

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA FLÁVIA SCHVABE DUARTE

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL.,  
RUBIACEAE: ASPECTOS FITOQUÍMICOS, MORFOANATÔMICOS E  
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS**

CURITIBA

2017

ANA FLÁVIA SCHVABE DUARTE

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL.,  
RUBIACEAE: ASPECTOS FITOQUÍMICOS, MORFOANATÔMICOS E  
AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Deise Prehs Montrucchio

CURITIBA

2017

Duarte, Ana Flávia Schwabe  
Contribuição ao estudo de *Guettarda uruguensis* Cham. & Schldl., Rubiaceae: aspectos fitoquímicos, morfoanatômicos e avaliação de atividades biológicas e farmacológicas / Ana Flávia Schwabe Duarte – Curitiba, 2017.

174 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Deise Prehs Montrucchio

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais. 2. Rubiaceae. 3. Tricomas. 4. Ensaios biológicos. 5. Farmacologia.  
I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Montrucchio, Deise Prehs. II. Universidade Federal do Paraná.  
III. Título.

CDD 615.32

# TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE  
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de ANA FLAVIA SCHVABE DUARTE intitulada: *Contribuição ao estudo de Guettarda uruguensis Cham. & Schldl., Rubiaceae: aspectos fitoquímicos, morfoanatômicos e avaliação de atividades biológicas e farmacológicas.*, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 14 de Agosto de 2017.



OBDULIO GOMES MIGUEL  
Presidente da Banca Examinadora



VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo



MARLIS BALLARINI MIGUEL  
Avaliador Interno



YANNA DANTAS RATTMANN  
Avaliador Externo



CRISTINA PEITZ DE LIMA  
Avaliador Externo

*Com todo o meu amor, ao meu filho Vicente.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Stela Maris, Augusto Flávio, Ednei e irmãos, Isabel e Hermes. Aos meus queridos Vicente e Antonio. Família, agradeço pelo apoio incondicional, por toda felicidade, alegria e amor.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deise Prehs Montrucchio pela confiança, ensinamentos, paciência, dedicação e amizade. Agradeço imensamente pela minha formação profissional e crescimento pessoal.

Agradeço a todos os professores do grupo de pesquisa de produtos naturais (GPPN-UFPR) pela acolhida, em especial à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel e Prof. Dr. Vitor Alberto Kerber pelos conselhos, equilíbrio e sabedoria.

Ao Prof. Dr. Andersson Barison, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cleusa Bonna, Prof. Dr. José Ederaldo Queiroz Telles e Prof. Dr. Railson Henneber, pela disponibilidade, ensinamentos transmitidos e parceria, fundamentais para a construção deste trabalho.

Aos funcionários da Universidade Federal do Paraná Jair Lima, Jean Paulo Godoi, Maria da Graça Teixeira Toledo, Maurício Passos, Nilson Belém Filho, Paulo Sergio Diniz, pela disponibilidade e apoio. Muito obrigada.

Ao Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, em especial aos botânicos Osmar dos Santos Ribas e José Tadeu Weidlich Motta pela identificação e depósito das espécies e aos funcionários Juarez e Joel pelo auxílio na coleta em campo.

Ao Helton Josue Teodoro Muniz pelo belíssimo trabalho de conservação de frutas raras e exóticas. Agradeço pela coleta e envio das espécies.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica e Farmacotécnica da UFPR que fazem parte da minha trajetória, em especial à Angela Maria de Souza, Beatriz Cristina Konopatzki Hirota, Cristiane Bezerra Da Silva, Cristiane da Silva Paula, Daniella Maria Soares de Oliveira, Ellis Marina Szabo, Fernanda Maria Marins Ocampos, Francis Zortéa Merino, Gislene Mari Fujiwara, Isabel Christina Mignoni Homem, Luciane Dalarmi, Mariana Saragioto Krause, Ranieri Campos, Vanessa Cristina Dias Canteli, Vinícius Bednarckzuk de Oliveira. Sou grata pela amizade, colaboração e alegrias.

Agradeço a vida de todos os animais que fizeram parte deste trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização deste trabalho.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq, Finep e Fundação Araucária.

*“There are more things in heaven and earth, Horatio,  
Than are dreamt of in your philosophy.”  
William Shakespeare*

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**AA** – Atividade antioxidante  
**ABAP** - Cloreto de 2,2'-azo-bis-2-aminopropano  
**ALT** - Alanina aminotransferase  
**ANOVA** - Análise de variância de uma via  
**AST** - Aspartato aminotransferase  
**ATCC** – *American Type Culture Collection*  
**ATP** – Trifosfato de adenosina  
**CIM** - Concentração inibitória mínima  
**CL<sub>50</sub>** - Concentração letal média  
**d** - Duplete  
**dd** – Duplo duplete  
**DPPH** - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila  
**EBGF** – Extrato etanólico bruto de folha  
**EBGFL** – Extrato etanólico bruto de flor  
**FAA** – Solução de formaldeído-ácido acético-álcool  
**FLA** – Fração acetato de etila de flor  
**FLALC** – Extrato alcaloidico de flor  
**FLAQ** – Extrato aquoso de flor  
**FLB** – Fração butanol de flor  
**FLC** – Fração clorofórmio de flor  
**FLH** – Fração hexano de flor  
**FLR** – Fração remanescente de flor  
**FOA** – Fração acetato de etila de folha  
**FOALC** – Extrato alcaloidico de folha  
**FOAQ** – Extrato aquoso de folha  
**FOB** – Fração butanol de folha  
**FOC** – Fração clorofórmio de folha  
**FOH** – Fração hexano de folha  
**FOR** – Fração remanescente de folha  
**FRA** – Extrato acetato de etila de fruto  
**FRC** – Extrato clorofórmio de fruto  
**FRH** – Extrato hexano de fruto  
**FRR** – Extrato remanescente de fruto  
**HMBC** - *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*  
**HSQC** - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*  
**Hz** – Hertz  
**i.p.** – Intraperitoneal  
**i.pl.** – Intraplantar  
**IA** – Índice antioxidante  
**IC<sub>50</sub>** – Concentração inibitória média  
**J** – Constante de acoplamento  
**m** - Multiplete  
**m/z** – Relação massa-carga  
**MEV** - Microscópio eletrônico de varredura  
**MHz** - Megahertz  
**MS** – Espectrometria de massas  
**NL** – *Neutral loss*



**PANC** – Planta alimentícia não convencional  
**RMN de  $^{13}\text{C}$**  - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13  
**RMN de  $^1\text{H}$**  - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio  
**s** - Simpleto  
**t** - Tripleto  
**TBA** – Ácido tiobarbitúrico  
**TBARS** – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico  
**TMS** - Tetrametilsilano  
**TTC** - Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio  
**UV-VIS** – Ultravioleta visível  
**v.o.** – Via oral  
 $\delta_{\text{C}}$  - Deslocamento químico do carbono  
 $\delta_{\text{H}}$  - Deslocamento químico do hidrogênio

## RESUMO

*Guettarda uruguensis* Cham. & Schltl. (Rubiaceae), conhecida popularmente como veludinho, jasmim uruguaio e palo cruz, é uma planta nativa do Brasil. Possui flores aromáticas e frutos comestíveis. O gênero *Guettarda* tem sido descrito em literatura por apresentar várias propriedades biológicas, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica, entre outras. Tendo em vista o potencial terapêutico do gênero, este trabalho apresenta o estudo da morfoanatomia foliar das espécies *Guettarda pohliana*, *Guettarda uruguensis* e *Guettarda viburnoides* e o estudo fitoquímico e das atividades biológicas e farmacológicas da espécie *Guettarda uruguensis*. De modo geral, as espécies *Guettarda pohliana*, *Guettarda uruguensis* e *Guettarda viburnoides* apresentaram características morfoanatômicas concordantes com a família Rubiaceae, porém existem caracteres relevantes de caracterização. O perfil fitoquímico do extrato etanólico bruto obtido de folha e flor e das frações acetato de etila obtidas de folha, flor e fruto demonstrou a presença de compostos com características de ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides. Das frações hexano e acetato de etila de folha foram identificados os compostos: *p*-cumarato de eicosanila, *p*-cumarato de dotriacontila, *p*-cumarato de triacontila, glutinol e quercetina. A fração acetato de etila das folhas demonstrou elevado teor de compostos fenólicos e significativa atividade antioxidante. Excetuando-se as frações hexano e clorofórmio de folha e fração remanescente de fruto as amostras avaliadas frente a *Artemia salina* indicaram toxicidade. A fração hexano de folha demonstrou atividade larvicida para *Aedes aegypti*, produzindo efeito de letalidade e alterando a produção de ATP. De modo geral, as amostras apresentaram potencial antimicrobiano frente a *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. O extrato etanólico bruto obtido de folha foi avaliado em modelos farmacológicos e demonstrou: (i) atividade antinociceptiva no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e formalina; (ii) atividade anti-inflamatória nos modelos de edema de pata e peritonite, (iii) proteção gástrica no modelo de lesão aguda induzida pelo etanol, assim como o extrato aquoso obtido de folha; (iv) não produzir alteração sobre a motilidade gastrointestinal, indicadores de toxicidade avaliados *in vivo*, atividade locomotora e parâmetros comportamentais.

Palavras-chave: *Guettarda uruguensis*. Morfoanatomia. Composição química. Atividades biológicas.

## ABSTRACT

*Guettarda uruguensis* Cham. & Schldl. (Rubiaceae), popularly known as veludinho, jasmim uruguaio and palo cruz, is a plant native to Brazil, with aromatic flowers and edible fruits. *Guettarda* genus has been described in literature because of its several biological properties, such as antioxidant activity, anti-inflammatory, cytotoxic, among others. In view of the genus therapeutic potential, the present work presents the study of the leaf morphoanatomy of the *Guettarda pohliana*, *Guettarda uruguensis* and *Guettarda viburnoides* species, the phytochemical study and the biological and pharmacological activities of the *Guettarda uruguensis* species. In general, the *Guettarda pohliana*, *Guettarda uruguensis* e *Guettarda viburnoides* species presents morphological characteristics concordant with the Rubiaceae family, however there are relevant characterization characters. The phytochemical profile of the crude ethanolic extract obtained from leaf and flower, also the ethyl acetate fractions obtained from leaf, flower and fruit, showed the presence of compounds with the characteristics of hydroxycinnamic acids and flavonoids. From the leaf hexane and ethyl acetate fractions were identified the compounds: eicosanyl *p*-coumarate, dotriacontyl *p*-coumarate, triacontyl *p*-coumarate, glutinol and quercetin. The leaves ethyl acetate fraction demonstrated high phenolic compounds content and significant antioxidant activity. Excepting the leaf hexane and chloroform fractions, also the fruit fraction remaining, the samples evaluated against *Artemia salina* indicated toxicity. The leaf hexane fraction demonstrated a larvicidal activity for *Aedes aegypti*, producing a lethality effect and altering the production of ATP. In general, the samples presented antimicrobial potential against *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. The crude ethanolic extract obtained from leaf was evaluated in pharmacological models and demonstrated: (i) antinociceptive activity in the model of abdominal contortions induced by acetic acid and formalin; (ii) anti-inflammatory activity in the paw edema and peritonitis models, (iii) gastric protection in the acute injury model induced by ethanol, as well as the aqueous extract obtained from leaf; (iv) do not produce alteration on gastrointestinal motility, toxicity indicators evaluated *in vivo*, locomotor activity and behavioral parameters.

Keywords: *Guettarda uruguensis*. Morphoanatomy. Chemical composition. Biological assays.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESPÉCIE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	41
FIGURA 2 - ASPECTOS BOTÂNICOS DE <i>Guettarda pohliana</i> MÜLL. ARG., RUBIACEAE.....	43
FIGURA 3 - ASPECTOS BOTÂNICOS DE <i>Guettarda viburnoides</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	44
FIGURA 4 - EXSICATA DA ESPÉCIE <i>Guettarda pohliana</i> MÜLL. ARG., RUBIACEAE.....	46
FIGURA 5 - EXSICATA DA ESPÉCIE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	47
FIGURA 6 - EXSICATA DA ESPÉCIE <i>Guettarda viburnoides</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	48
FIGURA 7 - MÉTODO DE EXTRAÇÃO E PARTICIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO OBTIDO DE FOLHA DE <i>G. uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE POR MEIO DE APRELHO DE SOXHLET.....	51
FIGURA 8 - MÉTODO DE EXTRAÇÃO E PARTICIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO OBTIDO DE FLOR DE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE POR MEIO DE APRELHO DE SOXHLET.....	52
FIGURA 9 - MÉTODO DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE FRUTO DE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE POR MEIO DE APRELHO DE SOXHLET.....	53
FIGURA 10 - PREPARO DOS EXTRATOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DA ESPÉCIE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE POR MEIO DE APARELHO DE SOXHLET.....	53
FIGURA 11 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO.....	58
FIGURA 12 - EQUAÇÃO DA RETA OBTIDA POR REGRESSÃO LINEAR PARA O CÁLCULO DA IC <sub>50</sub> DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE DE FOLHA DA ESPÉCIE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	61
FIGURA 13 - EQUAÇÃO DA RETA OBTIDA POR REGRESSÃO LINEAR PARA O CÁLCULO DA IC <sub>50</sub> DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE OBTIDOS DE FLOR DA ESPÉCIE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	62
FIGURA 14 - EQUAÇÃO DA RETA OBTIDA POR REGRESSÃO LINEAR PARA O CÁLCULO DA IC <sub>50</sub> DO EXTRATO CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICO REMANESCENTE OBTIDO DE	

FRUTO DA ESPÉCIE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	63
FIGURA 15 - ESQUEMA DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM OS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA DE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	69
FIGURA 16 - ESQUEMA DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM OS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FLOR E FRUTO DE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	70
FIGURA 17 - AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE O EDEMA DE PATÁ INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	73
FIGURA 18 - AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE A PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	74
FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM O EBGF E FOAQ.....	75
FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL TOXICOLÓGICO.....	76
FIGURA 21 - AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA E COMPORTAMENTO TIPO- ANSIOLÍTICO E TIPO-ANTIDEPRESSIVO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL TOXICOLÓGICO...	80
FIGURA 22 - CARACTERÍSTICAS DA ANATOMIA DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Guettarda</i> .....	82
FIGURA 23 - MESOFILO DE <i>Guettarda</i> EM SECÇÃO TRANSVERSAL.....	85
FIGURA 24 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE FOLIAR DE <i>Guettarda pohliana</i> MÜLL. ARG., RUBIACEAE EM VISTA FRONTAL.....	86
FIGURA 25 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE FOLIAR DE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE EM VISTA FRONTAL.....	87
FIGURA 26 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE FOLIAR DE <i>Guettarda viburnoides</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE EM VISTA FRONTAL.....	88
FIGURA 27 - NERVURA CENTRAL DE <i>Guettarda pohliana</i> , <i>Guettarda uruguensis</i> e <i>Guettarda viburnoides</i> EM SECÇÃO TRANSVERSAL	89
FIGURA 28 - PECÍOLO DE <i>Guettarda pohliana</i> , <i>Guettarda uruguensis</i> e <i>Guettarda viburnoides</i> EM SECÇÃO TRANSVERSAL.....	90
FIGURA 29 - PECÍOLO DE <i>Guettarda pohliana</i> , <i>Guettarda uruguensis</i> <i>Guettarda viburnoides</i> EM SECÇÃO TRANSVERSAL.....	
FIGURA 30 - TESTES HISTOQUÍMICOS EM FOLHA DE <i>Guettarda pohliana</i> .....	92
FIGURA 31 - TESTES HISTOQUÍMICOS EM FOLHA DE <i>Guettarda uruguensis</i> ..	93

FIGURA 32 - TESTES HISTOQUÍMICOS EM FOLHA DE <i>Guettarda viburnoides</i> .	94
FIGURA 33 - PERFIL CROMATOGRÁFICO CLAE-DAD DOS EXTRATOS ETANÓLICOS OBTIDOS DE FOLHA E FLOR DE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	101
FIGURA 34 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO FOA.....	102
FIGURA 35 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO FLA.....	103
FIGURA 36 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO FRA.....	104
FIGURA 37 - ESTRUTURA QUÍMICA DO GLUTINOL.....	106
FIGURA 38 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) DA SUBSTÂNCIA AFSD-1.....	107
FIGURA 39 - ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) DA SUBSTÂNCIA AFSD-1.....	107
FIGURA 40 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA.....	108
FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) DA SUBSTÂNCIA AFSD-2.....	109
FIGURA 42 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) DA SUBSTÂNCIA AFSD-2.....	110
FIGURA 43 - ESTRUTURA QUÍMICA DO <i>p</i> -CUMARATO DE OCTACOSANILA (AFSD-3).....	112
FIGURA 44 - ESTRUTURA QUÍMICA DO <i>p</i> -CUMARATO DE TRIACONTILA (AFSD-4).....	112
FIGURA 45 - ESTRUTURA QUÍMICA DO <i>p</i> -CUMARATO DE DOTRIACONTILA (AFSD-5).....	112
FIGURA 46 - ESPECTRO DE RMN DE <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) DAS SUBSTÂNCIAS AFSD-3, AFSD-4 e AFSD-5.....	113
FIGURA 47 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) DAS SUBSTÂNCIAS AFSD-3, AFSD-4 e AFSD-5.....	113
FIGURA 48 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) DAS SUBSTÂNCIAS AFSD-3, AFSD-4 e AFSD-5.....	114
FIGURA 49 - EXPERIMENTO DE MASSAS EM FULL SCAN DA MISTURA DE AFSD-3, AFSD-4 E AFSD-5 (METANOL).....	114
FIGURA 50 - EXPERIMENTO DE MASSAS (MS <sup>2</sup> ) DO ÍON MOLECULAR DE <i>m/z</i> 555 (CE 38 V, EM METANOL) DE AFSD-3.....	115
FIGURA 51 - EXPERIMENTO DE MASSAS (MS <sup>2</sup> ) DO ÍON MOLECULAR DE <i>m/z</i> 583 (CE 44 V, EM METANOL) DE AFSD-4.....	115
FIGURA 52 - EXPERIMENTO DE MASSAS (MS <sup>2</sup> ) DO ÍON MOLECULAR DE <i>m/z</i> 611 (CE 36 V, EM METANOL) DE AFSD-5.....	116
FIGURA 53 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE <i>Guettarda uruguensis</i> POR MEIO DA METODOLOGIA DE FOSFOMOLIBDÊNIO.....	119

FIGURA 54 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE <i>Guettarda uruguensis</i> POR MEIO DA METODOLOGIA DE DPPH.....	120
FIGURA 55 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE <i>Guettarda uruguensis</i> POR MEIO DA METODOLOGIA DE TBARS.....	121
FIGURA 56 - MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE PEARSON PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM <i>Guettarda uruguensis</i> .....	126
FIGURA 57 - ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM <i>Guettarda uruguensis</i> .....	126
FIGURA 58 - EFEITO DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA DE <i>Guettarda uruguensis</i> SOBRE A CAPACIDADE DE SÍNTESE DE ATP MITOCONDRIAL POR LARVAS DE <i>A. aegypti</i> .....	130
FIGURA 59 - EFEITO DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FLOR DE <i>Guettarda uruguensis</i> SOBRE A CAPACIDADE DE SÍNTESE DE ATP MITOCONDRIAL POR LARVAS DE <i>A. aegypti</i> .....	131
FIGURA 60 - EFEITO DE EXTRATOS OBTIDOS DE FRUTO DE <i>Guettarda uruguensis</i> SOBRE A CAPACIDADE DE SÍNTESE DE ATP MITOCONDRIAL POR LARVAS DE <i>A. aegypti</i> .....	131
FIGURA 61 - EFEITO DO EBGF SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.....	136
FIGURA 62 - EFEITO DO EBGF SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA.....	136
FIGURA 63 - EFEITO DO EBGF SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMPO ABERTO.....	137
FIGURA 64 - EFEITO ANTIEDEMATOGÊNICO DO EBGF SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA.....	138
FIGURA 65 - EFEITO DO EBGF SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS NO MODELO DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	139
FIGURA 66 - EFEITO PROTETOR DO EBGF E FOAQ CONTRA LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL.....	143
FIGURA 67 - EFEITO DO EBGF SOBRE O ESVAZIAMENTO GÁSTRICO E TRÂNSITO INTESTINAL.....	143
FIGURA 68 - EFEITO DO EBGF SOBRE A VARIAÇÃO DE PESO DE CAMUNDONGOS.....	146
FIGURA 69 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE O PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS.....	147
FIGURA 70 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE PARÂMETROS	

BIOQUÍMICOS.....	150
FIGURA 71 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA AVALIADA EM CAMPO ABERTO.....	153
FIGURA 72 - EFEITO DO EBGF SOBRE A ATIVIDADE TIPO-ANSIOLÍTICA AVALIADA PELO TESTE DE ESCONDER ESFERAS.....	153
FIGURA 73 - AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO EBGF POR MEIO DO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.....	155



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - USO POPULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Guettarda</i> .....	28
TABELA 2 - ALCALOIDES IDENTIFICADOS NO GÊNERO <i>Guettarda</i> .....	30
TABELA 3 - IRIDOIDES IDENTIFICADOS NO GÊNERO <i>Guettarda</i> .....	32
TABELA 4 - TRITERPENOS, ESTERÓIDES E SAPONINAS IDENTIFICADAS NO GÊNERO <i>Guettarda</i> .....	33
TABELA 5 - OUTROS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO GÊNERO <i>Guettarda</i> .....	37
TABELA 6 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS ATRIBUIDAS A ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Guettarda</i> .....	38
TABELA 7 - ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA.....	97
TABELA 8 - NOMENCLATURAS ADOTADAS PARA DEFINIR EXTRATOS E FRAÇÕES ORGÂNICAS OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DA ESPÉCIE <i>Guettarda uruguensis</i> .....	98
TABELA 9 - RENDIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE FOLHA E FLOR DE <i>Guettarda uruguensis</i> COM RELAÇÃO A OBTENÇÃO DE EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS.....	98
TABELA 10 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO.....	99
TABELA 11 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE <sup>1</sup> H E RMN DE <sup>13</sup> C OBSERVADOS EM AFSD-1.....	106
TABELA 12 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE <sup>1</sup> H E HSQC OBSERVADOS EM AFSD-2.....	109
TABELA 13 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE <i>Guettarda uruguensis</i> .....	118
TABELA 14 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DA ESPÉCIE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	122
TABELA 15 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE <i>Guettarda uruguensis</i> FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO <i>Artemia salina</i> .....	127
TABELA 16 - ATIVIDADE LARVICIDA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE <i>Guettarda uruguensis</i> FRENTE AO MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i> .....	129
TABELA 17 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE <i>Guettarda uruguensis</i> CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.....	134
TABELA 18 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	148

TABELA 19 - EFEITO DA ADMINSTRAÇÃO DO EBGF SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	149
TABELA 20 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE AS ATIVIDADES LOCOMOTORA, TIPO-ANSIOLÍTICA E TIPO-ANTIDEPRESSIVA.....	155

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 OBJETIVO GERAL .....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	27
3.1 ASPECTOS FITOQUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Guettarda</i> .....	27
3.1.1 Uso popular de espécies do gênero <i>Guettarda</i> .....	27
3.1.2 Constituintes químicos do gênero <i>Guettarda</i> .....	29
3.1.3 Atividades biológicas do gênero <i>Guettarda</i> .....	37
3.1.4 Considerações sobre a espécie <i>Guettarda uruguensis</i> Cham. & Schtdl., Rubiaceae .....	39
3.1.5 Considerações sobre as espécies <i>Guettarda pohliana</i> Müll. Arg., Rubiaceae e <i>Guettarda viburnoides</i> Cham. & Schtdl., Rubiaceae .....	42
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	45
4.1 COLETA E REGISTRO DO MATERIAL VEGETAL .....	45
4.2 MORFOANATOMIA FOLIAR .....	49
4.3 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA .....	49
4.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO .....	50
4.4.1 Percolação à quente por meio de aparelho de Soxhlet .....	50
4.4.2 Preparo do infuso .....	53
4.4.3 Maceração .....	54
4.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ANALÍTICOS .....	54
4.5.1 Cromatografia em camada delgada .....	54
4.5.2 Cromatografia em coluna .....	55
4.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	56
4.5.4 Ressonância magnética nuclear .....	56
4.5.4 Espectrometria de massas .....	57
4.6 TEOR DE COMPOSTOS FENOLICOS .....	57
4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	58
4.7.1 Redução do complexo fosfomolibdênio .....	58
4.7.2 Captura de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila .....	59

4.7.3	Formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico .....	63
4.8	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE .....	64
4.8.1	Teste de letalidade para náuplios de <i>Artemia salina</i> .....	64
4.8.2	Atividade larvícida contra <i>Aedes aegypti</i> .....	65
4.8.2.1	Determinação de ATP mitocondrial.....	66
4.8.2.1.1	Preparo da suspensão de mitocôndrias .....	66
4.8.2.1.2	Determinação da produção de ATP mitocondrial.....	67
4.9	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	67
4.9	ESQUEMA EXPERIMENTAL .....	69
4.10	ESTUDO FARMACOLÓGICO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO OBTIDO DE FOLHA DA ESPÉCIE <i>Guettarda uruguensis</i> .....	71
4.10.1	Animais.....	71
4.10.2	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina.....	72
4.10.3	Contorções abdominais induzidas por injeção intraperitoneal de ácido acético .....	72
4.10.4	Edema de pata induzido por carragenina.....	72
4.10.5	Peritonite induzida por carragenina .....	73
4.10.6	Proteção gástrica .....	74
4.10.7	Avaliação de motilidade gástrica e trânsito intestinal.....	75
4.10.8	Toxicidade do extrato etanólico bruto obtido de folhas da espécie <i>Guettarda uruguensis</i> por metodologia <i>in vivo</i> .....	76
4.10.8.1	Triagem farmacológica comportamental .....	76
4.10.8.2	Avaliação do ganho ponderal .....	77
4.10.8.3	Análise hematológica .....	77
4.10.8.4	Avaliação do peso relativo dos órgãos .....	77
4.10.8.5	Análise histopatológica.....	77
4.10.9	Avaliação comportamental dos camundondos tratados com o extrato etanólico bruto obtido das folhas de <i>Guettarda uruguensis</i> .....	78
4.10.9.1	Teste do campo aberto.....	78
4.10.9.2	Teste de esconder esferas .....	79
4.10.9.3	Teste de natação forçada.....	79
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	80
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>81</b>

5.1 MORFOANATOMIA FOLIAR DAS ESPÉCIES <i>Guettarda uruguensis</i> , <i>Guettarda pohliana</i> e <i>Guettarda viburnoides</i> .....	81
5.1.1 Morfologia.....	81
5.1.2 Anatomia .....	83
5.1.3 Testes Microquímicos.....	84
5.1.4 Discussão da morfonatomia .....	95
5.2 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA.....	97
5.3 RENDIMENTO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PARTICIONAMENTO ..	98
5.4 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	99
5.5 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS.....	105
5.5.1 Determinação estrutural de AFSD-1 .....	105
5.5.2 Determinação estrutural de AFSD-2 .....	108
5.5.3 Determinação estrutural de AFSD-3, AFSD-4 e AFSD-5 .....	110
5.6 ANÁLISE DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE <i>Guettarda uruguensis</i> .....	117
5.6.1 Teor de compostos fenólicos.....	117
5.6.2.1 Método do fosfomolibdênio .....	118
5.6.2.2 Método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).....	119
5.6.2.3 Teor de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	120
5.6.3 Análise da atividade antioxidante .....	121
5.6.4 Correlação de Pearson e análise das componentes principais .....	124
5.7 TOXICIDADE PARA NÁUPLIOS DE <i>Artemia salina</i> .....	127
5.8 TOXICIDADE PARA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	129
5.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	133
5.10 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA .....	135
5.10.1 Nocicepção induzida por ácido acético .....	135
5.10.2 Nocicepção induzida por formalina .....	136
5.10.3 Avaliação da atividade locomotora .....	137
5.10.4 Atividade anti-inflamatória do EBGF.....	137
5.10.4.1 Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina .....	137
5.10.4.2 Peritonite induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina .....	139
5.10.5 Considerações sobre o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do EBGF ..	139

5.11 GASTROPROTEÇÃO E MOTILIDADE GASTROINTESTINAL .....	142
5.12 ESTUDO TOXICOLÓGICO IN VIVO.....	144
5.12.1 Sinais Clínicos.....	145
5.12.2 Ganho ponderal e peso relativo dos órgãos.....	145
5.12.3 Determinação dos parâmetros hematológicos .....	148
5.12.4 Determinação dos parâmetros bioquímicos .....	149
5.12.5 Avaliação histopatológica de fígado, rim e estômago .....	151
5.13 ATIVIDADES COMPORTAMENTAIS.....	152
5.13.1 Teste do campo aberto.....	152
5.13.2 Teste de esconder esferas .....	153
5.13.3 Teste de natação forçada.....	154
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>156</b>
REFERÊNCIAS.....	158
ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO .....	172
ANEXO B - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPR.....	173
ANEXO C – DECLARAÇÃO DE FORNECIMENTO DE ANIMAIS .....	174

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais nos remete ao princípio da evolução do homem na terra. Através da observação do comportamento instintivo dos animais, o homem primitivo percebeu de modo empírico que algumas plantas apresentam propriedades medicinais. Através de expedições, a humanidade teve contato com ervas, raízes e outras especiarias na forma de chás, essências, corantes e venenos (PINTO, 1995; PINTO et al., 2002; CALIXTO, 2005).

As plantas medicinais, além de serem utilizadas popularmente, também são fonte para obtenção de fármacos utilizados na clínica médica, como por exemplo a morfina, a primeira substância pura com atividade biológica isolada de uma planta (*Papaver somniferum*), a ser documentada oficialmente em 1804 pelo farmacêutico Friedrich Setürner (LI e VEDERAS, 2009).

O Brasil abriga aproximadamente 22% de todas as espécies de Angiospermas. É um país rico em biodiversidade, mesmo considerando o elevado índice de desmatamento, fato que gera áreas de *hotspot*<sup>1</sup>, como o Cerrado e a Floresta Atlântica. Contudo, mesmo contando com uma significativa variedade de plantas, muitas com indicação medicinal, apenas uma pequena parcela desse total tem algum estudo químico ou farmacológico. Portanto, na busca por novos fármacos, a exploração racional da biodiversidade brasileira é um tema recorrente e que merece investimento (BOLZANI et al., 1999).

A bioprospecção auxiliada por testes biológicos é uma forma racional para a busca de fármacos de origem vegetal, auxiliando a identificação de uma variedade de metabólitos secundários com bioatividade, uma vez que muitas famílias botânicas estão associadas a classes específicas de substâncias, sendo que inúmeras espécies continuam sem qualquer estudo químico e/ou biológico (SOEJARTO, 1996).

Na flora brasileira, há cerca de 2.000 espécies divididas em 120 gêneros (SOUZA; LORENZI, 2005) que ocorrem nos mais variados ecossistemas como a Amazônia, Floresta Atlântica e Cerrado. A família Rubiaceae é um dos maiores táxons de Angiospermas. Verificado o grande número de espécies ainda sem qualquer estudo químico e biológico, a prospecção da família é de grande

---

<sup>1</sup> *hotspots* são ecossistemas com elevada concentração de espécies endêmicas e intensa perda de habitat, onde priorizam-se esforços para proteção da biodiversidade.

importância científica e tecnológica. A quimiosistemática demonstra que cada subfamília de Rubiaceae é caracterizada pela predominância de uma classe de metabólito secundário, particularmente os iridoides, alcaloides indólicos, antraquinonas e triterpenos que são os principais quimiomarcadores da família Rubiaceae (BOLZANI, 2001). Nessa família, encontram-se espécies de valor medicinal, alimentar e econômico, como por exemplo: *Coffea arabica* L., conhecida como cafeeiro, planta utilizada no preparo do café, fonte de cafeína, uma metilxantina com diversas propriedades farmacológicas, utilizada em formulações farmacêuticas (SIMÕES et al., 2001); *Cephaelis ipecacuanha* (Brotero) Richard, conhecida como ipeca, possui em sua raiz a emetina, um poderoso emético (MORS et al., 1995); *Cinchona officinalis* L., fonte de obtenção de quina, um antimalárico; *Uncaria tomentosa* (Wild) DC., conhecida como unha de gato, fonte de alcalóides, glicosídeos do ácido quinóico, utilizada como imunostimulante e anti-inflamatório, possui produtos à base dessa planta introduzidos no mercado farmacêutico e faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (HEITZMAN et al., 2005); *Psychotria viridis* Ruiz & Pav, conhecida como chacrona, é uma planta de onde se extrai o alcaloide N,N-dimetiltriptamina, que em associação com outra espécie, a *Banisteriopsis caapi* (Spruce) Morton. ex. Briesb (Malpighiaceae), pode ser utilizada no preparo de uma bebida ritualística e medicinal conhecida como Ayahuasca (CALLAWAY et al., 1996; GROB et al., 1996).

As espécies de *Guettarda*, importante gênero da família Rubiaceae, também estão sendo estudadas sobre a perspectiva da química de produtos naturais (BRILLANCEAU et al., 1984; BHATTACHARYYA & ALMEIDA, 1985; FERRARI et al., 1986; KAN-FAN et al., 1986; FERRARI et al., 1986; AQUINO et al., 1988; CAPASSO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2008; LIMA et al., 2009; MOURA, 2011; TESTA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; DUARTE et al., 2014; DUARTE et al., 2016; NARESSI et al., 2015). No Brasil, espécies desse gênero são encontradas em todas as regiões do país. No sul, especificamente na Floresta Atlântica, o gênero está representado pelas espécies nativas *Guettarda uruguensis* Cham. & Schltl., Rubiaceae e *Guettarda viburnoides* Cham. & Schltl., Rubiaceae. Apesar de não ser utilizada na medicina popular, extratos e frações obtidos das cascas do caule da espécie *Guettarda uruguensis* apresentaram resultados promissores no que se refere ao seu potencial antioxidante, antimicrobiano e citotóxico (DUARTE, 2012; DUARTE et al., 2014). Entretanto, os estudos envolvendo a espécie *Guettarda*



*uruguensis* são preliminares, sendo necessária a continuidade do estudo fitoquímico e farmacológico da espécie, explorando as partes vegetativas que ainda não foram estudadas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo fitoquímico, e avaliar as atividades antioxidante, citotóxica, larvicida, antimicrobiana, antinociceptiva, anti-inflamatória, e tóxica de *Guettarda uruguensis*. Realizar o estudo morfoantômico de *Guettarda uruguensis*, *Guettarda pohliana* e *Guettarda viburnoides*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar as espécies *Guettarda uruguensis*, *Guettarda pohliana* e *Guettarda viburnoides*.
- Realizar um estudo morfoanatômico comparativo entre as espécies *Guettarda uruguensis*, *Guettarda pohliana* e *Guettarda viburnoides*.
- Objetivos relacionados especificamente com a espécie *Guettarda uruguensis*:
  - Obter e fracionar os extratos etanólicos obtidos a partir de folha e flor.
  - Obter os extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente a partir do órgão vegetal fruto.
  - Obter os extratos aquosos e alcaloídicos a partir de folha e flor.
  - Identificar metabólitos secundários.
  - Determinar o conteúdo total de compostos fenólicos dos extratos e frações obtidos folha, flor e fruto.
  - Avaliar a atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto.
  - Avaliar a toxicidade *in vitro* dos extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto.
  - Caracterizar o perfil antimicrobiano dos extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto.
  - Avaliar a atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, antiulcerogênica, ação sobre a motilidade gastrointestinal, atividade locomotora, comportamental e tóxica do extrato etanólico bruto obtido de folha.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ASPECTOS FITOQUÍMICOS E FARMACOLÓGICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Guettarda*

*Guettarda* é um gênero da família Rubiaceae e suas espécies distribuem-se pelo leste da África, ilhas dos Oceanos Índico e Pacífico e regiões neotropicais (ACHILLE et al., 2006). O Brasil conta com 19 espécies nativas, localizadas nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e Pampa (BARBOSA, 2015). O gênero é formado por 157 espécies e observam-se 90 sinonímias (THE PLANT LIST, 2010). A presente revisão de literatura sobre o gênero *Guettarda* descreve as indicações etnomedicinais, perfil químico e as atividades biológicas e farmacológicas de espécies do gênero *Guettarda*.

##### 3.1.1 Uso popular de espécies do gênero *Guettarda*

Algumas espécies do gênero *Guettarda* são utilizadas na medicina popular (TABELA 1). O tratamento de afecções clínicas relacionadas a um quadro inflamatório inicial parece estar ligado ao uso popular mais descrito. Até o momento, tem-se registro em literatura do uso popular com finalidade medicinal para as espécies *Guettarda acreana* K. Krause, *Guettarda angelica* Mart. ex Müll. Arg., *Guettarda coccinea* Aubl., *Guettarda macranta* Benth., *Guettarda platypoda* DC. e *Guettarda viburnoides* Cham. & Schldl.

Considerando o levantamento etnofarmacológico que demonstra a diversidade de propriedades medicinais atribuídas a algumas espécies do gênero, fica clara a necessidade e a importância de estudos na área de química de produtos naturais que abordem aspectos fitoquímicos e farmacológicos do gênero *Guettarda*.

TABELA 1 – USO POPULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Guettarda*.

<b>Espécie</b>	<b>Parte</b>	<b>Local</b>	<b>Uso popular</b>	<b>Referência</b>
<i>G. acreana</i>	Caule	Guianas	Fabricação do curare	FANSHAWE, 1950, MENNEGA et al., 1988, JOHNSTON, 1996
<i>G. angelica</i>	Raiz	Nordeste/Brasil	Cólica menstrual, constipação, febre	AGRA et al., 2007a; AGRA et al., 2007b; ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2008
			Febre, malária	MATOS, 1997
<i>G. coccinea</i>	Folha	Amazônia/Brasil	Diabetes, hepatite	COELHO-FERREIRA, 2009
		Guiana Francesa	Edema	PLOTKIN et al., 1775, HECKEL, 1897, BREMEKAMP, 1934
<i>G. macrantha</i>	Folha	Guianas	Dor de cabeça	GRENAND et al., 1987
<i>G. platypoda</i>	Raiz	Nordeste/Brasil	Cólica menstrual, constipação, febre	AGRA et al., 2007a; AGRA et al., 2007b; ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2008
<i>G. speciosa</i>	Caule	Ilhas Fiji/Polinésia	Promover menstruação, infecções maternas pós-parto	WEINER, 1971, WEINER, 1984
	Folha		Alívio da tosse, resfriado, dor de garganta	
	Casca do caule		Conjuntivite	
	Caule	Tuvalu/Polinésia	Epilepsia	
	Casca		Promover a menstruação	
	Casca		Diminuir o sangramento vaginal no pós-parto	
	Casca/folha		Amenorreia secundária	
		Tahiti	Antidiarreica, febrífuga, anticolinérgica	
	Casca	Nova Guiné	Disenteria, feridas	
	Folha	Micronésia/Oceania	Erupções cutâneas pruriginosas	
	Folha		Hemorroida	
Casca	Edema			
<i>G. viburnoides</i>		Pantanal/Brasil	Purificar sangue, diurético, úlcera, câncer de próstata, doenças cardíacas	BIESKI et al., 2012
			Indigestão	POVH e ALVES, 2013

FONTE: o autor (2017).

### 3.1.2 Constituintes químicos do gênero *Guettarda*

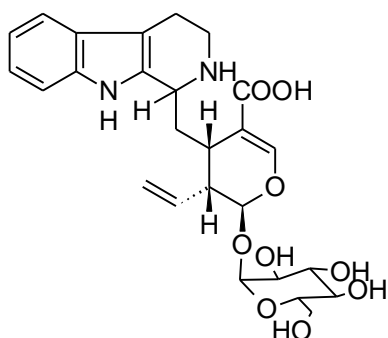
Com relação a química do gênero *Guettarda*, tem-se descritos alcaloides, triterpenos, saponinas triterpênicas do tipo ursano, iridoides e secoiridoides, triterpenos do grupo oleano, derivados do ácido quínico, fitoesteróis e outros compostos químico. Entretanto, as saponinas com núcleo de natureza triterpênica são os compostos mais descritos para o gênero *Guettarda*.

É importante notar que uma grande variedade de atividades biológicas é atribuída aos alcaloides, tais como agonistas e/ou antagonistas para receptores nicotínicos, muscarínicos, alfa e beta adrenérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, gabaérgicos, glutamato e opiáceos. Existem também alcaloides que atuam nos canais de sódio, cálcio e potássio e aqueles que têm efeitos inibitórios na acetilcolinesterase ou inibem a reabsorção de neurotransmissores (CORDELL et al., 2001). Os alcaloides indólicos ocorrem nas famílias Loganiaceae, Apocynaceae e Rubiaceae (VERPOORTE, 1998; BRUNETON, 1995), são marcadores químicos padronizados na subfamília Cinchonoideae (WIJINSMA e VERPOORTE, 1986; BOLZANI et al., 2001), especialmente na tribo Gettardeae (INOUYE et al., 1988). Embora os alcaloides indólicos sejam bastante frequentes em todas as subfamílias de Rubiaceae, também podem ocorrer em alguns gêneros os alcaloides quinolínicos (KERBER, 1999). Dois tipos de alcaloides, indólicos e quinolinicos, ocorrem no gênero *Gettarda* (TABELA 2). Catenamina (6) e 4,21-dehidrogeissoschizina (7) isolados das folhas de *G. eximia* são compósitos intermediários na produção enzimática de alcaloides do tipo heteroiohimbina. A gettardine isolada da casca de *G. heterosepala* é um elo importante na biossíntese dos alcaloides do tipo Corinanteano e Cinchonamina, precursores da quinina.

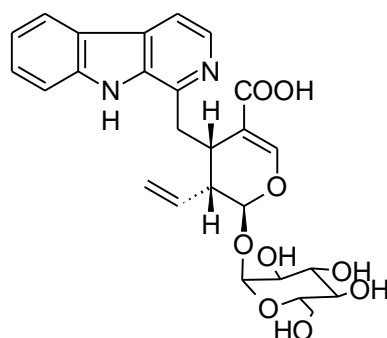
TABELA 2 – ALCALOIDES IDENTIFICADOS NO GÊNERO *Guettarda*.

No	Substância	Parte	Espécie	Referência
1	Ácido strictosidínico	folha	<i>G. acreana</i>	CAPASSO et al., 1998
2	Ácido lialosídico	folha	<i>G. acreana</i>	CAPASSO et al., 1998
3	Estrictosidina	folha	<i>G. acreana</i>	CAPASSO et al., 1998
4	Sickingina	folha	<i>G. acreana</i>	CAPASSO et al., 1998
5	5 $\alpha$ -carboxiestrictosidina	raiz	<i>G. ovalifolia</i>	JIANG et al., 1994
		raiz	<i>G. platyphoda</i>	FERRARI et al., 1986
		folha	<i>G. acreana</i>	CAPASSO et al., 1998
6	Catenamina	folha	<i>G. eximia</i>	HUSSON et al., 1977
7	4,21-dehidrogeissoschizina	folha	<i>G. eximia</i>	KAN-FAN & HUSSON, 1979
8	Antirina	folha	<i>G. heterosepala</i>	KAN-FAN et al., 1986
9	3-epi-antirina	folha	<i>G. heterosepala</i>	KAN-FAN et al., 1986
10	Guettardina	caule	<i>G. heterosepala</i>	BRILLANCEAU et al., 1984
11	Cupreína	caule	<i>G. noumeana</i>	MONTAGNAC et al., 1997
12	Dihidrocupreína	caule	<i>G. noumeana</i>	MONTAGNAC et al., 1997
13	N-metilquinicinol	caule	<i>G. noumeana</i>	MONTAGNAC et al., 1997
14	N-metildihidroquinicinol	caule	<i>G. noumeana</i>	MONTAGNAC et al., 1997
		caule	<i>G. trimera</i>	KAN-FAN et al., 1985
15	9-epi-N-metildihidroquinicinol	caule	<i>G. trimera</i>	KAN-FAN et al., 1985
16	N-metildihidroquinicinina	caule	<i>G. trimera</i>	KAN-FAN et al., 1985

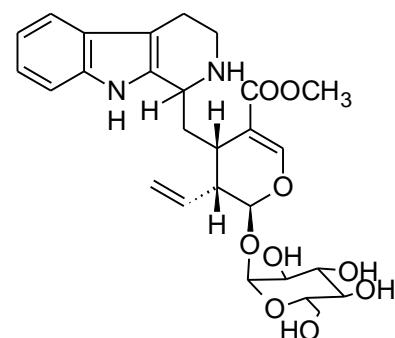
FONTE: o autor (2017).



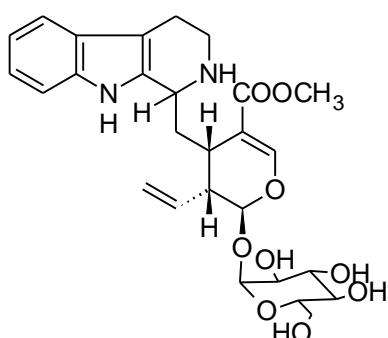
(1)



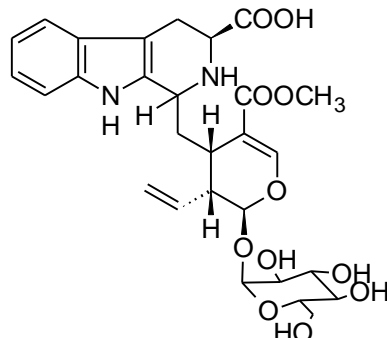
(2)



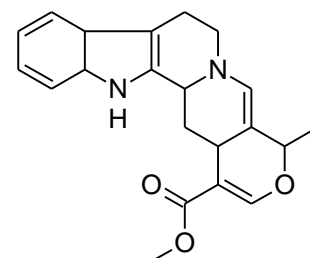
(3)



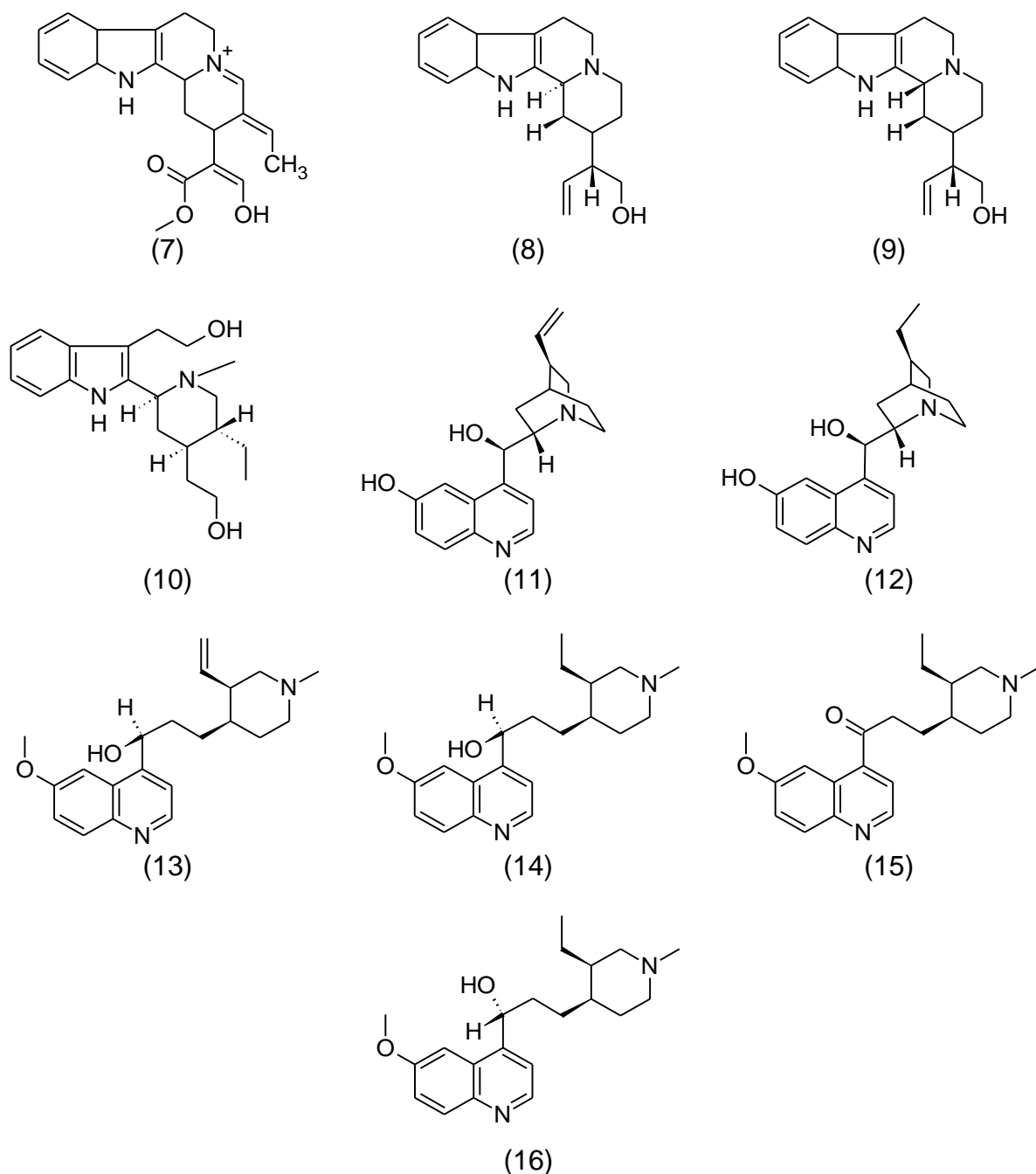
(4)



(5)



(6)



Estudos quimiotaxonômicos sugerem que a presença de três grupos distintos de iridóides na família Rubiaceae pode representar um padrão de tendência evolutiva (INOUE et al., 1988). Espécies da subfamília Cinchoneideae produzem compostos de relevância quimiotaxonômica, como a loganina, um precursor de secologanina, ocorrendo na via biossintética dos alcaloides indol monoterpêno (BRUNETON, 1995).

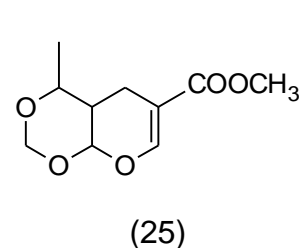
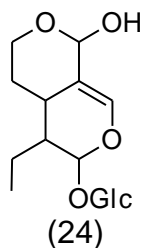
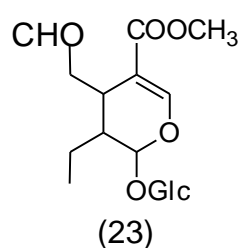
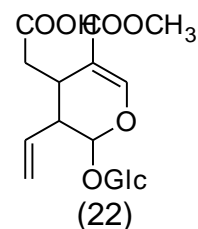
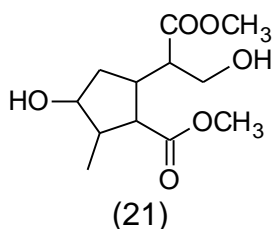
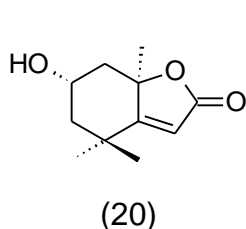
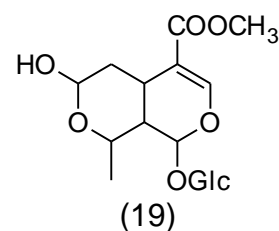
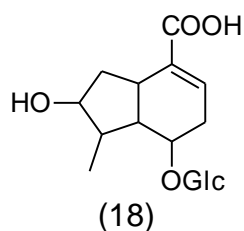
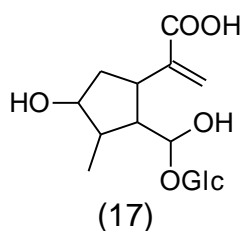
O estudo fitoquímico de extratos de clorofórmio obtidos da casca do caule e do caule de *G. grazielae* identificou um novo iridoide, até então inédito, denominado

guettardodiol e a sarracenina descrita pela primeira vez no gênero *Guettarda* por Moura et al. (2011). Na TABELA 3 encontram-se listados os iridoídeos identificados no gênero.

TABELA 3 – IRIDOÍDEOS IDENTIFICADOS NO GÊNERO *Guettarda*

No	Substância	Parte	Espécie	Referência
17	Ácido logânico	raiz	<i>G. platypoda</i>	AQUINO et al., 1988
		folha	<i>G. speciosa</i>	INOUYE et al., 1988
18	Loganina	raiz	<i>G. platypoda</i>	AQUINO et al., 1988
		nd	<i>G. speciosa</i>	YAGA & KAZUHIKO, 1985
		raiz	<i>G. pohliana</i>	OLIVEIRA et al., 2013
19	Morrinosol	raiz	<i>G. platypoda</i>	FERRARI et al., 1986
		raiz	<i>G. platypoda</i>	AQUINO et al., 1988
		caule	<i>G. grazielae</i>	MOURA, 2011
20	Loliolida	folha	<i>G. pohliana</i>	TESTA et al., 2012
21	Guettardodiol	casca	<i>G. grazielae</i>	MOURA, 2011
		caule	<i>G. grazielae</i>	MOURA, 2011
22	Secoxiloganina	raiz	<i>G. platypoda</i>	AQUINO et al., 1988
		folha	<i>G. pohliana</i>	TESTA et al., 2012
		raiz	<i>G. pohliana</i>	OLIVEIRA et al., 2013
		folha	<i>G. viburnoides</i>	NARESSI et al., 2015
23	Secologanina	folha	<i>G. speciosa</i>	INOUYE et al., 1988
24	Swerosídeo	raiz	<i>G. platypoda</i>	FERRARI et al., 1986
		raiz	<i>G. platypoda</i>	AQUINO et al., 1988
		raiz	<i>G. pohliana</i>	OLIVEIRA et al., 2013
25	Sarracenin	s	<i>G. grazielae</i>	MOURA, 2011

FONTE: o autor (2017).





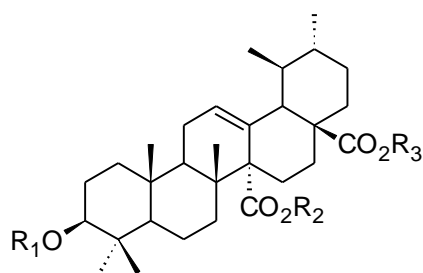
Os triterpenos pentacíclicos são frequentemente distribuídos por todo o reino vegetal, em sua forma livre, como agliconas ou na forma de saponinas. O subgrupo mais comum no gênero *Guettarda* são os triterpeno ácidos, especialmente os glicosídeos de ácido quinovico. Muitas destas saponinas estão ligadas a grupamentos carboxílicos pelas posições C-28 e C-27. Os grupos hidroximetil (CH<sub>2</sub>OH) também podem ser encontrados em posições C-23 ou C-24 em várias estruturas. Os glicosídeos normalmente são ligados a posição 3-hidroxilo por uma ligação glicosídica, bis-glicósido ou por meio de uma ligação éster em C-28 ou C-27. Glicosídeos do ácido quinovico com um padrão de glicosilação em C-3, C-27 são raros na natureza e foram encontrados somente em *G. platypoda*, *Uncaria guianensis* e *Uncaria tomentosa*, demonstrando um perfil metabólico característico dos dois gêneros. A glicose, galactose e ramnose são os glicosídeos mais comumente encontrados em associação ao ácido quinóvico no gênero *Guettarda*. Na TABELA 4 estão listados os esteroides, triterpenos e saponinas identificadas e descritas em literatura para o gênero *Guettarda*.

TABELA 4 – TRITERPENOS, ESTERÓIDES E SAPONINAS IDENTIFICADAS NO GÊNERO *Guettarda*.

