1.5%=1.5%) released 57.06% after 6 hours. As for the acute toxicity, it was observed that the group treated with AG had a lower survival rate of the larvae (40%) at the dose of 3000 mg/Kg in the formulation. Following the same trend, in the acute lethal dose concentration test (LD50) performed on *Zophobas morio* larvae, an LD50 of 2191.51 mg/Kg was observed for AG in 48 hours. Melanin analysis showed a decrease in concentrations of 30 mg/Kg in the AG group, 3mg/Kg of EA and 3, 300, 3000 mg/Kg of AG+EA, of pure drugs. In the groups with drugs incorporated into the gel, there was a significant decrease ( $P < 0.05$ ) of melanin in the vehicle (gel), at concentrations of 300 and 3000 mg/Kg of AG and EA. In the association of AG+EA, a reduction in the concentrations of 3 and 30mg/Kg was observed when compared to the control group. Thus, the gel showed good quality as a pharmaceutical formulation for topical use and low toxicity, being promising for use in cutaneous therapies.

Keywords: Bioassay, alternative model, toxicological assay, combination of active substances.

#### 4. INTRODUÇÃO

O ácido gálico (AG) e o ácido elágico (AE) são compostos naturais conhecidos por suas propriedades antioxidantes e potenciais benefícios para a saúde. Neste estudo, uma abordagem relevante foi a incorporação dessas substâncias ao gel com Poloxamer407®, um veículo amplamente utilizado em formulações farmacêuticas. Esses ácidos, pelas suas propriedades já conhecidas mostram-se promissores quanto ao potencial terapêutico, seja isoladamente ou a associação entre eles, devido a propriedades complementares.

Numerosos estudos têm comprovado os efeitos antioxidantes do ácido gálico, os quais estão relacionados à redução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS). O ácido elágico tem despertado cada vez mais interesse devido aos seus potenciais benefícios para a saúde, como seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antivirais e anticancerígenos. Diversos estudos também têm demonstrado a eficácia do ácido elágico contra uma variedade de patógenos, incluindo bactérias, fungos e parasitas. Além disso, o ácido elágico pode desempenhar um papel na redução dos danos causados pela radiação UV, seja mediando a cascata inflamatória ou reduzindo o estresse oxidativo nas células da pele (BAI et al., 2022). Nesse contexto, compostos com propriedades antioxidantes, como o ácido elágico e ácido gálico, têm sido alvo de investigações como potenciais agentes terapêuticos, esses compostos são conhecidos por sua capacidade de neutralizar EROs, reduzindo o estresse oxidativo.

Contudo, antes de utilizar esses compostos em formulações terapêuticas, é fundamental avaliar sua toxicidade aguda. A avaliação da toxicidade é uma etapa fundamental na descoberta de medicamentos, pois somente compostos que demonstrem segurança em ensaios pré-clínicos podem progredir para as fases clínicas. Consequentemente, vários modelos de toxicidade pré-clínica foram desenvolvidos e usados para prever o comportamento tóxico de novos compostos em humanos e excluir preliminarmente compostos inseguros (BRAI et al., 2023).

Os valores de DL50 (dose letal 50, que é a dose de uma substância que se espera causara morte de 50% dos animais testados) ou CL50 (concentração letal 50, para exposição por inalação) são frequentemente utilizados em testes de toxicidade sistêmica aguda em roedores para classificar substâncias em diferentes categorias de toxicidade, que por sua vez determinam os avisos de perigo exibidos nos rótulos dos produtos. (STRICKLAND et al., 2018). Entretanto, o uso de modelos alternativos, como invertebrados, está ganhando cada vez mais reconhecimento como uma abordagem válida para avaliar a toxicidade de substâncias, proporcionando uma alternativa ética e reduzindo a necessidade de testes em animais vertebrados.

A incorporação do ácido elágico e ácido gálico ao gel com Poloxamer407® permite uma administração precisa e controlada, simulando a aplicação tópica em feridas cutâneas.

Além da avaliação da toxicidade aguda, também será avaliado o potencial efeito terapêutico desses compostos em larvas de *Zophobas morio*. Serão analisados parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo, como a atividade de enzimas antioxidantes e a concentração de espécies reativas de oxigênio. Os resultados deste estudo fornecerão informações valiosas sobre a toxicidade aguda do ácido elágico e ácido gálico e seu potencial efeito antioxidante em larvas de *Zophobas morio*. Esses dados contribuirão para o desenvolvimento futuro de terapias que visem reduzir o estresse oxidativo e promover a cicatrização de feridas.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.5. Substâncias utilizadas

O Ácido elágico (AE) (Lote: 202204477-100G) foi obtido da ActivePharmaceutica (Brasil) e o Ácido gálico (AG) (Lote: 0178/1122) foi obtido pela ACS Reagentes (Brasil). O Poloxamer 407® foi obtido da ChemSpecs e o ácido oleico adquirido na Synth (Brasil).

### 5.6. Obtenção e avaliação da estabilidade termodinâmica do gel tópico de ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e a combinação de ambos (AG+AE)

Para obter o gel contendo ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e a combinação de ambos (AG+AE), o Poloxamer 407® na concentração de 20% foi hidratado sob refrigeração por 24 horas (over night). Em seguida, os fármacos foram incorporados por levigação com ácido oleico a uma concentração de 5%. Após 24 horas do preparo das formulações, verificou-se macroscopicamente a homogeneização e estabilização das mesmas (PANDEY et al., 2009); (UR-REHMAN et al., 2011). As formulações de AG e AE foram utilizadas na concentração de 3% (ALVES et al., 2020), enquanto que para a formulação contendo a associação, essa concentração foi reduzida para 1,5% de cada composto, a fim de avaliar o efeito da combinação.

O estudo de estabilidade preliminar foi realizado por meio da análise dos seguintes parâmetros: características organolépticas, pH determinado à temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0$  °C) usando um medidor de pH de bancada Simpla PH140 após uma diluição a 10% com água destilada (média  $\pm$  DP, n = 3), condutividade elétrica, as medidas de condutividade foram realizadas em temperatura ambiente ( $25,0 \pm 2,0$  °C) usando um condutivímetro de bancada MB-11 da marca Marte por imersão direta do eletrodo na amostra, sem prévia diluição e o teor do AG, AE e AG+AE na preparação semissólida foi realizado usando um espectrofotômetro Shimadzu uv-1800. Na análise organoléptica das formulações, foram observados o seu aspecto, cor, homogeneidade e processos de instabilidade como separação de fase. Os parâmetros foram analisados no início dos estudos (TO) e logo em seguida ao teste de gelo-degelo pelo método de termociclagem para um estudo de estabilidade acelerada. As formulações foram submetidas por cinco ciclos de termociclagem de congelamento e descongelamento. Cada ciclo consistiu

em 15 min de congelamento (-20 °C) em refrigerador (BRASTEMP, Brasil), seguido de 15 min de descongelamento (70 °C) em estufa (Icamo, Brasil). Ao final de cinco ciclos, as formulações foram verificadas quanto a quaisquer alterações visíveis, físicas e organolépticas (SINGH et al., 2014)

### **5.3 Cinética de liberação *in vitro* de gel tópico de ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e a combinação de ambos (AG+AE)**

O estudo foi conduzido utilizando-se membranas de nitrato de celulose (0,45µm) em células de difusão tipo Franz com área difusional de 1,77 cm<sup>2</sup> e volume de 14 mL. O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato pH 7,4 associado a 20% de EtOH num sistema composto por células individuais (32 ± 0,5 °C, 100 rpm). Aplicou-se 400mg de formulação no compartimento receptor diretamente sobre a membrana. As amostras da solução receptora foram coletadas nos tempos 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6 h. As leituras das alíquotas coletadas foram realizadas em UV/Vis λ=270,2nm para AG, 283,8 nm paraAE, 221 nm para ácido gálico (associado ao elágico) e 259,8 nm para ácido elágico (associado ao gálico). O volume total da fase receptora foi substituído a cada amostragem para reposição do meio (FIGUEIREDO et al.,2016).

### **5.4. Modelo alternativo invertebrado – *Zophobas morio***

Os experimentos foram realizados na Universidade Federal do Piauí, no Laboratório de Estudos Funcionais e Moleculares em Fisiofarmacologia – LAFMOL. As larvas de *Zophobas morio* usadas para avaliar a toxicidade aguda foram adquiridas no Laboratório Fisiologia do Departamento de Morfofisiologia Veterinária (CCA/UFPI). As larvas foram mantidas em caixas organizadoras de plástico com dimensões de 60 x 40 x 80 cm com água e ração ad libidum em sala fechada com temperatura ambiente 25 °C ± 2 °C. Foram selecionadas para o experimento, as larvas com peso entre 400 e 500 mg, de cor clara e uniforme, sem manchas escuras ou acinzentadas, divididas em grupos previamente organizados.

### **5.5. Avaliação de toxicidade aguda em larvas de *Z. morio***

Para avaliar a toxicidade aguda, foram utilizadas 10 larvas de *Z. morio* para cada concentração testada, em duplicada. O protocolo foi realizado em duas etapas: aplicação das substâncias AG, AE e AG+AE nas concentrações 3, 30, 300 e 300 mg/Kg e aplicação das substâncias AG, AE e AG+AE incorporadas ao gel com Poloxamer407® nas concentrações 3, 30, 300 e 300 mg/Kg. Foram aplicadas topicamente nas larvas, em um volume de 10 µL, utilizando-se uma seringa Hamilton (modelo 701 N, manômetro 26, capacidade de 100 µL) para a administração no hemocele, no segundo ou terceiro esternito visível acima das pernas, na região ventral. As larvas foram incubadas em temperatura ambiente em placas de Petri contendo dieta de reprodução, e o número de larvas mortas foi avaliado após 48 horas. Para

determinar a mortalidade das larvas, foi realizada uma inspeção visual individual para verificar a presença de melanização e/ou resposta a estímulos físicos após um toque suave (DE SOUZA et al.,2015).

### **5.6. Dose Letal (DL50)**

O protocolo de dose letal das larvas envolveu a determinação da quantidade de uma substância necessária para causar a morte de uma determinada porcentagem da população-alvo. O objetivo foi determinar a dose em que 50% dos indivíduos expostos são mortos, conhecida como DL50. As substâncias AG, AE, AG+AE puros e incorporados ao gel de Poloxamer foram testadas nas seguintes concentrações: 3, 30, 300, 3000 mg/Kg. Para cada amostra foram avaliadas 10 larvas, em duplicata. Os resultados foram avaliados em 24 h e novamente após 48 h, considerando-se como mortas as larvas que não reagiram à estímulos mecânicos (pinça) e/ou presença de melanização. A estimativa da DL50 foi feita pela Regressão linear de produtos log base 10. (LEI e SUN, 2018).

### **5.7. Protocolo experimentais ex vivo**

#### **5.7.1 Efeitos bioquímicos em larvas de *Zophobas morio* e Atividade das enzimas antioxidantes**

- **Coleta do homogenato**

Após aplicação dos fármacos descrito no item acima, adicionou-se 5 larvas de *Z. morio* no gral em duplicata e acrescentou-se 1 ml da solução tampão Fosfato de Sódio ph 7,4 para melhor homogeneização. Após isso, macerou-se as larvas retirando o máximo possível de fragmentos sólidos, despejou-se em um microtubo, coletando somente o homogenato.

- **Ensaio da melanina em larvas de *Zophobas morio***

As larvas foram homogeneizadas em 2ml de tampão fosfato. Coletou-se o homogenato e realizou-se a centrifugação desse homogenato a 3000 rpm, por 10 minutos. Coletou-se 10µL dosobrenadante dessa centrifugação em duplicata em microplaca e adicionou-se 190µL de tampão Fosfatode Sódio pH 7,4. Prosseguiu-se então para a leitura em espectrofotômetro GloMax a 405nm, sendo obtidas as absorbâncias para cada amostra.

- **Ensaio de glutatona reduzida (GSH)**

Para avaliar a glutatona reduzida (GSH) nas larvas, utilizamos uma solução tampão contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a uma concentração de 0,02 M. A proporção usada foi de 100 µL de amostra para 1 mL de tampão. O sobrenadante da segunda centrifugação do homogeneizado foi coletado e diluído com igual volume de uma solução de ácido tricloroacético (ATA) a 10%. Essa mistura foi agitada por 30 segundos e centrifugada a 3000

rpm por 15 minutos. Parte do sobrenadante foi coletado e misturado com dois volumes de uma solução tampão Tris contendo tris(hidroximetil)aminometano (Tris) a 0,4 M, EDTA a 0,2 M e pH 8,9. Para realizar a leitura, adicionamos 50  $\mu$ L de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DNTB) a 0,01 M a cada 3 mL da solução a ser analisada. Ajustamos o espectrofotômetro para o comprimento de onda de 412 nm, zerando-o com um branco (2 mL de água destilada, 4 mL de tampão Tris e 100  $\mu$ L de DNTB a 0,01 M), e realizamos a leitura da amostra usando um espectrofotômetro biospectro SP-220. As concentrações em  $\mu$ M de grupamentos sulfidrila reduzidos são obtidas multiplicando a absorbância do teste pelo fator 317,8 (HABEEB, 1972).

