

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAIS FERNANDA MOREIRA

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Reissek) M.C.
Johnst. (Rhamnaceae)

CURITIBA

2012

THAIS FERNANDA MOREIRA

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Rhamnaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Co-orientadoras: Prof^a. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Prof^a.Dra. Patrícia Maria Stuelp Campelo

CURITIBA

2012

Moreira, Thais Fernanda

Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Rhamnaceae) / Thais Fernanda Moreira – Curitiba, 2012.

93 f. : il. color. ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Patrícia Maria Stuelp Campelo

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

Inclui bibliografia

1. *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*. 2. Antraquinonas. 3. Fitoesteróis. 4. Antioxidantes. 5. Motilidade gastrointestinal. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Campelo, Patrícia Maria Stuelp. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.321

TERMO DE APROVAÇÃO

THAIS FERNANDA MOREIRA

Título: **CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (REISSEK) M.C. JOHNST. (RHAMNACEAE)**


Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.



Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Orientador



Profa. Dra. Joice Maria da Cunha
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Curitiba, 20 de dezembro de 2012.

Aos meus queridos pais, Sandra e Wandeyr

Ao meu amigo e irmão Lucas

Em especial à minha querida tia Waldenice Moreira Cano

Por todo amor, dedicação, paciência e incentivo!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela minha vida e todas conquistas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Obdulio Gomes Miguel**, pela orientação e paciência, pelos ensinamentos e amizade.

À Prof.^a Dra. **Marilis Dallarmi Miguel**, pela co-orientação, confiança e apoio durante este trabalho.

À Prof.^a Dra. **Patrícia Maria Stuelp Campelo**, pela co-orientação, por me acompanhar desde o início da caminhada acadêmica, pelos ensinamentos e conselhos, pelo apoio e motivação, pela confiança e acima de tudo pela amizade.

À Prof.^a Dra. **Ana Luísa Lacava Lordello**, do Departamento de Química da UFPR, pela contribuição nas análises de RMN.

Ao Prof. Dr. **Edvaldo Antônio Ribeiro Rosa** e a MsC **Rosimeire Takaki Rosa**, do laboratório de Estomatologia da PUCPR, pela amizade e pelo auxílio nos experimentos da atividade antimicrobiana.

Às doutorandas **Beatriz Cristina Konopatzki Hirota** e **Milena Kalegari**, pela obtenção e análise dos espectros de RMN, sugestões e amizade.

Às doutorandas **Cristiane da Silva Paula** e **Cristiane Bezerra da Silva**, pela ajuda diária, sugestões e amizade.

Às amigas **Daniella Maria Soares de Oliveira**, **Maria Fernanda Cordeiro Arruda**, **Fernanda Maria Martins Ocampos**, **Luciane Dalarmi**, **Ana Flávia Schwabe Duarte** e **Mariana Saragioto Krause**, pela companhia no laboratório e aulas, pelas conversas, risadas e amizade.

Aos estagiários **Alexsandra, Rodrigo e Diogo**, pela contribuição nos ensaios com animais.

À minha **família**, por todo amor, dedicação, paciência e incentivo.

Ao meu namorado **Fernando Sabino**, por todo amor e paciência.

Aos meus amigos **Marci Olivetti, Juliana Danna Kulik, Elaine Cristina de Almeida Abreu, Ana Luiza Dorigan de Matos Furlanetto, Andréa Kelly Yuki, Diogo Zerbini, Cleverton Luiz Pirich**, pelo carinho, amizade e companhia em todos os momentos.

À **Universidade Federal do Paraná**, ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, e à **CAPES**.

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

“Preferi a ciência e não a prata; e o conhecimento, mais do que o ouro fino, porque melhor é a sabedoria do que os rubis; e tudo o que mais se deseja não se pode comparar com ela.”

Provérbios 8:10-11

RESUMO

Espécies da família Rhamnaceae são conhecidas por seu potencial terapêutico e econômico. *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* é uma espécie nativa no Brasil, encontrada na região sul, popularmente conhecida como Cangica e Fruto-de-pombo. Apresenta um grande potencial químico e farmacológico por ser enquadrada no gênero *Rhamnus*. Ainda não existem estudos que descrevam suas propriedades biológicas. Desta maneira, o presente estudo teve por objetivos investigar a composição química desta espécie vegetal, e verificar suas possíveis atividades biológicas. Folhas e caules do vegetal foram coletados na cidade de Curitiba, campus Jardim Botânico (UFPR), secos, triturados, extraídos e fracionados por aparelho de Soxhlet, e posteriormente foram purificadas por cromatografia em coluna. Quanto as atividades biológicas foram verificadas, através de ensaios *in vitro*, a toxicidade preliminar frente *Artemia salina* e atividade hemolítica; a atividade antioxidante, através dos métodos de redução do radical DPPH, redução do complexo fosfomolibdênio e determinação da taxa de peroxidação lipídica; atividade antimicrobiana; e, por métodos *in vivo*, a avaliação das atividades antiulcerogênica e motilidade gastrointestinal. Foram identificadas as antraquinonas crisofanol e fisciona, e os fitoesteróis estigmasterol e sitosterol. De maneira geral, as amostras apresentaram atividade antioxidante em todas as metodologias testadas, com importante atividade inibitória sobre a peroxidação lipídica e ainda ausência de toxicidade sobre a *Artemia salina* e ausência de atividade hemolítica, com exceção da fração hexano do caule. Nenhuma amostra apresentou atividade antimicrobiana. O extrato alcoólico bruto do caule não inibiu ou diminuiu o efeito ulcerogênico do álcool. Este estudo demonstrou também que o extrato alcoólico bruto do caule possui ação sobre o trato gastrointestinal, reduzindo de maneira geral, a motilidade intestinal, e na menor dose, acelerando o esvaziamento gástrico. Apesar dos dados obtidos neste estudo, ainda são necessários novos estudos que determinem os mecanismos de ação das propriedades exercidas pelas amostras provenientes de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

Palavras-chave: *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, antraquinonas, fitoesteróis, antioxidantes, motilidade gastrointestinal.

ABSTRACT

Rhamnaceae species are known for their therapeutic and economic potential. *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* is popularly known as como Cangica, Português, Sudeste e Fruto-de-pombo. Has great potential for chemical and pharmacological be framed in the genus *Rhamnus*. Thus, the present study aimed to investigate the chemical composition of this plant and verify their possible biological activities. Thus, the vegetable leaves and stems were collected at UFPR, in Curitiba (PR), and extracted and fractionated by Soxhlet, and subsequently were purified by column chromatography. Regarding the biological activities were observed toxicity preliminar front *Artemia salina* and hemolytic activity; antioxidant activity, through the methods of the radical reduction (DPPH and phosphomolybdenum) and determining the rate of lipid peroxidation; antimicrobial activity, and evaluating antiulcer and gastrointestinal motility. Were identified the anthraquinones chrysophanol and physcion, and the phytosterols stigmasterol and sitosterol. Samples showed significant antioxidant activity in all tested methodologies, with significant inhibitory activity on lipid peroxidation, and and lack of toxicity on *Artemia salina* and absence of hemolytic activity, except for the stem fraction hexane. No sample showed antimicrobial activity. This study also demonstrated that the crude alcoholic extract of the stem has action on the gastrointestinal tract, reducing overall, intestinal motility, and at the lowest dose, accelerating gastric emptying. Although the data obtained, further studies are needed to determine the mechanisms of action of the properties of the samples from *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

Keywords: *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*; anthraquinones, phytosterols, antioxidants, gastrointestinal motility.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE GRÁFICOS	14
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1. FAMÍLIA RHAMNACEAE.....	20
3.1.1. Aspectos Botânicos	20
3.1.1.1. Descrição da espécie <i>Rhamnus sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i>	21
3.1.2. Aspectos farmacológicos e químicos.....	24
3.1.2.1. Compostos antraquinônicos	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	30
4.1.2.1. Umidade (Perda por dessecação)	30
4.1.2.2. Cinzas totais	30
4.1.2.3. Cinzas insolúveis em ácido.....	30
4.1.3. Ensaio sistemático de prospecção fitoquímica	30
4.1.4. Análises microquímicas	31
4.2. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	32
4.2.1. Obtenção dos extratos a serem trabalhados	32
4.2.1.1. Fracionamento dos extratos etanólicos brutos	33
4.2.2. Análise e purificação das frações	33
4.2.2.1. Isolamento dos compostos T1 a T5.....	34
4.2.2.2. Isolamento do composto T6.....	35
4.2.3. Elucidação estrutural	37
4.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE	38

4.3.1.	Formação do complexo fosfomolibdênico.....	38
4.3.2.	Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	39
4.3.3.	Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	39
4.4.	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM <i>Artemia salina</i>	40
4.4.1.	Eclosão dos cistos	40
4.5.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA <i>IN VITRO</i>	41
4.5.1.	Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue	41
4.5.2.	Atividade hemolítica com hemácias em suspensão	41
4.6.	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	42
4.7.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DO CAULE SOBRE O SISTEMA GASTROINTESTINAL.....	43
4.7.1.	Avaliação sobre a motilidade gastrointestinal	44
4.7.1.1.	Animais	44
4.7.1.2.	Esvaziamento gástrico de semissólidos	44
4.7.1.3.	Trânsito Intestinal	45
4.7.2.	Avaliação da atividade antiulcerogênica.....	45
4.7.2.1.	Animais	45
4.7.2.2.	Lesões gástricas induzidas por etanol absoluto	45
4.8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5.	FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS.....	47
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
6.1.	MATERIAL VEGETAL	48
6.1.1.	Análises físico-químicas	48
6.1.2.	Ensaio sistemático de análise fitoquímica	49
6.1.3.	Análises microquímicas	50
6.2.	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	50
6.2.1.	Rendimento dos extratos e frações	50
6.2.2.	Isolamento e identificação dos compostos T1 e T3	51
6.2.3.	Isolamento e identificação do composto T6.....	58
6.3.	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	62
6.3.1.	Formação do complexo fosfomolibdênico.....	62

6.3.2. Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	64
6.3.3. Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	70
6.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM <i>Artemia salina</i>	72
6.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	74
6.5.1. Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue	74
6.5.2. Atividade hemolítica com hemácias em suspensão	75
6.6. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	76
6.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DO CAULE SOBRE O SISTEMA GASTROINTESTINAL.....	76
6.7.1. Avaliação sobre a motilidade gastrointestinal	76
6.7.2. Avaliação da atividade antiulcerogênica	81
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
REFERÊNCIAS.....	85

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	<i>RHAMNUS SPHAEROSPERMA</i> VAR. <i>PUBESCENS</i>	23
FIGURA 2.	DESENHO ESQUEMÁTICO DE <i>RHAMNUS SPHAEROSPERMA</i> VAR. <i>PUBESCENS</i> (RHAMNACEAE).	23
FIGURA 3.	ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DAS ANTRAQUINONAS.	27
FIGURA 4.	ANTRAQUINONAS DESCRITAS PARA ESPÉCIES DO GÊNERO <i>RHAMNUS</i>	28
FIGURA 5.	EXSICATA N ^o 243989: ESPÉCIE <i>RHAMNUS SPHAEROSPERMA</i> VAR. <i>PUBESCENS</i>	29
FIGURA 6.	ESTRUTURA QUÍMICA DO CRISOFANOL PRESENTE EM <i>RHAMNUS SPHAEROSPERMA</i> VAR. <i>PUBESCENS</i>	53
FIGURA 7.	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DO ¹³ C PARA CRISOFANOL (200 MHz, CDCl ₃).	53
FIGURA 8.	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DO ¹ H PARA CRISOFANOL (200 MHz, CDCl ₃).	54
FIGURA 9.	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE HSQC PARA CRISOFANOL (400 MHz, CDCl ₃).	54
FIGURA 10.	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE HMBC PARA CRISOFANOL (400 MHz, CDCl ₃).	55
FIGURA 11.	ESTRUTURA QUÍMICA DA FISCIONA PRESENTE EM <i>RHAMNUS SPHAEROSPERMA</i> VAR. <i>PUBESCENS</i>	56
FIGURA 12.	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DO ¹³ C PARA FISCIONA (200MHz, CDCl ₃).	57
FIGURA 13.	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H PARA A FISCIONA (200MHz, CDCl ₃).	57
FIGURA 14.	ESTRUTURA QUÍMICA: (A) ESTIGMASTEROL E (B) SITOSTEROL PRESENTES EM <i>RHAMNUS SPHAEROSPERMA</i> VAR. <i>PUBESCENS</i>	58
FIGURA 15.	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H PARA A MISTURA DE FITOESTERÓIS (200 MHz, CDCl ₃).	60
FIGURA 16.	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C PARA FITOESTERÓIS (200 MHz, CDCl ₃).	61

FIGURA 17. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA EM RELAÇÃO AOS PADRÕES RUTINA E VITAMINA C.....	63
FIGURA 18. IC ₅₀ : CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA QUE REDUZ 50% DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE DPPH.....	70
FIGURA 19. INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	71
FIGURA 20. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM AGAR SANGUE.....	74
FIGURA 21. AVALIAÇÃO DA TAXA DE ESVAZIAMENTO GÁSTRICO DE SEMISSÓLIDOS	77
FIGURA 22. AVALIAÇÃO DA TAXA DE TRÂNSITO INTESTINAL.....	79
FIGURA 23. AVALIAÇÃO DAS ÚLCERAS INDUZIDAS POR ETANOL.....	82

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Curva do padrão rutina pela redução do DPPH.	65
Gráfico 2.	Curva do padrão vitamina c pela redução do DPPH.	65
Gráfico 3.	Curva do extrato alcoólico bruto do caule pela redução do DPPH.	66
Gráfico 4.	Curva da fração hexano do caule pela redução do DPPH.	66
Gráfico 5.	Curva da fração clorofórmio do caule pela redução do DPPH.	67
Gráfico 6.	Curva da fração acetato de etila do caule pela redução do DPPH.	67
Gráfico 7.	Curva do extrato alcoólico bruto das folhas pela redução do DPPH. ...	68
Gráfico 8.	Curva da fração hexano das folhas pela redução do DPPH.	68
Gráfico 9.	Curva da fração clorofórmio das folhas pela redução do DPPH.	69
Gráfico 10.	Curva da fração acetato de etila das folhas pela redução do DPPH. ...	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação taxonômica.....	22
TABELA 2. Grupos químicos de metabólitos secundários pesquisados no ensaio fitoquímico sistemático.	31
TABELA 3. Cromatografia em coluna do precipitado da fração hexano do caule...35	
TABELA 4. Cromatografia em coluna da fração hexano do caule.	36
TABELA 5. Cromatografia em coluna dos frascos 43 a 49 da fração hexano do caule.....	37
TABELA 6. Análises físico-químicas do material vegetal.....	48
TABELA 7. Classe de metabólitos identificados pela análise sistemática fitoquímica em <i>Rhamnus sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i>	49
TABELA 8. Rendimento das frações em relação ao extrato etanólico bruto.....	51
TABELA 9. Deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C correspondente à antraquinona Crisofanol.....	52
TABELA 10. Deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C correspondente à antraquinona Fisciona.....	56
TABELA 11. Deslocamentos químicos para ^{13}C correspondente ao Estigmasterol e Sitosterol.....	59
TABELA 12. Avaliação da toxicidade frente <i>Artemia salina</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A -	Absorbância
AAR% -	Atividade Antioxidante Relativa
ATCC -	American Type Culture Collection
CCD -	Cromatografia em Camada Delgada
CIM -	Concentração Inibitória Mínima
DPPH -	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
HPLC -	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC -	<i>Heteronuclear Multiple Quantun Correlation</i> $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$
HMQC -	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>
pH -	Potencial Hidrogeniônico
RMN ^1H -	Ressonância Nuclear Magnética de Hidrogênio 1
RMN ^{13}C -	Ressonância Nuclear Magnética de Carbono 13
<i>d</i> -	Dubleto
<i>dd</i> -	Duplo dubleto
<i>s</i> -	Singleto
<i>t</i> -	Tripleto
<i>J</i> -	Constante de Acoplamento
δ	Deslocamento químico
UV -	Ultra Violeta
°C -	Graus Celsius
°GL -	Graus Gay-Lussac
M -	Molar
Mg/Kg -	Miligrama por quilo
Mo -	Molibdênio
nm -	Nanômetro
p/v -	Peso por volume
DL ₅₀ -	Dose letal média
IC ₅₀ -	Concentração inibitória média

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais têm sido utilizados desde a antiguidade para o tratamento e/ou cura de doenças. Contudo, com a descoberta e o avanço dos fármacos sintéticos, esse uso foi parcialmente substituído, e as pesquisas sobre as propriedades terapêuticas de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais foram deixadas em segundo plano. Em consequência disso, grande parte do conhecimento atual provém da cultura popular (CALIXTO, 2005).

Assim, é justamente o conhecimento popular sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais que contribui para a divulgação de suas propriedades terapêuticas por meio da sua frequente indicação. Dessa maneira, mantém-se a prática do consumo de fitoterápicos e preparados de plantas *in natura* por grande parte da população, pois, apesar da disponibilidade de medicamentos sintéticos no mercado, parte da população ainda não tem acesso a eles. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no início da década de 1990, de 65 a 80% da população de países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de tratamento (MACIEL, 2002; CALIXTO, 2005).

Apesar do amplo uso dessas plantas pela população, suas propriedades medicinais e toxicidade ainda carecem de estudos comprobatórios, uma vez que a literatura indica que podem apresentar substâncias tóxicas ou composição química variável (CALIXTO, 2000).

Além do metabolismo primário, aquele fundamental para manter as funções vitais do vegetal, as plantas produzem também substâncias resultantes do metabolismo secundário, que se diferencia do primário, principalmente por não apresentar reações e produtos comuns à maioria das plantas, sendo específico em determinados grupos. Os metabólitos secundários podem apresentar efeitos medicinais ou tóxicos, além de exercerem funções como proteção contra predadores e atração de agentes polinizadores. (SIMÕES, 2004).

Sabe-se, ainda, que a natureza e a quantidade de princípios ativos extraídos de plantas medicinais podem variar de acordo com a época de coleta, temperatura, umidade, solo, ritmo circadiano, duração da extração e tipo de solvente, entre outros fatores, o que contribui para a dificuldade na obtenção de extratos padronizados e

validação de fitoterápicos, cujos marcadores sejam conhecidos, ou seja, com a mesma concentração de ativos (quando estes compostos são conhecidos) (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O Brasil possui uma extensa área territorial composta por vários biomas (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia e Caatinga), e conseqüentemente, apresenta diversos tipos de solos e climas, que promovem a grande variedade de tipos de vegetação e espécies vegetais distribuídas nos diversos ecossistemas brasileiros. Nesse contexto, entre as milhares de espécies vegetais existentes no Brasil, é possível que pelo menos a metade possa ter alguma propriedade terapêutica útil à população, porém, nem um por cento dessas espécies com potencial farmacológico foi motivo de estudos adequados (LORENZI; MATOS, 2002).

Outro fator a ser considerado é o desmatamento e extinção de espécies da flora nacional, pois, apesar do número crescente de estudos com plantas medicinais na atualidade, ainda existe a necessidade do aumento na pesquisa para a promoção do uso seguro e racional da medicina tradicional, principalmente das plantas medicinais brasileiras ainda não estudadas.

Assim, entre as milhares de espécies com alguma propriedade medicinal, estão as da família Rhamnaceae conhecidas por seu potencial terapêutico e econômico, o que justifica o estudo da espécie *Rhamnus sphaerosperma* Var. *pubescens*, uma vez que faltam estudos a respeito deste vegetal que viabilizem a segurança e eficácia do seu uso.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar análises da composição fitoquímica, das atividades biológicas e toxicológica dos extratos e frações obtidos do caule e folhas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a prospecção fitoquímica dos extratos e frações através de métodos cromatográficos e espectroscópicos;
- Averiguar a toxicidade dos extratos e frações, através de métodos *in vitro*;
- Verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos e frações;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos e frações;
- Determinar a atividade *in vivo* do extrato etanólico bruto do caule sobre a motilidade gastrointestinal de camundongos;
- Verificar a capacidade antiulcerogênica *in vivo* do extrato etanólico bruto do caule.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. FAMÍLIA RHAMNACEAE

3.1.1. Aspectos Botânicos

A família Rhamnaceae A. L. Jussieu compreende aproximadamente 50 gêneros e 900 espécies de distribuição cosmopolita, incluindo desde árvores e arbustos até trepadeiras lenhosas e ervas, embora essas últimas ocorram raramente (RICHARDSON *et al.*, 2000; GIULIETTI *et al.*, 2005; JOLY, 1985; SCHULTZ., 1968; PORTER, 1959).

As espécies pertencentes a esta família estão presentes em países com clima temperado e subtropical. No território brasileiro ocorrem em todas as regiões (GIULIETTI *et al.*, 2005; JOLY, 1985; SCHULTZ, 1968; PORTER, 1959). No Brasil, ocorrem naturalmente apenas 13 gêneros na flora nativa, os quais são *Alvimiantha*, *Ampelozizyphus*, *Colletia*, *Colubrina*, *Condalia*, *Crumenaria*, *Discaria*, *Gouania*, *Reissekia*, *Rhamnidium*, *Rhamnus*, *Scutia*, *Zizyphus* (SOUZA; LORENZI, 2005; LIMA, 2010).

O gênero *Rhamnus* está distribuído no Brasil entre as regiões Norte (Roraima), Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Goiás, Distrito Federal), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (LIMA, 2010).

As espécies desta família apresentam folhas simples, pecioladas e de tamanho variável, alternadas, subopostas ou opostas, de bordo inteiro ou serreado, trinérveas ou peninérvias, glabras ou pilosas, com ou sem estípulas e, as vezes, providas de glândulas dispersas no limbo ou dispostas na extremidade de cada dente (JOLY, 1985; SCHULTZ, 1968; PORTER, 1959).

As flores, em geral, são actinomorfas, pentâmeras ou tetrâmeras, e simétricas; podem ser pediceladas ou sésseis, bissexuais ou unissexuais. O cálice é formado por sépalas coriáceas de perfloração valvar; a corola por pétalas pequenas, inguiculadas, côncavas ou cuculadas, que muitas vezes envolvem os estames

opostos e de número igual ao seu. Ao redor do ovário médio ou ínfero, composto de carpelos sincarpas, existe um disco, ao qual estão presos os estames. As inflorescências são axilares, cimosas e, às vezes, compondo racemos; podem estar reduzidas a fascículos ou a uma única flor (JOLY, 1985; SCHULTZ, 1968; PORTER, 1959).

