

CONSTITUÍNTES QUÍMICOS DAS FOLHAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS DAS RAÍZES E FOLHAS DE *Guettarda pohliana* MÜLL. ARG. (RUBIACEAE)

Gláucio Testa, Paulo Roberto Neves de Oliveira, Cleuza Conceição da Silva, Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel e Silvana Maria de Oliveira Santin*

Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Lucília Kato e Cecília Maria Alves de Oliveira

Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus II- Samambaia, CP 131, 74001-970 Goiânia - GO, Brasil

Laura Lícia Milani de Arruda e Ciomar Aparecida Bersani-Amado

Departamento de Farmacologia e Terapêutica, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

Recebido em 27/5/11; aceito em 12/9/11; publicado na web em 3/11/11

CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE LEAVES AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY EVALUATION OF EXTRACTS OF ROOTS AND LEAVES OF *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (RUBIACEAE). This phytochemical investigation of *Guettarda pohliana* leaves led to the isolation of the triterpenes pomolic acid, rotundic acid, $3\beta,6\alpha,19\alpha,23$ -tetrahydroxyurs-12-en-28-oic acid, clethric acid, ursolic acid and oleanolic acid, the monoterpenoids loliolide and secoxyloganin, besides daucosterol and steroids. The structures of the isolated compounds were assigned on the basis of NMR data, including two-dimensional NMR methods. The anti-inflammatory activity of the crude methanolic extracts from leaves and roots, as well as of their fractions, was evaluated.

Keywords: *Guettarda pohliana*; triterpenoid; anti-inflammatory activity.

INTRODUÇÃO

O gênero *Guettarda*, pertencente à tribo Guettardeae (Rubiaceae), compreende cerca de 150 espécies distribuídas em regiões tropicais e neotropicais.¹ Espécies do gênero são popularmente utilizadas na América do Sul para tratamento de ferimentos e inflamações.²

Guettarda pohliana é uma espécie arbórea conhecida vulgarmente como angélica-do-mato. As espécies brasileiras *G. platypoda* e *G. angelica*, conhecidas pelo mesmo nome vulgar, são utilizadas popularmente como antifebris e antiespasmódicos³ e possuem comprovadas atividades anti-inflamatória³ e antibacteriana,⁴ respectivamente.

Em trabalho anterior, realizado com as raízes de *Guettarda pohliana*, reportou-se o isolamento do ácido quinóvico, de saponinas derivadas dos ácidos quinóvico e cinchólico, do daucosterol e do ácido 4,5-*O*-dicafeoilquínico, bem como a atividade antioxidante do extrato bruto e de suas frações.⁵

Em continuidade ao estudo da espécie *G. pohliana*, no presente trabalho descreve-se o isolamento e identificação de seis triterpenos, um monoterpene, um derivado do ácido clorogênico, um secoiridoide e, ainda, os resultados de atividade anti-inflamatória dos extratos brutos e frações das folhas e das raízes. As estruturas das substâncias isoladas foram definidas com base na análise de dados espectroscópicos de RMN ¹H e ¹³C uni- e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY e NOESY) e a comparação dos dados obtidos com os registrados na literatura.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros de RMN (uni- e bidimensionais) foram obtidos em espectrômetro Varian, modelo Mercury plus 300, operando a 300,06 MHz para ¹H e 75,46 MHz para ¹³C. Os deslocamentos químicos são

dados em ppm, tendo como referência interna o sinal do solvente e/ou do tetrametilsilano (TMS, $\delta = 0,0$ ppm). Para as cromatografias em coluna (CC) utilizou-se gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm, Merck) ou Sephadex LH-20, como fase estacionária. Para as cromatografias em camada delgada (CCD) e em camada delgada preparativa (CCDP) empregou-se gel de sílica 60 G e 60 GF₂₅₄ (Merck). A visualização dos compostos em CCD foi realizada por irradiação com luz ultravioleta em 254 e 366 nm e/ou por pulverização com solução de H₂SO₄/MeOH (1:1), H₂SO₄/anisaldeído/ácido acético (1:0,5:50 mL) seguido de aquecimento.