- **Ensaio da atividade da catalase**

O ensaio da atividade da catalase foi realizado seguindo o método descrito por Beutler (1975). A atividade da catalase foi determinada pela velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela enzima, medida pelo decréscimo da densidade óptica a 230 nm a uma temperatura de 37°C. Inicialmente, foi feita a diluição do homogeneizado em um eppendorf, adicionando 10  $\mu$ L do sobrenadante obtido da centrifugação do homogeneizado das larvas junto com 490  $\mu$ L de uma solução tampão chamada Tris HCl 1M EDTA 5 mM pH 8. Em seguida, o espectrofotômetro (Bioespectro SP220) foi ajustado para o comprimento de onda de 230 nm e zerado com água destilada. A leitura do meio de reação foi realizada adicionando 2 mL da solução em uma cubeta de quartzo, verificando se a absorbância atingia aproximadamente 0,650. Após isso, as amostras foram preparadas pipetando 10  $\mu$ L da diluição do sobrenadante e 2000  $\mu$ L do meio de reação em uma cubeta de quartzo. Foram realizadas leituras da absorbância no tempo 0 e após 6 minutos no espectrofotômetro modelo Bioespectro SP220. Uma unidade (U) da catalase correspondeu à atividade da enzima capaz de hidrolisar 1  $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a 37°C em pH 8,0.

### **5.8. Análises Estatísticas**

Análise de variância (ANOVA) e teste de t-student foi realizado para a avaliação da estabilidade preliminar das formulações. A curva de sobrevivência das larvas de *Z. morio* foram plotadas pela análise de Kaplan-Meier. A análise dos dados de toxicidade (DL50) foi feita usando Regressão linear de produtos Log<sub>10</sub>. Foi realizado ANOVA e pós-teste de Bonferroni usado para comparações entre os grupos nos ensaios *ex vivo*, sendo cada estudo feito em duplicata. Diferenças foram consideradas significativas quando P<0,05 como nível máximo de significância estatística.

## **6. Resultados**

- **Obtenção e avaliação da estabilidade termodinâmica do gel tópico de ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e a combinação de ambos (AG+AE)**

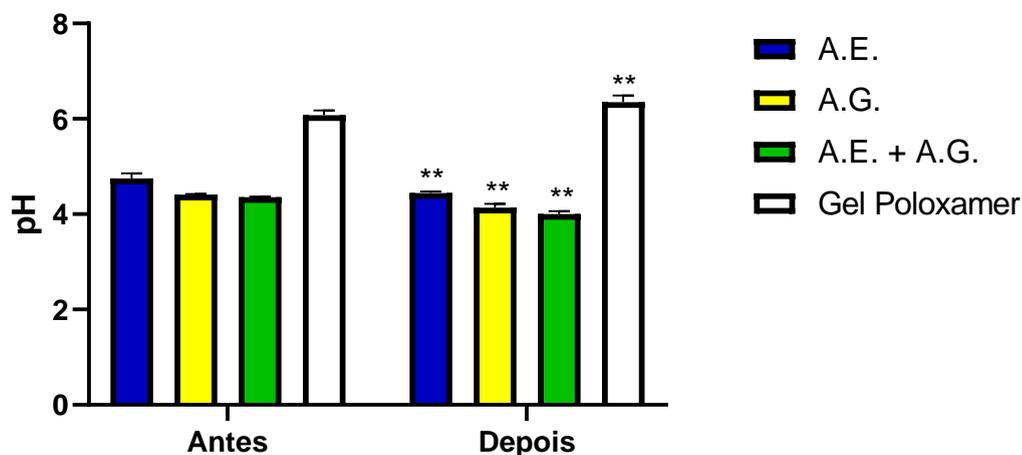
A tabela 01 e as figuras 01, 02 e 03 apresentam os resultados da avaliação da estabilidade preliminar das formulações testadas quanto as características organolépticas, ao pH, Condutividade e Teor (%) antes e depois do ciclo gelo-degelo.

**Tabela 01.** Avaliação das características organolépticas de gel tópico de AG, AE e AG+AE.

FORMULAÇÃO	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉTICAS
<b>Tempo 0</b>	
AG	Normal
AE	Normal
AG+AE	Normal
<b>Pós gelo-degelo</b>	
AG	Ligeiramente modificado
AE	Ligeiramente modificado
AG+AE	Ligeiramente modificado

O ciclo gelo-degelo em relação ao pH, causou uma redução ( $p < 0,05$ ) na maioria das amostras, incluindo o gel branco (sem fármaco) e o gel contendo os dois fármacos, porém nenhuma amostra obteve variação superior à faixa de pH normal para pele. Os valores de pH variaram de 4,8 a 6,0 (Figura 1A). Após o ciclo de congelamento e descongelamento, o pH variou de 4,4 a 6,0 (Figura 1A), com diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) em AE, AG, AE+AG e o gel.

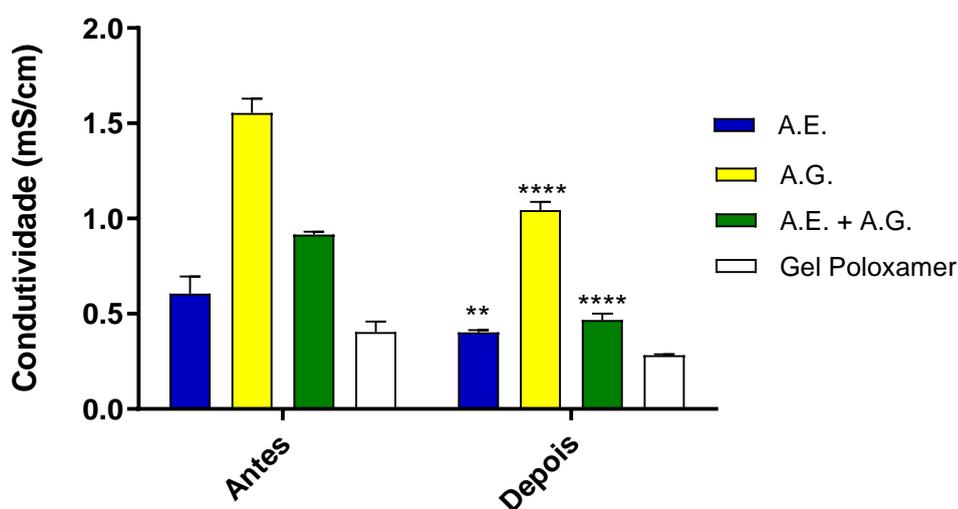
**Figura 01.** pH médio das formulações de gel, antes e após o ciclo de congelamento-descongelamento.



**Legenda:** AG- ácido gálico, AE- ácido elágico e AG+AE- ácido gálico associado com ácido elágico. ANOVA one-way foi realizada seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni, assumindo \*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Em relação à condutividade, todas as formulações apresentaram diminuição da condutividade após o ciclo de congelamento-descongelamento (Figura 2), com AG, AE, AG+AE apresentando diferença estatisticamente significativa após o teste de estabilidade ( $p < 0,05$ ).

**Figura 02.** Condutividade média das formulações de gel, antes e após o ciclo de congelamento-descongelamento

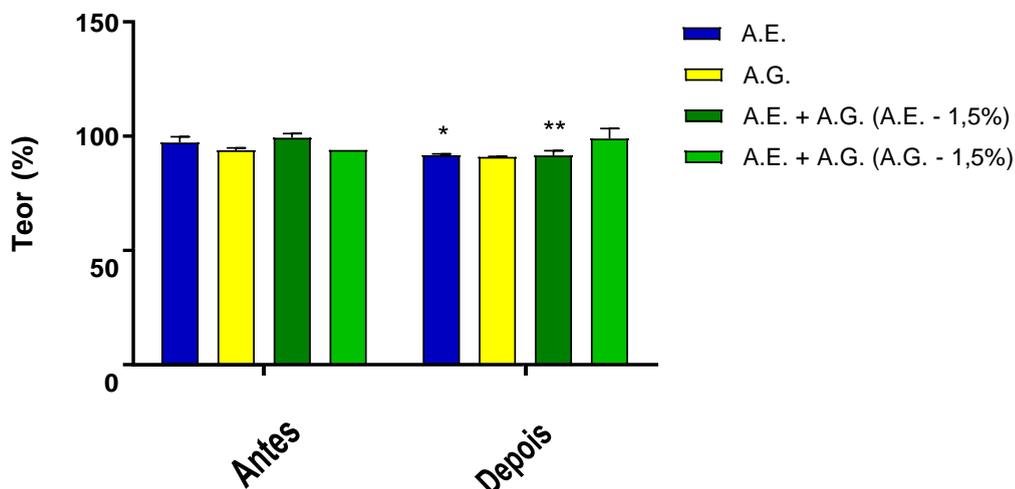


**Legenda:** AG- ácido gálico, AE- ácido elágico e AG+AE- ácido gálico associado com ácido elágico. ANOVA one-way foi realizada seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni, assumindo\*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Pode-se observar que o teor do fármaco nas formulações variou de 95,86% a 101,35% e que após o ciclo de congelamento-descongelamento variou de 91,30% a 101,51%. Uma

diferença estatisticamente significativa em relação ao teor antes e após o ciclo de aquecimento-resfriamento ( $p < 0,05$ ) foi observada apenas em AE e AE +AG (1,5% do AE) (Figura 3).

**Figura 03.** Teor das formulações de gel, antes e após o ciclo de congelamento-descongelamento.

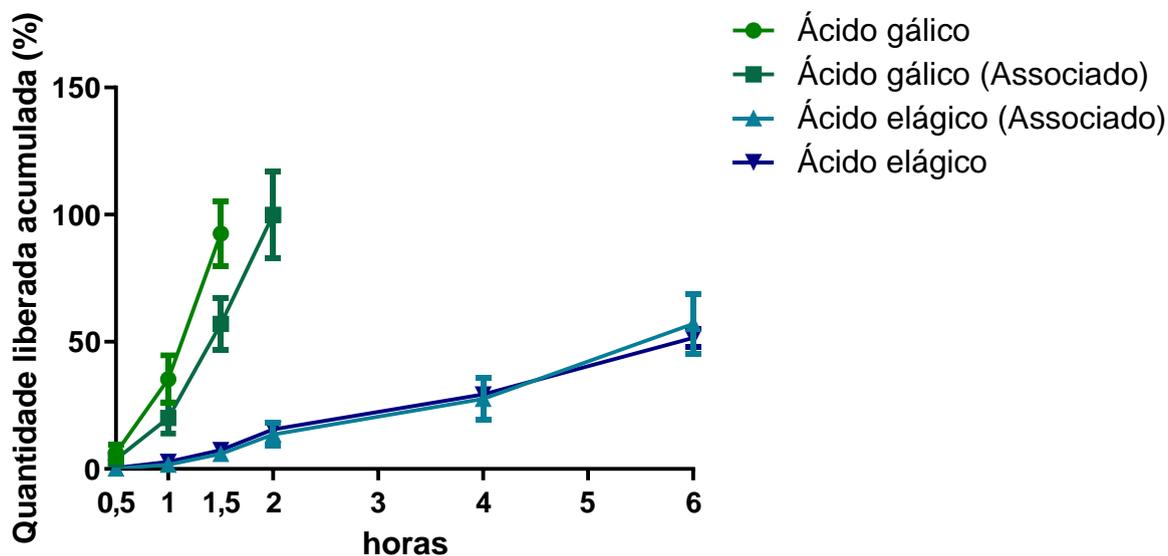


**Legenda:** AG- ácido gálico, AE- ácido elágico e AE+AG (AE 1,5%) e AE+AG (AG,1,5%) - ácido elágico associado com ácido gálico. ANOVA one-way foi realizada seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni, assumindo\*  $p \leq 0,05$  \*\*  $p \leq 0,01$ .

- **Cinética de liberação *in vitro* de gel tópico de ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e a combinação de ambos (AG+AE)**

Os resultados das formulações revelaram os seguintes dados de quantidade liberada acumulada ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e porcentagem liberada: Ácido gálico (3%) -  $6480,28 \pm 851,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (92,58%) em apenas 1,5 hora; Ácido elágico (3%) -  $3498,19 \pm 233,49 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (51,60%) após 6 horas; Ácido gálico (associado ao elágico) (1,5%) -  $3149,26 \pm 823,94 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (99,91%) em apenas 2 horas; Ácido elágico (associado ao gálico) (1,5%) -  $1979,18 \pm 392,50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (57,06%) após 6 horas. As formulações em associação demonstraram uma notável capacidade de liberar ácido gálico e ácido elágico, indicando seu potencial para aplicação tópica no tratamento de cicatrização.

