

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BEATRIZ ABDALLAH CHAIBUB

Identificação de punicalagina das folhas de *Lafoensia pacari* (Lythraceae) e avaliação das atividades biológicas.

Goiânia
2013

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Beatriz Abdallah Chaibub		
E-mail:	bia.farmaciauFG@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	UF:	CNPJ:	
Título:	Identificação de punicalagina das folhas de <i>Lafoensia pacari</i> (Lythraceae) e avaliação das atividades biológicas.		
Palavras-chave:	Planta medicinal, pacari, elagitaninos, anti-inflamatória, antiúlcero-gênica, antissecretora.		
Título em outra língua:	Identification of punicalagin from leaves of <i>Lafoensia pacari</i> (Lythraceae) and evaluation of biological activities.		
Palavras-chave em outra língua:	Medicinal plant, pacari, ellagitannins, anti-inflammatory, antiulcer, antisecretory.		
Área de concentração:	Fármacos e Medicamentos		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	30/08/2013		
Programa de Pós-Graduação:	Ciências Farmacêuticas		
Orientador (a):	Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara		
E-mail:	mtbara@gmail.com		
Co-orientador (a):*	Profa. Dra. Suzana da Costa Santos		
E-mail:	suzana.quimica.ufg@hotmail.com		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Beatriz Abdallah Chaibub
(Assinatura do (a) autor (a))

Data: 20 / 08 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

BEATRIZ ABDALLAH CHAIBUB

Identificação de punicalagina das folhas de *Lafoensia pacari* (Lythraceae) e avaliação das atividades biológicas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito necessário à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara

Co-orientadora: Profa. Dra. Suzana da Costa Santos

Goiânia

2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Goiás, em 30 de agosto de 2013, pela mestranda Beatriz Abdallah Chaibub.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Teresa Freitas Bara
Presidente

Profa. Dra. Joelma Abdaia Marciano de Paula
(UEG)

Profa. Dra. Marize Campos Valadares Bozinis
(FF/UFG)

À Deus por todas as graças unidas em minha vida e à minha mãe que nunca mediu esforços para a concretização dos meus sonhos. Toda minha gratidão pelo incentivo, ensinamentos e dedicação incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus o pastor da minha vida, sem a sua misericórdia, amor e bênçãos nada disso seria possível.

À minha mãe Zahia, a pessoa mais importante em minha vida, minha maior incentivadora, que nunca mediu esforços para este sonho se concretizar. Fez essa conquista valer a pena. Essa vitória também é toda sua!

À Profa. Maria Teresa F. Bara, pela orientação, confiança, paciência, dedicação, amizade e exemplo.

À todos os meus professores, em especial ao Prof. José Realino de Paula e a Profa. Leonice Manrique F. Tresvenzol pelo apoio, ensinamentos e amizade.

À professora Suzana da Costa Santos pela co-orientação e aprendizado e a sua aluna Gilmara Fortes pela companhia e ajuda.

Ao professor Elson Alves Costa e seus alunos de pós-graduação José Luís R. Martins e Iziara F. Florentino, pela valiosa contribuição para realização dos experimentos de atividade anti-inflamatória, antiulcerogênica e antissecretória.

Ao Prof. Pierri Alexandre dos Santos pela contribuição e atenção na parte química do trabalho.

À Leila Maria L. Parente pela companhia e colaboração para a realização dos experimentos de angiogênese e cicatrização.

Aos meus amigos que compartilharam, apoiaram e estiveram presentes durante todos os momentos, em especial ao Tiago Branquinho e Daniela Prado.

À todos os meus colegas de laboratório e da pós-graduação, em especial a Suzana Ferreira Alves e Leonardo Luiz Borges, pelo companheirismo, colaboração e momentos de descontração.

À Fernanda Belatto pela atenção, amizade e carinho dispensado.

À Maria Marques que gentilmente permitiu a coleta do material vegetal em sua propriedade.

À Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais por proporcionar a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

À todos que acompanharam a minha caminhada e que contribuíram de alguma maneira para realização deste trabalho, meu muito obrigada!

" O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes."

Cora Coralina.

" O Senhor é meu refúgio e minha cidadela, meu Deus, em quem eu confio."

Salmo 90.

RESUMO

Lafoensia pacari (Lythraceae) é uma planta do Cerrado Brasileiro conhecida como pacari. Estudos mostraram as atividades anti-inflamatória, antioxidante e antinociceptiva. Este trabalho objetivou isolar e identificar constituintes químicos e avaliar as atividades biológicas anti-inflamatória, antiulcerogênica, antissecretora, angiogênica e cicatrizante do extrato das folhas e do composto isolado de *L. pacari*. Iniciou-se pela caracterização da droga vegetal e obtenção do extrato bruto de pacari (EBP) em acetona 50% v/v. O extrato foi caracterizado e liofilizado para utilização nos testes de atividades biológicas. Seguiu-se para o fracionamento do EBP com acetato de etila e metanol. Foi realizada cromatografia em coluna de Diaion® HP-20 da fração solúvel em metanol e foi monitorado o perfil em cromatografia em camada delgada. Após as frações serem reunidas, avaliou-se o perfil cromatográfico por Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e o composto isolado foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), sendo obtidos os espectros unidimensional e bidimensional. Validou-se um método em CLAE para quantificação de punicalagina de acordo com os parâmetros da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. As atividades biológicas avaliadas para EBP liofilizado e punicalagina seguiram os modelos experimentais: atividade anti-inflamatória por edema de orelha induzido por óleo de cróton (EBP 5 mg/orelha), atividade antiulcerogênica por lesões gástricas induzidas por indometacina (EBP 150 mg/kg e punicalagina 120 mg/kg), avaliação de atividade antissecretora ácida gástrica em modelo de ligadura pilórica (EBP 75, 150, 300 mg/kg e punicalagina 120 mg/kg), atividade angiogênica no modelo da membrana corioalantoide (MCA) (EBP a 10%) e atividade cicatrizante pelo modelo das feridas cutâneas em ratos (EBP a 10%). Durante a caracterização da droga vegetal e do EBP, pode-se constatar a presença de taninos. O rendimento do EBP liofilizado foi de 37,6%. Na análise por CLAE verificou-se a presença de 2 picos majoritários no EBP, que indicou serem de um mesmo composto após a análise de seu espectro de absorção em UV. Após a cromatografia em coluna e monitoramento do perfil cromatográfico, as frações obtidas foram reunidas em 12 novas frações (PAC) e observou-se que PAC 2 a 7 apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, sendo o rendimento total de 67,23%. A PAC 6 foi analisada por RMN uni e bidimensionais, o que possibilitou a elucidação estrutural de punicalagina, um tanino hidrolisável da classe dos elagitaninos. O método validado para punicalagina provou ser seletivo, linear, preciso, exato e robusto. O teor de punicalagina quantificado em EBP foi de 65%. O EBP (5 mg/orelha) apresentou atividade anti-inflamatória por redução do edema de orelha em (41,44%, $p < 0,001$). O EBP na dose de 150 mg/kg e punicalagina na dose de 120 mg/kg reduziram o índice de lesão gástrica após administração da indometacina em 29,82 ($p \leq 0,05$) e 52,03% ($p \leq 0,001$) respectivamente. Na avaliação dos parâmetros de secreção ácida, o EBP e a punicalagina foram capazes de reduzir significativamente o volume (9,64%, $p \leq 0,05$; 11,24%, $p \leq 0,05$; 15,66%, $p \leq 0,001$) para EBP nas respectivas doses de 75, 150, 300 mg/kg e punicalagina em 9,69%, $p \leq 0,05$ (para a dose de 120 mg/kg), a acidez livre (76,89%, $p \leq 0,01$; 58,97%, $p \leq 0,01$; 49,66%, $p \leq 0,001$) para EBP nas respectivas doses de 75, 150, 300 mg/kg e punicalagina em 22,47%, $p \leq 0,05$ (para a dose de 120 mg/kg) e a acidez total (65,30%, $p \leq 0,001$; 71,46%, $p \leq 0,001$; 69,40, $p \leq 0,001$) para EBP nas respectivas doses de 75, 150, 300 mg/kg e punicalagina em 41,98%, $p \leq 0,01$ (para dose de 120 mg/kg) da secreção ácida de camundongos após 4 horas de ligadura pilórica. O EBP

a 10% apresentou propriedade angiogênica no modelo da MCA, diminuiu o tempo de cicatrização das feridas em ratos e aumentou significativamente dois parâmetros envolvidos na cicatrização, o número de vasos e a produção de colágeno. Esse é o primeiro estudo com as folhas do *L. pacari* demonstrando a presença de punicalagina e as atividades anti-inflamatória, antiúlcero-gênica, antissecretória, angiogênica e de diminuição do tempo de cicatrização do EPB e punicalagina.

Palavras chave: Planta medicinal, pacari, elagitaninos, anti-inflamatória, antiúlcero-gênica, antissecretora.

ABSTRACT

Lafoensia pacari (Lythraceae) is a native plant of the Brazilian cerrado known as pacari. Studies showed anti-inflammatory, anti-oxidant and antinociceptive activities. This work aimed to isolate and identify chemical compounds and biological activities as anti-inflammatory, antiulcer, antisecretory, angiogenic and healing of the extract of the leaves and of an isolated from *L. pacari*. Initially we prepared and characterized the plant drug and was obtained the crude extract of *pacari* (EBP) in acetone 50% v/v. The extract was characterized and lyophilized for use in testing of biological activities. Then we did the fractionation of EBP with ethyl acetate and methanol. Chromatography of the fraction soluble in methanol was performed on a column of Diaion® HP-20 and was monitored the chromatographic profile by thin layer chromatography. After collecting the fractions, we evaluated the chromatographic profile by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the isolated compound was analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR), obtaining one-dimensional and two-dimensional spectra. It was validated a HPLC method for quantification of punicalagin according to parameters of the National Agency for Sanitary Vigilance. The biological activities evaluated for EBP lyophilized and punicalagin followed the experimental models: anti-inflammatory activity in the croton oil-induced ear edema assay (EBP 5 mg / ear), antiulcer activity of gastric lesions induced by indomethacin (EBP 150 mg / kg and punicalagin 120 mg / kg), evaluation of antisecretory activity gastric acid in pylorus-ligation model (EBP 75, 150, 300 mg / kg and punicalagin 120 mg / kg), angiogenic activity in the chorioallantoic membrane model (CAM) (EBP 10 %) and the wound healing activity of cutaneous wound model in rats (EBP 10%). During the characterization of plant drug and EBP, we could confirm the presence of tannins. The yield of lyophilized EBP was 37.6%. In the HPLC analysis verified the presence of two peaks in the majority EBP, indicated that they are the same compound after the analysis of its UV absorption spectrum. After column chromatography and monitoring of the chromatographic profile, the fractions obtained were collected in 12 fractions (PAC) and observed that the PAC 2-7 showed the same chromatographic profile, and the total yield of 67.23%. The PAC 6 was analyzed for its one and two-dimensional NMR experiments, which allowed the structural elucidation of punicalagin, a hydrolysable tannin of the ellagitannins class. The validated method for punicalagin proved to be selective, linear, precise, accurate and robust. The content of punicalagin quantified in EBP was 65%. The EBP (5 mg / ear) showed anti-inflammatory activity by reducing edema of ear (41.44%, $p < 0.001$). The EBP at a dose of 150 mg / kg and punicalagin at a dose of 120 mg / kg reduced the rate of gastric damage following indomethacin administration of 29.82 ($p \leq 0.05$) and 52.03% ($p \leq 0.001$), respectively. In the evaluation of the parameters of acid secretion, the EBP and punicalagin were able to significantly reduce the volume (9.64%, $p \leq 0.05$; 11.24 %, $p \leq 0.05$, 15.66%, $p \leq 0.001$) for EBP in the respective doses of 75, 150, 300 mg / kg and in punicalagin 9.69%, $p \leq 0.05$ (to 120 mg / kg) a free acidity (76.89%, $p \leq 0.01$, 58.97%, $p \leq 0.01$, 49.66%, $p \leq 0.001$) for EBP in the respective doses of 75, 150, 300 mg/kg and punicalagina at 22.47%, $p \leq 0.05$ (for the 120 mg / kg) and total acidity (65.30%, $p \leq 0.001$, 71.46%, $p \leq 0.001$; 69.40, $p \leq 0.001$) to EBP in the respective doses of 75, 150, 300 mg/kg and in punicalagin 41.98%, $p \leq 0.01$ (to 120 mg / kg) acid secretion in mice 4 hours after pyloric ligation. The EBP 10% showed angiogenic property in the MCA model, decreased time to healing of wounds in rats and significantly

increased two parameters involved in wound healing, the number of vessels and collagen production. This is the first study of the leaves of *L. pacari* demonstrating the presence of punicalagin and anti-inflammatory, antiulcer, antisecretory, angiogenesis activities and decreased healing time of EPB and punicalagin.