Os frutos são pequenos e drupáceos; podem ser capsular-esquizocárpico e alados nas espécies com ovário ínfero, raramente sâmaras. As sementes geralmente são diminutas, lisas e brilhantes, ao menos em frutos secos (SOUZA; LORENZI, 2005).

O gênero *Rhamnus* L. compreende espécies arbóreas ou arbustivas inermes, com folhas simples peninérveas, pedúnculos frutíferos não intumescidos e frutos drupáceos (JOLY, 1985; SCHULTZ, 1968; PORTER, 1959).

3.1.1.1. Descrição da espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

A espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (figuras 1 e 2) é conhecida popularmente como Cangica, Português, Sudeste e Fruto-de-pombo. Apresenta como sinônimos botânicos relevantes os seguintes nomes: *Rhamnus pubescens* var. *chrysophylla*, *Rhamnus pubescens* var. *glabrescens*, *Rhamnus chrysophylla*, *Rhamnus polymorpha* var. *glabra* e *Rhamnus sectipetala*. (LIMA, 2010). A classificação taxonômica da espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* está representada na tabela 1.

Trata-se de uma árvore comum aos biomas Cerrado e Mata Atlântica. Sua área de dispersão abrange a Argentina, Paraguai, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia e Venezuela (JOLY, 1985; SCHULTZ, 1968; PORTER, 1959). No Brasil é uma planta nativa, não endêmica, e ocorre nos estados da Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (LIMA, 2010).

Esta espécie apresenta um grande potencial farmacológico por ser enquadrada no gênero *Rhamnus*, entretanto poucos estudos relatam suas propriedades. Possui também um grande potencial para uso na recuperação de ecossistemas degradados (ZANON; MEDEIROS, 2002).

TABELA 1. Classificação taxonômica.

	Cronquist (1968)		APG III (2009)
Reino	Plantae	Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta	Classe	Equisetopsida
Classe	Magnoliopsida	Subclasse	Magnoliidae
Subclasse	Rosidae	Superordem	Rosanae
Ordem	Rhamnales	Ordem	Rosales
Família	Rhamnaceae	Família	Rhamnaceae Juss.
Gênero	<i>Rhamnus</i>	Gênero	<i>Rhamnus</i> L.
Espécie	<i>Rhamnus sphaerosperma</i>	Espécie	<i>Rhamnus sphaerosperma</i>
Variedade	<i>pubescens</i>	Variedade	<i>pubescens</i>

Existem poucos relatos na literatura relacionados e direcionados para a espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*. Duarte *et al.* (2008) realizaram a caracterização microscópica das folhas e caule desse vegetal. De acordo com esse estudo, a folha é hipoestomática, com estômatos do tipo anormocítico; possui tricomas tectores longos, pluricelulares e unisseriados predominantes na face abaxial; seu mesofilo é dorsiventral com uma camada subepidérmica parenquimática junto a superfície adaxial. Possui ainda drusas e células mucilaginosas, e a nervura central e o pecíolo são percorridos por um feixe vascular colateral. O caule apresenta epiderme; seu felogênio tem instalação periférica. Ocorrem ainda fibras gelatinosas, fibras lignificadas e um cilindro floemático externo ao xilemático. Foram evidenciados canais secretores, drusas e células com compostos fenólicos na nervura central e pecíolo da folha e no caule (DUARTE, 2008).



FIGURA 1. *RHAMNUS SPHAEROSPERMA* VAR. *PUBESCENS*.

FONTE: MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA.

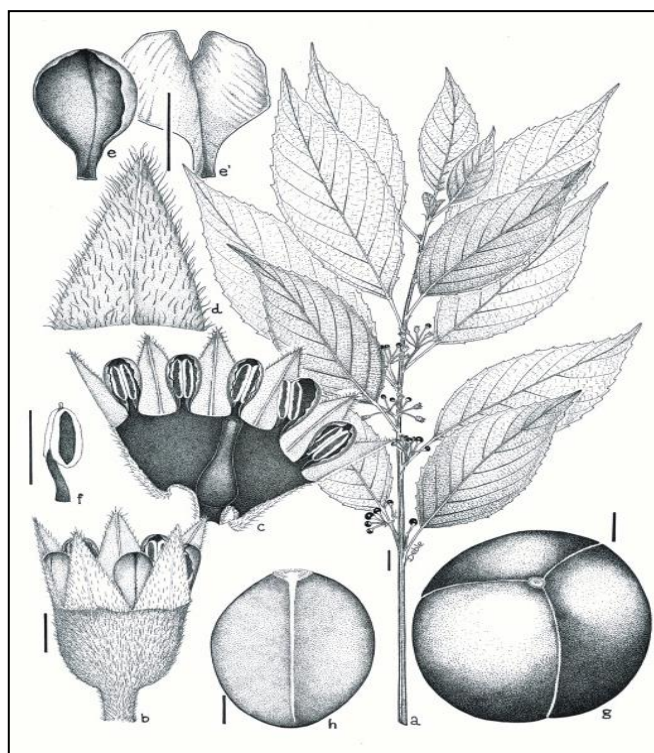


FIGURA 2. DESENHO ESQUEMÁTICO DE *RHAMNUS SPHAEROSPERMA* VAR. *PUBESCENS* (RHAMNACEAE).

FONTE: SANTOS, 2008

3.1.2. Aspectos farmacológicos e químicos

Muitas espécies da família Rhamnaceae destacam-se por suas características digitalóides, diuréticas e hipotensivas e por suas propriedades terapêuticas, como no tratamento de doenças infecciosas, no combate à febre, no tratamento da asma, na atividade laxativa e como tônicos. (CORRÊA, 1926).

Os estudos fitoquímicos com exemplares desta família têm demonstrado que a maioria das espécies apresenta em sua composição substâncias relacionadas à quinina, além de flavonoides, taninos, esteroides e triterpenos (VIANA, 2007).

Entre as espécies mais conhecidas e estudadas desta família destacam-se abaixo alguns gêneros e espécies, assim como suas atividades biológicas e principais componentes químicos.

A espécie *Ampelozizyphus amazonicus* é utilizada no tratamento dos sintomas da malária e como antídoto contra veneno de cobras na região amazônica. Essa planta também apresentou atividade contra *Tripanossoma cruzi* em testes *in vitro*, além de possuir saponinas e triterpenos com ação sobre a diurese, comprovado em testes com animais (ratos) (KRETTLI, 2001; ROSAS, 2007; DINIZ, 2009).

Colubrina retusa é outra espécie desta família e contém saponinas com pronunciada atividade antimicrobiana (LI, 1999; ELSOHL, 1999).

Existem ainda as plantas pertencentes ao gênero *Discaria*, que são utilizadas na medicina tradicional no tratamento de diabetes, afecções cutâneas e contra febre. A espécie *D. americana* possui atividade antibacteriana contra gram-negativos e gram-positivos, e apresenta em sua composição alcaloides ciclopeptídicos, triterpenóides, e óleo essencial, que contém alta atividade antioxidante (GIACOMELLI, 2004; RODRIGUEZ, 2008).

Outro gênero da família Rhamnaceae que inclui espécies com propriedades farmacológicas é o *Gouania*, do qual se destacam as espécies *G. lupuloides* e *G. ulmifolia*, utilizadas popularmente no tratamento de leishmaniose e dores estomacais, respectivamente. *G. ulmifolia* também apresenta triterpenóides com atividade antimicrobiana (GIACOMELLI, 2007; GACHET, 2010).

Do gênero *Hovenia* destaca-se a espécie *H. dulcis*, uma planta comumente utilizada para fins nutricionais e medicinais no continente asiático, sendo originária da China e Japão. Os extratos deste vegetal têm demonstrado propriedades antioxidante, antimicrobiana, antidiabética, hepatoprotetora, além da capacidade de detoxificação do etanol. Quanto à composição química, possui derivados saponínicos, saponinas triterpênicas e flavonóides (HYUN, 2010).

O gênero *Scutia* também apresenta relevância fitoquímica e farmacológica. A espécie *S. buxifolia* contém um teor elevado de flavonóides (quercetina, quercitrina, isoquercitrina, rutina) nas folhas e cascas. Esses flavonóides encerram alto poder antioxidante. Além desses compostos, a espécie possui também alcalóides ciclopeptídicos, que demonstraram capacidade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas (BOLIGON, 2009; MOREL, 2005). Antraquinonas isoladas de outra espécie deste gênero, a *S. myrtina*, apresentam propriedades anti-helmínticas e antiproliferativas sobre *Plasmodium falciparum* (AYERS, 2007; HOU, 2009).

Outro gênero relevante para esta família é o *Ziziphus*. As espécies deste gênero são reportadas por apresentarem diversas atividades biológicas e farmacológicas, entre as quais podemos citar atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, anti-helmíntica, antidiabética, ansiolítica, sedativa, entre outras. Quanto à composição química, já foram descritos alcalóides ciclopeptídicos, flavonóides, saponinas e triterpenos (PENG, 2000; LEE, 2003; ABDEL-ZAHER, 2005; BORGI, 2007; NISAR, 2007; PANDEY, 2008; BACHAYA, 2009).

Finalmente, o gênero *Rhamnus*, que inclui espécies de grande importância farmacológica e química, sendo as espécies *R. purshiana* e *R. frangula* as mais conhecidas no Brasil, principalmente por suas propriedades laxativas. Estas espécies são amplamente utilizadas pela população e sua composição química já está bem definida: apresentam compostos antraquinônicos, como antraquinonas livres (crisofanol, emodol), O-heterósidos (emodia-antrona), C-heterósidos, taninos, sais minerais e princípios amargos (SYDISKIS, 1991; SIMÕES, 2004; CUNHA, 2010).

Existem ainda outras espécies com relevância química e farmacológica neste gênero. Dentre elas estão *R. nepalensis*, *R. alaternus*, *R. lycioides*, *R. nakarai*, *R. alpinus*, *R. formosana* e *R. cathartica*.

A espécie *R. nepalensis*, também conhecida como *R. nipalensis*, possui em sua composição esteróides e triterpenos, isoflavona (di-O-metildaidzeína), flavonóides e antraquinonas, entre as quais destaca-se a emodina. Este vegetal é utilizado pela medicina popular no tratamento de herpes e como hipotensivo, e possui ação citotóxica comprovada contra células provenientes de carcinoma humano (nasofaringe) (SINGH, 2001; MAI, 2001).

Rhamnus alaternus apresenta diversas atividades, como, antibacteriana, antimutagênica, antigenotóxica, antioxidante, laxativa, purgativa, hipotensiva e capacidade de indução de apoptose em células cancerígenas. Quanto a sua composição química, já foram descritos flavonóides e antraquinonas, dentre elas a emodina (LONGO, 2005; AMMAR, 2008, AMMAR, 2011; BHOURI, 2011).

A espécie *R. lycioides* é conhecida por sua forte propriedade hipotensora, sendo o principal mecanismo de ação desta atividade a inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA). Possui em sua constituição química flavonóides, esteróides e triterpenos, catequinas, taninos, açúcares, resinas e compostos antraquinônicos. A atividade anti-hipertensiva tem sido atribuída a procianidina glicosilada (TERENCIO, 1990; TERENCIO, 1991).

Rhamnus nakaharai tem como propriedades a inibição de fosfodiesterases, atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, inibição da agregação plaquetária, além do tratamento da constipação intestinal e asma (WEI, 2001; NG, 2007).

Rhamnus alpinus apresenta ação sobre o sistema gastrointestinal, além das propriedades antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antioxidante. Em sua constituição química estão presentes as antraquinonas aloemodina, reína, emodina, crisofanol e fisciona (GENOVESE, 2010).

A espécie *Rhamnus formosana* tem atividade anti-inflamatória e apresenta flavonóides e antraquinonas (LIN, 1991). Por fim, a espécie *R. cathartica*, que é conhecida por sua toxicidade, porém, também é usada como purgativa (LICHTENSTEIGER, 1997).

Com base nos dados obtidos na literatura, conclui-se que entre os principais componentes químicos encontrados na família Rhamnaceae, considerando-se principalmente o gênero *Rhamnus*, estão os derivados antraquinônicos.

3.1.2.1. Compostos antraquinônicos

As antraquinonas pertencem à classe química das quinonas, que são produtos de oxidação de fenóis, e apresentam uma estrutura composta por dois grupamentos carbonílicos e duas ligações duplas entre carbonos. As quinonas são classificadas de acordo com o tipo de anel no qual estão inseridos os grupos carbonílicos e as duplas ligações (naftoquinonas, benzoquinonas e antraquinonas).

A estrutura química básica das antraquinonas (figura 3) é um anel antraceno com dois grupos cetonas nas posições C9 e C10 (SIMÕES, 2004; CUNHA, 2010).

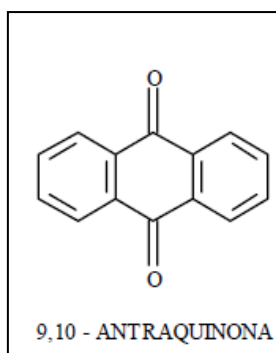


FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA BÁSICA DAS ANTRAQUINONAS.

FONTE: SIMÕES, 2004

As antraquinonas são as quinonas de maior relevância devido a sua importância farmacêutica. Entre as propriedades biológicas e farmacológicas descritas para antraquinonas estão toxicidade para cupins, ação protetora contra insetos, atividade alelopática, efeito laxante, atividade antiprotozoária, antibacteriana, antifúngica e antitumoral, porém o uso como agente laxativo é o mais aplicado para esta classe de metabólitos (SIMÕES, 2004; CUNHA, 2010).

Já foram descritas diversas antraquinonas para o gênero *Rhamnus*, (figura 4), das quais destaca-se a emodina, de grande interesse farmacológico, devido à diversidade de atividades biológicas que tem apresentado. Este metabólito secundário tem sido encontrado em diversas espécies vegetais, principalmente das famílias Fabaceae, Polygonaceae e Rhamnaceae, sendo esta última representada principalmente pelos gêneros *Rhamnus* e *Ventilago*. No gênero *Rhamnus* existem 23 espécies nas quais este metabólito já foi identificado. A antraquinona emodina,

tanto em sua forma livre (aglicona) como a glicosilada, tem sido isolada de várias partes das plantas (cascas, caule, folhas, flores, sementes e frutos) (IZHAKI, 2002).

Apesar do amplo uso dos compostos antraquinônicos como agentes laxativos, estudos recentes indicam que este uso, quando em grandes quantidades e/ou em longo prazo, pode estar associado ao aumento do risco no desenvolvimento de tumores colo-retal; entretanto, o uso em curtos períodos é considerado seguro. Outro fator relevante na utilização medicinal de antraquinonas são as interações medicamentosas, pois, devido a sua ação laxativa, podem diminuir a absorção de outros fármacos, e conseqüentemente, diminuir a eficácia do outro tratamento (VAN GORKON, 1999).

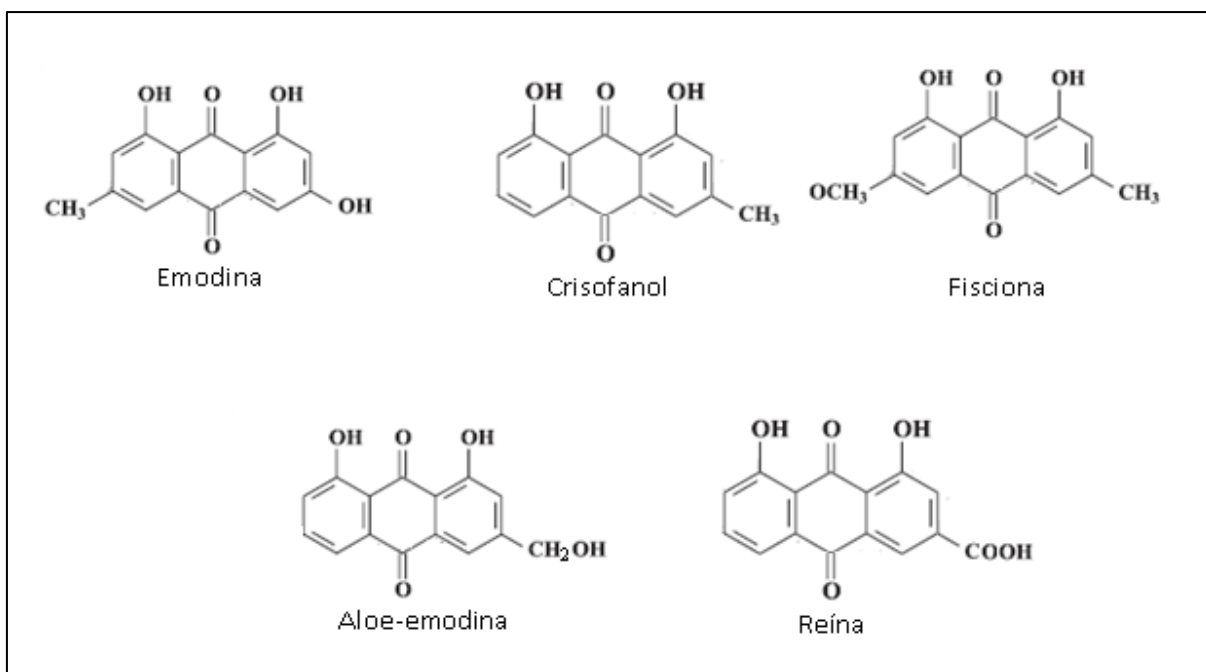


FIGURA 4. ALGUMAS ANTRAQUINONAS DESCRITAS PARA ESPÉCIES DO GÊNERO *RHAMNUS*.
FONTE: SIMÕES, 2004.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

4.1.1. Coleta, Identificação e exsicata

O material vegetal foi coletado na Universidade Federal do Paraná, *campus* Jardim Botânico, em maio de 2011. A determinação botânica foi realizada no herbário do Museu Botânico Municipal da cidade de Curitiba. A amostra foi comparada com a exsicata da espécie, (Figura 10), depositada na coleção botânica do museu sob o número 243989.

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados folhas e caules de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.



FIGURA 5. EXSICATA N°243989: ESPÉCIE *RHAMNUS SPHAEROSPERMA* VAR. *PUBESCENS*.
FONTE: MUSEU BOTÂNICO MUNICIPAL DE CURITIBA.

4.1.2. Análises físico-químicas

4.1.2.1. Umidade (Perda por dessecação)

A metodologia utilizada para a determinação da umidade foi realizada conforme descrito na Farmacopéia brasileira V (2010).

4.1.2.2. Cinzas totais

O método utilizado para determinação das cinzas totais está presente na Farmacopéia brasileira V. A porcentagem de cinzas totais foi calculada em relação à droga seca ao ar.

4.1.2.3. Cinzas insolúveis em ácido

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi utilizado para a determinação das cinzas insolúveis em ácido. A metodologia utilizada está presente na Farmacopéia brasileira V. A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido foi calculada em relação a droga seca ao ar.

4.1.3. Ensaio sistemático de prospecção fitoquímica

O ensaio sistemático tem como objetivo a identificação dos principais grupos do metabolismo secundário das espécies vegetais, através da identificação por reações de precipitação ou coloração. Esse ensaio foi realizado segundo MOREIRA (1979), adaptado por Miguel (2003).

Foram utilizados os extratos aquoso 20% (m/v) e hidroalcoólico 20% (m/v), ambos obtidos por maceração, para pesquisa da presença dos grupos químicos, segundo a tabela 2.

TABELA 2. Grupos químicos de metabólitos secundários pesquisados no ensaio fitoquímico sistemático.

	Extrato Aquoso	Extrato Hidroalcoólico
GRUPOS QUÍMICOS	Heterosídeos antociânicos	Alcalóides
	Heterosídeos saponínicos	Ácidos orgânicos
	Gomas e mucilagens	Compostos fenólicos
	Taninos	Flavonóides
	Aminogrupos	Cumarinas
	Ácidos voláteis	Antraquinonas
	Ácidos fixos	Esteróides e triterpenos

4.1.4. Análises microquímicas

Os testes microquímicos foram realizados para a verificação de componentes químicos marcadores nos tecidos vegetais. Para a realização dos testes, amostras frescas de folhas e caules, obtidas a 5 cm do ápice dos ramos, foram coletadas e fixadas em uma solução de formaldeído, ácido acético e álcool (FAA). Posteriormente, foram realizados cortes transversais a mão livre para a confecção das lâminas (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Através de reagentes químicos por reações de identificação foram pesquisados compostos fenólicos (cloreto férrico), substâncias lipofílicas (Sudam III), amiloplastos (lugol) e lignina (floroglucina clorídrica) (KRAUS; ARDUIN, 1997).

O material foi observado em microscópio óptico, no aumento de 200 vezes, e fotografado com o auxílio de câmera fotográfica para microscópio óptico, modelo TCA - 1.3, marca ALLTION®.

4.2. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

4.2.1. Obtenção dos extratos a serem trabalhados

As amostras de planta seca, estabilizada e moída, foram pesadas e extraídas com etanol 96°GL, em aparelho de Soxhlet modificado, para a obtenção do extrato alcoólico bruto (CARVALHO, 2001).

A um aparelho de Soxhlet foi conectado um condensador de bolas e um balão de fundo chato contendo pérolas de vidro. A esse sistema foram adicionados cerca de 4L de etanol 96°GL. Para a utilização deste equipamento, foram introduzidos cerca de 2kg do material vegetal seco no suporte de vidro do aparelho (este contém uma placa porosa e uma camada de algodão para conter o material vegetal). Sobre este sistema foi adicionado cerca de 4L de etanol 96°GL para extração. Todo o sistema foi levado ao aquecimento (60°C) em manta aquecedora e deixado em refluxo, de modo a obter o extrato alcoólico por extração em meio solvatado. Com o sistema sob aquecimento, o álcool presente no balão é evaporado e posteriormente condensado no condensador de bolas. Desse modo, o líquido extrator percorre novamente o material vegetal, permitindo desta forma a extração do mesmo (CARVALHO, 2001).

No momento em que o menisco do extrato no canal lateral do Soxhlet atingiu o ponto de refluxo, o extrato foi descarregado no balão por sifonamento passivo e o processo foi repetido dez vezes. Este procedimento previne a degradação térmica de substâncias no balão, uma vez que a quantidade de líquido extrator é constante no sistema e é capaz de solvatar os compostos presentes.

