

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

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.)
Tiegh., LORANTHACEAE**

CHANA DE MEDEIROS DA SILVA

PORTO ALEGRE, 2014

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

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.)
Tiegh., LORANTHACEAE**

**Tese apresentada por Chana de Medeiros da
Silva para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em
Ciências Farmacêuticas**

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi

PORTO ALEGRE, 2014

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31 de março de 2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Miriam Anders Apel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Rosana de Cássia de Souza Schneider

Universidade de Santa Cruz do Sul

Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini

Universidade de Santa Cruz do Sul

Silva, Chana de Medeiros da
ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Tripodanthus*
acutifolius (Ruiz & Pav.) Tiegh., LORANTHACEAE /
Chana de Medeiros da Silva. -- 2014.
191 f.

Orientador: José Ângelo Silveira Zuanazzi.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. *Tripodanthus acutifolius*. 2. compostos fenólicos. 3. atividade gastroprotetora. 4. atividade antimicrobiana e amebicida. 5. atividade anti-inflamatória, antioxidante e de toxicidade. I. Zuanazzi, José Ângelo Silveira, orient. II. Título.

O presente trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Farmacognosia e Toxicologia; Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos; Histologia Vegetal; Microbiologia; Cromatografia e Biotério da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Análises complementares foram realizadas na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGCF/UFRGS). Análises que envolveram cultura de células foram desenvolvidas no Laboratório de Genética Toxicológica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), em colaboração com a prof. Dra. Dinara Jaqueline Moura. Análises que envolveram a atividade amebicida foram desenvolvidas no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, em colaboração com a prof. Dra. Marilise Brittes Rotte. Também contou com a colaboração da professora Dra Gilsane de Lino von Poser deste programa.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor José Ângelo Silveira Zuanazzi, pelo exemplo, orientação, amizade e, principalmente, pela sua contribuição em minha formação científica;

À Professora Gilsane de Lino von Poser pelo auxílio na parte experimental, disponibilidade, sugestões e discussões;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disponibilidade e pelo saber compartilhado;

Ao CNPq pelo apoio financeiro fornecido;

Aos professores Marisa Teresinha Lopes Putzke, do Departamento de Biologia e Farmácia da Unisc e Sérgio Augusto de Loreto Bordignon, do Centro Universitário La Salle, pelo auxílio na identificação do material vegetal;

À Professora Lisianne Brittes Benitez do Laboratório de Microbiologia da Unisc, pela realização dos testes acerca da atividade antimicrobiana e pelo auxílio na interpretação dos resultados;

À Professora Dinara Jaqueline Moura, do Laboratório de Toxicologia Genética da UFCSPA, pelas análises toxicológicas e pelo auxílio na interpretação dos resultados;

À Professora Marilise Brittes Rotte, do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, pela realização dos ensaios que envolveram a atividade amebicida;

À Professora Rosana Schneider, do Laboratório de Cromatografia da Unisc e sua bolsista Maiara Souza, pelo auxílio nas análises cromatográficas, disponibilidade e discussões;

À FAMÍLIA TRIPODANTHUS, nome carinhosamente dado pelos meus alunos, colegas professores e funcionários técnicos da Unisc, que me auxiliaram nas mais

diferentes tarefas no decorrer deste trabalho. Esta família iniciou pequena, mas ao longo destes 4 anos foi crescendo e se multiplicando. Sendo assim, não poderia deixar de agradecer nominalmente a cada um de vocês que fizeram com que este trabalho se tornasse possível: Juliana Gruner, Ana Maria Nascimento, Ana Paula Rebechi, Camila Schirmann, Adriana Hieger, Eluana Gomes, Jeferson Henn, Kelly Condotta, Camila Melo, Thaís Souza, Jéssica Severo, Thamires Souza, Roberta Orlandi, Laércio Köhnlein, Helen Rosa, Joel Ellwanger, Danieli Soares, Lisianne Benitez e Dinara Moura: NÃO TENHO PALAVRAS PARA AGRADECER TUDO QUE FIZERAM.....

Aos meus colegas professores e funcionários da UNISC e aos meus alunos também, que sempre me incentivaram e apoiaram;

À todos os meus amigos, que longe ou perto, sempre torceram por mim;

Às minhas secretárias Teresinha e Ângela, por cuidarem de tudo em casa e do pequeno Lorenzo com tanto amor e carinho;

À minha Família, meu marido Luciano, que esteve sempre ao meu lado, me incentivando e dando carinho em todos os momentos; meu filho Lorenzo, que enche meu coração de alegria, amor e esperança; e ao Matheus que está para chegar e alegrar ainda mais nosso lar, que souberam aceitar e me esperar sempre que necessário; meu irmão Marlon, pela profunda amizade e carinho dedicados; e a meus pais, Fátima e Luiz, por terem alimentado os meus sonhos com muito amor. Obrigado é muito pouco para agradecer tamanha dedicação.

RESUMO

Tripodanthus acutifolius (Ruiz & Pav.) Tiegh. é uma planta hemiparasita pertencente à família Loranthaceae, conhecida popularmente no Brasil como “Erva-de-passarinho”. É amplamente distribuída na América do Sul, onde ataca uma vasta quantidade de hospedeiros. Até o momento, já foram relatadas importantes atividades biológicas para esta espécie na medicina popular, tais como anti-inflamatória, antimicrobiana, hipotensora, hipoglicêmica, ansiolítica, hemostática, analgésica, antipirética, diurética e antitumoral. Além disso, estudos fitoquímicos indicam a presença de compostos fenólicos, como os flavonoides, taninos, proantocianidinas e catequinas. No entanto, apesar do conhecimento da presença deste parasita em árvores urbanas e considerando seu extenso uso popular, pouco ainda se sabe sobre suas propriedades químicas, biológicas, farmacológicas e toxicológicas. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar os principais metabólitos secundários presentes no extrato aquoso (EA) de *T. acutifolius* e avaliar suas propriedades farmacológicas e toxicológicas, confirmando ou não sua utilização tradicional. As partes aéreas de *T. acutifolius* foram coletadas no município de Santa Cruz do Sul, RS, tendo como hospedeiro a espécie *Ligustrum lucidum* (Oleaceae). O EA foi preparado pela técnica de maceração a frio com exaustão (relação droga solvente: 1:10 v/v). A partir do estudo fitoquímico, foi possível confirmar a presença de catequina, rutina, quercetina e 7-hidroxi-flavona no EA. A atividade anti-inflamatória foi avaliada utilizando o modelo de indução de edema de pata por carragenina em camundongos. No estudo, o tratamento oral com o EA inibiu significativamente o edema na dose de 400 mg/Kg, em 3 e 4 horas após a administração de carragenina. A atividade gastroprotetora foi avaliada em ratos através da indução de lesões gástricas por etanol absoluto. Foi observado uma redução de 74,51% das ulcerações na dose de 400 mg/kg, bem como ausência de focos hemorrágicos e aumento da proteção das mucosas, quando comparado ao controle negativo. As propriedades citotóxicas, mutagênicas e antioxidantes do EA foram avaliadas em células de *Saccharomyces cerevisiae*, células de mamífero (V79) e frente à *Artemia salina*. Em *S. cerevisiae* o EA promoveu efeito citotóxico nas concentrações mais altas e apesar da ausência de efeitos citotóxicos frente à *A. salina*, um efeito citotóxico e genotóxico também foi observado em células V79 em concentrações superiores a 250 µg/mL. Entretanto, foi possível observar que o EA

não apresentou atividade mutagênica nas concentrações testadas, além de apresentar atividade antioxidante no teste in vitro do sequestro do radical DPPH•. A atividade antimicrobiana do EA foi avaliada contra diversas bactérias gram-positivas e negativas e contra o protozoário oportunista *Acanthamoeba castellanii*. Os resultados mostraram que todas as bactérias testadas foram sensíveis ao EA, caracterizando um amplo espectro de atividade antagonista do mesmo. Além disso, a atividade amebicida também apresentou mortalidade contra os trofozoítos. Assim, conclui-se que extrato testado possui potenciais efeitos anti-inflamatório, antioxidante, gastroprotetor e antimicrobiano, fato que justifica a continuidade dos estudos com esta planta e seu uso na medicina tradicional. Futuros estudos serão necessários para validar cientificamente o uso desta planta como um agente fitoterápico seguro e eficaz no combate a estes transtornos.

Palavras-chave: *Tripodanthus acutifolius*, anti-inflamatória, antioxidante, gastroprotetora, antimicrobiana, toxicidade.

ABSTRACT

CHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDY OF *Tripodanthus acutifolius* (RUIZ & PAV.) TIEGH., LORANTHACEAE

Tripodanthus acutifolius (Ruiz & Pav.) Tiegh. is an endemic shrub included in the Loranthaceae family, popularly known in Brazil as "Erva-de-passarinho". It is widely distributed in South America, where it grows on large variety of hosts. This plant is widely used in traditional medicine for a range of purposes, such as anti-inflammatory, antimicrobial, hypotensive, hypoglycemic, anxiolytic, hemostatic, analgesic, antipyretic and diuretic. Phytochemical studies of this species indicate the presence of polyphenolic compounds such as flavonoids, tannins, proanthocyanidins and catechins. However, in spite of the knowledge of mistletoe presence in urban trees and considering the extensive popular use of this plant, little is known about its chemical, biological, pharmacological and toxicological properties. Therefore, the purposes of this work was identify and characterize the main secondary metabolites present in *T. acutifolius* aqueous extract (AE) and evaluate their biological, pharmacological and toxicological activities, highlighting or not the popular use of the plant. The aerial parts of the *T. acutifolius* were collected in the city of Santa Cruz do Sul, RS, from the host *Ligustrum lucidum* (Oleaceae). The AE was prepared by static maceration with cold exhaustion (drug-solvent ratio 1:10 w/v). By means of HPLC analysis, catechin, rutin, quercetin and 7-hydroxyflavone were identified in the AE. The anti-inflammatory activity was evaluated in mice using carrageenan-induced paw edema. The inhibition of edema was observed at a dose of 400 mg.kg⁻¹, reducing edema in 3 and 4 hours after administration of carrageenan. The gastroprotective activity was evaluated in rats through acute gastric lesions induced by absolute ethanol. Oral administration of the AE at a dose of 400 mg.kg⁻¹ promoted a 74.51 % reduction in ulceration, resulted in an absence of hemorrhagic areas and increased mucosal protection. The cytotoxic, mutagenic and anti-oxidative properties were tested by eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*, V79 mammalian cells and *Artemia salina*. In *S. cerevisiae* the AE induced cytotoxic effect at the highest tested concentrations. Despite of absence of cytotoxic effects in *A. salina*, a cytotoxic and genotoxic effect also was observed in V79 cells in concentration upper to 250 µg.mL⁻¹. However, the results showed that the AE did not induce forward mutation and

showed antioxidant activity in the test by an *in vitro* DPPH• capture. The antimicrobial activity of the AE was tested against a variety of Gram positive and negative bacteria and against the opportunistic protozoan *Acanthamoeba castellanii*. The results showed that among the bacteria tested 100 % were sensitive to the antimicrobial substances, characterizing a broad spectrum of antagonistic activity of the AE. The amoebicidal activity also showed mortality against trophozoites. The results indicate that the tested extract has potential anti-inflammatory, antioxidant, gastroprotective and antimicrobial effects, justifying the continuation of studies with this plant and your use in traditional medicine. Further study may scientifically validate the use of this plant as a safety herbal medicine agent that could be of great benefit to patients with these disorders.

