



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



EVELYN MIRELLA LOPES PINA

ESTUDO FARMACOQUÍMICO DAS CASCAS DA RAIZ
DE *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae)

RECIFE

2011

EVELYN MIRELLA LOPES PINA

**ESTUDO FARMACOQUÍMICO DAS CASCAS DA RAIZ
DE *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Química de Produtos Naturais

Orientador: Prof^o Dr. Sebastião José de Melo

Co-Orientador: Prof^o. Dr. Haroudo Sátiro Xavier

RECIFE

2011

Pina, Evelyn Mirella Lopes

Estudo farmacológico das cascas da raiz de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae) / Evelyn Mirella Lopes Pina. – Recife: O Autor, 2011.

95 folhas: il., fig.; 30 cm.

Orientador: Sebastião José de Melo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. *Guettarda platypoda*. 2. Fitoquímica. 3. Toxicidade aguda. 4. Antitumoral. 5. Anti-inflamatório. I. Melo, Sebastião José de. II. Título.

583.52

CDD (20.ed.)

UFPE

CCS2011-100

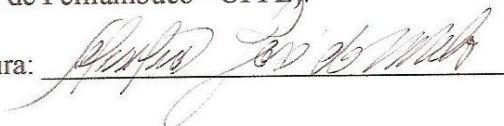


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Recife, 25 de fevereiro de 2011.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 25 de fevereiro de 2011 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

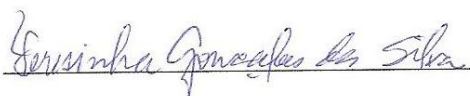
PRESIDENTE ORIENTADOR E EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Sebastião José de Melo.
(Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: 

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão.
(Núcleo de Nutrição do Centro Acadêmico Vitória da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: 

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Profª. Drª. Teresinha Gonçalves da Silva.
(Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: 

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Márcio Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Dalci José Brondani

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Antônio Rodolfo de Faria

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Pedro José Rolim Neto

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Beate Saegesser Santos

ÀquEle que um dia, antes que eu fosse formada no ventre de minha mãe, me escolheu com um propósito especial, dedico este trabalho e minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o autor de minha vida, meu refúgio e fortaleza, socorro que não me faltou em tempos de aflição. Sem Sua presença este trabalho não teria sido possível, portanto toda honra e toda glória sejam dadas a Ele: o meu Mestre maior!

Aos **meus pais, Socorro e Antônio, à minha irmã, Thaís, Tio Dinho (*In memoriam*) e os demais familiares** pelo apoio, colaboração, consolo, carinho, compreensão por minha ausência, em certos momentos, e amor sem limites dedicados a mim.

À **Vovó Carminha, Vovó Lourdes e Tia Fafá (*In memoriam*)** que, apesarem de não terem presenciado esta etapa de minha vida, muito contribuíram na minha educação e na formação do meu caráter. Minhas eternas saudades.

A **Renato Diniz**, meu namorado e amigo, por seu amor, apoio, incentivo e compreensão.

Parafraseando Prov.18:24b, “mas um verdadeiro amigo é mais chegado que um irmão”, agradeço **a todos os meus amigos e amigas** pela presença de vocês em minha vida: por rirem comigo nos momentos de alegria; por “chegarem junto” na hora da dificuldade e oferecer não só a mão, como todo o corpo; por tomar as dores e dizer "estou aqui, e você não vai passar por isso sozinha".

Ao **Prof. Sebastião José de Melo** pela maravilhosa orientação, além dos conselhos e da confiança para comigo na realização deste trabalho.

Ao **Prof. Haroudo Sátiro Xavier** por seus ensinamentos, sua paciência, atenção e por alegrar minha vida com um daqueles assovios. O senhor transformou esta “Mirella” numa pessoa melhor.

A **todos do Laboratório de Farmacognosia**, principalmente, **Antônio, Gibson e Isla Vanessa** (nossa agregada) pela amizade, ajuda e palavras de incentivo. Não teria sido a mesma coisa sem vocês!

A **Fernando Wesley** (IC) por todo seu esforço, compromisso, dedicação e valiosíssima ajuda na execução/elaboração deste trabalho.

À **Profª Rejane Pimentel e Profª Karina Randau** pelos conselhos e incentivo em fazer a seleção do mestrado. Sem aquela conversa em São Paulo, este sonho não teria nem começado.

A **todos do LTM**, em especial a **Magaly, Fabiana, Lariza e Larissa** por me agregarem a esta família e pela força e ajuda, principalmente, nos momentos de sufoco.

À **Profª Teresinha Gonçalves** e o **Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos e Laboratório de Cultura de Células**; à **Profª Ivone Souza** e o **Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental**; à **Profª Elba Lúcia** e o **Laboratório de Produtos Naturais**; à **Profª Nelly Caetano** e o **Laboratório de Análises Microbiológicas** e à **Profª Janete Magaly** e o **Laboratório de Coleção de Microorganismos**. Muito obrigada a todos pelos conselhos, ajuda e auxílio na execução deste trabalho.

A **Elias, Ricardo, Gustavo Leite e Túlio Couto** pelo auxílio inestimável no DQF.

A **“Hermano”** (Janilson) e **Orlando** pela ajuda e amizade.

A todos da **2ª Igreja Batista de Areias** por todas as orações e palavras de incentivo para a conclusão deste trabalho.

Ao **CNPq** pelo fomento financeiro.

Muito obrigada!

RESUMO

O presente trabalho teve como foco a realização de um estudo biológico para a investigação fitoquímica das cascas da raiz da espécie *Guettarda platypoda* e avaliar seu potencial farmacológico. Trata-se de uma planta pertencente a família Rubiaceae, conhecida popularmente por Angélica, Angélica-do-mato, Angélica-brava, dentre outros, e utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diferentes enfermidades. Na prospecção fitoquímica deste material vegetal, realizada a partir do extrato metanólico, constatou-se a presença da classe dos metabólitos Polifenóis (flavonóides, derivados cinâmicos e fenilpropanoglicosídeos), Terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteróides e saponosídeos) e Açúcares Redutores. O extrato bruto seco (EBS) de *G. platypoda* foi obtido a partir da evaporação do extrato metanólico para a avaliação farmacológica do mesmo. O EBS foi submetido ao ensaio de toxicidade aguda, o qual foi realizado de acordo com o protocolo da OCDE 423, não constatando-se o óbito de nenhum animal durante o decorrer do experimento com a dose máxima recomendada (2000 mg/kg). Para a determinação do potencial citotóxico, foi empregada a metodologia de acordo com o método MTT, utilizando-se a dose de 50 mg/mL do EBS frente a três diferentes linhagens, porém o EBS não apresentou atividade. A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada de acordo com a técnica de poços/difusão em ágar Muller-Hinton, utilizando bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (enterobactérias e não-fermentadoras), tendo-se utilizado o extrato nas concentrações de 10.000 µg/poço e de 5.000 µg/poço. Foi verificada ausência de atividade antimicrobiana para o EBS de *G. platypoda*. Na avaliação da atividade anti-inflamatória, os animais foram submetidos ao ensaio de edema induzido por carragenina, sendo testada a dose de 100 mg/kg por via oral. Observou-se que nesta dose o EBS de *G. platypoda* inibiu em 55,2% a migração de PMNL quando comparado ao grupo controle. Para a avaliação do potencial antitumoral (Sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich) foram testadas as dosagens de 100 e 200 mg/kg, empregado-se o método preconizado de Sugiura, Stock e Sugiura (1955), no qual somente se observou atividade do EBS de *G. platypoda* frente ao tumor de Sarcoma 180, tendo reduzido o peso médio dos tumores em ambas as dosagens (74,26% na dose de 100 mg/kg e 84,77% na dose de 200 mg/kg). Conclui-se que o EBS das cascas da raiz de *G. platypoda* é considerado como de toxicidade muito baixa ou ausente e de potencialidade anti-inflamatória e antitumoral frente à Sarcoma 180. É necessário, portanto, novos estudos fitoquímicos mais aprofundados, visando a caracterização e isolamento dos compostos químicos responsáveis pelas atividades farmacológicas apresentadas.

Palavras-chave: *Guettarda platypoda*. Fitoquímica. Toxicidade aguda. Antitumoral. Anti-inflamatório.

ABSTRACT

This paper focuses on the realization of a biological study for the phytochemical investigation of the root bark of *Guettarda platypoda* species and evaluate their pharmacological potential. It is a plant belonging to the Rubiaceae family, popularly known as “Angelica”, “Angélica-do-mato”, “Angélica-brava”, among others, and used in traditional medicine to treat various ailments. A phytochemical screening of plant material, made from the methanol extract showed the presence of the class of metabolites polyphenols (flavonoids, cinnamic derivatives and fenilpropanoglicosídeos) Terpenoids (monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, triterpenes, steroids and saponosídeos) and Reducing Sugars. The crude dry extract (CDE) of *G. platypoda* was obtained from the evaporation of the methanol extract for pharmacological assessment of it. The CDE was subjected to acute toxicity test, which was conducted according to OECD 423 protocol, not confirming the death of any animal during the course of the experiment with the maximum recommended dose (2000 mg/kg). To determine the cytotoxic potential, we used the methodology in accordance with the MTT assay, using a dose of 50 mg/mL CDE against three different strains, but the CDE was inactive. The determination of antimicrobial activity was performed according to the technique of wells/diffusion in agar Muller-Hinton, using Gram-positive and Gram-negative (Enterobacteriaceae and non-fermenting) and it was used the concentrations of 10,000 mg/well and 5,000 mg/well. It was verified the absence of antimicrobial activity to EBS *G. platypoda*. In the evaluation of anti-inflammatory activity, the animals were tested on edema induced by carrageenan, and tested a dose of 100 mg/kg orally. It was observed that this dose of CDE of *G. platypoda* inhibited 55.2% the migration of PMNL compared with control group. To assess the potential anti-tumor (Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma) were tested at doses of 100 and 200 mg/kg, employed the method recommended in Sugiura, Stock e Sugiura (1955), in which only observed activity of CDE *G. platypoda* against the Sarcoma 180 tumor and reduced the average weight of tumors at both doses (74.26% at a dose of 100 mg/kg and 84.77% at a dose of 200 mg/kg). We conclude that the CDE from the bark of the root of *G. platypoda* is considered as very low or absent toxicity and potential anti-inflammatory and antitumor activities against the Sarcoma 180. It is necessary therefore further phytochemical studies explored further, aiming at the characterization and isolation of chemical compounds responsible for the pharmacological activities presented.

Key words: *Guettarda platypoda*. Phytochemistry. Acute toxicity. Antitumor. Anti-inflammatory..

LISTA DE FIGURAS

Revisão da Literatura

FIGURA 01: Esquema ilustrativo, com destaque em vermelho, do hábito das diferentes plantas. A: árvore; B: arbusto; C: erva terrestre; D: liana ou cipó; E: epífita e; F: hemiepífita. **27**

ARTIGO - *Guettarda* (Rubiaceae): revisão química e farmacológica

FIGURA 01: Compostos isolados do gênero *Guettarda* **51**

FIGURA 02: Compostos isolados do gênero *Guettarda* (continuação) **52**

FIGURA 03: Compostos isolados do gênero *Guettarda* (continuação) **53**

FIGURA 04: Compostos isolados do gênero *Guettarda* (continuação) **54**

Capítulo 1

FIGURA 01: Extrato bruto seco das cascas da raiz de *Guettarda platypoda* **56**

FIGURA 02: Cromatograma para a identificação de flavonóides e derivados cinâmicos **61**

FIGURA 03: Cromatograma para a identificação de monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides. **61**

FIGURA 04: Identificação da presença de saponinas pela presença de espuma abundante e persistente no extrato de *G. platypoda*. **62**

FIGURA 05: Cromatograma para a identificação de açúcares redutores. **62**

FIGURA 06: Cromatograma para a identificação de proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. **62**

FIGURA 07: Cromatograma para a identificação de alcalóides **62**

FIGURA 08: Frações obtidas da cromatografia em coluna de EBSPHS. À esquerda, frações que originaram EBSPHS1; no centro S1 e S2; à direita, frações que originaram EBSPHS2	65
FIGURA 09: Procedimento para purificação das frações S1 e S2	66
FIGURA 10: Procedimento para a obtenção de S3	67
FIGURA 11: Estrutura da unidade 3,4 - dihidroxicinâmica	68

Capítulo 2

ARTIGO - *Pharmacological screening and acute toxicity of bark root of Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae)

FIGURE 01. Antitumor activity of methanolic extract of root bark of <i>G. platypoda</i> in <i>Mus musculus</i> female mice after implantation of Sarcoma 180. It was administered 0.5 mL of saline orally in the Control Group (CGS) and experimental treated groups (TS1 = 100 mg/kg; TS2 = 200 mg/kg) for 7 days. * P < 0.05.	76
FIGURE 02: Antitumor activity of methanolic extract of root bark of <i>G. platypoda</i> in <i>Mus musculus</i> mice after implantation of Ehrlich carcinoma. It was administered orally in the Control Group (CGC) 0.5 mL of saline and experimental treated groups (TC1 = 100 mg/kg; TC2 = 200 mg/kg) for 7 days. * P < 0.05.	77

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE *Guettarda platypoda*

FIGURA 01: Disposição dos compostos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana.	83
FIGURA 02. Perfil de inibição contra cepas bacterianas Gram-positivas	84
FIGURA 03. Perfil de inibição contra cepas bacterianas Gram-negativas	85

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

TABELA 01: Fases móveis e reagentes diversos consoantes ao grupo de metabólitos secundários a ser investigado.	60
---	-----------

Capítulo 2

TABELA 01: Micro-organismos utilizados no teste de atividade antibacteriana.	83
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de etila
AcOH	Ácido acético
AF	Ácido fórmico
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDE	Extrato Bruto Seco (Crude Dry Extract)
CHCl₃	Clorofórmio
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do governo brasileiro
COSY	Espectroscopia correlacionada
EBS	Extrato Bruto Seco
EBSP	Extrato Bruto Seco constituído por compostos polares
EBSPA1	Extrato Bruto Seco cromatografado com fase móvel de solução aquosa de acetona a 1%
EBSPA2	Extrato Bruto Seco cromatografado com fase móvel de solução aquosa de acetona a 2%
EBSPA3	Extrato Bruto Seco cromatografado com fase móvel de solução aquosa de acetona a 3%
EBSPA5	Extrato Bruto Seco cromatografado com fase móvel de solução aquosa de acetona a 5%
EBSPH	EBSP eluído em coluna cromatográfica com resina Duolite e fase móvel 100% H ₂ O
EBSPHS	Parte solúvel em MeOH da fração EBSPH após rotaevaporada
EBSPHM	Fração solúvel em MeOH de EBSPH após liofilizada
EBSPHMS	Fração de EBSPHM solúvel na mistura MeOH- Me ₂ CO-CH ₂ Cl ₂ (3:2:1)
ECAE	Comitê de Ética em Experimentação Animal (Ethics Committee of Animal Experiments)
GHS	Globally Harmonized Classification System
Me₂CO	Acetona

MeOH	Metanol
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolium]
<i>n</i>-BuOH	n-Butanol
NEU	solução de 1% difenilboriloxietilamina
PMNL	Leucócitos polimorfonucleares (Polymorph nuclear leucocytes)
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
TPPO₄	Tampão fosfato
TTZ	cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 PLANTAS MEDICINAIS	22
3.2 FAMÍLIA RUBIACEAE	24
3.2.1 Distribuição territorial	24
3.2.2 Importância no Brasil	25
3.2.3 Taxonomia	26
3.2.4 Características e hábitos	27
3.3 ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS	28
<i>Guettarda</i> (Rubiaceae): revisão química e farmacológica	
 Capítulo 1	 55
4 PERFIL FITOQUÍMICO DAS CASCAS DA RAIZ DE <i>Guettarda platypoda</i>	56
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	56
4.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA	57
4.2.1 Materiais e método	57
4.2.1.1 Pesquisa de Flavonóides	57
4.2.1.2 Pesquisa de Derivados Cinâmicos	57
4.2.1.3 Pesquisa de Fenilpropanoglicosídeos	58
4.2.1.4 Pesquisa de Proantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas	58
4.2.1.5 Pesquisa de Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e	58

<i>Diterpenóides</i>	
4.2.1.6 Pesquisa de Triterpenóides e Esteróides	58
4.2.1.7 Pesquisa de Glicosídeos Cardíacos	59
4.2.1.8 Pesquisa de Alcalóides	59
4.2.1.9 Pesquisa de Açúcares Redutores	59
4.2.1.10 Pesquisa de Saponosídeos	59
4.2.2 Resultados e discussão	61
4.3 ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	64
<i>Capítulo 2</i>	69
5 AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTITUMORAL E CITOTÓXICA DE <i>Guettarda platypoda</i>	70
5.1 ARTIGO II - Triagem farmacológica e toxicidade aguda da casca da raiz de <i>Guettarda platypoda</i> DC. (Rubiaceae)	70
6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE <i>Guettarda platypoda</i>	82
6.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO	82
6.2 TÉCNICA DE POÇOS	82
6.3 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS	82
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	86
8 REFERÊNCIAS	88
APÊNDICE A – Ilustração da atividade antitumoral frente a Sarcoma 180	93
ANEXO A – Espectro de RMN - ¹H de S3	94
ANEXO B – Espectro de COSY de S3	95

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo se sabe do potencial químico e farmacológico dos vegetais superiores devido à identificação da presença dos metabólitos secundários. Com isso, o número de trabalhos voltados para o estudo fitoquímico e farmacológico de espécies vegetais aumenta constantemente. Caules, flores, folhas, raízes, tubérculos, sementes e frutos são alvos de estudos interdisciplinares de forma a ampliar o conhecimento e a qualidade de vida do ser humano.

Relata-se na literatura que, mundialmente, utiliza-se 119 drogas, com estruturas definidas, que são extraídas de cerca de 90 espécies de plantas superiores (MORAIS; BRAZ-FILHO, 2007), das quase 400 mil espécies de plantas existentes em nosso planeta (BIODIVERSIDADE, 2011). O Brasil tem a maior diversidade biológica do mundo, com cerca de 55 mil destas espécies em seu território, apresentando uma variedade de biomas que reflete a riqueza da flora e da fauna local, sendo-as reconhecidas em termos globais. Por esse motivo, nosso país é o principal entre os chamados megadiversos, e muitas das espécies localizadas nos biomas nacionais são exclusivas (endêmicas) (PORTAL BRASIL, 2011). Devido a este fato, é fácil deduzir o potencial de produtos bioativos provenientes dos vegetais, porém um grande número de espécies vegetais brasileiras ainda não foi estudado sob o ponto de vista químico e/ou farmacológico, constatando-se também que, a cada ano, diminui o número de registros de novas substâncias isoladas oriundas do metabolismo secundário vegetal (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; DAVID et al., 2006).

Em adição, a população brasileira faz grande uso de plantas medicinais ou preparações destas, portanto é importante o fato de se avaliar o potencial farmacológico, identificar os compostos majoritários presentes nestas espécies e a avaliação da toxicidade destas. Assim, promove-se a segurança, eficácia e qualidade destas matérias-primas vegetais, como também se verifica se o uso popular condiz com os achados científicos e permite-se ter a dosagem tóxica destes extratos para garantir a segurança do seu uso.

Para a escolha da espécie em estudo, levou-se em consideração o fato da *Guettarda platypoda* pertencer à família Rubiaceae, sendo esta uma das principais famílias dos vegetais superiores, possuindo um renomado potencial químico,

farmacológico e econômico, além do gênero *Guettarda* conter, das 150 espécies identificadas, apenas 12 espécies relatadas nos periódicos acadêmicos. Unindo-se a estes fatos, ressalta-se a presença desta espécie no território nordestino, principalmente no litoral pernambucano, e seu estudo farmacológico ainda encontra-se em aberto.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo biológico para a investigação fitoquímica das cascas da raiz da espécie *Guettarda platypoda* e avaliar seu potencial farmacológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Efetuar uma prospecção fitoquímica do extrato metanólico das cascas da raiz de *Guettarda platypoda*, evidenciando os principais grupos de substâncias presentes na tentativa do isolamento delas;
- Estimar o potencial toxicológico (toxicidade aguda), através do teste de efeitos gerais, e determinar a DL₅₀ do extrato bruto de *Guettarda platypoda*;
- Avaliar o potencial citotóxico do extrato bruto de *Guettarda platypoda*;
- Averiguar a atividade anti-inflamatória do extrato bruto de *Guettarda platypoda*;
- Avaliar a atividade antitumoral do extrato bruto de *Guettarda platypoda* frente ao Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich;
- Avaliar a atividade antimicrobiana, frente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, do extrato bruto de *Guettarda platypoda*;

Revisão da Literatura

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

O interesse por plantas capazes de produzirem quaisquer tipos de efeitos no corpo humano é tão antigo como a própria humanidade. O emprego destas plantas no tratamento das doenças começou de maneira empírica e o resultado desse uso passou, assim, inicialmente de uma geração a outra por transmissão oral e, posteriormente, por descrições escritas deixadas pelas civilizações que nos precederam (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

Os primeiros relatos escritos que indicam o emprego terapêutico de fórmulas vegetais são hieróglifos das civilizações Egípcias e Assírias (ROSA, 2009). Em 1500 a.C., o Papiro de Ebers também vem a descrever centenas de plantas medicinais. Na Grécia, Teofrasto (372-285 a.C.), discípulo de Aristóteles (384-322 a.C.), catalogou cerca de 500 espécies vegetais. Hipócrates (460-361 a.C.), considerado o pai da medicina, utilizava drogas de origem vegetal em seus pacientes e deixou a obra *Corpus Hippocraticum*, a qual é considerada a mais clara e completa da Antiguidade no que se refere à utilização de plantas medicinais (PARLANGELLO, 2011). Posteriormente, as compilações de plantas medicinais foram desenvolvidas por diversos autores, entre eles Dioscórides, Scribônio Largo, Oribásio e Galeno (RICO, 2003).