**Figura 04.** Perfis de liberação *in vitro* de gel tópico de AG, AE e AG+AE.

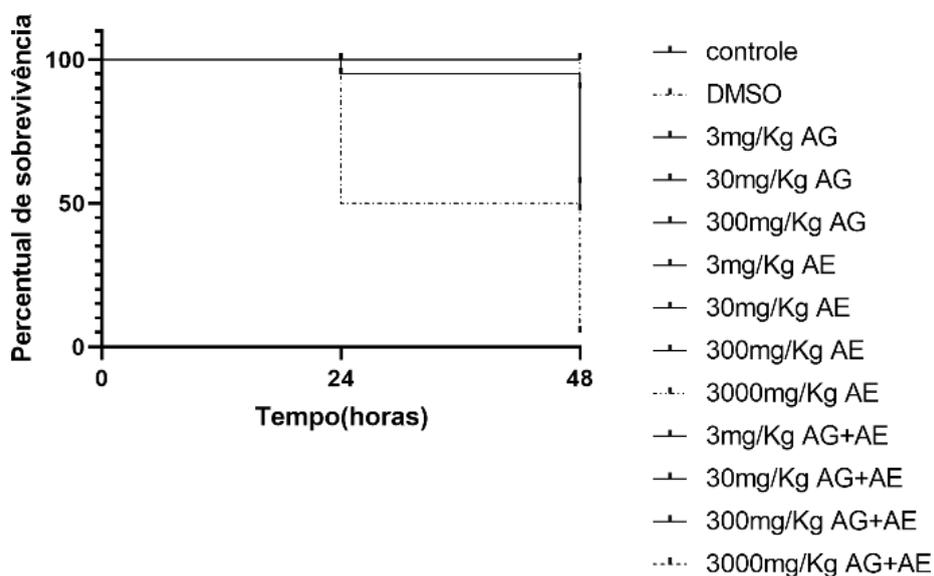


**Legenda:** As formulações de AG e AE liberaram respectivamente: 92,58 %; 51,60 %. Em associação com AG (associado ao elágico) +AE (associado ao gálico) teve um aumento da quantidade liberada correspondendo a 99,91% e 57,06 % respectivamente.

- **Avaliação de toxicidade aguda em larvas de *Z. morio***

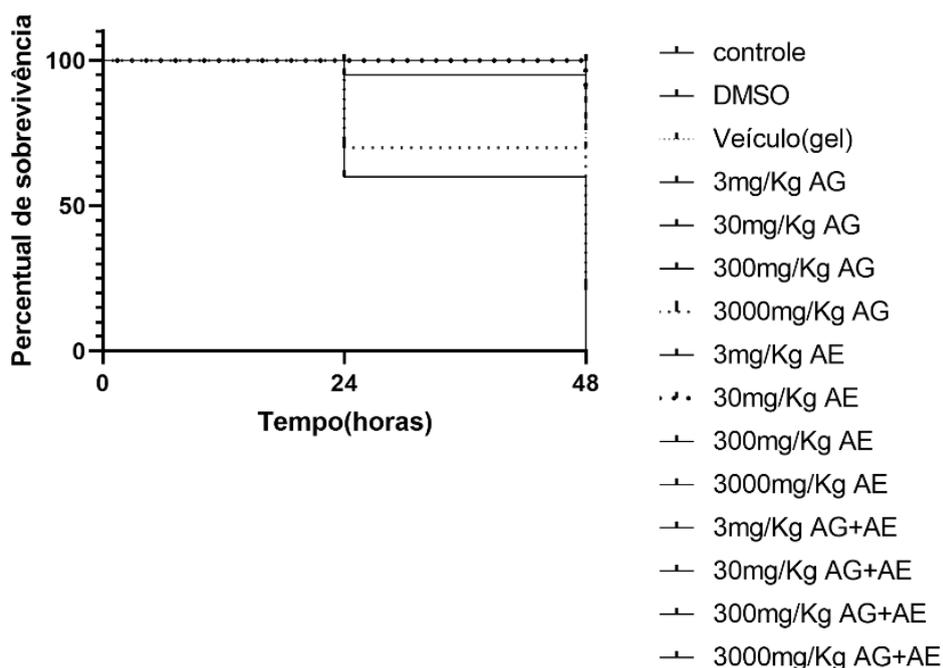
Os resultados dos perfis de sobrevivência das larvas de *Z. morio* expostas a diferentes concentrações de AG, AE e AG+AE, tanto na forma isolada quanto incorporadas ao gel com Poloxamer, são apresentados nas Figuras 05 e 06. Os resultados indicam uma relação dependente da concentração, onde a taxa de sobrevivência das larvas varia de acordo com a dose administrada. No grupo tratado com AG, observou-se uma taxa de sobrevivência de 100% nas doses de 3, 30 e 300 mg/kg. No grupo tratado com AE, as taxas de sobrevivência foram de 100% nas doses de 3, 30 e 300 mg/kg, e de 90% na dose de 3000 mg/kg, com apenas um óbito registrado, já no grupo com a combinação de AG+AE incorporada ao gel de Poloxamer as taxas de sobrevivência foi de 100% para 3 e 30mg/Kg, enquanto para a dose de 300mg/Kg foi de 50% (dois casos de canibalismo entre as larvas) e na dose de 3000mg/Kg a taxa de sobrevivência foi de 60% (Figura 05).

**Figura 05.** Percentual de sobrevivência nos grupos tratados com fármacos em sua forma isolada.



Os resultados da taxa de sobrevivência dos grupos tratados com AG, AE e AG+AE incorporados ao gel com Poloxamer (Fig. 06) demonstraram uma taxa de sobrevivência de 100% nas doses de 3, 30 e 300 mg/kg, no entanto, na dose de 3000 mg/kg, a taxa de sobrevivência foi de 40% no grupo tratado com AG, 100% no grupo tratado com AE nas doses de 3, 30 e 300 mg/kg e 80% na dose de 3000mg/Kg, enquanto para a associação do AG+AE a taxa de sobrevivência foi de 90% na dose de 3 mg/Kg (1 caso de canibalismo), 100% para as doses de 30 e 300 mg/Kg e 80% na dose de 3000 mg/Kg. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre as curvas de sobrevivência do grupo tratado com AG no gel com Poloxamer na dose de 3000 mg/kg, indicando uma toxicidade aguda significativa nessa concentração específica.

**Figura 06.** Percentual de sobrevivência nos grupos tratados com fármacos incorporados ao gel de Poloxamer



- **Dose letal (DL<sub>50</sub>)**

O resultado da avaliação da toxicidade aguda foi registrado na Tabela 02, mostrando a dose letal média necessária para causar a morte de 50% das larvas de *Zophobas morio* em um período de 48 horas. Durante esse tempo, foi observado um máximo de 60% de mortalidade com a concentração de 3000 mg/Kg de ácido gálico incorporado ao gel Poloxamer, apresentando uma DL<sub>50</sub> de 2191,51 mg/Kg. A estimativa da DL<sub>50</sub> foi feita pela Regressão de linear de produto Log<sub>10</sub>.

**Tabela 02.** Avaliação da dose letal (DL<sub>50</sub>) em larvas de *Zophobas morio* de acordo com as concentrações 3,30,300 e 3000 mg/Kg de ácido gálico (AG), ácido elágico (AE), AG+AE puros e na formulação FAG, FAE e FAG+FAE e incorporados ao gel em 48 horas após administração.

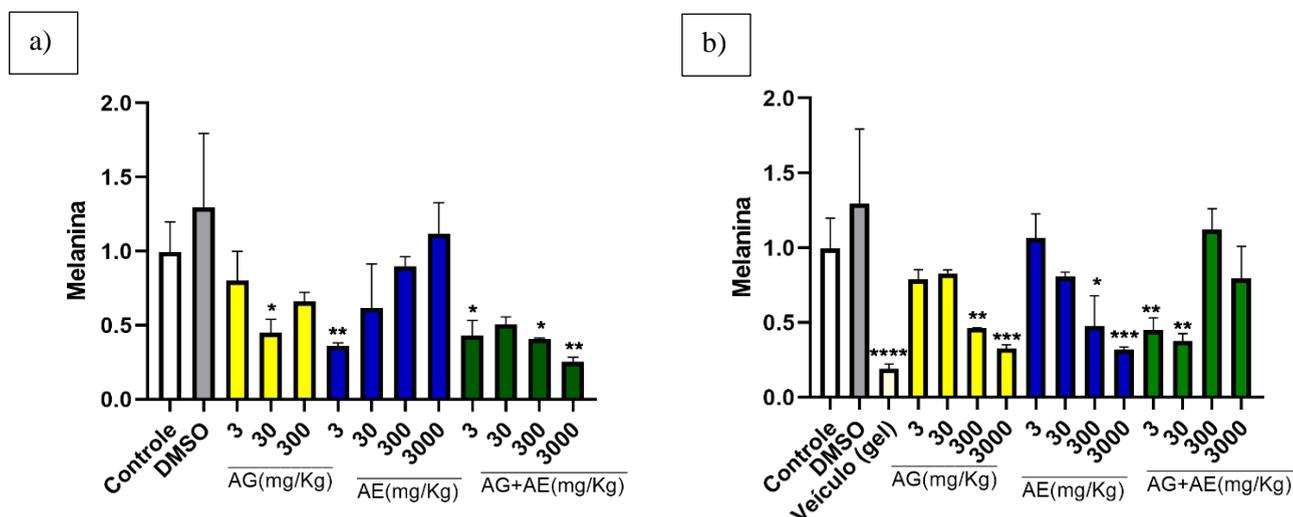
	<b>AG</b>	<b>AE</b>	<b>AG+AE</b>	<b>FAG</b>	<b>FAE</b>	<b>FAG+AE</b>
<b>Dose letal</b>	Dose não calculada	13609,69 mg/Kg	2191,51 mg/Kg	2382,32 mg/Kg	7480,27 mg/Kg	7480,27 mg/Kg

- **Efeitos bioquímicos em larvas de *Zophobas morio* e Atividade das enzimas antioxidantes**

#### Avaliação da melanina em larvas de *Zophobas morio*

As informações observadas na (Figura 07 a/b) demonstram as concentrações de Melanina obtidas após espectrofotometria a 405nm. Diante das comparações realizadas entre os grupos tratamentos e o grupo controle, a figura 07a apresenta diferença significativa nas concentrações 30 mg/Kg do AG, 3mg/Kg do AE e 3, 300,3000 mg/Kg do AG+AE dos fármacos puros. Na figura 07b observou-se uma menor expressão de melanina no veículo (gel), nas concentrações de 300 e 3000 mg/Kg do AG e AE, na associação de AG+AE incorporados ao gel foi observado diferença nas concentrações de 3 e 30mg/Kg quando comparado ao grupo controle. Análise de Bonferroni:  $P < 0,05^*$ ;  $P < 0,01^{**}$  e  $P \leq 0,001^{***}$ .

**Figura 07 (a/b).** Avaliação da melanina em larvas de *Zophobas morio* para diferentes grupos de tratamento. (a) fármacos isolados e (b) fármacos incorporados ao gel.

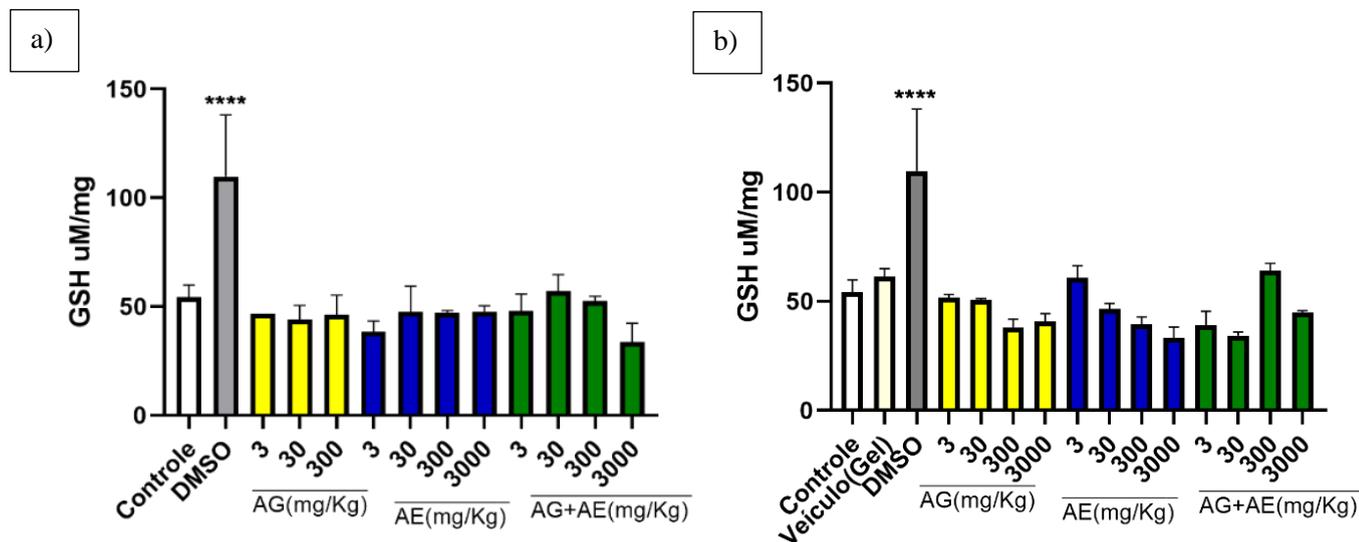


**Legenda:** a) Fármacos isolados (AG, AE e AG+AE) nas concentrações 3,30,300 e 3000mg/Kg e b) fármacos incorporados ao gel de poloxamer (FAG, FAE e FAG+AE) nas concentrações 3,30,300 e 3000mg/Kg. A análise de Bonferroni revelou diferenças estatisticamente significativas com um nível de significância de  $P < 0,05^*$ ,  $P < 0,01^{**}$  e  $p \leq 0,001^{***}$ .