Key-words: *Tripodanthus acutifolius*, anti-inflammatory, antioxidant, gastroprotective, antimicrobial, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Emissão de radícula e fixação de haustórios de <i>Tripodanthus acutifolius</i> no caule do hospedeiro..... | 32 |
| Figura 2 - Aspecto geral do parasitismo de <i>Tripodanthus acutifolius</i> sobre seu hospedeiro..... | 35 |
| Figura 3 – Características morfológicas das folhas de <i>Tripodanthus acutifolius</i> . | 38 |
| Figura 4 – Fotografia das flores e frutos de <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 38 |
| Figura 5 - Compostos fenólicos identificados em <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 41 |
| Figura 6 – Aspecto geral de <i>Ligustrum lucidum</i> com destaque para os frutos.... | 42 |
| Figura 7 – Exemplos de secoiridoides presentes em <i>Ligustrum lucidum</i> | 43 |
| Figura 8 – Esquema das frações obtidas por CCF e CC a partir do EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 58 |
| Figura 9 - Cromatograma obtido por CLAE do EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> , evidenciando os espectros de alguns compostos obtidos no UV..... | 60 |
| Figura 10 – Perfil cromatográfico obtido por CCD do EAB após fracionamento por CCF..... | 62 |
| Figura 11 – Perfil cromatográfico obtido por CCD da fração 3 da CC 4..... | 63 |
| Figura 12 – Cromatograma obtido por CLAE da fração E 4..... | 63 |
| Figura 13 – Espectro de IV da fração E4..... | 64 |
| Figura 14 – Perfil cromatográfico obtido por CCD das frações 4, 5, 6, 7 e 8 da CC 5..... | 64 |
| Figura 15 - Cromatograma obtido por CLAE da fração E 5 e sobreposição de espectro com a catequina..... | 65 |
| Artigo 1 | |
| Fig. 1 Growth inhibition (mm) of different <i>S. cerevisiae</i> strains exposed to hydrogen peroxide, previously treated for 4 h at 30°C with different concentrations of <i>T. acutifolius</i> aqueous extract..... | 81 |
| Fig. 2. Survival of V79 cells after exposure to <i>Tripodanthus acutifolius</i> aqueous extract after 24h measured by the MTT assay..... | 82 |
| Fig. 3. Induction of DNA strand breaks by piplartine in V79 cells as evaluated by the Comet assay..... | 82 |

| | |
|---|----|
| Fig. 4. Effect <i>Tripodanthus acutifolius</i> in V79 cells exposed for 24h plus oxidant H ₂ O ₂ for 0.5h and evaluated by Comet assay..... | 83 |
| Fig. 5. Effects of <i>Tripodanthus acutifolius</i> aqueous extract on the ROS production induced by H ₂ O ₂ in V79 cell. | 83 |
| Fig. 6. Accumulation of intracellular ROS measured by FACS using the DCF-DA probe..... | 84 |
| Fig. 7. Inhibitory effect of <i>Tripodanthus acutifolius</i> aqueous extract against mouse hind paw edema induced by carrageenan..... | 84 |
| Fig. 8. Damage index in blood cells of mice treated with the <i>Tripodanthus acutifolius</i> aqueous extract..... | 85 |
| Fig. 9. Radical scavenging activities of <i>Tripodanthus acutifolius</i> aqueous extract on DPPH [•] radical..... | 85 |

Artigo 2

| | |
|---|-----|
| Fig. 1. HPLC profiles of the AE of <i>Tripodanthus acutifolius</i> : Catechin, Rutin, Quercetin and 7-Hydroxyflavone..... | 113 |
| Fig. 2. Gastric ulcer indexes of stomachs from rats with ulcers induced by absolute ethanol and treated with the AE of the leaves of <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 114 |
| Fig. 3. Representative macroscopic photographs of stomachs and histological analysis using hematoxylin/eosin and periodic acid Schiff stains for experimental acute gastric ulcers induced by absolute ethanol..... | 115 |
| Fig. 4. Effects of AE from the leaves of <i>Tripodanthus acutifolius</i> on the pH of the stomach after induction of acute gastric damage by absolute ethanol..... | 116 |

Artigo 3

| | |
|---|-----|
| Fig 1. Amoebicidal activity of crude aqueous extract of <i>Tripodanthus acutifolius</i> presented as percentage of mortality of <i>Acanthamoeba castellanii</i> trophozoites..... | 130 |
|---|-----|

Artigo 4

| | |
|--|-----|
| Figura 1 - Folhas de <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 139 |
| Figura 2 - <i>Staphylococcus aureus</i> (045 A) resistente à meticilina inibida pelo extrato aquoso de <i>Tripodanthus acutifolius</i> até 15 mg/mL (A); <i>Staphylococcus</i> | |

| | |
|--|-----|
| <i>aureus</i> (039 A) resistente à metilina inibida pelo extrato aquoso de <i>Tripodanthus acutifolius</i> até 15 mg/mL (B)..... | 144 |
| Figura 3 - <i>Staphylococcus aureus</i> (055 A) resistente à metilina inibida pelo extrato aquoso de <i>Tripodanthus acutifolius</i> (A); <i>Staphylococcus aureus</i> (055 A) resistente à metilina inibida pelo extrato aquoso de <i>Tripodanthus acutifolius</i> até 2,5 mg/mL (B)..... | 145 |
| Figura 4 - <i>Staphylococcus aureus</i> (017 A) sensível à metilina inibida pelo extrato aquoso de <i>Tripodanthus acutifolius</i> (A); <i>Staphylococcus aureus</i> (017 A) sensível à metilina inibida pelo extrato aquoso de <i>Tripodanthus acutifolius</i> até 2,5 mg/mL (B)..... | 145 |
| Figura 5 – <i>Staphylococcus aureus</i> (018 A) sensível à metilina inibida pelo extrato aquoso de <i>Tripodanthus acutifolius</i> até 15 mg/mL (A); <i>Staphylococcus aureus</i> (021 A) sensível à metilina inibida pelo extrato aquoso de <i>Tripodanthus acutifolius</i> até 15 mg/mL (B)..... | 146 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Sistemas de gradientes testados inicialmente para análise cromatográfica do EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> por CLAE..... | 53 |
| Tabela 2 – Novos sistemas de gradientes para análise cromatográfica do EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> por CLAE..... | 53 |
| Tabela 3 - Frações obtidas por CCF a partir do EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 56 |
| Tabela 4 – Frações obtidas da CC 1 da fração acetato de etila do EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 56 |
| Artigo 1 | |
| Table 1. Strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> used in this study..... | 74 |
| Table 2. Induction of mutation in haploid N123 strain of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> after treatment with <i>Tripodanthus acutifolius</i> aqueous extract in the stationary phase in PBS..... | 79 |
| Table 3. Effects of <i>Tripodanthus acutifolius</i> aqueous extract on induced mutagenicity by hydrogen peroxide in haploid N123 strain of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in the stationary phase in PBS..... | 80 |
| Table 4. Brine shrimp lethality bioassay of the <i>Tripodanthus acutifolius</i> aqueous extract..... | 81 |
| Artigo 2 | |
| Table 1. Mobile phase composition during a run..... | 117 |
| Artigo 3 | |
| Table 1: Antibacterial activity and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of <i>Tripodanthus acutifolius</i> aqueous extract..... | 128 |
| Artigo 4 | |
| Tabela 1 - Menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento das | |

| | |
|--|-----|
| bactérias testadas..... | 141 |
| Tabela 2 - Atividade antibacteriana do extrato aquoso de <i>Tripodanthus acutifolius</i> frente aos microrganismos testados..... | 144 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA..... | 19 |
| 2 OBJETIVOS | 25 |
| 2.1 Objetivo Geral | 27 |
| 2.2 Objetivos específicos | 27 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 29 |
| 3.1 Família Loranthaceae..... | 31 |
| 3.2 <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 35 |
| 3.3 <i>Ligustrum lucidum</i> | 41 |
| 4 ANÁLISE QUÍMICA DE <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 45 |
| 4.1 Introdução | 47 |
| 4.2 Parte Experimental..... | 49 |
| 4.2.1 Procedimentos gerais..... | 49 |
| 4.2.2 Material vegetal e obtenção do EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 51 |
| 4.2.3 Desenvolvimento de método analítico por CLAE-DAD para avaliação do EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> e quantificação da catequina | 52 |
| 4.2.3.1 Preparo da amostra e dos padrões testados..... | 54 |
| 4.2.3.2 Análise quantitativa da catequina no EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 54 |
| 4.2.4 Fracionamento e isolamento de compostos presentes no EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 55 |
| 4.2.4.1 Cromatografia em coluna do tipo flash (CCF) | 55 |
| 4.2.4.2 Cromatografia em coluna (CC)..... | 56 |
| 4.3 Resultados e Discussão | 59 |
| 4.3.1 Análise da técnica de extração e rendimento do EAB..... | 59 |
| 4.3.2 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD para avaliação do EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> e quantificação da catequina | 60 |
| 4.3.2.1 Análise quantitativa da catequina no EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 62 |

| | |
|---|-----|
| 4.3.3 Isolamento dos constituintes do EAB de <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 62 |
| 4. 4 Conclusão | 65 |
| 5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE E DA TOXICIDADE DE <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 67 |
| 6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 91 |
| 7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>Tripodanthus acutifolius</i> ... | 119 |
| 8 DISCUSSÃO GERAL | 151 |
| CONCLUSÕES | 161 |
| REFERÊNCIAS..... | 165 |
| ANEXOS | 175 |
| ANEXO A – Cópia da autorização para coleta de <i>Tripodanthus acutifolius</i> | 177 |
| ANEXO B - Exsicata de <i>Tripodanthus acutifolius</i> depositada no Instituto de Ciências Naturais (ICN) da UFRGS..... | 178 |
| ANEXO C – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> ATRAVÉS DO MÉTODO DE DPPH DE <i>Tripodanthus acutifolius</i> (RUIZ & PAV.) TIEGH. EM DIFERENTES HOSPEDEIROS | 179 |
| ANEXO D - Protocolo das atividades anti-inflamatória e genotóxica de <i>Tripodanthus acutifolius</i> aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais | 190 |
| ANEXO E – Protocolo da atividade antiúlcera gástrica de <i>Tripodanthus acutifolius</i> aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais | 191 |

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

As plantas medicinais são reconhecidas como uma importante fonte para obtenção de moléculas bioativas, constituindo uma das mais bem sucedidas estratégias para a descoberta e síntese de novos medicamentos. Apesar de todo o potencial, sua utilização como fonte de pesquisa para a busca de novos compostos, com novos mecanismos de ação, alta seletividade e atividade, ainda é pouco explorada. Das milhares de espécies de plantas existentes no mundo, somente uma pequena parcela tem sido investigada fitoquímica e biologicamente (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; ELISABETSKY; SOUZA, 2004).