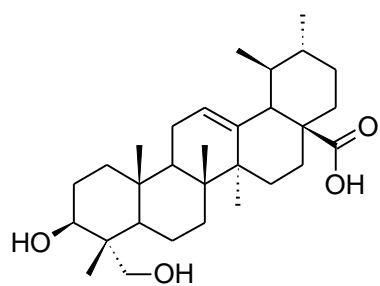
No	Substância	Parte	Espécie	Referência
26	Acetato de $\alpha$ -amirina	caule	<i>G. grazielae</i>	MOURA, 2011
		caule	<i>G. pohliana</i>	LIMA et al., 2009
27	Ácido ursólico	folha	<i>G. pohliana</i>	TESTA et al., 2012
		folha	<i>G. grazielae</i>	LIMA et al., 2009
		folha	<i>G. viburnoides</i>	NARESSI et al., 2015
28	Ácido quinóvico	casca	<i>G. angelica</i>	MATOS et al., 1986
			<i>G. angelica</i>	SOUZA et al., 1984
		casca	<i>G. platypoda</i>	BHATTACHARYYA & ALMEIDA, 1985
		raiz	<i>G. pohliana</i>	OLIVEIRA et al., 2008
		raiz	<i>G. platypoda</i>	FERRARI et al., 1986
29	Quinovic acid 3 $\beta$ -O- $\beta$ -D-fucopyranoside	casca	<i>G. angelica</i>	MATOS et al., 1986
		raiz	<i>G. platypoda</i>	FERRARI et al., 1986
30	3 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosil-quinóvico	folha	<i>G. acreana</i>	CAPASSO et al., 1998
		raiz	<i>G. angelica</i>	AQUINO et al., 1988
		caule, folha	<i>G. grazielae</i>	LIMA et al., 2009
		caule	<i>G. grazielae</i>	MOURA, 2011
		casca	<i>G. angelica</i>	SOUZA et al., 1984
31	Quinovic acid 3 $\beta$ -O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside	casca	<i>G. angelica</i>	MATOS et al., 1986
		casca	<i>G. angelica</i>	MATOS et al., 1986
32	Quinovic acid-(28 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-fucopyranosyl ester	casca	<i>G. platypoda</i>	AQUINO et al., 1989

No	Substância	Parte	Espécie	Referência
33	Quinovic acid 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-fucopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside]	casca	<i>G. platypoda</i>	AQUINO et al., 1989
34	Quinovic acid-(28 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester	casca	<i>G. platypoda</i>	AQUINO et al., 1989
35	Ácido 3 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosil-(28 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glicopiranosilester quinóvico	raiz	<i>G. platypoda</i>	AQUINO et al., 1988
		casca	<i>G. angelica</i>	MATOS et al., 1986
		raiz	<i>G. pohliana</i>	OLIVEIRA et al., 2008
36	Quinovic acid 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(28 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester	casca	<i>G. platypoda</i>	AQUINO et al., 1989
37	Ácido 3 $\beta$ -O-[ $\beta$ -D-glicopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosídeo] quinóvico	casca	<i>G. angelica</i>	MATOS et al., 1986
38	Quinovic acid 3 $\beta$ -O- $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -glucopyranoside	folha	<i>G. acreana</i>	CAPASSO et al., 1998
39	Quinovic acid 3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(27 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester	raiz	<i>G. platypoda</i>	AQUINO et al., 1988
40	Quinovic acid 3-O- $\beta$ -D-fucopyranosyl-(27 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -D-glucopyranosyl ester	folha	<i>G. acreana</i>	CAPASSO et al., 1998
41	3 $\beta$ ,23-dihydroxyurs-12-en-28-oic acid	raiz	<i>G. angelica</i>	SOUZA et al., 1984
42	Ácido rontúndico	raiz	<i>G. angelica</i>	SOUZA et al., 1984
		casca	<i>G. platypoda</i>	BHATTACHARYYA & ALMEIDA, 1985
		folha	<i>G. pohliana</i>	TESTA et al., 2012
		folha	<i>G. viburnoides</i>	NARESSI et al., 2015
43	Ácido uncárico	folha	<i>G. viburnoides</i>	NARESSI et al., 2015
44	Ácido pomólico	folha	<i>G. pohliana</i>	TESTA et al., 2012
45	Ácido clétrico	folha	<i>G. pohliana</i>	TESTA et al., 2012
46	3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23-trihydroxyurs-12-ene	caule	<i>G. pohliana</i>	LIMA et al., 2009
47	3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23-tetrahydroxyurs-12-en-28-oic	caule	<i>G. pohliana</i>	LIMA et al., 2009
		folha	<i>G. pohliana</i>	TESTA et al., 2012
48	Cicloartenona	folha	<i>G. pohliana</i>	LIMA et al., 2009
49	Sitostenona	folha	<i>G. pohliana</i>	LIMA et al., 2009
50	28-O- $\beta$ -D-glycopyranosyl quinovic acid	raiz	<i>G. pohliana</i>	OLIVEIRA et al., 2008
51	3-O- $\beta$ -D-quinovopyranosyl-28-O- $\beta$ -D-glycopyranosyl quinovic acid	raiz	<i>G. pohliana</i>	OLIVEIRA et al., 2008
52	3-O- $\beta$ -D-glycopyranosyl-28-O- $\beta$ -D-glycopyranosyl cincholic acid	raiz	<i>G. pohliana</i>	OLIVEIRA et al., 2008
53	Hederagenina	raiz	<i>G. angelica</i>	SOUZA et al., 1984
54	Ácido oleanólico	folha	<i>G. pohliana</i>	TESTA et al., 2012
55	$\beta$ -sitosterol	caule	<i>G. grazielae</i>	MOURA,2011
		folha	<i>G. viburnoides</i>	NARESSI et al., 2015
		folha	<i>G. pholiana</i>	TESTA et al., 2012
		casca	<i>G. platypoda</i>	BHATTACHARYYA & ALMEIDA, 1985
56	Stigmasterol	folha	<i>G. viburnoides</i>	NARESSI et al., 2015
		folha	<i>G. pholiana</i>	TESTA et al., 2012
57	Daucosterol	raiz	<i>G. pohliana</i>	OLIVEIRA et al., 2008
		folha	<i>G. pohliana</i>	TESTA et al., 2012
58	Campesterol	folha	<i>G. pholiana</i>	TESTA et al., 2012

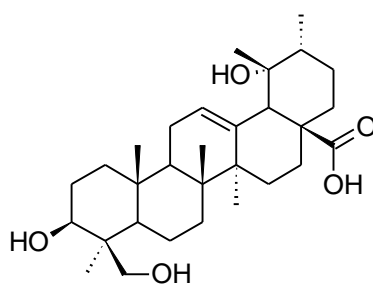
FONTE: o autor (2017).



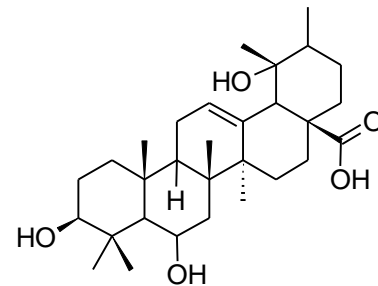
No	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
(26)	OAc	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
(27)	OH	COOH	CH <sub>3</sub>
(28)	H	H	H
(29)	Fuc	H	H
(30)	Glc	H	H
(31)	Rham	H	H
(32)	H	H	Fuc
(33)	Fuc-Glc	H	H
(34)	H	H	Glc
(35)	Glc	H	Glc
(36)	Glc-(1→3)-Rham	H	Glc
(37)	Glc-(1→3)-Rham	H	H
(38)	Rham-(1→3)-Glc-(1→6)-Glc	H	H
(39)	Glc	Glc	H
(40)	Fuc	Glc	H
(50)	H	H	Glc
(51)	Quin	H	Glc



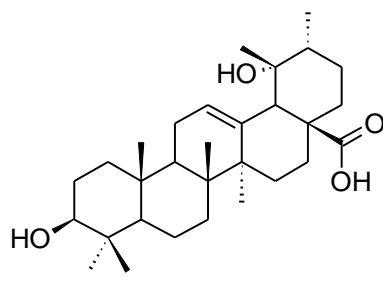
(41)



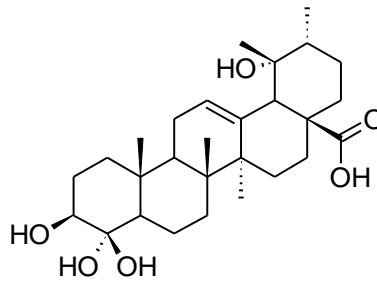
(42)



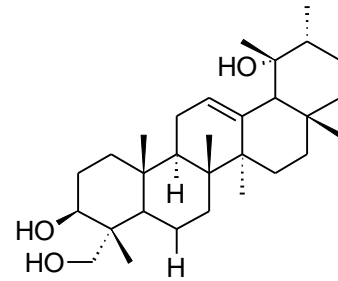
(43)



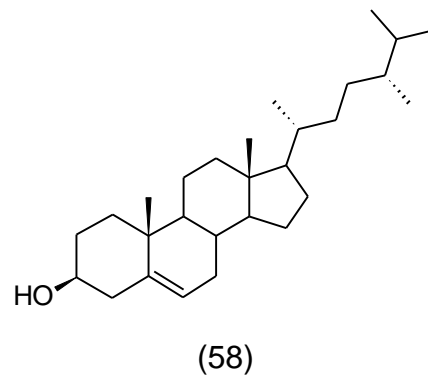
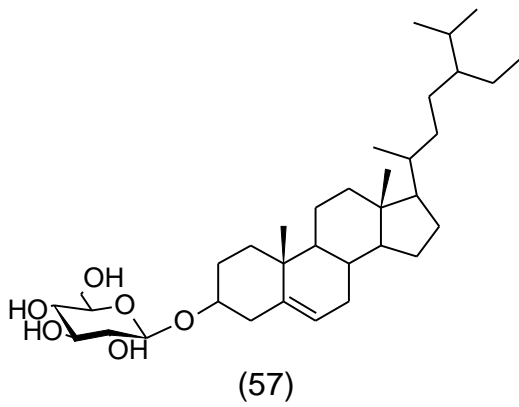
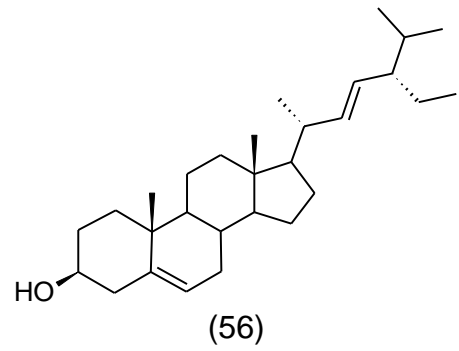
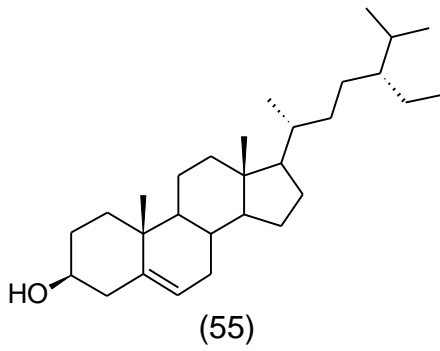
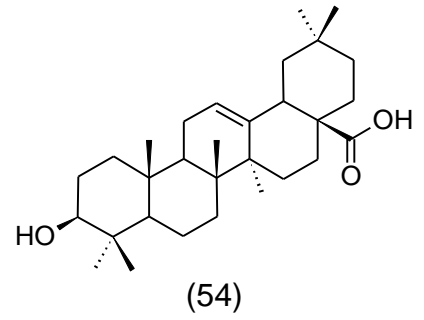
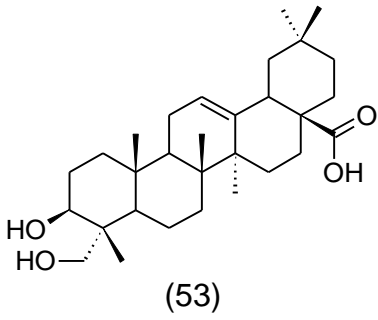
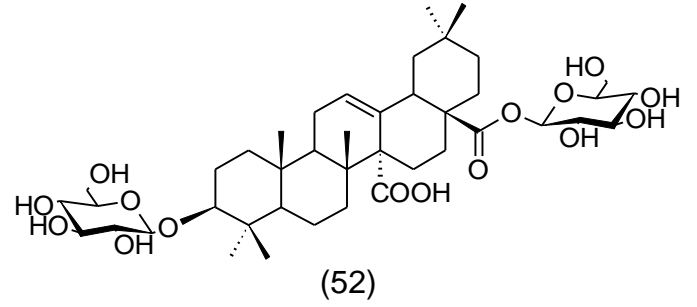
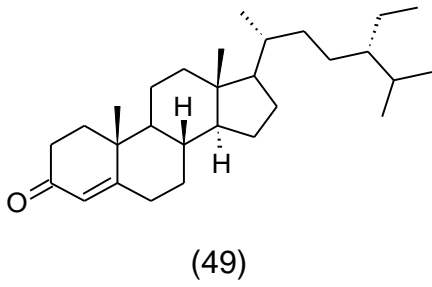
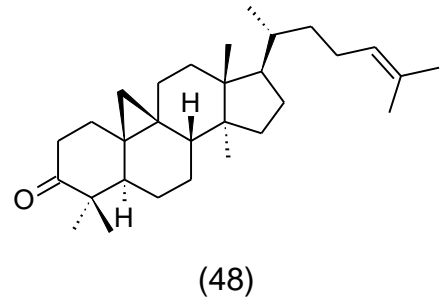
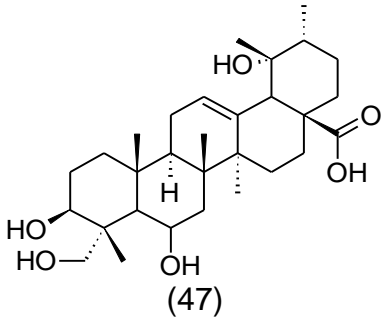
(44)



(45)



(46)

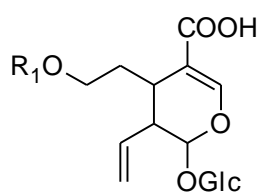


Para o gênero *Guettarda* foram identificados, em menor proporção, outros compostos, como por exemplo os derivados de ácidos fenólicos e flavonoides, além de uma porfirina e grandifloroside (TABELA 5).

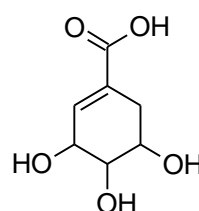
TABELA 5 – OUTROS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO GÊNERO *Guettarda*.

No	Substância	Parte	Espécie	Referência
59	Grandifloroside	folha	<i>G. viburnoides</i>	NARESSI et al., 2015
60	Ácido chiquímico	folha	<i>G. acreana</i>	CAPASSO et al., 1998
61	Ácido 5-cafeoilquínico	folha	<i>G. pohliana</i>	TESTA et al., 2012
		folha	<i>G. acreana</i>	CAPASSO et al., 1998
62	Ácido 4,5-dicafeoilquínico	raiz	<i>G. pohliana</i>	OLIVEIRA et al., 2008
		folha	<i>G. acreana</i>	CAPASSO et al., 1998
63	Quercetina-3-O-B-D-galactopiranosideo	folha	<i>G. viburnoides</i>	NARESSI et al., 2015
64	Quercetina-3-O-B-D-glucopiranosideo	folha	<i>G. viburnoides</i>	NARESSI et al., 2015
65	Feofitina a	folha	<i>G. platypoda</i>	RODRIGUES, 2013

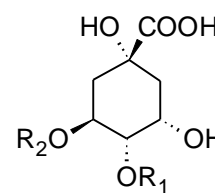
FONTE: o autor (2017).



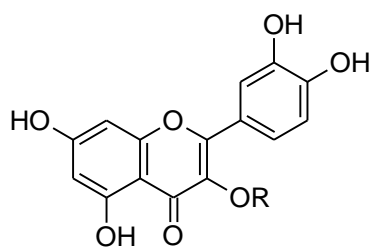
(59) R<sub>1</sub>=cafeoyl



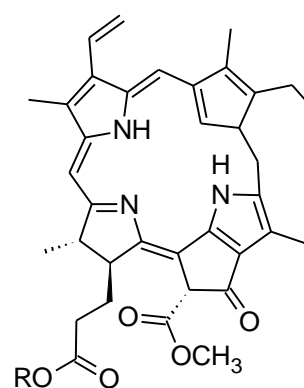
(60)



(61) R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=cafeoyl  
(62) R<sub>1</sub>=cafeoyl



(63) R=β-D-galactopyranosyl  
(64) R= β-D-glucopyranosyl



(65) R=C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>

### 3.1.3 Atividades biológicas do gênero *Guettarda*

Com relação às atividades biológicas, observa-se que as espécies do gênero *Guettarda* possuem elevado potencial de aplicação biológica, e nesse campo ainda há muito a ser pesquisado. Até o momento, apenas algumas atividades biológicas

do gênero foram investigadas (TABELA 6). As indicações de uso popular de espécies do gênero *Guettarda* revelam uma ampla gama de propriedades medicinais. Por exemplo, *G. angélica* tem sido utilizada popularmente para tratar cólicas menstruais, constipação, febre, malária, diabetes, hepatite, enquanto que *G. viburnoides* é utilizada no combate ao câncer de próstata e diurético. No entanto, pesquisas avaliaram até o momento apenas a atividade antiviral e antimicrobiana do extrato de *G. angelica*, enquanto que *G. viburnoides* foi estudada apenas com relação as suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Além desse fato, observa-se que várias espécies utilizadas popularmente não foram investigadas. Essa análise indica que embora o gênero possua diversas espécies que possuem relatos de uso etnomedicinal, ainda há muito a ser estudado no sentido de se comprovar o uso popular eficaz e seguro. Com relação à toxicidade, a espécie *G. platypoda* foi avaliada, demonstrando não ser tóxica quatorze dias após o tratamento agudo (2000 e 3000 mg/kg). Nesse estudo o exame macroscópico não revelou alteração nos órgãos, apenas alguns sinais, tais como inquietação, sonolência, piloereção e cauda tremendo, foram registrados por Pina et al. (2012). Portanto, pensando em bioprospecção, o acima exposto é muito relevante para informações sobre a elegibilidade de extratos ou compostos químicos. Até o momento, as atividades biológicas descritas para as espécies de *Guettarda* apresentam amplo espectro de ação, demonstrando por exemplo ação anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antimicrobiana e anticonvulsivante.

TABELA 6 – ATIVIDADES BIOLÓGICAS ATRIBUIDAS A ESPÉCIES DO GÊNERO *Guettarda*.

Atividade Biológica	Espécie	Parte	Referência
Antiespasmódica	<i>G. acreana</i>	folha	CAPASSO et al., 1998
Antimicrobiana	<i>G. uruguensis</i>	raiz, folha, flor	DUARTE et al., 2014; DUARTE et al., 2016
	<i>G. viburnoides</i>	folha	RAMOS, 2008
	<i>G. angelica</i>		BISPO et al., 2007
	<i>G. sericea</i>	nd	TEIXEIRA et al., 2014
	<i>G. speciosa</i>		THAMIZHVANAN et al., 2010
Anti-inflamatória	<i>G. viburnoides</i>	folha	NARESSI et al., 2015
	<i>G. pohliana</i>	folha, raiz	TESTA et al., 2012
	<i>G. platypoda</i>	raiz	PINA et al., 2012
Larvicida	<i>G. grazielae</i>	semente, casca do caule, folha	OLIVEIRA et al., 1010
Moluscicida	<i>G. pohliana</i>	folha	TESTA et al., 2007
Antioxidante	<i>G. viburnoides</i>	folha	NARESSI et al., 2015
	<i>G. uruguensis</i>	raiz, folha, flor	DUARTE et al., 2014; DUARTE et al., 2016

	<i>G. platypoda</i>	folha	
Antiviral	<i>G. platypoda</i>	compostos químicos isolados	AQUINO et al., 1989
	<i>G. angelica</i>	semente	BARROS et al., 2013
Antidiarreica	<i>G. speciosa</i>	casca do caule	GANDHIMATHI et al., 2009
Anticonvulsivante	<i>G. speciosa</i>	casca do caule	ARUMUGAM et al., 2009
	<i>G. speciosa</i>	casca do caule	SARAVANA KUMAR E GANDHIMATHI, 2009
	<i>G. speciosa</i>	casca do caule	SARAVANA KUMAR E GANDHIMATHI, 2010
	<i>G. spruceana</i>	planta toda	QUINTANS-JUNIOR et al., 2002
Citotóxica	<i>G. platypoda</i>	raiz	PINA et al., 2012
	<i>G. uruguensis</i>	raiz, folha, flor	DUARTE, 2012; DUARTE et al., 2016
	<i>G. pohliana</i>	raiz, folha	OLIVEIRA et al., 2013
	<i>G. platypoda</i>	raiz	PINA et al., 2012
Antiulcerogênica	<i>G. speciosa</i>	lb	REDDY et al., 2010
Antimalárica	<i>G. speciosa</i>	flor	KAOU et al., 2008
Toxicidade	<i>G. platypoda</i>	casca do caule	PINA et al., 2012

FONTE: o autor (2017).

### 3.1.4 Considerações sobre a espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schtdl., Rubiaceae

*Guettarda uruguensis* Cham. & Schtdl. (FIGURA 1) conhecida popularmente como veludinho, palo-cruz e jasmim uruguaio, possui frutos comestíveis e flores extremamente aromáticas, com perfume de jasmim muito semelhante a um outro jasmim da mesma família (*Gardenia jasminoides*). Os frutos maduros possuem epicarpo pubescente de coloração purpura, polpa branca, adocicada, saborosa e agradável, sendo consumidos *in natura* e na forma de licor. *Guettarda uruguensis* é classificada como uma planta alimentícia não convencional (PANC). Os frutos são também muito procurados pela avifauna. A floração é produtora de néctar e pólen ideais para criadores de abelhas nativas sem ferrão. É uma espécie ornamental que se cultivada em ambiente aberto possui hábito arbóreo (arvoreta de até 6 metros de altura), comumente encontrada nas bordas das matas, beira de rio e nascentes, apresentando hábito de arbusto apoiante ou escandente. É indicada para a composição de reflorestamentos heterogêneos destinados à recuperação da vegetação de áreas degradadas a beira de rios pois seus frutos atraem e alimentam diversas espécies de pássaros e pequenos mamíferos (KINUPP, 2007). Com

relação a sua distribuição geográfica, distribui-se pela Bolívia, Brasil, Argentina e Uruguai. No Brasil confirma-se ocorrência no Sudeste (Minas Gerais, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), nos domínios fitogeográficos do Cerrado, Floresta Atlântica e Pampa. Ocorre em vegetação de campo limpo, cerrado, floresta ciliar ou de galeria (DELPRETE et al., 2005; BARBOSA, 2015).

A espécie *G. uruguensis* possui como sinónimas: *Chomelia morongii* Britton; *Guettarda uruguensis* var. *grandifolia* Müll. Arg.; *Guettarda uruguensis* var. *sericans* Hassl.; *Guettarda uruguensis* var. *villicalyx* Hassl.; *Matthiola uruguensis* (Cham. & Schltl.) Kuntze.

Em estudo anterior, desenvolvido nos Laboratórios de Fitoquímica e Farmacotécnica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, as cascas do caule da espécie *Guettarda uruguensis* demonstraram a presença de metabólitos secundários com núcleo fundamental do tipo alcaloide, esteroide e/ou triterpenico, heterosídeo saponinico, tanino e aminogruppo. Extrato etanólico bruto e respectivas frações orgânicas desse mesmo órgão vegetal demonstraram significativa atividade antioxidante, antimicrobiana e alelopática (DUARTE et al., 2014; DUARTE, 2012).



FIGURA 1 - ESPÉCIE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.



FONTE: o autor (2017).

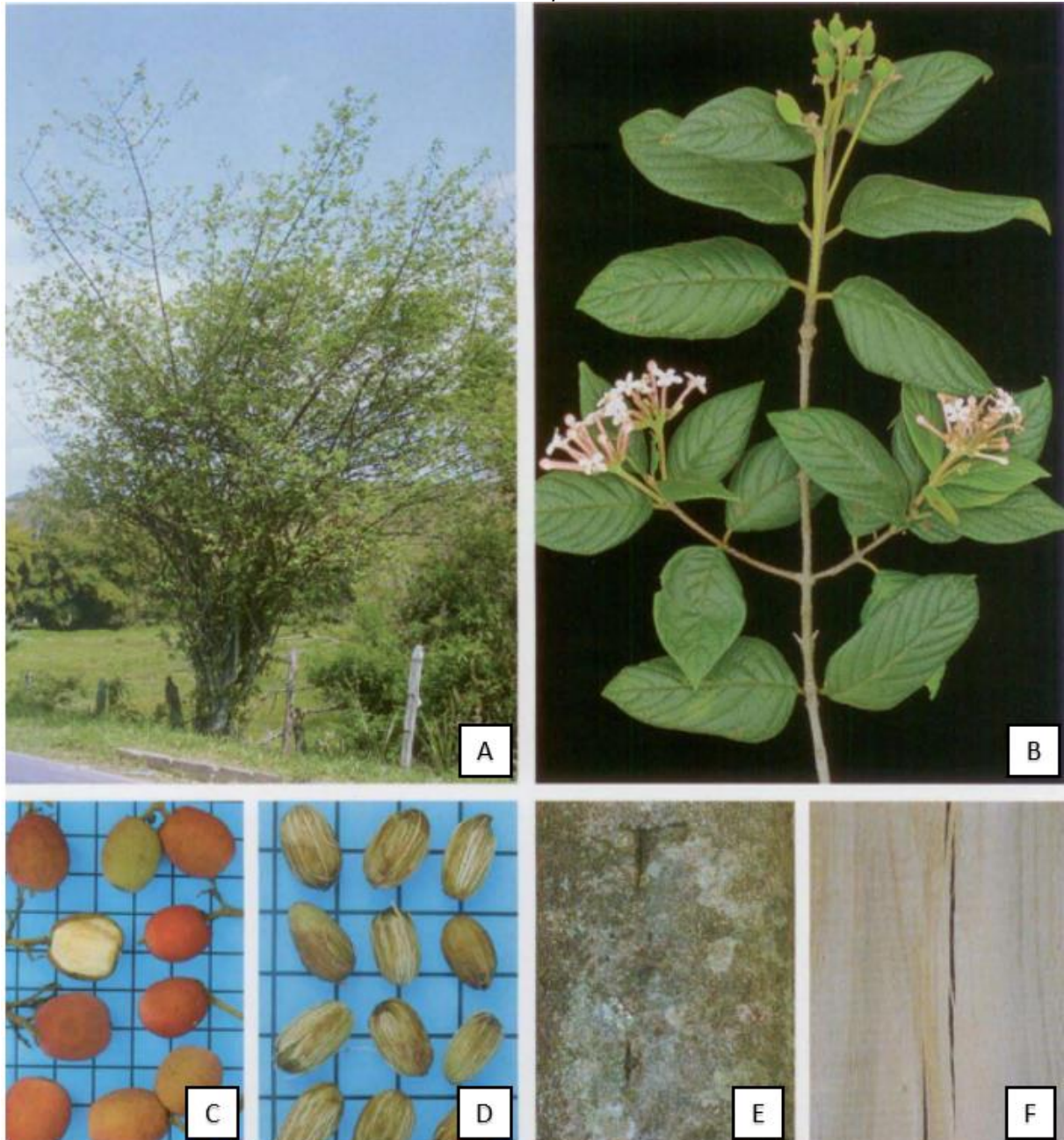
### 3.1.5 Considerações sobre as espécies *Guettarda pohliana* Müll. Arg., Rubiaceae e *Guettarda viburnoides* Cham. & Schltl., Rubiaceae

As espécies *G. pohliana* (FIGURA 2) e *G. viburnoides* (FIGURA 3) são estudadas no presente trabalho sobre a perspectiva da botânica, do estudo de características básicas de morfoanatomia foliar. Esse estudo comparativo contempla também a espécie *G. uruguensis*, objeto principal desse trabalho.

Assim como *G. uruguensis*, as espécies *G. pohliana* e *G. viburnoides* são conhecidas popularmente como veludinho. Provavelmente o nome popular dado a essas espécies ocorra em razão de uma característica da epiderme. As folhas dessas espécies apresentam alta pilosidade, o que provoca uma sensação ao toque que lembra a textura de um tecido de veludo. Entre as três espécies, analisando as características morfológicas externas, *G. viburnoides* é a que menos se assemelha a *G. pohliana* e *G. uruguensis*, sendo de mais fácil identificação entre as três. Quando em época de frutificação, as espécies se distinguem facilmente, entre outras características, pela diferença na coloração dos frutos. *G. pohliana* apresenta frutos vermelhos, *G. uruguensis* frutos roxos e *G. viburnoides* frutos brancos.

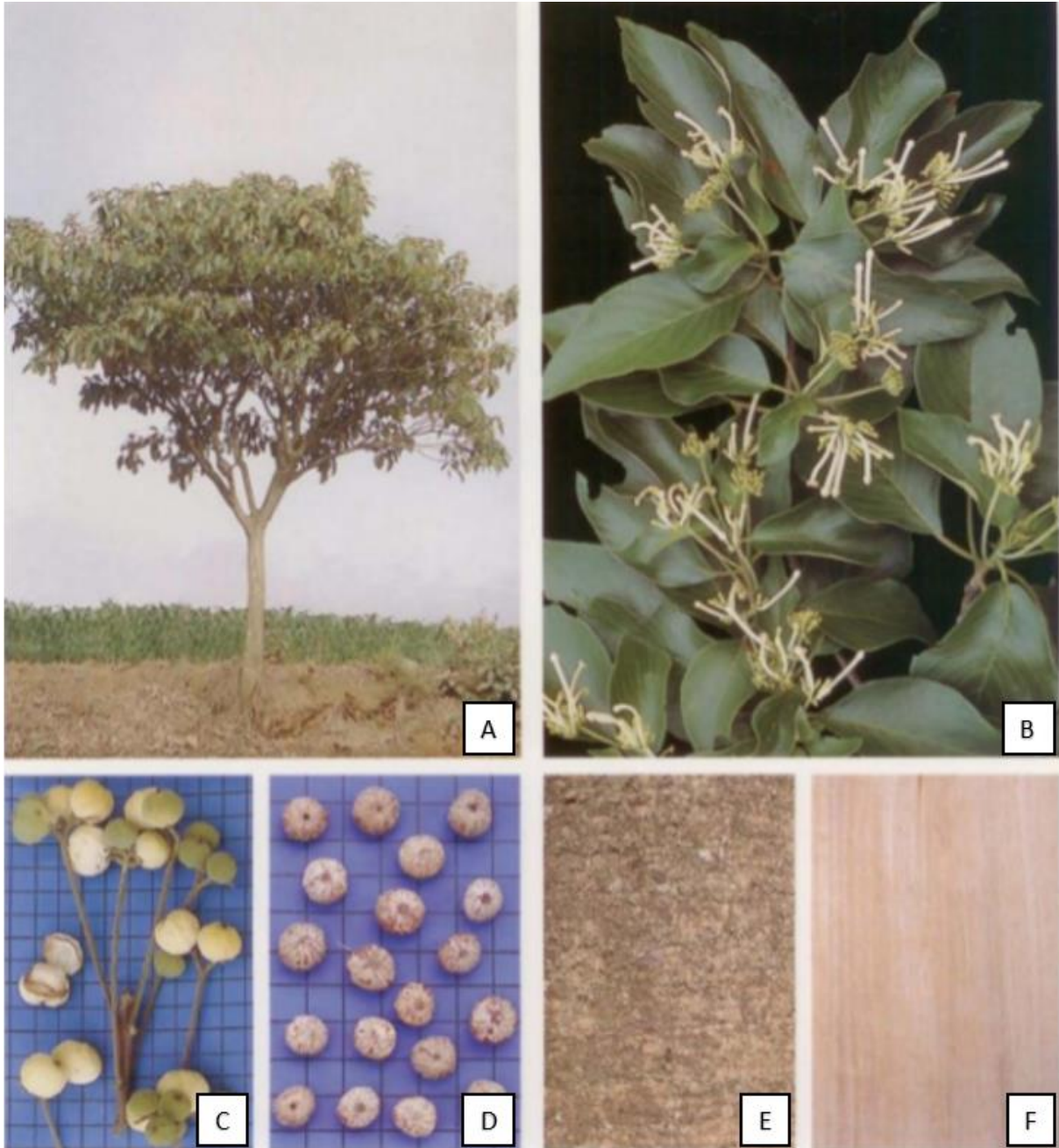
Como demonstrado pela revisão de literatura, as espécies *G. pohliana*, *G. uruguensis* e *G. viburnoides* são conhecidas popularmente por veludinho e possuem importância farmacológica. Nesse sentido, o estudo morfoanatômico comparativo das três espécies tem como objetivo contribuir para o conhecimento de espécies nativas da família Rubiaceae, tribo Guettardeae, gênero *Guettarda*.

FIGURA 2- ASPECTOS BOTÂNICOS DE *Guettarda pohliana* MÜLL. ARG., RUBIACEAE.



Legenda: A – árvore de *G. pohliana* no hábito; B – ramo contendo flores; C – frutos; D – sementes; E – aspecto do caule; F – madeira beneficiada. FONTE: adaptado de Lorenzi, 2009.

FIGURA 3 – ASPECTOS BOTÂNICOS DE *Guettarda viburnoides* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.



Legenda: A – árvore de *G. viburnoides* no hábito; B – ramo contendo flores; C – frutos; D – sementes; E – casca do caule; E – aspecto do caule; F – madeira beneficiada. FONTE: adaptado de Lorenzi, 1998.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COLETA E REGISTRO DO MATERIAL VEGETAL

A autorização para acesso ao patrimônio genético pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, do Ministério do Meio Ambiente, foi obtido sob número 02001.00165/2013-47 (ANEXO A).

Para o estudo fitoquímico, farmacológico e das atividades biológicas de *G. uruguensis* foram realizadas coletas de material botânico na cidade de Curitiba – PR, no Parque Municipal do Iguaçu, coordenadas: 25°32'13”S e 49°13'33”W. Para o preparo do extrato etanólico de folha, flor e fruto e suas respectivas frações foram realizadas coletas no período de Novembro de 2012 a Fevereiro de 2013. Para o preparo do extrato aquoso foi realizada uma única coleta em Novembro de 2015.

Para o estudo da morfoanatomia foliar de *G. pholiana* e *G. viburnoides*, foram utilizadas folhas coletadas de espécimes, adquiridos comercialmente em Janeiro de 2013, do “Viveiro Saputá/Sítio Frutas Raras”, localizado em Campina do Monte Alegre–SP, coordenadas: 23°32'09'S e 48°30'44W. Para o estudo da morfoanatomia foliar de *G. uruguensis*, foram utilizadas folhas coletadas de um espécime localizado em Curitiba - PR no período de Novembro de 2012 a Fevereiro de 2013 em localização geográfica já descrita anteriormente.

A partir das espécies coletadas foram confeccionadas exsicatas que estão depositadas no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, com os seguintes números de registro:

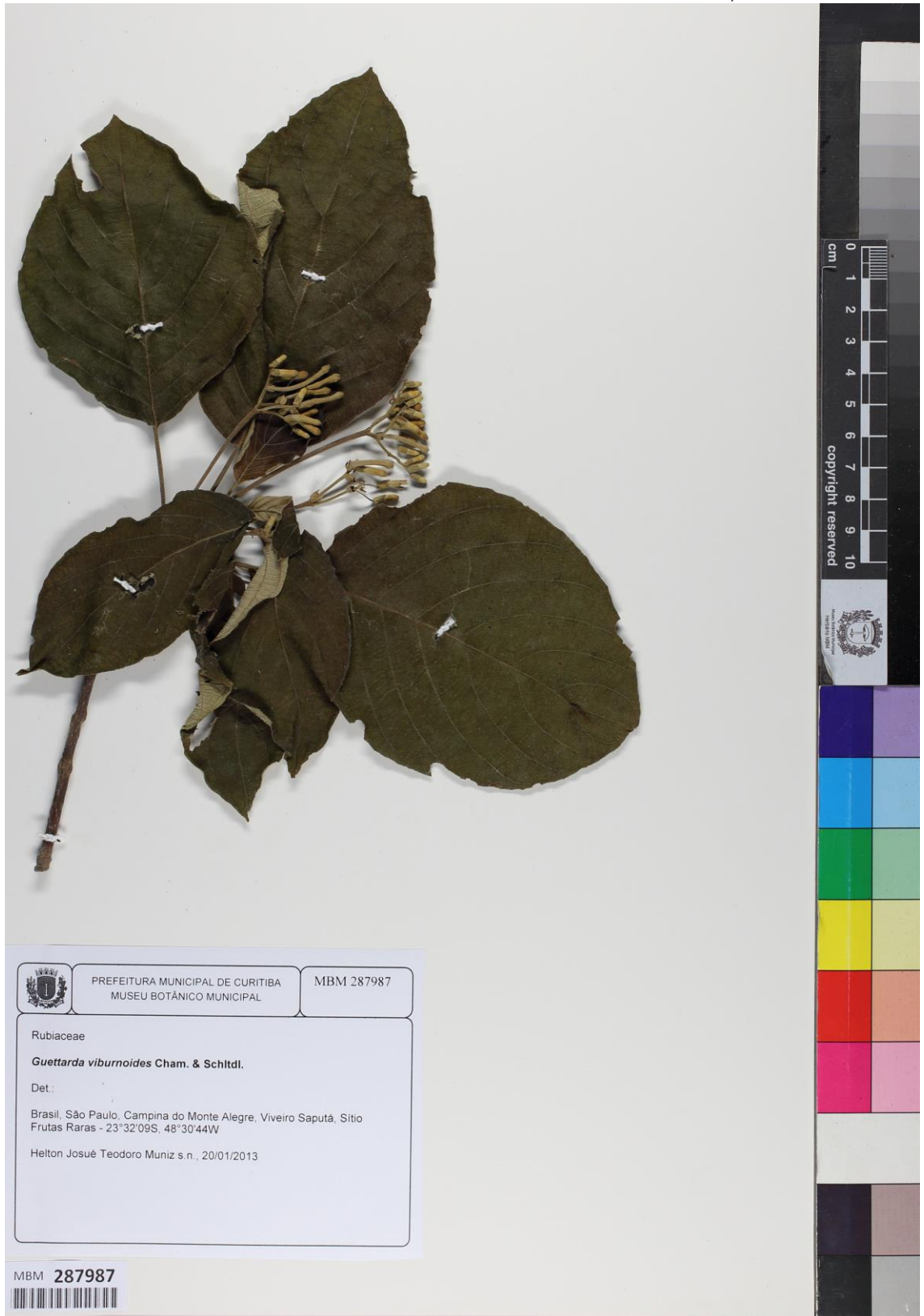
- *Guettarda pohliana* — MBM297775 (FIGURA 4)
- *Guettarda uruguensis* — MBM386376 (FIGURA 5)
- *Guettarda viburnoides* — MBM287987 (FIGURA 6)

FIGURA 4 – EXSICATA DA ESPÉCIE *Guettarda pohliana* MÜLL. ARG., RUBIACEAE.

FONTE: o autor (2017).

FIGURA 5 – EXSICATA DA ESPÉCIE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.

FONTE: o autor (2017).

FIGURA 6 - - EXSICATA DA ESPÉCIE *Guettarda viburnoides* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.

FONTE: o autor (2017).



## 4.2 MORFOANATOMIA FOLIAR

Foram realizadas análises de morfoanatomia foliar das espécies *Guettarda uruguensis*, *Guettarda pohliana* e *Guettarda viburnoides*.

As amostras foram fixadas em FAA com etanol 70% (JOHANSEN, 1940) e armazenadas em etanol 70% até o momento do seccionamento ou processamento para lâminas semipermanentes. As lâminas foliares foram seccionadas no sentido transversal. Foram confeccionadas lâminas semipermanentes a partir de amostras incluídas em polietilenoglicol 1500 U.S.P. (PEG). Para inclusão em PEG, as amostras foram pré-infiltradas em uma solução de PEG e álcool etílico 70% na proporção de 1:1, em estufa a 56 °C por 12h; seguido de infiltração com solução pura de PEG, por 4 horas. As secções foram feitas com 35 µm de espessura em micrótomo de rotação com navalha de aço. As lâminas foram coradas com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964), montadas em gelatina glicerizada (KAISER, 1880) e vedadas com esmalte incolor. Testes histoquímicos de Sudan III (SASS, 1951) e cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) foram utilizados para identificação de compostos lipofílicos e compostos fenólicos, respectivamente. As fotomicrografias foram obtidas através de microscópio, com câmera digital acoplada e programa de captura de imagem.

A análise ultraestrutural de superfície em microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada segundo Souza, 1998. As amostras fixadas sofreram desidratação etanólica crescente (80%, 90% e 100%), sendo transferidas a cada dez minutos. Essas amostras desidratadas foram inseridas em um suporte e colocadas no aparelho de ponto crítico Bal-Tec CPD-030. Em seguida, foram aderidas com uma fita de cobre em outro suporte, metalizadas com ouro no aparelho Balzers SCD-030, observadas e fotografadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6360LV.33.

## 4.3 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA

A pesquisa de diferentes grupos químicos foi realizada de acordo com MOREIRA, 1979. Foram obtidos extratos de folha, flor e fruto da espécie *G. uruguensis*.

i. Extrato hidroalcoólico a 20%: extração por maceração em banho-maria a 70°C por 90 minutos de 40 g das partes aéreas (folha, flor, fruto) de *G. uruguensis* estabilizadas e moídas, em 200 mL de álcool etílico a 70 %. Após 24 horas, o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e completou-se o volume até 200 mL, lavando-se o marco com líquido extrator. O extrato foi mantido sob refrigeração até a realização de todos os ensaios fitoquímicos.

– Glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos.

ii. Extrato aquoso a 20%: extração por maceração em banho-maria a 70°C por 90 minutos de 40 g das partes aéreas (folha, flor, fruto) de *G. uruguensis* estabilizadas e moídas, em 200 mL de água destilada. Após 24 horas, o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e completou-se o volume até 200 mL, lavando-se o marco com líquido extrator. O extrato foi mantido sob refrigeração até a realização de todos os ensaios fitoquímicos.

– Glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogenéticos, taninos (condensados e hidrolisáveis), aminogrupos e flavonóides.

#### 4.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

##### 4.4.1 Percolação à quente por meio de aparelho de Soxhlet

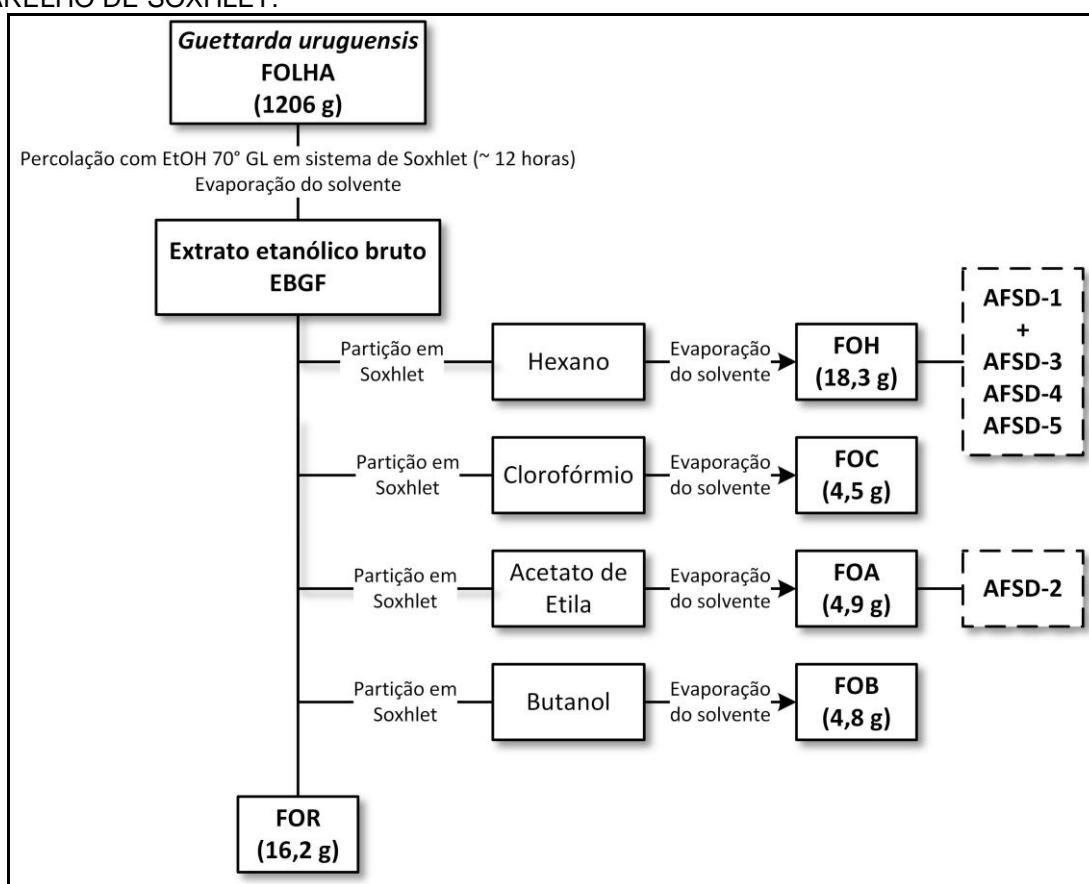
O extrato etanólico bruto das folhas (EBGF) e flores (EBGFL) da espécie *G. uruguensis* foram obtidos a partir de 1206 g de folhas e 360 g de flores, por meio de percolação a quente em aparelho de Soxhlet modificado (PI0611703-7A) utilizando etanol 70° GL como líquido extrator. Os extratos etanólicos de folha e flor foram concentrados em rotaevaporador. Na sequência, uma alíquota dos extratos etanólicos foi, individualmente, levada a secura em banho maria e outra alíquota utilizada na etapa de particionamento líquido-líquido para a obtenção de frações enriquecidas.

Uma alíquota dos extratos etanólicos brutos de folha (EBGF) e flor (EBGFL) foi particionada por meio de aparelho de Soxhlet modificado (PI0611703-7A) utilizando solventes em escala de polaridade crescente. Os solventes utilizados para a partição foram: hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol.

A partir do extrato etanólico bruto obtido de folha (EBGF) foram obtidas as frações: hexano (FOH), clorofórmio (FOC), acetato de etila (FOA), butanol (FOB) e remanescente (FOR). A partir do extrato etanólico bruto obtido de flor foram obtidas as frações: hexano (FLH), clorofórmio (FLC), acetato de etila (FLA), butanol (FLB) e remanescente (FLR). Todas as frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório e levadas a secar em banho maria a 60°C.

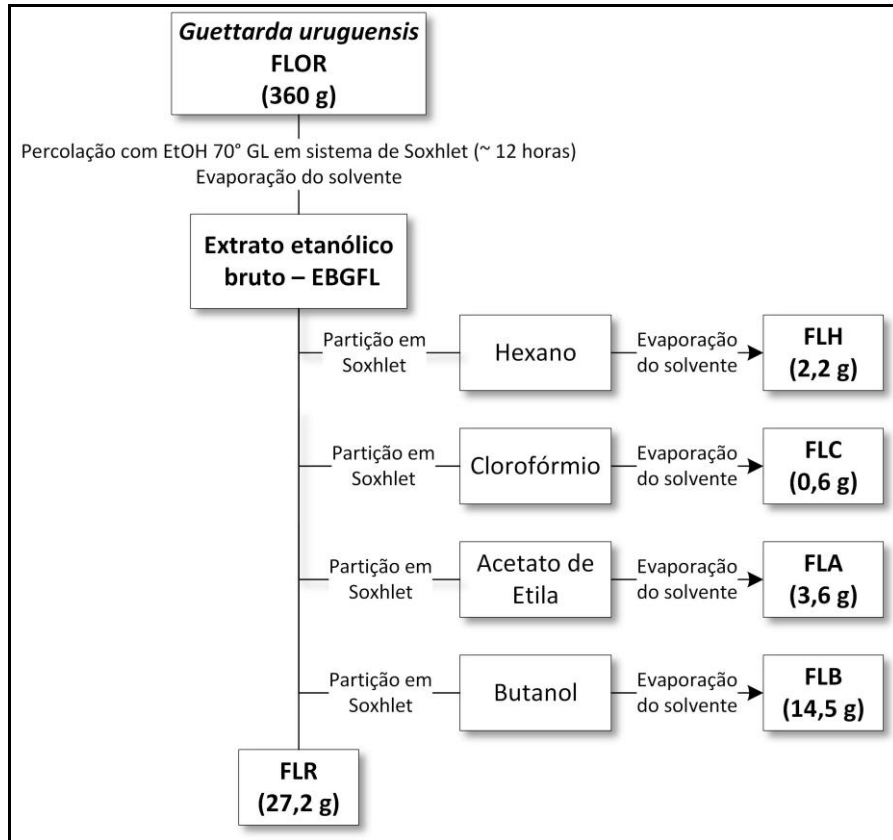
A partição líquido-líquido consiste na separação dos componentes de uma mistura baseado nos coeficientes de partição entre dois solventes imiscíveis. Foi utilizada para tornar a mistura das substâncias químicas presentes no extrato bruto de *G. uruguensis*, mais simples, concentrando os compostos de interesse em uma determinada faixa de polaridade. Os esquemas utilizados para obtenção dos extrato e frações de folha e flor de *Guettarda uruguensis* encontram-se em FIGURA 7, FIGURA 8 e FIGURA 10.

FIGURA 7 - MÉTODO DE EXTRAÇÃO E PARTICIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO OBTIDO DE FOLHA DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE POR MEIO DE APARELHO DE SOXHLET.



FONTE: o autor (2017).

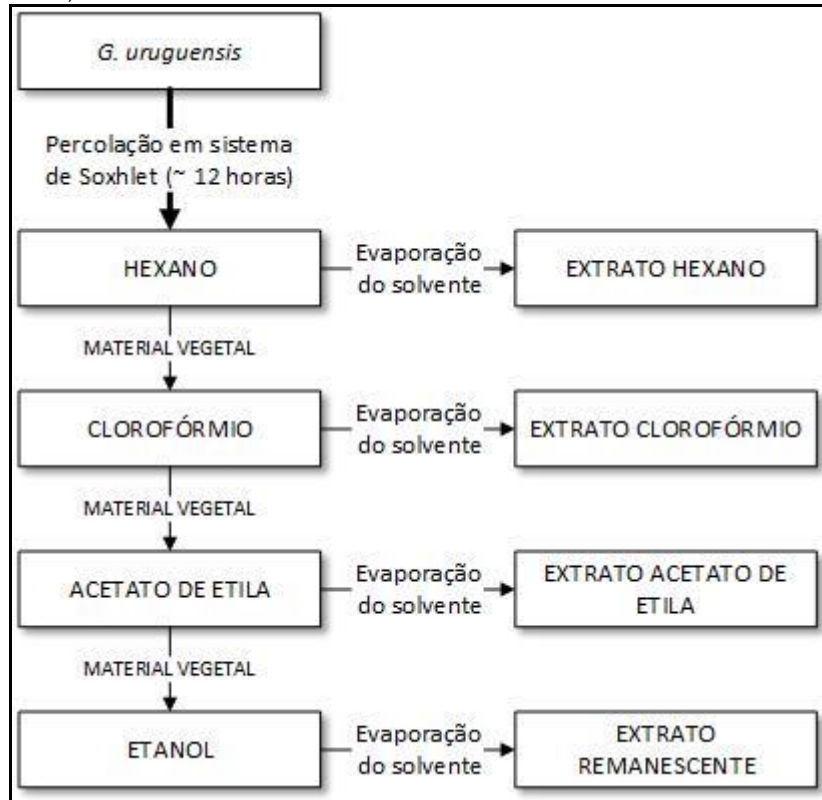
FIGURA 8 - MÉTODO DE EXTRAÇÃO E PARTICIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO OBTIDO DE FLOR DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE POR MEIO DE APARELHO DE SOXHLET.



FONTE: o autor (2017).

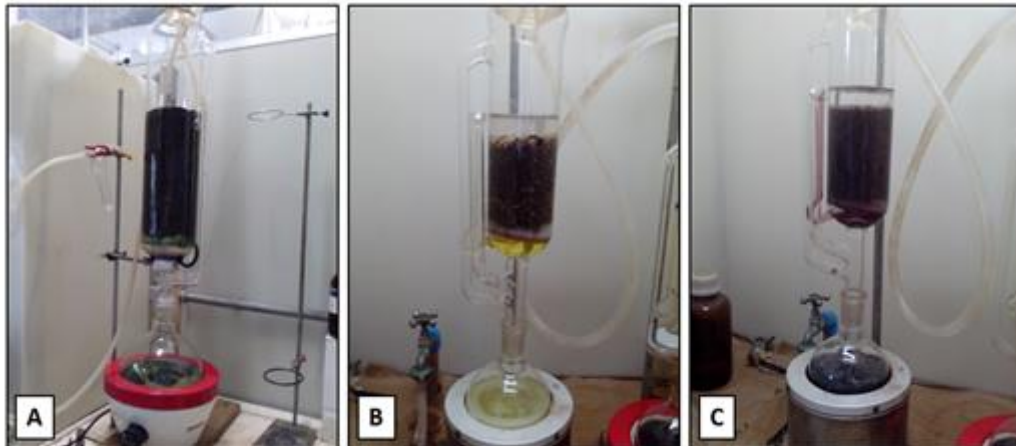
Os extratos dos frutos foram obtidos a partir de 200 g de material vegetal. Os extratos foram obtidos utilizando o método de percolação a quente por meio de aparelho de Soxhlet realizando-se extração direta em coeficiente de polaridade, ou seja, sem a prévia obtenção de um extrato bruto etanólico. Foram utilizados solventes em escala crescente de polaridade obtendo-se dessa maneira os extratos: hexano (FRH), clorofórmio (FRC), acetato de etila (FRA) e remanescente (FRR). Os extratos obtidos foram filtrados e concentrados em rotaevaporador à pressão reduzida. Na FIGURA 9 e FIGURA 10 encontram-se os esquemas utilizados para obtenção dos extratos de fruto de *Guettarda uruguensis*.

FIGURA 9 - MÉTODO DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE FRUTO DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE POR MEIO DE APRELHO DE SOXHLET.



FONTE: o autor (2017).

FIGURA 10 - PREPARO DOS EXTRATOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DA ESPÉCIE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE POR MEIO DE APARELHO DE SOXHLET.



Nota: A – obtenção do extrato etanólico bruto de folha, B – obtenção do extrato etanólico bruto de flor, C – obtenção do extrato hexânico de fruto. FONTE: o autor (2017).

#### 4.4.2 Preparo do infuso

O extrato aquoso das folhas (FOAQ, 500 g) e flores (FOAQ, 200 g) foram obtidos por meio de infusão. Nesse processo os materiais vegetais foram individualmente colocados em contato com água previamente aquecida até o ponto

de ebulição por um período de 1 hora em recipiente fechado. Os extratos obtidos foram filtrados, congelados e liofilizados.

#### 4.4.3 Maceração

Os extratos alcaloídicos das folhas (FOALC) e flores (FLALC) foram obtidos a partir de 400 g e 145 g de material vegetal, respectivamente. O processo extrativo utilizado foi a maceração contínua utilizando uma solução de etanol/hidróxido de amônio (EtOH/NH<sub>4</sub>OH) 1% como líquido extrator, à temperatura ambiente, por 7 dias com agitação diária. A mistura foi filtrada e o procedimento repetido por quatro vezes consecutivas. As soluções obtidas foram reunidas e concentradas em rotaevaporador. O extrato alcaloídico foi dissolvido em 100 mL de acetato de etila e em seguida acidulado com solução de ácido clorídrico 0,1 N. A seguir, foi realizado o fracionamento para extração de alcaloides ajustando-se o pH da fração aquosa ácida em 8 com adição de hidróxido de amônio concentrado e extraindo-se com 100 mL de clorofórmio. Em seguida, a fração aquosa teve seu pH elevado a 10 por adição de carbonato de sódio e foi extraída com 100 mL de clorofórmio. Por fim, o pH da fração aquosa foi ajustado em 12 com adição de solução de hidróxido de sódio 0,1 N e foi extraída com 100 mL de clorofórmio por três vezes. Os solventes foram eliminados das frações por meio de rotaevaporador.

### 4.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ANALÍTICOS

#### 4.5.1 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação. As análises foram realizadas em placas de sílica-gel 60G (Merck), espessura de 0,2 mm de sílica, com 5,0 x 2,5 cm (altura x largura). Foram testados diferentes sistemas de fase móvel de acordo com o tipo de composto a ser analisado, assim como diferentes reveladores. Os sistemas cromatográficos utilizados para avaliação dos extratos, frações e processos de separação foram os que apresentaram melhor separação dos compostos, como apresentado nos subitens seguintes.

a) Alcalóides (WAGNER & BLADT, 1996).

Sistema de eluição: Acetato de Etila:Ácido Fórmico:Ácido Acético:Água (100:11:11:27 v/v).

Revelador: Reagente de Dragendotff.

b) Cumarinas (WAGNER & BLADT, 1996).

Sistema de eluição: Éter:Tolueno:Ácido Acético (250:50:50 v/v). Revelador: Luz ultravioleta.

c) Derivados cinâmicos e flavonóides (WAGNER & BLADT, 1996).

Sistema de eluição:Acetato de etila:Ácido Fórmico:Ácido Acético:Água (100:11:11:27 v/v).

Revelador: Solução metanólica a 1 % de difenilborinato de amino-2-etila (NEU).

d) Terpenos e esteroides (STAHL, 1969).

Sistema de eluição: Hexano:Acetato de Etila (65:35 v/v).

Revelador: Etanol:Ácido Sulfúrico (95:5 v/v) com aquecimento a 100°C.

e) Saponinas (WAGNER & BLADT, 1996).

Sistema de eluição: Clorofórmio:Acetato de Etila:Água (65:55:10 v/v).

Revelador: Reagente de Liebermann-Burchard a 90°C.

f) Monossacarídeos e oligossacarídeos (SASSAKI et al., 2008).

Sistema de eluição: Acetato de Etila:Ácido n-propanóico:Ácido Fórmico:Água (4:2:2:1 v/v).

Revelador: Orcinol sulfúrico seguido de aquecimento.

#### 4.5.2 Cromatografia em coluna

Inicialmente cada amostra foi dissolvida em solvente apropriado (clorofórmio para fração hexano; metanol para fração acetato de etila) e incorporada a duas partes de sílica-gel 60 para cada parte de amostra, utilizando constante homogeneização em cápsula de porcelana, promovendo a evaporação do solvente,

até a formação da pastilha. A coluna cromatográfica foi empacotada com sílica-gel 60 na proporção de cinco partes em relação à pastilha, sendo que as mesmas foram separadas por um papel de filtro, a fim de minimizar possíveis perturbações na coluna.

Para o desenvolvimento das colunas cromatográficas em sistema aberto, a fase móvel foi constituída por um sistema composto por solventes combinados com o objetivo de organizar um gradiente de polaridade crescente. Iniciou-se com 100 % de hexano num volume de 100 mL, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5% em 5%, até 100% de acetato de etila. Após iniciou-se outro gradiente de polaridade, 100 % de acetato de etila, com variação de 5 % em 5 % de metanol. A eluição ocorreu a um fluxo de ~1 mL/min e frações de 15 mL foram coletadas.

O sistema eluente composto por clorofórmio-acetato de etila-água (65:50:10 v/v) utilizado na cromatografia a vácuo da fração acetato de etila obtida de folha (FOA) foi estabelecido, considerando o comportamento previamente detectado em cromatografia em camada delgada.

