

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Perfil fitoquímico e avaliação da toxicidade da espécie *Gunnera manicata* L.  
nativa do Rio Grande do Sul**

**KRISTIANE DE CÁSSIA MARIOTTI**

Porto Alegre, 2010



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Perfil fitoquímico e avaliação da toxicidade da espécie *Gunnera manicata* L.  
nativa do Rio Grande do Sul**

Dissertação apresentada por  
**Kristiane de Cássia Mariotti**  
para obtenção do GRAU DE MESTRE  
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Renata Pereira Limberger  
Co-orientadora: Dr. Eliane Dallegrave

PORTO ALEGRE, 2010

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 26.03.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dr. Mirna Bainy Leal  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr. Miriam Apel  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr. Gilsane Lino von Poser  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

M342p Mariotti, Kristiane de Cássia  
Perfil fitoquímico e avaliação da toxicidade da espécie *Gunnera manicata* L. nativa do Rio Grande do Sul / Kristiane de Cássia Mariotti. – Porto Alegre : UFRGS, 2010. – xv, 74 p.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Gunnera manicata*. 2. Gunneraceae. 3. Toxicidade aguda. 4. Fitoquímica. 5. Toxicologia. I. Limberger, Renata Pereira. II. Dallegrave, Eliane. III. Título.

CDU: 615.9:582.5

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr. Renata Pereira Limberger e co-orientação da Dr. Eliane Dallegrave. As etapas experimentais foram realizadas no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia, no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais e no Laboratório de Microbiologia Aplicada no Instituto de Ciências Básicas da Saúde, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As análises químicas foram desenvolvidas no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/RS) do Ministério da Agricultura e na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A pesquisa foi financiada pelo CNPq (Processo 553401/2008-4). Kristiane de Cássia Mariotti recebeu bolsa de mestrado do CNPq.



## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Renata Pereira Limberger pela carinhosa acolhida, pelas oportunidades concedidas, apoio, confiança, amizade e pelo extraordinário exemplo pessoal e profissional. Obrigada sempre!

À Prof<sup>a</sup> Dr. Eliane Dallegrave pela dedicação, incentivo e apoio na realização dessa dissertação.

À Prof<sup>a</sup> Dr. Mirna Bainy Leal pelo auxílio e colaboração na realização dessa dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia, Gabi, Carol, Madson, Dani, Pathy, Elo, Paulinha, Debi, Rose, Ana Laura, Ivão, Rafael, Prof<sup>a</sup> Dr. Solange, Rachel, Marcelo, Dona Bea pelos conselhos, discussões científicas, cafés e risadas.

À Jéssica, Gabi e Sabrina pela dedicação na execução dos experimentos.

Às minhas queridas amigas de “Fredí”, Camila, Gabi, Sara, Talita, Bene, Jami, Gisa pela lealdade e amizade de muitos anos, pelo apoio em todos os momentos, pelos conselhos, festas, risadas e principalmente pela adorável convivência!

Aos colegas e amigos da Faculdade, Max, Shumi, Rodrigo, Carol, Juli, Gabi, Silmi pela parceria, amizade e pelos bons momentos vividos.

Ao Mano (Carlos Alberto Wahys) por ser amigo fiel, companheiro de todas as horas, pela sede oficial do “churras da galera” e principalmente por ser o “paizinho”.

À minha Vó pelo exemplo de vida.

Às minhas irmãs queridas, Carla e Karina, pela amizade, companheirismo, dedicação e amor. Amo vocês!

Ao João Pedro, meu afilhado lindo, por trazer alegria a minha vida.

Aos meus pais João e Elenir, pelo apoio e compreensão. Pela eterna dedicação e amor. Agradeço imensamente com todo meu amor. Amo vocês!

A todos que de alguma forma contribuíram pra a realização desse trabalho.

## RESUMO

*Gunnera* é um gênero de angiosperma pertencente à família Gunneraceae. O gênero possui aproximadamente 45 espécies, dentre essas *G. perpensa* L. tem sido utilizada na África, apresentando efeitos relacionados ao ciclo reprodutivo, provavelmente devido ao (Z)-venusol. Decocções dessa planta são utilizadas no tratamento de doenças infecciosas devido à atividade antibacteriana e à antifúngica. O gênero *Gunnera* é capaz de formar uma complexa associação com a cianobactéria *Nostoc punctiforme* L. ocorrendo a formação da neurotoxina  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (BMAA) a qual é associada ao aparecimento de um complexo de esclerose/Parkinson/demência. No Rio Grande do Sul, encontra-se a espécie *G. manicata* L., da qual não constam, na literatura científica, estudos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos, apesar de ser apreciada ornamentalmente. Tendo em vista esses dados, o presente projeto avaliou o perfil tóxico-farmacológico e fitoquímico de *G. manicata*. Para os ensaios de toxicidade oral aguda e uterotrófico foi utilizado extrato aquoso de raízes e para as atividades antimicrobiana (disco difusão) e antioxidante (reação com 2,2 difenil-1-picril-hidrazil - DPPH\*), bem como para o perfil fitoquímico, foram utilizados extratos metanólicos e aquosos de raízes e folhas. Não foram observados sinais de toxicidade oral aguda, nem atividade sob o sistema reprodutor de ratas. O potencial antimicrobiano resultou em atividade frente à *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*. A capacidade antioxidante apresentou boa a moderada atividade. Na análise fitoquímica por cromatografia gasosa acoplada a detector de massa (CG-EM) e cromatografia líquida associada à espectrometria de massas em tandem (CL-EM/EM) não foram detectados BMAA nem (Z)-venusol. Entretanto, foram identificados ácido gálico e hiperosídeo. Os extratos avaliados demonstraram alto teor de compostos fenólicos totais, apesar da baixa concentração de flavonóides totais. Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho geram perspectivas para novos estudos, tendo em vista à ausência de sinais de toxicidade, o potencial biológico apresentado, a falta de informações sobre *G. manicata* na literatura científica e a prospecção de espécies bioativas.

Palavras chave: *Gunnera manicata* L., Gunneraceae, BMAA, (Z)-venusol, toxicidade aguda, ensaio uterotrófico.





## ABSTRACT

The genus *Gunnera* is a flowering plant belonging to the Gunneraceae family. The genus has about 45 species, among these *G. Perpensa* which has been used in Africa. It has effects related to the reproductive cycle, probably due to the (Z)-venusol. Decoctions of this plant are used in the treatment of infectious diseases due to antibacterial and antifungal activities. The genus *Gunnera* forms a complex association with the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* L. resulting in the formation of the neurotoxin  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA), which is associated with the development of a complex sclerosis / Parkinson / dementia. In Southern Brazil is found the specie *Gunnera manicata* L. on which scientific data about phytochemical, pharmacological and toxicological studies are lacking, despite of being assessed as ornamental plant. So, were investigated the toxico-pharmacological and phytochemical profile of *G. manicata*. In the oral acute toxicity and in the uterotrophic assays aqueous roots extracts were used. To antimicrobial and antioxidant (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl – DPPH - radical test) activities as well as phytochemical profile, methanol and aqueous extracts of roots and leaves were used. Was not observed neither sings of oral acute toxicity nor activity on the female reproductive system of rats. The antimicrobial potential showed activity against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Candida albicans*. Antioxidant capacity presented good to moderate activity. The phytochemical profile analysis was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometer (GC-MS) and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). BMAA and (Z)-venusol were not found and the samples presented gallic acid and hyperoside. The evaluated extracts showed a high content of total phenolic compounds despite of the low contends of total flavonoids. So, the results obtained in this work open prospects for new studies in view of the absence of signs of toxicity, the biological potential presented, the lack of information about *G. manicata* the scientific literature and the search for bioactive species.

**Key-words:** *Gunnera manicata* L., Gunneraceae, BMAA, (Z)-venusol, acute toxicity, uterotrophic assay.



## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATFA - Anidrido Trifluoracético

BMAA -  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Massas

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Ultravioleta

CL/EM- Cromatografia Líquida acoplada a Detector de Massas

CL-EM/EM – Cromatografia Líquida acoplada a Detector de Massas em Tandem

CFT – Compostos Fenólicos Totais

CPD - Complexo Parkinson/Demência

DPPH - 2,2-difenilpicril-1-picrilhidrazila

IC<sub>50</sub> - concentração necessária para inibir a atividade do DPPH em 50%

ELA - Esclerose Lateral Amiotrófica

ELA/CPD - Esclerose Lateral Amiotrófica/ Complexo Parkinson/Demência

*m/z* – Razão massa/carga

NMDA – N-metil-D-aspartato

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

TBDMS - tert-butildimetilsilil

TMS - Trimetilsilil

PFPA - Anidrido Pentafluorpropiónico



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
2.1 OBJETIVO GERAL.....	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	10
3.1 GENERALIDADES E USO POPULAR.....	12
3.2 COMPLEXO GUAM.....	15
3.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	17
4. MANUSCRITO I.....	21
5. MANUSCRITO II.....	37
6. DISCUSSÃO GERAL.....	55
7. CONCLUSÕES.....	61
8. REFERÊNCIAS.....	65
9. ANEXOS.....	73

## 1. INTRODUÇÃO

---





*Gunnera* é um gênero de angiosperma pertencente à família Gunneraceae. O gênero possui aproximadamente 45 espécies as quais variam em altura e tamanho das folhas. A distribuição natural de *Gunnera* é restrita ao hemisfério sul, típica das áreas que variam do Havaí, Nova Guiné/Malaya, Tasmânia, Antártica, América Central e América do Sul, sendo espécies de menor porte encontradas na Nova Zelândia, sudeste da Ásia e extremo sul da América do Sul (BERGMAN e OSBORNE, 2002), incluindo o Rio Grande do Sul (RS). A espécie *Gunnera manicata* L., nativa do RS, possui grande apreço como planta ornamental.

Com relação à constituição química do gênero, poucos são os dados disponíveis, todos relativos à espécie sul africana *Gunnera perpensa* L..

Rizomas de *G. perpensa*, são comumente utilizados na gravidez e no parto em tribos na África do Sul. Estudos desenvolvidos por Kaido e colaboradores (1996) comprovaram que extratos aquosos da planta possuem a capacidade de estimular a contração do útero e do íleo no ensaio de órgão isolado. Além dessa propriedade, sabe-se que decocções de *G. perpensa* possuem uso popular, na África, devido a propriedades antissépticas, à atividade antimicrobiana e antifúngica (STEENKAMP *et al.*, 2004; DREWES *et al.*, 2005). Uma vez que *G. perpensa* e *G. manicata* pertencem ao mesmo subgênero e considerando que *Gunnera* possui reconhecidas propriedades biológicas e ampla ocorrência no RS, podemos considerá-la uma candidata à planta de interesse na medicina popular. Entretanto, estudos de toxicidade devem preceder a avaliação farmacológica.

Dentre as espécies de angiospermas, o gênero *Gunnera* caracteriza-se por ser o único a apresentar simbiose com cianobactéria *Nostoc punctiforme* L. (OSBORNE *et al.*, 1992). A cianobactéria *Nostoc* é conhecida por produzir o aminoácido  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (BMAA), altamente polar e hidrossolúvel, que atua como uma neurotoxina. O BMAA já foi encontrado em cianobactérias em diversos locais pelo mundo (COX *et al.*, 2005). Estudos conduzidos por Chiu e colaboradores (2005) demonstraram que os filamentos móveis da cianobactéria são capazes de colonizar a espécie *G. manicata* através das células contidas em glândulas especializadas presentes no caule da planta (CHIU *et al.*, 2005).

Acredita-se que o BMAA possa ser a possível causa de uma doença grave denominada Complexo de Guam ou Complexo Parkinson/Demência (CPD) que se

manifesta como Parkinson atípico, demência e esclerose lateral amiotrófica (ELA), ou uma combinação destes três fenótipos (ELA/CPD) (STEELE *et al.*, 2002). A ELA é uma patologia neurológica crônica, degenerativa e letal (STEELE, 2005).

Considerando que *Gunnera* possui distribuição natural próxima a fontes de água, a ingestão involuntária de BMAA, pode estar ocorrendo. Assim, tendo em vista um potencial risco à saúde, o presente trabalho investigou a presença da neurotoxina e avaliou a toxicidade oral aguda de extratos da espécie nativa do RS. Também foram investigados os efeitos sobre o sistema reprodutor feminino, a atividade antimicrobiana, o potencial antioxidante e o perfil fitoquímico de *G. manicata*.



## **2. OBJETIVOS**

---



## 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade, as atividades farmacológicas e o perfil fitoquímico de extratos da espécie *G. manicata* nativa do RS.

## 2.2 Objetivos específicos

- Preparar extratos orgânicos (MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Hexano) e aquoso de *G. manicata*.
- Avaliar a toxicidade oral aguda dos extratos de *G. manicata* em ratos.
- Verificar a possibilidade de efeito anti ou estrogênico dos extratos de *G. manicata* por meio do ensaio uterotrófico em ratas imaturas.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *G. manicata*.
- Avaliar a atividade antioxidante usando o ensaio com o radical livre 2,2-difenilpicril-1-picril-hidrazila (DPPH).
- Investigar o perfil fitoquímico de extratos de *G. manicata*, com ênfase na verificação da presença de BMAA e (*Z*)-venusol, utilizando CG-EM e/ou CL-EM/EM.



### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

---





### 3.1 Generalidades e uso popular

*Gunnera* é um gênero de angiosperma pertencente à família Gunneraceae (BERGMAN, 2002) e está dividido em seis subgêneros: *Panke*, *Misandra*, *Milligania*, *Pseudogunnera*, *Gunnera* e *Ostenigunnera* (WANNTORP e WANNTORP, 2003). O subgênero *Gunnera* consiste na espécie africana *Gunnera perpensa* L., e nas espécies *Gunnera herteri* O. e *Gunnera manicata* L. encontradas no sul do Brasil, tendo essa última espécie uso ornamental.