#### Avaliação de Glutathiona reduzida (GSH)

A avaliação foi conduzida utilizando os fármacos isolados e também os fármacos incorporados ao gel contendo Poloxamer. Conforme observado na Figura 08 (a/b), as concentrações dos fármacos isolados e na formulação (a e b) não demonstraram diferenças significativas em relação ao grupo controle. No entanto, quando avaliamos o grupo tratado com DMSO observamos uma diferença significativa em comparação com as demais dosagens ( $P < 0,05$ ), resultando em um aumento na concentração de GSH quando comparada ao grupo controle.

**Figura 08 (a/b).** Concentração de Glutationa Reduzida em larvas de *Zophobas morio* para diferentes grupos de tratamento. (a) fármacos isolados e (b) fármacos incorporados ao gel.

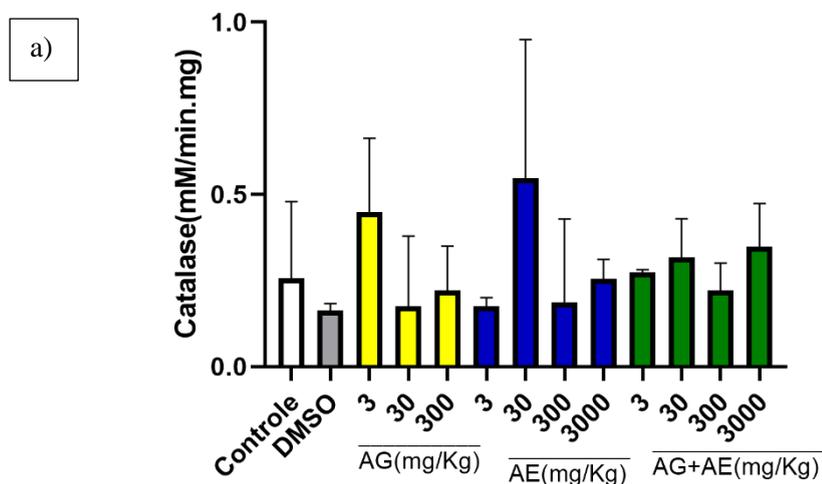


**Legenda:** Concentração de Glutationa Reduzida nos grupos Controle, DMSO, AG (3, 30 e 300mg/Kg) e AE (3, 30, 300 e 3000mg/Kg) e AG+AE (3, 30, 300, 3000mg/Kg), para avaliação dos fármacos isolados e nos grupos Controle, DMSO, AG incorporado ao gel (3, 30, 300, 3000mg/Kg) e AE incorporado ao gel (3, 30, 300, 3000mg/Kg), além da associação de AG+AE incorporado ao gel (3, 30, 300, 3000mg/Kg). Observou-se um aumento de GSH nas larvas tratadas com DMSO. Análise de Bonferroni:  $p \leq 0,001$  \*\*\*\*.

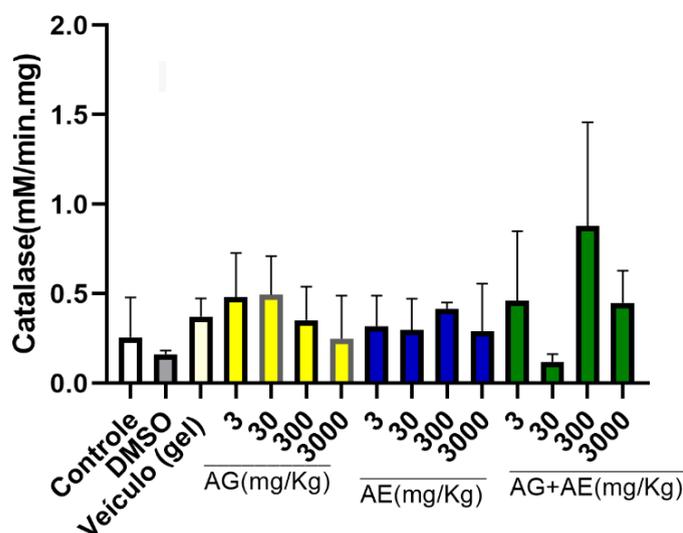
### Avaliação da atividade da catalase

Resultados da atividade enzimática da catalase para o homogenato das larvas tratadas com AG, AE, AG+AE isolados e AG, AE e AG+AE incorporados ao gel com Poloxamer em diferentes concentrações. Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações avaliadas, tanto nos fármacos puros como nos fármacos incorporados ao gel com Poloxamer, conforme ilustrado na Figura 09 (a/b).

**Figura 09 (a/b).** Avaliação da atividade da catalase em larvas de *Zophobas morio* para diferentes grupos de tratamento. (a) fármacos isolados e (b) fármacos incorporados ao gel.



b)



**Legenda:** Avaliação da atividade da catalase nos grupos Controle, DMSO, AG, AE e AG+AE, nas concentrações de 3, 30 e 300 mg/Kg para os fármacos isolados, e nos grupos Controle, DMSO, AG incorporado ao gel nas concentrações de 3, 30, 300 e 3000 mg/Kg, AE incorporado ao gel nas concentrações de 3, 30, 300 e 3000 mg/Kg, e associação de AG+AE incorporado ao gel nas concentrações de 3, 30, 300 e 3000 mg/Kg. Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações dos fármacos puros e os fármacos incorporados ao gel em comparação ao grupo controle.

## 7. DISCUSSÃO

Os resultados observados neste estudo são altamente promissores e destacam o potencial terapêutico do ácido gálico, ácido elágico e sua associação incorporados ao gel de Poloxamer 407®. A principal característica do Poloxamer 407® é a sua termo-reversibilidade, essa característica é o que desperta grande interesse para a otimização de formulações, sendo que abaixo da temperatura de transição, a amostra permanece fluida e acima dela torna-se semissólida (FERREIRA, 2019). Vários fatores influenciam a estabilidade das formulações, dentre eles os extrínsecos, como: temperatura, luz, oxigênio, umidade, material de acondicionamento, micro-organismos e vibração, os intrínsecos que estão relacionados com a natureza da formulação e a interação de seus componentes. Esses fatores geram, principalmente, incompatibilidades físicas e químicas que podem resultar em alterações nas características organolépticas da formulação, separação de fases e redução do teor da substância ativa (QUEIROZ, 2008).

O ciclo gelo-degelo causou uma diminuição do pH ( $p < 0,05$ ) na maioria das amostras, incluindo o gel branco (sem fármaco) e o gel contendo os dois fármacos. A avaliação do pH, além de ser uma medida importante em formulações tópicas, em especial para aquelas que entrarão em contato direto com lesões, permite estudar a estabilidade das formulações ao longo

do tempo. Neste estudo, o pH das formulações (entre 4 e 6) mostrou-se similar ao pH da pele (entre 4,0 e 7,0), que é indicado para uso cutâneo por reduzir as chances de reações de estresse cutâneo, como irritações (FIGUEIREDO et al., 2015; SÁ, 2020). As alterações observadas no teor (%) e na condutividade podem ser atribuídas a diferentes fatores, como a perda de água durante o ciclo de gelo-degelo das formulações, assim como as temperaturas às quais foram submetidas. Esses processos podem levar a uma diminuição na condutividade das amostras e aumentar a concentração dos fármacos presentes. Os estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos procuram fornecer informações que indiquem o grau de estabilidade relativa de um produto nas condições diversas de exposição a que estão submetidos, até seu prazo de validade (SILVA et al., 2022).

A avaliação da toxicidade de uma substância é realizada com o objetivo de prever os efeitos nocivos que a mesma poderá desencadear quando da exposição humana ou animal pelas diversas vias (CAZARIN et al., 2004). Os perfis de sobrevivência de larvas de *Z. Morio* foi realizado a fim de avaliar a toxicidade aguda do ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e associação AG+AE, puros e incorporados ao gel de Poloxamer 407®. De acordo com o teste realizado foi observado que o AG apresentou uma maior toxicidade apresentando 40% na taxa de sobrevivência na dose 3000 mg/Kg na formulação. Quanto a dose letal para 50% dos animais (DL50), foi observado para o AG a DL50 foi de 2191,51 mg/Kg em 48 horas, corroborando com o observado no percentual de sobrevivência. Já o AE, na formulação, teve uma alta taxa de sobrevivência na mesma concentração de 3000 mg/Kg (80%) e 100% nas demais doses, sendo a DL50 de 7480,27 mg/Kg. Essa concentração letal, que é muito alta, mostra a segurança do ácido elágico para uso terapêutico. O teste da concentração letal (CL50) ou dose letal aguda (DL50) é amplamente usado com o objetivo de encontrar a concentração da substância capaz de matar metade dos animais do grupo teste (TREVAN e DALE, 1927).

A toxicidade observada para o ácido gálico, pode ser atribuída à maior liberação do AG proporcionada pelo gel de poloxamer. Estudos anteriores, como o de Alves et al. (2020), também relataram uma quantidade significativa de liberação do AG (73,80%). No entanto, no presente estudo, foi observado uma liberação ainda maior (92,58 %). Essa diferença pode estar relacionada ao uso do aditivo ácido oleico (5%), que pode ter potencializado a solubilização do AG e, conseqüentemente, sua liberação mais pronunciada. Esses resultados indicam a importância da formulação do gel e dos aditivos utilizados na determinação da taxa de liberação e, por conseguinte, na toxicidade observada. Em relação ao uso do ácido oleico como aditivo, estudos anteriores, como o de Coêlho et al. (2018), destacaram os benefícios de sua inclusão

na formulação. Nesse estudo, a formulação contendo poloxâmico (25%), ácido oleico (5%) e manteiga de bacuri (10%) demonstrou um fluxo de liberação satisfatório. Esses resultados são consistentes com nossas próprias observações, indicando que a adição de ácido oleico (5%) pode desempenhar um papel crucial na melhoria da liberação dos componentes ativos da formulação. A formulação de sistemas de liberação de fármacos capazes de transportar e liberar o ácido elágico e ácido gálico no local desejado representa uma abordagem promissora para superar as limitações biofarmacêuticas desses polifenóis, permitindo uma melhor avaliação do seu potencial aplicação como antioxidantes captadores de radicais (ALFEI et al.,2020).

A presença desse aditivo pode ter contribuído para o desempenho positivo do gel no que diz respeito à liberação dos compostos no presente estudo. Em um estudo conduzido por Laurecea et al. em 2001, foi investigada a penetração percutânea do tenoxicam (TEN) utilizando diferentes formulações de gel. De acordo com os resultados, as formulações de gel sem propilenoglicol (PG) e contendo 3% ou 5% de ácido oléico (AO) apresentaram as maiores taxas de liberação do fármaco, semelhante ao que ocorreu com o AG com AO a 5% no presente estudo. Esses achados sugerem que o AO desempenha um papel crucial como potencializador em formulações de TEN, promovendo uma liberação efetiva do fármaco na superfície da pele e melhorando sua penetração percutânea. Dessa forma, o presente estudo destaca a importância do AO como um agente potencializador na formulação de géis contendo AG, AE e AG+AE, fornecendo uma base sólida para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas transdérmicas mais eficazes e personalizadas.

A avaliação da melanina demonstrou uma redução significativa nas concentrações 30 mg/Kg do AG, 3mg/Kg do AE e 3, 300,3000 mg/Kg do AG+AE dos fármacos puros. Observou-se também redução significativa da melanina no grupo veículo (gel), nas concentrações de 300 e 3000 mg/Kg do AG e AE. Na associação de AG+AE incorporados ao gel foi observado diferença nas concentrações de 3 e 30mg/Kg quando comparado ao grupo controle. Os resultados relativos à melanina estão fundamentados no estresse oxidativo, que é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células e tecidos e a capacidade natural dos organismos de desintoxicar espécies reativas abundantes, levando ao dano oxidativo global e ao envelhecimento celular (ALEKSANDROVA et al.,2021). A melanina desempenha um papel crucial na proteção da pele contra os raios ultravioleta, que são conhecidos por gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) (ROSSI, 2022). O ácido elágico e o ácido gálico são polifenóis pertencentes às categorias de elagitaninos e galotaninos, respectivamente, e são produzidos a partir da hidrólise

desses compostos. Esses taninos são sintetizados pelas plantas como parte do sistema de defesa contra ataques microbianos e de animais, e são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e outras atividades biológicas. (OLIVEIRA, 2016).

Na avaliação da glutathione reduzida nas concentrações dos fármacos isolados e na formulação não houve diferenças significativas em relação ao grupo controle. No entanto, quando foi avaliado o grupo tratado com DMSO, que é o controle positivo, foi observado um aumento na concentração de GSH ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo controle negativo, o que é o resultado esperado. Não foi observado diferença significativa na avaliação da catalase quando comparada ao grupo controle, seja nos fármacos puros ou incorporados ao gel. Glutathione é um tripeptídeo composto por L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-glicina, que está presente na maioria das células. A forma reduzida da glutathione (GSH) desempenha várias funções vitais, como manter a estabilidade dos grupos tióis das proteínas, reduzir ligações dissulfeto formadas pelo estresse oxidativo e neutralizar radicais livres. Portanto, a concentração intracelular de GSH é um indicador da capacidade da célula em manter a homeostase, protegendo-se contra agentes oxidantes (BERNO et al., 2010). Ácido elágico e ácido gálico, atuam neutralizando os efeitos negativos do estresse oxidativo, agindo como antioxidantes diretos ou ativando/induzindo sistemas enzimáticos antioxidantes nas células (GUADARRAMA, 2020).

