

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA SARAGIOTO KRAUSE

**ESTUDOS MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE FOLHA E CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE**

CURITIBA

2013

MARIANA SARAGIOTO KRAUSE

**ESTUDOS MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE FOLHA E CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE**

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

Orientadora: Profa. Dra. Márcia do Rocio Duarte
Coorientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANA SARAGIOTO KRAUSE

Título: ESTUDOS MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ZANTHOXYLUM RHOIFOLIUM LAM., RUTACEAE

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.



Profª. Dra. Márcia do Rocio Duarte
Orientadora



Prof. Dr. Roberto Pentarolo
Universidade Federal do Paraná



Dra. Juliane Rocha de Sant'Anna
Universidade Estadual de Maringá

Curitiba, 1 de março de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao meu Deus por me dar a vida, também agradeço aos meus pais Maria Inês e Adevair, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando.

Ao meu marido Lucas, pela compreensão, pelo amor e carinho nos momentos difíceis.

Às minhas irmãs e aos amigos pelo companheirismo.

À minha orientadora Márcia, pelas orientações e correções.

Ao meu coorientador Obdúlio pelas muitas conversas, paciência, amizade e confiança. À professora Marilis e ao professor Pontarolo pelo incentivo, apoio e pelos conselhos.

Ao biólogo Osmar do S. Ribas e aos funcionários do Museu Botânico Municipal de Curitiba pelas informações, pela identificação e pelo depósito do exemplar da espécie em estudo.

Ao Nilson, do Laboratório de Botânica, pela ajuda na preparação das lâminas permanentes.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio no processamento do material para realização da microscopia eletrônica de varredura.

Aos doutorandos Ranieri Campos, Vicinius de Oliveira, Cristiane de Paula, Cristina Peitz e Beatriz Hirota pelo auxílio e companheirismo.

Às mestrandas Thais Moreira, Ana Flávia Duarte, Fernanda Ocampos, Maria Fernanda Arruda, Daniela Oliveira, Juliana Kulik, Marileda Zuchetto e Samana Golin pela companhia, amizade, pelo auxílio e incentivo.

A todos os meus colegas de mestrado, em especial dos Laboratórios de Fitoquímica e Farmacotécnica.

À CAPES pela bolsa e pelos recursos e à UFPR pela colaboração.

RESUMO

A espécie medicinal *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. é uma Rutaceae, nativa do Brasil, conhecida popularmente como mamica-de-porca. O suco das folhas é usado, quando aplicado topicamente, contra dores de ouvido. Seu caule é utilizado na medicina popular no tratamento de dispepsias, cólicas e flatulência. O objetivo deste trabalho foi realizar estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule dessa espécie medicinal. Com referência à morfoanatomia, observou-se que a folha é composta, alternada e algumas vezes aculeada na face abaxial. A epiderme é uniestratificada, os estômatos são actinocíticos restritos à face abaxial, os tricomas são tectores em sua maioria do tipo unicelular, o mesofilo é dorsiventral, a nervura central apresenta formato côncavo-convexo e um feixe vascular colateral é observado nas folhas. No caule, o felogênio tem instalação superficial e há fibras. Cristais de oxalato de cálcio do tipo drusa e compostos fenólicos foram observados. Quanto à prospecção fitoquímica, nas frações acetato de etila, clorofórmio e hexano foram encontrados flavonoides, alcaloides e esteroides e/ou triterpenoides, enquanto que antocianidinas, saponinas e polifenóis foram detectados no extrato aquoso, tanto de folha como de caule, e taninos apenas em folha. Duas substâncias foram identificadas, os flavonoides hesperidina e vitexina. Com relação à atividade antioxidante, tanto no método da formação do complexo fosfomolibdênio como no TBARS a fração que apresentou o melhor resultado foi a fração hexano de folha. No estudo da atividade antimicrobiana, verificou-se que o extrato etanólico bruto e as frações de folha apresentaram atividade inibitória frente a *Pseudomonas aeruginosa* e a fração hidroalcoólica de caule apresentou inibição do crescimento da levedura *Candida albicans*. No teste de toxicidade a *Artemia salina*, foi observado que os extratos e as frações de folha e caule não são tóxicos ao microcrustáceo. Foi constatado que apenas as frações hidroalcoólicas de folha e caule apresentaram resultados positivos para hemólise, o que possivelmente indica a presença de saponinas hemolíticas na espécie em estudo. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento dessa espécie medicinal.

Palavras-chave: Anatomia Vegetal. Farmacobotânica. Flavonoides. Mamica-de-porca. Planta Medicinal.

ABSTRACT

The medicinal species *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. is a Rutaceae native to Brazil, commonly known in Portuguese as mamica-de-porca. The juice of the leaves is used topically against earaches. Its stem is used in folk medicine for the treatment of dyspepsia, flatulence and colic. The aim of this study was to investigate the morpho-anatomy, phytochemistry and biological activities of the leaf and stem of this medicinal species. Considering the morpho-anatomy, it was observed that the leaf is compound, alternate and sometimes aculeate on the abaxial surface. It has uniseriate epidermis, anomocytic stomata exclusively on the abaxial surface, unicellular non-glandular trichomes at mostly, dorsiventral mesophyll, concave-convex midrib, and a collateral vascular bundle. In the stem, the phellogen originates superficially. There are fibers, druses of calcium oxalate and phenolic compounds. With respect to the phytochemical screening, in ethyl acetate, chloroform and hexane fractions it was found respectively flavonoids, alkaloids, steroids and/or triterpenoids. Anthocyanidins, polyphenols and saponins were detected in the aqueous extract of leaf and stem and tannins only in leaf aqueous extract. Two substances were identified, the flavonoids hesperidin and vitexin. Regarding the antioxidant activity in both methods TBARS and phosphomolybdenum, the hexane fraction of the leaf presented higher antioxidant activity than the other samples. Considering the antimicrobial activity, the ethanol extract and fractions of the leaf inhibited *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans* growth was inhibited by the fraction of hydroalcoholic stem. In the *Artemia salina* toxicity assay, it was observed that the extracts and fractions from leaf and stem are nontoxic. Considering the hemolytic activity, only the hydroalcoholic fraction of the leaf and stem tested positive for hemolysis, which possibly may indicate the presence of hemolytic saponins in the species. The results of this work have contributed to the knowledge of this medicinal species.

Keywords: Flavonoids. Mamica-de-porca. Medicinal Plant. Pharmacobotany. Plant Anatomy.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (200 MHz, DMSO- d_6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-01, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE.....	60
GRÁFICO 2	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (200 MHz, DMSO- d_6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-01, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 10 - 120 PPM.....	61
GRÁFICO 3	ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200 MHz, DMSO- d_6 COM TMS) AMPLIADO DA SUBSTÂNCIA MS-01, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE.....	62
GRÁFICO 4	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200 MHz, DMSO- d_6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-01, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 1 - 5 PPM.....	63
GRÁFICO 5	CROMATOGRAMA OBTIDO DA SUBSTÂNCIA MS-02 ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, EM CLAE/UV, λ 267 nm, COLUNA X TERRA TM $5\mu\text{m}$ (MS C18, 250 mm x 4,6 mm d.i.).....	64
GRÁFICO 6	ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, EM METOH.....	66
GRÁFICO 7	ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, EM METOH ADICIONADO DE NAOH DEMONSTRANDO EFEITO BATOCRÔMICO NAS BANDAS 1 E 2, COMPARADO COM AS BANDAS 1a E 2a DO SUBSTÂNCIA EM METOH.....	67
GRÁFICO 8	ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, EM METOH E ADICIONADO DE HCl E AlCl_3 DEMONSTRANDO EFEITO BATOCRÔMICO EM QUATRO PICOS DE ABSORÇÃO 1, 2, 3 E 4, COMPARADO COM PICOS SUBSTÂNCIA EM METOH 1a, 2a, 3a E 4a.....	68

GRÁFICO 9	ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (200 MHz, DMSO-d6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE.....	71
GRÁFICO 10	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (200 MHz, DMSO-d6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 145 - 185 PPM.....	72
GRÁFICO 11	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (200 MHz, DMSO-d6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 90 - 130 PPM.....	73
GRÁFICO 12	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (200 MHz, DMSO-d6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 0 - 80 PPM.....	74
GRÁFICO 13	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (200 MHz, DMSO-d6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE.....	75
GRÁFICO 14	EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (200 MHz, DMSO-d6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 3 - 7 PPM.....	76
GRÁFICO 15	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, EM RELAÇÃO À VITAMINA C E RUTINA.....	78
GRÁFICO 16	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, E DO PADRÃO BHT.....	81

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE: ASPECTO GERAL NO HABITAT.....	22
FIGURAS 2-7	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE: 2. RAMO VEGETATIVO APICAL; 3. FOLHA COMPOSTA IMPARIPINADA; 4. FACE ADAXIAL DA EPIDERME FOLIAR, EM VISTA FRONTAL; 5. FACE ABAXIAL DA EPIDERME FOLIAR, EM VISTA FRONTAL; 6. TRICOMAS TECTORES ESTELARES (MEV); 7. DETALHE DE UM ESTÔMATO NA FACE ABAXIAL DA EPIDERME FOLIAR (MEV).....	47
FIGURAS 8-10	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, REGIÃO INTERNERVURAL DO FOLÍOLO, EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 8. INDICAÇÃO DE EPIDERME, TRICOMA TECTOR, PARÊNQUIMAS PALIÇÁDICO E ESPONJOSO E FEIXE VASCULAR DE PEQUENO PORTE; 9. PORMENOR DE UMA CAVIDADE SECRETORA NO MESOFILO; 10. DETALHE DE UM ESTÔMATO.....	48
FIGURAS 11-13	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, FOLÍOLO E NERVURA CENTRAL EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 11, 13. PARTE DO FEIXE VASCULAR, JUNTO À SUPERFÍCIE ADAXIAL E ABAXIAL, RESPECTIVAMENTE; 12. PORMENOR DO FEIXE VASCULAR COLATERAL, BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA, FLOEMA E XILEMA.....	49
FIGURAS 14-17	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, FOLHA EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 14. PORMENOR DO PECÍOLO, COM DESTAQUE PARA O FEIXE VASCULAR COLATERAL; 15. DETALHE DA ALA LATERAL DO PECÍOLO; 16, 17. ASPECTO DA RAQUE.....	50
FIGURAS 18-20	<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, CAULE EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 18. PORMENOR DA EPIDERME INDICANDO TRICOMA E EPIDERME; 19. DETALHE DO CILINDRO VASCULAR, ONDE SE NOTA PARTE DA BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA, FLOEMA E XILEMA; 20. DETALHE DO XILEMA E DA MEDULA.....	51

FIGURA 21

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA, DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, FRENTE AO MICRO-ORGANISMO *Escherichia coli*..... 82

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1	FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADOS EM FOLHA E CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE.....	43
TABELA 2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS DE FOLHA E CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE.....	54
TABELA 3	DADOS DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C E ¹ H DA SUBSTÂNCIA MS-01, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA HESPERIDINA.....	59
TABELA 4	VALORES DE COMPRIMENTOS DE ONDA DAS BANDAS 1 - 4 REFERENTES À VARREDURA NO ULTRAVIOLETA DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE.....	65
TABELA 5	DADOS DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C E ¹ H DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA VITEXINA.....	70
TABELA 6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, EM RELAÇÃO À VITAMINA C E RUTINA.....	77
TABELA 7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, E DO PADRÃO BHT.....	80

TABELA 8	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE, FRENTE AOS MICRO-ORGANISMOS <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> E <i>Candida albicans</i>	83
TABELA 9	MORTALIDADE E ÍNDICE DE MORTALIDADE DE <i>Artemia salina</i> AVALIADOS FRENTE AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E ÀS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE.....	85
QUADRO 1	POSIÇÃO SISTEMÁTICA DO GÊNERO <i>Zanthoxylum</i>	19
QUADRO 2	MICRO-ORGANISMOS INDICADORES UTILIZADOS NO ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, DE FOLHA E CAULE DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> LAM., RUTACEAE.....	40

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABAP	- Cloreto de 2,2'- azo-bis 2-amidinopropano
AlCl ₃	- Cloreto de alumínio
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BHT	- Butil-hidroxitolueno
BM	- Banho-maria
CIM	- Concentração inibitória mínima
DL50	- Dose letal média
DMSO-d ₆	- Dimetilsulfóxido deuterado
H ₃ PO ₄	- Ácido fosfórico
H ₂ SO ₄	- Ácido sulfúrico
HCl	- Ácido clorídrico
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
IV	- Infravermelho
METOH	- Metanol
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
NaOAc	- Acetato de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
p.a.	- Pró-análise
ppm	- Partes por milhão
RMN	- Ressonância magnética nuclear
SDS	- Dodecilsulfato de sódio
TBA	- Ácido tiobarbitúrico
TBARS	- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TMS	- Tetrametilsilano
TCC	- Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UFC	- Unidades Formadoras de Colônias
UV	- Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL.....	17
1.1.1 Objetivos específicos.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 FAMÍLIA RUTACEAE.....	18
2.2 GÊNERO <i>Zanthoxylum</i>	19
2.3 <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	20
2.4 ESTUDOS QUÍMICOS DE <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	32
3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	32
3.2.1 Lâminas semipermanentes.....	32
3.2.2 Lâminas permanentes.....	33
3.2.3 Dissociação da epiderme.....	33
3.2.4 Testes microquímicos.....	33
3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura.....	33
3.3 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	34
3.3.1 Cinzas totais.....	34
3.3.2 Umidade.....	35
3.3.3 Extratos brutos e frações.....	34
3.3.4 Ensaio sistemático em fitoquímica.....	35
3.3.5 Isolamento e identificação de flavonoides.....	37
3.3.6 Avaliação da atividade antioxidante.....	38
3.3.6.1 Método de formação do complexo fosfomolibdênio.....	38
3.3.6.2 Método TBARS.....	39

3.4 ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	40
3.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	40
3.4.2 Teste de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	41
3.4.3 Avaliação da atividade hemolítica	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 MORFOANATOMIA.....	44
4.1.1 Folha.....	44
4.1.2 Caule.....	46
4.2 ESTUDO FITOQUÍMICO.....	54
4.2.1 Determinação do teor de cinzas totais.....	54
4.2.2 Determinação do teor de umidade.....	55
4.2.3 Ensaio sistemático em fitoquímica.....	55
4.2.4 Isolamento e identificação de compostos.....	56
4.2.5 Atividade antioxidante.....	77
4.2.5.1 Método de formação do complexo fosfomolibdênio.....	77
4.2.5.2 Método TBARS.....	80
4.3 ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	82
4.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	82
4.3.2 Avaliação da toxicidade a <i>Artemia salina</i>	84
4.3.3 Avaliação da atividade hemolítica.....	86
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, o homem busca na natureza recursos para melhorar suas condições de vida, aumentando suas chances de sobrevivência. O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizadas pelo homem das cavernas, até as formas tecnologicamente mais sofisticadas à disposição do homem moderno (LORENZI; MATOS, 2002).

O avanço científico e tecnológico no uso das plantas medicinais acontece por meio do estudo detalhado, comprometido e aprofundado. A farmacognosia é a ciência que estuda as matérias-primas naturais, na sua maioria de origem vegetal (BRUNETON, 2001), e busca o isolamento, a identificação e a verificação da atividade farmacodinâmica de compostos bioativos (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1998).

Quando não se dispõe de estudos químicos sobre as espécies de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar o grupo de metabólitos secundários relevante das mesmas. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural (SIMÕES *et al.*, 2010). As oportunidades para identificação de produtos com possível utilização econômica aumentam com a diversidade das espécies (LEVIN, 1976).

A farmacognosia é importante e decisiva no Brasil, pois o país apresenta grande potencial vegetal ainda sem estudo, que pode contribuir no desenvolvimento de novos medicamentos. Torna-se, portanto, necessária à implantação de um programa contínuo e eficiente de estudos científicos para qualquer conquista de valor na área de plantas medicinais (YUNES *et al.*, 2001).

A família Rutaceae é um exemplo do potencial vegetal do Brasil, apresentando muitos representantes nativos, como as espécies do gênero *Pilocarpus*, conhecidas popularmente como jaborandi, fonte natural da pilocarpina. Destacam-se também *Ruta graveolens* L., tradicional arruda da medicina popular, e o gênero *Citrus* com vários tipos de frutos comestíveis (JOLY, 1998; SOUZA; LORENZI, 2008).

O gênero *Zanthoxylum* apresenta espécies com uso medicinal, podendo-se citar *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. Estudos demonstraram atividades antiparasitária

(BERTANI *et al.*, 2005; JULLIAN *et al.*, 2006; PENELUC *et al.*, 2009), antinociceptiva, analgésica (PEREIRA *et al.*, 2010), citotóxica (SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007a), quimioterápica (SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007b), antitumoral e antimicrobiana (WEBER, 2005; COSTA *et al.*, 2010).

Muitos estudos foram realizados para o isolamento e a elucidação estrutural de alcaloides (WEBER, 2005; TABORDA; SUAREZ, 2007; ZANON, 2010) e de componentes do óleo essencial (GONZAGA *et al.*, 2003a; SILVA; FIGUEIREDO; YANO, 2007a,b; PRIETO *et al.*, 2011) de *Z. rhoifolium*, porém pouco se conhece sobre os flavonoides presentes na planta (ARRUDA *et al.*, 1992).

Diante da importância do táxon, neste trabalho objetiva-se investigar *Z. rhoifolium*, sob os aspectos morfoanatômico, fitoquímico com enfoque em flavonoides e de atividades biológicas, com a finalidade de acrescentar dados ao conhecimento da flora brasileira e dessa planta medicinal e potencial droga vegetal.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae.

1.1.1 Objetivos específicos

- Caracterizar a morfoanatomia (macro e microscopia);
- Determinar cinzas totais;
- Realizar ensaio sistemático em fitoquímica;
- Isolar e identificar substâncias químicas da fração acetato de etila, obtida a partir do extrato etanólico bruto;
- Determinar atividade antioxidante do extrato etanólico bruto e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica;
- Pesquisar atividades biológicas do extrato etanólico bruto e das frações: ação antimicrobiana, toxicidade a *Artemia salina* e atividade hemolítica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA RUTACEAE

A família Rutaceae está compreendida na ordem Sapindales. O táxon é composto de aproximadamente 150 gêneros e 1.600 espécies, distribuídas em regiões temperadas do hemisfério sul e tropicais de todo o mundo, porém mais abundantes na Austrália e no sul da África (BARROSO *et al.*, 1991; EVANS, 1991; FERRONATO, 2010). No Brasil ocorrem 32 gêneros nativos e aproximadamente 150 espécies, encontrados nos centros de diversidade, ou seja, Florestas Atlântica e Amazônica (PIRANI, 2005; SOUZA; LORENZI, 2008).

São plantas perenes, principalmente arbustivas e arbóreas, raramente herbáceas, frequentemente aculeadas. A família apresenta folhas com formas e composição muito variáveis, essencialmente alternas, raras vezes opostas em alguns gêneros, frequentemente compostas (1-3 folioladas ou pinadas), sem estípulas, com glândulas que secretam óleos essenciais fortemente aromáticos (REITZ *et al.*, 1973; PIRANI, 2005; FERRONATO, 2010). Espaços secretores esquizógenos, que aparecem como pontos translúcidos estão presentes na planta. As flores são actinomorfas, raramente zigomorfas, hermafroditas, na grande maioria de diclamídeas. Os frutos são do tipo baga, drupa ou cápsula (BARROSO *et al.*, 1991; AGAREZ *et al.*, 1994).

A família Rutaceae apresenta uma variedade de metabólitos secundários já descritos como: alcaloides, cumarinas, flavonoides, lignanas, limonoides e terpenoides (Ambrosim, 2004). Do ponto de vista econômico destaca-se o gênero *Citrus* com muitos frutos comestíveis, entre eles bergamota (*Citrus × bergamia* Risso & Poit.), laranja (*C. aurantium* L.), limão (*C. limon* (L.) Burm. f.), lima (*C. lima* Macfad.), cidra (*C. medica* L.), pomelo (*C. maxima* (Burm.) Osbeck) e toranja (*C. paradisi* Macfad.). Também podem ser citadas as espécies produtoras de madeira de boa qualidade, como *Zanthoxylum* spp., o guarantã (*Esenbeckia leiocarpa* Engl.), o pau-marfim (*Balfourodendron eburneum* Mello ex Oliv.) e o pau-amarelo da região amazônica representado por espécies do gênero *Euxylophora* (JOLY, 1998; SOUZA; LORENZI, 2008).

Os representantes de Rutaceae são usualmente utilizados na medicina popular na forma de infusões para uma variedade de doenças inflamatórias

(MOURA *et al.*, 1997). Destacam-se diversas espécies com atividade fungicida, bactericida, antioxidante e citotóxica, como *Citrus reticulata* Blanco (Yi *et al.*, 2008), *C. sinensis* (L.) Osbeck, *C. aurantium*, *C. paradisi* (CACCIANI *et al.*, 1998), *Ruta graveolens* L. (IVANOVA *et al.*, 2005), *R. chalepensis* L. (IAUK *et al.*, 2004), e o jaborandi (*Pilocarpus spp.*) que fornece o alcaloide pilocarpina usado no tratamento de glaucoma e tem ação diaforética e cardiotônica (AGAREZ *et al.*, 1994; BERK, 2008; SAWAYA *et al.*, 2011).

2.2 GÊNERO *Zanthoxylum*

Zanthoxylum significa madeira amarela (*xanthos* = amarelo e *xylum* = madeira) (BARROSO *et al.*, 1991). O gênero (incluindo *Fagara*) compreende aproximadamente 200 espécies lenhosas, arbustivas ou arbóreas, pantropicais, com poucas espécies estendendo-se nas zonas temperadas da América do Norte e leste da Ásia (MELO; ZICKEL, 2004). O gênero *Zanthoxylum* é classificado segundo o sistema APG III (2009) conforme o QUADRO 1.

SISTEMA APG III	
REINO	Plantae
CLADO	Angiospermas
CLADO	Eudicotiledôneas nucleares
CLADO	Rosídeas
ORDEM	Sapindales
FAMÍLIA	Rutaceae
GÊNERO	<i>Zanthoxylum</i>

QUADRO 1 - POSIÇÃO SISTEMÁTICA DO GÊNERO *Zanthoxylum*
 FONTE: APG III (2009)

Uma característica marcante do gênero é apresentar tronco, ramos ou folhas frequentemente aculeados e indumento de tricomas simples, bífidos ou estrelados (PIRANI, 2005). As folhas são compostas, geralmente de disposição alternada, com a margem inteira ou crenada, sem estípulas, providas de glândulas oleíferas. Apresentam flores com inflorescência paniculada típica (REITZ *et al.*, 1973; BARROSO *et al.*, 1991).

Há muitas espécies com uso medicinal, podendo-se citar *Zanthoxylum xanthoxyloides* Lam., que possui atividades fungicida, bactericida, antioxidante e citotóxica (NGASSOUM *et al.*, 2003); *Z. leprieurii* Guill. & Perr. pode

ser usada como bactericida, no tratamento da esterilidade e de úlcera (NGANE *et al.*, 2000; TATSADJIEU *et al.*, 2003); *Z. ailanthoides* Sieb. & Zucc. com propriedades antioxidante e antimicrobiana (CHUNG *et al.*, 2006); *Z. chalybeum* Engl. usada contra malária, resfriado e pneumonia; *Z. usambarense* (Engl.) Kokwaro eficaz no tratamento de reumatismo (MATU; STADEN, 2003); *Z. armatum* DC. com atividade inseticida (TEWARY; BHARDWAJ; SHANKER, 2005) e *Z. budrunga* Wall. com propriedades antimicrobiana e citotóxica (ISLAM *et al.*, 2001).

2.3 *Zanthoxylum rhoifolium*

Zanthoxylum rhoifolium Lam. (FIGURA 1) tem como sinonímia botânica *Fagara rhoifolia* (Lam.) Engl., *Z. perrotetti* DC. e *Z. sorbifolium* A.St.-Hil. É amplamente distribuído por toda a América do Sul, do norte até a Argentina, ocorrendo em vários tipos de formações vegetais, sendo mais frequente na orla e em clareira de floresta, mata de terra firme e capoeira (PIRANI, 2005). Também pode ser encontrado em terrenos não cultivados, em solos arenosos a arenoargilosos (MELO; ZICKEL, 2004). No Brasil pode ocorrer em todo o país, principalmente na mata pluvial da encosta atlântica e na floresta semidecídua de altitude (LORENZI, 2002).

Floresce de setembro a maio, frutifica principalmente de novembro a julho (PIRANI, 2005). É designado geralmente pelos seguintes nomes vulgares: laranjinha-do-mato, limãozinho, cafezinho (Pernambuco), mamica-de-porca, tinguaciba-da-folha miúda, guarita, espinho-de-vintém, mamica-de-cadela, teta-de-cadela, teta-de-porca, tembetaru, tambatarão, juva, juvevê (sudeste e sul do Brasil), tamanqueira-de-espinho, tamanqueira-de-terra-firme, tamanqueira-limão e carne-de-anta (Amazônia) (REITZ *et al.*, 1973; MELO; ZICKEL, 2004; PIRANI, 2005).

As árvores medem aproximadamente 12 a 20 m de altura e os troncos possuem de 30 a 40 cm de diâmetro, têm uma leve forma de cone, com ramificação racemosa. A copa é grande e arredondada, com folhagem não muito densa, de cor verde clara.

A casca do caule tem coloração cinza escura, com acúleos grandes, de pontas finas e bases bem alargadas afixadas na parte interna da casca. A madeira tem cor amarelada, é leve e dura, de boa qualidade, própria para construção civil, carroçaria,

marcenaria, carpintaria, ripas, remos e cabos de instrumentos agrícolas e de ferramentas (REITZ *et al.*, 1973). A árvore é ornamental e pode ser usada no paisagismo, principalmente na arborização urbana (LORENZI, 2002).

As folhas são de cor verde amarelada, compostas e alternadas, apresentam de 5 a 13 pares de folíolos opostos, lâminas elípticas até oblongo-elípticas frequentemente aculeadas no dorso, com margens crenadas e medem geralmente de 3 a 8 cm de comprimento e 1 a 2 cm de largura (CORRÊA, 1973).

A raiz é amarga e aromática, ligeiramente adstringente, tônica, estomáquica e febrífuga. A casca é também amarga e tônica e é recomendada para dispepsias, flatulências e cólicas. O suco das folhas é usado, quando aplicado topicamente, contra dores de ouvido (CORRÊA, 1973).



FIGURA 1 - *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE: ASPECTO GERAL NO HABITAT
FONTE: O AUTOR (2011)

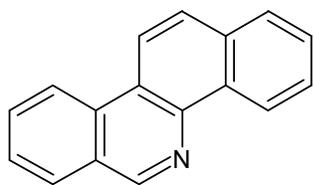
2.4 ESTUDOS QUÍMICOS DE *Zanthoxylum rhoifolium*

As plantas da família Rutaceae produzem uma variedade de constituintes químicos, dentre esses podem ser citados óleos essenciais, alcaloides, glicosídeos e substâncias amargas que são encontrados principalmente em tecidos de crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e dutos (FONT QUER, 2001; SIMÕES *et al.*, 2010).

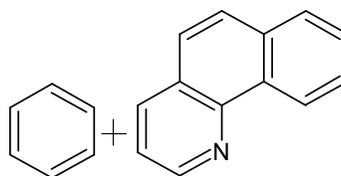
A) Alcaloides

Em *Z. rhoifolium* foram identificados alcaloides com núcleo benzofenantridínico (1 e 2), que são uma classe da família dos isoquinolínicos (BRUNETON, 2001). Os alcaloides benzofenantridínicos são comuns no gênero e podem ser utilizados como marcadores (SUN; DUAM, 1996). Estudos relatam a capacidade destes em inibir a aderência de bactérias na formação da placa dental e serem utilizados em dentifrícios e enxaguatórios bucais na prevenção de periodontite (GODOWSKI, 1989).