#### 4.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência

Os experimentos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizados em um cromatógrafo Merck Hitachi – Elite Lachrom, equipado com um detector com disposição de diodo (DAD), bomba (L-2130) e injetor manual. A separação foi realizada utilizando uma coluna RP-18 Waters Xterra® (4.6 mm x 250 mm x 5 µm). A detecção do DAD foi realizada a 329 nm. Foram injetados 20 µL de cada amostra previamente filtrada (0,45 mM, Milipore). A fase móvel foi composta por dois eluentes: A: metanol; B: fase ácida, gradiente de eluição: 0 - 40 min: 20 - 100% A, 40 - 43 min 100% A. A fase ácida foi composta por ácido acético 1%. Os eluentes foram injetados a um fluxo de 1 mL/min. A identificação dos compostos foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e perfil UV entre as amostras e padrões. Como padrões foram utilizados ácido cafeico, ácido clorogênico e rutina.

#### 4.5.4 Ressonância magnética nuclear



Os experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizados em um espectrometro AVANCE III 400, operando a 9.4 T, observando os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a 400,13 e 100.61 MHz respectivamente, equipado com uma sonda direta multinuclear de 5 mm ou com uma com uma sonda inversa multinuclear de 5 mm. Todos os deslocamentos químicos foram observados em relação ao sinal do TMS, em 0,00 ppm, como referência interna.

Foram realizados ainda experimentos de RMN em um espectrometro AVANCE III HD 600, operando a 14.1 T, observando os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  a 600,13 e 150.90 MHz respectivamente, equipado com uma sonda inversa quadrinuclear de 5 mm com gradiente z. Todos os deslocamentos químicos foram observados em relação ao sinal do TMS, em 0,00 ppm, como referência interna.

Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  foram adquiridos com uma janela espectral de ~11 ppm e ~240 ppm, respectivamente. Os espectros de RMN de correlação  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uma ligação (HSQC) e a longa distancia (HMBC) foram otimizados para uma média de constantes de acoplamento  $^1J_{(\text{H,C})}$  e  $^{\text{LR}}J_{(\text{H,C})}$  de 140 e 8 Hz, respectivamente.

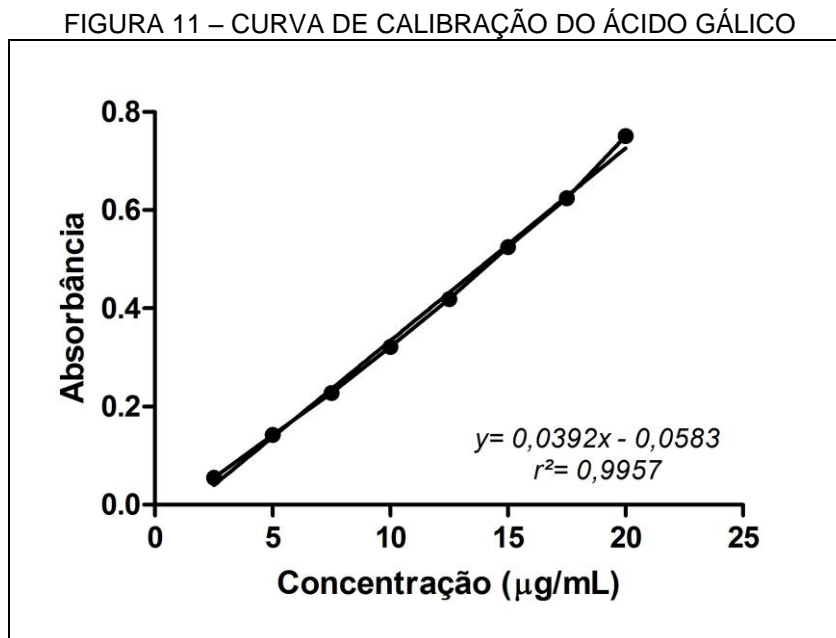
#### 4.5.4 Espectrometria de massas

Os espectros de massas de baixa resolução IES-EM/EM foram obtidos nos modos de ionização negativo em um espectrômetro de massas LTQ XL Linear Ion Trap da Thermo Scientific, equipado com uma fonte de IES.

#### 4.6 TEOR DE COMPOSTOS FENOLICOS

A determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos e frações obtidos de folhas, flores e frutos de *G. uruguensis* foi realizada por meio do método de Folin–Ciocalteu, descrito por Slinkard e Singleton (1977). Uma alíquota da amostra (1000 mg/mL) foi adicionada ao reagente de Folin-Ciocalteu sendo adicionada posteriormente uma solução de carbonato de sódio saturada (10%). A reação foi mantida em ambiente protegido de luz por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 760 nm. A concentração dos compostos fenólicos totais foi expressa em miligramas de ácido

gálico por grama de extrato (mg EAG/g), calculo obtido por meio da construção da analítica apresentada na FIGURA 11.



FONTE: o autor (2017).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos de folha, flor e frações obtidas destes, assim como dos extratos obtidos dos frutos foi realizada utilizando os testes de redução do complexo fosfomolibdênio, captura de radicais livres (DPPH) e formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

##### 4.7.1 Redução do complexo fosfomolibdênio

A atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto de *Guettarda uruguensis* foi avaliada quanto a capacidade de redução do complexo fosfomolibdênio, de acordo com metodologia descrita por Prieto, Pineda e Aguilar, 1999. As amostras foram preparadas na concentração de 200 µg/mL. Destas, alíquotas de 0,3 mL foram adicionados a 3 mL de solução reagente do reativo fosfomolibdico (molibdato de amônio 4 mM, fosfato sódico monobásico 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M). A mistura foi agitada e após 90 minutos de incubação em banho-maria a 95°C e posterior resfriamento, a absorbância foi medida em 695 nm,

usando um espectrofotômetro UV-VIS 1601 Shimadzu. Como padrões foram utilizados a rutina (200 µg/mL) e o ácido ascórbico (200 µg/mL); como branco foi utilizado 0,3mL de metanol com 3 mL do reagente; para zerar o espectrofotômetro foi utilizado metanol. A atividade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%) em relação aos padrões, conforme a equação 1 (Eq. 1).

$$AAR\% \text{ em relação ao controle} = \left( \frac{Abs \text{ amostra} - Abs \text{ branco}}{Abs \text{ controle} - Abs \text{ branco}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde:

*Abs amostra*: absorbância da amostra

*Abs branco*: absorbância do branco

*Abs controle*: absorbância do controle

#### 4.7.2 Captura de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

A atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto de *Guettarda uruguensis* foi avaliada quanto a capacidade de sequestrar radicais livres, utilizando-se o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), de acordo com Mensor et al. (2001), com adaptações. As amostras foram preparadas em diferentes concentrações (2 µg/mL a 1000 µg/mL) e a 71 µL de cada amostra foram adicionados 29 µL de uma solução de DPPH (0,3 mM). A mistura foi agitada e após trinta minutos de incubação em ausência de luz a absorbância foi medida em 518 nm, usando um leitor de placas (Multiscan FC, Thermo Scientific®). Como padrões foram utilizados rutina (2 µg/mL a 12 µg/mL) e ácido ascórbico (1,6 µg/mL a 8 µg/mL); o branco específico de cada amostra foi determinado usando 71µL da amostra e 29µL de metanol e o controle negativo 71µL de metanol e 29µL de DPPH. O potencial de redução de radical DPPH foi obtido através do cálculo de porcentagem de atividade antioxidante (AA), conforme a equação 2 (Eq. 2).

$$\% AA = \left\{ \frac{Abs \text{ amostra} - Abs \text{ branco}}{Abs \text{ controle}} \right\} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:

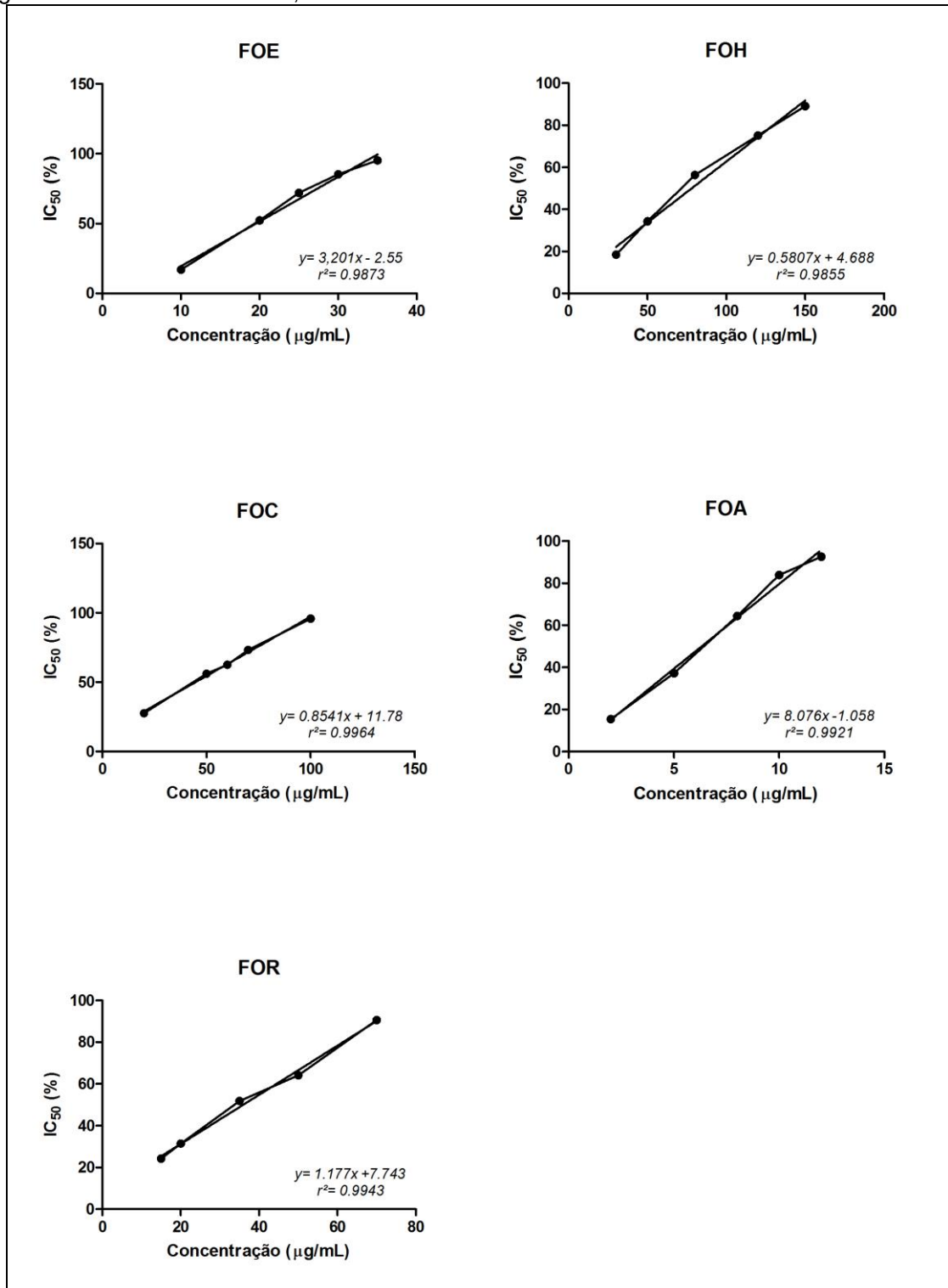
*Abs amostra*: absorbância da amostra

*Abs branco*: absorbância do branco

*Abs controle*: absorbância do controle

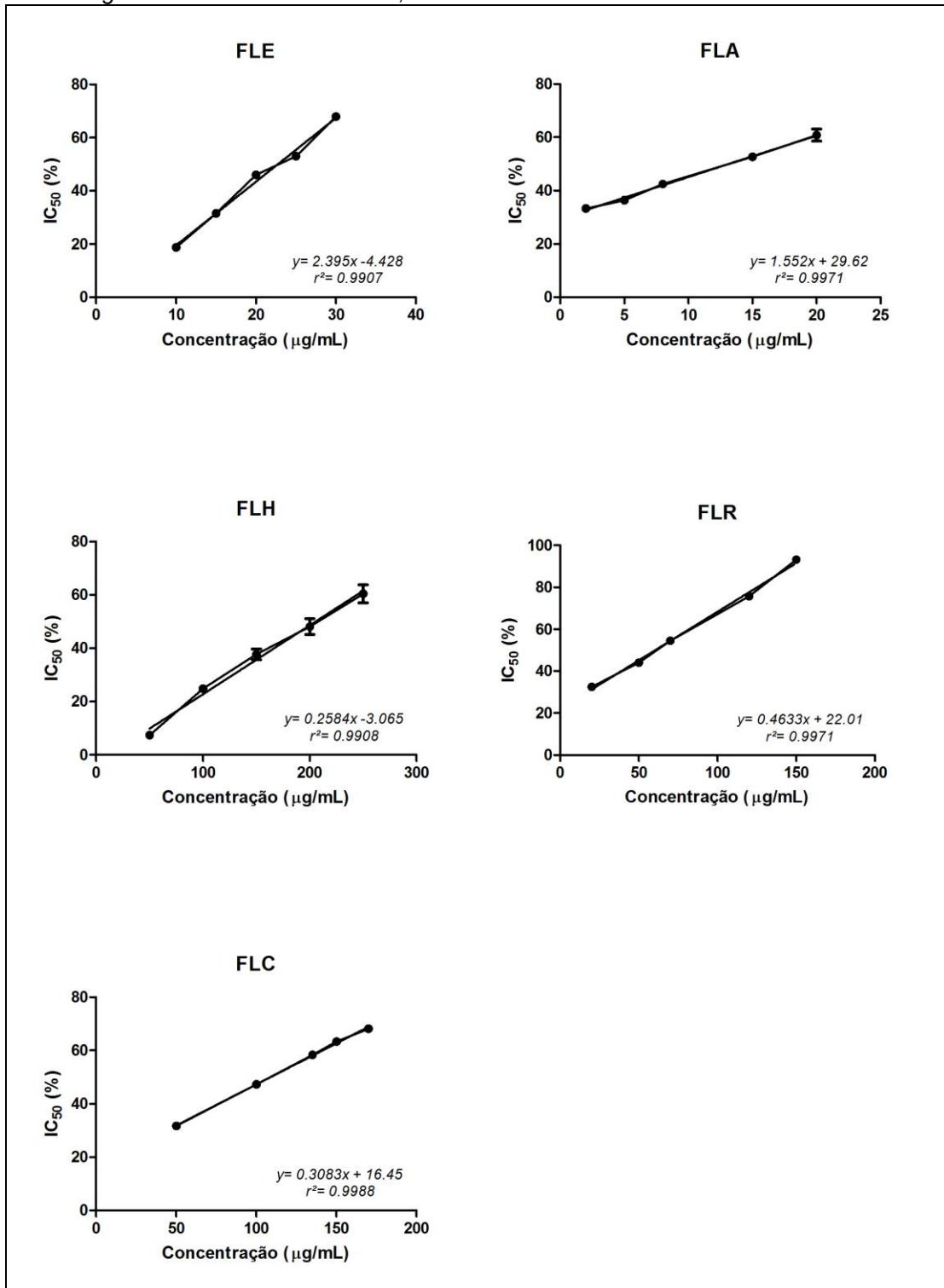
A fim de comparar os resultados obtidos foi estabelecida a  $IC_{50}$ , ou seja, a quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% da concentração inicial do radical DPPH, calculados por regressão linear e plotados em gráficos onde a abscissa representava a concentração da amostra analisada e a ordenada a proporção da porcentagem antioxidante. No intervalo linear foi estabelecida a equação de reta de primeiro grau ( $y=ax+b$ ) sendo, portanto determinada para cada amostra analisada os valores de  $IC_{50}$ . O coeficiente de correlação linear ( $r^2 \geq 0,98$ ) obtido para cada amostra demonstra boa linearidade (FIGURA 12, FIGURA 13, FIGURA 14).

FIGURA 12 - EQUAÇÃO DA RETA OBTIDA POR REGRESSÃO LINEAR PARA O CÁLCULO DA IC<sub>50</sub> DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE DE FOLHA DA ESPÉCIE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.



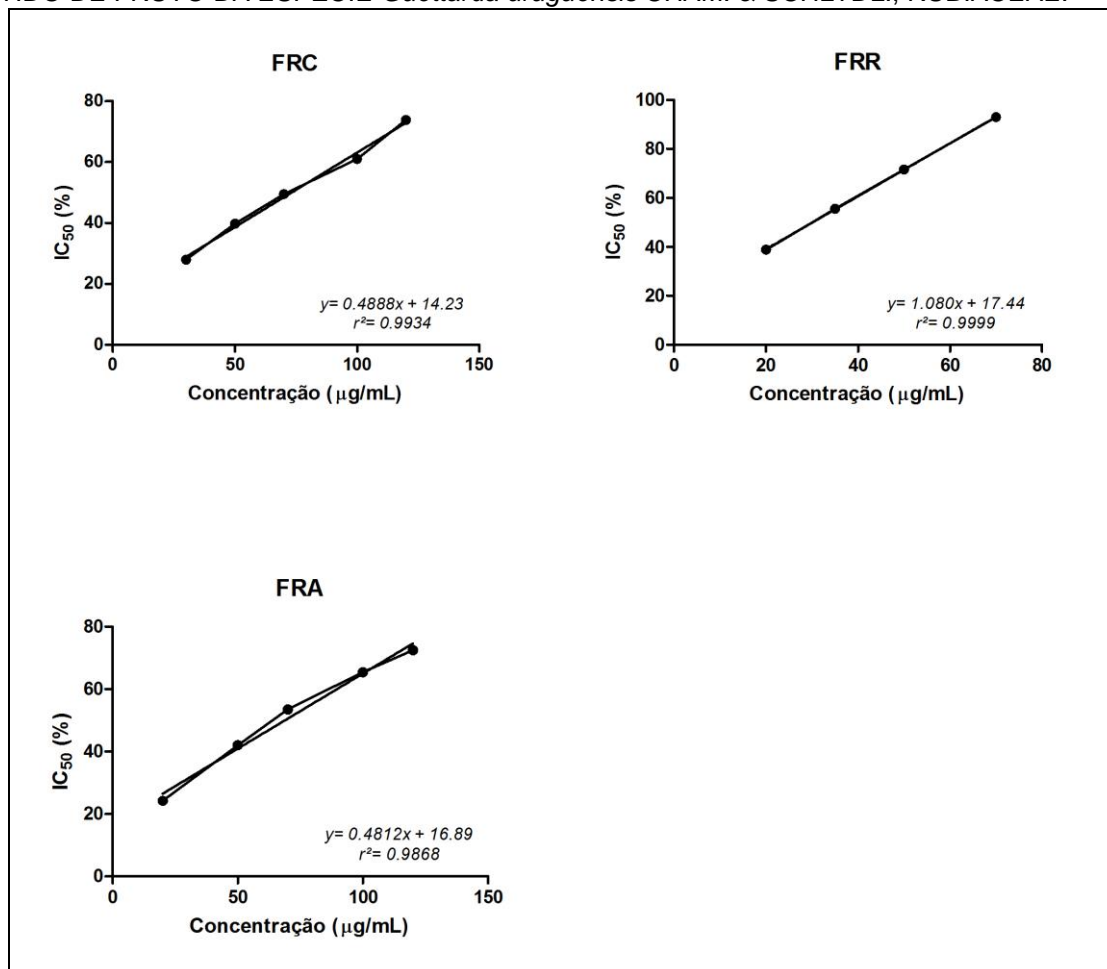
Legenda: EBGF: extrato etanólico bruto; FOH: fração hexano; FOC: fração clorofórmio; FOA: fração acetato de etila; FOB: fração butanol; FOR: fração remanescente. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 13 - EQUAÇÃO DA RETA OBTIDA POR REGRESSÃO LINEAR PARA O CÁLCULO DA IC<sub>50</sub> DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE OBTIDOS DE FLOR DA ESPÉCIE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE



Legenda: EBGFF: extrato etanólico bruto; FLH: fração hexano; FLC: fração clorofórmio; FLA: fração acetato de etila; FLB: fração butanol; FLR: fração remanescente. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 14 - EQUAÇÃO DA RETA OBTIDA POR REGRESSÃO LINEAR PARA O CÁLCULO DA IC<sub>50</sub> DO EXTRATO CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICO REMANESCENTE OBTIDO DE FRUTO DA ESPÉCIE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.



Legenda: FRC: extrato clorofórmio; FRA: extrato acetato de etila; FLR: extrato remanescente.  
 FONTE: o autor (2017).

#### 4.7.3 Formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto de *Guettarda uruguensis* foi avaliada quanto a determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Moraes et al. (2006) e Moreira (2012). Em tubos de ensaio foram adicionados 100 µL de amostra (70µg/mL em etanol), 400 µL de água destilada, 500 µL de solução da gema de ovo 5% (p/v) preparada em solução de dodecil sulfato de sódio 0,55%, 50 µL cloreto de 2,2'-azobis-2-aminopropano (ABAP) (0,035%), 1500 µL de ácido acético 20% e 1500 µL de ácido tiobarbitúrico 0,4% preparado em SDS 0,55%. O material foi submetido a banho-maria a 95° C por 1 hora. Após resfriamento, adicionou-se 1500 µL de n-butanol para extração da fase orgânica com posterior centrifugação durante 3

minutos a 3000 rpm e os sobrenadantes mensurados em espectrofotômetro em 532 nm. O mesmo processo foi realizado com tubos controle, nos quais foram adicionados todos os reagentes exceto as amostras, que foi substituída por 100 µL de metanol. O branco da amostra foi preparado substituindo o ABAP por 50 µL de água. A atividade antioxidante de cada amostra (1 mg/mL) foi mensurada por meio do cálculo do índice antioxidante (IA), determinado conforme equação 3 (Eq. 3).

$$IA (\%) = 1 - \left( \frac{Abs\ amostra - Abs\ branco}{Abs\ controle} \right) \times 100 \quad (Eq\ 3)$$

onde:

*IA*: índice antioxidante

*Abs amostra*: absorbância da amostra

*Abs branco*: absorbância do branco da amostra

*Abs controle*: absorbância do controle

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

A toxicidade dos extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto de *Guettarda uruguensis* foi avaliada frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e larvas do mosquito *Aedes aegypti*.

No teste letalidade para náuplios de *Artemia salina* foram avaliados os extratos: aquoso obtido de folha (FOAQ) e flor (FLAQ); alcaloidico obtido de folha (FOALC) e flor (FLALC); etanólico obtido de folha (EBGF) e flor (EBGFL); extratos obtidos dos frutos (FRH, FRC, FRA, FRR). Foram avaliadas as frações obtidas a partir do extrato etanólico das folhas e frações obtidas a partir do extrato etanólico das flores.

No teste da atividade larvicida contra *Aedes aegypti* foram avaliados os extratos: etanólico obtido de folha (EBGF) e flor (EBGFL); extratos obtidos dos frutos (FRH, FRC, FRA, FRR). Foram avaliadas as frações obtidas a partir do extrato etanólico das folhas e frações obtidas a partir do extrato etanólico das flores.

##### 4.8.1 Teste de letalidade para náuplios de *Artemia salina*



A determinação da toxicidade dos extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto da espécie *Guettarda uruguensis* para náuplios de *Artemia salina* foi avaliada segundo a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), com modificações.

Os cistos de *Artemia salina* adquiridos em loja de aquários foram colocados em funil de separação com solução salina (200 mg/L) por 24 horas para eclodirem em ausência de luz, com controle de temperatura (27-30°C) e pH (8-9). A solução salina foi preparada adicionando sal marinho (23 g NaCl, 11 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 4 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,3 g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ou CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0,7 g KCl) em 1L de água destilada. Após 24 horas, os cistos não eclodidos foram descartados, o funil foi reabastecido com nova salina e os náuplios reinseridos, novamente em ausência de luz por mais 24 horas. Ao fim do tempo de eclosão correspondente a 48 horas, os náuplios foram coletados e em seguida avaliados frente as amostras.

As amostras nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL em DMSO 1% em solução salina foram testadas em quadruplicata, acondicionadas em tubos do tipo Eppendorf®. Como controle negativo foram utilizados a salina e o solvente (DMSO 1% em salina). Como controle positivo foi utilizado dodecilsulfato de sódio (SDS) nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL de solução salina. A análise de letalidade para *Artemia salina* frente aos controles foram realizados em quadruplicata. Em cada tubo do tipo Eppendorf® foram colocados 10 náuplios e 2,5 mL de amostra. As placas foram incubadas em estufa (27-30° C) pelo período de 24 horas, na sequência o número de náuplios imóveis foi contabilizado com auxílio de iluminação artificial e lupa. Os dados foram analisados pelo método Probit (FINNEY, 1971) com o objetivo de estimar a concentração letal a 50% dos indivíduos (CL<sub>50</sub>) com 95% de confiabilidade.

#### 4.8.2 Atividade larvicida contra *Aedes aegypti*

A determinação da atividade larvicida dos extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto da espécie *Guettarda uruguensis* para mosquitos de *Aedes aegypti* foi avaliada segundo a metodologia descrita por WHO, (1981) com modificações.

Os ovos de *Aedes aegypti* da linhagem Rockefeller foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz – RJ. Para a eclosão dos ovos, estes foram colocados em bandeja de plástico e adicionados 500 mL de água sem cloro, e em seguida levada para estufa BOD com temperatura a 27 ± 2 °C e umidade relativa de 80 ±5%. A dieta

das larvas consistiu de ração de peixe (aldon basic, MEP 200 complex) do período de eclosão até o 3º estágio larval. Foram preparadas soluções de concentração de 1.000 µg/mL dos extratos e frações, solubilizando as amostras com 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas com água sem cloro em concentrações distintas de 1000, 500, 250 e 125 µg/mL para os testes. Foram colocadas 15 larvas do 3º estágio em copo de plástico contendo as amostras e o volume foi completado para 5 mL. Para cada concentração foram usadas 45 larvas em triplicata. Solução aquosa de DMSO 0,5 % foi utilizada em triplicata como controle negativo.

A atividade larvicida foi avaliada após 24 horas por meio da contagem do número de larvas mortas em cada amostra. O controle positivo foi o inseticida temefós grau técnico 90% lote 005/2011 fabricado por laboratórios “Fersol Mairinque”, São Paulo, e feita a calibração segundo o protocolo recomendado pela Organização Mundial da Saúde descrito em WHO, 1981<sup>a,b</sup>. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas mortas. Os valores da concentração letal (CL<sub>50</sub>) em µg/mL foram determinados utilizando o método de análise Probit (FINNEY, 1971). Os resultados obtidos foram analisados levando-se em conta as diferentes amostras testadas e a porcentagem de mortalidade das larvas obtidas nos diferentes tratamentos.

#### 4.8.2.1 Determinação de ATP mitocondrial

##### 4.8.2.1.1 Preparo da suspensão de mitocôndrias

Para os ensaios sobre a síntese de trifosfato de adenosina (ATP), mitocôndrias das larvas vivas de *A. aegypti* foram isoladas. Neste ensaio, as larvas foram colocadas em aproximadamente dois volumes de meio de extração a frio composto por manitol a 0,4 M, tampão Tris-HCl (pH 7,2) 50 mM, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1,0 mM, cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 1,0 mM, 0,1% de cisteína (p/v) e 0,5 % de ácido graxo livre de albumina de soro bovino (BSA) (p/v).

Após dois minutos de contato com o meio, as larvas foram homogeneizadas em aparelho Van-Potter, e em seguida foi filtrado através de várias camadas de gaze para ser centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos depois de se ajustar o pH para 7,2 com hidróxido de potássio (KOH). O sobrenadante foi centrifugado a 20.000

rpm durante 10 min e o sedimento mitocondrial foi suspenso em 2,0 mL de um meio contendo manitol 0,3 M, EDTA 1,0 mM, 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazina etanosulfônico (HEPES) 20 mM (pH 7,2) e ácido graxo livre de BSA 0,2 % (w/v). As suspensões de mitocôndrias foram posteriormente purificadas num gradiente de Percoll™ de acordo com o procedimento descrito por Jackson et al. (1979) e Bracht et al. (2003). O sedimento mitocondrial resultante contendo cerca de 1,5-2,3 mg de proteína mitocondrial foi suspenso num volume final de 1,5 mL de um meio contendo manitol 0,3 M, EDTA 1,0 mM, HEPES 20 mM (pH 7,2) e ácido graxo livre de BSA 0,2 % (p/v). Todas as operações foram realizadas a 0-4°C.

#### 4.8.2.1.2 Determinação da produção de ATP mitocondrial

A suspensão de mitocôndrias obtidas a partir das larvas (1 g/mL) foram incubadas a 25 °C no mesmo meio de reação utilizado para medir o oxigênio contendo L-malato 10 mM, L-glutamato 10 mM, tiamina pirofosfato clorado 300 µM, NAD 200 µM (VIANELLO et al., 1997). A reação foi iniciada pela adição de ADP 5,0 mM e parada após 10 minutos pela adição de 0,3 M de ácido perclórico. Após centrifugação a 4000 rpm durante 10 min, o sobrenadante foi neutralizado com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e o perclorato de potássio foi removido por centrifugação a 4000 rpm durante 5 min. A fim de excluir a participação de qualquer síntese de ATP independente da fosforilação oxidativa, tais como a síntese de ATP da cinase dependente de adenilato, um controle com antimicina A 10 µM foi adicionado ao sistema de incubação. As quantidades residuais de ATP medida na presença de um antimicina foram descontados. O teor de ATP do extrato neutralizado foi determinado espectrofotometricamente, utilizando um método enzimático da hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase de acordo com LAMPRECHT e TRAUTSCHOLD (1974). Os dados foram submetidos a regressão linear pelo software Sigmaplot 11.

## 4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto de *Guettarda uruguensis* foi realizada através do método da concentração inibitória mínima (CIM) (CLSI, 2008). As culturas de micro-organismos utilizados foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis*

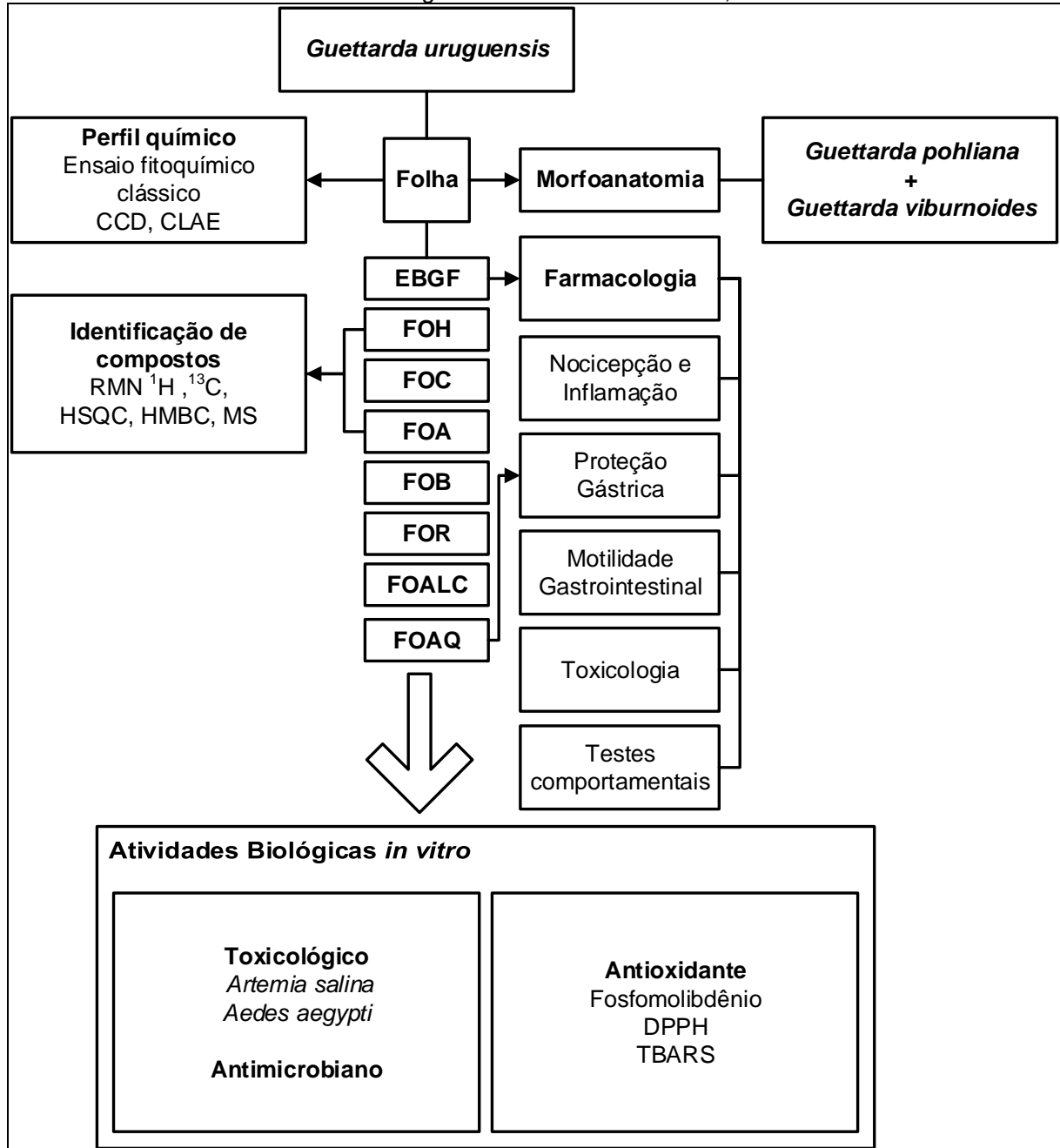
(ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Os extratos e frações foram preparados através de diluição seriada em 100 µL de caldo Mueller-Hinton (MHB–Merck, Darmstadt, Alemanha), em um intervalo de concentração de 1000 a 7,81 µg/mL em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de “U”.

As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina fisiológica na concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL, equivalente ao tubo 0,5 de McFarland e em seguida foram inoculadas em um volume de 5 µL nos poços, permanecendo uma concentração final de  $10^4$  UFC/mL. O controle negativo da atividade inibitória dos diluentes, etanol e DMSO, foi realizado adicionando-se 100 µL de solução de etanol 10% e DMSO 2% em 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. Para o controle de esterilidade, foram utilizados 100 µL de MHB e 100 µL do extrato, fração ou composto isolado. O controle positivo ou de viabilidade bacteriana, foi preparado com 100 µL de MHB e 5 µL dos inóculos bacterianos. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 20 horas. Decorrido este intervalo de tempo foram acrescentados 20 µL de solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 0,5% e as microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C. Para validação da técnica e controle metodológico foi verificado se as linhagens referência utilizadas estavam dentro do intervalo de confiança estipulado pelo CLSI (2008). Ou seja, quando testada Vancomicina para *S. aureus* entre 0,5-2,0 µg/mL e para *E. faecalis* entre 1-4 µg/mL.

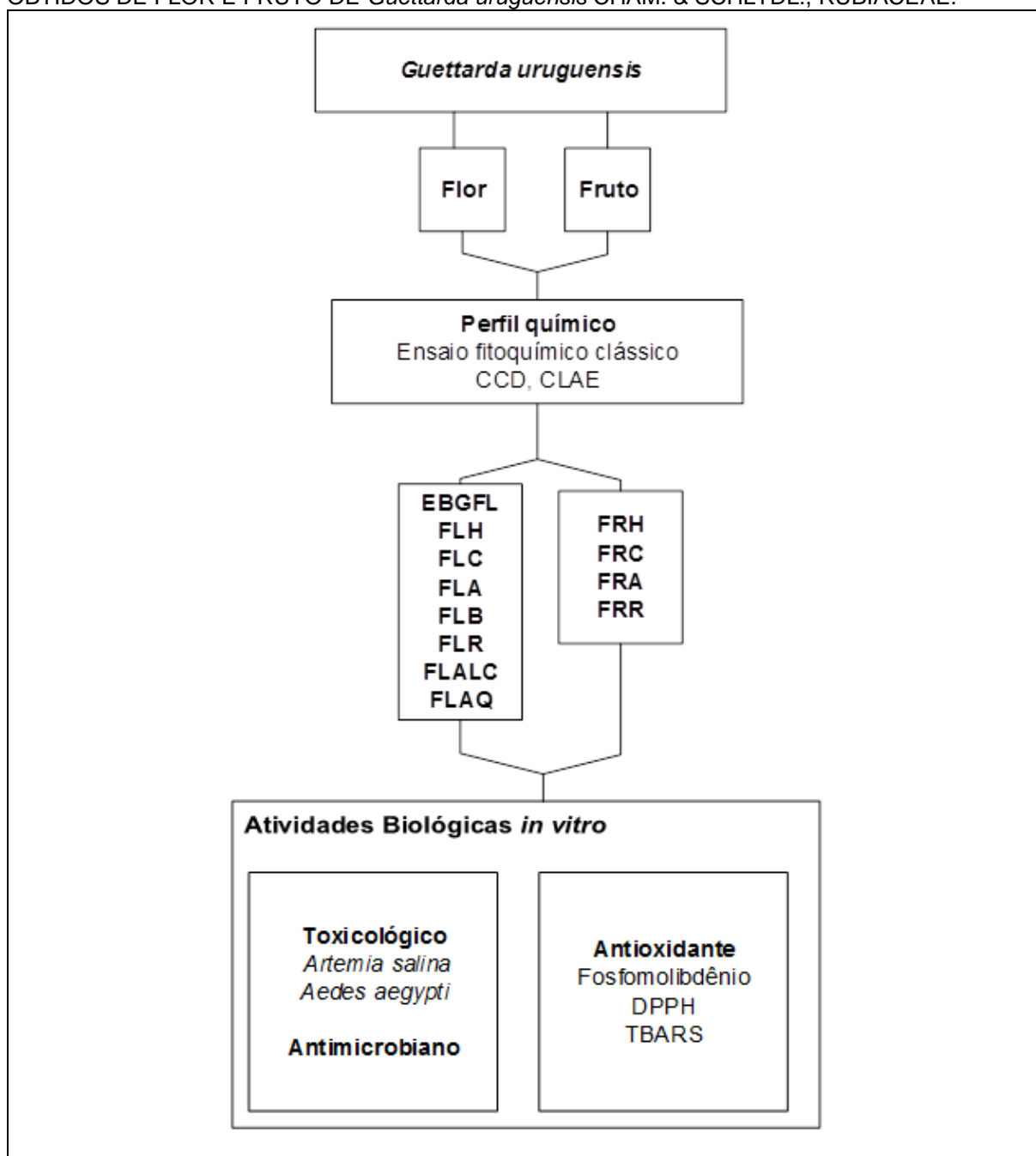
Para a *Candida albicans* foi utilizado meio líquido RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA) (CLSI, 2008). A suspensão foi preparada em solução salina fisiológica na concentração inicial de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL, sendo diluída em meio líquido até atingir uma concentração final de  $1,0$  a  $5,0 \times 10^3$  UFC/mL e em seguida inoculados 100 µL nos orifícios. A microplaca foi incubada por 48 horas a 35 °C. Após este período foram adicionados 20 µL de TTC 0,5% e a placa foi reincubada por três horas a 35°C.

## 4.9 ESQUEMA EXPERIMENTAL

FIGURA 15 – ESQUEMA DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM OS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.

FONTE: o autor (2017).

FIGURA 16 – ESQUEMA DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM OS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FLOR E FRUTO DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.



FONTE: o autor (2017).

#### 4.10 ESTUDO FARMACOLÓGICO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO OBTIDO DE FOLHA DA ESPÉCIE *Guettarda uruguensis*

Os testes farmacológicos da espécie *Guettarda uruguensis* foram realizados utilizando o extrato etanólico bruto obtido a partir do órgão vegetal folha (EBGF). O caráter de escolha de EBGF ocorreu em função dos resultados observados nos testes *in vitro* (antioxidante, larvicida, toxicológico, antimicrobiano) para o órgão vegetal folha quando em comparação aos resultados demonstrados para flor e fruto submetidos as mesmas avaliações.

Tendo como parâmetro os resultados obtidos previamente por meio dos testes *in vitro* obtidos no presente estudo, o uso popular, atividades biológicas e farmacológicas descritas em literatura para outras espécies do gênero *Guettarda* procedeu-se a escolha dos métodos de avaliação. O estudo farmacológico do extrato etanólico bruto obtido de folhas da espécie *Guettarda uruguensis* (EBGF) foi desenvolvido com o objetivo de investigar os efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório, proteção gástrica, atividade gastrointestinal, testes comportamentais e avaliação de toxicidade. No teste de proteção gástrica avaliou-se a ação do EBGF e do extrato aquoso obtido de folha (FOAQ). Os testes de nocicepção, inflamação, atividade gastrointestinal, testes comportamentais e toxicidade foram realizados somente com o EBGF.

##### 4.10.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*) adultos de ambos os sexos, provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR e do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (ANEXO C). Para avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória foram utilizados camundongos Swiss machos. Para avaliação de proteção e esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e avaliação toxicológica foram utilizados camundongos Swiss fêmeas. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclo claro/escuro de 12 horas, tratados com ração e água *ad libitum*. Os animais permaneceram no laboratório para sua adaptação por um período de pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. O projeto foi aprovado pelo

Comitê Setorial de Ética em Experimentação Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR (CEUA/BIO-UFPR, número de aprovação 794; ANEXO B).

#### 4.10.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina

O teste de nocicepção induzida por formalina foi realizado conforme metodologia descrita por Hunskaar et al. (1985). Este modelo permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica e a inflamatória (HUNSKAAR, HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992). Os animais foram pré-tratados com veículo (C: salina, 10 mL/kg) ou EBGf (30, 100 e 300 mg/kg) por via oral e após 60 min foi injetado por via intraplantar (i.pl.) um volume de 20 µl de solução de formalina 2,5% na superfície ventral da pata posterior direita do animal. A resposta nociceptiva foi observada durante o período de 0-5 min (fase neurogênica) e de 15-30 min (fase inflamatória) após a injeção da formalina, contabilizando o tempo (em segundos) que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada.

#### 4.10.3 Contorções abdominais induzidas por injeção intraperitoneal de ácido acético

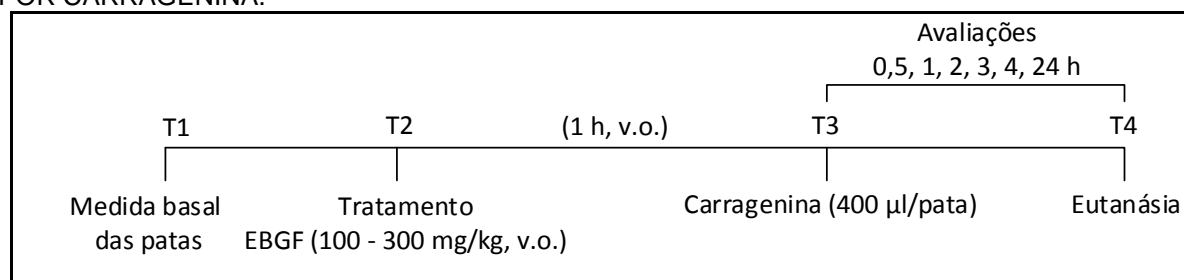
O teste de contorções abdominais induzidas por injeção intraperitoneal de ácido acético foi realizado conforme metodologia descrita por Nascimento et al. (2010). Nesse modelo, a injeção intraperitoneal de ácido acético permite avaliar a dor visceral de origem inflamatória, com pouca especificidade, mas boa sensibilidade. É considerado uma ferramenta para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos produtos (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001). Os animais foram tratados pela via oral com veículo (salina, 10 mL/kg) ou EBGf (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) e após 60 min do tratamento administrou-se via intraperitoneal (i.p.) 0,45 mL de ácido acético 0,6%. O número de contorções abdominais (contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores) foi quantificado cumulativamente, durante 20 min (COLLIER et al., 1968; SANTOS et al., 1999; LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001).

#### 4.10.4 Edema de pata induzido por carragenina



O edema de pata induzido por carragenina é uma metodologia que permite a observação do efeito sistêmico do composto teste através da indução de um estímulo inflamatório local. O edema é induzido pela administração intraplantar (i.pl.) de carragenina (20 µL solução 2%) na pata traseira direita dos camundongos (adaptado de LEVY,1969). A espessura da pata traseira dos animais foi avaliada previamente com o uso de um micrômetro digital sendo essa a medida basal. Em seguida, o EBGf (100 e 300 mg/kg, v.o) foi administrado 60 minutos antes da administração da carragenina (400 µg/pata, i.pl.) na pata posterior direita no volume de 20 µL. A espessura da pata traseira direita foi avaliada novamente com o nos tempos de 0,5, 1, 2, 3, 4 e 24h após a aplicação do estímulo inflamatório. Os resultados são expressos como a diferença entre a espessura da pata a cada tempo e a espessura antes da injeção de carragenina (basal). Como controle negativo, foi injetado 20 µL de salina na pata esquerda. O esquema experimental esta ilustrado na FIGURA 17.

FIGURA 17 - AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGf SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.



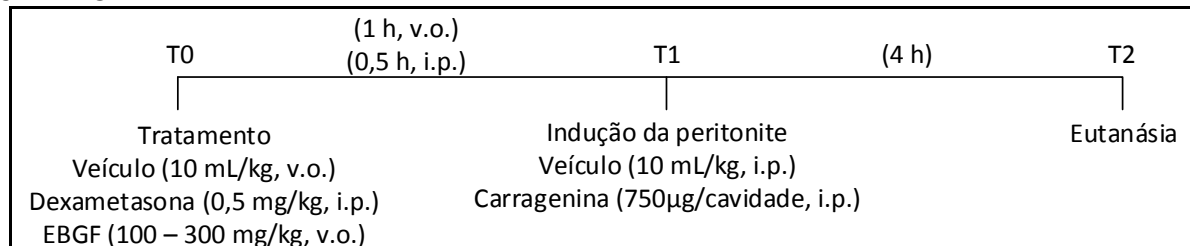
FONTE: o autor (2017).

#### 4.10.5 Peritonite induzida por carragenina

Para avaliar a atividade anti-inflamatória do EBGf a carragenina foi utilizada como estímulo para produzir uma resposta inflamatória aguda na cavidade peritoneal em camundongos. Os animais foram pré-tratados com veículo (salina, 10 mL/kg, v.o.), extrato bruto das folhas (100 e 300 mg/kg, v.o.) e dexametasona (anti-inflamatório esteroide, glicocorticóide, 0,5 mg/kg, v.o.) 60 minutos antes da injeção de carragenina (750 µg/cavidade) na cavidade peritoneal. O grupo controle negativo recebeu somente uma injeção de salina (10 mL/kg) no peritônio. Quatro horas após a indução da peritonite, os animais foram mortos por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 mL de solução salina heparinizada (20

UI/mL). A seguir, o líquido peritoneal foi coletado e processado para posterior análise (PAGANO et al., 2002). A contagem de leucócitos totais foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer após a diluição do fluido peritoneal com líquido de Türk (1:20). O esquema experimental esta ilustrado na FIGURA 18.

FIGURA 18 - AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE A PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA

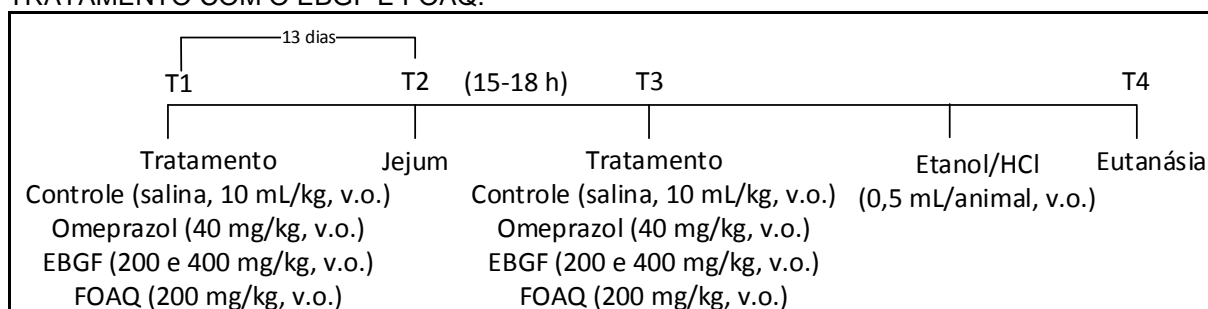


FONTE: o autor (2017).

#### 4.10.6 Proteção gástrica

A avaliação do efeito de proteção gástrica do extrato etanólico bruto obtido das folhas de *G. uruguensis* (EBGF) foi realizada de acordo com o método de Andreo et al. (2006). Camundongos swiss fêmeas (N=6) foram tratados via oral com o veículo salina (10 mg/mL), omeprazol (40 mg/kg) e EBGF (200 e 400 mg/kg) e FOAQ (200 mg/kg) uma vez ao dia, durante 7 dias consecutivos. Após o penúltimo tratamento os animais foram mantidos em jejum por 24 horas com acesso livre a água. Uma hora após o último tratamento, os animais receberam 0,2 mL de uma solução de 54 0,3 M de HCl/etanol 60% (50:50), via oral. Uma hora após a administração do agente necrotizante, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os estômagos foram removidos, abertos ao longo da maior curvatura e estendidos para análise das lesões gástricas. As lesões gástricas foram avaliadas através do software Image Tool<sup>®</sup> Versão 3.0. O esquema experimental esta ilustrado na FIGURA 19.

FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA MUCOSA GÁSTRICA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM O EBGF E FOAQ.



FONTE: o autor (2017).

#### 4.10.7 Avaliação de motilidade gástrica e trânsito intestinal

A avaliação do efeito de motilidade gástrica e trânsito intestinal do extrato etanólico bruto obtido das folhas de *Guettarda uruguensis* (EBGF) foi realizada de acordo com o método de Scarpignato (1980) e Stickney (1959). Camundongos swiss fêmeas foram mantidos em jejum por 6 horas com acesso livre a água. Transcorrido esse tempo, os animais foram tratados com o EBGF (200 e 400 mg/kg, v.o.), atropina (3mg/kg, s.c.), metoclopramida (30mg/kg, v.o.) e soro fisiológico (0,1mL/10g, v.o.). Após 1 hora dos tratamentos, foi administrado por via oral uma solução semi-sólida de um marcador colorido (vermelho de fenol 0,5% em carboximetilcelulose 1,5%; 10 mg/mL). O grupo controle tempo zero foi morto por deslocamento cervical logo após a administração do marcador colorido, e os outros grupos após 15 min da administração. A cavidade abdominal foi aberta, o piloro e a parte distal do esôfago foram pinçados, o estômago foi retirado com seu conteúdo, aberto e lavado com 7 ml de água destilada. O conteúdo gástrico foi coletado e centrifugado a 1500 rpm por 15 min. Na sequência, 0,6 ml do sobrenadante foi coletado, e adicionado a 0,6 ml de NaOH 0,025 N (pH12). A mistura foi agitada e a absorbância foi medida em 560 nm, usando um espectrofotômetro UV-VIS 1601 Shimadzu. Os resultados são expressos pela porcentagem de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle tempo zero. O grupo controle tempo zero, constituído por animais submetidos a administração apenas do marcador colorido, foi eutanasiado logo após a administração do marcador.

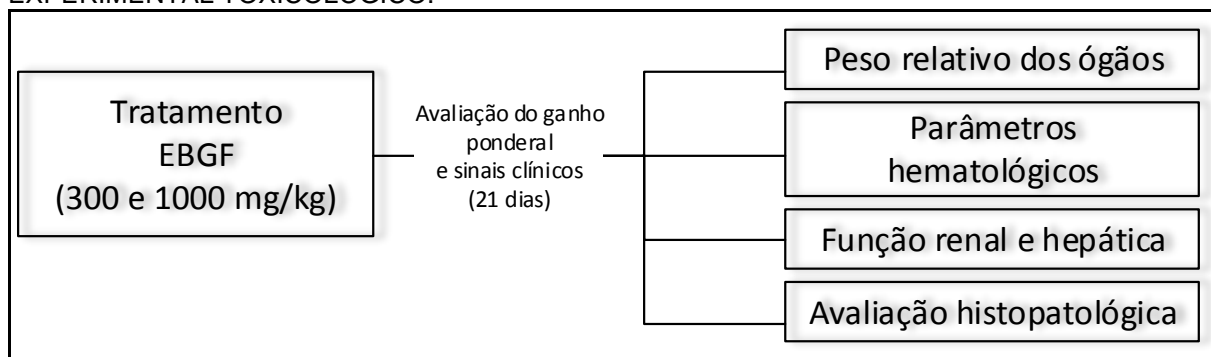
Para a determinação do trânsito intestinal, os mesmos animais submetidos a avaliação de esvaziamento gástrico tiveram suas cavidades abdominais abertas e após o pinçamento e remoção do estômago, seus intestinos delgados foram

removidos. Determinou-se o comprimento total do intestino delgado de cada animal (distância entre o piloro até a válvula ileocecal), e a distância percorrida pelo marcador (até a última porção que contenha pelo menos 1 cm contínuo do marcador). Os resultados foram expressos em porcentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado. Como controles foram utilizados soro fisiológico (0,1 mL/10g, v.o.), atropina (3mg/kg, s.c.) e neostigmina (20 µg/kg, s.c.).

#### 4.10.8 Toxicidade do extrato etanólico bruto obtido de folhas da espécie *Guettarda uruguensis* por metodologia *in vivo*

Para avaliação da toxicidade do EBGF foram realizadas análises bioquímicas, hematológicas, histopatológicas e avaliação de sinais clínicos. O esquema experimental está ilustrado pela FIGURA 20.

FIGURA 20 - AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BÍOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL TOXICOLÓGICO.



FONTE: o autor (2017).

##### 4.10.8.1 Triagem farmacológica comportamental

A triagem farmacológica é realizada por meio de observações comportamentais sistemáticas, fornecendo uma estimativa da toxicidade da substância sobre o sistema nervoso central e autônomo (CUNHA et al., 2009). A triagem foi realizada por meio da administração diária do EBGF (300 - 1000 mg/kg) ou veículo durante 21 dias, com observação dos parâmetros comportamentais a cada 24 horas. Os parâmetros comportamentais avaliados foram: piloereção,

cianose, respiração, tônus, atividade geral. Os escores atribuídos foram: 0-ausência de sinal, 1-raros sinais, 2-sinais evidentes, 3-sinais evidentes e contínuos.

#### 4.10.8.2 Avaliação do ganho ponderal

Com o objetivo de avaliar o ganho ponderal, os animais foram pesados a cada dois dias durante o período de 21 dias.

#### 4.10.8.3 Análise hematológica

Após o tratamento realizado no 21º dia, os animais foram alocados em jejum pelo período de 12 horas, com consumo de água à vontade. Para a coleta de sangue os animais foram anestesiados com cetamina:xilazina e o sangue dos animais foi coletado pela aorta abdominal e armazenado em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético disódico a 5%. As amostras foram imediatamente submetidas a análise em contador hematológico automatizado. Os resultados foram expressos por  $\mu\text{l}$ /amostra, com exceção do hematócrito que foi expresso em porcentagem.

#### 4.10.8.4 Avaliação do peso relativo dos órgãos

Foram determinados o peso relativo dos órgãos: fígado, rins, baço, pulmão, coração, cérebro, estômago. Os resultados são expressos como peso do tecido por 100 g de peso do animal.

#### 4.10.8.5 Análise histopatológica

Cortes transversais do lóbulo direito do fígado, rins e estômago foram obtidos e fixados no líquido metacan, composto por 60 mL de metanol, 30 mL de clorofórmio e 10 mL de ácido acético glacial, por três horas. Na sequência, o material foi submetido a banhos consecutivos de etanol absoluto por três vezes durante 30 minutos e permaneceu em repouso por 16 horas em temperatura ambiente no etanol absoluto contendo xilol na mesma proporção. Após as 16 horas, o material sofreu diafanização em xilol três vezes consecutivas durante 30 minutos cada. O material

foi então impregnado em parafina líquida por duas horas em estufa, sob temperatura de 58 °C. Os blocos histológicos foram submetidos à microtomia, obtendo-se cortes com três micrometros de espessura. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com hematoxilina de Harris, por 60 segundos. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente com água destilada para posterior coloração com eosina durante 1 minuto, segundo Beutler et al. (1995) e Culling et al. (1985). Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada, desidratadas em solução crescente de etanol (70 a 100%, durante cinco minutos em cada etapa), diafanizadas primeiramente em álcool e xilol (etapa única de cinco minutos) e após somente em xilol (duas etapas a 100%, durante cinco minutos cada). Ao final da preparação, as lâminas foram avaliadas em microscopia ótica.

#### 4.10.9 Avaliação comportamental dos camundondos tratados com o extrato etanólico bruto obtido das folhas de *Guettarda uruguensis*

A atividade locomotora e os parâmetros comportamentais do tipo ansiolítico e tipo depressivo foram avaliados por meio dos testes de campo aberto, teste de esconder esferas e teste de natação forçada os quais foram realizados após a administração aguda e prolongada (21 dias) do EBGF (300-1000 mg/kg, v.o.). O esquema experimental esta ilustrado pela FIGURA 21.

##### 4.10.9.1 Teste do campo aberto

A avaliação da atividade locomotora dos animais foi realizada por meio do teste do campo aberto. Transcorrido o tempo de 1 hora após a administração de veículo (salina, 0,1 mL/10 g, v.o.) e do EBGF (300-1000 mg/kg, v.o.), cada camundongo foi avaliado. O campo aberto usado consiste em uma arena quadrada confeccionada em madeira (50 cm de altura e 50 cm de largura) pintada de branco. A base da arena foi dividida em 16 espaços quadrados dispostos com o mesmo espessamento. Cada camundongo foi colocado no centro do campo aberto e o comportamento deambulação (número de quadrados cruzados com todas as patas) foi contabilizado durante 6 minutos. As sessões foram filmadas por uma câmera colocada acima do campo aberto. Foi utilizado etanol 10% em água para limpeza do

campo aberto entre os animais. O intuito do teste foi analisar a locomoção do animal, verificando se os resultados obtidos em outros testes não eram decorrentes de alterações motoras nos animais em consequência do tratamento recebido.