Raízes e rizomas da espécie *G. perpensa* apresentam uso tradicional em tribos Africanas. São popularmente conhecidos como “*Isihlambezo*” e “*Inembe*” e comumente utilizados na gravidez e no parto. Muitas mulheres na África do Sul usam preparações obtidas dos rizomas desta planta para induzir ou aumentar o trabalho de parto, para expelir a placenta (DREWES *et al.*, 2005), para impedir hemorragia pós-parto e como medicação anticoncepcional. No mesmo país, a planta também é utilizada na prática veterinária com os mesmos fins do uso humano (MCGAW e ELOFF, 2008). O “*Isihlambezo*” é administrado oralmente por mulheres da tribo africana Zulu durante o último trimestre da gravidez para facilitar o trabalho de parto (KAIDO *et al.*, 1996). Outros usos das decocções das raízes de *G. perpensa* são para o alívio de dores no período menstrual e para cura da infertilidade feminina (DREWES *et al.*, 2005).

Essas utilizações são, em parte, comprovadas por estudos conduzidos por Kaido e colaboradores (1996) que testaram decocções de plantas usadas na medicina tradicional sul-africana em ensaio com músculo uterino e íleo isolados de ratas. Os extratos aquosos de *G. perpensa* provocaram contrações nos órgãos testados e proporcionaram um aumento da resposta à ocitocina. O estudo concluiu que o extrato examinado atua diretamente no útero, podendo justificar o uso popular.

Khan e colaboradores (2004) determinaram a atividade biológica de *G. perpensa* testando o extrato aquoso, os extratos orgânicos (acetato de etila e metanol), e o composto majoritário (Z)-venusol puro (7,8-di-hidroxi-6-(hidroximetil)-3 - [(z) - (4 - hidroxifenil) metilidene] tetra-hidro - 4aH - pirano [2,3-b][1,4]dioxin-2-one) (Figura 1), um glicosídeo terpênico, identificado por Proliac e col. (1981) e Pagani (1990). O ensaio foi realizado em músculo uterino e íleo isolado de ratas. O extrato aquoso estimulou diretamente uma resposta contrátil no íleo e no músculo uterino. A

pré-incubação com atropina reduziu essa resposta significativamente, podendo evidenciar que os receptores colinérgicos muscarínicos estão envolvidos na resposta contráctil. Nem os extratos orgânicos, nem o (Z)-venusol puro apresentaram essa atividade. Os resultados encontrados indicaram que esse metabólito exerce sua ação conjuntamente com as outras substâncias contidas no extrato.

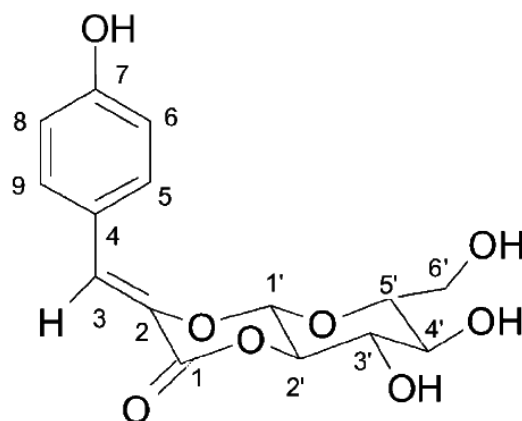


Figura 1: Estrutura química do (Z)-venusol.

Outro uso popular de *G. perpersa* consiste na infusão de folhas utilizada internamente ou aplicada externamente para o tratamento de psoríase (DREWES *et al.*, 2005). Esta propriedade foi investigada posteriormente por Steenkamp e colaboradores (2004) que demonstrou alto potencial antimicrobiano. Os extratos de *G. perpersa* apresentam uma proeminente atividade antibacteriana frente a diversos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella sp.*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, justificando seu uso para o tratamento de tais infecções (STEENKAMP *et al.*, 2004). Em um estudo conduzido por Drewes e colaboradores (2005), foi realizada a avaliação antimicrobiana do material vegetal fresco de *G. perpersa*, demonstrando uma sensibilidade mais elevada nos extratos das folhas, seguida dos extratos das hastes e das raízes. Neste mesmo estudo foi possível o isolamento de duas benzoquinonas e um benzopirano do extrato diclorometano das folhas e das hastes de *G. perpersa*. Do extrato metanólico da planta foi obtido o fitol, um irritante suave da pele, também encontrado em inúmeras outras espécies vegetais (LEWIS, 1992), sendo a provável causa da irritação de pele relatada durante a manipulação da planta. As duas benzoquinonas, 2-metil-6-(3-metil-2-butenil) benzo-1,4-quinona e

3-hidroxi-2-metil-5-(3-metil-2-butenil) benzo-1,4-quinona e o benzopirano, 6-hidroxi-8-metil-2,2-dimetil-2H-benzopirano (Figura 2) foram testados para atividade antimicrobiana junto com os extratos frescos das hastes, das folhas e das raízes. A atividade observada nas folhas foi mais elevada em todos os casos, comparada com as hastes, justificando a prática popular de usar os extratos de folhas da planta como antisséptico (DREWES *et al.*, 2005; GRIERSON e AFOLAYAN, 1999).

O uso das partes aéreas da *G. perpensa* pela tribo Zulu, como emético, também é relatado (DREWES *et al.*, 2005).

Além dos compostos citados, alguns outros como o pirogalol, o ácido succínico e o ácido elágico foram extraídos e isolados do extrato aquoso das raízes secas de *G. perpensa* (DREWES *et al.*, 2004).

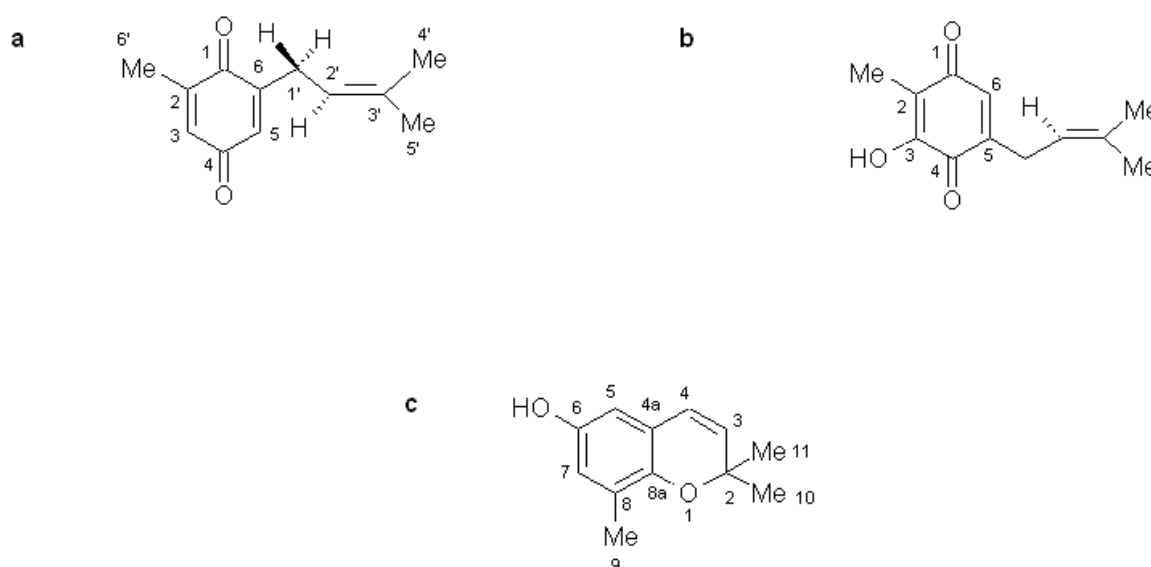


Figura 2: Estrutura química do (a) 2-metil-6-(3-metil-2-butenil) benzo-1,4-quinona; (b) 3-hidroxi-2-metil-5-(3-metil-2-butenil) benzo-1,4-quinona e (c) 6-hidroxi-8-metil-2,2-dimetil-2H-benzopirano.

Com relação à constituição química das espécies de *Gunnera*, poucos são os dados disponíveis na literatura, e a maioria deles relativos à espécie africana *G. perpensa*. Nenhum trabalho com a espécie *G. manicata* foi encontrado.

Deve-se considerar que a espécie nativa do RS tem apreço ornamental e que atualmente, as plantas ornamentais estão cada vez mais ocupando espaços livres em praças, jardins, interiores de casas e de locais de trabalho, uma vez que muitas

delas se adaptam a diferentes condições ambientais. Assim, são de fácil acesso para crianças e adultos, podendo constituir uma fonte importante de intoxicações (LOPES *et al.*, 2009).

### 3.2 Complexo de Guam

Dentre as espécies de angiospermas, o gênero *Gunnera* caracteriza-se por ser o único a apresentar uma simbiose com cianobactéria *Nostoc punctiforme* L. (OSBORNE *et al.*, 1992). A cianobactéria *Nostoc* é conhecida por produzir o aminoácido BMAA, altamente polar e hidrossolúvel, que atua como uma neurotoxina. O BMAA já foi encontrado em cianobactérias em diversos locais do mundo, tendo sido descoberto primeiramente em plantas do gênero *Cycas* (Cycadaceae), que também apresenta relação simbiótica com *Nostoc punctiforme* (COX *et al.*, 2003; COX *et al.*, 2005).

A neurotoxina BMAA é um aminoácido não-protéico estruturalmente equivalente a uma alanina metilada (Figura 3) (COX *et al.*, 2003). Uma vez ingerido, pode se ligar a proteínas no organismo (MURCH *et al.*, 2004).

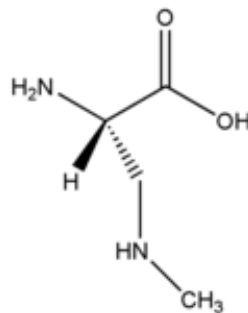


Figura 3: Estrutura química do  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (BMAA).

Acredita-se que o BMAA possa ser a possível causa de uma doença grave denominada Complexo de Guam ou CPD. Caracteriza-se por ser uma doença que se manifesta como o Parkinson atípico, demência e esclerose lateral amiotrófica (ELA), ou uma combinação destes três fenótipos, ELA/CPD (STEELE *et al.*, 2002; LOBNER *et al.* 2007).

O Complexo de Guam é uma doença neurodegenerativa, progressiva e fatal das Ilhas Marianas, da península de Kii no Japão e da planície litorânea de Nova

Guiné ocidental. A ELA é uma patologia neurológica crônica, degenerativa e letal. Observada primeiramente por Zimmerman em 1945 e relatada subsequente por médicos da Marinha americana e pelo Serviço de Saúde Pública dos EUA, a doença de Chamorros, como era denominada, parecia ser clínica e patologicamente idêntica à ELA clássica. Mas ao contrário da ELA que ocorre em outras localidades a doença era freqüentemente familiar e vinha ocorrendo na pequena população de Guam por mais de um século, sendo 100 vezes mais prevalente no local do que em qualquer outra parte no mundo (STEELE, 2005).

Pesquisadores trabalharam a fim de caracterizar esta síndrome, descrevendo um padrão incomum de degeneração neurofibrilar que afeta o córtex temporal medial, os gânglios da base e tronco cerebral e designando esta síndrome de CPD (MORRIS *et al.*, 2001), pois apresentava características clínicas tanto de Parkinson - alterações do movimento, tremor, rigidez, bradicinesia (lentidão do movimento), hipocinesia (redução da amplitude do movimento), acinesia (ausência de movimento), alterações de postura, expressões faciais tipo máscara - quanto de demência - declínio de memória, perda lenta e progressiva das funções cognitivas, apatia, alterações do ciclo sono / vigília, desordens da personalidade, depressão e comportamento por vezes violento.

Um dos aspectos intrigantes de ELA/CPD em Guam é o período longo de latência da doença. A taxa da incidência local é ainda quatro vezes superior a do restante da população mundial, mesmo décadas após os Chamorros deixarem a ilha. Esse período de latência sugere que o BMAA possa funcionar como uma toxina de ação lenta (COX *et al.*, 2003; MURCH *et al.*, 2004).

Nos hábitos alimentares da população nativa da ilha encontra-se tradição de comer tortas feitas com a farinha das sementes de *Cycas*, onde se descobriu primeiramente a existência de BMAA (VEGA e BELL, 1967). A biomagnificação tem sido sugerida como um mecanismo que pode gerar doses elevadas da neurotoxina, suficientes para produzir a doença neurológica (MURCH *et al.*, 2004). Esta hipótese confirma-se parcialmente pela descoberta recente de concentrações elevadas de BMAA em morcegos *Pteropus mariannus*, que são considerados uma iguaria muito apreciada que faz parte da alimentação dos Chamorros (COX *et al.*, 2003).

Estudos sugerem que um reservatório neurotóxico de BMAA dentro do cérebro pode ter impactos neuropatológicos diversos, como (a) alteração da conformação terciária das neuroproteínas devido à incorporação do aminoácido não-protéico e, conseqüentemente, alteração de sua atividade biológica; (b) alteração do potencial iônico das células neuronais; (c) geração de radicais livres que poderão catalisar processos químicos deletérios; (d) captação e liberação de íons metálicos tais como Zn, Cu, Ca, e Al; (e) truncamento de proteínas antes de terminada a síntese do ribossoma, devido à incorporação do BMAA (PAPAPETROPOULOS, 2007). Outra hipótese considerada é a de que a liberação lenta do BMAA na forma livre pode estar agindo como agonista em determinados receptores (MURCH *et al.*, 2004). Ainda, considera-se que o BMAA, que tem atuação em receptor N-metil-d-aspartato (NMDA), podendo atuar como um aminoácido excitatório. Portanto, grandes quantidades de BMAA podem produzir excitotoxicidade, talvez por atuação semelhante ao glutamato (QUADROS *et al.*, 2006).

Este efeito pode ocorrer através de uma única ingestão do BMAA ou por uma exposição leve e contínua dentro dos tecidos cerebrais, tendo por resultado a morte neuronal. Etnologicamente, tal exposição crônica não poderia produzir a doença aguda, como foi observado em modelos animais, através da administração de níveis elevados de BMAA, mas pode resultar na latência e na natureza progressiva da doença entre os Chamorros (PAPAPETROPOULOS, 2007).

No campo epidemiológico da ELA muitos fracassos têm ocorrido no intuito de identificar um fator causal relevante. Somente, na Ilha de Guam é que foi identificada uma relação direta de pacientes com ELA e um fator exógeno, ou seja, uma palmeira do grupo *Cycad* utilizada como fonte de alimento (preparo de farinha) ou para abrasão na pele pela população local (QUADROS *et al.*, 2006).