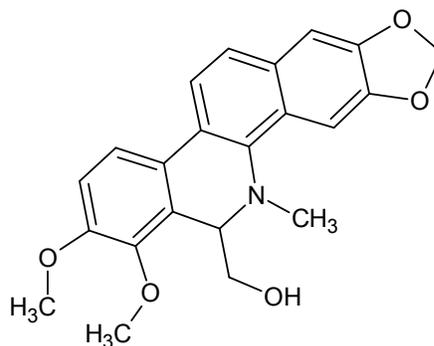
Os alcaloides benzofenantridínicos isolados de *Z. rhoifolium* são: boconolina (3), queleritrina (4), 6-acetonil-di-hidroqueleritrina (5), zantoxilina (6), zantoxilina A (7), roifolina A (8), roifolina B (9), fagaridina (10), avicina (11), oxiavicina (12), nitidina (13) e oxinitidina (14). Esses compostos foram encontrados em folha, fruto, casca de raiz e de caule (GONZAGA *et al.*, 2003b; WEBER, 2005; TABORDA; SUAREZ, 2007; ZANON, 2010).



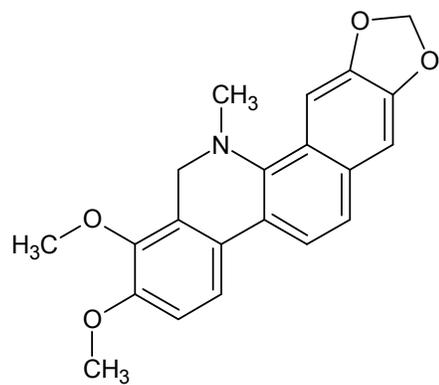
(1)



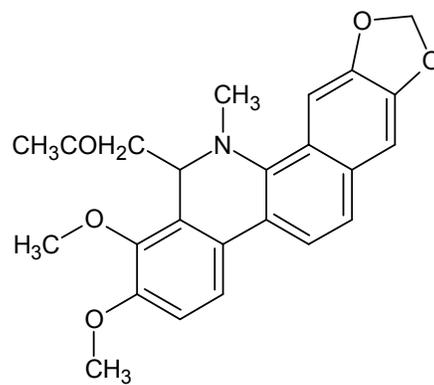
(2)



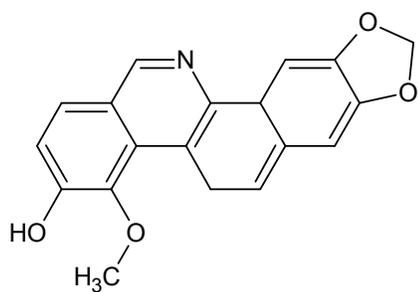
(3)



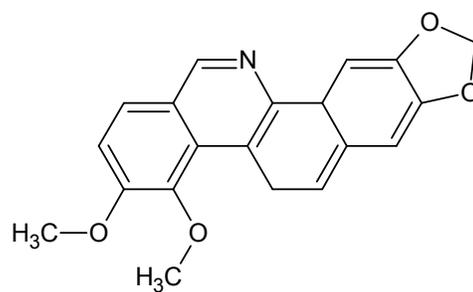
(4)



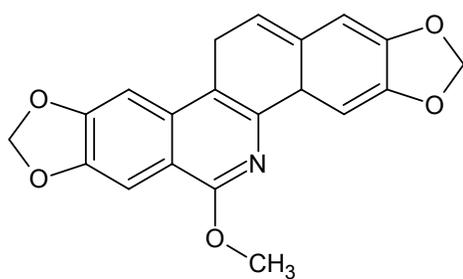
(5)



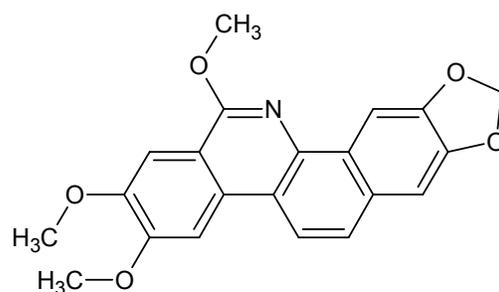
(6)



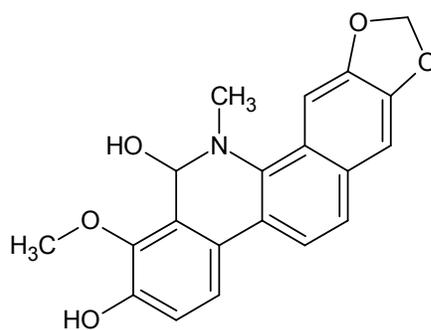
(7)



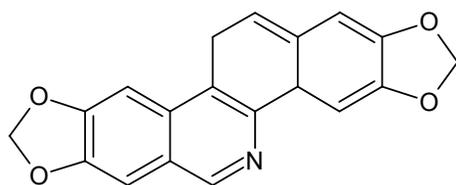
(8)



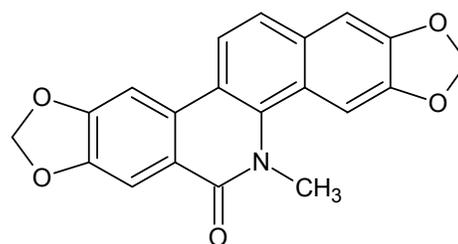
(9)



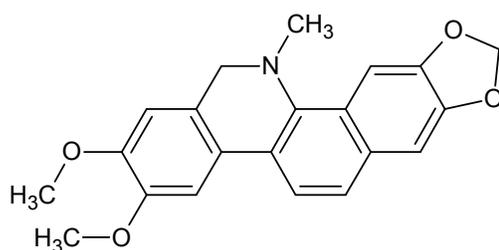
(10)



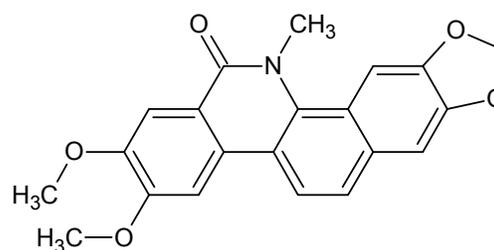
(11)



(12)



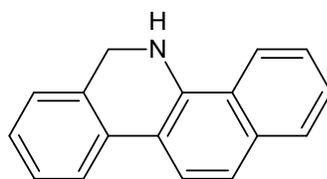
(13)



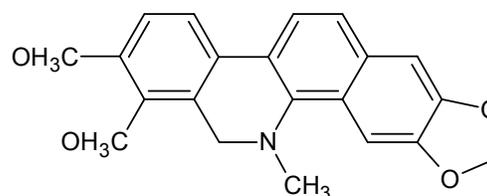
(14)

O alcaloide queleritrina (4) apresenta atividade antitumoral e citotóxica. Estudos recentes com o alcaloide demonstraram atividade antimicrobiana em baixas concentrações. O composto químico roifolina, do qual derivam os alcaloides roifolina A (8) e roifolina B (9), tem efeito antiarrítmico. Os metabólitos nitidina (13) e oxinitidina (14) possuem ação antitumoral e o primeiro é inibidor da transcriptase reversa e tem efeito sobre o protozoário *Plasmodium falciparum* por sua ação citotóxica e inibidora da DNA topoisomerase I (DUKE, 1992; WEBER, 2005; JULLIAN *et al.*, 2006).

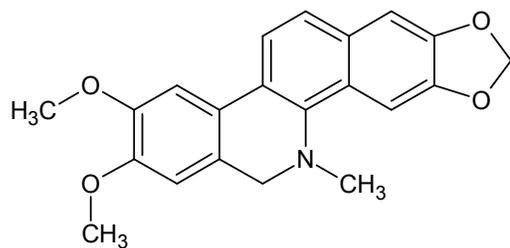
Foram isolados alcaloides com núcleo di-hidrobenzofenantridínicos (15) na espécie: di-hidroqueleritrina (16), di-hidronitidina (17) e di-hidroavicina (18) (MOURA *et al.*, 1997; JULLIAN *et al.*, 2006; ZANON, 2010).



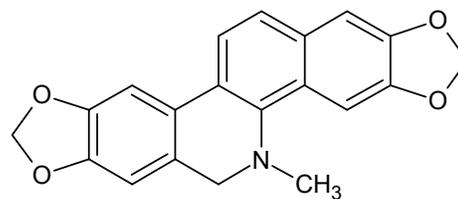
(15)



(16)

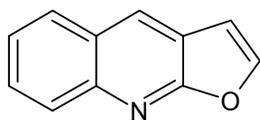


(17)

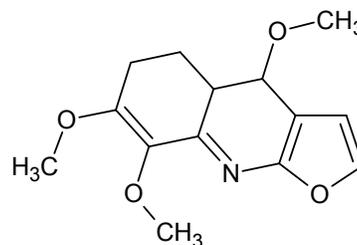


(18)

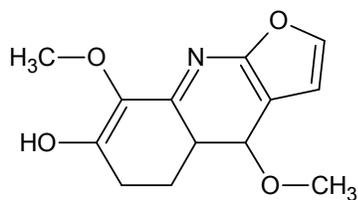
Seis alcaloides com núcleo furoquinolínico (19) foram identificados: skimianina (20), haplopina (21), Z-dimetilroifolina (22), fagarina (23) e 8-hidroxi-4,7-dimetoxi-furoquinolina (24). Esses metabólitos foram isolados de fruto, folha e caule da espécie (ARRUDA *et al.*, 1992; MOURA, 1997; JULLIAN *et al.*, 2006; ZANON, 2010).



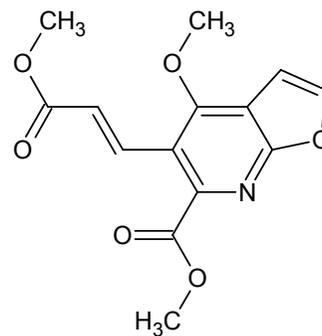
(19)



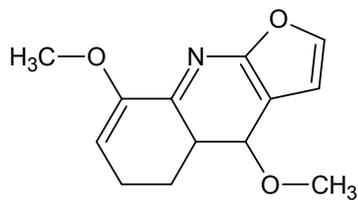
(20)



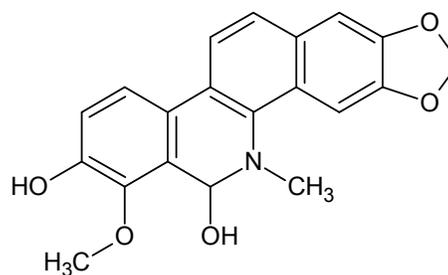
(21)



(22)



(23)

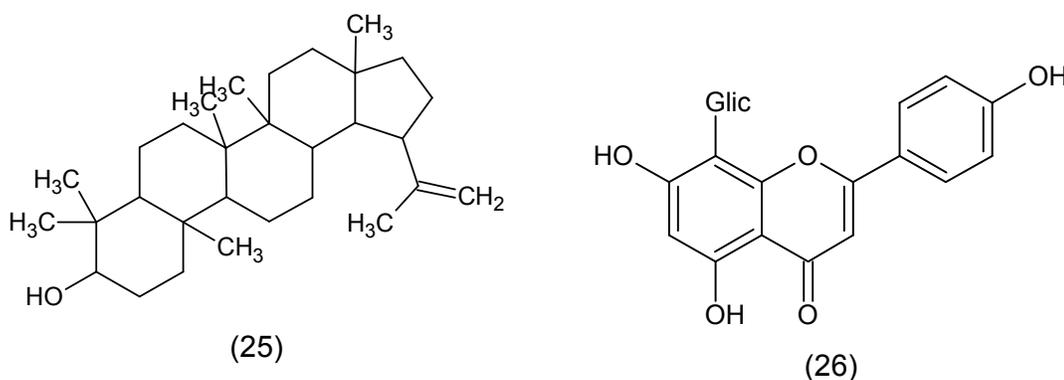


(24)

O alcaloide skimianina (20) é comum em Rutaceae. Apresenta atividade antiespasmódica, miorreloxante, sedativa e vasodilatadora. O composto químico fagarina (23) tem atividade antiarrítmica e espasmolítica (DUKE, 1992).

B) Terpenoides

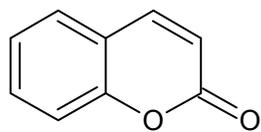
Foi isolado de caule, folha e fruto de *Z. rhoifolium* um triterpeno pentacíclico, o lupeol (25) e um esteroide o β -sitosterol (26) (ARRUDA *et al.*, 1992; WEBER, 2005; ZANON, 2010).



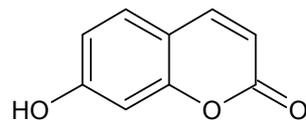
O triterpeno lupeol (25) apresenta uma diversidade de ações já descritas na literatura, como antirreumático, antitumoral e citotóxico (DUKE, 1992). Gallo e Sarachine (2009) pesquisaram as atividades biológicas do lupeol e encontraram ação anti-inflamatória e anti-hipertensiva, uma baixa citotoxicidade e modulação da resposta inflamatória.

C) Cumarinas

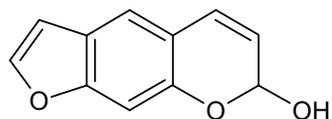
Foram isoladas em *Z. rhoifolium* por Arruda *et al.* (1992) cumarinas pertencentes a diferentes classes. A cumarina classificada como simples (27), umbeliferona (28), as furanocumarinas (29), isopimpinellina (30) e imperatonina (31), a furanocromona (32), felopterina (33) e as cumarinas o-preniladas (34), auraptena (35) e 5-hidroxiauraptena (36).



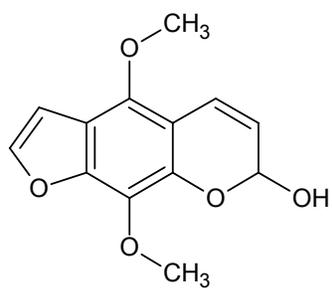
(27)



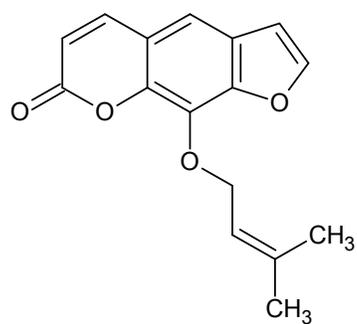
(28)



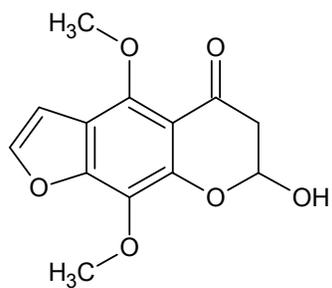
(29)



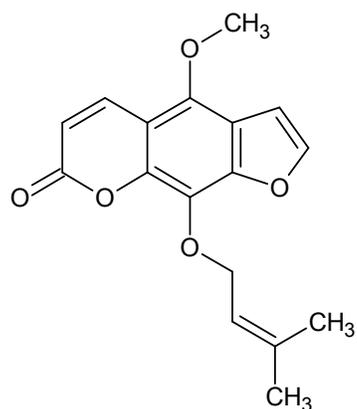
(30)



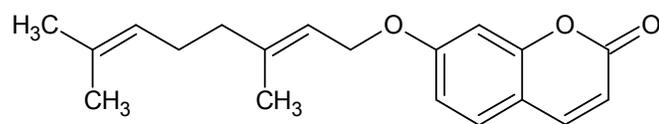
(31)



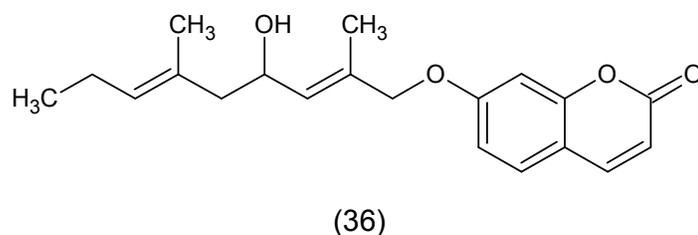
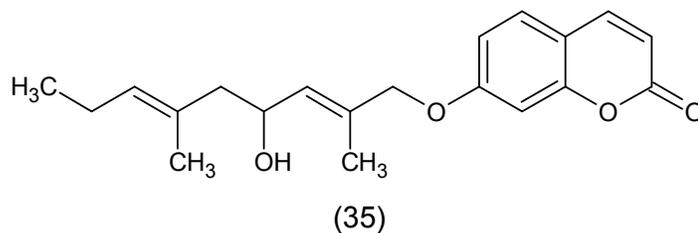
(32)



(33)



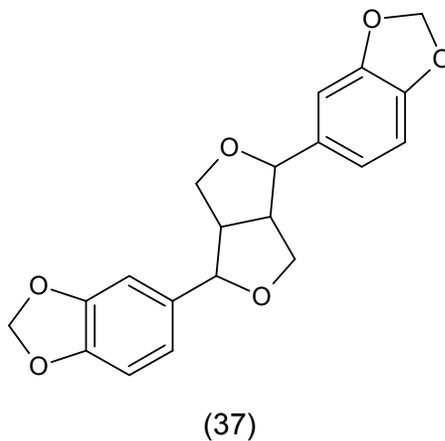
(34)

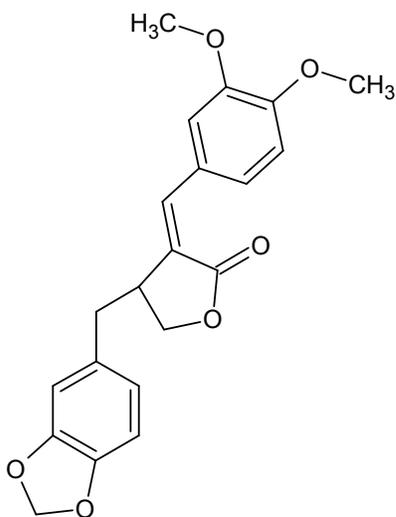


A umbeliferona (28) tem atividade aleloquímica, anti-histamínica, antisséptica, fungicida e protetora solar. A furanocumarina isopimpinellina (30) possui atividade anti-inflamatória, diurética, inseticida e mutagênica e a imperatonina (31) demonstra ação anticonvulsivante, anti-inflamatória, antimutagênica, hepatotóxica e moluscicida. A cumarina auraptena (35) é espasmolítica (DUKE, 1992).

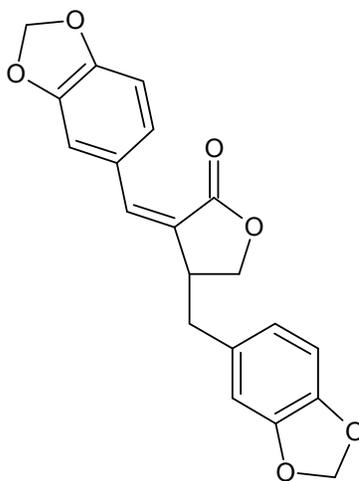
D) Lignanas

Possuem uma diversa atividade biológica comprovada, dentre elas podem ser citadas: antitumoral, antifúngica e anti-inflamatória. As lignanas encontradas na espécie em questão são a sesamina (37), kaerofilina (38) e gadaína (39) (WEBER, 2005; SIMÕES *et al.*, 2010; ZANON, 2010).





(38)

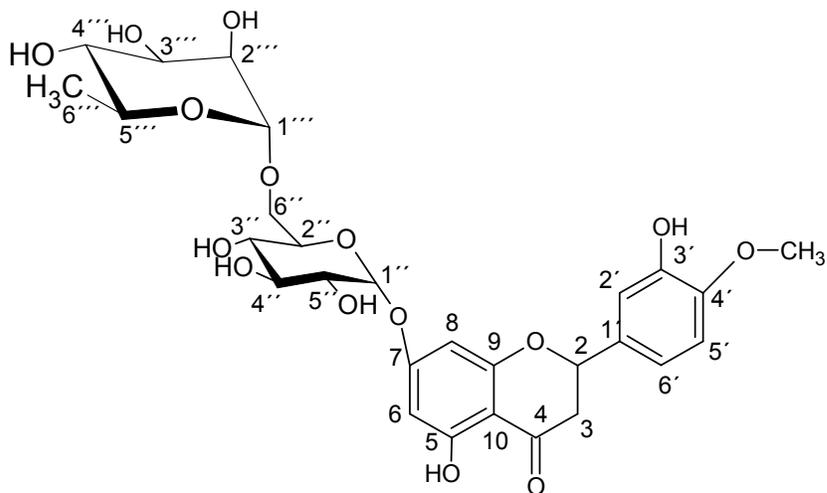


(39)

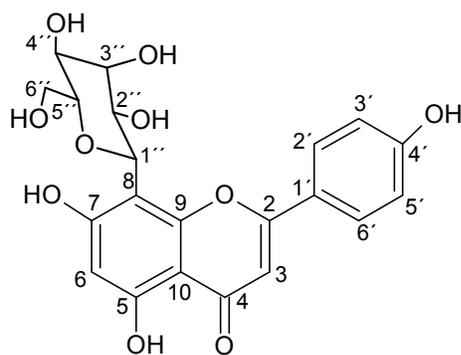
A lignana sesamina (37) possui funções biológicas diversas, como ação antioxidante, bactericida e citostática (DUKE, 1992). Estudos revelam que a sesamina previne o acúmulo de colesterol e diminui a sua absorção (ROGI *et al.*, 2011).

E) Flavonoide

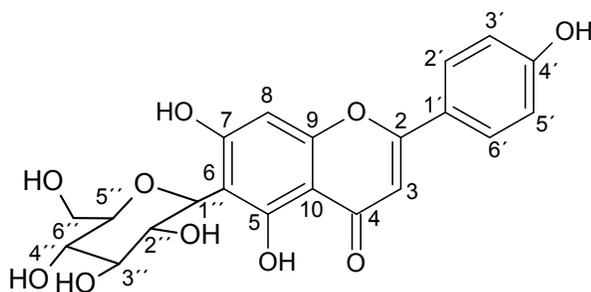
Em *Z. rhoifolium* foi isolado de caule e identificado com uso de RMN o flavonoide hesperidina (40) (ARRUDA *et al.*, 1992), e os flavonoides vitexina (41) e isovitexina (42) foram isolados de folha e identificados por cromatografia em papel e ultravioleta por Von Poser, Gosmann e Camargo (1989).



(40)



(41)



(42)

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BOTÂNICO

Foi realizada a coleta de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae, no Campus Jardim Botânico da UFPR, em Curitiba, localizado nas coordenadas aproximadas de 25° 26' S e 49° 14' W, na altitude de 930 m, em agosto de 2011.

Os exemplares foram submetidos à confecção de exsicata e identificação no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba-PR. Esta foi depositada sob registro MBM 375903.

O material coletado foi processado para a realização dos estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas.

Posteriormente foi efetuada uma nova coleta em novembro de 2011, este material foi adicionado ao anterior e utilizado para estudos fitoquímico e de atividades biológicas.

3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Foram feitos estudos morfoanatômicos com folha desenvolvida, a partir do quarto nó, e caule jovem, obtido entre 5 a 30 cm do ápice caulinar. Foi adotada a classificação de Hickey (1974) para determinar a morfologia externa foliar. O material foi fixado em FAA 70 (JOHANSEN, 1940) e posteriormente estocado em etanol a 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

3.2.1 Lâminas semipermanentes

Secções transversais e longitudinais, incluindo paradérmicas à mão livre foram feitas do material vegetativo fixado, para montagem de lâminas semipermanentes. Analisaram-se caule, pecíolo, raque, peciólulo e terço inferior do folíolo. A coloração foi efetuada com azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1972). As lâminas foram montadas com glicerina a 50% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e para a lutagem foi utilizado esmalte incolor (BEÇAK; PAULETE, 1976). O material foi observado e fotografado no microscópio Olympus CX41.

3.2.2 Lâminas permanentes

Para a confecção de lâminas permanentes utilizou-se o material fixado, desidratado em série etanólica crescente e incluído em glicol-metacrilato (Leica Historesin ®). Este foi seccionado no plano transversal em micrótomo de rotação Olympus CUT 4055, obtendo-se cortes de 7 a 9 µm. Os cortes foram corados com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; McCULLY, 1964) e como meio de montagem foi usado Entellan® (KRAUS; ARDUIN, 1997).

3.2.3 Dissociação da epiderme

Parte do material foliar foi tratado com peróxido de hidrogênio e ácido acético glacial 1:1 (v/v). As superfícies epidérmicas foram coradas com safranina e verde malaquita (KRAUS; ARDUIN, 1997), empregando-se glicerina a 50% (v/v) como meio de montagem.

3.2.4 Testes microquímicos

Foram realizados testes microquímicos em cortes transversais do material fixado, feitos à mão livre, utilizando-se os reativos: floroglucina clorídrica para verificação de lignina (FOSTER, 1949), Sudam IV para substâncias lipofílicas (SASS, 1951), cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940), lugol para amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976), Wagner para alcaloides (FURR; MAHLBERG, 1981) e ácido sulfúrico para cristais de cálcio (OLIVEIRA; AKISUE; AKISUE, 1991).

3.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

Para a análise ultraestrutural de superfície (MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura) (SOUZA, 1998), a lâmina foliar previamente fixada passou por desidratação em série etanólica crescente, seguida pelo ponto crítico de CO₂ no equipamento Bal-Tec CPD-030. Posteriormente foi aderida a suporte, metalizada com ouro no equipamento Balzers Union FL 9496, submetida a alto vácuo e observada no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6360LV.

3.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

O material coletado foi colocado para secar à temperatura ambiente. Folha e caule foram triturados separadamente, em moinho de facas e martelos para que no momento da extração fosse aumentada a superfície de contato entre o material e o solvente (SONAGLIO *et al.*, 1999).

3.3.1 Cinzas totais

Para a determinação do teor de cinzas totais (TABELA 1), foi adotado o método gravimétrico descrito na Farmacopeia Brasileira 5 (2010), incinerando-se o material em mufla até a eliminação do carvão, sem ultrapassar a temperatura de 600 °C. Após resfriamento foi realizada a pesagem do resíduo. A análise foi feita em triplicata e o resultado foi calculado em porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal original seco à temperatura ambiente.

3.3.2 Umidade

Para a verificação do teor de umidade (TABELA 1), foi colocado 1 g de material vegetal de folha e caule em cadinhos de porcelana e foram colocados em estufa a 100°C, por um período de 3 h, até a obtenção de peso constante. Os cadinhos com as amostras foram retirados da estufa e colocados em dessecador para esfriar. Após este processo a amostra foi pesada e os resultados foram aplicados à fórmula a seguir e expressos em porcentagem de umidade. Onde Pa é o peso do cadinho mais o peso da amostra, e Ps é o peso do cadinho mais o peso da amostra seca.

$$\% \text{ umidade} = (P_a - P_s) / P_a \times 100$$

3.3.3 Extratos brutos e frações

O extrato aquoso de folha e caule foi preparado a 20% (m/v) com o material vegetal triturado em contato com água destilada aquecida em BM (banho-maria) a 60 °C por 1 h. O macerado foi filtrado e mantido sob refrigeração.

A preparação do extrato etanólico bruto foi feita com etanol a 96 °GL, em refluxo contínuo por 18 h, a 50 °C, em aparelho de Soxhlet modificado. Posteriormente foi realizado um particionamento (líquido-líquido) do extrato em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio e acetato de etila), sendo a fração remanescente a hidroalcoólica (TABELA 1) (CARVALHO, 2001). Em seguida, o extrato e as frações foram secos em rotaevaporador e posteriormente em BM a 70 °C.

