

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E TECNOLOGIA**

GUILHERME MARTINS GOMES FONTOURA

**BIOATIVIDADE DE *Punica granatum* NO REPARO DE
LESÕES INFECTADAS**

IMPERATRIZ

2021

GUILHERME MARTINS GOMES FONTOURA

**BIOATIVIDADE DE *Punica granatum* NO REPARO DE
LESÕES INFECTADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de concentração: Interdisciplinar.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Cristina Gonçalves Maciel

Coorientador: Prof. Dr. Aramys Silva Reis

IMPERATRIZ

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Fontoura, Guilherme Martins Gomes.

Bioatividade de Punica granatum no reparo de lesões infectadas / Guilherme Martins Gomes Fontoura. - 2021.
92 p.

Coorientador(a): Aramys Silva dos Reis.

Orientador(a): Márcia Cristina Gonçalves Maciel.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Tecnologia/ccsst, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, 2021.

1. Agente antibacteriano. 2. Cicatrização. 3. Punica granatum. 4. Romã. I. Maciel, Márcia Cristina Gonçalves. II. Reis, Aramys Silva dos. III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

FONTOURA, G. M. G. **BIOATIVIDADE DE *Punica granatum* NO REPARO DE LESÕES INFECTADAS**. 2021. 92 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Tecnologia), Programa de Pós-graduação em Saúde e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de concentração: Interdisciplinar.

Aprovado em ___/___/_____.

Banca examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Márcia Cristina Gonçalves Maciel
Presidente da banca

Prof^ª. Dr^ª. Rosane Nassar Meireles Guerra Liberio
Examinador 1 – Externo

Prof^ª. Dr^ª. Andreany Martins Cavalli
Examinador 2 – Externo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Osvaldo Fontoura Filho e Sirlei Martins Gomes Fontoura, incansáveis em sua generosidade, dedicação, incentivo, amor e carinho em toda minha vida.

A minha Vó Maria (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela saúde e força para conduzir este trabalho.

Aos meus pais Osvaldo Fontoura Filho e Sirlei Martins Gomes Fontoura, aos meus irmãos Gustavo Martins Gomes Fontoura, Hígor Martins Gomes Fontoura e Davi Martins Gomes Fontoura, e a todos os familiares pelo apoio durante essa jornada.

Ao meu namorado Aloiso Sampaio Souza, que esteve sempre comigo, me incentivando e apoiando desde a abertura do edital até a conclusão deste mestrado, te amo.

As minhas professoras da graduação Rosângela Reis e Karine Watanabe, por sempre acreditarem no meu potencial, e me incentivaram a seguir o caminho da pesquisa e docência.

Aos meus queridos amigos e mentores Rafaela Cristina Gomes Araújo, Victor Pereira Lima, Paula Gabrielle Gomes Candido, Gislane Romano Mendonça, Wherveson de Araújo Ramos, Maria Simone Maciel Pereira, Wanderson Lopes Santos Freitas, Wanderson Barros, Marcos Marinho de Sousa Júnior e Lorrany Fontenele Moraes da Silva, pela contribuição científica, incentivo e apoio nos momentos de dúvida, pelo suporte emocional e amizade, vocês são exemplo e inspiração.

A minha orientadora Professora Márcia Cristina Gonçalves Maciel, pela paciência, disponibilidade e orientações para realização deste trabalho.

Agradeço a meu coorientador Professor Aramys Silva dos Reis, por todos os ensinamentos, paciência, companheirismo e carinho.

Agradeço a empresa Apis Flora em nome da Professora Dr^a. Andresa Berretta, por ceder o extrato bruto padronizado de *Punica granatum* utilizado em todos os experimentos.

Ao Laboratório de Imunofisiologia da Universidade Federal do Maranhão, São Luís-MA, por ceder a infraestrutura para a realização do experimento de cicatrização, e aos parceiros de experimentação Liliane Rodrigues, Suzanna Sousa, Patrícia Alves, Arthur Carneiro e Régis Farias.

Ao Laboratório de Química da Universidade Federal do Maranhão, Campus de Imperatriz-MA, por ceder a infraestrutura para a realização do experimento de antioxidantes, ao Prof. Richard Dutra e ao colega Marcos Marinho pela colaboração neste experimento.