A onipresença de cianobactérias no ambiente terrestre, de água doce e de água salobra sugere um potencial risco para a ampla exposição humana (OLIVEIRA, e PEREIRA, 2009). Além disso, a distribuição do gênero *Gunnera* ocorre próxima a fontes de água, o que pode promover a ingestão involuntária de BMAA.

### **3.3 Análise fitoquímica**

O método de preparação da amostra representa o primeiro estágio no desenvolvimento do procedimento analítico. Na análise de extratos vegetais, a preparação da amostra é uma etapa crítica. Se não for realizada adequadamente pode comprometer o resultado obtido, introduzindo imprecisão e inexatidão (HUIE, 2002; SMITH, 2003; NYIREDY, 2004).

Os principais objetivos da preparação da amostra para análise cromatográfica são: (1) aumentar a seletividade do método através da remoção dos potenciais interferentes; (2) aumentar a sensibilidade promovendo a concentração do analito; (3) quando necessário, converter o analito em uma forma mais adequada para a separação ou detecção; (4) propiciar o desenvolvimento de um método mais robusto e reprodutível independente de variações da matriz (SMITH, 2003; LANÇAS, 2004).

No que tange a etapas analíticas, a maioria dos métodos propostos para o BMAA utiliza cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A falta de sensibilidade e especificidade desta técnica representa um limitante quando se trata de matrizes mais complexas como extratos vegetais. Para contornar estes inconvenientes, alguns autores propõem a utilização de sistemas mais específicos como o emprego de detector eletroquímico (SANTIAGO *et al.*, 2006), ultravioleta após derivação (MURCH *et al.*, 2004b; COX *et al.*, 2005), fluorescência e massas (BANACK *et al.*, 2006).

A utilização de técnicas cromatográficas acopladas a detector de massas (CG/EM e CL/EM) vem crescendo exponencialmente nos últimos anos, sendo consideradas as mais seletivas e específicas, permitindo a identificação inequívoca dos componentes da amostra. Dentre essas, a CG/EM é a mais acessível e difundida entre os laboratórios de toxicologia do mundo inteiro. O detector de massas apresenta características ideais tanto para fins de identificação quanto para quantificação. A obtenção da massa molecular e de um padrão de fragmentação, reduz o número de possibilidades estruturais possibilitando a identificação com alto grau de confiança (MATTOLLI *et al.*, 2005; BARNES *et al.*, 2006; MARCHEI *et al.*, 2006; PELLATI e BENVENUTI, 2007). Entretanto, para possibilitar a análise do BMAA por CG em amostras complexas, procedimentos alternativos de extração, purificação e derivação devem ser estabelecidos.



O método de Husek (1991) é o único referenciado na literatura para esta finalidade. Este método foi adaptado por outros autores (HUANG *et al.*, 1993; PAN *et al.*, 1997; GUO *et al.*, 2007) e emprega extração em meio aquoso, seguido pela pré-concentração e purificação por SPE e derivação com cloroformatos, em água-etanol-piridina (60:32:8) à temperatura ambiente, para posterior análise por CG/EM. Embora este método tenha se mostrado adequado para análise do BMAA, os reagentes de derivação são tóxicos e explosivos.

A etapa de derivatização de aminoácidos é decisiva para permitir a análise por CG. A análise direta do BMAA por esta metodologia não é possível devido a sua elevada polaridade, baixa volatilidade e instabilidade térmica. Estas dificuldades podem ser superadas recorrendo à modificação química dos grupos funcionais polares da molécula através da preparação de derivados adequados. Esta é a etapa final de preparação da amostra e consiste na substituição dos grupos polares da molécula por outros menos polares, melhorando as suas características de volatilidade, adsorção e estabilidade (CASTILHO e SILVEIRA, 1998).

Os reagentes de silição são os agentes de derivatização mais difundidos. Nestas reações, o hidrogênio ativo presente nos grupos -OH, -SH e -NH são substituídos por grupos trimetilsilil (TMS) ou tert-butildimetilsilil (TBDMS). A silição do BMAA não é relatada ainda, mas de outros aminoácidos sim (HUANG *et al.*, 1993), apesar de a silição de grupos amino ser caracterizada pela baixa reatividade (KATAOKA, 1996).

A acilação é outra reação de derivação empregada para aminoácidos (HUANG *et al.*, 1993). O procedimento consiste na conversão dos hidrogênios presentes em grupos -NH<sub>2</sub>, -NH, -OH, -SH em ésteres, tioésteres e amidas por meio de reação com anidrido acético, anidrido trifluoracético (ATFA) ou anidrido pentafluoropropiônico (PFPA). Estas reações geralmente são realizadas na presença de piridina que, além de atuar como solvente, age como catalisador da reação, por ser aceptor de hidrogênio (KATAOKA, 1996).

Para a etapa analítica do composto (Z)-venusol, duas propostas foram encontradas na literatura científica. Ambas utilizam a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na identificação do composto além de técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultravioleta (CLAE-UV) e

cromatografia líquida acoplada a detector de massas (CL-EM). Segundo Khan e colaboradores (2004), a preparação da amostra para a análise por CL-EM envolveu uma etapa de hidrólise do glicosídeo e posterior acetilação do (Z)-venusol. Para tanto, o extrato aquoso de *G. perpensa* foi extraído com acetato de etila e então submetido à acetilação com anidrido acético e piridina, aquecendo o meio reacional por alguns minutos e mantendo-o em repouso *overnight*. Após, para obtenção do composto acetilado foi realizada a solubilização da mistura em água e posterior extração com acetato de etila (KHAN *et al.*, 2004; VIORNERY *et al.*, 2000).

Assim, tendo em vista a inexistência de dados tóxico-farmacológicos e fitoquímicos de *G. manicata*, fica caracterizada a necessidade de estudos visando relacionar a espécie nativa com uma possível produção de BMAA, seu potencial toxicológico, suas propriedades biológicas e sua constituição química.

#### 4. MANUSCRITO I

---

**“Absence of  $\beta$ -*n*-methylamino-l-alanine and acute toxicity of *Gunnera manicata* L., native from southern Brazil.”**

Submetido para publicação no *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.



O presente trabalho descreve a investigação da presença da neurotoxina BMAA e a avaliação da toxicidade oral aguda dos extratos aquosos da espécie *Gunnera manicata* L. Para a etapa analítica foram utilizadas as técnicas cromatográficas de CG-EM e CL-EM/EM. Na análise por CG-EM foi realizada a derivatização das amostras. O ensaio de toxicidade foi realizado em grupos de doze ratos Wistar (machos e fêmeas) pela administração oral de 2000 mg/kg de extrato aquoso das raízes.

Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram a ausência da neurotoxina BMAA e de toxicidade aguda, abrindo perspectivas para novos estudos químicos e biológicos que visem à prospecção de espécies bioativas.



**Absence of  $\beta$ -n-methylamino-L-alanine and acute toxicity of *Gunnera manicata* L., native from southern Brazil.**

**Kristiane de Cássia Mariotti<sup>1</sup>, Fabiano Barreto<sup>2</sup>, Gabriela Cristina Schmitt<sup>1</sup>, Ivomar Zancanaro<sup>1</sup>, Eliane Dallegrave<sup>3</sup>, Rodrigo B. Singer<sup>4</sup>, Mirna Bainy Leal<sup>5</sup>, Renata Pereira Limberger<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> *Laboratory of Analysis and Toxicological Research, Department of Analysis, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul Toxicology Laboratory,*

<sup>2</sup> *National Agricultural Laboratory of Rio Grande do Sul, LANAGRO/RS ,*

<sup>3</sup>*Toxicology Information Center of Rio Grande do Sul, State Foundation of Production and Research in Health, <sup>4</sup>Department of Botany, Federal University of Rio Grande do Sul,*

<sup>5</sup>*Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Natural Products, Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul*

**\*Correspondence:**

R. P. Limberger

Laboratório de Análises e Pesquisas Toxicológicas

Departamento de Análises

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 2752

90610-000 - Porto Alegre - RS, Brazil

Tel.: +55 51 3308-5297; fax: +55 51 3308-5437.

E-mail address: renata@ufrgs.br (Prof. Dr. Renata Pereira Limberger)

*Gunnera* (Gunneraceae) forms a complex association with the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* L.. The *Gunnera-Nostoc* symbiosis is the only reported involving a flowering plant and as a result there is the formation of the neurotoxic amino acid  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine (BMAA). In Southern Brazil is found the specie *Gunnera manicata* L. on which scientific data about phytochemical, pharmacological and

toxicological studies are lacking. So the acute toxicity and the presence of neurotoxic amino acid in aqueous extracts of *G. manicata* were investigated. The acute toxicity test was conducted with administration of aqueous roots extract of *G. manicata* at a concentration of 2000 mg/kg in single dose orally in Wistar rats. Lethality was monitored daily for 14 days after treatment. The relative mass of organs was analyzed by one-way ANOVA and macroscopic changes were investigated. The BMAA analysis was made by GC/MS and involved a preliminary step of derivatization. The LC-MS/MS analysis was made by direct infusion. The present study demonstrated absence of neurotoxin in the analyzed samples of *G. manicata* and absence of acute toxicity in aqueous roots extracts. These data demonstrate that the extracts of the roots of *G. manicata* have a high margin of drug safety.

**Uniterms:** *Gunnera manicata* L. BMAA. Acute toxicity. GC/MS. LC-MS/MS.

*Gunnera* (Gunneraceae) forma uma complexa associação com a cianobactéria *Nostoc punctiforme* L.. A simbiose *Gunnera-Nostoc* é a única relatada envolvendo uma angiosperma e, em decorrência desta, ocorre a formação da neurotoxina  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (BMAA). No sul do Brasil encontra-se a espécie *G. manicata* L., da qual não constam, na literatura científica, estudos fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos. Assim, o presente estudo avaliou a toxicidade aguda e a presença da neurotoxina BMAA em extratos aquosos de *G. manicata*. O ensaio de toxicidade aguda foi realizado com extrato aquoso das raízes de *G. manicata* na concentração de 2000 mg/kg, administrado em dose única via oral em ratos Wistar. Letalidade foi observada diariamente durante 14 dias pós-tratamento. Após a eutanásia, a massa relativa dos órgãos foi analisada por ANOVA de uma via e investigou-se a presença de alterações macroscópicas nos órgãos. A análise do BMAA por CG/EM envolveu uma etapa preliminar de derivatização. A análise por CL-EM/EM foi realizada por infusão direta. O presente estudo demonstrou a ausência da neurotoxina nas amostras de *G. manicata* analisadas bem como a ausência de toxicidade aguda no extrato aquoso das raízes. Esses dados demonstram alta margem de segurança dos extratos testados.

**Unitermos:** *Gunnera manicata* L. BMAA. Toxicidade aguda. CG/EM. CL-EM/EM.



## INTRODUCTION

*Gunnera* (Gunneraceae) comprises more than forty species occurring mainly in the Southern Hemisphere (Wanntorp, 2003). Some cyanobacteria are involved in symbioses with hosts such as fungi (lichens), bryophytes, cycads, mosses, ferns (*Azolla*) and genus *Gunnera*. The most common cyanobacteria found in symbioses with plants belongs to the filamentous heterocystous genus *Nostoc* (Nilsson *et al.*, 2000). The *Gunnera-Nostoc* symbiosis is unique in being the only angiosperm genus involved in symbiotic associations with the nitrogen-fixing cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. Possibly, this symbiosis is a relic of an earlier partnership which evolved during a period when there was a limited supply of inorganic forms of nitrogen (Osborne *et al.* 1992).

Motile filaments of cyanobacteria, known as hormogonia, colonize *Gunnera* plants through cells in the plant's specialized stem glands. In an *in vitro* experiment, optimized conditions were found for establishment of the *Nostoc-Gunnera* symbiosis by inoculating mature glands with hormogonia from *Nostoc punctiforme*. *Gunnera manicata* L. plants were grown on nitrogen-replete medium and were determinate that nitrogen status was the main determinant for gland development. In contrast to uninoculated plants, *G. manicata* plants colonized by *N. punctiforme* were able to continue their growth on N-limited medium (Chiu *et al.* 2005).

The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA), a non protein amino acid, was found to be produced by cyanobacterial root symbionts of genus *Nostoc* (Cox *et al.* 2005). The naturally occurring, non-essential amino acid, BMAA, has been recently found in high concentrations in brain tissues of patients with tauopathies such as the Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism-Dementia Complex (ALS/PDC) in the South Pacific island of Guam and in a small number of Caucasian, North American patients with sporadic Alzheimer's disease. BMAA is produced by cyanobacteria that are present in all conceivable aquatic and/or terrestrial ecosystems and may be accumulated in living tissues in free and protein bound forms through the process of biomagnifications (Papapetropoulos, 2006). Once ingested, BMAA can be bound by proteins within the body, resulting in a slow release of free BMAA over years. It was demonstrated, through enzymatic cleavage, that BMAA is incorporated within the actual amino acid sequence of the protein would add weight to this hypothesis. BMAA was discovered in the brain tissues of nine Canadian Alzheimer's patients

(Cox *et al.* 2005) and was also presented in neurotoxic foods, include cycad flour, flying foxes and other feral or wild animals that are important components of the Chamorro traditional diet (Banack, 2006). It was found in cyanobacterial-plant symbiosis like *Gunnera kauaiensis* (Cox *et al.* 2005). Nilsson and coworkers (2000) about among 45 cyanobacterial isolated from 11 different *Gunnera* species originated from different geographical areas. The most common cyanobacteria found in symbioses with plants belong to the filamentous heterocystous genus *Nostoc* (Nilsson *et al.*, 2000).