## 8. CONCLUSÃO

Conclui-se que, os géis tópicos contendo ácido gálico, ácido elágico e sua associação demonstraram uma notável capacidade de liberação dos fármacos, especialmente quando veiculados em um gel contendo ácido oleico. Além disso, essas formulações não produziram estresse oxidativo, como evidenciado pela manutenção dos níveis de glutathione e catalase e até protegeram contra o estresse como visto pela redução da melanina em relação ao controle. Esses resultados indicam o potencial dessas formulações no tratamento de afecções cutâneas, fornecendo uma base sólida para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas cutâneas mais eficazes e personalizadas.

## 9. REFERÊNCIAS

ALEKSANDROVA, K.; KOELMAN, L.; RODRIGUES, C. E. Dietary patterns and biomarkers of oxidative stress and inflammation: A systematic review of observational and intervention studies. **Redox Biology**, v. 42, p. 101869, 1 jun. 2021.

ALFEI, S.; MARENGO, B.; ZUCCARI, G. Oxidative Stress, Antioxidant Capabilities, and Bioavailability: Ellagic Acid or Urolithins? **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 8, p. 707, 4 ago. 2020.

ALVES, M. M. DE M. et al. Gallic and Ellagic Acids Are Promising Adjuvants to Conventional Amphotericin B for the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 12, p. e00807-20, 17 nov. 2020.

BAI, S. et al. Ellagic Acid Increases Stress Resistance via Insulin/IGF-1 Signaling Pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 19, p. 6168, 20 set. 2022.

BERNO, L. I. et al. Efeitos do selenio oriundo da torta de castanha-do-brasil sobre a concentracao de glutathiona reduzida (GSH) em ratos Wistar. **Alimentos e Nutricao (Brazilian Journal of Food and Nutrition)**, v. 21, n. 2, p. 231–240, 1 abr. 2010.

BEUTLER, E. (1975) The preparation of red cells for assay. In: Beutler E., Ed., *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Stratton Company, New York, 8-18.

BRAI, A. et al. *Tenebrio molitor* as a Simple and Cheap Preclinical Pharmacokinetic and Toxicity Model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2296, 24 jan. 2023.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, p. 289–299, set. 2004.

COÊLHO, E. DE S. et al. Emulgel based on amphotericin B and bacuri butter (*Platonia insignis* Mart.) for the treatment of cutaneous leishmaniasis: characterization and in vitro assays. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 44, n. 10, p. 1713–1723, out. 2018.

DAHER, C. C. et al. Development of O/W emulsions containing *Euterpe oleracea* extract and evaluation of photoprotective efficacy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 639–652, set. 2014.

DE SOUZA, P. C. et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182–186, nov. 2015.

FERREIRA, E. Desenvolvimento e avaliação de hidrogel baseado em poloxamer- quitosana contendo eugenol para aplicação na mucosa bucal. 4 abr. 2019.

FIGUEIREDO, K. A. et al. In vivo evaluation of anticonvulsant and antioxidant effects of phenobarbital microemulsion for transdermal administration in pilocarpine seizure rat model. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 131, p. 6–12, abr. 2015.

FIGUEIREDO, K. A. et al. Phenobarbital loaded microemulsion: development, kinetic release and quality control. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 251–264, jun. 2016.

GUADARRAMA GUADARRAMA, D. Efecto citotóxico de ácido gálico, ácido tánico, y ácido elálgico sobre la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549. 26 jan. 2023.

HABEEB, A. F. [37] Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. **Methods in Enzymology**, v. 25, p. 457–464, 1972.

LARRUCEA, E. et al. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 113–119, 1 set. 2001.

LEI, C.; SUN, X. Comparing lethal dose ratios using probit regression with arbitrary slopes. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 61, dez. 2018.

LIN, Y. et al. Gallic Acid Alleviates Gouty Arthritis by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation and Pyroptosis Through Enhancing Nrf2 Signaling. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 580593, 2020.

OLIVEIRA, L. M. L. DE [UNESP. *Punica granatum*: quantificação de polifenóis de extratos e potencial antifúngico contra *Candida albicans*. 19 jan. 2016.

PANDEY, M. S.; BELGAMWAR, V. S.; SURANA, S. J. Topical Delivery of Flurbiprofen from Pluronic Lecithin Organogel. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 1, p. 87–90, 2009.

QUEIROZ, M. B. R. Desenvolvimento e estudo da estabilidade de gel com extrato de matricaria (*L.*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica comparada com gel de diclofenaco sódico. 27 jun. 2008.

ROSSI, B., F (2022). **MODULAÇÃO DAS ENZIMAS CATALASE E SUPERÓXIDO DISMUTASE EM TECIDOS ANIMAL E VEGETAL EXPOSTOS A NARINGENINA LIVRE E ENCAPSULADA**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão.

SÁ, F. A. P. DE. Desenvolvimento de sistemas de liberação de paromomicina visando o tratamento tópico passivo e iontoforético de lesões decorrentes da leishmaniose tegumentar. 27 abr. 2020.

SILVA, R. E. M. N. E et al. Formulação farmacêutica a base de quitosana e extrato de *Schinus terebinthifolius* Raddi: desenvolvimento e estudo tecnológico. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e50311825006–e50311825006, 27 jun. 2022.

SINGH, V. K. et al. Guar gum and sesame oil based novel bigels for controlled drug delivery. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v. 123, p. 582–592, 1 nov. 2014.

STRICKLAND, J. et al. Status of acute systemic toxicity testing requirements and data uses by U.S. regulatory agencies. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 94, p. 183–196, abr. 2018.

TREVAN, J. W.; DALE, H. H. The error of determination of toxicity. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character**, v. 101, n. 712, p. 483–514, jan. 1997.

UR-REHMAN, T.; TAVELIN, S.; GRÖBNER, G. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 409, n. 1–2, p. 19–29, 16 maio 2011.

## CAPÍTULO 2

**Potencial terapêutico do ácido gálico, ácido elágico e sua associação incorporados  
ao gel de Poloxamer 407 na cicatrização de feridas em ratos**

Therapeutic Potential of Gallic Acid, Ellagic Acid, and Their Combination Incorporated  
into Poloxamer 407 Gel on Wound Healing in Rats

**Potencial terapêutico do ácido gálico, ácido elágico e sua associação incorporados  
ao gel de Poloxamer 407 na cicatrização de feridas em ratos**

*Therapeutic Potential of Gallic Acid, Ellagic Acid, and Their Combination  
Incorporated into Poloxamer 407 Gel on Wound Healing in Rats*

Campelo, J.; E.; S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina,  
PI, Brasil.  
jamilly\_erica@hotmail.com

**Resumo**

Neste estudo, foi realizada a avaliação do efeito do ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e sua associação ao gel de poloxamer 407, com foco na cicatrização de feridas cutâneas. Após sete dias do início do tratamento, todos os grupos apresentaram a formação de crostas que se estenderam até o tecido subcutâneo. Além disso, ao longo do período de tratamento, verificou-se uma regressão progressiva das feridas nos grupos tratados com ácido elágico com a associação de ácido gálico e ácido elágico, superando os demais grupos (grupo controle negativo, grupo controle positivo e ácido gálico). Na análise final, aos 21 dias, a combinação desses ácidos demonstrou ser particularmente eficaz na promoção da regeneração e na redução das feridas cutâneas. Esses resultados fornecem evidências sólidas do potencial terapêutico do ácido elágico e sua associação com ácido gálico na aceleração do processo de cicatrização cutânea. Com base nesses achados, conclui-se que a combinação de AG+AE foi mais eficaz do que o medicamento de referência utilizado como controle positivo, assim essa combinação quando incorporada ao gel de poloxamer 407, mostrou-se promissora como agente tópico para promover a cicatrização de feridas, podendo servir de base para o desenvolvimento de um novo cicatrizante de uso tópico.

Palavras-chave: Associação de drogas, regeneração, produtos naturais, cicatrização, gel, terapia tópica.

**Potencial terapêutico do ácido gálico, ácido elágico e sua associação incorporados  
ao gel de Poloxamer 407 na cicatrização de feridas em ratos**

*Therapeutic Potential of Gallic Acid, Ellagic Acid, and Their Combination  
Incorporated into Poloxamer 407 Gel on Wound Healing in Rats*

Campelo, J.; E.; S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Doutoranda em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Piauí, Teresina,  
PI, Brasil.  
jamilly\_erica@hotmail.com

Abstract

In this study, we evaluated the effect of gallic acid (GA), ellagic acid (EA), and their association with poloxamer 407 gel on cutaneous wound healing. After seven days of treatment initiation, all groups presented the formation of crusts that extended to the subcutaneous tissue. Moreover, throughout the treatment period, a progressive regression of wounds was observed in the groups treated with ellagic acid in association with gallic acid and ellagic acid, surpassing the other groups (negative control group, positive control group, and gallic acid group). In the final analysis at 21 days, the combination of these acids demonstrated to be particularly effective in promoting skin regeneration and reducing cutaneous wounds. These results provide robust evidence of the therapeutic potential of ellagic acid and its association with gallic acid in accelerating the cutaneous healing process. Based on these findings, it is concluded that the combination of GA+EA was more effective than the reference drug used as a positive control, thus showing promise as a topical agent to promote wound healing, which could serve as a basis for the development of a new topical healing product.

Keywords: Drug combination, regeneration, natural products, wound healing, gel, topical therapy.

## 10. INTRODUÇÃO

Feridas são lesões que comprometem a integridade da pele, resultando em alterações na sua estrutura anatômica e fisiológica. Podem ser causadas por danos elétricos, térmicos, químicos ou mecânicos, decorrentes de questões terapêuticas, físicas ou distúrbios que afetam o tecido vivo. (ABDULLAH et al.,2018). A cicatrização de feridas é um processo complexo de substituição das células danificadas e das camadas de tecido. As feridas agudas seguem estágios bem definidos de cicatrização, com sinais evidentes em até quatro semanas. No entanto, feridas crônicas não progredem normalmente nesses estágios e não apresentam cicatrização aparente dentro desse período. Vários fatores, como a localização da ferida, mediadores sistêmicos, tipo de lesão e presença de doenças subjacentes, influenciam o processo de cicatrização. O tratamento de feridas geralmente envolve estratégias como fechamento físico da margem da ferida, suturas e curativos. Em casos em que a ferida é inacessível, a abordagem é permitir que a área danificada se limpe e se preencha com tecido conjuntivo, ocorrendo a cicatrização sequencialmente por fases (TRINH et al., 2022).

O processo de cicatrização de feridas envolve as fases de hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (YAMAUCHI et al., 2016). A fase inicial no processo de cicatrização de feridas é a fase inflamatória, que é considerada uma etapa crítica do processo de cicatrização de feridas e essencial para a prevenção de infecções e envolvida na regeneração tecidual (EO et al., 2026).

A combinação de drogas é amplamente usada para melhorar a eficácia do tratamento, reduzir a toxicidade para as células saudáveis e evitar o desenvolvimento de resistência aos medicamentos. O objetivo principal é obter interações sinérgicas, que demonstram a superioridade da combinação em relação aos medicamentos individuais. Isso permite alcançar resultados mais expressivos com menor utilização de recursos. Encontrar métodos eficientes para comprovar os benefícios da combinação é essencial para aproveitar ao máximo essa estratégia terapêutica (DUARTE e VALE, 2022).

O ácido gálico (AG) é um composto orgânico de polifenol, conhecido por suas propriedades anti-inflamatórias, demonstradas em diversos estudos. O AG tem a capacidade de inibir a produção de fatores inflamatórios, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e proteína semelhante à tioredoxina-4B, que são ativados pelo NF- $\kappa$ B. Além disso, o AG reduz a secreção de mediadores pró-inflamatórios, como NO, PGE2 e IL-6, de forma dependente

da dose. Além de suas propriedades anti-inflamatórias, o AG também possui efeito antioxidante. Ele pode atravessar a membrana do lipossoma e reagir com o radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH), o que contribui para a prevenção da lesão causada pelo estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas (WEN et al., 2022). O ácido elágico, um derivado dimérico do ácido gálico, é reconhecido por sua atividade antioxidante. Ele demonstra uma poderosa capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio (EROS) e também exibe outros efeitos biológicos, como atividades anticancerígenas e anti-inflamatórias (NEAMATALLAH et al., 2020).