Após a produção dos extratos alcoólicos brutos, foi determinado o teor de sólidos, segundo a metodologia da Farmacopéia brasileira V (2010). Foram pipetados volumetricamente 10 mL do extrato bruto e transferidos para uma placa de Petri previamente dessecada. A placa foi acondicionada em estufa a 105°C até peso constante. A diferença entre a massa da placa com o resíduo do extrato e a placa vazia forneceu o teor de sólidos por 10 mL do extrato.

4.2.1.1. Fracionamento dos extratos etanólicos brutos

As frações foram obtidas através do sistema de partição líquido-líquido. Foram utilizados solventes de diferentes polaridades, em ordem crescente de polaridade (n-hexano, clorofórmio, acetato de etila). Todos os solventes utilizados apresentavam padrão analítico.

Para o sistema de partição líquido-líquido foi utilizado o aparelho Soxhlet modificado, contendo o extrato alcoólico bruto, conectado ao condensador de bolas e a um balão de fundo chato com pérolas de vidro, onde foi inserido o solvente utilizado de acordo com a fração desejada. Todo o sistema foi levado ao aquecimento em manta aquecedora e deixado sob refluxo por cerca de 6 horas.

Durante a obtenção da fração hexânica do caule ocorreu a formação de um precipitado marrom-avermelhado, o qual foi submetido à análise por cromatografia em camada delgada e, posteriormente, à purificação por cromatografia em coluna.

4.2.2. Análise e purificação das frações

As frações foram previamente analisadas através de métodos cromatográficos (cromatografia em camada delgada e por cromatografia líquida de alta eficiência).

Para as análises de cromatografia em camada delgada, foram utilizadas cromatoplasmas de sílica Sílica-gel 60 F254 Merck[®]. As amostras foram diluídas em metanol ou clorofórmio, de acordo com a sua solubilidade. Como fase móvel foi utilizada uma solução de hexano, acetato de etila e ácido fórmico (6:6:0,3). As placas foram visualizadas com lâmpada UV no comprimento de onda de 360 nm, e quando necessário, reveladas com dietilamina.

A purificação das frações foi realizada através de cromatografia em coluna. Cada fração (hexânica e seu precipitado, clorofórmica e acetato de etila) foi incorporada a sílica-gel 60, para a formação da pastilha de sílica. Esta pastilha foi submetida à cromatografia em coluna, onde ocorreu a eluição da amostra através do sistema de passagem de solventes (hexano, acetato de etila e metanol) com

gradientes de polaridades crescentes. O controle de eluição foi feito com lâmpada de luz UV a 360 nm.

As características das frações recolhidas foram observadas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se cromatoplaças de Sílica-gel 60 F254 Merck®.

4.2.2.1. Isolamento dos compostos T1 a T5

A cromatografia em coluna do precipitado da fração hexano (20,19g) deu origem a compostos codificados como T1, T2, T3, T4 e T5.

Nesta cromatografia foi utilizado um gradiente de polaridade com início em 100% de hexano até 100% de acetato de etila, e de 100% de acetato até 80% de metanol, e para limpeza da coluna foram utilizados 100% de etanol e 100% de água. Os dados cromatográficos estão presentes na tabela 3.

O composto T1 foi obtido após a evaporação do solvente, que promoveu a cristalização das substâncias, com a formação de cristais alaranjados. Esses cristais foram lavados com éter de petróleo para retirada da resina que havia no mesmo frasco. Após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), os frascos semelhantes foram reunidos.

Os demais frascos, após análises em CCD, foram reunidos, e após a secagem foi observada a formação de cristais. Posteriormente, em novas análises de CCD foram constatadas as presenças de apenas três substâncias em cada um dos frascos codificados como F94-97, F78-79, F78-79.2 (separado por raspagem após a secagem do solvente pela diferença de coloração) e F100-133.

As amostras F94-97, F78-79 e F100-133 foram submetidas à cromatografia preparativa em vácuo, com fase móvel composta por hexano, acetato de etila e ácido fórmico (6:6:0,3; ou 6:3:0,3) obtendo-se os compostos T2, T3 e T5, respectivamente.

O conteúdo do frasco F78-79.2 foi solubilizado em metanol, onde foi observada a formação de cristais no fundo do frasco. A amostra então foi submetida a baixa temperatura (-20°C) para aumentar o grau de cristalização, os cristais foram separados por centrifugação (5 min., 14.000 r.p.m.) e lavados com metanol, este isolado foi codificado como T4.

TABELA 3. Cromatografia em coluna do precipitado da fração hexano do caule de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

Hexano (%)	Acetato de etila (%)	Frascos
100	—	—
95	05	01 – 04
90	10	05 – 15
85	15	16 – 20
80	20	21 – 30
75	25	31 – 36
70	30	37 – 41
65	35	42 – 46
60	40	47 – 57
55	45	58 – 63
50	50	64 – 68
45	55	69 – 73
40	60	74 – 78
35	65	79 – 83
30	70	84 – 88
25	75	89 – 93
20	80	94 – 97
15	85	98 – 102
10	90	103 – 107
05	95	108 – 112
—	100	113 – 117
Metanol (%)	Acetato de etila (%)	Frascos
05	95	118 – 123
10	90	124 – 127
15	85	128 – 133
20	80	134 – 139
25	75	140 – 144
30	70	145 – 150
40	60	151 – 156
50	50	157 – 161
60	40	162 – 167
70	30	168 – 172
80	20	173 – 177

4.2.2.2. Isolamento do composto T6

O composto T6 foi obtido através da cromatografia em coluna da fração hexano do caule (15,0g), utilizando-se gradiente de polaridade a partir de 100% de hexano até 100% de acetato de etila (escala com intervalos de 5%) e de 100% de

acetato de etila até 60% de metanol (escala em 10%). Os dados cromatográficos podem ser observados na tabela 4.

TABELA 4. Cromatografia em coluna da fração hexano do caule de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

Hexano (%)	Acetato de etila (%)	Frascos
100	—	1 – 26
95	05	27 – 36
90	10	37 – 44
85	15	45 – 54
80	20	55 – 61
75	25	62 – 71
70	30	72 – 80
65	35	81 – 89
60	40	90 – 98
55	45	99 – 107
50	50	108 – 114
45	55	115 – 125
40	60	126 – 132
35	65	133 – 141
30	70	142 – 151
25	75	152 – 158
20	80	159 – 163
15	85	164 – 171
10	90	172 – 176
05	95	177 – 183
—	100	184 – 207
Metanol (%)	Acetato de etila (%)	Frascos
05	95	208 – 215
10	90	216 – 223
20	80	224 – 232
30	70	233 – 241
40	60	242 – 247

Após a evaporação do solvente, os frascos 43 a 49 apresentaram cristais com coloração branca misturados com uma substância de característica oleosa, de cor verde. O conteúdo desses frascos foram reunidos e submetidos a nova purificação por cromatografia em coluna, com fase estacionária de sílica-gel 60 e fase móvel com gradiente de polaridade a partir de 100% de éter de petróleo até

100% de hexano e 100% de hexano até 100% de acetato de etila. Os dados cromatográficos estão apresentados na tabela 5.

TABELA 5. Cromatografia em coluna dos frascos 43 a 49 da fração hexano do caule de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

Éter de petróleo(%)	Hexano (%)	Frascos
100	—	1 – 12
95	05	13 – 16
90	10	17 – 19
85	15	20 – 23
80	20	24 – 26
75	25	27 – 29
70	30	30 – 33
60	40	34 – 36
55	45	37 – 39
50	50	40 – 43
40	60	44 – 47
Acetato de Etila (%)	Hexano (%)	Frascos
—	100	48 – 50
10	90	51 – 60
20	80	61 – 68
50	50	69 – 75
100	—	76 – 81

Após esta purificação os frascos 66 a 68 foram lavados com éter de petróleo, obtendo-se uma substância cristalina de coloração branca, denominada T6.

4.2.3. Elucidação estrutural

As substâncias isoladas foram submetidas às análises espectrométricas para determinação de sua estrutura. Os ensaios realizados foram espectroscopia de ressonância nuclear magnética de ^1H e ^{13}C . Estes experimentos foram realizados no departamento de Química (UFPR).

4.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE

As análises para determinação do perfil antioxidante foram realizadas para todas as amostras (extratos brutos e frações) de folhas e caules de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*.

4.3.1. Formação do complexo fosfomolibdênio

Essa análise se baseia na técnica descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), e apresenta a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos, quanto hidrofílicos.

O reativo foi preparado 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), e água q.s.p. 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento do uso. Soluções padrões de ácido ascórbico (vitamina C) e rutina, bem como as amostras testadas, foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol (BIANCO, 2003).

Em tubo de ensaio, foram adicionados 3 mL de reativo e 0,3 mL da amostra. Este procedimento foi realizado para os padrões e para o branco (no qual foi utilizado metanol). A análise foi realizada em triplicata.

Os tubos foram fechados e levados ao banho-maria a 95°C por 90 min. Após o resfriamento, foi realizada a leitura de absorvância no comprimento de onda 695nm, em espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu®. A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR%), em relação à rutina (200µg/mL) e vitamina C (200µg/mL), usadas como padrão. Os resultados foram calculados da seguinte maneira:

$$\text{AAR\% VITAMINA C} = \left(\frac{\text{Abs}_A - \text{Abs}_{\text{Branco}}}{\text{Abs}_{\text{Vitamina C}} - \text{Abs}_{\text{Branco}}} \right) \times 100$$

$$\text{AAR\% RUTINA} = \left(\frac{\text{Abs}_A - \text{Abs}_{\text{Branco}}}{\text{Abs}_{\text{Rutina}} - \text{Abs}_{\text{Branco}}} \right) \times 100$$

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

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

O potencial de redução do DPPH pelas amostras foi analisado espectrofotometricamente segundo Mensor *et al.* (2001). Foram preparadas cinco soluções metanólicas das amostras em diferentes concentrações, das quais 2,5mL foram colocados em contato com 1mL da solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Como branco foram utilizados 2,5mL da solução de cada amostra e 1mL de metanol. E também um controle com 2,5mL de metanol e 1mL de solução de DPPH. Após 30 min de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518nm. Como padrões foram utilizados rutina e vitamina C. A habilidade dos extratos em reduzir o radical foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ Inibição do DPPH} = 100 - \left(\frac{Abs_A - Abs_{Branco}}{Abs_{Controle}} \right) \times 100$$

4.3.3. Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método é útil para avaliar a potencialidade de diferentes amostras em inibir o processo de peroxidação de lipídios. A dosagem das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) reflete a quantidade de malondialdeído (MDA) formado na degradação de lipídios promovida pela peroxidação. O teste foi realizado segundo Morais *et al.* (2006), com modificações.

Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,1 mL de uma solução de amostra na concentração de 70µg/mL em etanol, 0,4 mL de H₂O, 0,5 mL de solução de gema de ovo 5% (p/v) previamente preparada em solução de SDS 0,55% (dodecil sulfato de sódio), 50 µL de ABAP 35mM (cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano), 1,5mL de

ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de TBA 0,4% (ácido tiobarbitúrico) também preparada em solução de SDS 0,55%. Os tubos foram levados a banho-maria a 95°C por 1 hora. Após o resfriamento da solução, adicionou-se 1,5 mL de 1-butanol, para extração da fase orgânica. Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min. Em seguida, foi realizada a leitura do sobrenadante em 532nm. Como branco foi utilizado o 1-butanol. Como controle negativo, foi utilizada a mesma solução, sendo a amostra substituída por 0,1 mL de etanol. O teste foi realizado em quintuplicata.

As espécies reativas do ácido tiobarbitúrico foram calculadas pela equação:

$$IA\% = \left(1 - \frac{Abs_A}{Abs_{CN}}\right) \times 100$$

4.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM *Artemia salina*

4.4.1. Eclosão dos cistos

Os cistos de *Artemia salina* foram estimulados a eclodir para a obtenção dos náuplios. Para isso, cistos (200 mg/400 mL) foram colocados em solução salina (23 g NaCl; 11 g MgCl₂·6H₂O; 4 g Na₂SO₄; 1,3 g CaCl₂·2H₂O ou CaCl₂·6H₂O; 0,7 g KCl, 1000 mL de água destilada, pH 9), sob aeração contínua, exposição à iluminação (20W) e temperatura ambiente durante 48 horas.

O ensaio foi realizado para os extratos brutos e suas respectivas frações, das folhas e caules, nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL. As amostras foram diluídas em etanol e colocadas em frascos adequados para a realização do teste. O solvente foi evaporado em estufa a 50°C, 24 horas antes do teste. Como controle positivo, foi utilizado sulfato de quinidina, nas mesmas concentrações das amostras. Também foi realizado o controle com etanol. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Foram transferidos 30 náuplios de *Artemia salina* para cada frasco contendo as amostras ou controles e o volume foi ajustado para 2,5 mL. Após 24 horas de contato com as amostras, foi realizada a contagem dos indivíduos mortos. Os dados foram submetidos à análise pelo método estatístico Probitos para a determinação

dos valores de DL_{50} com intervalo de confiança de 95%. As amostras foram consideradas tóxicas quando os valores de DL_{50} se apresentaram menores que $1000\mu\text{g/mL}$ (MEYER *et al.*, 1982).

4.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA *IN VITRO*

A avaliação da atividade hemolítica das amostras foi realizada conforme preconizado no manual de Métodos de Controle de Qualidade para Materiais de Plantas Medicinas publicado pela Organização Mundial as Saúde (OMS, 1988).

4.5.1. Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue

Em discos de papel filtro Whatman ($n^{\circ}1$), com aproximadamente 7mm de diâmetro, foram aplicados 20 μL da amostra a ser testada, na concentração de $1000\mu\text{g/mL}$. Após este procedimento, os discos foram levados à secura, em estufa a 50°C , sobre ágar sangue. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 35°C . As amostras com atividade hemolítica provocaram a formação de halo hemolítico no agar sangue e este foi medido para a comparação com o controle positivo (saponina 1mg/mL). Foi realizado o controle dos solventes utilizados para diluição das amostras; onde 20 μL de solvente foram aplicados no disco de papel e levado a secura em estufa a 50°C , e aplicados sobre o ágar.

4.5.2. Atividade hemolítica com hemácias em suspensão

Para o preparo da suspensão cerca de 5 mL de sangue de carneiro (Newprov[®]) foram lavados com tampão fosfato pH 7,4 e centrifugados até a obtenção do sobrenadante límpido e incolor. Então 1mL foi transferido para o balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com tampão fosfato pH 7,4. Esta suspensão foi usada enquanto o líquido sobrenadante permaneceu límpido e incolor e mantida fria.

Para a realização do teste, os extratos e frações foram diluídos com tampão fosfato, nas concentrações de 50, 100, 250 e 500 µg/mL e colocados em contato com a suspensão de hemácias a 2%.

Os tubos de ensaio foram agitados cuidadosamente, evitando a formação de espuma. Após 30 min de repouso foram agitados novamente e deixados em repouso por 150 min.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 5 min, a 2500 rpm. Então foi verificada a formação hemólise total (solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos).

Nos tubos onde ocorreu hemólise, foi realizado outro teste para a quantificação da menor concentração de amostra onde ocorreu a atividade hemolítica. As concentrações testadas foram 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 e 500 µg/mL. Os tubos foram observados após 24 horas, e a menor concentração com atividade hemolítica foi determinada para a menor concentração com hemólise total.

4.6. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos e frações foi empregado o método microdiluição, para determinar a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Microbicida Mínima. Para realização dos testes foram utilizados *Staphylococcus aureus* ATCC[®]25293[™], *Staphylococcus epidermidis* ATCC[®]12228[™], *Salmonella thyphimurium* ATCC[®]14028[™], *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®]9027[™], *Escherichia coli* ATCC[®]25922[™] e *Candida albicans* SC5314.

As cepas em teste foram repicadas em caldo BHI (bactérias) e Sabouraud (fungos) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, as suspensões microbianas foram comparadas e padronizadas de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala McFarland. Então, 100µl de cada cepa foram inoculadas em 1800µl do meio (BHI ou Sabouraud), e 10µl dessa mistura foram adicionados em cada poço da placa de cultura de células já contendo o meio com as amostras.

As amostras utilizadas foram os extratos alcoólicos brutos e suas respectivas frações, nas concentrações de 12,5; 25; 50; 100; 200 e 400 µg/mL.

Os extratos e frações foram dissolvidos em BHI ou Sabouraud e filtrados em membrana estéril com poros de 0,22µm, para esterilização das soluções. Em seguida, 100µl de cada concentração foram transferidos para cada poço da placa de cultura de células. As placas foram fechadas e mantidas em estufa a 37°C. Os resultados foram lidos nos tempos de 24 e 48 horas após a inoculação. A formação de um botão de crescimento microbiano no fundo da placa de cultura indica que o extrato apresenta capacidade de inibição do crescimento dos microrganismos na concentração em teste. Os ensaios foram realizados em triplicata (ANVISA, 2003).

O conteúdo de cada poço onde a MIC foi determinada foi transferido, com o auxílio de um swab estéril, para uma placa de petri, previamente preparada contendo apenas agar BHI. As placas foram incubadas em estufa, a 37°C, por 24 horas. O crescimento microbiano nesta placa indica que a amostra possui apenas atividade bacteriostática ou fungistática (capacidade de inibir o crescimento). Por outro lado, a ausência de crescimento microbiano indica que a amostra possui, atividade microbicida (capacidade de provocar a morte das células dos microrganismos) (ANVISA 2003).

4.7.AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DO CAULE SOBRE O SISTEMA GASTROINTESTINAL

Para verificar a atuação do extrato bruto do caule sobre o sistema gastrointestinal foram avaliados os seus efeitos sobre a motilidade gastrointestinal e atividade antiulcerogênica frente a ingestão de etanol absoluto, em modelos experimentais com animais.

4.7.1. Avaliação sobre a motilidade gastrointestinal

4.7.1.1. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) variedade *Swiss*, adultos jovens, machos, pesando entre 25 e 30g, provenientes do biotério da PUCPR. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais-PUCPR, protocolo nº 700.

4.7.1.2. Esvaziamento gástrico de semissólidos

Camundongos (n=8) em jejum de 6 horas foram tratados, por via oral (gavagem), com extrato alcoólico bruto do caule de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* nas doses de 20, 100 e 500 mg/kg. Após 1 hora dos tratamentos, foi administrado 500µL do marcador colorido (vermelho de fenol 0,5% em carboximetilcelulose 1,5%) e após 15 min os animais foram eutanasiados por tiopental (200 mg/kg). A cavidade abdominal foi aberta, o piloro e a parte distal do esôfago foram pinçados. O estômago retirado com seu conteúdo e triturado com 10 mL de água destilada. O homogenato foi centrifugado a 1500 rpm por 15 min, e então 1,0 mL do sobrenadante foi coletado e misturado com 1,0 ml de NaOH 1N (pH12). Os resultados foram obtidos por leitura espectrofotométrica a 560 nm e expressos em porcentagem de esvaziamento gástrico em relação ao grupo controle tempo zero (SCARPIGNATO, 1980).

O grupo controle tempo zero (administração apenas do marcador colorido) foi eutanasiado logo após a administração do marcador. Adicionalmente, foram utilizados como controles atropina via subcutânea 3mg/kg, metoclopramida via oral 30mg/kg e soro fisiológico (veículo utilizado para diluir os extratos) via oral (0,1mL/10g).

4.7.1.3. Trânsito Intestinal

Os mesmos animais (n=8) do experimento anterior (esvaziamento gástrico de semissólidos) tiveram suas cavidades abdominais abertas e após o pinçamento e remoção do estômago, seus intestinos delgados foram removidos. Com auxílio de uma régua, determinou-se o comprimento total do intestino delgado de cada animal (distância entre o piloro até a válvula ileocecal), e a distância percorrida pelo marcador (até a última porção que contenha pelo menos 1 cm contínuo do marcador). Os resultados foram expressos em porcentagem da distância percorrida pelo marcador em relação ao comprimento total do intestino delgado (STICKNEY, 1959).

Como controles foram utilizados soro fisiológico 0,1mL/10g por via oral, atropina subcutânea 3mg/kg e neostigmina subcutânea na dose de 20µg/kg.

4.7.2. Avaliação da atividade antiulcerogênica

4.7.2.1. Animais

Foram utilizados ratos (*Ratus norvegicus*, variedade Wistar) adultos, fêmeas, pesando entre 150 e 300g provenientes do biotério da PUC-PR. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais-PUCPR, protocolo nº 700.

4.7.2.2. Lesões gástricas induzidas por etanol absoluto

As lesões gástricas induzidas por etanol (indução aguda) foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Robert *et al.* (1979).

