

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELLA MARIA SOARES DE OLIVEIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL
Buddleja stachyoides CHAM. & SCHLTDL. (SCROPHULARIACEAE)**

**CURITIBA
2012**

DANIELLA MARIA SOARES DE OLIVEIRA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE VEGETAL
Buddleja stachyoides CHAM. & SCHLTDL. (SCROPHULARIACEAE)**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel
Co-orientação: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel

**CURITIBA
2012**

Oliveira, Daniella Maria Soares

Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie vegetal
Buddleja stachyoides Cham e Schltl. (Scrophulariaceae) / Daniella
Maria Soares Oliveira – Curitiba, 2012.
100 f. ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel
Coorientador: Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Buddleja stachyoides*. 2. *Scrophulariaceae*. 3. Atividade
antioxidante. 4. Verbacosídeo. 5. Fenilpropanoide. 6. *Artemia salina*.
7. Atividade hemolítica. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdúlio
Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida, bênção e proteção.

À minha mãe **Maria Dulce Soares de Oliveira**, à minha irmã **Dircélia**, ao meu sobrinho **Otávio** e **toda minha família** pelo apoio, incentivo, dedicação, compreensão, carinho e amor.

À **Universidade Federal do Paraná** e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À minha orientadora **Prof^a Dra. Marilis Dallarmi Miguel** pelos ensinamentos, confiança e amizade.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel** pela dedicação, confiança, paciência, ensinamentos, amizade e coleta.

Ao Doutor **João Luiz Souza Carvalho** pelo incentivo e sugestões.

Ao Laboratório do **Institut de Chimie de Substances Naturelles**, em Gif-sur-Yvette, França pela disponibilização dos equipamentos de ressonância magnética nuclear e HPLC.

À doutoranda **Milena Kalegari** pela realização das análises dos espectros de RMN e HPLC, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao Laboratório de Estomatologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná pela disponibilização dos equipamentos e material para realização da atividade antimicrobiana.

À empresa **As Ervas Curam** e ao presidente **Aldo C. Dadalt** por disponibilizar o equipamento de HPLC e fornecer material para as análises.

Aos colegas **Robson Dadalt, Marineli Gelinsk, Tatiana Lissi** pela ajuda, sugestões e amizade.

Às colegas de mestrado **Thais Fernanda Moreira, Maria Fernanda Cordeiro, Fernanda Maria Ocampos, Luciane Dalarmi e Ana Flávia Duarte** pela ajuda nas análises, amizade e companheirismo.

A todos os colegas de mestrado e doutorado pelas contribuições e amizade.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a espécie *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltldl. pertencente à família Scrophulariaceae. A partir das partes aéreas e raiz desta espécie coletadas no campus Jardim Botânico da Universidade Federal do Paraná, preparou-se extratos alcoólicos brutos e frações com diferentes polaridades, com estas amostras foram realizadas as atividades: antioxidantes, antimicrobiana, de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e hemolítica. Foi isolado e identificado um Fenilpropanoide denominado Verbascosídeo, a partir da fração acetato de etila das partes aéreas por RMN-¹H e HPLC. O estudo de algumas atividades biológicas, com os extratos e frações, revelaram grande capacidade antioxidante da espécie pelo método da redução do complexo do fosfomolibdênio, redução do radical DPPH e teste com espécies reativas do ácido tiobarbitúrico, principalmente nas frações acetato de etila e hexano das partes aéreas e raiz, apresentando um potencial antioxidante maior do que o padrão de rutina e BHT (hidroxibutiltolueno). O composto isolado verbascosídeo presente em maior concentração na fração acetato de etila é o responsável pela atividade antioxidante em potencial. Nenhuma das frações apresentou atividade antimicrobiana após 48 h de incubação. As frações clorofórmio das partes aéreas e hexano da raiz apresentaram uma pequena atividade hemolítica, provavelmente devido à presença de saponinas. Com relação ao teste de toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*, as amostras não apresentaram toxicidade. Portanto, torna-se interesse dar continuidade ao isolamento de outros compostos e realizar novas atividades biológicas e farmacológicas para a espécie *Buddleja stachyoides*.

Palavras-chave: *Buddleja stachyoides*. Scrophulariaceae. Atividade antimicrobiana. Atividade antioxidante. *Artemia salina*. Atividade hemolítica. Verbascosídeo. Fenilpropanoide.

ABSTRACT

The aim of this work was to study the species *Buddleja stachyoides* Cham. & Schlttdl. belonging to the family Scrophulariaceae. From the aerial parts and roots of this species collected in the Botanical Gardens campus of the Federal University of Paraná, prepared alcoholic extracts and crude fractions with different polarities, with these samples were performed the activities: antioxidant, antimicrobial, toxicity test against the microcrustacean *Arthemiasalina* and hemolytic. Was isolated and identified a phenylpropanoid called Verbascoside from the ethyl acetate fraction of the aerial parts by ¹H-NMR and HPLC. The study of some biological activities with the extracts and fractions, showed high antioxidant capacity of the species by the method of reduction of complex phosphomolybdenum, reduction of DPPH and test with thiobarbituric acid reactive species, mainly in the fractions ethyl acetate and hexane from the aerial parts and root, an antioxidant potential higher than the standard rutin and BHT (butyl hydroxy toluene). The compound isolated verbascoside present in higher concentration in the ethyl acetate fraction is responsible for the antioxidant activity potential. None of the fractions showed antimicrobial activity after 48 hours of incubation. The chloroform fraction of the aerial parts and hexane fraction of the roots showed little hemolytic activity, probably due to the presence of saponins. Regarding toxicity test against the microcrustacean *Arthemiasalina*, the samples showed no toxicity. Therefore, it becomes interest to continue the isolation of other compounds and hold new biological activities and pharmacological to the species *Buddleja stachyoides*.

Key words: *Buddleja stachyoides*. Scrophulariaceae. Antimicrobial activity. Antioxidant activity. *Arthemiasalina*. Hemolytic activity. Verbascoside. Phenylpropanoid.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>Buddleja stachyoides</i> NO MUNDO.....	20
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE VEGETAL <i>Buddleja stachyoides</i> NO BRASIL	20
FIGURA 3 - <i>Buddleja stachyoides</i>	22
FIGURA 4 - FOTO DA ESPÉCIE VEGETAL <i>Buddleja stachyoides</i>	23
FIGURA 5 - COMPOSTOS ISOLADOS DE ESPÉCIES DE <i>Buddleja</i>	24
FIGURA 6 - IRIDOIDES ISOLADOS DE ESPÉCIES DE <i>Buddleja</i>	25
FIGURA 7 - ESTRUTURA DO VERBASCOSÍDEO [2-(3,4-DIHIIDROXIFENILETIL)-1-O-A-L-RAMNOPIRANOSIL-(1→3)-B-D-(4-O-CAFEIL)-GLUCOPIRANOSÍDEO].....	26
FIGURA 8 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS FENILPROPANOIDES: VERBASCOSÍDEO, ISOVERBASCOSÍDEO, MARTINOSÍDEO E EUCOSCEPTOSÍDEO OBTIDOS DE <i>Buddleja davidii</i>	26
FIGURA 9 - EXSICATA DE <i>Buddleja stachyoides</i> DO HERBÁRIO DO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA (ACERVO Nº 339899)	29
FIGURA 10 - PARTES AÉREAS DE <i>Buddleja stachyoides</i>	30
FIGURA 11 - RAÍZES DE <i>Buddleja stachyoides</i>	30
FIGURA 12 - OBTENÇÃO DO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO POR APARELHO DE SOXLET MODIFICADO	40
FIGURA 13 - FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO	55
FIGURA 14 - MULTICROMATOGRAMAS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>Buddleja stachyoides</i>	61
FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS E PADRÃO DE VERBASCOSÍDEO.....	62
FIGURA 16 - ESPECTROS DE UV E PUREZA OBTIDOS DOS PICOS DO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS E PADRÃO DE VERBASCOSÍDEO	63
FIGURA 17 - CORRELAÇÃO ESPECTRAL DAS AMOSTRAS COM O PADRÃO DE VERBASCOSÍDEO	64
FIGURA 18 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE VERBASCOSÍDEO.....	65

FIGURA 19 - CONCENTRAÇÃO DE VERBASCOSÍDEO PRESENTE NO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS.....	66
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA DO COMPOSTO 1 OBTIDO NA SEGUNDA PURIFICAÇÃO.....	67
FIGURA 21 - PICO DO COMPOSTO 1 CORTADO E COLETADO EM QUATRO PARTES.....	67
FIGURA 22 - CROMATOGRAMAS E ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO 1 OBTIDOS NA TERCEIRA PURIFICAÇÃO.....	68
FIGURA 23 - ESPECTRO DE PRÓTON PARA A SUBSTÂNCIA ISOLADA VERBASCOSÍDEO.....	69
FIGURA 24 - TÉCNICA CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR DE QUANTUM-SIMPLES (HSQC) UTILIZADA PARA O COMPOSTO 1.....	72
FIGURA 25 - TECNICA CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR DE MÚLTIPLAS LIGAÇÕES (HMBC) UTILIZADA PARA O COMPOSTO 1.....	72
FIGURA 26 – PROVÁVEL ESTRUTURA DO COMPOSTO 1.....	73
FIGURA 27 - ILUSTRAÇÃO DA <i>Arthemisa salina</i> UTILIZADA NA TOXICIDADE PRELIMINAR DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Buddleja stachyoides</i>	87
FIGURA 28 - TUBOS COM HEMÓLISE TOTAL OBTIDA COM O PADRÃO DE SAPONINA.....	89
FIGURA 29 - DEMONSTRAÇÃO DA FORMAÇÃO DE HALO DO CONTROLE POSITIVO (SAPONINA) EM PLACA DE ÁGAR SANGUE.....	91

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA (ARR%) EM RELAÇÃO AOS PADRÕES RUTINA E VITAMINA C ATRAVÉS DO TESTE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO	75
GRÁFICO 2 - CURVA DO PADRÃO RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPP	78
GRÁFICO 3 - CURVA DO PADRÃO VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH	78
GRÁFICO 4 - CURVA DO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS PELA REDUÇÃO DO DPPH	79
GRÁFICO 5 - CURVA DA FRAÇÃO HEXANO DAS PARTES AÉREAS PELA REDUÇÃO DO DPPH	79
GRÁFICO 6 - CURVA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS PARTES AÉREAS PELA REDUÇÃO DO DPPH	80
GRÁFICO 7 - CURVA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS PARTES AÉREAS PELA REDUÇÃO DO DPPH	80
GRÁFICO 8 - CURVA DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE DAS PARTES AÉREAS PELA REDUÇÃO DO DPPH	81
GRÁFICO 9 - CURVA DO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DA RAIZ PELA REDUÇÃO DO DPPH	81
GRÁFICO 10 - CURVA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DA RAIZ PELA REDUÇÃO DO DPPH	82
GRÁFICO 11 - CURVA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA RAIZ PELA REDUÇÃO DO DPPH	82
GRÁFICO 12 - CURVA DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE DA RAIZ PELA REDUÇÃO DO DPPH	83
GRÁFICO 13 - IC 50: CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA QUE REDUZ 50% DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE DPPH	84
GRÁFICO 14 - AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Buddleja stachyoides</i>	85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – GRADIENTE DESENVOLVIDO EM HPLC PARA O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>Buddleja stachyoides</i>	43
TABELA 2 - MÉTODO EM HPLC DESENVOLVIDO PARA ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS.....	44
TABELA 3 - MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO 1	45
TABELA 4 - SEGUNDO MÉTODO DE PURIFICAÇÃO EM HPLC PARA O COMPOSTO 1	46
TABELA 5 - RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS PARA AS PARTES AÉREAS E RAIZ DE <i>Buddleja stachyoides</i>	56
TABELA 6 - RESULTADOS DO ENSAIO FITOQUÍMICO PARA A ESPÉCIE <i>Buddleja stachyoides</i>	57
TABELA 7 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS EM RELAÇÃO AO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO.....	60
TABELA 8 - COMPARAÇÃO DOS VALORES DE RMN - ¹ H E PROJEÇÃO DO RMN - ¹³ C OBTIDOS PARA O COMPOSTO 1 E OS VALORES ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA O VERBASCOSÍDEO.....	71
TABELA 9 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ATRAVÉS DA DL 50 OBTIDA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES SOBRE O MICROCRUSTÁCEO <i>Artemia salina</i>	88
TABELA 10 - DIÂMETRO DOS HALOS FORMADOS NA ATIVIDADE HEMOLÍTICA... ..	90

LISTA DE SIGLAS

ATCC – American Type Culture Collection

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

DAD - Detector de Arranjo de Diodos

d - Dubleto

dd - Duplo dubleto

ELSD – Detector de Luz por Evaporação e Dispersão

HMBC - Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações

HPLC– High Performance Liquid Chromatography

HSQC – Correlação Heteronuclear de Quantum-Simples

J - Constante de Acoplamento

m- Singleto Largo

mAU - Um milésimo da Unidade de Absvância

MIC– Concentração Inibitória Mínima

PDA – Detector de Arranjo de Fotodiodos

RMN-¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13

RMN-¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

UV – Ultravioleta

YNB – Base Nitrogenada de Leveduras

LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de cálcio bihidratado

$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de cálcio hexahidratado

CCl_4 – Tetracloreto de Carbono

DL_{50} – Dose letal média

DMSO-d_6 – Dimetilsulfóxido deuterado

HCN – Ácido cianídrico

HCl – Ácido clorídrico

H_2SO_4 – Ácido sulfúrico

IC_{50} – Concentração inibitória média

KCl – Cloreto de potássio

M – Molar

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – Cloreto de magnésio hexahidratado

N – Normal

Na_2CO_3 – Carbonato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

Na_2SO_4 – Sulfato de sódio

NH_4OH – Hidróxido de amônio

nm – Nanômetro

pH – Potencial hidrogeniônico

μg – Micrograma

μM – Micromassa

$\mu\text{g/mL}$ – Micrograma por mililitro

μL – Microlitro

v/v – Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	<i>Buddleja stachyoides</i> CHAM. & SCHLTDL.....	18
3.1.1	Enquadramento taxonômico.....	18
3.1.2	Família Scrophulariaceae e gênero <i>Buddleja</i> L.	18
3.1.3	Sinônimos e nomes populares da espécie <i>Buddleja stachyoides</i>	19
3.1.4	Distribuição geográfica da espécie <i>Buddleja stachyoides</i>	19
3.1.5	Habitat da espécie <i>Buddleja stachyoides</i>	21
3.1.6	Descrição Macroscópica da espécie <i>Buddleja stachyoides</i>	21
3.1.7	Uso Popular da espécie <i>Buddleja stachyoides</i>	22
3.1.8	Constituição química	23
3.1.9	Atividades biológicas e farmacológicas	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	MATERIAL VEGETAL	29
4.1.1	Coleta, Identificação e exsicata	29
4.1.2	Análises físico-químicas	31
4.1.2.1	Umidade	31
4.1.2.2	Cinzas totais	31
4.1.3	Ensaio fitoquímico	32
4.1.3.1	Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%.....	32
4.1.3.2	Pesquisa de alcaloides.....	32
4.1.3.3	Pesquisa de ácidos orgânicos	33
4.1.3.4	Pesquisa de fenóis	33
4.1.3.5	Pesquisa de flavonoides.....	33
4.1.3.6	Pesquisa de cumarinas	34
4.1.3.7	Pesquisa de antraquinonas	34
4.1.3.8	Pesquisa de esteróis e triterpenos	35
4.1.3.9	Pesquisa de iridoides	35
4.1.3.10	Preparo do extrato aquoso a 20%	35
4.1.3.11	Pesquisa de heterosídeos antociânicos	36
4.1.3.12	Pesquisa de heterosídeos saponínicos	36
4.1.3.13	Pesquisa de gomas e mucilagens	36
4.1.3.14	Pesquisa de taninos	37
4.1.3.15	Pesquisa de aminogrupos	37
4.1.3.16	Pesquisa de ácidos voláteis	37
4.1.3.17	Pesquisa de ácidos fixos	38
4.1.3.18	Pesquisa de heterosídeos cianogênicos	38
4.1.3.19	Pesquisa de valepotriatos.....	39
4.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	39
4.2.1	Extração por Soxhlet	39
4.2.2	Determinação do teor de sólidos	41
4.3	OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES.....	41
4.3.1	Sistema de partição líquido – líquido	41

4.4	PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES	42
4.4.1	Seleção do marcador fitoquímico	42
4.4.2	Identificação dos compostos	44
4.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	46
4.5.1	Formação do complexo fosfomolibdênio	46
4.5.2	Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	47
4.5.3	Teste de inibição da peroxidação lipídica	48
4.6	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	49
4.6.1	Método de microdiluição (determinação da concentração inibitória mínima)	49
4.6.2	Preparo das amostras e do teste	50
4.6.3	Preparo do inóculo	50
4.6.4	Concentração bactericida mínima	50
4.7	ANÁLISE DA ATIVIDADE SOBRE <i>Arthemiasalina</i>	51
4.7.1	Preparo da solução salina	51
4.7.2	Eclosão dos ovos	51
4.7.3	Preparo das amostras	52
4.7.4	Avaliação da toxicidade	52
4.8	ATIVIDADE HEMOLÍTICA	53
4.8.1	Atividade hemolítica em tubos	53
4.8.1.1	Preparo da suspensão de hemácias	53
4.8.1.2	Avaliação da atividade hemolítica	53
4.8.2	Atividade hemolítica em ágar sangue	54
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4.10	FLUXOGRAMA DA PESQUISA	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS PARA <i>Buddleja stachyoides</i>	56
5.1.1	Análises para a matéria prima vegetal <i>Buddleja stachyoides</i>	56
5.1.2	Ensaio sistemático em fitoquímica dos extratos aquoso e hidroalcoólico de <i>Buddleja stachyoides</i>	57
5.2	RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	59
5.3	SELEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR FITOQUÍMICO	60
5.4	PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS	66
5.5	IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO	68
5.6	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	73
5.6.1	Formação do complexo Fosfomolibdênio	74
5.6.2	Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	77
5.6.3	Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	85
5.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	87
5.7.1	Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Arthemiasalina</i>	87
5.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA	89
5.8.1	Avaliação da atividade hemolítica nos tubos	89
5.8.2	Avaliação da Atividade hemolítica na placa de ágar sangue	90
5.9	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	91
6	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é amplamente disseminado e encontra-se em expansão pelo mundo (WHO, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a difusão dos conhecimentos necessários para o uso racional de plantas medicinais e também de fitoterápicos na saúde da população (AMARAL *et al.* 2005). Atualmente, o Brasil possui uma Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), que tem como objetivo ampliar as opções terapêuticas oferecidas aos usuários do SUS, garantindo o acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e outros serviços relacionados, com segurança, eficácia e qualidade (BALBINO, 2010). No portal do MINISTÉRIO DA SAÚDE pode-se encontrar a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – RENISUS (2009) que contém 71 espécies vegetais, possuindo a finalidade de auxiliar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva, incluindo as ações que serão desenvolvidas pelos outros ministérios participantes do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, relacionadas à regulamentação, cultivo/manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos. Tem também a função de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da RENAFITO (Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos).

O principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados, no Brasil, é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), autarquia do Ministério da Saúde que tem como papel proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços (BRASIL, 1999). O registro de medicamentos é a etapa na qual os mesmos são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem expostos a venda para utilização pela população, sendo uma das ações realizadas pela Anvisa para garantir a segurança da saúde da população (CARVALHO, 2008).

A regulamentação em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) 14/2010, que determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas.

São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Os medicamentos fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (ANVISA, RDC nº 14/2010).

O emprego correto das plantas para fins terapêuticos pela população em geral, requer o uso de plantas medicinais selecionadas por sua eficácia e segurança terapêuticas. A toxicidade de medicamentos preparados com plantas pode parecer insignificante quando comparada com os medicamentos alopáticos, entretanto é um problema preocupante à saúde pública (Balbino, 2010).

Inúmeras espécies nativas são amplamente empregadas pela população, algumas possuem estudos químicos e/ou farmacológicos oferecendo suporte para a sua utilização, outras são empregadas baseadas apenas em conhecimento empírico ou tradicional. (SIMÕES *et al.*, 2001). A validação de novas drogas vegetais através da pesquisa seria o caminho para obtenção de um melhor aproveitamento das plantas medicinais e seus derivados aplicados à fitoterapia (LORENZI, 2008).

Muitas espécies do gênero *Buddleja* já foram estudadas e algumas atividades biológicas tais como antioxidantes, antimicrobianas, enzimáticas foram testadas (MAHLKE, 2007). A espécie *Buddleja stachyoides* é utilizada na medicina caseira com base na tradição popular, como anti-hemorroidal, béquica (acalma a tosse), analgésica, sudorífica, calmante, emoliente e anti-reumática (LORENZI, 2008). Até o momento possui apenas um composto isolado o Verbascosídeo ou Acteosídeo que é um fenilpropanoide. O estudo citado por Backhousea (2008) demonstra que o Verbascosídeo apresenta atividade antinoceptiva, sendo mais ativo que o ibuprofeno e, segundo Gitzel Filho *et al.* (2012) o verbascosídeo inibiu a enzima prolil oligopeptidase importante em doenças neurodegenerativas.

A escolha do tema do projeto foi baseada no crescente interesse e necessidade de pesquisas sobre plantas medicinais, principalmente aquelas pouco estudadas e que são utilizadas na medicina popular, tendo como objetivo realizar estudo fitoquímico e atividades biológicas relacionadas, além da comprovação da segurança e eficácia da espécie vegetal *Buddleja stachyoides*.

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo fitoquímico e de atividades biológicas para a espécie *Buddleja stachyoides*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Coletar e identificar a espécie em estudo.

Obter o extrato alcoólico bruto e frações.

Purificar e identificar os constituintes químicos e selecionar um marcador fitoquímico.

Analisar a atividade antimicrobiana do extrato alcoólico bruto e frações frente a diferentes cepas bacterianas.

Analisar a atividade antioxidante do extrato alcoólico bruto e frações.

Verificar a toxicidade do extrato alcoólico bruto e frações sobre o microcrustáceo *Artemia salina*.

Verificar a atividade hemolítica do extrato alcoólico bruto e frações.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Buddleja stachyoides* CHAM. & SCHLTDL.

2.1.1 Enquadramento taxonômico

A taxonomia da espécie vegetal *Buddleja stachyoides* está apresentada no quadro 1.

	Cronquist (1981)	APG III (2009)
Reino	Plantae	Plantae
Divisão	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Ordem	Scrophulariales	Lamiales
Família	Scrophulariaceae	Scrophulariaceae
Gênero	<i>Buddleja</i>	<i>Buddleja</i>
Espécie	<i>Buddleja stachyoides</i>	<i>Buddleja stachyoides</i>

QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Buddleja stachyoides* CHAM. & SCHLTDL
 FONTE: LOHMUELLER (2012)

2.1.2 Família Scrophulariaceae e gênero *Buddleja* L.

O gênero *Buddleja* L., assim como outros gêneros afins tem tido sua posição taxonômica discutida. Alguns botânicos como Bentham & Hooker (1876) e Solereder (1892) colocaram este gênero na família Lognaniaceae. Wilhelm (1910) e Wettstein (1935) criaram a família Buddlejaceae, gênero típico *Buddleja* L. (FERREIRA, 1988). Mas de acordo com os sistemas de classificação taxonômica das plantas Cronquist (1981) e APG III (2009) a família Buddlejaceae foi incluída à família Scrophulariaceae.

Scrophulariaceae é considerada uma família que tem distribuição cosmopolita, sendo composta por cerca de 25 gêneros e 1200 espécies. No Brasil, apenas quatro gêneros a representam, sendo três deles encontrados nas regiões nordeste e central e um na região sul (MAHLKE, 2007).

O nome *Buddleja* foi dado em homenagem ao botânico inglês Adam Buddle, sendo chamada normalmente de *Buddleia*. É um gênero de distribuição pantropical, presente no sul da Ásia, África e América. (MAHLKE, 2007).

Segundo Houghthon (1984), as espécies foram divididas em dois grupos de acordo com os tipos florais que apresentam, são chamadas de dióicas as da América e as da África e Ásia são chamadas de monóicas.

A revisão da literatura para espécie em estudo *Buddleja stachyoides* está descrita a seguir.

2.1.3 Sinônimos e nomes populares da espécie *Buddleja stachyoides*

As sinonímias da espécie são *Buddleja brasiliensis* Jacq ex Spreng., *Buddleja australis* Vell., *Buddleja albotomentosa* R. E. Fr., *Buddleja otophylla* Hassk. (LORENZI, 2008)

Popularmente é conhecida como barbasco ou verbasco em quase todo o Brasil, tingui-da-praia no Ceará, cezarina em Minas Gerais, carro-santo em Mato Grosso, calção-de-velho e verbasco-do-brasil na Bahia (FERREIRA, 1988) e, ainda barbasco-do-brasil, barrasco, barasco, barbaço, calça-de-velha, flor-de-verbasco, oassoma, vassoura, vassourinha, verbasci, verbasso” (LORENZI, 2008).

2.1.4 Distribuição geográfica da espécie *Buddleja stachyoides*

A distribuição geográfica pelo mundo da espécie *Buddleja stachyoides* concentra-se na América do Sul, principalmente nos países: Brasil, Argentina, Bolívia e Paraguai, conforme figura 1 (GWANNON, 2011).



FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE VEGETAL *Buddleja stachyoides* NO MUNDO
FONTE: GWANNON (2011)

A espécie *Buddleja stachyoides* tem origem nativa, não é endêmica do Brasil, tem como domínios fitogeográficos Cerrado, Mata Atlântica, Pampa. No Brasil, sua distribuição geográfica contempla as regiões Nordeste (Bahia, Alagoas), Centro-Oeste (Distrito Federal), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul), conforme apresentado no mapa de distribuição geográfica, figura 02 (SOUZA, 2010).



FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA ESPÉCIE VEGETAL *Buddleja stachyoides* NO BRASIL
FONTE: SOUZA (2010)

2.1.5 Habitat da espécie *Buddleja stachyoides*

Cresce espontaneamente em pastagens e terrenos baldios, onde é considerada planta daninha (LORENZI, 2008).

Segundo Ferreira (1988), a espécie *Buddleja stachyoides* apresenta ocorrência em “campos sujos, matas ciliares, cultivados, orlas de matas, beira de córregos, de estradas, de brejos, lugares abertos, terrenos baldios, campo seco, pastos, restinga e lugares rochosos”.

