

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE DAS FOLHAS DE *Pouteria ramiflora* Mart. Radlk. NO USO TÓPICO EM LESÕES CUTÂNEAS DE INDIVÍDUOS DIABÉTICOS

Fernanda da Silva (PIBIC/CNPq-UNIDERP), e-mail: silva.ferandad@gmail.com.

Rosemary Matias (Orientadora), e-mail: rosemarymatiasc@gmail.com.

Karen da Silva Santos (Co-orientação), e-mail: karensantos02@hotmail.com.

Andréia Cristina Lopes Correia (Co-orientadora), e-mail: andreiabio.correia@gmail.com.

Universidade UNIDERP / Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional

Área do conhecimento: Farmácia / Subárea: Etnofarmacologia

Área do conhecimento: Química / Subárea: Química dos Produtos Naturais

Introdução

A *Pouteria ramiflora* Mart., conhecida como figo do cerrado e massaranduba (LORENZI, 2002), é nativa do Cerrado brasileiro, apresentam ação anti-inflamatória, hipoglicemiante (FONTES JÚNIOR *et al.*, 2009), antioxidante e fotoprotetora (SILVA *et al.*, 2009). Sabendo-se que a cicatrização é o conjunto de fatores, dentre eles a inflamação, proliferação e remodelagem do tecido lesado, se torna importante à busca por tratamentos alternativos que possam favorecer o tratamento de feridas abertas, principalmente em pacientes com a Diabetes mellitus. Neste grupo de pacientes, o processo de cicatrização é lento, dificultando a agregação, proliferação e síntese celular (BRASILEIRO, 2011). Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do extrato etanólico das folhas de *P. ramiflora* na cicatrização em lesões cutâneas em ratos diabéticos e realizar análise fitoquímica.

Material e Métodos

As folhas de *Pouteria ramiflora*, coletadas em 26/05/2013, na Região do Taboco (20°29'54.47''S 55°48'48.49''O e 19°26'7.60''S 55°00'2.78''O), município de Corguinho, Mato Grosso do Sul, foram herborizadas e enviadas ao herbário do Laboratório de Morfologia Vegetal, Universidade Anhanguera-UNIDERP e após a identificação, um exemplar foi catalogado e incorporado ao acervo (7829).

Para obtenção do extrato etanólico (Ext_{EtOH}) a 20%, as folhas moídas e secas foram pesadas (100 g) e extraídas com etanol em aparelho de ultrassom (UNIDQUE®, 1450) por 60 minutos, seguido por 24 horas de extração por maceração, ambas a temperatura ambiente. O extrato Ext_{EtOH} a 20% foi submetido à análise fitoquímica via úmida. Os resultados foram analisados com base na intensidade da cor e/ou precipitação, comparados como o extrato padrão (Ext_{EtOH}) sendo considerado: positiva (+++), moderadamente positiva (++) , fracamente positivo (+), parcialmente positivo (\pm = com apenas turvação e/ou alteração parcial de cor) a ausência de cor e/ou precipitação como negativo (-) (MATIAS, 2015).

O extrato Ext_{EtOH} foi usado para quantificar os fenóis totais (Método Folin-Ciocalteu), com ácido gálico (10 a 350 mg mL⁻¹) como padrão ($Y = 1,067x - 0,004$ R² = 0,982). Para os

flavonoides (Método AlCl_3) o padrão foi a quercetina ($Y = 0,0633x - 0,0061$ $R^2 = 0,9998$) (DO et al., 2014). Foi determinado o perfil cromatográfico (CLAE) do Ext_{EtOH} e determinado o pH.

Preparo do Gel

Para o preparo do gel utilizou-se a concentração 2% de extrato Ext_{EtOH} incorporado no veículo a 70% de Gel Carbopol (M. Cassab®), utilizando o método a frio adicionando lentamente água sobre o polímero e agitando manualmente.