Considerando todas essas características do ácido gálico e elágico, é essencial avaliar o sinergismo dessas substâncias para determinar seu potencial terapêutico na cicatrização de feridas em ratos wistar. Essa análise se faz necessária para explorar o potencial terapêutico desses compostos e seu possível impacto positivo no processo de cicatrização de feridas. Em nossa pesquisa, realizamos a avaliação da atividade cicatrizante por meio da indução de feridas em ratos. O fechamento dessas feridas foi observado utilizando-se Ácido Gálico (AG), Ácido Elágico (AE) e a associação AG+AE incorporados em um gel de poloxamer 407. Essa abordagem nos permitiu investigar o efeito dessas substâncias na cicatrização das feridas, proporcionando insights importantes sobre seu potencial terapêutico.

## **11. MATERIAL E MÉTODOS**

### **11.5. Substâncias utilizadas**

O Ácido elágico (AE) (Lote: 202204477-100G) foi obtido da ActivePharmaceutica (Brasil) e o Ácido gálico (AG) (Lote: 0178/1122) foi obtido pela ACS Reagentes (Brasil). O Poloxamer 407® foi obtido da ChemSpecs e o ácido oleico adquirido na Synth (Brasil).

### **11.6. Caracterização do gel tópico de ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e associação de AG+AE**

Para obter o gel contendo ácido gálico (AG), ácido elágico (AE) e a combinação de ambos (AG+AE), o Poloxamer 407® (20%) foi hidratado sob refrigeração por 24 horas. Em seguida, os fármacos foram incorporados por levigação com ácido oleico a uma concentração de 5%. Após 24 horas do preparo das formulações, verificou-se macroscopicamente a homogeneização e estabilização das mesmas (PANDEY et al., 2009); (UR-REHMAN et al., 2011). As formulações de AG e AE foram utilizadas na

concentração de 3% (ALVES et al. 2020), enquanto que para a formulação contendo a associação, essa concentração foi reduzida para 1,5% de cada composto, a fim de avaliar o efeito da combinação.

As formulações apresentaram pH compatível com a pele (4,0 e 6,0), teor 95,86% a 101,35% e liberação Ácido gálico (3%) -  $6480,28 \pm 851,02 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (92,58%) em apenas 1,5 hora; Ácido elágico (3%) -  $3498,19 \pm 233,49 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (51,60%) após 6 horas; Ácido gálico (associado ao elágico) (1,5%) -  $3149,26 \pm 823,94 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (99,91%) em apenas 2 horas; Ácido elágico (associado ao gálico) (1,5%) -  $1979,18 \pm 392,50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (57,06%) após 6 horas.

### **11.3 Drogas e produtos químicos**

Ácido gálico (3%), ácido elágico (3%), (1,5%) de AG+( 1,5%) de AE, ácido oleico (5%), poloxamer 407 (20%), tiopental sódico (150mg kg<sup>-1</sup>, i.p.), 90 mg de Ketamina + 10 mg de Xilazina por kg de PC, colagenase 1,2 U/g.

### **11.4. Animais**

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar (250g) com 60 dias de idade, pesando 250g, provenientes do biotério da Universidade Estadual do Piauí, localizado no centro de pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estadual do Piauí (UESPI) - Teresina – PI. Os animais foram mantidos em gaiolas-padrão, mantidos a  $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  e ciclo claro-escuro de 12 h com água e ração à vontade. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UESPI, número **008613/2023-67**.

### **11.5. Indução da ferida**

Para a realização das cirurgias, os animais foram anestesiados (associação de 90 mg de Ketamina + 10 mg de Xilazina por kg de PC, via intraperitoneal). Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito frontal e a região dorsal foi epilada. Foi realizada a assepsia do local utilizando álcool 70%. Posteriormente, um punch cirúrgico foi utilizado para delimitar uma área de 1,2 cm, removendo a pele até atingir a fáscia muscular, resultando na criação de três lesões dermatológicas padronizadas (Figura 01). Após a realização da cirurgia, os animais foram alocados em gaiolas, sendo seis animais por gaiola, agrupados de acordo com o tratamento a ser administrado. O tratamento com os géis tópicos foi iniciado aproximadamente 20 minutos após a cirurgia, com aplicações

diárias realizadas sempre no mesmo horário em todos os grupos de tratamento (OTTERÇO et al.,2018).

**Figura 01-** Ilustração das três feridas dermatológicas



Fonte: Arquivo pessoal.

### 11.6. Agrupamento e tratamento tópico

Para avaliar a cicatrização de feridas cutâneas da formulação, foram utilizados modelos de excisão de feridas. Os ratos foram divididos em cinco grupos (n = 6) de acordo com o tratamento a que foram submetidos:

Grupo controle → placebo, tratado com gel de Polaxamer® vazio
Grupo controle positivo → colagensase 1,2U/g – medicamento de referência
Grupo AG 3% com ácido oleico 5%
Grupo AE 3% com ácido oleico 5%
Grupo AG 1,5% + AE 1,5% com ácido oleico 5%, todos em gel de Polaxamer®.

Todos os grupos foram tratados topicamente com 1 ml da formulação em cada aplicação indicada para cada grupo, utilizando-se seringa de dose sem agulha. Os grupos foram tratados e avaliados durante 21 dias, sendo constituído o dia 0 (dia da indução da lesão) e dia 7, 14 e 21 (após a indução da lesão, respectivamente).

### 11.7. Fotogrametria digital - análise macroscópica

A fotogrametria digital foi realizada imediatamente após a incisão da lesão e no 7º, 14º e 21º dias de tratamento. A imagem digital foi obtida com uma câmera de

smartphone (iPhone XR, 2018, Apple, Estados Unidos) com resolução de 12 megapixels. A câmera foi fixada em uma base e mantida a uma distância constante de 12cm. O diâmetro das feridas foi medido usando o software ImageJ (versão 1.39u) e as diretrizes de calibração do programa foram seguidas para determinar a área da lesão. Cada imagem foi aberta no programa e em seguida foi realizada a mensuração da distância de 1cm na régua que foi fotografada juntamente com a ferida, para a escolha da escala em centímetros, por meio da ferramenta Straight line selection e a opção Set scale na guia Analyze . Na sequência foi utilizada a ferramenta de corte (Cut) da guia Edit para isolar ao máximo apenas a ferida. Após esse procedimento a imagem foi convertida para o tipo 8 bit na guia Image, na função Type . Posteriormente a imagem resultante foi submetida à ferramenta analyze particles da guia analyze, que forneceu a área final da ferida em centímetros (RODRIGUES et al.,2013). Após a conclusão do experimento, todos os animais foram submetidos à eutanásia por meio de uma dose excessiva de anestésico, composta por cetamina (320mg/Kg) e xilazina (40mg/Kg) (MEIRELLES et al.,2008).

### **11.8. Análises estatísticas**

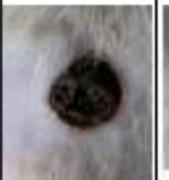
Os dados serão apresentados como a média  $\pm$  SEM. O delineamento será inteiramente casualizado. A análise estatística será realizada através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  serão considerados como diferenças significativas entre as médias.

## **12. RESULTADOS**

- **Fotogrametria digital - Análise macroscópica da evolução do processo de cicatrização de feridas**

Com base na avaliação macroscópica, foi observado uma melhora significativa na cicatrização das feridas nos grupos tratados com ácido elágico (AE) e ácido gálico associado ao ácido elágico (AG+AE) (conforme mostrado na Figura 02). Aos sete dias após a lesão, todos os espécimes dos cinco grupos apresentaram a formação de crostas que se estendiam para o tecido subcutâneo. Além disso, ao longo do tratamento, foi notada uma regressão progressiva das feridas nos grupos tratados com AE e AG+AE, sendo que aos 21 dias a associação desses ácidos demonstrou ser mais eficaz na promoção da regressão das feridas. Essa tendência de melhora pode ser visualizada nos gráficos a seguir (Figuras 03, 04 e 05), os quais demonstram a porcentagem de regressão em cada grupo estudado.

**Figura 02** - Lesões induzidas para avaliação da cicatrização durante os períodos experimentais.

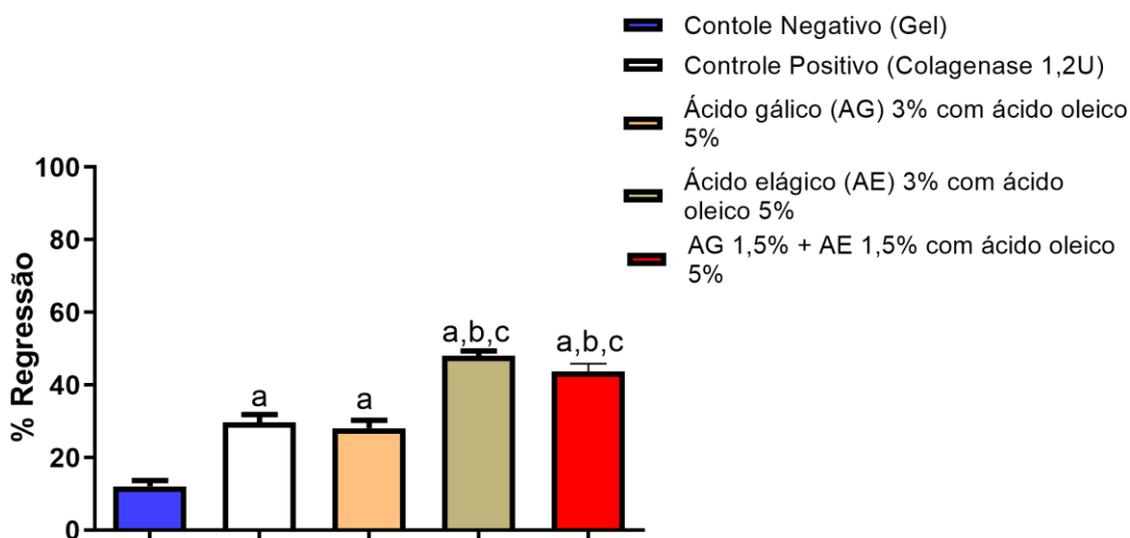
Grupos	Avaliação do fechamento da lesão			
	D0	D7	D14	D21
Grupo controle negativo (Gel Poloxamer407)				
Grupo controle positivo (Colagenase 1,2U)				
Grupo tratamento (AG 3% com AO5%)				
Grupo tratamento (AE 3% com AO5%)				
Grupo tratamento (AG (1,5%)+AE (1,5%) com AO5%)				

**Legenda:** Tratamento tópico nas lesões com Ácido Gálico (AG), Ácido Elágico (AE), AG+AE, gel (veículo) e colagenase 1,2U (controle positivo).

- **Representação gráfica da área da lesão por regressão ao longo do tempo nos diferentes grupos de tratamento (Figura 03, 04 e 05).**

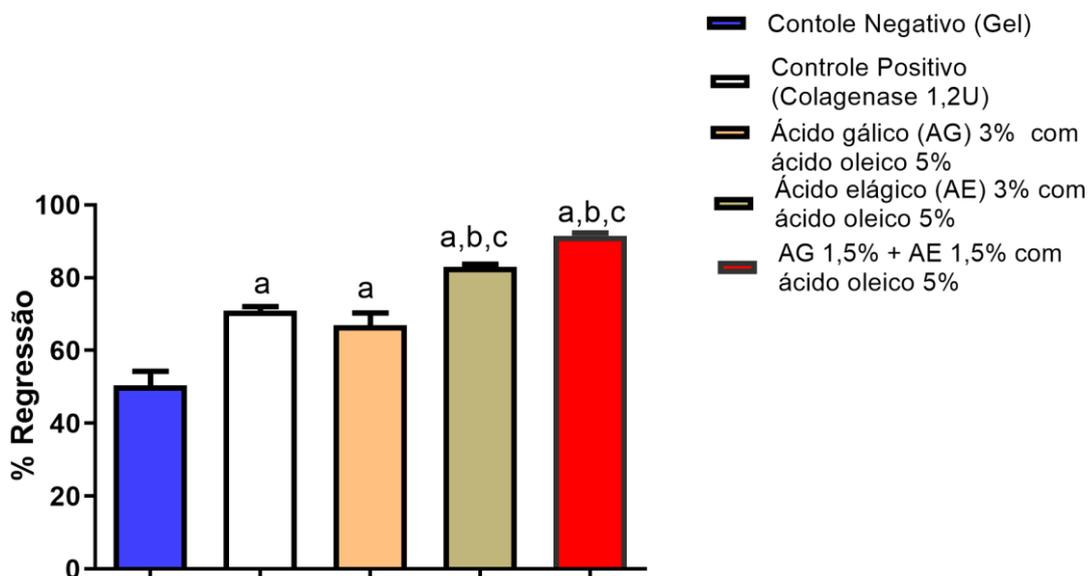
Controle negativo (gel), controle positivo (colagenase 1,2U), grupo 3 (ácido gálico 3% com ácido oleico 5%), grupo 4 (ácido elágico 3% com ácido oleico 5%) e grupo 5 (ácido gálico 1,5% + ácido elágico 1,5% com ácido oleico 5%).

**Figura 03** - Avaliação da regressão de feridas nos primeiros 7 dias, comparando as lesões tratadas com ácido gálico (AG), ácido elágico (AE), ácido gálico associado ao ácido elágico (AG+AE), controle positivo (Colagenase 1,2 U) e controle negativo (gel).