No fim do século XIV e início do século XV, iniciaram-se as expedições marítimas, proporcionando o maior acesso às ervas e outras especiarias na forma de chás, essências, corantes e até venenos. Exemplos são o bálsamo de copaíba; o curare em flechas envenenadas; a brazileína (corante oriundo do lenho do pau-brasil); o ópio originado de *Papaver somniferum*; entre outros que fazem parte de um grande arsenal terapêutico de origem vegetal (ROSA, 2009).

Já no século XVI, Paracelso afirmava que o importante não era juntar plantas e outros produtos no tratamento dos doentes, mas antes isolar seus princípios ativos. Porém este conhecimento do uso adequado das plantas medicinais manteve-se no domínio do puro empirismo até ao século XIX (RICO, 2003). Foi nesta época que os progressos na química começaram a permitir o isolamento de constituintes

com atividade farmacológica e o início da obtenção de novas moléculas através da síntese química (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

Os progressos da química de síntese e as perturbações introduzidas por sucessivas guerras, levaram a um certo esquecimento dos produtos vegetais em consequência da escassez de matérias-primas e da facilidade de obtenção de novos e mais ativos compostos. Explica-se, em parte, por estas razões, uma diminuição transitória do interesse pelas plantas medicinais e pela sua aplicação (RICO, 2003).

Parecia que a utilização direta das plantas medicinais iria desaparecer nos países ditos mais desenvolvidos, pois nos em desenvolvimento essa medicina tradicional continuou a ser muito importante. Contudo, nos finais do século passado, principalmente a partir dos anos 60, nota-se nos países desenvolvidos um renovado interesse pela fitoterapia, que, para além do emprego de novos fármacos vegetais e do uso de infusão, cozimentos e tinturas, passam a utilizar formas farmacêuticas mais elaboradas, sejam como comprimidos, cápsulas, etc. (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

Com isso, a Organização Mundial de Saúde (OMS), ao fim da década de 1970, criou o Programa de Medicina Tradicional, com objetivos de proteger e promover a saúde, incentivando a preservação da cultura popular sobre os conhecimentos da utilização de plantas medicinais (BRASIL, 2006; WHO, 2002). Neste programa, a OMS recomenda aos estados-membros o desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde, assim como promover o uso racional dessa integração (BRASIL, 2006).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde, sendo 85% deste percentual representado pelos os que utilizam plantas ou preparações destas (BRASIL, 2006). Assim, é necessário promover a segurança, eficácia e qualidade, bem como o acesso e uso racional dessas práticas (WHO, 2002).

No Brasil, em 2006, foi criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos tendo como objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006), aprovada pelo

Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Neste mesmo ano, a Portaria GM/MS nº 971, de 3 de maio de 2006, aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). Estes corroboraram, juntamente com a Portaria Interministerial nº 2.960, de 09 de dezembro de 2008 (a qual aprova o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos), para criar a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10, de 09 de março de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A RDC nº 10 se propõe a contribuir para a construção do marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais, particularmente sob a forma de drogas vegetais, a partir da experiência da sociedade civil nas suas diferentes formas de organização, de modo a garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a esses produtos (ANVISA, 2010).

3.2 FAMÍLIA RUBIACEAE

3.2.1 Distribuição territorial

Dentre as angiospermas, uma das maiores representantes é a família Rubiaceae, sendo a quarta maior família das dicotiledôneas, após Asteraceae, Orchidaceae e Fabaceae. Esta família compreende cerca de 13.000 espécies distribuídas em 650 gêneros e 44 tribos (DELPRETE, 2004).

A família Rubiaceae foi descrita primeiramente pelo botânico francês Antoine Laurent de Jussieu, em 1789, tem seu nome derivado do gênero *Rubia* L., do latim rubium, relativo à tinta vermelha produzida pelas raízes de algumas plantas deste gênero, utilizadas para tingir tecidos (PEREIRA, 2007).

Tem prevalência em regiões tropicais e subtropicais, podendo também atingir as regiões temperadas e frias da Europa e norte do Canadá (PESSOA, 2009). Além disso, desenvolve-se tanto em terrenos baixos quanto elevados; ao nível do mar ou mesmo em florestas altomontanas acima de 1.500 m (MARINERO, 2010).

Tem como seus maiores centros de diversidade situados nos continentes Africano e Americano, principalmente na América Central e do Sul (PESSOA, 2009). Nas Américas, a família Rubiaceae esta representada por 229 gêneros e 5200 espécies (VITARELLI; SANTOS, 2009), sendo 1200 espécies distribuídas na América do Sul (ROSA et al., 2010).

No Brasil, de acordo com a *Flora Brasiliensis*, Müller Argovensis (1881) e Schumann (1888, 1889) reportaram 99 gêneros e 1.002 espécies (MARGALHO; ROCHA; SECCO, 2009). Atualmente, no Brasil, ocorrem cerca de 120 gêneros e 2000 espécies, correspondendo a uma das principais famílias de nossa flora, presentes em quase todas as formações naturais: mata atlântica, cerrado, caatinga, restingas, floresta amazônica, matas serranas e de altitude, tabuleiros, dunas e campos abertos (DELPRETE, 2004; LIMA et al., 2010; PEREIRA, 2002). De acordo com Barbosa, Souza e Jardim (2011), a família Rubiaceae destaca-se também entre as mais diversas no Nordeste brasileiro, com 66 gêneros e cerca de 310 espécies.

3.2.2 Importância no Brasil

Apresenta espécies de grande importância econômica nos setores alimentícios, como é o caso da *Coffea arábica* L. (café), apesar de nativa da África muito cultivada no território brasileiro, e *Genipa americana* L. (jenipapo), frequentemente consumida no Nordeste devido ao seu fruto de polpa comestível. Outras espécies são utilizadas na terapêutica como a *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. (vassourinha-de-botão) e algumas espécies do gênero *Cinchona*, *Uncaria*, *Simira* e *Cephaelis*. Ainda são utilizadas para a extração da madeira, na produção de lenha e carvão e também na produção de estacas e mourões, tendo como exemplo as do gênero *Faramea* e *Neolamarckia*. Como ornamentais, destaca-se a *Ixora coccínea* L., com suas inflorescências arredondadas de cores vistosas, assim como várias espécies dos gêneros *Galium*, *Gardenia*, *Mussaenda* e *Pentas*. Também enfatiza-se as espécies dos gêneros *Palicourea* e *Psychotria* devido a toxicidade das mesmas (JOLY, 2002; MARGALHO; ROCHA; SECCO, 2009; PESSOA, 2009).

3.2.3 Taxonomia

Cronquist (1981) posicionou a família Rubiaceae na classe Magnoliopsida, subclasse Asteridae, ordem Rubiales. Recentemente, ela é inserida ao grupo das Asteridae, subgrupo das Euasteridae I, ordem Gentianales (CORE ASTERIDS, 2011). Porém, devido a sua vasta diversidade, é conhecida por ser uma família de difícil classificação no nível de subfamília.

As primeiras tentativas para sua classificação datam de 1891, quando Schumann propôs sua divisão em duas subfamílias (Cinchonoideae e Coffeoidae), baseado-se em um único caráter: o número de óvulos por lóculo. Esta prevaleceu até 1954, quando Engler, baseado-se, principalmente, no número de cotilédones na semente e na soldadura dos verticilos florais, inseriu a família Rubiaceae na classe Dicotyledoneae, subclasse Metachlamydeae, série Rubiales. Alguns anos depois, em 1959, Verdcourt dividiu esta família em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Guettardoideae, baseado-se em várias características, como hábito, forma de estípulas, tipo de indumento, presença de ráfides nas folhas, prefloração das corolas, entre outras (MARGALHO; ROCHA; SECCO, 2009; ROVA et al., 2002).

Robbrecht (1988, 1993) publicou a descrição morfológica desta família, reconhecendo quatro subfamílias, Cinchonoideae, Ixoroideae, Rubioideae e Antirheoideae, somando 44 tribos, concluindo também que as tribos Condamineae, Rondeletieae e Sipaneeae, com base na morfologia, são consideradas muito próximas das tribos da subfamília Cinchonoideae.

A implementação das técnicas moleculares contribuiu ainda mais para a compreensão da sistemática da família Rubiaceae. Estudos filogenéticos baseados em dados moleculares, como os de Bremer et al. (1995, 1999), reconheceram apenas três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae. Atualmente, Robbrecht e Manen (2006) reconhecem apenas duas subfamílias, Cinchonoideae e Rubioideae, com quatro supertribos (MARGALHO; ROCHA; SECCO, 2009).

3.2.4 Características e hábitos

A família possui os mais variados hábitos desde árvores, arbustos, subarbustos, ervas, árvores e até lianas (BARBOSA-FILHO et al., 2006; JOLY, 2002), como representado na figura 01.

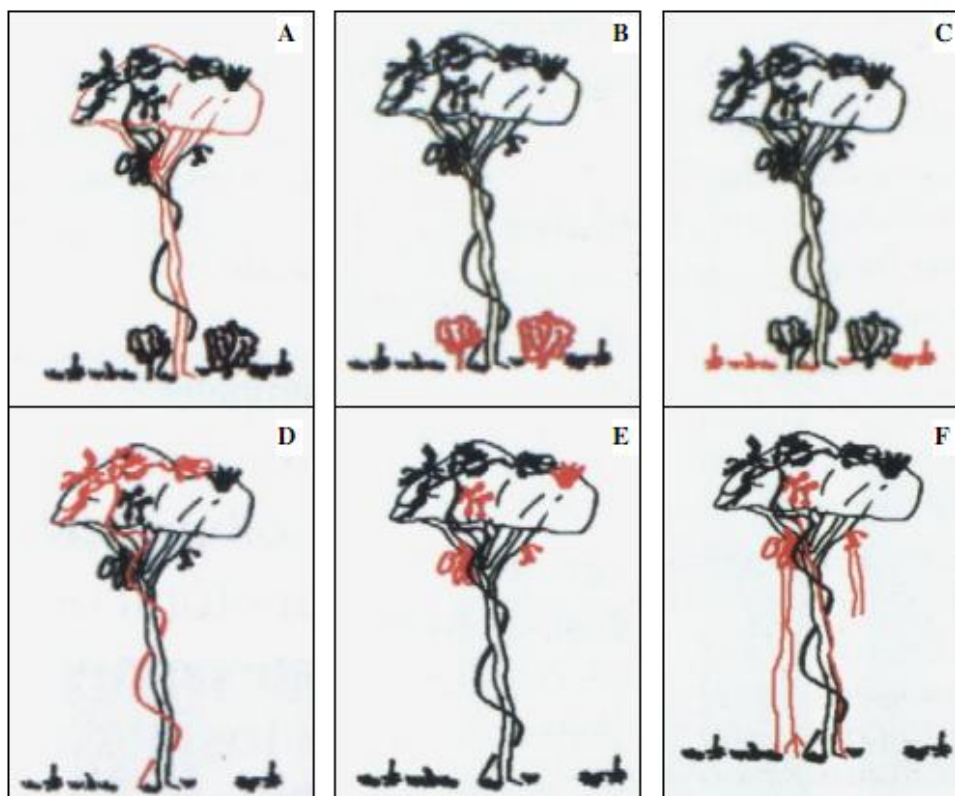


FIGURA 01: Esquema ilustrativo, com destaque em vermelho, do hábito das diferentes plantas. A: árvore; B: arbusto; C: erva terrestre; D: liana ou cipó; E: epífita e; F: hemiepífita. (Fonte: BRUN, BRUN e LONGHI, 1999).

Apresentam-se com estípulas interpeciolares, raro intrapeciolares, persistentes ou caducas. As folhas são simples, opostas ou verticiladas, raro pseudo-alternadas, com margem inteira, raramente repartida. Inflorescência geralmente cimosas, raro flor solitária. Flores são actinomorfas (simetria radial), gamopétalas, de coloração branca ou vermelho-amarelada, as vezes azul, tetra, penta ou hexâmeras (as vezes octâmeras), hermafroditas, diclamídeas. Cálice faltando ou apenas dentiforme ou normalmente desenvolvido. Androceu isômero com os lobos da corola e sempre alterno com estes. Estames epipétalos, alternipétalos, isodínamos, exsertos ou inclusos; anteras rimosas, raro poricida.

Ovário ínfero, bicarpelar ou pluricapelar, bilocular com muitos ou 1 ou 2 óvulos por lóculo. Heterostilia frequente em certos grupos (*Borreria*). Fruto do tipo cápsula septícida ou loculícida, sâmara, drupa ou esquizocarpo; sementes únicas a numerosas, aladas ou não (BARBOSA-FILHO et al., 2006; JOLY, 2002).

3.3 ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA BRASILEIRA DE PLANTAS MEDICINAIS

***Guettarda* (Rubiaceae): revisão química e farmacológica**

PINA, E.M.L.^{1,2}; ARAÚJO, F.W.C. de¹; XAVIER, H.S.²; MELO, S.J. de^{*1}.

¹ Laboratório de Química e Síntese de Produtos Naturais – Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco. Av. Professor Moraes Rego S/N, 50670-901 Recife – PE, Brasil.

² Laboratório de Farmacognosia – Departamento de Farmácia – Universidade Federal de Pernambuco. Rua Prof. Artur de Sá S/N, 50740-521 Recife – PE, Brasil.

* melosebastiao@yahoo.com.br

RESUMO: O gênero *Guettarda* (Rubiaceae) compreende plantas extensamente distribuídas em áreas tropicais, sendo popularmente utilizadas na América do Sul para tratamento de ferimentos e inflamações. Na busca bibliográfica realizada foi constatado o estudo químico/farmacológico de doze espécies, dentre elas, as espécies brasileiras *G. platypoda* e *G. angelica*, encontradas nas regiões Nordeste e Centro-Oeste e utilizadas na medicina tradicional como antipiréticas. Estudos comprovam a atividade anti-inflamatória da *G. acreana* e *G. platypoda*, e o efeito hipoglicêmico em ratos para a *G. angelica*. As investigações fitoquímicas nesse gênero revelam principalmente triterpenos, alcalóides, iridóides, secoiridóides e

PINA, E.M.L. Estudo farmacológico das cascas da raiz de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae)

derivados dos ácidos quínico e chiquímico. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão das espécies do gênero *Guettarda* estudadas química/farmacologicamente descritas na literatura.

Palavras-chave: *Guettarda*. Rubiaceae. Composição química. Revisão.

ABSTRACT: The genus *Guettarda* (Rubiaceae) comprises plants widely distributed in tropical areas. They are popularly used in South America to treat wounds and inflammations. In a literature search, we have found the chemical/pharmacology study of twelve species, among them, the Brazilian species *G. platypoda* and *G. angelica*, found in the Northeast and Midwest regions, being popularly used as antipyretic. Studies showed anti-inflammatory activity of *G. acreana* and *G. platypoda*, and the hypoglycemic effect in rats for *G. angelica*. The phytochemical investigation in this genus reveals mainly terpenoids, alkaloids, iridoids, secoiridoids and derivatives of quinine acid and quinic acid. The aim of this study was a review of the genus *Guettarda* studied chemistry/pharmacologically described.

Keywords: *Guettarda*. Rubiaceae. Chemical composition. Review.

INTRODUÇÃO

Embora a medicina moderna esteja em desenvolvimento em grande parte do mundo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 68% desta população utilizam plantas ou preparações destas (Brasil, 2006). O uso dos produtos naturais como fonte medicamentosa é tão antigo quanto a própria humanidade, havendo indícios que comprovam esta utilização desde a Antiguidade clássica, demonstrando a validade de plantas no tratamento de enfermidades. Atualmente, produtos naturais derivados de plantas são utilizados no desenvolvimento de novos fármacos (Cunha et al., 2003; David et al, 2006). Ao se considerar esta perspectiva de obtenção de novos fármacos originados de vegetais, o Brasil se destaca como o país de maior diversidade genética vegetal do mundo, com um vasto manancial ainda por ser explorado sob o ponto de vista químico-farmacológico (Barbosa-Filho et al., 2006; Simões et al., 2004).

Dentre as angiospermas, uma das maiores representantes é a família Rubiaceae, sendo a quarta maior nas dicotiledôneas, compreendendo cerca de 13.000 espécies distribuídas em 650 gêneros e 44 tribos (Delprete, 2004). Suas espécies estão presentes em regiões tropicais e subtropicais, podendo também atingir as regiões temperadas e frias da Europa e norte do Canadá (Pessoa, 2009).

Nas Américas, a família Rubiaceae está representada por 217 gêneros e 5000 espécies (Delprete, 2004) e, no Brasil, ocorrem cerca de 120 gêneros e 2000 espécies, correspondendo a uma das principais famílias de nossa flora. Esta família está presente em quase todas as formações naturais: mata atlântica, cerrado,

caatinga, restingas, floresta amazônica, matas serranas e de altitude, tabuleiros, dunas e campos abertos (Delprete, 2004; Lima et al., 2010; Pereira, 2002;). De acordo com Barbosa, Souza & Jardim (2011), a família Rubiaceae destaca-se também entre as mais diversas no Nordeste brasileiro, com 66 gêneros e cerca de 310 espécies.

Um dos representantes desta família é o gênero *Guettarda*, composto por cerca de 180 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais e neotropicais, com a ocorrência de 24 espécies distribuídas em todo o território brasileiro (Mól, 2010). São utilizadas na medicina popular para os mais diversos fins, destacando-se para o tratamento de ferimentos e inflamações (Agra et al., 2007, 2008; Bertucci et al., 2008; Capasso et al., 1998).

Este gênero é caracterizado por árvores, arvoretas ou arbustos com folhas pecioladas, lanceoladas ou oblongo-ovadas, verticiladas ou opostas dísticas e inflorescência cimosa, dicotômica, axilar, frequentemente com ramificações escorpióides, com poucas flores. As flores podem ser unissexuais a bissexuais, sésseis, cálice geralmente truncado, corola tubulosa a hipocrateriforme, branca, rosa, roxa, violeta, azul clara a amarela, pubescente na face externa, 5 a 6 estames inclusos, estilete inteiro, anteras oblongas a lineares, ovário ínfero de 2 a 9 lóculos, locular tri-tetralocular, uniovulado. Já o fruto apresenta-se drupáceo, globoso a alongado, carnoso e, geralmente, de coloração branca (Mól, 2010; Pereira, 2002).

Apesar do número significativo de espécies até o momento catalogadas, somente 12 espécies tem sido farmacologicamente/quimicamente investigadas mundialmente. Portanto, o objetivo deste trabalho de revisão é apresentar as espécies de *Guettarda* estudadas e descritas na literatura juntamente com seus componentes químicos e propriedades farmacológicas.

METODOLOGIA

Os dados do presente trabalho foram coletados usando a literatura dos portais eletrônicos *Web of Science*, *SciFinder Scholar (CAS Abstract)*, *SCIELO (Scientific Electronic Library Online)*, entre outros, utilizando como palavra-chave para este artigo de revisão o termo *Guettarda*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Essa revisão lida com as espécies do gênero *Guettarda* que foram estudadas cientificamente e que possuam resultados publicados nos principais meios de acesso eletrônico e impresso. Os trabalhos aqui incluídos foram publicados entre 1979 e 2010 em revistas indexadas reconhecidas internacionalmente, anais de congressos, ou foram apresentados como trabalhos para a conclusão de graduação, mestrado e doutorado. As estruturas das substâncias descritas neste trabalho são apresentadas ao final (Figuras 01, 02, 03, 04 e 05).

ASPECTOS QUÍMICOS DAS ESPÉCIES *Guettarda*

- ***Guettarda acreana* K. Krause**

Foram identificados por Capasso et al.(1998) do extrato metanólico o ácido strictosidínico **(1)**, ácido lialosídico **(2)**, 5 α -carboxistrictosidina **(3)**, strictosidina

(4), sickingina (5), ácido 5-cafeoilquínico (6), ácido 4,5-dicafeoilquínico (7), ácido chiquímico (8), ácido 3 β -O- α -ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-(β -glicopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -glicopiranosídeo quinóvico (9). Dois outros glicosídeos do ácido quinóvico também são relatados como presentes neste extrato por estes autores.

- ***Guettarda angelica* Mart.**

Segundo a descrição feita por Almeida (1982) baseando-se em Souza et al. (1980) e Matos et al.(1981, 1982), foram identificados as presenças do 3 α ,19 α -dihidroxi-3,25-lactona-6 β ,24-epoxi-urs-12-en-28-oico (10), ácido rotúndico (11), hederagenato de metila (12), ácido 3 β ,23-dihidroxi-urs-12-en-28-oico (13) e β -glicosídeos de cinchona.

Sousa et al. (1984) afirma a presença de flavonóides, alcalóides e triterpenos nesta planta e ainda descrevem a obtenção do ácido quinóvico (14) e seu glicosídeo, o ácido 3-O- β -D-glicopiranosil-quinóvico (15), na casca da raiz desta planta. Também fazem relato da presença, na madeira da raiz, do mesmo glicosídeo, além do ácido rotúndico (11), hederagenina (16) e do ácido 3 β ,23-dihidroxi-urs-12-en-28-oico (13).