In Southern Brazil, especially in the coastal region, *G. manicata* is found and there are few scientific data about phytochemical, pharmacological and toxicological studies. Considering that *G. manicata* plants are able to be colonized by *N. punctiforme* and from these symbiosis can result the formation of the neurotoxin BMAA, the present study investigated the presence of BMAA and the acute toxicity in aqueous extracts of the genus *G. manicata*, native from Southern Brazil.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemicals and reagents**

BMAA (CAS 15920-93-1) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Water was purified using a Milli-Q system (Millipore, Bedford, USA). Pyridine and acetonitrile HPLC grade were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), ethanol from Proquimios (Rio de Janeiro, RJ, Brazil), dichloromethane from Cromato (Diadema, SP, Brazil) and ethyl-chloroformate from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

### **Plant materials**

Roots and leaves of *G. manicata* were collected at Aparados da Serra region, Southern Brazil, and identified by Rodrigo B. Singer. A voucher specimen (R.B. Singer s. n., Serra da Roçinha, January 15th, 2009) was deposited at herbarium ICN—Departamento de Botânica—UFRGS in Porto Alegre, Brazil.

### **Preparation of extracts**

The aqueous extract was made with dried roots and leave extracted in water bath at 50 °C for 3 hours. The extract obtained, filtered and then concentrated to dryness under reduced pressure and the residue later dissolved in water to analysis.

### **Animals**

Twelve male and twelve female Wistar rats weighing respectively  $222.5 \pm 22.05$  g and  $191.16 \pm 12.92$  g obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) were used. They were housed in 47x34x18 cm polyethylene cages under standard conditions of temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), controlled humidity and 12 h-light/dark cycle. All animals were fasted overnight but provided free access to water and experimental procedures were performed during the light phase of the cycle. The experiments were performed after approval of the protocol by the FEPPS Ethics Committee (number CEP/FEPPS-04/2008) and were carried out in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals (Olfert, 1998).

### **Acute toxicity**

The experiment were conducted distributing the rodents into groups of six rats each, that were treated orally (by gavage) with water (control) or 2000 mg/kg of *G. manicata* aqueous root extract. The 2000 mg/kg dose was chosen based on previous experiments of our research group that has demonstrated low or non toxicity signs. All treatments were administered at a constant volume of 10 ml/kg. The animals was observed after dosing for 1 min at 5, 15, 30 min and 1, 2, 3, 4, 5, 6 h for the presence of respiratory, digestive and neurological alterations. The specific signs monitored were alterations in the locomotor activity, stimulus reaction, piloerection, salivation, gasping, ptose, tearing, tremors, writhing, and convulsions. The number of deaths and weight was noted in each 24 h for 14 days. After the 14th day, rat which survived were euthanasied, necropsied and analyzed for macroscopic alterations in heart, liver, kidneys, adrenals, lungs, brain and spleen. The weight of the organs were determined and expressed as relative weight (organ mass/ body weight x 100). In acute toxicologic studies, it was used 6 animals by group and only the high dose to reduce the number of animals in studies, considering the ethical aspects (Brasil, 2004; Cazarin, 2004).

### **Derivatization and extraction procedures**

Standard of BMAA derivatives were prepared by treatment of 250  $\mu\text{L}$  of BMAA solution (10 ng/mL) with a mixture of 100  $\mu\text{L}$  ethanol and 80  $\mu\text{L}$  pyridine (65:25:10 by volume). A 15  $\mu\text{L}$  aliquot of ethyl-chloroformate was added and the mixture was shaken vigorously for about 30 s until the evolution of  $\text{CO}_2$  gas was complete. The derivatives were extracted with 100  $\mu\text{L}$  of dichloromethane, with vigorous shaking. The mixture solution was centrifuged at 3500 rpm for 10 min. The extraction was performed twice. The organic layer was dried under  $\text{N}_2$  gas and reconstituted by adding 100  $\mu\text{L}$  of dichloromethane. A 1  $\mu\text{L}$  aliquot of extract was injected into the GC injection port running in a solvent vent mode (Guo *et al.* 2007). The aqueous extract of roots and leaves received the same treatment and were analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Both were analyzed with or without spiking standard BMAA.

Another extraction procedure was tested to investigate the presence of BMAA in roots and leaves. For the release of any protein-bound BMAA, acid hydrolysis was accomplished using 6 M HCl as the extraction medium, and incubating for 17 h at 110  $^\circ\text{C}$ . Excess of HCl was evaporated and the residue dissolved in water (600  $\mu\text{L}$ ). After centrifugation the extracts were passed through syringe filters. Ultrafiltration was used when necessary before aliquots were injected into the liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). These samples were also derivatized and analyzed by GC-MS system. All of them were analyzed with or without spiking standard BMAA

### **Determination of BMAA by GC-MS**

The samples were analyzed by GC/MS using a quadrupole MS system (Shimadzu CLASS17A-QP5000) operating at 70 eV. GC analysis was performed using a fused silica capillary column (30 cm x 0.25 x 0.25 mm, coated with DB-5). Injector and detector temperatures were set at 270  $^\circ\text{C}$ ; the oven temperature was held at 60  $^\circ\text{C}$  for 3 min and then ramped to 280  $^\circ\text{C}$  at a rate of 20  $^\circ\text{C}/\text{min}$ . The final temperature of 280  $^\circ\text{C}$  was reached in 5 min. Helium was employed as carrier gas (1 ml/min). This methodology was adapted from Guo and co-workers (2007). Under these conditions, the retention time of the BMAA derivative was 12.45 min, as demonstrated in the chromatogram (Figure 1).

**FIGURE 1** - a) Chromatogram and b) EI spectra of ethyl chloroformate derivatization of standard BMAA.

### **Determination of BMAA by LC-MS/MS - Mass spectrometric condition**

The analysis was made by direct infusion. The mobile phase used in the infusion procedure was mixed with solvent A (0.1% formic acid) and solvent B (acetonitrile) 50:50 v/v. The flow rate of syringe was  $10\mu\text{L min}^{-1}$ . A Sciex API 5000 triple stage quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used. The ions were monitored in full scan in positive mode, nitrogen was used for both nebulizer and collision gas. The profile of fragmentation was obtained from selection of a pattern ion and monitored in MS2 mode. By tuning MS1 for  $m/z$  119 and then scanning MS2 for product ions several fragments were observed. The optimal collision energy was 10 eV. For safe identification five specific product ions ( $m/z$  102, 88, 76, 73 and 44), all derived from a precursor ion of  $m/z$  119 and originating from different parts of the molecule, were detected (Rosen, 2008).

### **Statistical analysis**

All the results were expressed as mean  $\pm$  SEM (standard error of mean). Statistical analysis for body weight gain was evaluated by analysis of variance (ANOVA) of repeated measures and relative organs weight was done by one-way ANOVA, using SPSS 10.0 software. The significant level was set at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

Rats administered *G. manicata* roots extract did not develop any clinical signs of toxicity either immediately or during the post-treatment period with 2000 mg/kg. In the same observation period, no mortality occurred. No macroscopic changes in organs and none statistically significant changes in the assessment of the relative mass of organs of necropsied animals were observed.

The analytical investigation of the aqueous roots and leaves extracts and those that were made by acid hydrolysis showed no chromatographic profile or mass spectrum characteristic of the standard of ethyl chloroformate derivatization of BMAA. Similarly, in the LC-MS/MS analysis, in both extraction procedures, it was not observed the

presence of neurotoxin. After several analyses of different samples, it was considered absent in *G. manicata*.

## DISCUSSION

*G. manicata* is an appreciated ornamental plant, native of South Brazil. Despite of this use, none toxicity studies were found in scientific literature. After an extensive review we observed that this specie was able to be infected by *Nostoc punctiforme* L. (Chiu *et al.* 2005) and as result of this symbiosis could occur the production of beta-N-methylamino-L-alanina (BMAA), a non protein amino acid recently associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis-Parkinsonism-Dementia Complex (ALS/PDC) in the South Pacific Island of Guam. Considering this, the present work proposed the elucidation of the acute toxicity and the investigation of the presence of BMAA. The present investigation shows that the aqueous extract of the roots of *G. manicata* is non-toxic by oral route in rats, at least up to maximum doses of 2000 mg/kg body weight.

For the chemical analysis by GC/MS we had chosen to use chloroformates derivatizing with simplest alkyls, ethyl, already known as one of the favorable reagents for treating amino groups in gas chromatography for years that were revealed randomly as exceptionally rapid esterification agents (Husek, 1998). The chemical pretreatment of the sample aims at removing the active hydrogen atoms from all, or at least most, of the reactive groups. It is desirable that it should be carried out as quickly as possible with a minimum number of reagents and reaction steps. How BMAA is a non-proteic aminoacid, ethyl chloroformate was choose for derivation procedures to GC/MS analysis.

To eliminate any doubt regarding the presence or absence of BMAA, we chose to perform confirmation by LC-MS/MS analysis, focusing the absence of this non-proteic amino acid in the samples investigated.

Also, it is important to stress that, the *Nostoc* symbiosis is widespread amongst the *Gunnera* species (Wanntorp & Wanntorp, 2003). *Nostoc* aggregates are clearly visible in *G. manicata* transversal sections of the stem, as greenish dots or areas (R.B. Singer, pers. obs). Even the tiny *G. herteri* (a small and annual species, which is apparently the sister-group of all remaining *Gunnera* spp.) (Rutishauer *et al.* 2004) displays the anatomic stem channels that allow the *Nostoc* "infection". The absence

of toxic compounds in *G. manicata* strongly suggests that the presence of symbiotic *Nostoc* colonies does not grant per se the secretion of the aforementioned toxic compounds. This situation suggests that other factors (ex: ecological factors, phylogenetic biases, etc.) may be involved. Sampling *G. manicata* stems in different regions may help to elucidate if the presence/absence of toxic compounds is ecologically biased or not. On the other hand, a dense sampling within *Gunnera* species may allow elucidating whether the presence or not of toxic compounds is phylogenetically biased (for example: toxic compounds are found or lacking in groups of phylogenetically-related species).

In conclusion, the present study demonstrated the absence of the neurotoxin BMAA in samples of *G. manicata* native from Southern Brazil, that matter with the absent of acute toxicity in aqueous roots extracts of *G. manicata*. These results suggest that the *G. manicata* can be more secure to the pharmacological use, because these samples without BMAA do not induce neurological or systemic injuries. Considering these results, these data demonstrate that the extracts of the roots of *G. manicata* have a high margin of drug safety and other phytochemical and biological studies are being developed in order to prospect bioactive compounds or plant extracts.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors would like to acknowledge Dr. Ernani Pinto for providing us with BMAA, synthesized by his research group, for our preliminary analysis and to FEPPS, for animals donation. This work was supported by CNPq.

## **REFERENCES**

BANACK, S. A.; MURCH, S. J.; COX, P. A. Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Island. *J. Ethnopharmacol.*, v.106, n.1, p.97-104, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº90. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. *Diário Oficial da União*, n.53, Brasília, DF, 18 de março de 2004. Seção1, p.34.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Rev. Bras. Ciênc. Farmac.*, v.40, n.3, p.289-299, 2004.

CHIU, W. L., PETERS, G. A.; LEVIEILLE, G.; STILL, P. C.; COUSINS, S.; OSBORNE, B.; ELHAI, J. Nitrogen Deprivation Stimulates Symbiotic Gland Development in *Gunnera manicata*. *Plant Physiol.*, v.139, n.1, p.224-230, 2005.

COX, P. A.; BANACK, S. A.; MURCH, S. J.; RASMUSSEN, U.; TIEN, G.; BIDIGARE, R. R.; METCALF, J. S.; MORRISON, L. F.; CODD, G. A.; BERGMAN, B. Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.*, v.102, n.14, p.5074-5078, 2005.

GUO, T.; GEIS, S.; HEDMAN, C.; ARNDT, M.; KRICK, W.; SONZOGNI, W. Characterization of ethyl chloroformate derivative of beta-methylamino-l-alanine. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, v.18, n.5, p.817-825, 2007.

HUSEK, P. Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents, *J. Chromatogr. B*, v. 717, n.1-2, p.57-91, 1998.

NILSSON, M.; BERGMAN, B.; RASMUSSEN, U. Cyanobacterial diversity in geographically related and distant host plants of the genus *Gunnera*. *Arch. Microbiol.*, v.173, n.2, p.97-102, 2000.

OLFERT, E.D., CROSS, B.M., MCWILLIAM, A. Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación. Ontario, *Canadian Council on Animal Care*, 2.ed, v.1, pp. 211, 1998.

OSBORNE, B. A.; CULLEN, A.; JONES, P. W.; CAMPBELL, G. J. Use of nitrogen by the *Nostoc-Gunnera tinctoria* (Molina) Mirbel symbiosis. *New Phytol.*, v.120, n.4, p.481-487, 1992.

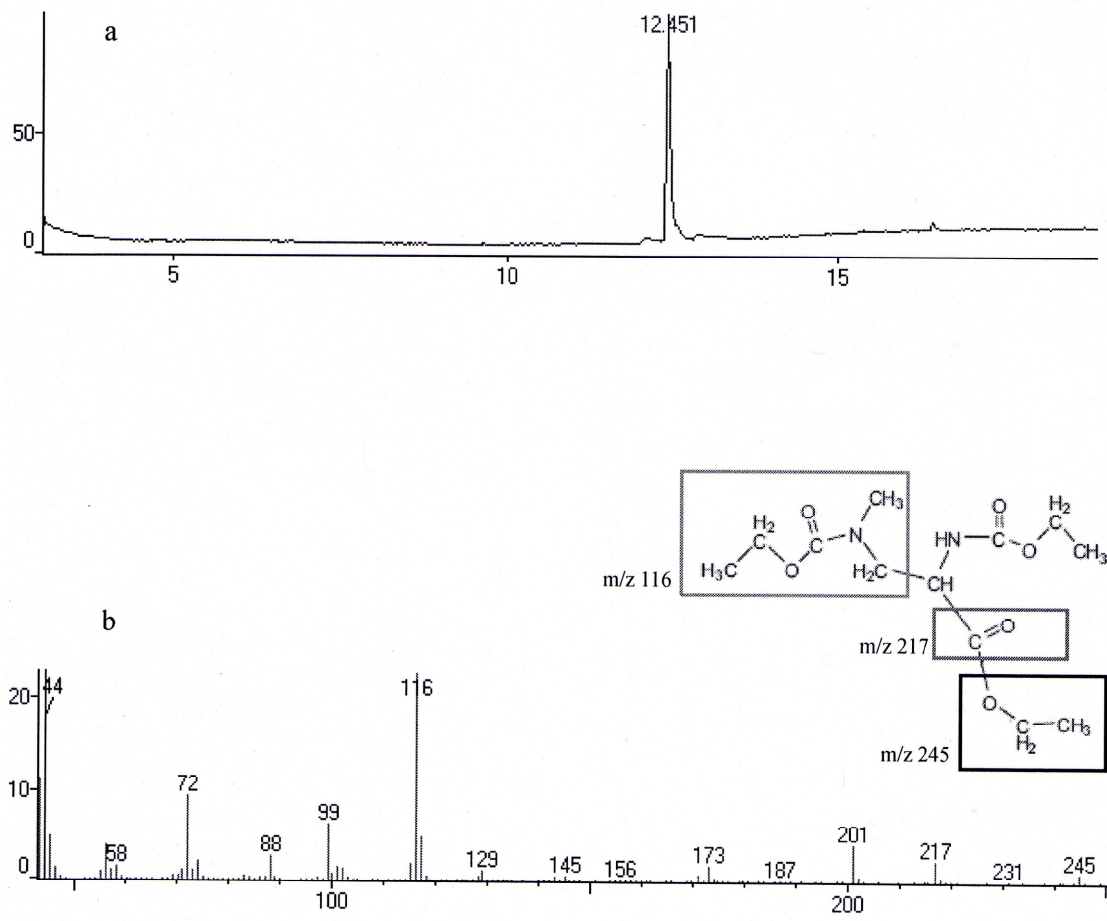


PAPAPETROPOULOS, S. Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) paradigm. *Neurochem. Int.*, v.50, n.7-8, p.998-1003, 2007.