Os animais foram mantidos em jejum por 12 – 18 horas, com acesso livre a água. O extrato alcoólico do caule foi administrado por via oral (gavagem) nas doses

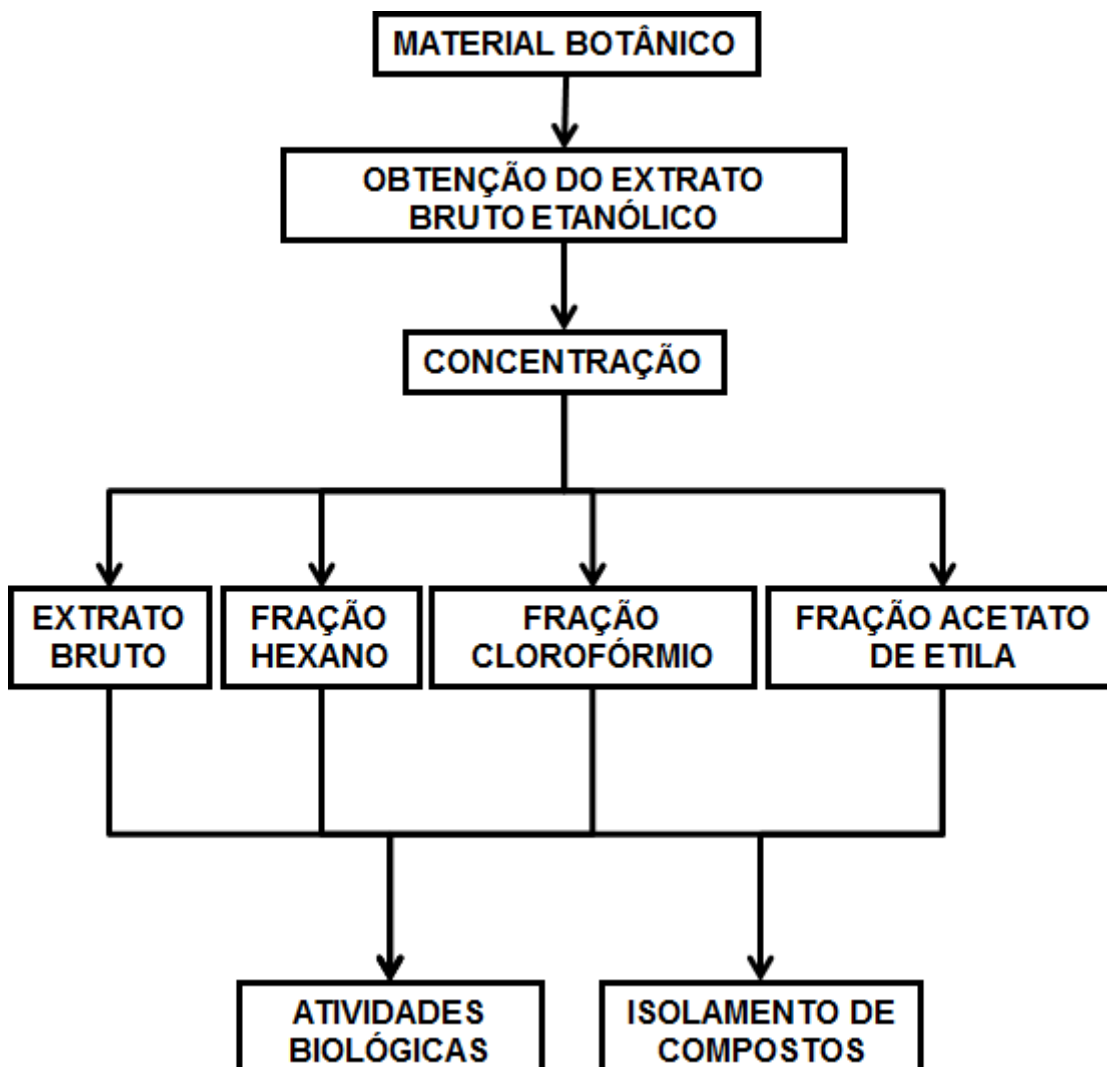
de 20, 100 e 500 mg/kg. Uma hora após o tratamento com o extrato, etanol absoluto (0,5 mL/200 g) foi administrado também por via oral (gavagem).

Após uma hora da administração do etanol, os animais foram eutanasiados com ketamina (100mg/kg) e xylasina (50mg/kg) e os estômagos foram removidos, distendidos e fixados com alfinetes para a analisar e fotografar as lesões gástricas. Como controles foram utilizados soro fisiológico (0,1 mL/100 g) e omeprazol (40 mg/kg). A avaliação das lesões gástricas induzidas por etanol foi realizada através do programa *Image Proplus*, no qual a área total lesionada foi expressa em porcentagem, em comparação com a área total de cada estômago.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas através da avaliação da variância pelo teste ANOVA seguida da análise de diferença pelo teste de Tukey (utilizando o programa *Statística 5.1*).

5. FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS



6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. MATERIAL VEGETAL

6.1.1. Análises físico-químicas

Os parâmetros para as análises do teor de umidade, cinzas totais e insolúveis em ácido estão sendo determinados pela primeira vez para a espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*. Os dados obtidos por meio dessas análises estão sumarizados na tabela 6.

TABELA 6. Análises físico-químicas do material vegetal.

Análise	Folhas	Caule
Umidade (%)	11,823 ± 0,224	12,615 ± 0,454
Cinzas totais (%)	7,943 ± 0,199	3,463 ± 0,535
Cinzas insolúveis (%)	4,869 ± 0,790	6,269 ± 1,821

A determinação destas análises indica a quantidade de matéria intrínseca no vegetal, e desta maneira, auxiliam na confirmação da identidade botânica, além de permitirem a identificação de adulterações e materiais estranhos na matéria-prima vegetal. Estes dados são considerados parâmetros de qualidade, e são amplamente utilizados para garantir a confiabilidade dos vegetais utilizados na produção de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2010).

6.1.2. Ensaio sistemático de análise fitoquímica

Os resultados obtidos durante a pesquisa dos grupos de metabólitos secundários (marcha fitoquímica) para folhas e caules da espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* podem ser observados na tabela 7.

TABELA 7. Classe de metabólitos identificados pela análise fitoquímica em *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

Extrato	Aquoso Folhas	Hidroalcoólico Folhas	Aquoso Caule	Hidroalcoólico Caule
Grupo Fitoquímico	Heterosídeos antociânicos	Ácidos orgânicos	Heterosídeos antociânicos	Ácidos orgânicos
	Heterosídeos saponínicos	Fenóis	Heterosídeos saponínicos	Fenóis
	Gomas e mucilagens	Flavonóides	Gomas e mucilagens	Flavonóides
	Aminogrupos	Cumarinas	Aminogrupos	Cumarinas
	Ácidos fixos	Antraquinonas	Ácidos fixos	Antraquinonas
	-	Esteróides/ triterpenos	-	Esteróides/ triterpenos

Neste ensaio, as reações indicativas de compostos pertencentes a classe das antraquinonas apresentaram os resultados mais expressivos. Estes dados contribuem para o direcionamento das pesquisas na identificação destas substâncias, e desta maneira, auxiliam no processo de escolha do possível marcador fitoquímico como parâmetro de qualidade, tanto para a matéria-prima vegetal, assim como de produtos obtidos desse vegetal.

6.1.3. Análises microquímicas

As análises microquímicas revelaram a presença de compostos fenólicos (teste com cloreto férrico) e amiloplastos (teste com lugol) nas estruturas da folha e do caule.

A partir da reação de coloração com Sudam III foi observado que a folha é revestida por uma cutícula delgada, de característica lipofílica, e que possui tricomas também resvestidos por esta cutícula. Este teste demonstrou a presença de suberina no revestimento do caule, o qual também possui tricomas.

Através do teste com floroglucina clorídrica foram observadas estruturas lignificadas no caule e nervura central da folha.

Esses testes são úteis no controle de qualidade da matéria-prima vegetal, pois, uma vez identificadas suas características estruturais e químicas, como por exemplo a presença de compostos fenólicos, amido ou quais estruturas são lignificadas, é possível determinar possíveis trocas da matéria-prima, garantindo o uso correto da planta medicinal.

6.2. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

6.2.1. Rendimento dos extratos e frações

O rendimento do extrato etanólico bruto obtido a partir do caule foi $3,962\% \pm 0,169$ e para o extrato bruto obtido das folhas foi de $16,214\% \pm 0,281$.

Foram obtidos 342,63g de extrato etanólico bruto do caule e 179,50g das folhas de *R. sphaerosperma*. Destes, foram retirados 23,26g do extrato bruto do caule e 19,76g do extrato bruto das folhas, para realização das atividades biológicas, sendo o restante utilizado no particionamento para obtenção das frações. A tabela 8 demonstra o rendimento das frações em relação à quantidade de extrato etanólico bruto utilizado.

O método de extração utilizado foi por aparelho de Soxhlet, pois as temperaturas de trabalho máximas não ultrapassam 60°C, prevenindo a alta degradação térmica. Isso ocorre por solvatação da amostra pelo solvente, e por se tratar de um sistema fechado, a perda de componentes voláteis é menor em comparação a outros métodos, como infusão e decocção. Este aparelho é importante também na economia dos solventes utilizados no processo, uma vez que a extração é feita com refluxo, promovendo o reaproveitamento do solvente (CARVALHO, 2001). Este método garante, ainda, reprodutibilidade do extrato vegetal, tanto no caráter químico, quanto no biológico, desde que a produção e coleta do material vegetal estejam padronizadas, pois a reprodução das atividades biológicas de interesse depende diretamente da composição química do extrato ou fração.

TABELA 8. Rendimento das frações obtidas em relação ao extrato etanólico bruto.

Amostra	Rendimento			
	Folhas		Caule	
	Massa (g)	Porcentagem	Massa (g)	Porcentagem
Extrato Etanólico Bruto	159,76	—	319,37	—
Fração Hexano	30,56	19,13%	59,32	18,57%
Fração Clorofórmio	19,99	12,52%	26,95	8,44%
Fração Acetato de Etila	22,78	14,26%	19,37	6,07%

6.2.2. Isolamento e identificação dos compostos T1 e T3

Após análise de ressonância nuclear magnética, o composto T1 foi identificado como a antraquinona crisofanol (1,8-diidroxi-3-metilantraquinona) (figura 6). A identidade deste composto foi determinada também pelas análises complementares de RMN, HSQC (correlação entre átomos de hidrogênio e carbono ligados diretamente) e HMBC (correlação entre os átomos de hidrogênio e carbono distantes). O espectro de RMN ¹H revelou dois sinais simples em δ 11,98 e 12,09 referentes aos grupamentos hidroxila e em δ 2,45 um sinal integrado para três

hidrogênios referente ao grupamento metila. O espectro apresentou ainda sinais em δ 7,79 (1H, dd, J 7,52Hz e 1,16Hz) e δ 7,27 (1H, dd, J 7,52Hz e 1,16Hz) característico de hidrogênio com acoplamento *orto* e *meta*, em δ 7,65 (1H, t, J 8,15Hz) de hidrogênio com acoplamento *orto* e também multipletos em δ 7,62 e 7,07 referentes a hidrogênios com acoplamento *meta*. Os dados das análises de RMN estão expressos na tabela 9.

TABELA 9. Deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C correspondente ao Crisofanol presente em *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

Posição	Deslocamentos Químicos (ppm)			
	^{13}C		^1H	
	Exp.	CHOI <i>et al.</i> , 2005	Exp.	CHOI <i>et al.</i> , 2005
1 (C)–OH	162,68	162,70	11,98 (s)	-
2 (CH)	124,69	124,3	7,07 (m)	7,21 (m)
3 (C)	149,30	149,8	-	-
4 (CH)	121,33	120,9	7,62 (m)	7,65 (m)
5 (CH)	119,88	119,6	7,79 (dd; $J=8,5\text{Hz}$ e 1,1Hz)	7,84 (dd; $J=8,0\text{Hz}$ e 1,5Hz)
6 (CH)	136,92	137,5	7,65(t, $J=7,98\text{Hz}$)	7,83 (t, $J=8,0\text{Hz}$)
7 (CH)	124,27	124,6	7,27 (dd; $J=8,5\text{Hz}$ e 1,1Hz)	7,37 (dd; $J=8,0\text{Hz}$ e 1,5Hz)
8 (C)–OH	162,39	162,7	12,09 (s)	-
9 (C)=O	192,48	192,9	-	-
10 (C)=O	181,91	181,7	-	-
11 (C)	133,59	134,1	-	-
12 (C)	115,82	116,2	-	-
13 (C)	113,68	114,2	-	-
14 (C)	133,25	133,8	-	-
Metila	22,3	21,4	2,45 (s)	2,11 (s)

Legenda: J = constante de acoplamento; *dd* = duplo dubleto, *t* = tripleto, *m* = multipleto

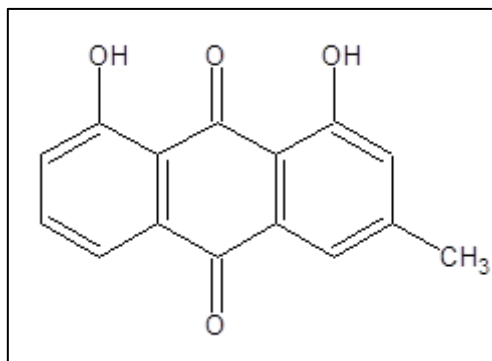


FIGURA 6. ESTRUTURA QUÍMICA DO CRISOFANOL PRESENTE EM *RHAMNUS SPHAEROSPERMA* VAR. *PUBESCENS*.

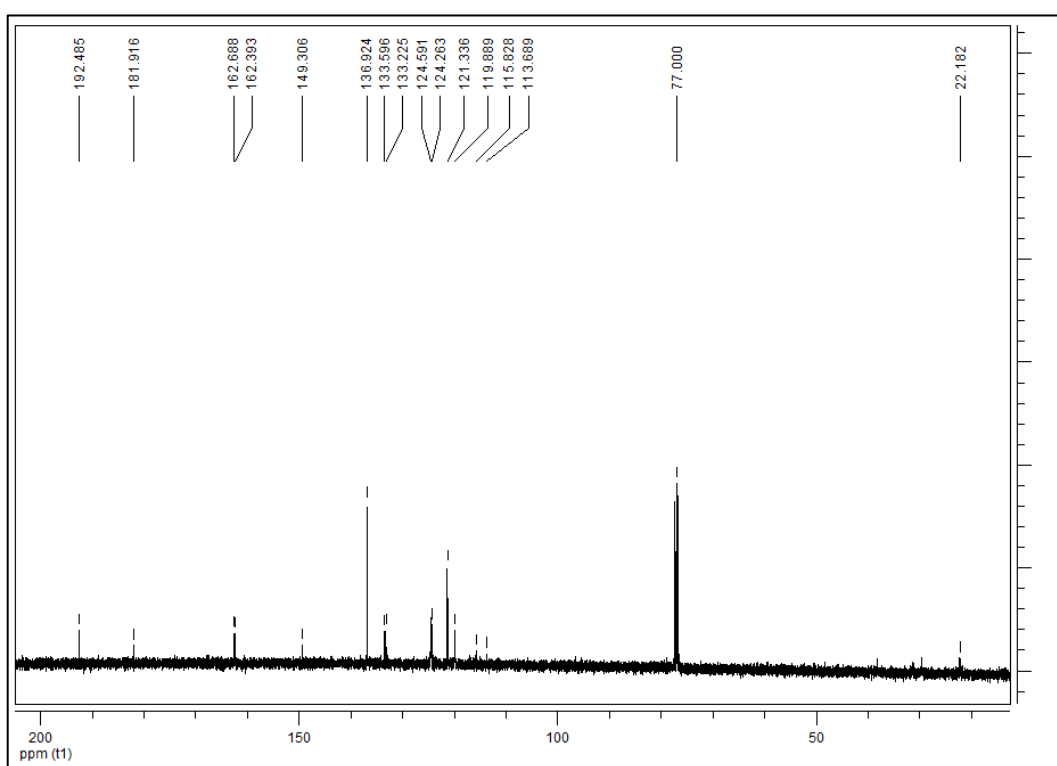


FIGURA 7. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DO ¹³C PARA CRISOFANOL (200 MHz, CDCl₃).

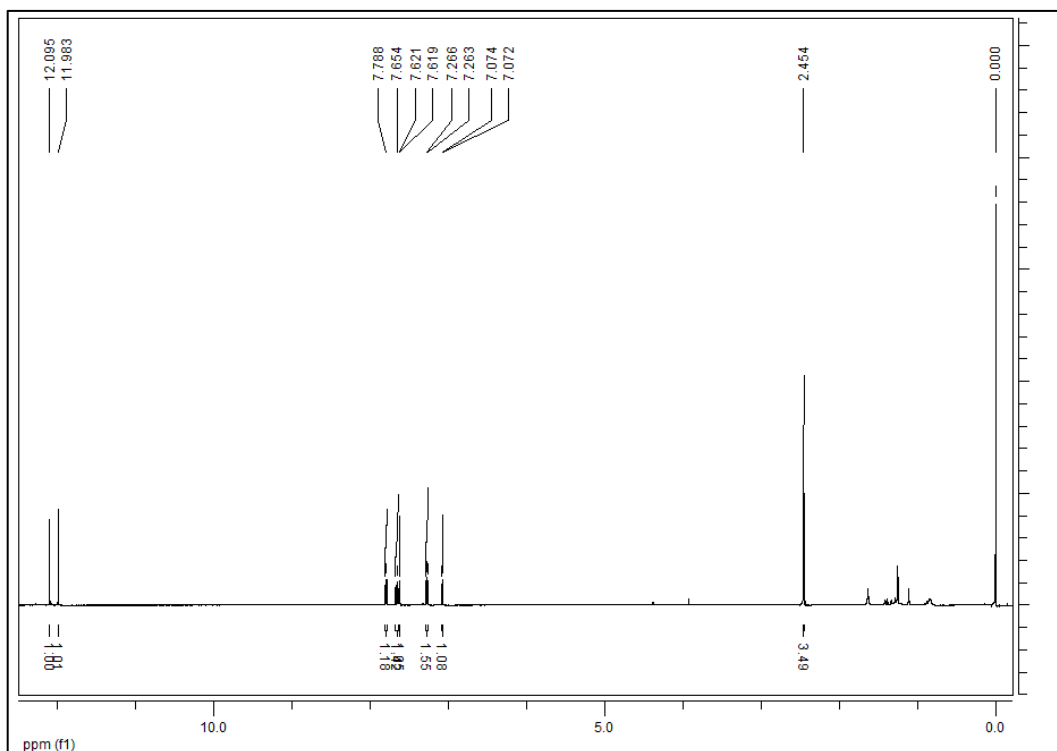


FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DO ^1H PARA CRISOFANOL (200 MHz, CDCl_3).

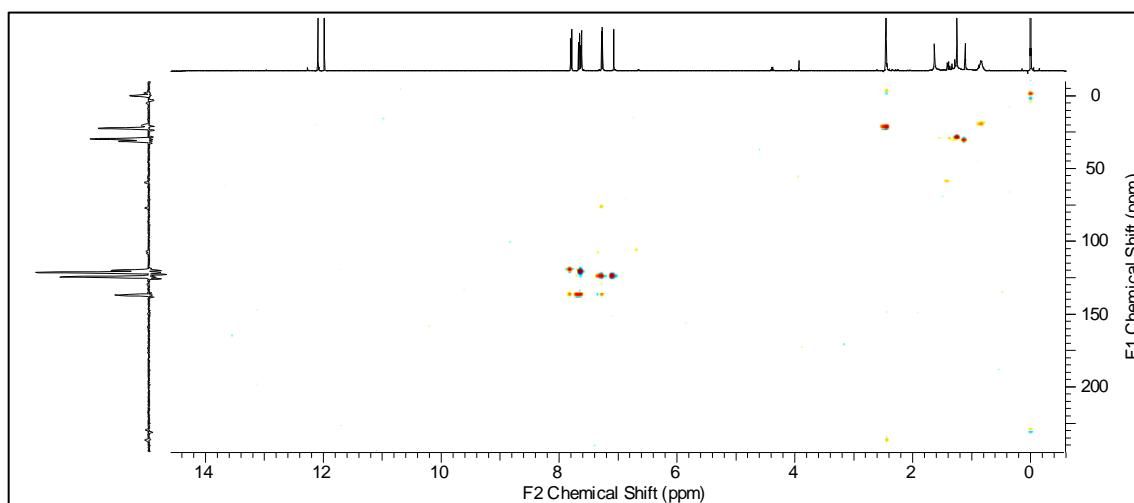


FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE HSQC PARA CRISOFANOL (400 MHz, CDCl_3).

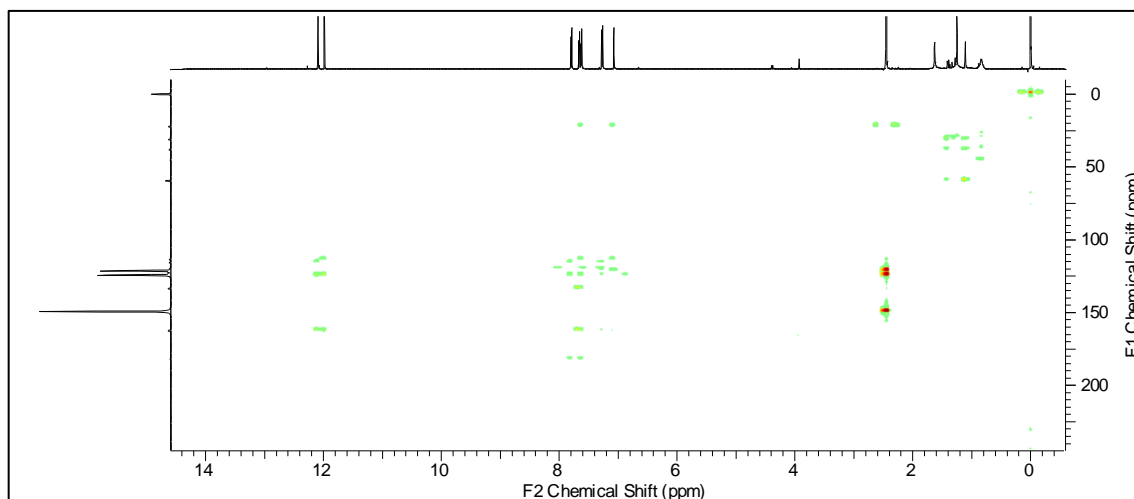


FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE HMBC PARA CRISOFANOL (400 MHz, CDCl_3).

O composto T3 foi identificado também como uma antraquinona, a fisciona (1,8-Dihidroxi-3-metoxi-6-metilantraquinona) (figura 10). Foi detectada a presença de uma mistura, entretanto, as outras substâncias não puderam ser identificadas, sendo necessárias mais etapas de purificação, para a sua separação e identificação. O espectro de RMN ^1H revelou dois sinais simples δ 12,10 e 12,29 referentes aos grupamentos hidroxila e em δ 2,44 um sinal integrado para três hidrogênios referente ao grupamento metila. O espectro mostrou ainda 4 sinais sendo um singlete em δH 7,66, 3 sinais duplos em δH 7,06 (J 0,69Hz), 7,27 (J 2,58Hz) e 6,60 (J 2,49Hz) referentes a acoplamento *meta*. O espectro revelou também um sinal referente aos 3H de uma metoxila em δH 3,93. Os deslocamentos químicos de carbono 13 e hidrogênio 1 podem ser observados na tabela 10.