Por Matos et al.(1986) são ainda identificados presentes no extrato etanólico da casca da raiz desta planta, o ácido quinóvico (14), ácido 3 β -O-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopiranosídeo] quinóvico (17), ácido 3 β -O- β -D-glicopiranosil-(28 \rightarrow 1)- β -D-glicopiranosilester quinóvico (18), ácido 3 β -O- β -D-glicopiranosídeo quinóvico (15) e o ácido 3 β -O- α -L-rhamnopiranosídeo quinóvico (19).

- ***Guettarda eximia* Baill.**

Das folhas da *G. eximia* foram isolados catenamina **(20)** (Husson et al., 1977 *apud* ALMEIDA, 1982), 17-hidroxicatenamina **(21)** (Kan-Fan & Husson, 1978 *apus* ALMEIDA, 1982) e hidrocloreto de 4,21-dehidrogeissoschizina **(22)** (Kan-Fan & Husson, 1979)

- ***Guettarda grazielae***

Moura et al. (2006) obtiveram o sitosterol **(23)**, o morronosol **(24)**, guettardotriol **(25)**, ácido 3-O- β -D-glicopiranosil quinóvico **(15)** e o acetato de α -amirina **(26)** a partir de frações do caule e de suas cascas oriundas da partição em hexano, clorofórmio e acetato de etila.

Nos resultados apresentados por Lima et al. (2007) foram isolados do extrato do caule em acetato de etila o composto 3 β ,19 α ,23-triidroxi-urs-12-eno **(27)**. Das folhas foram obtidos os compostos sitostenona **(28)** (proveniente do extrato hexânico) e o ácido ursólico **(29)** (proveniente do extrato clorofórmico).

No estudo realizado por Lima et al. (2009), a fração proveniente do extrato em acetato de etila das cascas do caule obteve-se o ácido 3 β -O- β -D-glicopiranosil quinóvico **(15)**. Do caule também foi obtido este composto, porém resultante da fração obtida em hexano-acetato de etila (9:1) do extrato clorofórmico. Desta mesma fração também foram detectados os compostos acetato de α -amirina **(26)**, 3 β ,19 α ,23-triidroxi-urs-12-eno **(27)** e o ácido 3 β ,6 β ,19 α ,23-tetrahidroxi-urs-12-en-28-óico **(30)**.

Neste mesmo estudo, Lima et al. (2009) obtém a fração hexano-acetato de etila (9:1), proveniente do extrato hexânico das folhas, sendo nela identificados os compostos cicloartenona **(31)** e sitostenona **(28)**. Já da fração em clorofórmio-metanol (7:3), obtida do extrato clorofórmico, o ácido ursólico **(29)** foi detectado.

- ***Guettarda heterosepala* Guill.**

Brillanceau et al. (1984) relatam o isolamento do alcalóide guettardina obtida da casca desta planta. Já Kan-Fan et al. (1986) obtiveram a 3-epi-antirina **(32)** das folhas desta espécie.

- ***Guettarda noumeana* Baill.**

Em estudo realizado por Montagnac et al. (1997) foram obtidos, após alcalinização da casca desta planta, os alcalóides quinolínicos cupreína **(33)**, dihidrocupreína **(34)**, N-metilquinicinol **(35)** e N-metildihidroquinicinol **(36)**.

- ***Guettarda ovalifolia* Urb.**

É descrito por Jiang et al. (1994) a presença do metabólito 3 α ,5 α -tetrahydrodeoxicordifoline.

- ***Guettarda platypoda* DC.**

Almeida (1982) avaliou o extrato etanólico das cascas da raiz desta planta e verificou a presença de saponinas, alcalóides, esteróides, triterpenos e taninos, bem como a ausência de flavonóides. Foram isolados o ácido quinóico (**14**), ácido rotúndico (**11**) e o β -sitosterol (**23**) a partir de frações ácidas oriundas do extrato etanólico obtidas do marco do extrato hexânico das cascas da raiz e uma saponina derivada do ácido quinóico a partir da fração básica do extrato anterior, sendo o isolamento destes compostos publicados posteriormente em Bhattacharyya & Almeida (1985).

Ferrari et al. (1986) identificou no extrato metanólico das raízes a presença do alcalóide 5 α -carboxistrictosidina (**3**) (precursor dos alcalóides indólicos monoterpénóides), o iridóide morronisídeo (**37**) e do secoiridóide swerosídeo (**38**), bem como o ácido quinóico (**14**) e seu derivado glicosídico, o ácido 3-(O-fucosil)-quinóico.

Aquino et al. (1988a) isolaram saponinas triterpênicas, sendo elas o ácido 3 β -O- β -D-glicopiranosil-(27 \rightarrow 1)- β -D-glicopiranosil ester quinóico (**39**), ácido 3 β -O- β -D-glicopiranosil-(28 \rightarrow 1)- β -D-glicopiranosil ester quinóico (**18**) e ácido 3 β -O- β -D-glicopiranosídeo quinóico (**15**). Em outro estudo realizado por Aquino et al. (1989a) são isoladas outras saponinas triterpênicas: ácido (28 \rightarrow 1)- β -D-glicopiranosilester quinóico (**40**), ácido (28 \rightarrow 1)- β -D-fucopiranosilester quinóico (**41**), ácido 3 β -O-[β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopiranosil]-(28 \rightarrow 1)- β -D-glicopiranosilester quinóico (**42**) e ácido 3 β -O-[β -D-fucopiranosil- β -D-glicopiranosil quinóico (**43**). Também são relatadas por estes autores os iridóides morronisídeo (**37**), ácido logânico e loganina e os secoiridóide secxiloganina e swerosídeo (**38**) (Aquino et al., 1988b).

Num estudo desenvolvido por Soares et al. (1998) foram isolados dois novos triterpenos pentacíclicos: um derivado do ácido tormêntico (ácido $3\beta,19\alpha,23$ -trihidroxi-urs-12-en-28-óico) e a 7-oxofriedelina.

Melo et al.(2008) observaram a presença do açúcar não redutor sacarose, bem como também a presença do ácido 3β -O- β -D-glicopiranosil-(28 \rightarrow 1)- β -D-glicopiranosilester quinóvico (**18**) e da 5α -carboxistrictosidina (**3**). Foi ainda verificada nas raízes de *G. platypoda* a presença de uma lectina (Pôrto, 2003).

A partir do extrato metanólico das folhas de *G. platypoda*, foi identificada a presença de flavonóides, taninos (proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas), saponosídeos, triterpenos e esteróides e a ausência de alcalóides, cumarinas, iridóides, assim como do ácido clorogênico (derivado cinâmico), rutina, quercetina e kempferol (flavonóides) (Corrêa, 2007).

- ***Guettarda pohliana* Müll. Arg.**

Oliveira et al. (2007, 2008) obtiveram da fração clorofórmica, proveniente do extrato metanólico das raízes, ácido quinóvico (**14**) e ácido 28-O- β -D-glicopiranosil quinóvico (**44**). A fração acetato de etila foi particionada, tendo a parte solúvel em água os compostos 3-O- β -D-glicopiranosil-28-O- β -D-glicopiranosil quinóvico (**45**), 3-O- β -D-glicopiranosil-28-O- β -D-glicopiranosil cinchólico (**46**) e o daucosterol (ácido 3-O- β -D-glicopiranosil-24 α -etil-colesta-5-enol) (**47**). Já da parte insolúvel em água foram identificados o ácido 3-O- β -D-quinovopiranosil-28-O- β -D-glicopiranosil quinóvico (**48**) e o ácido 4,5-O-dicafeoil quínico (**49**).

- ***Guettarda speciosa* Linn.**

Da parte lenhosa desta planta foi obtida a loganina **(50)** por Yaga & Kazuhiko (1985), sendo também identificada por Inouye et al.(1988) que ainda adiciona a descoberta da presença de secologanina **(51)**. Recentemente, novos compostos presentes nesta planta foram identificados a partir do extrato metanólico das folhas: guettardionosido **(52)**, derivado do glicerol glucuronideo, swerosideo **(38)**, morronisideo **(37)**, c-glicosídeo quinovico, ecdisona, icariside D₁ e cadambine (Cai et al., 2010)

Thamizhvanan et al. (2010) realiza uma análise fitoquímica do extrato clorofórmico e etanólico da entrecasca revelando a presença de alcalóides, flavonóides, triterpenoides, carboidratos, taninos, compostos fenólicos, gomas em mucilagem.

Arumugam et al. (2009) e Gandhimathi et al. (2009) analisaram o extrato etanólico da entrecasca identificando a presença de alcalóides, flavonóides, carboidratos, taninos, compostos fenólicos, gomas e mucilagem bem como a ausência de saponinas e esteróides. Foi ainda identificada a presença de triterpenóides neste mesmo extrato (Gandhimathi et al., 2009).

- ***Guettarda trimera* (Less.) DC.**

Kan-Fan et al. (1985) avaliaram a composição da casca do caule obtendo derivados quinicínicos a partir da extração clássica para alcalóides, como os

compostos N-metil dihidroquinicinol (**35**), 9-epi-N-metil dihidroquinicinol (**53**) e N-metil dihidroquinicina (**54**).

ASPECTOS FARMACOLÓGICOS E ETNOBOTÂNICOS DAS ESPÉCIES *Guettarda*

- ***Guettarda acreana* K. Krause**

Ascarruz et al. (1999) diz que esta planta é utilizada na medicina tradicional boliviana e avaliaram a fração orgânica proveniente do extrato do córtex desta planta. Verificou-se que nas doses a partir de 20 µg/mL há presença de morfologia celular anormal, mas somente nas frações de 160 µg/mL e 320 µg/mL é que apresenta morte celular (toxicidade). Apesar deste fato, os autores concluíram que possivelmente este extrato não é genotóxico, uma vez que não apresenta valores significativos em nenhuma das dosagens testadas (máxima de 320 µg/mL) e nenhuma relação dose-dependente.

A avaliação da ação espasmódica em íleo de cobaia foi feita por Capasso et al.(1998) onde foi observado um efeito espasmolítico dose-dependente, nas dosagens de 1,2; 2,5 e 5 µg/mL, dos extratos metanólico e CHCl₃/MeOH (9:1). Este efeito também foi observado quando testado a parte solúvel em MeOH do extrato de CHCl₃/MeOH e de frações oriundas deste extrato metanólico. Os compostos isolados destas (ácido strictosidínico, ácido lialosídico, 5α-carboxistrictosidina, strictosidina, sickingina, ácido 5-cafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico e ácido chiquímico) também apresentaram esta atividade.

Segundo West (1935) *apud* Almeida (1982), a *G. acrena* apresentou ainda, como ação farmacológica, efeito agonista ao Curare.

- ***Guettarda angelica* Mart.**

Etnomedicinalmente, usa-se as raízes contra cólicas menstruais, constipações, febres (principalmente puerperal), além do tratamento de tifo e diarreia (Agra et al., 2007; Lima et al., 2009). Sua propriedade emenagoga e para dispepsia também são descritas (Matos, 1987; Bahia, 1979). Braga (1976) afirma ainda que sua raiz possui ação abortiva. Na área veterinária, é utilizada no tratamento da diarreia de bovinos e equinos (Bahia, 1979).

Tavares & Sousa (1979) *apud* Almeida (1982) que o extrato aquoso produz atividade hipoglicemiante em ratos e Francisco (2004) descreve a atividade antibacteriana *in vitro* frente salmonelas. Soares et al. (2006) obtém resultados negativos na avaliação do extrato etanólico das folhas contra *Candida albicans*.

Barros et al. (2007, 2009) investiga o potencial antiviral dos extratos e frações de *G. angelica*, com prévia avaliação citotóxica. Os extratos das raízes, folhas e sementes foram avaliados contra o herpesvírus de eqüinos do tipo 1 (EHV-1), apresentando atividade antiviral somente o extrato das sementes (Barros et al., 2009). Contra o herpesvírus bovino e o suíno foram avaliados os extratos (aquoso e metanólico) e frações (aquosa, hexânica e em acetato de etila) da raiz, bem como os extratos aquosos das folhas e sementes, os quais não apresentaram nenhuma atividade, com exceção apenas do originado das sementes, que apresentou resultado positivo contra ambos os vírus (Barros et al., 2007).

- ***Guettarda grazielae***

Lima (2008) avalia a atividade larvicida, anticolinesterásica e antioxidante dos extratos das folhas e do caule de *G. grazielae*, obtendo resultados promissores na atividade contra larvas (4º estágio) de *Aedes aegypti* para as frações oriundas do extrato etanólico 90% de ambos os extratos. Moura et al. (2006) também verifica este potencial quando avalia a fração em acetato de etila do extrato etanólico 90% do caule.

Esta planta também apresenta provável atividade anticolinesterásica para as frações hexânica e clorofórmica do extrato em acetona das folhas (Lima, 2008) e da fração CHCl₃-MeOH (9:1) do extrato hexânico das folhas (Lima et al., 2007). Esta atividade foi apresentada devido à inibição qualitativa da ação da enzima acetilcolinesterase, quando comparada com a cafeína. A atividade antioxidante (DPPH), para a fração em acetato de etila do extrato em acetona das folhas (Lima, 2008) e a fração CHCl₃-acetato de etila (9:1) em hexano (Lima et al., 2007) foi verificada.

- ***Guettarda platypoda* DC.**

A raiz de *G. platypoda* é usada popularmente como antipirética (Aquino et al., 1988a,b; Bhattacharyya & Almeida, 1985; Ferrari et al., 1986) e durante o período puerperal (Bhattacharyya & Almeida, 1985; Matos, 1987) e ainda para correção de irregularidades menstruais (Seplantec, 1979).

Almeida (1982) relata a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico da casca da raiz desta planta na dose de 50 mg/kg (via intraperitoneal) e em doses superiores a 500 mg/kg (via oral), bem como a mesma atividade para a fração não-básica em doses superiores a 1000 mg/kg (via oral). Nesta fração encontram-se presentes o ácido rotúndico, o β -sitosterol, o ácido quinóvico e seu derivado glicídico, todos com já conhecida atividade anti-inflamatória, anteriormente relatada no estudo em questão.

A inibição de contrações uterinas de ratas induzidas por ocitocina, bradicinina e prostaglandina F₂ α (PGF₂ α) também foi descrita, bem como a ausência de efeito deste mesmo extrato sobre a pressão arterial, atividade hipoglicemiante, efeito espasmolítico (íleo e traquéia de cobaia, duodeno de coelho, reto anterior de sapo e músculo cardíaco), além de discreta irregularidade na frequência respiratória (Almeida, 1982). Pode-se ainda destacar a significativa atividade antioxidante (\approx 87%) que os extratos metanólico e etanólico das cascas da raiz apresentam (Melo et al., 2008).

De componentes isolados desta planta (glicosídeos do ácido quinóvico) é observada ação antiviral contra o rinovírus tipo 1B e o vírus da estomatite vesicular (Aquino et al., 1989b).

- ***Guettarda pohliana* Müll. Arg.**

Foi avaliada a atividade antioxidante (DPPH) de suas raízes após extração com metanol e partição com hexano, clorofórmio e acetato de etila. Os resultados deste ensaio mostraram que o extrato bruto e a fração de acetato de etila foram os que

apresentaram maior potencial antioxidante. Possivelmente, esta ação observada na fração citada é devido à presença do ácido 4,5-O-dicafeoilquínico (Oliveira et al., 2008).

- ***Guettarda speciosa* Linn.**

A entrecasca desta planta é muito utilizada tradicionalmente na medicina indiana para tratar a epilepsia (Kumar & Gandhimathi, 2009). Em Fiji, o pecíolo é utilizado para promover a menstruação e a planta é utilizada para tratar infecções maternas pós-parto. A decocção das folhas é utilizada para tratamento de resfriados, tosses e dores de garganta. A entrecasca é utilizada para tratamento da conjuntivite. Em Tonga, um chá feito com a entrecasca da raiz é utilizado para tratamento de epilepsia, assim também em Tirunelveli, Índia. No Taiti, a planta é utilizada como antidiarréica, febrífuga e anticolinérgicas (Arumugam et al., 2009).

Arumugam et al. (2009) avaliaram a atividade anticonvulsivante de *G.speciosa* em ratos a partir do extrato etanólico (95%) da entrecasca deste vegetal, ocorrendo atividade anticonvulsivante significativa nas doses de 200 e 400 mg/kg contra vários modelos de epilepsia. Neste estudo também foi avaliada a toxicidade do extrato, não sendo observado toxicidade até a dose de 2000 mg/kg por via oral. Na tentativa de descrição do mecanismo de ação, foi verificada as alterações de monoaminas (noradrenalina, dopamina, serotonina e ácido gama aminobutírico) durante as convulsões. O resultado deste estudo foi que o extrato utilizado aumenta o limiar para convulsão e diminui a suscetibilidade. Além disso, as propriedades anti-epilépticas verificadas podem ser devido à restauração das aminas biogênicas no

cérebro de ratos (Kumar & Gandhimathi, 2009). Em 2010, esses autores também avaliam os níveis antioxidantes no cérebro de ratos (após indução da convulsão) com o uso do extrato etanólico (95%) da entrecasca deste vegetal nas doses de 200 e 400mg/kg. No resultado obtido pode-se perceber um aumento significativo nos níveis das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutaciona peroxidase, glutaciona redutase e catalase) no cérebro desses animais e diminui inversalmente a peroxidação lipídica dos ratos tratados. Assim, a *G. speciosa* possui propriedades antioxidantes, diminuindo a quantidade de radicais livres (Kumar & Gandhimathi, 2010).

A propriedade antidiarreica (induzida por óleo de mamona) do extrato etanólico (90%) da entrecasca também foi avaliada em ratos, mostrando-se efetivo nas doses de 200 e 400 mg/kg, não sendo ainda esclarecido o mecanismo de ação (Gandhimathi et al., 2009).

Os extratos clorofórmico e etanólico das folhas desta planta demonstraram um potencial antifúngico e antibacteriano, quando avaliados utilizando o método de difusão em meio sólido. O extrato clorofórmico, nas doses de 50µg/mL, 100µg/mL e 200µg/mL, apresentou significativa atividade contra *Escherichia coli* e moderada atividade contra *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans* quando comparado aos padrões. O extrato etanólico, nas mesmas doses anteriores, apresentou significativa atividade contra *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans* e moderada atividade contra *Escherichia coli* quando comparado aos padrões. Ambos os extratos apresentaram baixa ou ausente atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Thamizhvanan et al., 2010).

- ***Guettarda spruceana***

Segundo Quitans-Junior et al. (2002), esta planta é utilizada popularmente por ser emenagoga, também possuindo efeito abortivo. Seus estudos avaliaram o potencial anticonvulsivante do extrato etanólico a 95%, não apresentando resultados positivos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma avaliação cuidadosa dos dados apresentados acima indica que, embora já existam estudos sobre as espécies do gênero *Guettarda*, muito ainda tem que ser investigado uma vez que das 180 espécies relatadas somente 12 foram até agora estudadas farmacologicamente/quimicamente. Esta revisão comprova também o valor do conhecimento tradicional para o desenvolvimento e autentificação de novos agentes medicinais. Deve-se ressaltar que o isolamento e caracterização das entidades químicas presentes no gênero, correlacionadas com a atividade farmacológica, podem contribuir para efetiva descoberta de compostos ainda mais relevantes para a terapêutica, bem como a identificação do marcador biológico e identificação do grupo farmacofórico e, assim, beneficiar efetivamente a sociedade.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do governo brasileiro) por seu apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, 114-140, 2007.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N, BASÍLIO I.J.L.D; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, 472-508, 2008.
- ALMEIDA, M.Z. de. **Estudo fitoquímico e triagem farmacológica da casca da raiz da *Guettarda platypoda* DC.**1982. 133 p. Dissertação (Mestrado - Produtos Naturais) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- AQUINO, R.; SIMONE, F.de; PIZZA, C.; CERRI, R.; MELLO, J.F de. Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. **Phytochemistry**, v.27, p.2927-2930, 1988a.
- AQUINO, R.; SIMONE, F. de; PIZZA, C.; MELLO, J.F. de. Further quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. **Phytochemistry**, v.28, p.199-201, 1989a.
- AQUINO, R.; SIMONE, F. de; SENATORE, F.; PIZZA, C. Iridoids and secoiridoids from *Guettarda platypoda*. **Pharmacological Research Communications**, v.20, p.105-108, 1988b.
- AQUINO, R.; SIMONE, F. de; PIZZA, C.; CONTI, C.; STEIN, M.L. Plant metabolites. Structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 4, p. 679-685, 1989b.
- ARUMUGAM, S.; PALANIVELU, A.; RETNASAMY, G.; RAMAIYAN, D. Study on the Antiseizure Activities of Inner Bark of *Guettarda Speciosa* (L.). **Iranian Journal Of Pharmacology & Therapeutics**, v. 8, n.2, p.73-76, 2009.
- ASCARRUNZ G., M.E.; OLIVARES P.J.; TABOADA L., G.; ROMERO, L.M. Evaluacion del Potencial Genotoxico de 4 extractos vegetales de la medicina tradicional boliviana. **Biofarbo**, v.7, n.7, p.57-66,1999.
- BAHIA. Governo do Estado. Seplantec. Subsecretaria de Ciência e Tecnologia. **Inventário de plantas medicinais do Estado da Bahia**. Salvador, 1979.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; DA SILVA, T.M.S; SETTE, I.M.F.; *et al.* Rubiaceae. In: LUCCHESI, A. M. (ed.). Instituto do Milênio do Semi-árido. **Plantas da Caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica**. v.4. Recife: Associação de Plantas do Nordeste, 2006, p.427-428.
- BARBOSA, M.R.de V.; SOUZA, E. B. de.; JARDIM, J.G. Rubiaceae. In: Checklist das Plantas do Nordeste (Versão 1.5). **Banco de Dados de Plantas do Nordeste**. Disponível em: <<http://www.cnip.org.br/bdnpn/checklistNE.pdf>>. Acesso em: 5 jan. 2011.
- PINA, E.M.L. Estudo farmacológico das cascas da raiz de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae)

BARROS, A.V.; CONCEIÇÃO, A.O.; SIMONI, I.C.; FERNANDES, M.J.B; ARNS, C.W. Antiviral activity and cytotoxicity of extracts and fractions from *Guettarda angelica* Mart. on equine herpesvirus type 1. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 20, 2009, Brasília. **Virus Reviews and Research**, v. 14. p. 170.