Keywords: Medicinal plant, pacari, ellagitannins, anti-inflammatory, antiulcer, antisecretory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto geral de <i>Lafoensia pacari</i> no município de Caldazinha/GO	22
Figura 2 - Biossíntese dos diferentes tipos de taninos hidrolisáveis e sua classificação em galotanino e elagitanino	26
Figura 3 - Aspecto geral de <i>Lafoensia pacari</i> no Cerrado	47
Figura 4 - Aspecto geral do galho florido de <i>Lafoensia pacari</i>	47
Figura 5 - Detalhe da folha de <i>Lafoensia pacari</i> (face adaxial)	48
Figura 6 - Detalhe do caule de <i>Lafoensia pacari</i>	48
Figura 7 - Cromatograma em CLAE do extrato bruto liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i>	52
Figura 8 - Espectros de absorção a 254nm do pico 1 (A) e do pico 2 (B) do extrato bruto liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i>	53
Figura 9 - Cromatogramas obtidos das análises por CLAE após fracionamento do extrato bruto de pacari com acetato de etila e metanol. (A) fração aquosa, (B) fração acetato de etila, (C) fração solúvel em metanol e (D) fração insolúvel em metanol	55
Figura 10 - Detalhe da coluna cromatográfica preenchida com Diaion® HP-20	56
Figura 11 - Frações com coloração amarela (PAC 1 a 7) coletadas da coluna cromatográfica preenchida com Diaion® HP-20	56
Figura 12 - CLAE das frações reunidas após cromatografia em coluna. (A) PAC 1, (B) PAC 2, (C) PAC 3, (D) PAC 4, (E) PAC 5, (F) PAC 6, (G) PAC 7, (H) PAC 8, (I) PAC 9, (J) PAC 10, (K) PAC 11, (L) PAC 12	59
Figura 13 - Cromatograma com a sobreposição dos picos presentes no EBP (em preto) e no PAC 6 (em vermelho) (A). Ambos com mesmo espectro de absorção em DAD (B)	62
Figura 14 - Espectro de RMN ¹ H obtido para o PAC 6 (Acetona D ₆ , 500,13 MHz)	67
Figura 15 - Espectro de RMN ¹ H expandido para observar a região dos H aromáticos, obtido para o PAC 6 (Acetona D ₆ , 500,13 MHz)	68
Figura 16 - Espectro de RMN ¹ H expandido para observar a região dos H anoméricos, obtido para o PAC 6 (Acetona-d ₆ , 500 MHz).....	69

Figura 17 - Espectro de RMN ¹ H expandido para observar a região dos H anomérico, obtido para o PAC 6 (Acetona-d ₆ , 500 MHz)	70
Figura 18 - Espectro de RMN ¹³ C obtido para o PAC 6 (Acetona-d ₆ , 125 MHz) ...	71
Figura 19 - Mapa de contorno <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> obtido para o PAC 6 (Acetona-d ₆ , 500 MHz)	72
Figura 20 - Mapa de contorno <i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i> obtido para o PAC 6 (Acetona-d ₆ , 500, MHz)	73
Figura 21 - Mapa de contorno <i>Correlation Spectroscopy</i> obtido para o PAC 6 (Acetona-d ₆ , 500 MHz)	74
Figura 22 - Estrutura química das punicalaginas α e β	75
Figura 23 - Cromatogramas obtidos para avaliação da especificidade do método. (A) branco, (B) EBP a 1 µg/mL e (C) punicalagina a 1 µg/mL	77
Figura 24 - Curva de calibração, equação da reta e coeficiente de correlação obtido para punicalagina	78
Figura 25 - Efeito do tratamento com o veículo (metanol), extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP 5 mg/orelha) ou dexametasona (0,5 mg/orelha) sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton 2,5%	81
Figura 26 - Efeito do tratamento com o veículo (água destilada 10 mL/kg - i.d), extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP 75, 150 e 300 mg/kg - i.d.) ou da ranitidina (50 mg/kg - i.d.) sobre o volume de secreção gástrica em camundongos após 4 horas de ligadura pilórica	83
Figura 27 - Efeito do tratamento com o veículo (água destilada 10 mL/kg - i.d), punicalagina (120 mg/kg - i.d) isolada de <i>Lafoensia pacari</i> ou da ranitidina (50 mg/kg - i.d.) sobre o volume de secreção gástrica em camundongos após 4 horas de ligadura pilórica	83
Figura 28- Efeito do tratamento com o veículo (água destilada 10 mL/kg - i.d), extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP 75, 150 e 300 mg/kg - i.d.) ou da ranitidina (50 mg/kg - i.d.) sobre a acidez livre (pH) da secreção gástrica em camundongos após 4 horas de ligadura pilórica	84
Figura 29 - Efeito do tratamento com o veículo (água destilada 10 mL/kg - i.d), punicalagina (120 mg/kg - i.d.) isolada de <i>Lafoensia pacari</i> ou da ranitidina (50 mg/kg - i.d.) sobre a acidez livre (pH) da secreção gástrica em camundongos após 4 horas de ligadura pilórica	84
Figura 30 - Efeito do tratamento com o veículo (água destilada 10 mL/kg - i.d), extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP 75, 150 e 300 mg/kg - i.d.) ou da ranitidina (50 mg/kg - i.d.) sobre a acidez total da secreção gástrica em camundongos após 4 horas de ligadura pilórica	85

Figura 31 - Efeito do tratamento com o veículo (água destilada 10 mL/kg - i.d), punicalagina (120 mg/kg i.d.) isolada de <i>Lafoensia pacari</i> ou da ranitidina (50 mg/kg - i.d.) sobre a acidez total da secreção gástrica em camundongos após 4 horas de ligadura pilórica	85
Figura 32 - Fatores protetores e agressores da mucosa gástrica, no qual o desequilíbrio leva à lesão	86
Figura 33 - Efeito do tratamento com o veículo (água destilada 10 mL/kg - v.o), extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP 150 mg/kg - v.o.) ou da ranitidina (50 mg/kg - v.o.) sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina (30 mg/kg - s.c.)	88
Figura 34 - Efeito do tratamento com o veículo (água destilada 10 mL/kg - v.o), da punicalagina (120 mg/kg - v.o.) isolada de <i>Lafoensia pacari</i> ou da ranitidina (50 mg/kg - v.o.) sobre as lesões gástricas induzidas por indometacina (30 mg/kg - s.c.)	88
Figura 35 - Área vascular da membrana corioalantoide fresca após os tratamentos. (A) Membrana corioalantoide tratada com água destilada (controle). (B) Membrana corioalantoide tratada com o extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP a 10%)	90
Figura 36 - Macroscopia das feridas na derme dos ratos. (A) Grupos controle tratados com água destilada no dia 0 (A1), 7º dia (A2) e 14º dia (A3). (B) Grupos tratados com extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP a 10%) no dia 0 (B1), 7º dia (B2) e 14º dia (B3)	93
Figura 37 - Fotomicrografia dos fragmentos da derme dos ratos corados em HE após 7 dias de tratamento com destaque para vasos sanguíneos (setas). (A) Grupo tratado com água destilada (controle). (B) Grupo tratado com o extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP a 10%)	94
Figura 38 – Fotomicrografia dos fragmentos da derme corados em HE dos ratos após 7 dias de tratamento com destaque para o conteúdo de colágeno (setas). A- Grupo tratado com água destilada (controle). B- Grupo tratado com o extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP a 10%)	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Padrões de compostos fenólicos testados em CLAE	34
Quadro 2 - Parâmetros avaliados na robustez	38
Quadro 3 - Pontuação para a composição do índice de lesão da mucosa gástrica	42

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Fluxograma da cromatografia em coluna de Diaion® HP-20 do EBP	36
Esquema 2 - Fluxograma com o resumo das atividades biológicas realizadas a partir do extrato bruto de pacari e punicalagina	46
Esquema 3 - Rendimentos do fracionamento do extrato bruto de pacari (EBP) com acetato de etila e metanol	54
Esquema 4 - Fluxograma indicativo da reunião das frações da cromatografia em coluna de Diaion® HP-20 da fração solúvel em metanol de EBP e massas obtidas após a liofilização	57
Esquema 5 - Fluxograma final com o resumo de toda fitoquímica realizada a partir do extrato bruto de pacari	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes químicos detectados na droga vegetal do pacari	49
Tabela 2 - Características físico-químicas do EBP	51
Tabela 3 - Dados do espectro de RMN de ¹ H para anômero α da punicalagina isolada das folhas de <i>Lafoensia pacari</i> em comparação com a punicalagina identificada para <i>Terminalia oblongata</i>	63
Tabela 4 - Dados do espectro de RMN de ¹ H para o anômero β da punicalagina isolada das folhas de <i>Lafoensia pacari</i> em comparação com a punicalagina identificada para <i>Terminalia oblongata</i>	64
Tabela 5- Dados do espectro de RMN de ¹³ C obtido para punicalagina isolada das folhas de <i>Lafoensia pacari</i> em comparação com a punicalagina identificada para <i>Terminalia oblongata</i>	64
Tabela 6 - Resultados obtidos para curva de punicalagina para a cálculo da linearidade	78
Tabela 7 - Resultados obtidos de repetibilidade do método para punicalagina	79
Tabela 8 - Resultados obtidos para precisão intermediária do método para punicalagina	79
Tabela 9 - Resultados obtidos para exatidão do método para punicalagina	80
Tabela 10 - Resultados obtidos para robustez do método para punicalagina	80
Tabela 11 - Morfometria (mediana, mínimo/máximo) dos vasos sanguíneos da membrana corioalantoide tratada com água destilada (controle) e o extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP a 10%)	91
Tabela 12 - Número de vasos (média ± desvio padrão) da membrana corioalantoide corada por HE analisada por planimetria, após o tratamento com água destilada (controle) e o extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP a 10%)	91
Tabela 13 – Medianas das variáveis histológicas avaliadas no 7º dia dos grupos tratados com água destilada (controle) e com o extrato liofilizado de <i>Lafoensia pacari</i> (EBP a 10%)	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetona-d ₆	Acetona deuterada
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
cm	Centímetro
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	Coefficiente de variação
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>dt</i>	Duplo tripleto
DAD	Detector de arranjo diiodo
DP	Desvio padrão
EBP	Extrato bruto de pacari
EPM	Erro padrão da média
g	Gram
H	Hidrogênio
H ⁺ /K ⁺ /ATPase	Bomba de próton
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
i.d.	Intraduodenal
<i>J</i>	Constante de acoplamento
kg	Quilograma
MCA	Membrana corioalantoide
mEq	Mili-equivalente
MHz	Megahertz

mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minuto
nm	Nanômetro
PAC	Pacari
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
p/v	Peso/volume
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
rpm	Rotação por minuto
s	Singleto
s.c.	Subcutâneo
<i>t</i>	Tripleto
v.o.	Via oral
v/v	Volume/volume
δ	Deslocamento químico
μg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Material vegetal	30
3.2 Caracterização da droga vegetal em pó	30
3.2.1 REAÇÕES HISTOQUÍMICAS	30
3.2.2 PESQUISA DE TANINOS	30
3.2.3 PESQUISA DE SAPONINAS	31
3.3 Preparação do extrato bruto do pacari (EBP)	31
3.4 Caracterização do extrato bruto do pacari	31
3.4.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS	32
3.4.2 DETERMINAÇÃO DE DENSIDADE RELATIVA E DE MASSA	32
3.4.3 DETERMINAÇÃO DO pH	33
3.4.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	33
3.4.5 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	33
3.5 Fracionamento do extrato bruto do pacari	34
3.6 Cromatografia em coluna	34
3.6.1 ANÁLISE DAS FRAÇÕES POR CCD	35
3.6.2 ANÁLISES DAS FRAÇÕES POR CLAE	35
3.6.3 ANÁLISE DA FRAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	35
3.7 Validação de metodologia analítica para quantificação de punicalagina por CLAE	36
3.7.1 ESPECIFICIDADE	37
3.7.2 LINEARIDADE	37
3.7.3 PRECISÃO	37
3.7.4 EXATIDÃO	37
3.7.5 ROBUSTEZ	38
3.8 Avaliação das atividades biológicas	38

3.8.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELO MÉTODO DO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON (<i>Croton tiglium</i> L.)	39
3.8.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTISSECRETORA ÁCIDA GÁSTRICA EM MODELO DE LIGADURA PILÓRICA	39
3.8.2.1 Volume da secreção gástrica	40
3.8.2.2 Acidez livre (pH)	40
3.8.2.3 Acidez total	40
3.8.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA POR LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA	41
3.8.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA POR MEIO DO MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTOIDE (MCA)	42
3.8.4.1 Avaliação morfológica da MCA	43
3.8.4.2 Avaliação das células inflamatórias e número de vasos sanguíneos da MCA	43
3.8.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE PELO MODELO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS	44
3.8.5.1 Avaliações morfológica e histológica	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Material vegetal	47
4.2 Caracterização da droga vegetal em pó	48
4.3 Preparação do extrato bruto do pacari (EBP)	50
4.4 Caracterização do extrato bruto do pacari	51
4.4.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	51
4.4.2 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	51
4.5 Fracionamento do extrato bruto do pacari	53
4.6 Cromatografia em coluna da fração solúvel em metanol	56
4.7 Validação de metodologia analítica para quantificação de punicalagina por CLAE	76
4.7.1 ESPECIFICIDADE	76
4.7.2 LINEARIDADE	77
4.7.3 PRECISÃO	78
4.7.4 EXATIDÃO	79
4.7.5 ROBUSTEZ	80

4.8 Avaliação das atividades biológicas	81
4.8.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELO MÉTODO DO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON	81
4.8.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTISSECRETORA ÁCIDA GÁSTRICA EM MODELO DE LIGADURA PILÓRICA	82
4.8.2.1 Volume da secreção gástrica	82
4.8.2.2 Acidez livre (pH)	83
4.8.2.3 Acidez total (mEq[H ⁺] /L/4h)	84
4.8.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA POR LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA	88
4.8.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA POR MEIO DO MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTOIDE (MCA)	90
4.8.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE PELO MODELO DAS FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS	92
4.8.5.1 Avaliações morfométrica e histológica	93
5 CONCLUSÃO	98
PERSPECTIVAS	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
APÊNDICE	110
ANEXO	113

1 INTRODUÇÃO

O segundo maior bioma do Brasil é o Cerrado, com área correspondente a aproximadamente 25% do território nacional. É detentor de 33% e 5% da biodiversidade nacional e mundial, respectivamente (SANTOS et al., 2010; BRASIL, 2013), sendo que 44% da sua flora é endêmica (KLINK; MACHADO, 2005). Apesar da elevada riqueza de espécies de flora e fauna, o Cerrado brasileiro é um dos biomas mais ameaçados do mundo, como consequência da expansão da agricultura, pecuária e o extrativismo. Dados publicados em 2011 mostraram que o Cerrado teve sua área de vegetação original reduzida, restando apenas 50,84% da área original que era de 2.039.386 km² (BRASIL, 2011). O Cerrado está sendo considerado um *hotspot* mundial, ou seja, área prioritária para conservação pelo alto grau de ameaça de extinção (KLINK; MACHADO, 2005; FOGGIO et al., 2007; SANTOS et al., 2010; BRASIL, 2013).