Material vegetal

As folhas da espécie *Guettarda pohliana* foram coletadas em abril de 2005, às margens da bacia de inundação do alto do Rio Paraná, na região de Porto Rico/PR. A exsicata do material vegetal encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob o registro n° HUNP 3563.

Isolamento dos constituintes químicos

As folhas de *Guettarda pohliana* (558,0 g) foram secas ao ar, pulverizadas e extraídas exaustivamente com MeOH, à temperatura ambiente, fornecendo 42,1 g de extrato bruto. Parte deste extrato (23,0 g) foi solubilizado em MeOH/H₂O 1:1 e submetido à partição em hexano, CHCl₃, AcOEt, o que resultou nas frações hexânica (1,1 g), clorofórmica (2,2 g), acetato de etila (2,8 g) e hidrometanólica (14,9). Parte da fração hexânica (478 mg) foi fracionada em gel de sílica com misturas de hexano e AcOEt em ordem crescente de polaridade. A subfração hexano:AcOEt 2% (6,0 mg) resultante forneceu mistura contendo as substâncias sitosterol, estigmasterol e campesterol. A subfração hexano:AcOEt 15% (38,0 mg) foi submetida a um novo fracionamento em gel de sílica utilizando como eluentes hexano e AcOEt em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se mistura das substâncias **1** e **2**. Parte da fração clorofórmica (1,51

*e-mail: smoliveira@uem.br

g) foi fracionada em gel de sílica utilizando como eluentes hexano, hexano:AcOEt 95-10% e AcOEt. As subfrações hexano:AcOEt 20% (37 mg) e hexano:AcOEt 70% (97,6 mg) resultantes foram submetidas a novo fracionamento em gel de sílica com CHCl_3 e AcOEt em ordem crescente de polaridade, resultando no isolamento novamente das substâncias **1** (3,0 mg) e **2** (3,2 mg) e das substâncias **3** e **4** como mistura (7,0 mg), respectivamente. As subfrações hexano:AcOEt 50% e hexano:AcOEt 60%, resultantes do tratamento da fração clorofórmica, apresentaram-se como sólidos amorfos e foram lavados com acetona, resultando na obtenção dos triterpenos **5**, **6** e **7** (10 mg) como mistura e de daucosterol (5,0 mg), respectivamente. Parte da fração AcOEt (1,2 g) foi submetida a uma filtração em Sephadex LH-20 utilizando-se com eluentes H_2O ; H_2O :MeOH 25, 50 e 75% e MeOH puro, resultando no isolamento de **8** (14,8 mg) e **9** (21,0 mg). A fração hidrometanólica (5,0 g) foi dissolvida em 100 mL de H_2O /MeOH 1:1 e submetida à partição em butanol. A fração butanólica resultante (2,5 g) foi então filtrada em Sephadex LH 20 com MeOH, resultando no isolamento de **9** (46,1 mg). O extrato bruto metanólico das raízes de *G. pohliana* e as frações deste extrato foram obtidos pelo mesmo procedimento realizado para as folhas. A partir do material seco e pulverizado (700,1 g) foram obtidos 39,1 g de extrato bruto. O particionamento deste extrato (31,0 g) resultou nas frações hexânica (2,6 g), clorofórmica (3,7 g), AcOEt (6,2 g) e hidrometanólica (17,4 g).