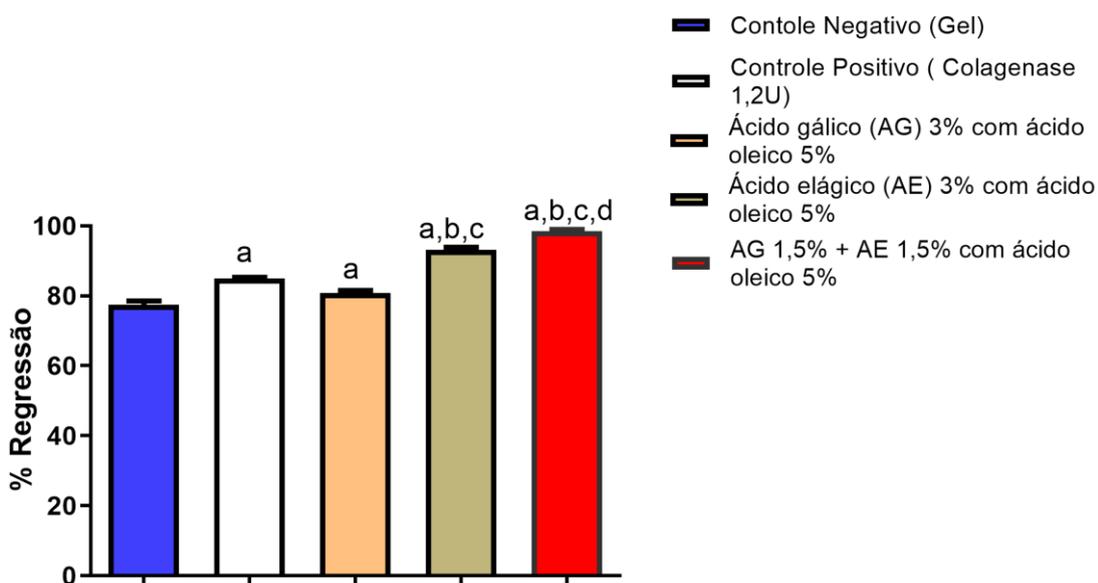
Legenda: a= $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo Controle Negativo; b= $p < 0,005$  quando comparado ao grupo Controle Positivo; c= $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo 3.

**Figura 04** - Avaliação da regressão de feridas aos 14 dias, comparando as lesões tratadas com ácido gálico (AG), ácido elágico (AE), ácido gálico associado ao ácido elágico (AG+AE), controle positivo (Colagenase 1,2 U) e controle negativo (gel).



Legenda: a= $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo Controle Negativo; b= $p < 0,005$  quando comparado ao grupo Controle Positivo; c= $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo 3

**Figura 05** - Avaliação da regressão de feridas aos 21 dias, comparando as lesões tratadas com ácido gálico (AG), ácido elágico (AE), ácido gálico associado ao ácido elágico (AG+AE), controle positivo (Colagenase 1,2 U) e controle negativo (gel).



Legenda: a= $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo Controle Negativo; b= $p < 0,005$  quando comparado ao grupo Controle Positivo; c= $p < 0,0001$  quando comparado ao grupo 3; d= $p < 0,0008$  quando comparado ao grupo 4.

### 13. Discussão

Esses resultados fornecem evidências sólidas do potencial terapêutico do ácido elágico e sua associação com ácido gálico na aceleração do processo de cicatrização cutânea. A cicatrização de feridas é um processo biológico essencial que está diretamente relacionado ao crescimento e regeneração dos tecidos. Durante esse processo, diversos elementos celulares e da matriz interagem para restaurar a integridade do tecido lesado e diversas propriedades de substâncias contribuem para acelerar a cicatrização, entre eles o efeito proliferativo, anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano e estimulante da angiogênese (TIWARI e PATHAK, 2023).

As substâncias em teste nesta pesquisa apresentam várias dessas propriedades. Assim, o ácido gálico tem efeito antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano. Essas propriedades podem ajudar a reduzir o estresse oxidativo, combater a inflamação e prevenir infecções, o que pode ser benéfico para a cicatrização de feridas. Além disso, o ácido gálico tem sido associado à estimulação do crescimento de fibroblastos, que são células envolvidas na produção de colágeno, uma proteína essencial para a formação de tecido cicatricial (SELVARAJ et al., 2022). Os fibroblastos desempenham um papel importante na cicatrização de feridas, incluindo feridas cutâneas. Durante esse processo, eles migram, proliferam e se transformam em células envolvidas em vários processos-chave, como a criação de uma nova estrutura de colágeno (STADELMANN et al., 1998). Estudos realizados por Yang et al. (2016) investigaram os efeitos do ácido gálico (AG) na cicatrização de feridas em condições normais e hiperglicídicas. Os resultados sugerem que o AG possui um efeito migratório sobre os fibroblastos e pode ser considerado um potencial agente terapêutico para tratar distúrbios cutâneos, incluindo problemas na cicatrização de feridas.

O ácido elágico (AE), outro tipo de ácido fenólico, também possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (NIRWANA et al., 2021). Estudos sugerem que o ácido elágico pode estimular a proliferação de células da pele, melhorar a síntese de colágeno e acelerar a cicatrização de feridas (YUNIARTI et al., 2018). Pesquisas realizadas por Al-Obaidi et al. (2014) concluíram que o AE acelerou o processo de cicatrização em alvéolos de ratos após a extração dentária. Esses achados sugerem o potencial do ácido elágico como um agente promissor na promoção da cicatrização de feridas. Um estudo conduzido por Yuniarti et al. (2018) investigou os efeitos da administração de extrato de romã padronizado a 7,5% com 40% de ácido elágico em feridas incisadas de ratos albinos por um período de 14 dias. Os resultados demonstraram que essa administração acelerou o processo de cicatrização de feridas, evidenciado pela melhora na deposição de colágeno,

infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) na área da ferida, angiogênese e grau de fibrose. Esses achados sugerem o potencial terapêutico do extrato de romã com alto teor de ácido elágico na promoção da cicatrização de feridas.

Neste estudo, essas substâncias foram incorporadas a um gel para obter uma formulação farmacêutica semissólida adequada para uso tópico. Os géis tópicos contêm um componente essencial chamado agente gelificante, que, quando dissolvido em um meio, forma uma rede tridimensional de partículas responsáveis pela viscosidade e pelo estado semi-sólido do gel (MENDONSA et al., 2018). O Poloxamer 407 (P407) é um exemplo de agente gelificante amplamente utilizado em diversos produtos farmacêuticos, como soluções orais, suspensões, formulações para inalação, formulações intravenosas (IV) e formulações oftálmicas ou tópicas. Reconhecido como um "ingrediente inativo" pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (FAKHARI et al., 2017), o P407 é um surfactante não iônico com capacidades emulsificantes, solubilizadoras de medicamentos e intensificadoras de viscosidade. Sua versatilidade o torna um componente frequente em várias formulações farmacêuticas. Esse agente gelificante é capaz de proporcionar viscosidade e consistência adequadas ao gel, facilitando sua aplicação tópica (CHUNG et al., 2020).

Em nossos estudos, os experimentos foram conduzidos com diferentes substâncias, incluindo ácido gálico 3% com ácido oleico 5%, ácido elágico 3% com ácido oleico 5%, e uma combinação de ácido gálico (1,5%) e ácido elágico (1,5%) com ácido oleico 5%. Foi avaliado o processo de cicatrização em feridas induzidas em ratos Wistar ao longo de 21 dias (nos dias 0, 7, 14 e 21). Durante a avaliação macroscópica por fotogrametria digital, pudemos observar uma regressão gradual das lesões tratadas com as substâncias, sendo mais evidente nos grupos tratados com ácido gálico e elágico em combinação. Essa observação macroscópica foi confirmada por meio da análise da regressão das feridas usando o software ImageJ (versão 1.39u), onde foi observada a maior porcentagem de regressão no grupo que recebeu a associação de ácido gálico e elágico, corroborando os resultados da avaliação macroscópica.

Em síntese, tanto o ácido gálico quanto o ácido elágico possuem propriedades antioxidantes compartilhadas, o que contribui para reduzir o estresse oxidativo nas células envolvidas no processo de cicatrização. Além disso, ambos os compostos possuem propriedades anti-inflamatórias, o que pode auxiliar no controle da resposta inflamatória, além da atividade antimicrobiana observada no ácido gálico e estimulante da proliferação dos fibroblastos, e o ácido elágico apresenta atividade angiogênica. Assim a associação de AG+AE incorporado ao gel poloxamer apresentam uma combinação de substâncias

favoráveis ao processo de cicatrização o que explica os resultados da maior taxa de regressão das feridas.

Até o momento, não foram conduzidos estudos específicos sobre a associação do ácido gálico e ácido elágico na cicatrização. No entanto, ao avaliar a liberação na combinação de AG + AE, foram identificados dois tempos de liberação distintos, resultando em uma notável melhora na eficácia do processo de cicatrização em feridas tratadas. Essa diferença nos tempos de liberação pode ter sido influenciada pelo tamanho das moléculas avaliadas. Essa descoberta destaca o potencial excepcional da combinação desses dois compostos, visto que a eficácia da associação superou significativamente a eficácia das substâncias isoladas. Além disso, foi superior ao da formulação de referência, que contém apenas colagenase, o que é perfeitamente explicável pelo fato de a associação estudada conter duas substâncias com uma variedade de efeitos complementares na aceleração do processo cicatricial.

#### 14. CONCLUSÃO

Conclui-se que a combinação de AG+AE foi mais eficaz que as formulações das substâncias isoladas, assim como ao medicamento de referência utilizado como controle positivo, de modo que se obteve uma formulação eficaz como agente tópico para promover a cicatrização de feridas, podendo servir de base para o desenvolvimento de um novo cicatrizante comercial de uso tópico.

#### 15. REFERÊNCIAS

ALVES, M. M. DE M. et al. Gallic and Ellagic Acids Are Promising Adjuvants to Conventional Amphotericin B for the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 12, p. e00807-20, 17 nov. 2020.

ABDULLAH, B. J.; ATASOY, N.; OMER, A. K. Evaluate the effects of platelet rich plasma (PRP) and zinc oxide ointment on skin wound healing. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 37, p. 30–37, 4 dez. 2018.

AL-OBAIDI, M. M. J. et al. Protective effect of ellagic acid on healing alveolar bone after tooth extraction in rat--a histological and immunohistochemical study. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 9, p. 987–999, set. 2014.

CHUNG, E. P. et al. Dual Asymmetric Centrifugation Efficiently Produces a Poloxamer-Based Nanoemulsion Gel for Topical Delivery of Pirfenidone. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 7, p. 265, 2 out. 2020.

DUARTE, D.; VALE, N. Evaluation of synergism in drug combinations and reference

models for future orientations in oncology. **Current Research in Pharmacology and Drug Discovery**, v. 3, p. 100110, 2022.

EO, H.; LEE, H.-J.; LIM, Y. Ameliorative effect of dietary genistein on diabetes induced hyper-inflammation and oxidative stress during early stage of wound healing in alloxan induced diabetic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 478, n. 3, p. 1021–1027, 23 set. 2016.

FAKHARI, A.; CORCORAN, M.; SCHWARZ, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. **Heliyon**, v. 3, n. 8, p. e00390, 30 ago. 2017.

MEIRELES, G. C. S. et al. Effectiveness of laser photobiomodulation at 660 or 780 nanometers on the repair of third-degree burns in diabetic rats. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 26, n. 1, p. 47–54, fev. 2008.

MENDONSA, N. S. et al. Development of poloxamer gel formulations via hot-melt extrusion technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 537, n. 1, p. 122–131, 15 fev. 2018.

NEAMATALLAH, T. et al. Nano Ellagic Acid Counteracts Cisplatin-Induced Upregulation in OAT1 and OAT3: A Possible Nephroprotection Mechanism. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 13, p. 3031, 2 jul. 2020.

NIRWANA, I. et al. Cytotoxicity and proliferation evaluation on fibroblast after combining calcium hydroxide and ellagic acid. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 12, n. 1, p. 27–31, 2021.

OTTERÇO, A. N. et al. Photobiomodulation mechanisms in the kinetics of the wound healing process in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, p. 22–29, 1 jun. 2018.

PANDEY, M. S.; BELGAMWAR, V. S.; SURANA, S. J. Topical Delivery of Flurbiprofen from Pluronic Lecithin Organogel. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 1, p. 87–90, 2009.

RODRIGUES DF, MENDES FF, DIAS TA, LIMA AR, SILVA LAF. O programa ImageJ como ferramenta de análise morfométrica de feridas cutâneas. *Encicl Biosf* 2013;9(17):1955

SELVARAJ, S.; AMARAL, J. M.; MURTY, V. R. Kinetics and antimicrobial activity of gallic acid by novel bacterial co-culture system using Taguchi's method and submerged fermentation. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 9, p. 584, 1 set. 2022.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, v. 176, n. 2, Supplement 1, p. 26S-38S, 1 ago. 1998.

TIWARI, R.; PATHAK, K. Local Drug Delivery Strategies towards Wound Healing. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 634, 13 fev. 2023.

TRINH, X.-T. et al. A Comprehensive Review of Natural Compounds for Wound Healing: Targeting Bioactivity Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9573, 24 ago. 2022.