Apesar da evolução de áreas como a síntese química de fármacos, as plantas medicinais constituem ainda um valioso arsenal de substâncias, tanto na forma de medicamento natural ou como matéria-prima para a indústria farmacêutica (INTERSIMONE; THOENE; RIERA, 2005). O valor destes remédios folclóricos é reconhecido atualmente pela medicina moderna, ainda mais quando observadas as condições de pobreza e falta de acesso às políticas públicas de saúde de muitas pessoas, que acabam recorrendo unicamente à terapêutica natural para zelar por sua saúde.

No entanto, este uso tradicional baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, “se é vegetal é natural; se não fizer bem, mal não faz”, pode ser considerado perigoso, pois muitas plantas possuem compostos tóxicos, e seu uso indiscriminado pode trazer problemas (OLIVEIRA; AKISUE, 2000). Sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Entre todos os medicamentos comercializados no mundo, cerca de 40% tiveram origem direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, salientando que 78% das drogas antibacterianas e 60% dos medicamentos antitumorais são derivados de produtos naturais (CRUZ, 2005). Das 252 drogas consideradas básicas

e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais.

Os fitoterápicos vêm sendo amplamente utilizados em diversos países. Na África, por exemplo, frente ao alto custo dos fármacos sintéticos, estima-se que 60% dos fármacos com atividades antitumorais e antimicrobianas, já comercializados ou em fase de pesquisa clínica, sejam de origem natural (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). As plantas medicinais desempenham, portanto, papel muito importante na medicina moderna, pois fornecem fármacos extremamente eficazes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química. Neste sentido, a investigação de novos e potenciais fármacos provenientes de plantas torna-se ainda mais exitosa quando apoiada numa base etnofarmacológica aliada ao fato de já haverem significativas correlações entre os efeitos farmacológicos apontados pelo uso popular com evidências científicas.

Dentre estas, encontra-se a espécie *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Tiegh., uma planta hemiparasita pertencente à família Loranthaceae, que vem sendo estudada com base em seus usos na medicina popular. Esta “erva-de-passarinho”, popularmente conhecida no Brasil, pode ser considerada umas das mais agressivas do grupo, principalmente pela diversidade de hospedeiros que afeta e a forma com que se prolifera pelo tronco, galhos e copa (ROTTA, 2004).

Até o momento, já foram relatadas importantes atividades biológicas atribuídas a estas ervas, como anti-inflamatória, analgésica, antipirética, antimicrobiana, antioxidante, hipotensora, diurética, hemostática e antitumoral, o que incita à busca de novas propriedades por meio da avaliação de seus extratos e frações (CRUZ, 1979 apud CORTEZ et al., 1988; FERNÁNDEZ et al., 1998; INTERSIMONE; THOENE; RIERA., 2005; VIEIRA et al., 2005; DAUD; HABIB; RIERA., 2006; SOBERÓN et al., 2010a).

Tendo em vista a ampla distribuição das ervas-de-passarinho, com destaque à espécie *T. acutifolius*, e em razão de suas propriedades farmacológicas já descritas, nota-se a importância da continuação dos estudos químicos e biológicos desta planta na pesquisa de novos alvos terapêuticos, envolvendo o efeito do extrato aquoso bruto de suas folhas.

De acordo com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente Tese de Doutorado foi redigida na forma de capítulos, apresentando uma breve introdução e relevância do tema, bem como os objetivos propostos (capítulos 1 e 2).

O referencial teórico (capítulo 3) inicia-se com um estudo acerca da Família Loranthaceae e do gênero *Tripodanthus*. Em seguida, apresenta-se a espécie estudada, *T. acutifolius*, suas características botânicas, constituintes químicos identificados, com destaque aos compostos fenólicos e propriedades farmacológicas relatadas.

Os capítulos 4 a 7 apresentam os artigos submetidos ou a serem submetidos para publicação, envolvendo o estudo químico e as atividades biológicas avaliadas para o extrato aquoso bruto (EAB) de *T. acutifolius*.

Na discussão geral (capítulo 8), apresenta-se a interpretação dos resultados e suas inter-relações, avaliando o real potencial desta espécie como agente terapêutico. Em seguida, apresenta-se a conclusão do trabalho.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo químico e biológico das folhas de *Tripodanthus acutifolius*, buscando identificar e caracterizar seus principais metabólitos secundários, bem como avaliar suas propriedades farmacológicas e toxicológicas descritas a partir de sua utilização na medicina tradicional.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um método analítico por CLAE-DAD para caracterização do extrato aquoso bruto (EAB) de *Tripodanthus acutifolius*, buscando identificar seus principais metabólitos secundários;
- Avaliar as atividades anti-inflamatória e antioxidante de *Tripodanthus acutifolius*;
- Avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de *Tripodanthus acutifolius*;
- Avaliar a atividade gastroprotetora de *Tripodanthus acutifolius* em ratos Wistar;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de *Tripodanthus acutifolius*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Família Loranthaceae

A família Loranthaceae, classificada na divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida e ordem Santalales, é constituída por espécies de arbustos eretos ou escandentes, incluindo cerca de 940 espécies classificadas em 70 gêneros (NICKRENT et al., 2010; AMICO et al., 2012; Sistema APG III, 2014). Apresentam-se distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, de ambos os hemisférios, com pouca frequência nas regiões temperadas (NORTON; CARPENTER, 1998, RUSSELL; NICKRENT, 2008).

É constituída por arbustos eretos ou escandentes, clorofilados e está entre as maiores famílias que possuem hemiparasitas, atacando uma grande variedade de hospedeiros (RIZZINI, 1968; HARRIS, 1992; TAINTER, 2002). Parasitam arbustos, arvoretas e árvores de ruas, praças, jardins e pomares, ocorrendo também em florestas nativas, de forma equilibrada, possivelmente devido à oferta alimentar às aves pela floresta (ROTTA; ARAUJO; OLIVEIRA, 2006).

As plantas desta família são conhecidas popularmente no Brasil como “Ervas-de-passarinho”, este termo é utilizado porque a maior parte das espécies depende das aves para dispersão de suas sementes (CAZETTA; GALETTI, 2003). As diferentes formas de nomenclatura destas espécies parasitas da família Loranthaceae são genericamente conhecidas como *gui*, *mistletoe* e *muérdago* nos idiomas francês, inglês e espanhol, respectivamente (ROTTA et al., 2005).

Este termo “Erva-de-passarinho” é atribuído a um grupo de plantas hemiparasitas compreendido por quatro famílias, sendo duas delas, Loranthaceae e Viscaceae, de maior importância biológica por atacarem uma variedade de hospedeiros nas árvores urbanas de diversas regiões no mundo (HARRIS, 1992; TAINTER, 2002). Fixam-se nos galhos e troncos da planta hospedeira e são capazes de ocupar toda sua copa, beneficiando-se de suas fontes de crescimento, podendo comprometer todo um programa de arborização (TATTAR, 1978; ROTTA, 2001).

A infestação ocorre através de pássaros que utilizam os frutos para alimentação e, após regurgitação ou defecação, as sementes liberadas aderem-se às plantas hospedeiras por possuírem uma camada de substância mucilaginosa aderente, chamada viscina. Lá germinam emitindo imediatamente radícula que se transforma em raízes especiais (haustórios), que penetram no caule do hospedeiro até atingir o xilema, desenvolvendo uma união complexa com o tecido vascular deste (Figura 1). Desta forma, as aves agem tanto como agentes disseminadores, como facilitadores da germinação desta hemiparasita (BARCIK et al., 2002; CAZETTA; GALETTI, 2003).



Figura 1 - Emissão de radícula (A) e fixação de haustórios de *Tripodanthus acutifolius* no caule do hospedeiro (B)

Fonte: Registro fotográfico da autora.

As ervas-de-passarinho são plantas parasitas que constituem um interessante grupo para diversos estudos, pois são capazes de modificar a estrutura e dinâmica do hospedeiro onde estão inseridas, reduzindo a biomassa e alterando a alocação de recursos da espécie (PRESS; PHOENIX, 2005 apud MOURÃO et al., 2009), além de serem muito utilizadas como curativas na medicina popular de diversos países (SOBERÓN et al., 2010a).

Os hemiparasitas ou semiparasitas são organismos que se utilizam da seiva bruta do hospedeiro para seu desenvolvimento e sobrevivência. Esta seiva fornece-lhes água e sais minerais, não sendo, contudo, completamente dependentes deste hospedeiro, pois possuem clorofila, e, portanto são capazes de realizar fotossíntese e produzir seus próprios compostos orgânicos, podendo mesmo em alguns casos viver sem ele. Além disso, pelo fato de crescerem sobre os galhos de seus

hospedeiros são consideradas plantas epiparasitas. Em função destas características, estas plantas podem se desenvolver independente do contato com o solo, parasitando ramos encontrados em troncos e galhos dos hospedeiros. Estas especificações certamente contribuem para a sua grande capacidade de proliferação tornando-as muito resistentes à erradicação (TATTAR, 1978; ROTTA, 2001; TAINTER, 2002; CALVIN; WILSON, 2006; LEAL; BUJOKAS; BIONDI, 2006).