BARROS, A.V.; ARAUJO, L.M.;SCHMITT, A.C.; SIMONI, I.C.; FERNANDES, M.J.B. Atividade antiviral *in vitro* de *Guettarda angelica* frente aos herpesvírus bovino e suíno. In: JORNADA PAULISTA DE PLANTAS MEDICINAIS, 7, 2007, São Paulo. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina - JBF**, v. 05. p.154.

BERTUCCI, A.; HARETCHE, F.; OLIVARO, C.; VÁZQUEZ, A. Prospección química del bosque de galería del río Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.21-25, 2008.

BHATTACHARYYA, J.; ALMEIDA, M.Z. Isolation of the constituents of the root-bark of *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v.48, p.148-149, 1985.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 3ª ed. Fortaleza: Escola Superior de Agricultura de Mossoró, 1976. 540 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>. Acesso 5 jan. 2011.

BRILLANCEAU, M.H.; KAN-FAN, C.; KAN, S.K.; HUSSON, H.P. Guettardine, a possible biogenetic intermediate in the formation of corynanthe-Cinchona alkaloids. **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 26, p. 2767-2770, 1984.

CAI, W.-H.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H.; SHINZATO, T.; TAKEDA, Y. A glycerol α -D-glucuronide and a megastigmane glycoside from the leaves of *Guettarda speciosa* L. **Journal of Natural Products** [publicado antes da impressão].2010.

CAPASSO, A.; BALDERRAMA, L.; SILVILA, S.C.; TOMMASI, N.; SORRETINO, L. Phytochemical and pharmacological studies of *Guettarda acreana*. **Planta Medica**, v.64, p.348-352, 1998.

CORRÊA, P.G. **Defesas foliares em resposta à herbivoria em espécies lenhosas de restinga, Ipojuca-pe**. 2007. 53 p.Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CUNHA, A. P. da; SILVA, A. P. da; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. p.21-61.

DAVID, J.P. de L.; DAVID, J.M.; SOARES, M.B.P *et al*. Introdução. In: LUCCHESI, A. M. (ed.). Instituto do Milênio do Semi-árido. **Plantas da Caatinga**: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica. v.4. Recife: Associação de Plantas do Nordeste, 2006, p.15-17.

DELPRETE, P.G. Rubiaceae (Coffea or Quinine family). In: SMITH, N. et al. (ed.). **Flowering plants of the neotropics**. Princeton: Princeton University Press, 2004. p.328-333.

FERRARI, F.; MESANA, I.; BOTTA, B.; DE MELLO, J.F. Constituents of *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v.49, p.1150-1151, 1986.

FRANCISCO, N. M. A. C.; ARGOLO FILHO, R. C.; MACIEL, B. M.; REZENDE, R. P.; SCHMITT, A. C. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* da planta *Guettarda angelica* sobre salmonellas isoladas das fezes de teiús. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10, 2004, Ilhéus. **EDITUS**, p. 133-134.

GANDHIMATHI, R.; SARAVANA KUMAR, A.; SENTHIL KUMAR, K.K.; KUSUMA PRAVEEN KUMAR, UMA MAHESWARI J. Pharmacological studies of anti-diarrhoeal activity of *Guettarda speciosa* (L.) in experimental animals. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 2, p.61-66, 2009.

INOUE, H.; TAKEDA, Y.; NISHIMURA, H.; KANOMI, A.; OKUDA, T.; PUFF, C. Chemotaxonomic studies of Rubiaceae plants containing iridoid glucosides. **Phytochemistry**, v.27, p.2591-2598, 1988.

JIANG, Y.; WENIGER, B.; QUIRION, J.C.; MULLER, C.; ANTON, R. 3 α ,5 α -Tetrahydrodeoxycordifoline from *Guettarda ovalifolia*. **Planta Medica**, v.60, p.294, 1994.

KAN-FAN, C.; BRILLANCEAU, M.H.; PUSSET, J.; CHAUVIERE, G.; HUSSON, H.P. Plants from New Caledonia. Part 98. Three quinicine derived alkaloids from *Guettarda trimera*. **Phytochemistry**, v.24, p.2773-2775, 1985.

KAN-FAN, C.; BRILLANCEAU, M.H.; HUSSON, H.P. Plants of New Caledonia. Part 107. 3-Epi-antirrhine, a new alkaloid from *Guettarda heterosepala*. **Journal of Natural Products**, v.49, p.1130-1132, 1986.

KAN-FAN, C.; HUSSON, H.P. Isolation and biomimetic conversion of 4,21-dehydrogeissoschizine. **Journal of Chemical Society**, v.22, p.1015-1016, 1979.

KUMAR, A.S.; GANDHIMATHI, R. Effect of *Guettarda speciosa* extracts on biogenic amines concentrations in rat brain after induction of seizure. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, s.1, p.237-243, 2009.

KUMAR, A.S.; GANDHIMATHI, R. Effect of *Guettarda speciosa* extracts on antioxidant enzymes levels in rat brain after induction of seizures by MES and PTZ. **Journal of Natural Products**, v. 3, p. 80-85, 2010.

LIMA, G.S.; MOURA, F.S.; OLIVEIRA, P.E.S.; CONSERVA, L.M.; LEMOS, R.P.L. Estudo Químico e Avaliação das Atividades Larvicida, Anti-radicalar e Anticolinesterásica de *Guettarda grazielae* (Rubiaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30, 2007, Águas de Lindóia. **Publicação online**.

LIMA, G.S. de. **Estudo químico biomonitorado de extratos das folhas e do caule de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de Química Orgânica / Química dos Produtos Naturais). Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

LIMA, G. S.; MOURA, F. S.; LEMOS, R. P. L.; CONSERVA, L. M. Triterpenos de *Guettarda grazielae* M: R.V. Barbosa (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.19, n.1b, p. 284-289, 2009.

LIMA, L.F., LIMA, P.B., ALMEIDA Jr., E.B. & ZICKEL, C.S. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae). **Biota Neotropica**, v.10, n.1, 2010. Disponível em: < <http://www.biotaneotropica.org.br/v10n1/pt/abstract?article+bn02310012010>>. Acesso: 31 jan 2011.

MATOS M.E.O.; SOUSA M.P.; MACHADO M.I.L.; BRAZ FILHO R. Quinovic acid glycosides from *Guettarda angelica*. **Phytochemistry**, v.25, p.1419-1422, 1986.

MATOS, F. J. de A. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha**. Fortaleza: UFC, 1997. 258 p.

MELO, S.J.de; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T.L.G.; SANTOS, H. S.; FONSECA, A.M., XAVIER, H.S. Derivados terpênico e indólico glicosilados das raízes de *Guettarda platypoda* D.C. (Rubiaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31, 2008, Águas de Lindóia. **Publicação online**.

MÓL, D.F. de F. **Rubiaceae em um remanescente de floresta atlântica no Rio Grande do Norte, Brasil**. 2010. 69 p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) - CENTRO DE BIOCÊNCIAS, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, NATAL.

MONTAGNAC, A.; LITAUDON, M.; PAÍS, M. Quinine and quinicine derived alkaloids from *Guettarda noumeana*. **Phytochemistry**, v.46, p. 973-975, 1997.

MOURA, F.de S.; OLIVEIRA, P.E.S. de; SILVA, T.B.C. da; CONSERVA, L.M.; SANTOS, A.C.B. dos; LEMOS, R.P.L. Estudo químico e avaliação da atividade larvicida de *Guettarda grazielae* (Rubiaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, 2006, Águas de Lindóia. **Publicação online**.

OLIVEIRA, P.R.N.; TESTA, G.; SANTIN, S.M.O.; da Silva, C.C.; SOUZA, M. de C. Triterpenos isolados de *Guettarda pohliana* (Rubiaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30, 2007, Águas de Lindóia. **Publicação online**.

OLIVEIRA, P.R.N.; TESTA, G.; DE SENA, S.B.; COSTA, W.F.; SARRAGIOTO, M.H.; SANTIN, S.M.O.; SOUZA, M.C. Saponinas triterpênicas das raízes de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Química Nova**, v.31, p. 755-758, 2008.

PEREIRA, M. do S. **A família Rubiaceae na reserva biológica Guaribas, Paraíba, Brasil**. 2002. 117p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PINA, E.M.L. Estudo farmacológico das cascas da raiz de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae)

PESSOA, M. do C. R. **Diversidade e riqueza da família Rubiaceae Juss. no Cariri Paraibano**. 2009. 83 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PÔRTO, V. B. dos S. **Purificação parcial de uma lectina da raiz de *Guettarda platypoda***. 2003. 33 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, R.N. de; FALCÃO, A.C.G.M.; AGRA, M. de F.; SOUSA, M. de F.V. de; BARBOSA-FILHO, J.M. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.21, n.3, p.179-184, 2002.

SIMÕES, C.M. de O. et al (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004. 1102 p.

SOARES, F.P.; RONCONI, C. A. V.; CUNHA, E. V. L. DA; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S. DA; BRAZ-FILHO, R. Four known triterpenoids isolated from three Brazilian plants: ^1H and ^{13}C chemical shift assignments. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 36, n.8, p.608–614, 1998.

SOARES, K.P.; AMORIM, L.N.; NASCIMENTO, K.M.; et al. Atividade de extratos de plantas do Nordeste do Brasil contra cepas de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche de Fortaleza. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 46, 2006, Salvador. **Publicação online**.

SOUSA M.P., MATOS M.E.O., MACHADO M.I.L., BRAZ-FILHO R., VENCATO I., MASCARENHAS Y.P. Triterpenoids from *Guettarda angelica*. **Phytochemistry** 23: 2589-2592, 1984.

THAMIZHVANAN, K.; PAVAN KUMAR, P.; THANUJA BACHALA; MADHU MOHAN, D.; KRISHNAKISHORE, P.; PRAVEEN KUMAR, K. Antibacterial and antifungal activities of various extracts of *Guettarda speciosa* L. **International Journal of Phytopharmacology**, v.1, n.1, p. 20-22, 2010.

YAGA S, KAZUHIKO K. On the termite-resistance of Okinawan timbers. IX. Termiticidal substance from the wood of *Guettarda speciosa* L. **Mokuzai Gakkaishi** 31: 684-687. 1985

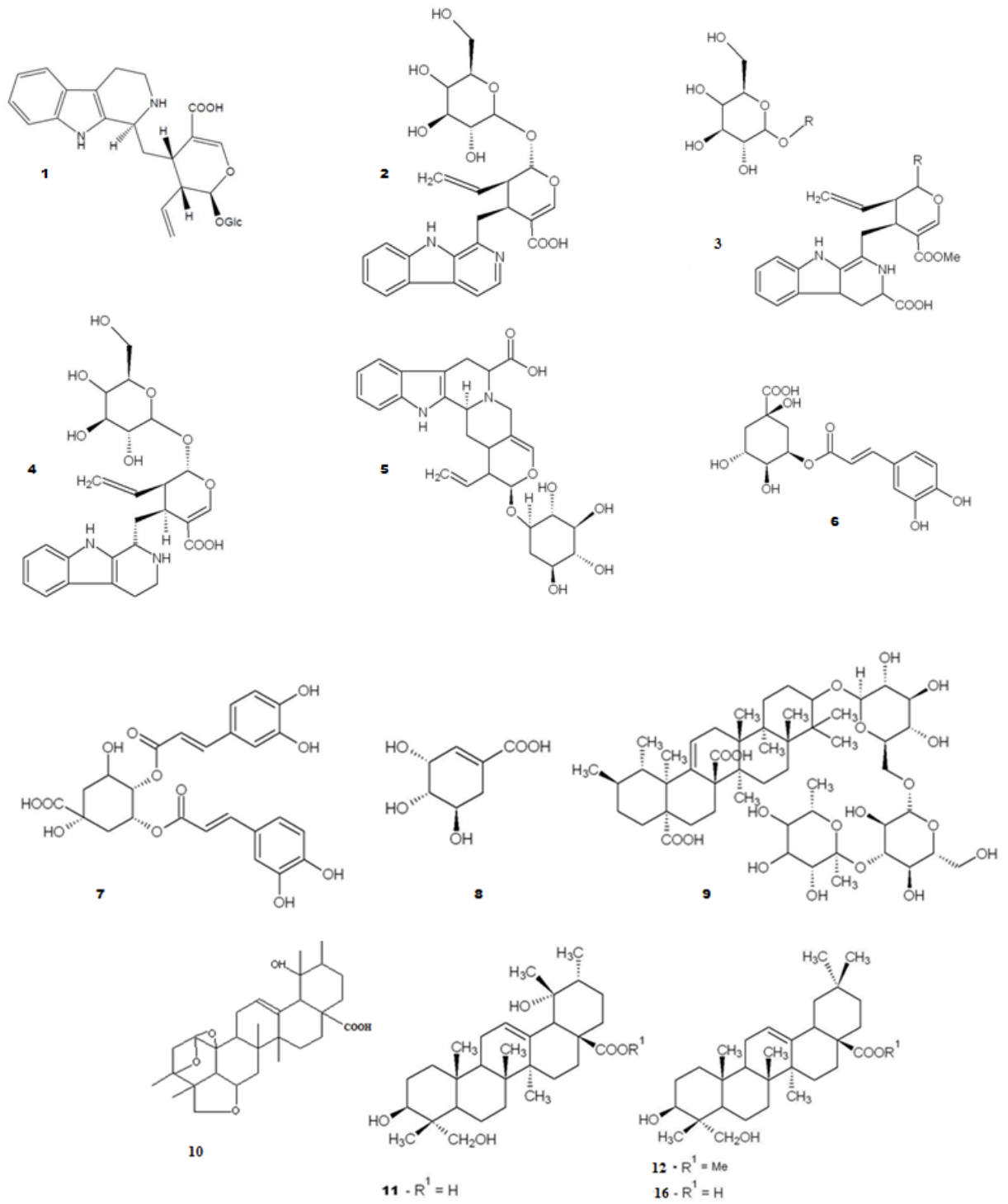


FIGURA 01: Compostos isolados do gênero *Guettarda*

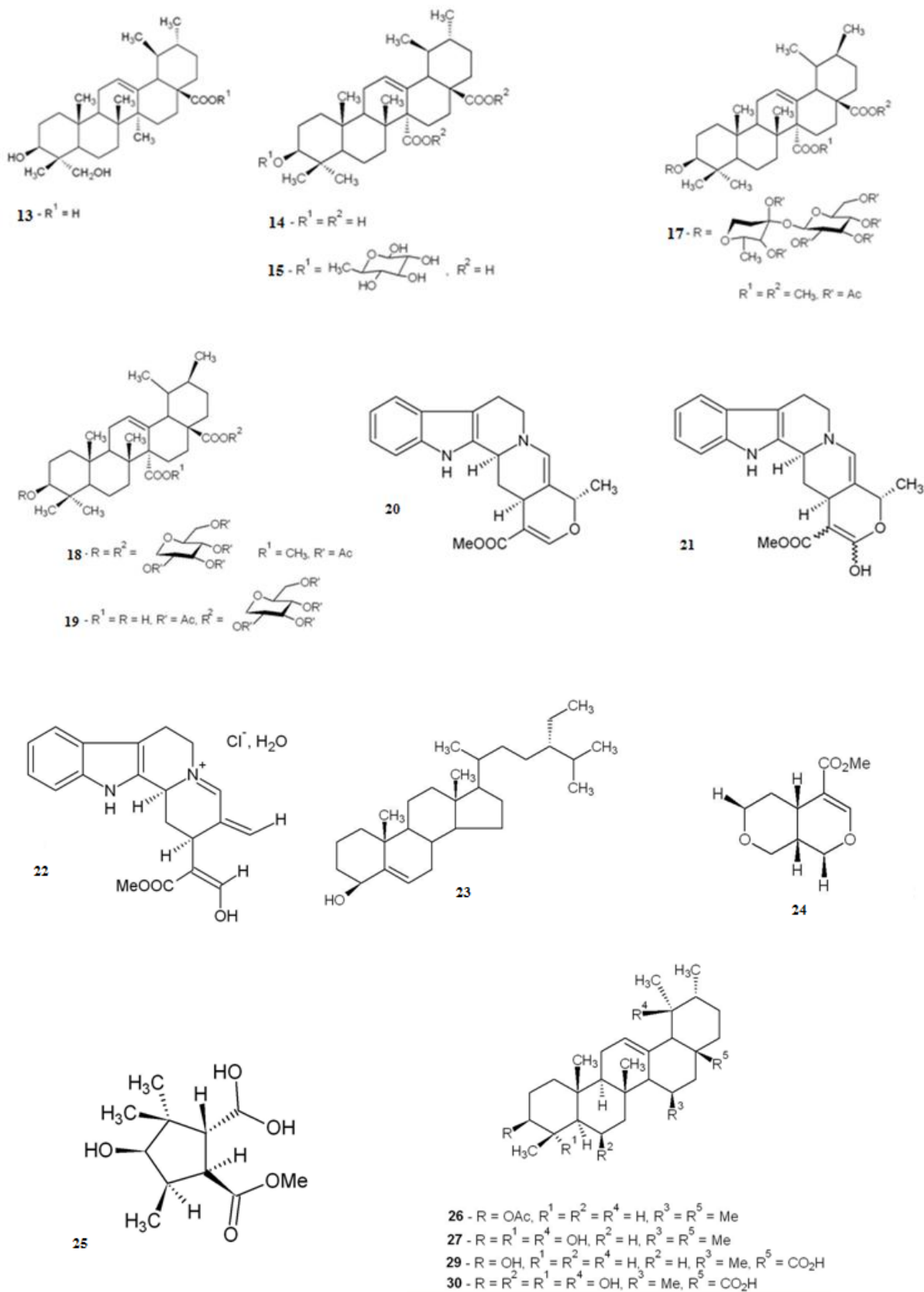


FIGURA 02: Compostos isolados do gênero *Guettarda* (continuação)

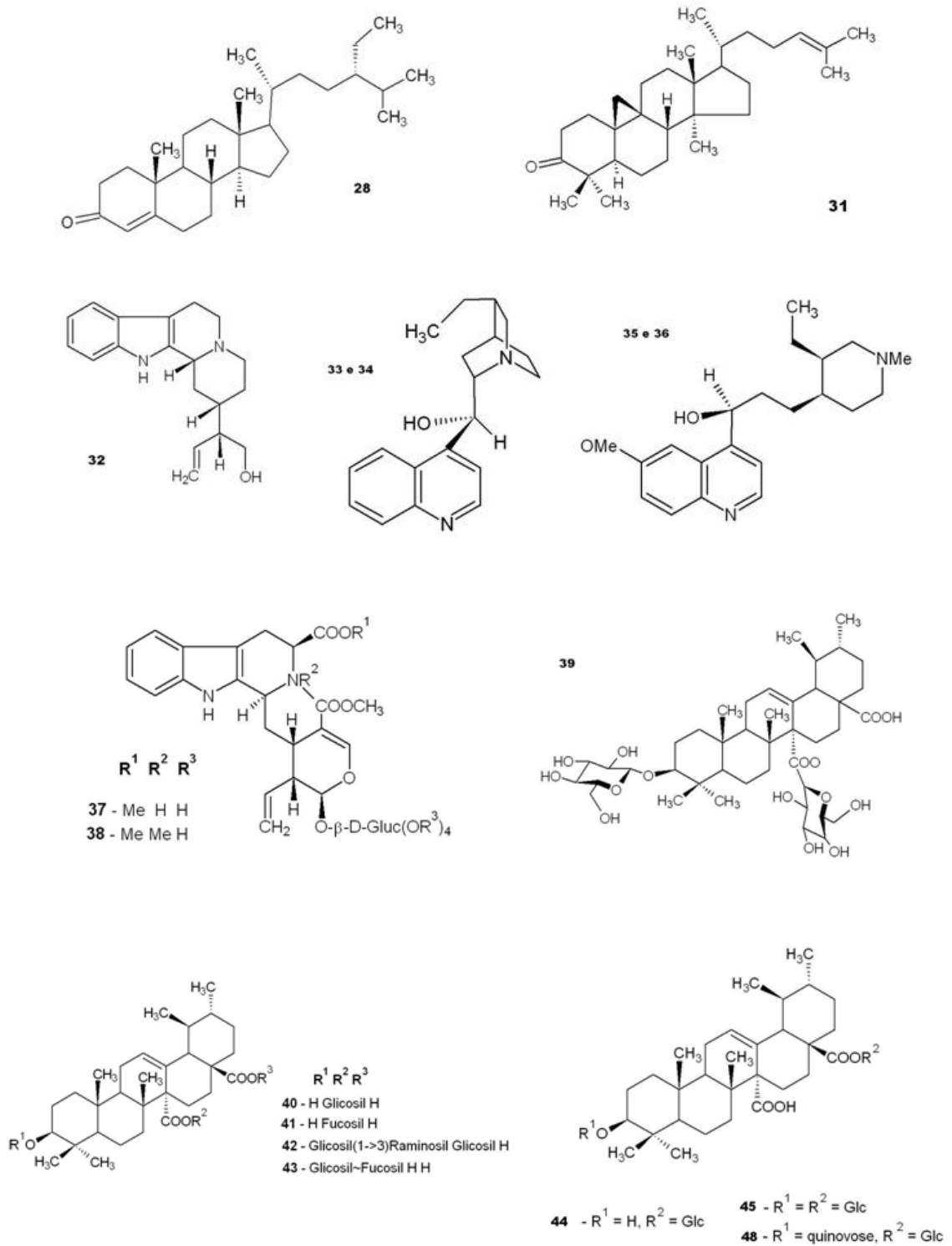


FIGURA 03: Compostos isolados do gênero *Guettarda* (continuação)