2.1.6 Descrição Macroscópica da espécie *Buddleja stachyoides*

A descrição macroscópica da espécie *Buddleja stachyoides* está ilustrada na figura 3 e segue tal qual descrita por Ferreira (1988):

Arbustos com 1-4 m de altura, ramos quadrangulares, levemente alados, densamente revestidos com pelos albos ou rufo-tomentosos. Folhas sésseis ou subsésseis; estípulas reduzidas a uma linha; lâminas ovadas ou lanceoladas, 7-25 cm de comprimento, 2-8,5 cm de largura, agudas até acuminadas no ápice, margens irregularmente serradas até crenadas, auriculadas ou perfoliadas até atenuadas na base, pubescente na face inferior. Inflorescência 10-30 cm de comprimento, formada por glomérulos interruptos dispostos em espigas, glomérulos multiflores, com flores sésseis ou subsésseis em cima, curtas e congestas; pedúnculos 0,5-2 cm de comprimento, lobos 1,5-3 mm de comprimento, acuminados; corola cilíndrica, tomentosa externamente, pelos simples na metade superior internamente, tubo 6,5 – 7 mm de comprimento, lobos 1,5-2,5 mm de comprimento, suborbiculares; anteras cerca de 1 mm de comprimento; ovário tomentoso, 2,5-4 mm de comprimento; estilete glabro, 5-5,5 mm de comprimento; estigma capitado, cerca de 0,5 mm de comprimento. Cápsula oblonga, tomentosa até glabrescente, 4-6,5 mm de comprimento. Sementes cerca de 1 mm de comprimento, com testa esponjosa na base. FERREIRA (1988, p.59-60).

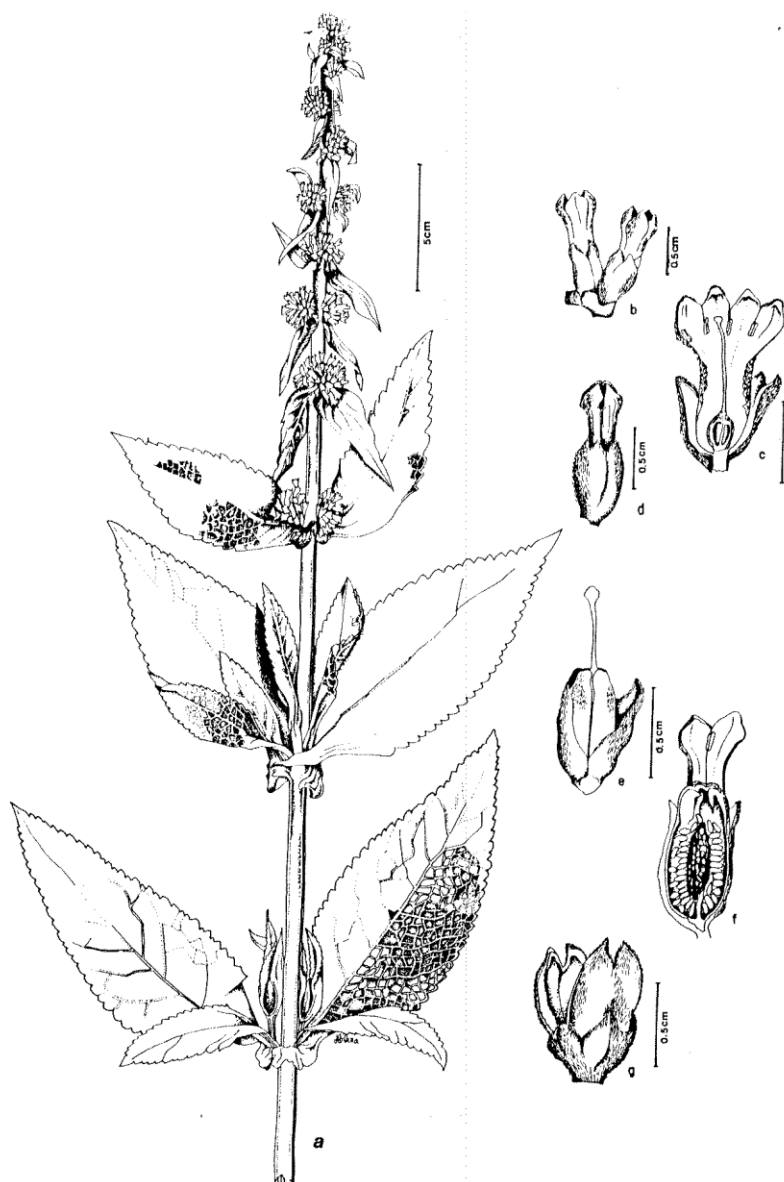


FIGURA 3 - *Buddleja stachyoides*

FONTE: FERREIRA (1988)

Legenda: a - aspecto geral do ramo florido; b - flores; c - flor em corte longitudinal; d - flor isolada; e - fruto com resquício de cálice; f - fruto em corte longitudinal com sementes; g - fruto aberto

2.1.7 Uso Popular da espécie *Buddleja stachyoides*

As propriedades atribuídas para a espécie *Buddleja stachyoides* são: emoliente, anti-helmintica, sudorífera, anti-hemorroidal, antiartrítica e anti-catarral, calmante, béquica (acalma a tosse), analgésica. Em animais é utilizada para lavar os olhos e tratar pisaduras de eqüinos (MAHLKE, 2007; LORENZI, 2008).

Segundo Lorenzi (2008) a etnofarmacologia registra que o chá feito com as cascas é empregado para tratar males dos pulmões, enquanto que suas raízes eram usadas contra envenenamento por picadas de cobras. O decocto de pedaços da

planta toda em um litro de água e usado em forma de banhos, é indicada em casos de contusões, machucaduras e dores em geral. A infusão desta planta na dose de 3 a 4 xícaras por dia é utilizada contra afecções catarrais, gripe forte, bronquites e tosses. Esta planta é considerada tóxica para peixes, e talvez para o ser humano, caso seja usada excessivamente. A foto da espécie vegetal *Buddleja stachyoides* está apresentada na figura 4.



FIGURA 4 - FOTO DA ESPÉCIE VEGETAL *Buddleja stachyoides*
FONTE: LORENZI (2008)

2.1.8 Constituição química

Pesquisas sobre os metabólitos secundários de diversas espécies de *Buddleja*, resultaram no isolamento de inúmeras substâncias como terpenoides, flavonoides, iridoides, feniletanoides, fenilpropanoides, sesquiterpenos, lignanas e saponinas (MAHLKE, 2007).

A maioria dos monoterpenos que estão presentes, especialmente, nas folhas e hastes jovens das plantas do gênero *Buddleja*, são iridoides constituídos de um esqueleto de 9 carbonos com um éster ou glicosídeo ligados no carbono C-6. Estes compostos foram denominados como: acumbina (estrutura 1), p-metoxicinamoil

aucubina (estrutura 2); buddlejosida A₂ (estrutura 3); Catalpol (estrutura 4); metilcatalpol (estrutura 5); catalposida (estrutura 6); p-metoxicinamoil catalpol (estrutura 7) (HOUGHTON, 2003). Essas estruturas estão apresentadas na figura 5.

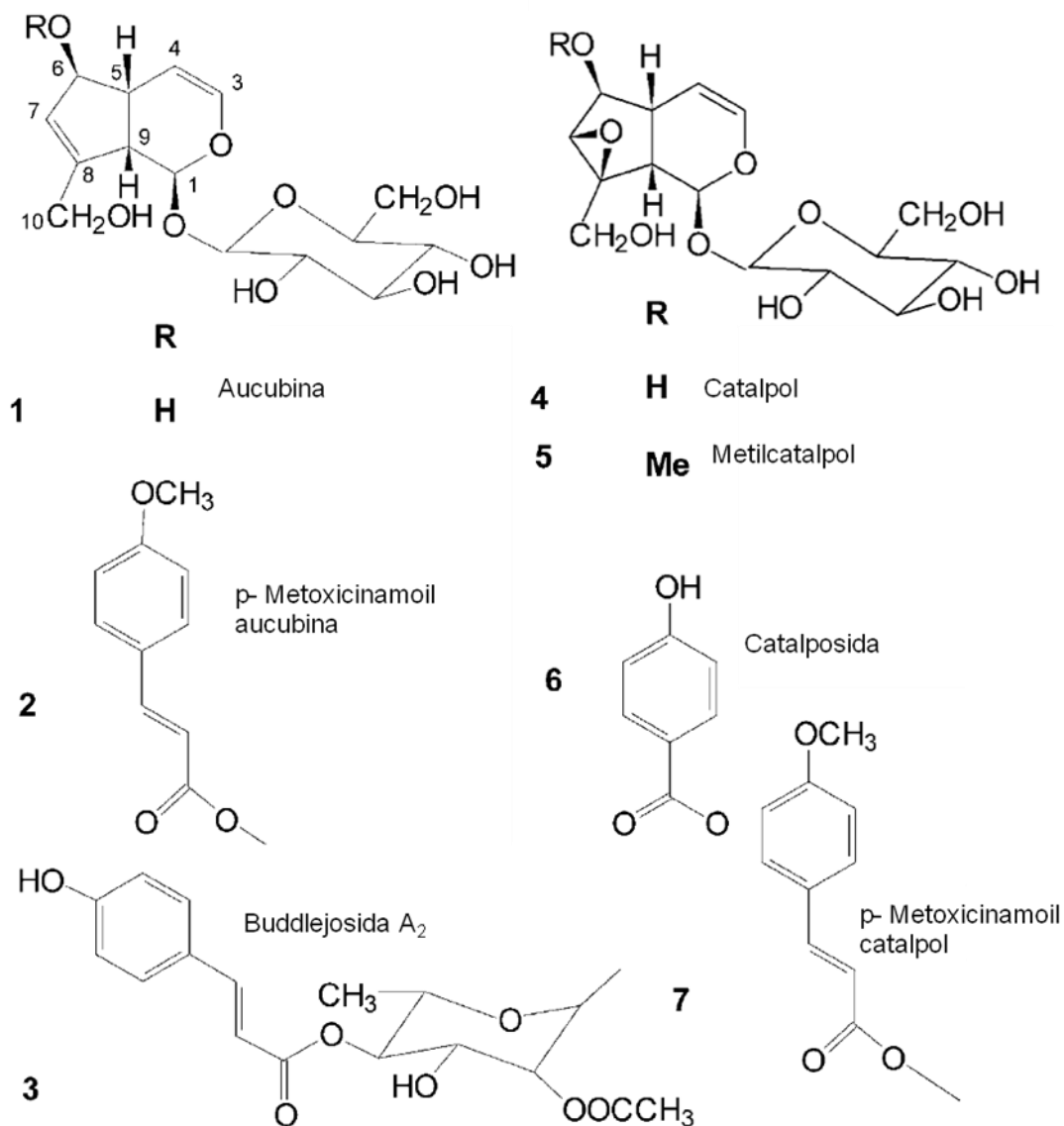


FIGURA 5 - COMPOSTOS ISOLADOS DE ESPÉCIES DE *Buddleja*
FONTE: HOUGHTON (2003)

Legenda: 1 - Aucubina; 2 - p-metoxicinamoil aucubina; 3 - buddlejosida A₂; 4 - Catalpol; 5 - metilcatalpol; 6 - catalposida; 7 - p-metoxicinamoil catalpol

Outros iridoide são compostos por esqueletos de ajugol, em que a ligação C7 e C8 é saturada, e C8 é substituído por um grupo metil e hidroxil. A estrutura desse iridoide e de seus derivados (estruturas 8 a 10; figura 6) já foram isolados das partes aéreas de *B. japonica* (HOUGHTON, 2003).

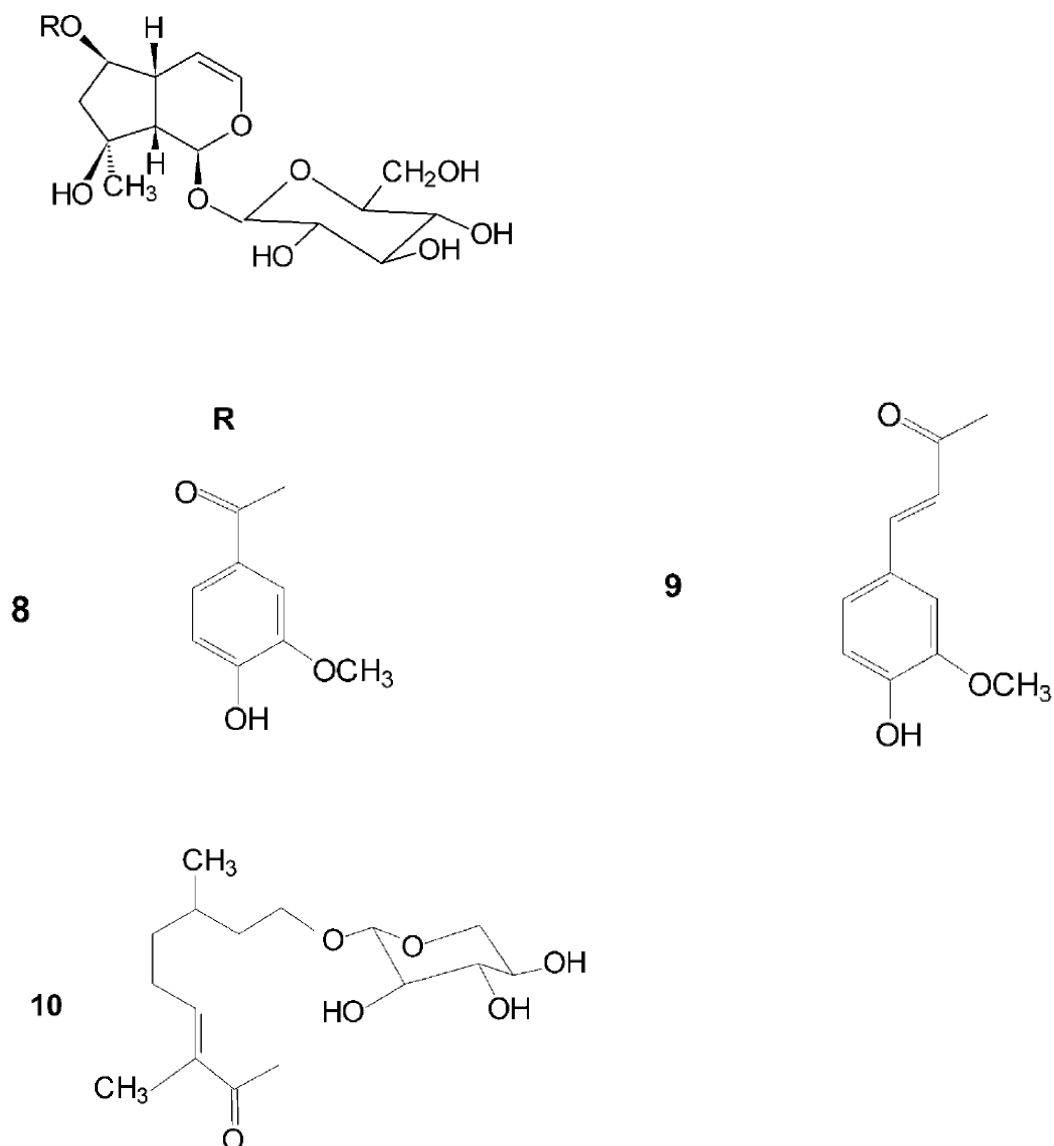


FIGURA 6 - IRIDOIDES ISOLADOS DE ESPÉCIES DE *Buddleja*

FONTE: HOUGHTON (2003)

Legenda - 8: Vanililajugol; 9: Feruloilajugol; 10: Buddjelosida A₁

O Fenilpropanoide glicosídeo verbascosídeo [2 - (3,4-dihidroxifeniletíl)-1-O- α -l-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -d-(4-O-cafeil)-glucopiranosídeo], (figura 7), foi isolado como o principal constituinte do extrato alcoólico bruto de *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng do Sul do Brasil. (GITZEL FILHO *et al.*, 2012).

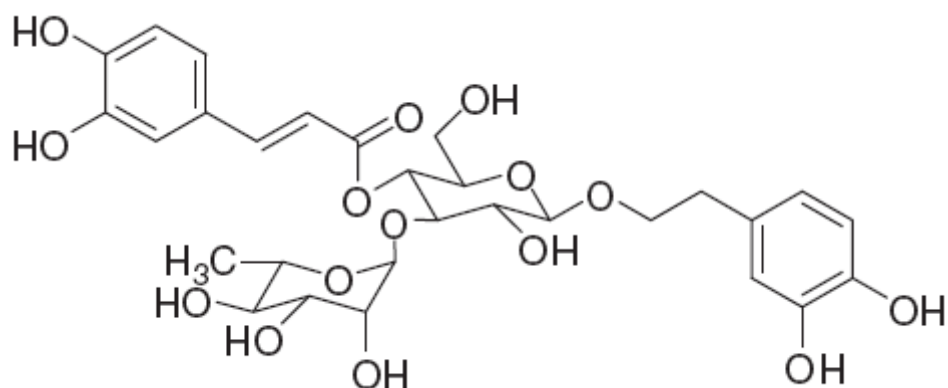


FIGURA 7 - ESTRUTURA DO VERBASCOSÍDEO [2-(3,4-DIHDROXIFENILETIL)-1-O-A-L-RAMNOPIRANOSIL-(1→3)-B-D-(4-O-CAFEIL)-GLUCOPIRANOSÍDEO]
 FONTE: GITZEL FILHO *et al.* (2012)

No extrato de *Buddleja davidii* obtido por biotecnologia, ou seja por uma tecnologia de cultura de células de plantas *in vitro*, que permite a obtenção de extratos enriquecidos com metabolitos secundários em concentrações que não podem ser obtidos por métodos tradicionais, foram identificados compostos derivados de Fenilpropanoides, tais como verbascosídeo, isoverbascosídeo, leucosceptosídeo A e martinosídeo (Figura 8) (VERTUANI *et al.*, 2011).

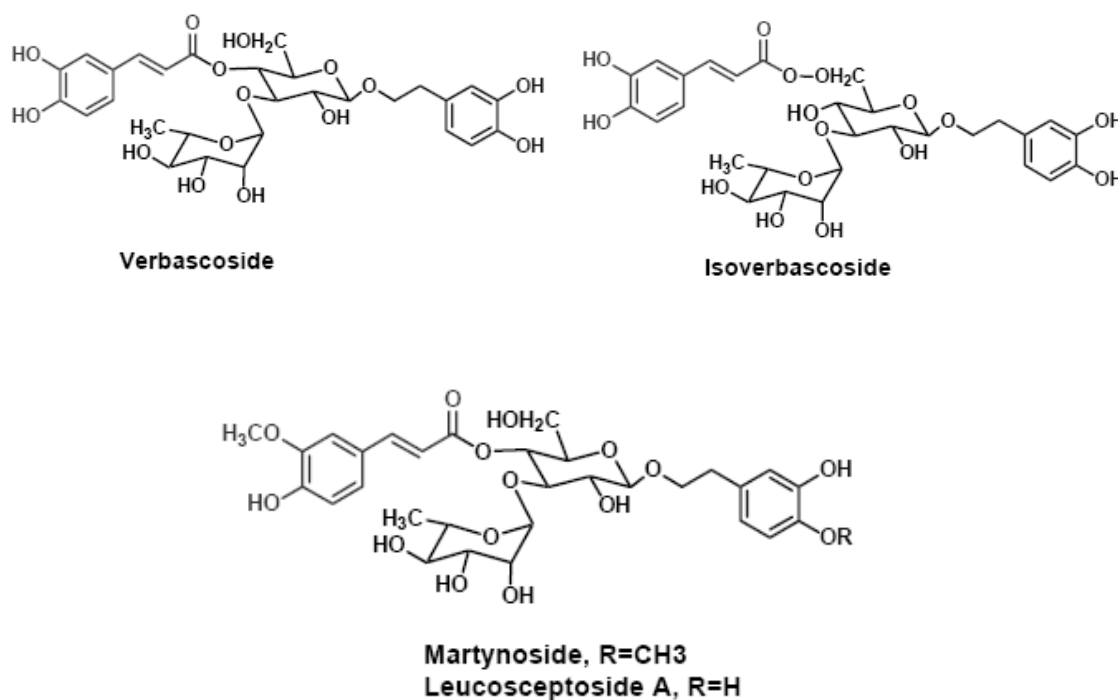


FIGURA 8 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS FENILPROPANOÍDES: VERBASCOSÍDEO, ISOVERBASCOSÍDEO, MARTINOSÍDEO E LEUCOSCEPTOSÍDEO, OBTIDOS DE *Buddleja davidii*
 FONTE: VERTUANI *et al.* (2011)

2.1.9 Atividades biológicas e farmacológicas

Alguns dos compostos isolados têm demonstrado efeito inibidor sobre a geração de eicosanóides de leucócitos, atividades anti-hepatotóxica, antifúngica, antibacteriana e antiprotozoária (MAHLKE, 2007).

A partir da fração de acetato de etila das flores da espécie vegetal *B. officinalis*, alguns compostos foram isolados, sendo que dois deles luteolina e acteosideo apresentaram uma potente atividade antioxidante (PIAO, 2003).

Os compostos contidos no gênero *Buddleja* como flavonoides, triterpenoides e carotenóides apresentam atividades anti-inflamatórias, flavonoides e feniletanóides são antioxidantes e outras substâncias indeterminadas podem causar proliferação dos fibroblastos (HOUGHTON, 2005).

O extrato metanólico de *B. crispa* mostrou significativa atividade antioxidante e inibitória contra a enzima lipoxigenase (AHMAD, 2007).

No estudo de Lee, Woo, e Kang (2005) isolou-se um glicosídeo Fenilpropanoide, acteosideo, de *Buddlejae Flos* (*B. officinalis*). Vários relatos têm demonstrado que ele inibe a atividade enzimática da enzima conversora da angiotensina, o que pode ser benéfico contra a hipertensão arterial. Uma série de estudos *in vitro* demonstraram claramente que ele também tem atividade imunomoduladora, anti-viral e anti-metástase. Recentemente, o acteosideo foi capaz de proteger da toxicidade hepática induzida por CCl₄ em fígado de camundongo. O acteosideo também tem um efeito direto na retirada do nitrito gerado na decomposição do óxido nítrico. Também foi relatado que acteosideo inibiu a formação de prostaglandina E₂, o fator de necrose tumoral e óxido nítrico e também suprimiu a atividade enzimática da ciclooxygenase (COX) -2.

Extratos metanólicos e alcoólicos de folhas de *Buddleja globosa* coletadas no outono e verão foram avaliados quanto à modelos de analgesia oral e tópica no movimento súbito de cauda, formalina e contorção abdominal. Foram utilizados os compostos verbascosídeo e luteolina 7-o-glucosídeo e como droga de referência foi usado o ibuprofeno. A influência sazonal foi observada nestes extratos, sendo que os coletados no outono resultaram em menor atividade. Os extratos mostraram uma atividade antinoceptiva dose-dependente em todos os ensaios, os maiores efeitos foram obtidos para os testes de formalina e contorção abdominal. O verbascosídeo

foi mais ativo que o ibuprofeno no teste de contorção (67,6% e 50,0% em doses equimolares) e mostrou efeitos semelhantes no movimento súbito de cauda (tópico e oral) perto de 25% em doses equivalentes ao ibuprofeno. Luteolina 7-o-glicosídeo foi ligeiramente mais ativa no teste de movimento súbito de cauda e quase a metade do que o verbascosídeo no ensaio de contorção abdominal. O efeito analgésico de *Buddleja globosa* demonstrado neste estudo ajudou a validar o seu uso em medicinas tradicionais (BACKHOUSEA, 2008).

O extrato bruto de *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng, frações e o composto verbascosídeo foram avaliados quanto à inibição das enzimas: acetilcolinesterase (AChE), dipeptidil-peptidase IV (DPP-IV) e prolil oligopeptidase (POP). O composto mostrou uma atividade fraca sobre DPP-IV com $IC_{50} > 150 \mu M$ e foi inativo sobre a AchE. Mas, houve uma inibição significativa da POP de uma forma dose-dependente com um valor de IC_{50} de $1,3 \pm 0,2 \mu M$, semelhante ao do controle positivo, baicalin, com uma IC_{50} de $1,2 \pm 3 \mu M$. (GITZEL FILHO *et al.*, 2012). A enzima prolil oligopeptidase (POP) é uma protease que hidrolisa pequenos peptídeos com prolina. É notável o aumento dos efeitos neuroprotetores e de melhora cognitiva com a utilização de inibidores da POP. (BORGES *et al.*, 2010). Estes compostos são importantes para o tratamento de condições clínicas, tais como perturbações neuropsiquiátricas e doenças neurodegenerativas. No entanto, até ao momento poucos estudos têm sido dedicados à descoberta de inibidores naturais de POP (GITZEL FILHO *et al.*, 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

3.1.1 Coleta, Identificação e exsicata

O material vegetal foi coletado na Universidade Federal do Paraná, campus Jardim Botânico nos meses de maio e junho.

Para realização da identificação botânica da espécie coletada, esta foi levada até o Herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba, Estado do Paraná, e foi comparada com a exsicata registrada sob o número 339899 *Buddleja stachyoides* pelo curador Osmar do Santos Ribas. A figura 9 apresenta a exsicata depositada no local.



FIGURA 9 - EXSICATA DE *Buddleja stachyoides* DO HERBÁRIO DO MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA (ACERVO Nº 339899)
FONTE: O AUTOR (2011)

As figuras 10 e 11 apresentam as partes aéreas e as raízes, respectivamente, da espécie vegetal *Buddleja stachyoides* coletadas e utilizadas no estudo.



FIGURA 10 - PARTES AÉREAS DE *Buddleja stachyoides*
FONTE: O autor (2011)



FIGURA 11 - RAÍZES DE *Buddleja stachyoides*
FONTE: O autor (2011)

3.1.2 Análises físico-químicas

Após a secagem (em estufa à 60°C) e rasura (em rasurador de ervas) das partes aéreas e raiz de *Buddleja stachyoides* foram realizadas as análises de umidade e cinzas totais e as metodologias estão descritas a seguir.

3.1.2.1 Umidade

Para determinação de umidade das partes aéreas e das raízes da planta estudada, foi escolhida a metodologia para a determinação de água em drogas vegetais, descrita na Farmacopéia Brasileira 5ª edição, com algumas adaptações. Pesou-se 2 g da planta rasurada e foi acondicionada em uma placa de Petri previamente dessecada nas mesmas condições a serem adotadas para a amostra, durante 30 minutos. A placa de Petri contendo a amostra foi levada à estufa à 105°C durante de 5 horas. O ensaio foi dado por concluído quando a amostra apresentou peso constante.