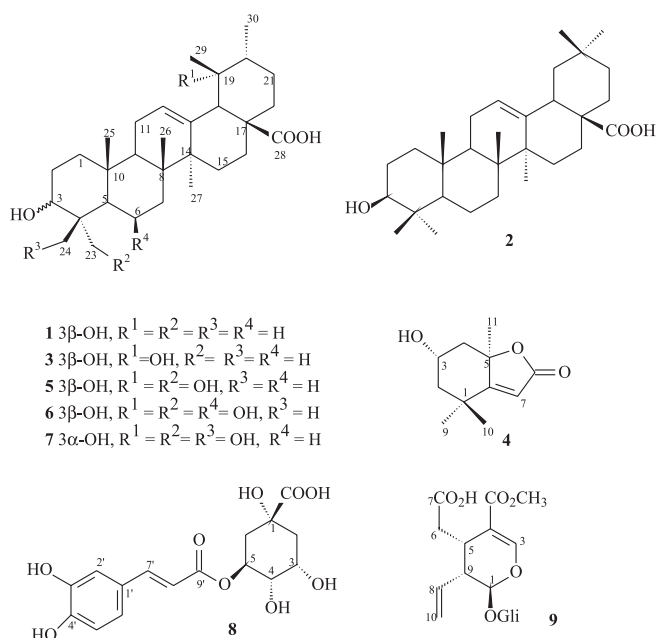
Avaliação da atividade anti-inflamatória

Empregou-se o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongo.⁶ Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas, pesando 25 g em média. O óleo de cróton foi diluído em uma solução de acetona/água 7:3 e aplicado, em concentração de 200 μg /orelha, nas faces internas das duas orelhas dos camundongos. Uma solução (20 μL) dos extratos brutos das folhas e raízes ou das suas frações foi aplicada na superfície interna da orelha esquerda (2,5 mg/orelha). A orelha direita recebeu apenas o solvente das amostras (20 μL). Após 6 h, os animais foram sacrificados e as orelhas seccionadas em discos circulares de 6 mm de diâmetro. Estas secções foram pesadas em balança analítica. Utilizou-se a indometacina como controle positivo. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm) e analisados utilizando teste de Student para comparação de duas médias, ou análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, sendo utilizado $P < 0,05$ como nível de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo fitoquímico das folhas de *G. pohliana* resultou no isolamento da mistura de esteroides β -sitosterol, estigmasterol e campesterol, dos ácidos ursólico (**1**)⁷ e oleanólico (**2**),⁷ do ácido pomólico (**3**) e loliolida (**4**) como mistura, do 3-*O*- β -glicopiranosil-24 α -etil-colesta-5-enol (daucosterol),⁸ da mistura dos triperpenos ácidos rotúndico (**5**), 3 β ,6 β ,19 α ,23-tetra-hidroxiurs-12-en-28-oico (**6**) e clétrico (**7**), do ácido 5-*O*-cafeoilquínico (**8**) e do secoiridoide secoxiloganina (**9**). As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas com base na análise dos dados espectroscópicos (RMN ^1H e ^{13}C , DEPT, COSY, HMQC, HMBC e NOESY) e por comparação com os dados disponíveis na literatura.

A mistura das substâncias **3** e **4** foi obtida da fração clorofórmica como cristais brancos. O espectro de RMN ^1H apresentou, dentre outros, dois sinais característicos de hidrogênios vinflicos em δ_{H} 5,27 (*t*, $J = 3,6$ Hz) e δ_{H} 5,74 (*s*), integrados em diferentes proporções, que indicaram a presença de duas substâncias. A análise dos dados de RMN ^1H e ^{13}C permitiu definir para a substância majoritária **3** o esqueleto triterpênico da série ursano, principalmente pelos sinais



em δ_{C} 129,5 e 140,0, relacionados aos carbonos olefínicos C-12 e C-13. Foram ainda observados sinais em δ_{C} 182,3, correspondente ao carbono da carboxila de grupo ácido, e em δ_{C} 79,8, relativo a carbono hidroximetínico. A presença de sinal em δ_{C} 73,6 referente a carbinólico terciário e o efeito de desproteção observado nos deslocamentos químicos de C-12 (δ_{C} 129,5) e C-20 (δ_{C} 43,1), quando comparados com os de **1**,⁸ além do singlete observado em δ_{H} 2,49 no espectro de RMN ^1H e atribuído ao H-18, possibilitaram inferir um grupo hidroxila na posição C-19. A comparação dos dados espectroscópicos com os da literatura^{7,9} permitiu identificar a substância **3** como o ácido pomólico.

Nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da mistura **3** e **4** ainda foram observados sinais adicionais, entre os quais, em δ_{C} 185,7; 174,1; 113,3 e 67,3, que indicaram para a substância **4** uma unidade lactônica α,β -insaturada. A comparação dos dados espectroscópicos com os da literatura¹⁰ permitiu identificar a substância **4** como sendo o isoprenoide loliolida.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C da mistura das substâncias **5**, **6** e **7** apresentaram sinais característicos de triterpenos da série ursano semelhantes ao ácido pomólico (**3**) com grupos hidroxila adicionais em seus esqueletos. A análise dos dados de RMN ^1H permitiu identificar três singletos largos em δ_{H} 5,61; 5,72 e 5,63 correspondentes aos hidrogênios vinflicos (H-12), e de três singletos em δ_{H} 3,11; 3,12 e 3,07 correspondentes a hidrogênios metínicos (H-18) para **5**, **6**, e **7**, respectivamente. Foram ainda observados sinais de duplo dupletos em δ_{H} 4,20 ($J = 11,4$ e 4,2 Hz, H-3) e 4,30 ($J = 11,4$ e 4,2 Hz, H-3), característicos de hidrogênios carbinólicos em triterpenos 3β -OH e de um singlete largo em δ_{H} 4,74 (H-3), característico de hidrogênios carbinólicos 3α -OH. Além destes, foram observados sinais adicionais na região característica de hidrogênios carbinólicos. O sinal em δ_{H} 5,08, referente a hidrogênio hidroximetínico, foi atribuído ao H-6, evidenciando a presença do grupo 6β -OH em **6**. Os pares de hidrogênios hidroximetilênicos em δ_{H} 4,07/4,43 (*d*, $J = 10,2$ Hz); 4,37/4,58 (*d*, $J = 10,8$ Hz) e 4,02/4,20 (*d*, $J = 10,5$ Hz) indicaram a presença dos grupos OH nas posições C-23 para **6** e C-23 e C-24 para **7**, respectivamente. O espectro de RMN ^{13}C apresentou sinais relacionados aos carbonos olefínicos C-12 e C-13 em δ_{C} 129,3 e 140,0 (**5**); 129,7 e 139,3 (**6**) e 129,4 e 139,9 (**7**), os sinais referentes a carbonos carbinólicos atribuídos para **5**: δ_{C} 73,8; 73,6 e 67,3; para **6**: δ_{C} 73,6; 68,2; 73,6 e 67,5; e para **7**: δ_{C} 70,8; 73,6; 68,9 e 64,8 e o sinal

em δ_C 182,3 correspondente aos carbonos carboxilícos C-28 para as três substâncias. A comparação dos dados espectroscópicos com os dados da literatura permitiu identificar as substâncias **5**, **6** e **7** como o ácido rotúndico,¹¹ o ácido 3 β ,6 β ,19 α ,23-tetra-hidroxiurs-12-em-28-oico^{4,12} e o ácido clétrico, respectivamente.¹³ O ácido rotúndico já havia sido isolado nas espécies *G. platypoda*,¹¹ *G. angelica*¹⁴ e *G. grazielae*⁴ e o triterpeno **6** já havia sido encontrado no caule de *G. grazielae*.⁴ O ácido clétrico está sendo descrito pela primeira vez no gênero, mas na família Rubiaceae já foi relatada sua presença em *Morinda citrifolia* (Noni),¹⁵ *Psychotria correae*¹⁶ e *Mussaenda pubescens*,¹³ espécies consideradas medicinais.