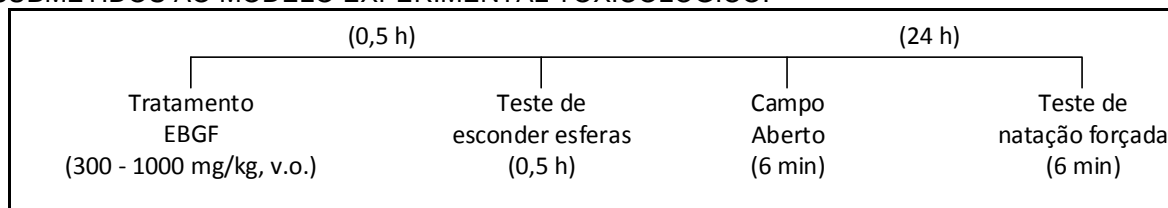
#### 4.10.9.2 Teste de esconder esferas

Imediatamente após o teste de campo aberto, cada camundongo foi colocado no centro de uma caixa de polietileno forrada com 5 cm de cepilho contendo 24 esferas de vidro uniformemente distribuídas pela periferia da caixa, durante o tempo de 30 minutos. Ao final desse período de exposição, contabilizou-se o número de esferas com pelo menos 2/3 da sua superfície coberta por serragem (BROEKKAMP et al., 1986). Este modelo explora o comportamento de roedores de ocultar objetos que representam ou são associados à estimulação aversiva. Drogas que apresentam atividade tipo ansiolítica diminuem o número de objetos escondidos pelos animais (TREIT et al., 1981).

#### 4.10.9.3 Teste de natação forçada

Transcorridas 24 horas do teste de esconder esferas, e após o tempo de 1 hora após a administração do veículo (salina, 10 mL/kg, v.o.) e do EBGF (300-1000 mg/kg, v.o.), cada camundongo foi colocado no centro de um cilindro de vidro (5 x 12,5 cm) preenchido com 19 cm de água a aproximadamente 24°C, durante o tempo de 6 minutos. Registra-se o tempo de latência para a imobilidade e após os dois primeiros minutos o tempo de imobilidade do animal. O animal foi julgado imóvel quando parava de nadar e executava apenas movimentos mínimos apenas para permanecer flutuando com a cabeça acima do nível da água. Após o teste de cada camundongo, estes foram secos e colocados em ambiente aquecido, enquanto que a água do cilindro foi trocada ao término de cada teste (CRYAN; MARKOU; LUCKI, 2002; CRYAN; VALENTINO; LUCKI, 2005). É considerado efeito tipo antidepressivo uma redução do tempo de imobilidade em uma determinada dose que não aumente a atividade locomotora (PORSOLT, 1977.; BORSINI e MELI, 1988).

FIGURA 21 - AVALIAÇÃO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA E COMPORTAMENTO DO TIPO-ANSIOLÍTICO E TIPO-ANTIDEPRESSIVO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO EXPERIMENTAL TOXICOLÓGICO.



FONTE: o autor (2017).

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  erro padrão da média. Com relação a atividade antioxidante, as  $IC_{50}$  foram estimadas por regressão linear e a comparação entre os valores foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett e/ou Tukey. A correlação entre o teor de compostos fenólicos e os resultados de atividade antioxidante foi realizada pelo coeficiente de correlação de Pearson e análise das componentes principais. Com relação a toxicidade para náuplios de *Artemia salina* e *Aedes aegypti*, a estimativa da  $CL_{50}$  foi realizada pelo método de Probit. No estudo farmacológico, a comparação entre os grupos experimentais foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey ou Newman-Keuls. Os softwares utilizados foram Microsoft Office Excel 2010, GraphPad Prism 5.1nk e Matlab R2015a.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 MORFOANATOMIA FOLIAR DAS ESPÉCIES *Guettarda uruguensis*, *Guettarda pohliana* e *Guettarda viburnoides*

#### 5.1.1 Morfologia

*Guettarda pohliana* (FIGURA 22 A e FIGURA 22 B, FIGURA 4) apresenta porte de arbusto com aproximadamente 3 metros de altura. As folhas são simples, de filotaxia oposta e têm estípulas interpeciolares. A lâmina foliar é simétrica com formato lanceolado ou oblongo-lanceolado e de textura membranácea. O ápice é agudo e a base aguda ou obtusa. O tamanho médio das folhas é de 8-12 cm × 4,6-6 cm. Apresenta nervuras secundárias 9-11/lado. O fruto apresenta formato de drupa, de coloração vermelha.

*Guettarda uruguensis* (FIGURA 22 C e FIGURA 22 D, FIGURA 5) apresenta porte de arbusto com aproximadamente 4 metros de altura. As folhas são simples, de filotaxia oposta e tem estípulas interpeciolares. A lâmina foliar é simétrica com formato ovalado e de textura papirácea. O ápice é acuminado e a base aguda ou obtusa. O tamanho médio das folhas é de 5-8 cm × 2-3,2 cm. Apresenta nervuras secundárias 6-10/lado. A flor tem coloração rosada e é extremamente aromática. O fruto apresenta formato de drupa, de coloração roxa a negra.

*Guettarda viburnoides* (FIGURA 22 E e FIGURA 22 F, FIGURA 6) apresenta porte de árvore com aproximadamente 8 metros de altura. As folhas são simples, de filotaxia oposta e têm estípulas interpeciolares. A lâmina foliar é simétrica com formato largo-lanceolada, ovado-lanceolada ou romboidal e de textura membranácea ou cartácea. O ápice é agudo e a base aguda ou obtusa. O tamanho médio das folhas é de 10-13 cm × 4,4-8 cm. Apresenta nervuras secundárias 7-11/lado. O fruto apresenta formato de drupa, de coloração amarelada.

FIGURA 22 –CARACTERÍSTICAS DA ANATOMIA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Guettarda*.



Legenda: Aspecto de espécies de *Guettarda* no hábito. A- flor de *G. pohliana*. B- fruto de *G. pohliana*. C- flor de *G. uruguensis*. D- fruto de *G. uruguensis*. E- flor de *G. viburnoides*. F- fruto de *G. viburnoides*. Fotografias: Helton Josué Teodoro Muniz.

### 5.1.2 Anatomia

A lâmina foliar, em secção transversal, apresenta epiderme uniestratificada com células maiores na face adaxial se comparadas com a face abaxial e apresenta uma cutícula fina e lisa em *G. pohliana* (FIGURA 23A) e *G. viburnoides* (FIGURA 23C) e mais espessa em *G. uruguensis* (FIGURA 23B). Os estômatos estão presentes na face abaxial, classificando a folha das três espécies como hipoestomática. São classificados como paracítico ou rubiáceos. Em *G. pohliana* (FIGURA 23A e 24E) e *G. uruguensis* (FIGURA 23B e 25F) os estômatos estão localizados no mesmo nível das células epidérmicas. Em *G. viburnoides* (FIGURA 23C e 26F) os estômatos estão projetados acima do nível das células epidérmicas. O mesofilo possui organização dorsiventral nas três espécies, apresentando de uma a duas camadas de células paliçádicas voltadas à face adaxial, e parênquima esponjoso multiestratificado na face oposta. Ao longo do mesofilo, encontram-se feixes vasculares de pequeno porte do tipo colateral, envoltos por uma bainha parenquimática que se prolonga até a epiderme da face adaxial formando extensões de bainha que são constituídas por células com paredes muito espessadas. Idioblastos contendo drusas encontram-se distribuídos no parênquima paliçádico (FIGURA 23A-C).

Os tricomas (FIGURA 24–26) apresentam quatro tipos morfológicos: (a) tipo 1 - tricoma unicelular, longo, inclinado na superfície, com parede espessas e cristais no interior. Ocorre nas três espécies; (b) tipo 2 - tricoma pluricelular, longo, ereto, de paredes mais delgadas, com ou sem ornamentação na superfície. Ocorre nas três espécies; (c) tipo 3 - tricoma bicelular, ereto, pontiagido, menor que os tipos 1 e 2 e com paredes delgadas. Ocorre nas três espécies. (d) tipo 4 - tricoma unicelular, inclinado, com ápice mais arredondado e paredes delgadas. Ocorre somente na espécie *G. viburnoides*. Os tricomas ocorrem sobre a superfície adaxial e abaxial, apresentando maior densidade na face abaxial das três espécies. Visualmente, *G. viburnoides* foi a espécie mais pilosa, apresentando os quatro tipos de tricomas descritos.

A nervura vascular central é biconvexa em *G. pohliana* e *G. uruguensis* (FIGURA 27A e FIGURA 27B.), sendo a superfície adaxial mais proeminente e afilada em *G. uruguensis*. *G. viburnoides* apresenta nervura central plano-convexa (FIGURA 27C). Para *G. pohliana*, observamos um sistema vascular envolto por

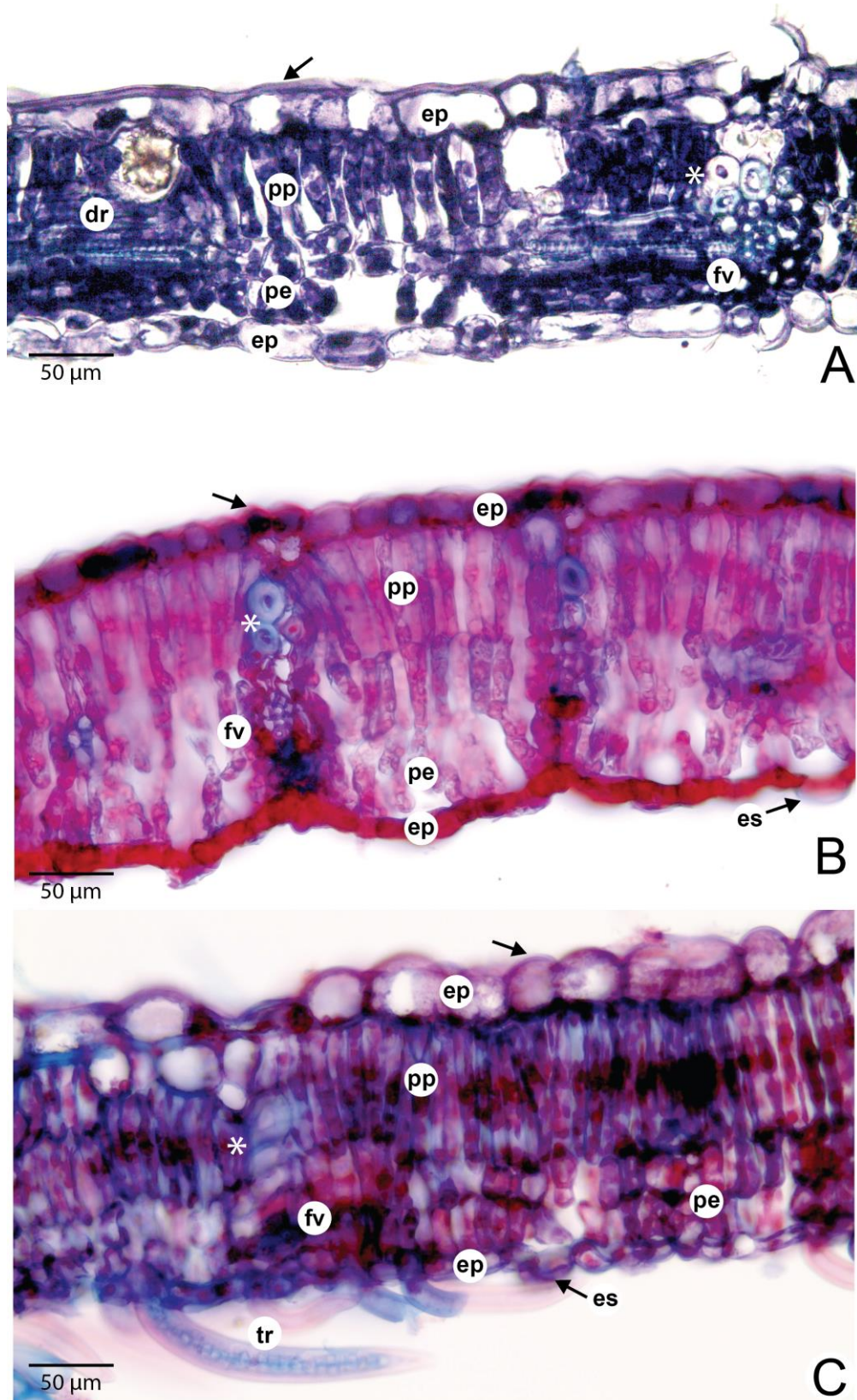
fibras, que apresentam parede espessa e não lignificada junto ao floema (FIGURA 27A e FIGURA 27G). Em posição subepidérmica ocorrem cerca de cinco camadas de colênquima variando entre angular para *G. pohliana* (FIGURA 27D) e anelar em *G. uruguensis* (FIGURA 27E) e *G. viburnoides* (FIGURA 27F). O restante do tecido fundamental é parenquimático com drusas nas três espécies (FIGURA 27H).

O pecíolo, em secção transversal, apresenta contorno arredondado nas três espécies (FIGURA 28A-C). A epiderme é uniestratificada, formada por células com formato arredondado, em vista transversal com presença de tricomas tectores semelhantes aos do limbo nas três espécies. Em posição subepidérmica ocorrem cerca de cinco camadas de colênquima variando entre angular para *G. pohliana* (FIGURA 28D) e anelar para *G. uruguensis* (FIGURA 28E) e *G. viburnoides* (FIGURA 28F). O restante do tecido fundamental é parenquimático com drusas presentes em *G. pohliana* (FIGURA 29A) e *G. uruguensis* (FIGURA 29B). O tecido vascular é formado por um feixe vascular colateral em forma de ferradura, mais aberto, com medula ampla em *G. pohliana* e *G. viburnoides* (FIGURA 29D e 29F) e mais fechado em *G. uruguensis*, com medula pouco delimitada (FIGURA 29C). Feixes floemáticos de pequeno porte ocorrem na região medular junto ao protoxilema semelhante em *G. pohliana* e *G. viburnoides*. Em *G. uruguensis* esses feixes ficam adensados dando um aspecto de feixe bicolateral (FIGURA 29C).

### 5.1.3 Testes Microquímicos

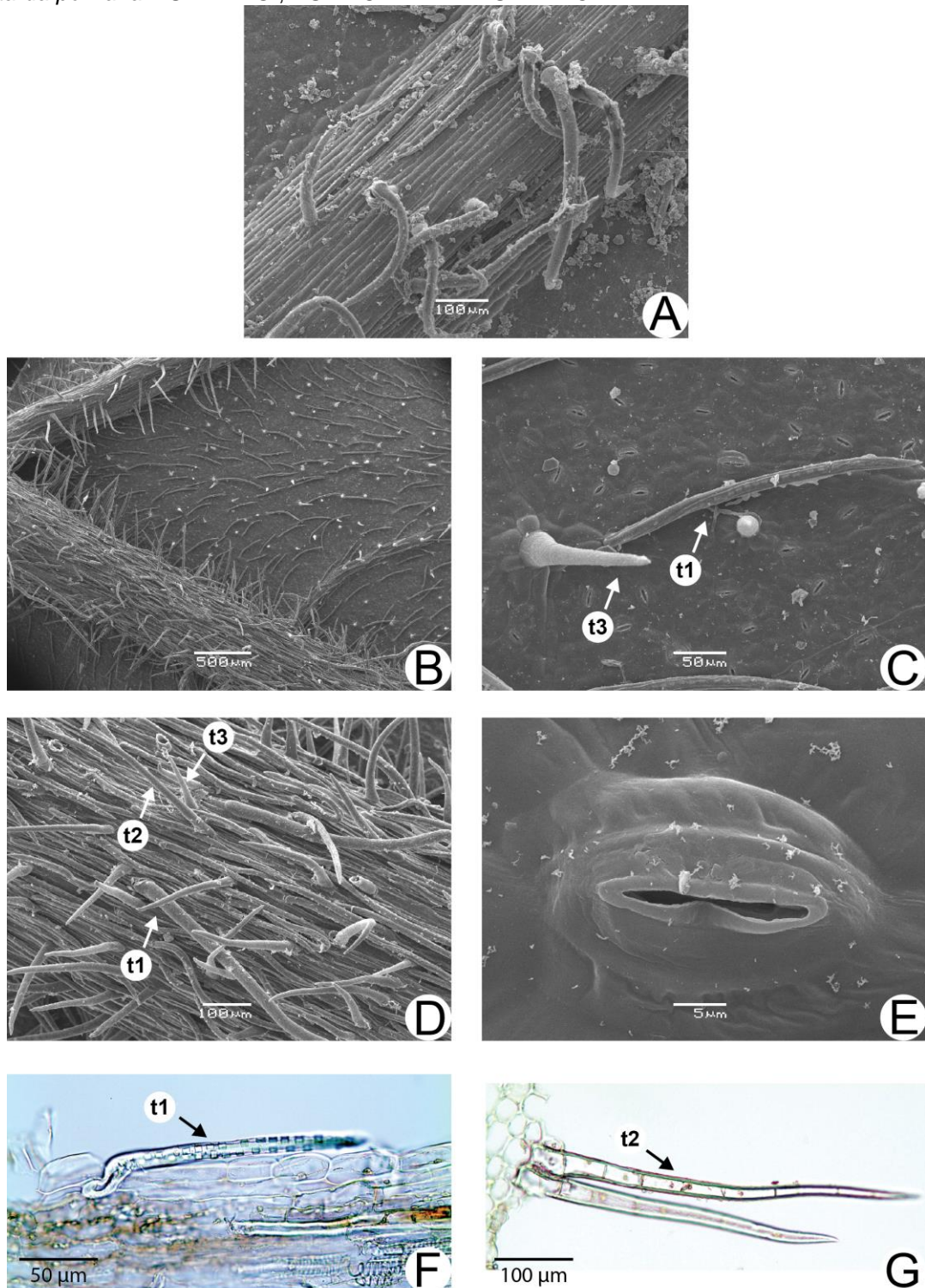
Foram detectadas células com conteúdo fenólico (teste positivo com cloreto férrico) e lipídico (positivo para sudan) em *G. pohliana* (FIGURA 30), *G. uruguensis* (FIGURA 31) e *G. viburnoides* (FIGURAS 32).

FIGURA 23 –MESOFILO DE *Guettarda pohliana*, *Guettarda uruguensis* e *Guettarda viburnoides* EM SECÇÃO TRANSVERSAL.



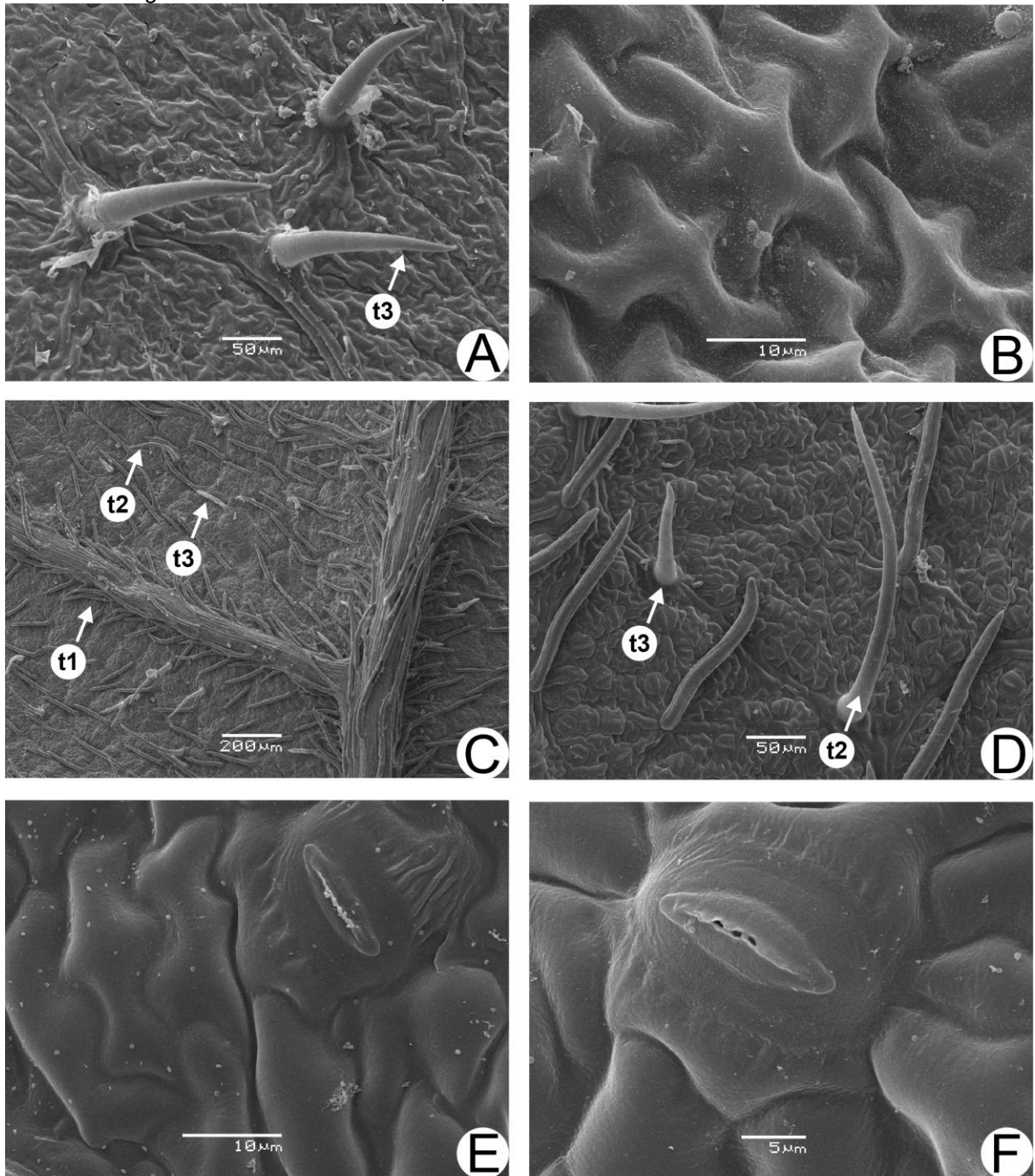
Legenda: A. *Guettarda pohliana*. B. *Guettarda uruguensis*. C. *Guettarda viburnoides*. Abreviaturas: seta - cutícula; ep - ep - epiderme; pp - parênquima paliádico; pe - parênquima esponjoso; dr - drusa; \* extensão de bainha; fv - feixe vascular; es - estômato; tr - tricoma. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 24 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE FOLIAR DE *Guettarda pohliana* MÜLL. ARG., RUBIACEAE EM VISTA FRONTAL.



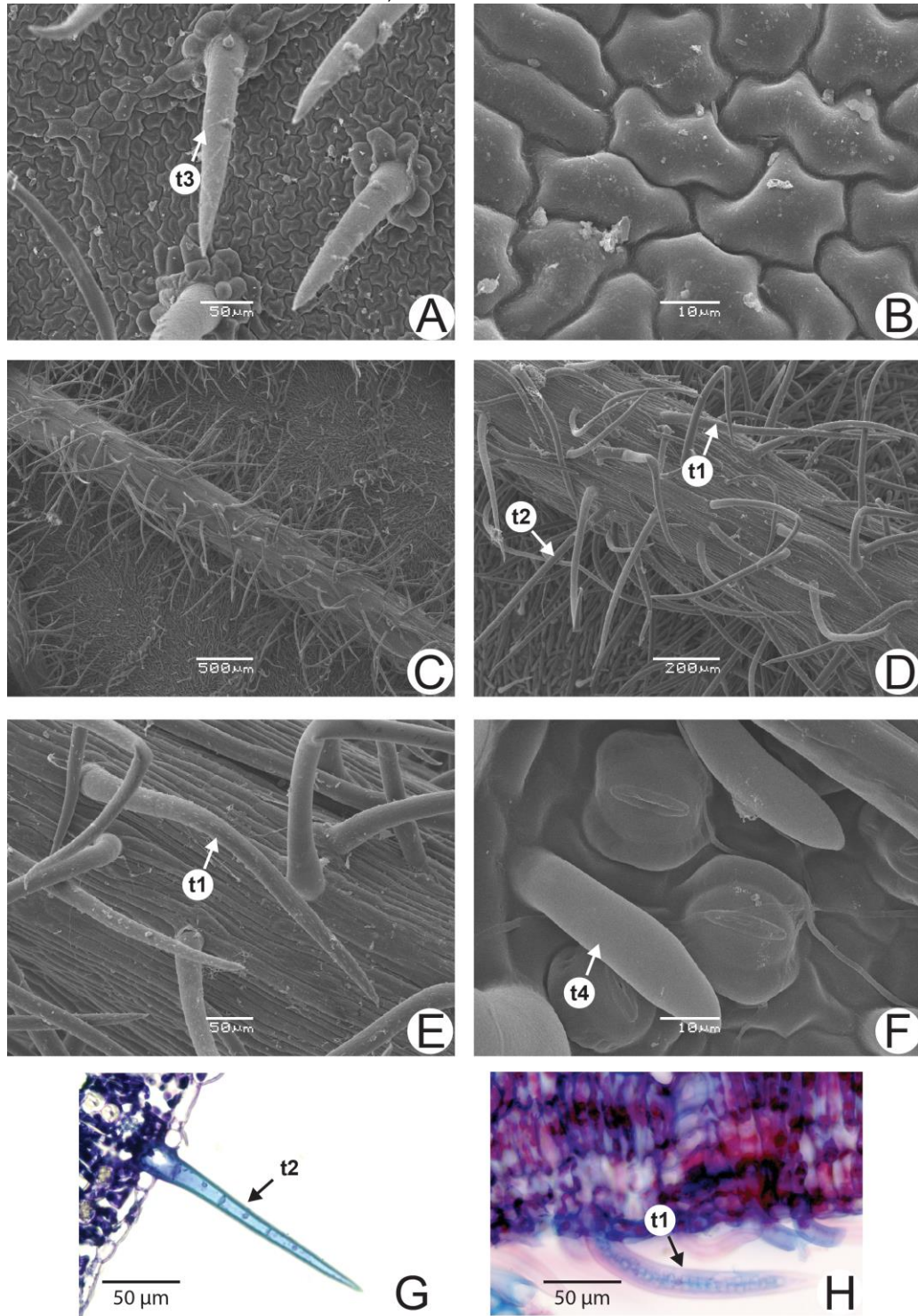
Legenda: A. Superfície foliar adaxial com tricomas tectores tipo 1 (t1) sobre a nervura central. B-F. Superfície foliar abaxial. B-C. Tricomas tectores tipo 1 (t1) e tipo 3 (t3) sobre o limbo. D. Detalhe dos tricomas tectores tipo 1 (t1) e tipo 3 (t3). E. Detalhe de um estômato. F. Detalhe dos tricomas tipo 1 (t1), tipo 2 (t2) e tipo 3 (t3) sobre a nervura central. G. Fotomicrografias de tricoma tipo 1 (t1) em corte transversal de limbo. F. Fotomicrografias de tricoma tipo 2 (t2) em corte transversal da nervura central. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 25 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE FOLIAR DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE EM VISTA FRONTAL.



Legenda: A-B. Superfície foliar adaxial. A. Tricomas tectores tipo 3 (t3) sobre o limbo. B. Superfície foliar adaxial. C-F. Superfície foliar abaxial. C. Tricoma tipo 1 (t1), tipo 2 (t2) e tipo 3 (t3) sobre o limbo. D. Detalhe dos tricomas tectores tipo 2 (t2) e tipo 3 (t3). E. Detalhe de um estômato. FONTE: o autor (2017).

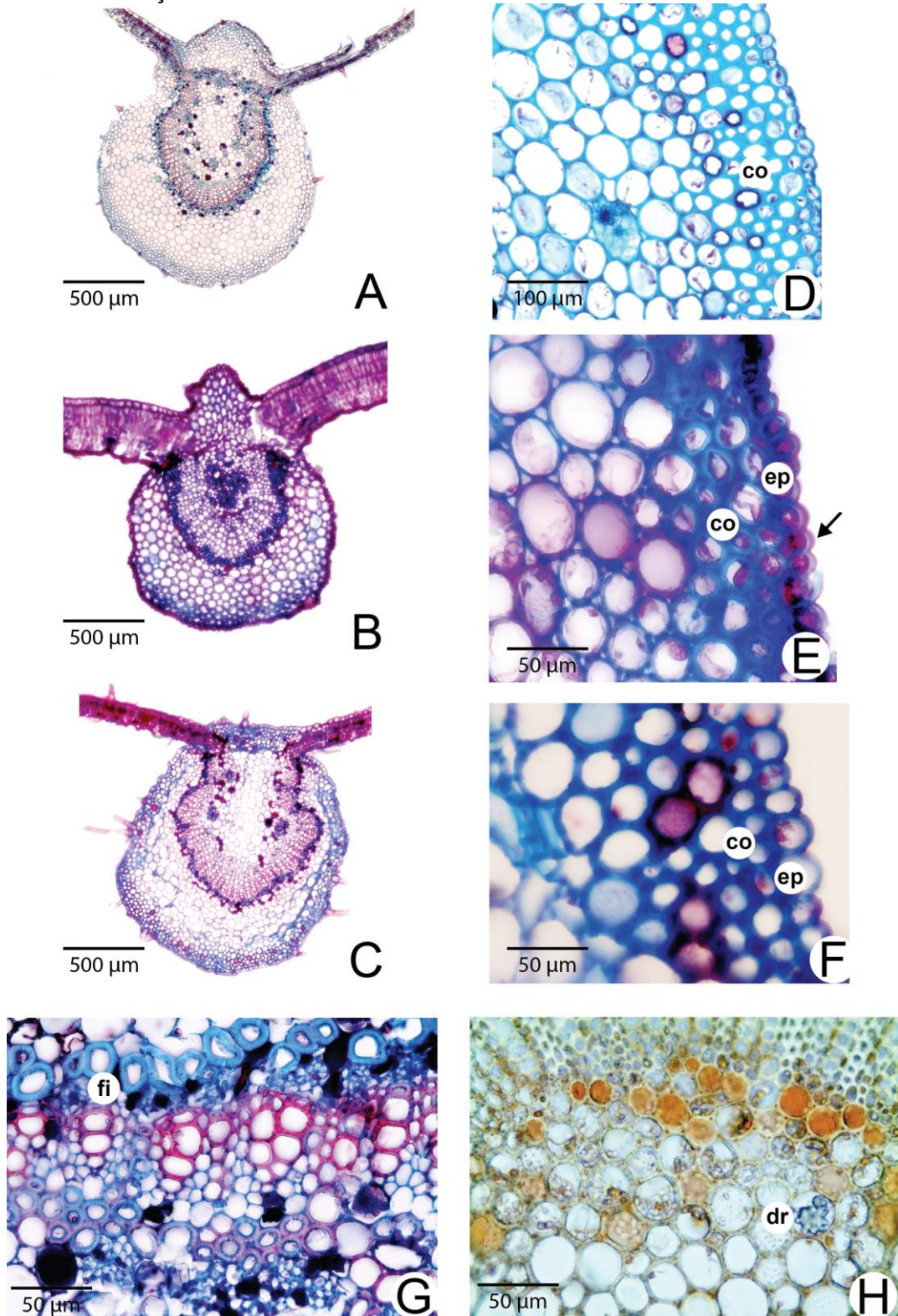
FIGURA 26 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DA SUPERFÍCIE FOLIAR DE *Guettarda viburnoides* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE EM VISTA FRONTAL.



Legenda: A-B. Superfície foliar adaxial. A. Tricoma tipo 1 (t1) sobre o limbo. B. Superfície foliar adaxial. C - G. Superfície foliar abaxial. C. Vista geral da superfície foliar abaxial. D. Tricomas tipo 1 (t1) e tipo 2 (t2) sobre a nervura central. E. Detalhe de tricoma tipo 1 (t1) com ornamentação em superfície sobre a nervura central. F. Tricoma tipo 4 (t4) sobre o limbo. F. Estômatos e detalhe de tricoma tipo 2 (t2). G-H. Fotomicrografias de cortes transversais de limbo. G. Tricoma tipo 2 (t2). H. Tricoma tipo 1 (t1) contendo cristais prismáticos. FONTE: o autor (2017).

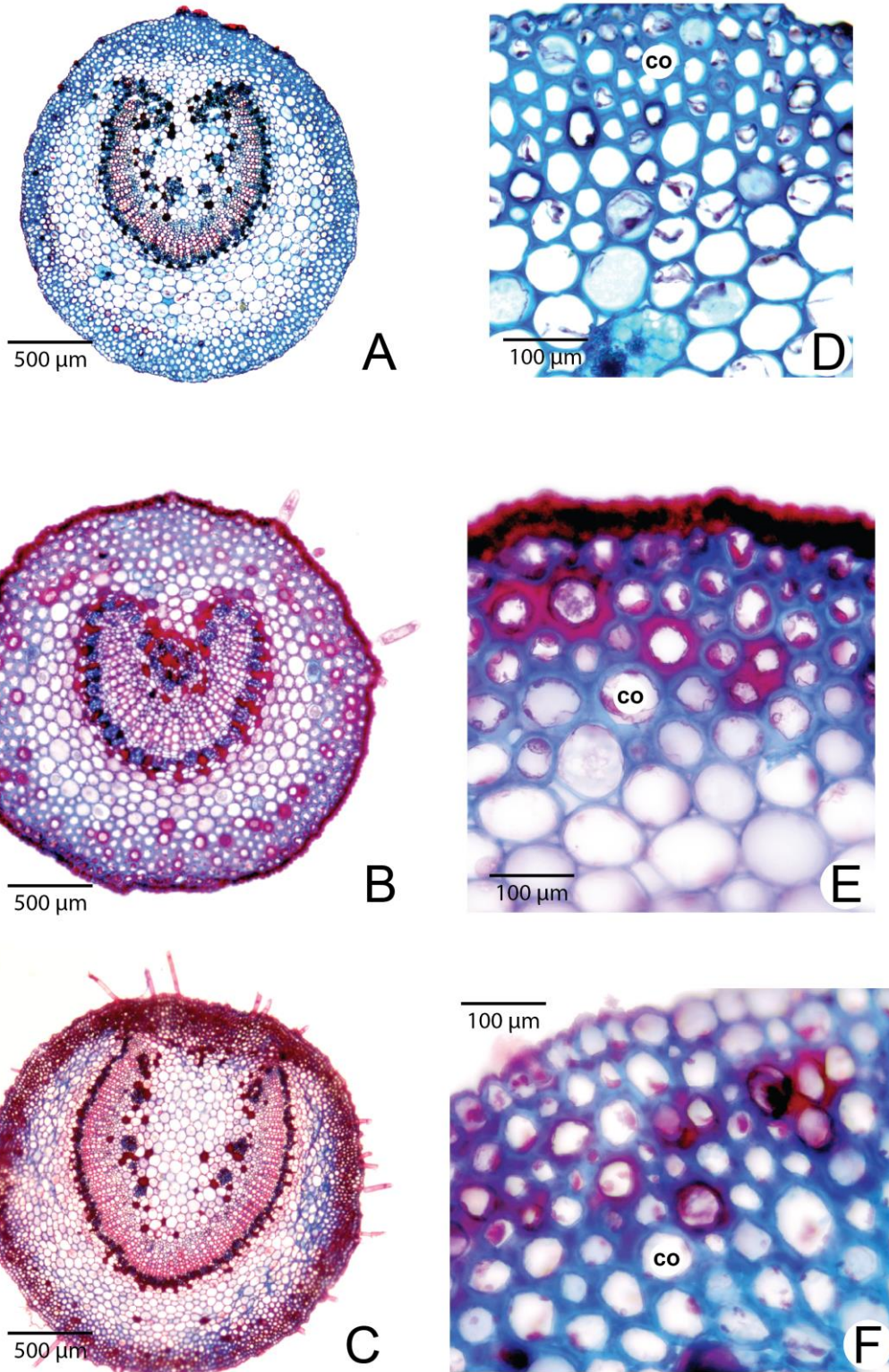


FIGURA 27 - NERVURA CENTRAL DE *Guettarda pohliana*, *Guettarda uruguensis* e *Guettarda viburnoides* EM SECÇÃO TRANSVERSAL.



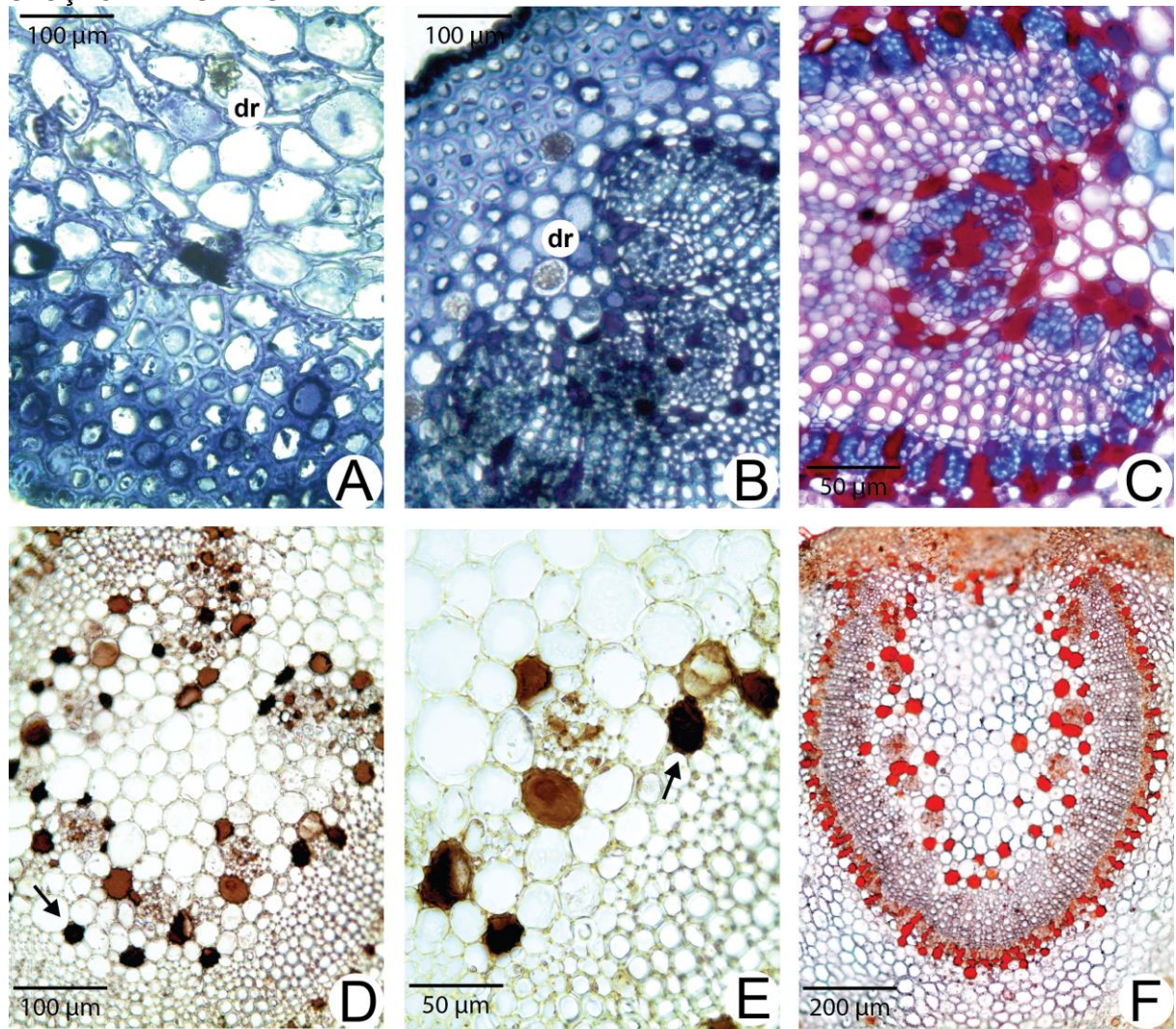
Legenda: A. *Guettarda pohliana*. B. *Guettarda uruguensis*. C. *Guettarda viburnoides*. D. Colênquima angular em *G. pohliana*. E. Colênquima anelar e cutícula delgada em *G. uruguensis*. F. Colênquima anelar em *G. viburnoides*. G. Anel contínuo de fibras não lignificadas em volta do feixe vascular de *G. pohliana*. Presença de drusas em *G. pohliana* (D) e *G. uruguensis* (H). Abreviaturas: seta - cutícula, ep - epiderme, co - colênquima, dr - drusa, fi - fibras. FONTE: o autor (2017)

FIGURA 28 - PECÍOLO DE *Guettarda pohliana*, *Guettarda uruguensis* e *Guettarda viburnoides* EM SECÇÃO TRANSVERSAL.



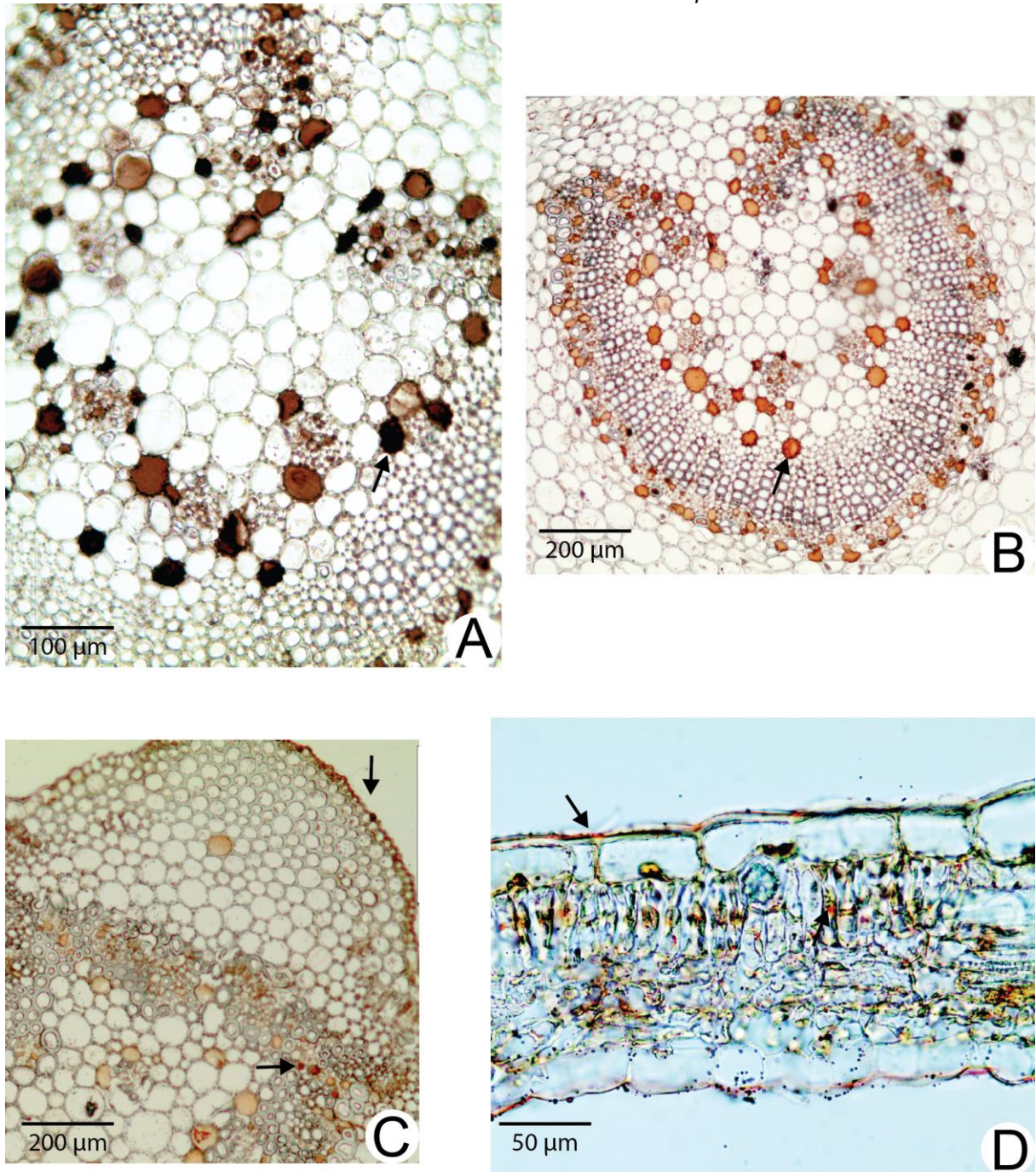
Legenda: A-D. *Guettarda pohliana*. B-E *Guettarda uruguensis*. C-F. *Guettarda viburnoides*. Abreviaturas: co – colênquima. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 29 - PECÍOLO DE *Guettarda pohliana*, *Guettarda uruguensis* e *Guettarda viburnoides* EM SECÇÃO TRANSVERSAL.



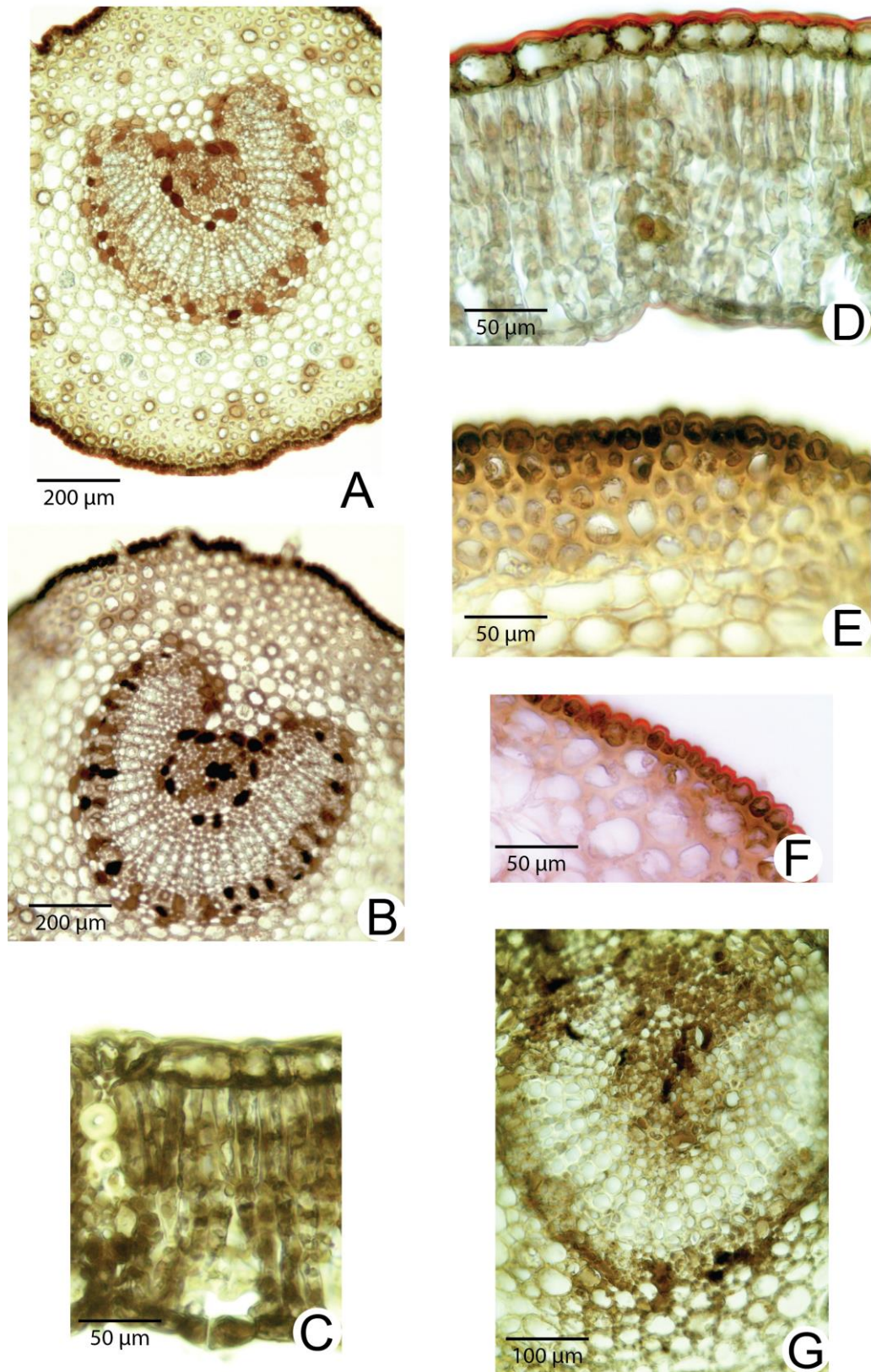
Legenda: A,D,E. *Guettarda pohliana*. B,C. *Guettarda uruguensis*. F. *Guettarda viburnoides*.  
Abreviaturas: dr - drusa, seta - composto fenólico. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 30 - TESTES HISTOQUÍMICOS EM FOLHA DE *Guettarda pohliana*.

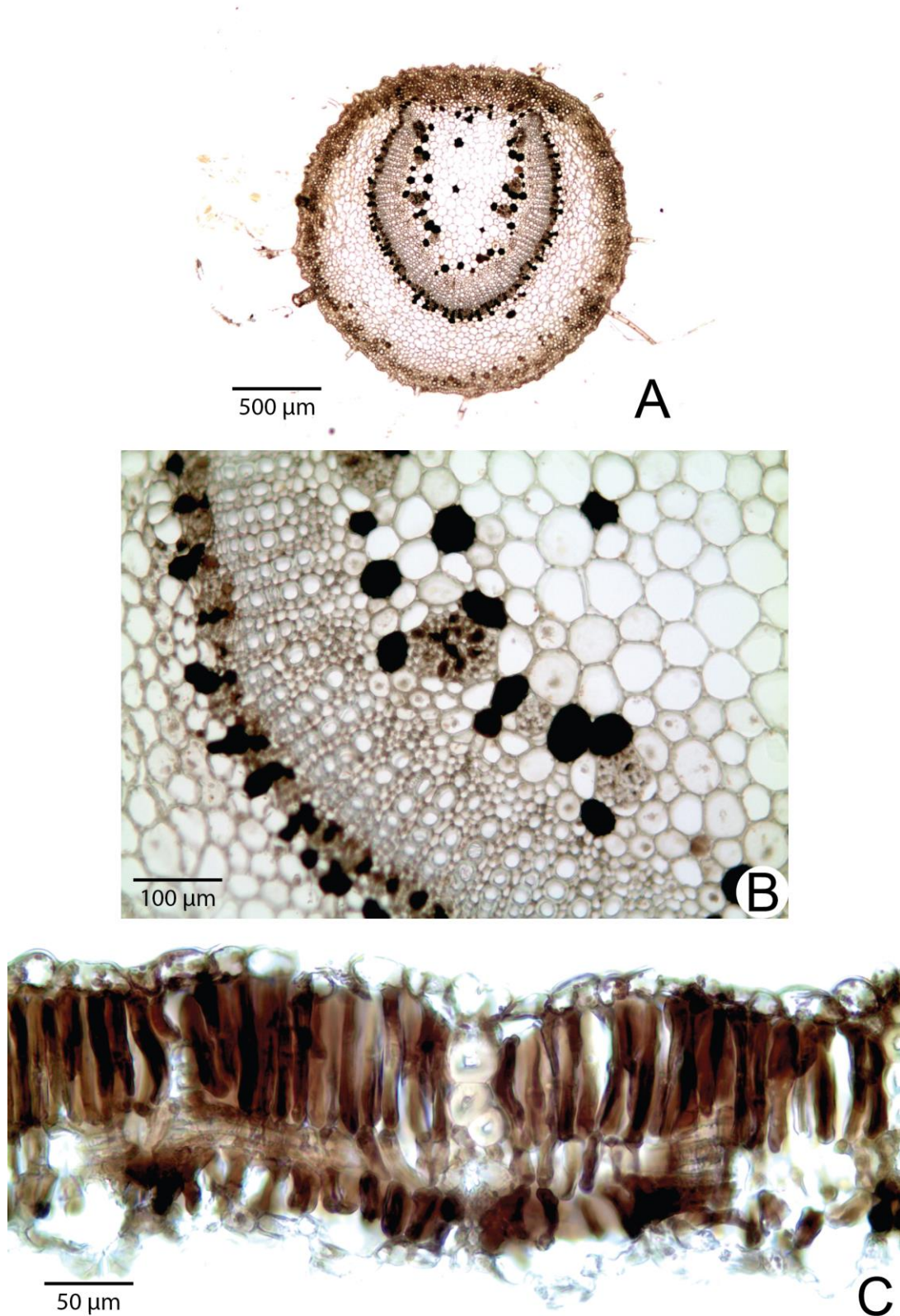


Legenda: A. Pecíolo com compostos fenólicos. B. Pecíolo com cutícula lipídica. C. Nervura central com cutícula lipídica e compostos lipídicos. D. Mesófilo com cutícula lipídica e compostos lipídicos. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 31 - TESTES HISTOQUÍMICOS EM FOLHA DE *Guettarda uruguensis*.



Legenda: A. Pecíolo com cutícula lipídica. B. Pecíolo com compostos fenólicos. C Mesofilo com compostos fenólicos. D. Mesofilo com cutícula lipídica. E. Nervura central com compostos fenólicos. F. Nervura central com cutícula lipídica. G. Nervura central com compostos fenólicos. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 32 - TESTES HISTOQUÍMICOS EM FOLHA DE *Guettarda viburnoides*.

Legenda: A. Pecíolo com compostos fenólicos. B. Detalhe do pecíolo com compostos fenólicos. C. Mesofilo com compostos fenólicos. FONTE: o autor (2017).

#### 5.1.4 Discussão da morfonatomia

As espécies *G. pohliana* Müll. Arg., *G. uruguensis* Cham. & Schltdl. e *G. viburnoides* Cham. & Schltdl., Rubiaceae, apresentam características morfológicas e anatômicas concordantes com a família Rubiaceae e gênero *Guettarda*, porém há alguns caracteres que podem ser considerados relevantes para a identificação de características individuais das mesmas.

A presença constante de estípulas interpeciolares é característica da família Rubiaceae (CRONQUIST, 1981; BARROSO et al., 1991; BURGER; TAYLOR, 1993; SOUZA; LORENZI, 2005; JUDD et al., 2008) e encontra-se nas três espécies analisadas.

Com relação aos aspectos anatômicos, *G. pohliana*, *G. uruguensis* e *G. viburnoides* apresentam caracteres de ocorrência comum em Rubiaceae, tais como folha hipoestomática, com estômatos paracíticos, tricomas tectores uni e pluricelulares, células epidérmicas com paredes anticlinais praticamente retas e mesofilo dorsiventral (METCALFE; CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981; WATSON; DALLWITZ, 2009).

Estômatos do tipo paracítico foram descritos por Solereder (1908) como sendo o tipo de estômato mais comum para a família Rubiaceae. Os estômatos estão localizados no mesmo nível das células epidérmicas em *G. pohliana* e *G. uruguensis* e acima do nível em *G. viburnoides*. É possível que uma umidade excessiva seja gerada pela elevada pilosidade observada na face abaxial de *G. viburnoides*, justificando dessa maneira a localização dos estômatos.

Com relação aos tricomas, verificamos a presença de 4 tipos morfológicos. *G. viburnoides* foi a espécie que apresentou maior pilosidade e a única que apresentou o tricoma tipo 4 - tricoma unicelular, inclinado, com ápice mais arredondado e paredes delgadas. Tricomas tectores densamente distribuídos em folhas podem servir como uma barreira mecânica contra temperaturas extremas, alta intensidade luminosa e perda excessiva de água (WERKER, 2000). Nesse sentido, a presença ou ausência de tricomas pode ser uma característica para a taxonomia (KUNIYOSHI, 1993). As três espécies apresentaram o tricoma tipo 1 - tricoma unicelular, longo, inclinado na superfície, com parede espessas e cristais no interior, que podem estar relacionados com mecâncismos de defesa contra herbivoria. A presença de tricoma unicelular, longo, com paredes espessas com cristais de

oxalato de cálcio embebidos na parede é descrita como característica da tribo Guettardeae (METCALFE & CHALK, 1950; BREMEKAMP, 1966) incluindo o gênero *Guettarda*. Alexandrino *et al.*, 2011 descreve a presença de tricoma com cristais para *G. viburnoides*.

As três espécies apresentaram extensões de bainha. Alexandrino *et al.* (2011) descreve a presença de extensões de bainha em *G. viburnoides* e acredita que essa possa ser uma característica taxonômica do gênero. No presente trabalho, verificamos a presença de extensões de bainha em *G. viburnoides*, *G. uruguensis* e *G. pohliana*. Portanto, estamos em concordância de que as extensões de bainha possam ser uma característica taxonômica do gênero *Guettarda*. O estudo de Alexandrino *et al.* (2011) e o presente trabalho são os únicos sobre anatomia foliar do gênero *Guettarda* portanto, sugerimos que outras espécies sejam avaliadas quanto a presença de extensões de bainha a fim de assegurar que a presença de extensões de bainha seja uma característica comum de espécies do gênero *Guettarda*.

O contorno da nervura central, em secção transversal, das três espécies mostra-se diverso. Em *G. pohliana* e *G. uruguensis*, assume formato biconvexo, enquanto que em *G. viburnoides* é plano-convexo.

A associação de fibras ao sistema vascular é mencionada para a família Rubiaceae (METCALFE; CHALK, 1950), corroborando com o verificado neste estudo para as três espécies.