A Universidade Federal do Maranhão, ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão Campus de Imperatriz-MA, e a todos os professores e professoras pela oportunidade de desenvolver este trabalho, contribuindo para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

Introdução: O estudo de cicatrização de feridas busca aperfeiçoar tecnologias já existentes, ou torná-las acessíveis a um maior número de pessoas, mediante o desenvolvimento de tecnologias mais simples e baratas, que sejam igualmente eficientes e que aproveitam de matérias-primas encontradas em regiões menos desenvolvidas. No maranhão, o grupo de pesquisa do Laboratório de Imunofisiologia tem contribuído ao longo dos anos com pesquisas de espécies vegetais com potencial cicatrizante, antimicrobiano e imunomodulador, como o óleo de copaíba, o babaçu, óleo de girassol e o mastruz. Do mesmo modo, a espécie vegetal *Punica granatum*, tem sido objeto de diversos estudos, demonstrando uma ampla atividade biológica. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo verificar o potencial antibacteriano e cicatrizante de uma formulação contendo *P. granatum* sobre um modelo de cicatrização de lesão infectada. **Material e Métodos:** Para avaliação da atividade antibacteriana do extrato de *P. granatum* (EHPg) foi utilizado o método *in vitro* de difusão em ágar. Foi verificada também, a atividade antioxidante do EHPg pelos testes de DPPH e ABTS. Para o modelo de cicatrização, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=12), incluindo controle negativo (CTRL); Fibrinase® (DFC, controle positivo); e uma formulação a base do EHPg como grupo de investigação. O diâmetro da ferida e a porcentagem de cicatrização foram investigados com o auxílio do software ImageJ. A análise macroscópica das feridas foi realizada em dias alternados. Aleatoriamente, animais de cada grupo foram eutanasiados nos dias 3, 7 e 10 e, em seguida, a pele ferida foi retirada para estudos patológicos. Por fim, a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) presentes nas feridas foram analisadas para verificar a atividade antibacteriana do EHPg *in vivo*. **Resultados:** O EHPg apresentou inibição sobre o crescimento e proliferação de todas as cepas testadas. Observou-se que o EHPg inibiu o crescimento do *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), em todas as concentrações de teste, com diferenças estatísticas para as maiores concentrações, variando de 18,67-21,33 mg/mL ($p < 0,05$). O potencial de eliminação de radicais livres do EHPg foi testado pelo método DPPH, exibindo uma $IC_{50} = 4,01 \mu\text{g/ml}$. Enquanto no método ABTS, o EHPg apresentou-se com $IC_{50} = 40,62 \mu\text{g/ml}$. O tratamento tópico de feridas de camundongos com lesão infectada induziu retração completa da ferida no dia 10 em todos os grupos. O tratamento com EHPg não resultou em uma aceleração do processo de cicatrização. Em relação a atividade antibacteriana *in vivo*, no dia 3 foi observado o crescimento microbiano em todos os grupos. As placas de UFC do grupo CTRL apresentou crescimento elevado em relação aos grupos DFC e EHPg. No dia 7, o crescimento foi classificado variando de pouco a médio para o grupo CTRL, enquanto no grupo DFC e

EHPg foi observado nenhum crescimento e pouco crescimento, respectivamente. No dia 10 observou-se novamente o crescimento de UFC em todos os grupos, com crescimento médio nos grupos CTRL e EHPg, e variando de nenhum crescimento a crescimento elevado no grupo tratado com DFC. **Conclusão:** Neste estudo, o EHPg apresentou inibição do crescimento bacteriano de diversas cepas *in vitro*, com grande atividade inibitória sobre MRSA. Apesar de não acelerar o processo de cicatrização, o EHPg foi capaz de reduzir a proliferação do MRSA em lesões infectadas. O EHPg contribuiu para melhorar a formação da nova estrutura do tecido lesionado, facilitando o processo de cicatrização por meio do controle da inflamação, proliferação de fibroblastos e abundante deposição de colégeno.

Palavras-chave: *Punica granatum*. Romã. Cicatrização. Agente antibacteriano.

