



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. & Scthdl. (Rubiaceae)

Ana Flávia Schvabe Duarte^{1*}, Beatriz Cristina Konopatzki Hirota¹, Vinicius Bednarczuk de Oliveira¹, Ranieri Campos¹
Fabio Seigi Murakami³, Marilis Dallarmi Miguel², Obdulio Gomes Miguel¹.

¹Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Laboratório de Fitoquímica, Curitiba, PR, Brasil.

²Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Laboratório de Farmacotécnica, Curitiba, PR, Brasil.

³Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Laboratório de Controle de Qualidade II, Curitiba, PR, Brasil.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano do extrato bruto e frações obtidas das cascas do caule da espécie *Guettarda uruguensis*. Os ensaios antioxidantes indicaram alto potencial antioxidante. No ensaio de redução de fosfomolibdênio, a fração acetato de etila apresentou atividade antioxidante de 41,67% em relação ao padrão de ácido ascórbico e superou em 35,21% a atividade do padrão rutina. No ensaio de redução do DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), a fração acetato de etila apresentou um IC_{50} de 10,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valor próximo ao do ácido ascórbico ($IC_{50} = 4,78 \mu\text{g mL}^{-1}$) e da rutina ($IC_{50} = 6,62 \mu\text{g mL}^{-1}$). Pelo ensaio de TBA (ácido tiobabúrico) o extrato bruto (IA = 71,48%) e a fração hexano (IA = 47,85%) apresentaram índices superiores ao controle de BHT (butil hidroxi tolueno) (IA = 42,66). Através do ensaio de microdiluição em placas, foi observado que o extrato bruto e frações apresentaram atividade antimicrobiana. O estudo fitoquímico qualitativo revelou a presença de alcaloides, cumarinas, esteroides e/ou triterpenos, heterosídeos saponínicos, taninos e aminogrupos.

Palavras-chave: *Guettarda uruguensis*. Antioxidante. Antimicrobiano.

INTRODUÇÃO

Registros históricos relatam que desde 4.000 a.C. o homem utiliza as plantas medicinais para o tratamento de várias doenças (Cowen & Helfand, 1990). Durante as últimas décadas, o conhecimento empírico de diversas civilizações sobre as propriedades medicinais de substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas tem sido comprovado (Cragg & Newman, 2013).

A oxidação é um processo natural dos organismos para a produção de energia. Por outro lado, uma produção descontrolada de radicais livres (ROS/RNS) está envolvida no aparecimento de muitas doenças, como artrite, aterosclerose, câncer e Parkinson (Halliwell, 1996). No sentido de amenizar as patologias geradas por meio de uma produção excessiva e descontrolada de radicais livres, tem-se observado uma busca crescente por novas fontes de antioxidantes obtidos a partir de produtos naturais.

Sabe-se que a vida é mutável desde a publicação de Darwin: *A Origem das Espécies*. Devido a isso, novos tipos de bactérias e resistência aos antimicrobianos vêm aparecendo, tornando importante a pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias que aprimorem os tratamentos correntes. Portanto, os produtos naturais se tornam uma fonte alternativa, uma vez que esse tipo de atividade é descrita para vários metabólitos secundários como terpenos, compostos nitrogenados e polifenóis (Guimarães *et al.*, 2010; Simões *et al.*, 2004).

O Brasil é o país de maior biodiversidade (aproximadamente 20% do total mundial) que, associado à grande diversidade cultural possui um rico conhecimento tradicional associado as plantas medicinais (Brasil, 2006).

O gênero *Guettarda* é composto por aproximadamente 1₅₀ espécies extensamente distribuídas em regiões neotropicais e tropicais. Está inserido na família Rubiaceae, tribo Guettardeae (Achille *et al.*, 2006).

Diversas espécies do gênero *Guettarda* são utilizadas popularmente no tratamento de afecções clínicas como: reumatismo, dor pélvica, malária, disenteria, febre, epilepsia, tosse, resfriado, dor de garganta, transtornos pós-parto,

Autor correspondente: Ana Flávia Schvabe Duarte, Laboratório de Fitoquímica - Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Paraná (UFPR) Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CEP.80210-170 - Curitiba - PR - Brasil. e-mail:anaduarte@ufpr.br

enxaqueca, diabetes, hepatite, cólica menstrual, constipação, hipoglicemiante, tifo, inflamação, contrações e/ou cólicas gastrointestinais (Agra, 2008; Albuquerque *et al.*, 2007; Capasso *et al.*, 1998; Ferreira, 2009; Grenand, 2004; Kaou, 2008; Seplantec, 1979; Weiner, 1971; Weiner, 1984).