3.3.4 Ensaio sistemático em fitoquímica

O ensaio sistemático em fitoquímica foi realizado com extrato aquoso e com as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica de folha e caule (TABELA 1).

Com o extrato aquoso foram realizados os testes para avaliação da presença de: glicosídeos antociânicos e cianogênicos, saponinas e taninos.

As frações foram utilizadas para verificar a presença dos seguintes metabólitos: alcaloides, glicosídeos flavônicos, cumarinas, antraquinonas e esteroides e/ou triterpenoides, segundo técnica descrita por Moreira (1979).

- Pesquisa de glicosídeos antociânicos

Três alíquotas do extrato tiveram os pHs ajustados para 4, 7 e 10. A mudança de coloração é indicativa de glicosídeos antociânicos.

- Pesquisa de glicosídeos cianogênicos

Foi feita a hidrólise dos glicosídeos cianogênicos em meio ácido. O resultado positivo pode ser verificado com o aparecimento da coloração vermelha em papel picrossódico.

- Pesquisa de saponinas

O extrato foi agitado energicamente durante 5 min e deixado em repouso durante 30 min para verificação de formação de espuma persistente, que é característica da presença de saponinas.

- Pesquisa de taninos

Os taninos foram pesquisados em três testes separadamente com cloreto férrico, gelatina e formol-clorídrico (Stiasny).

- Pesquisa de alcaloides

A pesquisa de alcaloides foi realizada com os reativos gerais de alcaloides: Mayer (iodo-mercurato de potássio), Dragendorff (iodo-bismutato de potássio), Bouchardat (iodo-iodeto de potássio) e Bertrand (ácido sílico-túngstico). A turvação ou precipitação do meio revelam resultado positivo.

- Pesquisa de glicosídeos flavônicos

A pesquisa foi feita por meio das reações de Shinoda, Taubock e Pacheco, nas quais as diferentes colorações dos flavonoides revelam estruturas químicas diversas.

- Pesquisa de cumarinas

Cumarinas foram detectadas através da fluorescência azul ou verde amarelada, observadas sob luz UV em meio básico.

- Pesquisa de antraquinonas

A pesquisa de antraquinonas foi efetuada pela reação de Bornträger. A coloração vermelha é indicativa de reação positiva para antraquinonas livres em meio básico.

- Pesquisa de esteroides e/ou triterpenoides

A reação de Liebermann-Burchard foi realizada para detecção de esteroides e/ou triterpenoides. Quando há reação positiva, são executadas também as reações de Keller-Kiliani e Baljet para desoxiaçúcares e lactonas pentacíclicas.

3.3.5 Isolamento e identificação de flavonoides

A) Fração acetato de etila de folha

A fração acetato de etila de folha após secagem, foi solubilizada em metanol (grau p.a. - pró-análise). Após a solubilização restou um fino pó de coloração amarela. Este foi centrifugado em centrifugador mini spin plus, Eppendorf, com rotação de 1000 rpm e lavado com metanol para eliminação de impurezas. Foram feitos testes de padrão espectral no UV (ultravioleta) para verificação do grupo químico, segundo metodologia descrita por Mabry, Markham e Thomas (1970), CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) para verificação da pureza e RMN (ressonância magnética nuclear) de ^{13}C e ^1H para identificação da estrutura.

Foi realizado um espectro de varredura no UV (200 a 400 nm) em espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV 1601 PC, para verificação de algumas características do composto. Primeiramente foi preparada uma solução do isolado que foi solubilizado em metanol (grau p.a.) na concentração de 1 mg/mL e depois de realizada a varredura foram adicionadas duas pastilhas de NaOH e foi obtido um novo espectro de varredura. A uma nova solução do composto foi adicionado AlCl_3 e HCl a 10% (v/v) e realizou-se a leitura (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

Para a análise em CLAE, foi utilizada coluna x terra TM 5 μm (MS 18 250 mm x 4,6 mm d.i.). A fase móvel foi composta por uma fase ácida

(H_3PO_4 e H_2SO_4 1:1 (v/v)) chamada de solvente A e metanol chamado de solvente B. A análise foi iniciada com 95% do solvente A, passou para 5% aos 35 min, dos 36 aos 40 min permaneceu em 5% e aos 41 min voltou a 95%. A velocidade de eluição foi de 1 mL/min.

Para identificação das estruturas foi realizado RMN de ^1H e ^{13}C , utilizando como solvente DMSO-d_6 (dimetilsulfóxido deuterado) e TMS (tetrametilsilano) como referência interna, a 200 MHz, na concentração de 33,3 mg/mL.

B) Fração acetato de etila de caule

A fração acetato de etila de caule foi dissolvida em etanol e incorporada em uma pequena quantidade de sílica para formar um pó seco e fino. O material foi submetido a eluição em coluna cromatográfica preparativa de sílica gel 60 (0,063-0,02 mm/ 70-230 mesh, Merck®) e como gradiente foi utilizado hexano e acetato de etila (7:3 a 0:10) e acetato de etila e metanol (10:0 a 0:10). As alíquotas foram recolhidas em frascos de penicilina de aproximadamente 20 mL e secas em temperatura ambiente.

Os frascos 103 a 123 formaram um precipitado de coloração amarelo que foi reunido e submetido à identificação em espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , utilizando DMSO-d_6 como solvente e TMS como referência interna, a 200 MHz, na concentração de 26,6 mg/mL. Não foram realizados outros métodos de identificação, pois o material isolado foi de 8 mg, suficiente para realizar esta única análise.

3.3.6 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi feita com o extrato etanólico bruto e as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica (TABELA 1).

3.3.6.1 Método de formação do complexo fosfomolibdênio

O método de formação do complexo fosfomolibdênio se baseia na redução do complexo molibdênio VI em V promovendo o aparecimento da coloração que pode ser quantificada. Essa reação pode determinar a presença de qualquer espécie redutora presente e avalia a capacidade antioxidante total da amostra.

Esse ensaio baseia-se no método descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999) com modificações. O reativo para formação do complexo fosfomolibdênio foi preparado com a mistura de soluções de NaHPO₄ 0,1 mol/L, molibdato de amônio 0,03 mol/L, H₂SO₄ 3 mol/L e água.

As amostras foram diluídas em metanol e foi feito um branco do solvente, com água destilada no lugar da amostra. Foram utilizados como padrões a vitamina C e rutina, e os testes foram realizados em triplicata. As amostras bem como os padrões foram utilizados na concentração de 200 µg/mL. Os tubos contendo o reativo e as amostras foram levados ao BM a 95 °C por 90 min. Após o resfriamento, foram realizadas as leituras de absorbância (A) em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu®, em 695 nm. Os resultados foram aplicados à fórmula a seguir e expressos em atividade antioxidante relativa da amostra em relação aos padrões. Onde A é a medida da absorbância.

$$\text{AAR \% em relação aos padrões} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{padrão}} - A_{\text{branco}}} \times 100$$

Para verificar a diferença estatística entre as amostras, foi aplicado o teste estatístico Anova e para a localização das diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; MENSOR *et al.*, 2001).

3.3.6.2 Método TBARS

Para realizar o teste TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), foi utilizada como fonte de lipídeos uma solução de gema de ovo homogeneizado (MORAIS *et al.*, 2006). As amostras foram testadas em triplicata na concentração de 100 µg/mL e solubilizadas em metanol. Um branco foi feito para o solvente e um controle positivo foi elaborado para observação da completa peroxidação dos lipídeos, onde foram adicionados todos os reativos com exceção da amostra. Como indutor da peroxidação lipídica foi utilizado ABAP (cloreto de 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano)) 0,07 mol/L. Foi adicionada uma solução de ácido acético a 20% (v/v), TBA (ácido tiobarbitúrico) 0,8% (m/v) e

SDS (dodecilsulfato de sódio) 1,1% (m/v). O BHT (butil-hidroxitolueno) foi empregado como padrão. Os tubos contendo os reativos foram levados ao BM a 95 °C, após o resfriamento foi adicionado 1-butanol, e foram levados à centrifugação em 3000 rpm por 10 min. As leituras de absorbância (A) foram feitas no espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu®, em 695 nm. Os resultados foram aplicados na fórmula abaixo e foram expressos em Índice Antioxidante (IA). Onde A é a média aritmética das absorbâncias das amostras testadas e C é a absorbância do controle positivo totalmente oxidado.

$$IA\% = 1 - \frac{A}{C} \times 100$$

Os testes estatísticos de Anova e Tukey ($p < 0,05$) foram utilizados nesse método (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; MENSOR *et al.*, 2001).

3.4 ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O estudo de atividades biológicas foi realizado com o extrato etanólico bruto e as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica (TABELA 1).

3.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Para verificação da atividade antimicrobiana dos extratos e frações (TABELA 1) foram utilizadas cepas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*), conforme QUADRO 2 a seguir.

MICRO-ORGANISMOS	ATCC
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Candida albicans</i>	10231

QUADRO 2 – MICRO-ORGANISMOS INDICADORES UTILIZADOS NO ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES

HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA, DE FOLHA E CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE

Para preservação das cepas dos micro-organismos foi utilizado o ágar Mueller Hinton para as bactérias e Sabouraud para o fungo, incubados a 37 °C por 24 a 48 h.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada com contraprova pelo método da verificação da CIM (concentração inibitória mínima) dos extratos e frações de folha e caule. Os ensaios foram realizados em placas de Elisa de 96 poços e foram utilizados os caldos Mueller Hinton e Sabouraud para as bactérias e fungo, respectivamente.

Como padrão positivo foi empregado o cloranfenicol para as bactérias e o cetoconazol para o fungo na concentração de 30 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente, e como controle negativo o metanol.

Para a preparação dos inóculos, cada micro-organismo foi individualmente transferido para um tubo de ensaio contendo salina a 0,9% e a turbidez das soluções foi ajustada com o tubo 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/mL).

Em todos os poços da placa de Elisa foram colocados 100 µL de caldo Mueller Hinton para as bactérias e Sabouraud para o fungo. No primeiro poço foi colocado 100 µL de amostra e foi realizada uma diluição seriada para cada poço seguinte, transferindo 100 µL do primeiro poço para o segundo e assim por diante, reduzindo em 50% a concentração de amostra em cada poço, e no último poço foram desprezados 100 µL. Após 10 µL de inóculo foi adicionado a cada poço.

O resultado foi verificado com uso do reagente TCC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio), que permite a observação do crescimento dos micro-organismos através da cor. A coloração rosa a vermelha indica crescimento e a ausência de coloração indica a inibição do crescimento. O aparecimento da coloração ocorre quando os hidrogênios formados durante a respiração celular do micro-organismo entram em contato com o TCC formando o formazam, que é uma substância vermelha e insolúvel e indica a presença de bactérias viáveis no meio (JOHNSON *et al.*, 1985; RAHMAN *et al.*, 2004).

3.4.2 Teste de toxicidade a *Artemia salina*

O teste foi realizado em triplicata, o controle negativo foi feito com metanol e o positivo com sulfato de quinidina. Após a eclosão dos ovos de *Artemia salina*, os náuplios foram colocados em contato com as frações que estavam em três concentrações diferentes 10, 100 e 1000 µg/mL. Estes foram mantidos em contato com os extratos por 24 h. Em seguida foi realizada a contagem de náuplios vivos e mortos. Os dados foram analisados pelo método estatístico Probitos, sendo determinados a DL₅₀ (dose letal média) e o intervalo de confiança de 95% (FINNEY, 1956; MEYER *et al.*, 1982).

3.4.3 Avaliação da atividade hemolítica

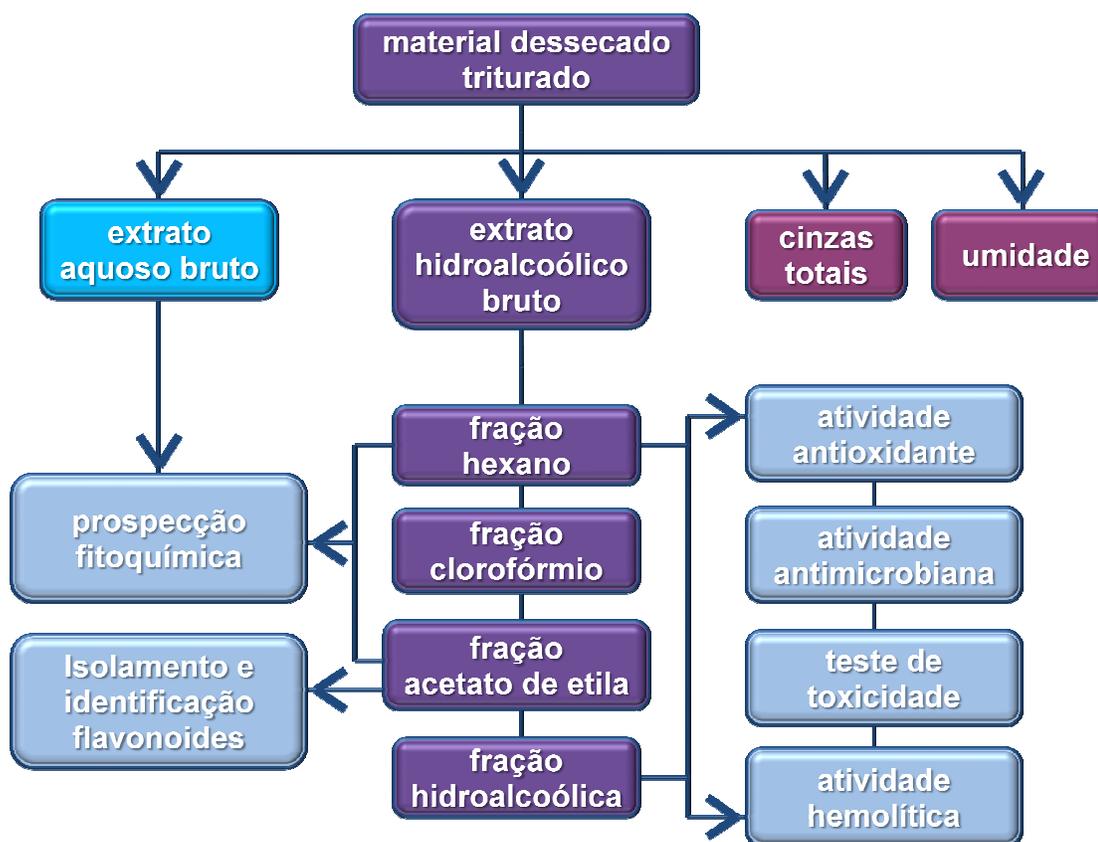
O sangue comercial (Newprov®) foi centrifugado em centrifugador mini spin plus, Eppendorf, com rotação de 1000 rpm, para separação dos eritrócitos e logo após essas células foram lavadas com tampão fosfato pH 7,4 gelado. Em seguida foi preparada uma suspensão de eritrócitos com o tampão fosfato (suspensão diluída a 10% (v/v)).

O teste foi realizado em microtubos tipo Eppendorf com volume de 2,0 mL. Foram utilizadas quatro concentrações 1000, 500, 200 e 100 µL dos extratos e frações de folha e caule de *Z. rhoifolium*, que foram solubilizadas em tampão fosfato pH 7,4 em triplicata. Como controle positivo foi utilizada água destilada.

Os microtubos foram levemente homogeneizados e incubados em estufa com temperatura de 37 °C. Após 3 h foram centrifugados por 5 min a 3000 rpm.

Para resultados negativos há formação de um pellet bem definido de eritrócitos, e resultados positivos são verificados através da coloração vermelha do sobrenadante (WHO, 1998).

TABELA 1 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS FITOQUÍMICO E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS REALIZADOS EM FOLHA E CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE
FONTE: O AUTOR (2013)



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MORFOANATOMIA

4.1.1 Folha

A folha de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae, é composta, alternada, imparipinada, peciolada, medindo aproximadamente 12 (8-15) cm de comprimento, com 7-15 folíolos (FIGURAS 2, 3), de textura coriácea, e às vezes aculeados na face inferior. A folha é curtamente peciolada, com comprimento de aproximadamente 2 (2-3) cm e base espessada. A raque, que é o eixo principal da folha, mede em torno de 10 (6-12) cm e os peciólulos, que interligam o folíolo à raque, apresentam em torno de 0,2 cm (FIGURAS 2, 3).

O limbo é simétrico a levemente assimétrico, de forma ovado-lanceolada, com ápice e base agudos a arredondados. A margem é crenada, com pequenos dentes arredondados e ascendentes. O tamanho médio é de 3 (3-4) cm x 1,5 (1-2) cm. A face adaxial apresenta coloração verde escura, enquanto a abaxial é verde clara (FIGURA 2). A nervação é pinada-broquidódroma, apresentando uma nervura central e dela partindo nervuras laterais secundárias que se prolongam até encontrarem a próxima, formando uma série de arcos proeminentes e de forma reta. As nervuras laterais formam um ângulo ascendente de aproximadamente 45°, são retas e ramificadas e de forma curvada nas proximidades da margem.

Em vista frontal do limbo, a epiderme é recoberta por uma cutícula nitidamente ornamentada por estrias (FIGURA 6), as quais tendem a acompanhar longitudinalmente as células epidérmicas que apresentam contorno poligonal (FIGURA 4).

Tricomas tectores distribuem-se em ambas as faces da epiderme foliar, isoladamente ou em grupos de dois ou três reunidos pela base, possuem extremidade aguda e são revestidos por cutícula granulosa (FIGURA 6). Apresentam-se na maioria das vezes na forma unicelular, porém tricomas pluricelulares também são observados.

Apenas a face abaxial da epiderme do folíolo apresenta estômatos, caracterizando a folha como hipoestomática (FIGURAS 5, 7). As células-guarda têm

formato reniforme, ao seu redor a cutícula forma estrias que se dispõem de modo circular e sobre as células-guarda são observadas cristas cuticulares (FIGURA 7). Os estômatos são classificados como actinocíticos, cada par de células-guarda é rodeado por três ou mais células, geralmente em forma radial (FIGURA 5).

Em secção transversal, a epiderme é uniestratificada, revestida por uma cutícula delgada e possui as células da face adaxial maiores que as da abaxial, em razão de paredes anticlinais mais altas (FIGURAS 8, 9). Os estômatos estão inseridos no mesmo nível em relação às demais células epidérmicas (FIGURAS 8-10).

O mesofilo é organizado de forma dorsiventral, composto de parênquima paliçádico e esponjoso (FIGURAS 8-10). O parênquima paliçádico é frequentemente uniestratificado junto a face adaxial e representa aproximadamente 30-40% da altura do mesofilo, e o parênquima esponjoso é formado de várias camadas de células na superfície oposta. Cavidades secretoras (FIGURA 9) contendo substâncias lipofílicas são observadas no parênquima paliçádico, junto à epiderme.

A nervura central apresenta formato côncavo-convexo com curvatura proeminente na face abaxial (FIGURAS 11, 13). Subjacente à epiderme, há algumas camadas de colênquima do tipo angular (FIGURA 13). Uma bainha completa e expressiva de células esclerenquimáticas envolve um único feixe vascular colateral, em arranjo tendendo a circular. No floema são identificados elementos crivados e células parenquimáticas e, no xilema, os elementos traqueais se dispõem em fileiras radiais, sendo separados por células parenquimáticas (FIGURAS 11-13). A região central apresenta células parenquimáticas com paredes espessadas e lignificadas (FIGURAS 11, 13).

O pecíolo, seccionado transversalmente, tem formato praticamente circular, com pequenas alas laterais (FIGURA 15). O sistema de revestimento é semelhante ao da nervura central. Apresenta inúmeros tricomas do tipo tector simples, unicelulares, de ponta aguda e com paredes espessadas (FIGURAS 14, 15). Adjacente à epiderme, é observada uma faixa colenquimática formada de dois a quatro estratos de células com espessamento anelar (FIGURAS 14, 15). Envolvendo o sistema vascular há uma bainha esclerenquimática cujas células têm paredes espessadas. Este é representado por um feixe colateral em formato circular.

A raque, seccionada transversalmente, tem formato plano-convexo. O sistema de revestimento e o vascular são semelhantes ao descrito para o pecíolo

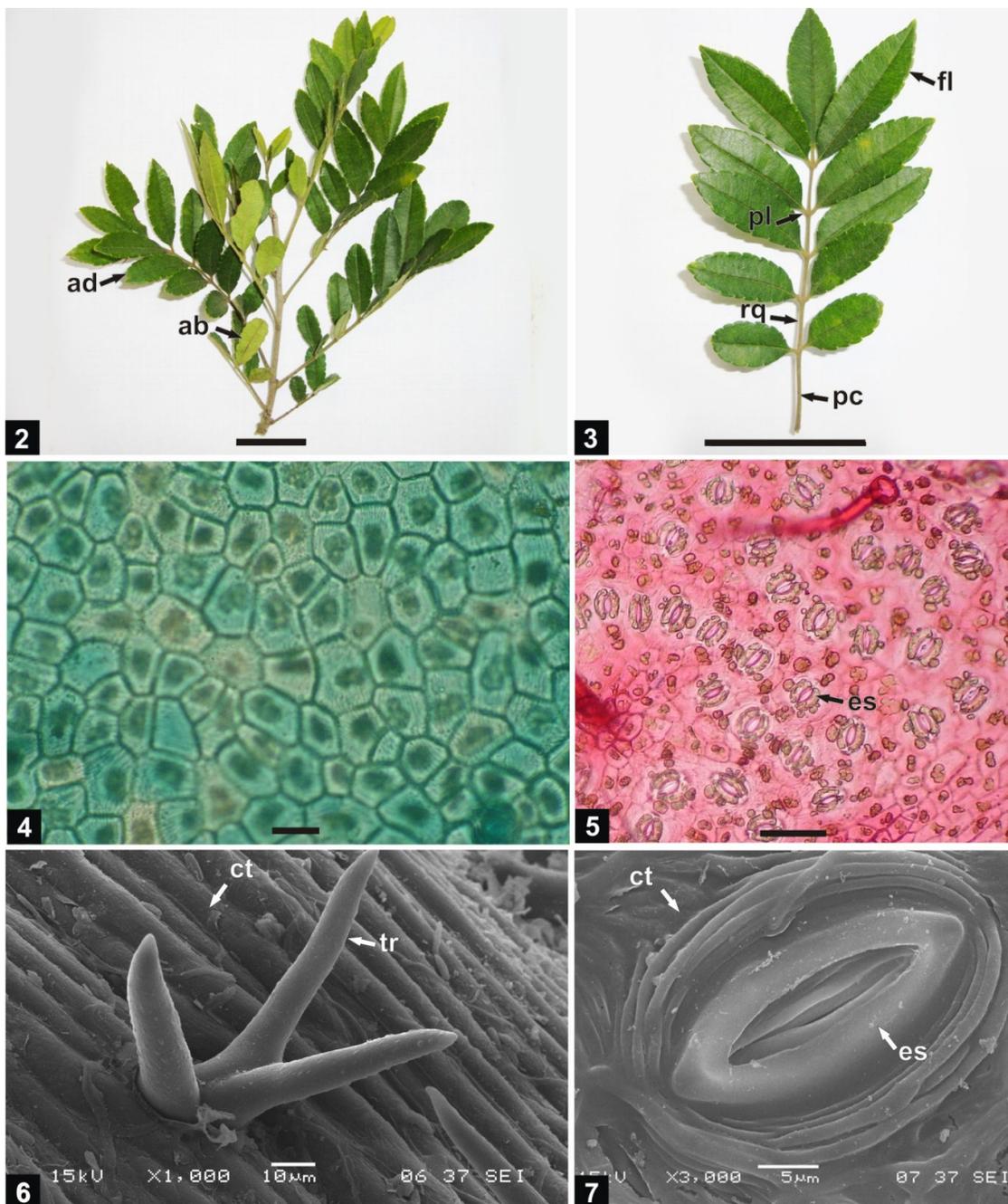
(FIGURAS 16, 17). O peciólulo em secção transversal apresenta dois prolongamentos ou alas laterais, e sua estrutura é semelhante à do pecíolo (FIGURA 15). Cristais de oxalato de cálcio do tipo drusa e compostos fenólicos foram observados nas diferentes partes da folha.

4.1.2 Caule

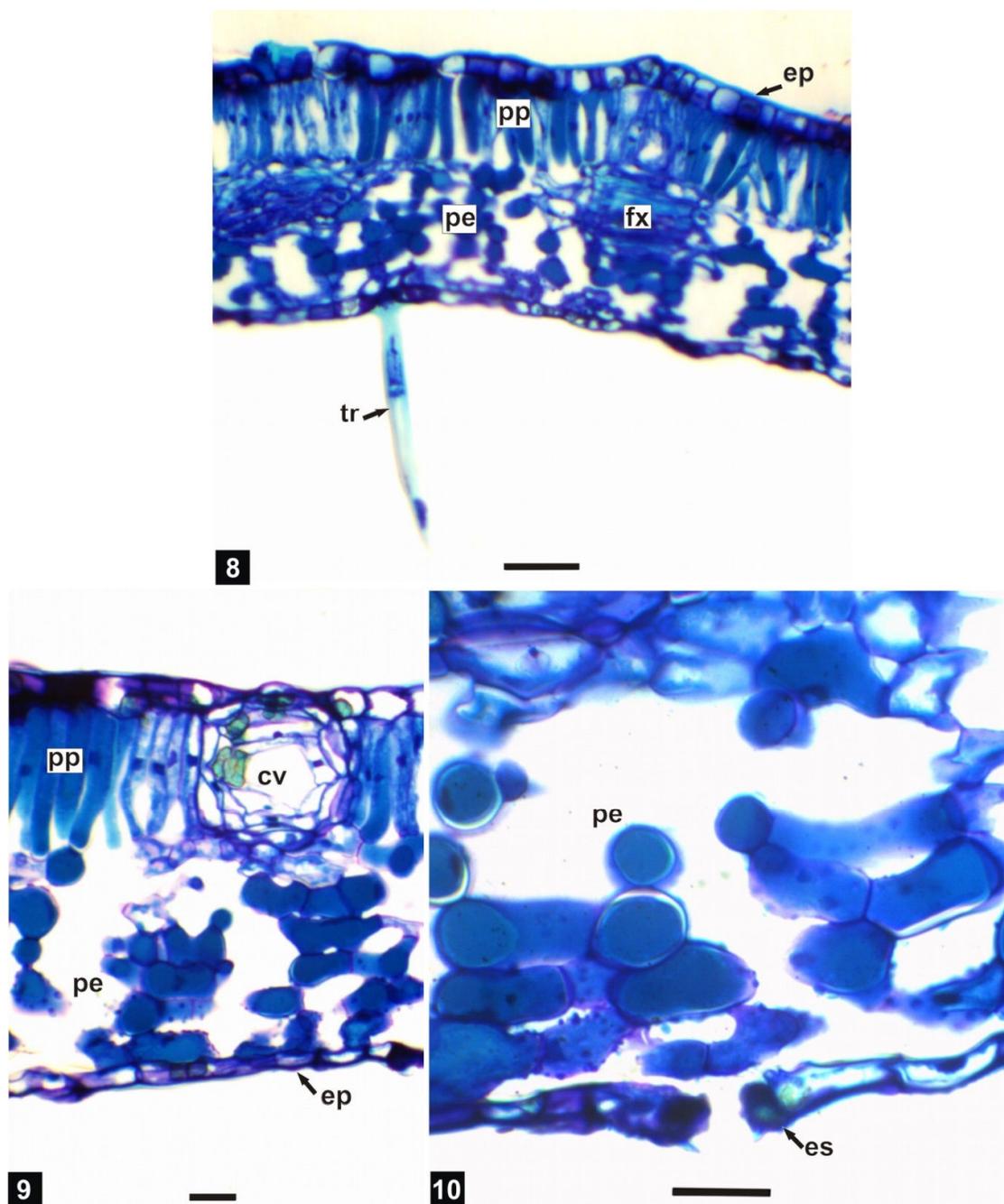
O caule, em estrutura secundária incipiente, apresenta contorno aproximadamente circular, com epiderme persistente como sistema de revestimento. Esta é composta de uma única camada de células, recoberta por cutícula espessa. Em secção transversal, as células da epiderme são alongadas em sentido anticlinal. Tricomas tectores uni e pluricelulares unisseriados, longos e de ponta aguda, solitários ou reunidos pela base, são encontrados em toda a superfície (FIGURA 18).