O tipo de cristal possui importância diagnóstica para gênero e espécies de Rubiaceae (METCALFE E CHALK, 1950). As espécies *G. pohliana*, *G. uruguensis* e *G. viburnoides* apresentaram drusas. Alexandrino *et al.* (2011) descreve a presença de drusas para a espécie *G. viburnoides*, em concordância com a constatação feita nesta investigação, a qual também apontou a ocorrência de drusas em *G. uruguensis* e *G. viburnoides*.

Os caracteres morfoanatômicos descritos neste trabalho enriquecem o conhecimento botânico da flora brasileira e favorecem o controle de qualidade farmacognóstico das potenciais drogas vegetais investigadas, ao serem avaliados conjuntamente para cada espécie. As três espécies são conhecidas popularmente no Brasil como veludinho, o que pode gerar confusão por parte da população. Desse modo, salientamos a importância da correta identificação morfoanatômica das espécies do gênero.



## 5.2 ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA

O ensaio sistemático de análise em fitoquímica tem como objetivo traçar um perfil químico, demonstrando por meio de reações físico-químicas as classes de compostos do metabolismo de plantas. Segundo Moreira (1979) e Simões et al. (2004), a identificação qualitativa dos grupos químicos é realizada com base em dois princípios: partição de substâncias entre duas fases imiscíveis (aquosa e orgânica) e formação de sais com diferenças de solubilidade em relação às bases ou ácidos que lhes deram origem.

A análise fitoquímica preliminar de folha, flor e frutos de *G. uruguensis* apresentou os resultados relacionados na TABELA 7. No extrato hidroalcoólico a 20% (m/v) foi detectada a presença de alcaloides, flavonoides, cumarinas, iridoides e esteroides/triterpenos. No extrato aquoso a 20% (m/v) foi detectada a presença de saponinas e aminogrupos.

TABELA 7 - ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE EM FITOQUÍMICA.

Composto químico pesquisado	Reagente	Resultado		
		Folha	Flor	Fruto
<b>Extrato hidroalcoólico 20%</b>				
Alcaloides	Dragendorff	+	+++	-
	Mayer	+	+++	-
	Bertrand	+	+++	-
Flavonóides	Heterosídeos flavônicos	+++	++	++
Cumarinas	KOH/UV	+	+	+
Iridoides		+	+	+
Triterpenos/Esteroides	Liebermann-Burchard	+++	++	++
<b>Extrato aquoso 20%</b>				
Saponinas	Espuma persistente*	+++	++	++
Aminogrupos	Niidrina	+	+	+

\*referente à reação de espuma persistente. FONTE: o autor (2017).

Os resultados obtidos por meio dessa análise estão em concordância com a literatura. De acordo com revisão bibliográfica (capítulo 3), em literatura tem-se descrito para o gênero *Guettarda* alcaloides, flavonoides, iridóides, triterpenos e esteroides e saponinas. Em adição aos compostos identificados e descritos em literatura até o momento para as espécies desse gênero, o ensaio fitoquímico preliminar dos extratos hidroalcoólicos de folha, flor e fruto revelou a presença de característica comum a compostos com esqueleto da classe de cumarinas.

### 5.3 RENDIMENTO DOS PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E PARTICIONAMENTO

Foram definidas nomenclaturas para os extratos e frações orgânicas obtidos de folha, flor e fruto da espécie *Guettarda uruguensis*, as quais estão descritas na TABELA 8.

TABELA 8 - NOMENCLATURAS ADOTADAS PARA DEFINIR EXTRATOS E FRAÇÕES ORGÂNICAS OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DA ESPÉCIE *Guettarda uruguensis*.

	Definição	Nomenclatura adotada
Folha	Extrato etanólico bruto	EBGF
	Fração hexano	FOH
	Fração clorofórmio	FOC
	Fração acetato de etila	FOA
	Fração butanol	FOB
	Fração remanescente	FOR
	Extrato alcaloídico	FOALC
	Extrato aquoso	FOAQ
Flor	Extrato etanólico bruto	EBGFL
	Fração hexano	FLH
	Fração clorofórmio	FLC
	Fração acetato de etila	FLA
	Fração butanol	FLB
	Fração remanescente	FLR
	Extrato alcaloídico	FLALC
	Extrato aquoso	FLAQ
Fruto	Extrato hexano	FRH
	Extrato clorofórmio	FRC
	Extrato acetato de etila	FRA
	Extrato remanescente	FRR

FONTE: o autor (2017).

O rendimento obtido no processo extrativo do extrato etanólico bruto de folha e flor foi estimado por meio do cálculo do resíduo seco e teor de sólidos totais (TABELA 9). O rendimento dos extratos obtidos dos frutos e frações obtidas de folha e flor referem-se a porcentagem em relação ao material vegetal seco e/ou a porcentagem em relação ao extrato bruto (TABELA 10).

TABELA 9 - RENDIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE FOLHA E FLOR DE *Guettarda uruguensis* COM RELAÇÃO A OBTENÇÃO DE EXTRATOS ETANÓLICOS BRUTOS.

Extrato	Resíduo seco (g) Média ± DP	Teor de sólidos totais (g)	Rendimento (%)
EBGF	0,66 ± 0,00	58,2 (720 mL)	16,2
EBGFL	0,80 ± 0,00	184,9 (2800 mL)	15,3

FONTE: o autor (2017).

TABELA 10 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO

Extrato/Fração	Rendimento	
	Material seco (g)	Rendimento (%)
<b>Folha (1200 g)</b>		
FOH	18,3	1,5
FOC	4,5	0,3
FOA	4,9	0,4
FOB	4,8	0,4
FOR	16,2	1,3
FOALC (400 g)	-	1,8
FOAQ (500 g)	-	9
<b>Flor (360 g)</b>		
FLH	2,2	0,6
FLC	0,6	0,1
FLA	3,6	1,0
FLB	14,5	4,0
FLHR	27,2	7,5
FLALC (145 g)	0,3	0,2
FLAQ (200 g)	32,6	16,3
<b>Fruto (200 g)</b>		
FRH	2,7	1,3
FRC	1,5	0,7
FRA	0,8	0,4
FRR	24,3	12,1

FONTE: o autor (2017).

#### 5.4 PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

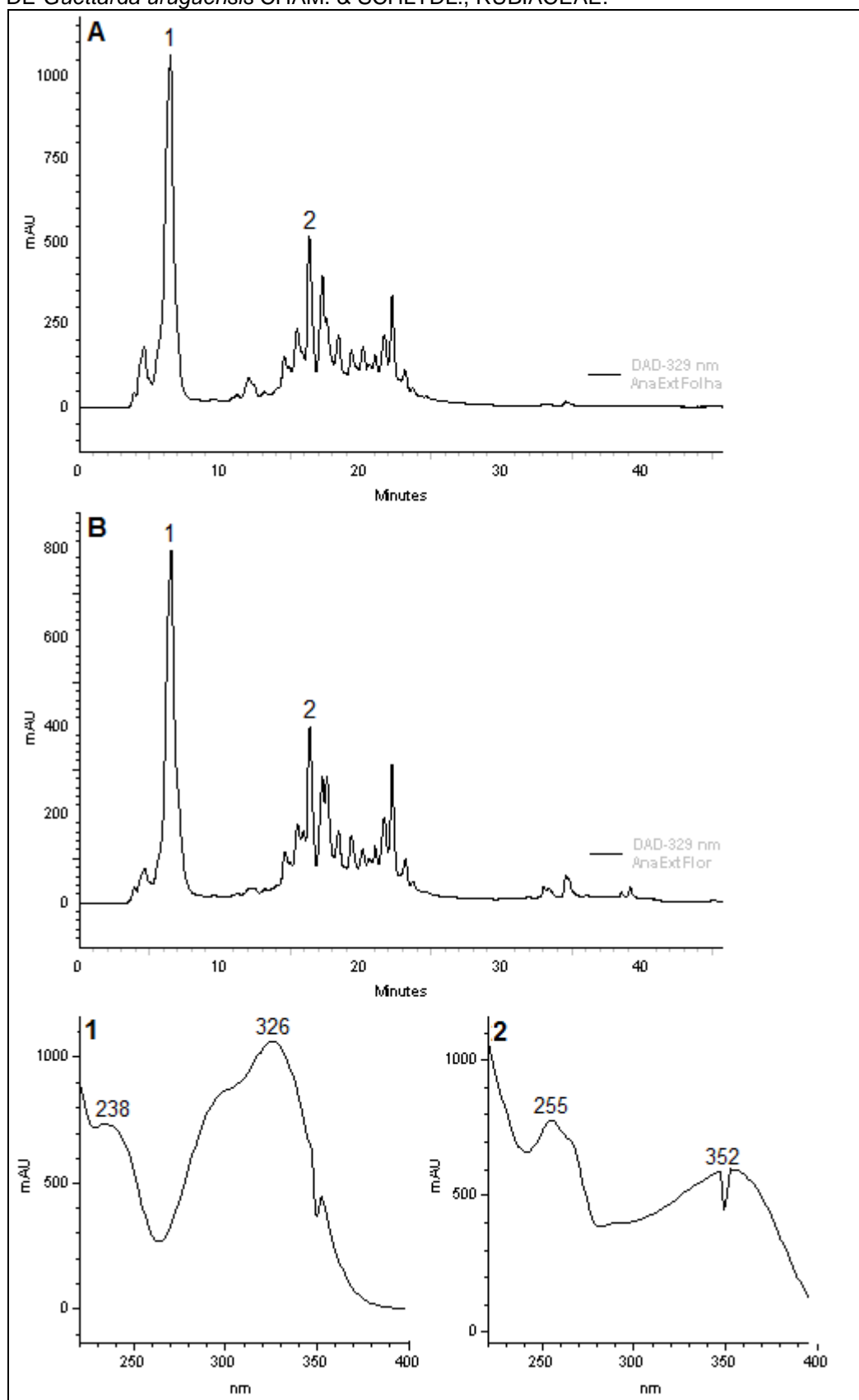
As frações acetato de etila obtidas de folha, flor e fruto da espécie *G. uruguensis* apresentam elevado conteúdo de compostos fenólicos, assim como atividade antioxidante significativa. Portanto, a determinação do perfil cromatográfico das frações acetato de etila e extratos bruto de folha, flor e fruto de *G. uruguensis* é incentivada.

A caracterização dos compostos majoritários por HPLC-DAD foi realizada pela comparação dos cromatogramas das amostras com padrões de flavonóides (rutina e quercetina) e de ácidos fenólicos (ácido caféico, ácido clorogênico e ácido rosmarínico). A escolha do melhor comprimento de onda para a análise dos compostos fenólicos, foi realizada através do monitoramento da faixa de comprimento de onda de 220 a 400 nm, por meio do sistema de detecção por arranjo de diodos (DAD). O comprimento de onda selecionado para as análises foi o de 327 nm, no qual obteve-se boa sensibilidade para a maior parte das substâncias que constituem as amostras avaliadas.

Pela comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos EBGF e EBGFL, frações FOA, FLA e FRA e dos padrões de flavonoides e ácido fenólicos, pode-se verificar que o perfil cromatográfico dos picos majoritários apresenta características de compostos fenólicos. A presença de flavonoides pode ser evidenciada em espectros de absorção no ultravioleta por meio da observação das bandas selecionadas nos cromatogramas que apresentaram dois máximos de absorção no espectro, sendo um  $\lambda_{\text{máx}}$  entre 250-280 nm e o outro em torno de 330-360 nm para flavonol 3-OH substituído ou 350-385 nm para flavonol 3-OH livre, indicando de que os flavonoides são da classe dos flavonóis (MARKHAM, 1982). A presença dos ácidos hidroxicinâmicos, ácido cafeíco e derivados cafeoil (245 nm e 325 nm), também foi observada.

Em ambos os extratos EBGF e EBGFL observa-se dois picos majoritários com tempo de retenção idênticos em tR 6,52 (pico 1) e tR 16,36 (pico 2). O espectro ultravioleta dos picos em tR 6,52 mostrou a presença de bandas de absorção características de ácidos hidroxicinâmicos (245 nm, 325 nm) e em tR 16,36 bandas de absorção características de flavonóis (255 nm e 352 nm). Os cromatogramas dos extratos diferem por EBGF apresentar picos mais intensos no tempo de 0–40 min enquanto EBGFL apresenta mais picos sendo esses mais intensos entre 30–40 min (FIGURA 33). O perfil cromatográfico das frações acetato de etila de folha, flor e fruto, demonstra a presença de ácidos fenólicos e flavonóis para FOA (FIGURA 34) e FRA (FIGURAS 36) respectivamente e somente ácido fenólicos para FLA (FIGURA 35).

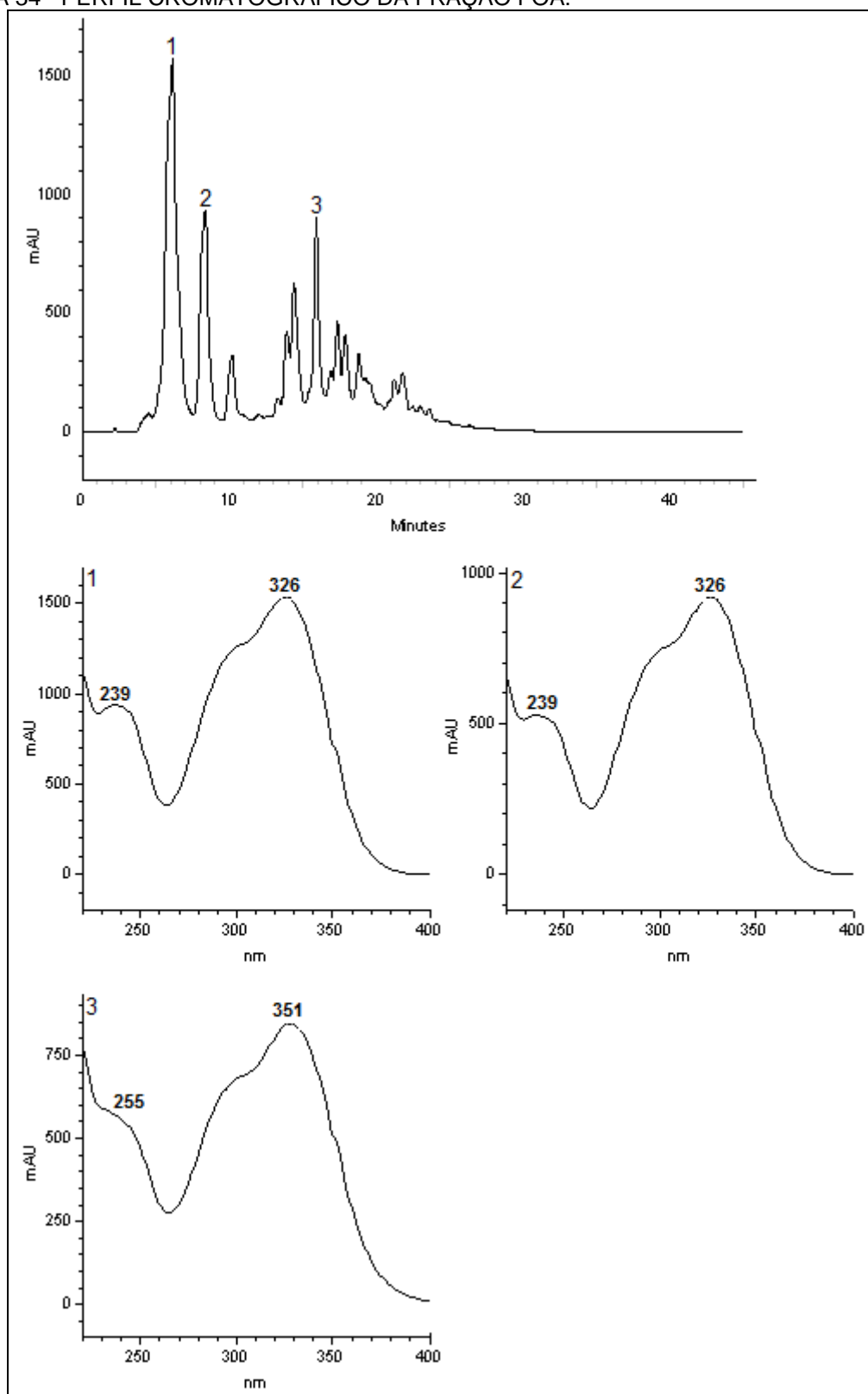
FIGURA 33 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS OBTIDOS DE FOLHA E FLOR DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.



Legenda: Perfil ultravioleta dos picos cromatográficos observados em extrato etanólico obtido de folha (A) e flor (B) de *G. uruguensis*. 1-tR 6,52; 2-tR 16,36.

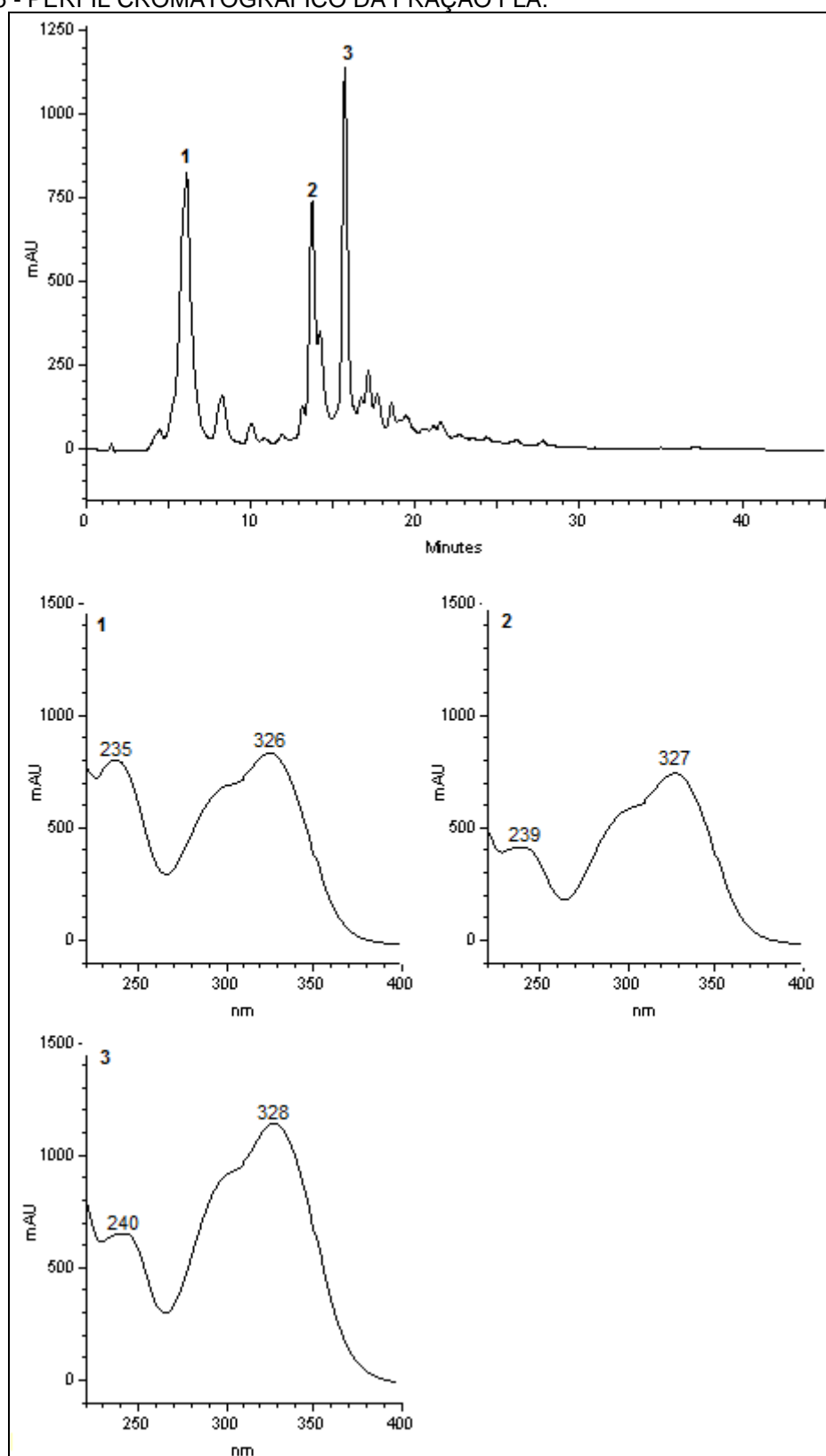
FONTE: o autor (2017)..

FIGURA 34 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO FOA.



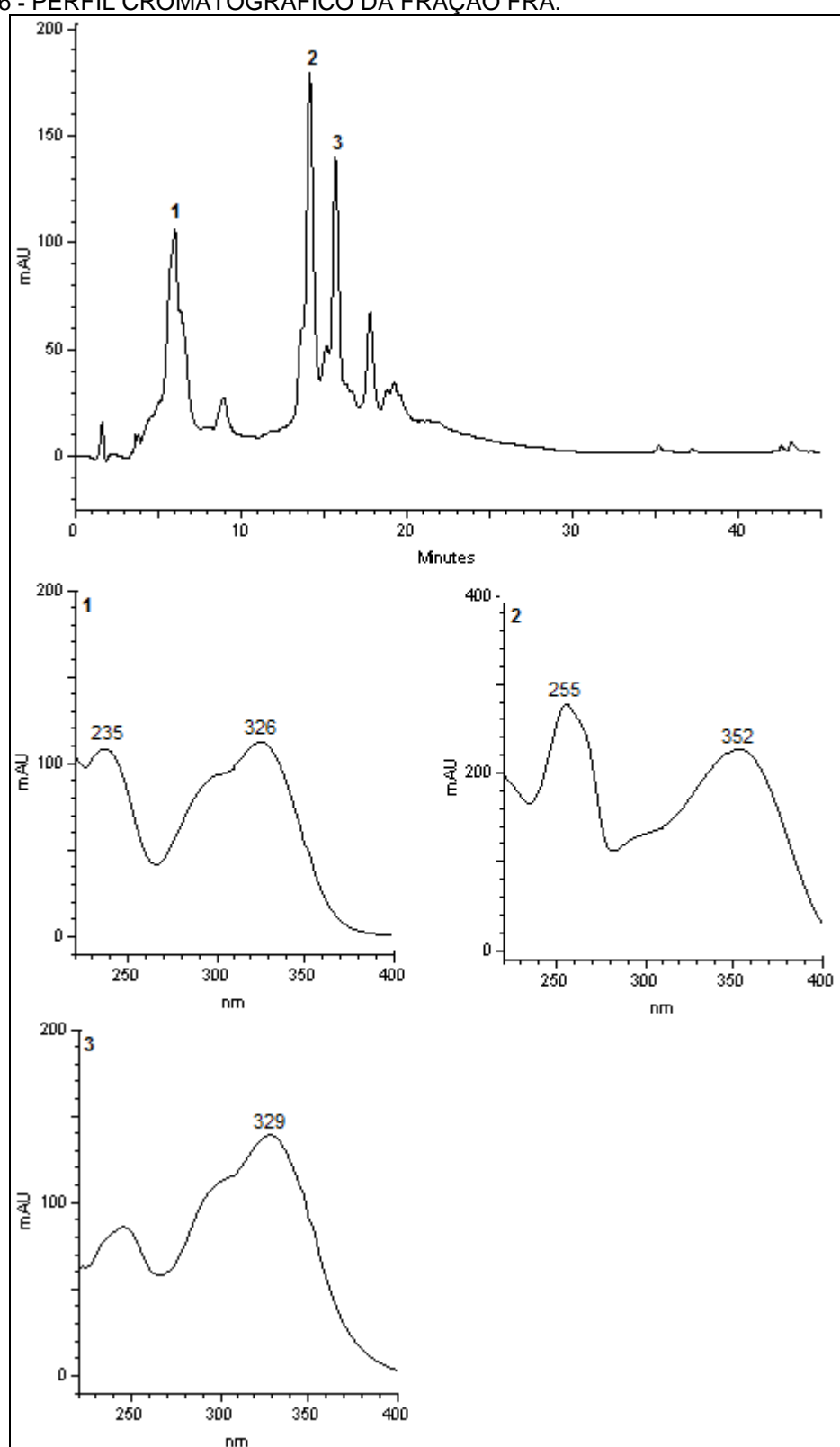
Legenda: Perfil ultravioleta dos picos cromatográficos. 1-tR 6,65; 2-tR 9,93; 3-tR 16,22.  
FONTE: o autor (2017).

FIGURA 35 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO FLA.



Legenda: Perfil ultravioleta dos picos cromatográficos. 1-tR 6,72; 2-tR 14,33; 3-tR 16,52.  
FONTE: o autor (2017).

FIGURA 36 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO FRA.



Legenda: Perfil ultravioleta dos picos cromatográficos. 1-tR 6,64; 2-tR 14,33; 3-tR 16,72.  
FONTE: o autor (2017).



## 5.5 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS OBTIDAS

### 5.5.1 Determinação estrutural de AFSD-1

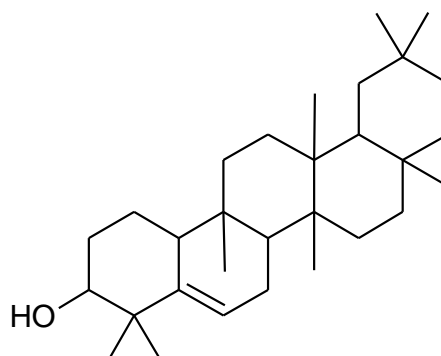
O tratamento cromatográfico da fração FOH em gel de sílica, seguida de recristalização das subfrações (10–23) resultou no isolamento de 40 mg de um sólido amorfo branco solúvel em clorofórmio, denominado AFSD-1.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), (FIGURA 38) apresentou oito simpletos em  $\delta_H$  1,04 (s, H23),  $\delta_H$  1,09 (s, H24),  $\delta_H$  0,85 (s, H25),  $\delta_H$  1,00 (s, H26),  $\delta_H$  0,98 (s, H27),  $\delta_H$  1,16 (s, H28),  $\delta_H$  0,95 (s, H29),  $\delta_H$  0,98 (s, H30), atribuídos a oito grupos metila; um multiplete em  $\delta_H$  5,63 (H-6) correspondente a hidrogênio ligado a carbono olefínico; um multiplete em  $\delta_H$  3,47 correspondente a hidrogênio ligado a carbono carbinólico.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), (FIGURA 39) mostrou a presença de trinta sinais, sugerindo tratar-se de um esqueleto triterpenico pentacíclico. Os sinais entre  $\delta_c$  141,6 e  $\delta_c$  122,0 caracterizam uma dupla ligação entre os carbonos C-5 e C-6, em semelhança com a literatura que relata que C-5 absorve entre  $\delta_c$  141,7-142,3 e C-6 entre  $\delta_c$  120,1-122,1 (MAHATO; KUNDU, 1994). A presença da hidroxila caracterizada pelo deslocamento químico em  $\delta_c$  76,3 com inserção em C-3 foi realizada com base em informações da literatura (MAHATO; KUNDU, 1994), onde tem-se que triterpenos com ausência de hidroxila na posição C-3 absorve para o mesmo em  $\delta_c$  42,1, enquanto que para C-3 hidroxilado ocorre absorção entre  $\delta_c$  79,0-76,0.

A análise dos dados experimentais e posterior comparação com os dados registrados em literatura (TABELA 11) permitiram identificar AFSD-1 como sendo o triterpeno glutinol (FIGURA 37), identificado pela primeira vez no gênero *Guettarda*.

FIGURA 37 - ESTRUTURA QUÍMICA DO GLUTINOL.

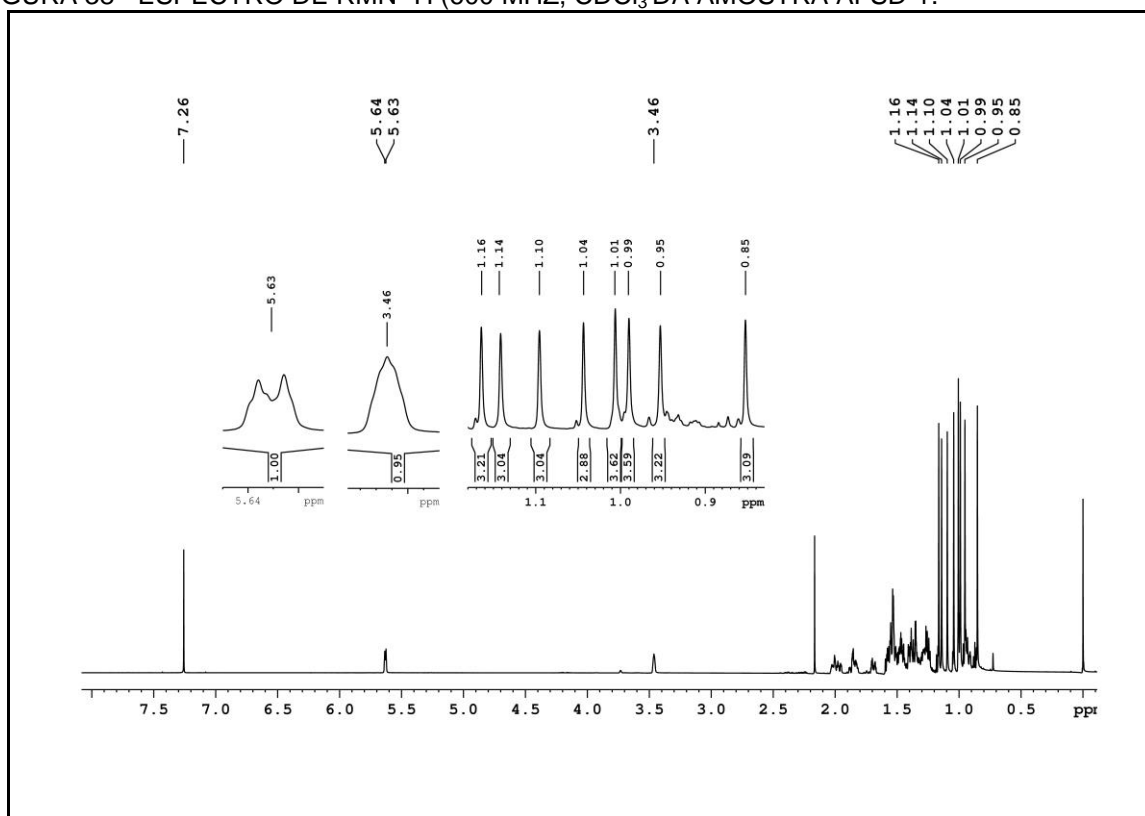


FONTE: o autor (2017).

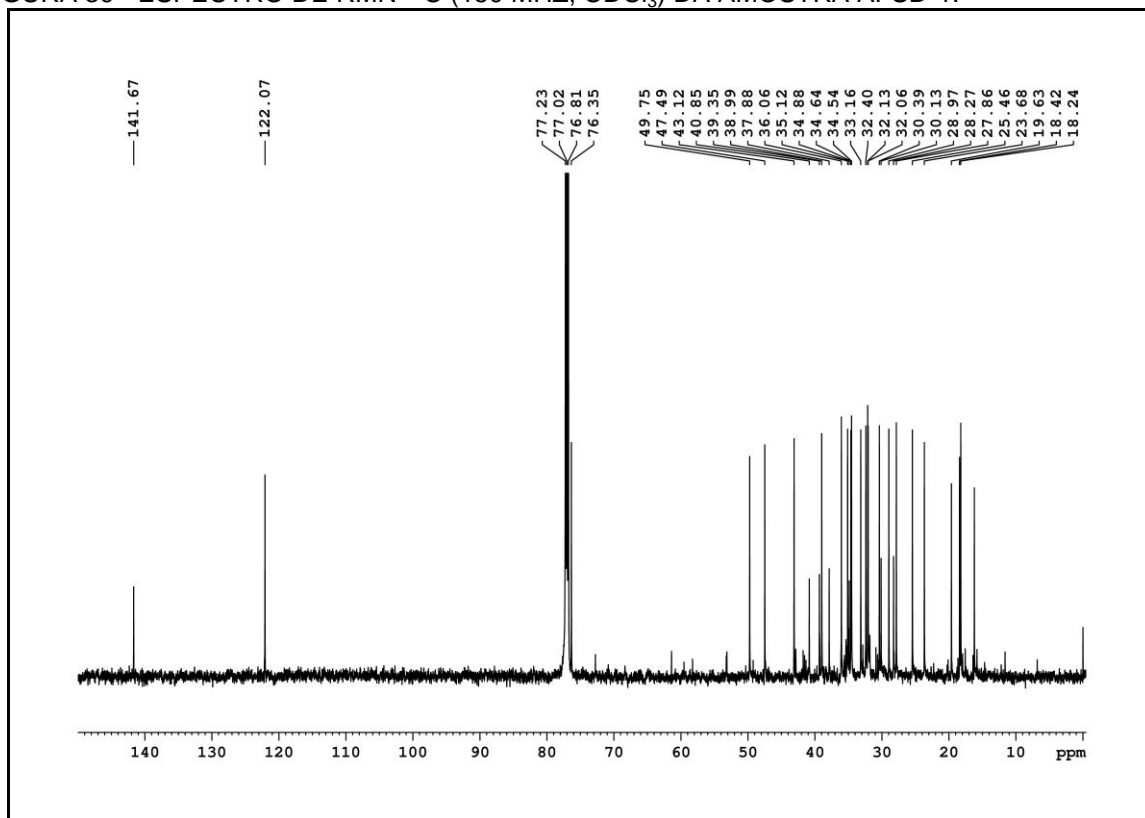
TABELA 11 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E RMN DE  $^{13}\text{C}$  OBSERVADOS EM AFSD-1.

Posição	AFSD-1 <sup>a</sup>		Glutinol <sup>b</sup>	
	$\delta_H$ (multiplicidade; J em Hz)	$\delta_C$ ( $^{13}\text{C}$ )	$\delta_H$ (multiplicidade; J em Hz)	$\delta_C$ ( $^{13}\text{C}$ )
1		18,2		18,2
2		27,8		27,8
3	3,46 (m)	76,3	3,47 (s)	76,3
4		39,3		39,2
5		141,6		141,6
6	5,63 (m)	122,0	5,63 (m)	122,0
7		23,6		23,6
8		49,7		49,6
9		34,8		34,8
10		47,4		47,4
11		34,5		34,5
12		30,3		30,3
13		40,8		40,8
14		37,8		37,8
15		32,0		32,0
16		36,0		36,0
17		30,1		30,0
18		43,1		43,0
19		35,0		35,0
20		28,2		28,2
21		33,1		33,1
22		38,9		38,9
23	1,04 (s)	28,9	1,04 (s)	28,9
24	1,14 (s)	25,4	1,14 (s)	25,4
25	0,85 (s)	16,2	0,85 (s)	16,1
26	1,00 (s)	19,6	1,10 (s)	19,6
27	0,99 (s)	18,4	1,01 (s)	18,4
28	1,16 (s)	32,4	1,16 (s)	32,3
29	0,95 (s)	34,6	0,95 (s)	34,4
30	0,98 (s)	32,1	0,99 (s)	32,1

Legenda: <sup>a</sup>: Experimento de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (600 MHz, 150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), utilizando TMS como referência interna. <sup>b</sup>: Dados da literatura de acordo com Miguel,1987 e Miranda *et al.*, (2012) <sup>b</sup>.  
FONTE: o autor (2017).

FIGURA 38 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) DA AMOSTRA AFSD-1.

FONTE: o autor (2017).

FIGURA 39 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) DA AMOSTRA AFSD-1.

FONTE: o autor (2017).

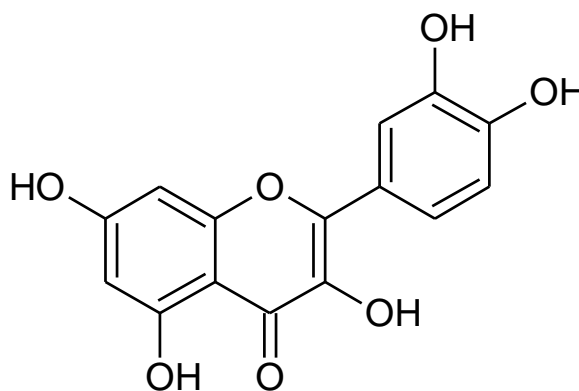
### 5.5.2 Determinação estrutural de AFSD-2

O tratamento da fração FOA em gel de sílica forneceu frações semipurificadas que foram reunidas em razão de semelhança observada em cromatografia em camada delgada analítica. O tratamento da subfração FOA3 em gel de sílica em coluna acoplada ao vácuo fornecendo o composto AFSD-2 em mistura.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto AFSD-2 (FIGURA 41) apresentou 5 sinais na região de aromáticos. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  6,37 (*d*,  $J=2,06$  Hz, H6) e  $\delta_{\text{H}}$  6,17 (*d*,  $J=2,06$  Hz, H8) são característicos de um sistema de acoplamento entre dois hidrogênios na posição meta em anel aromático, relacionados aos C-6 e C-8. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,72 (*d*,  $J=2,1$  Hz, H2'),  $\delta_{\text{H}}$  7,63 (*dd*,  $J=2,1$ ; 8,5 Hz H6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,88 (*d*,  $J=8,5$  Hz, H5') são característicos de anel aromático substituído nas posições 1',3',4', sendo relacionados ao anel B do flavonóide. As atribuições de  $\delta_{\text{C}}$  foram obtidas através da análise de espectros de HSQC (FIGURA 42).

Com base nos dados espectrais obtidos e dados de literatura (TABELA 12), foi proposta a estrutura de um flavonol 5,7,3',4'-tetra-OH, conhecido como quercetina (FIGURA 40). Essa substância, em sua forma livre, está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Guettarda*. A quercetina em sua forma conjugada (heterosídeo) com as hexoses D-glicose e D-galactose, foi identificada na espécie *G. viburnoides* (NARESSI et al., 2015). Até o momento, estes são os únicos dados de literatura com relação a identificação de flavonoides no gênero *Guettarda*.

FIGURA 40 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUERCETINA

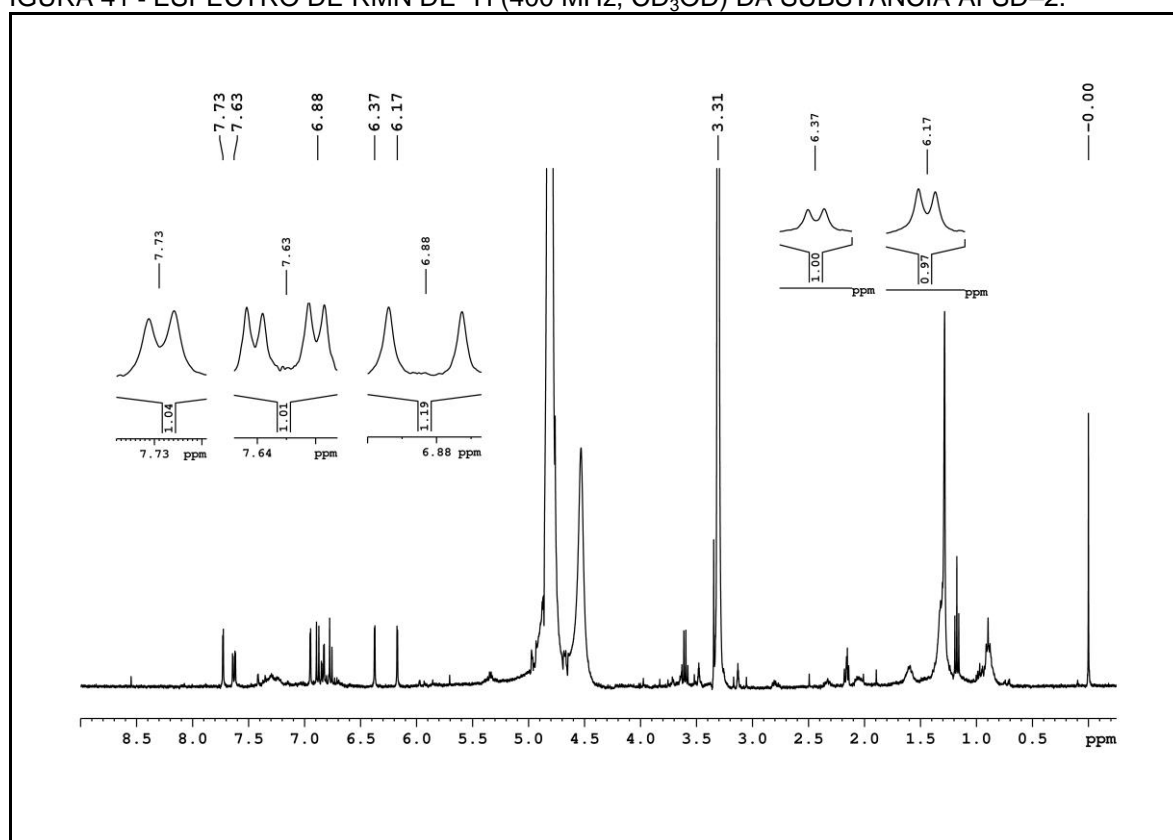


FONTE: o autor (2017).

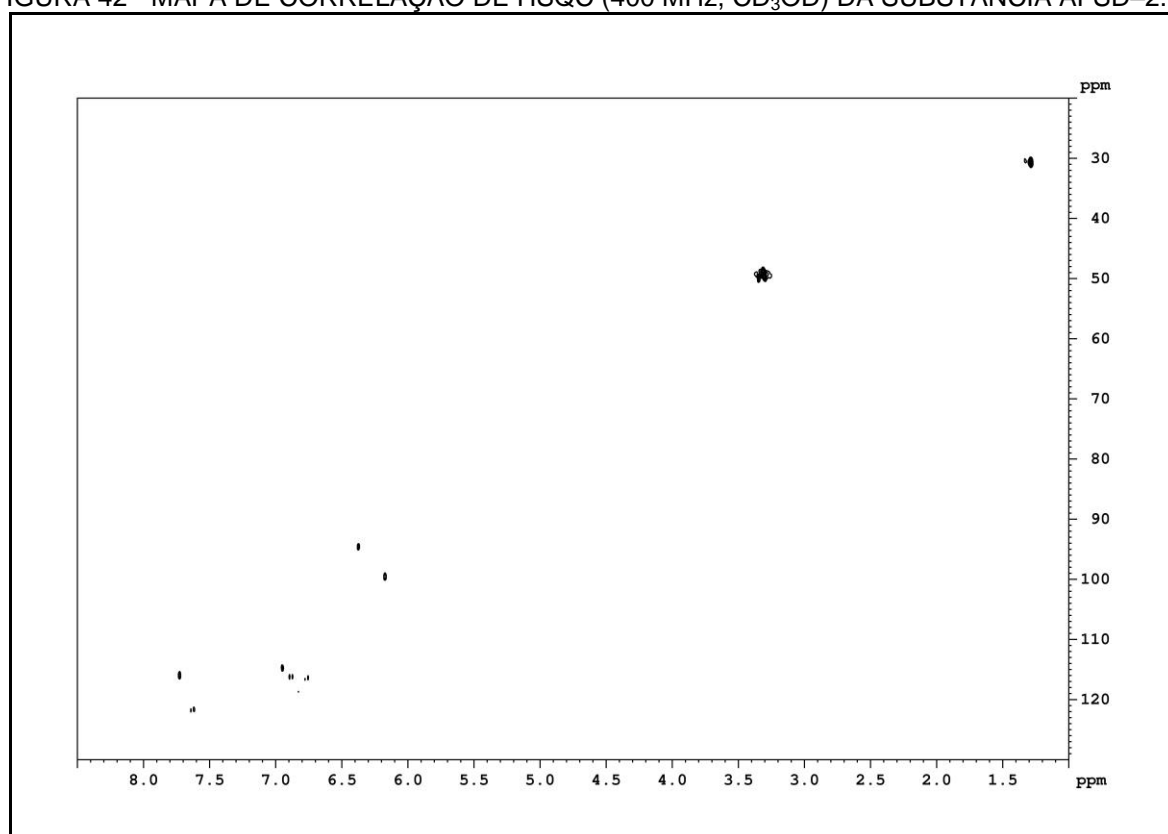
TABELA 12 - ASSINALAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  E HSQC OBSERVADOS EM AFSD-2.

Posição	AFSD-2 <sup>a</sup>		Quercetina <sup>b</sup>	
	$\delta_H$ (multiplicidade; <i>J</i> em Hz)	$\delta_C$ ( $^{13}\text{C}$ )	$\delta_H$ (multiplicidade; <i>J</i> em Hz)	$\delta_C$ ( $^{13}\text{C}$ )
6	6,37 1H, <i>d</i> , (2,06)	94,6	6,17 1H, <i>d</i> , (2,1)	99,1
8	6,17 1H, <i>d</i> , (2,06)	99,6	6,36 1H, <i>d</i> , (2,1)	94,4
2'	7,73 1H, <i>d</i> , (2,1)	115,9	7,72 1H, <i>d</i> , (2,1)	115,9
5'	6,88 1H, <i>d</i> , (8,5)	116,2	6,8 1H, <i>d</i> , (8,4)	116,1
6'	7,63 1H, <i>dd</i> , (2,1; 8,5)	121,7	7,6 1H, <i>dd</i> , (8,7; 2,1)	121,6

<sup>a</sup>: Experimento de RMN de  $^1\text{H}$  e HSQC (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), utilizando TMS como referência interna. As atribuições de  $\delta_C$  foram obtidas através da análise de espectro de HSQC. Dados da literatura de acordo com Kalegaril et al. (2011) e Miranda et al. (2014)<sup>b</sup>. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 41 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) DA SUBSTÂNCIA AFSD-2.

FONTE: o autor (2017).

FIGURA 42 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) DA SUBSTÂNCIA AFSD-2.

FONTE: o autor (2017).

### 5.5.3 Determinação estrutural de AFSD-3, AFSD-4 e AFSD-5

A fração FOH forneceu os compostos AFSD-3, AFSD-4 e AFSD-5 identificados em mistura. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 46) e correlações de HSQC (FIGURA 47) e HMBC (FIGURA 48) apresentaram um conjunto de sinais característicos de ésteres de cadeia longa do ácido *p*-cumárico presentes na mistura nas configurações *cis* (Z) e *trans* (E).

#### i. Éster do ácido *trans* *p*-cumárico

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H foram observados dois dupletos em  $\delta_H$  7,43 (2H, *d*,  $J=8,56$  Hz, H-2 e H-6) e  $\delta_H$  6,80 (2H, *d*,  $J=8,7$  Hz, H-3 e H-5) com constante de acoplamento característica de hidrogênios em sistemas aromáticos para-dissubstituídos. Os dupletos em  $\delta_H$  7,62 (*d*,  $J=15,1$  Hz, H-7) e  $\delta_H$  6,30 (*d*,  $J=16$  Hz, H-8) estão de acordo com a frequência de hidrogênios olefínicos em configuração *trans*. Esses dados estão compatíveis com o ácido *trans*-*p*-cumárico. Esta proposta foi confirmada pelos dados de RMN de HSQC (FIGURA 47) que apresentou sinais

de carbonila de éster conjugado com dupla *trans* em  $\delta_C$  167,3 (C-9),  $\delta$  144,0 (C-7),  $\delta_C$  116,0 (C-8), e sinais de carbonos em sistemas aromáticos em  $\delta_C$  157,6 (C-4),  $\delta_C$  127,5 (C-1),  $\delta_C$  115,1 (C-2 e C-6) e  $\delta_C$  130,0 (C-3 e C-5). Ainda no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e HSQC destaca-se o sinal em  $\delta_H$  4,18 (2H, *t*,  $J=6,8$  Hz);  $\delta_C$  64,7 (O-CH<sub>2</sub>) e  $\delta_H$  1,69 (*m*);  $\delta_H$  64,7, e demais sinais de cadeia alquila do éster proposto.

## ii. Éster do ácido *cis* *p*-cumárico

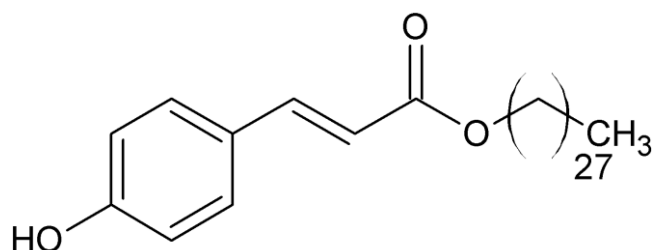
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram observados dois dupletos em  $\delta_H$  7,63 (2H, *d*,  $J=8,6$  Hz, H-2 e H-6) e  $\delta_H$  6,83 (2H, *d*,  $J=8,7$  Hz, H-3 e H-5) com constante de acoplamento característica de hidrogênios em sistemas aromáticos para-dissubstituídos. Os dupletos em  $\delta_H$  6,83 (*d*,  $J=12,8$  Hz, H-7) e  $\delta_H$  5,83 (*d*,  $J=12,8$  Hz, H-8) estão de acordo com a frequência de hidrogênios olefínicos em configuração *cis*. Esses dados estão compatíveis com o ácido *cis-p*-cumárico. Esta proposta foi confirmada pelos dados de RMN de HSQC (FIGURA 47) que apresentou sinais de carbonila de éster conjugado com dupla *trans* em  $\delta_C$  166,6 (C-9),  $\delta_C$  142,9 (C-7),  $\delta_C$  117,6 (C-8), e sinais de carbonos em sistemas aromáticos em  $\delta_C$  156,5 (C-4),  $\delta_C$  127,5 (C-1),  $\delta_C$  115,9 (C-2 e C-6) e  $\delta_C$  132,3 (C-3 e C-5). Ainda no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e HSQC destaca-se o sinal em  $\delta_H$  4,11 (2H, *t*,  $J=6,8$  Hz);  $\delta_H$  64,5 (O-CH<sub>2</sub>) e  $\delta_H$  1,63 (*m*);  $\delta$  64,5, e demais sinais de cadeia alquila do éster proposto.

Os compostos em mistura, foram submetidos a análise de ESI-MS em modo negativo de ionização (FIGURA 49), onde observou-se três compostos como íons desprotonados [M-H]<sup>-</sup>: AFSD-3 ( $m/z$  555), AFSD-4 ( $m/z$  583) e AFSD-5 ( $m/z$  611). Através do experimento de ESI-EM/EM, no modo negativo de ionização [M-H]<sup>-</sup> o íon deprotonado de  $m/z$  555 (AFSD-3) foi fragmentado, originando o íon fragmento de  $m/z$  163 referente ao ácido *p*-cumárico (FIGURA 50). O íon fragmento de  $m/z$  163 (ácido *p*-cumárico) também foi observado na fragmentação dos íons com  $m/z$  583 (AFSD-4, FIGURA 51) e  $m/z$  611, (AFSD-5, FIGURA 52). Com base nos dados espectrais obtidos e dados de literatura foi proposta a estrutura de três ésteres graxos do ácido *p*-cumárico.

A identificação do tamanho da cadeia alquila dos ésteres do ácido *p*-cumárico foi realizada pelo cálculo da perda neutra (NL- *neutral loss*), deduzida pela operação de subtração do fragmento referente ao ácido *p*-cumárico do íon *quasi*-molecular. Dessa forma, caracterizou-se a presença de uma série homóloga, sendo

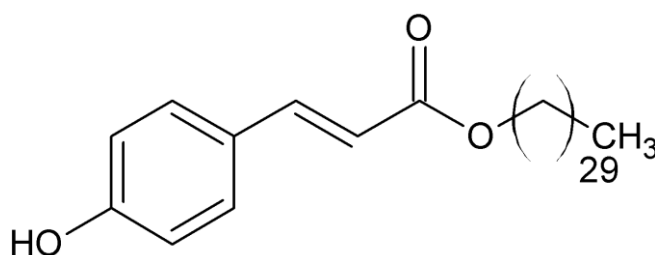
determinadas três estruturas: AFSD-3 ( $m/z$  555, fragmento em  $m/z$  163) apresentando uma NL 392, equivalente a uma cadeia alquílica correspondente a 28 carbonos, caracterizando o composto *p*-cumarato de octacosanila (FIGURA 43); AFSD-4 ( $m/z$  584, fragmento em  $m/z$  163) apresentando uma NL 420, correspondente a uma cadeia alquílica de 30 carbonos, caracterizando o composto *p*-cumarato de triacontila (*defuscin*) (FIGURA 44); AFSD-5 ( $m/z$  611, fragmento em  $m/z$  163) apresentando uma NL 448, correspondente a uma cadeia alquílica de 32 carbonos, caracterizando o composto *p*-cumarato de dotriacontila (*randilongin*) (FIGURA 45).

FIGURA 43 - ESTRUTURA QUÍMICA DO *p*-CUMARATO DE OCTACOSANILA (AFSD-3).



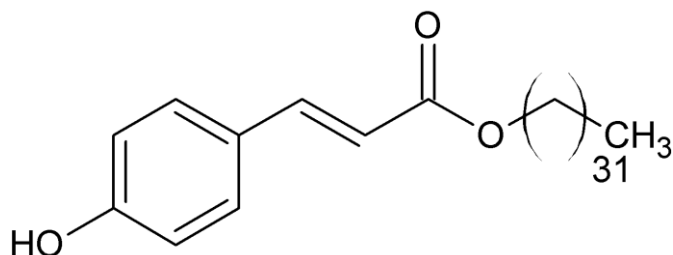
FONTE: o autor (2017).

FIGURA 44 - ESTRUTURA QUÍMICA DO *p*-CUMARATO DE TRIACONTILA (AFSD-4).



FONTE: o autor (2017).

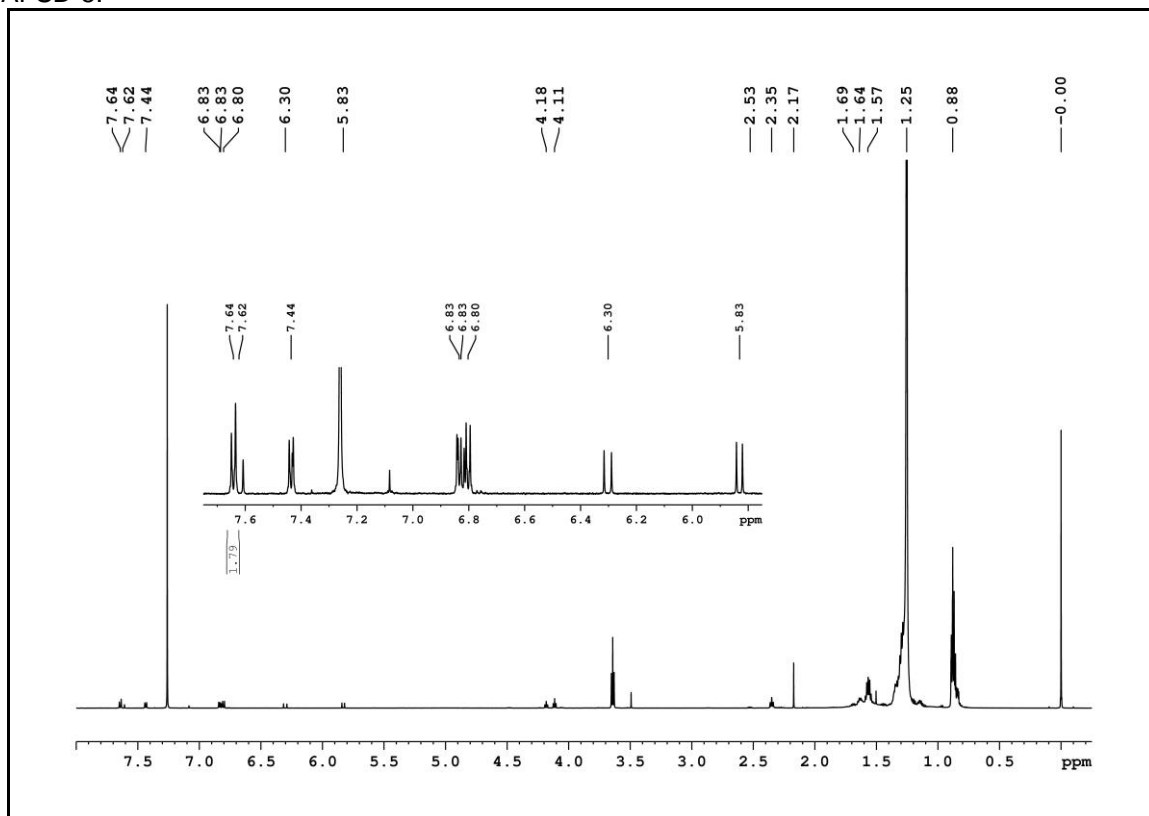
FIGURA 45 - ESTRUTURA QUÍMICA DO *p*-CUMARATO DE DOTRIACONTILA (AFSD-5).



FONTE: o autor (2017).