Entretanto, um dos fatores limitantes do parasitismo das ervas-de-passarinho se dá em relação ao seu hospedeiro, uma vez que são fundamentais os fatores como viabilidade, qualidade e resistência do hospedeiro ao parasita e a preferência do parasita (MARVIER; SMITH, 1997). Deste modo, a germinação e a chance de estabelecimento são dependentes do sucesso da dispersão de sementes em conjunto com a compatibilidade com o hospedeiro (CAZETTA; GALETTI, 2007). Neste sentido, algumas espécies são denominadas de especialistas por apresentarem uma limitação na quantidade de hospedeiros em que parasitam, enquanto existem aquelas que podem associar-se a diferentes espécies de plantas, sendo assim chamadas de generalistas (NORTON; CARPENTER, 1998; ARRUDA; CARVALHO, 2004).

As ervas-de-passarinho apresentam diferenças em relação à aparência das folhas, flores e frutos, na forma de crescimento, quanto ao hábito, e também na maneira como parasitam o hospedeiro. Por este motivo é sugerido denominá-las popularmente, de acordo com as características das folhas e hábito, como elementos que separem/identifiquem as espécies (ROTTA, 2005):

- erva-de-passarinho-da-folha-miúda: *Struthanthus polyrhysus* e *S. uraguensis*
- erva-de-passarinho-da-folha-graúda: *Struthanthus vulgaris*
- erva-de-passarinho-chorão: *Tripodanthus acutifolius*
- erva-de-passarinho-da-folha-comprida: *Phoradendron linearifolium*
- erva-de-passarinho: *Phoradendron piperoides* e *Psittacanthus sp.*

As diversas espécies de ervas-de-passarinho são comumente encontradas em plantas lenhosas, como em árvores de floresta, frutíferas, ornamentais, árvores em ambientes urbanos, em arbustos e cactos (DEVKOTA, 2005). Estas infestações intensas podem comprometer o desenvolvimento da planta hospedeira como um todo, sendo que a infestação em árvores frutíferas leva à perda de qualidade, baixa

produção de frutos e à morte da planta hospedeira; sendo assim, em função destes prejuízos, apresentam uma importância econômica às plantações. Outros efeitos causados pelas ervas-de-passarinho aos seus hospedeiros são o mau funcionamento dos tecidos lenhosos e da produção de galhas, o surgimento de folhagem esparsa e morte do ápice. Em virtude disso, estas espécies infestadas ficam mais predispostas ao ataque por insetos e doenças e mais susceptíveis à seca ou algum outro estresse ambiental adverso, como por exemplo, competição por espaço de crescimento e luz solar, do que indivíduos saudáveis da mesma espécie, podendo causar sua morte prematura. A única forma de controle, sem grandes prejuízos ao hospedeiro, é através da sua poda (VENTURELLI, 1981; CAIRES et al., 2009).

Apesar deste efeito negativo nas espécies parasitadas, estes parasitas também apresentam papel benéfico como fonte de recursos na medicina popular. As plantas pertencentes à família Loranthaceae são consideradas uma rica fonte de substâncias de interesse medicinal. São utilizadas tradicionalmente para o tratamento de diversas doenças como dor de garganta, distúrbios respiratórios, hemostáticos, para promover diurese, diminuir a pressão arterial e a glicemia e combater a aterosclerose, além de apresentarem atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiúlcera e antitumoral (DURAND et al., 1962 apud CORTEZ et al., 1988; NETO et al., 1988; FERNÁNDEZ et al., 1998; INTERSIMONE; THOENE; RIERA, 2005; VIEIRA et al., 2005; SOBERÓN et al., 2010a).

Além de Loranthaceae, estes parasitas distribuem-se pelas famílias Santalaceae, Misodendraceae, Eremolepidaceae e Viscaceae, onde estão incluídas diferentes espécies, infestando uma ou mais espécies de árvores. Aquelas investigadas mais comumente são *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Thiegh., *Struthanthus vulgaris* (Vell.) Mart., *Struthanthus polyrhysus* Mart., *Struthanthus uraguensis* (Hook. & Arn.) G. Don. (Loranthaceae) e *Phoradendron linearifolium* Eichl. (Viscaceae) que apresentam estrutura e padrão de colonização diferentes entre si (ROTTA, 2001).

3.2 *Tripodanthus acutifolius*

O gênero *Tripodanthus* (Eichler) Tiegh. é um pequeno gênero pertencente à família Loranthaceae encontrado na América do Sul, do qual fazem parte cerca de três espécies: *T. acutifolius* (Ruiz & Pav.) Tiegh., *T. flagellaris* (Cham. & Schldl.) Tiegh. e *T. belmirensis* F.J. Roldán & Kuijt. Enquanto *T. acutifolius* possui uma vasta distribuição, sendo encontrada na Argentina, Bolívia, Brasil, Equador, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela, as outras duas possuem uma distribuição mais limitada; *T. flagellaris* é encontrada na Argentina e Uruguai e *T. belmirensis*, somente na Colômbia (AMICO; VIDAL-RUSSEL; NICKRENT, 2007; AMICO et al., 2012; CAIRES; DETTKE, 2014).

Tripodanthus acutifolius (Figura 2), cujas sinonímias são *T. eugenioides* (Kunth) Tiegh., *T. ligustrinus* (Willd. ex Roem. & Schult.) Tiegh., *T. suaveolens* (Kunth) Tiegh., *Loranthus acutifolius* Ruiz & Pav. e *Phrygilanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Eichler (AMICO et al., 2012), distribui-se pelos vários estados brasileiros, podendo ser encontrada nas regiões Nordeste (Bahia, Ceará e Pernambuco), Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) (CAIRES; DETTKE, 2014).

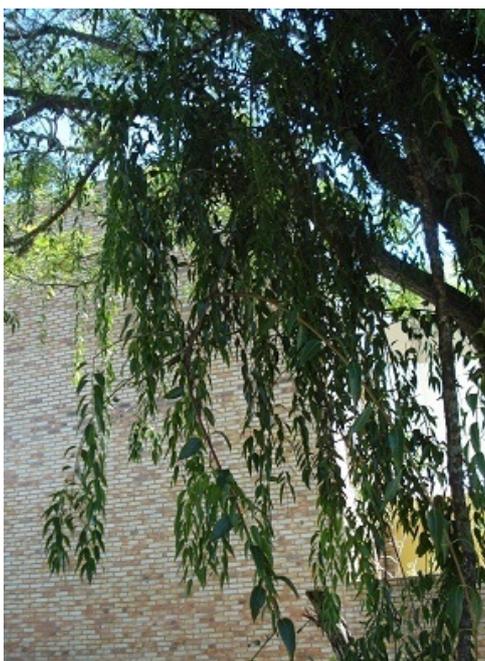


Figura 2 - Aspecto geral do parasitismo de *Tripodanthus acutifolius* sobre seu hospedeiro

Fonte: Registro fotográfico da autora.

Esta planta costuma parasitar espécies arbóreas de Leguminosas, Anacardiáceas, Sapindáceas, Zigoofiláceas, e Rosáceas. No Brasil, a infestação desta erva-de-passarinho é bastante comum na região sudeste, modificando o crescimento de árvores ornamentais dos gêneros *Cupressus*, *Casuarina* e *Ligustrum*, assim como influencia a perda da produção de várias árvores frutíferas, principalmente em espécies de *Citrus* spp. e em *Mangifera indica* L. (LEAL; BUJOKAS; BIONDI, 2006; RICCO et al., 2008). Por apresentar uma diversidade de hospedeiros, infestando tanto árvores nativas como exóticas e pela forma de proliferação que ataca pelo tronco, galhos e copa, *T. acutifolius* pode ser considerada uma das espécies mais agressiva desta família (ROTTA, 2004).

Quanto à seletividade por hospedeiros, *T. acutifolius* parece não ser um parasita específico. No entanto, parasita com maior frequência e de maneira predominante, as árvores de espécies exóticas, mesmo aquelas que, aparentemente, não se configuram como fontes de alimento para as aves, seus principais agentes dispersores (INTERSIMONE; THOENE; RIERA, 2005; ROTTA et al., 2005; RICCO et al., 2008). Em relação a *T. acutifolius*, *Ligustrum lucidum* W. T. Aiton (Oleaceae) é a espécie arbórea mais parasitada, demonstrando haver certa especificidade entre essas espécies (LEAL; BUJOKAS; BIONDI, 2006).

Em um estudo realizado por Rotta et al. (2005) para o reconhecimento prático de espécies de erva-de-passarinho na arborização da cidade de Curitiba, PR, percebeu-se que *T. acutifolius* é a espécie mais comumente encontrada. Sua presença nas copas das árvores é considerada um componente natural do sistema de arborização urbana, servindo como fonte de alimento para aves e também como uma característica de realce visual, já que apresenta um crescimento em forma de ramos longos pendentes, emprestando belo visual à planta hospedeira, confundindo-se com sua estrutura de copa e dando-lhe o aspecto de um chorão. O florescimento intenso com o perfume agradável semelhante ao da planta conhecida como dama-da-noite (*Cestrum noturnum* – Solanaceae) e a grande produção de frutos contribuem, ainda, para a composição deste cenário, do agrado da população urbana.

Esta distribuição destes hemiparasitas em seus hospedeiros pode ser determinada por uma série de fatores, sendo os mais frequentes a especificidade do mesmo, a distância entre hospedeiros, condições ambientais, luminosidade,

arquitetura da planta hospedeira, comportamento alimentar e seleção do habitat pelo agente dispersor (NORTON; CARPENTER, 1998; ARRUDA; CARVALHO; DEL-CLARO, 2006).

Tripodanthus acutifolius é uma planta hemiparasita que possui folhas normais com estômatos e clorofila, metabolizando substâncias orgânicas para seu desenvolvimento, e que tem a capacidade de absorver os elementos minerais da planta hospedeira através de seus haustórios. Esta relação de dependência é considerada um parasitismo unilateral, em que só o hospedeiro sofre os danos (PILLAR, 1994; DAUD; GALLO; RIERA, 2005; ROTTA et al., 2005).

Possui caules nodosos, formados por nós entumecidos, que apresentam-se no formato de cipó, pois ficam pendurados por entre a copa do hospedeiro ou ainda podem se difundir por toda copa até alcançar sua parte superior. A possibilidade de ocupação em árvores vizinhas à sua hospedeira é devido aos galhos poderem atingir um comprimento superior a de 5 metros (TAVARES, 2008).