A substância **8** foi isolada da fração AcOEt como sólido amorfo e caracterizada como ácido 5-*O*-cafeoilquinico, através da comparação dos dados espectroscópicos de RMN com os descritos na literatura.¹⁷ No espectro de RMN ¹H de **8** foram observados sinais característicos de uma unidade cafeoila, devido à presença de dois dupletos em δ_H 7,58 e 6,32 referentes a hidrogênios olefínicos em relação de acoplamento *trans* (*d*, *J* = 15,9 Hz), além de sinais correspondentes a aromático 1,3,4-trissubstituído. A posição do grupo cafeoila em C-5 do esqueleto ácido quinico foi inferida com base no efeito de desproteção observado para H-5 (δ_H 5,33, *ddd*, *J* = 10,8; 10,8 e 4,5 Hz) quando comparado ao H-3 (δ_H 3,87, *dd*, *J* = 9,9 e 3,3 Hz), aliado às constantes de acoplamento características dos mesmos. Esta posição também foi confirmada pelo mapa de contornos HMBC através da correlação de H-5 com C-9' (δ_C 168,8).

A substância **9** foi isolada da fração hidrometanólica como um sólido amorfo e caracterizada como o secoiridoide secoxiloganina, através da comparação dos dados espectroscópicos de RMN com os descritos na literatura.¹⁸ Substâncias desta classe são consideradas marcadores quimiotaxômicos da subfamília Antirheoideae, à qual pertence o gênero *Guettarda*,¹⁹ e secoxiloganina também foi verificada em *G. platypoda*.²⁰

Ensaio de atividade anti-inflamatória foram realizados para o extrato bruto das folhas e de suas frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidrometanólica, bem como para o extrato bruto das raízes e suas frações acetato de etila e hidrometanólica. Utilizou-se o modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongo. Os resultados mostraram que a administração na dose de 2,5 mg, por via tópica do extrato bruto e frações das folhas, inibiu o edema em 65% para o extrato bruto, 68% para a fração hexânica, 38% para a fração clorofórmica, 55% para a fração acetato de etila e 46% para a fração hidrometanólica. O extrato bruto e as frações acetato de etila e hidrometanólica das raízes inibiram o edema em 46, 43 e 22%, respectivamente, com a administração da mesma dosagem.

A atividade anti-inflamatória tópica dos ácidos ursólico, oleanólico, pomólico, rotúndico e quinóvico já é bastante conhecida.²¹ A presença destas substâncias em *G. pohliana* contribui para a significativa atividade observada no extrato bruto e frações hexânica e clorofórmica provenientes das folhas. A presença dos ácidos rotúndico e quinóvico no gênero vem justificar o uso popular das espécies no tratamento de ferimentos e inflamações.

CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das folhas de *Guettarda pohliana* resultou no isolamento de esteroides, dos triterpenos ácidos ursólico, oleanólico, pomólico, rotúndico, 3 β ,6 β ,19 α ,23-tetra-hidroxiurs-12-en-28-oico e clétrico, do isoprenoide lolilolida, de daucoesterol, do ácido 5-*O*-cafeoilquinico e do secoiridoide secoxiloganina. Os extratos brutos das folhas e raízes e frações provenientes destes extratos apresentaram significativa atividade anti-inflamatória para o modelo de edema de orelha. A presença de triterpenos pentacíclicos dos tipos ursano e oleanano, e também de saponinas derivadas do ácido quinóvico, foi

verificada em outras espécies do gênero, especialmente nas plantas medicinais do nordeste brasileiro *G. angelica* e *G. platypoda*. Esta última também apresentou atividade anti-inflamatória. Em ambas estão presentes os ácidos rotúndico e quinóvico e as saponinas. Os ácidos clétrico, oleanólico e pomólico estão sendo descritos pela primeira vez no gênero.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à CAPES pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