A porcentagem de água presente na amostra foi calculada da seguinte forma:

$$\text{(\% de água)} = \frac{(\text{P amostra} + \text{P placa de petri}) - (\text{P amostra dessecada} + \text{P placa de Petri}) \times 100}{\text{P amostra}}$$

Onde:

P = massa

% = porcentagem de água presente na droga vegetal

3.1.2.2 Cinzas totais

Para determinação das cinzas totais, foi utilizada a metodologia, presente na Farmacopéia Brasileira 5ª edição. Pesou-se cerca de 3 g da amostra pulverizada, transferiu-se para um cadinho (de silício) previamente tarado. Distribuiu-se a amostra uniformemente no cadinho que foi incinerado aumentando, gradativamente,

a temperatura até, no máximo, 600 ± 25 °C, até todo o carvão ter sido eliminado. O cadinho contendo as cinzas foi resfriado em dessecador e pesado. Em seguida foi calculada a porcentagem de cinzas totais presente na amostra.

3.1.3 Ensaio fitoquímico

Para identificação dos principais grupos do metabolismo secundário da espécie vegetal, foi realizado um ensaio fitoquímico, através da identificação por reações de precipitação ou coloração. Este ensaio foi realizado de acordo com Moreira (1979).

3.1.3.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%

Para obtenção do extrato hidroalcoólico, também foi utilizado o método de maceração. Pesou-se cerca de 40 g da matéria-prima vegetal, previamente rasurada, adicionou-se 200 mL de etanol 70% no frasco contendo a amostra, colocou-se em banho-maria a 70° C por 60 minutos, em seguida deixou-se em maceração por 48 horas, após este período o extrato foi filtrado e o volume completado para 200 mL com etanol 70%. Os ensaios fitoquímicos realizados com este extrato estão descritos a seguir.

3.1.3.2 Pesquisa de alcaloides

Secou-se 50 mL do extrato hidroalcoólico e o resíduo foi suspenso com 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico 1% . Essa solução foi filtrada e pipetou-se 2 mL do filtrado em 5 tubos de ensaio. Gotejou-se 2-3 gotas do Reativo de Mayer no tubo 1, 2-3 gotas do Reativo de Bertrand no tubo 2, 2-3 gotas do Reativo de

Bouchardat no tubo 3 e 2-3 gotas do Reativo de Dragendorff no tubo 4. O tubo 5 foi usado como comparativo (branco). A reação é considerada positiva se apresentar precipitação.

3.1.3.3 Pesquisa de ácidos orgânicos

O excedente da solução etanólica da pesquisa de alcaloides foi levado à secura e redissolvido em 5 mL de água destilada. A presença de ácidos orgânicos é indicada pelo pH ácido da solução.

3.1.3.4 Pesquisa de fenóis

Utilizou-se 2 mL da solução obtida na pesquisa de ácidos orgânicos adicionando 2 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. A presença de fenóis é confirmada pelo desenvolvimento de coloração.

3.1.3.5 Pesquisa de flavonoides

Transferiu-se 5 mL do extrato hidroalcoólico para 2 tubos de ensaio. Conduziu-se ambos os tubos para a capela de exaustão. O tubo nº 1 foi identificado como comparação e ao tubo nº 2 foi adicionado 2 pedaços de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico concentrado. Aguardou-se alguns minutos até que ocorresse a reação do líquido extrator acidificado com a limalha de magnésio. A reação é positiva se houver a formação de um anel de coloração rósea a vermelha.

3.1.3.6 Pesquisa de cumarinas

Acidificou-se 30 mL do extrato hidroalcoólico com ácido clorídrico concentrado até pH 1,0. Concentrou-se em banho-maria até a sua redução para 10 mL. Transferiu-se para funil de separação de 250 mL e extraiu-se duas vezes com 10 mL de éter etílico. Quando não aconteceu a separação, foi adicionado 10 mL de água deionizada no funil de separação. Reduziu-se o extrato orgânico para 5 mL em banho-maria. Em um papel de filtro, pipetou-se uma gota de hidróxido de sódio 1N (mancha nº 01), uma gota de extrato orgânico e uma gota de hidróxido de sódio 1N (mancha nº 02) e uma gota de extrato orgânico e uma gota de hidróxido de sódio 1N (mancha nº 03) sendo coberta por uma moeda. Levou-se o papel de filtro identificado com as 3 manchas para dentro da câmara de UV durante 3 minutos. A presença de Cumarinas é indicada pelo desenvolvimento de coloração com fluorescência azul, verde-amarelada ou amarela.

3.1.3.7 Pesquisa de antraquinonas

Aliquotou-se 20 mL do extrato hidroalcoólico e foi levado à fervura por 15 minutos sob refluxo adicionando-se 3 mL de ácido sulfúrico 10%. Após o resfriamento, transferiu-se para um funil de separação, adicionou-se 30 mL de água destilada e extraiu-se 3 (três) vezes com 10 mL de tolueno. O extrato toluênico foi concentrado a 10 mL e transferido para um tubo de ensaio, adicionou-se 10 mL de solução reagente de hidróxido de sódio, em seguida o mesmo foi agitado para mistura dos reagentes e ocorrência da reação. O aparecimento de coloração rósea ou avermelhada indica a presença de hidroxiantraquinonas e naftoquinonas.

3.1.3.8 Pesquisa de esteróis e triterpenos

Colocou-se 30 mL do extrato hidroalcoólico em cápsula de porcelana e evaporou-se até a secura em banho-maria. Com o auxílio de um bastão de vidro, dissolveu-se o extrato seco em 5 mL de clorofórmio. Pipetou-se 0,1, 0,5, e 1,0 mL do extrato clorofórmio para 3 tubos de ensaio e o volume foi completado para 2 mL com clorofórmio. A reação de Liberman Bouchard foi executada em capela de exaustão, adicionando-se 1,0 mL de anidrido acético e 2,0 mL de ácido sulfúrico P.A. lentamente. A reação é positiva se ocorrer formação de coloração azul à verde.

3.1.3.9 Pesquisa de iridoides

A pesquisa de Iridoides foi realizada a partir de três testes:

Transferiu-se 2 mL do extrato hidroalcoólico para um tubo de ensaio, adicionou-se cristais de floroglucinol e 1 mL de ácido clorídrico. A reação é positiva se houver a formação de coloração verde escura.

Transferiu-se 2 mL do extrato hidroalcoólico para um tubo de ensaio e adicionou-se 2 gotas de ácido sulfúrico. A reação é positiva se houver a formação de coloração rosa violáceo.

Transferiu-se 2 mL do extrato hidroalcoólico para um tubo de ensaio, adicionou-se cristais de vanilina e gotas de ácido sulfúrico. A reação é positiva se houver a formação de coloração rosa cereja.

3.1.3.10 Preparo do extrato aquoso a 20%

Para obtenção do extrato aquoso, foi utilizado o método de maceração. Pesou-se cerca de 40 g da matéria-prima vegetal, previamente rasurada, adicionou-se 200 mL de água purificada no frasco contendo a amostra, colocou-se em banho-maria a 70° C por 60 minutos, em seguida deixou-se em maceração por 48 horas,

após este período o extrato foi filtrado e o volume completado para 200 mL com água purificada. Os ensaios fitoquímicos realizados com este extrato estão descritos a seguir.

3.1.3.11 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Transferiu-se 2 mL do extrato aquoso para 3 tubos de ensaio e os mesmos foram levados até a capela. Procedeu-se a análise pipetando-se no tubo 1, 1 mL de ácido clorídrico concentrado e no tubo 2, 1 mL de hidróxido de amônio concentrado, o tubo 3 foi usado como branco para comparação de mudança de cor. Em meio ácido a coloração apresenta tons avermelhados e em meio básico tons azulados, mas se ocorrer mudança de coloração em relação ao tubo branco, a reação é positiva.

3.1.3.12 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Transferiu-se 2 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio, o mesmo foi agitado por 1 minuto. A formação de espuma persistente indica a presença de saponinas, que pode ser confirmada pela adição de solução de ácido clorídrico 1 %, pois a espuma é estável à ação de ácidos diluídos.

3.1.3.13 Pesquisa de gomas e mucilagens

Transferiu-se 2 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio e adicionou-se 3 a 4 gotas da solução de acetato de chumbo. A reação é positiva se após alguns minutos ocorrer a formação de turvação ou de espessamento da solução.

3.1.3.14 Pesquisa de taninos

Transferiu-se 5 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio e adicionou-se 5 gotas de cloreto férrico 1%, como houve a formação de um precipitado escuro deu-se continuidade a pesquisa. Pipetou-se 5 mL do extrato aquoso para um balão de fundo chato de 100 mL, acrescentou-se 5 gotas de formaldeído a 37% e 4 mL de ácido clorídrico. A mistura foi levada para o refluxo por 1 hora. Após o resfriamento, filtrou-se a solução por papel filtro e o material retido foi lavado com água destilada e álcool. Ao material retido no papel filtro adicionou-se 3 gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. Caso ocorra formação de coloração indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado adiciona-se excesso de acetato de sódio e 10-43 gotas de cloreto férrico 1%. Se houver formação de precipitado escuro ou azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

3.1.3.15 Pesquisa de aminogrupos

Recortou-se um pedaço de papel de filtro e com o auxílio de um bastão de vidro pingou-se o extrato aquoso, formando duas manchas. Este foi conduzido à capela e gotejou-se o reativo de ninhidrina somente sobre uma mancha, a outra serviu como comparativo de referência. Levou-se o papel de filtro à estufa à temperatura de 100°C por 5 minutos. Ao retirar o papel de filtro da estufa, a formação de coloração azul violácea indica reação positiva.

3.1.3.16 Pesquisa de ácidos voláteis

Em um tubo de ensaio colocou-se 5 mL do extrato aquoso e foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico 1 N, tomando-se o cuidado de não umedecer a parede do tubo. Prendeu-se um papel indicador em uma rolha de borracha e vedou-se o tubo

com essa rolha. O mesmo foi deixado em banho-maria à 60°C durante 30 minutos. A formação de coloração vermelha indica reação positiva.

3.1.3.17 Pesquisa de ácidos fixos

Em um balão de destilação, colocou-se 20 mL do extrato aquoso juntamente com 2 mL de solução de hidróxido de sódio 1N. Levou-se o conteúdo ao refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, acidificou-se 2 mL de ácido sulfúrico 1N e extraiu-se 3 vezes com 10 mL de éter etílico. Em seguida, os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativo, filtrados e levados à secura em banho-maria à 50°C. O resíduo foi aquecido em estufa durante 10 minutos a 100°C e após este tempo, adicionou-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio 1N, a solução foi filtrada novamente e gotejado em papel de filtro, de modo a obter uma mancha de 1 cm de diâmetro. Secou-se o papel filtro em estufa à 100°C por 10 minutos e então o mesmo foi tratado com o Reagente de Nessler. A presença de ácidos fixos é indicada pelo desenvolvimento de coloração.

3.1.3.18 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

Transferiu-se 5 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio, tomando-se o cuidado para não umedecer as paredes do tubo. Adicionou-se 1 mL de solução de ácido sulfúrico 1 N. Suspendeu-se com auxílio de uma rolha de borracha uma tira de papel pícrico (tira de papel de filtro previamente embebida em ácido pícrico e carbonato de sódio). O tubo de ensaio foi levado ao banho-maria à 60°C por 30 minutos. A reação é positiva se houver o desenvolvimento de coloração avermelhada no papel (resultante do contato do ácido pícrico com o HCN liberado da amostra ácida e formando o isopurpurato de sódio).

3.1.3.19 Pesquisa de valepotriatos

Pesou-se 1g de amostra particulada em becker de 50 mL. Adicionou-se 15 mL de diclorometano e levou-se ao agitador magnético por 5 minutos. Filtrou-se para um becker de 50 mL, lavando-se o resíduo com 2 mL de diclorometano. O filtrado foi levado ao banho-maria e concentrado até a secura. Solubilizou-se o resíduo com 0,2 mL de metanol. Acrescentando-se 3 mL de uma mistura de ácido clorídrico 25%: ácido acético P.A. (50:50). Transferiu-se para um tubo de ensaio e agitou-se manualmente por 5 minutos. O desenvolvimento de coloração azul-esverdeado indica a presença de valepotriatos.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

3.2.1 Extração por Soxhlet

As partes aéreas e as raízes da planta seca rasuradas foram pesadas e posteriormente extraídas em aparelho de Soxhlet modificado (figura 12) de acordo com Carvalho (2001).

Foi pesado e introduzido aproximadamente 2 kg do material vegetal seco, por vez, no suporte de vidro do aparelho de Soxhlet (este continha uma placa porosa e uma camada de algodão). O aparelho de Soxhlet modificado foi conectado a um a um balão de fundo chato contendo pérolas de vidro e adicionou-se cerca de 8000 mL de etanol 96 °GL percolando a amostra. Em seguida, o sistema foi conectado ao condensador de bolas e levado ao aquecimento em manta aquecedora. Após início do aquecimento, o líquido extrator contido no balão é evaporado e posteriormente condensado no condensador de bolas, percorrendo novamente o material vegetal, permitindo uma excelente extração. Quando o menisco do extrato no canal lateral do Soxhlet atingia o ponto de refluxo, o extrato era descarregado no balão por sifonamento e o processo era repetido aproximadamente 10 vezes até o

clareamento do líquido contido no canal lateral do Soxhlet. Este procedimento evita a degradação térmica das substâncias contidas no balão, pois a quantidade de líquido extrator é constante no sistema sendo capaz de solvatar os compostos (Carvalho, 2001).

Após o término da extração, obteve-se um extrato denominado extrato alcoólico bruto utilizado, posteriormente, para obtenção das frações e realização das atividades biológicas.



FIGURA 12 - OBTENÇÃO DO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO POR APARELHO DE SOXLET MODIFICADO
FONTE: O autor (2012)

3.2.2 Determinação do teor de sólidos

A análise de teor de sólidos foi realizada segundo a metodologia para determinação de resíduo seco em extratos fluidos e moles, presente na Farmacopéia Brasileira 5ª edição. Pipetou-se volumetricamente 2 mL do extrato alcoólico bruto e transferiu-se para uma placa de Petri previamente dessecada. A placa contendo a amostra foi levada ao banho-maria a 60 °C e posteriormente para a estufa à 105° C, por 3 horas. Após o resfriamento em dessecador, a placa contendo o resíduo foi pesada. A diferença entre o peso da placa com o resíduo do extrato e a placa vazia forneceu o teor de sólidos em 2 mL do extrato, para obtenção do valor em porcentagem realizou-se regra de três para 100 mL.

3.3 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

Para obtenção das frações foi utilizado o método de partição sistema líquido-líquido. Utilizando-se solventes de diferentes polaridades seguindo esta ordem: n-hexano, clorofórmio, acetato de etila. Os solventes utilizados são de padrão analítico (PA).

3.3.1 Sistema de partição líquido – líquido

Para a realização da partição líquido-líquido utilizou-se o aparelho de Soxhlet modificado conectado a um balão de fundo chato de 500 mL contendo pérolas de vidro. O extrato alcoólico bruto concentrado foi colocado no suporte de vidro do aparelho de Soxhlet e em seguida, foi adicionado o primeiro solvente hexano em cima do extrato alcoólico bruto, para facilitar a separação foi acrescentado um pouco de água destilada. Este sistema foi acoplado ao condensador de bolas, levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado sob refluxo por cerca de 12 horas. Este processo foi repetido com os demais solventes:

clorofórmio e acetato de etila. Após o particionamento, o extrato que sobrou foi denominado de fração remanescente hidroalcoólica.

3.4 PURIFICAÇÃO DAS FRAÇÕES

A purificação das frações foi realizada por cromatografia em coluna com fase estacionária de sílica gel 60 Merck®. Cerca de 10 g de cada fração (hexânica, clorofórmica, acetato de etila, evaporadas até a secura), foi incorporada a Sílica-gel 60 para a formação da pastilha de sílica. Esta pastilha foi submetida a cromatografia em coluna de sílica, onde a eluição da amostra foi realizada através do sistema de passagem de solventes com gradientes de polaridades crescentes, iniciando-se com 100% de hexano, depois uma mistura de hexano e acetato de etila na proporção 70:30, decrescendo a quantidade de hexano e aumentando a quantidade de acetato de etila, variando de 5 em 5 mL, até chegar a 100% de acetato de etila. Em seguida, utilizou-se a mistura acetato de etila e metanol na proporção 90:10, decaindo a quantidade de acetato de etila e aumentando a quantidade de metanol, variando de 5 em 5 mL. As frações eram recolhidas em pequenos frascos de aproximadamente 10 ml, posteriormente estes ficaram expostos em temperatura ambiente para evaporação dos solventes. O controle de eluição foi feito com lâmpada de luz UV à 360 nm.

Nos frascos recolhidos da fração acetato de etila foi utilizado cromatografia em camada delgada para separação dos compostos, a fase móvel consistia de uma mistura de acetato de etila, ácido fórmico e água (90:0,5:0,5) e o revelador era ácido difenilbórico 2- aminoetilester em etanol.

3.4.1 Seleção do marcador fitoquímico

Para encontrar um marcador fitoquímico e auxiliar na identificação dos compostos, foram desenvolvidos dois métodos em HPLC (Equipamento das Ervas Curam Indústria Farmacêutica Ltda: Merck-Hitashi composto de bomba L7100;

degaseificador de solventes L7812; injetor automático L-7200; detector DAD L7455; interface L7000 conectada ao sistema operacional Windows Professional; coluna Phenomenex Gemini-NX 5µm C-18 110 A, tamanho 250 x 4,6 mm, número de série 462569-14).

No primeiro método foram realizadas injeções das amostras extrato alcoólico bruto e frações das partes aéreas. No segundo método foi injetado apenas o extrato alcoólico bruto das partes aéreas e o padrão de verbascosídeo. Como fase móvel utilizou-se os seguintes solventes: bomba A - solução aquosa constituída de ácido sulfúrico 0,01 M + ácido fosfórico 0,4% + 0,4 % de dietilamina; bomba B - Metanol: solução aquosa constituída de ácido sulfúrico 0,05 M + ácido fosfórico 2% + 0,2% de dietilamina na proporção de 95:5; bomba C - Acetonitrila: solução aquosa constituída de ácido sulfúrico 0,05 M + ácido fosfórico 2% na proporção de 90:10. Os cromatogramas foram integrados no comprimento de onda 325 nm. A temperatura do Forno foi 35 °C. As amostras foram diluídas em metanol e fase aquosa com 2% de ácido fosfórico. O volume de injeção foi de 40 µL. O gradiente de fase móvel descrito para o primeiro método está apresentado na tabela 1.

TABELA 1 – GRADIENTE DESENVOLVIDO EM HPLC PARA O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *Buddleja stachyoides*

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fase C (%)	Fluxo (mL/min)
0,0	98,0	0,0	2,0	1,2
5,0	98,0	0,0	2,0	1,2
6,0	95,0	3,0	2,0	1,2
8,0	82,0	16,0	2,0	1,2
15,0	70,0	16,0	14,0	1,2
35,0	57,0	16,0	27,0	1,2
53,0	34,0	64,0	2,0	1,2
58,0	34,0	64,0	2,0	1,2
60,0	10,0	88,0	2,0	1,2
69,0	10,0	88,0	2,0	1,2
70,0	98,0	0,0	2,0	1,2
80,0	98,0	0,0	2,0	1,2

FONTE: O autor (2012)

O gradiente de fase móvel descrito para o segundo método está apresentado na tabela 2.

TABELA 2 - MÉTODO EM HPLC DESENVOLVIDO PARA ANÁLISE DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fase C (%)	Fluxo (mL/min)
0,0	100	0	0	1,1
3,0	100	0	0	1,2
5,0	90	7	3	1,2
15,0	81	16	3	1,2
28,0	70	21	9	1,2
36,0	70	21	9	1,2
40,0	59	26	15	1,2
45,0	59	26	15	1,2
47,0	20	65	15	1,2
53,0	20	65	15	1,2
54,0	100	0	0	1,1
60,0	100	0	0	1,1

FONTE: O autor (2012)

Para quantificar a quantidade de verbascosídeo presente no extrato alcoólico bruto das partes aéreas foi realizada uma curva de calibração com o padrão de verbascosídeo utilizando-se o segundo método desenvolvido no HPLC.

A solução padrão de verbascosídeo utilizada na curva de linearidade foi preparada pesando-se 3,3 mg de padrão de verbascosídeo e diluído em balão volumétrico de 10 mL com metanol. Obtendo-se uma solução de concentração de 0,33 mg/mL em metanol. Foram preparadas seis concentrações dissolvidas em fase ácida fosfórica 2% (0,044 mg/mL; 0,066 mg/ml; 0,088 mg/mL; 0,11mg/mL; 0,132 mg/mL e 0,154 mg/mL) a partir da solução de 0,33 mg/mL. Essas concentrações foram injetadas em triplicata, obtendo-se a curva de calibração do padrão de verbascosídeo.

3.4.2 Identificação do composto

Após a purificação da fração acetato de etila das partes aéreas de *Buddleja stachyoides* dos 107 frascos coletados de aproximadamente 10 mL cada, 3 deles apresentaram sinais de cristalização durante o processo de secagem e foram reunidos e centrifugados, obtendo-se então um precipitado.

O precipitado obtido foi ressuspenso em metanol e duas vezes de 10 mg foi cromatografada em cromatoplaça de sílica, utilizando como fase móvel acetato de etila, ácido fórmico e água (90:0,5:0,5) e como revelador ácido difenilbórico 2-aminoetilester em etanol. Duas bandas separadas foram raspadas e colocadas em dois frascos, dissolvidas em metanol e centrifugadas para retirada da sílica. As amostras dissolvidas em metanol, foram concentradas e pesadas, obtendo-se 10 mg do composto 1 e 4,3 mg do composto 2. Apenas com o composto 1 foi possível realizar a identificação por RMN ¹H. O composto 2 necessita obter uma maior quantidade para dar continuidade a sua identificação. Para identificar a estrutura do composto isolado foi utilizado o equipamento Ressonância Nuclear Magnética RMN ¹H Bruker® 600 MR tubo de 2mm, à 600 MHz pertencente ao Institut de Chimie de Substances Naturelles, em Gif-sur-Yvette, França.

O composto 1 não se apresentou puro após análise de RMN-¹H, portanto foi necessária uma segunda purificação. Para tanto realizou-se uma cromatografia preparativa em HPLC Gilson® (detector DAD 171 e ELSDTMII, bomba 322, Coluna Luna® PFP 5µm 250x21,20 mm), onde 10 mg foram dissolvidos em 300 µL de DMSO-d₆ e injetaram-se 300 µL no método descrito na tabela 3.

TABELA 3 - MÉTODO DE PURIFICAÇÃO DO COMPOSTO 1

Tempo (minutos)	Fase A: Água destilada + 0,1% ácido fosfórico	Fase B: Acetonitrila + 0,1% ácido fosfórico	Fluxo (mL/minuto)
0	80	20	24
20	75	25	24
27	0	100	24

FONTE: O autor (2012)

Para dar continuidade à purificação do composto 1 foi realizada uma terceira purificação, em HPLC analítica, HPLC Waters® PDA 996, ELSD 2420, Coluna Luna® PFP 5 µm 4,6x250 mm (coluna analítica). Foram dissolvidos 1,2 mg em 300 µL de metanol, com os quais fizeram-se injeções de 50 µL, e de 100 µL, recuperando-se manualmente o pico principal. O método está descrito na tabela 4.

TABELA 4 - SEGUNDO MÉTODO DE PURIFICAÇÃO EM HPLC PARA O COMPOSTO 1

Tempo (minutos)	Fase A: Água destilada + 0,1% ácido fosfórico	Fase B: Acetonitrila + 0,1% ácido fosfórico	Fluxo (mL/minuto)
0	80	20	1,0
20	80	20	1,0
22	0	100	1,0
29	0	100	1,0
30	80	20	1,0

FONTE: O autor (2012)

3.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1 Formação do complexo fosfomolibdênio

Esta técnica foi baseada no método descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, formando um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido. Para a realização deste ensaio, preparou-se o reativo através da adição de uma solução com fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), completando com água para 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras testadas, estavam na concentração de 200 µg/mL em metanol (BIANCO, 2003).

Em um tubo de ensaio, foi aliquoteado 0,3 mL da amostra e adicionou-se 1 mL do reativo. O mesmo foi feito para os padrões e para o controle negativo, o qual foi constituído de 0,3 mL de metanol e 1 mL do reativo. Também foi preparado um branco de amostra para os extratos e frações para descontar sua coloração, colocando-se no tubo de ensaio 0,3 mL de amostra e 1 mL de metanol em vez do reativo. Levou-se os tubos para o banho-maria à 95°C por 90 minutos. A análise foi realizada em triplicata, com os tubos hermeticamente fechados. Esperou-se os tubos atingirem a temperatura ambiente para proceder a leitura das absorvâncias (A) em 695 nm. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina, conforme as seguintes equações:

$$\text{AAR\% EM RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{A_{\text{(vitamina C)}} - A_{\text{(branco)}}}{A_{\text{(vitamina C)}}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{AAR\% EM RELAÇÃO À RUTINA} = \frac{A_{\text{(rutina)}} - A_{\text{(branco)}}}{A_{\text{(rutina)}}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

AAR% = Porcentagem de atividade antioxidante relativa

A = Absorvância

3.5.2 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre com o qual compostos vegetais que apresentam potencial atividade antioxidante interagem, permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre, reduzindo-o. É um método fácil, rápido e muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de amostras vegetais.

O potencial de redução do radical DPPH das amostras (extrato alcoólico bruto e frações) foi analisado espectrofotometricamente segundo Mensor *et al.* (2001). Foram preparadas cinco ou seis concentrações para cada amostra e para os padrões utilizados (Vitamina C e Rutina). Transferiu-se para um tubo de ensaio 2,5 mL da amostra e adicionou-se 1 mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Paralelamente, foi feito um controle negativo com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH e um branco de amostra para os extratos e frações para descontar sua coloração, substituindo o DPPH por 1 mL de metanol. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518 nm, zerando com metanol, correspondente a absorção máxima do radical em estudo.

A habilidade dos extratos em reduzir o radical foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ redução do DPPH} = \frac{A \text{ controle} - (A \text{ amostra} - A \text{ branco})}{A \text{ controle}} \times 100$$

Onde:

% redução do DPPH = Porcentagem de redução do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

A = Absorvância

3.5.3 Teste de inibição da peroxidação lipídica

Este teste foi realizado segundo Morais *et al.* (2006) com modificações, sendo utilizado para verificar a capacidade das amostras testadas em inibir a peroxidação lipídica, ou seja, inibir a formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) induzidas por um gerador de radicais livres (agente oxidante ABAP - cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano), em um substrato rico em lipídeos (gema de ovo). Como controle positivo foi utilizado o padrão de BHT (hidroxibutiltolueno).