As folhas de *T. acutifolius* apresentam grande variação quanto ao seu formato e suas dimensões, em função das condições de maior ou menor luminosidade. São simples, em geral opostas, eventualmente verticiladas ou alternas, de consistência membranoso-coriácea, e, quando frescas, são verde-escuras e brilhantes na face adaxial e opacas com muitas pontuações escuras (denominadas de “lenticelas”) na face abaxial, facilitando assim sua identificação (Figura 3). Apresentam flores em cáliculo, hexâmeras, solitárias ou comumente em tríades, com anteras elipsóides e apiculadas, variando da cor amarelo, amarelo-alaranjado, verde-oliva até vermelha, atingindo o comprimento de 1,2 a 1,6 cm. Os frutos são do tipo baga, pequenos e ovóides (Figura 4) (ROTTA et al., 2005; CAIRES et al., 2009).

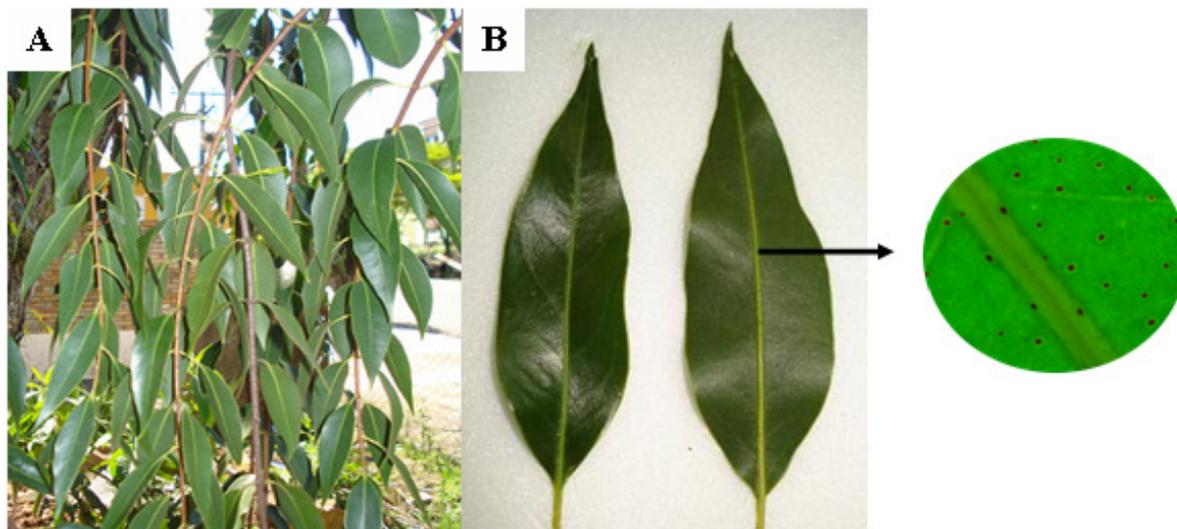


Figura 3 – Características morfológicas das folhas de *Tripodanthus acutifolius*
 Legenda: A) ramos escandentes; B) face adaxial e abaxial foliar, destacando as lenticelas
 Fonte: Registro fotográfico da autora

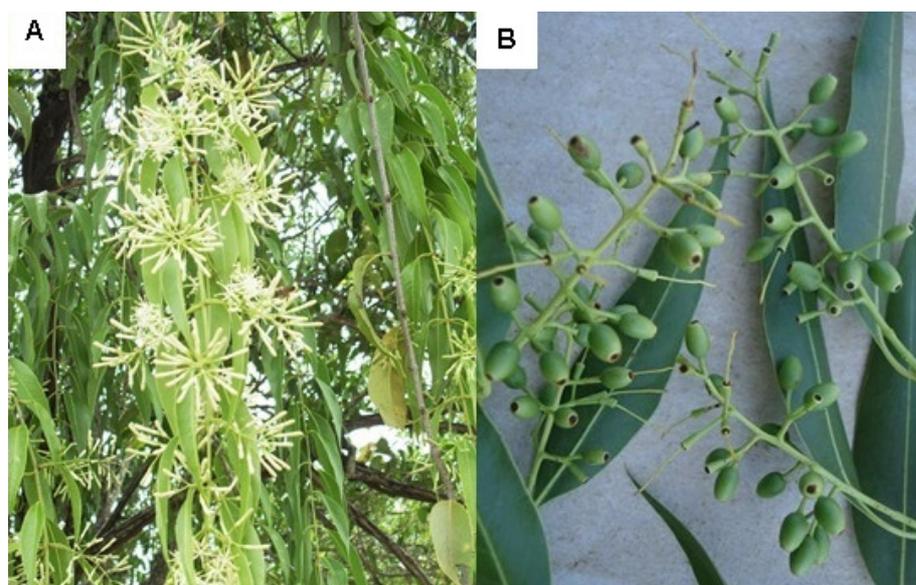


Figura 4 – Fotografia das flores e frutos de *Tripodanthus acutifolius*
 Legenda: A) flores; B) frutos. Fonte: Registro fotográfico da autora.

Esta espécie e outras da mesma família vêm sendo estudadas com base em seus usos na medicina popular. Até o momento, já foram atribuídas importantes atividades biológicas a estas ervas, como anti-inflamatória, analgésica, antipirética, antimicrobiana, antioxidante, hipotensora, diurética, hemostática e antitumoral (FERNÁNDEZ et al., 1998; VIEIRA et al., 2005; DAUD; HABIB, RIERA, 2006; SOBERÓN et al., 2010a).

Em Amaicha del Valle, na Argentina, as flores de *T. acutifolius* são utilizadas como ornamentais nas oferendas do festival de *Corpus Cristie*, sendo muito

utilizadas na medicina popular para diversos tipos de enfermidade, principalmente para infecções respiratórias, regulação da glicemia, como hipotensora e ansiolítica (INTERSIMONE; THOENE; RIERA, 2005).

A maioria dos estudos realizados com a espécie *T. acutifolius* é baseado neste conhecimento popular. No entanto, alguns trabalhos científicos já foram publicados sobre o potencial desta espécie, relatando as atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, antipirética e diurética (DAUD; GALLO; RIERA, 2005; INTERSIMONE; THOENE; RIERA, 2005; DAUD; HABIB; RIERA, 2006; SOBERÓN et al., 2006; SOBERÓN et al., 2007; SOBERÓN et al., 2010a, SOBERÓN et al., 2010b; SOBERÓN, et al., 2010c).

Daud e colaboradores (2005) avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos aquoso e etanólico obtidos das flores de *T. acutifolius* em micro-organismos Gram+ e Gram- de importância médica, e concluíram que o extrato etanólico inibiu o crescimento tanto de bactérias Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus faecalis*), quanto de Gram- (*Serratia marcescens*, *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*). Ressaltam que estes resultados corroboram a crença popular de que as flores desta espécie são eficazes contra infecções respiratórias.

Soberón et al. (2006) em estudo comparativo da atividade antibacteriana das folhas de *T. acutifolius* em três diferentes formas extrativas (infusão, decocção e tintura), concluíram que esta espécie representa fonte interessante como antibiótico, com atividade comparável a de antibióticos comerciais. A tintura da planta mostrou maior atividade antibacteriana em relação à forma de extração aquosa, demonstrando também a importância da forma de extração utilizada, uma vez que a atividade biológica é fortemente afetada pelo solvente e pelo método de extração aplicado.

Em outro estudo realizado por Soberón e colaboradores (2007) sobre a atividade antibacteriana de diferentes plantas utilizadas na medicina popular do noroeste da Argentina, demonstraram mais uma vez que *T. acutifolius* possui esta ação, só que desta vez, o extrato aquoso das folhas, preparado na forma de infusão, teve maior efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano. Analisaram também neste estudo a citotoxicidade dos extratos, concluindo que a infusão desta planta apresenta DL50 alta (1200 µg/mL) evidenciando citotoxicidade baixa.

Intersimone e colaboradores (2005) analisaram os efeitos diuréticos do extrato aquoso e etanólico das flores de *T. acutifolius* em ratos, em duas concentrações diferentes (200 e 400 mg/kg). Através do estudo, comprovaram a ação diurética dos dois extratos, sendo que estes na dose de 200 mg/kg apresentaram um maior poder natriurético em relação à dose de 400 mg/kg.

Daud et al. (2006) testaram a atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética do extrato aquoso e etanólico das flores de *T. acutifolius* em ratos. Os resultados mostraram que o extrato aquoso reduziu significativamente o edema induzido por carragenina dentro de 1 – 5 horas após a administração em todas as doses utilizadas (100, 200 e 400 mg/kg). Foi observado que o extrato aquoso apresentou maior potência anti-inflamatória do que o extrato etanólico e que um número maior de princípios ativos responsáveis pela atividade anti-inflamatória estavam disponíveis neste extrato. O fato de que os compostos presentes no extrato aquoso estavam ativos quando administrados por via oral, indica que eles não sofreram inativação gastrointestinal. É provável que os mecanismos de ação dos componentes deste extrato sejam semelhantes ao de anti-inflamatórios não esteroidais, ou seja, inibição da biossíntese de prostaglandinas.

Estes resultados apoiam o uso tradicional da planta no processo inflamatório, mas o mecanismo exato e os princípios bioativos responsáveis para essas ações precisam ser explicados, sendo necessário aprofundar a investigação nessa área. Quanto à atividade analgésica, observou-se que o mesmo extrato reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste da formalina, também reduziu o estímulo doloroso. Além disso, este reduziu a febre em doses superiores a 200 mg/kg no prazo de 2 horas em hipertermia induzida (DAUD; HABIB; RIERA., 2006).

Soberón et al. (2010a) realizaram a purificação e identificação de compostos fenólicos obtidos a partir da infusão das folhas de *T. acutifolius*, guiados pela atividade antibacteriana dessas substâncias. Concluíram que a ação antibacteriana desta planta seria atribuída parcialmente a quatro glicoflavonoides (rutina, nicotiflorina, hiperosídeo e isoquercetrina) e principalmente ao tripodantosídeo, pelo fato deste estar em uma maior concentração nas folhas. Estes mesmos pesquisadores (SOBERÓN et al., 2010c) ao analisar o efeito anti-inflamatório destes cinco compostos, concluíram que os glicosídeos da quercetina, sendo eles

hiperosídeo, rutina e isoquercetrina, demonstraram uma maior atividade inibitória da hialuronidase que a nicotiflorina e o tripodantosídeo, atrelando a atividade anti-inflamatória de *T. acutifolius* à presença destes flavonóis.