- Achille, F.; Motley, T. J.; Lowry, P. P.; Jeremie, J.; *Ann. Missouri Bot. Gard.* **2006**, *93*, 103.
- Capasso, A.; Balderrama, L.; Sivila, S. C.; Tommasi, N. D.; Sorrentino, L.; Pizza, C.; *Planta Med.* **1998**, *64*, 348.
- Agra, M. F.; Freitas, P. F.; Barbosa-Filho, J. M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 114; Bhattacharyya, J.; de Almeida, M. Z.; *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 148.
- Lima, G. S.; Moura, F. S.; Lemos, R. P. L.; Conserva, L. M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, *19*, 284.
- Oliveira, P. R. N.; Testa, G.; Sena, S. B.; Sarragiotto, M. H.; Souza, M. C.; Costa, W. F.; Santin, S. M. O.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 755.
- van Arman, G. C.; *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **1974**, *16*, 900.
- Mahato, S. B.; Kundu, A. P.; *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1517.
- Lendl, A.; Werner, I.; Glasl, S.; Kletter, C.; Mucaji, P.; Presser, A.; Reznicek, J.; Taylor, D. W.; *Phytochemistry* **2005**, *66*, 2381.
- Santos, R. P.; Lemos, T. L. G.; Pessoa, O. D. L.; Braz-Filho, R.; Rodrigues-Filho, E.; Viana, F. A.; Silveira, E. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 662.
- Cogenero, L. S.; Ide, R. M.; Nazari, A. S.; Dias Filho, B. P.; Nakamura, C. V.; Carvalho, J. E.; Foglio, M. A.; Sarragiotto, M. H.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 825.
- Soares, F. P.; Ronconi, C. A. V.; Cunha, E. V. L.; Barbosa-Filho, J. M.; Silva, M. S.; Braz-Filho, R.; *Magn. Reson. Chem.* **1998**, *36*, 608.
- Ma, X.; Chongren, Y.; Zhang, Y.; *Magn. Reson. Chem.* **2008**, *46*, 571.
- Zhao, W.; Wolfender, J.-L.; Hostettmann, K.; Cheng, K.; Xu, R.; Qin, G.; *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1073.
- Sousa, M. P.; Matos, M. E. O.; Machado, M. I. L.; Vencato, I.; Mascarenhas, Y. P.; Braz Filho, R.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 2589.
- Junko, T.; Ikeda, Y.; Komiyama, K.; Hayashi, M.; Kishida, A.; Ohsaki, A.; *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 343.
- Achenbach, H.; Lottes, M.; Waibel, R.; Karikas, G. A.; Correa, M. D.; Gupta, M. P.; *Phytochemistry* **1995**, *38*, 1537.
- Santos, A. R.; Barros, M. P.; Santin, S. M. O.; Souza, M. C.; Eberlin, M. N.; Meurer, E. C.; Sarragiotto, M. H.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 525; Meira, M.; David, J. M.; David, J. P.; Araújo, S. V.; Regis, T. L.; Giulietti, A. M.; Queiróz, L. P.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 751.
- Boros, C. A.; Stermitz, F. R.; *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1173.
- Inouye, H.; Takeda, Y.; Nishimura, H.; Kanomi, A.; Okuda, T.; Puff, C.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2591.
- Aquino, R.; De Simone, F.; Senatore, F.; Pizza, C.; *Pharm. Res. Comm.* **1988**, *20*, 105.
- Tsai, S.-J.; Yin, M.-C.; *J. Food Sci.* **2008**, *73*, 174; Schinella, G.; Aquila, S.; Dade, M.; Giner, R.; Recio, M. C.; Spegazzini, P.; Tourmier, H.; Rios, J. L.; *Planta Med.* **2008**, *74*, 215; Banno, N.; Akihisa, T.; Takuda, H.; Yasukawa, K.; Higashihara, H.; Ukiya, M.; Watanabe, K.; Kimura, Y.; Hasegawa, H.; Nishino, H.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 85; Sosa, S.; Altinier, G.; Politi, M.; Braca, A.; Morelli, I.; Della Loggia, R.; *Phytomedicine* **2005**, *12*, 271; Saad, S. F.; Saber, A. A. H.; Scott, P. M.; *Bull. Fac. Pharm.* **1967**, *6*, 253.