Foram catalogadas mais de 600 espécies vegetais do Cerrado de Mato Grosso para uso medicinal. Caso esse levantamento se realize em todo bioma, a quantidade de plantas utilizadas para fins medicinais será bem superior (GUARIM NETO; MORAIS, 2003).

Dentre as famílias mais representativas da flora do Cerrado que correspondem a 51% do total estão as Fabaceae (Leguminosae), Asteraceae (Compositae), Orchidaceae, Poaceae (Gramineae), Rubiaceae, Melastomataceae, Myrtaceae, Euphorbiaceae, Malpighiaceae e Lythraceae (RIBEIRO; DIAS, 2007). Lythraceae compreende 22 gêneros distribuídos genericamente por todo o mundo (JOLY, 2002), por sua vez, no Brasil ocorrem 6 espécies do gênero *Lafoensia*: *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., *Lafoensia densiflora* Pohl, *Lafoensia glyptocarpa* Koehne, *Lafoensia replicata* Pohl, *Lafoensia vandelliana* Cham. & Schltdl, *Lafoensia nummularifolia* A. St.-Hil. (MEIRA, 2000; SANO; ALMEIDA; RIBEIRO, 2008).

Lafoensia pacari A. St.-Hil. possui grande tradição de uso popular no Brasil por suas propriedades medicinais. É conhecida popularmente em Goiás como pacari, mangava-brava, dedal ou dedaleiro (LORENZI, 1992) (Figura 1). A etimologia do seu nome advém de *Lafoensia*, dedicado a Dom Juan de Lafõens (1719-1806), da casa de Bragança, membro da Academia de Lisboa e *pacari*, nome de origem tupi usado que significa "árvore de madeira preciosa" (CARVALHO, 2003).

Figura 1 - Aspecto geral de *Lafoensia pacari* no município de Caldasinha/GO.



Fonte: Próprio autor.

Está entre as espécies mais frequentes no Cerrado e de ampla distribuição, ocorrendo em mais de 50% das áreas (RIBEIRO; DIAS, 2007). Ocorre na Bolívia, Paraguai e Brasil nos estados do AP, BA, ES, GO, MA, MT, MS, MG, PA, PR, RJ, RS, SC, SP, TO e no DF. É uma árvore semicaducifólia, encontrada nas regiões de Cerrado, cerradão, mata ciliar, mata seca e florestas de altitude. Sua altura pode variar de 5 a 25 m, sendo que no Cerrado é uma árvore de 1 a 10 m de altura (LORENZI, 1992; CARVALHO, 2003).

Em relação à fenologia, *L. pacari* apresenta a floração com início no final da época de chuvas, no mês de abril até agosto, a frutificação ocorre entre junho a setembro, sendo a dispersão dos frutos mais intensa em setembro, a queda das folhas de julho a setembro e o novo brotamento das folhas ocorre de setembro a dezembro. As três primeiras fases são sazonais e coincidentes com a época de seca e o brotamento com o início das chuvas (SANTOS; COELHO; PIRANI, 2009).

Conforme classificação das categorias de espécies extintas ou ameaçadas, *L. pacari* encontra-se como espécie vulnerável, que corre risco alto de extinção em médio prazo. Isto advém das alterações ambientais e intenso extrativismo (FACHIM; GUARIM, 1995). A retirada incorreta das cascas do caule de pacari para uso medicinal causa o anelamento do caule, o que pode levar a morte da planta (TONELLO, 1997 apud SANTOS, 2006).

Levantamentos etnobotânicos indicaram o uso medicinal das folhas e cascas do caule de *L. pacari* em Goiás como cicatrizante (VILA VERDE; PAULA;

CARNEIRO, 2003) e como antidiarreico (COELHO et al., 2005). No Mato Grosso é a segunda erva mais procuradas no comércio local, sendo as suas folhas e cascas do caule utilizadas para úlceras, gastrite, câncer, emagrecimento, cicatrização, inflamação e problemas do fígado (CABRAL; PASA, 2009). O uso das cascas do caule de pacari foi o mais citado simultaneamente como anti-inflamatório e anti-ulcerogênico (JESUS et al., 2009).

Os estudos científicos publicados nos últimos anos mostraram que as cascas do caule e as folhas do pacari apresentam diversas atividades biológicas. Rogério et al. (2003) demonstraram o potencial do extrato etanólico da casca do caule de *L. pacari* para uso em inflamações eosinofílicas, ao reduzir o nível de interleucina 5, como as provocadas por parasitas, como *Toxocara canis*. Também verificou-se que o tratamento com o extrato etanólico de *L. pacari* reduziu o recrutamento de eosinófilos e a produção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-13), podendo ser uma alternativa terapêutica em processos alérgicos e para a asma (ROGÉRIO et al., 2008). Nascimento et al. (2011) mostraram que a casca do caule possui um efeito antinociceptivo independentemente da ação anti-inflamatória, envolvendo mecanismos capazes de reduzir a dor neurogênica. Há evidências que o extrato da casca do pacari possui efeito antidepressivo (GALDINO et al., 2009). Tamashiro Filho et al. (2012) demonstraram a atividade antiulcerogênica do extrato metanólico das cascas de pacari. Foi detectado gastroproteção nos modelos de indução de úlceras agudo e crônico. Essa atividade foi dependente da atividade antioxidante, antissecretória e pela inibição de citocinas pró-inflamatórias, mas foi independente da motilidade gastrointestinal e da secreção de muco.

Muller et al. (2007) detectaram que o extrato metanólico das folhas de *L. pacari* foi ativo contra o herpes vírus tipo 1. O mesmo extrato das folhas de *L. pacari* foi considerado muito ativo contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ALVES et al., 2000). O extrato etanólico das folhas do pacari mostrou atividade antinociceptiva no método das contorções abdominais induzidas por ácido acético e no modelo de dor induzida por formalina, tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória e atividade antiinflamatória devido a redução do edema de orelha induzido por óleo de cróton. O extrato não afetou a coordenação motora, hipnose ou sedação (GUIMARÃES et al., 2010). Em avaliações de toxicidade verificou-se que o extrato metanólico das folhas de *L. pacari* foi atóxico para *Artemia salina* (ALVES et al., 2000) e constatou-se ausência

de genotoxicidade do extrato etanólico das folhas de pacari pelo teste de detecção de mutação e recombinação somática em *Drosophila melanogaster* (PORTO et al., 2008).

A prospecção fitoquímica do extrato da casca do caule de *L. pacari* indicou a presença de taninos, esteroides e saponinas (SOLON et al., 2000; VIOLANTE et al., 2009). Solon et al. (2000) isolaram e identificaram o ácido elágico das frações etérea e acetato de etila das cascas do caule, sendo o ácido elágico considerado o principal inibidor da formação de radicais livres e da xantina oxidase. O extrato das folhas apresentou flavonoides como campferol-3-O-glicosídeo, 3-O-glicosil-glicosídeos do campferol e da quercetina, e 3-O-glicosídeos da quercetina (galactosídeo, glicosídeo e glicosil-xilosídeo) (SANTOS; SALATINO; SALATINO, 2000).

Sampaio et al. (2011) verificaram o efeito positivo da temperatura e dos micronutrientes na produção de compostos fenólicos (taninos, flavonoides e ácido elágico) nas folhas de pacari. Os composto fenólicos se concentraram nos meses de temperatura mais baixa, sendo que os taninos hidrolisáveis foram os compostos com maior concentração (32 a 54%). Segundo Okuda et al. (2009), Lythraceae é conhecida pela presença de taninos hidrolisáveis da classe dos elagitaninos; esses taninos foram identificados em diversos gêneros, dentre eles *Cuphea*, *Lagerstroemia*, *Woodfordia* e *Lythrum* (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 2000).

Os taninos são compostos fenólicos de alta massa molecular (500 a 3.000 Daltons), solúveis em água e que possuem a propriedade de formarem complexos insolúveis com alcaloides e proteínas (SANTOS; MELLO, 2007). Nas plantas os taninos possuem uma função importante na defesa contra herbívoros e micro-organismos (MONTEIRO et al., 2005). Os taninos são responsáveis por algumas atividades farmacológicas como antisséptico, antidiarréico, antimicrobiano, antídoto contra intoxicações, cicatrizante, anti-inflamatório, antioxidante, antiviral e antitumoral. As principais propriedades responsáveis pelas atividades farmacológicas foram a redução de íons metálicos, ligação e precipitação de proteína e ação antioxidante (OKUDA, 2005).

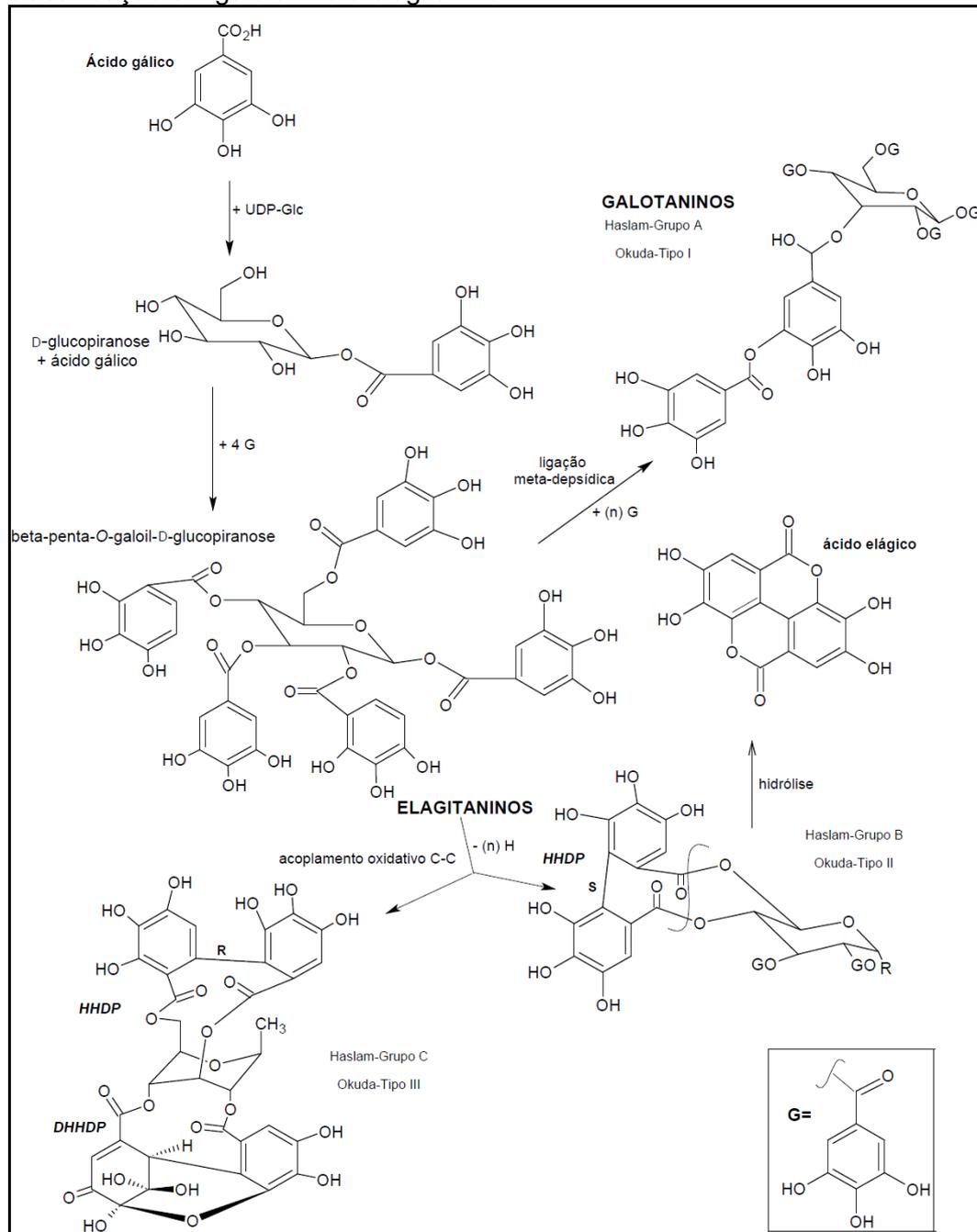
Os taninos distinguem-se quimicamente em dois grupos: os taninos condensados e os taninos hidrolisáveis (SANTOS; MELLO, 2007). Os taninos condensados são abundantes no reino vegetal e são designados como proantocianidinas, porque este tipo de polifenol sofre degradação oxidativa para

formar, mediante aquecimento em meio ácido, pigmentos antocianidinas (avermelhadas). As proantocianidinas são formadas por ligações entre compostos de flavan-3-óis (YOSHIDA; HATANO; ITO, 2005).