Procedimentos cirúrgicos e eutanásia: Animais, grupos experimentais e tratamentos

Foram utilizados 30 ratos machos (*Rattus norvegicus*: albinus, Rodentia, Mammalia), pesando de 200 a 250g da linhagem Wistar, procedentes do Biotério Central da Universidade Anhanguera-Uniderp, previamente observados quanto às condições gerais de saúde, recebendo ração e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos com 5 animais ($n=5$) no período de 7 e 14 dias de pós-operatório e mantidos em gaiolas individuais de polipropileno. O grupo controle negativo G1: Controle (Carbopol). Grupos experimentais: G2: Grupo Ext_{EtOH} , G3: Grupo Gel: Ext_{EtOH} (2%). O protocolo para uso de animais em experimentação foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Anhanguera- UNIDERP (2953/2014).

Indução de diabetes

A indução ocorreu pela administração de estreptozotocina (Sigma®), via intraperitoneal (50 mg Kg^{-1}), dissolvida em tampão citrato (0,01M, pH 4,5) após 12 horas em jejum (EBAID et al., 2011). A confirmação do aumento da glicemia foi realizada pela glicosimetria (Accu-check®), no 7º dia após a indução, considerando diabético o animal com índice superior a 250 mg/dl.

Procedimentos cirúrgicos e eutanásia

Os animais foram anestésicos por via intraperitoneal com Cetamina (90 mg kg^{-1}) e Xilazina (10 mg kg^{-1}), imobilizados em decúbito ventral e, após a tricotomia do dorso, demarcação de uma área de aproximadamente 8 mm com *punch* metálico, foi realizada à incisão e retirada de um segmento cutâneo de espessura total do dorso do animal produzindo-se uma ferida aberta, no centro da área tricotomizada, até a exposição da fáscia muscular dorsal.

As lesões induzidas foram tratadas de acordo com os grupos experimentais. No término do período estabelecido, os animais foram eutanasiados com dose letal de anestésico, em as feridas foram excisada com margem de 0,5 mm de pele íntegra em torno da lesão, em profundidade até a fáscia muscular, em condições assépticas, realizando-se corte mediano, tendo sido a peça fixada em formol a 10%, para posterior processamento do material e confecção das laminais histológicas. Para avaliação do número de células, foram capturados dez campos, ao acaso, de cada lâmina, utilizando-se microscópio óptico comum em lente ocular 10x, lente objetiva 10x e 40x.

Resultados e Discussão

Na prospecção fitoquímica o extrato Ext_{EtOH} das folhas de *P. ramiflora* apresentou: compostos fenólicos, taninos e flavonoides (+++); cumarinas, triterpenos e açúcares redutores (++); antraquinonas, flavonas, xantonas, esteróides e saponinas (+). O teor de compostos fenólicos foi de $225,8 \pm 0,20 \text{ mg g}^{-1}$ e de flavonoides de $98,20 \pm 0,50 \text{ mg g}^{-1}$. No perfil cromatográfico (CLAE) evidenciou-se bandas em λ_{max} 250, 280 e 350 nm, características de compostos fenólicos e flavonoides. O percentual encontrado de compostos fenólicos foi relativo com outras espécies como *P. caimito* (TUESTA et al., 2014), *P. gardneriana* (ROCHA et al., 2011) e *P. obovata* (DINI, 2011) ambas com alto potencial antioxidante. O pH médio do extrato foi de $4,7 \pm 0,01$ sendo compatível com a pele humana (VELASCO et al., 2012).

Quadro 1. Resultados do teste *in vivo* do gel do extrato Ext_{EtOH} de *P. ramiflora*

Período	Grupos	Crosta	Inflam.	Fibrop.	Neovascul.	Colágeno	Reepit.
7 dias	GG 2%	3,0±0,5	2,5±0,5	3,0±0,5	1,1±0,5	0,5±0,5	0,0±0,0
	Ex.B.	3,0±0,5	2,1±0,5	3,0±0,0	1,5±0,5	0,5±0,5	0,0±0,0
	GC	2,6±0,5	2,0±0,5	2,4±0,5	1,4±0,5	0,2±0,7	0,0±0,0
14 dias	GP 2%	3,0±0,5	1,1±0,5	3,0±0,5	2,9±0,5	2,8±0,5	3,0±0,5
	Ex.B.	3,0±0,5	1,0±0,6	3,0±0,5	3,0±0,5	2,9±0,5	2,8±0,5
	GC	3,0±0,5	1,4±0,5	2,6±0,5	2,1±0,5	2,1±0,5	1,6±0,5

Inflamação= Inflam.; Fibroplásia =Fibrop.; Neovascularização= Neovascul; Gral de reepitelização =Reepit.; Grupo gel 2%= GG 2%; Grupo extrato bruto= Ex. B.; Grupo controle(carbopol)=GC.