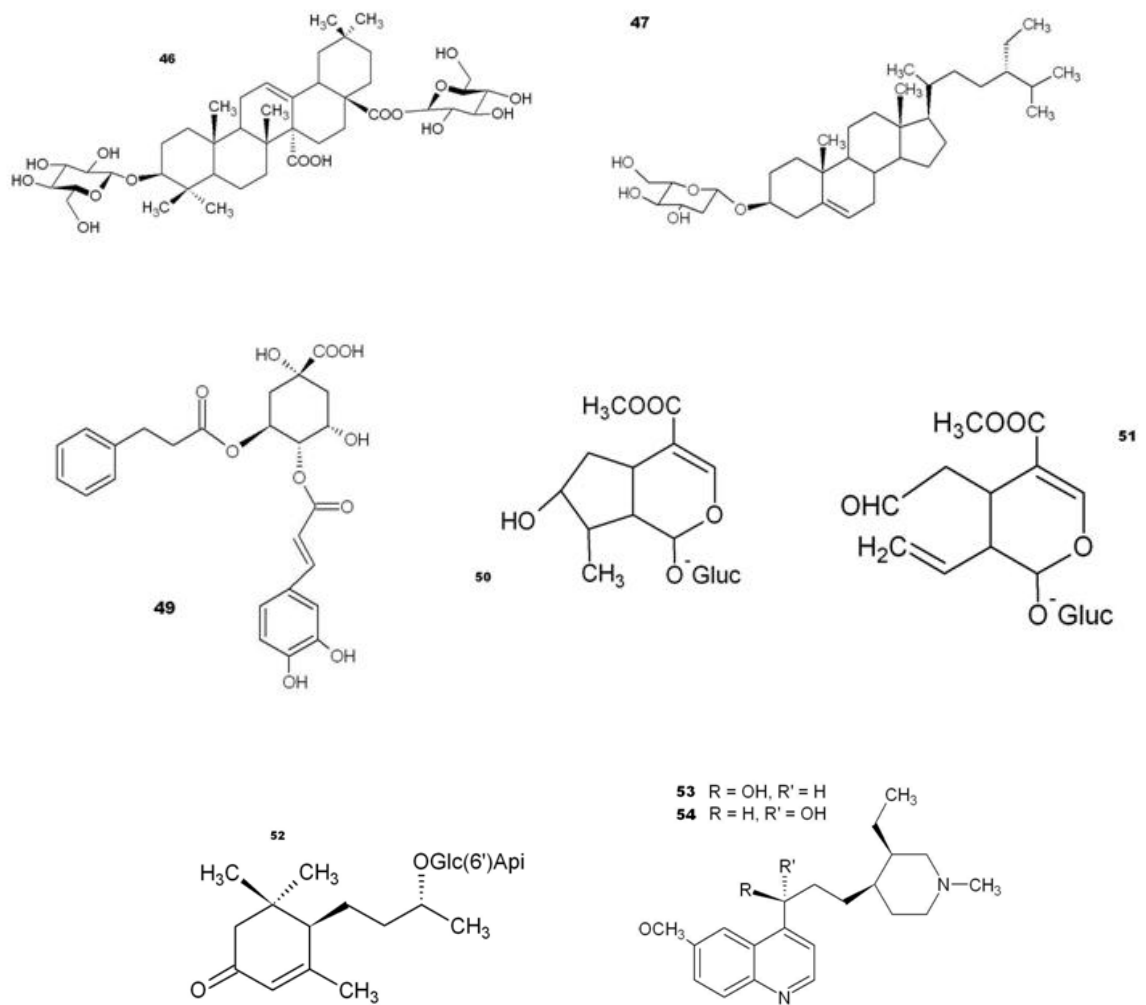


FIGURA 04: Compostos isolados do gênero *Guettarda* (continuação)

Capítulo 1

4 PERFIL FITOQUÍMICO DAS CASCAS DA RAIZ DE *Guettarda platypoda*

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material botânico (raízes) foi coletado no mês de agosto/2009, obtido no município de Itamaracá, Pernambuco, a cerca de 50 km do Recife, limitando-se a norte com Goiana, ao sul com Igarassu, a leste com Oceano Atlântico e a oeste com Itapissuma (ALMEIDA JR., PIMENTEL e ZICKEL, 2007). A identificação da espécie *Guettarda platypoda* foi feita pela Dr^a Alda Chiappeta e identificada pelo número 5341.

Após a coleta, as cascas da raiz foram retiradas o mais breve possível (não ultrapassando 12h após coletada) e exposta para secagem em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante uma semana, para eliminação da umidade e estabilização do conteúdo enzimático. O material foi reduzido a pó em moinho elétrico e pesado (736,8 g).

A extração dos componentes fixos das cascas da raiz foi feita por infusão metanólica (mistura a 10% p/v), com posterior maceração de 72h e agitação esporádica. Os extratos foram filtrados e os resíduos re-extraídos. As soluções obtidas neste processo foram destiladas à pressão reduzida em evaporador rotativo a 50 ± 5 °C, obtendo-se assim 173,3 g do extrato bruto seco (EBS). O EBS das cascas da raiz de *Guettarda platypoda* caracterizou-se por um pó fino e amarelo (Figura 01).



FIGURA 01: Extrato bruto seco das cascas da raiz de *Guettarda platypoda*
(Foto: Evelyn)

4.2 TRIAGEM FITOQUÍMICA

4.2.1 Materiais e método

Utilizando-se placas de Sílica Gel (ALUGRAM® SIL G/UV254, Ref: 818133), alíquotas de 10µL foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) para a análise da presença dos principais metabólitos secundários: Polifenóis (flavonóides, derivados cinâmicos, fenilpropanoglicosídeos, proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas e taninos gálicos), Terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e esteróides), Glicosídeos Cardíacos, Alcalóides e Açúcares Redutores, empregando-se diversas fases móveis e reveladores específicos como descritos na Tabela 01. Para a análise da presença de Saponosídeos foi realizado o teste de afrogenicidade.

4.2.1.1 Pesquisa de Flavonóides

Após revelação com o reagente NEU (solução a 1% de difenilboriletoxietilamina), procedeu-se à observação em câmara de UV (365 nm). A presença de bandas de fluorescência laranja, amarela ou verde foram usadas para atestar a presença de flavonóides. O extrato metanólico de alcachofra (*Cynara scolymus* L.) foi utilizado como padrão devido à presença de alguns flavonóides, como luteolina e quercetina.

4.2.1.2 Pesquisa de Derivados Cinâmicos

Bandas de fluorescência azuladas no UV (365 nm), atenuadas após a revelação com o reagente de NEU (Solução a 1% de difenilboriletoxietilamina), apresentando-se, então, com fluorescência azul intensa, foram usadas como indicativo da presença de derivados cinâmicos. O extrato metanólico de alcachofra (*Cynara scolymus* L.), devido à presença de ácido clorogênico, cinarina e ácido caféico, foi utilizado como padrão.

4.2.1.3 Pesquisa de Fenilpropanoglicosídeos

Bandas de fluorescência azuladas no UV (365 nm), apresentando-se com fluorescência verde-limão após a revelação com o reagente de NEU (Solução a 1% de difenilboriletoxiethylamina), e nova observação no UV (365 nm), foram usadas como indicativo da presença de fenilpropanoglicosídeo.

4.2.1.4 Pesquisa de Proantocianidinas condensadas e Leucoantocianidinas

A presença de bandas de coloração vermelha, após revelação com vanilina clorídrica e visualização no visível, foi utilizada como resultado positivo para a presença de taninos. Se a coloração vermelha apresentar-se no ponto de aplicação, é detectada a presença de proantocianidinas condensadas; se houver migração, é evidenciada a presença de leucoantocianidinas.

4.2.1.5 Pesquisa de Monoterpenóides, Sesquiterpenóides e Diterpenóides

É detectada a presença desses metabólitos quando o cromatograma é revelado com vanilina sulfúrica e posterior aquecimento em estufa a 100 °C por 5 min e surgem bandas de coloração azul escuro, confirmando a presença destes.

4.2.1.6 Pesquisa de Triterpenóides e Esteróides

Para detectar a presença desses metabólitos, o cromatograma é revelado com o reagente de Liebermann-Burchard com posterior aquecimento em estufa a 100°C por 5 min. O aparecimento de bandas de coloração avermelhada, quando observadas no UV 365 nm, indica a presença de triterpenos e esteróides. São utilizados o padrão de beta-sitosterol, beta-amirina e ácido ursólico.

4.2.1.7 Pesquisa de Glicosídeos Cardíacos

O extrato metanólico das folhas de Espirradeira (*Nerium oleander*) foi utilizado como padrão por conter substância como a oleandrina. Após revelação com reagente de Kedde, a presença de bandas de coloração violácea e/ou azul-violácea determina a presença de glicosídeos cardíacos.

4.2.1.8 Pesquisa de Alcalóides

O cromatograma foi revelado com o reagente de Dragendorff, utilizando como padrão a pilocarpina. A presença de bandas de coloração laranja foi usada como critério para acusar a existência de alcalóides.

4.2.1.9 Pesquisa de Açúcares Redutores

Os padrões xilose, arabinose, rhamnose, glicose e maltose foram empregados para a identificação de açúcares redutores no extrato. O cromatograma é revelado com o cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTZ), com posterior aquecimento em estufa a 100°C por 5 min. O surgimento de bandas com R_f igual aos padrões, bem como colorações idênticas, é interpretado como resultado positivo à presença desses metabólitos.

4.2.1.10 Pesquisa de Saponosídeos

O teste consistiu no aquecimento, em placas de Petri, de 12 mL do EBS em metanol, para a eliminação do solvente. O produto resultante foi diluído em água destilada e colocado em tubo de ensaio, com posterior agitação manual (30 s) e repouso por aproximadamente duas horas (COSTA, 2001). A observação da consistência e persistência da espuma resultante por mais de 2h foi utilizada como critério para avaliar a presença de saponosídeos.

TABELA 01: Fases móveis e reagentes diversos consoantes ao grupo de metabólitos secundários a ser investigado.

Metabólito Secundário	Fase Móvel	Revelador	Referência
Flavonóides	AcOEt-AF-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26)	NEU	NEU, 1956; WAGNER & BLADT, 1996
Derivados Cinâmicos	AcOEt-AF-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26)	NEU	NEU, 1956; WAGNER & BLADT, 1996
Fenilpropanoglicosídeos	AcOEt-AF-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26)	NEU	NEU, 1956; WAGNER & BLADT, 1996
Proantocianidinas Condensadas e Leucoantocianidinas	AcOEt-AF-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26)	Vanilina clorídrica	ROBERTSON, CARTURIGHT & WOOD, 1956
Monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpeterpenóides	Tolueno-AcOEt (97:3)	Vanilina Sulfúrica + estufa 100°C / 5 min.	WAGNER & BLADT, 1996
Triterpenos e Esteróides	Tolueno-AcOEt (90:10)	Liebermann-Burchard + estufa 100°C / 5 min	HARBONE, 1998; SHARMA, 1991
Glicosídeos Cardíacos	AcOEt-MeOH-H ₂ O (81:11:8)	Keed	WAGNER & BLADT, 1996
Alcalóides	AcOEt-AF-AcOH-H ₂ O (100:11:11:26)	Dragendorff	WAGNER & BLADT, 1996
Açúcares redutores	<i>n</i> -BuOH-Me ₂ CO-TPPO ₄ (4:5:1)	TTZ + estufa 100°C / 5 min.	RUSSEL, 1982

Legenda: AcOEt-AF-AcOH-H₂O = Acetato de etila/Ácido fórmico/ Ácido acético/Água; Tolueno-AcOEt = Tolueno/ Acetato de etila; AcOEt-MeOH-H₂O = Acetato de etila/Metanol/Água ; *n*-BuOH-Me₂CO-TPPO₄ = *n*-Butanol/Acetona/Tampão fosfato, pH 5,0; NEU = solução de 1% difenilboriloxietilamina; TTZ = cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio

4.2.2 Resultados e discussão

Flavonóides, derivados cinâmicos (Figura 02), fenilpropanoglicosídeos, monoterpénóides, sesquiterpenóides e diterpenóides (Figura 03), triterpenóides, esteróides, saponinas (Figura 04) e açúcares redutores (Figura 05) foram observados no extrato metanólico da casca da raiz de *Guettarda platypoda*. Os demais metabólitos, como proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas (Figura 06), glicosídeos cardíacos e alcalóides (Figura 07) não foram detectados nos ensaios realizados.

Provavelmente, há a presença no extrato metanólico das cascas da raiz de *Guettarda platypoda* do composto orientina, um flavonóide c-glicosilado, derivado da luteonina, uma flavona. Porém, nossos estudos mostram-se ser inéditos na identificação desta classe de metabólitos secundários para as raízes desta espécie, pois os mesmos não foram identificados na prospecção fitoquímica realizada por Almeida (1982) na avaliação do extrato etanólico das raízes de *G. platypoda*. Corrêa (2007), no entanto, constatou a presença de flavonóides no extrato das folhas de *G. platypoda*, porém notando a ausência de quecertina, kempferol e rutina.

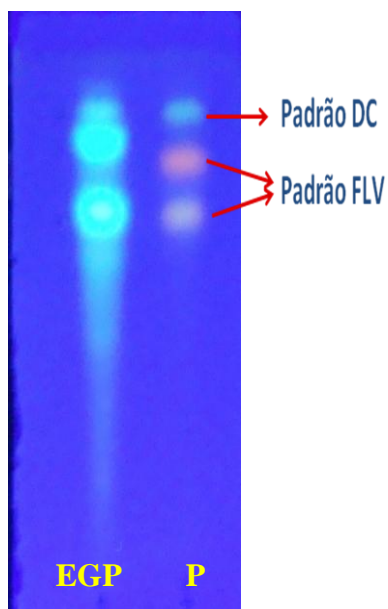


FIGURA 02: Cromatograma para a identificação de flavonóides e derivados cinâmicos. **EGP:** Extrato metanólico das cascas da raiz de *G.platypoda*; **P:** Padrão; **DC:** Derivado cinâmico; **FLV:** Flavonóides.



FIGURA 03: Cromatograma para a identificação de monoterpénóides, sesquiterpenóides e diterpenóides. **EGP:** Extrato metanólico das cascas da raiz de *G. platypoda*; **P:** Padrão



FIGURA 04: Identificação da presença de saponinas pela presença de espuma abundante e persistente no extrato de *G. platypoda*.

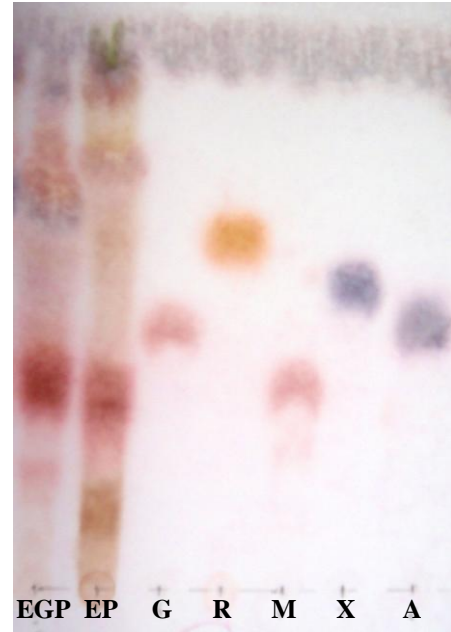


FIGURA 05: Cromatograma para a identificação de açúcares redutores. **EGP:** Extrato metanólico das cascas da raiz de *G. platypoda*; **EP:** Extrato padrão **X:** xilose; **A:** arabinose; **M:** maltose; **G:** glicose; **R:** rhamnose



FIGURA 06: Cromatograma para a identificação de proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas. **EGP:** Extrato metanólico das cascas da raiz de *G. platypoda*; **PL:** Padrão leucoantocianidinas; **PPC:** Padrão proantocianidinas condensadas

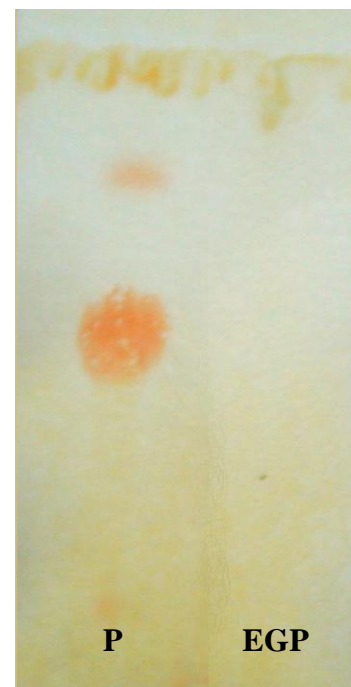


FIGURA 07: Cromatograma para a identificação de alcalóides. **EGP:** Extrato metanólico das cascas da raiz de *G. platypoda*; **P:** Padrão

Na cromatografia para identificação de triterpenóides/esteróides foi observada uma coloração violácea forte, o que pode indicar provavelmente a presença de ácidos triterpênicos (ácido oleanólico ou ácido ursólico). Estudos fitoquímicos anteriores das cascas da raiz de *G. platypoda* corroboram com os nossos resultados na identificação da presença desses metabólitos secundários, pois se tem a presença de dois triterpenos (ácido quinóvico e ácido rotúndico) no extrato etanólico da casca da raiz da *G. platypoda* (Almeida, 1982; Bhattacharyya; Almeida, 1985), bem como o ácido quinóvico no extrato metanólico deste material vegetal por Ferrari *et al.* (1986). Num estudo desenvolvido por Soares *et al.* (1998) são isolados dois novos triterpenos pentacíclicos: um derivado do ácido tormêntico (ácido 3 β ,19 α ,23-tri-hidroxi-urs-12-en-28-óico) e a 7-oxofriedelina. O esteróide beta-sitosterol foi verificado no extrato por nós avaliado, o qual também já havia sido descrito anteriormente (Almeida, 1982; Bhattacharyya; Almeida, 1985).

Foi constatada, no teste de afrogenicidade, a presença muito abundante de espuma (Figura 04), que perdurou por mais de 24h. Vários autores relatam a presença de diversas saponinas triterpênicas derivados do ácido quinóvico (Aquino *et al.*, 1988a, 1989a; Almeida, 1982; Bhattacharyya; Almeida, 1985; Ferrari *et al.*, 1986; Melo *et al.*, 2008). Triterpenos, esteróides e saponosídeos também são presentes nas folhas segundo a prospecção realizada por Corrêa (2007).

Em adição, foi por nós detectada a presença do açúcar redutor maltose, apresentando ausência dos demais açúcares testados.

Taninos foram identificados no extrato etanólico das raízes (Almeida, 1982) e metanólico das folhas (Corrêa, 2007), porém não foram por nós encontrados, como observado na Figura 06. Também não notamos a presença de alcalóides (Figura 07), mas Ferrari *et al.* (1986) localizou no extrato metanólico a presença do alcalóide 5 α -carboxistrictosidina (precursor dos alcalóides indólicos monoterpênóides), sendo também relatado por Melo *et al.* (2008). Na prospecção do extrato etanólico realizada por Almeida (1982) foi encontrado pouco conteúdo de alcalóide. Este também não foi observado no extrato metanólico das folhas (Corrêa, 2007).

Ainda é visto na literatura que Ferrari *et al.* (1986) identifica a presença do iridóide morronisídeo e do secoiridóide swerosídeo no extrato metanólico das raízes de *G. platypoda*. Aquino *et al.* (1988b) também observa nesse extrato a presença desses dois metabólitos secundário, além de mais dois iridóides (ácido logânico e loganina) e um secoiridóides (secoxiloganina).

4.3 ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Na tentativa de isolar os compostos presentes no extrato metanólico de *G. platypoda*, e buscando realizar uma prévia eliminação de pigmentos e moléculas de pouca polaridade contidas no Extrato Bruto Seco (EBS), 5g deste extrato foram solubilizados em água, com posterior filtração para reter aquelas moléculas. Desta forma, obteve-se o extrato constituído por compostos polares (EBSP), cromatografando-se esta solução aquosa em coluna cromatográfica de fase reversa, utilizando-se Duolite S861 como fase estacionária e um sistema gradiente água → acetona 5% como fase móvel. Desta forma, obtive-se 05 frações: EBSPH, tendo como fase móvel apenas água; EBSPA1, a fase móvel foi uma mistura água/acetona (99:1); EBSPA2, utilizando-se água e acetona (98:2), EBSPA3, sendo a fase o sistema água/acetona (97:3) e, finalmente, a EBSPA5, utilizando-se água e acetona (95:5), como fase móvel.