Sendo assim, de acordo com os estudos científicos publicados, os principais constituintes químicos identificados para *T. acutifolius* são os compostos fenólicos, dentre eles flavonoides (rutina, nicotiflorina, hiperosídeo e isoquercetrina), taninos condensados e proantocianidinas (catequina, epicatequina e catequina-4- β -ol) e um raro fenilbutanoide glicosilado chamado de tripodantosídeo (Figura 5) (DAUD; HABIB; RIERA, 2006; RICCO et al., 2008; SOBERÓN et al., 2010a).

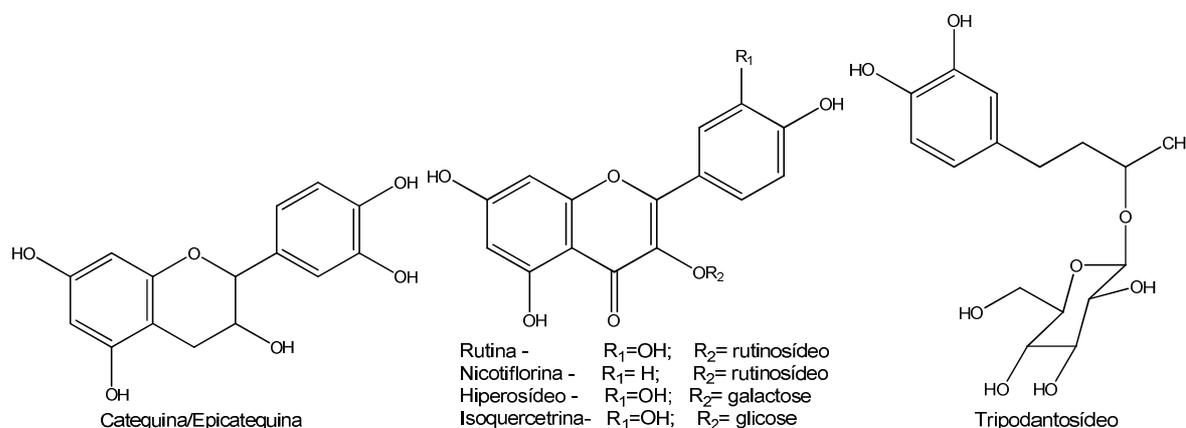


Figura 5 - Compostos fenólicos identificados em *Tripodanthus acutifolius*

Fonte: DAUD; HABIB; RIERA, 2006; RICCO et al., 2008; SOBERÓN et al., 2010a

3.3 *Ligustrum lucidum*

Ligustrum lucidum W. T. Ait (Oleaceae) é uma espécie vegetal pertencente à família Oleaceae, da ordem das Lamiales, que conta com cerca de 20.000 espécies distribuídas entre 22 famílias. Esta família é amplamente distribuída em regiões tropicais a temperadas por volta do mundo (JUDD et al., 2009). No Brasil, estas espécies ocorrem nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste, Centro-oeste, Sudeste e Sul (Sistema APG III, 2014).

O Ligustro (Figura 6) é uma árvore originária da China, muito utilizada na arborização urbana das cidades, podendo atingir até 10 metros de altura quando adulta. Também é conhecida popularmente como alfeneiro, alfeneiro-da-china, alfeneiro-brilhante e alfeneiro-de-rua. Possui tronco grosso, de casca escura e com

fissuras irregulares, que sustenta a copa densa, de forma arredondada. Suas folhas são simples, opostas, ovaladas, com ápice alongado, verde-escuras, brilhantes, coriáceas, com 8–15 cm de comprimento. As inflorescências distribuem-se em panículas cônicas, densa, terminal, com flores brancas pequenas, e se formam de outubro a fevereiro. Os frutos são drupas em cachos, arredondados, roxo-pardos, com 1-2 sementes pequenas (LORENZI, 2003).



Figura 6 – Aspecto geral de *Ligustrum lucidum* com destaque para os frutos

Fonte: LORENZI, 2003; Sistema APG III, 2014.

Seus frutos são muito utilizados na Medicina Tradicional Chinesa, na prevenção e tratamento de várias doenças, tais como diabetes e doenças cardíacas. Também são utilizados popularmente para tratar problemas renais, fortalecer o fígado e melhorar a visão. Este uso se dá devido à elevada concentração dos ácidos oleanólico e ursólico, que constituem os componentes majoritários dos frutos. Estes compostos têm atraído muita atenção devido suas propriedades anticancerígenas, antimutagênicas, anti-inflamatórias, antioxidantes, imunomoduladoras, hepatoprotetoras e antiprotozoárias (XIA et al., 2011; GAO et al., 2007).

Além de ácido ursólico e oleanólico, a literatura relata a presença de compostos voláteis, triterpenos, flavonoides, secoiridoides glicosídicos e compostos fenólicos nesta espécie (LIU et al., 2010). Os iridoides e securidoides glicosídicos (Figura 7) também têm sido amplamente estudados nesta espécie, pois sua

presença está relacionada aos efeitos protetores no fígado e rins e no tratamento da osteoporose (YANG et al., 2010; AOKI et al., 2012; CHENG et al., 2013; ZANGH et al., 2013).

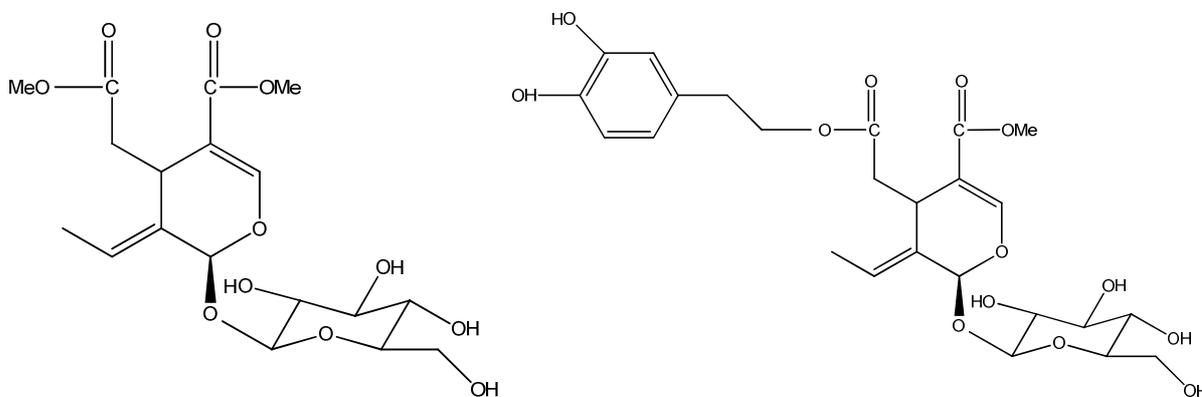


Figura 7 – Exemplos de secoiridoides presentes em *Ligustrum lucidum*

Fonte: HE et al., 2001.

4 ANÁLISE QUÍMICA DE *Tripodanthus acutifolius*

4 ANÁLISE QUÍMICA DE *Tripodanthus acutifolius*

4.1 Introdução

A pesquisa fitoquímica visa conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou determinar a sua presença. Na análise fitoquímica, uma das etapas consiste na identificação e caracterização de compostos bioativos de extratos e frações, bem como no fracionamento, isolamento e purificação de substâncias. Nestas etapas a cromatografia tem lugar de merecido destaque, uma vez que os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isolamento mais amplamente utilizados atualmente (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003; FALKENBERG et al., 2004).

De acordo com estudos científicos publicados já relatados anteriormente nesta tese, os principais constituintes químicos identificados para *T. acutifolius* são os compostos fenólicos, dentre eles taninos condensados e proantocianidinas (catequina, epicatequina e catequina-4- β -ol), flavonoides (rutina, nicotiflorina, hiperosídeo e isoquercetrina) e um raro fenilbutanoide glicosilado chamado de tripodantosídeo (DAUD; HABIB; RIERA, 2006; RICCO et al., 2008; SOBERÓN et al., 2010a).

Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular entre 500 e 3000 Dalton, as quais apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas (SANTOS; MELLO, 2004). São responsáveis pela adstringência de frutos e vegetais, isto porque ocorre a precipitação das glicoproteínas salivares ocasionando a perda do poder lubrificante. Os taninos são divididos em dois grupos, sendo um deles os hidrolisáveis e o outro grupo os condensados, esses amplamente encontrados no reino vegetal, são também designados como proantocianidinas, pelo fato de apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas (MONTEIRO et al., 2005).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina popular no tratamento de diversas doenças tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, distúrbios estomacais, renais e do sistema

urinário, processos inflamatórios em geral. Possuem também diversas atividades biológicas como ação bactericida, fungicida, antiviral, antitumoral e antioxidante (SANTOS; MELLO, 2004; MONTEIRO et al., 2005).

Em estudo realizado por Ricco et al. (2008) em que observaram as variações do perfil de polifenóis de *T. acutifolius* infectado pelo inseto cochonilha (*Dactylopius coccus*), foram analisados e comparados os extratos metanólicos de folhas sadias e infectadas. Nas folhas sadias o perfil de leucoantocianidinas e proantocianidinas foi caracterizado pela presença de catequina, epicatequina e catequina-4- β -ol. Já nas folhas infectadas, foi caracterizada a presença de catequina e oligômeros e polímeros derivados. Os extratos foram tratados com ácido, indicando a presença de cianidina para ambos os materiais. Os níveis de fenóis totais, taninos totais e proantocianidinas foram maiores nas folhas infectadas em comparação com as folhas sadias. Esses níveis elevados podem estar associados à infecção, sugerindo um possível mecanismo de defesa frente aos agentes agressores. Desta forma, é necessário considerar a condição fitossanitária de *T. acutifolius* usado como fonte de material vegetal em infusões ou extratos, porque distintos perfis de compostos podem resultar em diferenças com relação à atividade biológica.

Os flavonoides representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre produtos de origem natural. Possuem um núcleo básico com 15 átomos de carbono, arranjados de modo a formar dois anéis aromáticos A e B, que se encontram ligados por três unidades de carbono, que podem ou não formar um terceiro anel C (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

Sua presença nos vegetais está relacionada a diversas funções: proteção dos vegetais contra raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais com finalidade de polinização, antioxidantes, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBONE; WILLIAMS, 2000). Destacam-se por possuírem propriedades farmacológicas tais como antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antimicrobiana, hormonal, antialérgica, dentre outras (FLÓREZ et al., 2002).