TABELA 10. Deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C correspondente à Fisciona presente em *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

Posição	Deslocamentos Químicos (ppm)			
	^{13}C		^1H	
	Exp.	CHU <i>et al.</i> , 2005	Exp.	CHU <i>et al.</i> , 2005
1 (C)-OH	166,53	166,1	12,10	12,06
2 (CH)	106,76	106,1	6,67 (<i>d</i> , $J=2,49\text{Hz}$)	6,74
3 (C)	162,48	161,9	-	-
4 (CH)	108,20	107,8	7,27 (<i>d</i> , $J= 2,58\text{Hz}$)	7,32
5 (CH)	124,49	124,0	7,66 (<i>s</i>)	7,64
6 (C)	148,44	148,0	-	-
7 (CH)	121,27	120,7	7,06 (<i>d</i> , $J= 0,69\text{Hz}$)	7,09
8 (C)-OH	165,17	164,7	12,29	12,19
9 (C)=O	190,75	190,2	-	-
10 (C)=O	181,95	181,6	-	-
11 (C)	135,21	134,7	-	-
12 (C)	113,64	113,1	-	-
13 (C)	110,23	110,2	-	-
14 (C)	133,17	132,7	-	-
Metila	22,15	21,7	2,44	2,42
Metoxila	56,08	55,7	3,93	3,93

Legenda: J = constante de acoplamento; d = dubleto

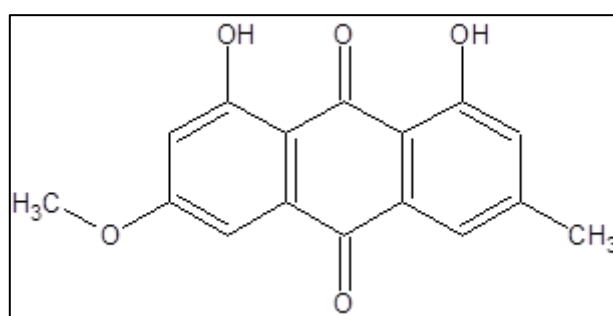


FIGURA 11. ESTRUTURA QUÍMICA DA FISCIONA PRESENTE EM *RHAMNUS SPHAEROSPERMA* VAR. *PUBESCENS*.

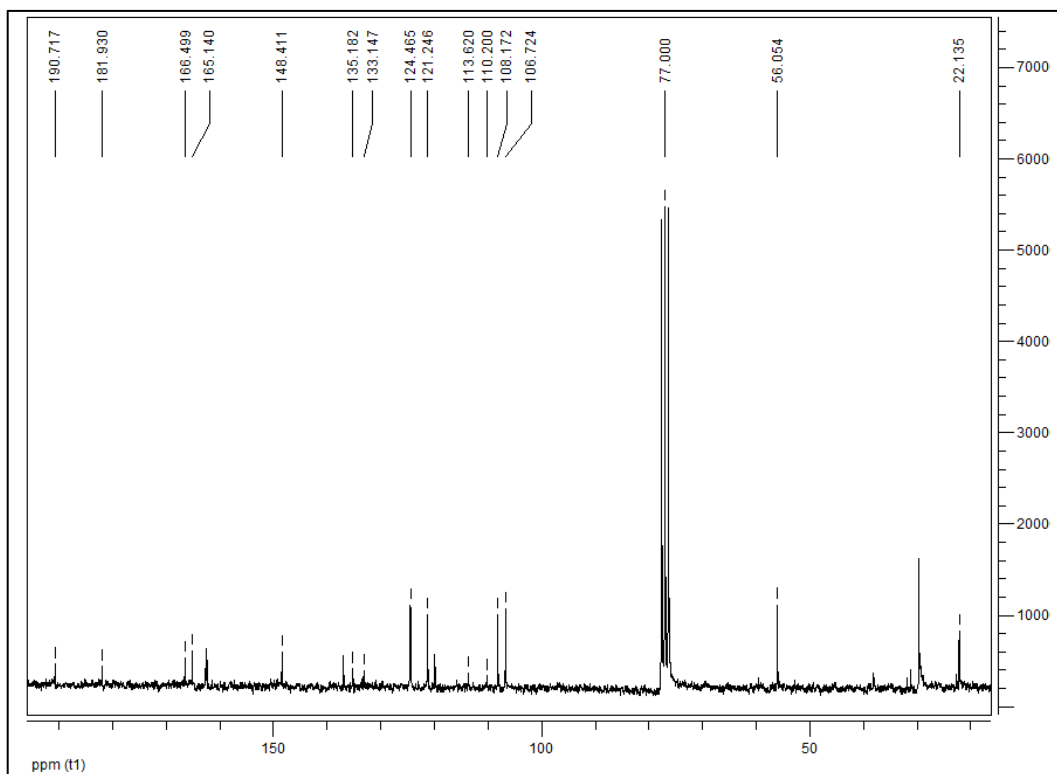


FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DO ^{13}C PARA FISCIONA (200MHz, CDCl_3).

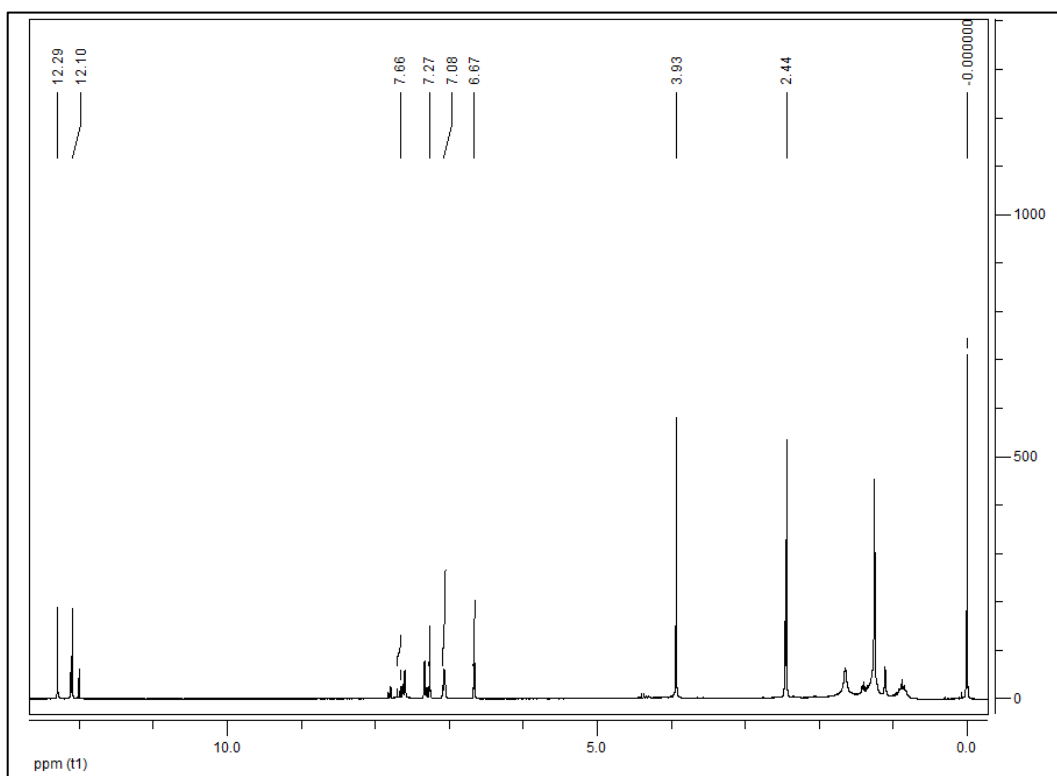


FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H PARA A FISCIONA (200MHz, CDCl_3).

6.2.3. Isolamento e identificação do composto T6

A análise de ressonância nuclear magnética do composto T6, em CDCl_3 , 200 MHz, revelou a mistura dos fitosteróis estigmasterol e sitosterol (figura 14). Os sinais em $\delta 140,75$ e $121,72$ indicam os carbonos da ligação dupla entre C-5 e C-6 de ambos os esteróides. A dupla ligação entre C-22 e C-23, característica do estigmasterol foi identificada pelos sinais $\delta 138,32$ e $129,26$. Foi observado ainda um sinal em $\delta 71,79$, atribuído ao carbono C-3 (Dados apresentados na tabela 11).

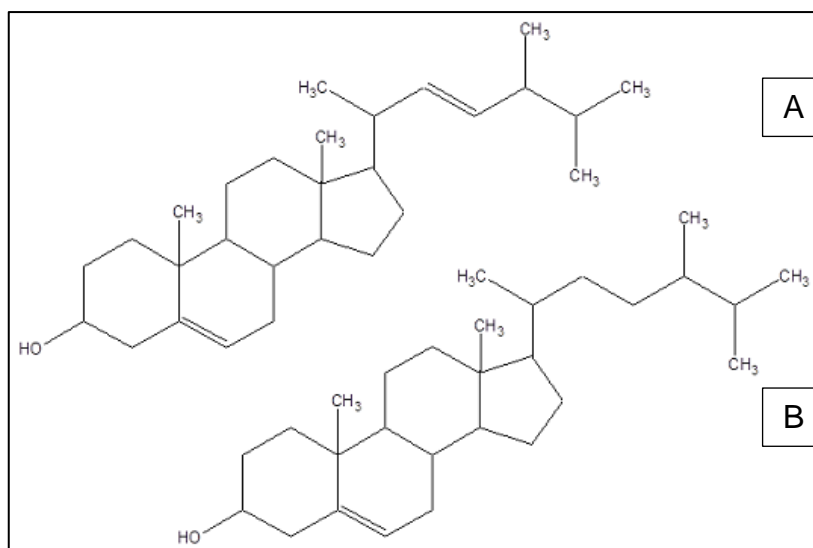


FIGURA 14. ESTRUTURA QUÍMICA: (A) ESTIGMASTEROL E (B) SITOSTEROL PRESENTES EM *RHAMNUS SPHAEROSPERMA* VAR. *PUBESCENS*.

TABELA 11. Deslocamentos químicos para ^{13}C correspondente ao Estigmasterol e Sitosterol presentes em *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

Posição	Deslocamentos Químicos (ppm)			
	Estigmasterol		Sitosterol	
	Exp.	GOIS, 2010	Exp.	GOIS, 2010
1 (CH ₂)	37,23	37,3	37,23	37,3
2 (CH ₂)	31,88	31,9	31,88	31,9
3 (CH)	71,79	71,7	71,79	71,7
4 (CH ₂)	42,28	42,3	42,28	42,3
5 (C)	140,75	140,8	140,75	140,8
6 (CH)	121,72	121,6	121,72	121,6
7 (CH ₂)	31,88	31,9	31,63	31,9
8 (CH)	31,88	31,9	31,63	31,9
9 (CH)	50,11	50,2	50,11	50,2
10 (C)	36,49	36,5	36,49	36,5
11 (CH ₂)	21,06	21,1	21,06	21,1
12 (CH ₂)	39,75	39,9	39,75	39,9
13 (C)	42,28	42,5	42,28	42,5
14 (CH)	56,75	56,8	56,75	56,8
15 (CH ₂)	24,29	24,3	24,29	24,3
16 (CH ₂)	29,23	29,0	28,23	28,3
17 (CH)	56,03	56,1	56,03	56,1
18 (CH ₃)	12,23	12,1	11,84	11,9
19 (CH ₃)	19,38	19,4	19,38	19,4
20 (CH)	40,48	40,5	36,13	36,2
21 (CH ₃)	21,06	21,1	18,73	18,8
22(CH/CH ₂)	138,32	138,54	33,92	33,9
23(CH/CH ₂)	129,26	129,49	26,04	26,1
24 (CH)	51,22	51,3	45,81	45,9
25 (CH)	31,63	31,9	29,12	29,2
26 (CH ₃)	21,20	21,3	19,80	19,8
27 (CH ₃)	19,01	19,0	19,01	19,1
28 (CH ₂)	25,39	25,4	23,04	23,1
29 (CH ₃)	12,23	12,3	12,23	12,3

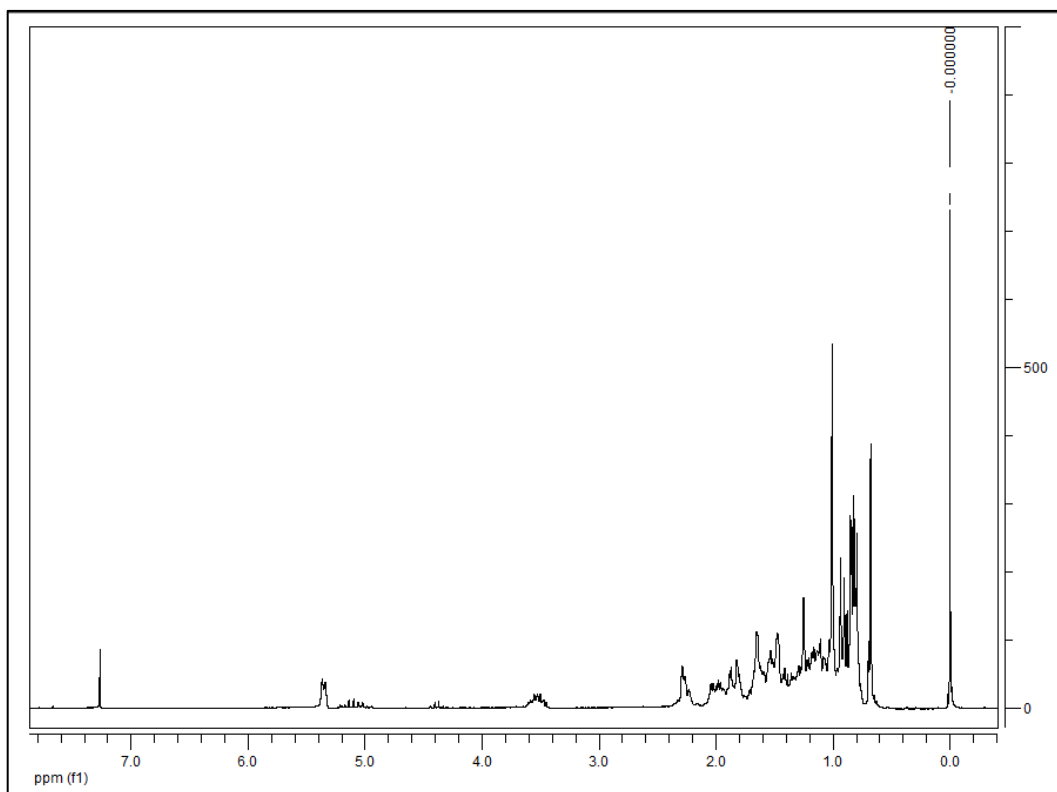


FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹H PARA A MISTURA DE FITOESTERÓIS (200 MHz, CDCl₃).

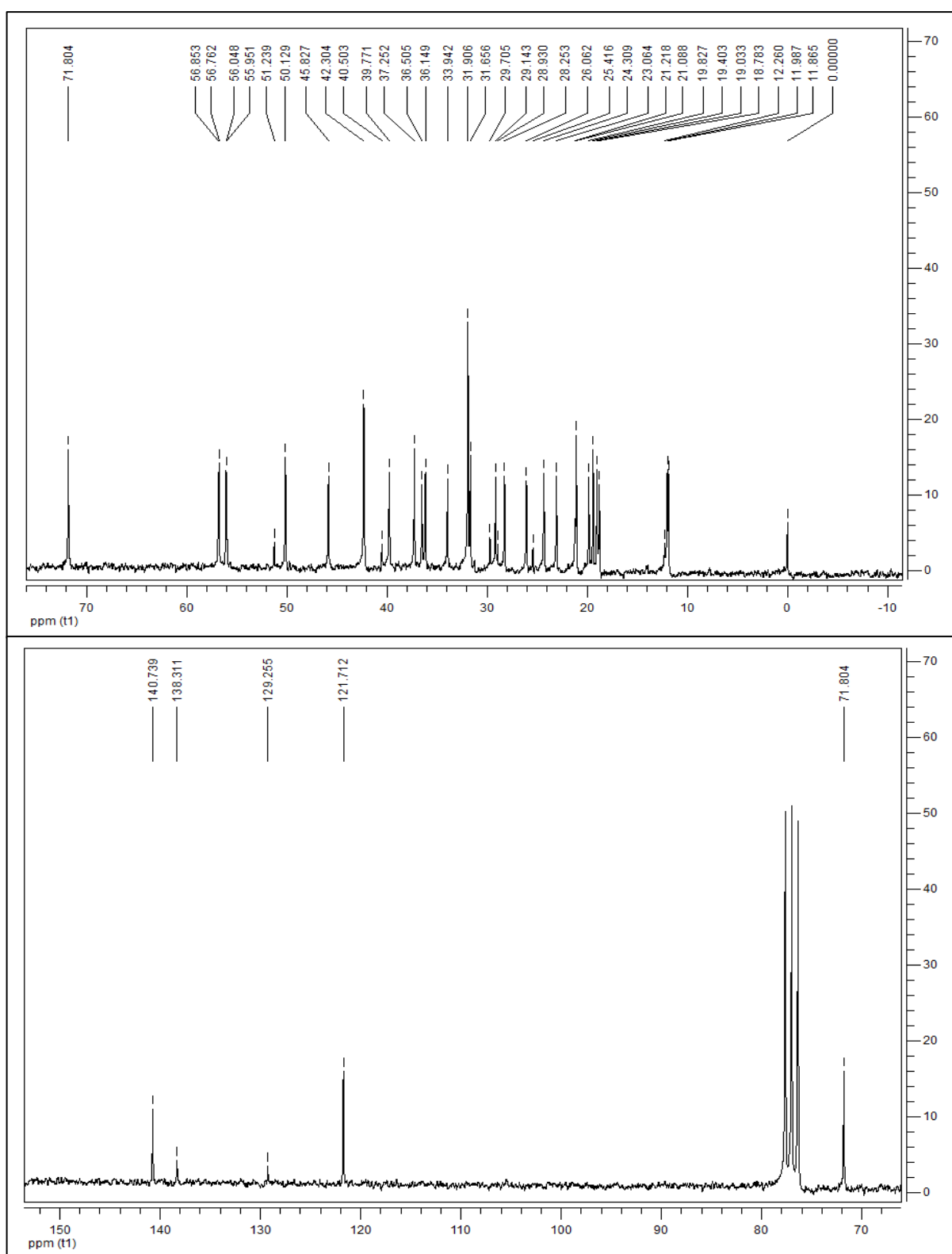


FIGURA 16. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C PARA A MISTURA DE FITOESTERÓIS (200 MHz, CDCl_3).

6.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são compostos que apresentam a capacidade de reverter ou inibir a oxidação de outras substâncias. Os agentes antioxidantes apresentam, além do auxílio na prevenção de diversas doenças, uma larga aplicação industrial, principalmente nos setores farmacêutico, cosmético e alimentício. Desta maneira, a aplicação de agentes antioxidantes obtidos de produtos naturais se torna uma alternativa aos obtidos quimicamente, pois estes produtos passam por rigorosos testes toxicológicos, de segurança e eficácia para o uso das suas propriedades medicinais, exigidos para medicamentos fitoterápicos (BARREIROS; DAVID, 2006; NIKI, 2010).

No organismo, os danos causados pela presença de radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio e nitrogênio geralmente estão relacionados com o desenvolvimento de diversas doenças, como insuficiência cardíaca e respiratória, aterosclerose, doenças degenerativas, mutagênese e carcinogênese (NIKI, 2010), bem como com o agravamento de processos inflamatórios.

O perfil da atividade antioxidante dos extratos e frações foi determinado através das metodologias *in vitro* de formação do complexo fosfomolibdênio, redução do radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazila), e determinação da taxa de peroxidação lipídica (TBARS).

6.3.1. Formação do complexo fosfomolibdênico

A avaliação da atividade antioxidante pela formação do complexo fosfomolibdênico determina a capacidade antioxidante total de uma amostra frente a uma reação de óxido-redução. Permite avaliar componentes tanto lipofílicos quanto hidrofílicos (PRIETO *et al.*, 1999).

Este ensaio fundamenta-se na redução do molibdênio VI a molibdênio V na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, ocorrendo a formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente a 695nm. A atividade antioxidante relativa

(AAR%) foi determinada por comparação com os padrões rutina e vitamina C (valores considerados como 100% de formação do complexo). Para este teste todas as amostras e padrões foram utilizados na concentração de 200 µg/mL. Os resultados obtidos estão expressos na figura 15.

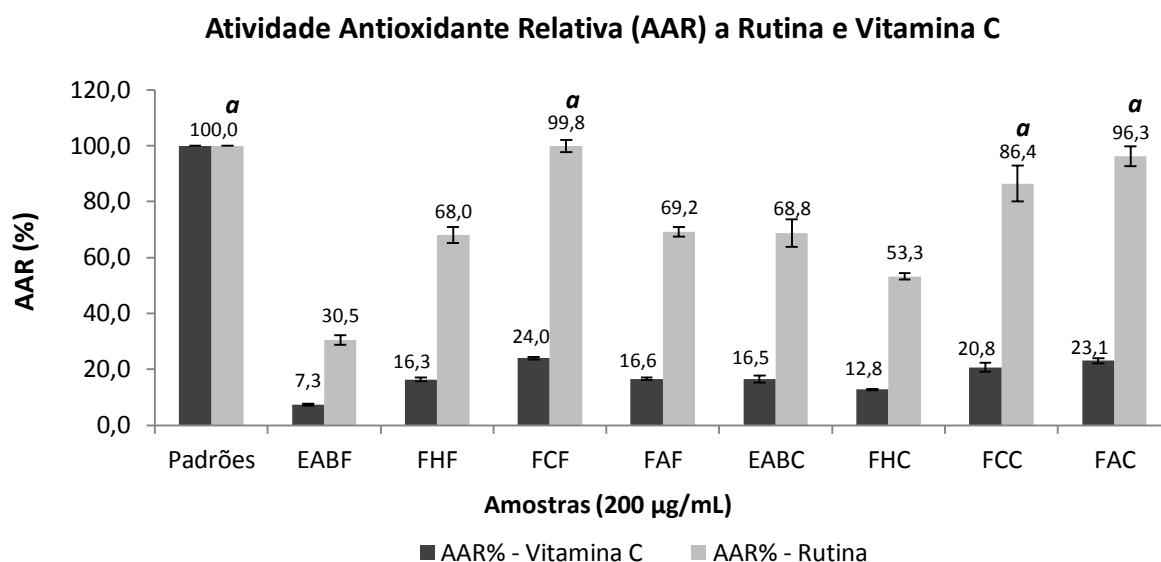


FIGURA 17. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA EM RELAÇÃO AOS PADRÕES RUTINA E VITAMINA C. (EABF: extrato alcoólico bruto das folhas; FHF: fração hexano das folhas; FCF: fração clorofórmio das folhas; FAF: fração acetato de etila das folhas; EABC: extrato alcoólico bruto do caule; FHC: fração hexano do caule; FCC: fração clorofórmio do caule; FAC: fração acetato de etila do caule). Letras iguais representam igualdade estatística (diferença estatística considerada para $p \leq 0,01$).

No ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio, algumas amostras apresentaram capacidade antioxidante semelhante a da rutina; as frações clorofórmio do caule (FCC) e da folha (FCF), e acetato de etila do (FAC) demonstraram maior capacidade antioxidante neste teste, sendo seus valores estatisticamente iguais aos deste padrão.

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

O método de análise da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH permite a avaliação da quantidade de amostra necessária para neutralizar uma determinada quantidade do radical livre (DPPH). A atividade antioxidante da amostra, assim como a concentração ideal são dependentes das características moleculares das substâncias presentes na mesma, assim como suas interações com a molécula deste radical (MOLYNEUX, 2004; NIKI, 2010). A molécula do DPPH é um radical livre estável, que em solução etanólica possui coloração violeta, quando esta solução entra em contato com substâncias doadoras de átomos de hidrogênio para o radical, ocorre a sua redução e a solução muda para a cor amarela (MOLYNEUX, 2004).

Para a avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazila) foram testadas cinco concentrações de cada amostra e a porcentagem de inibição do DPPH foi calculada a partir da absorbância obtida para cada concentração.

A IC_{50} (figura 15) determina a concentração da amostra que é capaz de reduzir 50% da concentração inicial de DPPH, e foi calculada com base na equação da reta obtida das curvas de concentração de cada amostra com a porcentagem de inibição do DPPH produzida. Este processo é denominado de regressão linear, e as equações foram consideradas confiáveis somente quando o valor de R^2 (linearidade da reta) foi superior a 0,98. Os gráficos 1-10 representam as curvas das concentrações utilizadas de cada amostra para a redução do DPPH, empregadas na construção dos gráficos para o cálculo de IC_{50} (os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão).

Os gráficos 1 e 2 representam os valores utilizados na construção da curva dos padrões Rutina e vitamina C. Para a rutina as concentrações utilizadas variaram de 2 a 10 $\mu\text{g/mL}$, e para a vitamina C, os valores foram de 1,6 a 8 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico 1. Curva do padrão rutina pela redução do DPPH.

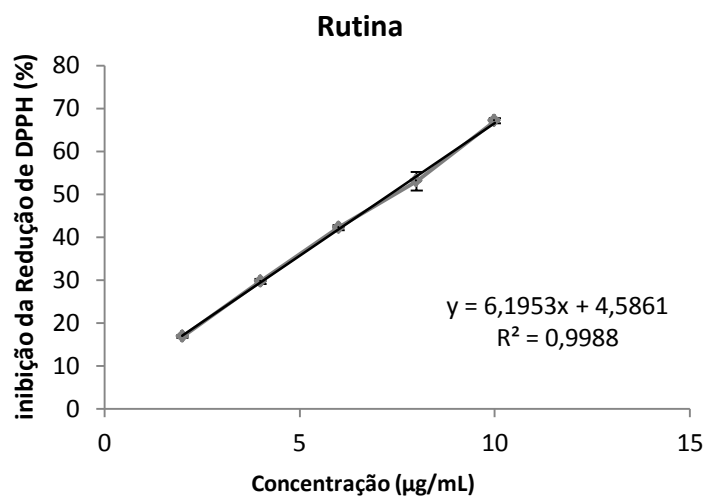
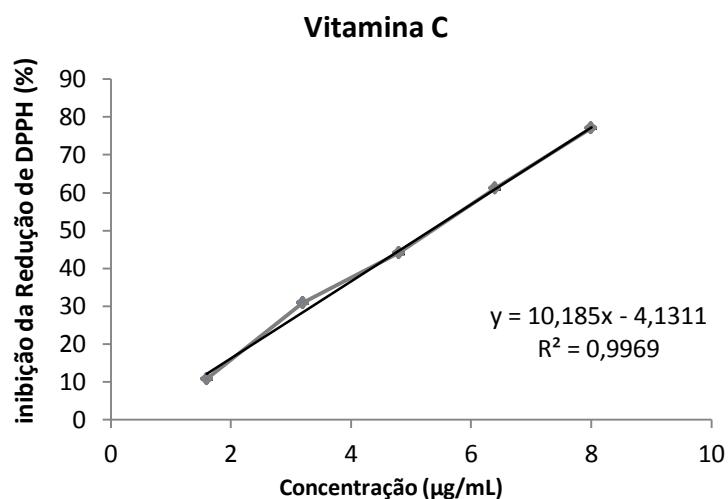


Gráfico 2. Curva do padrão vitamina c pela redução do DPPH.



Os gráficos 3 a 6 representam as curvas obtidas para os extratos e frações obtidos do caule de *R. sphaerosperma*.

Para o extrato alcoólico bruto, as concentrações ativas na redução do DPPH foram de 25 a 125 µg/mL (gráfico 3). Para a fração hexano do caule (gráfico 4), foram observadas as concentrações mais altas (150 a 430 µg/mL), indicando menor atividade antioxidante desta amostra, quando avaliada a capacidade de redução do DPPH.

Gráfico 3. Curva do extrato alcoólico bruto do caule pela redução do DPPH.

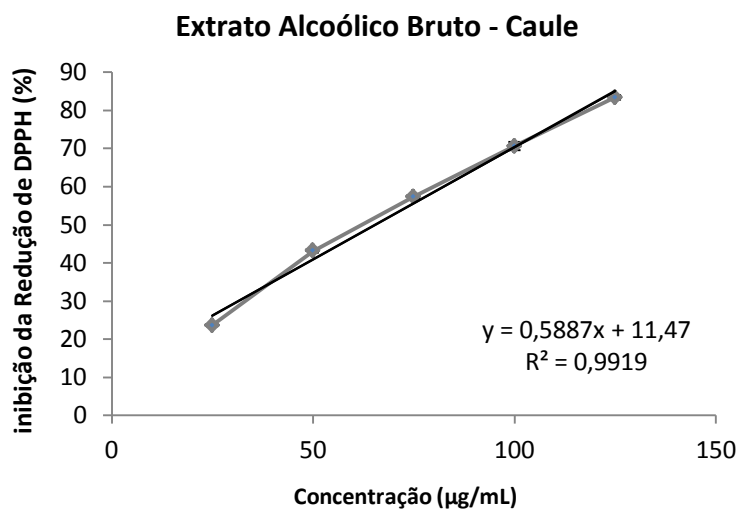
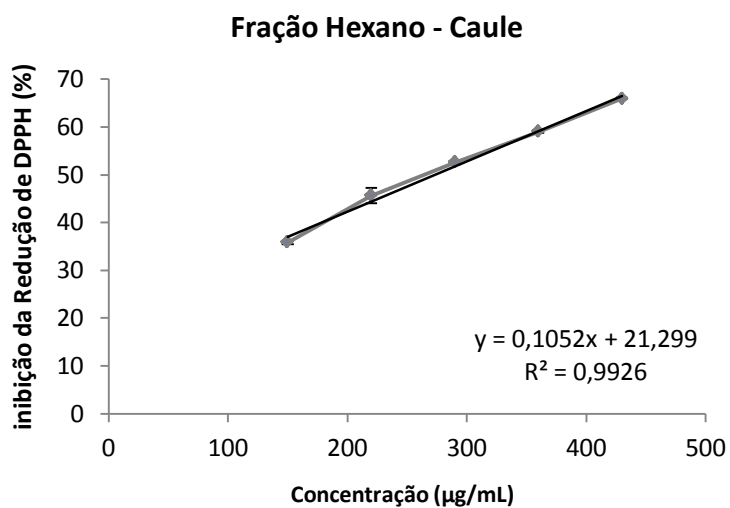
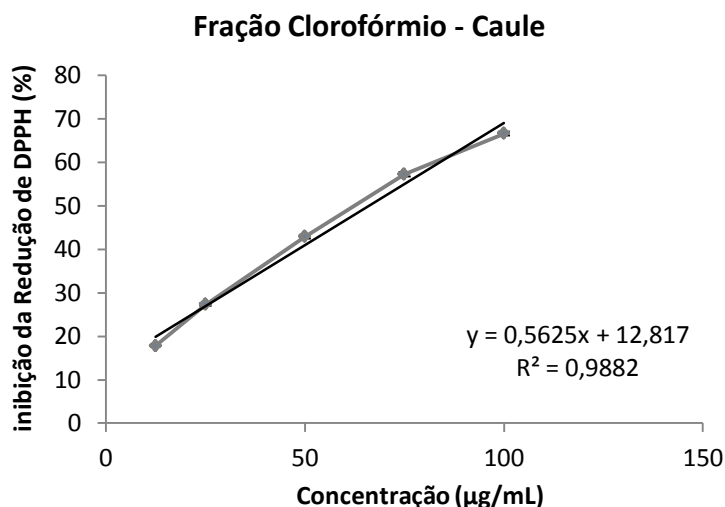


Gráfico 4. Curva da fração hexano do caule pela redução do DPPH.



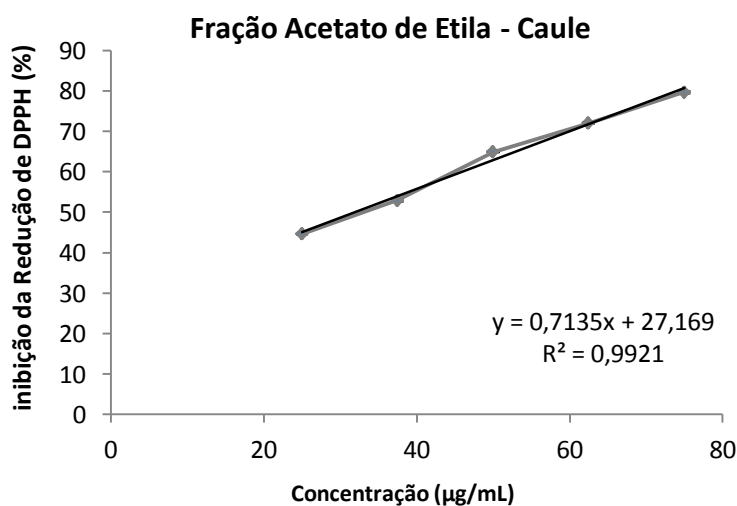
Com o aumento da polaridade das frações obtidas do caule (substâncias com caráter mais hidrofílico) foram observados resultados mais favoráveis, ou seja, as concentrações necessárias para redução do DPPH foram menores.

Gráfico 5. Curva da fração clorofórmio do caule pela redução do DPPH.



A fração clorofórmio (gráfico 5), que possui polaridade ligeiramente maior que a fração hexano, apresentou atividade neste método na faixa de concentração de 12,5 a 100µg/mL. E a fração acetato de etila (gráfico 6) apresentou atividade na faixa de 25 a 75 µg/mL.

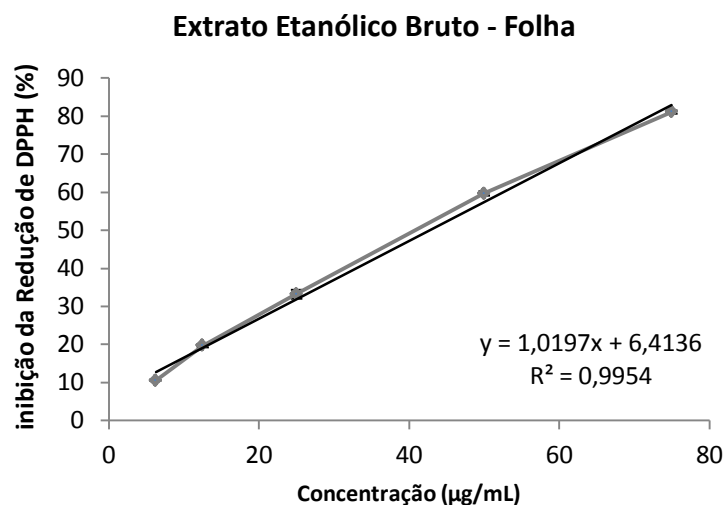
Gráfico 6. Curva da fração acetato de etila do caule pela redução do DPPH.



Os resultados obtidos para as amostras das folhas de *R. sphaerosperma* estão demonstrados nos gráficos 7 a 10.

O extrato alcoólico bruto (gráfico 7) demonstrou melhor atividade antioxidante neste método, sendo que as concentrações variaram de 6,25 a 75µg/mL.

Gráfico 7. Curva do extrato alcoólico bruto das folhas pela redução do DPPH.



Da mesma forma que no caule, a fração hexano das folhas (gráfico 8) também apresentou menor atividade na redução do DPPH, sendo que a faixa de concentração variou de 50 a 250 µg/mL. Já a fração clorofórmio (gráfico 9) apresentou uma faixa de 12,5 a 100 µg/mL.

Gráfico 8. Curva da fração hexano das folhas pela redução do DPPH.

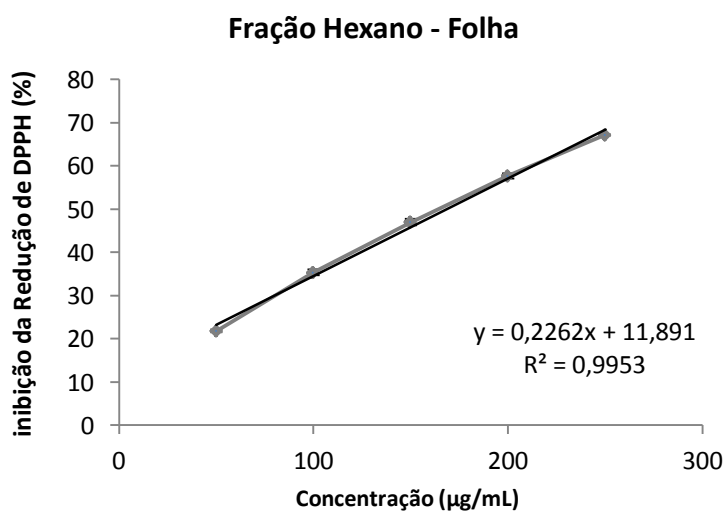
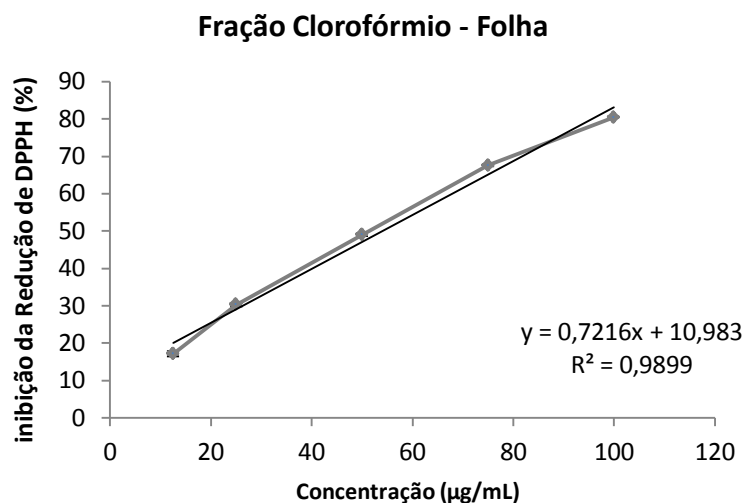
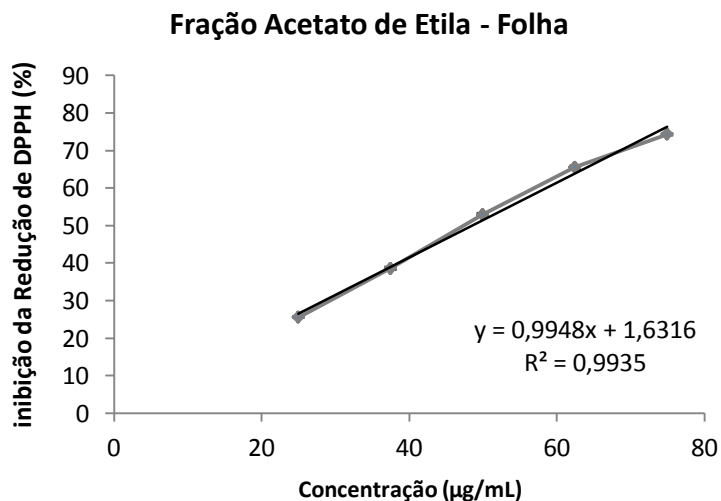


Gráfico 9. Curva da fração clorofórmio das folhas pela redução do DPPH.



A fração acetato de etila das folhas (gráfico 10) apresentou melhor atividade entre as frações obtidas das folhas, com uma faixa de concentração de 25 a 75 µg/mL.

Gráfico 10. Curva da fração acetato de etila das folhas pela redução do DPPH.



Quando os valores obtidos de IC_{50} para cada amostra foram comparados, pode-se observar que todas as amostras apresentaram resultados estatisticamente diferentes dos padrões utilizados (vitamina C e rutina). Entretanto, as frações hexano, tanto da folha quanto do caule, apresentaram menor atividade na redução do DPPH, sendo os valores de IC_{50} os mais altos, ou seja, maiores quantidades de amostra são necessárias para obtenção da atividade desejada.

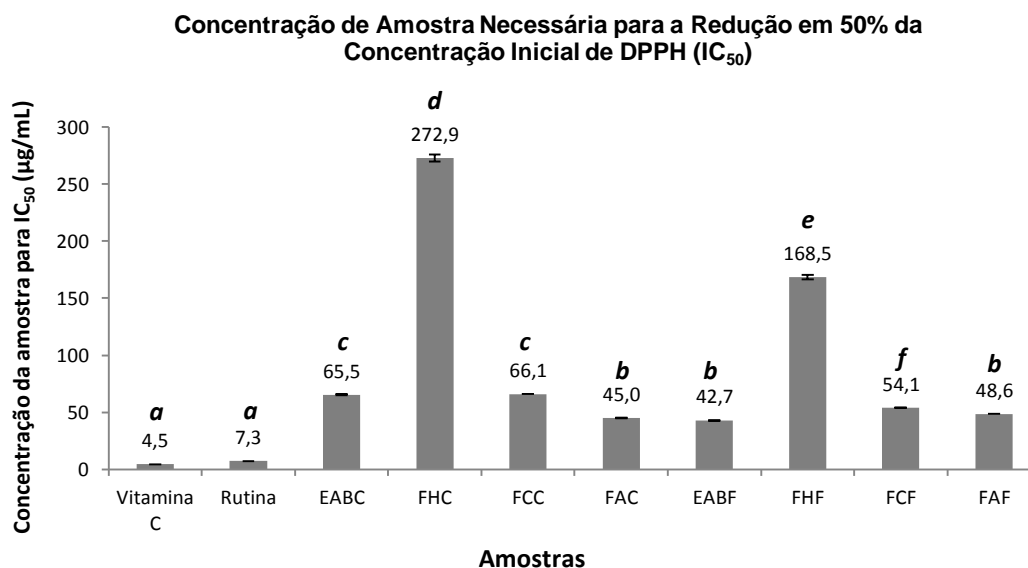


FIGURA 18. IC₅₀: CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA QUE REDUZ 50% DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE DPPH. (EABF: extrato alcoólico bruto das folhas; FHF: fração hexano das folhas; FCF: fração clorofórmio das folhas; FAF: fração acetato de etila das folhas; EABC: extrato alcoólico bruto do caule; FHC: fração hexano do caule; FCC: fração clorofórmio do caule; FAC: fração acetato de etila do caule). Letras iguais indicam igualdade estatística (diferença estatística considerada para $p \leq 0,01$).

6.3.3. Teste com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este teste é utilizado para verificar a capacidade das amostras testadas em inibir a peroxidação lipídica induzida por um agente oxidante. O método baseia-se na reação do malondialdeído (MDA) formado pela oxidação de lipídeos pelo ataque de agentes oxidantes. Este produto da oxidação de lipídeos reage então com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob alta temperatura e baixo pH, demonstrando, de maneira indireta, a quantidade de lipídeos oxidados (LIU *et al.*, 1997; MORAIS *et al.*, 2006).

Os resultados obtidos estão mostrados na figura 17. Neste ensaio, diferentemente dos outros testes de atividade antioxidante, as amostras de caráter mais lipofílico apresentaram melhor atividade. As frações hexano e clorofórmio do caule demonstraram capacidade antioxidante superior a do padrão utilizado, indicando possivelmente que os compostos lipofílicos presentes nestas frações são

mais ativos na inibição da oxidação causada por agentes oxidantes, do que na neutralização de radicais livres.

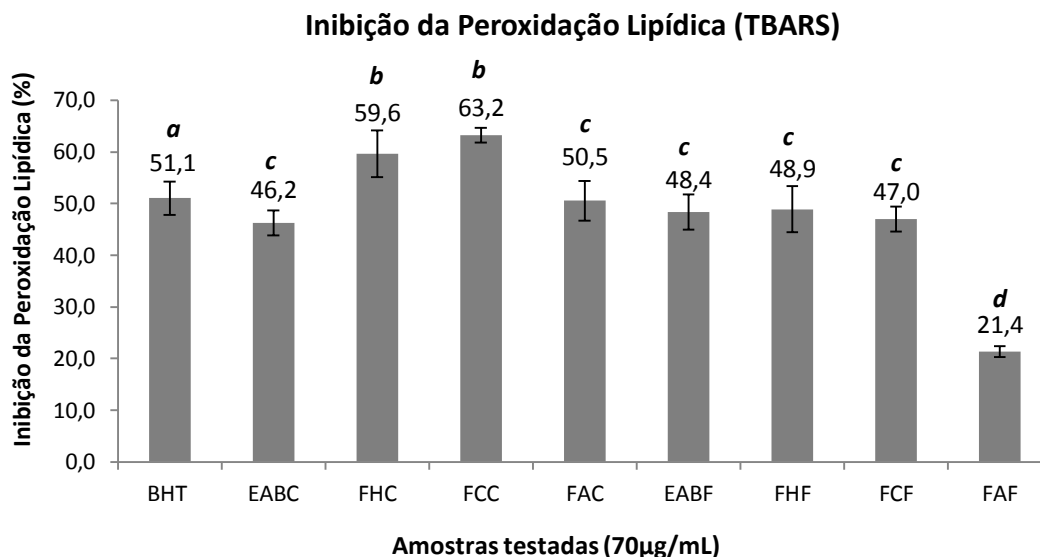


FIGURA 19. INIBIÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA. (BHT: hidroxibutiltolueno; EABF: extrato alcoólico bruto das folhas; FHF: fração hexano das folhas; FCF: fração clorofórmio das folhas; FAF: fração acetato de etila das folhas; EABC: extrato alcoólico bruto do caule; FHC: fração hexano do caule; FCC: fração clorofórmio do caule; FAC: fração acetato de etila do caule). Letras iguais indicam igualdade estatística (diferença estatística considerada para $P \leq 0,05$).