UR-REHMAN, T.; TAVELIN, S.; GRÖBNER, G. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 409, n. 1–2, p. 19–29, 16 maio 2011.

WEN, L. et al. Gallic Acid Alleviates Visceral Pain and Depression via Inhibition of P2X7 Receptor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6159, 31 maio 2022.

YAMAUCHI, M. et al. Wound healing delays in  $\alpha$ -Klotho-deficient mice that have skin appearance similar to that in aged humans - Study of delayed wound healing mechanism. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 4, p. 845–852, 13 maio 2016.

YANG, D. J. et al. Gallic Acid Promotes Wound Healing in Normal and Hyperglucidic Conditions. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 21, n. 7, p. 899, 8 jul. 2016.

YUNIARTI, W. M.; PRIMARIZKY, H.; LUKISWANTO, B. S. The activity of pomegranate extract standardized 40% ellagic acid during the healing process of incision wounds in albino rats (*Rattus norvegicus*). **Veterinary World**, v. 11, n. 3, p. 321–326, mar. 2018.

## 16. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostram que as formulações farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico são eficazes e serão úteis para o desenvolvimento de medicamentos comerciais para o tratamento de afecções cutâneas. Conclui-se que os ácidos gálico e elágico, juntamente com o uso de agentes gelificantes como o Poloxamer 407, representam uma área promissora de pesquisa para o desenvolvimento de terapias inovadoras que possam melhorar a cicatrização de feridas e contribuir para a saúde da pele.

## 17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

AL ZAHRANI, N. A.; EL-SHISHTAWY, R. M.; ASIRI, A. M. Recent developments of gallic acid derivatives and their hybrids in medicinal chemistry: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 204, p. 112609, 15 out. 2020.

ANDRADE, R. C.; ALVES, J. D. C.; ROSELINO, M. N. A REVIEW OF ZOPHOBAS MORIO: CHEMICAL, NUTRITIONAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS. Em: VERRUCK, S. (Ed.). **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 3**. 1. ed. [s.l.] Editora Científica Digital, 2021. p. 533–548.

B, K. et al. Ethnopharmacological approaches to wound healing--exploring medicinal plants of India. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 2, 11 jan. 2007.

BAI, J. et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 133, p. 110985, jan. 2021a.

BAI, J. et al. Gallic acid: Pharmacological activities and molecular mechanisms involved in inflammation-related diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 133, p. 110985, jan. 2021b.

BEKESCHUS, S. et al. Medical gas plasma-stimulated wound healing: Evidence and mechanisms. **Redox Biology**, v. 46, p. 102116, 1 out. 2021.

BOONLAI, W. et al. Thermosensitive Poloxamer 407/Poly(Acrylic Acid) Hydrogels with Potential Application as Injectable Drug Delivery System. **AAPS PharmSciTech**, v. 19, n. 5, p. 2103–2117, jul. 2018.

CANTERI DE SOUZA, P. et al. An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 4, p. 125, 12 nov. 2018.

CECI, C.; GRAZIANI, G.; FARAONI, I.; CACCIOTTI, I. Strategies to improve ellagic acid bioavailability: from natural or semisynthetic derivatives to nanotechnological approaches based on innovative carriers. **Nanotechnology**. Sep 18;31(38):382001, 2020.doi: 10.1088/1361-6528/ab912c.

- CHEN, H. et al. A Shape-Adaptive Gallic Acid Driven Multifunctional Adhesive Hydrogel Loaded with Scolopin2 for Wound Repair. **Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)**, v. 15, n. 11, p. 1422, 17 nov. 2022.
- CRISTIANO, M. C. et al. The Rheolaser Master™ and Kinexus Rotational Rheometer® to Evaluate the Influence of Topical Drug Delivery Systems on Rheological Features of Topical Poloxamer Gel. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 8, p. 1979, 23 abr. 2020.
- DANTAS-MEDEIROS, R. et al. A new hydrogel containing a proanthocyanidin polymer-rich extract of *Commiphora leptophloeos* for treating vulvovaginal candidiasis: Preclinical results using the alternative model of *Galleria mellonella*. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 85, p. 104531, 1 ago. 2023.
- DE ARAÚJO, F. F. et al. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. **Food Chemistry**, v. 338, p. 127535, 15 fev. 2021.
- DJEDJIBEGOVIĆ, J. et al. Ellagic Acid-Derived Urolithins as Modulators of Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. e5194508, 28 jul. 2020.
- DUMORTIER, G. et al. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 12, p. 2709–2728, dez. 2006.
- EMING, S. A. et al. Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 5, p. 517–527, jul. 2009.
- EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIĆ-CANIĆ, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 265, p. 265sr6, 3 dez. 2014.
- FURLAN, A. L. D.; FISCHER, M. L. MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS COMO RECURSO DIDÁTICO: UM NOVO PARADIGMA BIOÉTIKO PARA O ENSINO DA ZOOLOGIA. **Educação em Revista**, v. 36, p. e230590, 11 set. 2020.
- GHAHARY, A.; GHAFARI, A. Role of keratinocyte-fibroblast cross-talk in development of hypertrophic scar. **Wound Repair and Regeneration: Official**

**Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 15 Suppl 1, p. S46-53, 2007.

GIULIANO, E. et al. Mucosal Applications of Poloxamer 407-Based Hydrogels: An Overview. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 159, 12 set. 2018.

GOBIN, M. et al. A Combination of the Natural Molecules Gallic Acid and Carvacrol Eradicates *P. aeruginosa* and *S. aureus* Mature Biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7118, 27 jun. 2022.

KHAN, B. A. et al. New Perspectives on the Efficacy of Gallic Acid in Cosmetics & Nanocosmeceuticals. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 43, p. 5181–5187, 2018.

KOPPA RAGHU, P. et al. Evolution of Nanotechnology in Delivering Drugs to Eyes, Skin and Wounds via Topical Route. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 167, 27 jul. 2020.

KOZAN, A.; GUNER, R. Y.; AKYOL, M. A retrospective assessment and comparison of the effectiveness of benzoyl peroxide; the combination of topical niacinamide, gallic acid, and lauric acid; and the combination of benzoyl peroxide and erythromycin in acne vulgaris. **Dermatologic Therapy**, v. 33, n. 4, p. e13534, 2020.

LEE, W.-J. et al. Ellagic acid inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, ROS generation, and inflammation in human endothelial cells. **Journal of Vascular Surgery**, v. 52, n. 5, p. 1290–1300, nov. 2010.

LI, S.; XIA, M. Review of high-content screening applications in toxicology. **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 12, p. 3387–3396, dez. 2019.

MACÊDO, N. S. et al. Evaluation of ellagic acid and gallic acid as efflux pump inhibitors in strains of *Staphylococcus aureus*. **Biology Open**, v. 11, n. 10, p. bio059434, 15 out. 2022.

MANIAN, M. et al. Formulation and Evaluation of the In Vitro Performance of Topical Dermatological Products Containing Diclofenac Sodium. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, p. 1892, 7 set. 2022.

MEKONNEN, A. et al. In vivo wound healing activity and phytochemical screening of the crude extract and various fractions of *Kalanchoe petitiiana* A. Rich (Crassulaceae) leaves in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 2, p. 638–646, 30 jan. 2013.

MO, J. et al. Wound healing activities of standardized pomegranate rind extract and its major antioxidant ellagic acid in rat dermal wounds. **Journal of Natural Medicines**, v. 68, n. 2, p. 377–386, abr. 2014.

MOOLI, R. G. R.; MUKHI, D.; RAMAKRISHNAN, S. K. Oxidative Stress and Redox Signaling in the Pathophysiology of Liver Diseases. **Comprehensive Physiology**, v. 12, n. 2, p. 3167–3192, 29 mar. 2022.

OGUNTIBEJU, O. O. Medicinal plants and their effects on diabetic wound healing. **Veterinary World**, v. 12, n. 5, p. 653–663, maio 2019.

OLIVEIRA, G. L. DA S.; LABRE, M. B. Q.; LABRE, L. V. Q. Avaliação da atividade medicinal da libidibia ferrea – uma revisão sistemática / Evaluation of the medicinal activity of libidibia ferrea - a systematic review. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 2, p. 5242–5251, 25 mar. 2022.

OSO, B. et al. Comparative Study of the in vitro Antioxidant Properties of Methanolic Extracts of *Chromolaena odorata* and *Ageratum conyzoides* used in Wound Healing. **International Annals of Science**, v. 6, n. 1, p. 8–12, 2019.

PASTAR, I.; STOJADINOVIC, O.; YIN, N.C.; RAMIREZ, H.; NUSBAUM, A.G.; SAWAYA, A.; PATEL, S.B.; KHALID, L.; ISSEROFF, R.R.; TOMIC-CANIC, M. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. **Adv Wound Care (New Rochelle)**. v.1, p.445-464,2014. doi:10.1089/wound.2013.0473

PASTAR, I. et al. Epigenetic regulation of cellular functions in wound healing. **Experimental Dermatology**, v. 30, n. 8, p. 1073–1089, ago. 2021.

PEREIRA, L. DE P. et al. Modulator effect of a polysaccharide-rich extract from *Caesalpinia ferrea* stem barks in rat cutaneous wound healing: Role of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO, TGF- $\beta$ . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 187, p. 213–223, 1 jul. 2016.

PRIMO, R. B. DE B. et al. CAENORHABDITIS ELEGANS, GALLERIA MELLONELLA E DROSOPHILA MELANOGASTER COMOMODELOS

ALTERNATIVOS PARA PESQUISA IN VIVO DE PLANTAS MEDICINAIS. **PRODUTOS NATURAIS E SUAS APLICAÇÕES: DA COMUNIDADE PARA O LABORATÓRIO**, v. 1, n. 1, p. 156–163, maio 2021.

PIRES, E. F. **POTENCIAL ANTIBACTERIANO E CITOTÓXICO DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA ASTERACEAE E SEUS EFEITOS NA ASSOCIAÇÃO COM AMPICILINA**. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Químicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2022.

RÍOS, J.-L. et al. A Pharmacological Update of Ellagic Acid. **Planta Medica**, v. 84, n. 15, p. 1068–1093, out. 2018.

ROCHA, J. E. **AValiação da Atividade Antioxidante e Citoprotetora de Taninos Hidrolisáveis como Proteção Contra a Ação Tóxica de Metal Pesado**. Dissertação de mestrado. Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri– URCA, 2018.

RUMBOS, C.I.; ATHANASSIOU, C.G. The Superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera: Tenebrionidae): A ‘Sleeping Giant’ in Nutrient Sources. **Journal of Insect Science**. Volume 21, Issue 2, 13, 2021. Doi.org/10.1093/jisesa/ieab014

SEREMET, O. C. et al. Toxicity of plant extracts containing pyrrolizidine alkaloids using alternative invertebrate models. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 6, p. 7757–7763, jun. 2018.

SHARIFI-RAD, J. et al. Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 3848084, 2022a.

SHARIFI-RAD, J. et al. Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 3848084, 2022b.

SHEDOEVA, A. et al. Wound Healing and the Use of Medicinal Plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2019, p. 2684108, 2019.

SINGH HALLAN, S. et al. Ellagic Acid Containing Nanostructured Lipid Carriers for Topical Application: A Preliminary Study. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 6, p. 1449, 23 mar. 2020.

SON, Y.-W. et al. Advances in selecting appropriate non-rodent species for regulatory toxicology research: Policy, ethical, and experimental considerations. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, v. 116, p. 104757, out. 2020.

SUBRAMANIAN, V. et al. Topical application of Gallic acid suppresses the 7,12-DMBA/Croton oil induced two-step skin carcinogenesis by modulating anti-oxidants and MMP-2/MMP-9 in Swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 66, p. 44–55, abr. 2014.

TEJCHMAN, K.; KOTFIS, K.; SIENKO, J. Biomarkers and Mechanisms of Oxidative Stress-Last 20 Years of Research with an Emphasis on Kidney Damage and Renal Transplantation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 8010, 27 jul. 2021.

THAKUR, R. et al. Practices in wound healing studies of plants. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2011, p. 438056, 2011.

TRINH, X.-T. et al. A Comprehensive Review of Natural Compounds for Wound Healing: Targeting Bioactivity Perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9573, 24 ago. 2022.

WANG, Y. et al. Mechanism of glycyrrhizin on ferroptosis during acute liver failure by inhibiting oxidative stress. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 5, p. 4081–4090, nov. 2019.

## 18. ANEXOS



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO ÁCIDO ELÁGICO E ÁCIDO GÁLICO INCORPORADO AO GEL COM POLAXAMER407 PARA USO TÓPICO EM RATOS”. Protocolo número 008613/2023-67, sob responsabilidade de *Antônio Luiz Martins Maia Filho*, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **DEFERIDO**, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

ESPÉCIE	LINHAGEM	SEXO	IDADE	PESO	VIGÊNCIA DO PROJETO	Nº DE ANIMAIS
RATO ISOGÊNICO	WISTAR	MACHO	02 MESES	250G	02 ANOS	172

TERESINA, 28 DE ABRIL DE 2023

Prof. Dr. Francisco Araújo  
CRMV – 0415/17  
Coordenador do CEUA-UESPI  
Portaria nº 0667 de 11/11/21