ROSÉN, J.; HELLENÄS, K. E. Determination of the neurotoxin BMAA (b-N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry), *Analyst*. v.133, n.12, p.1785-1789, 2008.

RUTISHAUSER, R.; WANNTORP, L.; PFEIFER, E. *Gunnera herteri* – developmental morphology of a dwarf from Uruguay and Brazil (Gunneraceae). *Plant Syst. Evol.*, v.248, n.1-4, p.219-241, 2004.

WANNTORP, L.; WANNTORP, H. E. The biogeography of *Gunnera* L.: vicariance and dispersal. *J. Biogeogr.*, v.30, n.7, p. 979-987, 2003.



**FIGURE 1** - a) Chromatogram and b) EI spectra of ethyl chloroformate derivatization of standard BMAA.

## 5. MANUSCRITO II

---

**“CHEMICAL CONSTITUENTS AND PHARMACOLOGICAL PROFILE OF  
*Gunnera manicata* L.”**

Artigo submetido para publicação na revista *Biochemical Systematics and Ecology*.



A ausência da neurotoxina BMAA e de toxicidade aguda nos extratos aquosos de *Gunnera manicata* L. abriram perspectivas a novos estudos químicos e biológicos. Assim, dando sequência à avaliação da espécie nativa, o presente manuscrito descreve a investigação fitoquímica e farmacológica de *G. manicata*. Os extratos testados apresentaram atividade frente *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans*. Não foi evidenciada atividade sob o sistema reprodutor feminino no ensaio uterotrófico. A capacidade antioxidante foi avaliada pela reação com 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH\*) e todas as amostras apresentaram boa a moderada atividade. Na análise fitoquímica por CL-EM/EM não foi detectado (Z)-venusol. Todas as amostras apresentaram ácido gálico. Os extratos avaliados demonstraram alto teor de compostos fenólicos totais apesar da baixa concentração de flavonóides totais.



## CHEMICAL CONSTITUENTS AND PHARMACOLOGICAL PROFILE OF

### *Gunnera manicata* L.

**Authors: K. C. Mariotti<sup>1</sup>, J. M. Nunes<sup>2</sup>, S. S. Pinto<sup>3</sup>, G. Meirelles<sup>2</sup>, F. Barreto<sup>4</sup>, R. Fortunato<sup>4</sup>, G. L. von Poser<sup>1</sup>, R. B. Singer<sup>5</sup>, E. Dallegrave<sup>6</sup>, S. T. Van Der Sand<sup>3</sup>, R. P. Limberger<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, CEP: 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Produção de Matéria-Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, CEP: 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500/202, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup> Laboratório Nacional Agropecuário no Rio Grande do Sul – LANAGRO-RS- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Estrada Ponta Grossa, 3036, CEP: 91780-580, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>5</sup> Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500. Laboratório de Sistemática de Criptógramas, sala 107. Bairro Agronomia CEP: 91501-970, Porto Alegre-RS, Brazil

<sup>6</sup> Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Rua Domingos Crescêncio, nº132, 8º andar, CEP: 90650-090, Porto Alegre, RS, Brazil

#### **\*Correspondence author:**

R. P. Limberger

Laboratório de Análises e Pesquisas Toxicológicas

Departamento de Análises

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 2752

90610-000 - Porto Alegre - RS, Brazil

Tel.: +55 51 3308-5297; fax: +55 51 3308-5437.

E-mail address: renata@ufrgs.br (Prof. Dr. Renata Pereira Limberger)

## **Abstract**

*Gunnera perpensa* (Gunneraceae) is an African plant widely used in traditional medicine. In agreement, this specie presents antibacterial and antifungal compounds and activity on female reproductive system. Nevertheless, there is no information regarding South American *Gunnera* species. Therefore, this study assessed the phytochemical and pharmacological profiles of the Brazilian *G. manicata*. Antimicrobial activity was screened and showed that *S. aureus* and *C. albicans* were the most sensitive microorganisms. Uterotrophic assay did not show *in vivo* anti or estrogenic activity. Phenolic compounds and venusol were investigated by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). All samples presented gallic acid, and the methanolic extract of leave presented hyperoside but venusol was not found. Total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) were evaluated. TPC was higher in methanol extract being TFC low in all extracts. Antioxidant activity was evaluated by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical test. All samples presented good to moderated antioxidant activity.

**Keywords:** *Gunnera manicata* L., Gunneraceae, antimicrobial assay, DPPH, phenolic content, uterotrophic assay.

## **1. Introduction**

*Gunnera* (Gunneraceae) species are mainly found in the Southern hemisphere. In Southern Africa, *G. perpensa* is a medicinal plant used by traditional healers for the treatment of venereal diseases. These medicinal properties are due to the presence of antibacterial and antifungal compounds (Buwa, 2005). Rural inhabitants of the Eastern Cape Province use leaves of this plant as a dressing for wounds (Drewes *et al.*, 2005). It is also a traditional herbal remedy used by many South African women as antenatal medications or to induce or augment labour, to treat women infertility, expel the placenta and/or prevent post-partum haemorrhage (Kaido *et al.* 1997; Kahn *et al.* 2004). Kahn and co-workers (2004) shown that aqueous extract of *G. perpensa* directly stimulates a contractile response for both the ileum and uterus muscle in isolated organ assay. *Gunnera manicata* L. species is a native plant from Southern



Brazil, in high altitudes (from 900 m onwards) at the borderline between the States of Rio Grande do Sul and Santa Catarina, in a region locally known as “Aparados da Serra”. Despite of being appreciated as an ornamental plant and belong to the same family (Gunneraceae) of *G. perpensa* (extensive studied species), there are few data about *G. manicata* in scientific literature. So, new approaches about this species are necessary.

Considering these data, the aim of this work was to evaluate the pharmacological and phytochemicals profiles of *G. manicata*. Therefore, this study evaluated the effect of plant extracts on the female reproductive system in rats, the antimicrobial properties, antioxidant potential, total phenol content (TPC), total flavonoid content (TFC) and the presence of phenolic compounds and (z)-venusol by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometer (LC-MS/MS). This study represents the first analysis of pharmacological and phytochemicals proprieties of *G. manicata*.

## **2. Materials and methods**

### 2.1 Plant material

Roots and leaves of *G. manicata* were collected in Aparados da Serra region, Southern Brazil, and identified by Rodrigo B. Singer. A voucher specimen (R.B. Singer s. n., Serra da Roçinha, January 15th, 2009) is deposited at herbarium ICN—Departamento de Botânica—UFRGS in Porto Alegre, Brazil.

### 2.2 Preparation of extracts

The aqueous extracts were made with dried roots or leaves extracted in a water bath at 50 °C for 3 hours (ARE50 / ALE50 aqueous roots and aqueous leaves extracts, respectively) or at 100 °C for 1 hour (ARE 100 / ALE 100 aqueous roots and aqueous leaves, respectively). The methanol extract was macerated for 24 h at room temperature (MRE / MLE – methanol roots and methanol leaves extract, respectively). These extracts were collected, filtered, concentrated to dryness under reduced pressure and the residue was refrigerated until the experiments.

### 2.3 Assay for antimicrobial activity

Determination of antimicrobial activities of *G. manicata* extracts was accomplished by agar diffusion method. The dried plant extracts were dissolved in water or methanol to a final concentration of 25.0 mg ml<sup>-1</sup> and filtered by 0.22 µm Millipore filters for sterilization. A screening of antibacterial activities was carried out with the extracts of the test organisms Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 8668, *Bacillus subtilis* ATCC 19659), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25933) and yeast (*Candida albicans* ATCC 10231). By means of a sterile cork borer wells (9 mm) were punctured in plates containing Muller-Hinton agar previously seeded with one of the test organisms (the final inoculum size was 1x10<sup>8</sup> CFU/ml, 0.5 MacFarland). One hundred microliters (100 µL) of extract were added in each well. The Petri dishes were incubated at 8 - 10°C for 16 h for the diffusion of the bioactive compounds. After this period, the incubation continued at 28 - 37°C for 24 h. So, the inhibition zones were measured. The diameters of inhibition zones were used as a measure of antimicrobial activity. Assays were carried out in triplicate. Gentamicin, was used as positive controls for bacteria and nystatin for fungi.

## 2.4 Uterotrophic assay

### 2.4.1 Animals

Immature female Wistar rats (21 days) obtained from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS, Porto Alegre, RS, Brazil) were used. They were housed in polyethylene cages under standard conditions of temperature (22 ± 2 °C), controlled humidity and 12 h-light/dark cycles. Standard pellet food and tap water were available *ad libitum*. The experiments were performed after approval of the protocol by the FEPPS Ethics Committees (numbers 04/2008) and were carried out in accordance with current guidelines for the care of laboratory animals.

### 2.4.2 Biological assay

The test compounds were given daily for 3 consecutive days by oral gavage (po) to the immature female rats (6-7 animals/group). ARE50 at the dose of 500.0 and 1500.0 mg/kg/day were used to assess possible estrogenic activity. For detection of antiestrogenicity, tamoxifen 20.0 mg/kg/day and a dose of 1500.0 mg/kg/day were administered to estrogen-treated females (estradiol cypionate 0.4 mg/kg/day). The

vehicle (corn oil 10 ml/kg/day) was administered as a negative control while estradiol cypionate (0.4 mg/kg/day) was used as a positive control for estrogenicity and tamoxifen (20.0 mg/kg/day) as a positive control for antiestrogenicity. The dosing volume for all solutions was 10 ml/kg body. Animals were weighed everyday and killed by cervical dislocation 24 h after the final dose. After euthanasia, the rats were necropsied and analyzed for macroscopical alterations in liver, kidneys, adrenals, uterus and ovaries. The uterus was excised, trimmed free of fat, pierced, and dried to remove fluid. The body of the uterus was cut just above its junction with the cervix and at the junction of the uterine horns with the ovaries (Odum *et al.*, 1997; Arbo *et al.*, 2009). The weight of the organs was determined and expressed as relative weight (organ mass/ body weight x 100).

## 2.5 Assay of DPPH spectrophotometric

The quantitative evaluation of antioxidant activity against the stable radical DPPH was performed by spectrophotometric measures of the consumption of this radical in the presence of antioxidants (Brand-Williams *et al.*, 1995). Briefly, aliquots of aqueous or methanol solution of test samples in different concentrations were added to a DPPH<sup>•</sup> ethanolic solution (molar absorption coefficient 517 nm: 11500 M cm<sup>-1</sup>). The measurement of DPPH solution absorbance started immediately after mixing the samples. The decrease in absorbance was monitored at  $\lambda = 517$  nm during 600 seconds with measurements every 1 second and at 25 °C. For the evaluation of the antioxidant capacity, experimental data (kinetics profiles of DPPH<sup>•</sup> decay) were adjusted in terms of the percentage reduction of the DPPH and Q, sometime referred to as “inhibition” or “quenching”, which is defined by

$$Q = 100 (A_o - A_c)/A_o$$

where  $A_o$  is the initial absorbance and  $A_c$  is the value of the added sample concentration  $c$ . This value of  $A_c$  should be that in the cuvette in the absence of any DPPH, and should take into account the dilution of the original sample solution by the added DPPH solution (Molyneux, 2004). The experiments were performed in triplicate and results were expressed as the average of  $A/A_o$  and the  $IC_{50}$  (concentration of 50% DPPH radical bleaching) was calculated for each sample. Ethanol was used as blank in the spectrophotometer. Quercetin was used as reference.

## 2.6 Phytochemical profile

### 2.6.1 Determination of total phenolic content

Total phenolic content (TPC) was assayed using the Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) modified method. Appropriate dilutions of the samples were oxidized with 0.2 N Folin-Ciocalteu reagent (Merck Darmstadt, Germany; 2 N diluted 10-fold) and after 5 min the reaction was neutralized with saturated sodium carbonate (75 g l<sup>-1</sup>). After 30 min of reaction at room temperature the absorbance of the resulting blue color was measured at 765 nm wavelength with an ultraviolet-visible Biospectro SP-220 spectrophotometer. TPC was expressed as milligrams of quercetin equivalent per 100 milligram of dry extract (QE(100 mgDE)<sup>-1</sup>) through a calibration curve of quercetin (Ivanova *et al.*, 2005), with concentrations ranging from 50 to 500 mg ml<sup>-1</sup> ( $r^2 > 0.99$ ).

### 2.6.2 Determination of the total flavonoid content (TFC)

The total flavonoid content in aqueous and methanol extracts was determined according to the German Pharmacopoeia method (DAB 9) general method, using AlCl<sub>3</sub> 1% (m/v).