Na região subepidérmica, observa-se a periderme em formação, devido à instalação do felogênio que forma súber em direção à periferia e, na posição oposta, a feloderme (FIGURA 18). No córtex, ocorrem algumas camadas de colênquima do tipo angular e parênquima cortical multisseriado (FIGURA 18), além de cavidades secretoras isodiamétricas, cujo epitélio é multisseriado. No cilindro vascular, uma bainha esclerenquimática e praticamente contínua envolve o sistema vascular. O floema, o qual se encontra externamente ao xilema, constitui-se de elementos crivados, células parenquimáticas e algumas fibras. O xilema, que é totalmente lignificado, apresenta células parenquimáticas, fibras e elementos traqueais que formam fileiras radiais (FIGURAS 19, 20).

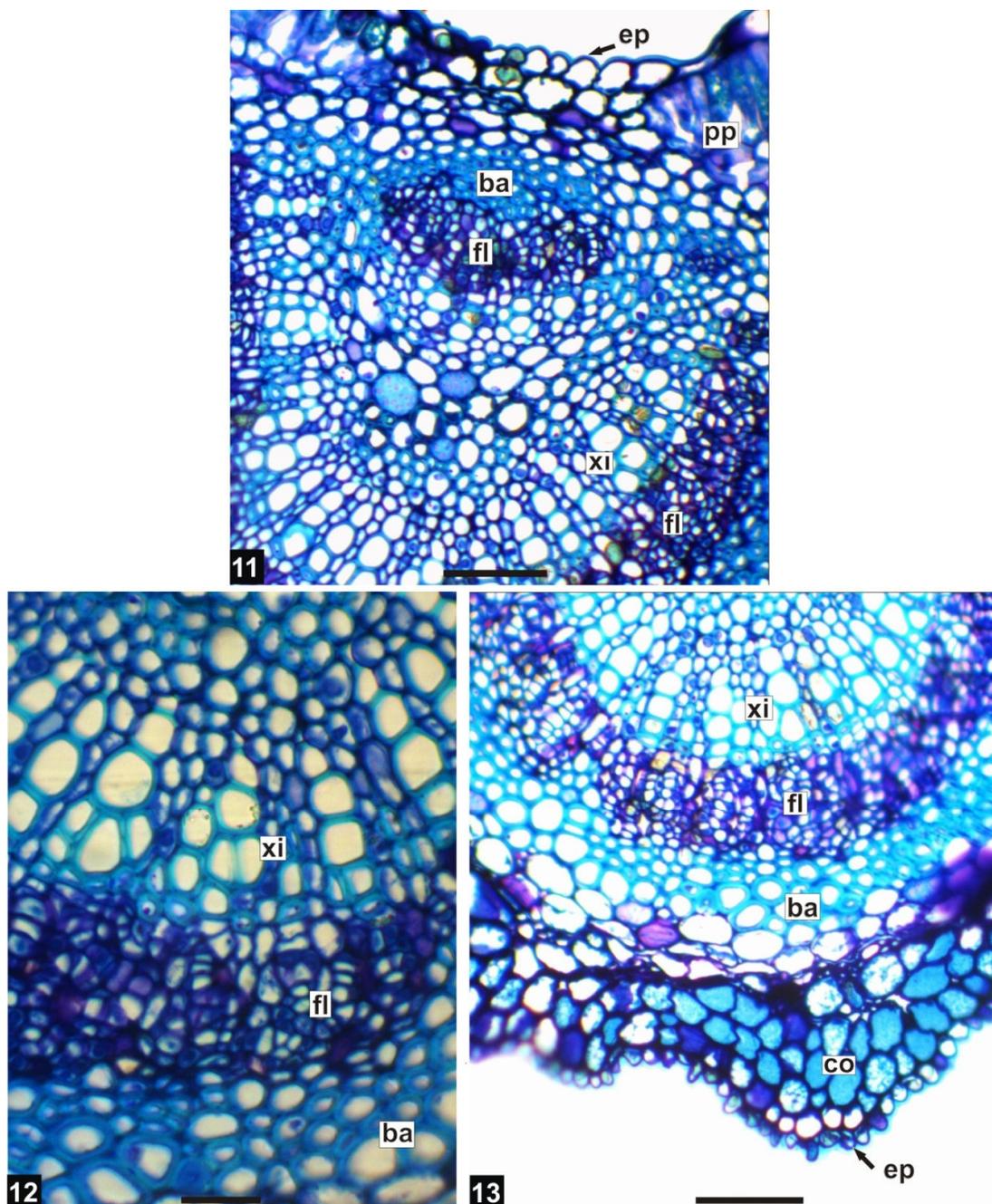
Na medula e no córtex, distribuem-se idioblastos com prismas de oxalato de cálcio e conteúdo mucilaginoso, além de algumas fibras. No córtex, há presença de células contendo alcaloides e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos também podem ser observados no xilema, no floema e na medula. Amiloplastos são encontrados no parênquima cortical, xilema, floema e na medula.



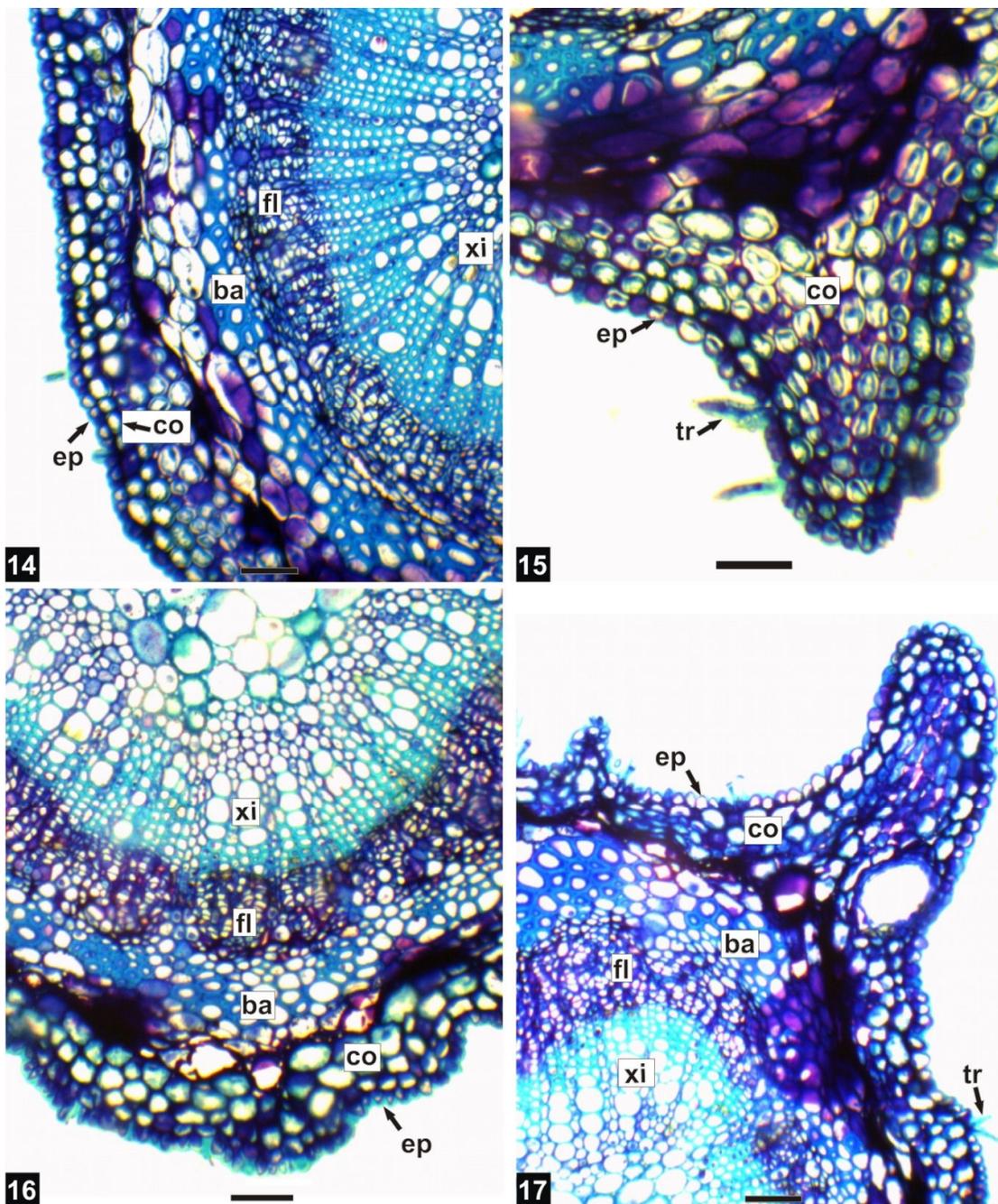
FIGURAS 2-7 - *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE: 2. RAMO VEGETATIVO APICAL; 3. FOLHA COMPOSTA IMPARIPINADA; 4. FACE ADAXIAL DA EPIDERME FOLIAR, EM VISTA FRONTAL; 5. FACE ABAXIAL DA EPIDERME FOLIAR, EM VISTA FRONTAL; 6. TRICOMAS TECTOSES ESTELARES (MEV); 7. DETALHE DE UM ESTÔMATO NA FACE ABAXIAL DA EPIDERME FOLIAR (MEV). ABREVIATURAS: ab- FACE ABAXIAL, ad- FACE ADAXIAL, ct- CUTÍCULA, es- ESTÔMATO, fl- FOLÍOLO, pc- PECÍOLO, pl- PECÍÓLULO, rq- RAQUE, tr- TRICOMA. BARRA = 4 cm (2, 3), 20 µm (4), 5 µm (5).



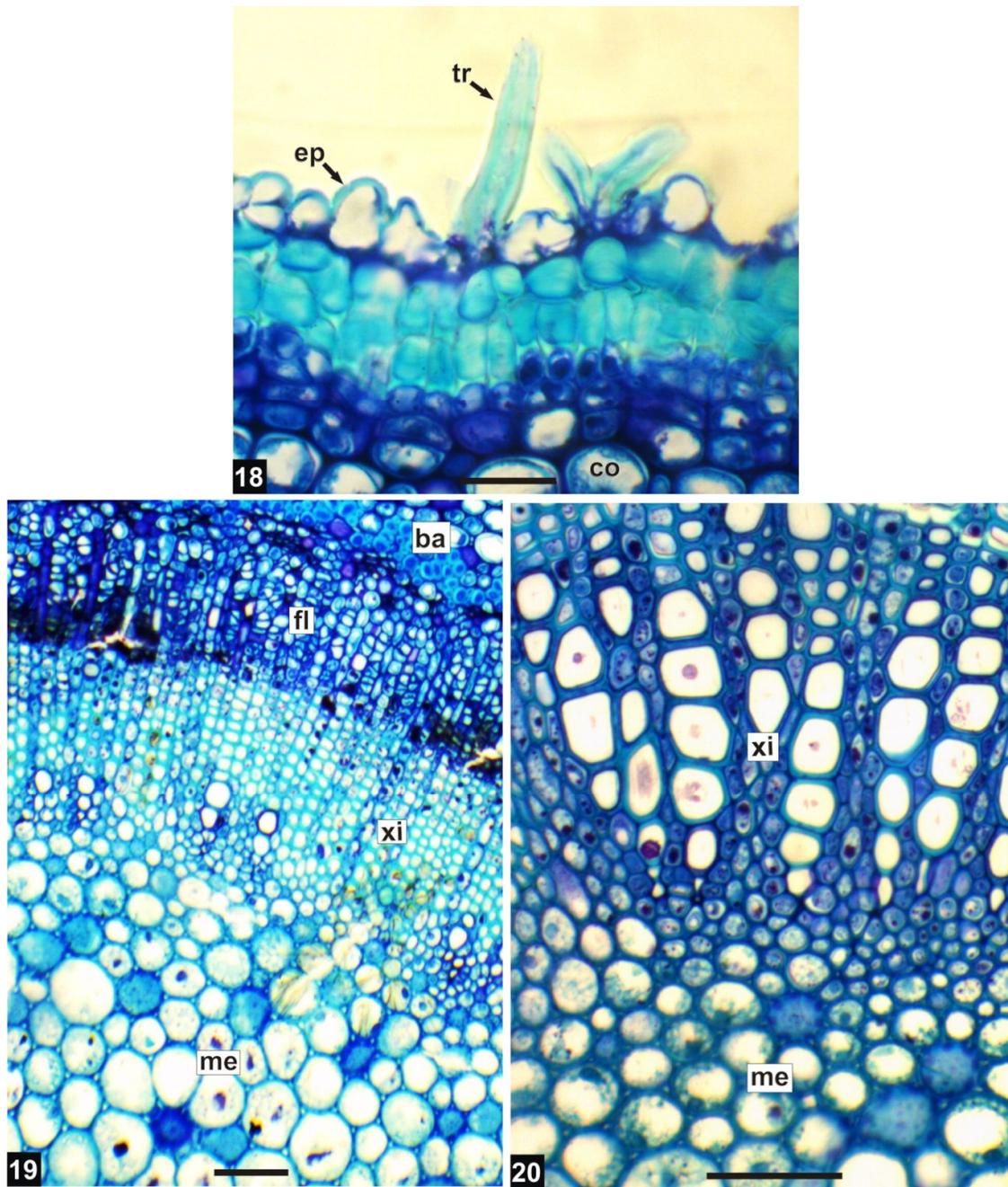
FIGURAS 8-10 - *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, REGIÃO INTERNERVURAL DO FOLÍOLO, EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 8. INDICAÇÃO DE EPIDERME, TRICOMA TECTOR, PARÊNQUIMAS PALIÇÁDICO E ESPONJOSO E FEIXE VASCULAR DE PEQUENO PORTE; 9. PORMENOR DE UMA CAVIDADE SECRETORA NO MESOFILO; 10. DETALHE DE UM ESTÔMATO. ABREVIATURAS: cv- CAVIDADE SECRETORA, ep- EPIDERME, es- ESTÔMATO, fx- FEIXE VASCULAR, pe- PARÊNQUIMA ESPONJOSO, pp- PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, tr- TRICOMA. BARRA = 20 μ m (9, 10), 50 μ m (8).



FIGURAS 11-13 - *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, FOLÍOLO E NERVURA CENTRAL EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 11, 13. PARTE DO FEIXE VASCULAR, JUNTO À SUPERFÍCIE ADAXIAL E ABAXIAL, RESPECTIVAMENTE; 12. PORMENOR DO FEIXE VASCULAR COLATERAL, BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA, FLOEMA E XILEMA. ABREVIATURAS: ba- BAINHA, co- COLÊNQUIMA, ep- EPIDERME, fl- FLOEMA, pp- PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO, xi- XILEMA. BARRA = 20 μ m (12), 50 μ m (11, 13).



FIGURAS 14-17 - *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, FOLHA EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 14. PORMENOR DO PECÍOLO, COM DESTAQUE PARA O FEIXE VASCULAR COLATERAL; 15. DETALHE DA ALA LATERAL DO PECÍOLO; 16, 17. ASPECTO DA RAQUE. ABREVIATURAS: ba- BAINHA, co- COLÊNQUIMA, ep- EPIDERME, fl- FLOEMA, tr- TRICOMA, xi- XILEMA. BARRA = 20 μ m (14), 50 μ m (15-17).



FIGURAS 18-20 - *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, CAULE EM SECÇÃO TRANSVERSAL: 18. PORMENOR DA EPIDERME INDICANDO TRICOMA E EPIDERME; 19. DETALHE DO CILINDRO VASCULAR, ONDE SE NOTA PARTE DA BAINHA ESCLERENQUIMÁTICA, FLOEMA E XILEMA; 20. DETALHE DO XILEMA E DA MEDULA. ABREVIATURAS: ba- BAINHA, co- COLÊNQUIMA, ep- EPIDERME, fl- FLOEMA, me- MEDULA, tr- TRICOMA, xi- XILEMA. BARRA = 20 μ m (18), 50 μ m (19-20).

Com relação à morfologia externa foliar de *Z. rhoifolium*, foi constatada semelhança com os aspectos atribuídos às Rutaceae, no que se refere à folha ser composta e alternada, apresentar lâmina foliar com margem crenada e às vezes aculeada na face inferior (REITZ *et al.*, 1973; PIRANI, 2005; FERRONATO, 2010).

Quanto à anatomia foliar, as características comuns à família e que são descritas nesta análise consistem de tricoma tector uni e pluricelular do tipo estelar, estômatos na face abaxial, cavidades secretoras e mesofilo dorsiventral. Esses aspectos são de fácil reconhecimento na análise microscópica, o que favorece o controle farmacognóstico, e são relevantes na taxonomia da família (METCALFE; CHALK, 1950; REITZ *et al.*, 1973; CRONQUIST, 1981; BARROSO *et al.*, 1991).

Em comparação com outros membros de *Zanthoxylum*, de um modo geral, não se constata uma semelhança quanto aos tricomas. Os tricomas são utilizados como auxiliar na identificação de uma espécie, devido à grande variedade de formas existentes. As plantas geralmente apresentam tricomas de um tipo específico (CUTLER *et al.*, 2011). Ogundipe (2002) descreveu a anatomia foliar de onze espécies do gênero *Zanthoxylum*: *Z. bouetense* (Pierre ex Letouzey) P.G.Waterman, *Z. buesgenii* (Engl.) P.G.Waterman, *Z. dinklagei* (Engl.) P.G.Waterman, *Z. gilletti* (De Wild.) P.G.Waterman, *Z. lemairei* (De Wild.) P.G.Waterman, *Z. leprieurii* Guill. & Perr., *Z. rubescens* Planch. ex Hook., *Z. tessmannii* (Engl.) Ayafor, *Z. thomense* A.Chev. ex Waterman, *Z. viride* (A.Chev.) P.G.Waterman e *Z. zanthoxyloides* (Lam.) Zepern. & Timler. Em seus estudos, foram encontrados em *Z. bouetense*, *Z. buesgenii* e *Z. viride* tricomas pluricelulares e unisseriados, assim como também foram encontrados nesta investigação. Já a espécie *Z. armantum*, analisada por Munir *et al.* (2011), apresentou ausência de tricomas e em *Z. coco* Gillies ex Hook. f. & Arn. e *Z. petiolare* A.St.-Hil. & Tul. foram verificados apenas tricomas glandulares (BANDONI *et al.*, 2009). Neste trabalho, *Z. rhoifolium* revelou a presença de tricomas uni e pluricelulares, isolados ou reunidos pela base, tricomas são uma característica comum à família, segundo Metcalfe e Chalk (1950). Porém, tricomas reunidos pela base não foram descritos para outras espécies do gênero, podendo essas estruturas ser potencialmente utilizadas na caracterização da espécie.

Foi possível observar semelhança em grande parte das espécies de *Zanthoxylum*. Em seus estudos, Ogundipe (2002) encontrou em todas as espécies, folha hipoestomática e em sua maioria estômatos actinocíticos, assim como no

estudo em questão. Somente na espécie *Z. armantum* foram observados folha anfiestomática e estômatos do tipo actinocítico, estes também foram encontrados em *Z. coco* e *Z. petiolare* (BANDONI *et al.*, 2009; MUNIR *et al.*, 2011). Todas as espécies do gênero *Zanthoxylum* encontradas na literatura apresentam estômatos inseridos no mesmo nível que as demais células epidérmicas (PARIS; MOYSE-MIGNON, 1947; PARIS; MOYSE-MIGNON, 1951; OGUNDIPE, 2002; BANDONI *et al.*, 2009; MUNIR *et al.*, 2011).

Um aspecto relevante de *Z. rhoifolium* é o fato de apresentar cutícula nitidamente ornamentada em toda a superfície, o que não é comum ao gênero. Apenas nas espécies *Z. gilletii*, *Z. leprieurii*, *Z. tessmannii* e *Z. zanthoxyloides* foi descrito um tipo de cutícula ornamentada, porém esta se apresenta apenas ao redor das células-guarda dos estômatos (OGUNDIPE, 2002). A cutícula é a interface entre a planta e o ambiente, possuindo diferentes funções nas plantas como controle da perda de água, barreira mecânica, filtro e refletor na presença de luz e resistência à abrasão (FAINI; LABBÉ; COLL, 1999; CUTLER *et al.*, 2011) e pode ser útil na caracterização da espécie em estudo.

Quanto às características comuns encontradas nos membros de *Zanthoxylum* e que são semelhantes às encontradas nas folhas da espécie em estudo, podem-se citar ausência de hipoderme, contorno poligonal das células da epiderme, mesofilo dorsiventral, venação do tipo broquidódromo, bainha esclerenquimática, cristais de oxalato de cálcio e cavidades secretoras (OGUNDIPE, 2002; BANDONI *et al.*, 2009; MUNIR *et al.*, 2011).

Nos demais órgãos como pecíolo, pecíolulo, raque e caule, há pouco relato na literatura para o gênero, neste estudo foi constatada semelhança com as demais espécies da família quanto ao sistema vascular do tipo colateral (METCALFE; CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981).

Com referência à raque, em *Z. gilletii* (referido pela sinonímia *Fagara macrophylla* (Oliv.) Engl.), foi observada apenas a presença de tricomas tectores unicelulares (PARIS; MOYSE-MIGNON, 1951).

No caule de *Z. rhoifolium*, constatou-se uma epiderme persistente e pôde ser identificado um início de crescimento secundário com a presença do felogênio subjacente à epiderme, iniciando o processo de formação de súber e feloderme. A epiderme está presente em todas as partes do vegetal durante o crescimento

primário, pode ter uma ou mais camadas e diferir na forma, estrutura e ocorrência de células especializadas (CUTLER *et al.*, 2011).

Algumas semelhanças são encontradas entre o caule de *Z. rhoifolium* e o de *Z. zanthoxyloides* (referido pela sinonímia *Fagara xanthoxyloides* Lam.), tais como bainha de células lignificadas ao redor do cilindro vascular, cavidades secretoras no parênquima e prismas de oxalato de cálcio (PARIS; MOYSE-MIGNON, 1947). Esses aspectos são comuns ao gênero e possuem fácil reconhecimento microscópico.

4.2 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.2.1 Determinação do teor de cinzas totais

O teor de cinzas totais é um parâmetro físico-químico que estabelece a quantidade de substâncias residuais não voláteis presentes na amostra. É a soma da matéria inorgânica intrínseca mais as substâncias de origem externa ou matéria inorgânica extrínseca (BRAGA *et al.*, 2007; SIMÕES *et al.*, 2010). Esse parâmetro está presente na farmacopeia brasileira e é utilizado pela indústria farmacêutica no controle de qualidade da matéria-prima utilizada na produção de fitoterápicos.

Valores acima do estabelecido para uma determinada matéria-prima vegetal indicam a presença de impurezas inorgânicas extrínsecas (SIMÕES *et al.*, 2004).

Os valores obtidos na determinação de cinzas de folha e caule de *Z. rhoifolium* estão expressos em porcentagem em relação ao material vegetal seco à temperatura ambiente, e foram sumarizados na TABELA 2.

TABELA 2 - DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS TOTAIS DE FOLHA E CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE

AMOSTRA	CINZAS TOTAIS (g %)			MÉDIA/ DESVIO PADRÃO
FOLHA	11,63	10,75	10,80	11,06 ± 0,494
CAULE	9,33	8,56	8,94	8,94 ± 0,385

Os resultados obtidos demonstram um valor maior para folha do que para caule, podendo-se concluir que a folha possui maior quantidade de matéria inorgânica não volátil com 11,06% do que o caule com 8,94%. Esses resultados podem contribuir para o estabelecimento de padrões de qualidade e caracterização da espécie vegetal.

4.2.2 Determinação do teor de umidade

A determinação da perda de umidade verifica se a secagem do material foi eficiente. A presença de umidade pode causar a degradação do material por contaminação microbiana e a secagem excessiva a degradação de compostos por hidrólise (SIMÕES et al., 2004; SIMÕES et al., 2010). A perda por dessecação de folha e caule de *Z. rhoifolium*, apresentou um teor de umidade médio de 7% para folha e de 5% para caule o que está dentro do limite máximo recomendado para drogas vegetais (SIMÕES et al., 2004).

4.2.3 Ensaio sistemático em fitoquímica

Os testes preliminares, qualitativos, que obtiveram resultados positivos no ensaio sistemático em fitoquímica estão descritos a seguir:

Extrato aquoso

- Antocianidinas: presentes em folha e caule;
- Saponinas: detectadas em folha e caule;
- Taninos: encontrados em folha;

Frações

- Flavonoides: observados nas frações acetato de etila e hidroalcoólica de folha e caule;
- Alcaloides: encontrados na fração clorofórmio de folha e caule;
- Esteroides e triterpenoides: detectados na fração hexano de caule.

O ensaio sistemático em fitoquímica revelou a presença de antocianidinas, saponinas e taninos, não há relatos na literatura da ocorrência destes metabólitos em *Z. rhoifolium*.

Flavonoides foram observados em folha e caule da espécie. Em estudos realizados, os flavonoides hesperidina (40), vitexina (41) e isovitexina (42) foram encontrados e isolados nesses órgãos vegetais. Os flavonoides possuem conhecida atividade antioxidante e capacidade de diminuir a fragilidade capilar. Na planta

acredita-se que tenham função protetora, pois vários compostos desse grupo possuem ação antifúngica (ARRUDA *et al.*, 1992; VON POSER; GOSMANN; CAMARGO, 1989).

Alcaloides foram detectados na fração clorofórmio de folha e caule. Dados da literatura revelam que esses compostos são muito abundantes em *Z. rhoifolium*, principalmente em raiz, mas são encontrados também em folha e caule (ARRUDA *et al.*, 1992; MOURA *et al.*, 1997; GONZAGA *et al.*, 2003b; WEBER, 2005; JULLIAN *et al.*, 2006; TABORDA; SUAREZ, 2007; ZANON, 2010).

A fração hexano de caule revelou um resultado positivo para esteroides e triterpenoides. Esses resultados são compatíveis com estudos realizados por Arruda *et al.* (1992). Esses metabólitos estão presentes em diversos órgãos do vegetal como caule, folha e fruto (WEBER, 2005; ZANON, 2010; LADINO *et al.*, 2011).

Não foi encontrado resultado positivo para cumarinas e lignanas no estudo, porém há relatos na literatura que demonstraram a presença destas substâncias na espécie (WEBER, 2005; ZANON, 2010; LADINO *et al.*, 2011).