Pesou-se 3 mg do extrato bruto, das frações e padrão de BHT e diluiu-se cada um em 1 mL de etanol. Em seguida, 0,1 mL das amostras foram aliqüotados em tubos de ensaio e adicionaram-se as seguintes soluções:

- 0,4 mL de H₂O;
- 0,5 mL de solução de gema de ovo a 5% (p/v) em solução de SDS 0,55% (dodecil sulfato de sódio);
- 50 µl de ABAP 35 mM (cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano);
- 1,5 mL de ácido acético 20% (pH 3,5);
- 1,5 mL de uma TBA 0,4% (ácido tiobarbitúrico) preparada em solução de SDS 0,55%.

Os tubos de ensaio foram levados ao banho-maria à 95°C por 1 hora. Após o resfriamento, adicionou-se aos tubos 1,5 mL de 1-butanol para extração da fase orgânica. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos e foi realizada a leitura do sobrenadante a 532 nm. Foi preparado um branco de amostra para os extratos e frações para descontar sua coloração, substituindo-se o ABAP por 50µL de água. Para zerar o espectrofotômetro foi utilizado o 1-butanol. No controle

negativo a amostra foi substituída por 0,1 mL de etanol. O teste foi realizado em quintuplicata.

As espécies reativas do ácido tiobarbitúrico foram calculadas da seguinte maneira:

$$IA \% = \frac{1 - (A \text{ amostra} - A \text{ branco})}{A \text{ controle negativo}} \times 100$$

Onde:

IA% = Porcentagem de inibição da peroxidação lipídica

A = Absorvância

3.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O potencial antimicrobiano da espécie vegetal foi avaliado através do Método de Microdiluição (Anvisa, M7-A6, 2003). As cepas dos microrganismos utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 25293[™]), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC[®] 12228[™]), *Salmonella thyphimurium* (ATCC[®] 14028[™]), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] 9027[™]), *Escherichia coli* (ATCC[®] 25922[™]) e *Candida albicans* (ATCC[®] Sc5314[™]).

Foram utilizadas as amostras do extrato alcoólico bruto e as frações da espécie vegetal.

3.6.1 Método de microdiluição (determinação da concentração inibitória mínima)

O método de microdiluição da amostra em meio de cultura líquido utiliza placas de cultura de células com fundo redondo, e é eficaz na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (ANVISA, 2003).

As cepas foram inoculadas em um meio de cultura líquido contendo as amostras testadas em várias concentrações. Após incubação, efetuou-se a leitura da concentração mínima capaz de inibir o crescimento bacteriano.

3.6.2 Preparo das amostras e do teste

Os extratos e as frações foram dissolvidos em meio Müller-Hinton ou YNB e filtrados em membrana estéril, com poros de 0,22 μ m, para esterilização das soluções. Em seguida, foram transferidos 100 μ L de cada concentração (12,5 μ g/mL; 25 μ g/mL; 50 μ g/mL; 100 μ g/mL; 200 μ g/mL e 400 μ g/mL) para os poços da placa de cultura de células (96 poços).

3.6.3 Preparo do inoculo

As cepas bacterianas em teste foram repicadas em caldo Muller Hinton para bactérias e YNB para fungos e incubadas à 35°C por 24 horas. Após este período as suspensões bacterianas foram comparadas e padronizadas de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala Mac Farland. Em seguida, 100 μ L de cada bactéria foram inoculadas em 900 μ L do meio (caldo Müller-Hinton ou YNB), e 5 μ L desta mistura foram adicionados em cada poço da placa de cultura de células de 96 poços já contendo o meio com as amostras. As placas foram fechadas e mantidas em estufa a 35°C. Os resultados foram analisados nos tempos de 24 e 48 horas após a incubação.

A formação de um botão de crescimento bacteriano no fundo da placa de cultura indica que o extrato não apresenta capacidade de inibição do crescimento das bactérias na concentração testada. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6.4 Concentração bactericida mínima

O conteúdo do poço onde a concentração mínima da amostra inibiu o crescimento bacteriano foi transferido com o auxílio de um swab estéril para uma placa de petri, previamente preparada contendo apenas agar Müller Hinton (ANVISA, 2003).

As placas foram incubadas em estufa, a 35°C, por 24 horas. O crescimento bacteriano nesta placa indica que a amostra possui apenas atividade bacteriostática (capacidade de inibir o crescimento bacteriano). Por outro lado, a ausência de crescimento bacteriano indica que a amostra possui, além da atividade bacteriostática, atividade bactericida (capacidade de provocar a morte das células bacterianas).

3.7 ANÁLISE DA ATIVIDADE SOBRE *Artemia salina*

3.7.1 Preparo da solução salina

Para obtenção dos náuplios de *Artemia salina* foi necessário a incubação dos ovos deste microcrustáceo em água salgada. Portanto, foi preparada água do mar artificial pela adição de 41 g de sal marinho (23 g NaCl; 11 g MgCl₂·6H₂O; 4 g Na₂SO₄; 1,3 g CaCl₂·2H₂O ou CaCl₂·6H₂O; 0,7 g KCl) e completando-se para 1000 mL de água purificada.

O pH foi ajustado para 9,0 com Na₂CO₃ para evitar o risco de morte dos náuplios por diminuição do pH durante a incubação. Segundo Lewan *et al.* (1992), pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

3.7.2 Eclosão dos ovos

A estimulação da eclosão dos ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foi feita através da sua incubação em água salgada por 48 horas, sob aeração contínua e expostos à iluminação. A temperatura foi controlada entre 27 e 30°C e o pH entre 8-9. Na primeira hora do processo manteve-se a iluminação (20W) sobre o recipiente (UTYAMA, 2003).

3.7.3 Preparo das amostras

Preparou-se uma solução de concentração de 10 mg/mL para cada uma das amostras testadas (extrato alcoólico bruto e frações), solução 1. A partir desta solução, foi preparada a solução 2 pela diluição 1:10. Transferiu-se para três frascos as seguintes tomadas de amostras: frasco 1 adicionou-se 250 μ L da solução 1, frasco 2 adicionou-se 25 μ L da solução 1 e frasco 3 adicionou-se 25 μ L da solução 2. O procedimento foi realizado em triplicata.

O controle negativo foi preparado com o solvente etanol nas mesmas concentrações que a amostra (10,100 e 1000 μ g/mL). E para o controle positivo foi utilizado uma solução de sulfato de quinidina.

Os frascos foram levados para estufa por 24 horas para evaporação completa do solvente.

3.7.4 Avaliação da toxicidade

Após a eclosão dos ovos, foram transferidas 30 náuplios de *Artemia salina* com pipeta de Pasteur para cada frasco contendo as amostras e os controles (positivo e negativo) evaporados. O volume de todos os frascos foi ajustado com água do mar artificial para 2,5 mL.

Após 24 horas realizou-se a contagem dos náuplios mortos e vivos com auxílio de lupa.

Os dados foram submetidos a análise pelo método estatístico Probitos segundo Finney (1956) e determinados os valores de DL50 e 95% de intervalo de confiança. As frações são consideradas ativas ou tóxicas quando a DL50 for menor que 1000 μ g/mL. (MEYER *et al.*, 1982).

3.8 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A atividade hemolítica avalia a capacidade da substância estudada em realizar o rompimento das hemácias liberando hemoglobina.

3.8.1 Atividade hemolítica em tubos

3.8.1.1 Preparo da suspensão de hemácias

O sangue de carneiro (Marca Newprov[®]) foi lavado e centrifugado com solução de tampão fosfato pH 7,4 (PBS) gelado, até o sobrenadante ficar límpido. Em seguida, transferiu-se 1 mL desta solução para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com tampão fosfato pH 7,4 (Suspensão diluída 2%).

3.8.1.2 Avaliação da atividade hemolítica

Para este teste foram usadas as concentrações de 100, 200, 500 e 1000 µg/mL do extrato alcoólico bruto e frações das partes aéreas e raiz de *Buddleja stachyoides*. As diluições foram preparadas em solução tampão fosfato num volume final de 1 mL.

Posteriormente, estes foram misturados com 1 mL da suspensão de hemácias a 2%.

Após o preparo da solução teste os tubos de ensaio foram agitados cuidadosamente, evitando a formação de espuma. Após 30 minutos de repouso foram agitados novamente, e deixados em repouso por 150 minutos. Após o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, a 2500 rpm. Os tubos de ensaio foram observados para verificação da ocorrência ou não da formação de hemólise total (solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos).

Nos tubos onde ocorreu a formação de hemólise, foi realizado outro teste para a quantificação da menor concentração de amostra onde ocorre a atividade hemolítica, utilizando concentrações que variaram de 100 a 950 µg/mL, com variações de 50 µg entre elas. Os tubos foram observados após 24 horas, e a menor concentração com atividade hemolítica foi determinada para a menor concentração com hemólise total apresentando uma solução límpida, vermelha e sem o depósito de eritrócitos.

3.8.2 Atividade hemolítica em ágar sangue

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado segundo a metodologia de difusão das amostras em ágar sangue na concentração de 1000 µg/mL, em duplicata. Como controle positivo foi utilizado padrão de saponina na mesma concentração e para controle negativo foi utilizado o solvente de diluição das amostras.

Para o ensaio de difusão em ágar utilizou-se a técnica de antibiograma em discos. Papéis Whatmann nº1 (7 mm de diâmetro, esterilizado) foram distribuídos sobre placas de ágar sangue e em seguida foram impregnados com alíquotas de 20 µL das amostras anteriormente preparadas. Como controle negativo foi utilizado 20 µL do solvente etanol usado na diluição das amostras, aplicados aos discos. Após a aplicação, as placas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. Decorrido este período, as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de hemólise (medidos em mm). A presença de saponinas nas amostras pode gerar a formação de halos de hemólise (EFING, 2008).

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises foram tratados estatisticamente utilizando-se o programa Statistica 5.1, a avaliação da variância foi feita pelo teste ANOVA seguida da análise de diferença pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.10. FLUXOGRAMA DA PESQUISA

A figura 13 apresenta o fluxograma geral da metodologia de obtenção, atividades biológicas e identificação dos extratos e frações da espécie *Buddleja stachyoides*.

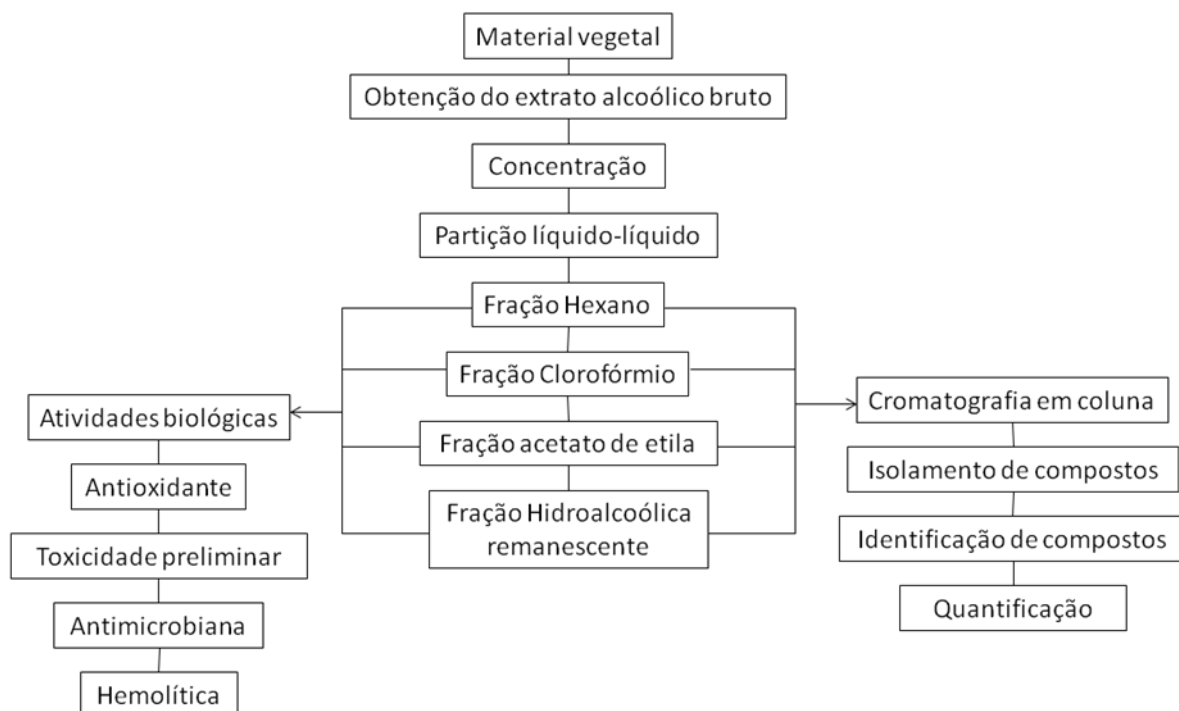


FIGURA 13 - FLUXOGRAMA ILUSTRATIVO

FONTE: O autor (2011)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS PARA *Buddleja stachyoides*

5.1.1 Análises para a matéria prima vegetal *Buddleja stachyoides*

A determinação do teor de umidade em drogas vegetais é necessária, pois a presença excessiva de água permite o desenvolvimento de microrganismos e ocasiona reações enzimáticas que levam a degradação dos constituintes químicos. A determinação do teor de cinzas totais permite avaliar a existência de impurezas inorgânicas não voláteis, ou seja, algum constituinte que não seja da própria droga vegetal (SIMÕES, 2001).

Portanto após a secagem da droga vegetal, foram realizadas as análises de determinação de umidade e cinzas totais. Os resultados destes testes estão expressos como média \pm desvio padrão de 6 determinações independentes e entre parênteses está o desvio padrão relativo obtido, podendo ser visualizados na tabela 5.

TABELA 5 - RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS PARA AS PARTES AÉREAS E RAIZ DE *Buddleja stachyoides*

Amostra	Teor de Umidade (%)	Determinação de cinzas totais (%)
Partes Aéreas	9,0228 \pm 0,3016 (3,3428)	6,1428 \pm 0,2080 (3,3867)
Raiz	8,6233 \pm 0,2423 (2,8098)	5,5963 \pm 0,2606 (4,6564)

FONTE: O autor (2011)

A média encontrada para o teor de umidade foi de 9,0228% \pm 0,3016 para as partes aéreas e 8,6233% \pm 0,2423 para a raiz de *Buddleja stachyoides*, estando dentro da especificação de 8 a 14% estabelecida em diferentes farmacopéias em diversas monografias (SIMÕES, 2001). Para o teor de cinzas obteve-se uma média

de 6,1428% \pm 0,2080 para as partes aéreas e 5,5963% \pm 0,2606 para a raiz, estes valores também são bastante aceitáveis para drogas vegetais.

5.1.2 Ensaio sistemático em fitoquímica dos extratos aquoso e hidroalcoólico de *Buddleja stachyoides*

O ensaio fitoquímico consiste em testes preliminares de identificação de grupos de metabólitos secundários, mediante ensaios químicos de coloração e precipitação. Os metabólitos secundários são produzidos pelos vegetais com a função de defesa ou atração e apresentam atividades biológicas interessantes, com grande importância nas áreas farmacêutica, alimentar, agrônômica, perfumaria, etc. (SIMÕES, 2001). Conhecendo-se as classes de compostos presentes na espécie vegetal em estudo, ajuda a direcionar a pesquisa em relação ao isolamento e identificação dos compostos. Os resultados do ensaio fitoquímico realizado para os extratos aquoso e hidroalcoólico da espécie vegetal estão demonstrados na tabela 6.

TABELA 6 - RESULTADOS DO ENSAIO FITOQUÍMICO PARA *Buddleja stachyoides*

Análises	Extrato Aquoso		Extrato Hidroalcoólico	
	Partes aéreas	Raiz	Partes aéreas	Raiz
Alcaloides			-	-
Ácidos orgânicos			+	+
Fenóis			+	+
Flavonoides			+	+
Cumarinas			+	+
Antraquinonas			-	-
Triterpenos			+	+
Antocianos			+: básico	+: ácido
Iridoides	+	+		
Saponinas	+	+		
Mucilagem	+	+		
Taninos	-	-		
Aminogrupos	+	+		
Ácidos voláteis	-	-		
Ácidos Fixos	+	+		
Heterosídeos cianogênicos	-	-		
Valepotriatos	-	-		

FONTE: O autor (2011)

NOTA: (+) positivo; (-) negativo

Nos resultados do ensaio fitoquímico apresentados na tabela 5, pode-se notar que estão presentes os principais compostos (iridoides, triterpenos, saponinas, flavonoides, cumarinas e fenóis) mencionados na literatura para as diversas espécies do gênero *Buddleja*. No teste de identificação de iridoides, as partes aéreas tiveram reação positiva no primeiro teste com a formação de coloração verde escura e no terceiro teste em que houve a formação de coloração rosa cereja. Para a raiz apenas no terceiro teste houve a formação de coloração rosa cereja, significando que provavelmente existe uma diferença estrutural entre os iridoides presentes nas partes aéreas e na raiz. Para triterpenos ocorreu a formação de coloração verde tanto para as partes aéreas quanto para a raiz. As partes aéreas apresentaram uma espuma bastante persistente no teste para saponinas, já na raiz a quantidade de espuma formada foi menor e menos persistente. No teste de flavonoides ocorreu o desenvolvimento de coloração rósea e para os fenóis houve uma mudança de coloração nos extratos.

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor, odor e coloração em diversos vegetais, sendo economicamente interessantes como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. Alguns ácidos fenólicos (ácido clorogênico, caféico e ferúlico) e seus ésteres com esteróis e triterpenos apresentam estudos relatando a atividade antioxidante, importante atividade na indústria de alimentos. Do ponto de vista farmacológico existe o interesse nas atividades antibacteriana e antiviral de ésteres do ácido caféico.

As cumarinas possuem um odor característico e eram utilizadas como aromatizantes em alimentos industrializados, porém foi considerada tóxica pela agência americana (FDA – Food and Drug Administration), mas devido as vantagens do odor, estabilidade e baixo custo ainda é utilizada em indústrias de produtos de limpeza e cosméticos.

Os flavonoides são encontrados em grande abundância nos vegetais e estão presentes em medicamentos indicados para o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e agindo como co-fator da vitamina C. Outras pesquisas sugerem que alguns flavonoides possuem ação anticancerosa, antiviral e anti-hemorrágico. Porém, é difícil atribuir exclusivamente aos flavonoides alguma atividade farmacológica específica.

As saponinas são glicosídeos de esteróis ou de terpenos policíclicos e possuem uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra

parte hidrofílica (açúcares). Entre as atividades biológicas pode-se destacar a atividade hemolítica, ictiotóxica e molusquicida e anti-helmíntica. Possui também ação hipocolesterolemiantes, mecanismo explicado pelo aumento da excreção do colesterol, por formação de complexo com as saponinas administradas por via oral ou por aumentar a eliminação de ácidos biliares nas fezes. O uso de drogas vegetais contendo saponinas como antiinflamatória (castanha da Índia), expectorante (polígala, primula, hera) e diurética (salsaparrilha e cavalinha) é bastante tradicional. Outros empregos farmacêuticos são adjuvantes para aumentar a absorção de outros medicamentos ou como adjuvante para aumentar a resposta imunológica (SIMÕES *et al.*, 2001).

5.2 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

O extrato bruto das partes aéreas foi obtido através da extração por Soxhlet, onde foram utilizadas 5970 g de droga vegetal, obtendo-se após à extração e concentração, em rotaevaporador, 1200 mL de extrato bruto líquido. Foi determinado o resíduo seco (0,6647g/mL) deste extrato líquido e posteriormente foi concentrado até a secura, em banho-maria à 60°C, obtendo-se 797,64 g de extrato alcoólico bruto, fornecendo um rendimento de 13,36 % \pm 2,34.

Para obtenção do extrato bruto da raiz, foram utilizados 2385 g de droga vegetal para a extração, obtendo-se após a concentração, em rotaevaporador, 240,1 mL de extrato bruto líquido. O resíduo seco deste extrato líquido foi de 0,2602 g/mL e obteve-se, após concentração até a secura em banho-maria à 60°C, 62,48 g de extrato alcoólico bruto, fornecendo um rendimento de 2,62 % \pm 0,056.

Destes extratos, foram retirados 40,57g do extrato alcoólico bruto das partes aéreas e 3,68 g do extrato alcoólico bruto da raiz para realizar as atividades biológicas, o restante foi utilizado no fracionamento. A tabela 7 demonstra o rendimento das frações em relação à quantidade de extrato alcoólico bruto utilizado.

TABELA 7 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS EM RELAÇÃO AO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO

Amostra	Rendimento			
	Partes aéreas		Raiz	
	Massa (g)	Porcentagem	Massa (g)	Porcentagem
Extrato Alcoólico Bruto	757,07 g	—	58,80 g	—
Fração Hexano	102,20 g	13,50 %	10,52 g	17,89 %
Fração Clorofórmio	54,77 g	7,63 %	11,97 g	20,35 %
Fração Acetato de Etila	82,05 g	10,84 %	2,05 g	3,49 %
Fração Hidroalcoólica Remanescente	516,32 g	68,20 %	42,66 g	77,55 %

FONTE: O autor (2012)

5.3 SELEÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MARCADOR FITOQUÍMICO

As injeções realizadas com as amostras extrato bruto e frações das partes aéreas no primeiro método desenvolvido em HPLC forneceram os cromatogramas que estão apresentados na figura 14. Podemos notar que em todas as amostras, o pico predominante apresentou tempo de retenção similar ao padrão de verbascosídeo. O método, apesar de ter separado o pico majoritário, não apresentou boa resolução.

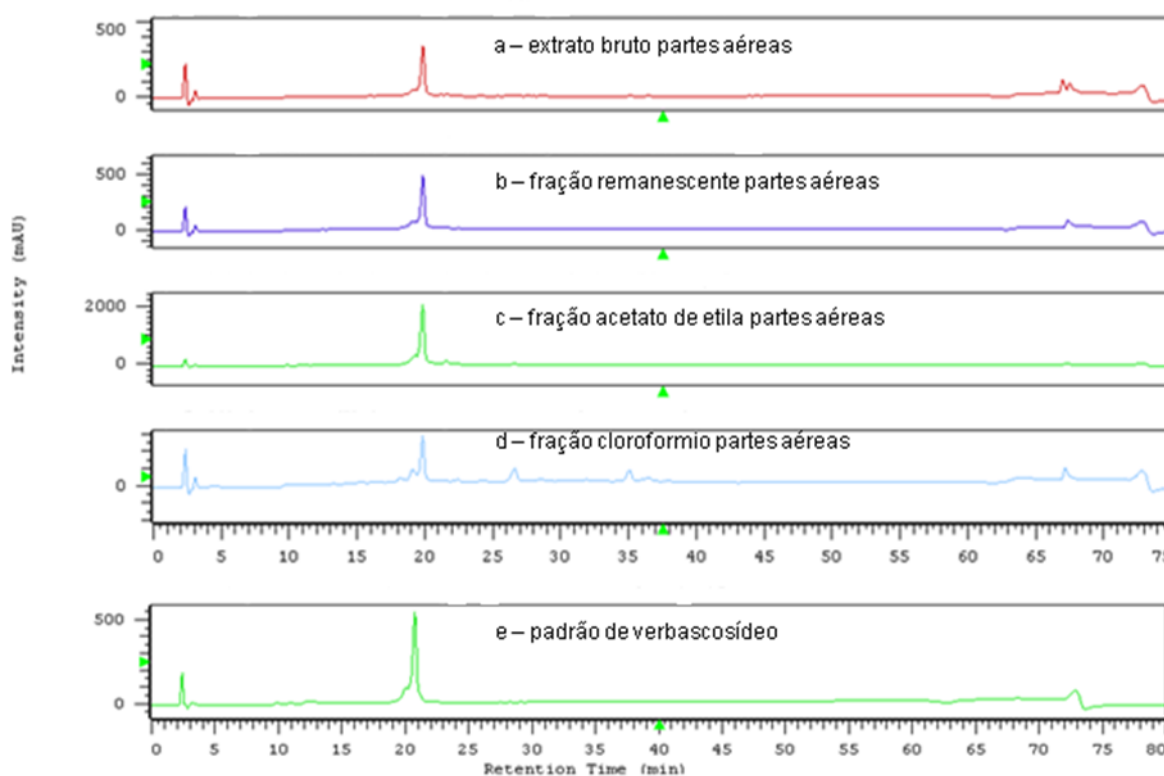


FIGURA 14 - MULTICROMATOGRAMAS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *Buddleja stachyoides*

FONTE: O autor (2012)

Legenda: a - Extrato bruto das partes aéreas; b - Fração remanescente das partes aéreas; c - fração acetato de etila das partes aéreas; d - fração cloroformio das partes aéreas; e - padrão verbascosídeo

Após desenvolver o segundo método em HPLC, foram injetadas as amostras extrato alcoólico bruto das partes aéreas, o extrato alcoolico bruto das partes aéreas co-injetado com o padrão de verbascosídeo e o padrão de verbascosídeo. Os cromatogramas estão apresentados na figura 15.

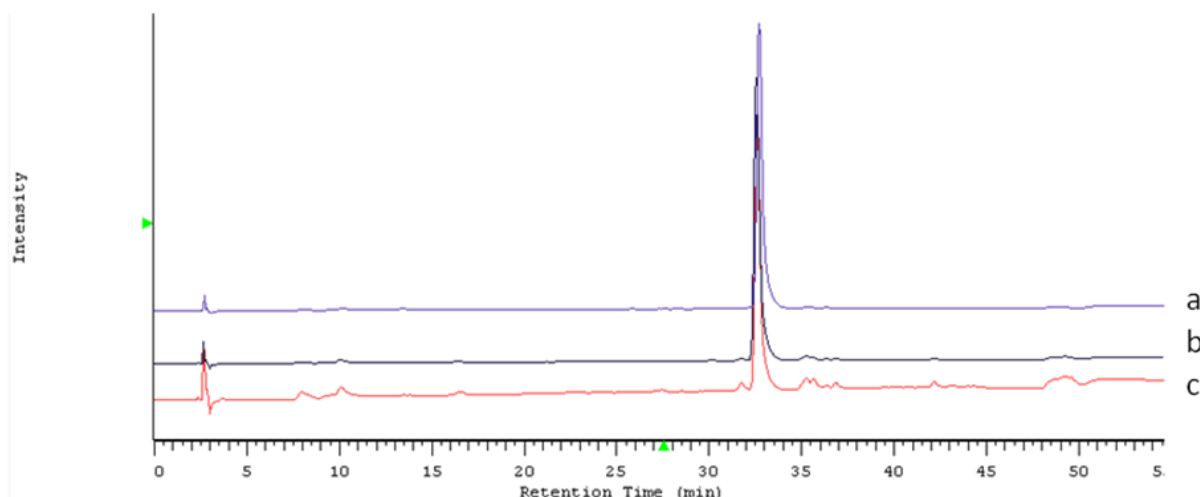


FIGURA 15 - CROMATOGRAMAS DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS E PADRÃO DE VERBASCOSÍDEO

FONTE: O autor (2012)

Legenda: a – cromatograma do extrato bruto das partes aéreas; b - cromatograma do extrato bruto das partes aéreas co-injetado com padrão de verbascosídeo; c - cromatograma do padrão de verbascosídeo

O cromatograma obtido do extrato alcoólico bruto das partes aéreas apresentou um pico majoritário com intensidade de aproximadamente 450 mAU, no tempo de retenção de 32,61 minutos. O cromatograma do extrato alcoólico bruto das partes aéreas co-injetado com o padrão de verbascosídeo apresentou o pico majoritário no tempo de retenção de 32,53 minutos com intensidade de aproximadamente 1650 mAU e o cromatograma do padrão de verbascosídeo apresentou o pico no tempo de retenção de 32,69 minutos com intensidade de aproximadamente 1400 mAU. Os tempos de retenção do pico majoritário foram praticamente os mesmos nas três amostras, demonstrando que existe uma similaridade entre o pico presente no extrato alcoólico bruto e o pico de verbascosídeo.