A fração EBSPH teve o solvente evaporado e ao resíduo adicionado metanol. À parte solúvel (EBSPHS) empreendemos o fracionamento por meio de coluna cromatográfica de permeação em gel utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária, e como fase móvel, uma mistura constituída de Metanol-Acetona-Diclorometano (3:2:1), obtendo-se duas frações (EBSPHS1) e (EBSPHS2). O procedimento que acabamos de descrever, apesar de conduzir a um bom estágio de isolamento das principais moléculas, não permitia a obtenção de material puro, razão pela qual recromatografamos cada fração. Para a primeira fração (EBSPHS1) utilizamos as mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente e, para a outra (EBSPHS2), a fase móvel foi alterada para Acetona-Metanol-Diclorometano (3:2:1). Desta forma, da fração (EBSPHS1), obteve-se uma substância (S1), ainda não rigorosamente pura, e em quantidade insuficiente para a realização dos espectros de RMN de ^{13}C e os bidimensionais, e assim, não sendo possível a elucidação da estrutura química de S1 (Figura 08). Relativo à fração (EBSPHS2), após recromatografarmos a mesma mais duas vezes, utilizando as mesmas condições cromatográficas, obtivemos a substância S2 (Figura 08), também não rigorosamente pura e igualmente à S1, em quantidade insuficiente para a realização dos espectros de RMN ^{13}C e as técnicas bidimensionais. Esta metodologia é também descrita no diagrama apresentado na Figura 09.

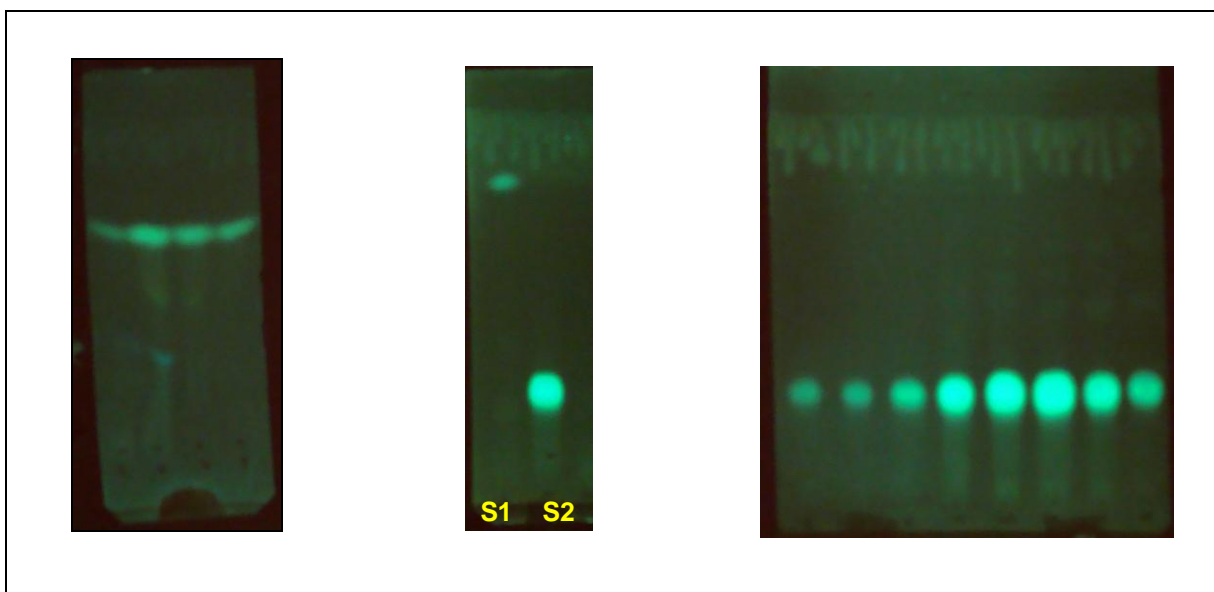


FIGURA 08: Frações obtidas da cromatografia em coluna de EBSPHS. À esquerda, frações que originaram EBSPHS1; no centro S1 e S2; à direita, frações que originaram EBSPHS2.

Para conseguirmos um extrato enriquecido em moléculas S1 e S2, 10 g do EBS foi solubilizado com água, obtendo-se assim, o extrato constituído por compostos polares (EBSP), cromatografando-se o mesmo em coluna cromatográfica, utilizando-se Duolite S861 como fase estacionária e água como fase móvel. A fração obtida (EBSPH), após liofilizada, foi tratada com metanol, filtrada (EBSPHM) e rotoevaporada. Ao resíduo, foi adicionado o sistema de solventes Metanol-Acetona-Diclorometano (3:2:1) e adicionados à parte solúvel (EBSPHMS), 10 mL de Metanol a quente, e filtrado. Em seguida, empreendemos o fracionamento do filtrado por meio de coluna cromatográfica de permeação em gel utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionária, e Metanol-Acetona-Diclorometano (3:2:1) como fase móvel, obtendo-se uma mistura de substâncias (S3) e que apesar de termos realizado mais 03 sucessivas cromatografias nas mesmas condições, não obtive-se êxito no isolamento da substância pura. Esta metodologia pode ser observada na Figura 10.

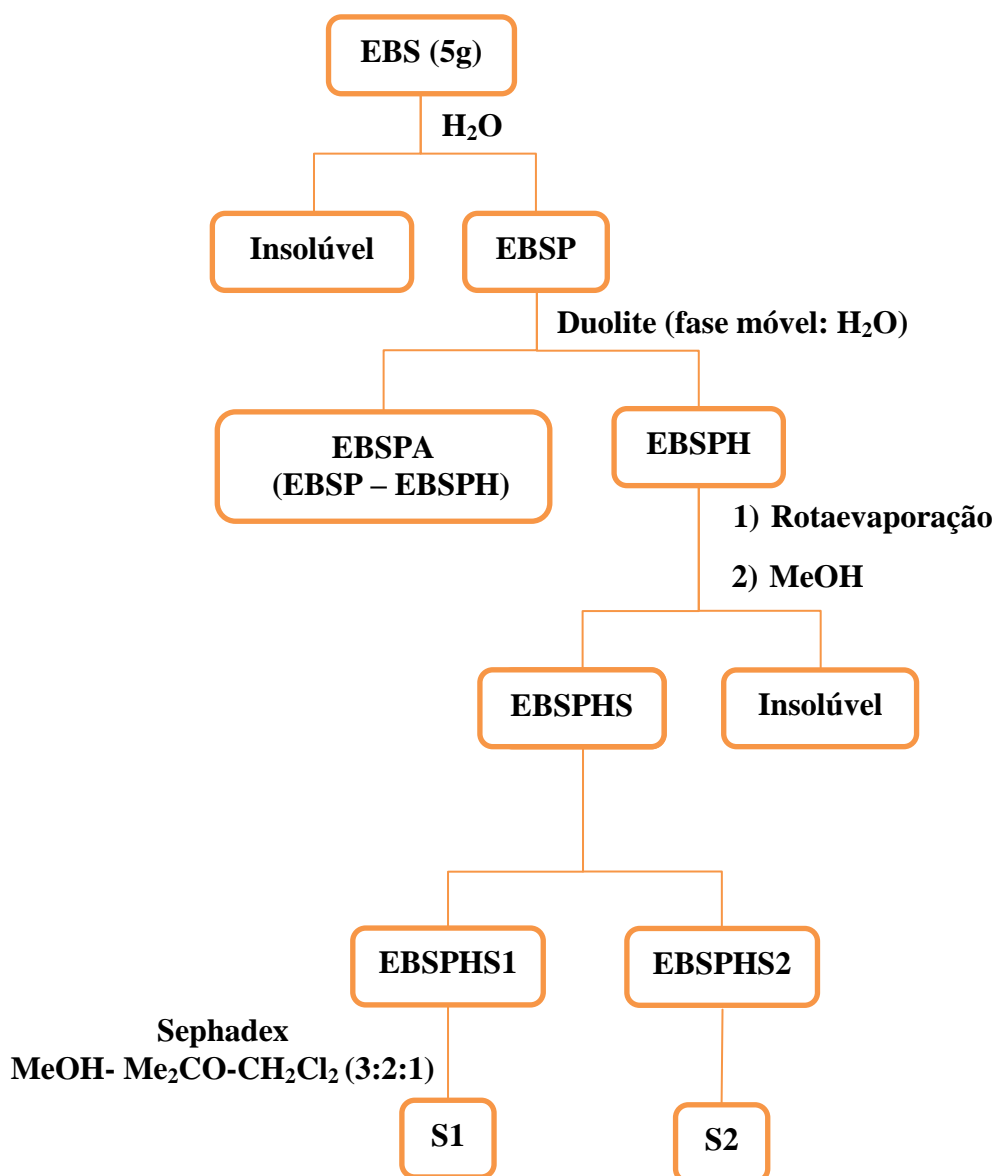


FIGURA 09: Procedimento para purificação das frações S1 e S2. **EBS:** Extrato Bruto Seco; **EBSP:** extrato constituído por compostos polares; **EBSPH:** EBSP eluído em coluna cromatográfica com resina Duolite e fase móvel 100% H₂O; **EBSPA:** EBSP eluído em resina Duolite com fase móvel contendo H₂O - Me₂CO ; **EBSPHS:** parte solúvel em MeOH da fração EBSPH após rotaevaporada; **EBSPHS1** e **EBSPHS2:** frações originadas do fracionamento em coluna cromatográfica com Sephadex LH-20 e fase móvel MeOH- Me₂CO-CH₂Cl₂ (3:2:1).

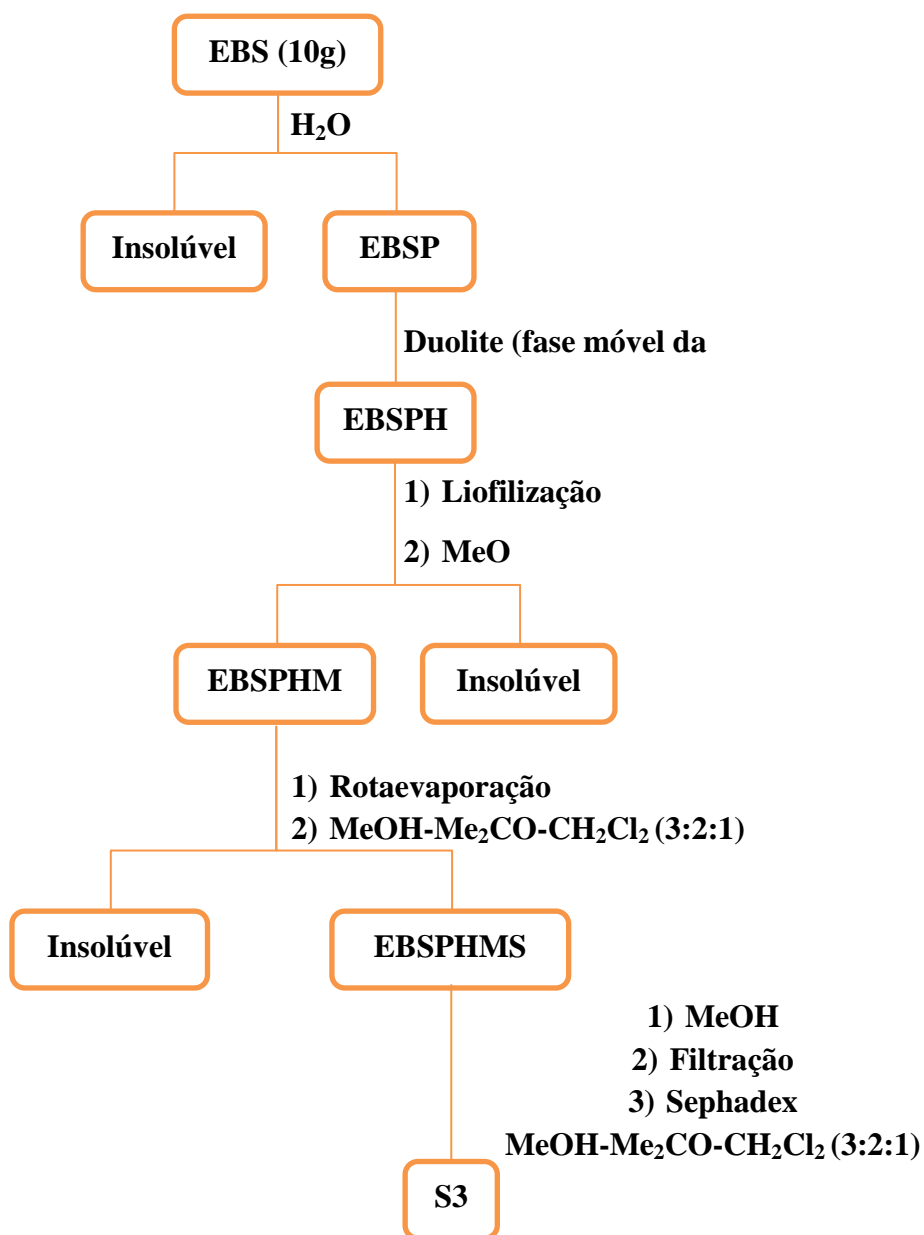
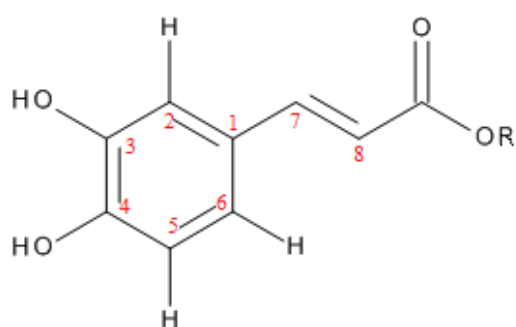


FIGURA 10: Procedimento para a obtenção de S3. **EBS:** Extrato Bruto Seco; **EBSP:** extrato constituído por compostos polares; **EBSPH:** EBSP eluído em coluna cromatográfica com resina Duolite e fase móvel 100% H₂O; **EBSPHM:** fração solúvel em MeOH de EBSPH após liofilizada; **EBSPHMS:** fração de EBSPHM solúvel na mistura MeOH- Me₂CO-CH₂Cl₂ (3:2:1).

Na tentativa de obtermos mais informações sobre as características químicas de S3, realizamos além de espectros unidimensionais de RMN de ^1H e de ^{13}C , o de correlação da COSY (2-D), que se trata de procedimento básico da espectroscopia de correlação que fornece um espectro em duas dimensões a partir do qual quase todas as correlações $^1\text{H} - ^1\text{H}$ podem ser determinadas.

Analisando os referidos espectros de RMN ^1H e de COSY de S3 (Anexos A e B), além de sinais de estruturas químicas não elucidadas, pode-se identificar sinais compatíveis com a presença de unidades 3,4 - dihidroxicinâmicas (Figura 11). Esses sinais são δ (ppm): 6,28 (d, $J = 16,0$ Hz); 6,78 (d, $J=7,5$ Hz); 6,93 (d, $J=7,5$ Hz); 7,05 (s) e 7,56 (d, $J = 16,0$ Hz).



Posição	δ (ppm)	J (Hz)
2	7,05	–
5	6,78	7,5
6	6,93	7,5
7	7,56	16,0
8	6,28	16,0

FIGURA 11: Estrutura da unidade 3,4 - dihidroxicinâmica

Capítulo 2

5 AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTITUMORAL E CITOTÓXICA DE *Guettarda platypoda*

5.1 Artigo submetido a *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*

Pharmacological screening and acute toxicity of bark root of *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae)

Evelyn Mirella Lopes Pina^{1,2}, Fernando Wesley Cavalcanti de Araújo¹, Ivone Antônia de Souza³, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos³, Teresinha Gonçalves da Silva⁴, Larissa Cardoso Corrêa de Araújo⁴, Silene Carneiro do Nascimento⁴, Gardenia Carmen Gadelha Militão⁴, Haroudo Sátiro Xavier², Sebastião José de Melo^{1*}.

¹ Laboratório de Química e Síntese de Produtos Naturais – Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco; ² Laboratório de Farmacognosia – Departamento de Farmácia – Universidade Federal de Pernambuco; ³ Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental – Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco; ⁴ Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos e Laboratório de Cultura de Células – Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco; ⁵ Departamento de Fisiologia e Farmacologia – Universidade Federal de Pernambuco

* *Laboratório de Química e Síntese de Produtos Naturais – Departamento de Antibióticos – Universidade Federal de Pernambuco. Av. Professor Moraes Rego S/N, 50670-901, Cidade Universitária, Recife – PE, Brasil. Fone/Fax: +55 81 21268347. melosebastiao@yahoo.com.br*

ABSTRACT

The species *Guettarda platypoda* pertences to Rubiaceae family and is known as *Angelica*, *Angelica-do-mato*. It is used in folk medicine as febrifuge, during the puerperal period and to corrent menstrual irregularities. The purpose of this work was to investigate the anti-inflammatory, antitumor and cytotoxic potential as well as to evaluate the acute toxicity of the methanolic extract of *G. platypoda* in female mice. After applying the methodologies to measure each activity, it was verified the absence or low toxicity in doses of 2000 mg/kg; promising anti- inflammatory in a dose of 100 mg/kg and absence of antitumor activity on Ehrlich carcinoma and on cytotoxic activity against the chosen live cell cancer.

Key-words: antitumor activity, anti-inflammatory activity, cytotoxicity, acute toxicity, *Guettarda platypoda*.

1 INTRODUCTION

The genus *Guettarda* belongs to Rubiaceae family. This family occupies the fourth place in diversity in the whole planet. Besides, they are distributed all over the world, occurring both in chilly temperatures and tropical and subtropical environments [1, 2]. Also, this family has medicinal, ornamental and agricultural importance [2]. The genus *Guettarda* is composed by 180 species widely distributed in tropical and neotropical regions [3].

G. platypoda is found in coastal plain of northeast Brazil and is known for several names as *Angelica* or *Angelica-do-mato* [4, 5]. *G. platypoda* is a shrub and its root is used in folk medicine as febrifuge [6], as well as during the puerperal period [7] and to correct menstrual irregularities [8].

Our objective in this work is to evaluate the anti-inflammatory activity and evaluate the acute toxicity. Due to the absence of works about antitumor and cytotoxic activity of *G.platypoda*, these activities were also investigated in research.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Botanic material and methanolic extract

Bark of *G. platypoda* were collected in August/2009 in the town of Itamaracá (Pernambuco/Brazil) which is 50 km far from Recife, bordered North by Goiana, South by Igarassu, east by the Atlantic Ocean and west by Itapissuma [9]. The plant was identified by Alda Chiappeta and filed under the number 5341. After it was collected, the bark was retired as soon as possible and left to dry in room temperature (25 ± 2 °C) for a entire week, for elimination of humidity and to stabilize enzymatic content. The material was triturated and the extraction of the fixes components were obtained by infusion, followed by 72 hours maceration with sporadic agitations, using methanol. The extracts were filtered and the residues extracted. In the end, the combined filtrates were distilled in low pressure in rotative evaporation in 50 °C, to obtain the Crude Dry Extract (CDE).

2.2 Animals

Adult female mice (*Mus musculus*) were used, weighing 25 - 35 g provided in Antibiotics Department vivarium located at Federal University of Pernambuco. The animals were kept in polypropilene cages with water and ration (LABINA Purina Brazil) *ad libitum*, under controlled lightness, light and dark cycles of 12 hours and temperature (23 ± 2 °C). The experimental procedure was performed according to the ethical principles of CEEA (Ethics Committee of Animal Experiments) of Federal University of Pernambuco under the number 23076.013788/ 2009-82.

2.3 Acute Toxicity Evaluation

Animals were submitted to acute toxicity essay (ow) according the OECD 423 protocol [10]. The CDE from *G. platypoda*, was given per oral way. After 8 hours of fasting, the animals received a 2000 mg/kg dose. The animals were observed during the first 24 hours and periodically in a 14 days period. In the end of the 14 days, the animals were sacrificed in CO₂ chambers and taken to autopsy to macroscopic observation of organs (liver, kidney and spleen).

2.4 Anti-inflammatory activity evaluation

The animals (n = 06 per group) were submitted to carrageenan-induced edema test. One hour before the experiment, the animals received the *G. platypoda* CDE orally in doses of 100 mg/kg. The standard group received the vehicle (10% propylene glycol in saline, orally. For inducing peritonitis in animals, a carrageenan solution (1%) was applied in peritoneal cavity (10mL/kg weight). After 4 hours, the animals were sacrificed in CO₂ chambers and immediately submitted to surgery to have their peritoneal cavity opened, which was cleaned with 3% solution of EDTA. The collected exudates were centrifuged and re-suspended in saline and the count of polymorph nuclear leucocytes (PMNL) was performed in cell automatic counter (Micros 60) [11]. The inflammation inhibition is calculated by using the formulation:

$$II (\%) = [(C-T) / C] \times 100$$

Where:

II = Percentage of inflammation inhibition

C = Average PMNL in control group

T = Average PMNL in the experimental treated group

2.5 Antitumor evaluation (Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma)

The antitumor experiment was performed according to Sugiura, Stock & Sugiura method [12]. After removing tumor mass from donor animal, it was placed in physiologic solution associate with an antibiotic, separating necroses from the other parts. After this, the fragments (about 3 mm) were introduced by subcutaneous way in the receptors animals.