4.2.4 Isolamento e identificação de compostos

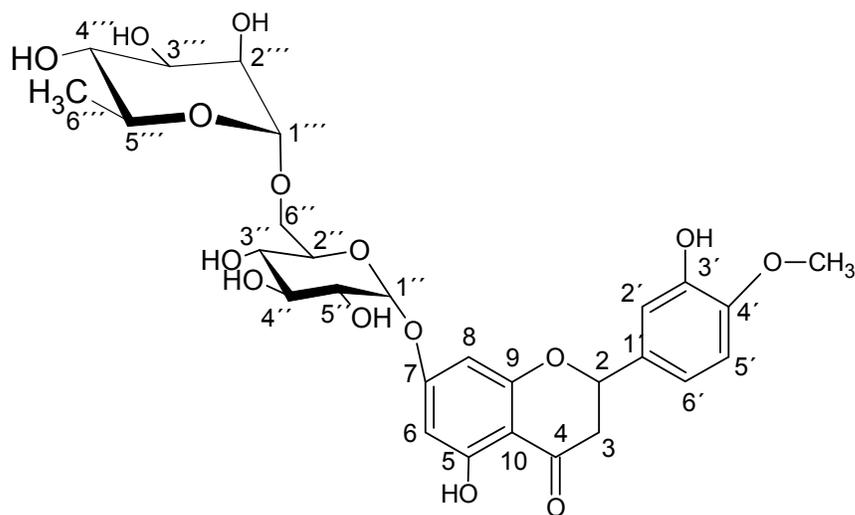
Foram isolados dois compostos de folha e caule de *Z. rhoifolium*, ambos da fração acetato de etila e denominados MS-01 e MS-02.

A estrutura do MS-01 foi definida com base nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , bem como por meio da comparação com a literatura (FERREIRA *et al.*, 2000; MOCCELINI *et al.*, 2009).

No espectro de RMN de ^1H foi possível observar a presença de hidroxila e metoxila presentes em C-5 e C-7, respectivamente, reconhecidas devido à presença do par de singletos largos em δ_{H} 6,13 (H-6 e H-8) e o sinal múltiplo em δ_{H} 6,93 foi atribuído aos hidrogênios aromáticos H-2', H-5' e H-6' (GRÁFICO 3). Também foram observados sinais na região dos hidrogênios aromáticos em δ_{H} 5,48 (dd, J= 15,28 Hz, H-2), δ_{H} 2,77 (m, J= 6,97 Hz, H-3eq) e δ_{H} 2,81 (dd, J= 20,29 Hz, H-3ax), os quais caracterizaram o esqueleto da flavanona (GRÁFICOS 3, 4). Os sinais em δ_{H} 4,53 (d, J= 7,45 Hz) e em δ_{H} 4,98 caracterizam os hidrogênios anoméricos H-1" e H-1"', respectivamente, e o sinal em δ_{H} 1,08 (d, J= 7,0 Hz, H-6''') juntamente com o sinal de dubleto em δ_{H} 1,04 (d, J= 6,90 Hz, H-6'') confirmam a presença de uma unidade ramnose na molécula (GRÁFICOS 3, 4). As hidroxilas

fenólicas ficaram caracterizadas por sinais absorvidos em δ_H 12,01 (s, 5-OH) e 9,09 (s, OH-3'), (GRÁFICO 3).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C confirmou a presença dos hidrogênios ligados aos carbonos metínico em δ_C 78,3 (C-2) e metilênico em δ_C 42,0 (C-3). Os valores em δ_C 96,3 (C-6), 165,1 (C-7) e 95,5 (C-8) são relativos aos carbonos metínicos não oxigenados sp^2 . Com esses resultados foi possível identificar o composto como uma flavanona 7-O-glicosilada. E os valores de δ_C 114,1, 112,0 e 117,9 foram atribuídos aos carbonos C-2', C-5' e C-6' (GRÁFICO 1, 2). O espectro de RMN de ^{13}C também auxiliou na confirmação dos sinais dos carbonos quaternários da unidade aglicona proposta para o MS-01 que são: 131,1 (C-1'), 146,3 (C-3') 147,9 (C-4') (GRÁFICO 1). Outros valores significativos encontrados foram: δ_C 197,0 (C-4=O), 163,2 (C-5) e 162,3 (C-9). Os valores de deslocamentos químicos expressos na TABELA 3, foram condizentes com a fórmula molecular $C_{28}H_{34}O_{15}$ e confirmaram a estrutura da 7-O- β -D-rutinosil-3',5-di-hidroxi-4'-metoxiflavanona ou hesperidina (40).



(40)

A hesperidina (40) é um flavonoide abundantemente encontrado nos sucos de frutas cítricas da família Rutaceae. Um estudo realizado com esse flavonoide afirma que no fígado, o metabólito na forma glicosilada, hesperidina-ácido glicurônico, inibe a HMG-Coa redutase e a síntese de colesterol hepático, o que produz uma redução no colesterol plasmático (KIM *et al.*, 2003). Outra pesquisa utilizando ratos tratados com óleo de palma e hesperidina demonstrou um resultado positivo na redução do colesterol total e do HDL (VINUEZA; FARIA; CÉZAR, 2008).

Estudo realizado por Chiba *et al.* (2003) testou o efeito da hesperidina na inibição da perda óssea em camundongos e obteve bons resultados na administração de hesperidina com α -glicosil-hesperidina, uma forma glicosilada do flavonoide que é mais solúvel. Tendo em vista que *Z. rhoifolium* apresenta esse metabólito, o potencial terapêutico justifica o uso popular.

Os valores de RMN podem ser observados na TABELA 3 e nos GRÁFICOS 1 - 4.

TABELA 3 - DADOS DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C E ^1H DA SUBSTÂNCIA MS-01, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA HESPERIDINA

C	MS-01 ^a		HESPERIDINA ^b		HESPERIDINA ^c	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
2	78,3	5,48 (dd, J = 15,28 Hz)	78,4	5,49 (dd, J = 12,18 Hz, H-2)	78,6	5,5 (dl, J = 9,0 Hz)
3	42,0	2,77 (m, J = 6,97 Hz, H-3eq) 2,81 (dd, J = 20,29 Hz, H-3ax)	42,1	2,77 (dd, J = 3,11 Hz, H-3eq) 3,07 (dd, J = 13,8 Hz, H-3ax)	42,1	2,50 - 2,90 (m)
4	196,9	-	197,0	-	197,1	-
5	163,0	12,01 (s, 5-OH)	163,1	12,06 (s, 5-OH)	163,1	12,00 (s)
6	96,3	6,13 (sl)	96,4	6,15 (sl)	96,3	6,5 (sl)
7	165,1	-	165,2	-	165,2	-
8	95,5	6,13 (sl)	95,6	6,12 (sl)	95,5	6,91 (sl)
9	162,4	-	162,5	-	162,9	-
10	103,3	-	103,3	-	103,1	-
1'	130,8	-	130,9	-	131	-
2'	114,1	6,93 (m)	114,2	6,92 (m)	114,2	6,75 - 6,95 (m)
3'	146,4	9,09 (s, 3-OH)	146,5	-	146,5	9,10 (s, 3-OH)
4'	147,9	-	147,9	-	148,0	-
5'	112,0	6,93 (m)	112,0	6,92 (m)	112	6,75 - 6,95 (m)
6'	117,9	6,93 (m)	117,9	6,92 (m)	118	6,75 - 6,95 (m)
1''	100,5	4,53 (d, J = 7,45 Hz)	100,6	4,52 (d, J = 7,3 Hz)	100,7	4,98 (d, J = 8,0 Hz)
2''	72,9	3,15 - 3,54 (m)	73,0	3,09 - 3,86 (m)	73,1	3,20 - 3,90 (m)
3''	76,2	-	76,3	-	76,4	3,20 - 3,90 (m)
4''	69,5	-	69,6	-	69,7	3,20 - 3,90 (m)
5''	75,5	-	75,5	-	75,6	3,20 - 3,90 (m)
6''	66,0	1,04 (d, J = 6,90 Hz)	66,1	1,08 (d, J = 6,0 Hz)	66,1	3,20 - 3,90 (m)
1'''	99,4	4,98 (s)	99,5	4,97 (s)	99,5	4,50 (s)
2'''	70,2	-	70,3	-	70,4	3,20 - 3,90 (m)
3'''	70,6	-	70,7	-	70,8	3,20 - 3,90 (m)
4'''	72,0	-	72,1	-	72,2	3,20 - 3,90 (m)
5'''	68,2	3,15 - 3,54 (m)	68,3	3,09 - 3,86 (m)	68,4	3,20 - 3,90 (m)
6'''	17,7	1,08 (d, J = 7,0 Hz)	17,8	-	17,9	1,10 (d, J = 6,8 Hz)
4'-OCH ₃	55,6	3,82 (s)	55,7	-	55,7	3,85 (s)

NOTA: a-Dados experimentais (^{13}C e ^1H - 200 MHz, DMSO-d6); b-MOCCELINI et al., 2009 (^{13}C - 50 MHz, ^1H - 200 MHz, DMSO-d6); c-FERREIRA et al., 2000 (^{13}C - 50,3 MHz, ^1H - 200 MHz, DMSO-d6).

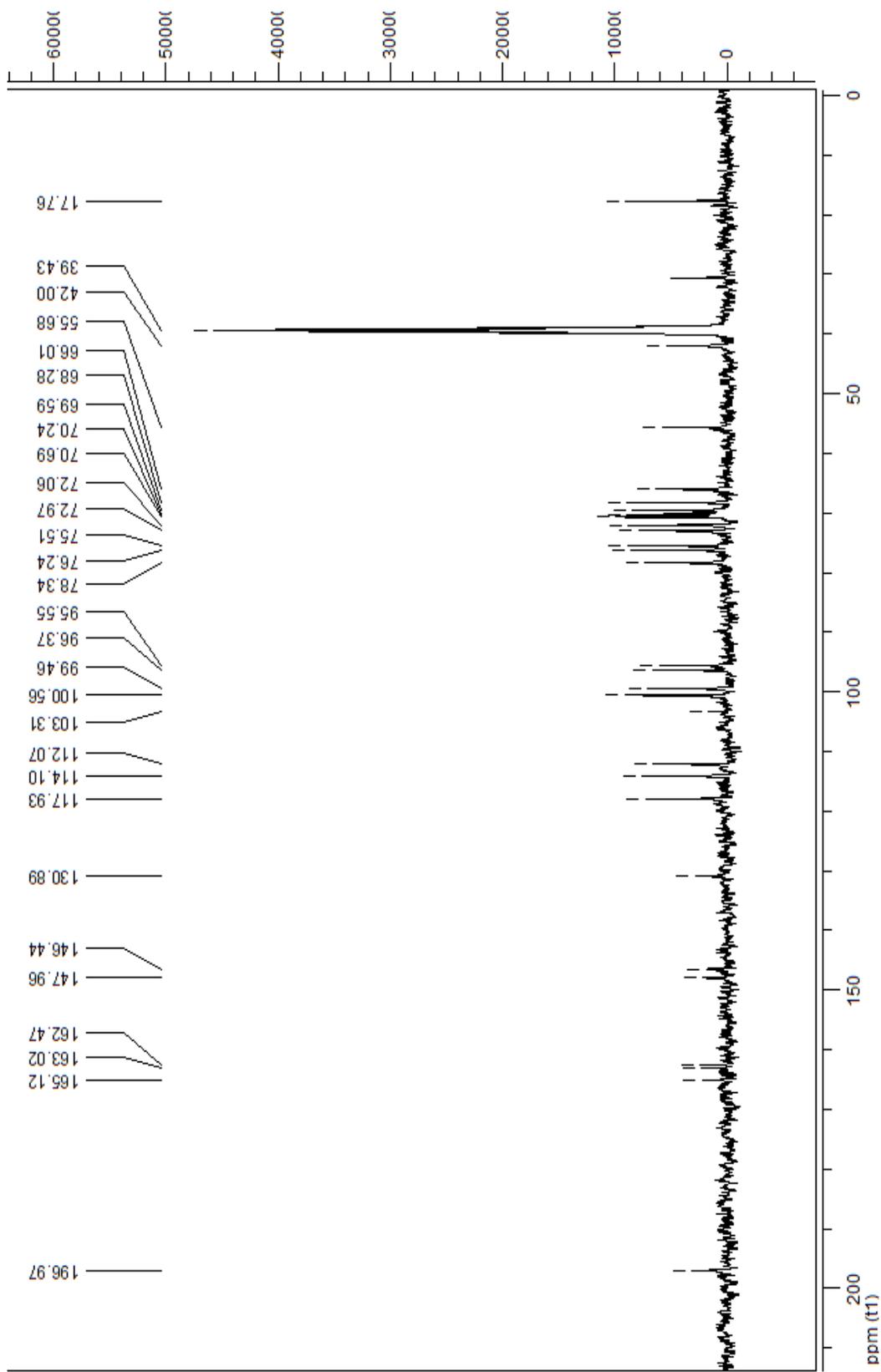


GRÁFICO 1 - ESPECTRO DE RMN DE ¹³C (200 MHz, DMSO-d₆ COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-01, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE

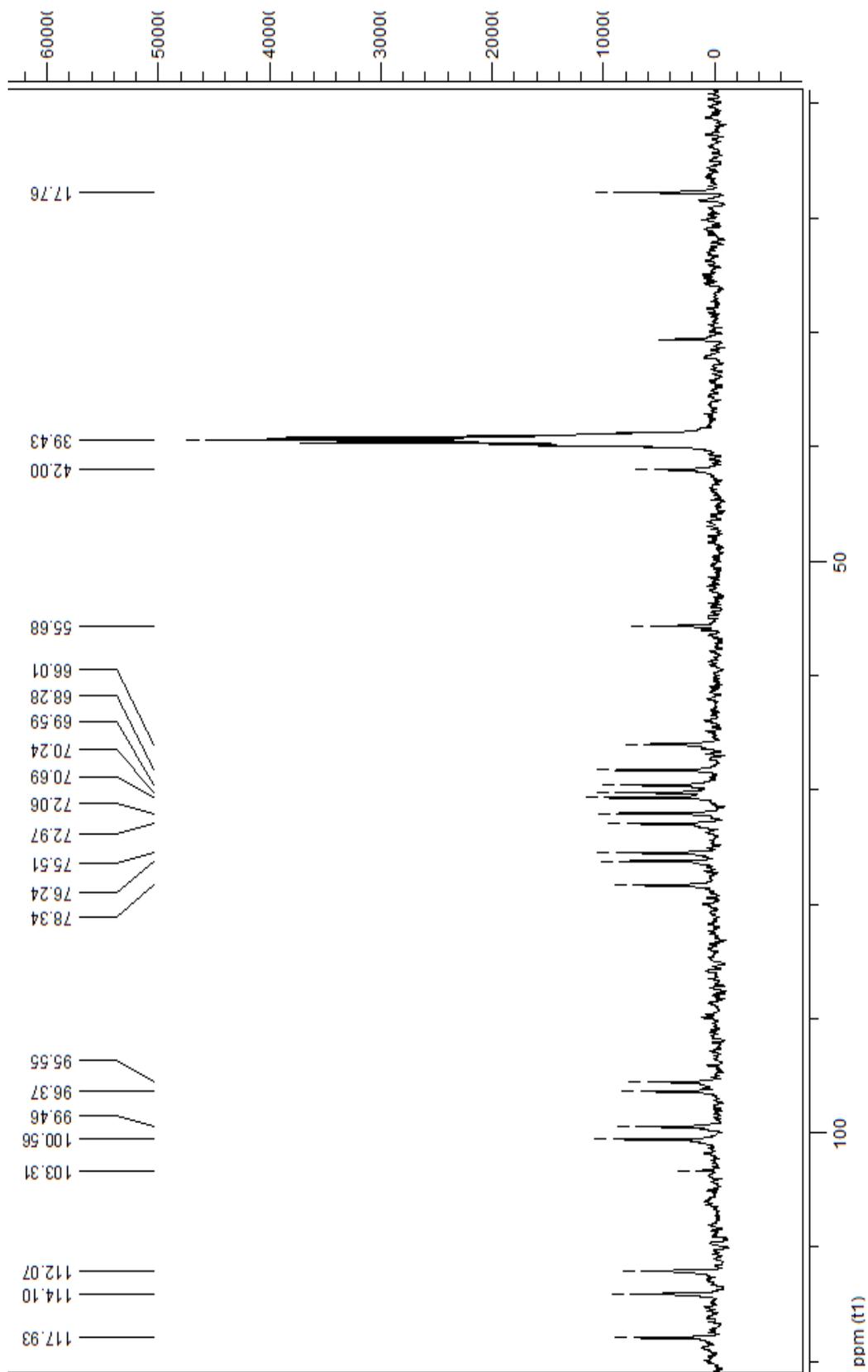


GRÁFICO 2 - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³C (200 MHz, DMSO-d₆ COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-01, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 10 - 120 PPM

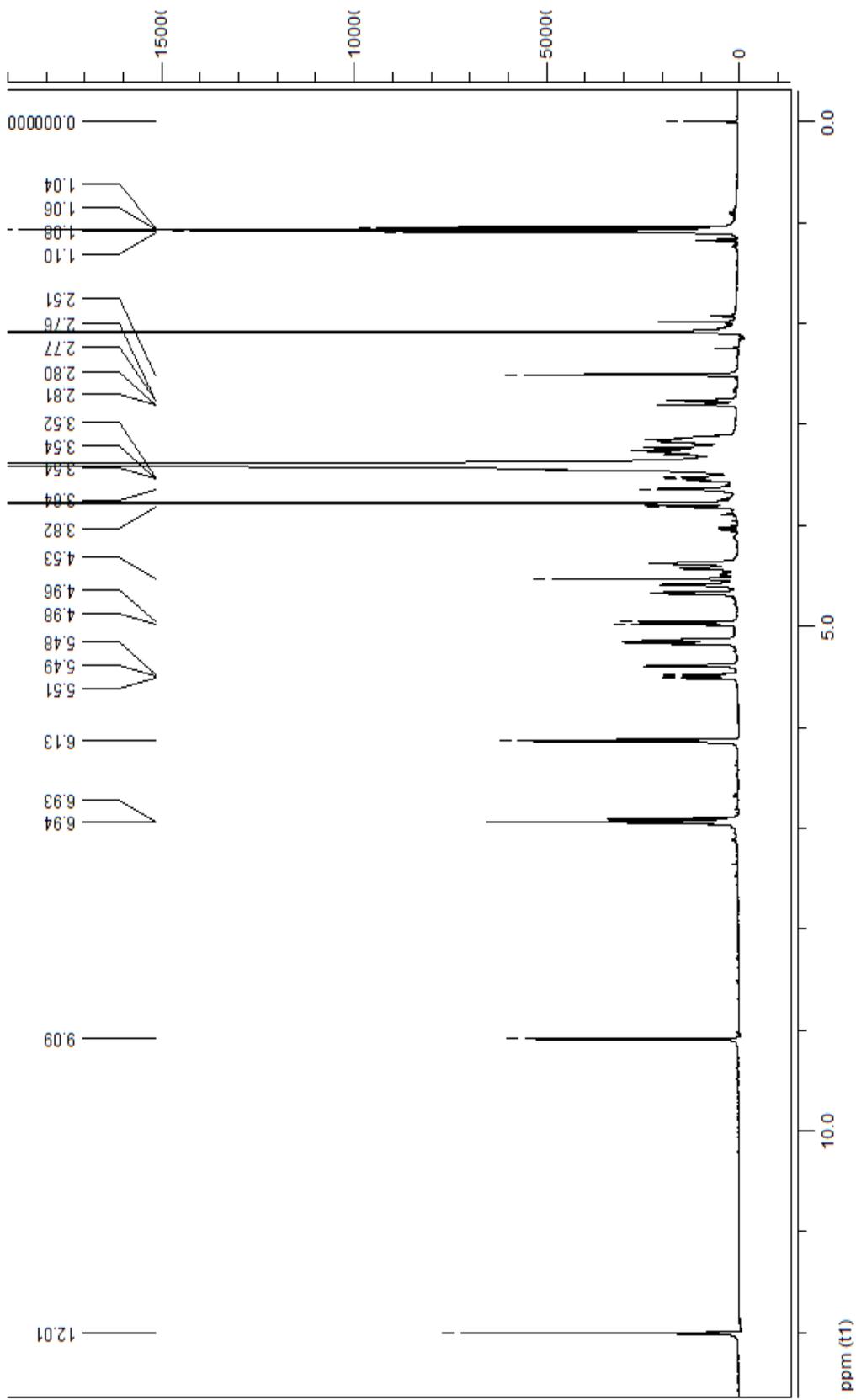


GRÁFICO 3 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200 MHz, DMSO-d_6 COM TMS) AMPLIADO DA SUBSTÂNCIA MS-01, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE

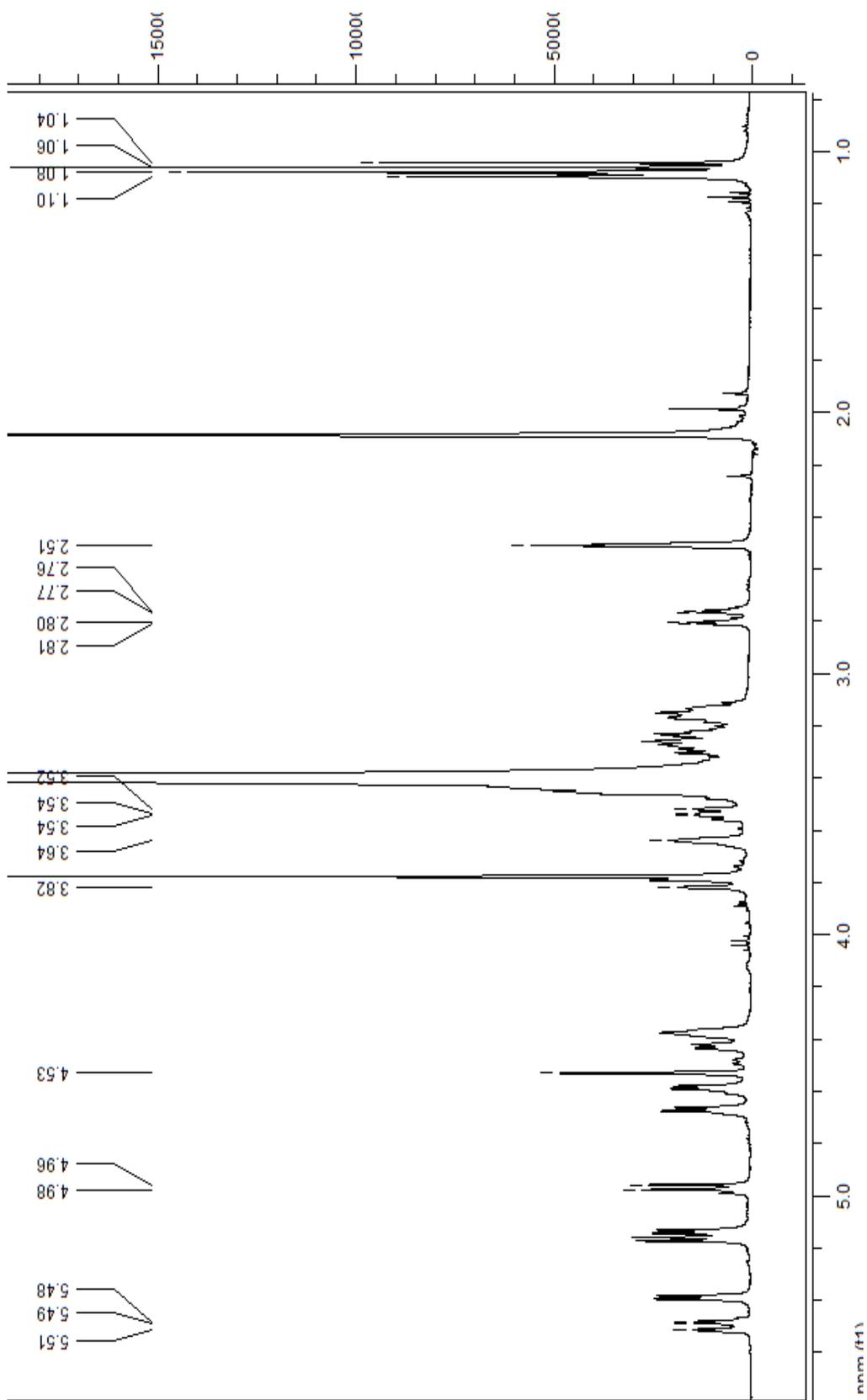


GRÁFICO 4 - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹H (200 MHz, DMSO-d₆ COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-01, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 1 - 5 PPM

A segunda substância denominada MS-02, foi isolada da fração acetato de etila de folha de *Z. rhoifolium*. Foi realizada uma análise em CLAE, como é verificado no GRÁFICO 5.

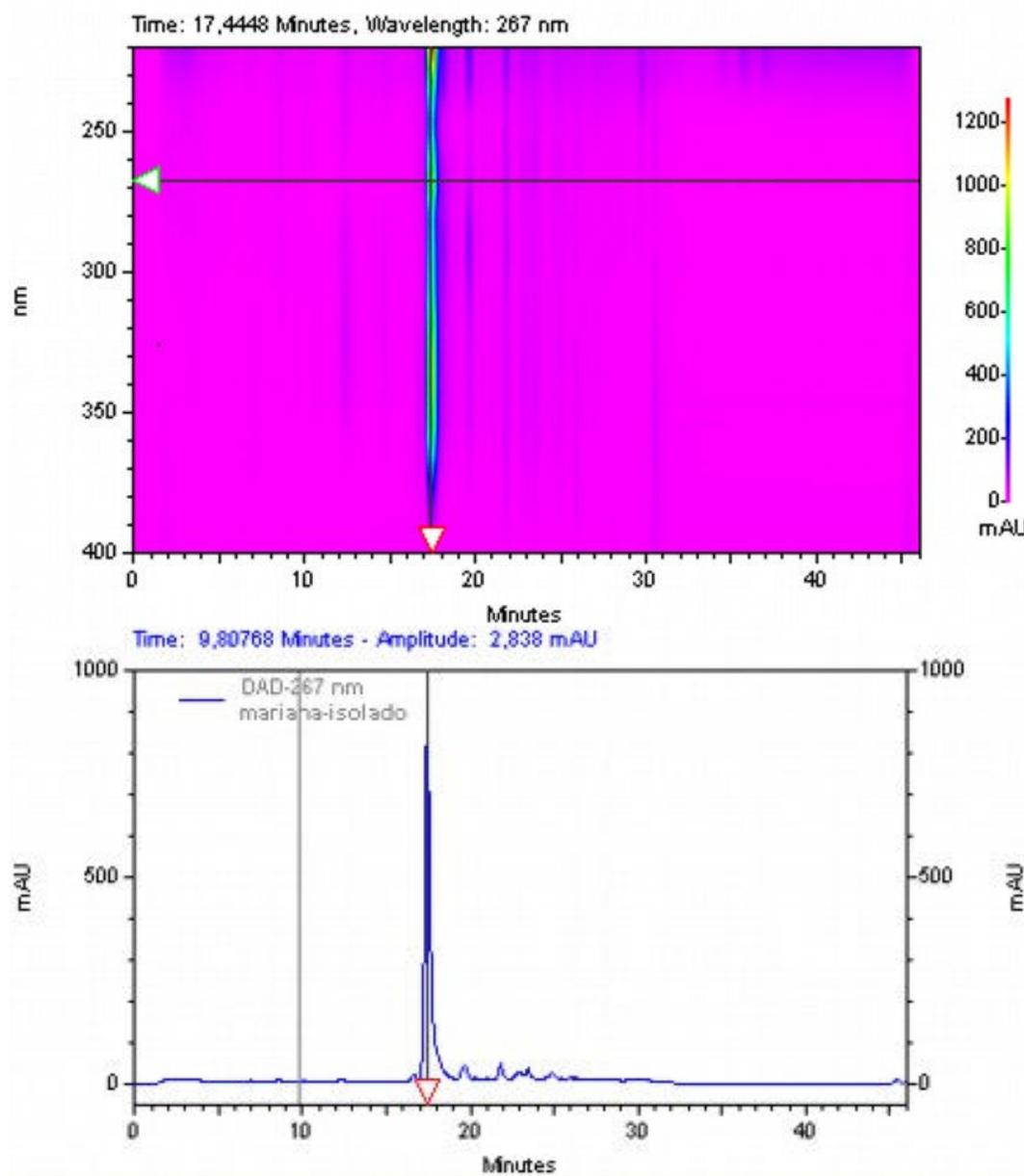


GRÁFICO 5 – CROMATOGRAMA OBTIDO DA SUBSTÂNCIA MS-02 ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, EM CLAE/UV, λ 267 nm, COLUNA X TERRA TM 5 μ m (MS C18, 250 mm x 4,6 mm d.i.)