Each plant extract (1.0 ml of 1:100 g ml<sup>-1</sup>) were separately mixed with 7.0 ml of methanol prior to 2.0 ml of 1% aluminum chloride. The calibration curve was performed with methanolic quercetin solutions at concentrations of 1.0 to 8.0 µg ml<sup>-1</sup> ( $y = 0.078x + 0.0065$ ,  $r^2 = 0.998$ ). Absorption of these sample solutions was measured after 10 min at 420 nm wavelength with an ultraviolet-visible Biospectro SP-220 spectrophotometer. The TFC was calculated from the equation:

$$C = \frac{AFd}{mE^{1\%}_{1cm}}$$

where “C” is the TFC content expressed as grams of quercetin per 100 g of sample, “A” is the measured absorption (A.U.), “Fd” is a dilution factor, “m” is the sample weight (g) and “E<sup>1%</sup><sub>1cm</sub>” is the specific absorption of quercetin - AlCl<sub>3</sub> complex. Each analysis was repeated three times.

### 2.6.3 LC-MS/MS analysis

The analysis was made by direct infusion in a Sciex API 5000 triple stage quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The mobile phase

used in the infusion procedure was mixed with solvent A (0.1% formic acid) and solvent B (acetonitrile). The flow rate of syringe was  $10 \mu\text{l min}^{-1}$ . The ions were monitored in full scan in positive and negative mode, nitrogen was used for both nebulizer and collision gas. The optimized parameters were: declustering potential 100 eV, entrance potential 10 eV, collision energy 35 eV, and collision cell exit potential 10 eV. The profile of fragmentation was obtained from selection of a pattern ion and monitored in MS2 mode. The target ions monitored were 169 for gallic acid; 301 for quercetin; 353 for chlorogenic acid; 463 for hyperoside and 609 for rutin (Barberán, 2001; Clifford, 2003). The (z)-venusol analysis was performed according to Kahn and co-workers (2004).

## 2.7 Data analysis

For uterotrophic assay, data were analyzed by analysis of variance (ANOVA). Differences between groups were determined by Bonferroni's post-hoc, the significant level was set at 1% ( $p < 0.01$ ).

The  $IC_{50}$  values were determined by linear regression between the DPPH radical bleaching and sample concentration. All results were obtained from three independent experiments and given as mean  $\pm$  standard deviation (SD). The correlation between the antioxidant activity and total phenolic content was also determined using the linear regression equation.

## 3. Results

The results of antimicrobial activity were assessed qualitatively by the presence or absence of inhibition zones. Different extracts at  $25 \text{ mg ml}^{-1}$  (w/v) obtained from of *G. manicata* demonstrated this activities. For the antibacterial propriety only ALE50 exhibited activity against *S. aureus* and *S. pyogenes*. MRE exhibited activity against *B. subtilis* and *C. albicans*. MLE exhibited activity against *C. albicans*. Neither ARE100 nor ALE100 exhibited antimicrobial activities. None sample extracts tested exhibit antimicrobial activity against gram-negative bacterial species tested in this study (Table 1).

**Table 1.** Antimicrobial activity of *G. manicata* extracts (inhibition zones in diameter (mm)).

***G. manicata* extracts (25 mg ml<sup>-1</sup>)      ARE100   ARE100   ARE50   ALE50   MLE   MRE**

**Microorganisms species**

<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19659	-	-	-	-	-	17
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	20	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 8668	-	-	-	16	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25933	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	-	-	-	-	18	16

\*A dash (–) indicate no antimicrobial activity.

In the uterotrophic assay, no abnormal clinical findings or body weight changes were detected in the rats given the test extracts. The wet and dry relative weights of the uterus of rats given estradiol cypionate (0.4 mg/kg/day) were significantly increased compared to the vehicle. Tamoxifen 20.0 mg/kg/day significantly reverted the estradiol effect. The uterus relative mass of rats treated with extracts were not significantly different from control (Figure 1).

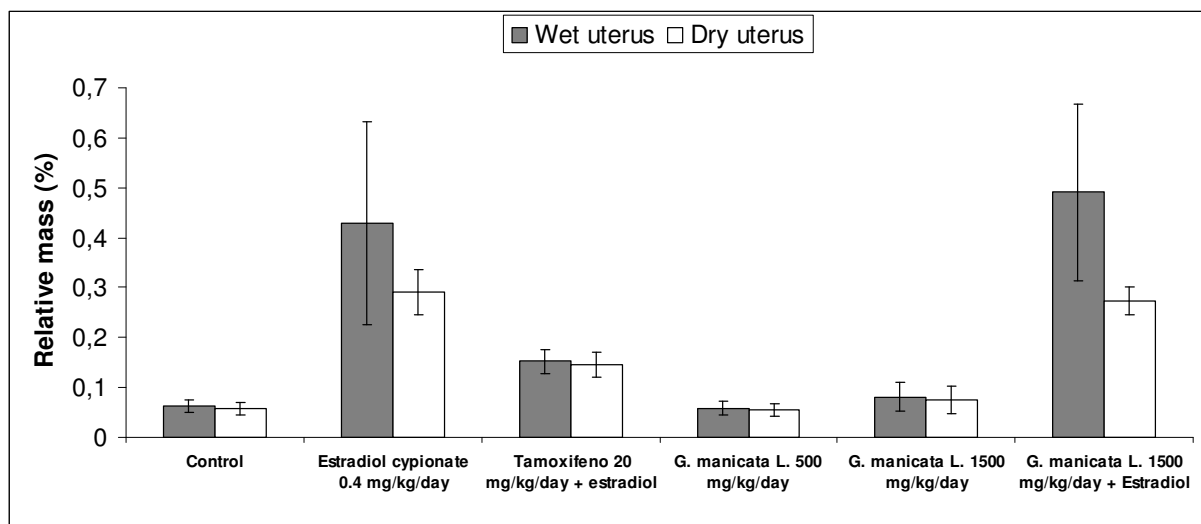


Figure 1. Effect of *G. manicata* extracts in the wet and dry uterus relative mass. Values represent mean  $\pm$  SE of the relative uterus weight (n=6-7).

In analysis of antioxidant potential, the ability of samples to scavenge DPPH radical was determined on the bases of their concentrations providing 50% inhibition (IC<sub>50</sub>). The ALE100, ARE100 and ARE50 exhibited strong antioxidant activity.

The TPC of plant extracts were determined using a colorimetric assay method. Results were expressed as quercetin equivalent per 100 milligram of dry extract. The amounts of TPC were higher in MRE, followed by ARE100 and ALE100 (Table 2). In statistical analysis, there was no linear correlation between TPC and antioxidant activity ( $r^2=0.2316$ ).

In analysis of TFC, all samples demonstrated low content of flavonoids, contrasting with the values of TPC.

**Table 2.** Total Flavonoid Content (TFC) (g% of extract), Total Phenolic Content (TPC) (QE(100 mg DE)<sup>-1</sup>) and IC<sub>50</sub> values (µg mL<sup>-1</sup>) from aqueous and methanol *G. manicata* extracts.

<i>G. manicata</i> extracts	TFC	TPC	IC <sub>50</sub>
ALE50	1.69 ± 0.0005	13.42 ± 1.06	28.17 ± 0.80
ARE50	1.59 ± 0.002	19.47 ± 1.53	15.68 ± 0.36
ALE100	2.85 ± 0.057	28.39 ± 1.47	12.47 ± 0.16
ARE100	0.31 ± 0.002	28.11 ± 1.61	15.92 ± 0.38
MLE	0.53 ± 0.004	11.70 ± 1.38	39.89 ± 0.38
MRE	3.85 ± 0.002	30.13 ± 1.24	33.93 ± 0.61

In the investigation of five different phenolic compounds by LC-MS/MS, all extracts present gallic acid and only methanol extract of leave exhibited hyperoside. Rutin, quercetin and chlorogenic acid were not found in the analyzed samples as well as Z-venusol was also not found.

#### 4. Discussion

*G. manicata* is a known and appreciated ornamental plant native from Southern Brazil. Considering these facts and the absence of scientific information about pharmacological and phytochemical aspects, this work was performed. For both, different extracts were tested against specific target microorganisms utilized as taxonomical representatives in an initial screening. The ALE50 extracts of *G. manicata* showed activity against *S. pyogenes* and *S. aureus*, one of the most persistent infectious microorganisms commonly found in nosocomial infections

(Steenkamp 2004). The MRE and MLE exhibited activity against *C. albicans*, a significant cause of infection in humans. Several of the more commonly isolated of these species are less susceptible to commonly used azole antifungal drugs, a factor that possess significant difficulties for effective treatment (Coleman *et al.*, 1998).

None extract tested exhibited activity against gram-negative bacteria. This result may be explained because these microorganisms have an outer membrane consisting of lipoproteins and lipopolysaccharides, which is selectively permeable and thus regulates access to the underlying structures. This renders the Gram-negative bacteria generally less susceptible to plant extracts than the Gram-positive bacteria (Samec *et al.*, 2009).

Effects of plant extracts on the female reproductive system were not detected through the uterotrophic assay. No abnormal clinical findings or body weight changes were detected in organs of the rats given the test extracts. This data was according to the chemical analysis that showed absence of (z)-venusol. This is the major compound find in roots and rhizomes of *G. perpersa* and the activities on uterus is attributed to its action in conjunction with substances present in the whole extract (Khan *et al.*, 2004).

For the antioxidant analysis, the samples tested indicated a good to moderate activity. The MRE and the MLE showed moderate antioxidant potential when compared, a good antimicrobial and antifungal activities and high TPC. These data may appoint to a correlation between antimicrobial activities and the amount of phenolic compounds.

In this work, was not verify a linear correlation between TPC and antioxidant potential. This relationship reported in literature is somewhat confusing. Some investigators have proposed the existence of a close correlation between antioxidant activity and phenolic compounds content of the extracts obtained from various natural sources. Others did not correlate them merely to each other and contributed a wide range of compounds such as phenolics, peptides, organic acids and other components in antioxidant activity (Ebrahimabadi *et al.*, 2010).

Flavonoids constitute the largest group of plant phenolics (Balasundram *et al.*, 2006) and its antimicrobial effects have been extensively researched (Samec *et al.*, 2009). Considering these data, the presence of flavonoids was investigated. As result, low TFC were found despite of the great amount of TPC in sample analyzed. These data suggest that another class of phenolic compounds, like hydrolyzate



tannins, for example, may be responsible for amount of TPC. This fact may be partially confirmed by the LC-MS/MS analysis, that present gallic acid in all extracts.

This findings opening exciting possibilities for more in-deep studies using *G. manicata* as a source for the discovery of novel leader structures to be used in drug production, and also for the development of active plant extracts useful in treating a variety of humans and animals disease. The results founded in this work encourage complementary studies on the chemical composition of the plant extracts focusing in separation and structure elucidation of their active components and evaluation of biological activity of each compound separately.

### **Conflict of interest statement**

The authors declared that there is no conflict of interest.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank CNPq for financial support.

### **References:**

Ao, C., Li, A., Elzaawely, A. A., Xuan, T. D., Tawata, S., 2008. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Ficus microcarpa* L. fil. Extract. Food Control. 19, 940–948.

Arbo, M. D., Franco, M. T., Larentis, E. R., Garcia, S. C., Sebben, V.C., Leal, M. B., Dallegrave, E., Limberger, R. P., 2009. Screening for in vivo (anti)estrogenic activity of ephedrine and p-synephrine and their natural sources *Ephedra sinica* Stapf. (Ephedraceae) and *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) in rats. Arch Toxicol. 83, 95-99.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 99, 191–203.

Barberán, F. A. T., Gil, A. I., Cremin, P., Waterhouse, A. L., Plerce, B. H., Kader, A. A., 2001. HPLC-DAD-ESI/MS Analisis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums. J. Agric. Food Chem. 19, 4748-4760.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol-Leb.* 28, 25-30.

Buwa, L.V., van Staden, J., 2006. Antibacterial and antifungal activity of traditional medicinal plants used against venereal diseases in South África. *J. Ethnopharmacol.* 103, 139–142.

Clinfford, H., Johnston, K. L., Knight, S., Kuhnert, N., 2003. Hierarchical scheme for LC-MS identifications of chlorogenic acids. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2900-2911.

Coleman, D. C., Rinaldi, M. G., Haynes, K. A., Rex, J. H., Summerbell, R. C., Anaissie, E. J., Li, A., Sullivan, D. J., 1998. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol.* 36, Suppl 1:156-65.

Drewes, S. E., Khan, F., Vuuren, S. F. V., Viljoen, A. M., 2005. Simple 1,4-benzoquinones with antibacterial activity from stems and leaves of *Gunnera perpensa*. *Phytochem.* 66, 1812–1816.

Ebrahimabadi, A. H., Ebrahimabadi, E. H., Djafari-Bidgoli, Z., Kashi, F. J., Mazoochi, A., Batooli, H., 2010. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. *Food Chem.* 119, 452–458.

Fumagali, E., Gonçalves, R. A. C., Machado, M. de F. P. S., Vidoti, G. J., Oliveira, A. J. B., 2008. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Braz. J. Pharmacognosy.* 18, 627-641.

Khan, F., Peter, X. K., Mackenzie, R. M., Katsoulis, L., Gehring, R., Munro, O. Q., Heerden, F. R. Van., Drewes, S. E., 2004. Venusol from *Gunnera perpensa*: structural and activity studies. *Phytochem.* 65, 1117-1121.

Langfield, R. D., Scarano, F. J., Heitzman, M. E., Kondo, M., Hammond, G. B., Neto C. C., 2004. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. J. Ethnopharmacol. 94, 279–28.

McGaw, L. J., Eloff, J. N., 2008. Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. J. Ethnopharmacol. 119, 559–574.

Odum J, Lefevre PA, Tittensor S, Paton D, Routledge EJ, Beresford NA, Sumpter JP, Ashby J (1997) The rodent uterotrophic assay: Critical protocol features, studies with phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. Regul Toxicol Pharmacol 25, 176-188.

Šamec, D., Gruz, J., Strnad, M., Kremer, D., Kosalec, I., Jurišić Grubešić, R., Karlović, K., Lucić, A., Piljac-Zegarac, J., 2010. Antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae) flower and leaf infusions (*Teucrium arduini* L. antioxidant capacity). Food Chem. Toxicol. 48, 113–119.

Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, Am. J. Enol. Vitic. 16, 144-158.