The animals were divided in three groups (n = 05 animals per group). During the experiment (7 days), the animals were weighed and the control group received 0.5 mL of physiological solution orally, the positive group was treated with metotrexato (2.5 mg/kg oral way) and the test group was administered the *Guettarda platypoda* CDE in doses of 100 mg/kg and 200 mg/kg. The experimental chemotherapy was started 48 hours after the transplant. In the end of the treatment

(8th day) all the animals were weighed and sacrificed, and the organs (liver, kidneys, heart, lung and spleen) were removed and weighed, as well as the tumors were excised, dissected and weighed. The tumor inhibition is calculated using the formula:

$$\text{TWI (\%)} = [(C-T) / C] \times 100$$

Where:

TWI = Percentage of tumor inhibition

C = Average of tumor weight in control group

T = Average of tumor weight in treated group

2.6 Cytotoxicity evaluation

The cytotoxic potential of Crude Dry Extract was evaluated by the MTT assay [13], against three human tumor cell lines: HT29 (human colon carcinoma), MCF-7 (breast human carcinoma) and NCI H-292 (lung human cancer) were obtained from Rio de Janeiro's Cell Bank (Brazil). All cell lines were maintained in DMEN medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin, at 37° C with 5% CO₂. The cells were plated in 96- well plates at 1 x 10⁵ cells/mL. The *Guettarda platypoda* Crude Dry Extract was diluted in DMSO 0.5% and tested in duplicate in 50 µg/mL concentration. After 72 hours of incubation 25 µL of MTT (5mg/mL) was added. Three hours later the MTT formazan product was dissolved in 100 mL DMSO and absorbance was measured at 595 nm. The experiments were analyzed according its averages and standards deviations using *Graph Pad Prism* program

2.7 Statistical analyze

The values were expressed in mean ± standard deviation and tested with ANOVA and Student's t-test. The significance level was p < 0.05.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Acute toxicity evaluation

Some signs and unusual symptoms during the first 60 minutes of acute toxicity protocol were observed. Some weak responses were observed and exciting behavioral characteristics (agitation, touch response, tachycardia and tremor), inhibitory (sleepiness) and others (piloerection and tail quivering). However, none animal died during the experiment. The viscera taken presented a yellowish aspect, but with other normal macroscopic aspects preserved.

Regarding the sex of animals used, females were chosen because according to Lipnicki [14] conventional LD₅₀ tests shows that, although there is little difference in sensitivity between sexes, where differences are observed, the females are generally lightly more sensitive.

According to the criteria for acute toxicity by the GHS (Globally Harmonized Classification System) the fact that no serious injury or death occurred in any animal tested at the highest recommended dose (2000 mg/kg), indicate that the compounds are fit in class 5 (very low or no toxicity) [15]. According to Vital [11] the absence of atypical behavior is also another indication of lack of toxicity of the compounds.

3.2 Anti-inflammatory activity evaluation

The CDE of *Guettarda platypoda* in dose of 100 mg/kg inhibited in 55.2% the migration of PMNL ($4.72 \pm 1.3 \times 10^6$ /cavity) comparing with the control group ($10.5 \pm 2.6 \times 10^6$ /cavity). The indometacin, utilized as pattern, inhibited the cellular migration in 53.3% ($4.9 \pm 0.5 \times 10^6$ /cavity).

This activity may be due to the presence of quinovic acid glycosides [16] and beta-sitosterol [17] that are described as present in the roots of *G. platypoda* [6, 18, 19, 20].

The β -sitosterol is described by possessing potent anti-inflammatory activity, similar to hydrocortisone [17]. It was tested the dose of 300 mg/kg (data not shown) but we did not obtain satisfactory results due to the presence of intense hemolysis.

This probably occurred due to the percentage of saponin present in the roots of this *G.platypoda* described by various authors [6, 18].

3.3 Antitumor activity evaluation

The extract reduced the mean weight of Sarcoma 180 tumors in the groups treated at doses of 100 mg/kg (74.26%) and 200 mg/kg (84.77%) in relation to mean tumor weight of control group treated with saline. The positive control group, metotrexato (2.5 mg/kg oral way) had 89% tumor inhibition. In the evaluation of Ehrlich carcinoma, treated groups showed a slight increase in the average weight of tumors compared to the control group. The positive control group had 92% tumor inhibition. The effects of CDE of *G. platypoda* in the average weight (in grams) of tumors of Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma are found in Figures 01 and 02.

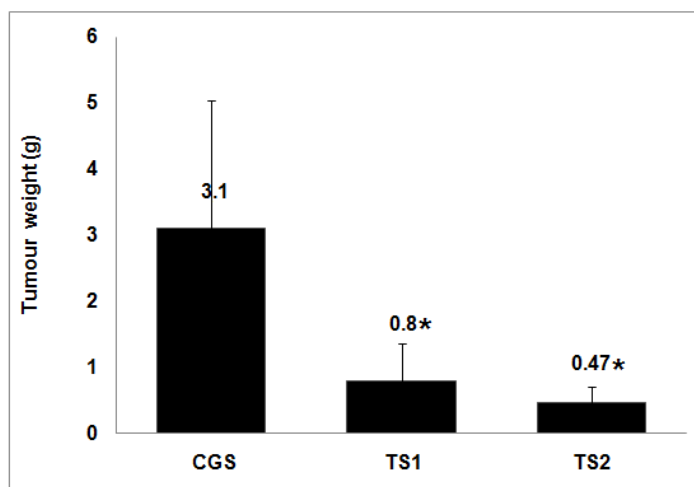


FIGURE 01: Antitumor activity of methanolic extract of root bark of *G. platypoda* in *Mus musculus* female mice after implantation of Sarcoma 180. It was administered 0.5 mL of saline orally in the Control Group (CGS) and experimental treated groups (TS1 = 100 mg/kg; TS2 = 200 mg/kg) for 7 days. * $p < 0.05$.

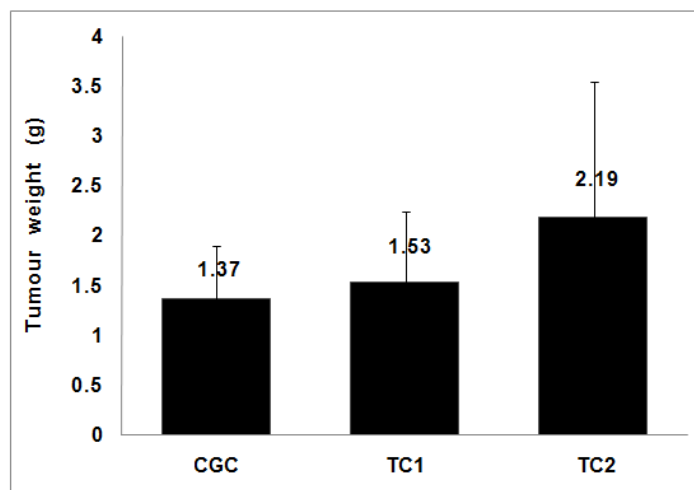


FIGURE 02: Antitumor activity of methanolic extract of root bark of *G. platypoda* in *Mus musculus* mice after implantation of Ehrlich carcinoma. It was administered orally in the Control Group (CGC) 0.5 mL of saline and experimental treated groups (TC1 = 100 mg/kg; TC2 = 200 mg/kg) for 7 days.
* $p < 0.05$.

We found that during the experiment, the animals showed no significant changes in weight. The animals with Sarcoma 180, 90% of animals of the experimental treated groups (both dosages) had lung hyperemic, friable, fibrous-looking; an animal in the group treated with dose of 100 mg/kg (TS1) showed cystic appearance in the kidneys. In respect of animals with Ehrlich carcinoma, it was macroscopically verified that two animals in group TC1 had lung hemorrhage. With these exceptions, the animals of both strains, and independent of the presence or absence of treatment, showed no macroscopic changes in organs, with no consistency fibrous, thrombus, lesions and atrophy on the edge of the organs, preserving aspects in relation to structure, texture and shape. The tumors were well-defined and had a solid consistency.

The CDE of *G. platypoda* is quite promising for the treatment of Sarcoma 180, but did not provide satisfactory results against the Ehrlich carcinoma. Therefore, it is important emphasize the positive results of this study which may improve our understanding in the use of this plant as an alternative anti-cancer therapy for Sarcoma 180 because this strain is the most difficult to treat, according to Almeida [21], who emphasizes that tumors sarcomatose are more difficult to treat because they affect regions of bone and muscle. The identification of active principles and their mechanisms of action still need to be studied in order to enhance the promising

effects in treatment of this strain. In addition, no growth carcinoma tumor statistically significant.

3.4 Cytotoxicity evaluation

Analysis of cytotoxicity by MTT method has been used in the screening program of the National Cancer Institute of the USA (NCI), which tests more than 10,000 samples each year [22]. It is a rapid, sensitive and inexpensive test. It was first described by Mosman [13] as having the potential to analyze the viability and metabolic state of the cell.

This is a colorimetric analysis based on conversion of the salt 3 - (4,5-dimethyl-2-thiazole) -2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) into blue formazan from mitochondrial enzymes present only in metabolically active cells. The study carried out using cytotoxic MTT method allows to easily define the cytotoxicity, but not the mechanism of action [23]. The average of cell growth inhibition (IC%) of cell treated with 50 µg/mL of CDE was 15.2 % ± 0.6 for HT29, 1.7 % ± 0.5 for NCI-H-292. No inhibition was observed in MCF-7 cells treated with CDE.

An intensity scale was used to evaluate the cytotoxic potential of the samples tested: samples with no activity (10-20% inhibition), with few activity (cell growth inhibition ranging from 20 to 50%) with moderate activity (cell growth inhibition ranging from 50 to 70%) and with large activity (cell growth inhibition ranging from 70 to 100%), thus none of the strains tested with CDE of *G. platypoda* presented activity.

4 CONCLUSIONS

The methanolic extract of *G. platypoda* has low toxicity and promising anti-inflammatory activity at doses of 100 mg/kg and antitumor activity to Sarcoma 180 at doses of 100 mg/kg and 200 mg/kg. It's necessary to continue the studies with fractions to determine which fraction may contain the active ingredient. The cytotoxic activity did not indicate satisfactory results for the strains tested. These tests don't

necessarily discard the potential of CDE against this activity and it is necessary additional tests using other cell strains and experimental models.

ACKNOWLEDGMENT

We wish to express our appreciation to CNPq (National Council for Scientific and Technological Development of the Brazilian government) for its financial support.

REFERENCES

- [1] GAZDA, V. E. **Abordagem Química e Estudo da Atividade biológica das Raízes de *Chiococca Alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- [2] JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002, p. 570-571.
- [3] MÓL, D.F. de F. **Rubiaceae em um remanescente de floresta atlântica no Rio Grande do Norte, Brasil**. 2010. 69 p. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, NATAL.
- [4] ANDERSSON, L. A provisional checklist of neotropical Rubiaceae, **Scripta Bot. Belg.**, v.1, p.1-199, 1992.
- [5] PEREIRA, M.S.; BARBOSA, M.R.V. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. **Acta BotBras**, v.18, p.305-318, 2004.
- [6] BHATTACHARYYA, J.; ALMEIDA, M.Z. Isolation of the constituents of the root-bark of *Guettarda platypoda*. **J Nat Prod**, v.48, p.148-149, 1985.
- [7] MATOS, F. J. de A. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha**. Fortaleza: UFC, 1997. 258 p.
- [8] BAHIA. Governo do Estado. Seplantec. Subsecretaria de Ciência e Tecnologia. **Inventário de plantas medicinais do Estado da Bahia**. Salvador, 1979.
- [9] ALMEIDA JR, E.B. de; PIMENTEL, R.M. de M.; ZICKEL, C.S. Flora e formas de vida em uma área de restinga no litoral norte de Pernambuco, **Brasil. Revista de Geografia**, v. 24, n.1, p.19-34, 2007.
- [10] **OECD 423**. Guideline for testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 14 p. 2001.

- [11] VITAL, F. A. C.; MELO, S. J.; SILVA, T. G.; *et al.* Avaliação da Toxicidade aguda e das Atividades Citotóxica, Antimicrobiana e Antiinflamatória de 7-aryl-2,3-diidrotiazolo[3,2-a]pirimidin-5-ona-6-carbonitrila. **Lat. Am. J. Pharm.** v. 28, n. 4, p. 507-512, 2009.
- [12] SUGIURA, K.; STOCK, C.C.; SUGIURA, M.M. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rats tumors, **Cancer Research** 2: 38–50. 1955
- [13] MOSSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.
- [14] LIPNICK R. L.; COTRUVO, J. A.; HILL, R. N.; BRUCE, R. D.; *et al.* Comparison of the Up-and Down, Conventional LD50, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. **Fd. Chem. Toxicol.**, v. 33, p. 223-231, 1995.
- [15] **OECD 436.** Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11. Available:
<<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24no-0,FF.html>>.
- [16] AQUINO, R.; VINCENZO, F.; FRANCESCO, S.; *et al.* Plant Metabolites. New Compounds and Anti-Inflammatory Activity of *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, vol. 54, n., p. 453-459, 1991.
- [17] GUPTA, M.B.; NATH, R.; SRIVASTAVA, N.; *et al.* Anti-Inflammatory and Antipyretic Activities of β -Sitosterol. **Planta Med**, v. 39, n.6, p.157-163, 1980.
- [18] FERRARI, F.; MESANA, I.; BOTTA, B.; DE MELLO, J.F. Constituents of *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v.49, p.1150-1151, 1986.
- [19] AQUINO, R.; SIMONE, F.de; PIZZA, C.; CERRI, R.; MELLO, J.F de. Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. **Phytochemistry**, v.27, p.2927-2930, 1988.
- [20] AQUINO, R.; SIMONE, F. de; PIZZA, C.; MELLO, J.F. de. Further quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. **Phytochemistry**, v.28, p.199-201, 1989.
- [21] ALMEIDA, V.L. de; LEITÃO, A. ; REINA, L. del C. B.; *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- [22] SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 82, n.13, p.1107-1112, 1990.

[23] BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S; McCOY, K. D.; WANG, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. **Biochemica**, v.4, p.14-19, 1996.

6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE *Guettarda platypoda*

6.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO

As cascas da raiz foram secas a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante uma semana, sendo posteriormente reduzidas a pó em moinho elétrico e pesadas (736,8 g). Para a obtenção do extrato foi realizada uma infusão metanólica a 10% (p/v), com posterior maceração de 72h e agitação esporádica. Os extratos foram filtrados e os resíduos re-extraídos. As soluções obtidas neste processo foram destiladas à pressão reduzida em evaporador rotativo a 50 ± 5 °C, obtendo-se assim 173,3 g do extrato bruto seco (EBS).

6.2 TÉCNICA DE POÇOS

No estudo da atividade antibacteriana foi utilizada a técnica de poços/difusão em ágar Muller-Hinton. As culturas bacterianas inoculadas neste meio e após 24 horas de incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ foram suspendidas em 5 mL de solução fisiológica estéril e comparadas as turvações do tubo 0,5 da escala McFarland (10^8 UFC/ mL) (NCCLS, 2003).

6.3 PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS

O semeio dos inóculos foi realizado com swab de algodão estéril na superfície de placas de Petri contendo 20 mL de ágar Muller-Hinton, procedendo subsequentemente à perfuração asséptica dos poços (perfurador de 6 mm de diâmetro) e aplicando DMSO à 50% (controle negativo) com pipeta automática na razão de 100 µl por poço. De outra parte, realizados screening de atividade antimicrobiana do extrato metanólico das raízes da *Guettarda platypoda*, utilizando as concentrações de 12,5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL. No ensaio, o antibiótico controle foi Gentamicina (100 µg/mL), como demonstrado na Figura 01.

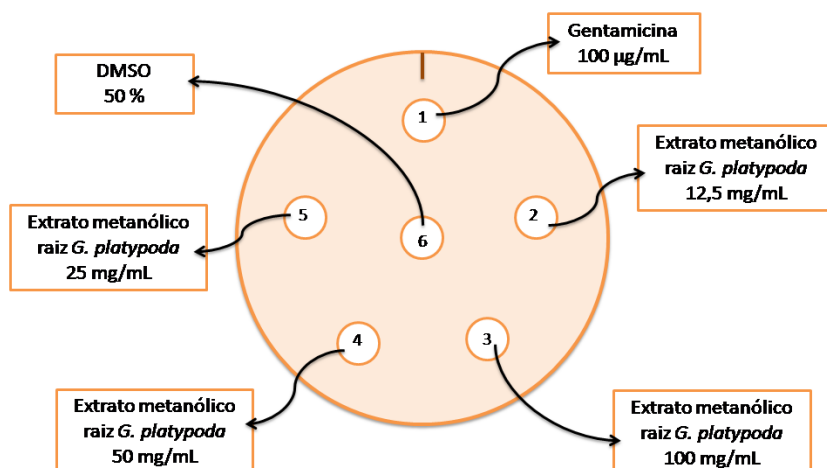


FIGURA 01. Disposição dos compostos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana.

Os micro-organismos utilizados neste ensaio encontram-se descritos na tabela abaixo (Tabela 01), indicado o código da coleção utilizada e sua respectiva origem.

TABELA 01: Micro-organismos utilizados no teste de atividade antibacteriana.

CÓDIGO	CEPA	ORIGEM
AM 103	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
AM 642	<i>Staphylococcus aureus</i>	Secreção
AM 428	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sangue
AM 206	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 14502
AM 379	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreção de ferida cirúrgica
AM 343	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreção catéter
AM 245	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	LACEN
AM 789	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	Secreção catéter
AM 1050	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
AM 247	<i>Escherichia coli</i>	–
AM 1056	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299
AM 997	<i>Enterococcus faecalis</i>	Urina

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade antimicrobiana de um extrato é determinada pela medida do halo de inibição deste frente às bactérias testadas (LENETTE, 1987). Após incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24 horas foram realizadas as medidas dos halos de inibição e seus resultados avaliados foram conforme os seguintes parâmetros: halos $< 9\text{ mm}$, inativo; $9\text{-}12\text{ mm}$, pouco ativo; $13\text{-}18\text{ mm}$, ativo; $> 18\text{ mm}$, muito ativo (ALVES, 2000).

Para a avaliação do extrato das cascas de raiz de *Guettarda platypoda* frente às cepas Gram positivas (*S.aureus*, *S.saprophyticus*, *S. coagulase negativo* e *E. faecalis*) obteve-se halos de inibição apenas na cepa AM 103 (*S. aureus*) de ordem 12 mm para concentração de $10.000\text{ }\mu\text{g/poço}$ e de 11 mm para concentração de $5.000\text{ }\mu\text{g/poço}$, sendo considerado pouco ativo contra este micro-organismo como observado na figura 02. O extrato também não apresentou halos de inibição para as demais cepas Gram-positivas testadas, bem como para as Gram-negativas do grupo das enterobactérias (*E. coli* e *K. pneumoniae*) e Gram-negativas não fermentadoras (*P. aeruginosa*) (Figura 03).

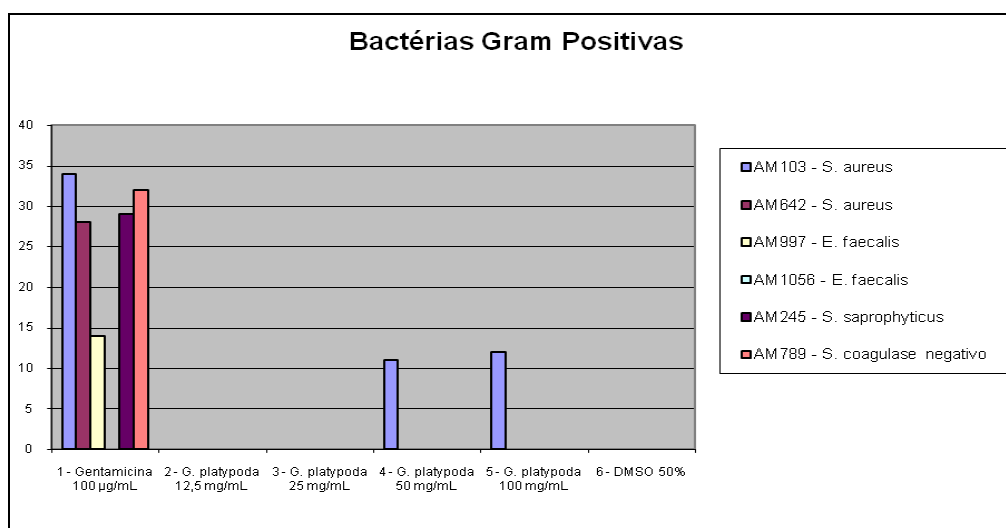


FIGURA 02. Perfil de inibição contra cepas bacterianas Gram-positivas.

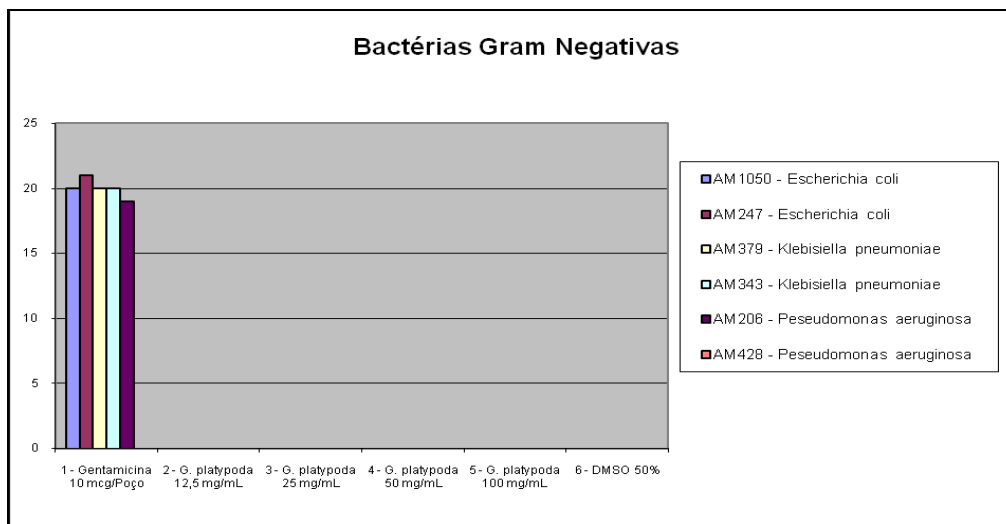


FIGURA 03. Perfil de inibição contra cepas bacterianas Gram-negativas.