Estudos biológicos indicam que as espécies do gênero *Guettarda* possuem atividades como: antiespasmódico (Capasso *et al.*, 1998), hipoglicemiante (Souza *et al.*, 1984), anti-inflamatório (Testa *et al.*, 2012; Pina *et al.*, 2012), antimicrobiano (Bispo *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 1984), antifúngico (Thamizhvanan *et al.*, 2010), larvicida (Moura, 2006), antioxidante (Oliveira *et al.*, 2008), antiviral (Barros *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2013), antidiarreico (Gandhimathi *et al.*, 2009) antiépilético (Arumugam *et al.*, 2009), antiulceroso (Reedy *et al.*, 2010).

Em revisão sobre o perfil fitoquímico do gênero *Guettarda*, foi identificada a presença de alcaloides, triterpenos, iridoides, secoiridoides, derivados do ácido quínico, um fitoesteróide e o ácido chiquímico (Lima, 2008). De 2008 até 2013 foram identificadas saponinas triterpênicas (Oliveira *et al.*, 2008), triterpenos (Lima *et al.*, 2009; Testa *et al.*, 2012); uma nova substância, denominada guettardionoside (Cai *et al.*, 2011), esteroides, e a identificação, até então inédita para o gênero, dos ácidos clétrico, oleanólico, pomólico (Testa *et al.*, 2012), um novo iridóide, denominado guettardodiol, além de um secoiridóide, sarracenin (Moura *et al.*, 2011).

Guettarda uruguensis, espécie conhecida popularmente como veludinho, é uma planta ornamental, indicada para a composição de reflorestamentos heterogêneos destinados a recuperação da vegetação de áreas degradadas (Lopes & Gonçalves, 2012). Possui frutos comestíveis, considerados agradáveis como “fruto de recurso ou de sobrevivência”, consumidos diretamente ou na forma de licores. Possui flores extremamente aromáticas (Kinupp, 2007). É considerada uma espécie potencialmente alimentícia (Corrêa & Penna, 1984; Kunkel, 1984).

Observado que algumas espécies do gênero são utilizadas popularmente com finalidades medicinais, com reconhecidas atividades biológicas, e considerando a escassez de estudos sobre potenciais atividades biológicas de *Guettarda uruguensis*, espécie nativa do Brasil, este trabalho teve como principal objetivo investigar a potencial atividade antioxidante e antimicrobiana, assim como a composição química das cascas do caule do vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal foi coletado no campus Jardim Botânico – Universidade Federal do Paraná e identificado pela exsicata MBM 342335 pertencente ao Herbário do Museu Botânico de Curitiba.

A partir do material vegetal coletado (1190g) foi realizada a triagem por meio da separação manual das cascas do caule, que posteriormente foram secas em estufa a uma temperatura de 50°C e trituradas em moinho de facas.

Parâmetros farmacognósticos

As metodologias utilizadas para a determinação de perda por dessecação (método gravimétrico) e a determinação quantitativa das cinzas totais foram realizadas conforme descrito pela Farmacopeia Brasileira (2010).

Para determinar a perda por dessecação as cascas do caule foram trituradas até a formação de um pó fino. Em seguida, sua massa (1 g) foi pesada em papel de filtro chato, previamente dessecado durante 30 minutos, utilizando balança analítica. Após a pesagem o mesmo foi colocado em estufa à temperatura de 105°C por 5 horas. Depois de arrefecida à temperatura ambiente em dessecador, foi submetida a nova pesagem até a obtenção do peso constante. A percentagem de perda por dessecação foi obtida pela equação:

$$P(\%) = \frac{Pu - Ps}{Pa}$$

Onde: Pu representa o peso do papel de filtro contendo a amostra antes da dessecação, Ps o peso do papel de filtro contendo a amostra após a dessecação em estufa, e Pa o peso da amostra.

Para a determinação quantitativa de cinzas totais foi pesado 1 g de cascas do caule pulverizadas e em seguida, transferidas para cadinho de porcelana previamente calcinado, arrefecido e pesado. Em seguida, a amostra foi incinerada a temperatura de 600°C. A percentagem de cinzas foi calculada em relação à matéria-prima vegetal seca.

Para as determinações de perda por dessecação e cinzas totais as análises foram realizadas em sextuplicata e os resultados são expressos em percentagem (%p/p) ± desvio padrão.