Conforme pode ser observado no cromatograma, a substância MS-02 se apresenta em maior concentração na amostra, podendo assim ser realizado o espectro de RMN para elucidação da estrutura.

Foi obtido um espectro de varredura no UV da substância MS-02, para verificação de algumas características. Os comprimentos de onda estão apresentados na TABELA 4. Os dados para a interpretação dos espectros de UV foram consultados em Mabry, Markham e Thomas (1970).

TABELA 4 - VALORES DE COMPRIMENTOS DE ONDA DAS BANDAS 1 - 4 REFERENTES À VARREDURA NO ULTRAVIOLETA DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE

DADOS DO ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA				
Max (nm)				
BANDA	METOH	NaOH	AlCl₃	AlCl₃+ HCl
1	330	391	348	348
2	270	329	304	339
3	215	277	276	276
4	201	210	219	219

O espectro do composto solubilizado em METOH (grau p.a.) está demonstrado no GRÁFICO 6.

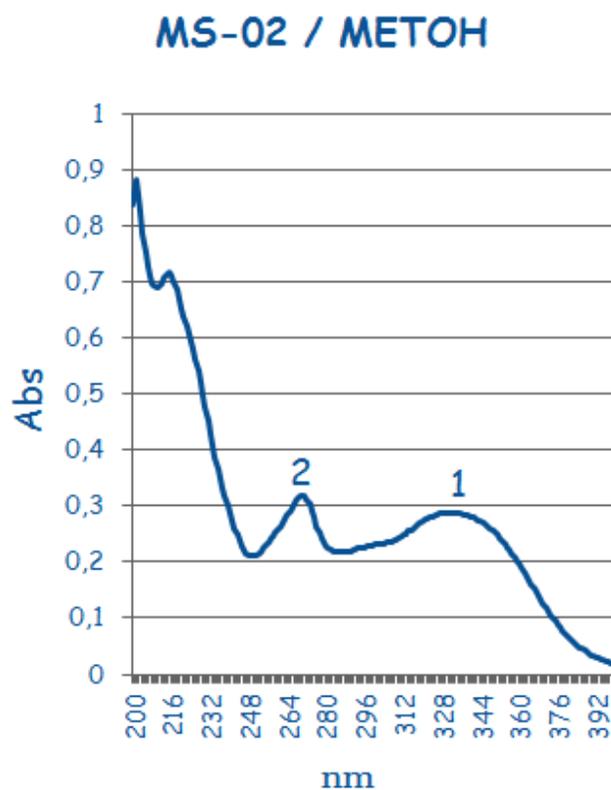
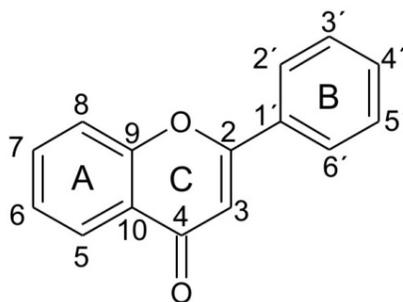


GRÁFICO 6 - ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, EM METOH

A substância MS-02 apresentou picos de absorção em λ 270 (banda 2) e 330 nm (banda 1). Segundo Mabry, Markham e Thomas (1970), os flavonoides apresentam absorção entre λ 200 e 400 nm. Essas informações indicam que a substância MS-02 seja um flavonoide e os valores de banda 1 entre λ 304 e 350 nm sugerem que seja do grupo das flavonas. A absorção na banda 1 está associada ao anel B do núcleo das flavonas (43), e a banda 2 relacionada à absorção do anel A com C.



(43)

Foi adicionado NaOH à substância MS-02 diluído em metanol (grau p.a.) para verificação de um possível efeito batocrômico nas bandas 1 e 2. O resultado pode ser observado no GRÁFICO 7.

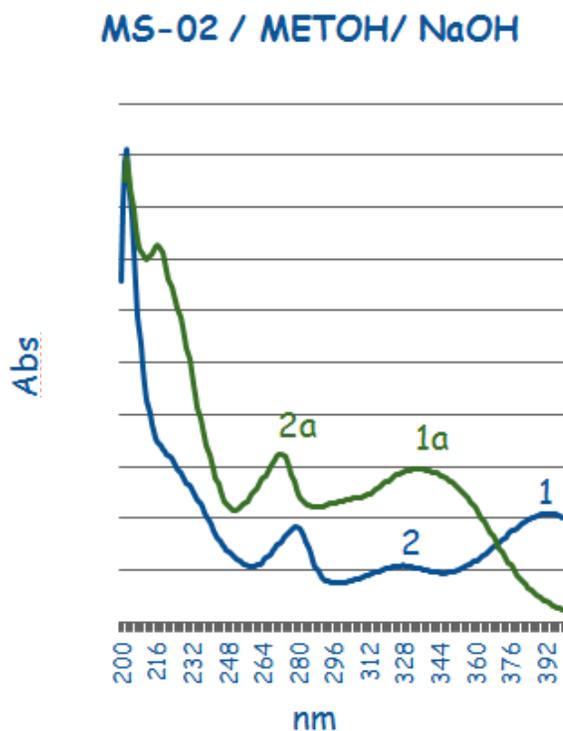


GRÁFICO 7 - ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, EM METOH ADICIONADO DE NAOH DEMONSTRANDO EFEITO BATOCRÔMICO NAS BANDAS 1 E 2, COMPARADO COM AS BANDAS 1a E 2a DA SUBSTÂNCIA EM METOH

O efeito batocrômico na banda 1, de λ 330 para 391 nm evidencia presença de grupo hidroxila em 4' (43), e o efeito batocrômico na banda 2 de λ 270 para 329 nm, indica a presença de OH livre em 7 (43) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

O espectro das 5-hidroxi flavonas com AlCl_3 e HCl consiste em quatro picos de absorção, bandas 1, 2, 3 e 4, todas com efeito batocrômico relativo aos picos de absorção em METOH . Esse efeito foi observado na substância MS-02 adicionada de AlCl_3 e HCl , como demonstrado no GRÁFICO 8.

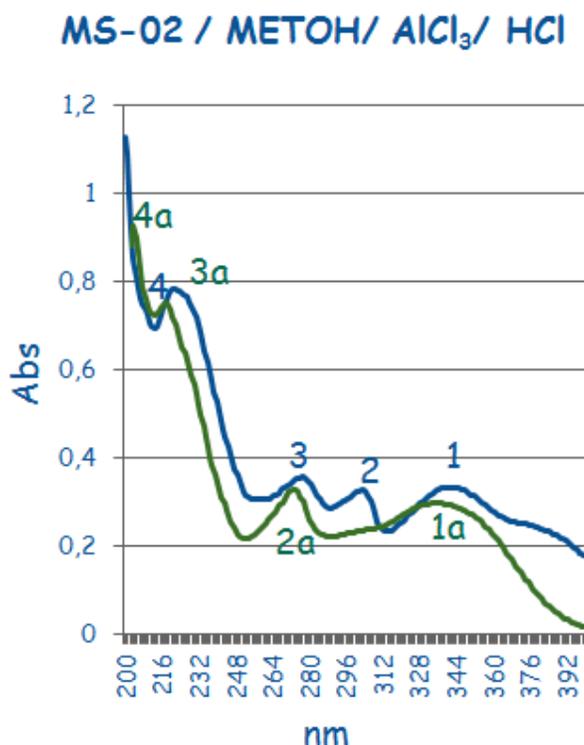


GRÁFICO 8 - ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, EM METOH E ADICIONADO DE HCl E AlCl_3 DEMONSTRANDO EFEITO BATOCRÔMICO EM QUATRO BANDAS DE ABSORÇÃO 1, 2, 3 E 4, COMPARADAS COM AS BANDAS DA SUBSTÂNCIA EM METOH 1a, 2a, 3a E 4a

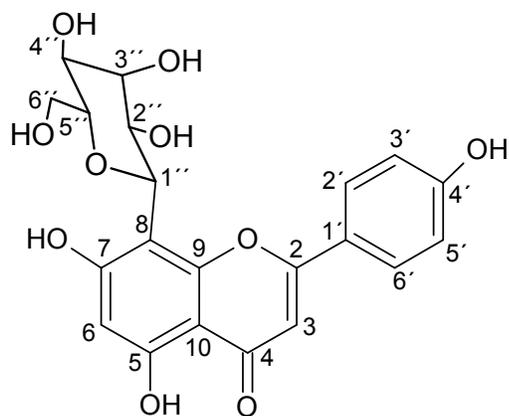
Pode-se observar o efeito batocrômico nas quatro bandas do gráfico. A banda 1 teve deslocamento de λ 330 nm com METOH para λ 348 nm com a adição de AlCl_3 e HCl . Na banda 2 o efeito batocrômico foi ainda maior passando de λ 270 para 339 nm. As bandas 3 e 4 obtiveram valores de λ 215 e 201 nm com METOH e λ 276 e 219 nm, respectivamente, com a adição de AlCl_3 e HCl .

Pode-se concluir a partir das observações dos espectros no UV que a substância MS-02 é muito provavelmente uma flavona 4',5,7-tri-hidroxilada.

A substância MS-02 foi então submetida à análise em RMN de ^1H e ^{13}C e o solvente utilizado foi o DMSO- d_6 com TMS a 200 MHz.

No espectro de RMN de ^1H para a substância MS-02 foram observados sinais de hidrogênios aromáticos em δ_{H} 6,92 (H-3', H-5'), 8,01 (H-2', H-6'), 6,28 (H-6) e 6,79 (H-3). O sinal em δ_{H} 4,67 (H-1'') caracteriza a presença de um hidrogênio anomérico, sendo esse valor compatível para C-glicosídeos (GRÁFICO 13, 14).

Com relação ao espectro de RMN de ^{13}C foi encontrado o sinal em δ_{C} 182,13 que indica a presença de carbonila α,β -insaturada em C-4 e três sinais em δ_{C} 160,42 (C-5), 161,15 (C-4') e 162,57 (C-7), que são atribuídos a carbonos aromáticos ligados a heteroátomo (GRÁFICO 9 e 10). Foram observado também dois sinais duplos referentes a carbono ligado a hidrogênio em anel aromático, aparecendo em δ_{C} 115,86 (C-3', C-5') e 128,99 (C-2', C-6') (GRÁFICO 9 e 11). A presença de unidade glicosídica foi confirmada no espectro de RMN de ^{13}C pela presença de seis sinais característicos na região de δ_{C} 73,39 a 61,32 (C-1'' a C-6'') (GRÁFICOS 9, 12). A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , a comparação com a literatura (TANAKA, 2005; ZHOU, 2005; CARDOZO, 2006; SUZART, 2007), bem como a varredura no UV, permitiram identificar a substância como o flavonoide C-glicosilado vitexina (41).



(41)

Os valores de RMN de ^{13}C e ^1H encontrados nesta investigação são semelhantes aos da literatura e estão expressos na TABELA 5.

TABELA 5 - DADOS DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C E ^1H DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, EM COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA PARA VITEXINA

C	MS-02 ^a		VITEXINA ^b	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
2	164,01	-	163,82	-
3	102,47	6,79 (s)	102,32	6,78 (s)
4	182,13	-	181,96	-
5	160,42	13,17 (s, OH)	160,00	13,17 (s, OH)
6	98,16	6,28 (s)	98,01	6,27 (s)
7	162,57	-	162,43	-
8	104,61	-	104,42	-
9	156,02	-	155,87	-
10	104,06	-	103,91	-
1'	121,63	-	121,48	-
2'	128,99	8,01 (d, J = 8,6 Hz)	128,83	8,02 (d, J = 8,0 Hz)
3'	115,86	6,92 (d, J = 8,6 Hz)	115,68	6,89 (d, J = 8,0 Hz)
4'	161,15	-	161,00	-
5'	115,86	6,92 (d, J = 8,6 Hz)	115,68	6,89 (d, J = 8,0 Hz)
6'	128,99	8,01 (d, J = 8,6 Hz)	128,83	8,02 (d, J = 8,0 Hz)
1''	73,39	4,67 (d, J = 9,6 Hz)	73,25	4,68 (d, J = 10,0 Hz)
2''	70,56	3,84 (m)	70,42	3,82 (m)
3''	78,66	3,25 (m)	78,52	3,25 (m)
4''	70,87	3,27 (m)	70,71	3,35 (m)
5''	81,83		81,72	3,25 (m)
6''	61,32		61,16	3,78 (m)

NOTA: a- Dados experimentais (200 MHz, DMSO-d₆, TMS); b- SUZART, 2005 (125 MHz, CDCl₃).

Ensaio utilizando o modelo de inflamação crônica em ratas demonstrou que a vitexina possui atividade anti-inflamatória semelhante ao do padrão piroxicam, efeito protetor da mucosa gástrica similar a do antiulceroso sucralfato e ação como potente hipotensivo (PRABHAKAR *et al.*, 1981; COFFIGNY *et al.*, 2000; RUIZ *et al.*, 2004). A atividade antimicrobiana do flavonoide contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* foi demonstrada em estudos realizados por Afifi, Shervington e Darwish (1997). Kim *et al.* (2005) encontraram resultados satisfatórios da vitexina como potente sequestrador de radicais livres e na prevenção de reações adversas da pele induzidas por radiação UV.

Os resultados obtidos são promissores e favorecem à continuidade de estudos, objetivando-se a identificação de outros compostos.

Os espectros de absorção de RMN de ^{13}C e ^1H estão nos GRÁFICOS 9 - 14.

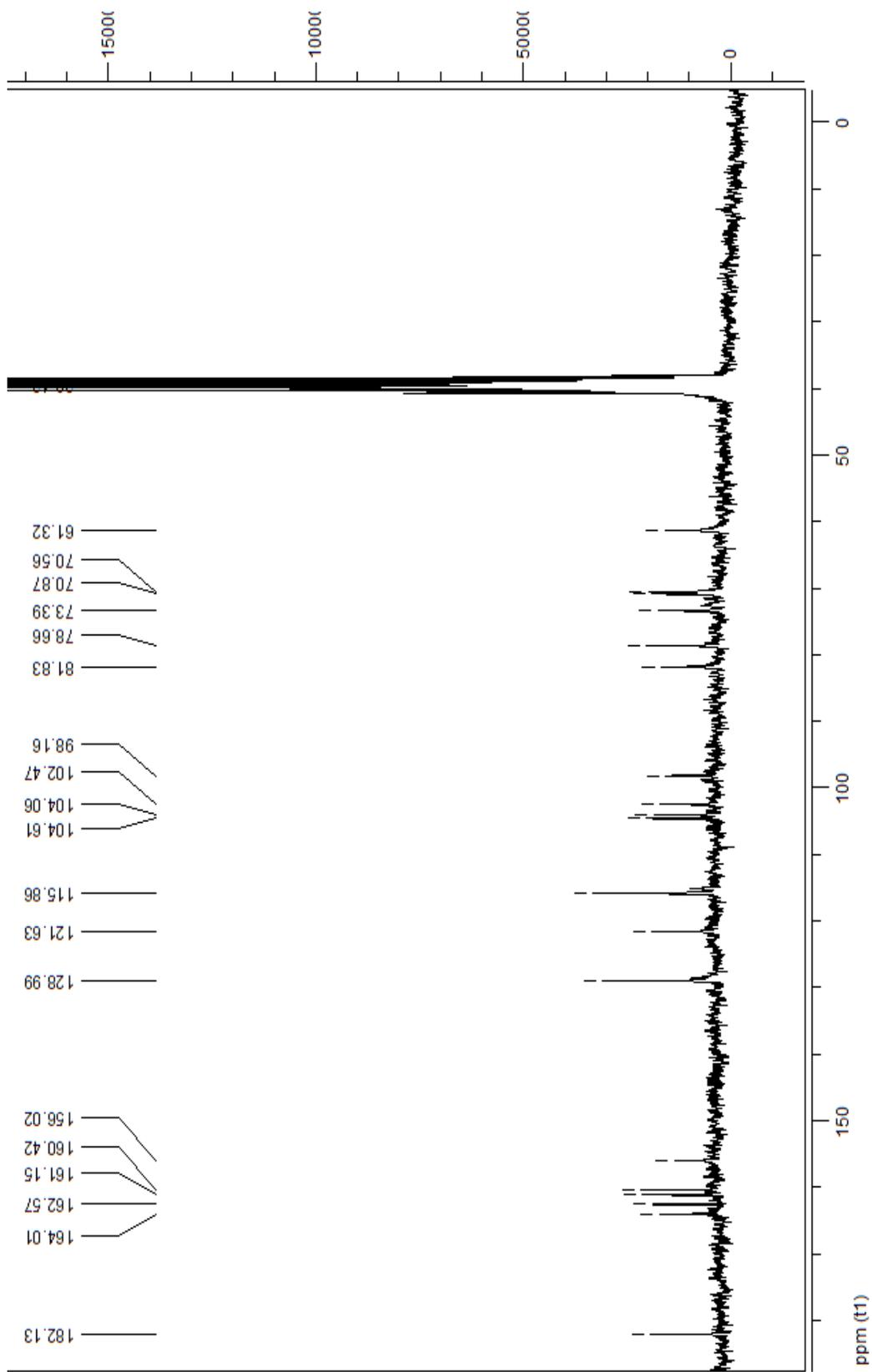


GRÁFICO 9 - ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (200 MHz, DMSO-d_6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE

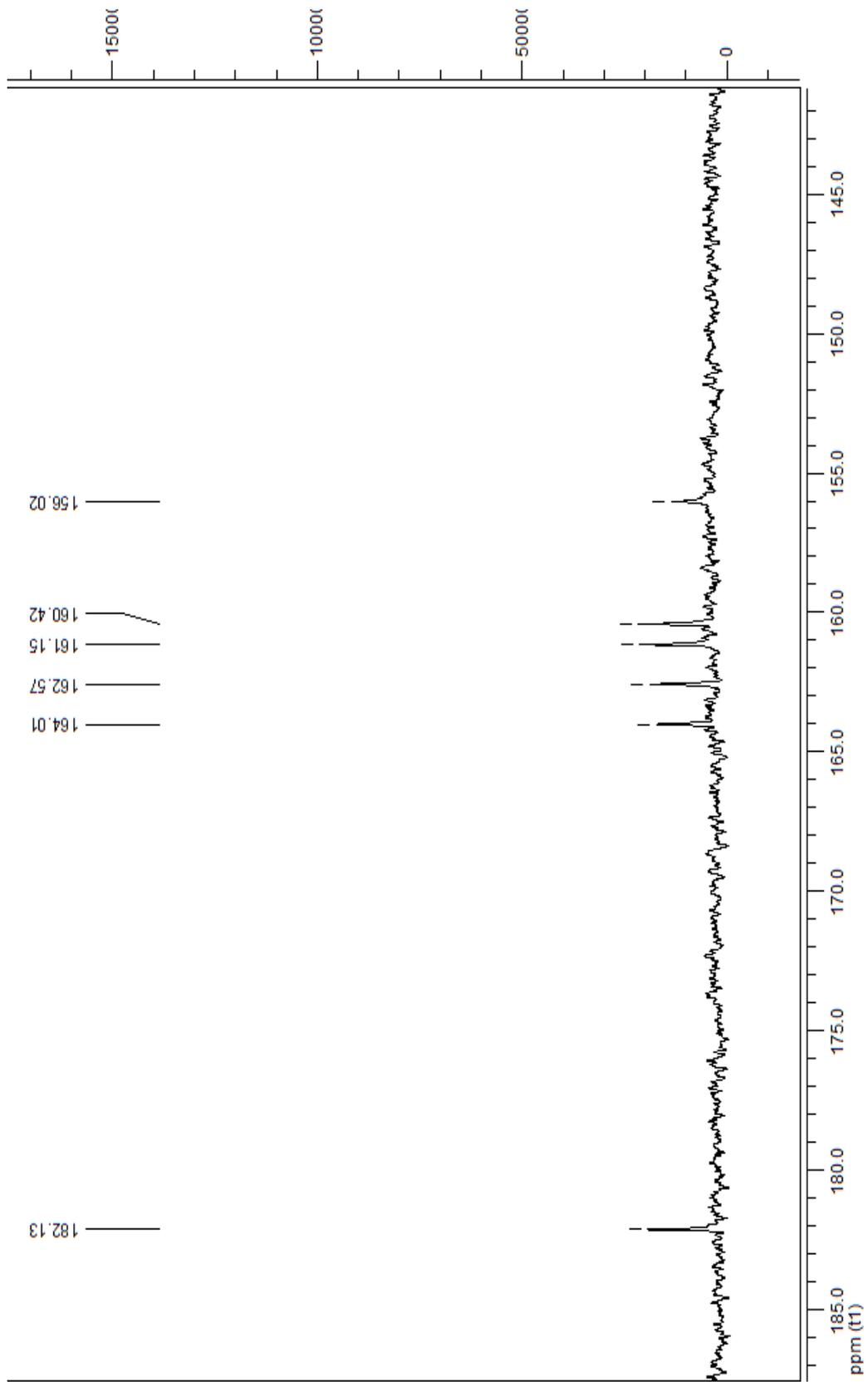


GRÁFICO 10 - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ¹³C (200 MHz, DMSO-d6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 145 - 185 PPM

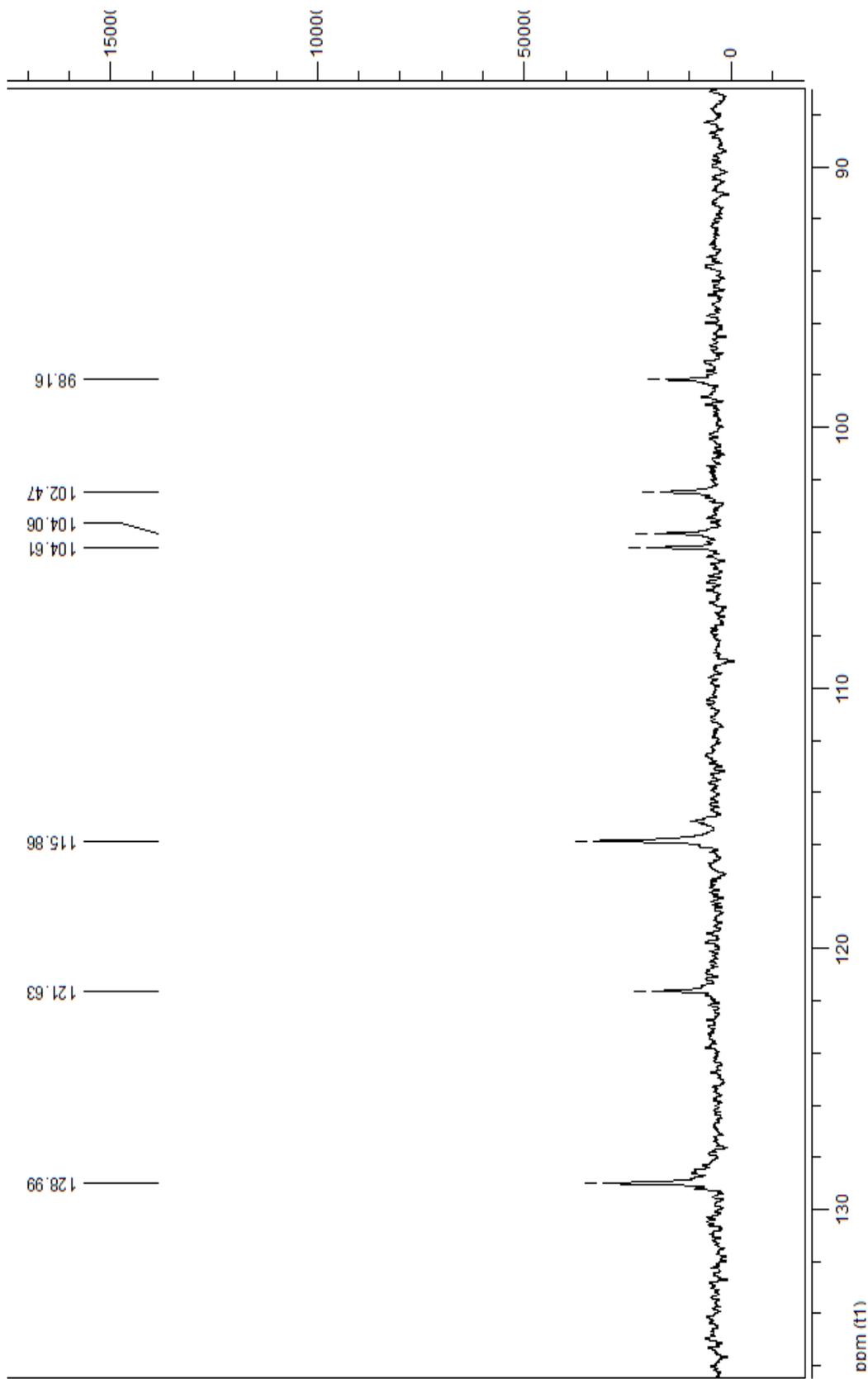


GRÁFICO 11 - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (200 MHz, DMSO- d_6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 90 - 130 PPM