Os taninos hidrolisáveis são encontrados em ampla variedade de plantas dicotiledôneas, ocorrendo nos caules, cascas do caule, folhas e frutos. Apresentam como estrutura básica um núcleo central de açúcar, β -penta-O-galoil-D-glicopiranoose, esterificado com ácido gálico. É constituído por duas classes, os galotaninos e os elagitaninos. A classificação dos taninos hidrolisáveis difere por autores, Haslam (1982) divide em 3 grupos (grupo A, B e C) e Okuda, Yoshida e Hatano (2000) em 4 tipos (tipo I, II, III e IV) (POUYSÉGU et al., 2011). A figura 2 mostra a formação das classes dos taninos hidrolisáveis.

A estrutura central dos galotaninos está ligada a outras unidades de ácido gálico por ligações meta-depsídicas. A presença de acoplamento oxidativo C-C do grupo éster do galoil na posição 2,3 e/ou 4,6 de um núcleo D-glucopiranoose (4C_1) foi utilizado para definir os elagitaninos. A unidade hexaidroxidifenoil (HHDP) é a característica estrutural que determina os taninos hidrolisáveis da classe dos elagitaninos. A hidrólise de unidades HHDP de elagitaninos dá origem à sua transformação na bislactona do ácido elágico. Há os elagitaninos que contêm unidades de HHDP ligadas a 1,6, 2,4 e/ou 3,6 na posições do anel D-glucopiranoose (4C_1) com substituinte na posição axial. A oxidação do grupo HHDP dá origem à formação da unidade deidroexaidroxidifenoil (DHHDP).

Figura 2 - Biossíntese dos diferentes tipos de taninos hidrolisáveis e sua classificação em galotanino e elagitanino.



Fonte: Adaptado de POUYSEGU et al., 2011.

Os elagitaninos possuem uma diversidade estrutural que favorece o estudo das atividades biológicas e farmacológicas (OKUDA et al., 2009). Aproximadamente 40% dos elagitaninos oligômeros caracterizados até o momento foram isolados das espécies de Onagraceae, Lythraceae, Myrtaceae, Trapaceae e Melastomataceae, indicando essas famílias como uma fonte natural (YOSHIDA; AMAKURA; YOSHIMURA, 2010).

Dentre os diversos elagitaninos já isolados e com atividades biológicas promissoras encontra-se a punicalagina, que foi identificada primeiramente em pericarpos de *Punica granatum* L. Lythraceae (Punicaceae) e posteriormente de espécies de *Terminalia* (Combretaceae) (YOSHIDA; AMAKURA; YOSHIMURA, 2010). Yang et al. (2012) verificaram que ratos tratados com punicalagina e submetidos a dose letal de enterovírus 71 tiveram diminuição da mortalidade e alívio dos sintomas clínicos, devido a capacidade de inibição da replicação viral. Dell'Agli et al. (2010) relataram que o extrato de *P. granatum* e punicalagina possuíam atividade antimalárica, por inibição de enzimas do ciclo do *Plasmodium falciparum*. A punicalagina apresentou efeito quimiopreventivo em células induzidas por proteína RAS ativada (vírus do sarcoma de rato que está envolvida no desenvolvimento de câncer em humanos), pois suprimiu a proliferação celular por uma possível interrupção do ciclo celular e diminuiu a concentração de superóxido de hidrogênio intracelular (CHEN; LI, 2006). Segundo Nigris et al. (2007) os antioxidantes presentes no suco da romã, dentre eles a punicalagina, reduziu a ativação de enzimas pró-aterogênica, diminuiu a progressão da aterosclerose e melhorou a função vascular de ratos. A punicalagina demonstrou proteção contra a aterosclerose devido à redução da biossíntese de triglicerídeos em macrófagos, efeito atribuído à inibição em 54% da DGAT1 (enzima que regula a produção de gordura) (ROSENBLAT; AVIRAM, 2011).

Os efeitos da punicalagina em estudos de farmacologia com base na sua capacidade antioxidante foram demonstrados *in vitro* e *in vivo*. Kulkarni et al. (2007) sugerem que o mecanismo de ação antioxidante da punicalagina é por eliminação de espécies reativas de oxigênio, bem como, a sua ligação com íons metálicos. O extrato das folhas de *Terminalia catappa* L., que possui como maior componente a punicalagina suprimiu a genotoxicidade induzida por bleomicina em células de ovário de hamster chinês e a proliferação de espécies reativas de oxigênio (CHEN et al., 2000). Um estudo avaliou ratos que receberam dieta enriquecida com 20% do extrato das cascas de romã (6% de punicalagina= 4,8 g/kg/dia) por via oral em quantidades crescentes a cada semana (0,39; 0,54; 1,12; 1,3 e 1,18 g/dia), com duração final de 37 dias (5 semanas). Verificou-se ausência de alterações nos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos, exceto a redução de ureia e de triglicerídeos (devido à diminuição do valor nutritivo da dieta e da palatabilidade) mostrando a ausência de toxicidade (CERDÁ et al., 2003). A punicalagina isolada da

romã inibiu o dano oxidativo e apresentou elevada atividade antiproliferativa em linhagem de células cancerígenas de mama, pulmão e colo de útero (AQIL et al., 2012).

Como relatado acima, *L. pacari* e os taninos são responsáveis por diversas atividades biológicas e na literatura são encontrados trabalhos que descrevem a presença de ácido elágico em *L. pacari*, não havendo estudos com os elagitaninos. Aliado a isso, em Sampaio (2010) relata em sua Dissertação (trabalho desenvolvido em nosso laboratório - LPPN/FF/UFG) que a concentração de taninos encontrada nas folhas de *L. pacari* é mais alta que a encontrada nas cascas do caule. Visando o uso sustentável dessa espécie, prefere-se a utilização das folhas, pois a retirada incorreta das cascas do caule pode levar ao anelamento do caule ocasionando a morte da planta. Assim, justifica-se o presente trabalho, o qual pretende caracterizar os taninos presentes nas folhas de *L. pacari*, bem como suas atividades biológicas, sendo uma nova proposta de trabalho em relação ao já descrito na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar os principais taninos nas folhas de *Lafoensia pacari* e avaliar as atividades biológicas do extrato acetônico e do composto isolado das folhas de *Lafoensia pacari*.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a droga vegetal (folha) em pó: reações histoquímicas, determinação do índice de espuma e pesquisa de taninos por precipitação da gelatina;
- Obter o extrato em banho de ultrassom e caracterizar o extrato bruto do pacari (EBP): determinar o teor de sólidos, pH e densidade relativa e de massa e perfil cromatográfico (CCD e CLAE);
- Realizar estudos fitoquímicos do EBP direcionados para taninos: fracionar, isolar e identificar o constituinte químico por meio de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e de carbono (RMN ¹³C);
- Validar uma metodologia analítica por CLAE para quantificação da substância isolada;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato liofilizado de pacari pelo teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton;
- Avaliar a atividade antiulcerogênica do extrato liofilizado de pacari e do composto isolado pelo teste de lesão gástrica induzida por indometacina;
- Avaliar a atividade antissecretora do extrato liofilizado de pacari ácida gástrica do extrato e do composto isolado em modelo de ligadura pilórica.
- Avaliar a atividade angiogênica do extrato liofilizado de pacari através do modelo da membrana corioalantoidea (MCA).
- Avaliar a atividade cicatrizante do extrato liofilizado de pacari pelo modelo das feridas cutâneas em ratos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As folhas de pacari foram coletadas no município de Caldazinha/GO (16° 39' 54,5" Sul, 49° 00' 03,9" Oeste, 1100 m de altitude) no mês de dezembro/2011. O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. José Realino de Paula da Universidade Federal de Goiás e uma exsicata foi depositada no herbário desta instituição sob registro UFG/47581.

As folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 30 °C, trituradas em moinho de facas e armazenadas em freezer.

3.2 Caracterização da droga vegetal em pó

3.2.1 REAÇÕES HISTOQUÍMICAS

Ao pó adicionou-se o reagente de acordo com a classe de metabólito secundário em estudo. Para pesquisa de saponina, adicionou-se uma gota de ácido sulfúrico e observou-se a sequência de cores (amarelo, vermelho e violeta ou azul-esverdeada). Para tanino, cloreto de ferro (III) a 10% com uma pequena quantidade de carbonato de sódio (cerca de 2 mg), seguida de lavagem com água após 3 minutos. Observou-se estruturas azul-esverdeado (BRASIL, 2010).

3.2.2 PESQUISA DE TANINOS

A determinação qualitativa de taninos foi realizada pelo método de precipitação com gelatina (COSTA, 2001). Fez-se uma extração empregando 2 g da droga em 50 mL água e levou-se a ebulição por 5 minutos. Após filtração completou-se o volume para 100 mL. Em um tubo com 5 mL deste extrato, acrescentaram-se 4 gotas de solução de gelatina a 2,5% (p/v) em solução de cloreto de sódio 5% (p/v), verificando a formação de um precipitado branco.

3.2.3 PESQUISA DE SAPONINAS

Para a pesquisa de saponinas foi determinado o índice de espuma. Um grama do pó da droga vegetal com 50 mL de água foi submetido à fervura por 30 minutos, filtrou-se para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume. Em uma série com 10 tubos de ensaio de mesmo tamanho e com tampa, colocou-se no primeiro tubo 1 mL de solução extrativa e 9 mL de água destilada, no segundo tubo 2 mL de solução extrativa e 8 mL de água destilada e assim sucessivamente, até o décimo tubo com 10 mL de solução extrativa. Tampou-se e agitou-se verticalmente por 15 segundos. Mantiveram-se os tubos em repouso por 15 minutos e mediu-se a altura da espuma persistente (BRASIL, 2010).

3.3 Preparação do extrato bruto do pacari (EBP)

Para a obtenção do extrato bruto, fez-se testes para a seleção do solvente extrator, utilizando metanol PA e a 70% v/v, etanol PA 95% e a 70% v/v e acetona a 70% e a 50% v/v. As extrações foram realizadas em banho de ultrassom durante 30 minutos. Evaporou-se os solventes em rotaevaporador, filtrou-se o extrato em papel e analisou os perfis cromatográficos dos extratos por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE) .

Após seleção da melhor condição para extração dos taninos, o extrato bruto do pacari foi obtido por extração das folhas (250 g) com mistura acetona/água 50% (total de 13,05 L), em banho de ultrassom por 30 minutos por ciclo até esgotamento. A acetona foi evaporada e a parte aquosa filtrada em funil de Buchner para eliminação de clorofilas e compostos apolares. Posteriormente, o extrato foi armazenado em freezer e uma parte foi liofilizada (MUELLER-HARVEY, 2001; SANTOS; MELLO, 2007).

3.4 Caracterização do extrato bruto do pacari

Para o extrato bruto obtido das folhas do pacari realizaram-se as determinações do teor de sólidos, pH e densidade relativa e de massa conforme descrito na Farmacopéia Brasileira 5ª Edição (BRASIL, 2010). As análises foram realizadas em triplicata e o resultado expresso como média dos valores obtidos.

3.4.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS

Para determinar a quantidade de substância volátil, utilizou-se balança de infravermelho com lâmpada de halogênio, com 1 g da amostra. O resultado obtido em percentual de substâncias voláteis e água foi subtraído de 100%, resultando no teor de sólidos (BRASIL, 2010).

3.4.2 DETERMINAÇÃO DE DENSIDADE RELATIVA E DE MASSA

A densidade relativa (d_{23}^{23}) foi medida pelo método do picnômetro. Pesou-se o picnômetro vazio, contendo água destilada a 23 °C (temperatura ambiente) e com o extrato a 23 °C. A diferença entre o picnômetro vazio e com conteúdo forneceu a massa de água e do extrato. Assim, d_{23}^{23} foi determinada pela razão entre a massa do extrato e a massa de água (BRASIL, 2010), conforme a equação 1:

$$d_{23}^{23} = \frac{m_e - m_v}{m_a - m_v} \quad (1)$$

Onde: m_e = massa do picnômetro com extrato

m_a = massa do picnômetro com água

m_v = massa do picnômetro vazio

d_{23}^{23} = densidade relativa a 23 °C

A densidade de massa (ρ) é a razão de sua massa por seu volume a 23 °C, calculada a partir da densidade relativa (BRASIL, 2010), de acordo com a equação 2 abaixo:

$$\rho = 0,99754 \times d_{23}^{23} + 0,0012 \quad (2)$$

Onde: 0,99754 = densidade da água a 23 °C

3.4.3 DETERMINAÇÃO DO pH

O pH foi determinado utilizando peagâmetro, calibrado previamente com as soluções tampão 7,0 e 4,0 (BRASIL, 2010).