Para determinar o rendimento do processo de extração e de particionamento, o extrato bruto etanólico e as frações provenientes deste foram concentrados à secura em evaporador rotatório. O peso do extrato e das frações foi determinado e seu rendimento calculado em percentagem, em relação à quantidade de material vegetal seco de partida utilizado para a extração.

Preparo do extrato bruto e frações

O extrato bruto etanólico foi preparado a partir de 1190 g de material vegetal. A extração foi realizada a quente, a temperatura de aproximadamente 78°C, em sistema fechado por meio de aparelho de Soxhlet utilizando como líquido extrator etanol 96°GL. O extrato bruto etanólico obtido foi filtrado a vácuo em funil de Büchner sendo sequencialmente concentrado até a evaporação do etanol utilizando evaporador rotatório com pressão reduzida a temperatura de 78°C e 1₅₀ rpm.

Em seguida o extrato bruto obtido foi particionado por meio de aparelho de Soxhlet modificado (Carvalho *et al.*, 2009), utilizando solventes (PA) em escala crescente de polaridade. Foram obtidas as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente.

O extrato bruto etanólico e frações obtidas foram evaporadas em banho-maria a 50°C até a secura, acondicionadas ao abrigo da luz e armazenadas a 5°C.

Estudo fitoquímico

A identificação qualitativa dos grupos químicos foi 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 (Moreira, 1979; Simões *et al.*, 2004).

O extrato hidroalcolóico a 20% (m/v) foi obtido a partir do material vegetal triturado e macerado em etanol 70% (v/v) em banho-maria a 60°C por 1 h e filtrado. Em seguida foi realizado o particionamento por meio de escala crescente de polaridade, obtendo-se as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcolóica. Nessas frações foi analisada a presença/ausência de alcaloides, leucoantocianidinas, flavonoides, cumarinas, iridoides, antraquinonas e esteroides/triterpenos.

O extrato aquoso a 20% (m/v) foi obtido a partir do material vegetal macerado com água destilada em banho-maria a 60°C por 1h e filtrado. Nesse extrato foi analisada a presença/ausência de glicosídeos antocianícos e cianogénéticos, saponinas, taninos e aminogrupos.

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada através do ensaio de microdiluição em placas, utilizando metodologia descrita na CLSI (2005) com modificações. O extrato bruto e frações foram testados nas concentrações entre 1000 e 7,8 g mL⁻¹ frente aos microorganismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 2785), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Candida albicans* (ATCC 10231). Os inóculos foram preparados a partir de culturas recentes (24 horas) de cada microorganismo e a padronização (108 UFC/mL) foi determinada comparando-se à escala 0,5 de McFarland. Os microorganismos foram inoculados na presença dos extratos em estufa bacteriológica a 36 ± 1°C por 24 horas quando bactéria e 48 horas para levedura.

Após o período de incubação 10 L de solução reveladora de cloreto de trifênil tetrazolium (0,5% v/v) foram adicionados aos poços e a microplaca foi incubada novamente por um período de três horas. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato capaz de inibir crescimento observável. Os testes foram realizados em triplicata utilizando-se cloranfenicol 30 g mL⁻¹ e cetoconazol 50 g mL⁻¹ como controle positivo.

*Avaliação da atividade antioxidante**Método de redução do complexo fosfomolibdênio*

A atividade antioxidante total foi determinada através do método da redução do complexo fosfomolibdênio descrito por Prieto *et al.* (1999). A atividade antioxidante de cada amostra foi comparada à atividade do ácido ascórbico e da rutina. Para cada amostra analisada foi preparada uma solução metanólica 200 g mL⁻¹. 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). Os tubos foram incubados em banho-maria a 95°C por noventa minutos e, após resfriamento, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro UV no comprimento de onda de 695 nm. Como branco foi utilizado 0,3 mL de metanol adicionado de 3 mL do reagente.

A atividade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR) em relação aos padrões, conforme a equação:

$$AAR\% \text{ controle} = \left(\frac{AbsA - AbsB}{AbsP - AbsB} \right) \times 100$$

Onde: *AbsA* representa a absorbância da amostra, *AbsB* a absorbância do branco e *AbsP* a absorbância do padrão.