Soberón et al. (2010a) realizaram a purificação e identificação de compostos fenólicos obtidos a partir da infusão das folhas de *T. acutifolius*, guiados pela atividade antibacteriana dessas substâncias. Concluíram que a ação antibacteriana desta planta seria atribuída parcialmente a quatro glicoflavonoides (rutina,

nicotiflorina, hiperosídeo e isoquercetrina) e principalmente ao tripodantosídeo, pelo fato deste estar em uma maior concentração nas folhas. Estes mesmos pesquisadores (SOBERÓN et al., 2010c) ao analisarem o efeito anti-inflamatório destes cinco compostos, concluíram que os glicosídeos da quercetina, sendo eles hiperosídeo, rutina e isoquercetrina, demonstraram uma maior atividade inibitória da hialuronidase que a nicotiflorina e o tripodantosídeo, atrelando a atividade anti-inflamatória de *T. acutifolius* à presença destes flavonóis.

Entretanto, apesar dos estudos relatados até o presente momento, pouco ainda se sabe sobre sua composição química e a variação desta composição destes hemiparasitas de acordo com os seus hospedeiros, já que na literatura disponível não há nenhum relato sobre quais eram os hospedeiros da espécie estudada. Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar e identificar os compostos majoritários presentes no extrato aquoso bruto das folhas de *T. acutifolius*, epiparasita de *Ligustrum lucidum*.

4.2 Parte Experimental

4.2.1 Procedimentos gerais

As práticas desenvolvidas para a elaboração desta parte do trabalho foram realizadas nos laboratórios de Farmacognosia e de Cromatografia da Universidade de Santa Cruz do Sul/UNISC. O processo de liofilização do extrato aquoso foi realizado na Central Analítica do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da UFRGS.

Os solventes e reagentes utilizados foram procedentes das marcas FMaia, Nuclear, Proton Química, Reagen, Sigma Aldrich, Synth e Vetec. A água utilizada nos experimentos e na preparação dos reagentes e eluentes foi a destilada e, no caso de análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi a obtida por osmose reversa (água ultra-pura).

Para as cromatografias analíticas em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas com gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®) de espessura de 0,2 mm com suporte de alumínio 20 x 20 cm. A aplicação das amostras foi feita com capilares de

vidro. As análises foram realizadas em cuba saturada, com migração ascendente. Como fase móvel (FM) foram utilizados vários eluentes, selecionados de acordo com a característica dos compostos analisados. A detecção das substâncias por CCD se deu pela visualização sob luz ultravioleta (UV) em comprimentos de ondas de 254 e 365 nm (Câmara CAMAG[®]) e com reagentes cromogênicos, tais como anisaldeído-ácido sulfúrico¹ e vanilina sulfúrica².

Para a cromatografia em coluna do tipo flash (CCF) foi utilizado gel de sílica 60 Carvalhaes[®] com tamanho de partículas 0,04 – 0,063 mm (230-400 mesh ASTM). Para a cromatografia em coluna (CC) foi utilizado gel de sílica 60 Merck[®] com tamanho de partículas 0,063 - 0,200 mm (70-230 mesh ASTM). Tanto na CCF como na CC se utilizou uma proporção de 1:20 (g/g) em relação ao peso da amostra e a quantidade de sílica utilizada para empacotamento da coluna de vidro.

Para as análises cromatográficas em CLAE o método de separação foi o de fase reversa utilizando pré-coluna e coluna Gemini C-18 (250 x 4,66 mm), marca Phenomenex[®]. A fase móvel constituiu-se de um sistema de gradiente com água e ácido trifluoracético (TFA) (0,01%) como fase polar (A) e acetonitrila e TFA (0,08%) (fase orgânica – fase B), com fluxo de eluição de 0,8 mL/min. As amostras, antes de serem injetadas no cromatógrafo (20 µL), foram colocadas em banho de ultrassom por 30 minutos, para serem degaseificadas, em seguida foram filtradas (membrana 0,45 µm, Chromafil[®]Xtra) e transferidas para os *vials*. Durante as análises foi realizada varredura com comprimentos de onda que variaram de 190-400 nm.

Para a espectrometria no infravermelho foi utilizado o espectrômetro Spectrum 400 FT-IR/FT-NIR Spectrometer (Perkin Elmer[®]) com varredura na faixa 4000-750 cm⁻¹ de redução, usando a técnica de reflectância especular e analisados em software OMNIC E.S.P versão 7.0.

Os seguintes equipamentos foram utilizados no desenvolvimento do trabalho: Balança semi-analítica Marte, modelo AL500; Bomba de vácuo Tecnal, modelo TE-058; Câmara de lâmpada UV Camag (254 e 366 nm); Cromatógrafo Shimadzu LC-10 (Tokyo, Japão), equipado com bomba LC-20AT, auto injetor SIL-20A, com

¹ Solução de Anisaldeído - misturar, na ordem, 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico (Fonte: FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª Ed.).

² Solução de Vanilina - dissolver 1 g de vanilina em etanol e completar o volume para 100 mL com o mesmo solvente. Adicionar, cuidadosamente, 2 mL de ácido sulfúrico e homogeneizar (Fonte: FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª Ed.).

detector de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A; Espectrômetro Spectrum 400, Perkin Elmer; Estufa de ar circulante Tecnal, modelo TE-394/3; Estufa de secagem e esterilização Tecnal, modelo TE-393/2; Evaporador rotatório Marconi, modelo MA120; Lavadora Ultrasônica UNIQUE; Liofilizador Eduards modelo Modulyo 4K; Moinho de facas Tecnal, modelo TE-648; Sistema de purificação de água Millipore Milli-Q.

4.2.2 Material vegetal e obtenção do EAB de *Tripodanthus acutifolius*

As folhas de *T. acutifolius* foram coletadas na Rua Gaspar Silveira Martins esquina com Coronel Oscar Jost, entre as coordenadas 29°42'17.36"S, 52°25'26.54"O no município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, no mês de setembro de 2010, no período da manhã, tendo como hospedeiro a espécie *Ligustrum lucidum* W. T. Aiton (Oleaceae). A coleta foi autorizada pela Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Saneamento de Santa Cruz do Sul, sob número 282/2010 (ANEXO A). A identificação botânica desta espécie foi realizada pela Dra. Marisa Terezinha Lopes Putzke, botânica e professora do Departamento de Biologia e Farmácia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC), sendo posteriormente depositada no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande Sul (UFRGS), sob número ICN 167796 pelo botânico Sérgio Augusto de Loreto Bordignon (ANEXO B).

Após coleta, as folhas de *T. acutifolius* foram separadas e analisadas, sendo que apenas as folhas íntegras foram selecionadas, sem doença, rasuras ou contaminantes. Em seguida, as folhas foram lavadas em água corrente e posteriormente secas em estufa de ar circulante à temperatura de 40°C, por um período de 48 horas. Após secagem completa, realizou-se a retirada dos caules restantes, permanecendo como farmacógeno apenas as folhas inteiras e totalmente secas. Na sequência, as folhas foram moídas em moinho de facas e armazenadas em frasco de vidro âmbar, devidamente limpo e rotulado.

Para a obtenção do extrato, a droga seca foi colocada em frasco-âmbar e recoberta com água destilada, na proporção droga-solvente 1:10 (p:v). A preparação do extrato se deu pela técnica de maceração estática, por um período de 24 horas,

sendo que após este período, o líquido extrativo foi filtrado e o solvente renovado por cinco dias consecutivos. Os líquidos extrativos obtidos foram concentrados em evaporador rotatório e posteriormente liofilizados, obtendo-se o extrato aquoso bruto (EAB), que teve seu peso seco determinado para cálculo de rendimento.

4.2.3 Desenvolvimento de método analítico por CLAE-DAD para avaliação do EAB de *Tripodanthus acutifolius* e quantificação da catequina

As análises iniciais para o desenvolvimento do método por CLAE foram realizadas utilizando como fase móvel A: solução aquosa de ácido trifluoracético (TFA) 0,5% (v/v) e como fase móvel B: acetonitrila. Foram avaliados diferentes sistemas gradientes, bem como variações nas proporções das fases móveis. Para o desenvolvimento do método foi utilizada pré-coluna e coluna Phenomenex Gemini C-18 (250 mm x 4,6 mm) e cromatógrafo Shimadzu LC-10, descrito anteriormente. Durante as análises foi realizada varredura com comprimentos de ondas que variaram de 190-400 nm.

Nos diferentes sistemas gradientes avaliados (Tabela 1) foram realizadas alterações na temperatura de condicionamento da coluna bem como no fluxo de eluição da fase móvel. Estas análises foram realizadas na Central Analítica do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Posteriormente as análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia da Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC) onde foi testado o sistema selecionado a partir das análises iniciais. Utilizou-se a mesma pré-coluna e coluna empregada anteriormente e um equipamento equivalente.

Com o intuito de obter uma melhor resolução para os sinais presentes no cromatograma optou-se por modificar a composição das fases, incluindo o TFA também na fase orgânica. Assim sendo, definiu-se como fase móvel A, uma solução aquosa de TFA 0,01% e como fase B, uma solução de acetonitrila com TFA 0,08% em três novos sistemas de gradiente – Sistemas 4 a 6 (Tabela 2).