3.4.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em cromatoplasmas de alumínio recobertas com sílica (Merck), fase móvel composta por acetona, tolueno e ácido fórmico (3:3:1) e a revelação foi feita com solução de vanilina/H₂SO₄ com aquecimento e FeCl₃/HCl (SANTOS; MELLO, 2007), verificando assim a presença de taninos hidrolisáveis.

3.4.5 CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O EBP (1 µg/mL em água ultrapura) foi submetido à cromatografia em fase líquida de alta eficiência, em aparelho Waters, com bomba quaternária, detector de arranjo diodos (DAD) 2998 e sistema de dados Enpower 2.0. Utilizou-se coluna Waters C18, 250 x 4,6 mm, vazão de 1,0 mL/minuto, volume de injeção de 10 µL, temperatura de 25 °C, detecção máxima à 254 nm e fase móvel composta (OKUDA; YOSHIDA; HATANO, 1989) por gradiente de acetonitrila (A) e solução 0,01 M H₃PO₄ : 0,01 M KH₂PO₄ (B) (iniciado em 8% de A, 18% de A em 20 min., 50% de A em 35 min., 80% de A em 45 min., finalizando com 8% de A em 50 min.).

Além de verificar o perfil cromatográfico do EBP, foram injetados 15 padrões de compostos fenólicos (Quadro 1) que foram isolados de plantas e identificados pela Prof^a Suzana da Costa Santos do Instituto de Química, para comparação dos tempos de retenção e do espectro de absorção (190 nm a 600 nm).

Quadro 1 - Padrões de compostos fenólicos testados em CLAE.

PADRÕES TESTES	
Oenoteína B	Pentagalolil-glicose
Genina D	Telimagrandia I
1,3,6-tri-galolil-glicoronosídeo	Catequina
Pedunculagina	Naringina
Telimagrandina II	Rutina
3-galolil-4,6- hexaidroxidifenol	Galato de (-) -epigalocatequina
2,3,6-trigalolil-glicose	Oenoteína C

3.5 Fracionamento do extrato bruto do pacari

O fracionamento foi realizado no Laboratório de Bioatividade Molecular do Instituto de Química/UFG sob supervisão da Prof^a Suzana da Costa Santos.

O extrato bruto de pacari (6,23 L) foi dividido em 14 porções (450 mL) e extraído com acetato de etila (10x100 mL) em funil de separação. As frações acetato de etila foram reunidas e o solvente recuperado em rotaevaporador. As frações aquosas também foram reunidas e liofilizadas. Parte da fração aquosa (45,065 g) foi parcialmente solubilizadas em 400 mL de metanol e filtrada. Separou-se a fração insolúvel da fração solúvel em metanol, a qual foi submetida a evaporação do solvente seguida de liofilização.

3.6 Cromatografia em coluna

A cromatografia foi realizada no Laboratório de Bioatividade Molecular do Instituto de Química/UFG sob supervisão da Prof^a Suzana da Costa Santos.

Uma parte da fração solúvel em metanol (20,010 g) foi submetida à cromatografia em coluna com gel polimérico vinílico Diaion® HP-20 como adsorvente (coluna de 28 x 4 cm). Primeiramente, lavou-se a coluna com água destilada. Após, a fração foi solubilizada em água destilada e aplicada na coluna. Utilizou-se como eluente: gradiente de água 100%, água/metanol (8:2, 6:4, 4:6, 2:8), metanol 100%, metanol/acetona (8:2, 6:4, 2:8) e acetona 100% (Esquema 1).

As frações foram coletadas em tubos de ensaio e os solventes orgânicos evaporados. As frações foram monitoradas por CLAE e CCD, conforme descrito nos itens subsequentes.

3.6.1 ANÁLISE DAS FRAÇÕES POR CCD

As frações foram submetidas à CCD, em cromatoplaças de alumínio recobertas com sílica (Merck) como adsorvente, fase móvel composta por acetona, tolueno e ácido fórmico (3:3:1); e ácido fórmico, formiato de etila e tolueno (1:7:1) e revelação com solução de FeCl_3/HCl 0,01 mol/L (SANTOS; MELLO, 2007) observadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 365 nm. Conforme o perfil detectado, as frações foram reunidas e liofilizadas.

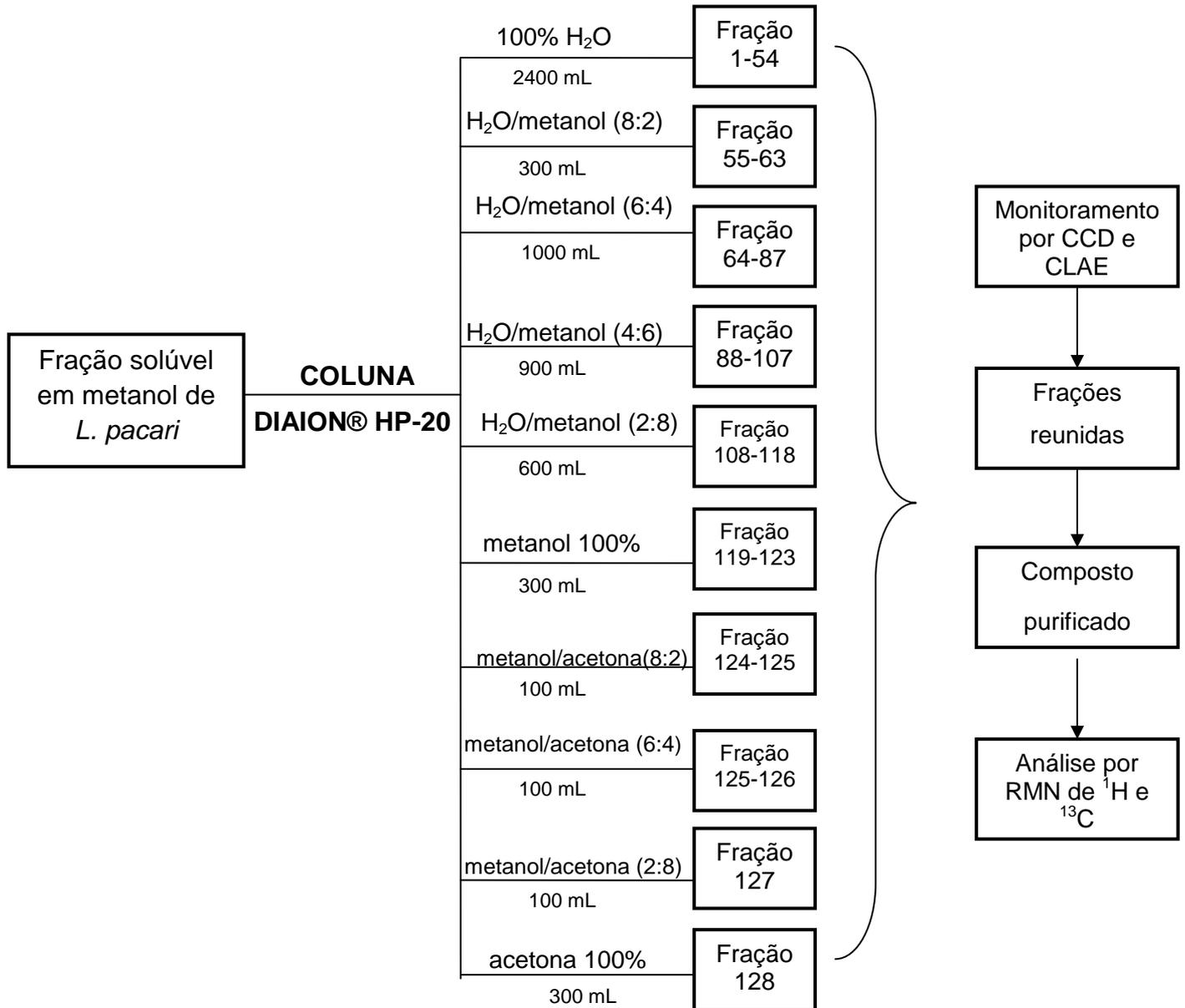
3.6.2 ANÁLISES DAS FRAÇÕES POR CLAE

As frações na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ em água ultrapura foram analisadas por CLAE. As análises foram realizadas utilizando o equipamento e condições descritas no item 3.4.5 (página 33).

3.6.3 ANÁLISE DA FRAÇÃO POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A fração que estava pura, foi analisada no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química/UFG, sob coordenação do Prof. Dr. Luciano Lião. A caracterização foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H) e Carbono (^{13}C), unidimensional e bidimensional (COSY- *Correlation Spectroscopy*, HMBC- *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, HSQC- *Heteronuclear Single Quantum Coherence*), em equipamento Bruker Avance III 500 (campo de 11,75 Tesla: frequência de 500,13 MHz para o ^1H e de 125,76 MHz para o ^{13}C). A amostra foi solubilizada em acetona- d_6 e os deslocamentos químicos dos espectros foram referenciados ao padrão interno TMS (tetrametilsilano). Para o processamento e análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram utilizados os programas TopSpin e ACDLabs 12.0.

Esquema 1 - Fluxograma da cromatografia em coluna de Diaion® HP-20 do EBP.



3.7 Validação de metodologia analítica para quantificação de punicalagina por CLAE

A validação do método selecionado foi realizada de acordo com a RE 899/2003 (BRASIL, 2003). Analisou-se os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

3.7.1 ESPECIFICIDADE

A especificidade foi determinada através da análise dos cromatogramas de varredura (190 nm a 600 nm) da solução do extrato a 1 µg/mL, solução do padrão a 1 µg/mL e da água ultrapura (solvente).

3.7.2 LINEARIDADE

Para a análise da linearidade prepararam-se 3 curvas padrão à partir de uma solução do padrão a 2 mg/mL em água ultrapura, com concentrações de 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL e 2 mg/mL. A partir do gráfico obtido da concentração média do padrão e área média dos picos, calculou-se a linearidade pelo coeficiente de correlação obtido na regressão linear. Assim, obteve-se também o intervalo linear.

3.7.3 PRECISÃO

A precisão foi avaliada nos níveis de repetibilidade e precisão intermediária. Para a repetibilidade, prepararam-se 6 soluções do extrato na concentração de 100% (1 mg/mL), calculou-se o coeficiente de variação (equação 3) entre os resultados. A precisão intermediária foi obtida pelo cálculo do coeficiente de variação entre os resultados da análise em 2 dias diferentes e outro analista.

$$CV (\%) = \frac{DP}{\bar{T}} \times 100 \quad (3)$$

Onde: DP= Desvio padrão dos teores obtidos

\bar{T} = Média dos teores obtidos

3.7.4 EXATIDÃO

A exatidão foi realizada a partir do extrato em 3 concentrações diferentes, sendo 50% (2,5 mg/5 mL), 100% (5,0 mg/5 mL) e 150% (7,5 mg/5 mL) da concentração teórica analisada, cada uma em triplicata. Foi determinada de acordo

com a equação 4, expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{[\text{médica experimental}]}{[\text{teórica}]} \times 100 \quad (4)$$

3.7.5 ROBUSTEZ

A robustez do método foi avaliada a partir de pequenas variações nos parâmetros do método já estabelecido, comparando esses resultados obtidos com os resultados nas condições normais, por meio do coeficiente de variação (CV). Os parâmetros avaliados estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Parâmetros avaliados na robustez.

PARÂMETRO	CONDIÇÕES		
	Normal	Variações	
Vazão (mL/min)	1	0,9	1,1
Comprimento de onda – λ (nm)	254	253	255

3.8 Avaliação das atividades biológicas

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Goiás nº 104/2008 e nº 067/2012 (Anexo 1). Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos em experimentação animal preconizados pelo Conselho Nacional para Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os testes de atividade anti-inflamatória, atividade antiulcerogênica e antissecretória foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais (LFPN)-ICB/UFG, sob supervisão do Prof. Dr. Elson Alves Costa. As atividades angiogênicas e cicatrizantes foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN)-FF/UFG e no biotério da Faculdade de Farmácia/UFG respectivamente. Os animais (camundongos e ratos) foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG).

3.8.1 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA PELO MÉTODO DO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÓLEO DE CRÓTON (*Croton tiglium* L.)

Empregou-se a metodologia de acordo com Zanini et al. (1992). Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* adulto, fêmeas, pesando entre 40 e 45 g. Os animais foram distribuídos em 3 grupos com 10 animais cada. Em todos os grupos, foram administradas na superfície interna da orelha direita 25 µL da solução de óleo de cróton 2,5% em acetona e 25 µL de acetona na orelha esquerda. Após 30 minutos todos os animais receberam 25 µL em ambas as orelhas de: metanol no grupo 1; EBP liofilizado na concentração de 200 mg/mL (5 mg/orelha) em metanol no grupo 2 e acetato de dexametasona 20 mg/mL (0,5 mg/orelha) em metanol no grupo 3. Após 4 horas da aplicação do agente flogístico, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Discos de 6 mm de diâmetro de ambas as orelhas foram retirados e pesados. A atividade antiedematogênica foi avaliada pela diferença de peso entre as orelhas dos animais. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão das médias (EPM). Na análise dos resultados utilizou-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Consideraram-se como valores significantes aqueles cujo $p \leq 0,05$. Para a análise dos dados foi utilizado o *software* GraphPad Prism 3.0.