Os espectros de UV e a pureza dos picos obtidos para as amostras extrato alcoólico bruto das partes aéreas, extrato alcoólico bruto das partes aéreas adicionado de padrão verbascosídeo e o padrão de verbascosídeo podem ser visualizados na figura 16. Os espectros de UV das três amostras são bastante similares, apresentando absorção em 329,1 nm e as purezas dos picos foram maiores que 99%. Para o pico do extrato bruto das partes aéreas a pureza obtida foi 99,95%, para o pico do extrato bruto das partes aéreas adicionado de padrão

verbascosídeo a pureza obtida foi 99,93% e o para o pico do padrão de verbascosídeo a pureza foi de 99,89%.

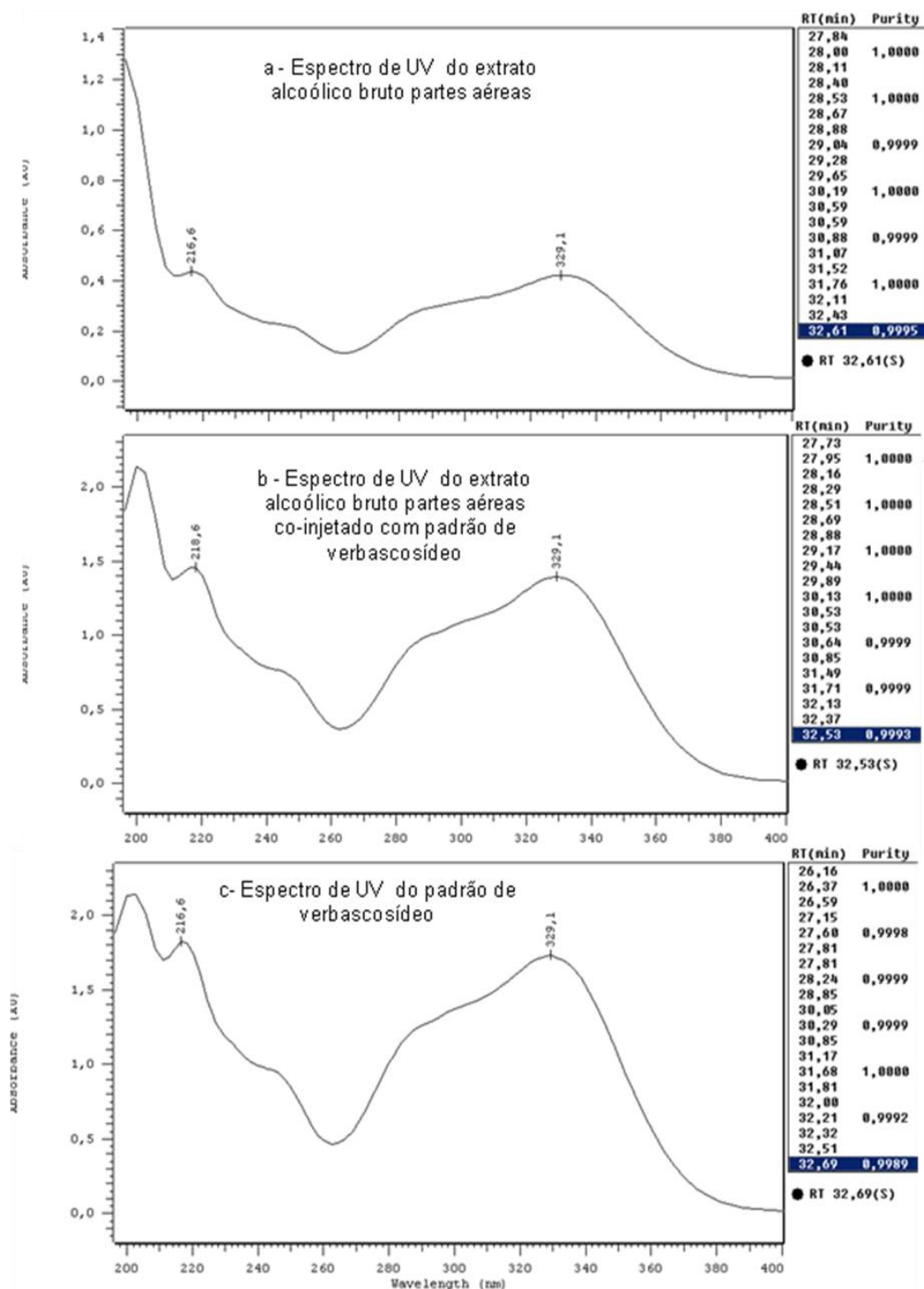


FIGURA 16 - ESPECTROS DE UV E PUREZA OBTIDOS DOS PICOS DO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS E PADRÃO DE VERBASCOSÍDEO

FONTE: O autor (2012)

Legenda: a – espectro de UV e pureza do pico do extrato bruto das partes aéreas; b - espectro de UV e pureza do pico do extrato bruto das partes aéreas contaminado com padrão de verbascosídeo; c - espectro de UV e pureza do pico do padrão de verbascosídeo

As correlações espectrais dos picos apresentadas na figura 17 para as amostras extrato bruto das partes aéreas e extrato bruto das partes aéreas adicionado de padrão de verbascosídeo foram verificadas através da comparação com o padrão de verbascosídeo presente na biblioteca do HPLC. Todas as correlações foram superiores a 95%, demonstrando a existência de similaridade entre os espectros de UV. Para a amostra extrato alcoólico bruto das partes aéreas adicionado de padrão de verbascosídeo a correlação espectral foi de 99,73%, apresentando-se superior à correlação espectral encontrada (95,05%) para a amostra extrato bruto das partes aéreas.

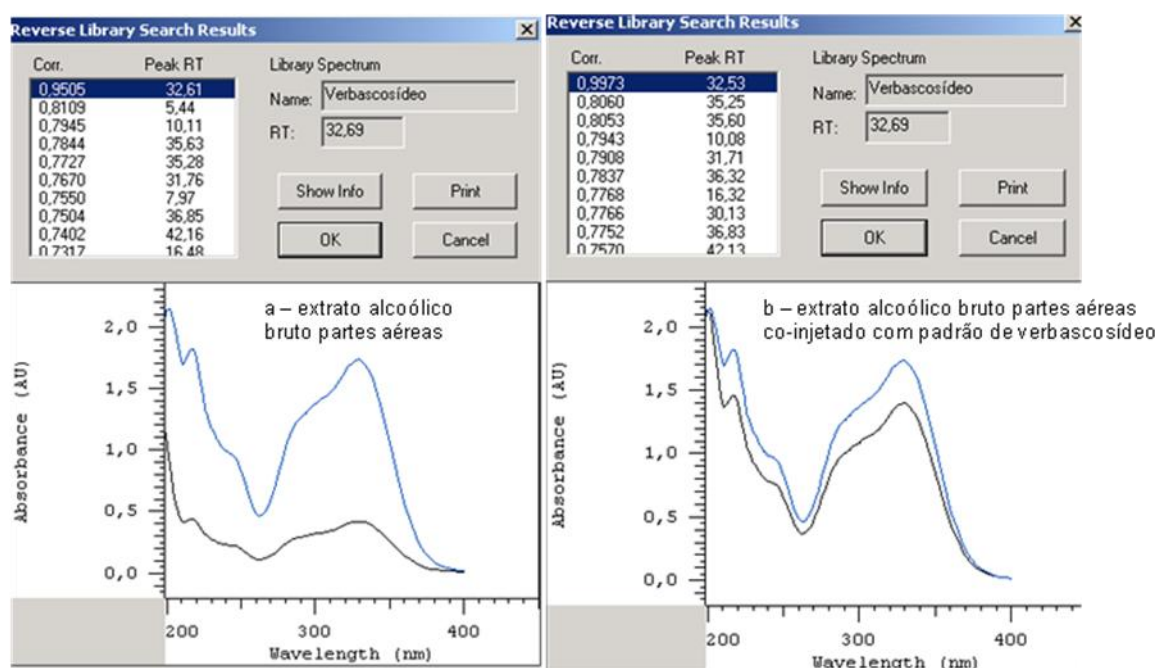


FIGURA 17 - CORRELAÇÃO ESPECTRAL DAS AMOSTRAS COM O PADRÃO DE VERBASCOSÍDEO

FONTE: O autor (2012)

Legenda: a- correlação espectral da amostra extrato alcoólico bruto das partes aéreas; b - correlação espectral da amostra extrato alcoólico bruto das partes co-injetado com padrão de verbascosídeo

A curva de calibração do padrão de verbascosídeo (figura 18) com concentrações de 0,044; 0,066; 0,088; 0,132 e 0,154 mg/ml apresentou um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9873, sendo maior que a especificação para fitoterápicos que é de 0,98.

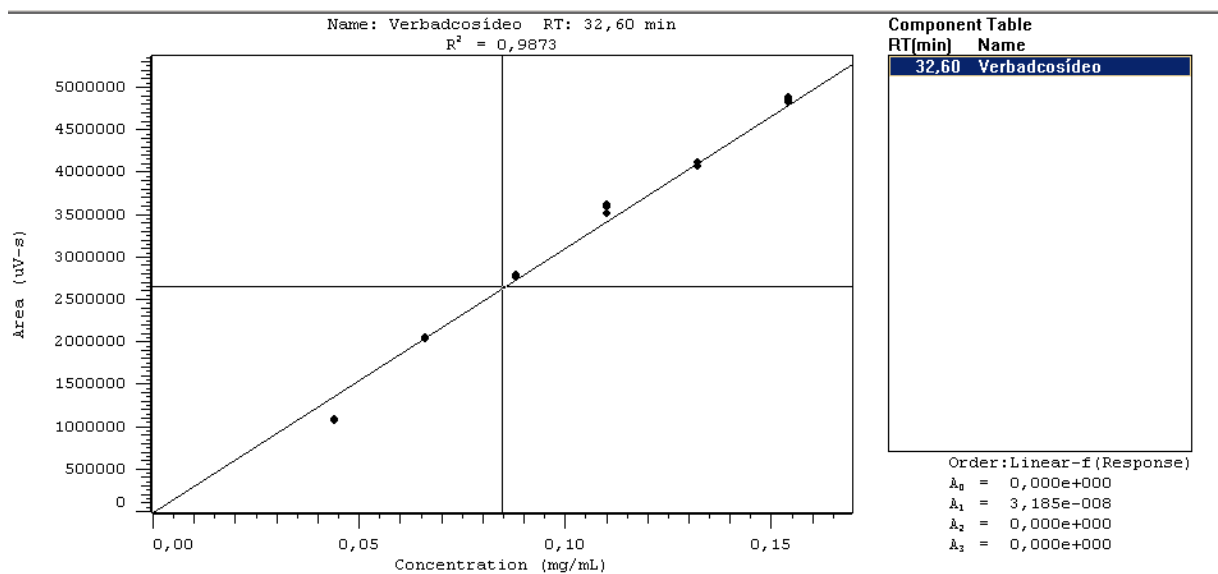


FIGURA 18 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE VERBASCOSÍDEO
 FONTE: O autor (2012)

Após obtenção da curva de calibração foi possível calcular a concentração de verbascosídeo presente na amostra de extrato alcoólico bruto das partes aéreas. Foram pesadas 134 mg da amostra extrato alcoólico bruto (equivalente a 1 g de droga vegetal) e diluídas para balão volumétrico de 50 mL com metanol, depois foi diluída 1:5 em fase ácida fosfórica 2%, obtendo-se uma diluição final de 1:250. A concentração encontrada foi de 17,62 mg/g de verbascosídeo, conforme figura 19. A quantidade de verbascosídeo nas partes aéreas de *Buddleja stachyoides* em porcentagem é de 1,762 %.

Devido ao teor bastante elevado e a facilidade de separar e quantificar o verbascosídeo presente nas partes aéreas da espécie, este seria o marcador escolhido para realização de uma validação analítica e utilizado para padronização no controle de qualidade em um possível medicamento fitoterápico desenvolvido com o extrato alcoólico bruto das partes aéreas de *Buddleja stachyoides*.

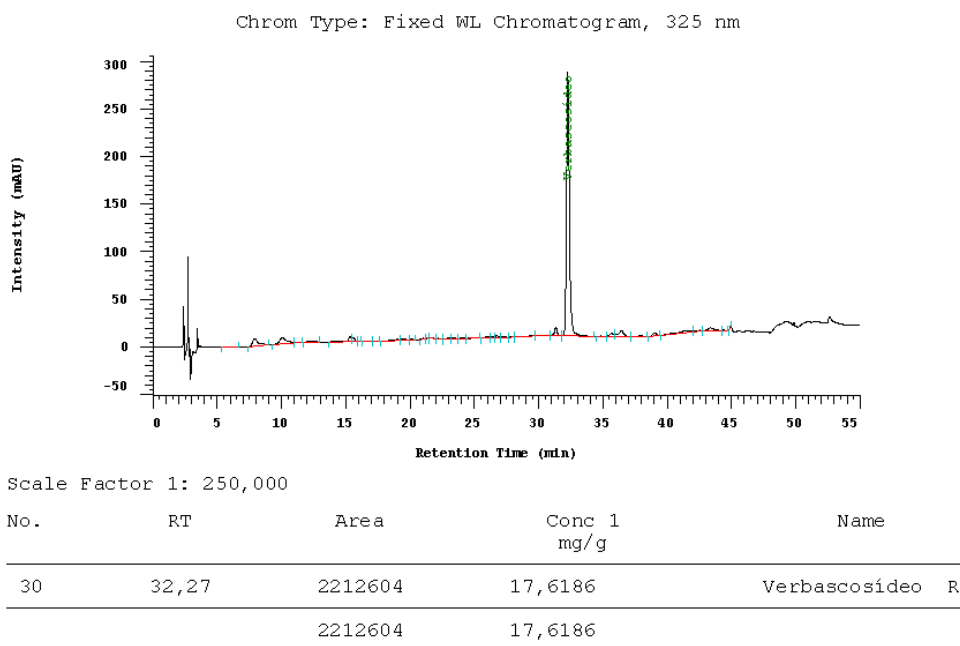


FIGURA 19 - CONCENTRAÇÃO DE VERBASCOSÍDEO PRESENTE NO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS
 FONTE: O autor (2012)

5.4 PURIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS

Depois da primeira purificação em cromatoplaça o composto 1 foi injetado em HPLC e o pico majoritário saiu em 9,5 minutos (figura 20), em seguida foi coletado, cortando-o em quatro partes, conforme figura 21. Realizou-se RMN de próton dos 4 tubos para poder misturar as frações puras que correspondessem ao mesmo composto. Os tubos misturados foram 7, 8, 9, obtendo-se 1,2 mg, porém no final o composto ainda não estava completamente puro.

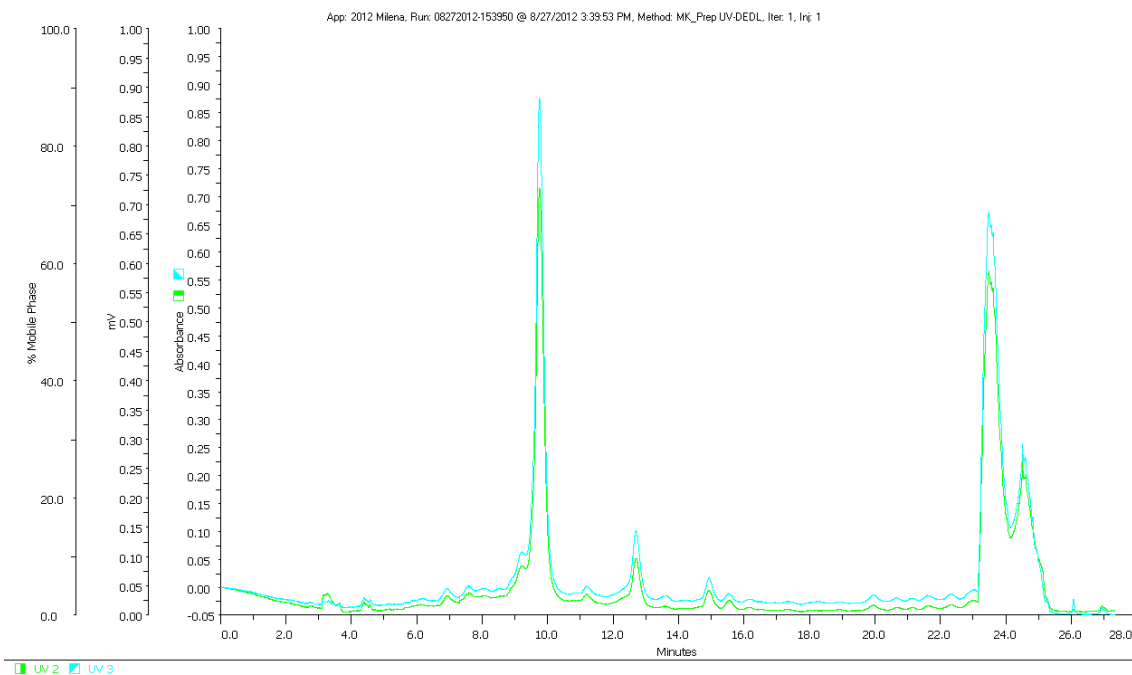


FIGURA 20 - CROMATOGRAMA DO COMPOSTO 1 OBTIDO NA SEGUNDA PURIFICAÇÃO
 FONTE: O autor (2012)

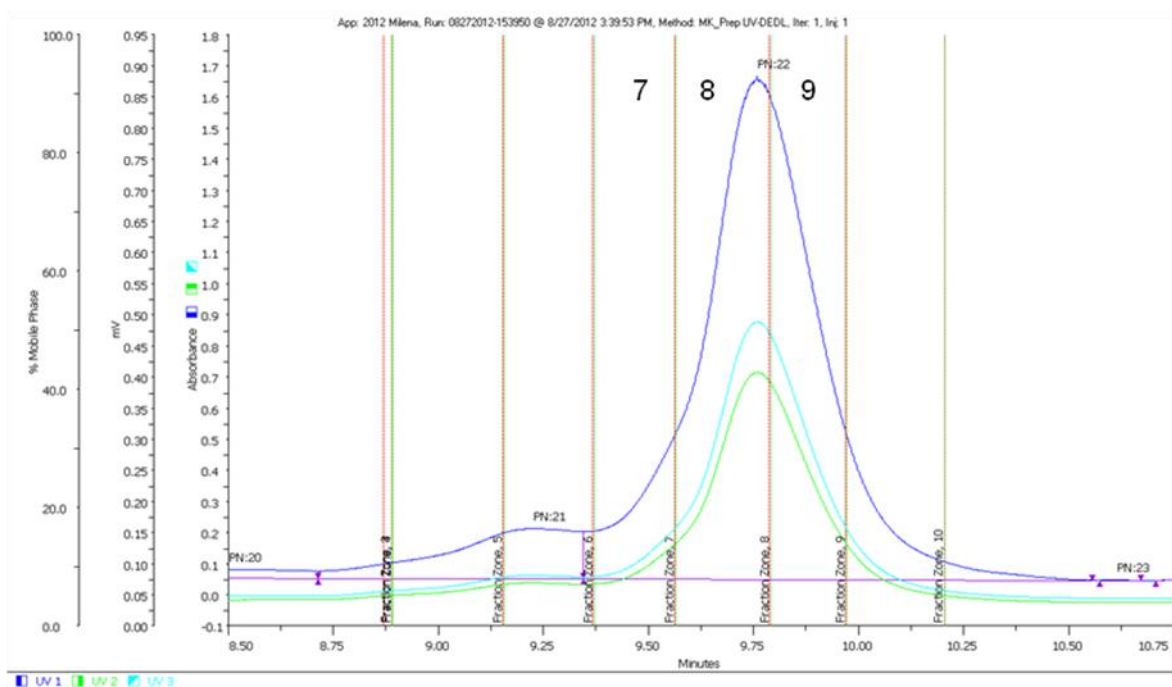


FIGURA 21 - PICO DO COMPOSTO 1 CORTADO E COLETADO EM QUATRO PARTES
 FONTE: O autor (2012)

Para dar continuidade à purificação do composto 1 foi realizada uma terceira purificação, em HPLC com coluna analítica. Os cromatogramas obtidos e o espectro UV estão apresentados na figura 22. O primeiro cromatograma (a) representa o detector por presença ELSD, e o segundo (b) refere-se ao detector UV. Após a segunda purificação, foi recuperado 0,4 mg do composto 1, aparentemente puro.

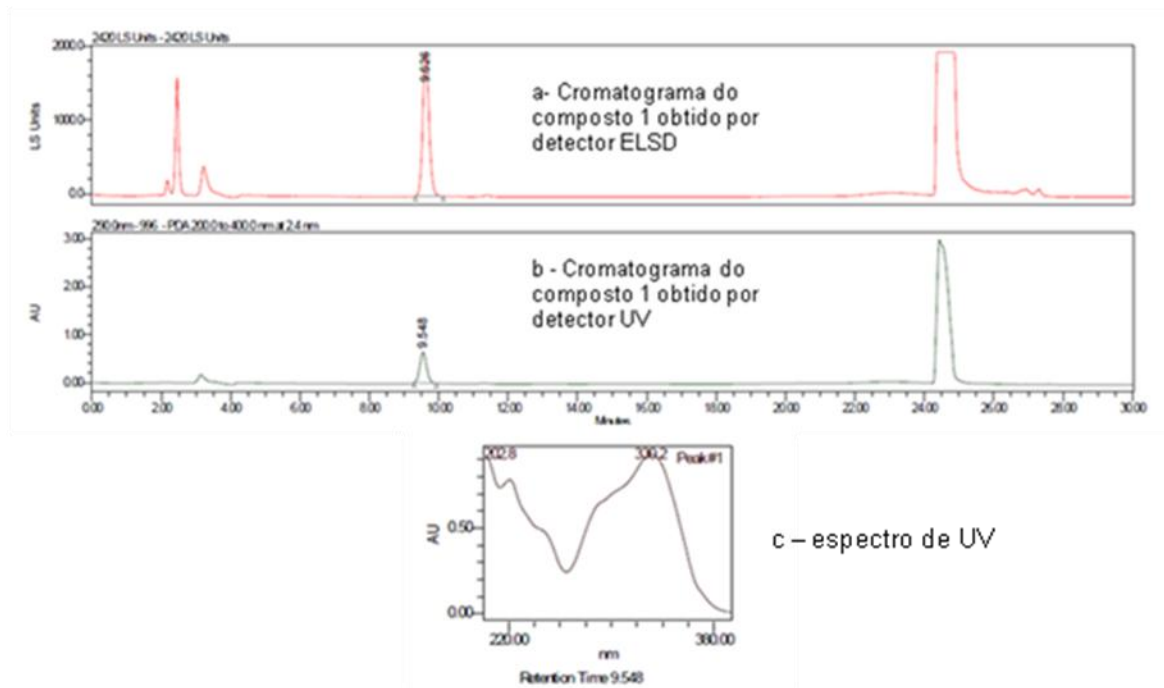


FIGURA 22 - CROMATOGRAMAS E ESPECTRO DE UV DO COMPOSTO 1 OBTIDOS NA TERCEIRA PURIFICAÇÃO

FONTE: O autor (2012)

Legenda: a – cromatograma do composto 1 obtido por detector ELSD; b - cromatograma do composto 1 obtido por detector UV; c – espectro de UV

5.5 IDENTIFICAÇÃO DO COMPOSTO

O espectro de próton obtido por RMN para o composto 1 está apresentado na figura 23.

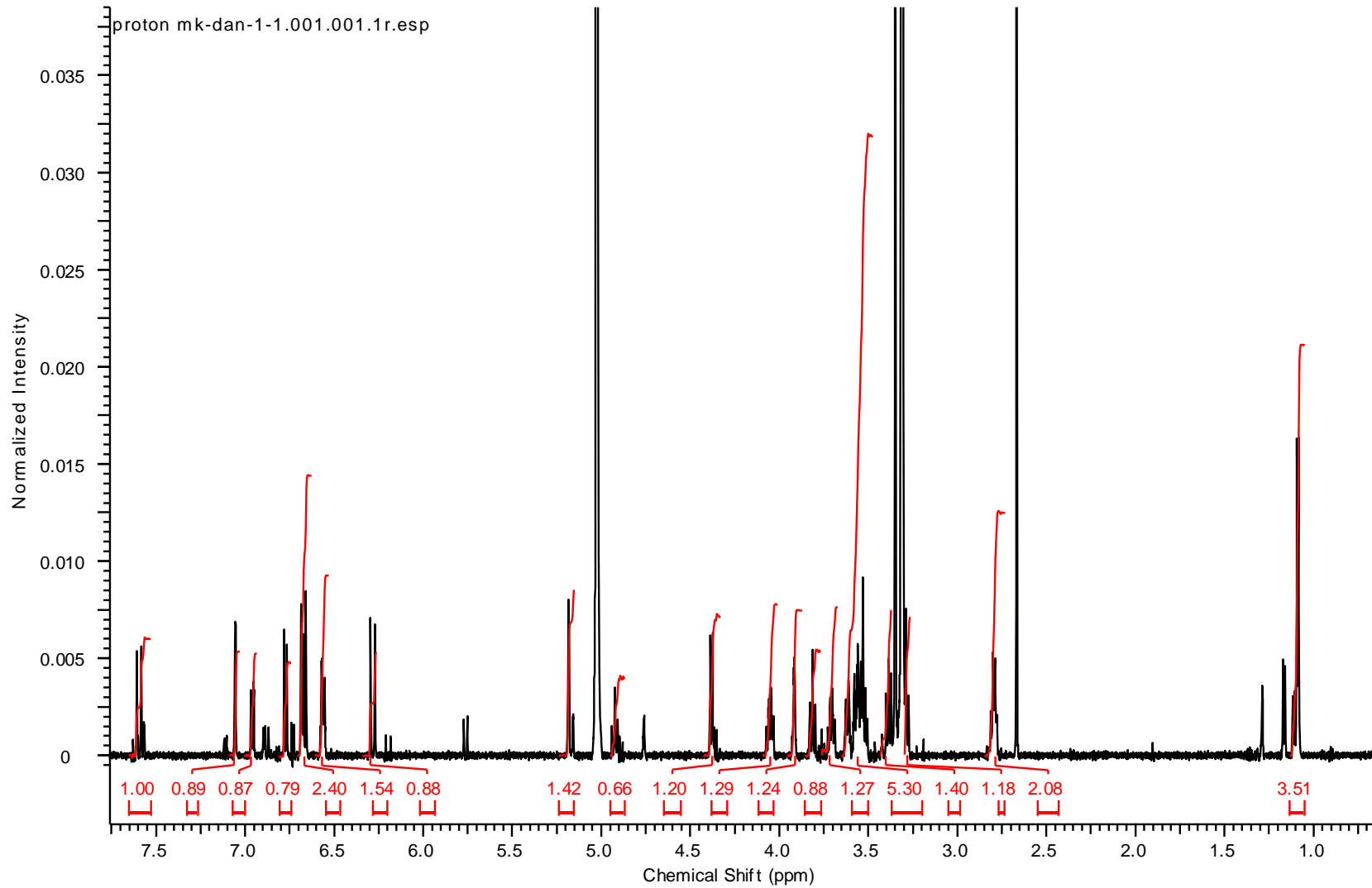


FIGURA 23 - ESPECTRO DE PRÓTON PARA A SUBSTÂNCIA ISOLADA VERBASCOSÍDEO
FONTE: O autor (2012)

A comparação dos sinais, os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento (J) obtidos da projeção do RMN ^{-13}C e do espectro de RMN ^{-1}H do composto 1 com os valores obtidos na literatura para o verbascosídeo está apresentada na tabela 13.