Na avaliação dos achados histológicos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos em nenhuma das variáveis estudadas. A reação inflamatória foi moderada nos grupos no 7º dia com presença de tecido de granulação, além da formação de capilares, esses resultados corroboram com os obtidos por Godeiro *et al.* (2010). No 14º dia o processo tornou-se mais intenso em ambos os grupos, porém um pouco mais acentuada no grupo GG 2% e tratado com Extrato Etanólico. Segundo Sampaio (2009), a formação precoce do tecido de granulação é favorecida pela maior concentração de colágeno e vasos sanguíneos. No grupo tratado GG2% e G(Ext_{EtOH}) foi evidenciado uma completa formação do epitélio, sem infiltrado inflamatório e intensa fibroplásia, sendo possível observar a presença de intensa da vascularização e de tecido conjuntivo neoformado.

Conclusão

O gel (2%) do extrato etanólico das folhas de *P. ramiflora* favoreceu o desenvolvimento de fibras colágenas de forma mais efetiva, melhorando a densidade vascular por mais que estejam comprometidos. A ocorrência de sinais discretos de inflamação, edema e hipertermia nos grupos tratados com o gel (2%) pode estar associada à ação antioxidante dos compostos fenólicos e flavonoides, minimizando as lesões consequentemente da liberação dos radicais livres tóxicos.

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica (PIBIC). Ao apoio financeiro do CNPq, Centro de

Pesquisa do Pantanal (CPP), Instituto Nacional de Áreas Úmidas (INAU) e a FUNDECT.

Referências

BRASILEIRO, F.G. *Bobliolo: patologia geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

DINI, I. Flavonoid glycosides from *Pouteria obovata* (R. Br.) fruit flour. *Food Chem.*, v.124, n.3, p.884-888, 2011.

DO, Q.D. *et al.* Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoids content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food Drug Anal.*, v.22, p.296-302, 2014.

SAMPAIO, C.P.P. *et al.* Alterações inflamatórias provocadas pelo metronidazol em feridas: estudo experimental em ratos. *J. Vasc. Bras.*, v.8, n.3, p.232-237, 2009.

EBAID, H. *et al.* Whey protein enhances normal inflammatory responses during cutaneous wound healing in diabetic rats. *Lipids Health Dis.*, v.10, n.235, p.1476-1511, 2011.

FONTES JUNIOR, E.A. *et al.* Antinociceptive and antiinflammatory properties of the ethanolic extract of *Pouteria ramiflora* roots. *Latin Am. J. Pharm.*, v.28, n.6, p.812-818, 2009.

GODEIRO, J.R.G. *et al.* Avaliação da atividade cicatrizante de creme à base de *Triticum vulgare* em feridas cutâneas de gatas submetidas à ovários salping o histerectomia. *Acta Vet. Bras.*, v. 4, n.2, p.78-85, 2010.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

MATIAS, R. *Roteiro de análise fitoquímica*. Campo Grande: Universidade Anhanguera Uniderp, 2015.

ROCHA, W.S. *et al.* Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do Cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v.33, n.4, p.1215-1221, 2011.

SILVA, C.A.M.; SIMEONI, L.A; SILVEIRA, D. Genus *Pouteria*: Chemistry and biological activity. *Rev. Bras. Farm.*, v.19, n.2501, 2009.

TUESTA, G. *et al.* Actividad antioxidante y determinación de compuestos fenólicos del caimito (*Pouteria caimito*), caimitillo (*Chrosophylum sanguinolentum*), guava (*Inga edulis*) y yarina (*Phytelephas macrocarpa*). *Folia Amazónica*, v.23, n.1, p.87-92, 2014.

VELASCO, M.V. *et al.* Influences of bioactive substances on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions. *Biomed. Biopharm. Res.*, v.9, n.1, p.119-130, 2012.