3.8.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTISSECRETORA ÁCIDA GÁSTRICA EM MODELO DE LIGADURA PILÓRICA

A metodologia utilizada para este experimento foi proposta por Visscher, et al. (1954). Os animais utilizados nesse experimento foram camundongos albinos *Swiss* adulto, fêmeas, pesando entre 40 e 45 g, mantidos em jejum de 16 horas com acesso livre a água contendo 5% glicose. Foram distribuídos em grupos de até 12 animais, anestesiados com éter e colocados em decúbito dorsal em uma placa de cortiça. Através de uma incisão de cerca de 2 cm no abdômen, o estômago foi localizado e realizada a ligadura do piloro com fio de algodão. Os animais foram tratados por via intraduodenal (i.d.) com veículo- água 10 mL/kg, EBP liofilizado 75 mg/kg, 150 mg/kg, 300 mg/kg, punicalagina 120 mg/kg ou ranitidina 50 mg/kg. Suturou-se a parede abdominal e 4 horas após a cirurgia, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Fez-se o pinçamento do esôfago para

evitar perda do material secretado, os estômagos foram removidos, lavados, secos em gaze e mantidos em béquer com salina gelada. Seccionou-se o estômago ao longo da curvatura menor e a mucosa foi lavada individualmente com 2 mL de água destilada, recolhendo-se o suco gástrico e o lavado em tubos de ensaios, que foram centrifugados a 1500 rpm por 30 minutos.

3.8.2.1 Volume da secreção gástrica

O sobrenadante do suco gástrico foi transferido para uma proveta e mediu-se o volume (mL). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (EPM) de cada grupo experimental. Na análise dos resultados utilizou-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. .Foram considerados como valores significantes aqueles cujo $p \leq 0,05$.

3.8.2.2 Acidez livre (pH)

O sobrenadante obtido de cada estômago foi completado para 10 mL com água destilada e determinou-se a acidez livre (pH) em peagâmetro. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (EPM) de cada grupo experimental. Na análise dos resultados utilizou-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. . Foram considerados como valores significantes aqueles cujo $p \leq 0,05$.

3.8.2.3 Acidez total

A acidez total (mEq[H⁺]/L/4h) de cada conteúdo estomacal foi determinada através de titulação com NaOH 0,01 M, tendo como indicador ácido-base a fenolftaleína 2%. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (EPM) de cada grupo experimental. Na análise dos resultados utilizou-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. . Foram considerados como valores significantes aqueles cujo $p \leq 0,05$.

3.8.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA POR LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA

Este experimento foi realizado de acordo com metodologia de Djahanguri (1969). Utilizaram-se camundongos albinos *Swiss* adulto, fêmeas, pesando entre 40 e 45 g, em jejum de sólidos por 16 horas com acesso livre a água contendo 5% de glicose. Os animais foram divididos em grupos, os quais foram administrados por via oral (v.o), a água (n= 9 e 10; 10 mL/kg, veículo), EBP liofilizado (n= 10; 150 mg/kg), punicalagina (n= 9; 120 mg/kg) ou ranitidina (n= 10; 50 mg/kg). Após 1 hora foi administrado subcutaneamente (s.c.) a indometacina (30 mg/kg) e depois de 3 horas da administração do agente lesivo, repetiram-se todos os tratamentos. Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ após 6 horas da administração da indometacina. A partir de abertura no abdômen, o estômago foi removido, lavado externamente, aberto ao longo da pequena curvatura, o conteúdo gástrico foi desprezado e a mucosa foi lavada com salina. Os estômagos foram mantidos em béquer com salina gelada até a inspeção em estereoscópio, sendo determinado o número de úlceras e o índice de lesões.

O índice de lesões foi determinado segundo protocolo pré-estabelecido adaptado da tabela proposta por Macaúbas et al. (1988), que consideram o edema de mucosa, hemorragias, intensidade de ulceração, número total de úlceras e petéquias por cm² da mucosa gástrica (Quadro 3). Foram atribuídos pontos às lesões e a soma reflete a intensidade da lesão, formando o índice de lesão. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão das médias (EPM) de cada grupo experimental. Para a análise dos resultados utilizou-se análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Os valores considerados como significantes foram aqueles cujo $p \leq 0,05$.

Quadro 3 - Pontuação para a composição do índice de lesão da mucosa gástrica.

LESÃO	PONTUAÇÃO
Descoloração da mucosa	1 ponto
Edema	1 ponto
Hemorragias	1 ponto
Perda de pregas da mucosa	1 ponto
Cada 10 petéquias	2 pontos
Úlceras ou erosões de até 1 mm	nº x 2 pontos
Úlceras ou erosões maiores de 1 mm	nº x 2 pontos
Úlcera perfurada	nº x 2 pontos

Fonte: Macaúbas et al., 1988.

3.8.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA POR MEIO DO MODELO DA MEMBRANA CORIOALANTOIDE (MCA)

A MCA foi preparada segundo metodologia adaptada de Vargas et al. (2007). Utilizaram-se 30 ovos de galinhas da linhagem Cobb, embrionados com dois dias de idade, obtidos de matrizes com 34 a 35 semanas de idade, doados pela empresa Superfrango S.A. (Itaberaí, Goiás). Os ovos foram acomodados em incubadora (Premium Ecológica IP-130), sob umidade de 65-67% e temperatura de 37 °C.

Os ovos foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos com 15 ovos cada, sendo:

G1: grupo controle tratado com água destilada,

G2: grupo tratado com EBP a 10% em água destilada

No 3º dia de incubação foram removidos 2 a 3 mL de albume por uma pequena abertura na casca do ovo utilizando uma seringa descartável. Em seguida, o orifício foi selado com parafina histológica líquida. A incubação continuou até o 12º dia, quando a parafina foi retirada e os ovos foram tratados com 100 µL de água destilada (G1), 100 µL da solução do EBP a 10% em água destilada (G2) adicionado diretamente sobre a superfície da MCA, empregando uma seringa descartável. Os ovos foram novamente selados com parafina e incubados por mais 2 dias. Após esse período, fragmentos da MCA foram retirados para avaliações morfológica e histológica.

A abertura da casca, a retirada do albume e os tratamentos foram realizados em uma câmara de segurança biológica tipo II.

A eutanásia dos embriões foi realizada por secção medular na região atlanto-occipital.

3.8.4.1 Avaliação morfométrica da MCA

Fragmentos com 1 a 2 cm da MCA da região onde o extrato foi aplicado de cada ovo foram distendidos sobre uma lâmina de vidro e analisados microscopicamente. O registro fotográfico foi realizado em um fotomicroscópio Zeiss® (Axionstar Plus) com máquina fotográfica digital acoplada, utilizando o software Image J 1.3.1 (NIH, Estados Unidos). Foram fotografados 30 campos que apresentavam vasos sanguíneos e calculou-se a porcentagem de área marcada em vermelho por campo (WILLIAMS, 1977).

Para a análise estatística dos resultados utilizou-se o teste de Mann-Whitney e pós-teste de Dunn. O programa GraphPad InStat 3.0 e teste de normalidade de Fromthe Kolmogorov-Smirnov foram utilizados para análise dos dados. Considerou-se como valores significantes aqueles cujo $p \leq 0,05$.

3.8.4.2 Avaliação das células inflamatórias e número de vasos sanguíneos da MCA

Fragmentos da MCA de cada ovo ($n=10$) foram fixadas em formalina tamponada e posteriormente incluídos em parafina e corados pela técnica de hematoxilina e eosina. As células inflamatórias foram avaliadas considerando o escore: ausente (0), discreto (1 a 25%), moderado (25 a 50%) e acentuado (acima de 50%) (PARENTE et al., 2011).

O número de vasos sanguíneos na mesoderme da MCA foi determinado utilizando-se a planimetria por contagem de pontos com o auxílio do software Image J 1.3.1 (NIH, Estados Unidos). Para isso, um retículo quadrangular composto por 25 pontos foi superposto à imagem histológica e foram contados apenas os vasos nas intersecções presentes no campo visual (RIBATTI et al., 2000; PRADO et al., 2006).

O número de vasos sanguíneos foi analisado estatisticamente por meio de ANOVA e teste de Tukey. O programa GraphPad InStat 3.0 e teste de normalidade de Fromthe Kolmogorov-Smirnov foram utilizados para análise dos dados. Considerou-se como valores significantes aqueles cujo $p \leq 0,05$.

3.8.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE PELO MODELO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS

Na avaliação da atividade cicatrizante foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, fêmeas, com 60 dias de idade, peso entre 160 a 190 g. Os animais foram aclimatados no Biotério da Faculdade de Farmácia da UFG, por um período de dez dias, mantidos em gaiolas de polietileno, forradas com maravalhas, sob condições ambientais controladas (temperatura 23 ± 2 °C, umidade relativa do ar entre 50 e 70% e período claro/escuro de 12 h) e com fornecimento de água e ração *ad libitum*. O experimento foi realizado de acordo com protocolo adaptado de Lopes et al. (2005) e Garros et al. (2006).

Os animais foram pesados e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos com 5 animais cada, sendo:

C1: grupo controle tratado com água destilada durante 7 dias,

C2: grupo tratado com EBP a 10% em água destilada durante 7 dias,

C3: grupo controle tratado com água destilada durante 14 dias e

C4: grupo tratado com EBP a 10% em água destilada durante 14 dias.

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados (cetamina, 70 mg/kg e xilazina, 10mg/kg, IM) e a região dorso-cervical foi epilada. As feridas foram realizadas com um *punch* metálico circular de 1 cm de diâmetro na pele de cada animal. Logo após a cirurgia e diariamente no mesmo horário aplicou-se nas feridas 100 µL de água destilada (C1 e C3) e 100 µL da solução do EBP a 10% (C2 e C4) com auxílio de uma seringa descartável.

Logo após a cirurgia e nos 2 dias seguintes os animais receberam por v.o o analgésico cloridrato de tramadol para minimizar a dor.

Diariamente os animais foram examinados quanto ao aspecto geral e as feridas avaliadas macroscopicamente, observando-se presença ou ausência de: hiperemia, hemorragia, exsudato e crosta.

Ao final de cada etapa, 7 dias após o procedimento cirúrgico para os grupos C1 e C2 e 14 dias após o procedimento cirúrgico para os grupos C3 e C4, os animais foram pesados e eutanasiados em câmara de CO₂.

3.8.5.1 Avaliações morfométrica e histológica

As feridas foram fotografadas nos dias zero, 7 (grupo C1 e C2) e 14 (grupo C3 e C4) utilizando uma câmera digital acoplada em tripé, mantida a uma distância de 27 cm da ferida. As imagens foram digitalizadas em microcomputador, com o auxílio do Software Image J 1.3.1 (NIH, Estados Unidos). Foi calculado o grau de contração da área (GC) da ferida, conforme a equação 3 (OLIVEIRA et al., 2000).

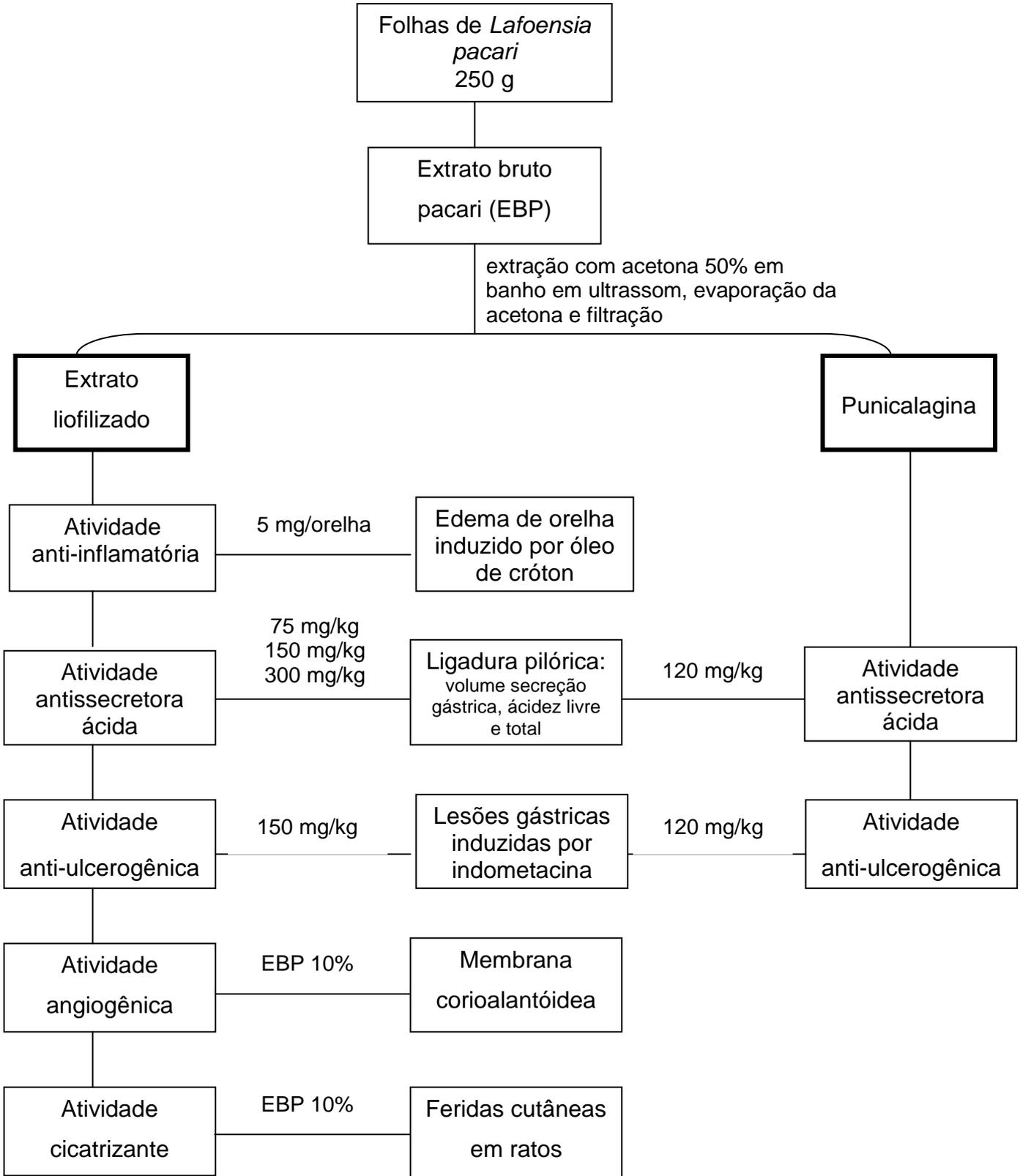
$$\text{Contração da ferida (\%)} = \frac{(\text{área lesada inicial} - \text{área contraída})}{\text{área lesada inicial}} \times 100 \quad (3)$$

Para a avaliação histológica, um fragmento de cada ferida foi retirado após a eutanásia, fixado em formol tamponado, processado e corado por hematoxilina e eosina. Foram avaliadas as variáveis ao 7º dia: colágeno, fibrina, hemorragia, hiperemia e infiltrado inflamatório. No 14º dia avaliou-se a reepitelização e hiperplasia epidermal. Todas avaliações foram realizadas de acordo com escores adaptados de Biondo-Simões et al. (2006).