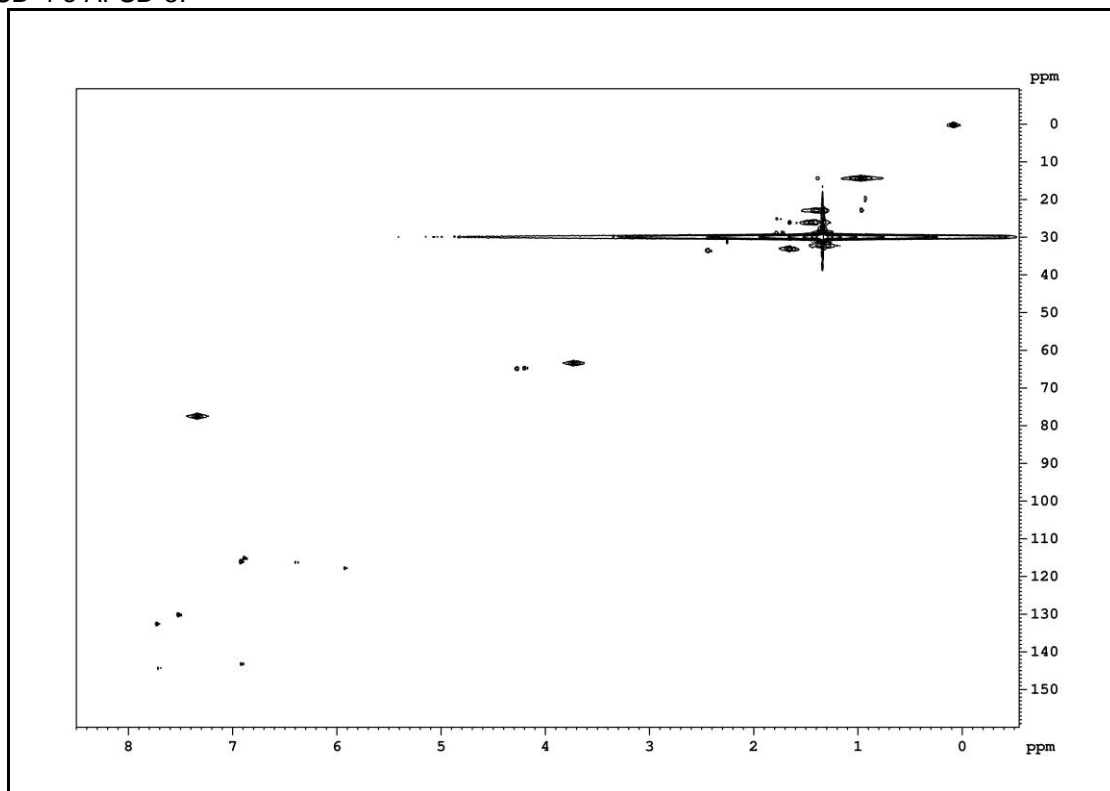


FIGURA 46 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) DAS SUBSTÂNCIAS AFSD-3, AFSD-4 e AFSD-5.



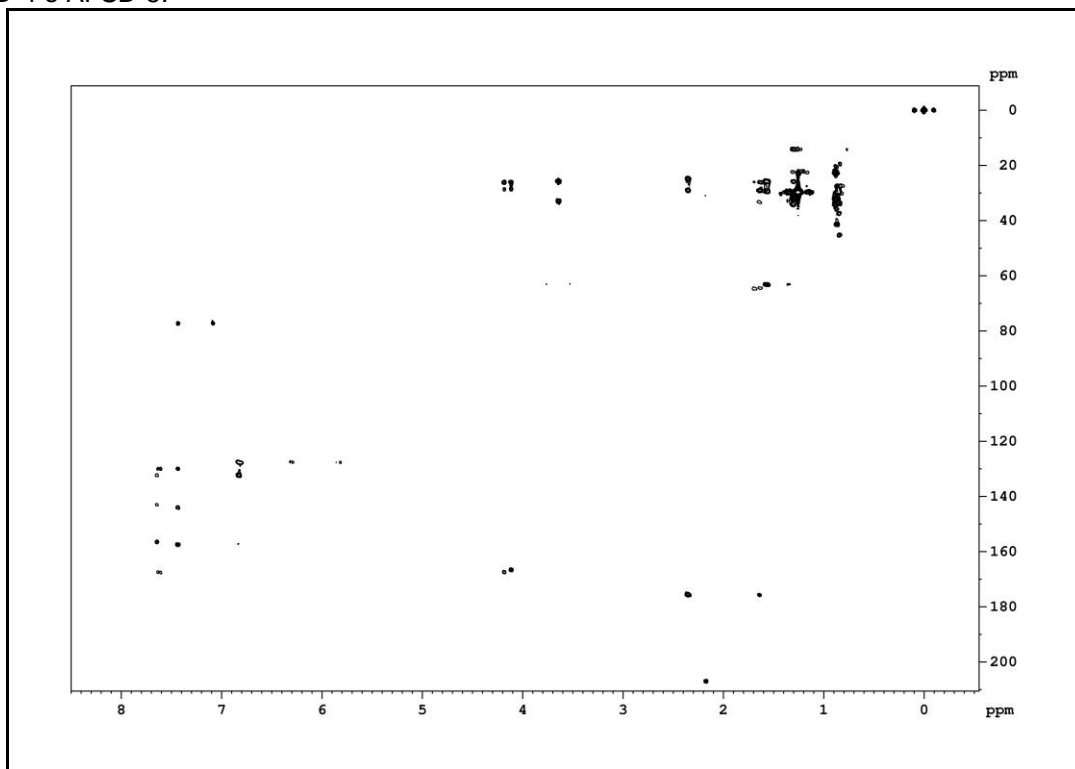
FONTE: o autor (2017).

FIGURA 47 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) DAS SUBSTÂNCIAS AFSD-3, AFSD-4 e AFSD-5.



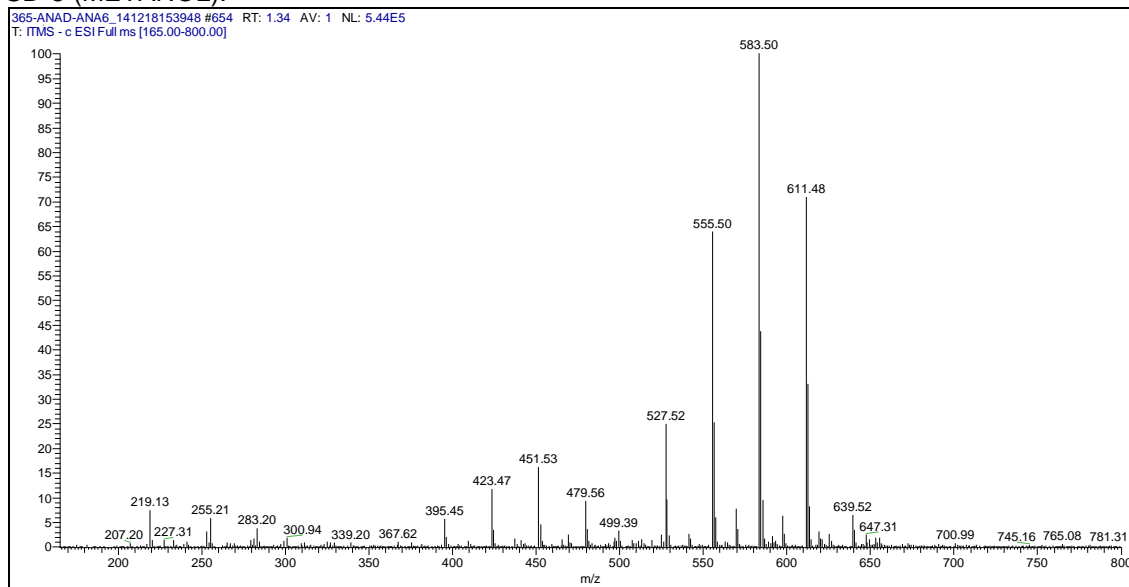
FONTE: o autor (2017).

FIGURA 48 - MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) DAS SUBSTÂNCIAS AFSD-3, AFSD-4 e AFSD-5.



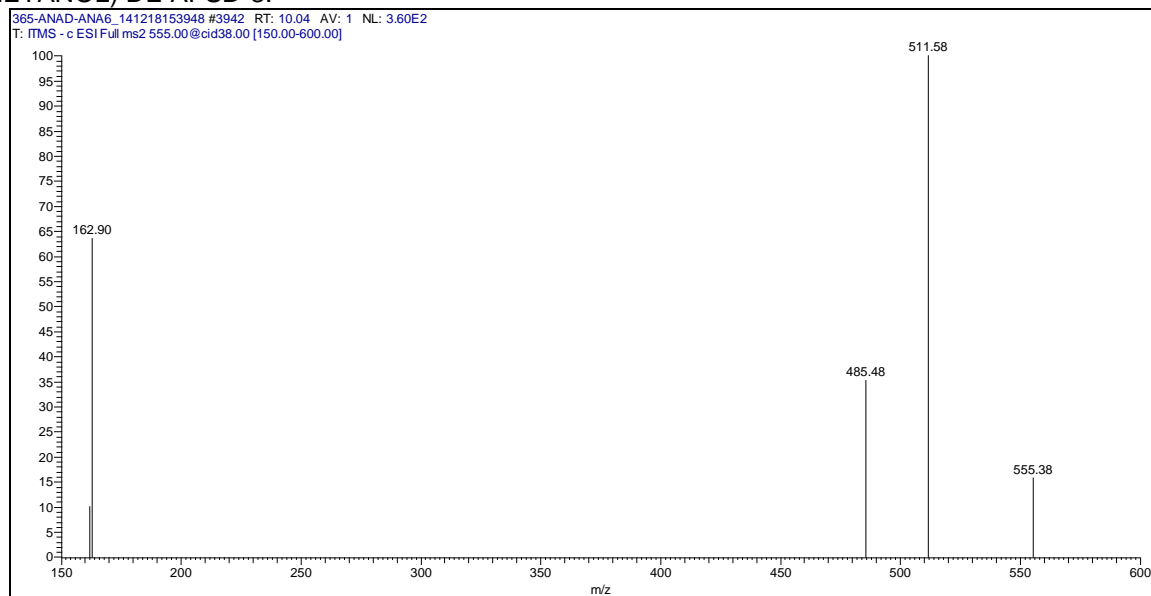
FONTE: o autor (2017).

FIGURA 49 - EXPERIMENTO DE MASSAS EM FULL SCAN DA MISTURA DE AFSD-3, AFSD-4 E AFSD-5 (METANOL).



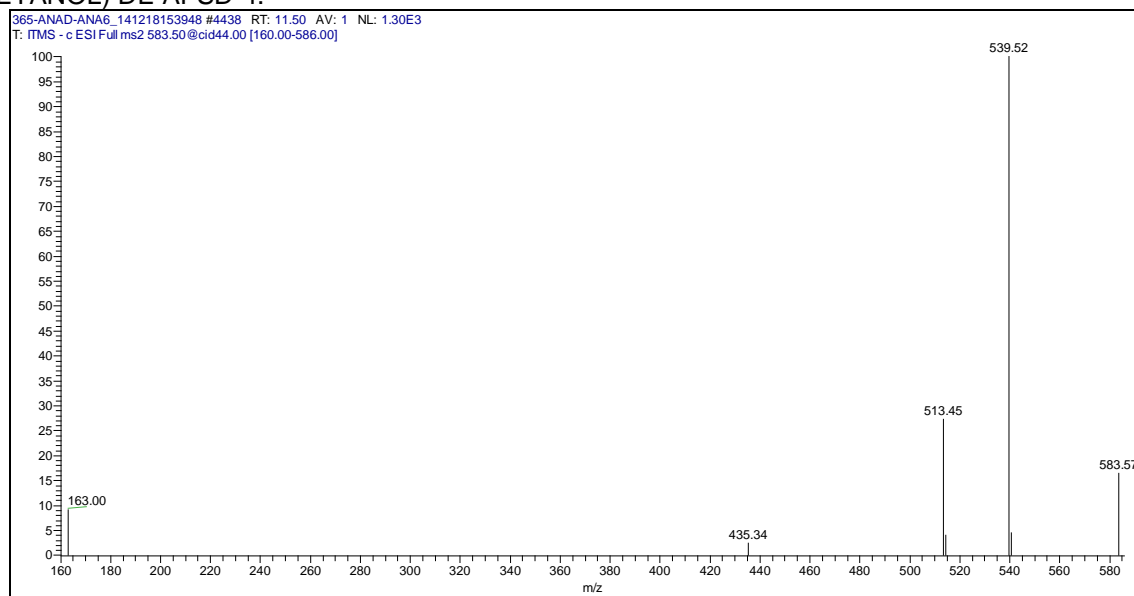
FONTE: o autor (2017).

FIGURA 50 - EXPERIMENTO DE MASSAS (MS<sup>2</sup>) DO ÍON MOLECULAR DE  $m/z$  555 (CE 38 V, EM METANOL) DE AFSD-3.



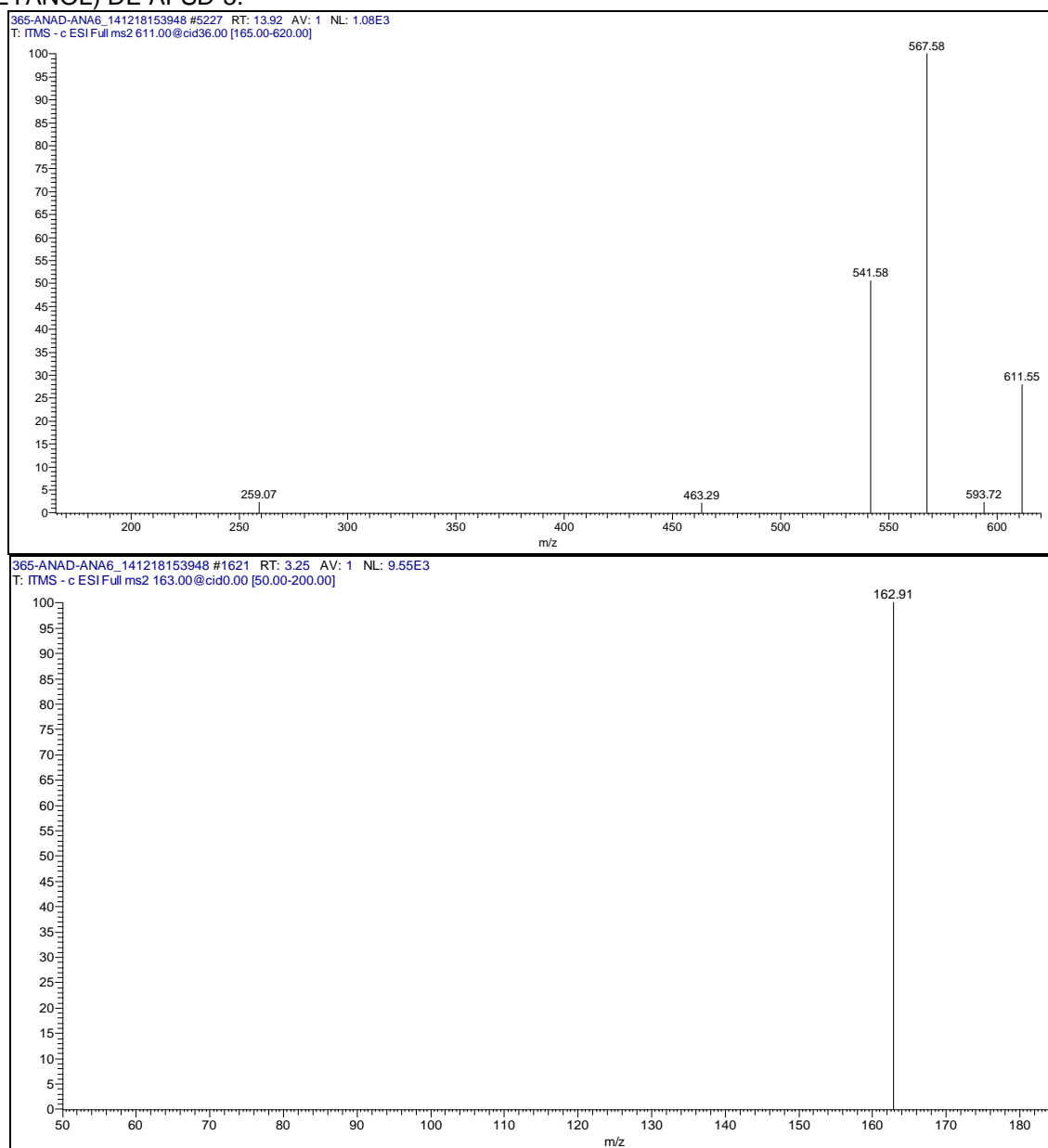
FONTE: o autor (2017).

FIGURA 51 - EXPERIMENTO DE MASSAS (MS<sup>2</sup>) DO ÍON MOLECULAR DE  $m/z$  583 (CE 44 V, EM METANOL) DE AFSD-4.



FONTE: o autor (2017).

FIGURA 52 - EXPERIMENTO DE MASSAS (MS<sup>2</sup>) DO ÍON MOLECULAR DE  $m/z$  611 (CE 36 V, EM METANOL) DE AFSD-5.



FONTE: o autor (2017).

Até o momento, há pouca informação sobre ácidos fenólicos para o gênero *Guettarda*, sendo identificados em *Guettarda pohliana* e *Guettarda acreana* os ácidos 5-cafeoilquinico e 4,5 dicafeoilquinico (CAPASSO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2008; TESTA et al., 2012, NARESSI et al., 2015).

A descrição dos ésteres de cadeia longa do ácido *p*-cumárico (*p*-cumarato de octacosanila, *p*-cumarato de triacontila e *p*-cumarato de dotriacontila) é inédita para o gênero *Guettarda* porém, esses compostos já foram identificados em outras espécies. O *p*-cumarato de octacosanila foi identificado em *Eugenia copacabanensis* Kiaersk, Myrtaceae (CARVALHO JUNIOR et al., 2014), *Tanacetum gracile* Hook. f. &

Thomson, Compositae (KHAN, 2000). O composto *p*-cumarato de triacontila (defuscin) foi identificado em *Dendrobium fuscescens* Griff, Orchidaceae (TALAPRATA et al., 1989a), *Erythrina senegalensis* DC, Fabaceae (WANDJI et al., 1990), *Bombacopsis glabra* (Pasq.) A. Robyns, Bombaceae (PAULA et al., 2006); Talaprata e colaboradores (1989b) identificaram o *p*-cumarato de dotriacontila (randilongin) em *Randia Longiflora* Lamk, Rubiaceae.

## 5.6 ANÁLISE DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE *Guettarda uruguensis*

### 5.6.1 Teor de compostos fenólicos

O resultado do ensaio para a determinação do teor de compostos fenólicos presentes no extrato e frações provenientes das folhas, flores e frutos de *G. uruguensis* realizado pelo método de Follin Ciocateu está demonstrado na TABELA 13. Para critério de classificação foram adotados os índices descritos por Chew et al., 2011.

Pelo doseamento do teor de compostos fenólicos totais, verificou-se que os extratos e frações de *G. uruguensis* apresentam elevada concentração de compostos fenólicos (fenólicos totais > 50 mg.EAG/g). A amostra FOA ( $860,1 \pm 8,2$  mg.EAG/g) apresentou o maior teor de compostos fenólicos, seguida pelo EBGF ( $460,6 \pm 6,2$  mg.EAG/g) e frações FLA ( $416,5 \pm 4,8$  mg.EAG/g) e FOB ( $410,8 \pm 4,9$  mg.EAG/g). A amostra FRR ( $58,5 \pm 1,6$  mg.EAG/g) apresentou o menor teor de compostos fenólicos.

TABELA 13 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE *Guettarda uruguensis*.

Extrato/Fração	Teor de Fenólicos Totais (mg EAG/g)
EBGF	460,6 ± 6,2
FOC	193,5 ± 0,8
FOA	860,1 ± 8,2
FOB	410,8 ± 4,9
FOR	179,7 ± 1,1
EBGFL	199,9 ± 3,7
FLC	111,4 ± 0,8
FLA	416,5 ± 4,8
FLB	348,8 ± 8,8
FLR	196,5 ± 3,3
FRC	88,1 ± 1,5
FRA	189,2 ± 5,8
FRR	58,5 ± 1,6

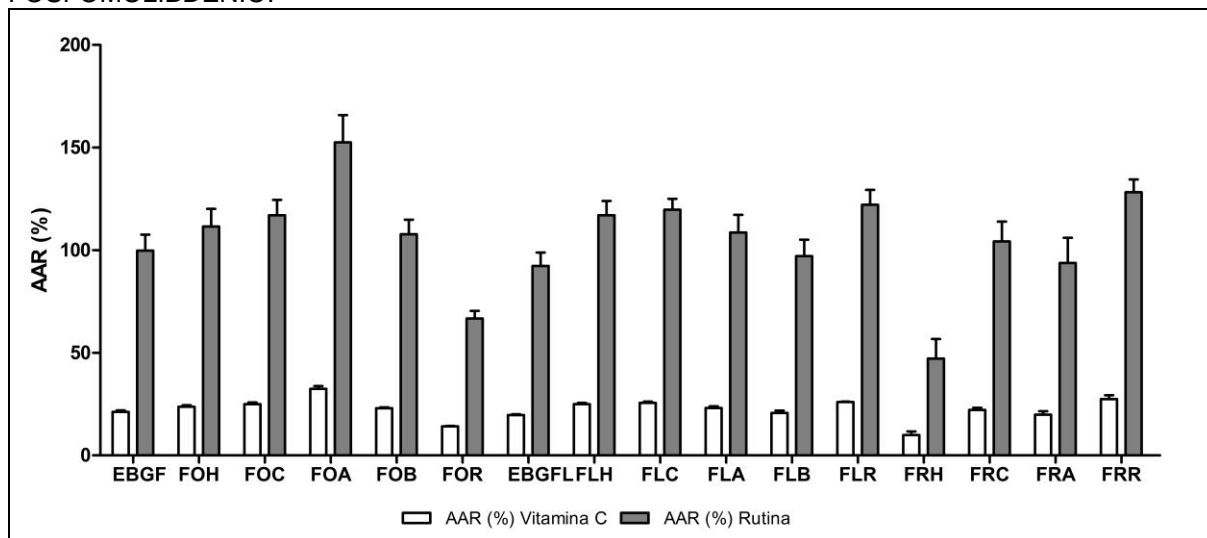
Legenda: Os resultados são expressos como médias ± erro padrão da média em relação aos valores obtidos em triplicata. EBGF: extrato etanólico bruto folha; FOH: fração hexano folha; FOC: fração clorofórmio folha; FOA: fração acetato folha; FOB: fração butanol folha; FOR: fração remanescente folha; EBGFL: extrato etanólico bruto flor; FLH: fração hexano flor; FLC: fração clorofórmio flor; FLA: fração acetato de etila flor; FLB: fração butanol flor; FLR: fração remanescente flor; FRH: extrato hexano fruto; FRC: extrato clorofórmio fruto; FRA: extrato acetato de etila fruto; FRR: extrato metanólico remanescente fruto. Fonte: o autor (2017).

#### 5.6.2.1 Método do fosfomolibdênio

A capacidade antioxidante dos extratos e frações de folha, flor e fruto de *G. uruguensis* em reduzir o fosfomolibdênio foi avaliada como atividade antioxidante equivalente em relação ao ácido ascórbico e a rutina.

Os índices de atividade antioxidante obtidos por meio do ensaio de fosfomolibdênio (FIGURA 53) indicam que os extratos e frações apresentam atividade antioxidante superior à rutina (*r*) e inferior em relação ao ácido ascórbico (*aa*). Ainda com relação a redução de fosfomolibdênio, destaca-se o melhor desempenho antioxidante obtido pela amostra FOA [(151,51±0,03% *r*); (32,41±0,03% *aa*)] seguido por FLR [(121,59±0,01% *r*); (26,01±0,01% *aa*)] e FRR [(128,14±0,03% *r*); (27,1±0,03% *aa*)].

FIGURA 53 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE *Guettarda uruguensis* POR MEIO DA METODOLOGIA DE FOSFOMOLIBDÊNIO.

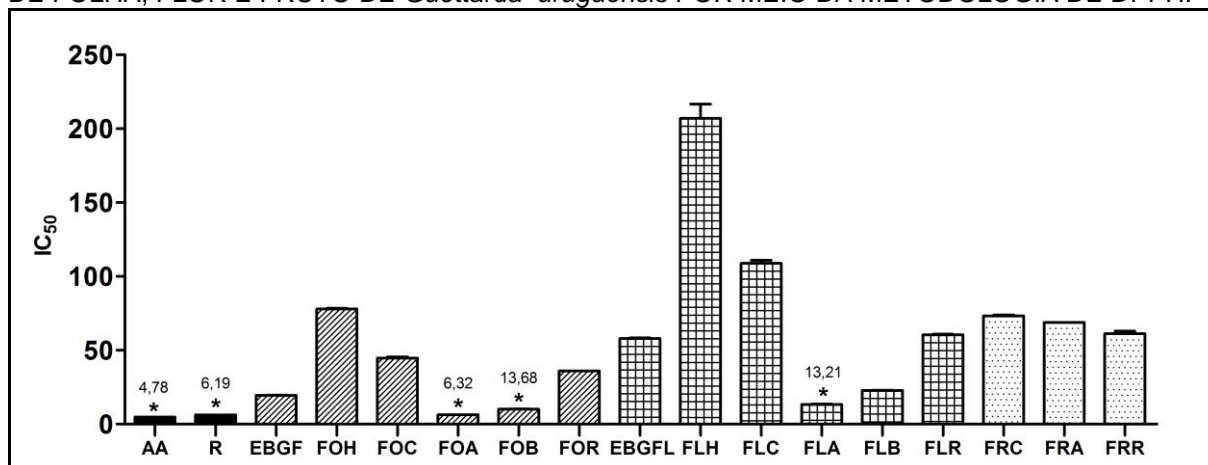


Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média em relação aos valores obtidos em triplicata ou quadruplicata. EBGF: extrato etanólico bruto folha; FOH: fração hexano folha; FOC: fração clorofórmio folha; FOA: fração acetato folha; FOB: fração butanol folha; FOR: fração remanescente folha; EBGFL: extrato etanólico bruto flor; FLH: fração hexano flor; FLC: fração clorofórmio flor; FLA: fração acetato de etila flor; FLB: fração butanol flor; FLR: fração remanescente flor; FRH: extrato hexano fruto; FRC: extrato clorofórmio fruto; FRA: extrato acetato de etila fruto; FRR: extrato metanólico remanescente fruto; AAR(%): atividade antioxidante verificada em relação aos controles ácido ascórbico e rutina. Fonte: o autor (2017).

#### 5.6.2.2 Método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

Com relação a atividade antioxidante das amostras de extratos e frações de *G. uruguensis* avaliadas por meio do método de DPPH, verifica-se que os melhores índices antioxidantes foram obtidos pela fração acetato de etila das folhas (FOA), fração acetato de etila de flores (FLA) e fração butanol de flores (FLB). As amostras FOA ( $IC_{50} = 6,32 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ ), FOB ( $IC_{50} = 13,68 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$ ) e FLA ( $IC_{50} = 13,21 \pm 0,66 \mu\text{g/mL}$ ) apresentaram valores estatisticamente semelhantes ( $p < 0,05$ ) aos valores dos padrões de referência, ácido ascórbico ( $IC_{50} = 4,78 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ ) e rutina ( $IC_{50} = 6,19 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ ). A amostra FLB ( $IC_{50} = 22,73 \pm 0,29 \mu\text{g/mL}$ ) também demonstrou elevada atividade antioxidante. A atividade antioxidante dos extratos obtidos de frutos demonstrou atividade antioxidante inferior aos demais órgãos vegetais. Contudo, entre os extratos obtidos de frutos que foram analisados pela metodologia de DPPH, verifica-se que FRR ( $IC_{50} = 61,22 \pm 2,79 \mu\text{g/mL}$ ) teve o melhor desempenho. Os resultados da atividade antioxidante obtidos pelo método do DPPH estão expressos na FIGURA 54 e TABELA 14.

FIGURA 54 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE *Guettarda uruguensis* POR MEIO DA METODOLOGIA DE DPPH.



Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média em relação aos valores obtidos em triplicata ou quadruplicata. A comparação entre as amostras foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. Os níveis de significância são indicados por \* $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle. EBGF: extrato etanólico bruto folha; FOH: fração hexano folha; FOC: fração clorofórmio folha; FOA: fração acetato folha; FOB: fração butanol folha; FOR: fração remanescente folha; EBGFL: extrato etanólico bruto flor; FLH: fração hexano flor; FLC: fração clorofórmio flor; FLA: fração acetato de etila flor; FLB: fração butanol flor; FLR: fração remanescente flor; FRH: extrato hexano fruto; FRC: extrato clorofórmio fruto; FRA: extrato acetato de etila fruto; FRR: extrato metanólico remanescente fruto; IC<sub>50</sub>: concentração necessária para inibir em 50% a concentração inicial de radicais DPPH; DPPH: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. Fonte: o autor (2017).

### 5.6.2.3 Teor de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

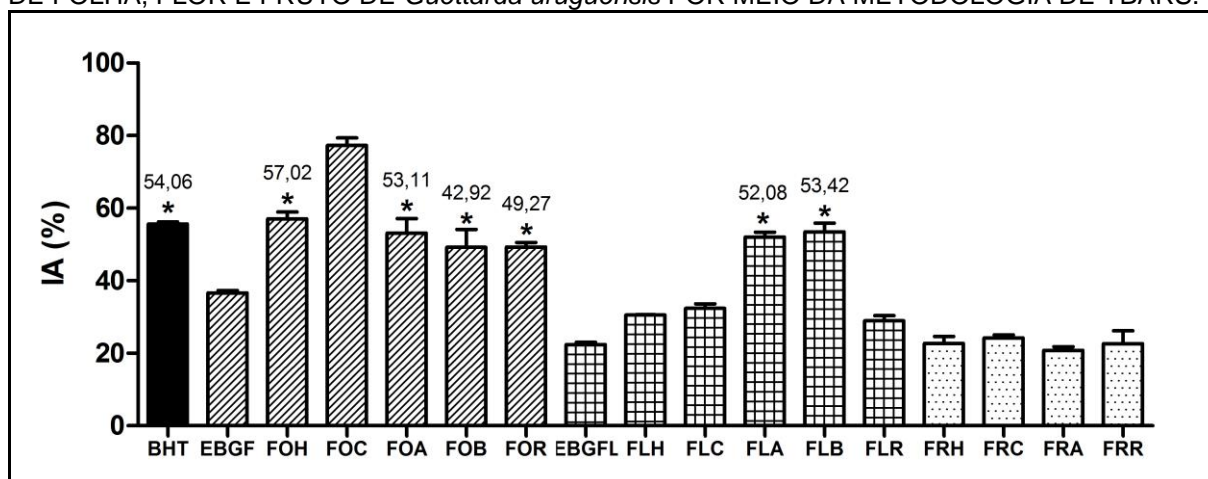
A atividade antioxidante de extratos e frações de folha, flor e fruto de *G. uruguensis* foi avaliada com relação a capacidade de proteção contra a lipoperoxidação. Os resultados da avaliação atividade antioxidante pelo método de TBARS estão expressos na FIGURA 55 e TABELA 14.

No ensaio de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, avaliou-se a capacidade das amostras com relação ao índice antioxidante, referente a formação do malonaldeído. Nesse quesito, com relação as amostras avaliadas, verificou-se que a folha foi o órgão vegetativo que apresentou maior índice antioxidante, destacando-se FOC (IA = 77,31  $\pm$  3,64%), FOH (IA = 57,02  $\pm$  3,28%) e FOA (IA = 53,11  $\pm$  6,89%), com índices antioxidantes superiores ou estatisticamente semelhantes ( $p < 0,05$ ) aos índices antioxidantes apresentados pelo controle BHT (IA = 54,6%). Assim como as folhas, as flores também demonstraram atividade antioxidante significativa, sendo que as frações acetato de etila (IA = 52,08  $\pm$  2,20%) e butanol (IA = 53,42  $\pm$  4,29%) apresentaram valores estatisticamente semelhantes



( $p < 0,05$ ) ao controle BHT (IA = 54,6%). Com relação aos extratos orgânicos obtidos dos frutos, as amostras apresentaram índice antioxidante inferior ao padrão BHT.

FIGURA 55 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE *Guettarda uruguensis* POR MEIO DA METODOLOGIA DE TBARS.



Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média em relação aos valores obtidos em triplicata ou quadruplicata. A comparação entre as amostras foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. Os níveis de significância são indicados por \* $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle. EBGF: extrato etanólico bruto folha; FOH: fração hexano folha; FOC: fração clorofórmio folha; FOA: fração acetato folha; FOB: fração butanol folha; FOR: fração remanescente folha; EBGFL: extrato etanólico bruto flor; FLH: fração hexano flor; FLC: fração clorofórmio flor; FLA: fração acetato de etila flor; FLB: fração butanol flor; FLR: fração remanescente flor; FRH: extrato hexano fruto; FRC: extrato clorofórmio fruto; FRA: extrato acetato de etila fruto; FRR: extrato metanólico remanescente fruto; IA: índice antioxidante. Fonte: o autor (2017).

### 5.6.3 Análise da atividade antioxidante

Os extratos etanólicos brutos obtidos de folha e flor e respectivas frações orgânicas, assim como os extratos orgânicos obtidos de frutos da espécie *Guettarda uruguensis*, foram avaliados com relação as suas atividades antioxidantes utilizando as metodologias de formação do complexo fosfomolibdenio, redução do radical DPPH e metodologia de TBARS.

A espécie *Guettarda uruguensis* demonstrou por meio de três metodologias significativa atividade antioxidante. A atividade antioxidante dos extratos e frações obtidos de folha e flor, assim como os extratos obtidos de fruto de *G. uruguensis* foi mensurada por meio do mecanismo de oxirredução (método de fosfomolibdenio), captura de radicais (método de DPPH) e inibição da lipoperoxidação (método de TBARS). Em síntese, os resultados obtidos encontram-se listados na TABELA 14.

TABELA 14 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DA ESPÉCIE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL, RUBIACEAE.

EXTRATO/ FRAÇÃO	Metodologia			
	Fosfomolibdênio (%)		DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)	TBARS IA (%)
	Ácido ascórbico	Rutina		
EBGF	21,23 ± 0,01	99,24 ± 0,01	19,54 ± 0,20	36,63 ± 1,20
FOH	23,71 ± 0,01	110,83 ± 0,01	78,01 ± 0,62	57,02 ± 3,28 <sup>a</sup>
FOC	24,92 ± 0,01	116,51 ± 0,01	44,74 ± 1,44	77,31 ± 3,64
FOA	32,41 ± 0,03	151,51 ± 0,03	6,32 ± 0,03 <sup>a</sup>	53,11 ± 6,89 <sup>a</sup>
FOB	22,95 ± 0,01	107,19 ± 0,01	13,68 ± 0,20 <sup>a</sup>	42,92 ± 2,71 <sup>a</sup>
FOR	14,18 ± 0,00	66,28 ± 0,00	35,89 ± 0,13	49,27 ± 2,22 <sup>a</sup>
EBGFL	19,65 ± 0,01	91,66 ± 0,01	58,65 ± 0,98	22,41 ± 1,10
FLH	24,92 ± 0,01	116,51 ± 0,01	206,8 ± 16,99	30,53 ± 0,21
FLC	25,55 ± 0,00	119,43 ± 0,00	108,8 ± 3,58	32,36 ± 2,23
FLA	23,09 ± 0,01	107,95 ± 0,01	13,21 ± 0,66 <sup>a</sup>	52,08 ± 2,20 <sup>a</sup>
FLB	20,66 ± 0,02	96,59 ± 0,02	22,73 ± 0,29	53,42 ± 4,29 <sup>a</sup>
FLR	26,01 ± 0,01	121,59 ± 0,01	60,42 ± 0,82	28,94 ± 2,53 <sup>l</sup>
FRH	9,94 ± 0,03	46,43 ± 0,03	>1000	22,71 ± 3,25
FRC	22,14 ± 0,02	103,4 ± 0,02	73,21 ± 1,13	24,18 ± 1,45
FRA	19,85 ± 0,03	92,8 ± 0,03	68,8 ± 0,06	20,82 ± 1,73
FRR	27,41 ± 0,03	128,14 ± 0,03	61,22 ± 2,79	22,65 ± 6,13
Ácido ascórbico	100	—	4,78 ± 0,04 <sup>a</sup>	—
Rutina	—	100	6,19 ± 0,06 <sup>a</sup>	—
BHT	—	—	—	54,6 <sup>a</sup>

Legenda: Os resultados são expressos como médias ± erro padrão da média em relação aos valores obtidos em triplicata ou quadriplicata. A comparação entre as amostras foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. Médias com a mesma letra na coluna não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si pelo teste de Dunnett. EBGF: extrato etanólico bruto folha; FOH: fração hexano folha; FOC: fração clorofórmio folha; FOA: fração acetato folha; FOB: fração butanol folha; FOR: fração remanescente folha; EBGFL: extrato etanólico bruto flor; FLH: fração hexano flor; FLC: fração clorofórmio flor; FLA: fração acetato de etila flor; FLB: fração butanol flor; FLR: fração remanescente flor; FRH: extrato hexano fruto; FRC: extrato clorofórmio fruto; FRA: extrato acetato de etila fruto; FRR: extrato metanólico remanescente fruto; IC<sub>50</sub>: concentração necessária para inibir em 50% a concentração inicial de radicais DPPH; DPPH: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila; IA: índice antioxidante; -: não determinado. Fonte: o autor (2017).

Os estudos sobre as propriedades antioxidantes de produtos naturais estão direcionados classicamente a compostos da classe dos flavonoides e dos ácidos fenólicos. A propriedade antioxidante de plantas medicinais é frequentemente associada as características redox dos compostos fitoquímicos. Compostos fenólicos formam um grande grupo de metabólitos secundários de origem em produtos naturais, atuando como sequestradores de radicais livres e antioxidantes. A relação estrutura-atividade de diversos compostos fenólicos é conhecida, sendo que a capacidade de eliminação de radicais livres e atividade antioxidante dos compostos fenólicos é influenciada pelo número e posição dos grupos hidroxila no anel aromático dos compostos fenólicos e pela glicosilação de agliconas e presença de outros grupos doadores de hidrogênio (-NH, -SH) (RICE-EVANS et al., 1996; RICE-EVANS et al., 1997).

Seguindo o princípio de que flavonoides e ácidos fenólicos são as substâncias de interesse na pesquisa por antioxidantes originários de produtos naturais, destaca-se a identificação em espécies de *Guettarda* dos flavonoides quercetina-3-O-B-D-galactopiranosídeo, quercetina-3-O-B-D-glucopiranosídeo and grandifloroside (NARESSI et al., 2015); ácidos fenólicos: ácido 5-cafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico (CAPASSO et al., 1998, OLIVEIRA et al., 2008, TESTA et al., 2012), ácido chiquimico (CAPASSO et al., 1998). Observa-se que os ácidos 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico derivados da quercetina demonstraram habilidade de remoção de radicais livres, com valores de IC<sub>50</sub> próximos ao demonstrado pela fração FLA obtida de *Guettarda uruguensis* no ensaio de DPPH.

Destaca-se que algumas espécies do gênero *Guettarda* possuem uso medicinal popular, porém até o momento, apenas as espécies *G. uruguensis* (DUARTE et al., 2014; DUARTE et al., 2016), *G. viburnoides* (NARESSI et al., 2015) e *G. platypoda* (RODRIGUES et al., 2014) foram investigadas com relação a atividade antioxidante.

Com o objetivo de traçar um comparativo entre as espécies de *Guettarda*, compilamos dados de literatura referentes ao conteúdo de compostos fenólicos. As frações metanol-água do caule (347,75 ± 0,02 EAG/g) e fração acetato de etila das folhas (298,03 ± 0,002 EAG/g) da espécie *Guettarda grazielae* apresentaram elevado teor de compostos fenólicos (LIMA et al., 2009). O conteúdo total de compostos fenólicos foi mensurado em equivalente de ácido tânico para a espécie *Guettarda speciosa*, sendo que o extrato aquoso (115,81 ± 0,67 mg TAE/g extrato) apresentou a maior concentração dentre os extratos analisados (REVATHI E; RAJESWARI, 2013). A observação desses dados, permite concluir que a espécie *G. uruguensis* apresenta um elevado conteúdo de compostos fenólicos com relação a classificação de literatura adotada e também com relação as demais espécies do mesmo gênero botânico avaliadas até o momento.

Segundo Rodrigues et al. (2014), o extrato das folhas de *Guettarda platypoda* (IC<sub>50</sub> = 7,02 x 10<sup>-3</sup> mg/mL), fração acetato de etila (IC<sub>50</sub> = 5.58 x 10<sup>-3</sup> mg/mL) e fração metanólica (IC<sub>50</sub> = 8,10<sup>-3</sup> mg/mL) apresentaram atividade antioxidante superior ao padrão de vitamina c (IC<sub>50</sub> = 8,14 x 10<sup>-3</sup> mg/mL). Ainda com relação a esse estudo, o autor sugere que esses resultados estão relacionados a presença de flavonoides, taninos e açúcares redutores. Duarte et al. (2014), avaliou a atividade antioxidante do extrato bruto (IC<sub>50</sub> = 15,98 mg/mL) obtido das cascas do caule de *G. uruguensis* e

respectivas frações orgênicas: hexano ( $IC_{50} = 353,53$  mg/mL), diclorometano ( $IC_{50} = 54,34$  mg/mL), acetato de etila ( $IC_{50} = 10,91$  mg/mL) e hidroalcoólica remanescente ( $IC_{50} = 24,14$  mg/mL) com relação aos valores apresentados pelos padrões, ácido ascórbico ( $IC_{50} = 4,77$  mg/mL) e rutina ( $IC_{50} = 6,62$  mg/mL). Segundo Naressi et al. (2015), o extrato bruto obtido das folhas da espécie *G. viburnoides* ( $IC_{50} = 24,69$  mg/mL) e frações acetato de etila ( $IC_{50} = 18,92$  mg/mL), hidroalcoólica ( $IC_{50} = 26,47$  mg/mL) e o composto grandiosofilio ( $IC_{50} = 20,52$  mg/mL) demonstraram por meio do método do DPPH elevada atividade antioxidante.

Entretanto, é fundamental considerar esses dados através de uma perspectiva global, onde o método de Follin Ciocateau, mesmo com as limitações inerentes ao método com relação a especificidade, é amplamente utilizado como ferramenta para o doseamento de compostos fenólicos totais presentes tanto em extratos vegetais complexos quanto em frações purificadas. As limitações que dizem respeito à especificidade se devem ao fato de que a metodologia fundamenta-se em reações de redução, portanto se considerados como interferentes nas amostras analisadas, substâncias não fenólicas como por exemplo, ácido ascórbico, açúcares redutores (por exemplo, glicose e frutose) e proteínas (aminoácidos) podem gerar um teor de compostos fenólicos superestimado (LOWRY et al., 1951; EVERETTE et al., 2010).

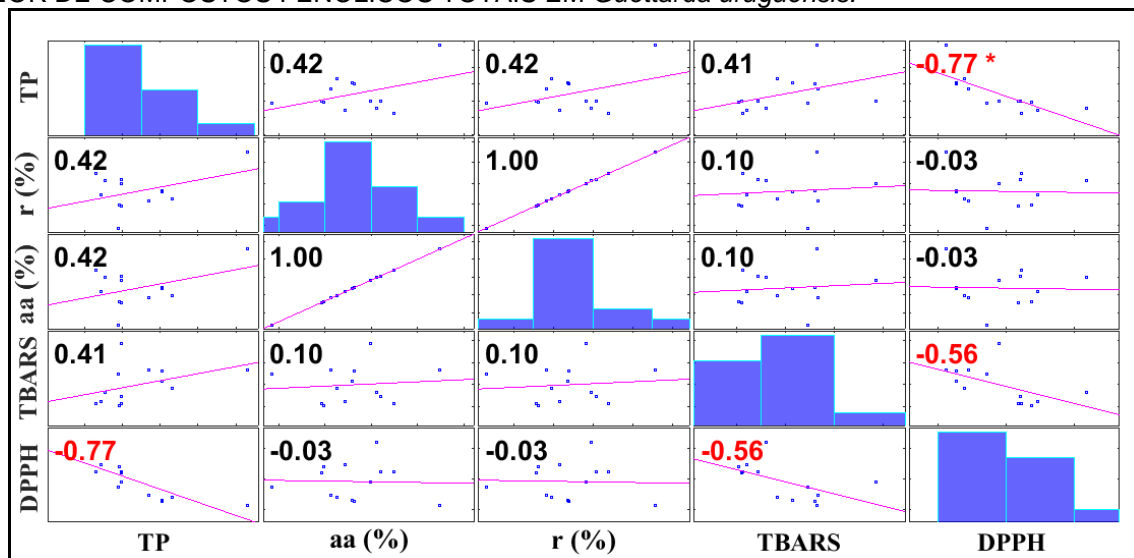
A espécie *G. uruguensis* é uma planta amplamente cultivada, possuindo frutos comestíveis e flores extremamente aromáticas. Ainda considerando que existe uma relação inversa entre a ingestão de alimentos ricos em substâncias antioxidantes e a ocorrência de inúmeras patologias clínicas, os resultados apresentados até o momento são extremamente interessantes e incentiva-se a continuidade da pesquisa nesse sentido. Desse modo, o elevado potencial antioxidante observado para *G. uruguensis*, em especial para o órgão vegetal folha, demonstra a importância da continuidade da investigação das atividades biológicas que estejam relacionadas a atividade antioxidante como por exemplo, a atividade anti-inflamatória que esta diretamente relacionada com o uso popular descrito para algumas espécies do gênero *Guettarda*.

#### 5.6.4 Correlação de Pearson e análise das componentes principais

Os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes estão correlacionados com o teor de compostos fenólicos (TP) de acordo com a análise de regressão linear, como demonstrado pela análise de Pearson (FIGURA 56). O coeficiente de Pearson indicou forte correlação entre o ensaio de DPPH e o teor de TP ( $r=0,77$ ;  $p<0,01$ ), observado que o índice de  $IC_{50}$  se refere a concentração necessária para inibir em 50% a concentração inicial de radicais DPPH, ou seja, baixos valores de  $IC_{50}$  significam que a substância em questão, em tese, é um potente antioxidante. Observa-se também que houve perfeita correlação entre os ensaios antioxidantes:  $aa$  (%) e  $r$  (%) ( $r=1$ ;  $p<0,01$ ); DPPH e TBARS ( $r=0,56$ ;  $p<0,05$ ).

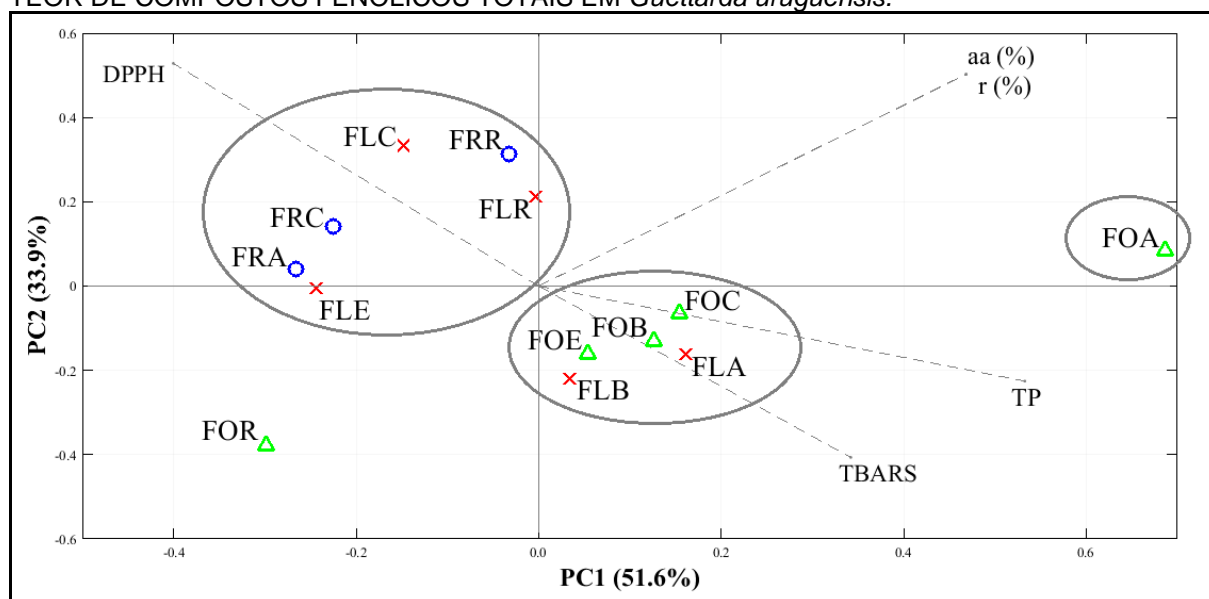
A FIGURA 57 apresenta as duas componentes principais (PC1 e PC2) que correlacionam o teor de fenólicos totais e as atividades antioxidantes (fosfomolibdênio, DPPH e TBARS) dos extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto da espécie *G. uruguensis*. PC1 explica 51,6% da variabilidade encontrada na análise dos dados, enquanto PC2 explica 33,9%. PC1 e PC2 distinguem as amostras com relação ao teor de fenólicos totais e ao desempenho em atividades antioxidantes. As amostras que apresentam elevado teor de fenólicos totais dividem-se em dois grupos: (i) FOA, no qual se observa superior teor de fenólicos totais e expressiva atividade antioxidante. Com relação a influência do teor de fenólicos totais nas atividades antioxidantes, o mesmo tem maior influência no ensaio de fosfomolibdênio; (ii) FOE, FLB, FOB, FOC e FLA apresentam desempenho semelhante nas atividades antioxidantes de DPPH e TBARS com relação ao teor de fenólicos totais. Outro grupo observado, (iii) formado pelas amostras FLE, FLR, FLC, FRR, FRA, FRC, distingue-se dos grupos (i) e (ii) pelo inferior teor de fenólicos totais.

FIGURA 56 - MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE PEARSON PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM *Guettarda uruguensis*.



Legenda: TP: teor de fenólico totais; r (%): atividade antioxidante verificada em relação ao controle rotina; aa (%): atividade antioxidante verificada em relação ao controle ácido ascórbico; TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; DPPH: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. Fonte: o autor (2017).

FIGURA 57 - ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM *Guettarda uruguensis*.



Legenda: PC1/PC2: componentes principais; TP: teor de fenólico totais; r (%): atividade antioxidante verificada em relação ao controle rotina; aa (%): atividade antioxidante verificada em relação ao controle ácido ascórbico; TBARS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; DPPH: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila. FOE: extrato etanólico bruto folha; FOC: fração clorofórmio folha; FOA: fração acetato folha; FOB: fração butanol folha; FOR: fração remanescente folha; FLE: extrato etanólico bruto flor; FLH: fração hexano flor; FLC: fração clorofórmio flor; FLA: fração acetato de etila flor; FLB: fração butanol flor; FLR: fração remanescente flor; FRH: extrato hexano fruto; FRC: extrato clorofórmio fruto; FRA: extrato acetato de etila fruto; FRR: extrato metanólico remanescente fruto. Fonte: o autor (2017).

## 5.7 TOXICIDADE PARA NÁUPLIOS DE *Artemia salina*

O ensaio de letalidade para náuplios de *Artemia salina* demonstra que as amostras FOH, FOALC, FOR e FRR não foram tóxicas, apresentando  $CL_{50} > 1000$   $\mu\text{g/mL}$ . As demais amostras apresentaram taxas de concentração letal variando entre  $< 10$   $\mu\text{g/mL}$  a 494,82  $\mu\text{g/mL}$ , caracterizando níveis com relação ao grau de toxicidade, em uma escala, que oscilaram entre alta a moderada toxicidade (TABELA 15). Os critérios descritos por Meyer et al. (1982) e Amarante et al. (2011) foram utilizados para a avaliação e classificação do grau de toxicidade. O grau de toxicidade foi classificado como: baixo ( $CL_{50} > 500$   $\mu\text{g/mL}$ ), moderado ( $100$   $\mu\text{g/mL} < CL_{50} < 500$   $\mu\text{g/mL}$ ) e alta toxicidade ( $CL_{50} < 100$   $\mu\text{g/mL}$ ).

TABELA 15 - AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE *Guettarda. uruguensis* FRENTE AO MICROCRUSTÁCEO *Artemia salina*.

Extrato/Fração	Toxicidade em <i>Artemia salina</i>	
	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Intervalo de confiança de 95%
EBGF	494,82	193,03-1268,42
FOH	> 1000	nd
FOC	61,68	27,86-136,60
FOA	90,85	51,32-160,84
FOB	43,19	5,41-345,07
FOR	421,70	162,10-1007,00
FOAQ	65,29	42,07-101,32
FOALC	> 1000	nd
EBGFL	142,51	35,34-574,70
FLH	51,79	18,35-146,17
FLC	< 10	nd
FLA	38,99	09,82-154,78
FLB	69,73	42,12-115,43
FLR	25,12	05,33-118,39
FLAQ	84,83	34,26-210,09
FLALC	21,54	11,53-40,27
FRH	149,62	74,20-301,70
FRC	69,78	12,55-388,13
FRA	153,99	71,58-331,27
FRR	> 1000	nd

Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média em relação aos valores obtidos em triplicata. EBGF: extrato etanólico bruto folha; FOH: fração hexano folha; FOC: fração clorofórmio folha; FOA: fração acetato folha; FOB: fração butanol folha; FOR: fração remanescente folha; FOAQ: extrato aquoso folha; FOALC: extrato alcaloidico folha; EBGFL: extrato etanólico bruto flor; FLH: fração hexano flor; FLC: fração clorofórmio flor; FLA: fração acetato de etila flor; FLB: fração butanol flor; FLR: fração remanescente flor; FLAQ: extrato aquoso flor; FLALC: extrato alcaloidico flor; FRH: extrato hexano fruto; FRC: extrato clorofórmio fruto; FRA: extrato acetato de etila fruto; FRR: extrato metanólico remanescente fruto; nd: não determinado; IC 95%: Intervalo de confiança em 95%;  $CL_{50}$ : concentração letal média. FONTE: o autor (2017).

Dentre as amostras avaliadas, FLC ( $CL_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ) apresentou o grau de toxicidade mais severo, gerando a maior taxa de letalidade para *A. salina*. A princípio, atribuiu-se a alta toxicidade demonstrada pela FLC a presença de alcaloides, posto que alcaloides podem apresentar toxicidade nesse modelo. Alcaloides foram descritos em literatura para o gênero *Guettarda* (KAN-FAN & HUSSON, 1979, BRILLANCEAU et al., 1984, FERRARI et al., 1986, MONTAGNAC et al., 1997, CAPASSO et al., 1998), sendo também detectados pelo presente trabalho por meio da análise fitoquímica preliminar. Cabe mencionar, que em estudo anterior (DUARTE, 2012) a fração clorofórmio obtida das cascas do caule de *G. uruguensis* ( $CL_{50} = 80,31 \mu\text{g/mL}$ ) apresentou toxicidade semelhante ( $p < 0,05$ ) ao sulfato de quinidina ( $CL_{50} = 81,14 \mu\text{g/mL}$ ).

Nesse sentido, para avaliação no modelo de letalidade para *A. salina*, foram realizadas extrações para a obtenção de extratos alcaloidicos. Partindo do pressuposto de que a toxicidade observada fosse ocasionada pelos alcaloides, observamos que FLALC ( $CL_{50} < 21,54 \mu\text{g/mL}$ ) demonstrou alta toxicidade, porém em menor grau em comparação a FLC ( $CL_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ). Esses dados demonstram que a elevada toxicidade observada para FLC ( $CL_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ) não é ocasionada somente pela presença de alcaloides, e sim por mais de uma classe de substâncias que está presente nessa fração.

Com relação aos extratos e frações obtidos de folhas de *G. uruguensis*, observamos que FOB ( $CL_{50} < 43,19 \mu\text{g/mL}$ ), FOC ( $CL_{50} < 61,68 \mu\text{g/mL}$ ) e FOAQ ( $CL_{50} < 65,29 \mu\text{g/mL}$ ) apresentam alta toxicidade. De maneira semelhante ao suposto no caso das flores, esperava-se que a toxicidade apresentada pela FOC pudesse ser atribuída à presença dos alcaloides, porém FOALC ( $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ ) não demonstrou toxicidade, reforçando a hipótese de que esta não seja causada somente pela presença de alcaloides. Nesse caso, não descartamos a possibilidade de que a maior concentração de alcaloides observada nas flores, quando comparada as folhas, possa ter contribuído para esse efeito. O ensaio fitoquímico preliminar indicou a presença de compostos saponinicos, portanto, a alta toxicidade gerada pela exposição do microcrustáceo as frações mais polares FOB ( $CL_{50} < 43,19 \mu\text{g/mL}$ ) e FOAQ ( $CL_{50} < 65,29 \mu\text{g/mL}$ ) pode estar relacionada a presença de saponinas nessas frações. Esse fato reforça a necessidade de um estudo fitoquímico aprofundado, com o objetivo de elucidação estrutural das substâncias presentes em FLC, FLALC, FOC, FOB e FOAQ.



Como perspectiva, tem-se que: *i* – as frações mais polares de folha (FOB) e (FOAQ) apresentam alta toxicidade e é possível que as saponinas sejam as responsáveis por esse efeito. *ii* – esse pressuposto está baseado na atividade antiviral de glicosídeos do ácido quinóico obtidos da espécie *G. angelica* (AQUINO et al., 1989). *iii* – é importante avaliar se, caso as saponinas sejam tóxicas a *A. salina*, se essa toxicidade se refere a alguma razão farmacológica ou simplesmente em virtude de suas propriedades tensoativas, o que geraria efeito de letalidade para o microcrustáceo devido a baixa disponibilidade de oxigênio.

### 5.8 TOXICIDADE PARA LARVAS DE *Aedes aegypti*

O teste de avaliação de atividade larvicida demonstra que a exposição de larvas de *Aedes aegypti* a FOH causou a mortalidade de larvas com uma  $CL_{50} < 135$   $\mu\text{g/mL}$ . As demais amostras testadas, nas concentrações de 250, 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ , não causaram mortalidade das larvas de *Aedes aegypti*, apresentando  $CL_{50} > 1000$   $\mu\text{g/mL}$  (TABELA 16).