Método do sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

O potencial de redução do radical DPPH foi determinado segundo o proposto por Mensor *et al.* (2001). Foram preparadas soluções metanólicas das amostras e dos padrões (rutina e ácido ascórbico) em diferentes concentrações, das quais alíquotas de 2,5 mL foram adicionadas a 1 mL de solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol mL⁻¹. Para cada amostra foi utilizado um branco contendo 2,5 mL da solução e 1 mL de metanol para cada concentração. Como controle negativo foi utilizado 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. O ensaio foi realizado a temperatura ambiente e após 30 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518 nm.

A atividade sequestrante do radical DPPH foi obtida por meio da porcentagem de atividade antioxidante (AA), conforme a equação:

$$\% \text{ inibição do DPPH} = 100 - \left(\frac{AbsA - AbsB}{AbsC} \right) \times 100$$

Onde: *AbsA* representa a absorbância da amostra, *AbsB* a absorbância do branco e *AbsC* a absorbância do padrão.

A fim de comparar os resultados obtidos foi estabelecida a IC50, calculada por regressão linear. No intervalo linear foi estabelecida a equação do tipo $y = ax + b$, sendo determinada para cada amostra analisada os valores de IC50.

Método de determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A determinação de TBARS foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Moraes *et al.* (2006), com adaptações. Foram utilizadas concentrações de 1000 ppm da amostra e butil hidroxi tolueno (BHT) como padrão. Todo o procedimento foi realizado em quadruplicata. Para o preparo da fonte de lipídeos foi utilizada gema de ovo previamente separada da clara e filtrada, sendo em seguida solubilizada em SDS. Em tubos de ensaio foram adicionados 100 µL da amostra, 400 µL de água destilada,

500 µL da solução da gema 5%, 1500 µL da solução de TBA 0,4%. O material foi submetido a banho-maria a 95°C por uma hora. Após resfriamento do material, foram adicionados a cada tubo 1500 µL de n-butanol a fim de se extrair o material lipídico. Em seguida, os tubos foram centrifugados durante três minutos a 3000 rpm e os sobrenadantes foram utilizados para realizar a leitura em espectrofotômetro a 532 nm.

Os resultados foram expressos pelo índice antioxidante (IA) obtido conforme a equação:

$$IA\% = \left(1 - \frac{AbsA}{AbsC}\right) \times 100$$

Onde: *AbsA* representa a absorbância da amostra e *AbsC* absorbância do controle.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, avaliando-se as diferenças entre as concentrações e entre as amostras pelo teste de Tukey, sendo estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Parâmetros farmacognósticos

A fim de estabelecer parâmetros mínimos de qualidade para o material vegetal, foram determinados o teor de umidade $7,0566 \pm 0,343\%$ e cinzas totais $2,0633 \pm 0,427\%$.

Com relação ao processo de extração, foram avaliados o rendimento do extrato bruto etanólico (5,2%) e frações: hidroalcoólica remanescente (2,182%), diclorometano (1,3188%), acetato de etila (0,7953%) e hexano (0,6%).

Estudo fitoquímico

Os grupos de metabólitos secundários detectados nas frações do extrato hidroalcoólico foram: alcaloides, esteroides e/ou triterpenos. Para o extrato aquoso os grupos detectados foram: heterosídeos saponínicos, taninos e aminogrupos.

Atividade antimicrobiana

Todas as amostras demonstraram atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. epidermidis* e *C. albicans*. A fração hidroalcoólica remanescente apresentou concentração mínima inibitória de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente a *S. epidermidis*.

Exceto a fração acetato de etila, que apresentou inatividade frente a *P. aeruginosa*, todas as demais amostras demonstraram moderada atividade antibacteriana (Tabela 1).

Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante, nos três métodos avaliados (fosfomolibdênio, DPPH e TBARS) foi bem expressiva (Tabela 2). Considerando a atividade antioxidante da rutina e do ácido ascórbico como padrão de referência, a fração acetato de etila apresentou o melhor desempenho com atividade antioxidante de 41,67% em relação ao ácido

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana de extrato bruto e frações de *Guettarda uruguensis* Cham. & Schtdl. (Rubiaceae) frente a diferentes microorganismos

| Amostra | Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | | | | |
|---------|--|-----------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
| EB | 1000 | 500 | - | 250 | 500 |
| FHEX | 100 | 250 | - | 250 | 250 |
| FDCM | 100 | 250 | - | 250 | 250 |
| FAE | - | 250 | - | - | 250 |
| FHR | - | 100 | - | 500 | 500 |

EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FDCM: fração diclorometano; FAE: fração acetato de etila; FHR: fração hidroalcoólica remanescente.