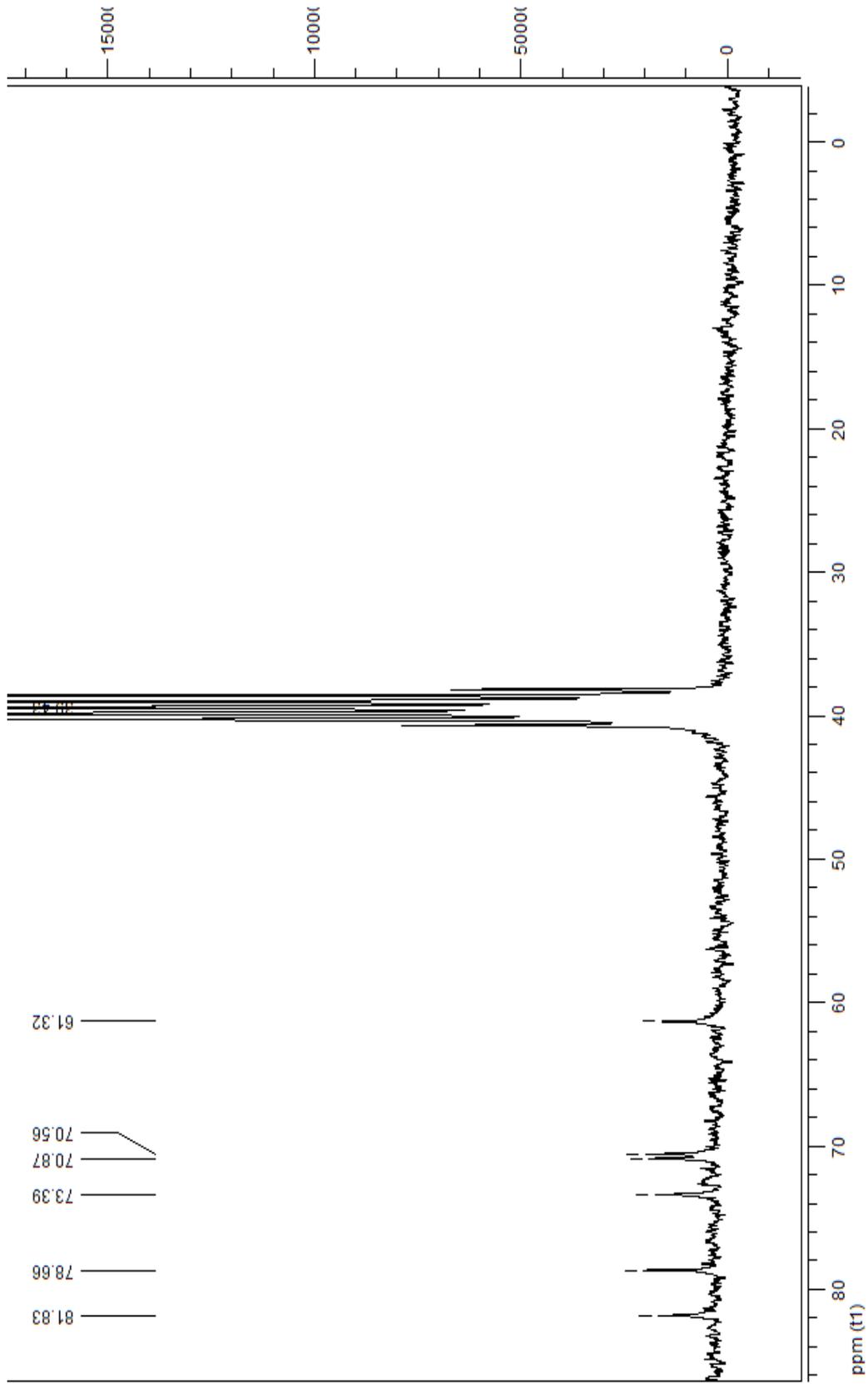


GRÁFICO 12 - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (200 MHz, DMSO- d_6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 0 - 80 PPM

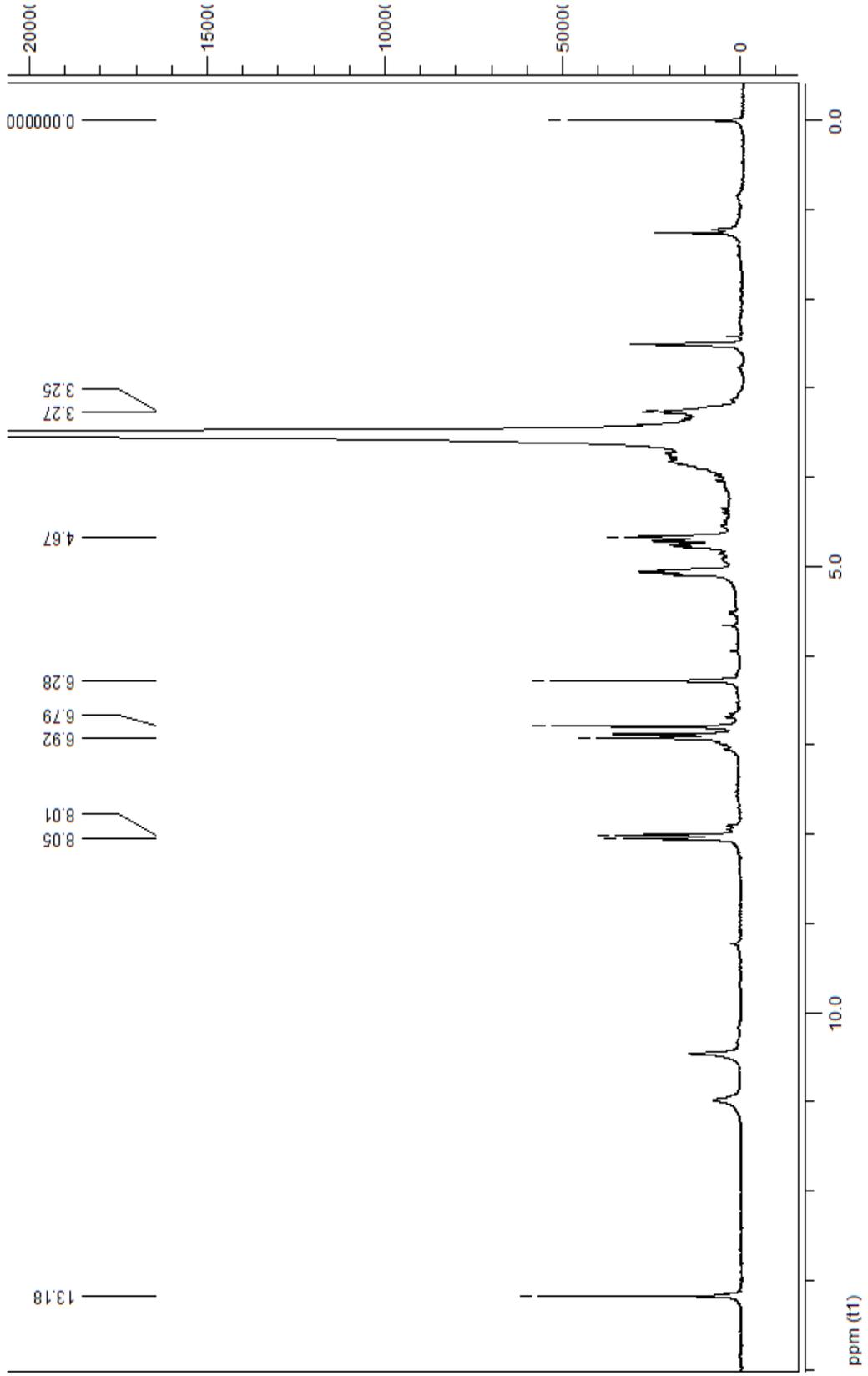


GRÁFICO 13 - ESPECTRO DE RMN DE ¹H (200 MHz, DMSO-d6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE

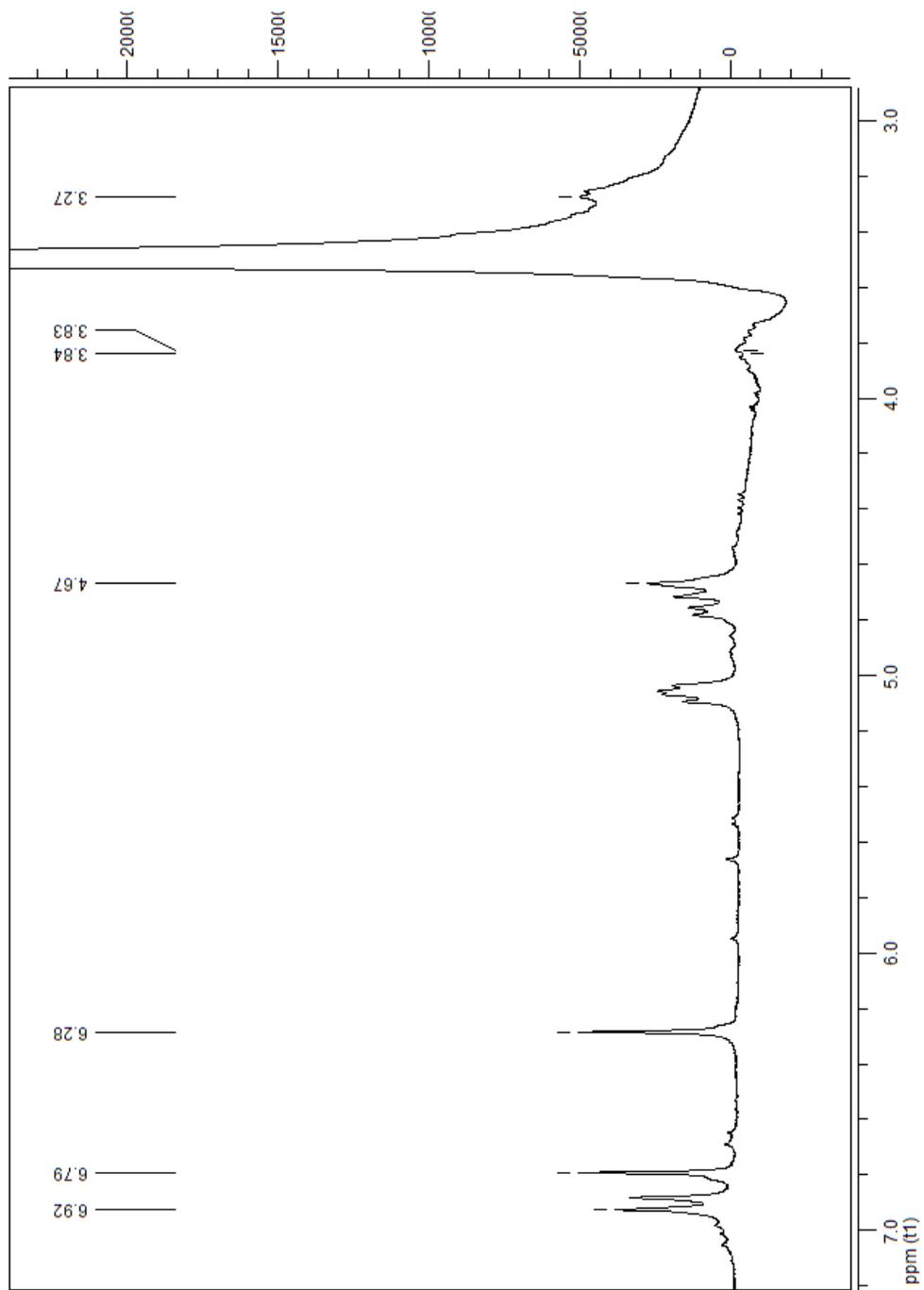


GRÁFICO 14 - EXPANSÃO DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200 MHz, DMSO- d_6 COM TMS) DA SUBSTÂNCIA MS-02, ISOLADA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE FOLHA DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, NA REGIÃO DE δ 3 - 7 PPM

4.2.5 Atividade antioxidante

4.2.5.1 Método de formação do complexo fosfomolibdênio

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada com o extrato etanólico bruto e frações de folha e caule de *Z. rhoifolium*, e os cálculos levaram em consideração a vitamina C e a rutina como 100%. Os resultados são apresentados na TABELA 6 e no GRÁFICO 15.

TABELA 6 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE FORMAÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, EM RELAÇÃO À VITAMINA C E RUTINA

AMOSTRA	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À VITAMINA C (%) E ± DP		ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À RUTINA (%) E ± DP	
	FOLHA	CAULE	FOLHA	CAULE
EX ETANÓLICO BRUTO	26,1a ± 0,64	26,3a ± 1,11	116,1b ± 2,28	112,8a ± 3,93
FR HEXANO	30,1b ± 1,27	18,3b ± 0,63	131,6b ± 4,50	85,7b ± 2,25
FR CLOROFÓRMIO	22,3a ± 0,23	29,1a ± 0,70	97,5a ± 0,82	120,9a ± 2,48
FR ACETATO DE ETILA	23,1a ± 0,85	25,7a ± 1,15	100,2a ± 3,03	110,9a ± 4,07
FR HIDROALCOÓLICA	23,1a ± 0,93	20,5a ± 0,39	100,4a ± 3,31	102,1a ± 1,38

NOTA: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Anova e Tukey; DP = Desvio padrão; EX = Extrato; FR = Fração.

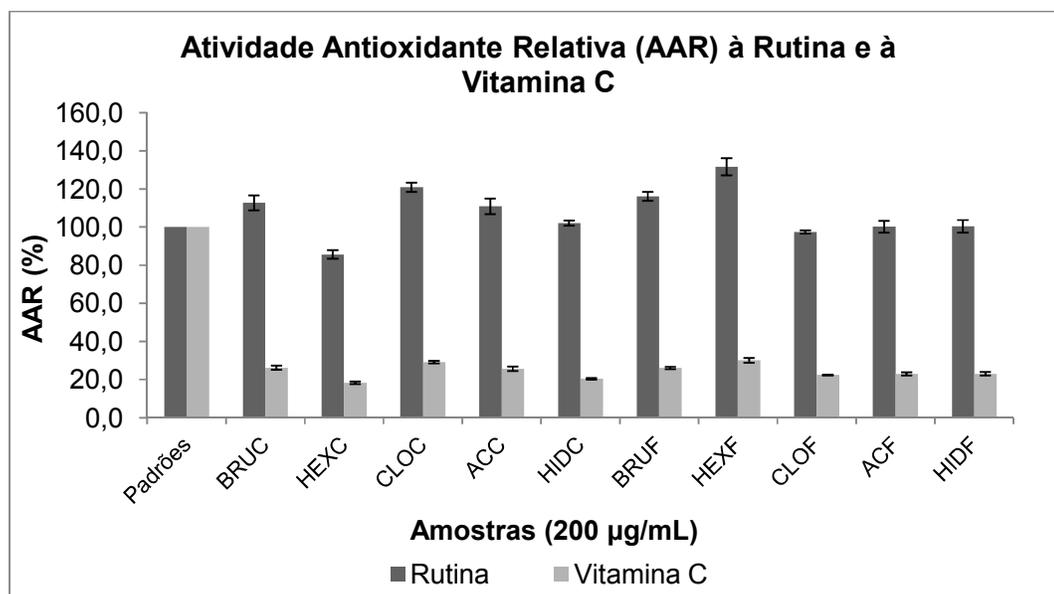


GRÁFICO 15 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, EM RELAÇÃO À VITAMINA C E RUTINA

NOTA: BRUC = extrato etanólico bruto de caule; HEXC = fração hexano de caule; CLOC = fração clorofórmio de caule; ACC = fração acetato de etila de caule; HIDC = fração hidroalcoólica de caule; BRUF = extrato etanólico bruto de folha; HEXF = fração hexano de folha; CLOF = fração clorofórmio de folha; ACF = fração acetato de etila de folha; HIDF = fração hidroalcoólica de folha.

De acordo com os resultados apresentados, foi observado que todas as amostras testadas (extrato etanólico bruto, frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica) demonstraram atividade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio.

A fração que obteve melhores resultados de AAR (vitamina C) foi a hexano de folha, cujo valor de 30,1% é estatisticamente diferente dos demais resultados encontrados para folha.

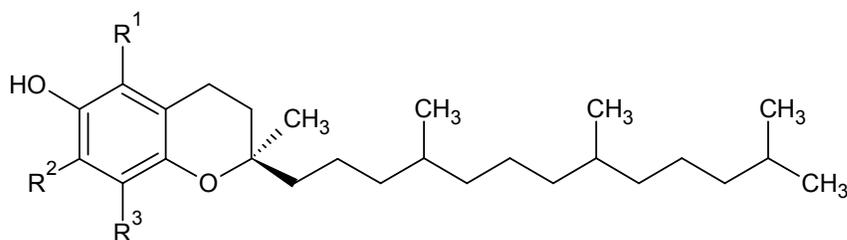
A fração clorofórmio de caule obteve o segundo maior valor de AAR (vitamina C) com 29,1%, seguido dos extratos etanólicos brutos de folha e caule que obtiveram valores de aproximadamente 26%. Esses valores foram determinados em relação a atividade antioxidante da vitamina C (ácido ascórbico), atribuída neste estudo como 100%.

Quando essas amostras foram comparadas com o padrão rutina, a AAR (rutina) para o extrato etanólico bruto foi igual a 112,8% em caule e de 116,1% em folha. A fração hexano obteve AAR (rutina) de 85,7% em caule e 131,6% em folha. Essa diferença, nos valores das frações hexano de folha e caule, pode ser devida à dificuldade de solubilização da amostra da fração hexano de caule.

Para a fração clorofórmio, a AAR (rutina) foi de 120,9% para caule e de 97,5% para folha. A fração acetato de etila apresentou valores de 110,9% em caule e 100,2% em folha, e a fração hidroalcoólica obteve resultado de 102,1% e 100,4% para caule e folha, respectivamente.

Considerando que as frações hexano de folha e clorofórmio de caule foram as mais ativas e que apresentaram atividades antioxidantes relativas superiores, quando comparadas à atividade antioxidante da rutina e que esta é muito utilizada em experimentos como padrão para atividade antioxidante (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SOUSA *et al.*, 2007), pode-se afirmar que essas frações podem ser consideradas como antioxidantes em potencial, podendo ter aplicação na terapêutica, inclusive com possibilidade de separação de ativos.

A atividade antioxidante elevada na fração hexano de folha pode estar relacionada à presença de tocoferóis e tocotrienos nos vegetais, em geral. Os tocoferóis podem ser classificados como antioxidantes primários que agem doando átomos de hidrogênio, ou como antioxidantes biológicos (NAMIKI, 1990; BAILEY, 1996; RAMALHO, 2006). A atividade antioxidante dos tocoferóis é principalmente devida à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, interrompendo a reação de propagação em cadeia. Os tocoferóis estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais e existem quatro tipos segundo a localização dos grupos metila no anel: α , β , γ e δ (42) (JORGE, 2006).



α – tocoferol: $R_1=R_2=R_3=CH_3$
 β – tocoferol: $R_1=R_3=CH_3$; $R_2=H$
 γ – tocoferol: $R_1=H$; $R_2=R_3=CH_3$
 δ – tocoferol: $R_1=R_2=H$; $R_3=CH_3$

(42)

Não há relatos na literatura da presença de tocoferóis em *Zanthoxylum*, porém já foi demonstrada a presença de tocoferol na família Rutaceae no gênero *Citrus* em estudos realizados por Matthaus e Özcan (2012).

4.2.5.2 Método TBARS

A determinação da inibição da peroxidação lipídica pelo método TBARS foi realizada com o extrato etanólico bruto e frações de folha e caule de *Z. rhoifolium*. Os resultados foram expressos em Índice Antioxidante (IA), obtido em porcentagem e são apresentados na TABELA 7 e no GRÁFICO 16.

TABELA 7 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, E DO PADRÃO BHT

AMOSTRA (100 µg/mL)	FOLHA (IA %) ± DP	CAULE (IA %) ± DP
EXTRATO ETANÓLICO BRUTO	52,9a ± 2,3	64,2a ± 4,6
FRAÇÃO HEXANO	67,0a ± 3,4	60,9a ± 5,0
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	49,1a ± 2,4	60,3a ± 3,0
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	57,9a ± 3,3	59,3a ± 3,7
FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA	56,4a ± 1,4	52,9a ± 9,6
BHT	68,4a ± 7,4	

NOTA: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Anova e Tukey; BHT = butil-hidroxitolueno; DP = desvio padrão; IA = índice antioxidante

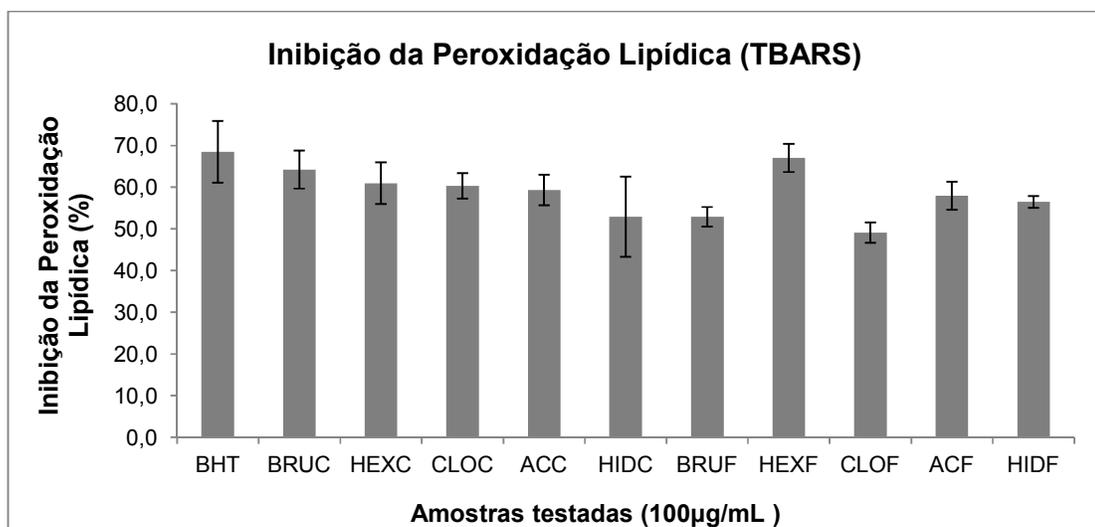


GRÁFICO 16 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, E DO PADRÃO BHT

NOTA: BRUC - extrato etanólico bruto de caule; HEXC - fração hexano de caule; CLOC - fração clorofórmio de caule; ACC - fração acetato de etila de caule; HIDC- fração hidroalcoólica de caule; BRUF - extrato etanólico bruto de folha; HEXF - fração hexano de folha; CLOF - fração clorofórmio de folha; ACF - fração acetato de etila de folha; HIDF- fração hidroalcoólica de folha

Foi observado que a fração hexano de folha obteve 67,0% de índice antioxidante, esse valor é muito próximo ao do padrão BHT de 68,4%. Este resultado é importante, pois é estatisticamente igual ao do padrão.

A segunda melhor ação antioxidante foi a do extrato etanólico bruto de caule com 64,2% de atividade antioxidante, seguido da fração clorofórmio de caule que obteve 60,3%. Esse resultado confirmou o obtido no teste anterior em que as atividades antioxidantes das frações hexano e clorofórmio foram as mais elevadas.

Os demais resultados encontrados também são promissores, pois são estatisticamente semelhantes ao padrão BHT.

Outras espécies do gênero *Zanthoxylum* demonstraram atividade antioxidante: *Z. xanthoxyloides* e *Z. ailanthoides* Sieb. & Zucc. (NGASSOUM *et al.*, 2003; CHUNG *et al.*, 2006). Além disso, a lignana sesamina isolada de *Z. rhoifolium* também demonstrou atividade antioxidante (DUKE, 1992).

4.3 ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

A FIGURA 21 mostra a variação na intensidade de cor após o período de incubação de 24 h do extrato etanólico bruto e frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica de caule de *Z. rhoifolium* frente ao micro-organismo *Escherichia coli*. A cor mais intensa revela uma maior quantidade de micro-organismos viáveis.

Os resultados estão expressos na TABELA 8.

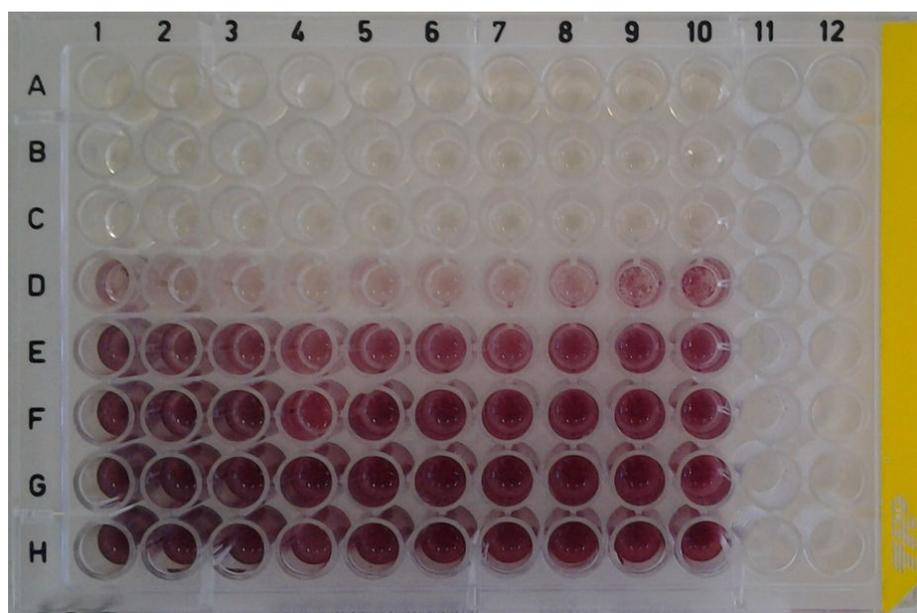


FIGURA 21 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO MÉTODO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, FRENTE AO MICRO-ORGANISMO *Escherichia coli*
NOTA: A = 1000 µg/mL; B = 500 µg/mL; C = 250 µg/mL; D = 125 µg/mL; E = 62,5 µg/mL; F = 31,2 µg/mL; G = 15,6 µg/mL; H = 7,8 µg/mL; 1,2 = Extrato etanólico bruto; 3,4 = Fração hexano; 5,6 = Fração clorofórmio; 7,8 = Fração acetato de etila; 9,10 = Fração hidroalcoólica

TABELA 8 - AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULE DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE, FRENTE AOS MICRO-ORGANISMOS *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* E *Candida albicans*

AMOSTRA		CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (µg/mL)			
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
FOLHA	EX ETANÓLICO BRUTO	125	250	62,5	250
	FR HEXANO	125	250	62,5	125
	FR CLOROFÓRMIO	125	250	62,5	125
	FR ACETATO DE ETILA	125	250	62,5	125
	FR HIDROALCOÓLICA	125	250	62,5	125
CAULE	EX ETANÓLICO BRUTO	125	250	125	125
	FR HEXANO	125	250	125	125
	FR CLOROFÓRMIO	125	250	125	125
	FR ACETATO DE ETILA	125	250	125	125
	FR HIDROALCOÓLICA	125	500	125	62,5

NOTA: EX = Extrato; FR = Fração

Foi verificado que o extrato etanólico bruto e as frações de folha foram bastante ativos frente à bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, obtendo valores de CIM de 62,5 µg/mL. Esse resultado é considerado satisfatório, segundo a classificação adotada em que resultados acima de 1000 µg/mL indicam ausência da inibição do crescimento bacteriano, resultados entre 1000-500 µg/mL indicam atividade fraca, resultados entre 100-500 µg/mL revelam atividade moderada e abaixo de 100 µg/mL considera-se uma boa atividade antibacteriana (HOLETZ *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Carmeli *et al.* (1999) demonstraram que *P. aeruginosa* é a principal causa de infecções hospitalares entre os bacilos gram-negativos não fermentadores de glicose. Outra importância significativa é a relativa resistência frente a antibióticos e a suscetibilidade diminuída aos desinfetantes e antissépticos que esta bactéria apresenta (GOMEZ *et al.*, 1998).

A literatura relata que o extrato etanólico de *Z. fagara* (L.) Sarg. demonstrou atividade antibacteriana frente às bactérias gram-positivas, e pouca atividade contra as gram-negativas como *P. aeruginosa* (MACIAS; COY; CUCA, 2010). Neste estudo esse resultado não se manteve, visto que o melhor resultado obtido foi para *P. aeruginosa*, e tanto gram-positivas como gram-negativas obtiveram resultados de inibição no mínimo moderados.

Outra fração que obteve um resultado importante foi a hidroalcoólica de caule com CIM de 62,5 µg/mL frente a *Candida albicans*. Essa fração, dentre as demais,

foi a que apresentou o melhor resultado de inibição para a levedura. Nas demais frações, o resultado foi considerado moderado na inibição de *C. albicans*.

As bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* foram sensíveis aos extratos e às frações de folha e caule de *Z. rhoifolium*, e estes apresentaram atividade moderada aos demais micro-organismos. Esse dado é muito parecido com o obtido para a espécie *Z. alatum* Roxb. (NEGI *et al.*, 2012).

A atividade antimicrobiana do gênero demonstrada em relação a *E. coli*, pode ser devida à presença de metabólitos como o alcaloide benzofenantridínico di-hidroqueleritrina (16). Estudo realizado com o metabólito isolado de caule de *Z. rhetsa* DC. comprovou atividade satisfatória na concentração de 16 µg/mL quando testado em *E. coli* (TANTAPAKUL *et al.*, 2012). A presença desse alcaloide já foi demonstrada em *Z. rhoifolium* e outras espécies do gênero (ZANON, 2010).