A ausência de atividade antimicrobiana pode estar relacionada à composição química do extrato, uma vez que o mesmo não apresentou taninos e estes são descrito por Simões (2004) como sendo especialmente responsáveis por tal atividade. Estes metabólitos apresentam a capacidade de complexar-se com macromoléculas, tais como polissacarídeos e proteínas, podendo ter sua atuação nos micro-organismos na inibição das enzimas de bactérias e/ou a complexação dos substratos dessas enzimas, agindo sobre as membranas celulares de micro-organismos, modificando o seu metabolismo, ou mesmo na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo, assim, a disponibilidade destes elementos essenciais para o metabolismo dos micro-organismos.

Considerações finais e Perspectivas

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A prospecção fitoquímica identificou a presença de flavonóides (orientina), derivados cinâmicos, fenilpropanoglicosídeos, monoterpenóides, sesquiterpenóides e diterpenóides, ácidos triterpênicos (ácido oleanólico ou ácido ursólico), esteroide (beta-sitosterol), saponinas e açúcar redutor (maltose). Adicionalmente, pode-se identificar sinais nos espectros de uma e duas dimensões de RMN (^1H e ^{13}C) de componentes presentes na mistura (relativamente complexa) que são compatíveis com unidades 3,4-dihidroxicinâmicas.

O estudo da bioatividade do extrato bruto metanólico das cascas da raiz de *Guettarda platypoda* não apresentou toxicidade quando testado por via oral. O extrato apresentou potencial anti-inflamatório na dose de 100 mg/kg (inibição de 55,2% da migração de PMNL) no tratamento da inflamação aguda *in vivo* (modelo de migração leucocitária induzidos pela carragenina), sendo cerca de 10 vezes mais efetivo quando comparado com a avaliação do extrato bruto etanólico realizada por Almeida (1982). Nesta, a dosagem de 1000 mg/kg obteve menos que 50% de inibição do edema.

Na atividade antitumoral frente a Sarcoma 180 foi verificada uma inibição tumoral de 74,26% e 84,77%, para as doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg, respectivamente. Estes resultados mostram-se promissores para o tratamento desse tipo de câncer e foram os primeiros descritos na literatura com esta espécie vegetal.

A falta de dados na literatura quanto à espécie estudada nos mostra a necessidade de um estudo fitoquímico mais aprofundado, visando a caracterização e isolamento dos compostos químicos responsáveis pelas atividades farmacológicas apresentadas. Assim, através das substâncias isoladas, será possível o planejamento de futuros trabalhos para a comprovação e detalhamento dessas atividades, como possíveis ensaios clínicos que deem respaldo ao uso popular, bem como a possível padronização da matéria-prima e a melhor formulação para a elaboração de um fitoterápico.

Não foram observados resultados positivos na atividade antitumoral para carcinoma de Ehrlich, atividade antibacteriana e atividade antifúngica, bem como a ausência de potencial citotóxico para o extrato metanólico de *Guettarda platypoda*.

Referências

9 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.Z. de. **Estudo fitoquímico e triagem farmacológica da casca da raiz da *Guettarda platypoda* DC.** 1982. 133 p. Dissertação (Mestrado - Produtos Naturais) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

ALMEIDA JR, E.B. de; PIMENTEL, R.M. de M.; ZICKEL, C.S. Flora e formas de vida em uma área de restinga no litoral norte de Pernambuco, Brasil. **Revista de Geografia**, v. 24, n.1, p.19-34, 2007.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). **RESOLUÇÃO - RDC Nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010.** Brasília, 10 mar. 2010. 8 p.

AQUINO, R.; SIMONE, F.de; PIZZA, C.; CERRI, R.; MELLO, J.F de. Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. **Phytochemistry**, v.27, p.2927-2930, 1988a.

AQUINO, R.; SIMONE, F. de; PIZZA, C.; MELLO, J.F. de. Further quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. **Phytochemistry**, v.28, p.199-201, 1989a.

AQUINO, R.; SIMONE, F. de; SENATORE, F.; PIZZA, C. Iridoids and secoiridoids from *Guettarda platypoda*. **Pharmacological Research Communications**, v.20, p.105-108, 1988b.

BARBOSA-FILHO, J.M.; DA SILVA, T.M.S; SETTE, I.M.F.; *et al.* Rubiaceae. In: LUCCHESI, A. M. (ed.). Instituto do Milênio do Semi-árido. **Plantas da Caatinga: perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica.** v.4. Recife: Associação de Plantas do Nordeste, 2006, p.427-428.

BARBOSA, M.R.de V.; SOUZA, E. B. de.; JARDIM, J.G. Rubiaceae. In: Checklist das Plantas do Nordeste (Versão 1.5). **Banco de Dados de Plantas do Nordeste.** Disponível em: <<http://www.cnip.org.br/bdnp/checklistNE.pdf>>. Acesso em: 5 jan. 2011.

BHATTACHARYYA, J.; ALMEIDA, M.Z. Isolation of the constituents of the root-bark of *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v.48, p.148-149, 1985.

BIODIVERSIDADE. Notícia postada dia 05/10/2010. Disponível em: <<http://www.igeduca.com.br/artigos/acontece/biodiversidade.html>>. Acesso: 04 fev. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos.** Brasília, DF, 2006.

BREMER, B.; ANDREASEN, K.; OLSSON, D. Subfamilial and tribal relationships in the Rubiaceae based on *RbcL* sequence data. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v.82, p. 383-397, 1995.

BREMER, B.; JANSEN, R.K.; OXELMAN, B.; BACKLUND, M.; LANTZ, H.; KIM, K.J. More characters or more *taxa* for a robust phylogeny-case study from the coffee family (Rubiaceae). **Systematic Biology**, v. 48, n.3, p.413-435,1999.

BRUN, E.J.; BRUN, F.G.K.; LONGHI, S.J. Técnicas de Coleta e Herborização de Material Botânico. 1999. Disponível em: < http://web.dv.utfpr.edu.br/www.dv/profesores/arquivos/Mauricio%20Romero%20Gorenstein/SILVI_herborizacao%20material%20botanico.pdf>. Acesso 04 fev. 2011.

CORE ASTERIDS. Lamiids Part 1. Disponível em: < http://courses.washington.edu/bot113/summer/LectNotes/2010/Lecture7_2.pdf>.2011

CORRÊA, P.G. **Defesas foliares em resposta à herbivoria em espécies lenhosas de restinga, Ipojuca-PE.** Tese de Mestrado em Botânica. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2007.

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

CRONQUIST. Classification of Dicotyledons. In: SMITH, N. et al. (ed.). **Flowering plants of the neotropics.** Princeton: Princeton University Press, 2004, p.529-531.

CUNHA, A. P. da; SILVA, A. P. da; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003, p.21-61.

DAVID, J.P. de L.; DAVID, J.M.; SOARES, M.B.P *et al.* Introdução. In: LUCCHESI, A. M. (ed.). Instituto do Milênio do Semi-árido. **Plantas da Caatinga:** perfil botânico, fitoquímica e atividade biológica. v.4. Recife: Associação de Plantas do Nordeste, 2006, p.15-17.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. Casa Civil. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.** Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, Brasília, 22 jun. 2006.

DELPRETE, P.G. Rubiaceae (Coffea or Quinine family). In: SMITH, N. et al. (ed.). **Flowering plants of the neotropics.** Princeton: Princeton University Press, 2004, p.328-333.

FERRARI, F.; MESANA, I.; BOTTA, B.; DE MELLO, J.F. Constituents of *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v.49, p.1150-1151, 1986.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods.** 3ªed. London: Chapman & Hall, 1998.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002, p. 570-571.

LIMA, L.F., LIMA, P.B., ALMEIDA Jr., E.B. & ZICKEL, C.S. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae). **Biota Neotropica**, v.10, n.1, 2010. Disponível em: < <http://www.biotaneotropica.org.br/v10n1/pt/abstract?article+bn02310012010>>. Acesso: 31 jan 2011.

PINA, E.M.L. Estudo farmacológico das cascas da raiz de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae)

MARGALHO, L.F.; ROCHA, A.E.S. da; SECCO, R. de S. Rubiaceae Juss. da estinga da APA de Algodual/Maiandeuá, Maracanã, Pará, Brasil. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, v. 4, n. 3, p. 303-339, 2009.

MARINERO, F.E.C. **Estudo taxonômico do gênero *Manettia Mutis ex L. (Rubiaceae) no sul do Brasil***. 2010. 78 p. Dissertação (Mestrado em Botânica – Área Taxonomia de Fanerógamas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MELO, S.J.de; BRAZ-FILHO, R.; LEMOS, T.L.G.; SANTOS, H. S.; FONSECA, A.M., XAVIER, H.S. Derivados terpênico e indólico glicosilados das raízes de *Guettarda platypoda* D.C. (Rubiaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31, 2008, Águas de Lindóia. **Publicação online**.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. Produtos Naturais. **Estudos Químicos e Biológicos**. Fortaleza: Editora da Universidade Estadual do Ceará, 2007.

NEU, R.A. New reagent for differentiating and determining flavones of paper chromatograms. **Naturwissenschaften**, v. 43, p.82, 1956.

PARLANGELLO, K.M. **Fitoterapia**. 2009. Disponível em: <<http://www.apanar.org.br/site/fitoterapia/>>. Acesso: 04 jan. 2011.

PEREIRA, M. do S. **A família rubiaceae na reserva biológica guaribas, Paraíba, Brasil**. 2002. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2002.

PEREIRA, G.F. **A família Rubiaceae Juss. na vegetação ripária de um trecho do alto rio Paraná, Brasil, com ênfase na tribo Spermaceae**. 2007. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR.

PESSOA, M. do C. R. **Diversidade e Riqueza da Família Rubiaceae Juss. no Cariri Paraibano**. 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

PORTAL BRASIL. **Por Dentro do Brasil – Meio Ambiente**. 34p. setembro/2010. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/cop/materiais-para-download/por-dentro-do-brasil-2013-meio-ambiente-2013-setembro-2010>>. Acesso 04 jan. 2011.

PÔRTO, V. B. dos S. **Purificação parcial de uma lectina da raiz de *Guettarda platypoda***. 2003. 33 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

RICO, J.M.T. Prefácio. In: CUNHA, A. P. da; SILVA, A. P. da; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. [Lisboa]: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003, p.9-11.

ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. **Opera Botanica Belgica**, v. 1, p. 1-271, 1988.

PINA, E.M.L. Estudo farmacológico das cascas da raiz de *Guettarda platypoda* DC. (Rubiaceae)

ROBBRECHT, E. Introduction to advances in Rubiaceae macrosystematics. **Opera Botanica Belgica**, v. 6, p. 7-18, 1993

ROBERTSON, E.H.; CARTWRIGHT, R.A.; WOOD, D.J. **J. Sci. Food. Agr.**, v.07, p. 637-640, 1957.

ROSA, E.A. da; Silva, B.C. e; Silva, F.M. da; et al. Flavonóides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.4, p. 484-488, 2010.

ROSA, E.A. da. **Contribuição ao estudo químico das espécies vegetais *Palicourea rigida* e *Palicourea coriacea* e avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e moluscicida de *Palicourea rigida***. 2009. 216 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da UEM, Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

ROVA, J. H.E.; DELPRETE, P.G.; ANDERSSON, L.T; ALBERT, V.A.. A *trnL-F* cpDNA sequence study of the Condamineae-Rondeletieae Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. **American Journal of Botany**, v. 89, n.1, p.145–159, 2002.

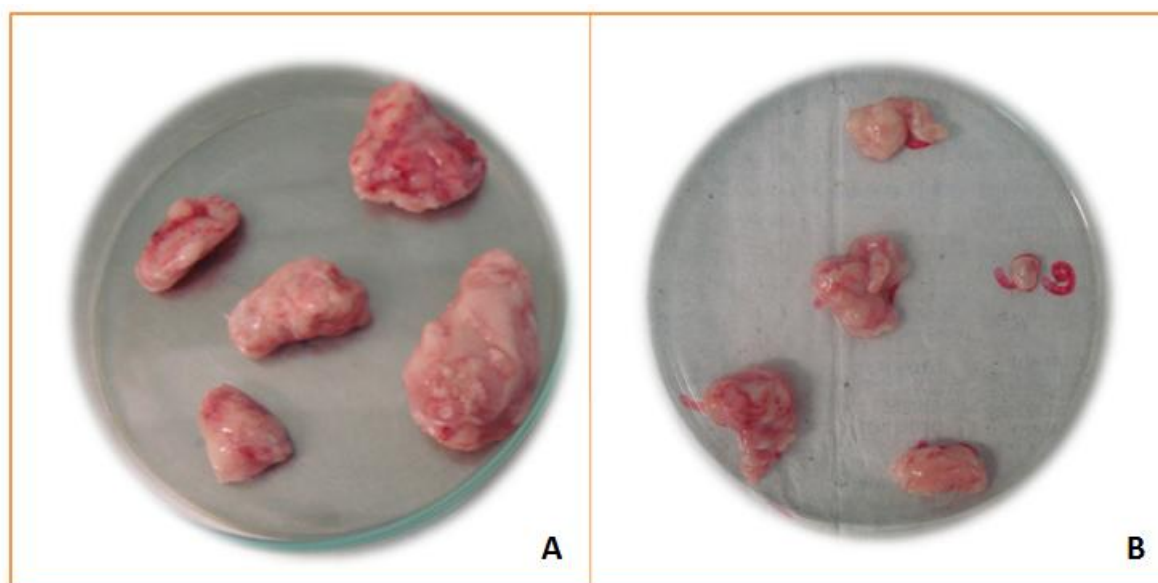
SHARMA, O.P.; DAWRA, R.K. Thin-layer chromatography separations of lantadens, the pentacyclic triterpenoids from (*Lantana camara*) plant. **J. Chrom.**, v.587, p.351-354, 1991.

SOARES, F.P.; RONCONI, C. A. V.; CUNHA, E. V. L. DA; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S. DA; BRAZ-FILHO, R. Four known triterpenoids isolated from three Brazilian plants: ¹H and ¹³C chemical shift assignments. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 36, n.8, p.608–614, 1998.

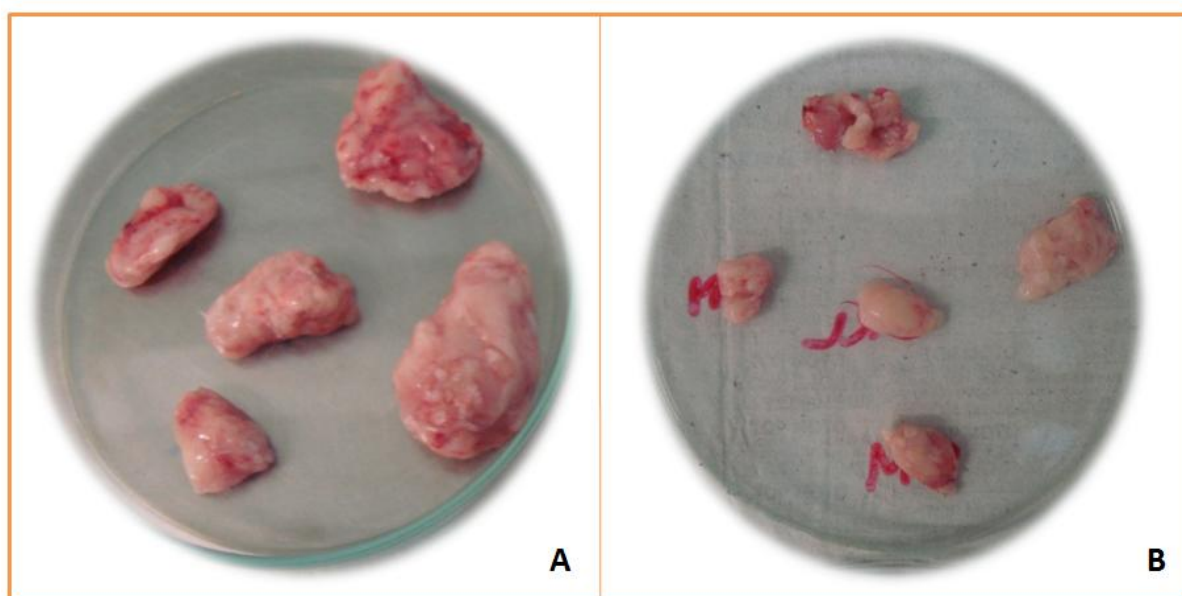
VITARELLI, N.C.; SANTOS, M.. Anatomia de estípulas e coléteres de *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). **Acta bot. bras.**, v.23, n.4, p. 923-928, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drugs analysis. A thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlim: Springer Verlag, 1996. 384p.

WHO. **Traditional medicine strategy 2002-2005**. Geneva, 2002. 65 p.

APÊNDICE A – Ilustração da atividade antitumoral frente a Sarcoma 180

Avaliação da atividade antitumoral de *Guettarda platypoda* (dose = 100 mg/kg) frente a Sarcoma 180. **A:** Grupo Controle; **B:** Grupo Tratado (TS1)

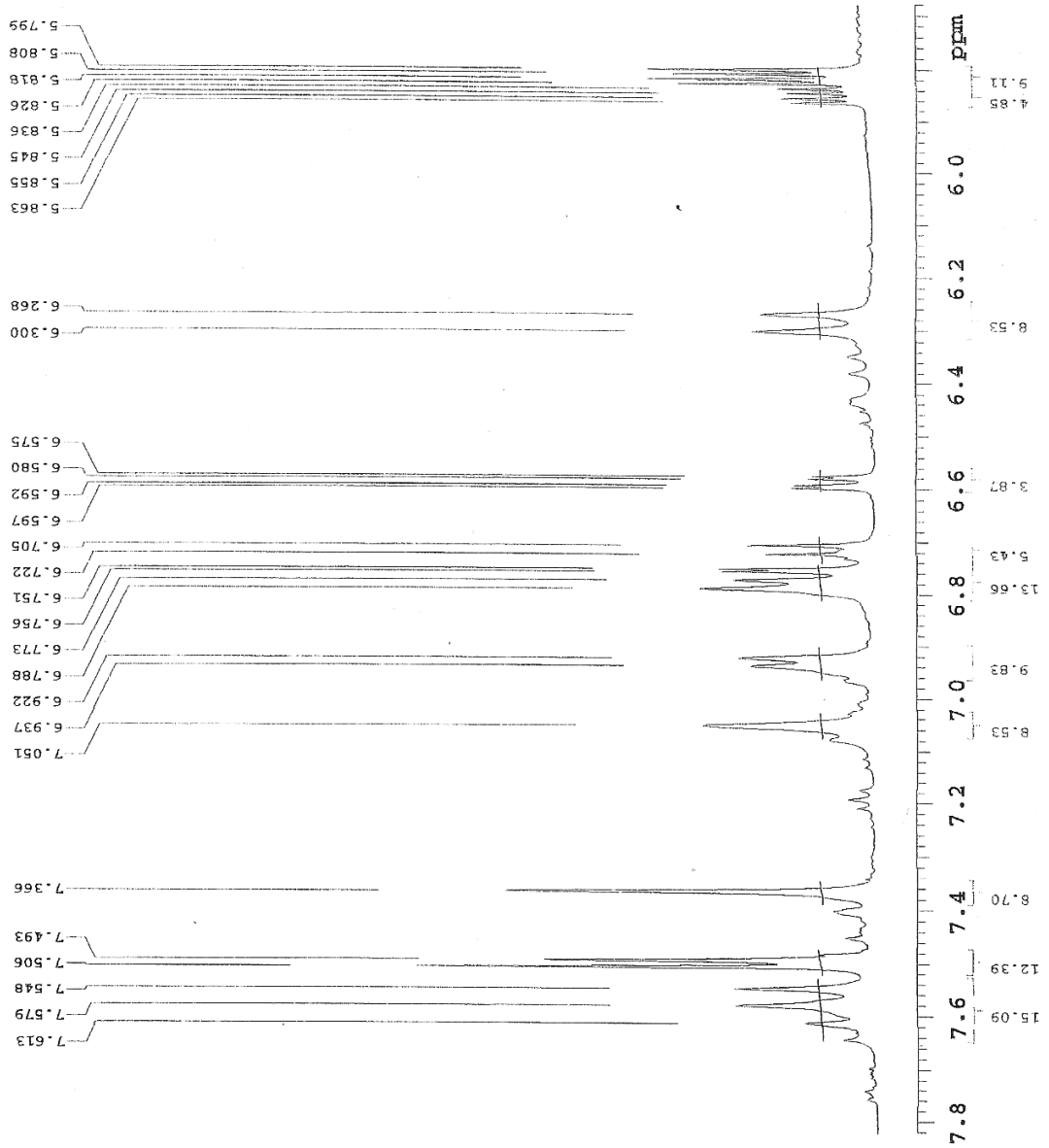


Avaliação da atividade antitumoral de *Guettarda platypoda* (dose = 200 mg/kg) frente a Sarcoma 180. **A:** Grupo Controle; **B:** Grupo Tratado (TS2)

ANEXO A – Espetro de RMN - ¹H de S3

Evelyn-Gplat-Prof. Sebastiao-UFRPE
Op-Vicente
14/09/2010

Sample: Evelyn-Gplat
File: exp
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: cd3od
Temp. 27.0 C / 300.1 K
Operator: central
VNMR5-500 "vnmrs500"
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 2.049 sec
Width 8012.8 Hz
44 repetitions
OBSERVE H1, 499.5798613 MHz
DATA PROCESSING
Resol. enhancement -0.0 Hz
FT size 65536
Total time 6 min, 37 sec



ANEXO B – Espectro de COSY de S3