Tabela 2 – Atividade antioxidante de extrato bruto e frações de *Guettarda uruguensis* Cham. & Schtdl. (Rubiaceae) obtida pelo método do fosfomolibdênio, DPPH e TBARS.

| Amostra | AA em relação a rutina (%) | AA em relação ao ácido ascórbico (%) | IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$) x± dp | IA% |
|-----------------|----------------------------|--------------------------------------|---|--------|
| EB | 89,2 | 27,49 | 15,98±0,0026 | 71,48 |
| FHEX | 74,8 | 23,05 | 353,5353±0,0026 | 47,85 |
| FDCM | 97,95 | 30,19 | 54,3478±0,0065 | 36,6 |
| FAE | 135,21 | 41,67 | 10,9122±0,0066 | 23,05 |
| FHR | 71,34 | 21,98 | 24,1470±0,0204 | 26,54 |
| Ácido Ascórbico | | | 4,7780±0,0040 | |
| Rutina | | | 6,6228±0,0027 | |
| BHT | | | | 42,675 |

EB: extrato bruto; FH: fração hexano; FDCM: fração diclorometano; FAE: fração acetato de etila; FHR: fração hidroalcoólica remanescente.

ascórbico, e quando comparada à rutina, um flavonoide de reconhecida ação antioxidante, ela se mostrou ainda mais ativa, superando em 35,21% a atividade da mesma, sendo, portanto o resultado mais promissor. A fração diclorometano também demonstrou uma relevante atividade antioxidante, atingindo 97,95% da atividade antioxidante exibida pelo padrão rutina, e 30,19% de atividade antioxidante em relação ao ácido ascórbico.

Comparando os valores de IC₅₀ obtidos no ensaio do DPPH para as amostras e padrões analisados (ácido ascórbico com IC₅₀ = $4,7780 \mu\text{g mL}^{-1}$; rutina com IC₅₀ = $6,6228 \mu\text{g mL}^{-1}$) observamos que a fração acetato de etila apresentou o melhor desempenho (IC₅₀ = $10,9122 \mu\text{g mL}^{-1}$), seguido do extrato bruto etanólico (IC₅₀ = $15,98 \mu\text{g mL}^{-1}$). No ensaio de TBARS todas as amostras foram capazes de diminuir a lipoperoxidação. De acordo com os dados obtidos, o extrato bruto etanólico (IA = 71,48%) foi mais eficaz contra a lipoperoxidação, seguido da fração hexano (IA = 47,85%). Tanto o extrato bruto etanólico quanto a fração hexano apresentaram índices superiores ao controle BHT (IA = 42,675).

DISCUSSÃO

O teor de umidade residual foi estabelecido pela perda por dessecação, que indicou um valor abaixo ($7,0566 \pm 0,343$), porém próximo ao estabelecido ($8,14\%$) ao estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (2010). Dessa maneira preservou-se a estabilidade química e biológica do material vegetal, uma vez que um alto teor de umidade pode proporcionar o desenvolvimento de fungos e bactérias, hidrólise e atividade enzimática com consequente deterioração dos constituintes químicos.

O resultado da determinação de cinzas totais ($2,0633 \pm 0,427\%$) apresentou-se abaixo do limite máximo de 14% , que é um valor estabelecido para diversas drogas vegetais descritas na Farmacopeia Brasileira (2010), indicando dessa forma que estas não possuem excesso de substâncias aderentes de origem terrosa que poderiam estar presentes como contaminantes.

Os resultados obtidos nos ensaios de análise farmacognóstica contribuem no processo de padronização de parâmetros de qualidade para as cascas do caule da espécie *G. uruguensis* devido à ausência de limites estabelecidos na literatura para essa espécie.

O resultado do estudo fitoquímico qualitativo indicou, por meio de reações características, a presença de heterosídeos saponínicos (teste de formação de espuma), esteroides e/ou triterpenos (Lieberman-Burchard) e alcaloides (Mayer, Dragendorff, Bertrand) revelando perfil químico semelhante ao encontrado para outras espécies do gênero.

Com relação ao uso de produtos naturais antimicrobianos não existe unanimidade sobre o nível de inibição aceitável quando estes são comparados ao de antibióticos conhecidos (Aligianis *et al.*, 2001; Duarte, 2006). De acordo com o critério de Holetz *et al.* (2002), concentrações abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentam boa atividade antimicrobiana, entre 100 - $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ moderada e entre 500 e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ fraca atividade, com pouca valia no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas.

A avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana indicou que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis. A maior sensibilidade das Gram-positivas pode estar relacionada as diferenças na composição química, principalmente de parede bacteriana, o que pode ter dificultado a ação dos produtos antimicrobianos testados contra bactérias Gram-negativas.

As espécies Gram-negativas avaliadas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) demonstraram diferentes padrões de sensibilidade. A *E. coli* não foi sensível a nenhuma amostra avaliada, enquanto que *P. aeruginosa* demonstrou moderada sensibilidade frente ao extrato bruto e frações hexano, diclorometano e hidroalcoólica remanescente ($\text{CIM } 250$ - $500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esse resultado sugere que os metabolitos não interferiram no metabolismo básico, para reprodução, da *E. coli* mesmo com uma permeabilidade muito maior da membrana celular devido a composição de suas porinas (Nikaido, 2003). Portanto, a bactéria demonstrou resistência a esta ação antimicrobiana.

Em avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana da espécie *G. uruguensis* (Kelmer *et al.*, 2011) observou-se para o extrato bruto atividade frente a bactéria *S. aureus* ($\text{CIM } 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *E. coli* ($\text{CIM } 500 \mu\text{g mL}^{-1}$). Foram ativas frente a *S. aureus* as frações clorofórmica e hidroalcoólica remanescente, ambas apresentando $\text{CIM } 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Frente a *C. albicans* somente a fração clorofórmica se mostrou ativa ($\text{CIM } 500 \mu\text{g mL}^{-1}$).

A não semelhança da 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).

Avaliando a atividade antioxidante, a fração acetato de etila apresentou os melhores resultados quando avaliada pelo método do fosfomolibdênio e DPPH. No método do TBARS o extrato bruto demonstrou um índice antioxidante bem superior ao controle.

Segundo Schroeter *et al.* (2000) a hidrofília dos compostos deve ser considerada em ensaios de lipoperoxidação, uma vez que a baixa polaridade e alto coeficiente de partição de compostos lipofílicos permitem uma melhor interação com a matriz lipídica promovendo proteção ao dano. Dessa forma, podemos sugerir que os desempenhos superiores ao padrão BHT apresentados pelo extrato bruto e pela fração hexano utilizando o modelo do TBARS sejam atribuídos às características majoritariamente lipofílicas dessas amostras.

Oliveira *et al.* (2008) avaliaram pelo método do DPPH a espécie *Guettarda pohliana* sendo que o extrato bruto ($\text{IC}_{50} = 55,52 \mu\text{g mL}^{-1}$) e a fração acetato de etila ($\text{IC}_{50} = 33,31 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram os melhores potenciais antioxidantes quando comparados ao padrão BHT ($\text{IC}_{50} = 16,90 \mu\text{g mL}^{-1}$). Observamos que nestas espécies os compostos com maior potencial antioxidante estão solúveis no solvente de média polaridade, o acetato de etila, e que é possível que os compostos presentes no extrato bruto tenham uma ação sinérgica contribuindo para alto potencial antioxidante apresentado.

Os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes demonstram que diferentes mecanismos de ação estão envolvidos entre os compostos com características antioxidantes presentes nestes materiais e os reagentes destas técnicas, apresentando maior ou menor afinidade por estes, conforme foi descrito por Sánchez-Moreno (2002) e Vasconcelos *et al.* (2007).

O estudo antimicrobiano demonstrou uma tendência de moderada a boa frente as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), em pelo menos três frações (hexano, diclorometano e hidroalcoólica remanescente). Visto que a composição da flora bacteriana da superfície

cutânea do corpo humano é composta por estas bactérias Gram-positivas, que muitas vezes são elas as responsáveis por processos patológicos, torna-se interessante a identificação dos compostos responsáveis por estes efeitos.

Observada a existência de atividade antioxidante significativa e seguindo a tendência de substituir ou associar antioxidantes sintéticos aos provindos de fontes naturais, observamos que a espécie *G. uruguensis* demonstrou ser uma fonte promissora destes. Dessa maneira, verifica-se a relevância da identificação dos compostos responsáveis por estes efeitos, no sentido de contribuir para o processo de obtenção de antioxidantes oriundos de produtos naturais.