Sokmen, A., Jones, B.M., Erturk, M., 1999. The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. J. Ethnopharmacol. 67, 79–86.

Steenkamp, V., Mathivha, E., Gouws, M. C., Rensburg, C. E. J. van., 2004. Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. Journal of Ethnopharmacology. 95, 353–357.

Tshikalange, T. E., Meyer, J. J. M., Hussein, A.A., 2005. Antimicrobial activity, toxicity and the isolation of a bioactive compound from plants used to treat sexually transmitted diseases. J. Ethnopharmacol. 96, 515–519.

Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. D., 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4113-4117.

Van Vuuren, S.F., 2008. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 119, 462–472.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

---



Este trabalho objetivou traçar um perfil tóxico-farmacológico e fitoquímico de *G. manicata* (Gunneraceae), uma vez que, após extensa revisão na literatura, raros trabalhos foram encontrados sobre esta espécie nativa do RS.

Os dados relativos à *G. perpensa*, planta do mesmo subgênero e amplamente utilizada por tribos sul-africanas, serviram como base para orientar a seleção dos ensaios químicos e biológicos desse estudo.

Dessa forma, primeiramente foi realizado o ensaio de toxicidade oral aguda em ratos (machos e fêmeas), o qual não demonstrou sinais clínicos de toxicidade nem imediatamente, nem após o tratamento. Tais dados abriram perspectivas para novas investigações. No estudo do perfil fitoquímico as análises foram realizadas empregando-se CL-EM/EM e CG-EM. BMAA não foi detectado nas amostras investigadas.

Apesar da ausência de toxicidade e da neurotoxina, observações visuais demonstram a existência de simbiose entre a cianobactéria *Nostoc* nas amostras de *Gunnera* analisadas. Agregados de *Nostoc* são claramente visíveis como pontos ou áreas esverdeadas em cortes transversais de caules *G. manicata* (R.B. Singer, pes. obs). Mesmo *G. herteri*, uma espécie muito pequena e de ocorrência anual, (RUTISHAUER *et al.* 2004) exibe os canais anatômicos nos caules os quais permitem a infecção pela *Nostoc*. A ausência de BMAA em *G. manicata* sugere fortemente que a presença de colônias simbióticas de *Nostoc* não garante *per se* a secreção da neurotoxina. Esta situação sugere que outros fatores (ex: fatores ecológicos, filogenéticos, etc.) possam estar envolvidos. Amostras de caules de *G. manicata* coletadas de diferentes regiões poderiam ajudar a elucidar se a presença/ausência do composto tóxico é resultado de um desequilíbrio ecológico ou não. Também, uma amostragem maior de espécies de *Gunnera* poderia elucidar se a presença ou não da neurotoxina é uma tendência filogenética (por exemplo: compostos tóxicos são encontrados ou não em grupos de espécies filogeneticamente correlacionados).

Outro composto alvo de investigação foi o (Z)-venusol, o qual não foi encontrado nas amostras analisadas por CL-EM/EM.

No estudo de Khan e colaboradores (2004) foi verificado que o extrato bruto de *G. perpensa* apresentou melhor atividade sobre útero e íleo no ensaio de órgão isolado quando comparado ao composto isolado, (Z)-venusol. Os autores sugerem que os demais constituintes dos extratos testados possam ter um sinergismo com o

(Z)-venusol, de forma a manifestar o potencial espasmódico nos órgãos testados (KHAN *et al.*, 2004). Considerando a possibilidade de atuação conjunta de vários constituintes presentes nos extratos de *G. perpensa* sobre o trato reprodutivo feminino, tanto por seu uso popular na África (STEENKAMP, 2003; McGAW & ELFFORT, 2008; KHAN *et al.*, 2004), quanto pelos resultados de Khan e colaboradores (2004), procedeu-se a avaliação do efeito anti ou estrogênico de *G. manicata* L.. Para tanto, foi realizado o ensaio uterotrófico em ratas imaturas. Como resultado, os extratos testados não apresentaram atividade sobre o sistema reprodutor, ratificando os resultados encontrados na análise química que indicam a ausência do (Z)-venusol, com a conseqüente impossibilidade de sinergismo com outros compostos presentes no extrato de *Gunnera* sp.. Também se deve considerar que o ensaio uterotrófico é um teste de triagem, e, como tal, não é suficiente para caracterizar completamente a ausência de ação estrogênica ou antiestrogênica de um extrato (ARBO *et al.*, 2009). Além disso, efeitos reprodutivos incluem outras ações que não só as sobre o útero, considerando que o sistema endócrino é altamente complexo, assim, uma substância pode alterá-lo através de diversos mecanismos, como, por exemplo, através do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, o qual não pode ser descartado através de um teste de triagem de curta duração (ANDRADE *et al.*, 2001).

A fim de ampliar o perfil fitoquímico da espécie, realizaram-se os ensaios espectrofotométricos para a verificação dos compostos fenólicos totais (CFT) e do conteúdo total de flavonóides. Os extratos analisados apresentaram um alto teor de CFT e uma pequena fração de flavonóides. Tais dados sugerem que outra classe fitoquímica, que não flavonóides, seja responsável pelo alto teor de CFT verificado. Para a identificação dessas substâncias fenólicas realizou-se a análise por CL-EM/EM de extratos de *G. manicata*. Ácido gálico e hiperosídeo foram identificados. Considerando esses dados e o fato de que muitos metabólitos secundários, em especial os compostos fenólicos, apresentam pronunciada atividade antioxidante, procedeu-se o ensaio da atividade anti-radicalar utilizando-se o radical estável DPPH. O extrato metanólico e o aquoso apresentaram baixas concentrações de IC<sub>50</sub>, o que demonstra um bom potencial antioxidante. Nesse estudo não foi verificada uma correlação linear entre CFT e a atividade antioxidante. Na literatura pesquisada, a relação entre CFT e potencial antioxidante mostrou-se confusa. Alguns autores propõem uma estreita correlação entre CFT e atividade antioxidante



de extratos obtidos de diferentes fontes naturais. Outros não correlacionam meramente um ao outro e consideram que uma extensa gama de outros compostos tais como peptídeos e ácidos orgânicos dentre outras substâncias podem ser responsáveis pela atividade antioxidante (EBRAHIMABADI *et al.* 2010).

Os dados fitoquímicos obtidos e os trabalhos de McGaw e Eloff, 2005; Steenkamp e colaboradores, 2004 demonstrando a atividade antibacteriana e antifúngica e os de Drewes e colaboradores 2005 que identificaram nos extratos de *G. perpensa* duas benzoquinonas e um benzopirano, suportaram a investigação dessas propriedades nos extratos de *G. manicata*. As amostras analisadas apresentaram atividade frente à *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Essa atividade é condizente com os trabalhos referenciados e pode estar correlacionada ao elevado teor de compostos fenólicos encontrados nos extratos que foram ativos.

Assim, os resultados encontrados nesse trabalho a respeito da toxicidade oral aguda, do perfil fitoquímico e das propriedades farmacológicas abrem perspectivas a novos estudos visando a elucidação os compostos responsáveis pela importante atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos de *G. manicata* e a prospecção de novos compostos bioativos.



## **7. CONCLUSÕES**

---



Diante dos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- Ratos tratados por via oral (gavage) com extratos aquosos de raízes de *G. manicata* não demonstraram sinais toxicidade aguda;
- Os extratos aquosos de raízes de *G. manicata* não demonstraram atividade anti ou estrogênica no ensaio uterotrófico com ratas imaturas;
- Nas análises qualitativas em extratos aquosos de raízes e de folhas por CG-EM, bem como nas realizadas por CL-EM/EM não foram encontrados os fragmentos de massas ( $m/z$ ) relativos ao BMAA, conforme comparação com amostra padrão;
- Na análise qualitativa por CL-EM/EM para a investigação da presença de (Z)-venusol, não foram encontrados os fragmentos de massas ( $m/z$ ) relativos ao composto, conforme comparação com dados publicados na literatura científica;
- Na análise qualitativa por CL-EM/EM para a identificação de compostos fenólicos, ácido gálico foi detectado nos extratos metanólico e aquoso, enquanto hiperosideo foi identificado somente no extrato metanólico de folhas de *G. manicata*;
- A análise espectrofotométrica do conteúdo de fenólicos totais evidenciou alto teor desses compostos nos extratos metanólico e aquoso de raízes e de folhas de *G. manicata*;
- A análise espectrofotométrica do conteúdo de flavonóides totais evidenciou baixo teor desses compostos nos extratos metanólico e aquoso de raízes e de folhas de *G. manicata*;
- A avaliação da atividade antioxidante pelo método *in vitro* baseado na captura do radical DPPH demonstrou baixos valores de IC<sub>50</sub>, o que indica um bom

potencial antioxidante dos extratos metanólico e aquoso de raízes e de folhas de *G. manicata*;

- A avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica demonstrou que o extrato metanólico de raízes foi ativo contra *B. subtilis* e *C. albicans*, o extrato metanólico de folhas foi ativo contra *C. albicans* e o extrato aquoso de folhas foi ativo contra *S. aureus* e *S. pyogenes*.

Considerando que os extratos testados de *G. manicata*, nativa do Rio Grande do Sul, apresentaram atividade antimicrobiana, um bom potencial antioxidante e ausência de toxicidade, justificadas pelo perfil fitoquímico apresentado, conclui-se que a mesma pode ser considerada candidata a continuidade de investigação química e farmacológica.

## **8. REFERÊNCIAS**

---





ANDRADE, A. J. M.; ARAÚJO, S.; SANTANA, G. M.; OHI, M.; DALSENTER, P. R. Screening for *in vivo* (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities of technical and formulated deltamethrin. *Regul. Toxicol. Pharm.*, v.35, p. 379-382, 2002.

ARBO, M. D.; FRANCO, M. T.; LARENTIS, E. R.; GARCIA, S. C.; SEBBEN, V.C.; LEAL, M. B.; DALLEGRAVE, E.; LIMBERGER, R. P. Screening for *in vivo* (anti)estrogenic activity of ephedrine and p-synephrine and their natural sources *Ephedra sinica* Stapf. (Ephedraceae) and *Citrus aurantium* L. (Rutaceae) in rats. *Arch. Toxicol.*, v.83, p.95-99, 2009.

BANACK, S. A.; MURCH, S. J.; COX, P. A. Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Island. *J. Ethnopharmacol.*, v.106, n.1, p.97-104, 2006.

BARNES, S.; PRASAIN, J. K.; WANG, C-C.; MOORE, D.R. Applications of LC-MS in the study of the uptake, distribution, metabolism and excretion of bioactive polyphenols from dietary supplements. *Life Sciences*, v.78, n.18, p.2054-2059, 2006.

BERGMAN, B.; OSBORNE, B. A. The Gunnera-Nostoc symbiosis. *Biol. Environ.*, v.102B, n.1, p.35–39, 2002.

CASTILHO, M. C.; SILVEIRA, M. I. N. Técnicas de derivatização química para cromatografia em fase gasosa: I – Sililação. *Rev. Port. Farm.*, v. XLVIII, n.2, 1998.

CHIU, W. L.; PETERS, G. A.; LEVIEILLE, G.; STILL, P. C.; COUSINS, S.; OSBORNE, B.; ELHAI, J. Nitrogen deprivation stimulates symbiotic gland development in *Gunnera manicata*. *Plant Physiol.*, v.139, n.1, p.224-230, 2005.

COX, P. A.; BANACK, S. A.; MURCH, S. J. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the chamorro people of Guam. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*, v.100, n.23, p.13383-13383, 2003.

COX, P. A.; BANACK, S. A.; MURCH, S. J.; RASMUSSEN, U.; TIEN, G.; BIDIGARE, R. R.; METCALF, J. S.; MORRISON, L. F.; CODD, G. A.; BERGMAN, B. Diverse taxa of cyanobacteria produce  $\beta$ -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*, v.102, n.14, p.5074-5078, 2005.

DREWES, S. E.; KHAN, F.; PETER, X. K.; MACKENZIE, R. M.; KATSOULIS, L.; GEHRING, R.; MUNRO, O. Q.; HEERDEN, F. R. V. Venusol from *Gunnera perpensa*: structural and activity studies. *Phytochemistry*, n.65, p.1117–1121, 2004.

DREWES, S. E.; KHAN, F.; VUUREN, S. F. V.; VILJOEN, A. M. Simple 1,4-benzoquinones with antibacterial activity from stems and leaves of *Gunnera perpensa*. *Phytochemistry*, v.66, p.1812–1816, 2005.

GRIERSON, D.S.; AFOLAYAN, A.J. An ethnobotanical study of the plants used for the treatment of wounds in the Eastern Cape, South Africa. *J. Ethnopharmacol.*, v.67, p.327-332, 1999.

GUO, T.; GEIS, S.; HEDMAN, C.; ARNDT, M.; KRICK, W.; SONZOGNI, W. Characterization of ethyl chloroformate derivative of beta-methylamino-L-alanine. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, v.18, n.5, p.817-825, 2007.

HUANG, Z. H.; WANG, J.; GAGE, D. A.; WATSON, J. T.; SWEELEY, C. C. Characterization of N-ethoxycarbonyl ethyl esters of amino acids by mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v.635, p.271-281, 1993.

HUIE, C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Anal. Bional. Chem.*, v.373, p.23-30, 2002.

HUSEK, P. Chloroformatesc in gas chromatography as general purpose derivatizing agents, *J. Chromatogr. B*, v.717, n.1-2, p.57-91, 1998.

KAIDO, T. L.; VEALE, D. J. H.; HAVLIK, I.; RAMA, D. B. K. Preliminary screening of plants used in South Africa as traditional herbal remedies during pregnancy and labour. *J. Ethnopharmacol.*, v.55, p.185-191, 1996.

KATAOKA, H. Derivatization reactions for the determination of amines by gas chromatography and their applications in environmental analysis. *J. Chromatogr. A*, v. 733, p.19-34, 1996.

KHAN, F., PETER, X. K., MACKENZIE, R. M., KATSOULIS, L., GEHRING, R., MUNRO, O. Q., HEERDEN, F. R. VAN., DREWES, S. E. Venusol from *Gunnera perpensa*: structural and activity studies. *Phytochemistry*, v.65, p.1117-1121, 2004.