De maneira geral, as amostras de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* demonstraram uma importante capacidade antioxidante frente aos métodos utilizados. Este dado corrobora com estudos realizados em outras espécies deste gênero, como *Rhamnus alaternus*, *Rhamnus nakaharai* e *Rhamnus alpinus*, que além do amplo uso popular e diversas atividades biológicas comprovadas, são descritas também por sua atividade antioxidante expressiva, em diversos métodos de análise utilizados (NG *et al.*, 2007; AMMAR *et al.*, 2008; GENOVESE *et al.*, 2010; AMMAR *et al.*, 2011).

Na determinação da atividade antioxidante total, as amostras apresentaram perfil estatisticamente igual ao padrão rotina, um flavonoide que possui ampla variedade de atividades farmacológicas, sendo que muitas delas são associadas com sua atividade antioxidante, como por exemplo, a atividade anti-inflamatória (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Quanto à habilidade em neutralizar radicais livres, as amostras apresentaram concentrações muito superiores às dos padrões rotina e

vitamina C, indicando que para atuarem na inibição destes radicais são necessárias maiores quantidades de amostra quando comparadas com os controles.

A atividade antioxidante de uma amostra sobre radicais livres depende de fatores determinados pela estrutura química das espécies envolvidas. Em reações *in vitro*, os parâmetros importantes são a reatividade química das moléculas presentes na amostra com a molécula do radical, e a estequiometria da reação (número de moléculas de radical que a amostra é capaz de neutralizar). Porém, em reações *in vivo*, além destes outros fatores estão envolvidos, que são determinados pelas taxas metabólicas de absorção, distribuição e retenção do fármaco nos tecidos, como a concentração e mobilidade da amostra no ambiente da reação e a interação com outros antioxidantes (WILLIAMS *et al.*, 1995; BONDET *et al.*, 1997; NIKI, 2010).

Quando as amostras foram analisadas com relação a sua habilidade em inibir ou prevenir a peroxidação lipídica, as frações mais lipofílicas (hexano e clorofórmio) apresentaram melhor atividade, com taxas de inibição superiores às do controle BHT, que tem sido amplamente utilizado como conservante por inibir a peroxidação lipídica. Desta maneira, pode-se sugerir aplicações industriais, como conservantes em indústrias alimentícias e farmacêuticas, uma vez que a busca por compostos atóxicos com essas propriedades tem sido alvo de pesquisas nesta área (BUTTERFIELD *et al.*, 2002; CHAKRABORTY *et al.*, 2009; NIKI, 2010; STYSKAL *et al.*, 2012).

Além disso, a capacidade em inibir ou prevenir danos oxidativos está associada com o tratamento e prevenção de doenças, como por exemplo, de origem inflamatória e degenerativas. Entretanto, não é possível extrapolar os resultados obtidos nos ensaios de atividade antioxidante para reações que ocorrem em organismos vivos, pois tratam-se de reações químicas realizadas *in vitro*, e dessa forma, testes *in vivo* são necessários para estabelecer o perfil da atividade antioxidante das amostras utilizadas em sistemas vivos.

6.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* (microcrustáceo de água salgada) é um teste preliminar, rápido e eficiente, que determina se a amostra

testada possui indícios de toxicidade em apenas 24 horas. Este teste permite o direcionamento de estudos com extratos vegetais, de maneira que substâncias tóxicas para o microcrustáceo podem ser testadas para fins inseticidas e antiparasitários. Por outro lado, compostos que demonstram ausência de toxicidade devem prosseguir para estudos farmacológicos e toxicológicos *in vivo* para comprovação da sua eficácia e segurança (MEYER *et al.*, 1982).

As amostras foram consideradas tóxicas quando os valores de DL₅₀ foram menores que 1000 µg/mL (MEYER *et al.*, 1982). Como controle positivo foi utilizado sulfato de quinidina nas mesmas concentrações das amostras. Neste ensaio, nenhuma das amostras testadas de *R. sphaerosperma* var. *pubescens* apresentou toxicidade frente aos microcrustáceos, e os testes foram direcionados para as atividades farmacológicas. Os resultados estão expressos na tabela 12.

TABELA 12. Avaliação da toxicidade frente *Artemia salina*.

Amostra	Mortalidade / Concentração			DL50 (µg/mL)	Intervalo de Confiança de 95%
	10 (µg/mL)	100 (µg/mL)	1000 (µg/mL)		
EABC	0	3	0	> 1000	—
FHC	0	0	4	> 1000	—
FCC	0	0	1	> 1000	—
FAC	1	0	2	> 1000	—
EABF	0	1	1	> 1000	—
FHF	0	0	0	> 1000	—
FCF	1	2	6	> 1000	—
FAF	0	0	5	> 1000	—
ETANOL	0	0	0	> 1000	—
SULFATO DE QUINIDINA	3	26	85	177,38	136,9 – 229,9

LEGENDA: EABC (extrato alcoólico bruto caule); FHC (fração hexano caule); FCC (fração clorofórmio caule); FAC (fração acetato de etila caule); EABF (extrato alcoólico bruto folha); FHF (FRAÇÃO HEXANO FOLHA); FCF (fração clorofórmio folha); FAF (fração acetato de etila folha).

6.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

6.5.1. Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue

Na triagem de atividades biológicas e toxicológicas de extratos vegetais, existe a necessidade da verificação da atividade hemolítica das espécies estudadas, uma vez que o ferro liberado do grupo heme, proveniente da hemoglobina livre no plasma, a partir da ruptura de hemácias, é prejudicial devido aos danos que podem ser causados em órgãos vitais, como fígado e rins (BEDNARCZUK *et al.*, 2010).

Foram utilizadas duas metodologias para verificar a atividade hemolítica das amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*. Na avaliação da atividade hemolítica através do teste em ágar sangue, nenhuma amostra apresentou formação de halo hemolítico.

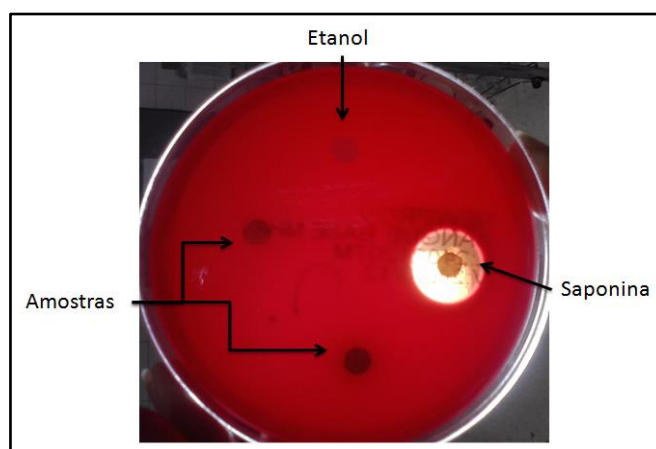


FIGURA 20. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM AGAR SANGUE. (Etanol: controle do solvente utilizado - não ocorreu formação de halo hemolítico; Saponina: controle positivo - formação do halo hemolítico; Amostras: exemplo de duas amostras utilizadas - não ocorreu formação de halo hemolítico).

6.5.2. Atividade hemolítica com hemácias em suspensão

Para o teste de atividade hemolítica em sangue de carneiro em suspensão a 2%, apenas a fração hexano do caule apresentou atividade hemolítica, sendo 0,25 mg/mL a menor concentração com capacidade hemolítica.

As diferenças nos resultados observadas para os métodos aplicados podem ser explicadas devido às características de polaridade da amostra e do ágar, pois na metodologia em ágar sangue, existe a necessidade de difusão da amostra para o mesmo para assim exercer sua atividade frente às hemácias ali inseridas. Entretanto, como a amostra possui um perfil lipofílico e o ágar hidrofílico, existe uma barreira que impede a migração dos componentes da amostra para os poros formados pelo ágar, e desta maneira, a visualização do resultado para esta amostra pode ter sido um falso-negativo. Portanto, quando as amostras foram solubilizadas em contato direto com as hemácias, ocorreu a formação de hemólise provocada pelos componentes da fração hexano do caule.

De maneira geral, as amostras de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* não apresentaram toxicidade para as hemácias, apenas a fração hexano do caule. Como o extrato bruto do caule não apresentou atividade hemolítica em nenhuma concentração testada pode-se supor que as substâncias hemolíticas presentes neste extrato apenas exercem este efeito em concentrações elevadas, uma vez que o processo de fracionamento promove a concentração de substâncias na amostra. Ou ainda, pode haver a presença de outros compostos no extrato bruto que são capazes de inibir ou neutralizar a ação hemolítica dos compostos da fração hexano, e assim, a atividade hemolítica não é observada para o extrato bruto do caule.

Uma vez que a utilização popular não é dos extratos fracionados, e os testes farmacológicos são direcionados pela etnofarmacologia, a atividade hemolítica observada para a fração hexano não deve ser um fator limitante para a continuidade das pesquisas. Porém, testes adicionais de toxicidade devem ser executados para garantir o uso seguro destes extratos.

6.6. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O método de microdiluição foi aplicado porque permite o contato direto das amostras em diferentes concentrações com os microrganismos a serem testados em suspensão, diferentemente do método de difusão em ágar, no qual as substâncias testadas precisam se difundir por ele para exercerem seu efeito sobre os microrganismos. Entretanto, este método é limitado pela solubilidade das amostras testadas, pois apenas solventes inertes aos microrganismos podem ser utilizados.

Nenhuma das amostras testadas apresentou efetividade na inibição do crescimento ou morte celular das cepas testadas após o tempo máximo de observação (48 horas). Porém, a fração acetato de etila do caule, na maior concentração testada (400 µg/mL), causou a inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella thyphimurium* em 24 horas de contato.

Possivelmente, doses maiores desta fração poderiam exercer o efeito antibacteriano desejado, mas devido à solubilidade limitada desta amostra, testes com concentrações acima desse valor não foram realizados.

A obtenção de um efeito antimicrobiano de extratos vegetais é interessante na busca de novos fármacos com diferentes modos de atuação sobre os microrganismos patogênicos, uma vez que superinfecções por microrganismos ultraresistentes têm sido observadas rotineiramente. Sendo assim, já que a fração utilizada apresenta uso limitado devido a sua solubilidade, torna-se interessante, como etapas futuras, a purificação e determinação da substância que possa exercer a atividade antimicrobiana.

6.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO BRUTO DO CAULE SOBRE O SISTEMA GASTROINTESTINAL

6.7.1. Avaliação sobre a motilidade gastrointestinal

As espécies do gênero *Rhamnus* são descritas por sua atividade sobre o trato gastrointestinal, principalmente por exercerem ação laxativa, devido à presença

de antraquinonas em sua composição química (NIJS *et al.*, 1993). Para avaliar qual o efeito do extrato bruto do caule sobre o trato gastrointestinal foram realizados os testes de esvaziamento gástrico de semissólidos e trânsito intestinal, e desta maneira, verificar se o extrato atua em algum desses segmentos.

A avaliação da capacidade de aumentar ou diminuir o esvaziamento gástrico foi determinada pela quantificação do marcador (vermelho de fenol) que permaneceu no estômago dos animais após o tempo do experimento, utilizando uma curva de calibração com o marcador vermelho de fenol. A partir desta curva, o conteúdo gástrico de cada animal foi quantificado e os resultados expressos como média±desvio padrão de microgramas de marcador por estômago ($\mu\text{g}/\text{estômago}$).

Os resultados estão expressos como média±desvio padrão, e podem ser observados na figura 21.

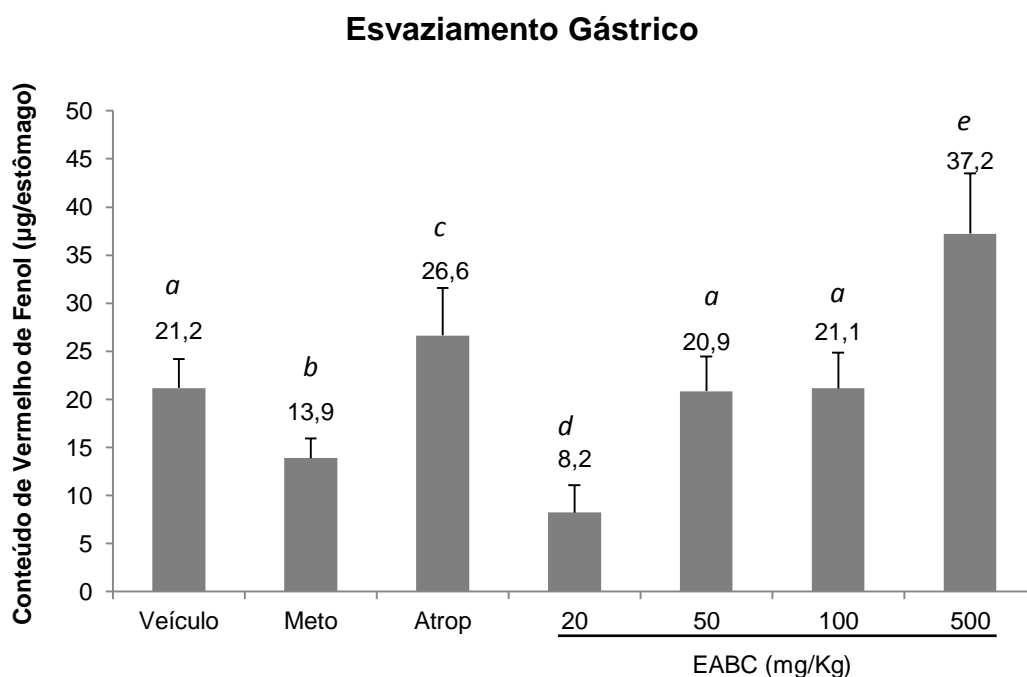


FIGURA 21. AVALIAÇÃO DA TAXA DE ESVAZIAMENTO GÁSTRICO DE SEMISSÓLIDOS. (VEÍCULO = grupo tratado com salina; METO = grupo tratado com metoclopramida, 30mg/Kg; ATROP = grupo tratado com atropina, 3mg/kg; EABC = extrato alcoólico bruto do caule, 20mg/Kg, 50mg/kg, 100mg/Kg e 500mg/Kg). Letras iguais indicam igualdade estatística (diferença estatística considerada para $P \leq 0,05$).

Os dados obtidos nos experimentos com os grupos tratados com o extrato e com os controles soro fisiológico, metoclopramida e atropina foram comparados com

a média obtida para o grupo controle tempo 0 ($31,33 \pm 4,9$ μg de vermelho de fenol por estômago), que foi eutanasiado imediatamente após a administração do marcador, representando assim a quantidade total de marcador que o estômago acomoda no estado fisiológico, sem intervenções medicamentosas ou patológicas.

Como esperado, o controle com metoclopramida (30 mg/kg) aumentou a taxa de esvaziamento gástrico, sendo a média de 44,37% em relação ao grupo tempo 0 (quantidade máxima de marcador no estômago considerada 100%), já que ela é um antagonista do receptor dopaminérgico D_2 , que aumenta a motilidade do esôfago, do estômago e do intestino (RANG *et al.*, 2008).

Da mesma maneira, o grupo controle tratado com atropina (3 mg/kg, via subcutânea), um agente anticolinérgico que inibe a motilidade gastrointestinal, reduziu a taxa de esvaziamento gástrico, sendo o conteúdo correspondente a 85,07% do total.

É interessante observar que os grupos tratados com o extrato alcoólico bruto do caule promoveram a diminuição (20 mg/kg) e o aumento (500 mg/kg), significativos no conteúdo gástrico, quando comparados com o controle negativo.

Para verificar a atuação do extrato sobre o trânsito intestinal, foram utilizados os mesmos animais do experimento de esvaziamento gástrico, e após a remoção do estômago, o intestino foi retirado, estendido e a distância percorrida pelo marcador foi medida. Como controles, além do grupo tratado com salina, foram utilizados a atropina, que reduz o trânsito intestinal, e a neostigmina, um agente anticolinesterásico que em pequenas doses aumenta a contratilidade rítmica do estômago e intestino (HELLSTROM, 2006; RANG, *et al.*, 2008; RAO, *et al.*, 2009; CELLINI *et al.*, 2011).

Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão, e podem ser observados na figura 22.

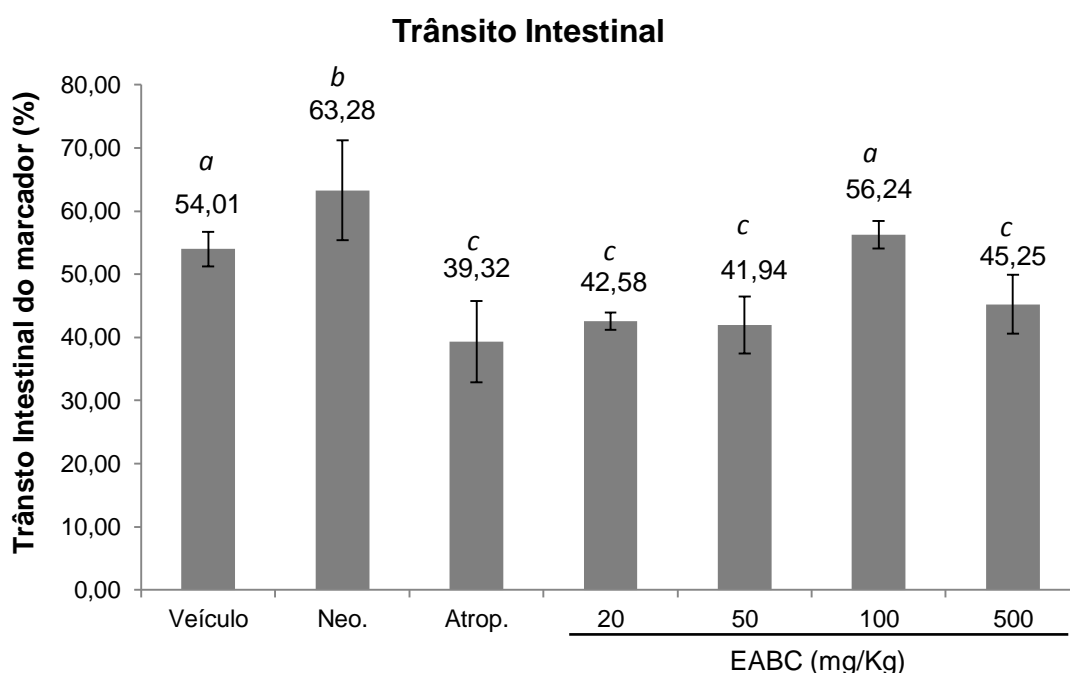


FIGURA 22. AVALIAÇÃO DA TAXA DE TRÂNSITO INTESTINAL. (VEÍCULO = grupo tratado com salina; NEO. = grupo tratado com neostigmina, 20 μ g/Kg; ATROP. = grupo tratado com atropina, 3mg/Kg; EABC = extrato alcoólico bruto do caule). Letras iguais indicam igualdade estatística (diferença estatística considerada para $p \leq 0,05$).

O grupo tratado com neostigmina (20 μ g/kg, via subcutânea) aumentou o trânsito intestinal para 63,3% e o tratado com atropina (3 mg/kg, via subcutânea) reduziu a taxa de trânsito intestinal para 39,3%, ambos em comparação com o grupo controle tratado com soro fisiológico e atuando como esperado.

Os grupos tratados com o extrato alcoólico bruto do caule promoveram uma diminuição significativa no trânsito intestinal quando comparados com o controle negativo, com exceção do grupo tratado com 100 mg/kg de extrato que não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

Os resultados obtidos nos testes de avaliação da motilidade gastrointestinal sugerem que o extrato alcoólico do caule de *Rhamnus sphaerospema* var. *pubescens* atua nos segmentos do trato gastrointestinal, estômago e intestino, de maneira independente. Esses resultados são contrários ao esperado para um extrato com antraquinonas em sua composição química, que de acordo com a literatura deveria promover o aumento da velocidade do trânsito intestinal, por

irritação da mucosa do intestino, exercendo efeitos laxativos (NIJS *et al.*, 1992). Sendo assim, neste extrato deve haver outros componentes com ação sobre o TGI.

No estômago, o tipo de influência exercida pelo extrato variou com a dose, onde a menor concentração acelerou o esvaziamento gástrico, enquanto a maior, 500 mg/kg, apresentou efeito contrário, retardando o esvaziamento gástrico. Ou seja, o mesmo extrato, porém administrado em doses diferentes, apresenta efeitos contrários sobre o esvaziamento gástrico. Por outro lado, nas doses de 50 e 100 mg/kg, não houve diferença significativa em comparação com o controle negativo.

Este efeito exercido pelo extrato na dose 20 mg/kg pode ser resultado da atuação dos componentes do extrato sobre receptores que influenciam os movimentos peristálticos no estômago ou piloro. Entre os mecanismos conhecidos por acelerarem o esvaziamento gástrico estão o agonismo de receptores muscarínicos (M_2 e M_3) por agentes colinérgicos, como acetilcolina, betanecol e ésteres da colina em geral, a modulação de receptores serotoninérgicos, o antagonistas dopaminérgicos, como a metoclopramida, e a atuação de agentes anticolinesterásicos, como a neostigmina (HELLSTROM, 2006; RANG, *et al.*, 2008; RAO, *et al.*, 2009; CELLINI *et al.*, 2011). Dessa forma, existe a necessidade de se realizarem outros experimentos para determinar o(s) mecanismo(s) de atuação do extrato nestas concentrações, bem como determinar o(s) componente(s) ativo do extrato.

Podem-se sugerir algumas explicações para a diminuição do esvaziamento gástrico observado na dose de 500 mg/kg do extrato. Uma delas é o aumento no teor de substâncias lipofílicas, uma vez que o conteúdo gástrico rico em gorduras diminui o esvaziamento gástrico pela produção de hormônios e inibição da bomba pilórica (HUNT, *et al.*, 1968). Ou, ainda, o extrato pode ser composto por substâncias com ações antagônicas, das quais algumas exercem seu efeito na menor dose (20 mg/kg), e outras necessitam de uma dose maior para serem efetivas. Outro fato interessante é que nas doses maiores que 20mg/kg ocorre diminuição do esvaziamento gástrico, indicando ainda, que outras substâncias, em maiores concentrações, inibem a ação dos componentes que promovem o aumento do esvaziamento. Estas hipóteses podem ser confirmadas pela ausência de efeitos nas doses de 50 e 100 mg/kg, o que poderia indicar uma anulação dos efeitos de

ambas as substâncias nessas concentrações. Estudos mais detalhados devem ser realizados para tentar explicar essas observações.