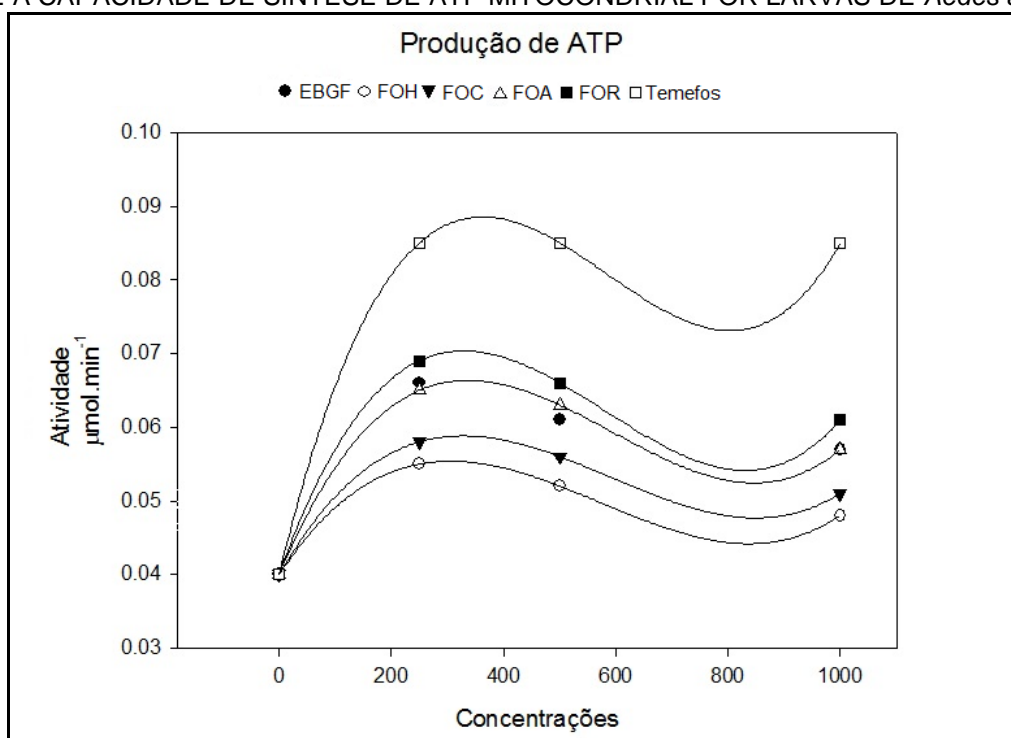
TABELA 16 - ATIVIDADE LARVICIDA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE *Guettarda uruguensis* FRENTE AO MOSQUITO *Aedes aegypti*.

Extrato/Fração	Letalidade para <i>Aedes aegypti</i>			
	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )/Mortalidade			$CL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
	250	500	1000	
EBGF	1	2,33	3	> 1000
FOH	8	9	10	< 135
FOC	2,33	2	0	> 1000
FOA	0	0	0	> 1000
FOR	0	0	0	> 1000
EBGFL	0	0	0	> 1000
FLH	0	0	0	> 1000
FLC	0	3,4	5	> 1000
FLA	3,4	2	0	> 1000
FLR	0	0	2,4	> 1000
FRH	5	0	0	> 1000
FRC	0,8	0	4,33	> 1000
FRA	0	0	1,7	> 1000
FRR	0	0	3,7	> 1000
Temefós	0	0	0	$\leq 60$

Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média em relação aos valores obtidos em triplicata. EBGF: extrato etanólico bruto folha; FOH: fração hexano folha; FOC: fração clorofórmio folha; FOA: fração acetato folha; FOR: fração remanescente folha; EBGFL: extrato etanólico bruto flor; FLH: fração hexano flor; FLC: fração clorofórmio flor; FLA: fração acetato de etila flor; FLR: fração remanescente flor; FRH: extrato hexano fruto; FRC: extrato clorofórmio fruto; FRA: extrato acetato de etila fruto; FRR: extrato metanólico remanescente fruto;  $CL_{50}$ : concentração letal média. FONTE: o autor (2017).

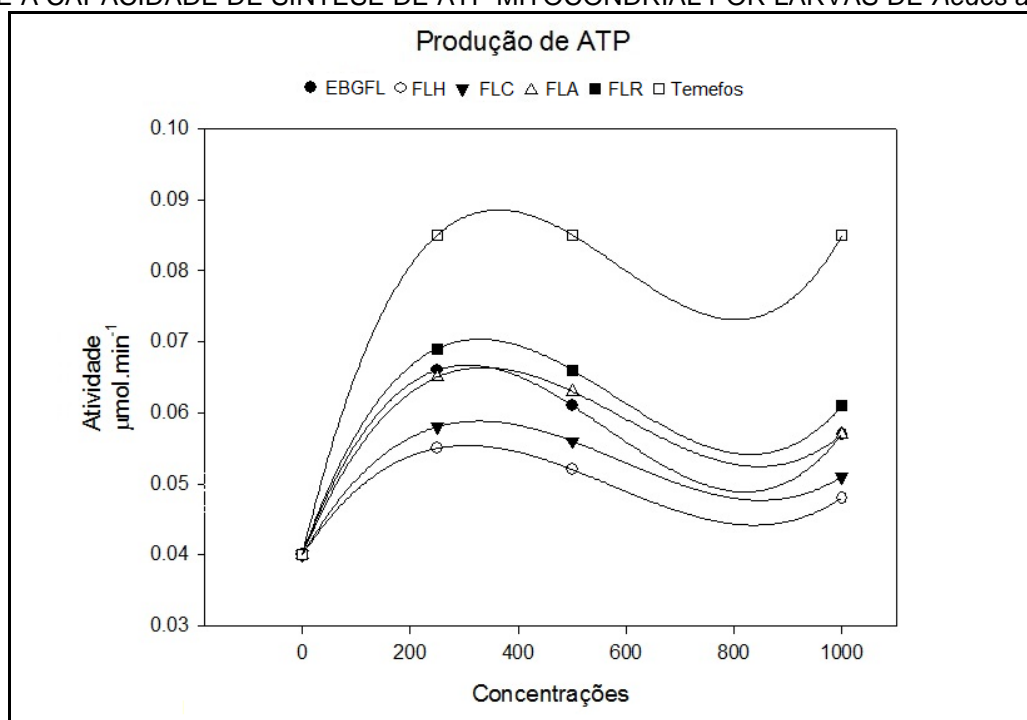
Com relação a produção de ATP mitocondrial, os resultados apresentados (FIGURA 58-60) demonstram que todos os extratos e concentrações foram capazes de causar alterações, quando comparados ao larvicida temefós. As frações FLH (0,038  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ), FLC (0,041  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ), EBGFL (0,044  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) e FOH (0,033  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ), FOC (0,037  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ), EBGF (0,042  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) foram eficientes em interferir na produção de ATP, em relação a fração acetato de etila e fração remanescente de folhas e flores (FIGURA 58 e FIGURA 59). No entanto a FRA dos frutos foi quem teve maior efeito na interrupção da produção de ATP, com produção de 0,032  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . O FRE e FRC apresentaram perfis similares ao observado para o extrato etanólico bruto e fração clorofórmio das flores e folhas (FIGURA 60).

FIGURA 58 - EFEITO DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA DE *Guettarda uruguensis* SOBRE A CAPACIDADE DE SÍNTESE DE ATP MITOCONDRIAL POR LARVAS DE *Aedes aegypti*.



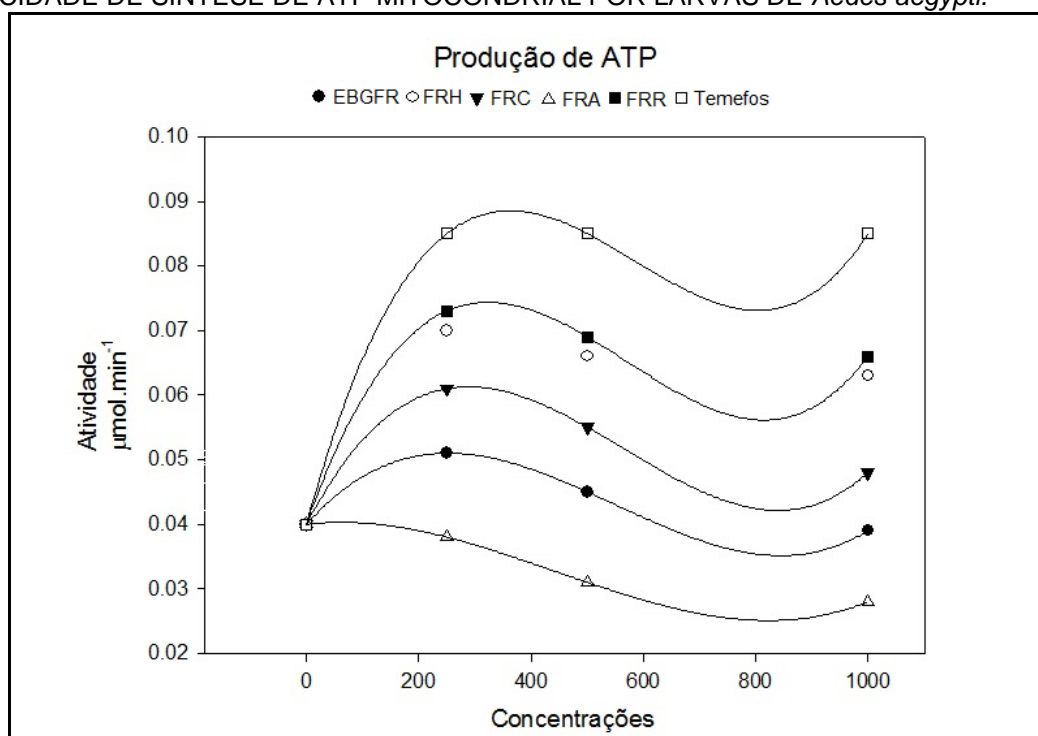
Legenda: EBGF- extrato etanólico folha; FOH – fração hexano folha; FOC – fração clorofórmio folha; FOA – fração acetato de etila folha; FOR – fração remanescente folha. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 59 - EFEITO DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FLOR DE *Guettarda uruguensis* SOBRE A CAPACIDADE DE SÍNTESE DE ATP MITOCONDRIAL POR LARVAS DE *Aedes aegypti*.



Legenda: EBGFL- extrato etanólico flor; FLH – fração hexano flor; FLC – fração clorofórmio flor; FLA – fração acetato de etila flor; FLR – fração remanescente flor. FONTE: o autor (2017).

FIGURA 60 - EFEITO DE EXTRATOS OBTIDOS DE FRUTO DE *Guettarda uruguensis* SOBRE A CAPACIDADE DE SÍNTESE DE ATP MITOCONDRIAL POR LARVAS DE *Aedes aegypti*.



Legenda: FRH- extrato hexano fruto; FRC – extrato clorofórmio fruto; FRA – extrato acetato de etila fruto; FRR – extrato metanólico remanescente fruto. FONTE: o autor (2017).

A produção de ATP mitocondrial é determinada pela sua eficiência bioenergética (definida como o ATP produzido nas mitocôndrias por molécula de nutriente) e a sua capacidade de síntese de ATP (definida como a taxa de ATP produzida nas mitocôndrias por unidade de tempo), ambas reguladas pelo sistema celular de procura e oferta de energia. Assumindo que o desenvolvimento da larva é crucial para o sucesso na fase adulta, bem como a reprodução e dispersão, evidencia-se que a FH, FCL e EEB (flores e folhas), EEB, FCL e FAE (frutos) podem contribuir para que as larvas não cheguem a fase final de desenvolvimento, tendo em vista que as baixas taxas de ATP podem influenciar no desenvolvimento da larva a mosquito (SUAREZ et al., 2000) O desenvolvimento de estruturas como os músculo do vôo estão condicionados à capacidade respiratória acoplado à síntese de ATP. A este respeito, pode-se especular que a eficiência e capacidade de produção de ATP mitocondrial podem contribuir para futuras alterações no mosquito (RAUHAMÄKI et al., 2014).

Embora apenas a fração hexano das folhas tenha demonstrado potencial larvicida com relação a mortalidade das larvas, o perfil das demais frações e extratos devem ser investigados quanto ao seu potencial como larvicida fisiológico, uma vez que interferem na produção de ATP das larvas de *A. aegypti*.

Ainda com relação a atividade larvicida, outras espécies de *Guettarda* foram avaliadas frente ao mosquito do *Aedes aegypti*. Oliveria et al. (2010) demonstra toxicidade para o 4º estágio de desenvolvimento de *A. aegypti* em diversos extratos de *Guettarda grazielae*; semente: extrato bruto ( $CL_{50} = 178,8 \mu\text{g/mL}$ ), fração clorofórmio ( $CL_{50} = 94,0 \mu\text{g/mL}$ ) e acetato de etila ( $CL_{50} = 51,6 \mu\text{g/mL}$ ); casca do caule: fração clorofórmio ( $CL_{50} = 153,6 \mu\text{g/mL}$ ) e acetato de etila ( $CL_{50} = 223,8 \mu\text{g/mL}$ ); folha: fração hexano ( $CL_{50} = 131,7 \mu\text{g/mL}$ ). Segundo Lima (2008) a avaliação das frações em hexano e em acetato de etila, oriundas dos extratos em etanol das folhas e do caule de *Guettarda grazielae* M.R.V Barbosa apresentam  $CL_{50}$  131,73 ppm e  $CL_{50}$  58,18 ppm, respectivamente.

## 5.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras demonstrou atividade antimicrobiana exclusivamente frente as bactérias gram positivas. No presente trabalho, adotou-se o critério descrito por Holetz et al. (2002), preconizando boa atividade antimicrobiana (CIM $\leq$ 100  $\mu$ g/mL), moderada atividade (CIM 100-500  $\mu$ g/mL), fraca atividade (CIM 500-1000  $\mu$ g/mL) e inatividade (CIM $>$ 1000  $\mu$ g/mL).

As amostras FOH (0,25 mg/mL), EBGF (0,5 mg/mL), FOR (0,5 mg/mL), FLA (0,5 mg/mL), FLR (0,5 mg/mL) e FRR (0,5 mg/mL) demonstraram atividade antibacteriana frente a *Enterococcus faecalis*. As amostras FOA (0,5 mg/mL) e FOR (0,1 mg/mL) demonstraram atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. Por meio do ensaio de atividade antimicrobiana observa-se que o menor valor de CIM obtido refere-se a FOR (0,1 mg/mL) frente a *S. aureus*. Segundo Holetz et al. (2002) e Ríos e Recio (2005) valores de CIM inferiores a 0,1 mg/mL obtidos para extratos e frações são extremamente interessantes do ponto de vista da prospecção de novos agentes antimicrobianos com origem em produtos naturais, como no caso de plantas medicinais.

Para os demais microorganismos utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana, os extratos e respectivas frações demonstram valores correspondentes a baixa atividade (CIM=1,0 mg/mL) e inatividade (CIM $>$ 1,0 mg/mL). Os microorganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans* foram resistentes as amostras avaliadas. Os valores de concentração inibitória mínima obtidos para os extratos e frações obtidos de folha, flor e fruto da espécie *G. uruguensis* estão expressos na TABELA 17.

Com relação a atividade antimicrobiana da espécie *G. uruguensis* é valido descrever que já existiam estudos anteriores, porém utilizando as cascas do caule para obtenção de extrato vegetal. Kelmer et al., 2011 demonstra que o extrato bruto CIM 500  $\mu$ g/mL frente a bactéria *S. aureus* e fração clorofórmica com CIM 125  $\mu$ g/mL frente a *S. aureus*. O melhor desempenho da fração clorofórmica foi atribuído a presença do ácido ursólico como componente. Segundo Duarte (2012) o extrato bruto e frações de casca do caule de *G. uruguensis* demonstraram atividade antimicrobiana frente a *S. epidermidis* e *C. albicans*. A fração hidroalcoólica remanescente apresentou concentração inibitória mínima de 100  $\mu$ g/mL frente a *S. epidermidis*. Com excessão da fração acetato de etila, que apresentou inatividade

frente a *P. aeruginosa*, todas as demais amostras avaliadas demonstraram moderada atividade antibacteriana. A existência de alguns pontos que diferem entre a CIM observada entre os estudos pode estar relacionada ao fato da biossíntese de compostos secundários sofrer interferência de fatores ambientais, como sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento. Entre esses destaca-se a época de coleta, uma vez que a quantidade e até mesmo a natureza dos constituintes químicos não é constante durante o ano. Outra explicação inclui as diferenças entre os órgãos vegetais e as características do processo de extração (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

TABELA 17 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS E FRAÇÕES OBTIDOS DE FOLHA, FLOR E FRUTO DE *Guettarda uruguensis* CHAM. & SCHLTDL., RUBIACEAE.

Extratos/ Frações	Microrganismo/CIM (mg/mL)					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
EBGF	1,0	0,5	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0
FOH	1,0	0,25	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0
FOC	1,0	1,0	>1,0	1,0	>1,0	>1,0
FOA	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
FOB	1,0	>1,0	1,0	1,0	>1,0	>1,0
FOR	0,1	0,5	1,0	1,0	>1,0	>1,0
EBGFL	>1,0	1,0	1,0	>1,0	>1,0	>1,0
FLH	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0
FLC	1,0	1,0	1,0	1,0	>1,0	>1,0
FLA	1,0	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
FLB	>1,0	1,0	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0
FLR	>1,0	0,5	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0
FRH	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0
FRC	>1,0	1,0	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0
FRA	>1,0	>1,0	1,0	>1,0	>1,0	>1,0
FRR	>1,0	0,5	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0

Legenda: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603); *Candida albicans* (ATCC 10231); EBGF: extrato etanólico bruto folha; FOH: fração hexano folha; FOC: fração clorofórmio folha; FOA: fração acetato folha; FOB: fração butanol folha; FOR: fração remanescente folha; EBGFL: extrato etanólico bruto flor; FLH: fração hexano flor; FLC: fração clorofórmio flor; FLA: fração acetato de etila flor; FLB: fração butanol flor; FLR: fração remanescente flor; FRH: extrato hexano fruto; FRC: extrato clorofórmio fruto; FRA: extrato acetato de etila fruto; FRR: extrato metanólico remanescente fruto. FONTE: o autor (2017).

## 5.10 ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

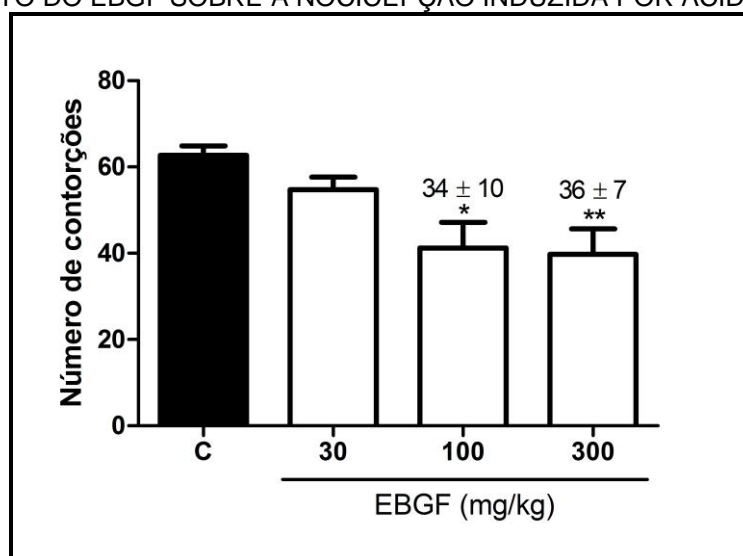
A avaliação dos efeitos farmacológicos da espécie *Guettarda uruguensis* foi realizada com o extrato etanólico bruto obtido de folhas (EBGF). Ainda, de forma complementar, avaliou-se o efeito de proteção gástrica do extrato aquoso obtido de folhas de *Guettarda uruguensis* (FOAQ).

O critério de eleição utilizado para submeter o EBGF a investigação farmacológica de nocicepção, inflamação, proteção gástrica, motilidade gastrointestinal e toxicidade justifica-se a partir de duas premissas: *i*) a primeira referente aos resultados demonstrados por esse extrato no presente estudo com relação a atividade antioxidante, perfil químico e atividades biológicas *in vitro*; *ii*) possibilidade de correlação observada entre a atividade biológica demonstrado para a espécie *G. uruguensis* no presente estudo versus indicações de uso popular de outras espécies do mesmo gênero. Portanto, o extrato etanólico bruto obtido de folha da espécie *G. uruguensis* (EBGF) foi avaliado com relação a possíveis atividades farmacológicas por meio dos modelos de nocicepção induzida por formalina, nocicepção induzida por ácido acético, edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, peritonite induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina, lesão gástrica induzida por etanol, motilidade gastrointestinal, avaliação toxicológica e comportamental.

### 5.10.1 Nocicepção induzida por ácido acético

O EBGF nas doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg reduziu as contorções abdominais causadas pela administração intraperitoneal de ácido acético 0,6% causando respectivamente reduções médias de  $34 \pm 10\%$  e  $36 \pm 7\%$  (FIGURA 61).

FIGURA 61 - EFEITO DO EBGF SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO.

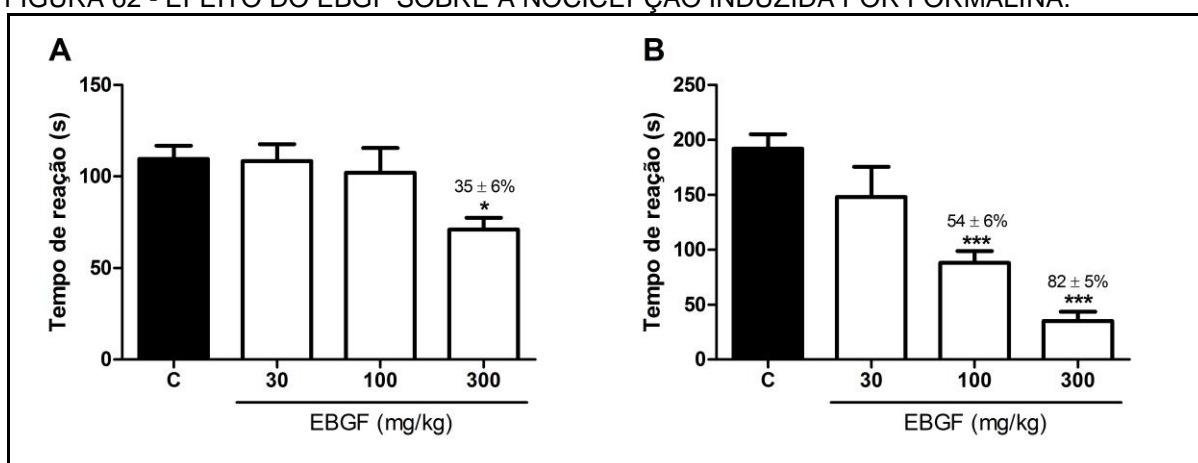


Nota: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por \*\*p<0,05 quando comparados com o grupo controle. Os números acima das colunas representam a inibição verificada.). FONTE: o autor (2017).

#### 5.10.2 Nocicepção induzida por formalina

O EBGF na dose de 300 mg/kg reduziu a fase neurogênica (0-5 minutos) e inflamatória (15–30 minutos) da nocicepção induzida por formalina causando respectivamente reduções médias de 35 $\pm$ 6% (FIGURA 62A) e 82  $\pm$  5% (FIGURA 62B). O EBGF na dose de 100 mg/kg reduziu a fase inflamatória, com 54  $\pm$  6%.

FIGURA 62 - EFEITO DO EBGF SOBRE A NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA.



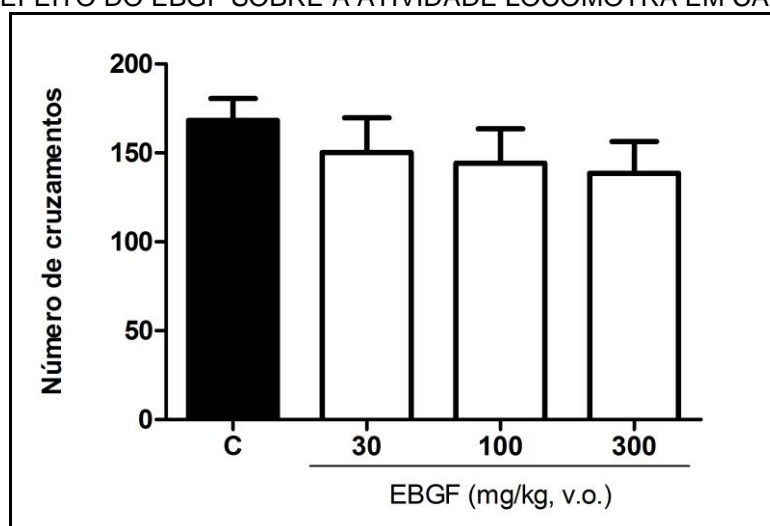
Legenda: A nocicepção foi avaliada na fase neurogênica (0-5 min, painel A) e inflamatória (15-30 min, painel B). Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por \*\*\*p<0,001, \*p<0,05 quando comparados com o grupo controle. Os números acima das colunas representam a inibição verificada. EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G.uruguensis*. C: grupo controle (salina, 10 mL/kg). FONTE: o autor (2017).



### 5.10.3 Avaliação da atividade locomotora

O teste de campo aberto realizado com os animais tratados com o EBGF nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg demonstrou que não houve diferença estatística entre o número de cruzamentos médios do grupo controle ( $184,4 \pm 19,6$ ) e dos grupos tratados, conforme FIGURA 63. Portanto, o EBGF nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg não causou alterações na atividade locomotora dos animais, indicando que os resultados demonstrados nos testes de formalina e ácido acético não são efeitos inespecíficos por diminuição da capacidade motora.

FIGURA 63 - EFEITO DO EBGF SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMPO ABERTO.



Nota: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n=6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. FONTE: o autor (2017).

### 5.10.4 Atividade anti-inflamatória do EBGF

O gênero *Guettarda* é utilizado popularmente para o tratamento de afecções clínicas de origem inflamatória. O EBGF foi avaliado com relação ao seu potencial anti-inflamatório por meio dos modelos farmacológicos de edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina e peritonite induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina.

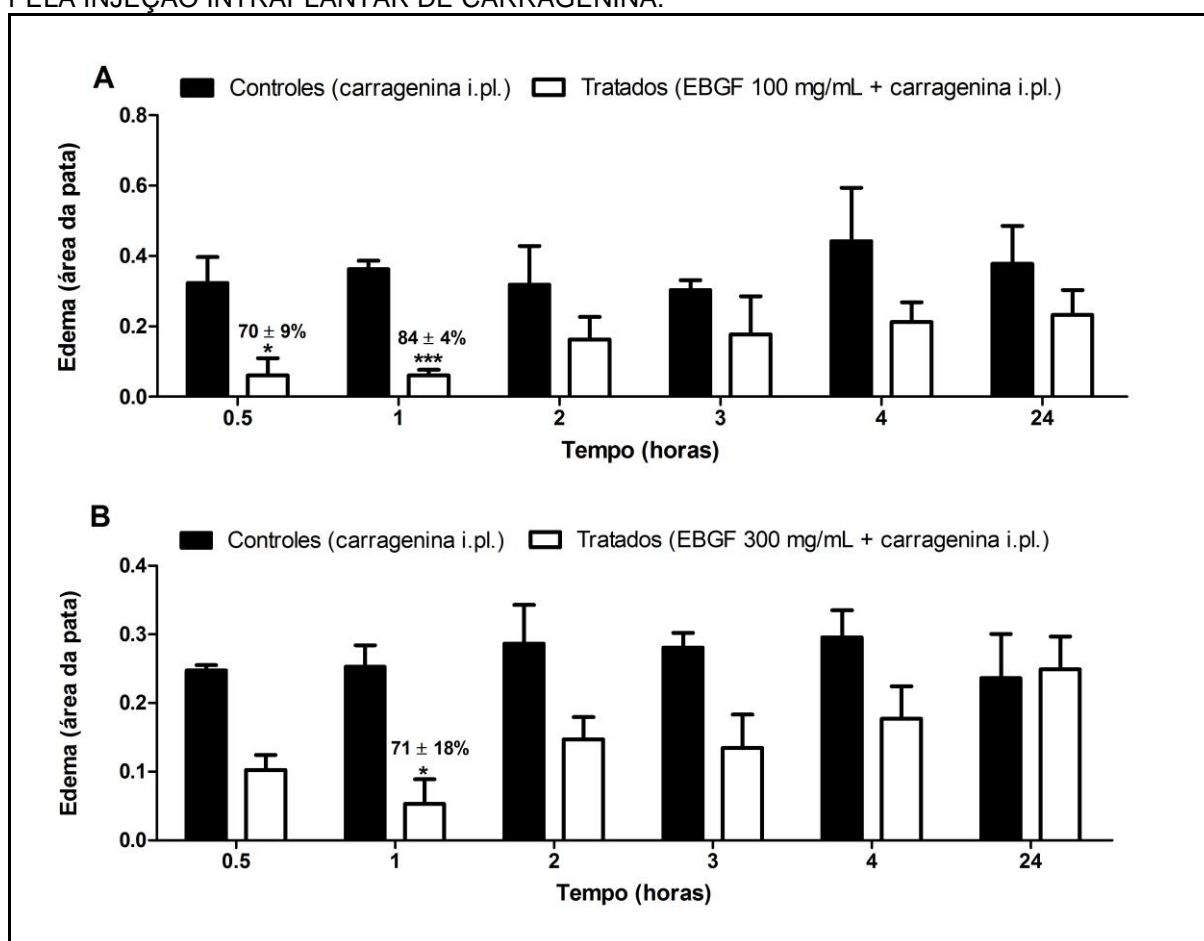
#### 5.10.4.1 Edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina

No grupo de animais tratados com veículo (10 mL/kg, v.o., grupo controle) a injeção intraplantar de carragenina (400  $\mu$ g/pata) promoveu a formação de um

edema progressivo, que em 240 minutos após a injeção do agente flogístico foi de  $0,44 \pm 0,22 \text{ cm}^2$ .

O EBGF (100 e 300 mg/kg) foi capaz de reduzir o edema de pata causado pela administração intraplantar de carragenina. O EBGF na dose de 100 mg/kg promoveu diminuição do edema nos tempos de 30 e 60 minutos com inibições médias de  $70 \pm 9\%$  e  $84 \pm 4\%$ , respectivamente (FIGURA 64). O EBGF na dose de 300 mg/kg reduziu a formação do edema no tempo de 60 minutos em  $71 \pm 18\%$ .

FIGURA 64 - EFEITO ANTIEDEMATOGÊNICO DO EBGF SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE CARRAGENINA.

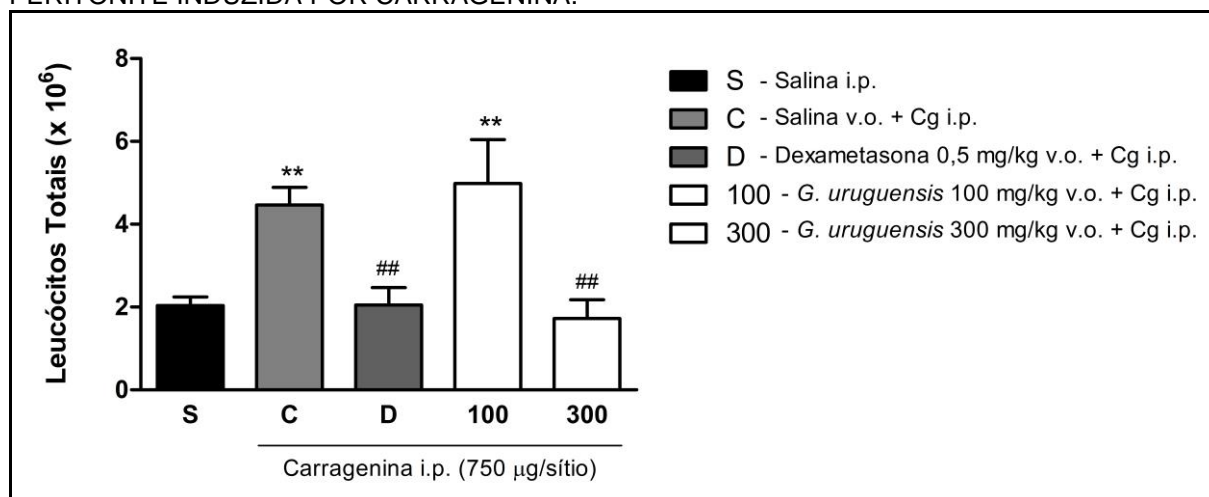


Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n=6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Os níveis de significância são indicados por \* $p<0,05$  ou \*\*\* $p<0,001$  quando comparados com o grupo controle. Os números acima das colunas representam a inibição verificada. EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G.uruguensis*; C: grupo controle (salina, 10 mL/kg). FONTE: o autor (2017).

#### 5.10.4.2 Peritonite induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina

A administração intraperitoneal de carragenina causou um aumento da permeabilidade vascular dos vasos capilares caracterizada pelo acréscimo da migração de leucócitos para  $4,46 \times 10^6$  células/mL na cavidade peritoneal (FIGURA 65). O influxo leucocitário apresentado pelo grupo tratado com dexametasona apresentou em média  $2,05 \pm 0,83 \times 10^6$  células/mL e o grupo naive  $2,04 \pm 0,45 \times 10^6$  células/mL. Observou-se uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da inflamação, caracterizada pela redução de  $61 \pm 10\%$  no número de leucócitos totais do exsudato peritoneal dos animais tratados com EBGf na dose de 300 mg/kg quando comparado ao grupo controle carragenina. O mesmo efeito não foi observado para o grupo de animais tratados com EBGf na dose de 100 mg/kg. O pré-tratamento dos animais com dexametasona inibiu significativamente em  $54 \pm 9\%$  a resposta inflamatória induzida pela carragenina, reduzindo a migração leucocitária de maneira similar ao efeito encontrado para o grupo EBGf 300 mg/kg.

FIGURA 65 - EFEITO DO EBGf SOBRE A MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS TOTAIS NO MODELO DE PERITONITE INDUZIDA POR CARRAGENINA.



Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias ( $n=6-8$ ). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por \*\* $p < 0,01$  quando comparados com o grupo salina ou ## quando comparados com o grupo controle. Os números acima das colunas representam a inibição verificada. FONTE: o autor (2017).

#### 5.10.5 Considerações sobre o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do EBGf

O conjunto de dados experimentais obtidos por meio dos modelos de nocicepção e inflamação demonstram que o EBGf possui ação analgésica e anti-

inflamatória. A administração do EBGF produziu efeito analgésico em camundongos submetidos aos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético e nocicepção induzida por formalina.

O teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é descrito como sendo um modelo clássico de dor visceral de origem inflamatória. É aplicado como uma ferramenta de triagem para avaliar o potencial de novos compostos com atividade analgésica e anti-inflamatória. Em camundongos, a administração intraperitoneal de ácido acético provoca irritação da membrana serosa, originando um comportamento reflexo e estereotipado, que evidencia a presença de dor visceral. Esse comportamento estereotipado é caracterizado por contorções abdominais e redução da atividade motora (LE BARS, 2001). Por meio da realização do teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, observou-se que a administração via oral do EBGF foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais. O modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético apresenta boa sensibilidade e pouca especificidade. Portanto, o EBGF também foi avaliado em outro modelo a fim de confirmar seu potencial antinociceptivo.

A resposta nociceptiva do modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina é bifásica, permitindo induzir e avaliar duas fases da dor, a fase neurogênica e a inflamatória. Esse teste produz no animal um comportamento característico, que consiste em lamben e/ou morder a pata injetada. A nocicepção neurogênica (primeira fase; 0–5 min), é originada pela estimulação direta nociceptores. Na fase inflamatória (segunda fase; 15-60 min), a nocicepção é decorrente de uma resposta inflamatória e da sensibilização central no corno dorsal da medula espinhal. Compostos que agem primariamente no sistema nervoso central, inibem a resposta nociceptiva da fase neurogênica e inflamatória, enquanto que compostos que agem primariamente na periferia inibem somente a fase inflamatória (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJOLSEN et al., 1992; LE BARS, 2001). Nesse sentido, o tempo de reação, traduzido pelo comportamento de lamben e/ou morder a pata injetada com formalina foi reduzido pela administração do EBGF, inibindo tanto a fase neurogênica quanto a inflamatória, sendo essa última de modo mais pronunciado.

Com relação a atividade locomotora, o resultado obtido por meio do modelo de campo aberto demonstrou que o EBGF não interferiu sobre a atividade locomotora. Esse fato confirma que o efeito analgésico verificado anteriormente para

o EBGF por meio do modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e injeção intraplantar de formalina não tem relação com efeitos motores inespecíficos.

Observado que a administração do EBGF demonstrou expressiva redução da nocicepção nos dois modelos experimentais utilizados, ácido acético e formalina, sendo que no segundo modelo o EBGF demonstrou efeito de forma mais pronunciada na fase inflamatória, investigou-se a atividade anti-inflamatória do EBGF por meio dos modelos de edema de pata e peritonite, ambos induzidos pela carragenina.

A resposta inflamatória no modelo de edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina foi introduzido por WINTER et al. (1962) e adaptado para camundongos por LEVY (1969). É um modelo de inflamação utilizado para a triagem de compostos com potencial anti-inflamatório (VINEGAR et al., 1969). Em camundongos, esse modelo é caracterizado por uma resposta bifásica, constituída por uma fase aguda (resposta inflamatória precoce), com duração de seis horas, seguida de uma resposta tardia que inicia em 24 horas, tem seu ápice em 72 horas, e declínio a partir de 96 horas após a aplicação da carragenina (SUGISHITA et al., 1981; HENRIQUES et al., 1987; POSADAS et al., 2004). O agente flogístico utilizado nesse modelo é a carragenina, um colóide obtido de algas da classe Rhodophyceae. A administração intraplantar de carragenina promove vasodilatação, extravasamento plasmático e migração celular na área inflamada (HENRIQUES et al., 1987; ARYA e KUMARS, 2005). Por meio da realização do teste de edema de pata induzida pela injeção intraplantar de carragenina, observou-se que a administração via oral do EBGF foi capaz de reduzir o edema, em especial após a primeira hora da aplicação do agente flogístico.

A resposta inflamatória de camundongos tratados com o EBGF também foi avaliada no modelo de peritonite induzida por carragenina. Nesse modelo verificou-se que o tratamento com o EBGF reduziu a migração de leucócitos após 4 horas da administração da carragenina.

Como visto anteriormente no capítulo de revisão de literatura, diversas plantas são apontadas pela população para o tratamento de afecções clínicas que são, no caso de espécies do gênero *Guettarda*, em maior parte, resultantes de um desequilíbrio fisiológico gerado por um quadro inflamatório. Dessa forma, os resultados obtidos até o momento, de forma preliminar para o EBGF, estão de

acordo com os descritos em literatura para outras espécies do gênero, os quais demonstraram que *Guettarda viburnoides* (NARESSI et al., 2015) e *Guettarda platypoda* (PINA et al., 2012) possuem ação anti-inflamatória. Pina e colaboradores (2012) investigaram a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico das raízes de *Guettarda platypoda* 50 mg/kg (67%), 100 mg/kg (53,5%), 150 mg/kg (66,5%) e 200 mg/kg (35,6%) por meio do modelo de peritonite induzida por carragenina, demonstrando redução da migração de leucócitos polimorfonucleares estatisticamente semelhante ao padrão indometacina (51,8%). Naressi e colaboradores (2015) avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico (77,6%) e frações clorofórmio (99,0%), acetato de etila (61,0%) e hidroalcoólica (67,0%) obtidos de *Guettarda viburnoides* nas doses de 2,5–5 mg por meio do teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton e avaliação da enzima mieloperoxidase, onde verificou-se a atividade antioxidante das amostras também pela inibição da atividade enzimática das mesmas amostras. Testa e colaboradores (2012) investigaram a atividade anti-inflamatória de *Guettarda pohliana*, demonstrada pela inibição do edema de orelha induzido por óleo de cróton após a administração de 2,5 mg, por via tópica, do extrato bruto obtido de folha (65%), e respectivas frações hexano (68%), clorofórmio (38%), acetato de etila (55%) e hidrometanólica (46%). O extrato bruto obtido de raiz (46%), frações acetato de etila (43%) e hidrometanólica (22%) inibiram o edema de orelha com a administração da mesma dosagem (2,5 mg).

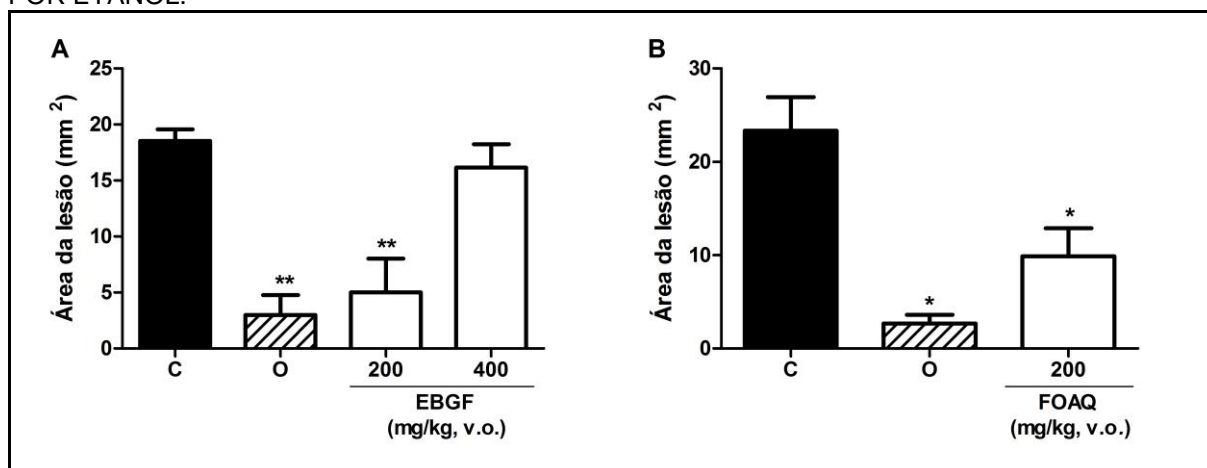
#### 5.11 GASTROPROTEÇÃO E MOTILIDADE GASTROINTESTINAL

No modelo de lesão gástrica induzida por etanol, o pré-tratamento dos camundongos com omeprazol (40 mg/kg) foi capaz de prevenir a formação da lesão gástrica em  $84 \pm 10\%$  ( $2,98 \pm 1,79 \text{ mm}^2$ ) quando comparado com o grupo controle (salina, 10 mL/kg) ( $18,54 \pm 1,03 \text{ mm}^2$ ). O pré-tratamento durante 7 dias com EBGF na dose de 200 mg/kg preveniu a formação da lesão gástrica induzida pelo etanol em  $73 \pm 16\%$  ( $5,00 \pm 3,02 \text{ mm}^2$ ). A administração de EBGF (400 mg/kg) não protegeu a mucosa gástrica (Figura 66A).

O pré-tratamento durante 7 dias com FOAQ na dose de 200 mg/kg preveniu a redução das lesões gástricas induzidas por etanol em  $58 \pm 13\%$  ( $9,89 \pm 3,0 \text{ mm}^2$ ). A administração de omeprazol (40 mg/kg) foi capaz de prevenir a formação da lesão

gástrica em  $89 \pm 4\%$  ( $2,67 \pm 0,92 \text{ mm}^2$ ) quando comparado com o grupo controle (salina, 10 mL/kg) ( $23,34 \pm 3,59 \text{ mm}^2$ ) (Figura 66B).

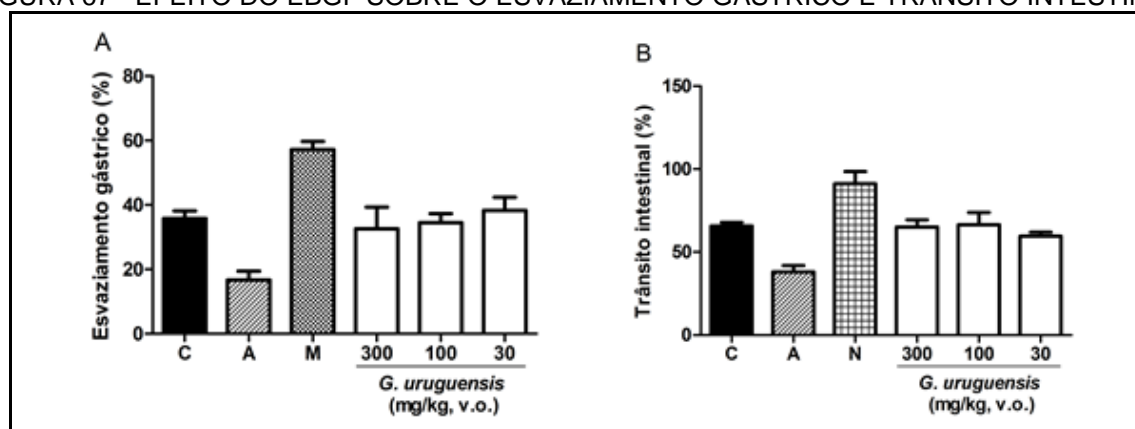
FIGURA 66 - EFEITO PROTETOR DO EBGF E FOAQ CONTRA LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL.



Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n=6-8). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Os níveis de significância são indicados por \*\*p<0,05 e \*\*\*p<0,01 (Painel A); \*p<0,05 e \*\*p<0,01 (Painel B) quando comparados com o grupo controle. Os números acima das colunas representam a inibição verificada. A: efeito de proteção gástrica do EBGF; B: efeito de proteção gástrica do EAQGF; EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G. uruguensis*; EAQF: extrato aquoso obtido de folha de *G. uruguensis*; C: grupo controle (salina, 10 mL/kg); O: omeprazol (40 mg/kg). FONTE: o autor (2017).

A administração do EBGF, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, não modificou o trânsito intestinal e o esvaziamento gástrico, quando comparado aos grupos controle (salina, 10 mL/kg) bem como, quando comparado a atropina (3 mg/kg), ou metoclopramida (30 mg/kg) (FIGURA 67).

FIGURA 67 - EFEITO DO EBGF SOBRE O ESVAZIAMENTO GÁSTRICO E TRÂNSITO INTESTINAL



Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n=6-8). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. A: esvaziamento gástrico; B: trânsito intestinal; EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G. uruguensis*; C: grupo controle (salina, 10 mL/kg, v.o.); A: atropina (3 mg/kg, s.c.); M: metoclopramida (30 mg/kg, v.o.); N: neostigmina (20 mg/kg, s.c.). FONTE: o autor (2017).

O gênero *Guettarda* apresenta diversas descrições de uso etnofarmacológico, dentre elas se encontram ações diurética e no tratamento de úlcera. No entanto, algumas destas indicações de uso popular não apresentam estudos científicos comprobatórios. Por esta razão um dos objetivos do presente estudo foi avaliar a atividade de proteção gástrica e a motilidade gastrointestinal da espécie *Guettarda uruguensis*.

Para estudar a ação de proteção gástrica do EBGF e FOAQ utilizamos o modelo de lesão gástrica induzido por etanol. Nesse modelo é possível avaliar se o extrato estimula e/ou mantém a resistência da mucosa gástrica frente a agentes exógenos. As lesões hemorrágicas provocadas por um agente exógeno, nesse caso o etanol, ocorrem pelos danos oxidativos em células do epitélio gástrico, produzindo congestão, inflamação e lesão tecidual. Ou seja, o etanol é capaz de causar lesões na mucosa gástrica porque ocorre uma redução nos fatores de proteção. A administração de FOAQ e EBGF foi eficaz em proteger a mucosa gástrica contra as lesões induzidas pelo etanol.

Com o intuito de avaliar a participação da via colinérgica no mecanismo de ação gastroprotetor dos extratos da *Guettarda* determinamos a taxa de trânsito intestinal e o esvaziamento gástrico. Neste modelo, a taxa de esvaziamento gástrico está relacionada ao mecanismo neurohumoral, que depende de uma inervação vagal intacta. Com isso, os neurônios mioentéricos da parede gástrica sofrem a ação de vários neurotransmissores, dentre eles a acetilcolina. Os neurônios excitatórios contêm acetilcolina e/ou substância P, os quais se projetam diretamente para a camada de músculo circular, promovendo a contração. A acetilcolina é a principal responsável pela regulação da motilidade intestinal, atuando através dos receptores muscarínicos M1 e M3 (HANSEN, 2003). O EBGF não exerceu influência sobre a motilidade gastrointestinal. Observado que o EBGF não alterou a taxa de esvaziamento gástrico e de trânsito intestinal, sugerimos que a via colinérgica não tem participação importante no mecanismo de ação gastroprotetor deste extrato nestas doses testadas.

## 5.12 ESTUDO TOXICOLÓGICO IN VIVO

De acordo com os princípios da toxicologia, toda substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, via de



administração, tempo de uso e sua frequência. Portanto, uma substância que tenha como finalidade aplicação terapêutica, deve ser analisada com relação a seus parâmetros toxicológicos, com o objetivo de garantir de que seu uso não cause eventos adversos ao organismo (VAZ et al.,1997).

A avaliação dos animais submetidos a administração do EBGF foi realizada utilizando um esquema posológico de dose diária durante 21 dias consecutivos. A avaliação de toxicidade se baseou na observação de parâmetros hematológicos, bioquímicos, histopatológicos e ainda de forma complementar, o monitoramento do efeito da administração aguda e prolongada do EBGF nas doses de 300 mg/kg e 1000 mg/kg sobre parâmetros comportamentais dos animais submetidos a avaliação toxicológica.

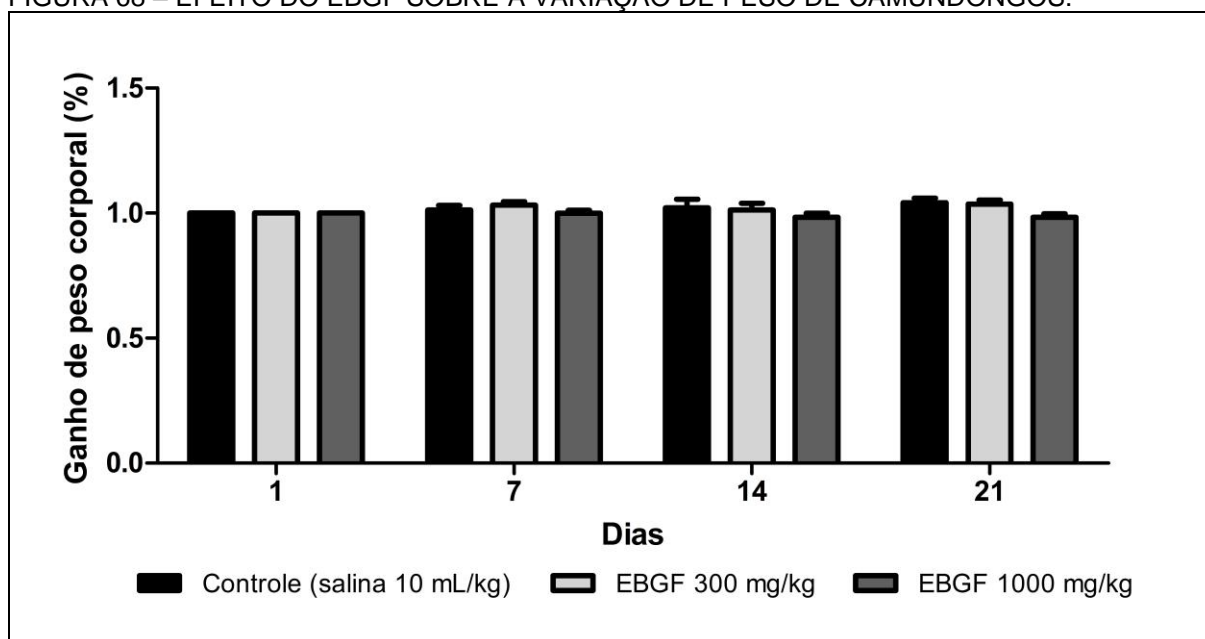
#### 5.12.1 Sinais Clínicos

A administração do EBGF nas doses de 300 mg/kg e 1000 mg/kg, durante o período de 21 dias, não resultou em morte dos animais dos grupos tratados nem tampouco dos animais do grupo veículo (10 mL/kg, grupo controle). Durante o período de 21 dias os animais foram observados diariamente, sendo excluído qualquer indicativo de possível sinal de toxicidade, como por exemplo, contorções abdominais, piloereção, queda da pelagem, cianose, hipnose, sedação, movimentos anômalos e agressividade.

#### 5.12.2 Ganho ponderal e peso relativo dos órgãos

A administração do EBGF 300 mg/kg e 1000 mg/kg não afetou a massa corporal dos camundongos tratados quando comparados com os animais do grupo controle (salina, 10 mL/kg) submetidos ao mesmo esquema posológico, conforme FIGURA 68.

FIGURA 68 – EFEITO DO EBGF SOBRE A VARIAÇÃO DE PESO DE CAMUNDONGOS.

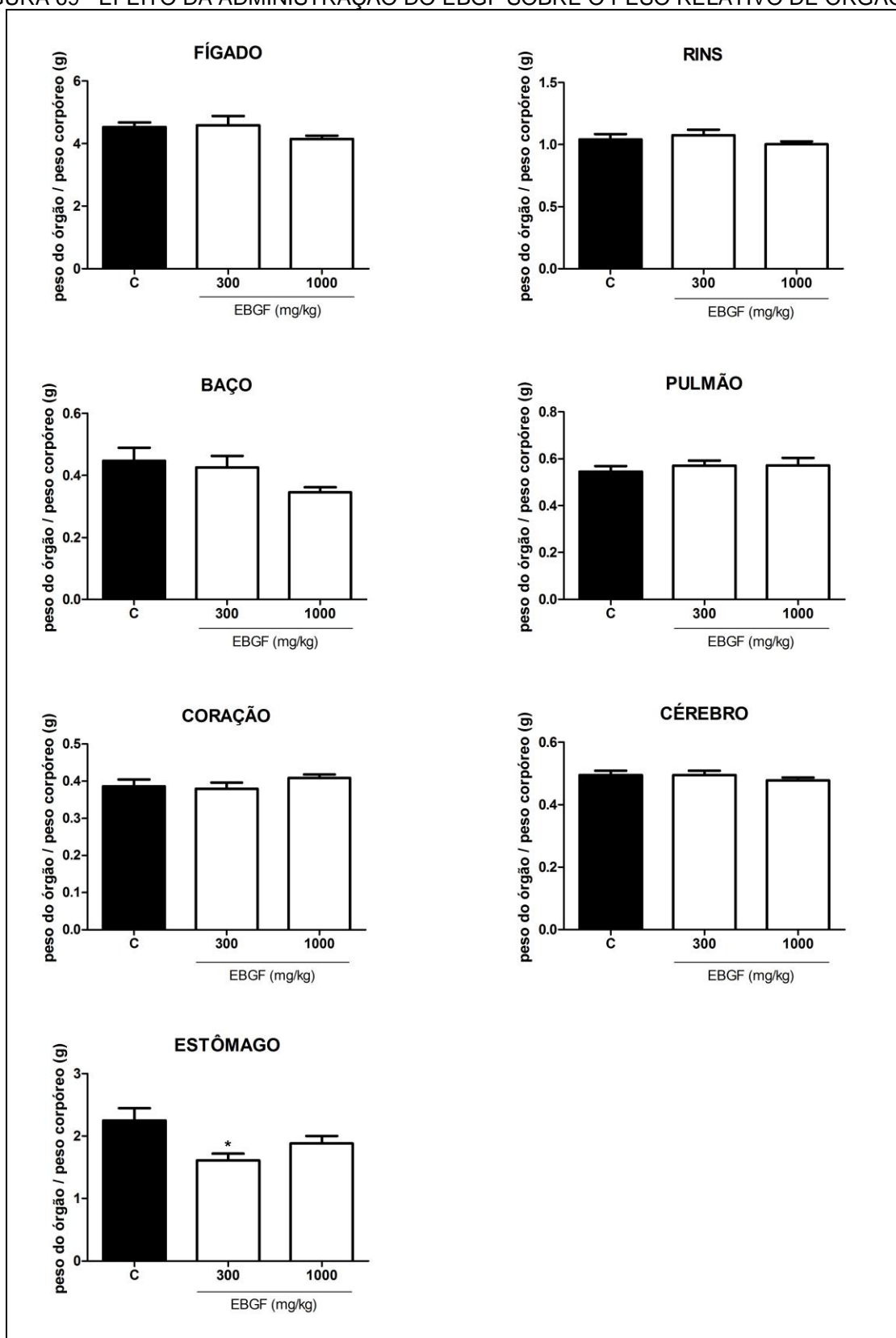


Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G. uruguensis*. FONTE: o autor (2017).

Após o período de tratamento os órgãos (fígado, rim, coração, pulmão, coração e cérebro) dos animais foram removidos, pesados e submetidos a avaliação macroscópica de tamanho e coloração e pesados.

A administração do EBGF 300 mg/kg e 1000 mg/kg não produziu alterações macroscópicas e não afetou o peso relativo dos órgãos dos camundongos tratados quando comparados com os animais que receberam salina (10 mL/kg, grupo controle) no mesmo esquema posológico (FIGURA 69). Entretanto, observamos que o grupo de animais tratados com EBGF 300 mg/kg apresentou peso relativo de estômago ( $1,60 \pm 0,24\%$ ) significativamente ( $p < 0,05$ ) menor em relação ao peso relativo de estômago dos animais do grupo controle ( $0,53 \pm 0,1\%$ ).

FIGURA 69 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE O PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS



Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (n=6-8). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Os níveis de significância são indicados por \* $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle. EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G. uruguensis*; C: grupo controle (salina, 10 mL/kg, v.o.). FONTE: o autor (2017).

### 5.12.3 Determinação dos parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos avaliados foram série eritrocitária, série leucocitária e plaquetas. Os resultados estão demonstrados na TABELA 19.