AGRADECIMENTOS

Ao Osmar dos Santos Ribas, curador do herbário do Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba (MBM), pela identificação da espécie vegetal. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

ABSTRACT

Assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of the crude ethanolic extract and organic fractions obtained from the stem bark of the specie Guettarda uruguensis Cham. & Schtdl. (Rubiaceae)

This main purpose of this study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant effects of the crude extract and fractions obtained from the stem bark of the plant species. The antioxidant assays indicated high antioxidant capacity. In the reduction assay of the phosphomolybdenum, the ethyl acetate fraction showed antioxidant activity of 41.67% compared to standard ascorbic acid and exceeded in 35.21% the activity of the standard rutin. In the reduction assay of the DPPH (2,2-diphenyl¹-picrylhydrazyl), the ethyl acetate fraction showed an IC₅₀ of 10.91 µg mL⁻¹, equivalent to the ascorbic acid (IC₅₀ = 4.78 µg mL⁻¹) and rutin (IC₅₀ = 6.62 µg mL⁻¹). By the TBA (thiobarbituric acid) assay the crude extract (IA = 71.48%) and hexane fraction (IA = 47.85%) had an index higher than the control of BHT (butyl hydroxy toluene) (IA = 42.675). Through of assay of microdilution on plates was verified that the crude extract and fractions showed antimicrobial activity. The qualitative phytochemical study revealed the presence of alkaloids, coumarins, steroids and/or triterpenoids, saponin glycosides, tannins and amino groups.

Key words: *Guettarda uruguensis*. Antioxidant effect. Antimicrobial activity.

REFERÊNCIAS

Achille F, Motley TJ, Lowry II PP, Jérémie J. Polyphyly in *Guettarda*. (Rubiaceae, Guettardeae) based on nrDNA its sequence data. *Ann Missouri Bot Gard*. 2006;93:103-21.

Agra MF, Silva KN, Basílio JLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18(3):472-508.

Albuquerque UP, Monteiro JM, Ramos MA, Amori E.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J Ethnopharmacol*. 2007;110(1):76-91.

Aligianis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two Origanum species. *J Agric Food Chem*. 2001;49(9):4168-70.

Arumugam S, Palanivelu A, Retnasamy G, Ramaiyan D. Study on the Antiseizure Activities of Inner Bark of *Guettarda Speciosa* (L.). *IJPT*. 2009;8(2):73-6.

Barros AV, Araújo LM, Schmitt AC, Simoni IC, Fernandes MJB. Atividade antiviral *in vitro* de *Guettarda angelica* frente aos herpes vírus bovino e suíno. *J Bras Fitomed*. 2007;5:154.

Barros AV, Conceição AO, Simoni IC, Padilla MA, Fernandes MJB, Arns CW. *In vitro* antiviral activity of seeds from *Guettarda angelica* against avian viruses. *J App Pharm Sci*. 2013;3(7):31-3.

Bispo NJ, Francisco NMC, Schmitt AC. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato metanólico da planta *Guettarda* angélica sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas. *Laes Haes*. 2007;4:164-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, 2006.

Cai WH, Matsunami K, Otsuka H, Shinzato T, Takeda Y. A glycerol α -D-glucuronide and a megastigmane glycoside from the leaves of *Guettarda speciosa* L. *J Nat Med*. 2011;65:364-9.

Capasso A, Balderrama L, Sivila SC, De Tommasi N, Sorrentino L, Pizza C. Phytochemical and pharmacological studies of *Guettarda acreana*. *Planta Med*. 1998; 64(4):348-52.

Carvalho JLS, Cunico MM, Dias JFG, Miguel MD, Miguel OG. Term-stability of extractive processes from *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae for Soxhlet modified system. *Quim Nova*. 2009;32(4):1031-5.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 15º Suplemento informativo. M100-S15. 2005;25(1).

Corrêa MP, Penna LA. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal; 1984.

Cowen DL, Helfand WH. Pharmacy: an illustrated history. New York, NY: Harry N. Abrams; 1990.

- Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source for novel drug leads. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(6):3670-95.
- Duarte MCT. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *MultiCiência: Rev Interdisciplinar Centros e Núcleos da Unicamp*. 2006;7:1-16.
- Farmacopéia Brasileira. 5. ed. v.1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA; 2010.
- Ferreira AC. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonical coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). *J Ethnopharmacol*. 2009;126:159-75.
- Gandhimathi R, Saravana KA, Senthil-Kumar KK, Kusuma PK, Uma MJ. Pharmacological studies of anti-diarrhoeal activity of *Guettarda speciosa* (L.) in experimental animals. *J Pharm Sci Res*. 2009;1(2):61-6.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP. Medicinal Plants: Factors of influence on the content of secondary metabolites. *Quim Nova*. 2007;30:374-81.
- Grenand P, Moretti C, Jacquemin H, Prévost M-F. *Pharmacopées traditionnelles en Guyane Créoles, Wayapi*. Palikur. Paris: Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (ORSTOM); 2004.
- Guimarães DD, Momesso LS; Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím Nova* 2010;33(3):667-79.
- Halliwel B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*. 1996;16:33-50.
- Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem I Oswaldo Cruz*. 2002;97:1027-31.
- Kaou AM, Mahiou-Leddet V, Hutter S, Ainouddine S, Hassani S, Yahaya I, Azas N, Ollivier E. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2008;116:74-83.
- 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 Maringense de Biologia / XXVI Semana de Biologia, Maringá; 2011.
- Kinupp VF. 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.
- Kunkel G. *Plants for human consumption: An Annotated Checklist of the Edible Phanerogams and Ferns*. Koenigstein: Koeltz Scientific Books; 1984.
- Lima GS, Moura FS, Lemos RPL, Conserva LM. Triterpenos de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae). *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19:284-9.
- Lima GS. Estudo químico biomonitorado de extratos das folhas e do caule de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae). [Dissertação]. Maceió: Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas; 2008.
- Lopes SB, Gonçalves L. Elementos para aplicação prática das árvores nativas do sul do Brasil na conservação da biodiversidade. 18 p. Acesso em: 29 nov. 2012. Disponível em: <http://www.fzb.rs.gov.br>.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitao GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, Leitao SG. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res*. 2001;15(2):127-30.
- Morais SM, Catunda-Jr EA, Silva ARA, Martins-Neto JS. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. *Quim Nova*. 2006;29:907-910.
- Moreira EA. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. *Trib Farm*. 1979;47(1):1-19.
- Moura FS, Lima GS, Meneghetti MR, Lyra Lemos RP, Conserva LM. A new iridoid from *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae). *Nat Prod Res*. 2011;25(17):1614-20.
- Moura FS. Estudo Químico e Avaliação das Atividades Antimalárica, Larvicida, Antioxidante e Anticolinesterásica de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae). [Dissertação]. Maceió: Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade de Alagoas, 2006.
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67:593-656.
- Oliveira PRN, Testa G, de Sena SB, da Costa WF, Sarragiotto MH, Santin SMO, de Souza MC. Saponinas triterpênicas das raízes de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Quím Nova*. 2008;31(4):755-8.
- Pina EML, Araújo FWC, Souza IA, Bastos IVGA, Silva TG, Nascimento SC, Militão GCG, Soares LA, Xavier HS, Melo SJ. Pharmacological screening and acute toxicity of bark roots of *Guettarda platypoda*. *Rev Bras Farmacogn*. 2012;22(6):1315-22.
- 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. *Anal Biochem*. 1999;269:337-41.
- Reedy TSK, Kumar AS, Gandhimathi R. Evaluate the antiulcerogenic properties of *Guettarda speciosa* (L.) in experimental animals. *Int J Biopharm*. 2010;1(1):1-6.

Sánchez-Moreno C. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int.* 2002;8(3):121-37.

Schroeter H, Williams R J, Matin R, Iversen L, Rice-Evans CA. Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:1222-33.

Seplantec, Subsecretaria de Ciência e Tecnologia. Inventário de plantas medicinais do Estado da Bahia. Salvador, 1979.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5th ed. UFRGS/UFSC: Porto Alegre (RS)/ Florianópolis (SC), Brazil, 2004.

Sousa MP, Matos MEO, Machado MIL, Braz-Filho R, Vencato I, Mascarenhas YP. Triterpenoids from *Guettarda angelica*. *Phytochemistry.* 1984;23:2589-92.

Testa G, Oliveira PRN, Silva CC, Schuquel ITA, Santin SMO. Constituintes químicos das folhas e avaliação anti-inflamatória de extratos das raízes e folhas de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). *Quim Nova.* 2012;35(3):527-9.

Thamizhvanan K, Pavan KP, Thanuja B, Madhu MD, Krishnakishore P, Praven K. Antibacterial and antifungal activities of various extracts of *Guettarda speciosa* L. *Inter J Phytopharmacol.* 2010;1(1):20-2.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007;30(5):1323-38.

Weiner MA. *Ethnomedicine in Tonga.* *Econ Bot.* 1971;25:423-50.

Weiner MA. *Secrets of Fijian Medicine.* Fiji Govt. Printer, Suva, Fiji. 1984.

Recebido em 16 de setembro de 2013

Aceito em 19 de novembro de 2013