Podemos destacar no espectro RMN ^{-1}H do composto 1 a presença de um conjunto de sinais a δ 6.66 (1H, d, $J = 7,89$ Hz, H-5), δ 6,69 (1H, d, $J = 2,02$ Hz, H-2) e δ 6,56 (1H, dd, $J = 7,89$ Hz, $J = 2,02$ Hz, H-6), e outro conjunto em δ 6,77 (1H, d, $J = 8,07$ Hz, H-5'''), 6,96 ppm (1H, dd, $J = 8,25$ Hz, $J = 2,2$ Hz, H-6''') e 7,06 ppm (1H, d, $J = 2,02$ Hz, H-2'''). Estas ressonâncias são características da presença de dois sistemas 1,3,4-trissubstituídas aromáticos. Um destes sistemas aromáticos é parte de uma porção-cafeoil devido aos sinais de dois prótons olefinicos em δ 6,28 (1H, d, $J = 15,77$ Hz, H-8''') e δ 7,60 (1H, d, $J = 15,77$ Hz, H-7'''), o que indica uma geometria trans. Sinais de prótons a δ 2,80 (2H, m, H-7), 3,71 ppm (1H, m, H-8a) e δ 4,05 (1H, m, H-8b), revelaram que o segundo sistema aromático faz parte da porção feniletanoide. O espectro de RMN ^{-1}H também apresentou um número de sinais entre 3,00 e 4,00 ppm, o que sugere a existência de açúcar na molécula. Um sinal em δ 1,08 (3H, d, $J = 6,24$ Hz, H-6''') é observado para os 3H do grupo CH_3 correspondente a ramnose e, além disso, um sinal a δ 5,18 (1H, d, $J = 1,47$ Hz, H-1'') com uma pequena constante de acoplamento pode ser designado para o próton anomérico de um α -L-ramnose. O sinal do próton anomérico aparece para a glucose (β -hexopiranoose) em δ 4,38 (1H, d, $J = 7,89$ Hz, H-1'). Comparando-se os dados de RMN ^{-1}H com os dados anteriormente publicados (GITZEL FILHO *et al.*, 2012; ESCALONA, 2006), levou-se à prosposta de ser a substância verbascosídeo.

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DOS VALORES DE RMN - ¹H E PROJEÇÃO DO RMN - ¹³C OBTIDOS PARA O COMPOSTO 1 E OS VALORES ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA O VERBASCOSÍDEO

Posição	(GITZEL FILHO <i>et al.</i> , 2012)				Composto 1			(ESCALONA, 2006)		
	RMN ¹ H - Verbascosídeo			RMN ¹³ C	RMN ¹ H		RMN ¹³ C	RMN 1H - Verbascosídeo		RMN ¹³ C
	Tipo de C	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)	δ (ppm)	J (Hz)	δ (ppm)
cafeico										
1'''	C	-	-	127,7	-	-	125,8			125,5
2'''	CH	7,07	d (2,0)	115,3	7,06	d (2,02)	114,8	7,06	d (1,9)	114,7
3'''	C			146,87			145,5			145,5
4'''	C			149,82			148,4			148,5
5'''	CH	6,79	d (8,2)	116,56	6,77	d (8,07)	116,2	6,78	d (8,2)	113,3
6'''	CH	6,97	dd (8,2; 2,0)	123,26	6,96	dd (8,25; 2,2)	123	7	dd (8,2; 1,9)	121,4
7'''	CH	7,6	d (15,9)	148,06	7,6	d (15,77)	148,1	6,2	d (15,9)	145,7
8'''	CH	6,28	d (15,9)	114,74	6,28	d (15,77)	114,2	7,6	d (15,9)	115,4
9'''	C=O			168,35			166,5			166
feniletanoide										
1	C			131,52			129,7			131,5
2	CH	6,71	d (2,0)	117,16	6,69	d (2,02)	117,2	6,72	-	117,1
3	C			146,16			144,7			146
4	C			144,71			143,1			144,8
5	CH	6,69	d (8,1)	116,36	6,66	d (7,89)	116,2	6,68	d (8,0)	116,3
6	CH	6,58	d (8,1)	121,3	6,56	dd (7,89;2,2)	120,9	6,57	dd (8;2)	121,2
7	CH ₂	2,8	m	36,6	2,8	m	36,4	2,79	t	36,5
8	CH ₂	4,05 - 3,75	m	72,3	4,05 - 3,71	m	72,1	3,79 - 3,70	m	72,1
Glucose										
1'	CH	4,39	d (7,90)	104,23	4,38	d (7,89)	103,9	4,38	d (7,9)	104,1
2'	CH	3,4	d (9,2; 7,9)	76,24	3,39	t (8,4)	76	3,39	dd (9; 7,9)	77,7
3'	CH	3,81	t (9,2)	81,7	3,81	t (9,17)	81,4	3,81	t (9,0)	84,5
4'	CH	4,93	m	70,46	4,92	m	70,2	4,98	t (9,5)	70
5'	CH	3,56	m	76,07	3,56	m	71,3	3,79	-	75,5
6'	CH ₂	3,71 - 3,56	m	62,41	3,61 - 3,52	m	62,1	3,6	dd (11,5; 1,4)	62,6
Ramnose										
1''	CH	5,2	d (2,0)	103,07	5,18	d (1,47)	102,7	5,18	d (1,3)	102,7
2''	CH	3,93	m	72,39	3,92	dd (3,3; 1,83)	72	3,92	dd (3,0;1,7)	72,2
3''	CH	3,59	m	72,09	3,56	m	71,3	3,6	-	72,2
4''	CH	3,32	m	73,83	3,29	t (9,5)	73,7	3,29	t (9,5)	73,9
5''	CH	3,59	m	70,64	3,56	m	71,3	3,6	-	70
6''	CH ₃	1,1	d (6,2)	18,49	1,08	d (6,24)	18,5	1,09	d (6,2)	17,9

FONTE: O autor (2012)

Para obter a projeção dos carbonos da molécula correspondentes a cada próton, foi utilizada a técnica de Correlação Heteronuclear de Quantum-simples (HSQC) que faz a correlação de acoplamento heteronuclear (próton-carbono)

espaçado por ligação (1J) a curta distância (figura 29). Os carbonos quartenários e a carbonila foram determinados através da técnica de Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações (HMBC) que faz a correlação de acoplamento heteronuclear espaçado por várias ligações (2J ou 3J), importante para estabelecer correlações ^1H - ^{13}C através de duas e três ligações (figura 30). A presença da carbonila pelo HMBC foi detectada pela correlação do próton 7,60 com um carbono 166,5 ppm.

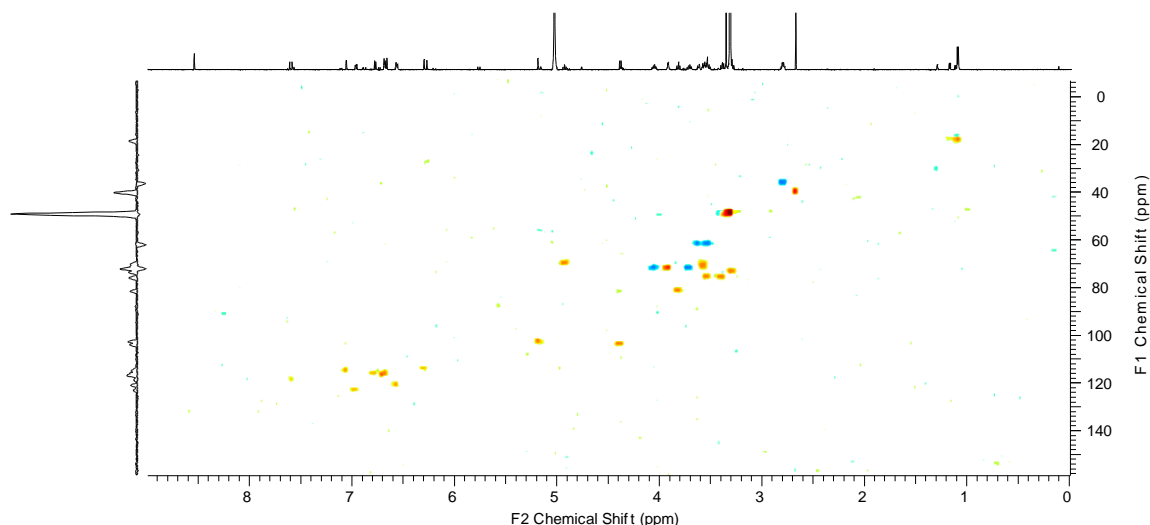


FIGURA 24 - TÉCNICA CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR DE QUANTUM-SIMPLES (HSQC) UTILIZADA PARA O COMPOSTO 1
FONTE: O autor (2012)

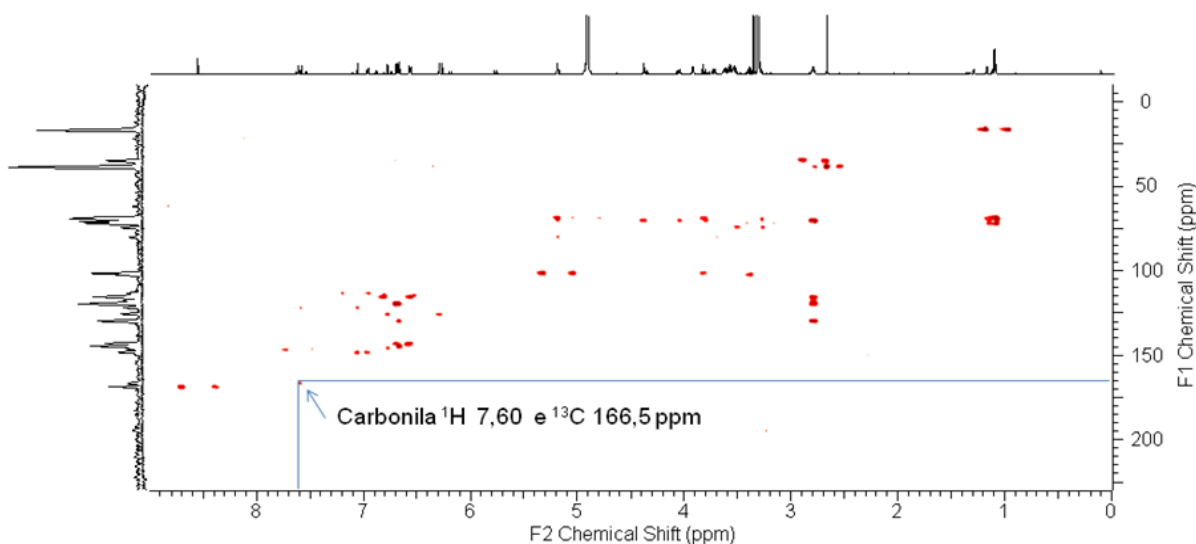


FIGURA 25 - TECNICA CORRELAÇÃO HETERONUCLEAR DE MÚLTIPLAS LIGAÇÕES (HMBC) UTILIZADA PARA O COMPOSTO 1
FONTE: O autor (2012)

Estes ensaios, juntamente com a atribuição HSQC e HMBC permitiram encontrar o anel caféico, os açúcares (glicose e ramnose) e o anel do feniletanoide.

A provável estrutura do composto 1 está apresentada na figura 26.

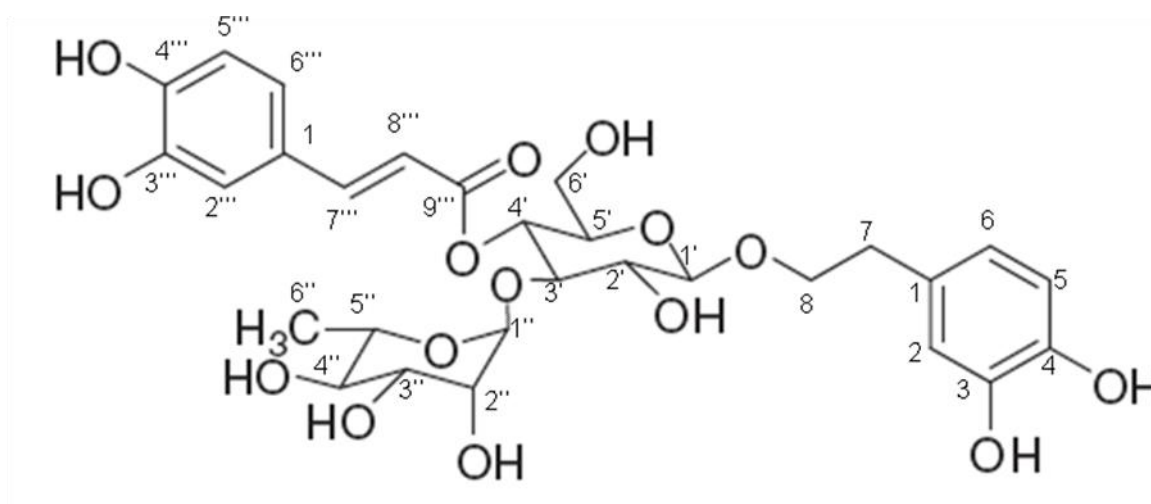


FIGURA 26 – PROVÁVEL ESTRUTURA DO COMPOSTO 1
 FONTE: O autor (2012)

5.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbia e do metabolismo animal, e assim, as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidos em situações fisiológicas ou patológicas por mecanismos diferentes como na respiração celular e reações de oxidação, porém, suas concentrações são mantidas sob um equilíbrio através da ação de agentes antioxidantes naturais. O termo radical livre (RL) é freqüentemente definido para designar qualquer átomo ou molécula, com existência independente, apresentando em sua estrutura atômica, um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, conferindo maior reatividade em relação às espécies não radicalares (GUTIERREZ, 2002). Fisiologicamente essas espécies ativas apresentam diversas funções, como por exemplo, em situações onde há necessidade de ativação do sistema imunológico, na qual os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio e o superóxido para destruir bactérias e outros elementos estranhos, e ainda, participam de processos de sinalização celular e estão também envolvidas na síntese e regulação de algumas proteínas (WARD;

PETERS, 1995). Entretanto, seu excesso causa efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares (mitocôndrias e membranas), provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma podem provocar diversas patologias como câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, entre outras (ALVES *et al.*, 2010).

Os organismos vivos produzem substâncias que são capazes de combater os radicais livres, regenerando ou prevenindo os danos oxidativos provocados por eles, exercendo o papel de antioxidante. Em condições normais, a concentração de ERO e ERN dentro das células é extremamente baixa. Essa forma, as defesas antioxidantes do organismo podem ser de origem endógena (enzimáticas e não enzimáticas) ou exógena. As enzimáticas são constituídas principalmente por superóxido dismutase; catalase; glutathione peroxidase; glutathione reductase; peroxirredoxina; tioredoxina e enzimas de reparo, que sintetizam glutathione e que repõe NADPH; enquanto as não-enzimáticas são, por exemplo, ácido úrico e albumina. Dentre aquelas provenientes da dieta são encontrados: ácido ascórbico, α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, polifenóis, flavonoides, etc (FARIA, 2009).

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais. (ALVES *et al.*, 2010).

O perfil da atividade antioxidante dos extratos e frações utilizados neste estudo foi determinado através das metodologias de formação do complexo fosfomolibdênio, da redução do radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazila), e da determinação da taxa de peroxidação lipídica através da reação com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

5.6.1 Formação do complexo Fosfomolibdênio

Este ensaio fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, formando um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V) em pH ácido. Sua absorvância é

medida por espectrofotômetro a 695nm. A atividade antioxidante relativa (AAR%) foi calculada em relação aos padrões rutina e vitamina C (valores considerados como 100% de formação do complexo). Para a realização deste teste a concentração das amostras e dos padrões foi de 200 µg/mL. O método de complexação pelo fosfomolibdênio, descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), é uma maneira simples e barata de se avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de extratos obtidos de plantas, bem como suas frações. Possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos. Os resultados obtidos das AAR em relação à Vitamina C e Rutina podem ser visualizados no gráfico 1.

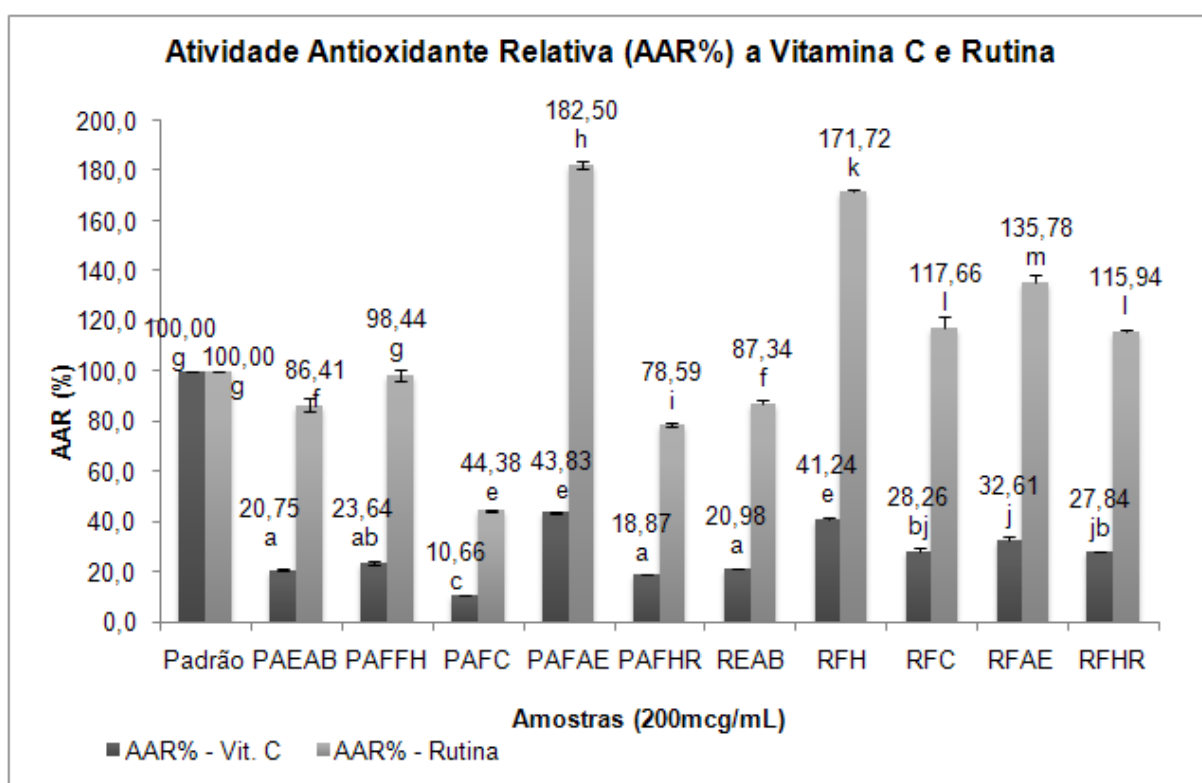


GRÁFICO 1 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA (ARR%) EM RELAÇÃO AOS PADRÕES RUTINA E VITAMINA C ATRAVÉS DO TESTE DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO

FONTE: O autor (2012)

Legenda: PAEAB - extrato alcoólico bruto das partes aéreas; PAFH - fração hexano das partes aéreas; PAFC - fração clorofórmio das partes aéreas; PAFAE - fração acetato de etila das partes aéreas; PAFHR - fração hidroalcoólica remanescente das partes aéreas; REAB - extrato alcoólico bruto da raiz; RFH - fração hexano da raiz; RFC - fração clorofórmio da raiz; RFAE - fração acetato de etila da raiz; RFHR - fração hidroalcoólica remanescente da raiz

Nota: As letras foram utilizadas para classificação estatística e o uso de letras iguais significa que as amostras são estatisticamente iguais

Pode-se verificar neste ensaio que as amostras apresentam atividade antioxidante por redução do complexo do fosfomolibdênio, tendo como referência os padrões de vitamina C e rutina. Pode-se notar que a fração acetato de etila das partes aéreas e a fração hexano da raiz apresentaram maior atividade antioxidante, sendo cerca de 40% em relação à vitamina C, e em relação à rutina apresentaram atividade muito superior cerca de 80%, portanto, são consideradas frações antioxidantes em potencial. A atividade antioxidante presente na fração acetato de etila provavelmente, deve-se aos compostos fenólicos que apresentam capacidade de capturarem radicais como hidroxila, peroxila, superóxido e óxido nítrico.

O isolado verbascosídeo ou acteosídeo é um fenilpropanoide, portanto um composto fenólico, presente em alta concentração na fração acetato de etila. As propriedades biológicas esta substância têm sido descritas na literatura, e possui diversas atividades, incluindo antioxidante, anti-inflamatória, fotoprotetora e quelante. O efeito antioxidante, bastante significativo, do verbascosídeo foi recentemente documentado em um estudo experimental que comparava inúmeras substâncias antioxidantes naturais, utilizando vários métodos de determinação. Além disso, a atividade anti-inflamatória do verbascosídeo foi confirmada por um ensaio *in vitro* realizado em culturas de células primárias de queratinócitos humano, em que o verbascosídeo foi capaz de reduzir significativamente, de forma dose-dependente, a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias. Este estudo também demonstrou que ele promove a melhora e reparação de inflamações na pele, devido à sua atividade seqüestradora de ERO, antioxidante, quelante de ferro, e propriedade indutora da glutathione transferase (GST). Um estudo *in vivo*, conduzido em inflamação da mucosa intestinal, demonstrou que ele é capaz de inibir a ativação de proteínas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, a atividade enzimática da matriz metaloproteinases, este último também envolvido nos fenômenos de envelhecimento da pele. Os resultados deste estudo sugeriram que o verbascosídeo tem a função de eliminar os radicais intracelulares, reduzindo os sinais microscópicos e macroscópicos de colite em rato. Assim, a administração de verbascosídeo pode ser benéfico para o tratamento de doença inflamatória do intestino (VERTUANI *et al.*, 2011).

A atividade antioxidante presente na fração hexano provavelmente, deve-se a presença de carotenóides que removem, seja quimicamente ou fisicamente, o oxigênio *singlet* (1O_2), que é formado quando o oxigênio absorve energia (luz ou

radiação) no seu estado fundamental, que apesar de não constituir um radical livre apresenta um maior poder oxidante e reage rapidamente com biomoléculas (BARREIROS *et al.*, 2006).

Outras frações como hexano das partes aéreas, clorofórmio, acetato de etila e remanescente da raiz também apresentaram atividades próximas ou superiores ao padrão de rutina.

5.6.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazila) é estável e apresenta coloração púrpura, porém, quando reduzido passa a ter coloração amarela. Através deste ensaio foi avaliada a capacidade das amostras e padrões (Rutina e Vitamina C) de reduzir o radical DPPH. Foram preparadas e testadas cinco concentrações para algumas amostras e seis concentrações para outras. A porcentagem de inibição do DPPH foi determinada a partir da leitura das absorvâncias à 518nm de cada concentração. Também foi calculado, por regressão linear (a partir da equação da reta do gráfico obtido para cada amostra), o IC50, ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. Este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenoides (ALVES *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos estão demonstrados nos gráficos 2 a 12. Como podemos notar todas as curvas dos padrões e amostras apresentaram um coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,98.