A administração do EBGf (300 e 1000 mg/kg) não alterou os parâmetros hematológicos dos camundongos, quando comparados com os parâmetros dos animais que receberam salina (10 mL/kg, grupo controle). Porém, observa-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de neutrófilos segmentados no grupo tratado com o EBGf 300 mg/kg. Observa-se que o aumento de neutrófilos segmentados não refletiu no número de leucócitos totais, portanto não foi característico de infecção bacteriana. Observado que esse evento não ocorreu para o grupo de animais tratados com o EEBF 1000 mg/kg, considerou-se o aumento de neutrófilos segmentados como um achado laboratorial, sem atribuição de parâmetro de toxicidade.

TABELA 18 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGf SOBRE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.

Parâmetro	Amostras		
	Controle	EBGf	
		300 mg/mL	1000 mg/mL
Hemácias ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	8,76 $\pm$ 1,30	8,64 $\pm$ 0,87	8,52 $\pm$ 0,68
Hemoglobina (g/dL)	14,43 $\pm$ 1,81	14,5 $\pm$ 1,56	13,43 $\pm$ 1,03
Hematócrito (%)	43,33 $\pm$ 7,03	42,3 $\pm$ 6,40	40,03 $\pm$ 2,67
MCV	49,33 $\pm$ 2,80	48,83 $\pm$ 3,31	45,47 $\pm$ 3,33
MCH	16,66 $\pm$ 0,83	16,81 $\pm$ 0,53	15,71 $\pm$ 0,18
MCHC	33,75 $\pm$ 1,88	34,53 $\pm$ 1,72	33,43 $\pm$ 0,55
RDW	12,68 $\pm$ 1,20	12,93 $\pm$ 1,71	13,38 $\pm$ 0,31
Leucócitos ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	3,13 $\pm$ 1,35	3,33 $\pm$ 1,84	2,53 $\pm$ 0,53
Monócitos (%)	7,00 $\pm$ 2,06	5,66 $\pm$ 0,55	4,83 $\pm$ 1,57
Segmentados (%)	5,33 $\pm$ 1,76	11,50 $\pm$ 1,54	9,66 $\pm$ 1,62
Eosinófilos (%)	0,83 $\pm$ 0,54	0,00 $\pm$ 0,00	0,66 $\pm$ 0,33
Linfócitos (%)	86,83 $\pm$ 3,82	83,33 $\pm$ 1,78	83,77 $\pm$ 2,71
Plaquetas ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	340,66 $\pm$ 107,77	362,33 $\pm$ 231,13	361,83 $\pm$ 150,07
MPV	7,58 $\pm$ 1,22	7,583 $\pm$ 2,61	6,61 $\pm$ 0,59
PCT	0,25 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,13	0,23 $\pm$ 0,08
PDW	2,81 $\pm$ 2,22	3,56 $\pm$ 3,80	2,3 $\pm$ 1,78

Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por  $*p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle. MCV: volume corpuscular médio; MCH: hemoglobina corpuscular média; MCHC: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: amplitude de distribuição dos eritrócitos; MPV: volume plaquetário médio; PCT: plaquetócrito; PDW: amplitude de distribuição de plaquetas; EBGf: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G. uruguensis*; C: grupo controle (salina, 10 mL/kg, v.o.). FONTE: o autor (2017).

#### 5.12.4 Determinação dos parâmetros bioquímicos

A avaliação da função hepática (TABELA 20, FIGURA 70) demonstra que a administração do EBGF (1000 mg/kg) reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) o valor de aspartato amino-transferase (AST =  $52,5 \pm 14,84$  U/L) em relação ao valor apresentado pelos animais do grupo controle (AST =  $80,25 \pm 10,340$  U/L). Observamos ainda que embora não tenha sido estatisticamente significativa, os animais tratados com EBGF 1000 mg/kg apresentaram uma tendência de diminuição dos níveis de aspartato alanina-transferase (ALT =  $19,5 \pm 3,53$  U/L) quando comparados aos animais do grupo controle (ALT =  $36,5 \pm 9,29$  U/L).

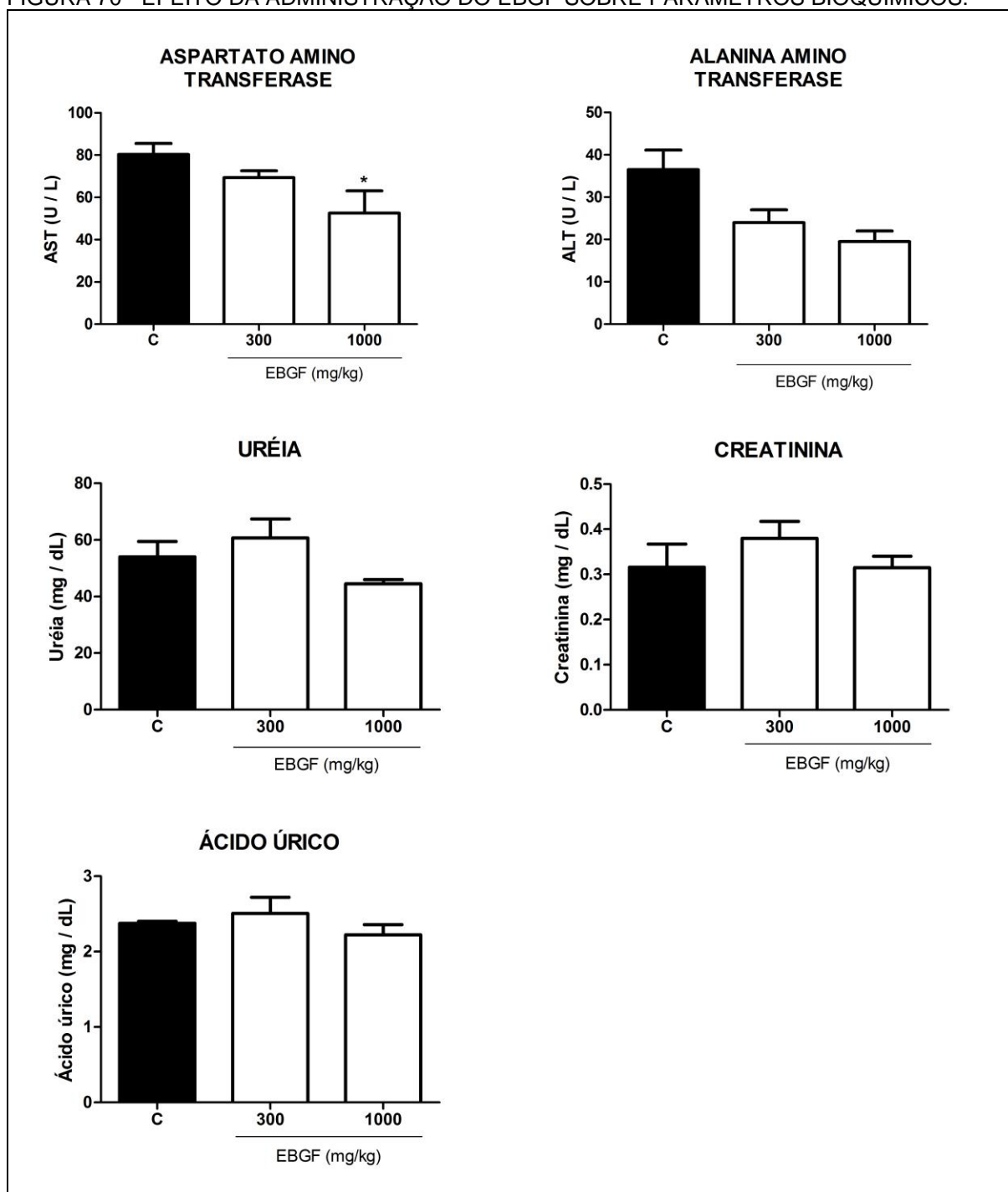
A administração do EBGF (300 e 1000 mg/kg) não alterou os valores de uréia, creatinina e ácido úrico dos camundongos, comparados com os valores encontrados para os animais do grupo controle (FIGURA 70).

TABELA 19 - EFEITO DA ADMINSTRAÇÃO DO EBGF SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.

Parâmetro	Grupos		
	Controle	EBGF (mg/kg)	
		300	1000
ALT (U/L)	$36,5 \pm 9,29$	$24 \pm 5,19$	$19,5 \pm 3,53$
AST (U/L)	$80,25 \pm 10,340$	$69,33 \pm 5,68$	$52,5 \pm 14,84^*$
URÉIA (mg/dL)	$40,75 \pm 27,62$	$60,66 \pm 11,71$	$44,5 \pm 2,12$
CREATININA (mg/dL)	$0,31 \pm 0,13$	$0,38 \pm 0,06$	$0,31 \pm 0,03$
ÁCIDO ÚRICO (mg/dL)	$1,22 \pm 1,33$	$5,16 \pm 3,11$	$2,23 \pm 0,20$

Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média ( $n=6$ ). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por  $*p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle. AST = aspartato amino-transferase; ALT = alanina amino-transferase; EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G. uruguensis*; C: grupo controle (salina, 10 mL/kg, v.o.). FONTE: o autor (2017).

FIGURA 70 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.



Legenda: Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. Os níveis de significância são indicados por \* $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle. AST = aspartato amino-transferase; ALT = alanina amino-transferase; EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G. uruguensis*; C: grupo controle (salina, 10 mL/kg, v.o.). FONTE: o autor (2017).

#### 5.12.5 Avaliação histopatológica de fígado, rim e estômago

A análise histopatológica é uma avaliação fundamental em estudos toxicológicos. É utilizada para determinar se o agente avaliado é capaz de promover lesão ao órgão avaliado, podendo ainda caracterizar o tipo e extensão de uma pré-determinada lesão.

O estômago dos animais submetidos a administração do EBGF (300–1000 mg/kg) apresentou mucosa íntegra e ausência de erosão/úlceras e inflamação.

O fígado dos animais submetidos a administração do EBGF (300–1000 mg/kg) apresentou arquitetura preservada e ausência de necrose, esteatose, apoptose, tumefação e colestase. Esse dado contrasta com o descrito anteriormente, demonstrando que a redução ( $p < 0,05$ ) da aspartato aminotransferase (AST =  $52,5 \pm 14,84$  U/L) dos camundongos tratados com o EBGF 1000 mg/kg em relação ao valor apresentado pelos animais do grupo controle (AST =  $80,25 \pm 10,340$  U/L).

O rim dos animais submetidos a administração do EBGF (300–1000 mg/kg) apresentou ausência de glomerulite e hialinização glomerular, ausência de cistificação, inflamação e necrose no túbulo glomerular. Presença de interstício virtual, papila e cálice preservados.

O estudo histopatológico dos órgãos coletados de camundongos submetidos a administração do EBGF (300–1000 mg/kg), em esquema posológico previamente descrito, não revelou alterações quando comparados aos animais do grupo controle, tanto no fígado, quanto no rim e estômago dos animais avaliados. Todos os animais do estudo, controles e testes, apresentaram órgãos com estruturas preservadas e ausência de alterações histológicas características e compatíveis com qualquer sinal de toxicidade que pudessem estar associadas ao uso do EBGF (300–1000 mg/kg).

### 5.13 ATIVIDADES COMPORTAMENTAIS

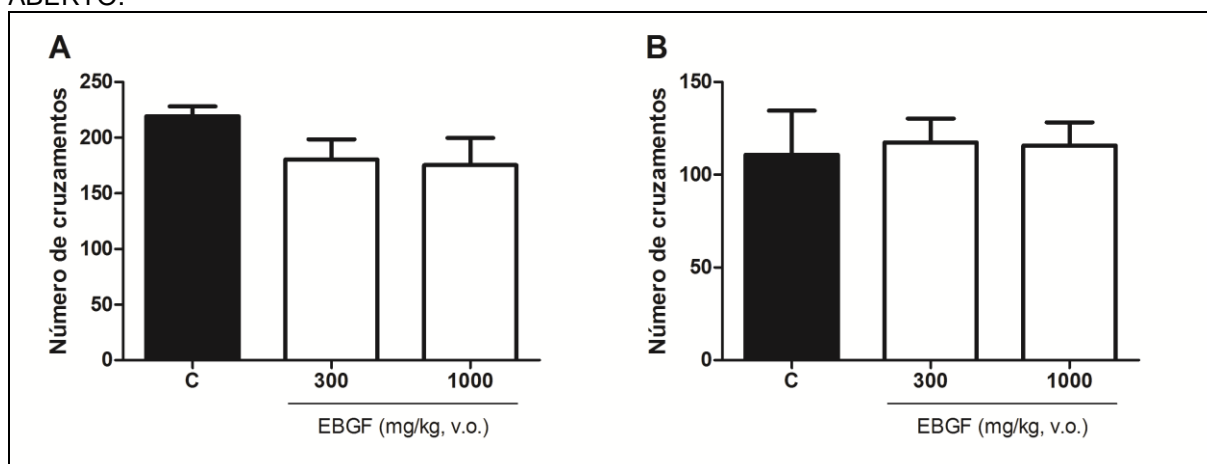
O efeito da administração do extrato etanólico bruto obtido das folhas da espécie *Guettarda uruguensis* (EBGF) nas doses de 300 mg/kg e 1000 mg/kg, durante o período de 21 dias, foi avaliado sobre a atividade locomotora e comportamento tipo ansiolítico e depressivo de camundongos por meio dos testes de campo aberto, teste de esconder esferas e teste de natação forçada, respectivamente.

#### 5.13.1 Teste do campo aberto

O objetivo do teste de campo aberto foi averiguar uma possível alteração motora decorrente dos tratamentos com o EBGF nas doses de 300 e 1000 mg/kg, o que poderia produzir falsos resultados nos testes de nocicepção, teste de esconder esferas e teste de natação forçada. O efeito da administração oral do EBGF (300 e 1000 mg/kg) sobre a atividade locomotora foi avaliada por meio da contagem do número de cruzamentos no campo aberto durante o período de 6 minutos. Os dados obtidos (FIGURA 71, TABELA 21) demonstram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados, tanto na avaliação logo após a primeira administração quanto após a administração prolongada. Desse modo, é possível concluir que a administração do EBGF (300 e 1000 mg/kg) não demonstrou prejuízo a atividade locomotora dos animais. Portanto, sugere-se que o efeito antinociceptivo demonstrado pelo EBGF 100 e 300 mg/kg, assim como demais resultados obtidos pelos testes comportamentais apresentados em sequência não foram influenciados por alteração da atividade motora.



FIGURA 71 - EFEITO DO EBGF SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA AVALIADA EM CAMPO ABERTO.

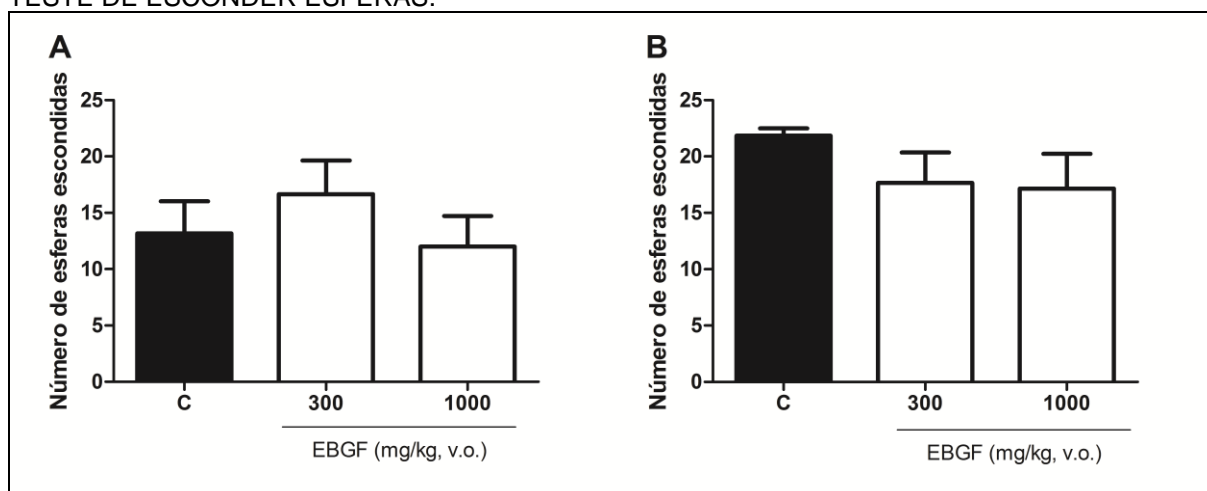


Legenda: A atividade locomotora foi avaliada após a administração aguda (A) e crônica (B) do EBGF. Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G. uruguensis*; C: grupo controle (salina, 10 mL/kg, v.o.). FONTE: o autor (2017).

### 5.13.2 Teste de esconder esferas

A administração oral, aguda e repetida, do EBGF (300 e 1000 mg/kg) não promoveu efeito do tipo ansiolítico no teste de esconder esferas. Os dados obtidos estão expressos na FIGURA 72 e TABELA 21, e demonstram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados, tanto na avaliação após a primeira administração quanto após a administração prolongada.

FIGURA 72 - EFEITO DO EBGF SOBRE A ATIVIDADE TIPO-ANSIOLÍTICA AVALIADA PELO TESTE DE ESCONDER ESFERAS.



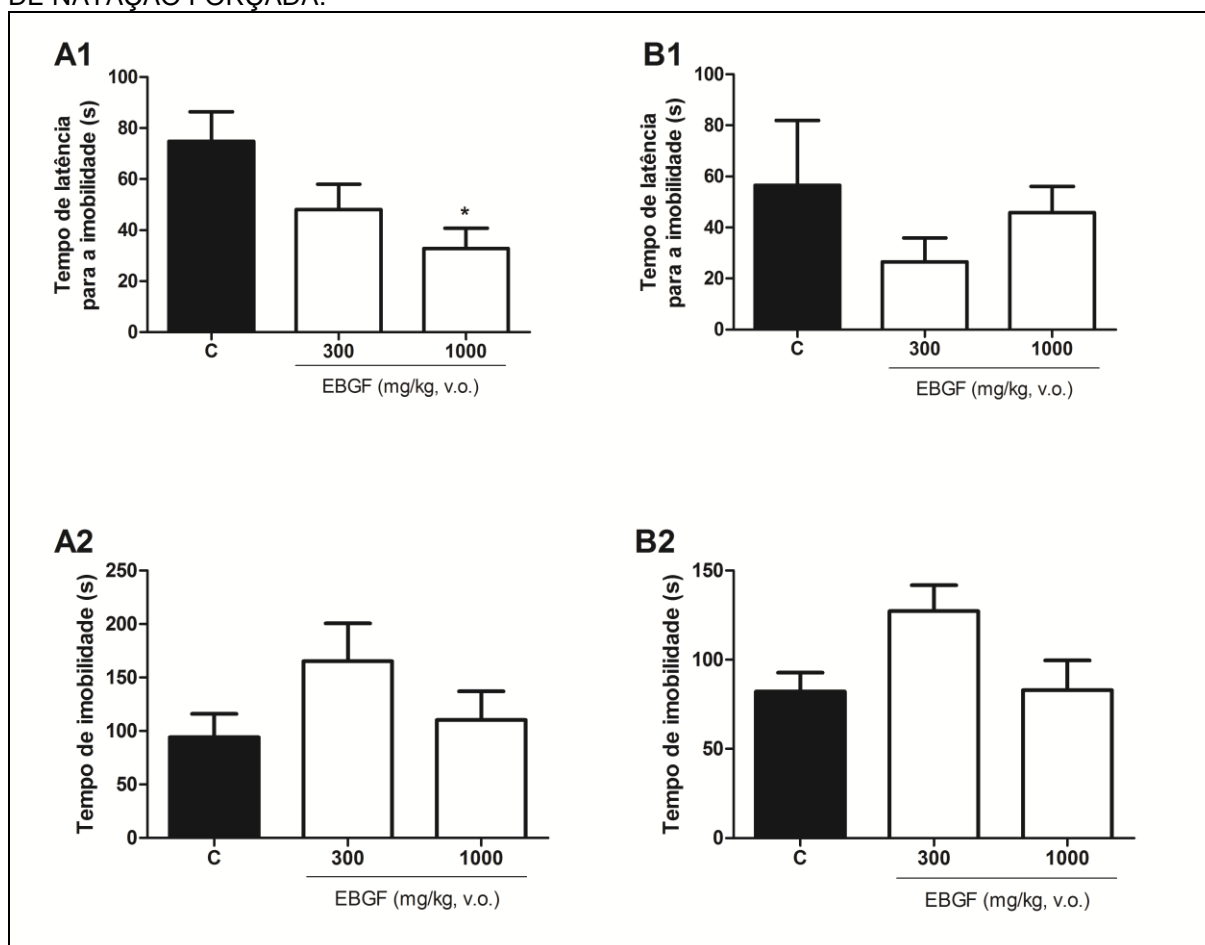
Legenda: A atividade tipo-ansiolítica foi avaliada após a administração aguda (A) e crônica (B) do EBGF. Os resultados são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G. uruguensis*; C: grupo controle (salina, 10 mL/kg, v.o.). FONTE: o autor (2017).

### 5.13.3 Teste de natação forçada

No teste de natação forçada os camundongos tratados com o EBGF (300 e 1000 mg/kg) foram avaliados quanto ao seu desempenho em relação a dois parâmetros: tempo de latência para a imobilidade e tempo de imobilidade. Esses parâmetros foram utilizados como medida para avaliação de um comportamento tipo depressivo. A administração aguda e prolongada do EBGF nas doses de 300 e 1000 mg/kg não alterou ( $p < 0,05$ ) o parâmetro tempo de imobilidade após o tratamento agudo e prolongado em comparação ao grupo tratado com veículo. Os animais tratados com o EBGF 1000 mg/kg demonstraram ( $p < 0,05$ ) uma diminuição no tempo de latência para a imobilidade após administração aguda, sendo um sugestivo de que a administração do EBGF 100 mg/kg cause, em um primeiro momento, um comportamento tipo depressivo (FIGURA 73, TABELA 21).

O teste de natação forçada (TNF) descrito por Porsolt e colaboradores (1977) é um modelo largamente utilizado para detecção de potencial efeito tipo-antidepressivo, possui como características básicas a rápida execução e validade preditiva (PORSOLT et al., 1978; BORSISNI E MELI, 1988). O TNF constitui-se em analisar o tempo de imobilidade dos animais, tendo como premissa o fato de que em uma situação de estresse inescapável, os camundongos adquirem um comportamento de imobilidade, reduzido por fármacos com ação tipo-antidepressiva. A conduta normal de um animal é apresentar movimentos iniciais vigorosos de fuga para fora do cilindro de água. Após esse primeiro momento, o animal passa a alternar entre imobilidade, ou movimentos mínimos apenas para manter a cabeça fora da água, e movimentos de fuga, representados pela natação e escalada das paredes laterais. Diversos estudos reportam que fármacos antidepressivos aumentam o período de atividade dos animais e, conseqüentemente, diminuem a imobilidade (BORSINI E MELI, 1988). Um aumento do tempo de latência para a imobilidade, como o observado nos animais tratados uma única vez com o EBGF 1000 mg/kg, indicaria um comportamento tipo depressivo, porém esse mesmo comportamento não foi observado para os mesmos animais após o tratamento prolongado.

FIGURA 73 – AVALIAÇÃO DO EFEITO TIPO-ANTIDEPRESSIVO DO EBGF POR MEIO DO TESTE DE NATAÇÃO FORÇADA.



Legenda: A atividade tipo-antidepressiva foi avaliada pelo teste de natação forçada, onde avaliou-se o tempo de latência para a imobilidade (TLI) e tempo de imobilidade (TI) após a administração aguda (A1 e A2) e prolongada (B1 e B2) do EBGF. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=6). Os níveis de significância são indicados por \* $p < 0,05$  quando comparados com o grupo controle. EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G. uruguensis*; C: grupo controle (salina, 10 mL/kg, v.o.). FONTE: o autor (2017).

TABELA 20 - EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO EBGF SOBRE AS ATIVIDADES LOCOMOTORA, TIPO-ANSIOLÍTICA E TIPO-ANTIDEPRESSIVA.

Grupos		Avaliação da atividade locomotora e comportamental			
		Campo aberto	Teste de esconder esferas	Teste de natação forçada	
				NC	NEE
1° dia	300 mg/kg	180,3 $\pm$ 18,17	16,67 $\pm$ 2,97	48,00 $\pm$ 9,07	165,3 $\pm$ 35,39
	1000 mg/kg	175,3 $\pm$ 24,36	12,00 $\pm$ 6,66	32,75 $\pm$ 8,03	110,4 $\pm$ 26,79
	Controle	168,3 $\pm$ 12,17	13,17 $\pm$ 2,85	74,80 $\pm$ 11,53	94,17 $\pm$ 21,89
21° dia	300 mg/kg	117,4 $\pm$ 12,86	17,67 $\pm$ 2,70	56,5 $\pm$ 25,49	127,2 $\pm$ 14,67
	1000 mg/kg	115,8 $\pm$ 12,35	17,17 $\pm$ 3,08	26,5 $\pm$ 9,40	82,92 $\pm$ 16,63
	Controle	110,8 $\pm$ 23,68	21,83 $\pm$ 0,65	45,83 $\pm$ 10,25	82,05 $\pm$ 10,80

Legenda: Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (n=6). A comparação entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Newman-Keuls. EBGF: extrato etanólico bruto obtido de folhas de *G. uruguensis*; C: grupo controle (salina, 10 mL/kg, v.o.); NC: número de cruzamentos em campo aberto; NEE: número de esferas escondidas; TLI: tempo de latência para imobilidade; TI: tempo de imobilidade; (s): tempo cronometrado em segundos. FONTE: o autor (2017).

## 6 CONCLUSÕES

- As espécies *G. pohliana*, *G. uruguensis* e *G. viburnoides* apresentam características morfológicas e anatômicas concordantes com a família Rubiaceae, porém existem alguns caracteres individuais relevantes para a identificação das mesmas que contribuem para o enriquecimento do conhecimento da flora medicinal brasileira, especialmente do gênero *Guettarda*.

- Extratos e frações obtidos de folhas, flores e frutos da *G. uruguensis* apresentaram elevada concentração de compostos fenólicos e demonstraram atividade antioxidante pelas metodologias de fosfomolibdênio, DPPH e TBARS, destacando-se entre todas as amostras avaliadas a fração acetato de etila obtida das folhas (FOA).

- O perfil cromatográfico obtido por CLAE do EBGF, EBGFL, FOA, FLA e FRA demonstrou a presença de compostos com bandas de absorção em ultravioleta características de ácidos fenólicos e flavonoides.

- O estudo fitoquímico possibilitou a identificação das substâncias: glutinol (AFSD-1), quercetina (AFSD-2), e três ésteres de cadeia longa do ácido *p*-cumárico: *p*-cumarato de eicosanila (AFSD-3), *p*-cumarato de triacontila (AFSD-4) *p*-cumarato de dotriacontila (AFSD-5). As substâncias descritas estão sendo relatadas pela primeira vez no gênero *Guettarda*.

- A FOH demonstrou potencial larvicida para *Aedes aegypti*, produzindo efeito de letalidade e diminuição da produção de ATP. A FOH foi eficaz ainda em inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis*. Os efeitos descritos são atribuídos, ao menos em parte, a presença do composto glutinol, identificado nessa fração. Ainda com relação a FOH, destaca-se que essa não produziu toxicidade ao microcrustáceo *Artemia salina*.

- Com relação ao perfil de atividade antimicrobiana, as amostras EBGF, FOH, FOHR, FLHR e FREB apresentaram atividade antimicrobiana frente ao microorganismo *Enterococcus faecalis*. FOA promoveu inibição de *Staphylococcus aureus*.

- O EBGF promoveu efeito antinociceptivo no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e inibiu a resposta nociceptiva na primeira e segunda fase do modelo de formalina. A ação antinociceptiva do EBGF não envolveu o comprometimento da atividade locomotora.

- O EBGF promoveu atividade anti-inflamatória nos modelos de edema de pata e peritonite, ambos induzidos por carragenina.

- O EBGF e FOAQ demonstraram efeito de proteção gástrica no modelo de lesão aguda induzida pelo etanol. EBGF não produziu alteração sobre a motilidade gastrointestinal.

- A administração do EBGF, em um esquema posológico de dose diária durante 21 dias consecutivos não produziu alterações em indicadores de toxicidade como ganho de peso, peso relativo de órgãos vitais, parâmetros hematológicos, bioquímicos, sendo confirmados por avaliação histopatológica de órgãos como fígado, rim e estômago.

- A administração do EBGF, em um esquema posológico de dose diária durante 21 dias consecutivos, não produziu alteração sobre a atividade locomotora e sobre os parâmetros comportamentais avaliados, sendo um sugestivo de que o EBGF não atue modulando comportamentos do tipo-ansiolítico e tipo-antidepressivo.

## REFERÊNCIAS

- ACHILLE, F.; MOTLEY, T.J.; LOWRY, II. PP.; JÉRÉMIE, J. Polyphyly in *Guettarda*. (Rubiaceae, Guettardeae) based on nrDNA its sequence data. **Ann Missouri Bot Gard**, v. 93, p. 103-121, 2006.
- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; BASÍLIO, I.J.D.; NURIT, K.; COELHO, V.P.; BARBOSA, D.A. Sinopse da flora medicinal do Cariri Paraibano. **Oecol Bras**, v. 11, n. 3, p. 323-330, 2007a.
- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev bras farmacogn**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007b.
- 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. **Rev Bras Farmacogn**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, A.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76-91, 2007.
- ALEXANDRINO, C.R.; MORAES, T.M.S.; CUNHA, M. Micromorfologia e Anatomia Foliar de Espécies de Rubiaceae do Parque Nacional de Itatiaia-RJ. **Floresta e Ambiente**, v. 18, p. 275-288, 2011.
- AMARANTE, C.B.; MÜLLER, A.H.; PÓVOA, M.M.; DOLABELA, M.F. Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta Amazonica**, v. 41, n.3, p. 431-434, 2011.
- ANDREO, M.A.; BALLESTEROS, K.V.R.; HIRUMA-LIMA, C.A.; MACHADO DA ROCHA, L.R.; SOUZA BRITO, A.R.M.; VILEGAS, W. Effect of Mouriri pusaextracts on experimentally induced gastric lesions in rodents: Role of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide in gastroprotection. **J Ethnopharmacol**, v. 107, p. 431-441, 2006.
- AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CERRI, R.; DE MELLO, J.F. Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 9, p. 2927-2930, 1988.
- AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA; 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, 1989.
- ARUMUGAM, S.; PALANIVELU, A.; RETNASAMY, G.; RAMAIYAN, D. Study on the antiseizure activities of inner bark of *Guettarda Speciosa* (L.). **Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 8, p. 73-6, 2009.

ARYA, S.; KUMAR, V.L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against diferente mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, v.4, p. 228-232, 2005.

BARBOSA, M.R. *Guettarda* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

BARROS, A.V.; CONCEIÇÃO, A.O.; SIMONI, I.C.; PADILLA, M.A.; FERNANDES, M.J.B.; ARNS, C.W. In vitro antiviral activity of seeds from *Guettarda angelica* against avian viruses. **J App Pharm Sci.**, v. 3, n. 7, p. 31-33, 2013.

BARROSO, G.M. 1991. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: UFV.

BEAUTLER, E.; LITCHMAN, M.A.; COLLER, B.S.; KIPPS, T.J. Willians. **Hematology**. New York: McGraw Hill, 1995.

BHATTACHARYYA, J.; DE ALMEIDA, M.Z.; Isolation of the constituents of the root-bark of *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 1, p. 148-149, 1985.

BIESKI, I.G.C.; RIOS, S.F.; OLIVEIRA, R.M.; ESPINOSA, M.M.; MACEDO, M.; ALBUQUERQUE, U.P.; OLIVEIRA, M.D.T. Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evid Based Complement. Alternat Med.**, p. 1-36, 2012.

BISPO, N.J.; FRANCISCO, N.M.C.; SCHMITT, A.C. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato metanólico da planta *Guettarda angélica* sobre bactérias gram-positivase gram-negativas. **Laes and Haes**, v.4, p.164-169, 2007.

BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; LOPES, M. N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of cerrado and atlantic forest. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 2, p. 181-186, 1999.

BOLZANI, V.S.; YONG, M.C.M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.S. & LOPES, M.N. Secondary Metabolites from Brazilian Rubiaceae Plant Species: Chemotaxonomical and biological significance. **Recent Research Development in Phytochemistry**, v. 5, p. 19-31, 2001.

BORSINI, F.; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology** (Berl). v. 94, n. 2, p.147-60, 1988.

BRACHT, A.; SUZUKI-KEMMELMEIER, F.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L.; CONSTANTINI, J.; YAMAMOTO, N.S.; ISHII-IWAMOTO, E.L. Enzimas. In: Bracht A and Ishii-Iwamoto EL (Eds), Métodos de laboratório em Bioquímica, Maringá: Manole, p. 103-137, 2003.

BREMEKAMP, C.E.B. Remarks on the position, the delimitation and the subdivision of the Rubiaceae. **Acta Botanica Neerlandica**, v. 15, p. 1-33, 1966.

BREMEKAMP, C.E.B; Rubiaceae, p. 113-294. In: Pulle, A., ed., **Flora of Suriname**. v. 4, part. 1, Leiden: E.J.Brill. 1934.

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.

BROEKKAMP, C.L.; RIJK, H.W.; JOLY-GELOUIN, D.; LLOYD, K.L. Major tranquilizers can be distinguished from minor tranquilizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 126, p. 223-229, 1986.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. Paris: Lavoisier Publishing, 1995.

BURGER, W.; TAYLOR, C.M. Rubiaceae. *Fieldiana Bot* 33: 1-333, 1993.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CALLAWAY, J.C.; RAYMON, L.P.; HEARN, L.P.; MCKENNA, D.J.; GROB, C.S.; BRITO, C.S.; MASH, G.S. Quantification of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 20, p. 492-497, 1996.

CAPASSO, A.; BALDERRAMA, L.; SIVILA, S.C.; DE TOMMASI, N.; SORRENTINO, L.; PIZZA, C. Phytochemical and pharmacological studies of *Guettarda acreana*. **Planta Medica**, v. 64, n. 4, p.348-352, 1998.

CARVALHO JUNIOR, A.R; GOMES, G.A.; FERREIRA, R.O.; CARVALHO, M.G. Chemical constituents and antioxidant activity of leaves and branches of *Eugenia copacabanensi* Kiaersk (Myrtaceae). **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, 2014.

CHEW, Y.L.; CHAN, E.W.L.; TAN, P.L.; LIM, Y.Y.; STANSLAS, J.; GOH, J.K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 12, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M07-A8: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M38-A2: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard Document. Wayne, PA, USA, 2008.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonical coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **J Ethnopharmacol.**, v. 126, n. 1, p. 159- 175, 2009.



COLLIER, H.O.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br J Pharmacol Chemother**, v. 32, n. 2, p.295-310, 1968.

CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytother Res.**, v. 15, n. 3, p.183-205, 2001.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University, 1981.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 238-245, 2002.

CRYAN, J.F.; VALENTINO, R.J.; LUCKI, I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 547-569, 2005.

CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR, W.T. **Cellular Pathology Technique**. London: Butterworth and Co, 1985.

CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI L.L.; VALADARES M.C.; FREITAS, H.O.G.; SENNA, A.A.S.; JUNIOR, R.S.L. Acute and subacute toxicity studies of the latex and of the ethanolic extract of the leaves of *Synadenium umbellatum* Pax in rats. **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, p. 403-411, 2009.

DELPRETE, P.G., SMITH, L.B. & KLEIN, R.M. Rubiáceas. *In* **Flora Ilustrada Catarinensis**. v.2, Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, 2005.

DUARTE, A.F.S. **Estudo fitoquímico, toxicidade e atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana e alelopática) de cascas do caule de *Guettarda uruguensis* Cham. & Schtdl., Rubiaceae**. 118f. Curitiba, 2012. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

DUARTE, A.F.S.; HIROTA, B.C.K.; OLIVEIRA, V.B.; CAMPOS, R.; MURAKAMI, F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schtdl. (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 607-614, 2014.

DUARTE, A.F.S.; SZABO, E.M.; DUARTE, I.S.; MERINO, F.J.Z.; OLIVEIRA, V.B.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Evaluation of antioxidant capacity, phenolic content, antimicrobial and cytotoxic properties of *Guettarda uruguensis* flowers and fruits. **Afr J Pharm Pharmacol**, v. 10, n. 47, p. 1014-1024, 2016.

EVERETTE, J.D.; BRYANT, Q.M.; GREEN, A.M.; ABBEY, Y.A.; WANGILA, G.W.; WALKER, R.B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the

Folin-Ciocalteou reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139-8144, 2010.

FANSHAWE, D.B. 1950. **Forests Products of British Guiana. Part II. Minor Forest Products**. 81 pp. Forestry Bulletin No. 2 (New Series). Forest Department, British Guiana.

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

FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. 3ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1971. p.76-80.

GANDHIMATHI, R.; SARAVANA KUMAR, A.; SENTHIL KUMAR, K.K.; PRAVEEN KUMAR, K.; UMA MAHESWARI, J. Pharmacological studies of anti-diarrhoeal activity of *Guettarda speciosa* (L.) in experimental animals. **J Pharm Sci & Res**, v. 1, n. 2, p. 61- 66, 2009.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Medicinal Plants: Factors of influence on the content of secondary metabolites. **Quim Nova**, v. 30, p. 374 – 381, 2007.

GRENAND, P. **Pharmacopées traditionnelles en Guyane Créoles, Palikur, Wayapi**. Paris: Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (ORSTOM); 1987.

GROB, C.S.; MCKENNA, D.J.; BRITO, J.C.; NEVES, E.S.; OBERLANDER, G.; SAIDE, O.L.; LABIGALINI, E.; TALCA, C.; MIRANDA, C.T.; STRASSMAN, R.J.; BOONE, K.B. Human psychopharmacology of ayahuasca a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. **Mental Disease**, v. 184, p. 86-94, 1996.

HANSEN, M.B. Neurohumoral Control of Gastrointestinal Motility. **Physiol. Res**. v. 52, p. 1-30, 2003.

HECKEL, E. 1897. **Les Plantes Médicinales et Toxiques de la Guyane Francaise**. 93 p.

HEITZMAN, M.E.; NETO, C.C; WINIARZ, E.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 66, p. 5-29, 2005.

HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R.S.B. Mouse paw oedema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 243-49. 1987.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem I Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J Neurosci Meth**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-14, 1987.

HUSSON, H.P.; KAN-FAN, C.; SEVENET, T.; VIDAL, J.P. Structure de la cathenamine intermediaire cle de la biosynthese des alkaloides indoliques. **Tetrahedron Lett**, v. 22, p. 1889-1892, 1977.

INOUE, H.; TAKEDA, Y.; NISHIMURA, H.; KANOMI, A.; OKUDA, T.; PUFF, C. Chemotaxonomic studies of rubiaceous plants containing iridoid glycosides. **Phytochemistry**, v. 27, n. 8, p. 2591-2598, 1988.

JACKSON, C.; DENCH, J.E.; HALL, D.O.; MOORE, A.L. Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica sol gradient centrifugation. **Plant Physiol**, v. 64, p. 150-153, 1979.

JIANG, Y.; WENIGER, B.; QUIRION, J.C.; ANTON, R. 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -Tetrahydrodeoxycordifoline from *Guettarda ovalifolia*. **Planta Med**, v. 60, p. 294, 1994.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, Mc Graw Hill Book, 1940.

JOHNSTON, M.; COLQUHOUN, A. Preliminary ethnobotanical survey of Kurupukari: an Amerindian settlement of central Guyana. **Economic Botany**, v. 50, n. 2, p. 182-194, 1996.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Plant systematics**. Sunderland: Sinauer. 2008.

KAISER, E. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. **Bot. Zentralb.**, v. 1880, p. 25-26, 1880.

KALEGARI, M.; MIGUEL, M.D.; DIAS, J.F.G.; LORDELLO, A.L.L.; LIMA, C.P.; MIYAZAKI, C.M.S.; ZANIN, S.M.W.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, O.G. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

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

KAN-FAN, C.; BRILLANCEAU, M.H.; PUSSET, J.; CHAUVIERE, G.; HUSSON, H.P. Plants from New Caledonia. Three quinicine derived alkaloids from *Guettarda trimera*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 11, p. 2773-2775, 1985.

KAN-FAN, C.; BRILLANCEAU, M.H.; HUSSON, H.P.; Plants of New Caledonia. 3 - Epi-antirhine, a new alkaloid from *Guettarda heterosepala*. **J Nat Prod**, v. 49, n. 6, p. 1130 - 1132, 1986.

KAOU, A.M.; MAHIU-LEDDET, V.; HUTTER, S.; AÏNOUDDINE, S.; HASSANI, S.; YAHAYA, I.; AZAS, N.; OLLIVIER, E. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 74-83, 2008.

KELMER F, Lopes DS, Marrega TP, Camacho DP, Moura VM. **Perfil de susceptibilidade antimicrobiana do extrato bruto e frações da planta *Guettarda uruguensis***. In: *XII Encontro Maringaense de Biologia / XXVI Semana de Biologia, 2011, Maringá*.

KERBER, V.A. **Análise dos alcalóides de *Psychotria brachyceras* Mull. ArG. e *Psychotria umbellata* Vell, e o estabelecimento e caracterização de cultura de células de *P. umbellata* Vell**. [Tese de doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

KHAN, A.M. **Phytochemical and structural studies on the chemical constituents of *Taxus wallichiana*, *Tanacetum gracile*, *Jolyana laminarioides* and other marine algae**. [Thesis]. Pakistan: International Center for Chemical Sciences, H.E.J. Research Institute of Chemistry, University of Karachi; 2000.

KINUPP, V.F. **Plantas alimentícias não-convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS**. [Tese]. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.

KUNIYOSHI, Y.S. **Aspectos morfo-anatômicos do caule, raiz e folha de *Tabebuia cassinoides* (Lam.) DC. (Bignoniaceae) em diferentes fases sucessionais no litoral do Paraná** [tese] Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 1993. 130 p.

LAMPRECHT, W.; TRAUTSCHOLD, I. Adenosine-5-triphosphate. Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Methods of Enzymatic Analysis**, v. 4, p. 2101-2110, 1974.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, p. 601-606, 1969.

LI, J.W.H.; VEDERAS, J.C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

LIMA, G.S.; MOURA, F.S.; LEMOS, R.P.L.; CONSERVA, L.M. Triterpenes from *Guettarda grazielae* MRV Barbosa (Rubiaceae). **Rev Bras Farmacogn**, v. 19, p. 284-289, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Vol. 2. Nova Odessa, Ed. Plantarum, 1998. 352p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. Vol. 3. Nova Odessa, Ed. Plantarum, 2009. 384p.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Bio Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A.P.  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1517-1575, 1994.

MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982.

MATOS, M.E.O.; SOUZA, M.P. MACHADO, M.I.L., BRAZ-FILHO, R. Quinovic acid glycosides from *Guettarda angélica*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 6, p. 1419-1422, 1986.

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

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. "Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: Rahman A, ed., **Studies in Natural Product Chemistry** 9, Elsevier, Amsterdam, p. 383-409, 1991.

MENNEGA, E. A.; TAMMENS-DE ROOIJ, W. C. M.; JANSEN-JACOBS, Eds. **Check-list of woody plants of Guyana**. Ede, The Netherlands: Tropenbos Foundaion, 281 pp. 1988.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITAO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITAO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res.** v. 15, n. 2, p. 127-30, 2001.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon, 1950.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIGUEL, O.G. **Componentes químicos de *Sebastiania Shottiana* Muell. Arg, Hipoteses sobre a correlação entre estrutura e atividade farmacológica**. Santa Catarina. [Tese]. Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Universidade Federal de Santa Catarina, 1987.

MIRANDA, M.L.D.; GARCEZ, F.R.; ABOT, A.R.; GARCEZ, W.S. Constituintes químicos das folhas de *Riedeliella graciliflora* Harms (LEGUMINOSAE). **Quim. Nova**, v. 35, n. 7, p. 1306-1311, 2012.

MONTAGNAC, A.; LITAUDON, M.; PAIS, M. Quinine and quinicine derived alkaloids from *Guettarda noumeana*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 5, p. 973-975, 1997.

MORAIS, S.M.; CATUNDA-JR, E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS-NETO, J.S. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Quim Nova**, v. 29, p. 907-910, 2006.

MOREIRA, E.A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MOREIRA, T.F. **Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Rhamnaceae)**. 97f. Curitiba, 2012. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

MOURA, F.S.; LIMA, G.S.; MENEGHETTI, M.R.; LYRA LEMOS, R.P.; CONSERVA, L.M. A new iridoid from *Guettarda grazielae* MRV Barbosa (Rubiaceae). **Nat. Prod. Res**, v. 5, p. 1614-1620, 2011.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T. **Botânica Econômica Brasileira**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., 1995.

NARESSI, M.A.; MANHOLER, D.D.; AMES, F.Q.; BERSANI-AMADO, C.A.; FORMAGIO, A.S.N.; PEREIRA, Z.V.; COSTA, W.F.; BALDOQUI, D.C.; SARRAGIOTTO, M.H. Chemical constituents, anti-inflammatory, and free-radical scavenging activities of *Guettarda viburnoides* Cham. & Schltld. (Rubiaceae). **Quím. Nova**, v. 38, n. 7, p. 932-936, 2015.

NASCIMENTO, F.P.; FIGUEREDO, S.M.; MARCON, R.; MARTINS, D.F.; MACEDO, S.J.; LIMA, D.A.; ALMEIDA, R.C.; OSTROSKI, R.M.; RODRIGUES, A.L.; SANTOS, A.R. Inosine reduces pain-related behavior in mice: involvement of adenosine A1 and A2A receptor subtypes and protein kinase C pathways. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 334, n. 2, p. 590-598, 2010.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**. v.59, p.368-373, 1964.

OLIVEIRA, P.R.N.; TESTA, G.; SENA, S.B.; COSTA, W.F.; SARRAGIOTO, M.H.; SANTIN, M.O. Chemical constituents of the roots of *Guettarda pohliana* Müll. ArG. (Rubiaceae). **Quím Nova**, v.31, n.4, p.755-758, 2008.

OLIVEIRA, P.V.; FERREIRA, J.C.Jr.; MOURA, F.S.; LIMA, G.S.; OLIVEIRA, F.M.; OLIVEIRA, P.E.; CONSERVA, L.M.; GIULIETTI, A.M.; LEMOS, R.P. Larvicidal activity of 94 extracts from ten plant species of northeastern of Brazil against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitol Res**, v. 107, n. 2, p. 403–407, 2010.

OLIVEIRA, P.R.N.; TESTA, G.; MEDINA, R.P.; OLIVEIRA, M.A.; KATO, L.; SILVA, C.C.; CARVALHO, J.E.; SANTIN, M.O. Cytotoxicity activity of *Guettarda pohlinana* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Nat Prod Res**, v. 27, n. 18, p. 1677-1681, 2013.

PAGANO, R. L.; DIAS, M. A.; DALE, C. S.; GIORGI, R. Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediate carrageenan-induced antinociception in mice. **Mediators Inflamm**, v. 11, n. 4, p. 203-210, 2002.

PAULA, V.F.; CRUZ, M.P. CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Bombacopsis glabra* (BOMBACACEAE). **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 213-215, 2006.

PINA, E.M.L., *et al.* Pharmacological screening and acute toxicity of bark roots of *Guettarda platypoda*. **Braz J Pharmacog.**, v. 22, p. 1315-1322, 2012.

PINTO, A.C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, v. 18 n. 6, p. 608-615, 1995.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-59, 2002.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p. 331-38, 2004.

PLOTKIN, M.J.; BOOM, B.M.; ALLISON, M. 1991. **The ethnobotany of Aublet's Histoire des Plantes de la Guiane Française**. Monogr. Syst. Bot. v. 35, p. 1-108, 1775.

POVH, J.A.; ALVES, G.S.P. Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade de Santa Rita, Ituiutaba–MG. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 231-242, 2013.

PORSOLT, R.D.; LePICHON, M.; JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p.730- 732, 1977.

PORSOLT, R.D.; BETIN, A.; JALFRE, M. "Behavioral despair" in rats and mice: strain differences and the effect of imipramine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 51, n. 3, p. 291-294, 1978b.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

QUINTANS-JUNIOR, L.J.; ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; AGRA, M.F.; SOUSA, M.F.V.; BARBOSA-FILHO, J.M. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farm Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 179-84, 2002.

RAMOS, D.F.; LEITÃO, G.G.; COSTA, F.N.; ABREU, L.; VILLARREAL, J.V.; LEITÃO, S.G.; SAID Y FERNÁNDEZ, S.L.; SILVA, P.E.A. Investigation of the antimycobacterial activity of 36 plant extracts from the Brazilian Atlantic Forest. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 44, n. 4, p. 669-674, 2008.

REVATHI, D., RAJESWARI, M. In Vitro Evaluation of Nitric Oxide Scavenging Activity of *Guettarda speciosa* Linn. **Int J of Scienc and Research**, v. 4, n. 9, 2015.

RAUHAMÄKI, V.; J. WOLFRAM, E.; JOKITALO, I.; HANSKI, AND E; P. DAHLHOFF. Differences in the Aerobic Capacity of Flight Muscles between Butterfly Populations and Species with Dissimilar Flight Abilities. **Plos One** 9:e78069, 2014.

RICE-EVANS, C.; NICOLAS, J.; MILLER, J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Sci.**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 80-84, 2005.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433-443, 1979.

RODRIGUES, G.C.R. **Estudo fitoquímico das folhas de *Guettarda platypoda* D.C. (Rubiaceae) e avaliação da atividade biológica.** [Dissertação de Mestrado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

SANTOS, A. R.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 289, n. 1, p. 417-26, 1999.

SARAVANA KUMAR, A.; AMUTHA, P.; GANDHIMATHI, R.; DHANAPAL, R. Study on phytochemical profile and antiepileptic activity of inner bark of *Guettarda speciosa* (L.). **Iran J Pharm Ther**, v. 8, n. 1, p. 73-76, 2009.

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

SASS, J.E. **Botanical Microtechnique**, 2<sup>nd</sup> ed. Iowa State College Press, Ames, 1951.

SASSAKI, G. L., SOUZA, L. M., CIPRIANI, T. R., & IACOMINI, M. TLC of carbohydrates. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phitochemistry**. US: CRC Press, 2008. v. 99, p. 255-276

SCARPIGNATO, S.; CAPOVILLA, T.; BERTACCINI, G. Action of caerulein on gastric emptying of conscious rat. **Arch. Int. Pharmacodyn.** v. 243, p. 286-294, 1980.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5<sup>o</sup> ed. UFRGS/UFSC: Porto Alegre (RS)/ Florianópolis (SC), Brazil, 2004.



SLINKARD, K.; SINGLETON, V.L. **Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods**. v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 1-15, 1996.

SOLEREDER, H. Systematic anatomy of the dicotyledons. **A handbook for laboratories of pure and applied botany**. Oxford: Clarendon Press, v. 2, 1182p., 1908.

SOUZA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MACHADO, M.I.L.; BRAZ FILHO, R.; VENCATO, I.; MASCARENHAS, Y.P. Triterpenoids from *Guettarda angélica*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2589-2592, 1984.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

STAHL, E. **Thin-Layer Chromatography**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 1969.

STICKNEY, J.C.; NORTHUP, D.W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rat. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 101, p. 582-583, 1959.

SUAREZ, R.K.; STAPLES, J.F.; LIGHTON, JR.; MATHIEU-COSTELLO, O. Mitochondrial function in flying honeybees (*Apis mellifera*): respiratory chain enzymes and electron flow from complex III to oxygen. **J Exp Biol**, v. 203, p. 905-911, 2000.

SUGISHITA, W.; AMAGAYA, S.; OGIHARA, Y. Antiinflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. **J. Pharmacobiodyn**. v. 8, p. 565-75, 1993.

TALAPRATA, B.; DAS, A.K.; TALAPRATA, S.K. Defuscin, a new phenolic ester from *Dendrobium fuscescens*: Conformation of shikimic acid. **Phytochemistry**, v. 28, n. 1, p. 290-292, 1989a.

TALAPATRA, S.K.; SARKAR, A.C.; CHAKRABARTI, S.; TALAPATRA, B.J. Randiflorin, a new pentacyclic triterpene lactone and randilongin, a new *p*-coumaric acid ester from *R. longiflora*. **Indian Chemistry Society**, v. 66, p. 694-698, 1989b.

TEIXEIRA, E.; RABELO, E.; SILVA, B.; NETO, L.N.; ARRUDA, F.; SANTOS, H.; ALBUQUERQUE, M.; BANDEIRA, P.; NASCIMENTO, K.; CAVADA, B.; MARTINS, J. Antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Guettarda sericea* against oral streptococci. **BMC Proceedings**, v. 8, p. 54, 2014.

TESTA, G.; SENA, S.B.; OLIVERIA, P.R.N.; SILVA, C.C.; SANTIN, S.M.O. Estudo fitoquímico e atividade moluscicida das folhas da espécie vegetal *Ghettarda pohliana*

(Rubiaceae). In: XVI Encontro anula de Iniciação Científica PIBIC/CNPQ, 2007, Maringá-PR. XVI Encontro anula de Iniciação Científica PIBIC/CNPQ, 2007.

TESTA, G.; OLIVEIRA, P.R.N.; SILVA, C.C.; SCHUQUEL, I.T.A.; SANTIN, S.M.O. Constituintes químicos das folhas e avaliação anti-inflamatória de extratos das raízes e folhas de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Quim Nova**. v. 35, n. 3, p. 527-529, 2012.

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

THE PLANT LIST (2013), v.1.1, 1 jan. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em: 9 jul 2015.

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TREIT, D.; PINEL, J. P. J.; FIBIGER, H. C. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. v. 15, p. 619- 626, 1981.

VAZ, Z.R.; MATA, L.V.; CALIXTO, J.B. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal end chemical models of nociception in mice. **Phyt Res**, v. 11, p. 101-6, 1997.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as lead for drug development. **Drug Discov Today**, v. 3, n. 5, p. 232-638, 1998.

VIANELLO, A.; BRAIDOT, E.; PETRUSSA, E.; MACRI, F. ATP synthesis driven by alpha-keto acid-stimulated alternative oxidase in pea leaf mitochondria. **Plant Cell Physiol**, v. 38, p. 1368-1374, 1997.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELPH, J.L.; JOHNSTON, P.R., VENABLE, A.L.; McKENZIE, K.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the hind limb of the rat. **Fed. Proc.**, v. 46, n. 1, p. 118-126, 1987.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis. **A thin layer chromatography atlas**. Heidelberg: Springer, 1996.

WANDJI, J.; NKENGFACK, A.E.; FOMUM, Z.T.; UBILLAS, R.; KILLDAY, K.B.; TEMPESTA, M.S. A new prenylated isoflavone and long chain esters from two *Erythrina* species. **J. Nat. Prod.** v. 53, p. 1425-1429, 1990.

WEINER, M.A; Ethnomedicine in Tonga. **Econ. Bot**, v. 25, p. 423-450, 1971.

WEINER, M.A. **Secrets of Fijian Medicine**. Govt. Printer, Suva, Fiji, 1984.

WERKER, E. Trichome diversity and development. In: Hallahan DL, Gray JC, editors. *Plant Trichomes*. London: Academic Press. **Advances in Botanical Research**, n. 31, p. 1-30, 2000.

WHO - World Health Organization. Instructions for Determining the Susceptibility or Resistance of Mosquito Larvae to Insecticide. WHO/VBC/81.807,1-6.995, 1981.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 111, p. 544-47, 1962.

WIJINSMA, R.; VERPOORTE, R. Anthraquinones in the Rubiaceae. **Programm Chemistry Organization of Natural Products**, v. 49: p. 79-149, 1986.

YAGA, S.; KAZUHIKO, K. On the termite-resistance of Okinawan timbers. IX. Termiticidal substance from the wood of *Guettarda speciosa* L. **Mokuzai Gakkaishi**, v. 31, n. 8, p. 684-687, 1985.

## ANEXO A – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

### AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35, DE 27 DE ABRIL DE 2011 Nº 03/2014

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, as **atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

**Objetivo da Autorização:** Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

**Período das atividades:** 2000 a 2019.

**Validade da Autorização:** Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº 02001.001165/2013-47.

Volney Zanardi Junior  
 Presidente

Brasília, 17 de março de 2014.

## ANEXO B - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPR



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 794

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

### CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".


**PROCESSO:** 23075.011375/2014-31

**APROVADO:** 22/05/2014 – R.O. 04/2014

**TÍTULO:** Investigação farmacológica de extratos vegetais utilizados popularmente – ênfase em atividades antinociceptiva e anti-inflamatória

**AUTORES:** Deise Prehs Montrucchio, Fernanda Maria Martins Ocampos, Daniella Maria Soares de Oliveira, Ana Flávia Schwabe Duarte, Mariana Saragiotto Krause, Vinicius Bednarczuck de Oliveira, Luciane Dalarmi

**DEPARTAMENTO:** Farmácia (Setor de Ciências da Saúde)

  
Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio  
Coordenador da CEUA

**ANEXO C – DECLARAÇÃO DE FORNECIMENTO DE ANIMAIS**


Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pro-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Centro de Criação de Animais de Laboratório


**DECLARAÇÃO DE  
FORNECIMENTO DE ANIMAIS**

Declaramos que foram fornecidos 30 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss albino, machos, nascidos entre os dias 18/08/2015 e 25/08/2015, para fins de pesquisa, pelo sistema de permuta,

Para Ana Flávia Schwab Duarte, CPF [REDACTED]

Os mesmos foram entregues em condições sanitárias adequadas.

  
Candido José Thomaz Pereira  
Coordenador do Biotério Central  
PUCPR

  
Rafael Zotz  
Responsável do Biotério  
Central - PUCPR

Ana Flávia Schwab Duarte  
Curitiba, 30 de setembro de 2015.