Nenhum dos extratos e frações demonstrou ausência de inibição e os dados encontrados nesta investigação e as informações da literatura indicam que a espécie e o gênero possuem significativa atividade antimicrobiana.

4.3.2 Avaliação da toxicidade a *Artemia salina*

O teste de toxicidade com o microcrustáceo *Artemia salina* foi realizado por se tratar de uma análise rápida, acessível, confiável e de baixo custo. Os ovos são facilmente encontrados à venda em lojas especializadas em aquários, pois servem de alimentos para peixes e têm boa durabilidade.

Os resultados do índice de mortalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* estão expressos na TABELA 9.

TABELA 9 - MORTALIDADE E ÍNDICE DE MORTALIDADE DE *Artemia salina* AVALIADOS FRENTE AO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E ÀS RESPECTIVAS FRAÇÕES HEXANO, CLOROFÓRMIO, ACETATO DE ETILA E HIDROALCOÓLICA DE FOLHA E CAULÉ DE *Zanthoxylum rhoifolium* LAM., RUTACEAE

AMOSTRA		MORTALIDADE/ CONCENTRAÇÃO (µg/mL)			DL ₅₀ (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (µg/mL)
		10	100	1000		
FRAÇÃO						
FOLHA	EX ETANÓLICO BRUTO	1	3	2	-	-
	FR HEXANO	0	2	3	-	-
	FR CLOROFÓRMIO	2	0	6	-	-
	FR ACETATO DE ETILA	0	1	4	-	-
	FR HIDROALCOÓLICA	1	1	2	-	-
CAULÉ	EX ETANÓLICO BRUTO	1	5	8	-	-
	FR HEXANO	9	14	16	-	-
	FR CLOROFÓRMIO	1	5	9	-	-
	FR ACETATO DE ETILA	0	0	1	-	-
	FR HIDROALCOÓLICA	1	0	2	-	-
CONTROLE	QUINIDINA	3	26	85	177,38	136,9 – 229,9
	METANOL	0	0	0	-	-

NOTA: EX = Extrato; FR = Fração

A quinidina utilizada como controle positivo apresentou uma DL₅₀ de 177,38 µg/mL com intervalo de confiança de 95% (136,9 – 229,9), mostrando ser bastante tóxica. O controle do solvente foi atóxico, não interferindo nos resultados da análise.

Observando os dados é possível perceber que nenhuma das amostras se mostrou tóxica ao microcrustáceo *Artemia salina*, pois todas apresentaram resultado de DL₅₀ superior a 1000 µg/mL, concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa segundo Meyer *et al.* (1982).

Esse resultado não era o esperado, pois estudos realizados com plantas do gênero demonstraram toxicidade frente ao microcrustáceo, como é o caso de *Z. budrunga*, *Z. leprieurii*, *Z. rhetsa* DC. e *Z. setulosum* P. Wilson (AHSAN *et al.*, 2000; ISLAM *et al.*, 2001; BOEHME *et al.*, 2008; NGOUMFO *et al.*, 2010).

Vários trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, virucida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida (MEYER *et al.*, 1982).

Em estudos realizados com *Z. rhoifolium* foi demonstrada atividade tóxica, como é o caso do estudo realizado por Silva, Figueiredo e Yano (2007a, b), em que

o óleo extraído das folhas demonstrou um potencial quimioterápico, antimicrobiano e antimalárico. Outro estudo realizado com o óleo extraído do fruto revelou atividade inseticida e antifúngica (PRIETO *et al.*, 2011) e a investigação do potencial antimicrobiano relatado neste trabalho demonstrou resultado positivo de atividade antibacteriana nos extratos e nas frações de folha e caule da espécie.

O resultado negativo para esse teste de toxicidade pode ter ocorrido devido a variações sazonais, geográficas ou nutricionais da planta.

4.3.3 Avaliação da atividade hemolítica

Foram testados nesse ensaio os extratos brutos e as frações de folha e caule de *Z. rhoifolium*. Apenas as frações hidroalcoólica de folha na concentração de 1 mg/mL e hidroalcoólica de caule nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL apresentaram resultado positivo para hemólise.

Saponinas hemolíticas quando presentes em amostras sanguíneas produzem mudanças na membrana do eritrócito, causando a difusão da hemoglobina no meio. Sendo assim, esse teste pode ser utilizado como confirmatório do teste preliminar realizado no ensaio sistemático em fitoquímica para saponinas, onde foi obtido resultado positivo em folha e caule da espécie (WHO, 1998; MANETTI *et al.*, 2010).

Relatos da literatura revelam uma diversidade de usos de saponinas com efeito biológico benéfico. Dentre eles, pode ser citado um estudo que demonstrou o poder das saponinas como barreira química nas plantas para proteção de ataque de fungos patogênicos (BOWYER *et al.*, 1995). Outro estudo revelou que um adjuvante de saponina obteve um resultado positivo, quando utilizado junto com vacinas anti-HIV, aumentando a resposta mediada por células imunitárias (WU *et al.*, 1992).

O teste de hemólise é utilizado como ensaio toxicológico em extratos de organismos marinhos (DRESCH *et al.*, 2005), investigação de hemolisinas em microorganismos (ANDRADE; SUASSUNA, 1988) e pesquisa de capacidade hemolítica para cepas de *Candida* (RÖRIG; COLACITE; ABEGG, 2009). A avaliação da atividade hemolítica também está presente no Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da Anvisa (ANVISA, 2003), mostrando-se um ensaio de ampla aplicação.

O resultado de hemólise positivo justifica mais pesquisas no isolamento e na identificação de saponinas hemolíticas desta espécie como medicamentos ou outros produtos para uso humano e animal.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Zanthoxylum rhoifolium Lam., apresenta características morfológicas e anatômicas que concordam com a família Rutaceae. A morfologia externa, cutícula e o tipo dos tricomas são as características que se apresentaram mais relevantes na identificação e diferenciação da espécie de estudo. As descrições e ilustrações de folha e caule deste trabalho podem contribuir para a identificação dessa planta. Quanto à anatomia, foi encontrada folha com tricomas tectores unicelulares e pluricelulares, estômatos actinocíticos na face abaxial, cavidades secretoras, células contendo compostos fenólicos, cristais de oxalato de cálcio e um único feixe vascular colateral na nervura central no pecíolo no peciólulo e na raque. Embora esses aspectos sejam comuns ao gênero, possuem fácil reconhecimento microscópico e quando considerados em conjunto, favorecem o controle farmacognóstico de uma potencial droga vegetal.

No ensaio sistemático em fitoquímica detectaram-se flavonoides, alcaloides e esteroides e/ou triterpenoides nas frações acetato de etila, clorofórmio e hexano, respectivamente, enquanto que antocianidinas e saponinas foram detectadas no extrato aquoso tanto de folha como de caule, e taninos apenas em folha. Foram isolados e identificados dois compostos no presente estudo. Os compostos são a hesperidina e a vitexina, que são flavonoides bem conhecidos do gênero. Na atividade antioxidante pelo método de formação do complexo fosfomolibdênio, as frações hexano de folha e clorofórmio de caule foram as mais ativas, e no método TBARS a fração hexano de folha e o extrato bruto de caule apresentaram os melhores resultados. Na atividade antimicrobiana, as maiores atividades encontradas foram do extrato etanólico bruto e das frações de folha frente a *Pseudomonas aeruginosa*, e a fração hidroalcoólica de caule frente a *Candida albicans*. As bactérias *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* demonstraram ser sensíveis aos extratos e às frações de folha e caule de *Z. rhoifolium* e sua atividade foi considerada moderada. No teste de toxicidade a *Artemia salina*, os extratos e as frações apresentaram resultados negativos frente ao microcrustáceo. Na avaliação da atividade hemolítica, foi observado que apenas a fração hidroalcoólica de folha e caule foi positiva para hemólise, podendo o teste ser utilizado como confirmatório da presença de saponinas hemolíticas. Os resultados inéditos obtidos com relação à espécie são promissores e favorecem a perspectiva

da continuidade desses estudos, objetivando-se a identificação de outros compostos e realização das atividades biológicas das substâncias isoladas.

REFERÊNCIAS

AFIFI, F. U.; SHERVINGTON, A.; DARWISH, R. Phytochemical and biological evaluation of *Arum palaestinum*. **Acta Technologiae et Legis Medicamenti**, Parma, v. 8, n. 2, p.105-111, 1997.

AGAREZ, F. V.; RIZZINI, C. M.; PEREIRA, C. **Botânica taxonomia, morfologia e reprodução dos angiospermae**: chaves para determinação das famílias. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1994. p. 206.

AHSAN, M.; ZAMAN, T. A.; HASAN, C. M.; ITO, C.; ISLAM, S. K. N. Constituents and cytotoxicity of *Zanthoxylum rhesta* stem bark. **Fitoterapia**, Milano, v. 71, n. 6, p. 697-700, 2000.

AMBROSIM, A. R. P. **Estudo fitoquímico de plantas das famílias Rutaceae e Meliaceae visando o isolamento de substâncias protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos e antileishmanioses**. 261 f. Dissertação (Doutorado em Química), Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

ANDRADE, J. R. C.; SUASSUNA, I. Atividades citotóxica e hemolítica em *Escherichia coli* uropatogênicas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 2, p. 193-199, 1988.

ANVISA. **Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos**, Brasília, 2003. p. 23.

APG III - THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 161, p. 105-121, 2009.

BAILEY, A. E. **Bailey's industrial oil and fat products**. 5. ed. New York: John Wiley, 1996. v. 3.

BANDONI, A. L.; RETTA, D.; LIRA, P. M. D. L.; BAREN, C. M. Son realmente útiles los aceites esenciales? **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Talca, v. 8, n. 5, p. 317-322, 2009.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991. p. 251-309.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v. 1.

BERK, L. Systemic pilocarpine for treatment of xerostomia. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, Silver Spring, v. 4, p. 1333-1340, 2008.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J. C.; ESTERRE, P. H.; DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 98, p. 45–54, 2005.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOEHME, A. K.; NOLETTO, J. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Bioactivity and chemical composition of the leaf essential oils of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum setulosum* from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, Oxon, v. 22, n. 1, 2008.

BOWYER, P.; CLARKE, B. R.; LUNNESS, P.; DANIELS, M. J.; OSBOURN, A. E. Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. **Science**, New York, v. 267, n. 5196, p. 371-374, 1995.

BRAGA, T. V.; OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES, R. G. R.; NAGEM, T. J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 287-290, 2007.

BRUNETON, J. **Farmacognosia: fitoquímica y plantas medicinales**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 2001. p. 283, 885.

CACCIONI, D.; GUIZZARDI, M.; BIONDI, D.; RENDA, A.; RUBERTO, G. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 1-2, p. 73-79, 1998.

CARDOZO, M. A. R. **Metabólitos especiais isolados dos galhos e folhas de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr. (Leguminosae) e das flores de *Laseguea erecta* Mull. Arg. (Apocynaceae)**. 112 f. Dissertação (Especialização em Química Orgânica) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

CARMELI, Y.; TROILLEY, N.; ELIOPOULOS, G. M.; SAMORE, M. H. Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, p. 1379-1382, 1999.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae**. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

CHIBA, H.; UEHARA, M.; WU, J.; WANG, X.; MASUYAMA, R.; SUZUKI, K.; KANAZAWA, K.; ISHIMI, Y. Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 133, p. 1892-1897, 2003.

CHUNG, Y. C.; CHIEN, C. T.; TENG, K.; CHOU, S. Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & Zucc. **Food Chemistry**, Reading, v. 97, n. 3, p. 418-425, 2006.

COFFIGNY, M. R. A.; LARIONOVA, M.; RODRÍGUEZ, S. S.; MONTALBÁN, G. A. Evaluación de la actividad antiulcerosa del 2"-o-ramnosil 4"-o -metil-vitexina de las hojas de *Piper ossanum*. **Revista Cubana de Medicina Militar**, Havana, v. 29, n. 2, p. 114-117, 2000.

CORRÊA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, v. 2, p. 33, 1931. In REITZ, P. R.; COWAN R. S.; SMITH L. B.; KLEIN, R. M. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 3, 1973.

COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R.; BRITO, S. A.; PEREIRA, C. K. B.; SOUZA, E. O. RODRIGUES, F. F. G. Biological screening of Araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. **Pharmacognosy Magazine**, Bangalore, v. 6, n. 24, p. 331-334, 2010.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p. 815-817.

CUCA, S. L. E.; TABORDA, M. M. E. Isolated metabolites from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Revista Colombiana de Química**, Bogotá, v. 36, p. 5-11, 2007.

CUTLER, D. F.; BOTHA, T.; STEVENSON, D. W. **Anatomia vegetal: uma abordagem aplicada**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

DRESCH, R. R.; HAESER, A. S.; LERNER, C.; MOTHES, B.; VOZÁRI-HAMPE, M. M.; HENRIQUES, A. T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (*Porifera*) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 15, n.1, p. 16-22, 2005.

DUKE, J. A. **Handbook of biologically active phytochemicals and their activities**. Boca Raton: CRC Press, 1992. p. 101.

EVANS, W. C. **Trease y Evans farmacognosy**. 13. ed. México: McGraw-Hill, 1991.

FAINI, C. L. F.; LABBÉ, C.; COLL, J. Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. **Biochemical Systematic Sand Ecology**, Oxford, v. 27, p. 673-679, 1999.

FB 5 – Farmacopeia Brasileira. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v. 1, p. 198.

FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 42-46, 2000.

FERRONATO, R. **Análise química e antimicrobiana do óleo essencial de *Helietta apiculata* Benth. (Rutaceae)**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Comunitária Regional de Chapecó, Chapecó, 2010.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University, 1956.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales: el dioscórides renovado**. Barcelona: Ediciones Península, 2001. p. 426.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. Princeton: D. Van Nostrand, 1949.

FURR, M.; MAHLBERG P. G.; Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. **Journal of Natural Products**, Lafayette, v. 44, p. 153-159, 1981.

GALLO, M. B. C.; SARACHINE, M. J. Biological activities of lupeol. **International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science**, Takamatsu, v. 3, n. 1, p. 46-66, 2009.

GODOWSKI, K. C. Antimicrobial activity of sanguinarine. **Journal of Clinical Dentistry**, Yardley, v. 1, p. 96-101, 1989.

GOMEZ, L. C.; MATIA, E. C.; CUIEL, A. G.; DIAZ, J. P. Infecciones por *Pseudomonas* spp. **Medicine**, Buenos Aires, v. 7, n. 78, p. 3629-3633, 1998.

GONZAGA, W. A.; WEBER, A. D.; GIACOMELLI, S. R.; SIMIONATTO, E.; DALCOL, I. I.; DESSOY, C. M.; MOREL, A. F. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, p. 773-774, 2003a.

GONZAGA, W. A.; MOREL, F. N.; BURROW, R. A.; MOSSMER-MAICHLE, C. Antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 4, p. 371-374, 2003b.

HICKEY, L. J. Clasificación de la arquitectura de las hojas de dicotiledoneas. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, Buenos Aires, v. 16, n. 1-2, p. 1-26, 1974.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

IAUK, L.; MANGANO, A. R.; RAGUSA, S.; MAIOLINO, R. M.; CONSTANZO, R.; SERRA, A.; SPECIALE, A. Protection against murine endotoxemia by treatment with *Ruta chalepensis* L., a plant with anti-inflammatory properties. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 90, p. 267-272, 2004.

ISLAM, A.; SAYEED, A.; BHUIYAN, M. S. A.; MOSADDIK, M. A.; ISLAM, M. A. U.; KHAN G. R. M. A. M., Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Zanthoxylum budrunga*. **Fitoterapia**, Milano, v. 72, p. 428-430, 2001.

IVANOVA, A.; MIKHOVA, B.; NAJDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; KOSTOVA, I. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Ruta graveolens*. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, p. 344-347, 2005.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, 1940.

JOLY, A. B. **Botânica**: Introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Nacional, 1998. p. 407.

JULLIAN, V.; BOURDY, D.; GEORGES, S.; MAUREL, S.; SAUVAIN, M. Validation of use of a traditional antimalarial remedy from French Guiana, *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 106, p. 348–352, 2006.

KIM, H. K.; JEONG, T. S.; LEE, M. K.; PARK, Y. B.; CHOI, M. S. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. **Clinica Chimica Acta**, Gent, v. 327, p. 129-137, 2003.

KIM, J. H.; LEE, B. C.; KIM, J. H.; SIM, G. S.; LEE, D. H.; LEE, K. E.; YUN, Y. P.; PYO, H. B. The isolation and antioxidative effects of vitexin from *Acer palmatum*. **Archives of Pharmacal Research**, Seoul, v. 28, n. 2, p. 195-202, 2005.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Edur, 1997.

LADINO, O. J. P.; RODRIGUEZ, J. A. P.; MORENO, J. M. L.; SARMIENTO, L. L.; SUÁREZ, L. E. C. Propiedades antibacterianas *in vitro* de metabolitos secundarios aislados de dos especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae). **Revista Cubana de Farmacia**, Havana, v. 45, n. 3, p. 431-438, 2011.

LEVIN, D. A. Alkaloids-bearing plants: ecogeographic perspective. **American Naturalist**, Chicago, v. 110, p. 261-284, 1976.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 1, p. 327.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, 1970.

MACIAS, V. E. V.; COY, E. D. B.; CUCA, L. E. Novel furocarbazole alkaloids and antibacterial activity of ethanol extract from *Zanthoxylum fagara* (L.) Sargent. **Revista Colombiana de Química**, Bogotá, v. 39, n. 3, 2010.

MANETTI, L. M.; TURRA, A. F.; TAKEMURA, O. S.; LAVERDE JR, A. Avaliação da atividade hemolítica de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae) Arquivos de Ciência da Saúde da UNIPAR, Umuarama, v. 14, n. 1, p. 43-47, 2010.

MATTHAUS, B.; ÖZCAN, M. M. Chemical evaluation of *Citrus* seeds, an agro-industrial waste, as a new potential source of vegetable oils. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 63, n. 3. p. 313-320, 2012.

MATU, E. N.; STADEN, J. V. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 87, p. 35-41, 2003.

MELO, M. F. F.; ZICKEL, C. S. Os gêneros *Zanthoxylum* L. e *Esenbeckia* Kunth (Rutaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 18, n. 1, p. 73-90, 2004.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 127-130, 2001.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons: leaves, stems, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford, Clarendon Press, 1950. p. 305-317.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 45, p. 31-34, 1982.

MOCCELINI, S. K.; SILVA, V. C.; NDIAYE, E. A.; SOUSA, P. T.; VIEIRA, P. C. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd. (Rutaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 131-133, 2009.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JUNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. S.; RONDINA, D.; CARDOSO, J. H. L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

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

MOURA, N. F.; RIBEIRO, H. B.; MACHADO, E. C. S.; ETHUR, E. M., ZANATTA, N.; MOREL, A. F. Benzophenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Phytochemistry**, Nantes, v. 46, n. 8, p. 1443-1446, 1997.

MUNIR, M.; KHAN, M. A.; AHMED, M.; BANO, A.; AHMED, S. N.; TARIQ, K.; TABASSUM, S.; MUKHTAR, T.; AMBREEN, M.; BASHIR, S. Foliar epidermal anatomy of some ethnobotanically important species of wild edible fruits of northern Pakistan. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 5, n. 24, p. 5873-5880, 2011.

NAMIKI, M. Antioxidants/ Antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 29, p. 273, 1990.

NEGI, R.; NEGI, Y. K.; UNİYAL, V.; SAXENA, S.; BISHT, S. Phytochemical analysis and antibacterial activity of three indigenous plants of Garhwal Himalaya against some pathogenic microorganisms. **Journal of Pharmacy Research**, Kharar, v. 5, n. 3, p. 1583-1586, 2012.

NGANE, A. N.; BIYITI, L.; AMVAM, P. H.; BOUCHET, P. Evaluation of antifungal activity of extracts of two Cameroonian Rutaceae: *Zanthoxylum leprieurii* Guill. et Perr. and *Zanthoxylum xanthoxyloides* Waterm. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 70, p. 335-342, 2000.

NGASSOUM, M. B.; ESSIA-NGANG, J. J.; TATSADJIEU, L. N.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; ADJOUJDI, O. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, p. 284-287, 2003.

NGOUMFO, R. M.; JOUDA, J. B.; MOUAFO, F. T.; KOMGUEM, J.; MBAZOA, C. D.; SHIAO, T. C.; CHOUDHARY, M. I.; LAATSCH, H.; LEGAULT, J.; PICHETTE, A.; ROY, R. *In vitro* cytotoxic activity of isolated acridones alkaloids from *Zanthoxylum lepreurii* Guill. et Perr. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 18, p. 3601-3605, 2010.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, Vienna, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OGUNDIPE, O. Leaf anatomical studies on eleven species of *Zanthoxylum* Linn. (Rutaceae). **Phytomorphology**, Hyderabad, v. 52, p. 103-112, 2002.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998. p. 2.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1991.

PARIS, M. R.; MOYSE-MIGNON, M. H. Recherches sur les *Fagara* Africains. III- Etude du *Fagara macrophylla* Engler. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, Paris, v. 9, p. 479-492, 1951.

PARIS, M. R.; MOYSE-MIGNON, M. H. Etude préliminaire du *Fagara xanthoxyloides* Lam. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, Paris, v. 5, p. 410-419, 1947.

PENELUC, T.; DOMINGUES, L. F.; ALMEIDA, G. N.; AYRES, M. C. C.; MOREIRA, E. L. T.; CRUZ, A. C. F.; BITTENCOURT, T. C. B. S. C. Atividade anti-helmíntica do extrato aquoso das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae), **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 18, supl. 1, p. 43-48, 2009.

PEREIRA, S. S.; LOPES, L. S.; MARQUES, R. B.; FIGUEIREDO, K. A.; COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. C. R. Antinociceptive effect of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) in models of acute pain in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 129, p. 227-231, 2010.

PIRANI, J. R. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rutaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 56, n. 86, p. 189-204, 2005.

PRABHAKAR, M. C.; BANO, H.; KUMAR, I.; SHAMSI, M. A.; KHAN, S. Y. Pharmacological Investigations on Vitexin. **Planta Medica**, v. 43, n. 12, p. 396-440, 1981.

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**, New York, v. 269, p. 337-341, 1999.

PRIETO, J. A.; PATIÑO, O. J.; DELGADO, W. A.; MORENO, J. P.; CUCA, L. E. Chemical composition, insecticidal, and antifungal activities of fruit essential oils of three Colombian *Zanthoxylum* species. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillán, v. 71, n. 1, p. 73-82, 2011.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

REITZ, P. R.; COWAN, R. S.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1973. p. 3-12.

RODRIGUES, E.; MENDES, F. R.; NEGRI, G. Plants indicated by Brazilian indians for disturbances of the central nervous system: A bibliographical survey. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 6, p. 211-244, 2006.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1972.

ROGI, T.; TOMIMORI, N.; ONO, T.; KISO, Y.; The mechanism underlying the synergetic hypocholesterolemic effect of sesamin and α -tocopherol in rats fed a high-cholesterol diet. **Journal of Pharmacological Science**, Sendai, v. 115, p. 408-416, 2011.

RÖRIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 2, p. 225-227, 2009.

RUIZ, C. M.; SÁNCHEZ, M. G.; MARTÍN, S. M. M.; LARIONOVA, M.; PERNAS, C. S.; LUGONES, M. M.; ALCORTA, V. R. Evaluación antiinflamatoria del flavonoide 2"-o-ramnosil 4"-o- metil vitexina en ratas. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Havana, v. 9, n. 1, p. 0, 2004.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College, 1951.

SAWAYA, A. C. H. F.; VAZ, B. G.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA, P. Screening species of *Pilocarpus* (Rutaceae) as sources of pilocarpine and other imidazole alkaloids. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Witzzenhausen, v. 58, n. 3, p. 471-480, 2011.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-102, 1999.

SILVA, S. L.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 37, p. 281-286, 2007a.

SILVA, S. L.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 576, p. 180-188, 2007b.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2004. p. 199-222.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2010. p. 765-884.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p. 422-485.

SUN, X. W.; DUAN, Z. X. Progress in the studies on medicinal plants of the genus *Zanthoxylum* Linn. Acta Pharmaceutica Sinica, Shangai. In: MORA, S.; CASTRO, V.; POVEDA, L.; CHAVARRÍA, M.; MURILLO, R. Chemical constituents from *Zanthoxylum setulosum* (Rutaceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v.10, n. 2, p. 155-158, 2011.

SUZART, L. R. **Considerações sobre os gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia*, estudo químico das duas espécies de *Ochnaceae*: *Ouratea hexasperma* St. Hil e *Ouratea cuspidata* St. Hil e atividades biológicas**. 187 f. Tese (Pós graduação em Química Orgânica) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.

TABORDA, M. E.; SUAREZ, L. E. C. Um nuevo alcaloide carbazólico de *Zanthoxylum rhoifolium*. **Scientia et Technica**, Pereira, v. 13, n. 33, p. 191-192, 2007.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TANTAPAKUL, C.; PHAKHODEE, W.; RITTHIWIGROM, T.; YOSSATHERA, K.; EACHATHAI, S.; LAPHOOKHIEO, S. Antibacterial compounds from *Zanthoxylum rhetsa*. **Archives of Pharmacal Reserch**, Seoul, v. 35, n. 7, p. 1139-1142, 2012.

TATSADJIEU, L. N.; NGANG, J. J. E.; NGASSOUM, M. B.; ETOA, F. X. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopia aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. **Fitoterapia**, Milano, v. 74, p. 469–472, 2003.

TEWARY, D. K.; BHARDWAJ, A.; SHANKER, A. Pesticidal activities in five medicinal plants collected from mid hills of western Himalayas. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 22, p. 241–247, 2005.

VINUEZA, J. C.; FARIA, J. B.; CÉSAR, T. B. Hesperidina diminui o colesterol sanguíneo de ratos alimentados com gordura saturada. **Alimento e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 473-479, 2008.

VON POSER, G. L.; GOSMANN, G.; CAMARGO, S. A. Flavonoides de *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae). **Ciência e Cultura**, v. 41, supl.7, p.487, 1989.

WEBER, A. D. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Zanthoxylum rhoifolium***. 138 f. Dissertação, (Mestrado em Química) – Setor de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

WHO, **Quality control methods for medicinal plant material**. WHO Library Cataloguing in Publication Data, London, 1998, p. 41.

WU, J. Y.; GARDNER, B. H.; MURPHY, C. I.; SEALS, J. R.; KENSIL, C. R.; RECCHIA, J.; BELTZ, G. A.; NEWMAN, G. W.; NEWMAN, M. J. Saponin adjuvant enhancement of antigen-specific immune responses to an experimental HIV-1 vaccine. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 148, n. 5, p. 1519-1525, 1992.

YI, Z.; YU, Y.; LIANG, Y.; ZENG, B. *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its mains flavonoids. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 41, n. 4, p. 597-603, 2008.

YUNES, R. A.; CECHINEL, V. F. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental: In: YUNES R. A.; CALIXTO J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argus, 2001. p. 523.

ZANON, G. **Análise fitoquímica e estudo das atividades antimicrobiana, antioxidante e de inibição da enzima acetilcolinesterase das espécies *Zanthoxylum rhoifolium* e *Zanthoxylum hyemale***. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Química, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2010.

ZHOU, X.; PENG, J.; FAN, G.; WU, Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. **Journal of Chromatography**, Talahassee, v. 1092, p. 216-221, 2005.