No intestino, todas as doses testadas do extrato mostraram um resultado semelhante de redução no trânsito intestinal, em comparação com o grupo controle tratado com soro fisiológico.

Devido à presença marcante de compostos antraquinônicos no extrato alcoólico bruto do caule, o resultado esperado seria o aumento do trânsito intestinal, uma vez que antraquinonas promovem a aceleração dos movimentos intestinais, através de uma ação mecânica que é dependente dos microrganismos que compõem a flora intestinal (NIJS *et al.*, 1992; NIJS *et al.*, 1993; YAGI *et al.*, 1997). Entretanto, os efeitos exercidos pelo extrato do caule demonstraram atividade contrária aos efeitos laxativos das antraquinonas, reduzindo a motilidade intestinal. Este resultado talvez seja devido à presença de outros compostos cujo efeito seja maior que àquele induzido pelos compostos antraquinônicos. Ou ainda, possa haver substâncias que provoquem inibição da ação das antraquinonas, por barreiras físicas, impedindo o acesso aos microrganismos, ou por interações químicas, inativando os grupos químicos responsáveis pela propriedade laxativa.

Outro fato que reforça esta hipótese, é que o uso popular como laxativo é feito a partir de extratos obtidos das cascas de plantas deste gênero, como *Rhamnus purshiana*, por exemplo, sendo que o extrato utilizado neste estudo foi confeccionado a partir do caule; sendo assim, substâncias com efeitos contrários ou inibitórios aos da antraquinonas podem ter sido extraídas.

Este estudo demonstrou que o extrato bruto do caule apresenta efeitos sobre a motilidade gastrointestinal; entretanto, novos testes devem ser realizados para o esclarecimento do mecanismo de ação dos componentes presentes neste extrato.

6.7.2. Avaliação da atividade antiulcerogênica

O etanol exerce efeito ulcerogênico e necrosante que resulta em dano direto na mucosa. Induz a redução da produção de muco, pela inibição da produção e liberação de prostaglandinas, além de provocar danos no endotélio vascular da

mucosa gástrica, isquemia e produção de espécies reativas de oxigênio (MATSUHASHI *et al.*, 2007).

No modelo de úlcera induzida por etanol, o extrato alcoólico bruto do caule não previniu a formação das lesões ulceradas provocadas pela administração do etanol, ao contrário, aumentou a intensidade das lesões nas doses de 100 e 500 mg/kg (figura 23).

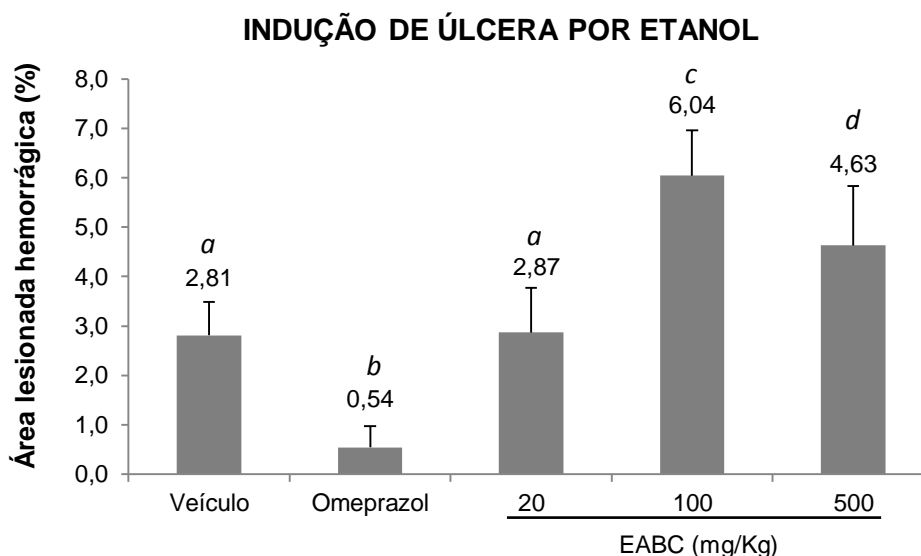


FIGURA 23. AVALIAÇÃO DAS ÚLCERAS INDUZIDAS POR ETANOL ABSOLUTO – QUANTIFICAÇÃO DA ÁREA LESIONADA COM HEMORRAGIA. (VEÍCULO = grupo tratado com salina; OMEPRAZOL = grupo tratado com omeprazol, 40 mg/kg; EABC = extrato alcoólico bruto do caule, 20; 100 e 500 mg/kg). Letras iguais indicam igualdade estatística (diferença estatística considerada para $p \leq 0,05$).

Este resultado pode ser explicado pelo efeito exercido pelo extrato sobre a motilidade gastrointestinal, que em doses elevadas promove a redução do esvaziamento gástrico, aumentando o tempo de permanência do agente lesivo, contribuindo para o aumento na intensidade das lesões. Porém, a aceleração da taxa de esvaziamento observada na dose de 20 mg/kg não foi suficiente para prevenir ou diminuir a intensidade das lesões, apenas não contribuiu para o agravamento do quadro. Como esperado, o controle omeprazol previniu o aparecimentos das úlceras induzidas pela administração de etanol.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados observados neste estudo, conclui-se que os objetivos propostos foram alcançados, e que *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* apresenta características que o tornam promissor no que diz respeito as suas atividades biológicas e farmacológicas, aliadas a sua rica composição química.

A espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, pertencente à família Rhamnaceae, possui em sua composição química grupos de metabólitos secundários de grande importância química e farmacológica, sendo a classe química das antraquinonas a mais expressiva neste vegetal. Neste estudo também foi possível a identificação das substâncias crisofanol, fisiona (antraquinonas), estigmasterol e sitosterol (fitoesteróis), que nunca foram descritas para esta espécie. Além disso, este vegetal apresenta um amplo potencial para o isolamento e identificação de novos compostos, uma vez que neste trabalho foram isoladas substâncias, as quais ainda não haviam sido identificadas nesta espécie.

A partir deste estudo também foi possível detectar a ausência de toxicidade dos extratos e frações a partir de método preliminar da toxicidade em *Artemia salina*. Mas, para assegurar a atoxicidade deste vegetal para uso em seres humanos e animais ainda são necessários novos ensaios preconizados pelos órgãos regulamentadores de saúde.

Apesar de não ter sido comprovada a atividade antimicrobiana neste trabalho, o extrato demonstrou possuir potencial antimicrobiano, visto que maiores doses não puderam ser testadas por limitações metodológicas.

Este vegetal possui ainda atividade antioxidante *in vitro*, demonstrada em diferentes testes, sendo evidenciada a inibição da peroxidação lipídica, o que permite explorar aplicações em setores industriais. Ou ainda, se torna interessante investigar a atuação das amostras em modelos *in vivo* de estresse oxidativo, para prevenção ou tratamento de doenças associadas a este problema.

Neste trabalho também foi verificada uma relevante ação inibitória sobre a motilidade gastrointestinal para o extrato bruto do caule. Este fato é interessante, já que os dados da literatura demonstram que extratos das cascas de plantas do mesmo gênero (ricos em antraquinonas) exercem efeito laxativo, ou seja, aceleram

a motilidade gastrointestinal. Desta maneira, novos estudos são necessários para descrever o mecanismo de ação deste vegetal sobre o trato gastrointestinal, assim como a elucidação das substâncias atuantes.

E, nos experimentos de indução de úlceras por etanol, o extrato não foi efetivo em inibir o aparecimento das lesões. O resultado deste teste sugere ainda, que a administração deste extrato, em doses elevadas, concomitante ao uso de álcool pode ser prejudicial ao organismo.

Este trabalho contribuiu para o enriquecimento dos dados a respeito de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, revelando importantes substâncias e atividades biológicas, porém, por se tratar de um vegetal com uma abundante composição química, ainda restam compostos para serem identificados e testados com relação as suas propriedades.

REFERÊNCIAS

ABDEL-ZAHER, A.O.; *et al.* Antidiabetic activity and toxicity of *Zizyphus spina* - Christi leaves. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 101, p. 129–138, 2005.

AMMAR, R.B. *et al.* Anti-lipid peroxidation and induction of apoptosis in the erythroleukaemic cell line K562 by extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae). **Natural Product Research**. V. 25 (11), p. 1047–1058, 2011.

AMMAR, R.B. *et al.* Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1-, nifuroxazide-, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. **Chemico-Biological Interactions**. V.174, p.1–10, 2008.

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

ANVISA: Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010.

AYERS, S. *et al.* Scutiaquinones A and B, Perylenequinones from the Roots of *Scutia myrtina* with Anthelmintic Activity. **Journal of Natural Products**. V. 70, p. 425-427, 2007.

BACHAYA, H.A.; *et al.* Anthelmintic activity of *Zizyphus nummularia* (bark) and *Acacia nilotica* (fruit) against *Trichostrongylid nematodes* of sheep. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 123, p. 325–329, 2009.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**. v. 29(1), p. 113-123, 2006.

BEDNARCZUK, V.O; VERDAM, M.C.S; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica. **Visão Acadêmica**.V.11 (2), p.43-50, 2010.

BHOURI, W.; *et al.* Induction of apoptosis in human lymphoblastoid cells by kaempferol 3-O-b-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-b-isorhamninoside from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae). **Cell Proliferation**. V.44, p. 283–290, 2011.

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

BOLIGON, A; *et al.* Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technology**. V.100, p. 6592–6598, 2009.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 30, p. 609–615, 1997.

BORGI, W.; GHEDIRA, K.; CHOUCANE, N. Antiinflammatory and analgesic activities of *Zizyphus lotus* root barks. **Fitoterapia**. V. 78, p.16–19, 2007.

BUTTERFIELD, A.D; *et al.* Lipid peroxidation and protein oxidation in alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid β -peptide-associated free radical oxidative stress. **Free radical biology & medicine**. V.32(11), p. 1050–1060, 2002.

CALIXTO, JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 100: 131-134, 2005.

CALIXTO, JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 33: 179-189, 2000.

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

CHAKRABORTY, S; SINGH, O.M.P.; DASGUPTA, A.; MANDAL, N.; DAS, H.N. Correlation between lipid peroxidation-induced TBARS level and disease severity in obsessive–compulsive disorder. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 33, p.363–366, 2009.

CELLINI, J.; JUKIC, A.M.Z.; LePARD, K.J. Neostigmine-induced contraction and nitric oxide-induced relaxation of isolated ileum from STZ diabetic guinea pigs. **Auton Neurosci.** V. 165(2), p.178–190, 2011.

CHOI, S.G. *et al.* Antidiabetic Stilbene and Anthraquinone Derivatives from *Rheum undulatum*. **Arch Pharm Res.** V. 28(9), p. 1027-1030, 2005.

CHU, X. *et al.* Preparative isolation and purification of five compounds from the Chinese medicinal herb *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A.** V. 1097, p.33–39, 2005.

CORRÊA, P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. 1926, v. 1-6.

CRONQUIST (1968). Sistemática de Angiospermas do Brasil, Classificação Segundo Cronquist, v.2, 1984.

CUNHA, A.P. **Farmacognosia e Fitoquímica.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 3 ed., 2010.

DUARTE, R.M.; BUDEL, M.J.; RAMOS, M.M. Diagnose anatomica foliar e caulinar de Fruto-de-pombo: *Rhamnus sphaerosperma* Sw. Var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. **Cadernos da Escola de Saúde Farmácia.** V. 1, 2008.

DINIZ, L.R.L., *et al.* Effect of triterpene saponins from roots of *Ampelozizyphus amazonicus* Ducke on diuresis in rats. **Journal of Ethnopharmacology.** V. 123, p. 275–279, 2009.

ELSOHLY, H.N.; DANNER, S.; LI, X.-C.; NIMROD, A.C.; CLARK, A.M. New Antimycobacterial Saponin from *Colubrina retusa*. **Journal of Natural Products.** V.62, p. 1341-1342, 1999.

GACHET, M.S.; *et al.* Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology.** V.128, p.184–197, 2010.

GOIS, R.W.S. estudo fitoquímico e biológico de *Bauhinia acuruana* Moric. Fortaleza, 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Ceará.

GENOVESE, S.; *et al.* Comparison of Three Different Extraction Methods and HPLC Determination of the Anthraquinones Aloe-emodine, Emodine, Rheine, Chrysophanol and Physcione in the Bark of *Rhamnus alpinus* L. (Rhamnaceae). **Phytochemical Analysis**. V.21, p. 261–267, 2010.

GIACOMELLI, S. R. *et al.* Cyclic peptide alkaloids from the bark of *Discaria Americana*. **Phytochemistry**. V. 65, p. 933–937, 2004.

GIACOMELLI, S. R. *et al.* Triterpenoids from *Gouania ulmifolia*. **Planta Medica**. V. 72, p.499-501, 2007.

GIULIETTI, A. M.; *et al.* , Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**. V.1, p. 52-61, 2005.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. V. 30 (2), 374-381, 2007.

HELLSTROM, P.M.; GRYBACK, P.; JACOBSSON, H. The physiology of gastric emptying. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**. V. 20 (3), p. 397-407, 2006.

HOU, Y.; *et al.* Antiproliferative and antimalarial anthraquinones of *Scutia myrtina* from the Madagascar forest. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. V. 17(7), p. 2871–2876, 2009.

HYUN, T.K.; EOM, S.H.; YU, C.Y.; ROITSCH, T. *Hovenia dulcis* – An Asian Traditional Herb. **Planta Medica**. V. 76, p. 943–949, 2010.

HUNT, J.N.; KNOX, M.T. A relation between the chain length of fatty acids and the slowing of gastric emptying. **J. Physiol**. V. 194, p.327-336, 1968.

IZHAKI, I. Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. **New Phytologist**. V.155, p. 205–217, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 7. ed. São Paulo: Nacional, 1985. 777p.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**.

Rio de Janeiro: Edur, 1997. 198 p.

KRETTLI, A.U.; ANDRADE-NETO, V.F.; BRANDÃO, M.G.L.; FERRARI, W.M.S. The Search for New Antimalarial Drugs from Plants Used to Treat Fever and Malaria or Plants Randomly Selected: a Review. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. Vol. 96 (8), p.1033-1042, 2001.

LEE, S.M.; *et al.* Cytotoxic triterpenóides from the fruits of *Zizyphus jujube*. **Planta Medica**, V. 69, p. 1051-1054, 2003.

LI, X-C.; ELSOHLY, N.; NIMROD, A.C., CLARK, A.M. Antifungal Jujubogenin Saponins from *Colubrina retusa*. **Journal of Natural Product**. V.62, 674-677, 1999.

LICHTENSTEIGER, C.A.; JOHNSTON, N.A.; BEA, V.R. *Rhamnus cathartica* (Buckthorn) Hepatocellular Toxicity in Mice. **Toxicology Pathology**. V. 25, p. 449, 1997.

LIMA, R.B. 2010. Rhamnaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000207>> Acesso em jul 2011.

LIN, C-N.; CHUNG, M.-I.; CAN, K.H.; LU, C.M. Flavonol and anthraquinone glycosides from *Rhamnus formosana*. **Phytochemistry**. V. 30 (9), p. 3103-3106, 1991.

LIU, J.; YEO, H.C.; DANIGER, S.J.; AMES, B.N. Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared with thiobarbituric acid. **Anal. Biochem**. 245, 161-166, 1997

LONGO, L.; VASAPOLLO, G.; RESCIO, L. Identification of Anthocyanins in *Rhamnus alaternus* L. Berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V.53, p. 1723-1727, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

MACIEL, M. A. M.; Angelo C. PINTO, A. C.; Valdir F.; VEIGA, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. V. 25 (3), 429-438, 2002.

MAI, L.P. *et al.* Cytotoxicity of Rhamnosylanthraquinones and Rhamnosylanthrones from *Rhamnus nepalensis*. **Journal of Natural Products**. V. 64, p.1162-1168, 2001

MATSUHASHI, T.; OTAKA, M.; ODASHIMA, M.; JIN, M.; KOMATSU, K.; WADA, I.; HORIKAWA, Y.; OHBA, R.; OYAKE, J.; HATAKEYAMA, N.; WATANABE, S. Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, p. 434 – 441, 2007.

MENSOR, L. L., *et al.* Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

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

MIGUEL, O.G. **Ensaio sistemático de análise em fitoquímica**. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** v. 26 (2), p. 211-219, 2004.

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.

MOREL, A.F.; *et al.* Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**. V. 66, p. 2571–2576, 2005.

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

NG, L-T.; LIN, C-C.; LU, C-M. Antioxidative effects of 6-Methoxysorigenin and its derivatives from *Rhamnus nakaharai*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. V.55(3), p.382-384, 2007.

NIJS, G.; WITTE, P.; GEBOES, K.; LEMLI, J. Influence of rhein anthrone and rhein on small intestine transit rate in rats: evidence of prostaglandin mediation. **European Journal of Pharmacology**. v. 218, p. 199-203, 1992.

NIJS, G.; WITTE, P.; GEBOES; MERTENS, J.; EYSSEN, H. Conventionalization of germ-free rats reverses the disability of rhein anthrone to induce laxation. **European Journal of Pharmacology**. v.239, p. 241-243, 1993.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 49, p. 503–515, 2010.

NISAR, M.; *et al.* Antinociceptive and Antipyretic Activities of the *Zizyphus oxyphylla* Edgew. Leaves. **Phytotherapy Research**. V. 21, p. 693–695, 2007.

OLIVEIRA, A.C.; *et al.* Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**. v. 32(3), p. 689-702, 2009.

PANDEY, M.B.; SINGH, A.K.; SINGH, V.P.; PANDEY, V.B. Cyclopeptide alkaloids from *Zizyphus sativa* bark. **Natural Product Research**. V. 22 (3), p. 219–221, 2008.

PENG, W-H. *et al.* Anxiolytic effect of seed of *Zizyphus jujuba* in mouse models of anxiety. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 72, p. 435–441, 2000.

PIETTA, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**. V.63, p.1035-1042, 2000.

PORTER, C. L. **Taxonomy of flowering plants**. 2nd ed. San Francisco: Freeman, c1959. xii, 452p.

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

QUIDEAU, S. *et al.* Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie Int. Ed**. V. 50, p. 586-621, 2011.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RAO, A.S.; CAMILLERI, M. Review article: metoclopramide and tardive dyskinesia. **Aliment Pharmacol Ther**. V. 31, p.11–19, 2009.

RICHARDSON, J. E.; *et al.* A phylogenetic of Rhamnaceae using *rbcl* and *trn-F* plastid DNA sequences. **American Journal of Botany**. v.87, n.9. p.1309-1324, 2000.

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

RODRIGUEZ, S.; MURRAY, A.P. Volatile components of *Discaria Americana* Gillies & Hook (Rhamnaceae). **Natural Product Research**. V. 22 (3), p. 253–257, 2008.

ROSAS, L.V.; CORDEIRO, M.S.C.; CAMPOS, F.R.; NASCIMENTO, S.K.R.; JANUÁRIO, FRANÇA, A.H.; NOMIZO, S.C.A.; TOLDO, M.P.A.; ALBUQUERQUE, S.; PEREIRA, P.S. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 40, p. 663-670, 2007.

SANTOS, S. Estudo anatômico do lenho e descrição Morfológica de cinco espécies Sul-rio-grandenses da família Rhamnaceae. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2008.

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

SCHULTZ, A. R. **Introdução ao estudo da botânica sistemática**: para uso nas faculdades de filosofia, de farmácia, escolas de agronomia, engenharia, geologia, etc. 3. ed. Porto Alegre, RS: Globo, 1968.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman`s reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1988.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis: UFSC, 2004.

SINGH, S.; PANDEY, M.B.; SINGH, A.K.; SINGH, U.; PANDEY, V.B.. A new chalcone glycoside from *Rhamnus nipalensis*. **Natural Product Research**. V. 22 (18), p.1657–1659, 2008.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

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

SYDISKIS, R.J.; OWEN, D.G.; LOHR, J.L.; ROSLER, K.-H.; BLOMSTER, A.R.N. Inactivation of Enveloped Viruses by Anthraquinones Extracted from Plants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V.35 (12), p. 2463-2466, 1991.

TERENCIO, M.C.; SANZ, M.J.; PAYA, M. A hypotensive procyanidin-glycoside from *Rhamnus lycioides* ssp. *Lycioides*. **Journal of Ethnopharmacology**. V.30, p. 205-214, 1990.

TERENCIO, M.C.; SANZ, M.J.; PAYA, M. Antihypertensive action of a procyanidin glycoside from *Rhamnus lycioides*. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 31, p. 109-114, 1991.

VAN GORKOM, B.A.P.; *et al.* Review article: anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. V.13, p. 443-452, 1999.

VIANA, F. A. C. Estudo comparativo, randomizado para avaliar a eficácia terapêutica de piperazina hexahidratada com extrato fluido de *Rhamnus purshiana* no tratamento de Ascaridíase. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.** v. 28, p. 25-30, 1995.

STYSKAL, J.; REMMEN, H.V.; RICHARDSON, A.; SALMON, A.B. Oxidative stress and diabetes: What can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? **Free Radical Biology & Medicine**. v. 52, p. 46–58, 2012.

WEI, B.-L.; LU, C.-M.; TSAO, L.-T.; WANG, J.-P.; LIN, C.-N. In Vitro Anti-Inflammatory Effects of Quercetin 3-O-Methyl Ether and Other Constituents from *Rhamnus* Species. **Planta Medica**. V. 67, 2001.

YAGI, T; YAMAUCHI, K.; KUWANO, S. The synergistic purgative action of aloemodin anthrone and rhein anthrone in mice: synergism in large intestinal propulsion and water secretion. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 49, p. 22-25, 1997.

ZANON, A; MEDEIROS, A.C.S. Conservação de sementes de fruto-de-pombo (*Rhamnus sphaerosperma* SWARTZ). **Boletim de Pesquisa Florestal, Colombo**, n. 36, p.29-39, 2002.