ABSTRACT

Introduction: The goals of wound care are to prevent infections, reduce swelling and inflammation, accelerate healing, and minimize scarring. However, the healing process can be aggravated by factors such as poor circulation at the wound site and microbial infection. The increase in antibiotic resistant pathogens makes the healing treatment of infected wounds less effective and leads to the search for new therapeutic agents effective against these bacteria. Therefore, the exploration of new natural healing compounds is important. Among them, the plant species *Punica granatum* popularly known as pomegranate has been widely used as a medicine for the treatment of various diseases. **Objectives:** To verify the antibacterial and healing potential of the crude extract of *P. granatum* on an infected wound healing model. **Material and Methods:** To evaluate the antibacterial activity of *P. granatum* extract (EHPg) the *in vitro* agar diffusion method was used. The antioxidant activity of EHPg was also verified by the DPPH and ABTS tests. For the healing model, the animals were randomly divided into three groups (n=12), including negative control (CTRL); Fibrinase® (DFC, positive control); and a formulation based on EHPg as a research group. Wound diameter and healing percentage were investigated with the help of ImageJ software. Macroscopic analysis of the wounds was performed every other day. Randomly, animals from each group were euthanized on days 3, 7 and 10 and then the wounded skin was removed for pathological studies. Finally, the count of colony forming units (CFU) present in the wounds was analyzed to verify the antibacterial activity of EHPg *in vivo*. **Results:** EHPg inhibited the growth and proliferation of all strains

tested. It was observed that EHPg inhibited the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at all test concentrations, with statistical differences for the highest concentrations, ranging from 18.67-21.33 mg/mL ($p < 0.05$). The free radical scavenging potential of EHPg was tested by the DPPH method, showing an $IC_{50} = 4.01 \mu\text{g/ml}$. While in the ABTS method, the EHPg presented with $IC_{50} = 40.62 \mu\text{g/ml}$. Topical wound treatment of mice with infected wounds induced complete wound retraction on day 10 in all groups. Treatment with EHPg did not result in an acceleration of the healing process. Regarding in vivo antibacterial activity, on day 3 microbial growth was observed in all groups. The CFU plates from the CTRL group showed high growth compared to the DFC and EHPg groups. On day 7, the growth was classified varying from little to medium for the CTRL group, while in the DFC and EHPg groups no growth and little growth were observed, respectively. On day 10, growth of CFU was again observed in all groups, with medium growth in the CTRL and EHPg groups, and varying from no growth to high growth in the CFD-treated group. **Conclusions:** In this study, EHPg showed inhibition of bacterial growth of several strains in vitro, with great inhibitory activity on MRSA. Despite not speeding up the healing process, EHPg was able to reduce the proliferation of MRSA in infected lesions. EHPg contributed to improve the formation of the new structure of the injured tissue, facilitating the healing process by controlling inflammation, fibroblast proliferation and abundant collagen deposition.

Keywords: *Punica granatum*. Pomegranate. Wound Healing. Antibacterial agent.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CSF-1	Fator estimulador de colônia 1
CTRL	Controle negativo
DFC	Pomada cicatrizante a base de desoxiribonuclease (6,66%), fibrolisina (0,1%) e cloranfenicol (1%) - Fibrinase®
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EHPg	Extrato bruto hidroalcolico de <i>Punica granatum</i>
FGFs	Fator de crescimento de fibroblastos
HGFs	Fator de crescimento de hepatócitos
IFNs	Interferons
IGFs	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	Interleucina 1
MMPs	Metaloproteinases
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
TGF- α	Fator de crescimento transformador α
TGF- β	Fator transformador de crescimento β
TIMPs	Inibidores de metaloproteinases
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 GERAL.....	13
2.2 ESPECÍFICOS	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 ESTRUTURA E FUNÇÃO DA PELE	14
2.1.1 Epiderme	15
2.1.2 Derme	15
2.1.3 Hipoderme.....	16
2.2 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	17
2.2.1 Inflamação.....	18
2.2.2 Proliferação.....	20
2.2.3 Remodelação.....	21
2.4 <i>PUNICA GRANATUM</i> L.	21
2.4.1 Potencial antibacteriano de <i>Punica granatum</i>	25
2.4.2 Potencial cicatrizante de <i>Punica granatum</i>	29
CAPÍTULO I	41
POTENCIAL TERAPÊUTICO DE <i>Punica granatum</i> NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: uma visão geral	41
CAPÍTULO II.....	55
PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA BRASILEIRA DA ESPÉCIE <i>Punica granatum</i>: UM ESTUDO A PARTIR DE PATENTES, TESES E DISSERTAÇÕES.....	55
CAPÍTULO III	68
POTENCIAL ANTIBACTERIANO E CICATRIZANTE DE <i>Punica granatum</i> EM UM MODELO DE CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS INFECTADAS POR MRSA.....	68
ANEXO A – APROVAÇÃO DO USO DE ANIMAIS PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO, SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRASIL.	90