LANÇAS, F.M. Extração em fase sólida (SPE). São Carlos: RiMa, 2004.

LEWIS, R.J. Sax's dangerous properties of industrial materials. *Van Nostrand-Reinhold*: New York, 1992.

LOBNER, D.; PIANA, P. M. T.; SALOUS, A. K.; PEOPLES, R. W. b-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Dis.*, v.25, p.360–366, 2007.

LOPES, R. K.; RITTER, M. R.; RATES, S. M. K. Revisão das atividades biológicas e toxicidade das plantas ornamentais mais utilizadas no Rio Grande do Sul, Brasil. *R. Bras. Bioci.*, v.7, n.3, p.305-315, 2009.

MARCHEI, E.; PICHINI, S.; PACIFICI, R.; PELLEGRINI, M.; ZUCARO, P. A rapid and simple procedure for the determination of ephedrine alkaloids in dietary supplements by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.*, v.41, p. 1633-1641, 2006.

MATTOLLI, L.; CANGI, F.; MAIDECCHI, A.; GHIARA, C.; TUBARO, M.; TRALDI, P. A rapid liquid chromatography eletrospray ionization mass spectrometry

method for evaluation of synephrine in *Citrus aurantium* L. Samples. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, p. 9860-9866, 2005.

MCGAW, L. J., ELOFF, J. N. Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. *J. Ethnopharmacol.*, v.119, 559–574, 2008.

MORRIS, H. R.; AL-SARRAJ, S.; SCHWAB, C.; GWINN-HARDY, K.; PEREZ-TUR, J.; WOOD, N. W.; HARDY, J.; LEES, A. J.; MCGEER, P. L.; DANIEL, S. E.; STEELE, J. C. A. clinical and pathological study of motor neurone disease on Guam. *Brain*, v.124, p. 2215–2222, 2001.

MURCH, S. J.; COX, P. A.; BANACK, S. A. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.*, v.101, n.33, p.12228-12231, 2004 .

MURCH, S.J.; COX, P.A.; BANACK, S. A.; STEELE, S.A.; SACKS, O. W. Occurrence of B-methylamino-L-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol. Scand.*, v. 110, p. 267-269, 2004b.

NYIREDY,S. Separation strategies of plant constituents – current status. *J. Chromatogr. B*, v. 812. p. 35-51, 2004.

OLIVEIRA, A. S. B., PEREIRA, R. D. B. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) Three letters that change the people's life. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v.67, n.3-A, p.750-782, 2009.

OSBORNE, B. A.; CULLEN, A.; JONES, P. W.; CAMPBELL, G. J. Use of nitrogen by the *Nostoc-Gunnera tinctoria* (Molina) Mirbel symbiosis. *New Phytol.*, v.120, n.4, p.481-487, 1992.

PAGANI, F. Constituents of *Umbilicus rupestres*. *Bolletino Chimio Farmacêutico*, v.129, p.278-280,1990.

PAN, M.; MABRY, T. J.; CAO, P.; MOINI, M. Identification of nonprotein amino acids from cycad seeds as N-ethoxycarbonyl ethyl ester derivatives by positive chemical-ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, v. 787, p. 288-294, 1997.

PAPAPETROPOULOS, S. Is there a role for naturally occurring cyanobacterial toxins in neurodegeneration? The beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) paradigm. *Neurochem. Int.*, v.50, n.7-8, p.998-1003, 2007.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S. Chromatographic and eletrophoretic methods for the analysis of phenetylamine alkaloids in *Citru aurantium*. *J. Chromatogr. A*, v.1161, p. 71-88, 2007.

PROLIAC, A.; DESAGE, M.; FAURE-BONVIN, J. Structure of venusol, a novel substance from *Umbilicus pendulinus*. *Tetraheatron Letters*, v.22, p.3583-3584, 1981.

QUADROS, A. A. J.; OLIVEIRA, A. S. B.; SILVA, H. C. A.; CHIEIA, M. A.; PEREIRA, R. D. B. ELA - Esclerose Lateral Amiotrófica – Atualização: São Paulo, 2006.

RUTISHAUSER, R.; WANNTORP, L.; PFEIFER, E. *Gunnera herteri* – developmental morphology of a dwarf from Uruguay and Brazil (Gunneraceae). *Plant Syst. Evol.*, v.248, n.1-4, p.219-241, 2004.

SANTIAGO, M.; MATARREDONA, E. R.; MACHADO, A.; CANO, J. Acute perfusion of BMAA in the rat's striatum by in vivo microdialysis. *Toxicol. Letters*, v.167, p.34-39, 2006.

SMITH, R.M. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatogr. A*, v.1000, p. 3–27, 2003.

STEELE, J. C.; CAPARROS-LEFEBVRE, D.; LEES, A. J.; SACKS, O. W. Progressive supranuclear palsy and its relation to pacific foci of the

parkinsonism–dementia complex and Guadeloupean parkinsonism. *Parkinsonism Relat. D.*, n.9, p.39–54, 2002.

STEELE, J. C. Parkinsonism–Dementia Complex of Guam. *Movement Disord.*, v.20, Suppl.12, p.S99–S107, 2005.

STEENKAMP, V. Traditional herbal remedies used by South African women for gynaecological complaints. *J. Ethnopharmac.*, v.86, p.97–108, 2003.

STEENKAMP, V.; MATHIVHA, E.; GOUWS, M. C.; VAN RENSBURG, C. E. J. Studies on antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. *J. Ethnopharmac.*, v.95, p.353-357, 2004.

VEGA, A.; BELL, E. A.  $\alpha$ - amino- $\beta$ -methil aminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinabis*. *Phytochemistry*, v.6, p.759-762, 1967.

VIONERY, L.; SALIBA, C.; DASKIEWICZ, J. B.; BAYET, C.; COMTE, G.; FENET, B.; GUTIERREZ, G.; BARRON, D. Phenilpropanoids from *Umbilicus pendulinus*. *Biol. Pharm. Bull.*, v.28, p.1765-1770, 2000.

WANNTORP, L.; WANNTORP, H. E. The biogeography of *Gunnera* L.: vicariance and dispersal. *J. Biogeogr.*, v.30, n.7, p.979-987, 2003.

**9. ANEXO**

Comitê de Ética

---



**FEPPS**  
Fórum de Ética em Pesquisa  
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FEPPS**

Av Ipiranga 5400, Prédio do IPB-LACEN, sala 06  
CEP 90.610-000 – PORTO ALEGRE/RS  
e-mail: cep\_fepps@fepps.rs.gov.br



**AVALIAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**2º PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO nº 04/2008 – CEP-FEPPS/RS**

**I) IDENTIFICAÇÃO**

**TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E DA ATIVIDADE ESTROGÊNICA OU ANTIESTROGÊNICA DOS EXTRATOS DE *GUNNERA HERTERI* E *G. MANICATA* EM RATOS WISTA.**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL: ELIANE DALLEGRAVE**

CURRÍCULO LATTES DO PESQUISADOR (o currículo dos demais pesquisadores deve estar depositado na Plataforma Lattes do CNPq):

**GERENTE OU ORIENTADOR: VIVIANE CRISTINA SEBEN**

**INSTITUIÇÃO DE ORIGEM: CIT/RS**

**LOCAL DE EXECUÇÃO: FACULDADE FÁRMÁCIA – DEPTO FARMACOLOGIA -UFRGS**

**ÁREA TEMÁTICA: Botânica**

**PATROCINADOR: UFRGS - FEPPS**

**DATA /ENTRADA CEP: 10.08.08**

**DATA /APROVAÇÃO CEP: 09.10.2008**

**II) AVALIAÇÃO DOS DOCUMENTOS E DA FOLHA DE ROSTO: Não necessária.**

- III) CARACTERIZAÇÃO DO TEMA E JUSTIFICATIVA:** Considerando a utilização das raízes da planta pela tribo Zulu da África como planta medicinal utilizada em atividades do ciclo reprodutivo, e em províncias orientais do Cape da África como um anti-séptico, e após efetuada uma avaliação antimicrobiana dos extratos frescos das hastes indicou uma sensibilidade mais elevada nos extratos das folhas, e a existência da planta em nossa área litorânea no RS da espécie *Gunnera Herteri* e *Manicata*, e não havendo literatura científica desta planta, este projeto busca avaliar o perfil da toxicidade sistêmica e o rastreamento da toxicidade reprodutiva dando início a avaliação do potencial de desenvolvimento de um medicamento a partir dos princípios ativos responsáveis pelos efeitos relatados por seu uso popular.

**IV) OBJETIVOS PRINCIPAL E ESPECÍFICOS:** Avaliação da toxicidade sistêmica e reprodutiva de espécies do gênero *Gunnera* nativas do Rio Grande do Sul.

**Específicas:** 1 – Estudar a toxicidade aguda, hepática, renal, cardíaca e sobre o sistema nervoso central, dos extratos orgânicos (MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Hexano) da *Gunnera herteri* e *G. Manicata* em ratos Wistar.

2 – Estudar o potencial estrogênico/antiestrogênico dos extratos orgânicos (MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Hexano) da *Gunnera Herteri* e *G. manicata* em ratas Wistar imaturas.



**V) METODOLOGIA:**

a) AMOSTRA – O material vegetal da amostra é constituído das partes aéreas da planta será coletado de populações nativas do Rio Grande do Sul. Uma exsicata será depositada no herbário do Dpto de Botânica da UFRGS. A identificação das espécies será realizada pelo botânico Dr. Rodrigo Singer do Depto Botânica – UFRGS. Serão utilizados 84 ratos Wistar adultos (80 dias), 42 machos e 42 fêmeas, e 54 ratas Wistar imaturas provenientes do CPEA-CDCT/FEPPS, e serão mantidos por 72h em ciclos claro/escuro, em ambiente com temperatura controlada (22 C + - 2 C) e umidade monitorada. A manipulação animal será realizada de acordo com a legislação vigente e seguindo os princípios éticos para a experimentação animal relatados por Godim(1995). Serão constituídos 9 grupos recebendo diariamente por via oral – 3 dias consecutivos- **Grupo 1** – 5ml/kg de óleo de canola (controle) **Grupo 2** – 0,4mg/kg de estradiol (controle de estrogenicidade) – grupo 3 – 10mg/kg de tamoxifeno, uma hora antes de 0,4mg/kg de estradiol (controle para antiestrogenicidade), **grupo 4** – dose 1 do extrato de *G. herteri* correspondente a 10 vezes a dose da infusão (mg/kg)- padronizada pela concentração dos princípios ativos potencial estrogênico do extrato. **Grupo 5** – dose do 2 do extrato de *G. herteri* correspondente a 100 vezes a dose de uso (mg/kg) potencial estrogênico do extrato, **grupo 6** – dose 2 do extrato de *G. herteri* uma hora antes de 0,4mg/kg de estradiol (potencial antiestrogênico do extrato)- **grupo 07** – dose de 1 extrato de *G. manicata* correspondente a 10 vezes a dose de uso da infusão (mg/kg)- **grupo 8** – dose 2 do extrato de *G. manicata* correspondente a 100 vezes a dose de uso mg/kg (potencial estrogênicos do extrato – **grupo 9** -dose 2 do extrato de *G. manicata* iuma hora antes de 0,4 mg/kg de estradiol (potencial aniestrogênico do extrato. Sua massa corporal será avaliada diariamente. Ao final do período de tratamento 24 h após a última administração as fêmeas serão eutanasiadas por deslocamento cervical, e após terão seus órgãos removidos (útero, fígado, baço, coração, rins e adrenais) e limpos dos tecidos adjacentes, avaliados quanto a massa relativa x massa corporal.

**b) CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO**

Todas as cobaias serão utilizadas e descartadas após a ingestão dos princípios ativos conforme legislação.

**c) MÉTODOS ESTATÍSTICOS**

Os dados serão apresentados como média padrão e erro da média da massa corporal relativa e da massa relativa dos órgãos. A massa corporal relativa avaliada por meio do teste ANOVA de medidas repetidas e a dos órgãos pela ANOVA de uma via. Ambas seguidas pelo teste de comparação de médias de Bonferroni, quando indicado. Será considerada uma confiança de 95%.

d) ADEQUAÇÃO AOS OBJETIVOS – A metodologia está adequada a apuração dos efeitos dos princípios ativos da *G. herteri* e *Manicata* em ratos Wistar, conforme acima.

**e) FORMA DE DESCARTE E/OU ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA**

Os resíduos químicos tratados e descartados em conformidade com o preconizado pelo Programa de Gerenc. De Resíduos da Comissão de Seg. Trabalho (COSAT) da Faculdade de Farmácia da UFRGS, considerando as normas atuais de biossegurança.

*mg*



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FEPPS**  
Av Ipiranga 5400, Prédio do IPB-LACEN, sala 06  
CEP 90.610-000 – PORTO ALEGRE/RS  
e-mail: cep\_fepps@fepps.rs.gov.br



**VI) EXEQÜIBILIDADE DO PROJETO:**

- a) ORÇAMENTO – Recursos financeiros para materiais disponíveis na UFRGS, apenas os ratos serão disponibilizados pela FEPPS, através do CPEA-CDCT/FEPPS.
- b) CRONOGRAMA - Previsão de setembro a dezembro de 2008, devendo ser alterado a partir desta avaliação.

**VII) RELEVÂNCIA DO PROJETO**

Destaca-se a possível utilização dos princípios ativos de plantas nativas e naturais da espécie *Gunnera hereteri* e *manicata* para uso medicamentoso.

**VIII) TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Não se aplica.

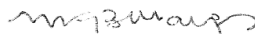
**IX) COMENTÁRIOS DOS RELATORES:**

Houve adequação de todos os itens solicitados no 1º parecer consubstanciado.

**X) PARECER DO CEP/FEPPS:**

O Comitê de Pesquisa e Ética da FEPPS/RS deliberou em reunião do dia 09/10/2008, Ata nº 08/2008, que o presente projeto está adequado ética e metodologicamente e portanto, aprovado por este Comitê.

Reiteramos que relatórios semestrais do projeto em andamento, relatório final e cópia do trabalho de conclusão e/ou publicação deverão ser entregues ao Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS.

  
Maria da Graça Boucinha Marques  
Coordenadora CEP-FEPPS/RS

Porto Alegre, 09 de outubro de 2008.