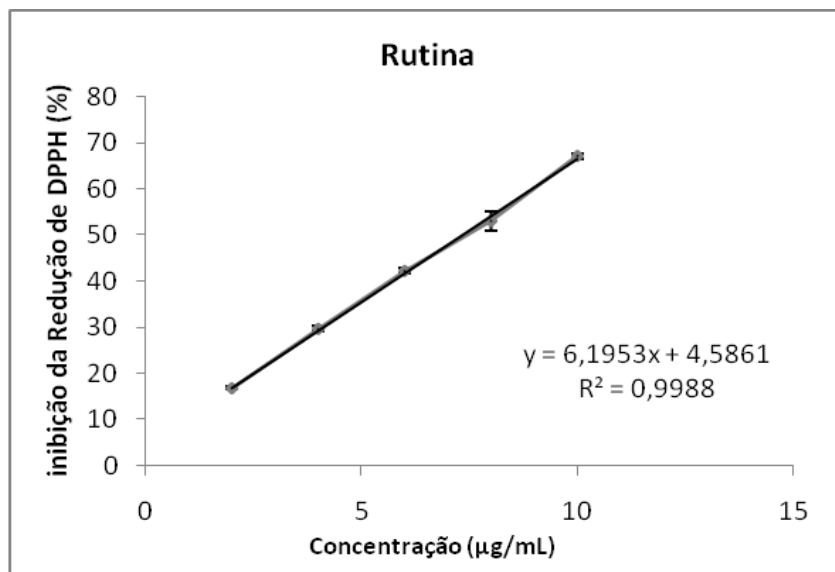


GRÁFICO 2 - CURVA DO PADRÃO RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH
FONTE: O Autor (2012)

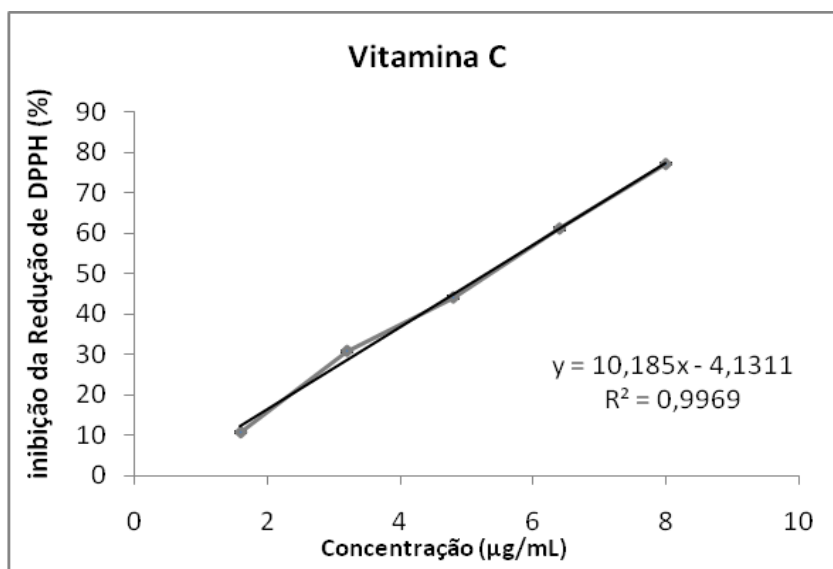


GRÁFICO 3 - CURVA DO PADRÃO VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH
FONTE: O autor (2012)

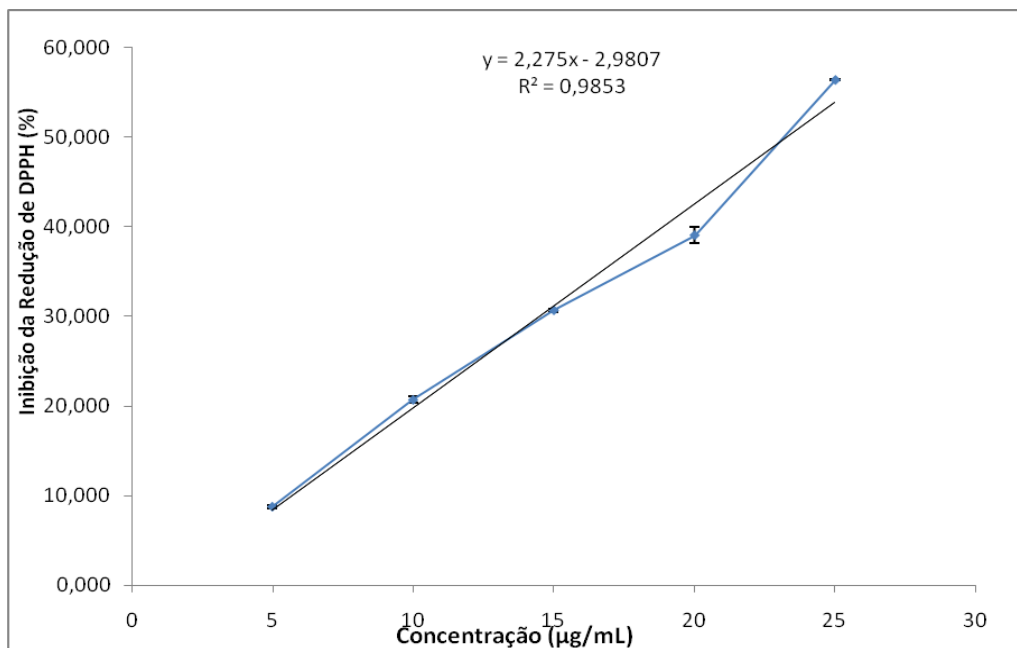


GRÁFICO 4 - CURVA DO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DAS PARTES AÉREAS PELA REDUÇÃO DO DPPH
 FONTE: O autor (2012)

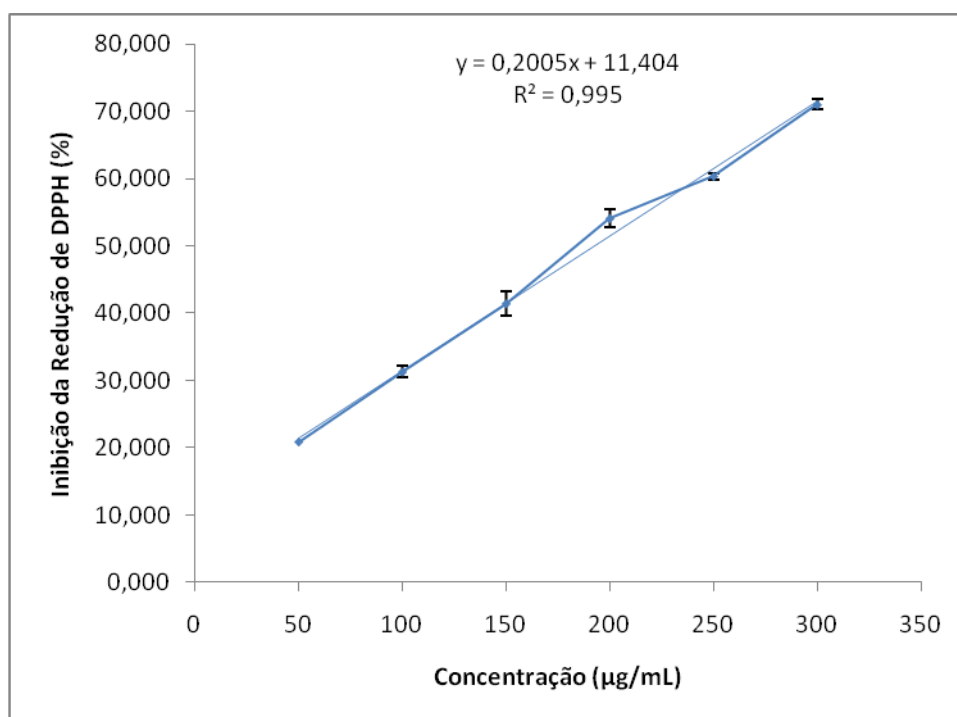


GRÁFICO 5 - CURVA DA FRAÇÃO HEXANO DAS PARTES AÉREAS PELA REDUÇÃO DO DPPH
 FONTE: O autor (2012)

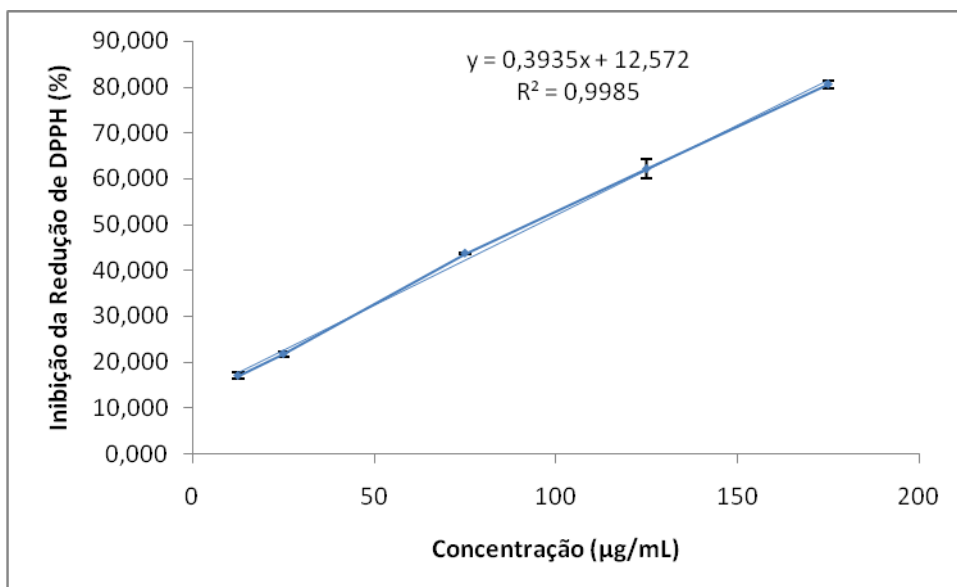


GRÁFICO 6 - CURVA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS PARTES AÉREAS PELA REDUÇÃO DO DPPH

FONTE: O autor (2012)

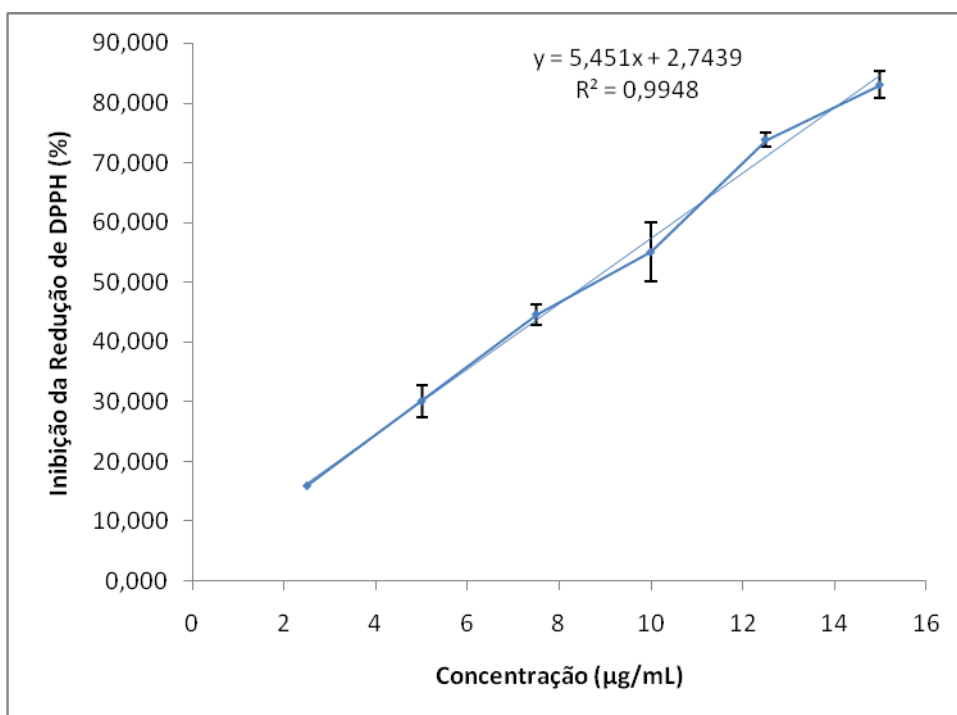


GRÁFICO 7 - CURVA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS PARTES AÉREAS PELA REDUÇÃO DO DPPH

FONTE: O autor (2012)

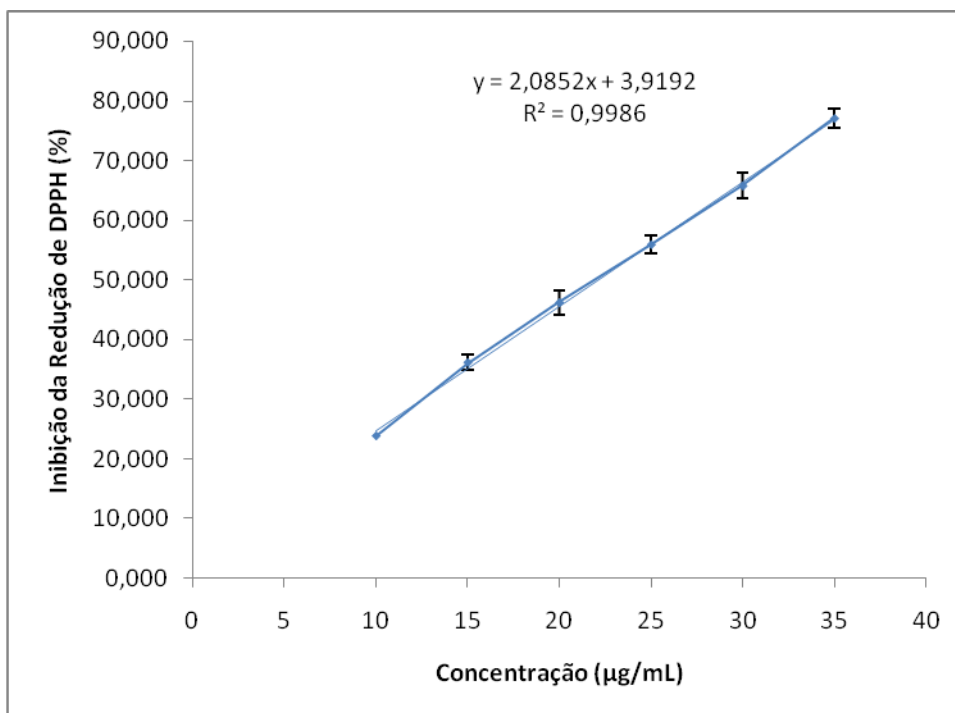


GRÁFICO 8 - CURVA DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE DAS PARTES AÉREAS PELA REDUÇÃO DO DPPH
 FONTE: O autor (2012)

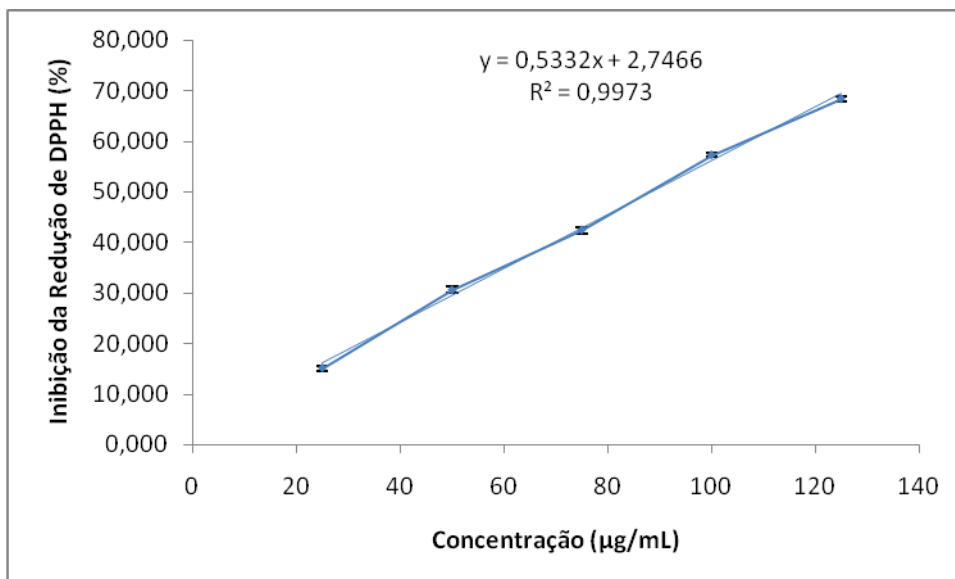


GRÁFICO 9 - CURVA DO EXTRATO ALCOÓLICO BRUTO DA RAIZ PELA REDUÇÃO DO DPPH
 FONTE: O autor (2012)

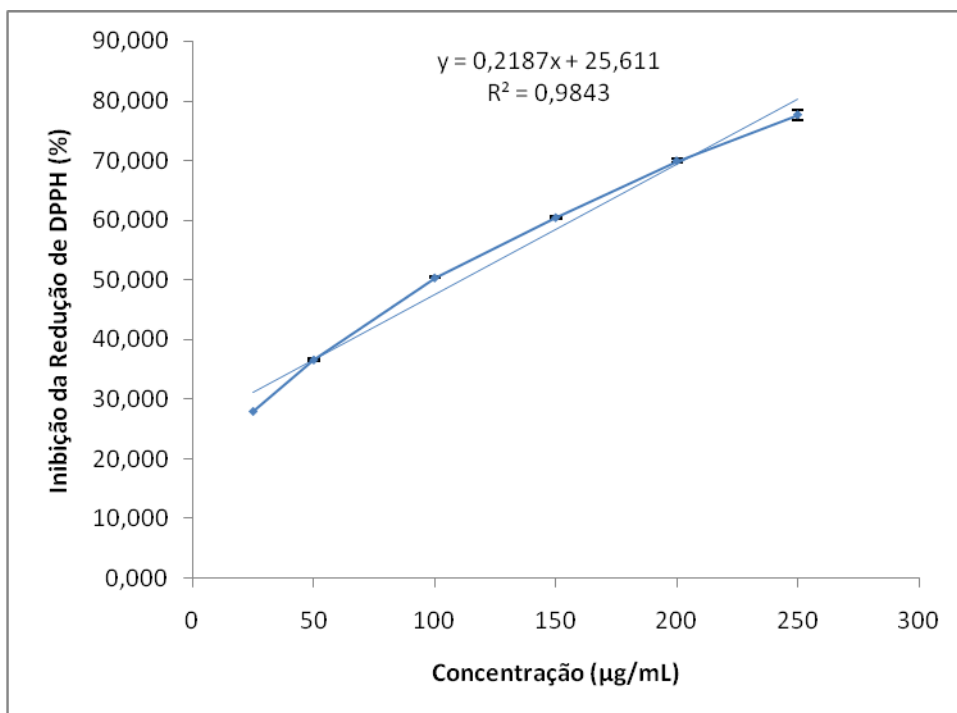


GRÁFICO 10 - CURVA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DA RAIZ PELA REDUÇÃO DO DPPH
 FONTE: O autor (2012)

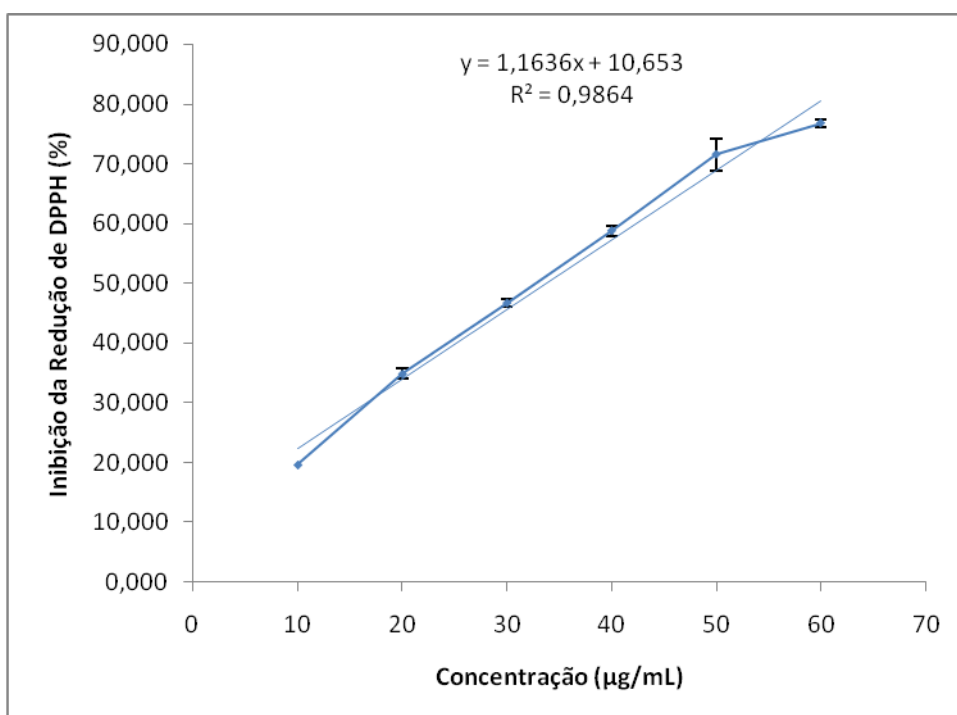


GRÁFICO 11 - CURVA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA RAIZ PELA REDUÇÃO DO DPPH
 FONTE: O autor (2012)

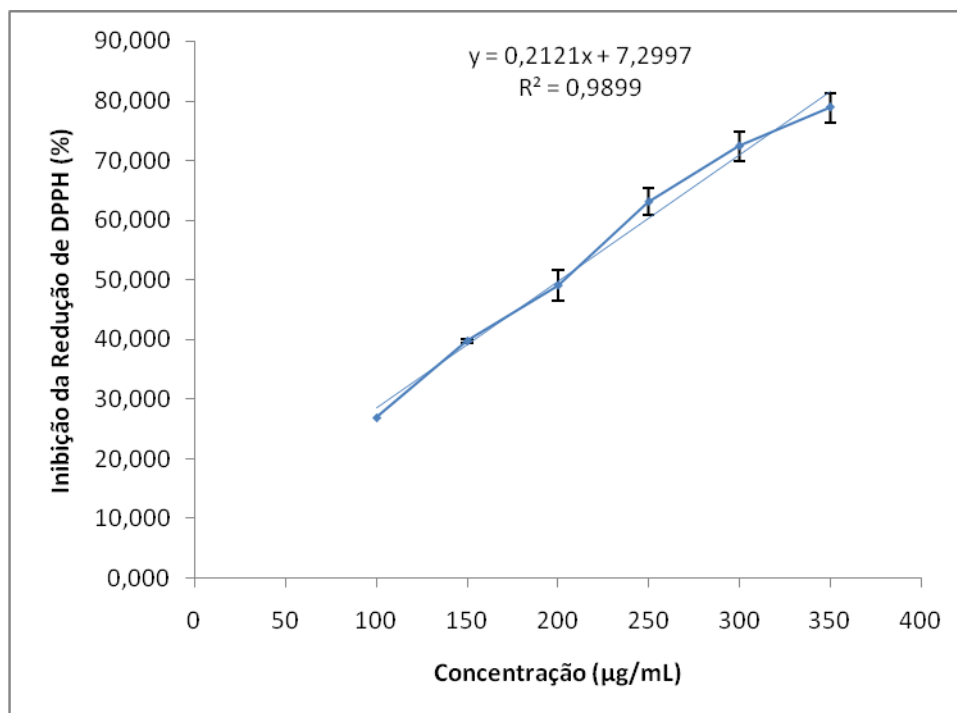


GRÁFICO 12 - CURVA DA FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE DA RAIZ PELA REDUÇÃO DO DPPH
 FONTE: O autor (2012)

Os valores de IC₅₀ que correspondem às médias de três repetições ± desvio padrão e a classificação estatística estão apresentados no gráfico 13. Analisando os resultados das amostras testadas, referente à concentração de amostra que reduz em 50% a concentração inicial de DPPH (IC 50), pode-se verificar que a Fração acetato de etila das partes aéreas apresentou o menor valor de IC 50 (8,67 ± 0,052) e é estatisticamente igual ao padrão de Rutina, portanto, pode ser considerada a mais ativa, demonstrando mais uma vez a capacidade dos compostos fenólicos presentes na fração acetato de etila de reduzir radicais livres como o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).

A fração hexano das partes aéreas neste teste não apresentou atividade antioxidante como aconteceu no teste de formação do complexo fosfomolibdênio, provavelmente no teste do DPPH o espectro dos carotenoides presentes nessa fração pode ter sobreposto o do DPPH ao redor de 515 nm, podendo ter interferido nos resultados.

Ambos os métodos avaliam o potencial antioxidante através de reações químicas, verificando a cinética da reação. Como as amostras apresentaram potencial antioxidante menor que o padrão de Vitamina C e maior que o padrão de

rutina, a cinética de reação das amostras provavelmente é intermediária à dos padrões, e com a fração hexano da raiz não foi possível realizar o teste com DPPH, pois nas concentrações testadas (100 a 500 µg/mL) não apresentou atividade antioxidante. As demais amostras testadas foram pouco satisfatórias neste teste.

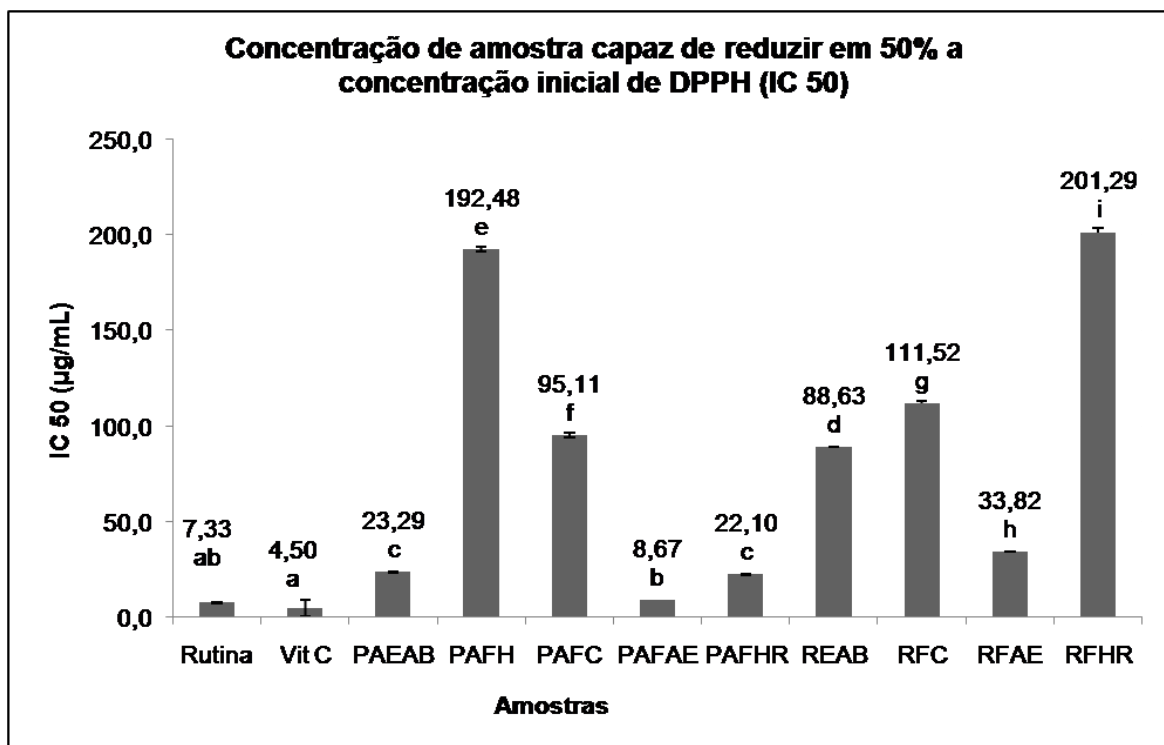


GRÁFICO 13 - IC 50: CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA QUE REDUZ 50% DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE DPPH

FONTE: O autor (2012)

Legenda: PAEAB - extrato alcoólico bruto das partes aéreas; PAFH - fração hexano das partes aéreas; PAFC - fração clorofórmio das partes aéreas; PAFAE - fração acetato de etila das partes aéreas; PAFHR - fração hidroalcoólica remanescente das partes aéreas; REAB - extrato alcoólico bruto da raiz; RFC - fração clorofórmio da raiz; RFAE - fração acetato de etila da raiz; RFHR - fração hidroalcoólica remanescente da raiz

Nota: As letras foram utilizadas para classificação estatística e o uso de letras iguais significa que as amostras são estatisticamente iguais

Embora o teste de DPPH seja largamente utilizado por apresentar simplicidade, rapidez e reprodutibilidade, os resultados devem ser cuidadosamente interpretados. Sendo a acessibilidade estérica o fator determinante da reação, moléculas pequenas que têm melhor acesso ao sítio do radical podem apresentar uma maior atividade aparente quando comparada às moléculas maiores (ALVES *et al.*, 2010).