Os resultados foram analisados por meio do teste de Mann-Whitney, considerando como valores significantes aqueles cujo $p \leq 0,05$. Utilizou-se o programa GraphPad InStat 3.0 e teste de normalidade de Fromthe Kolmogorov-Smirnov.

As atividades biológicas realizadas para o extrato bruto de pacari e para a punicalagina estão resumidas no Esquema 2.

Esquema 2 - Fluxograma com o resumo das atividades biológicas realizadas a partir do extrato bruto de pacari e punicalagina.



5 CONCLUSÃO

- Foi isolada e identificada punicalagina presente nas folhas de *Lafoensia pacari*.
- Validou-se uma metodologia analítica por CLAE para quantificação da punicalagina no extrato liofilizado; sendo o teor de punicalagina encontrado no extrato de 65%.
- EBP (5 mg/orelha) apresentou atividade anti-inflamatória por reduzir o edema de orelha induzido por óleo de cróton;
- EBP na dose 75, 150, 300 mg/kg i.d. e a punicalagina na dose de 120 mg/kg i.d. apresentaram atividade antissecretora, pois foram capazes de reduzir significativamente o volume gástrico, a acidez livre e acidez total;
- EBP e a punicalagina, nas doses de 150 mg/kg e 120 mg/kg v.o. respectivamente apresentaram atividade antiulcerogênica por reduzirem significativamente o índice da lesão gástrica induzida por indometacina;
- Através do método de ligadura pilórica, sugere-se que o EBP e a punicalagina exercem seu efeito antiulcerogênico devido à atividade antissecretória ácida.
- EBP a 10% apresentou atividade angiogênica significativa no modelo da membrana corioalantoide (MCA).
- EBP a 10% proporcionou uma redução no tempo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, com aumento significativo das variáveis envolvidas na cicatrização, os vasos sanguíneos e a produção de colágeno.

PERSPECTIVAS

- Isolar e identificar os demais constituintes do extrato bruto de pacari.
- Aprofundar nos testes de atividades biológicas e explorar seus respectivos mecanismos de ação.
- Realizar estudos para avaliar a citotoxicidade do EBP e de punicalagina.
- Microencapsulação do EBP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 367-373, 2000.
- AQIL, F.; MUNAGALA, R.; VADHANAM, M. V.; KAUSAR, H.; JEYABALAN, J.; SCHULTZ, D. J.; GUPTA, R. C. Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. **Food Research International**, v. 49, p. 345-353, 2012.
- ASRES, K.; BUCAR, F.; KNAUDER, E.; YARDLEY, V.; KENDRICK, H.; CROFT, S. L. *In vitro* antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 613-617, 2001.
- BARISON, A.; BIAVATTI, M. V. Aplicação de técnicas bidimensionais de RMN na investigação de produtos naturais. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais**. Ouro Preto: Editora UFOP, 2012. p. 255-288.
- BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; ALCANTARA, E. M.; DALLAGNOL, J. C.; YOSHIZUMI, K. O.; TORRES, L. F.; BORSATOS, K. S. Cicatrização de feridas: estudos comparativo em ratos hipertensos não tratados e tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, p. 74-78, 2006.
- BOLELI, I. C. Estresse, mortalidade e malformações embrionárias. In: MASCARI, M. **Manejo de Incubação**. São Paulo: FACTA, 2003. p. 394-434.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003a. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Brasília, 2003.
- BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 545p. v.1.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente- MMA e Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite. Acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA. **Monitoramento do bioma Cerrado 2009-2010**. Brasília: Centro de informação, documentação ambiental e editoração Luís Eduardo Magalhães – CID Ambiental, 2011. 65p.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente- MMA. **Biomas- Cerrado**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em 12 de Junho de 2013.
- CABRAL, P R. F.; PASA, M. C. Mangava-brava: *Lafoensia pacari* A. St. - Hil. (Lythraceae) e a etnobotânica em Cuiabá, MT. **Revista Biodiversidade**, v. 8, p. 2-21, 2009.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. 1039p. v. 1.

CASTELO BRANCO NETO, M. L.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; OLIVEIRA FILHO, M. A.; CZECHKO, N. G.; AOKI, S.; CUNHA, R.; FONSECA, V. R.; TEIXEIRA, H. M.; AGUIAR, L. R. F. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 17-22, 2006.

CERDÁ, B.; CERÓN, J. J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; ESPÍN, J. C. Repeated oral administration of high doses of the pomegranate ellagitannin punicalagin to rats for 37 days is not toxic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3493-3501, 2003.

CHEN, P.; LI, J.; LUI, T.; LIN, T. Folk medicine *Terminalia catappa* and its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Letters**, v. 152, p. 115-122, 2000.

CHEN, P.; LI, J. Chemopreventive effect of punicalagin, a novel tannin component isolated from *Terminalia catappa*, on H-ras-transformed NIH3T3 cells. **Toxicology Letters**, v. 163, p. 44-53, 2006.

COELHO, F. B. R.; DAL BELO, C. A.; LOLIS, S. F.; SANTOS, M. G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão-TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 52-55, 2005.

COELHO, J. M. ANTONIOLLI, A. B.; SILVA, D. N.; CARVALHO, T. M. M. B.; PONTES, E. R. J. C.; ODASHIRO, A. N. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, p. 45-051, 2010.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 992p. v. 3.

DELL'AGLI, M.; GALLI, G. V.; BULGARI, M.; BASILICO, N.; ROMEO, S.; BHATTACHARYA, D.; TARAMELLI, D.; BOSISIO, E. Ellagitannins of the fruit rind of pomegranate (*Punica granatum*) antagonize *in vitro* the host inflammatory response mechanisms involved in the onset of malaria. **Malaria Journal**, v. 9, p. 1-9, 2010.

DJAHANGUIRI, B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 4, p. 265-267, 1969.

DOIG, A. J.; WILLIAMS, D. H.; OELRICHS, P. B.; BACZYNSKYJ, L. Isolation and structure elucidation of punicalagin, a toxic hydrolysable tannin, from *Terminalia oblongata*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 1, p. 2317-2321, 1990.

FACHIM, E.; GUARIM, V. L. M. S. Conservação da biodiversidade: espécies da flora de Mato Grosso. **Acta Botanica Brasilica**, v. 9, p. 281-302, 1995.

FOGLIO, A. M.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, n. 7, 2007.

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; SAMPAIO, B. L.; FERREIRA, R. N.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Antidepressant-like effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 581-585, 2009.

GARROS, D. C. et al. Extract from *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in rats: morphometric and histological study. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, p. 55-65, 2006.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, p. 561-584, 2003.

GUIMARÃES, H.; NASCIMENTO, M. V. M.; TAVARES, A.; GALDINO, P. M.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Effects of ethanolic extract of leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae (pacari), in pain and inflammation models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 328-333, 2010.

HAGERMAN, A. E. Extraction of tannin from fresh and preserved leaves. **Journal of Chemical Ecology**, v. 14, p. 453-461, 1988.

HARDWICKE, J.; SCHMALJOHANN, D.; BOYCE, D.; THOMAS, D. Epidermal growth factor therapy and wound healing – past, present and future perspectives. **Surgeon**, v. 6, p. 172-177, 2008.

HASLAM, E. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in higher plants. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 41, p. 1-46, 1982.

HAYOUNI, E. A.; MILED, K.; BOUBAKER, S.; BELLASFAR, Z.; ABEDRABBA, M.; IWASKI, H.; OKU, H.; MATSUI, T.; LIMAM, F.; HAMDY, M. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. **Phytomedicine**, v. 18, p. 976-984, 2011.

HUNGUND, B. L.; PATHAK, C. H. **A survey of plants in Gujarat, India, for alkaloids, saponins, and tannins**. NE-201. Upper Darby: Northeastern Forest Experiment Station, 1971. 11p.

ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, p. 397-405, 2012.

JANNING, D.; ALBUQUERQUE, C. A. C.; BARAUNA, S. C. Avaliação preliminar do extrato hidroalcoólico de *Tabernaemontana catharinensis* no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos (*Rattus norvegicus*). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 8, p. 53-64, 2011.

JENA, B. K.; RATHA, B.; KAR, S.; MOHANTA, S.; TRIPATHY, M.; NAYAK, A. M. Wound healing potential of *Ziziphus xylopyrus* Willd. (Rhamnaceae) stem bark ethanol extract using *in vitro* and *in vivo* model. **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 2, p. 41-46, 2012.

JESUS, N. Z. T.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; ESPINOSA, M. M.; MARTINS, D. T. O. Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlcera e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 130-139, 2009.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002. 599p.

JOSSANG, A.; POUSSET, J.; BODO, B. Combreglutinin, a hydrolyzable tannin from *Combretum glutinosum*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 732-737, 1994.

KATO, E. T. M.; BACCHI, E. M.; HERNANDES, L. S. Farmacobotânica e atividade antiúlcera de plantas medicinais brasileiras. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia**: coletânea científica. Ouro Preto: Editora UFOP, 2012. p. 177-196.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, p. 147-155, 2005.

KORN, M.; BORGES, S. S. Procedimentos analíticos assistidos por ultrassom. **Revista Analytica**, n. 3, p. 34-39, 2003.

KRASZNI, M.; MAROSI, A.; LARIVE, A. K. NMR assignments and the acid-base characterization of the pomegranate ellagitannin punicalagin in the acidic pH-range. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 5807-5816, 2013.

KULKARNI, A. P.; ARADHYA, S. M.; DIVAKAR, S. Isolation and identification of a radical scavenging antioxidant – punicalagin from pith and carpellary membrane of pomegranate fruit. **Food Chemistry**, v. 87, p. 551-557, 2004.

KULKARNI, A. P.; MAHAL, H. S.; KAPOOR, S.; ARADHYA, S. M. *In vitro* studies on the binding, antioxidant, and cytotoxic actions of punicalagin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 1491-1500, 2007.

LAPPA, A. J.; CADEN, S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. São Paulo: Unifesp, 2007. 144p.

LEE, SANG-IK.; KIM, BYOUNG-SOO.; KIM, KYOUNG-SHIN.; LEE, S.; SHIN, KWANG-SOO.; LIM, JONG-SOON. Immune-suppressive activity of punicalagin via inhibition of NFAT activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 371, p. 799-803, 2008.

LOGEESWARI, K.; SRIPATHI, S. K. Wound Healing Medicinal Plants: A Review. **International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 199-218, 2012.

LOPES, G. C.; SANCHES, A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; HERNANDES, L.; MELLO, J. C. P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 265-272, 2005.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 1992. 368p.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Ultrasound: a powerful tool for leaching. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 41-47, 2003.

MACAÚBAS, C. I. P.; OLIVEIRA, M. G. M.; FORMIGONI, M. L. O. S.; SILVEIRA-FILHO, N. G.; CARLINI, E. A. Estudo da eventual ação anti-úlceras gástrica do bálsamo (*Sedum sp.*), folha fortuna (*Bryophyllum calycinum*), couve (*Brassica oleraceae*) e da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) em ratos. In: BRASIL. **Estudo da ação anti-úlceras gástrica de plantas brasileiras (*Maytenus ilicifolia* "espinheira-santa" e outras)**, Central de Medicamentos CEME, Ministério da Saúde, p. 5-20, 1988.

MACHADO, T. B.; LEAL, I. C. R.; AMARAL, A. C. F.; SANTOS, K. R. N.; SILVA, M. G.; KUSTER, R. M. Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. **Journal of Brazilian and Chemical Society**, v. 13, p. 606-610, 2002.

MAHAPATRA, S. S.; MOHANTA, S.; NAYAK, A. K. Preliminary investigation of the angiogenic potential of *Ziziphus oenoplia* root ethanolic extract using the chorioallantoic membrane model. **ScienceAsia**, v. 37, p. 72-74, 2011.