No estudo de Sánchez-Moreno *et al.*, com vinhos tinto, rose e branco demonstraram que existe uma correlação entre eficiência antirradicalar e concentração de polifenóis presentes nos vinhos, ressaltando que deve-se levar em

conta não somente a concentração do antioxidante, mas também o tempo de reação necessário para o sequestro deste radical, introduzindo assim a eficiência antirradicalar como um novo parâmetro para a avaliação da atividade antioxidante (ALVES *et al.*, 2010).

5.6.3 Teste de inibição da peroxidação lipídica

Este ensaio é utilizado para verificar a capacidade das amostras testadas em inibir a peroxidação lipídica, ou seja, inibir a formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) induzidas por um gerador de radicais livres (agente oxidante ABAP - cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano), em um substrato rico em lipídeos (gema de ovo). Como controle positivo foi utilizado o padrão de BHT (hidroxibutiltolueno). Os resultados obtidos estão expressos no gráfico 14.

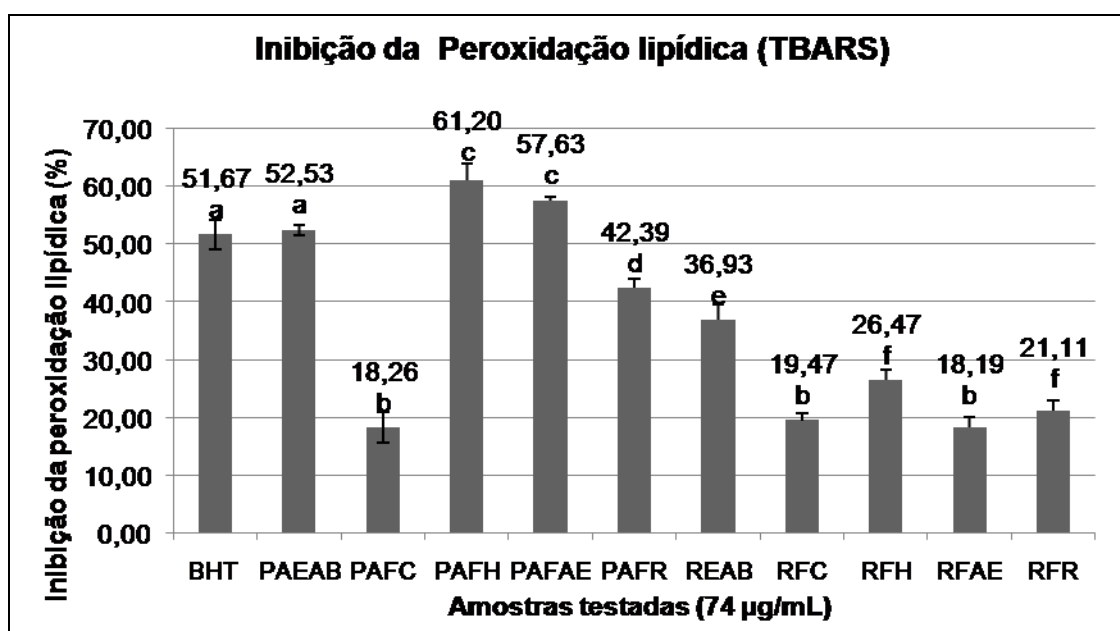


GRÁFICO 14 – AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Buddleja stachyoides*
 FONTE: O autor (2012)

Legenda: BHT - hidroxibutiltolueno; PAEAB - extrato alcoólico bruto das partes aéreas; PAFH - fração hexano das partes aéreas; PAFC - fração clorofórmio das partes aéreas; PAFAE - fração acetato de etila das partes aéreas; PAFHR - fração hidroalcoólica remanescente das partes aéreas; REAB - extrato alcoólico bruto da raiz; RFH - fração hexano da raiz; RFC - fração clorofórmio da raiz; RFAE - fração acetato de etila da raiz; RFHR - fração hidroalcoólica remanescente da raiz

Nota: As letras foram utilizadas para classificação estatística e o uso de letras iguais significa que as amostras são estatisticamente iguais

Analisando os resultados verificou-se que o extrato alcoólico bruto das partes aéreas apresentou capacidade de inibição da peroxidação lipídica ($52,53\% \pm 0,64$) estatisticamente semelhante ao padrão de BHT ($51,67\% \pm 2,60$). As amostras fração hexano ($61,20\% \pm 2,74$) e fração acetato de etila ($57,63\% \pm 0,62$) das partes aéreas apresentaram maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica que o padrão. Para a raiz, a amostra com maior capacidade de inibir a peroxidação lipídica foi o extrato bruto ($36,93\% \pm 2,62$), porém não tão eficiente quanto as amostras anteriores.

Os radicais livres atuam sobre alimentos ocorrendo a peroxidação lipídica e causando a deterioração dos corpos graxos. Ela também é responsável pela modificação do odor e sabor dos alimentos, bem como a perda da qualidade nutricional, acarretando depreciação e/ou rejeição por parte dos consumidores. A decomposição oxidativa pode ser iniciada por processos térmicos, absorção de raios gama ou radiação ionizante, ou por iniciação química envolvendo íons metálicos ou metaloproteínas. Para proporcionar ao consumidor alimentos com qualidade, as indústrias alimentícias adicionam antioxidantes aos alimentos, razão que justifica o atual interesse pela pesquisa de novos compostos antioxidantes (ALVES, 2010).

Devido a capacidade de inibição da peroxidação lipídica das amostras extrato alcoólico bruto e frações (acetato de etila e hexano) das partes aéreas de *Buddleja stachyoides* ter sido semelhante ao padrão BHT, pode-se pensar na substituição deste antioxidante bastante utilizado na indústria de alimentos e cosméticos, mas que apresenta dúvidas quanto a ser ou não cancerígeno, além de casos de dificuldade em metabolizá-lo. Portanto, o uso de conservantes originários de produtos naturais é bastante interessante, pensando-se em tornar os produtos mais saudáveis para o consumo, porém devem ser realizados testes em alimentos para comprovar sua eficácia.

5.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

5.7.1 Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada utilizado como alimento vivo para peixes, facilmente encontrado em lojas especializadas em aquários, que pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração letal média (DL50) (MEYER *et al.*, 1982). Muitos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida, pois se as amostras não apresentarem toxicidade neste teste, pode-se dar continuidade a estas atividades biológicas. Este bioensaio também tem sido citado na avaliação prévia de extratos de plantas com possível atividade antitumoral e está sendo utilizado para estudo biológico inicial de um grande número de amostras para detecção simultânea de toxicidade e fototoxicidade (MEYER *et al.*, 1982).

Para o cálculo da DL50 os resultados das amostras testadas foram submetidos ao teste estatístico Probitos. As amostras são consideradas tóxicas quando apresentarem DL50 menores que 1000µg/mL (MEYER *et al.*, 1982). Os resultados estão apresentados na tabela 9 e a figura 27 apresenta uma ilustração do microcrustáceo *Artemia salina*.



FIGURA 27 - ILUSTRAÇÃO DA *Artemia salina* UTILIZADA NA TOXICIDADE PRELIMINAR DOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Buddleja stachyoides*

TABELA 9 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ATRAVÉS DA DL 50 OBTIDA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES SOBRE O MICROCRUSTÁCEO *Artemia salina*

Amostra	Mortalidade/ Concentração			DL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de Confiança de 95% (µg/mL)
	10 (µg/mL)	100 (µg/mL)	1000 (µg/mL)		
Partes aéreas Extrato Bruto	4	0	0	>1000	-
Partes aéreas Fração Hexano	0	1	0	>1000	-
Partes aéreas Fração Clorofórmio	0	0	1	>1000	-
Partes aéreas Fração Acetato de Etila	0	2	0	>1000	-
Partes aéreas Fração Remanescente	1	0	3	>1000	-
Raiz Extrato Bruto	0	0	3	>1000	-
Raiz Fração Hexano	0	0	7	>1000	-
Raiz Fração Clorofórmio	1	0	0	>1000	-
Raiz Fração Acetato de Etila	0	0	3	>1000	-
Raiz Fração Remanescente	1	0	0	>1000	-
Sulfato de Quinidina	3	26	85	177,38	136,85 – 229,93

FONTE: O autor (2012)

Analisando-se os resultados nenhuma amostra apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, pois em todas as amostras o resultado de DL50 foi superior a 1000µg/mL. O controle negativo foi realizado com o solvente etanol nas mesmas concentrações testadas e não apresentou influência sobre os resultados, pois não houve mortalidade dos náuplios na presença do mesmo.

Este ensaio é uma estimativa para verificar a toxicidade das amostras, portanto, como as amostras tiveram resultado negativo, indica a possibilidade da utilização das partes aéreas e raiz sem apresentar toxicidade, desde que sejam usadas dentro das concentrações consideradas não tóxicas. Obviamente, outros testes de toxicidade deverão ser realizados para garantir a segurança de uso da droga vegetal *Buddleja stachyoides*.

5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

5.8.1 Avaliação da atividade hemolítica nos tubos

No teste em tubos contendo sangue de carneiro em suspensão a 2%, a fração clorofórmio da partes aéreas apresentou atividade hemolítica a partir da concentração 50 µg/mL, e a fração hexano da raiz apresentou atividade hemolítica a partir da concentração 100 µg/mL, sendo estas as menores concentrações com capacidade hemolítica. Provavelmente, a atividade hemolítica dessas amostras deve-se a presença de saponinas que possuem ação sobre membranas (ação hemolítica), alterando sua permeabilidade e causando a destruição das células sanguíneas, após centrifugação, tornando a solução vermelha e límpida caracterizada pela liberação de hemoglobina (SIMÕES *et al.*, 2001).

As demais amostras não apresentaram nenhuma atividade hemolítica, sendo interessante o resultado negativo, pois possibilita o uso como medicamentos ou outros produtos para uso humano e animal.

A ação hemolítica provocada pelo controle positivo saponina pode ser visualizada na figura 28, demonstrando a coloração vermelha, límpida e sem depósito de eritrócitos.



FIGURA 28 - TUBOS COM HEMÓLISE TOTAL OBTIDA COM O PADRÃO DE SAPONINA
FONTE: O autor (2012)

5.8.2 Avaliação da Atividade hemolítica na placa de ágar sangue

Os resultados obtidos no teste de avaliação da atividade hemolítica na placa de Agar sangue podem ser visualizados na tabela 10.

TABELA 10 - DIÂMETRO DOS HALOS FORMADOS NA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Amostra	*Diâmetro do halo formado (mm)
Partes aéreas Extrato Bruto	0
Partes aéreas Fração Hexano	0
Partes aéreas Fração Clorofórmio	8
Partes aéreas Fração Acetato de Etila	0
Partes aéreas Fração Hidroalcoólica	0
Remanescente	
Raiz Extrato Bruto	0
Raiz Fração Hexano	8
Raiz Fração Clorofórmio	0
Raiz Fração Acetato de Etila	8
Raiz Fração Hidroalcoólica Remanescente	0
Saponina (controle positivo)	17
Etanol (controle negativo)	0

FONTE: O autor (2012)

NOTA: *Os valores correspondem ao halo formado incluindo o diâmetro de 7 mm do disco de papel utilizado

Analisando os resultados do teste de atividade hemolítica em ágar sangue dos extratos brutos e frações das partes aéreas e raiz de *Buddleja stachyoides*, verificou-se que apenas as frações clorofórmio das partes aéreas, hexano e acetato de etila da raiz apresentaram a formação de um pequeno halo de hemólise. Essas amostras, com exceção da fração acetato de etila da raiz, apresentaram hemólise no teste com tubos. Provavelmente, a fração acetato de etila teria atividade hemolítica em concentrações diferentes daquelas testadas, por isso não foi detectada a atividade hemolítica no teste com a suspensão sanguínea à 2%.

A formação do halo no controle positivo (saponina) e a não formação de halo no controle negativo (etanol) e em duas amostras pode ser visualizada na figura 29.

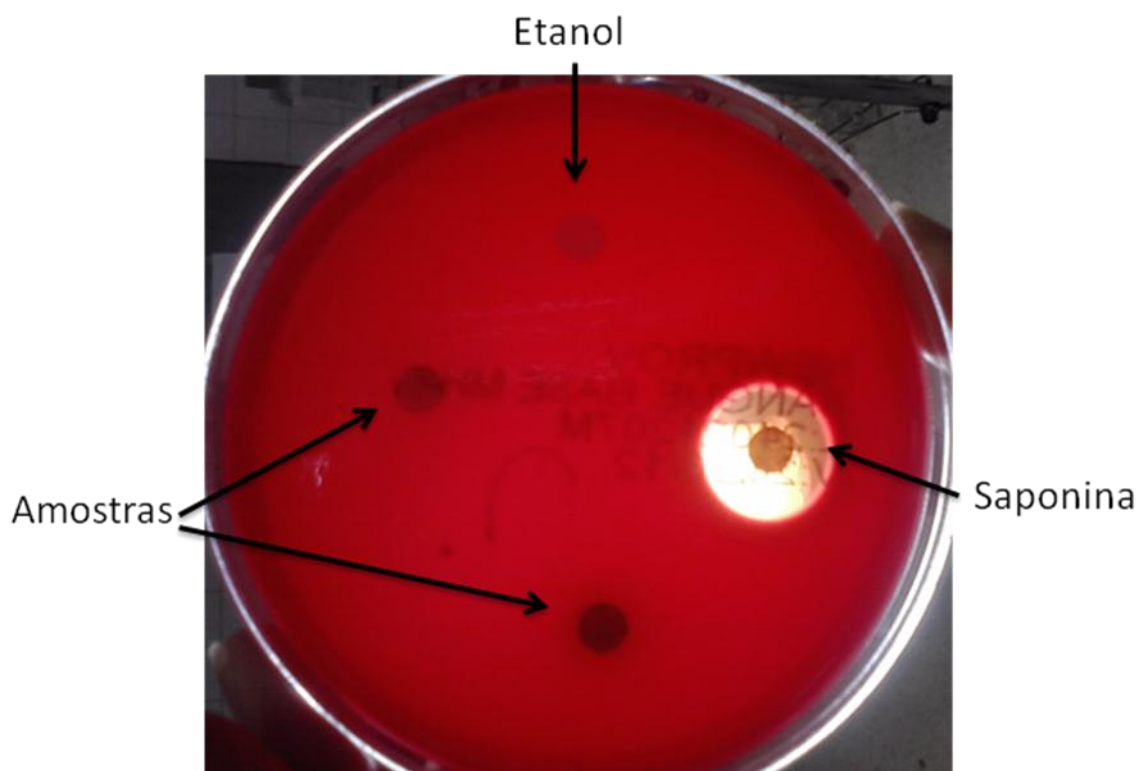


FIGURA 29 - DEMONSTRAÇÃO DA FORMAÇÃO DE HALO DO CONTROLE POSITIVO (SAPONINA) EM PLACA DE ÁGAR SANGUE
FONTE: O autor (2012)

5.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O potencial antimicrobiano da espécie vegetal foi avaliado através do método de microdiluição (ANVISA, M7-A6, 2003). As cepas dos microrganismos utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 25293[™]), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC[®] 12228[™]), *Salmonella thyphimurium* (ATCC[®] 14028[™]), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC[®] 9027[™]), *Escherichia coli* (ATCC[®] 25922[™]) e *Candida albicans* (ATCC[®] Sc5314[™]). Foram utilizadas as amostras extrato alcoólico bruto e frações das partes aéreas e raiz nas concentrações 12,5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL; 200 µg/mL e 400 µg/mL, porém, nenhuma das amostras apresentou atividade antimicrobiana após 48 horas. Ocorreu apenas uma inibição de crescimento em 24 horas da fração acetato de etila das partes aéreas na concentração 400 µg/mL sobre o microrganismo *Staphylococcus aureus* e da fração hidroalcoólica remanescente das partes aéreas na concentração 400 µg/mL sobre o

microrganismo *Escherichia coli*. Isto indica que estas amostras devem apresentar atividade antimicrobiana em concentrações mais altas, mas não foram realizados testes para determinar qual a concentração exata, devido a pouca importância dada a substâncias que necessitam de altas doses para serem ativas. Os extratos que apresentam uma concentração inibitória menor que 100µg/mL tem uma atividade antimicrobiana considerada boa, entre 100-500µg/mL é moderada, de 500-1000µg/mL é fraca e acima de 1000µg/mL considera-se inativo (HOLETZ *et al.*, 2002).

6 CONCLUSÃO

Levando-se em consideração os objetivos propostos para este trabalho e os resultados obtidos podem-se fazer as seguintes conclusões:

- A espécie *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltdl, pertencente à família Scrophulariaceae, apresenta como composto majoritário o Fenilpropanoide Verbascosídeo, o que foi confirmado através da obtenção deste isolado na fração acetato de etila das partes aéreas.
- A atividade antioxidante, nos três métodos testados (redução do complexo do fosfomolibdênio, redução do radical DPPH, teste com espécies reativas do ácido tiobarbitúico) a amostra mais expressiva foi a fração acetato de etila das partes aéreas. Mas de uma maneira geral, as frações acetato de etila e hexano das partes aéreas e raiz foram as mais ativas, com atividade cerca de 40 % em relação ao padrão vitamina C e superior aos padrões rutina e BHT. O verbascosídeo presente em maior concentração na fração acetato de etila deve ser o principal responsável pela atividade antioxidante em potencial, já na fração hexano essa atividade deve-se a possível presença de carotenoides, ainda não identificados.
- Na atividade antimicrobiana verificada pelo método de microdiluição a fração acetato de etila na concentração de 400 µg/mL das partes aéreas inibiu em 24 horas o crescimento do microrganismo *Staphylococcus aureus* e a fração remanescente na concentração de 400 µg/mL das partes aéreas inibiu em 24 horas o crescimento do microrganismo *Escherichia coli*. Após 48 horas de incubação nenhuma amostra foi capaz de inibir o crescimento microbiano.
- O teste de toxicidade não revelou atividade contra o microcrustáceo *Artemia salina*, pois todas as amostras apresentaram um valor de DL50 superior a 1000µg/mL, o que evidencia a baixa toxicidade das amostras.
- Na atividade hemolítica testada com suspensão de sangue de carneiro 2% e difusão em ágar sangue pelo método antibiograma, as frações clorofórmio das partes aéreas e hexano da raiz apresentaram atividade hemolítica a partir das concentrações 0,05 mg/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente, e pequenos halos de hemólise de 8 mm de diâmetro. Essa atividade hemolítica deve-se provavelmente a

presença de saponinas descrita na literatura e evidenciada no teste realizado no ensaio sistemático de fitoquímica.

Com a obtenção destes resultados para a espécie *Buddleja stachyoides*, torna-se interessante dar continuidade ao estudo de identificação de outros compostos e de outras atividades biológicas e farmacológicas. De acordo com a literatura o verbascosídeo apresenta diversas atividades biológicas importantes como à inibição da enzima Prolil oligopeptidase. Estudos mais completos poderão levar ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

AHMAD, I.; CHEN, S.; PENG, Y.; CHEN, S.; XU, L. Lipoxygenase inhibiting and antioxidant iridoids from *Buddleja crispa*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n.1, p.140 - 143, 2008.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 10, 2202-2210, 2010.

AMARAL, A. C. F.; SIMÕES, E. V.; FERREIRA, J. L. P. **Coletânea científica de plantas de uso medicinal**. Curitiba: Farmanguinhos, Fiocruz, Ministério da Saúde, 2005.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em:<<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10230&word=>>>. Acesso em: 11 mar 2011.

ANVISA, Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. M7-A6, v. 23, n. 2, 2003.

BACKHOUSEA, N.; DELPORTEA, C.; APABLAZAA, C.; FARÍAS, M.; GOÏTYA, L.; ARRAUA, S.; NEGRETEA, R.; CASTROA, C.; MIRANDAB, H. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 160 -165, 2008.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 6, n. 20, p. 992-1000, Fev. 2010.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J.P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BIANCO, E.M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpiaceae**. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2003.

BORGES, N. S.; DALCOL, I. GITZEL FILHO, A.; RIVERO, A. C.; ADOLPHO, L. O.; MARIN, D. F. Estudo fitoquímico e de atividade enzimática de *Artemisia verlotorum* Lamotte. **Jornada acadêmica integrada**, Universidade Federal de Santa Maria, Anais 25^a, 2010.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5 ed. Volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Congresso Nacional. Lei no. 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. DOU. Poder Legislativo, Brasília, DF, 27 jan. 1999.

BUDNI, P.; PETRONILHO, F. C.; Vanilde CITADINI-ZANETTE, V.; MARCONDES, C.; ZOCH, A. N.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL F. Estudos Preliminares da Atividade Antioxidante do Extrato Hidroetanólico de Folhas Jovens e Adultas de *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Toledo (ipê-roxo). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 3, n. 26, p. 394-398, 2007.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S.; Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Brasil, v. 18, n. 2, p. 314-319, Abr./Jun. 2008.

CARVALHO, J. L. de C. **Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.

CARVALHO, J. L. de C. **Desenvolvimento tecnológico de insumos, isolamento de marcadores e validação analítica dos derivados do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

COSTA, P. H. A., NETO, A. D. A., BEZERRA, M. A., PRISCO, J. T.; GOMES-FILHO, E. Antioxidant-enzymatic system of two sorghum genotypes differing in salt tolerance. **Brazilian Journal Plant Physiology**. v. 17, n. 4, p. 353-361, 2005.

DIAS, J. F. G, **Estudo Alelopático Aplicado de *Aster lenceolatus*, Willd.** 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

EFING, L. M. A. C. **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. –Hil.)**. 108f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

ESCALONA, C. D. R. A. **Diseño de la estandarización química y evaluación de la actividad analgésica tópica de un extracto activo de *Buddleja globosa* Hope, Buddlejaceae, matico**. 77f. Dissertação (título de Químico Farmacêutico) - Departamento de Química Farmacológica e Toxicológica, Departamento de farmacologia, Universidade do Chile, Santiago, 2006.

FARIA, F. M. **Determinação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e antioxidante de *Rhizophora mangle* L.** 155 f. Dissertação (Mestre em Farmacologia) - Departamento de farmacologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

FERREIRA, H. D. **Revisão taxonomica das especies de *Buddleja* L. (*Buddlejaceae*) que ocorrem no Brasil**. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Campinas, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1988.

GITZEL FILHO, A.; MOREL, A. F.; ADOLPHO, L.; ILHA, V.; GIRALT, E.; TARRAGÓ, T.; DALCOL, I. I. Inhibitory effect of verbascosídeo isolated from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng on prolyl oligopeptidase activity. **Phytotherapy Research**. v. 10, n. 26, p. 1472-1475, out. 2012.

GUTIERREZ, L. L. P. **Avaliação do estresse oxidativo sistêmico e órgão específico na intoxicação crônica por cloreto de mercúrio**. 88 f. Dissertação (mestrado) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

GWANNON. Disponível em: <<http://www.gwannon.com/species/Buddleja-stachyoides>>. Acesso em: 26/05/2011.

HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J.; A.Y. MENSAH, A. Y.; HENSEL, A.; DETERS, A. M. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 100–107, 2005.

HOUGHTON, P.J.; MENSAH, A. Y.; IESSA, N.; HONG, L. Y. Terpenoids in Buddleja: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity **Phytochemistry**, v. 64, p. 385–393 26, Mar. 2003.

JACKSON, M.J. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. **Proceedings of the Nutritional Society**, v.58, n. 4, p.673-676, 1999.

KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999. p. 210.

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA, 1983.

LEE, J. Y.; WOO, E.; KANG, K. W. Inhibition of lipopolysaccharide-inducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97 n. 3, p. 561–566, 2005.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Arthemisa salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 297-301, 1992.

LOHMÜLLER, A.; LOHMÜLLER, F. Disponível em: <<http://www.f-lohmueller.de/botany/fam/s/Scrophulariaceae.htm>> Acesso em: 10/10/2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativa e exóticas**. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2008. p. 487.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MAHLKE, J. D. **Buddleja thyrsoides LAM.: Estudo morfoanatômico, fitoquímico e biológico**. 118 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro Ciência da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. **Alelopatia: interações químicas entre espécies**. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-523.

MEDEIROS, J. B. **Redação científica: a prática de fichamentos, resumos, resenhas**. 7ed. São Paulo: Atlas, 2005.

MENSOR LL, MENEZES FS, LEITÃO GG, REIS AS, DOS SANTOS TC, COUBE CS, LEITÃO SG. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Res**, n.15, p. 127-130, 2001.

MEYER, B.N. *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n.1, p. 31, 1982.

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

MORAIS, S.M.; CATUNDA-JUNIOR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; MARTINS-NETO, J.S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian Croton species. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

PIAO, M. S.; KIM, M.; LEE, D. G.; PARK, Y.; HAHM, K.; MOON, Y.; WOO, E. Antioxidative Constituents from *Buddleia officinalis*. **Arch Pharm Res**, v. 26, n. 6, p. 453-457, 2003.

PIETRZYCKA, A.; STPNIEWSKI, M.; WASZKIELEWICZ, A.M.; MARONA, H.; KRZYZANOWSKA, A.; KLOSOWSKA, K.; SOLARZ, O. Effect of vita glucan on some antioxidant parameters of the human blood *In vitro* study. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 63, n. 6, p. 547- 551, 2006.

Portal do Ministério da Saúde. Disponível em:
<<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional>>. Acesso em: 29/05/2011.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

SIMÕES, C.M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L. APETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora Universidade/ UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2001.

Souza, V.C. 2010. Scrophulariaceae *in* **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB014541>>. Acesso em: 23/05/2011.

UTYAMA, I.K.A. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do vinagre e ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas**. 148 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2003.

VERTUANI, S.; BEGHELLI, E.; SCALAMBRA, E.; MALISARDI, G. COPETTI, S.; DAL TOSO, R.; BALDISSEROTTO, A.; MANFREDINI, S Activity and Stability Studies of Verbascoside, a Novel Antioxidant, in Dermo-Cosmetic and Pharmaceutical Topical Formulations. **Molecules**, v.16, n. 8, p. 7068-7080, 2011.

WAGNER, H. BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. 2 ed. Berlin: Springer, 2001. p. 298-299 e p. 318-319.

WARD, R.J.; PETERS, T.J. **Free Radicals**. In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*. New York: hurchill Livingstone, p. 765-777,1995.

World Health Organization. **WHO Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems**. Geneva, 2004. p. 1.