MALHEIROS, F. B. M.; GARCIA, A. C.; SOUZA, L. M. A.; SILVA, C. A. Efeito cicatrizante do extrato fluido da *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert em fórmulas magistrais semissólidas aplicadas em lesões cutâneas de ratos. **ConScientiae Saúde**, v. 10, p. 425-432, 2011.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTOS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares -Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, p. 393-410, 2003.

MATOS, L. G.; SANTOS, L. R.; FERREIRA, R. N.; PONTES, I. S.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Anti-inflammatory, antinociceptive, and sedating effects of *Lafoensia pacari* aqueous extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 341-346, 2008.

MAYER, W.; GÖRNER, A.; ANDRÄ, K. Punicalagin and punicalin, two tannins from pomegranate peel. **Liebigs Annalen der Chemie**, p. 1976-1986, 1977.

MEIRA, R. M. S. A. **Anatomia foliar e estudos morfológicos em espécies de *Lafoensia* Vand. (Lythraceae) nativas do Brasil**. 2000. 257f. Tese (Doutorado em

Biologia Vegetal)-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MENEZES, V. M.; ATALLAH, A. N.; LAPA, A. J.; CATAPANI, W. R. Assessing the therapeutic use of *Lafoensia pacari* St. Hil. extract (mangava-brava) in the eradication of *Helicobacter pylori*: double-blind randomized clinical trial. **Helicobacter**, v. 11, p. 188-195, 2006.

MITSUBISHI CHEMICAL. **DIAION™ & SEPABEADS™ Synthetic Adsorbents**, 2011. Disponível em: < http://www.diaion.com/en/products/synthesis_0201.html>. Acesso em 31 de julho de 2013.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005.

MULLER, V.; CHÁVEZ, J. H.; REGINATTO, F. H.; ZUCOLOTTI, S. M.; NIERO, R.; NAVARRO, D.; YUNES, R. A.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R. M.; ZANETTI, C. R.; SIMÕES, C. M. O. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 970-974, 2007.

MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p.3-20, 2001.

MUHAMMAD, S. H.; MUHAMMAD, S. The use of *Lawsonia inermis* linn. (henna) in the management of burn wound infections. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 934-937, 2005.

MUNDO, S. R.; DUARTE, M. R. Morfoanatomia foliar e caulinar de dedaleiro: *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, p. 522-529, 2007.

NASCIMENTO, M. V. M.; GALDINO, P. M.; FLORENTINO, I. F.; SAMPAIO, B. L.; VANDERLINDE, F. A.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Antinociceptive effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. independent of anti-inflammatory activity of ellagic acid. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 448-454, 2011.

NAYAK, B. S.; ISITOR, G.; PILLAI, G. K. The evidence based wound healing activity of *Lawsonia inermis* Linn. **Phytotherapy research**, v. 21, p. 827-831, 2007.

NGUYEN, A.; HOANG, V.; LAQUER, V.; KELLY, K. M. Angiogenesis in cutaneous disease: Part I. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 61, p. 921-942, 2009.

NIGRIS, F.; WILLIAMS-IGNARRO, S.; SICA, V.; LERMAN, L. O.; D'ARMIENTO, F. P.; BYRNS, R. E.; CASAMASSIMI, A.; CARPENTIERO, D.; SCHIANO, C.; SUMI, D.; FIORITO, C.; IGNARRO, L. J.; NAPOLI, C. Effects of a pomegranate fruit extract rich in punicalagin on oxidation-sensitive genes and eNOS activity at sites of perturbed shear stress and atherogenesis. **Cardiovascular Research**, v. 73, p. 414-423, 2007.

OLIVEIRA, S. T.; LEME, M. C.; PIPPI, N. L.; RAISER, A. G.; MANFRON, M. P. Formulações do confrei (*Symphytum officinalis* L.) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 7, p. 61-65, 2000.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analyzing tannins. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1-31, 1989.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Correlation of oxidative transformations of hydrolysable tannins and plant evolution. **Phytochemistry**, v. 55, p. 513-529, 2000.

OKUDA, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2012-2031, 2005.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H. Ellagitannins renewed the concept of tannins. In: QUIDEAU, S. **Chemistry and biology of ellagitannins**- An underestimated class of bioactive plant polyphenols. Singapore: World Scientific, 2009, p. 1-54.

PARENTE, L. M. L.; ANDRADE, M. A.; BRITO, L. A. B.; MOURA, V. M. B. D.; MIGUEL, M. P.; LINO-JÚNIOR, R. S.; TRESVENZOL, L. F. M.; PAULA, J. R.; PAULO, N. M. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, p. 19-24, 2011.

PORTO, M. P.; COSTA, E. A.; PAULA, J. R.; PEREIRA, K. C.; CUNHA, K. S. Avaliação tóxico-genética do extrato de *Lafoensia pacari* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. In: Congresso Brasileiro de Genética, 54., 2008, Salvador-BA. **Anais eletrônicos**, Sociedade Brasileira de Genética, 2008, p. 106.

POUYSÉGU, L.; DEFFIEUX, D.; MALIK, G.; NATANGELO, A.; QUIDEAU, S. Synthesis of ellagitannin natural products. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 853-874, 2011.

PRABHU, V. V.; GOPAL, V. Evaluation of angiogenesis potential of *Terminalia bellirica* Roxb. by chick chorio-allantoic membrane (CAM) assay. **International Journal of Drug Development & Research**, v. 3, p. 256-264, 2011.

PRADO, F. A.; AMBINDER, A. L.; JAIME, A. P. G.; LIMA, A. P.; BALDUCCI, I. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. **Revista de Odontologia da Universidade São Paulo**, v. 18, p. 7-13, 2006.

RAJASEKARAN, A.; SIVAKUMAR, V.; DARLINQUINE, S. Evaluation of wound healing activity of *Ammannia baccifera* and *Blepharis maderaspatensis* leaf extracts on rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 418-427, 2012.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBATTI, D.; VACCA, A.; RONCALI, L.; DAMMACCO, F. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* research on anti-angiogenesis. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 1, p. 73-82, 2000.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an *in vivo* assay to study antiangiogenesis. **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 482-513, 2010.

RIBEIRO, J. F.; DIAS, T. Parte I: Fatores Bióticos, Vegetação e Flora. In: BRASIL. **Cerrado e Pantanal: Áreas e ações prioritárias para conservação da biodiversidade**. 2. ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2007, p. 21-138.

ROGÉRIO, A. P.; SÁ-NUNES, A.; ALBUQUERQUE, D. A.; ANIBAL, F. F.; MEDEIROS, A. I.; MACHADO, E. R.; SOUZA, A. O.; PRADO JUNIOR, J. C.; FACCIOLI, L. H. *Lafoensia pacari* extract inhibits IL-5 production in toxocariasis. **Parasite Immunology**, v. 25, p. 393-400, 2003.

ROGÉRIO, A. P.; FONTANARI, C.; MELO, M. C. C.; AMBROSIO, S. R.; SOUZA, G. E. P.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; COSTA, F. B.; ALBUQUERQUE, D. A.; FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 1265-1273, 2006.

ROGÉRIO, A. P.; FONTANARI, C.; BORDUCCHI, E.; KELLER, A. C.; RUSSO, M.; SOARES, E. G.; ALBUQUERQUE, D. A.; FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. **European Journal of Pharmacology**, v. 580, p. 262-270, 2008.

ROMANI, A.; CAMPO, M.; PINELLI, P. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. **Food Chemistry**, v. 130, p. 214-221, 2012

ROSENBLAT, M.; AVIRAM, M. Pomegranate juice protects macrophages from triglyceride accumulation: inhibitory effect on *dgat1* activity and on triglyceride biosynthesis. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 58, p. 1-9, 2011.

SAMPAIO, B. L. **Influência dos fatores ambientais sobre a concentração de compostos fenólicos nas folhas e na casca do caule de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae)**. 2010. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

SAMPAIO, B. L.; BARA, M. T. F.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; PAULA, J. R. Influence of environmental factors on the concentration of phenolic compounds in leaves of *Lafoensia pacari*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 1127-1137, 2011.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. Foliar flavonoids of *Lafoensia* (Lythraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 487-488, 2000.

SANTOS, L. W. **Estudos ecológicos e agrônômicos de *Lafoensia pacari* St. Hil. (Lythraceae) na região de Barra do Garças-MT.** 2006. 60f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical)- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2006.

SANTOS, L. W.; COELHO, M. F. B.; PIRANI, F. R. Fenologia de *Lafoensia pacari* A.St.-Hil. (Lythraceae) em Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p.12-17, 2009.

SANTOS, M. A.; BARBIERI, A. F.; CARVALHO, J. A. M.; MACHADO, C. J. **O Cerrado brasileiro: notas para estudo.** Belo Horizonte: UFMG/Cedeplar, 2010. 15p.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, 2007. cap 24, p.615-656.

SILVA, I. D. D.; ARAGÃO, C. F. S. Avaliação de parâmetros de extração de *Cinchona* Vahl por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.776-780, 2009.

SOLON, S.; LOPES, L.; SOUSA JUNIOR, P. T.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 173-178, 2000.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora.** Embrapa Cerrados. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 1279p. 2v.

TAKEUCHI, K.; AIHARA, E.; SASAKI, Y.; NOMURA, Y.; ISE, F. Involvement of cyclooxygenase-1, prostaglandin E₂ and EP1 receptors in acid-induced HCO₃⁻ secretion in stomach. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, p. 661-676, 2006.

TAMASHIRO FILHO, P.; OLAITAN, B. S.; ALMEIDA, D. A. T.; LIMA, J. C. S.; MARSON-ASCÊNCIO, P. G.; ASCÊNCIO, S. D.; RIOS-SANTOS, F.; MARTINS, D. T. O. Evaluation of antiulcer activity and mechanism of action of methanol stem bark extract of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (Lythraceae) in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 497-505, 2012.

TANAKA, T.; NONAKA, GEN-ICHIRO; NISHIOKA, I. Tannins and related compounds. XL. Revision of the structures of punicalin and punicalagin and isolation and characterization of 2-o-galloylounicalin from the bark of *Punica granatum* L. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.34, p.650-655, 1986.

VARGAS, A.; ZEISSER-LABOUÈBE, M.; LANGE, N.; GURNY, R.; DELIE, F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1162-1176, 2007.

VILA VERDE, G. M.; PAULA, J. R.; CANEIRO, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 64-66, 2003.

VIOLANTE, I. M. P.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F. S.; SANTOS, R. A. N.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 452-457, 2009.

VISSCHER, F. E.; SEAY, P. H.; TAZELAAR JUNIOR, A. P.; VELDKAMP, W.; VANDER BROOK, M. J. Pharmacology of pamine bromide. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 110, p. 188-204, 1954.

WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 15, p. 691-703, 2002.

WILLIAMS, M. A. Quantitative methods in Biology. In: GLAUERT, A. M. **Practical methods in electron microscopy**. Amsterdam: North-Holland Publishing, 1977. v. 6. 234 p.

WILSON, T. C.; HAGERMAN, A. E. Quantitative determination of ellagic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1678-1683, 1990.

YANG, Y.; XIU, J.; ZHANG, L.; QIN, C.; LIU, J. Antiviral activity of punicalagin toward human enterovirus 71 *in vitro* and *in vivo*. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 67-70, 2012.

YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H. High molecular weight plant polyphenols (tannins): prospective functions. In: ROMEO, J. T. **Recent Advances in Phytochemistry: Chemical Ecology and Phytochemistry of Forest Ecosystem**, v. 39. Oxford: Elsevier, 2005. cap. 7, p. 163-190.

YOSHIDA, T.; AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, M. Structural features and biological properties of ellagitannins in some plant families of the order myrtales. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, 79-106, 2010.

ZANINI JUNIOR, J. C.; MEDEIROS, Y. S.; CRUZ, A. B.; YUNES, R. R. A.; CALIXTO, J. B. Action of compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-induced ear oedema in mice. A comparative study with steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Phytotherapy Research**, v. 6, p. 1-5, 1992.

ANEXO

ANEXO A - Certificado de aprovação pelo comitê de ética da Universidade Federal de Goiás do projeto para avaliação da atividade cicatrizante de plantas em animais.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 18 de fevereiro de 2013.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA/ENSINO PROTOCOLADO NA CEUA SOB O N.º. 067/12

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** *Avaliação da Atividade Cicatrizante em ratos do extrato de plantas medicinais*
2. **Pesquisador Responsável:** Leila Maria Leal Parente
3. **Unidade/Órgão:** Faculdade de Farmácia/FF-UFG
4. **Pesquisadores Participantes:** José Realino; Maria Tereza Freitas Bara; Leonice Manrique Faustino Trevenzol; Beatriz Abdallah Chaibub; Thaíze de Carvalho Silva; Elizama Rodrigues Alves;
5. **Unidade onde será realizado:** Faculdade de Farmácia/FF-UFG
6. **Data de apresentação do protocolo à CEUA:** 30/10/2012
7. **Data do Relato:** 12/11/2012
8. **Data de Primeiro Atendimento das Pendências:** 17/12/2012
9. **Data do Relato:** 14/01/2013
10. **Data de Segundo Atendimento das Pendências:** 29/02/2013

II - Parecer do CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

III - Data da reunião: 18/02/13

Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Profª. Mara Rúbia da Rocha
Pró-Reitora em exercício
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia
(Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com