Tabela 1 - Sistemas de gradientes testados inicialmente para análise cromatográfica do EAB de *Tripodanthus acutifolius* por CLAE

| Sistema 1 FM A: H ₂ O: TFA (0,5%) FM B: ACN Fluxo: 0,8 – T: 30°C | | Sistema 2 FM A: H ₂ O: TFA (0,5%) FM B: ACN Fluxo: 1,0 – T: 40°C | | Sistema 3 FM A: H ₂ O: TFA (0,5%) FM B: ACN: H ₂ O/TFA 0,5% (60/40) Fluxo: 0,8 – T: 30°C | |
|---|------|---|------|--|------|
| Tempo (min) | B% | Tempo (min) | B% | Tempo (min) | B% |
| 0,01 | 10 | 0,01 | 2 | 0,01 | 13 |
| 10 | 25 | 5 | 7 | 15 | 30 |
| 20 | 40 | 10 | 10 | 20 | 30 |
| 35 | 60 | 15 | 12 | 25 | 37 |
| 45 | 40 | 20 | 14 | 32 | 37 |
| 55 | 25 | 25 | 15 | 35 | 40 |
| 64,9 | 10 | 30 | 18 | 42 | 40 |
| 65 | Stop | 32 | 20 | 50 | 60 |
| | | 35 | 22 | 55 | 40 |
| | | 40 | 24 | 58 | 30 |
| | | 45 | 25 | 64 | 13 |
| | | 50 | 20 | 65 | Stop |
| | | 55 | 10 | | |
| | | 59 | 5 | | |
| | | 62 | 2 | | |
| | | 65 | Stop | | |

Tabela 2 – Novos sistemas de gradientes para análise cromatográfica do EAB de *Tripodanthus acutifolius* por CLAE

| Sistema 4 FM A: H ₂ O: TFA (0,01%) FM B: ACN: TFA (0,08%) Fluxo: 0,8 – Sem forno | | Sistema 5 FM A: H ₂ O: TFA (0,01%) FM B: ACN: TFA (0,08%) Fluxo: 0,8 – Sem forno | | Sistema 6 FM A: H ₂ O: TFA (0,01%) FM B: ACN: TFA (0,08%) Fluxo: 0,8 – Sem forno | |
|---|------|---|------|---|------|
| Tempo (min) | B% | Tempo (min) | B% | Tempo (min) | B% |
| 0 | 30 | 0 | 8 | 0 | 8 |
| 3 | 52 | 15 | 18 | 15 | 18 |
| 4 | 54 | 20 | 18 | 20 | 18 |
| 6 | 60 | 25 | 22 | 25 | 22 |
| 8 | 55 | 32 | 22 | 32 | 22 |
| 10 | 42 | 35 | 24 | 35 | 24 |
| 11 | 42 | 42 | 24 | 40 | 24 |
| 14 | 30 | 50 | 30 | 42 | 18 |
| 20 | Stop | 60 | 36 | 46 | 8 |
| | | 65 | 42 | 50 | Stop |
| | | 70 | 36 | | |
| | | 80 | 24 | | |
| | | 85 | 18 | | |
| | | 89 | 8 | | |
| | | 90 | Stop | | |

4.2.3.1 Preparo da amostra e dos padrões testados

A amostra (EAB) foi preparada numa concentração de 1 mg/mL, solubilizada em uma mistura de acetonitrila com água ultra pura (50:50). Em seguida, o balão foi colocado em ultrasom por 20 minutos. Após, a amostra foi filtrada (membrana 0,45 µm) para ser injetada no cromatógrafo.

Para comparação qualitativa dos compostos majoritários presentes no EAB, foram testados vários padrões de compostos fenólicos simples e polifenólicos a partir da disponibilidade dos mesmos nos laboratórios de farmacognosia da UNISC e da UFRGS, tais como ácido elágico, ácido cafeico, ácido ferrúlico, ácido p-cumárico, ácido siríngico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido clorogênico, quercetina, quercetina-3-β-D-glicosídeo, quercetina-3-D-galactosídeo, quercetrina, canferol, luteolina, rutina, flavona, 5-hidroxi-flavona, 3,4-di-idroxi-flavona, 6-hidroxi-flavona, 7-hidroxi-flavona, 7,8-di-idroxi-flavona, apigenina, catequina, epicatequina, galocatequina, hiperosídeo e isoquercetrina. Os padrões foram preparados numa concentração de 1 mg/mL e solubilizados em metanol grau HPLC.

Após desenvolvimento cromatográfico, os padrões foram analisados de acordo com seus respectivos tempos de retenção, seus espectros de absorção no UV e através de comparação espectral com os compostos presentes no EAB.

4.2.3.2 Análise quantitativa da catequina no EAB de *Tripodanthus acutifolius*

Após análise qualitativa e caracterização do EAB, o composto majoritário foi quantificado através da realização de uma curva de calibração da catequina nas concentrações de 0,1, 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 e 2,0 mg/mL, conforme metodologia descrita no item 4.2.3.

4.2.4 Fracionamento e isolamento de compostos presentes no EAB de *Tripodanthus acutifolius*

4.2.4.1 Cromatografia em coluna do tipo flash (CCF)

O fracionamento preliminar do EAB iniciou-se através da cromatografia em coluna do tipo flash (CCF). Nesta técnica, o gel de sílica foi suspenso em hexano e esta suspensão foi transferida para uma coluna de vidro, a qual possui uma das extremidades afilada e munida de torneira. Após a transferência e compactação do adsorvente, o EAB foi ressuspenso em uma pequena quantidade de água destilada e aplicado sob a extremidade superior da coluna. Os constituintes do extrato foram eluídos através da coluna com o auxílio de uma bomba de vácuo acoplada à extremidade superior desta, sendo recolhidas diversas frações de volumes variáveis, em função da sua coloração e de acordo com os eluentes utilizados. Os resultados da separação foram monitorados por CCD, sendo que as frações foram reunidas conforme a semelhança de seus constituintes (CANNELL, 1988).

Para esta coluna foram utilizadas 140 g de gel de sílica 60 (230-400 mesh) e 7,0 g do EAB de *T. acutifolius*. Os eluentes foram hexano (frações 1 – 2), acetato de etila (frações 3 – 9) e metanol (frações 10 – 20).

Foram utilizados cerca de 500 mL do solvente hexano, 800 mL de acetato de etila e 800 mL de metanol. Foram coletadas 20 frações de volume variável, não excedendo 150 mL cada. Após análise por CCD em diferentes sistemas cromatográficos³, optou-se por reunir algumas frações por estas apresentarem semelhanças (Tabela 3).

³ Sistema 1 – Diclorometano; Sistema 2 – Acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10) v/v; Sistema 3 – ácido acético:ácido clorídrico concentrado:água (30:3:10) v/v; Sistema 4 – ácido fórmico:ácido clorídrico concentrado:água (5:2:3) v/v; Sistema 5 – butanol:ácido acético:água (6:1:2) v/v; Sistema 6 – acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (100:11:11:27) v/v; Sistema 7 – clorofórmio:metanol (85:15) v/v; Sistema 8 – clorofórmio:metanol (65:35) v/v; Sistema 9 – tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (50:40:10) v/v (WAGNER; BLADT, 1995; SANTOS; MELLO, 2004; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

Tabela 3 - Frações obtidas por CCF a partir do EAB de *Tripodanthus acutifolius*

| 1ª Nomeação | 2ª Nomeação |
|-------------|-------------|
| 1 | 1 |
| 1.1 | 2 |
| 2-4 | 3 |
| 5-7 | 4 |
| 8-14 | 5 |
| 15 – 20 | 6 |

Após a realização e análise das frações por CCD, optou-se por trabalhar com as frações 4 e 5, pois acredita-se serem as frações mais ricas nos compostos fenólicos de interesse.

4.2.4.2 Cromatografia em coluna (CC)

Esta técnica segue a mesma descrita no item 4.2.4.1, porém sem a utilização de pressão. Os eluentes utilizados para a separação estão descritos a seguir.

Coluna 1 (CC 1)

Coluna: 20 g de gel de sílica 60 (70-230 mesh).

Amostra: 0,882 g da fração 4 da CCF.

Eluente: clorofórmio:metanol (65:35).

Vazão: 20 gotas/minuto.

Foram coletadas 145 frações de volume variável, não excedendo 10 mL cada. As mesmas foram monitoradas por CCD, utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (65:35), onde optou-se por reunir as frações 1 - 11 de acordo com a semelhança no CCD e por descartar as frações 12 – 145, por as mesmas não apresentarem manchas na CCD (Tabela 4).

Tabela 4 – Frações obtidas da CC 1 da fração acetato de etila do EAB de *Tripodanthus acutifolius*

| 1ª Nomeação | 2ª Nomeação |
|-------------|-------------|
| 1 | 1 |
| 2+3 | 2 |
| 4 | 3 |
| 5 | 4 |
| 6+7+8 | 5 |
| 9+10+11 | 6 |

Coluna 2 (CC 2)

Coluna: 23 g de gel de sílica 60 (70-230 mesh).

Amostra: 1,15 g da fração 5 da CCF.

Eluente: clorofórmio:metanol (65:35).

Vazão: 20 gotas/minuto.

Foram coletadas 30 frações de volume variável, não excedendo 10 mL cada. As mesmas foram monitoradas por CCD, utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (65:35), onde optou-se por descartar as frações 11 – 30, por as mesmas não apresentarem manchas na CCD. Além disso, observou-se semelhança nas frações 4 e 5 com a fração 5 da CC 1, assim optou-se por reuni-las.

Coluna 3 (CC 3)

Coluna: 30 g de gel de sílica 60 (70-230 mesh).

Amostra: fração 5 da CC 1 e frações 4 e 5 da CC 2 (0,75 g)

Eluente: clorofórmio:metanol (65:35).

Vazão: 20 gotas/minuto.

Foram coletadas 15 frações de volume variável, não excedendo 10 mL cada. As mesmas foram monitoradas por CCD, utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (65:35), onde observou-se semelhança nas frações 5, 6 e 7, optando-se por reuni-las, nomeando-a de fração 4. As demais frações foram descartadas por não apresentarem manchas na CCD.

Coluna 4 (CC 4)

Coluna: 15 g de gel de sílica 60 (70-230 mesh).

Amostra: fração 4 da CC 3 (0,25 g)

Eluente: clorofórmio:metanol (65:35).

Vazão: 20 gotas/minuto.

Foram coletadas 5 frações de volume variável, não excedendo 10 mL cada. As mesmas foram monitoradas por CCD, utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (65:35). A fração 3, codificada como E4, foi selecionada para análise em CLAE, por estar possivelmente isolada.

Coluna 5 (CC 5)

- Coluna: 15 g de gel de sílica 60 (70-230 mesh).

- Amostra: fração 2 da CC 4 (0,10 g)
- Eluente: clorofórmio:metanol (70:30)
- Vazão: 20 gotas/minuto.

Foram coletadas 10 frações de volume variável, não excedendo 5 mL cada. As mesmas foram monitoradas por CCD, utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (70:30), onde observou-se semelhança nas frações 4, 5 e 6, optando-se por reuní-las, nomeando-a de fração 4, bem como nas frações 7 e 8, nomeando-a de fração 5. A fração 5, codificada como E5, também foi selecionada para análise em CLAE, por estar aparentemente isolada.

Para uma melhor compreensão de quais foram as frações de interesse utilizadas nas CC e das frações possivelmente isoladas elaborou-se uma representação esquemática que pode ser visualizada na Figura 8.

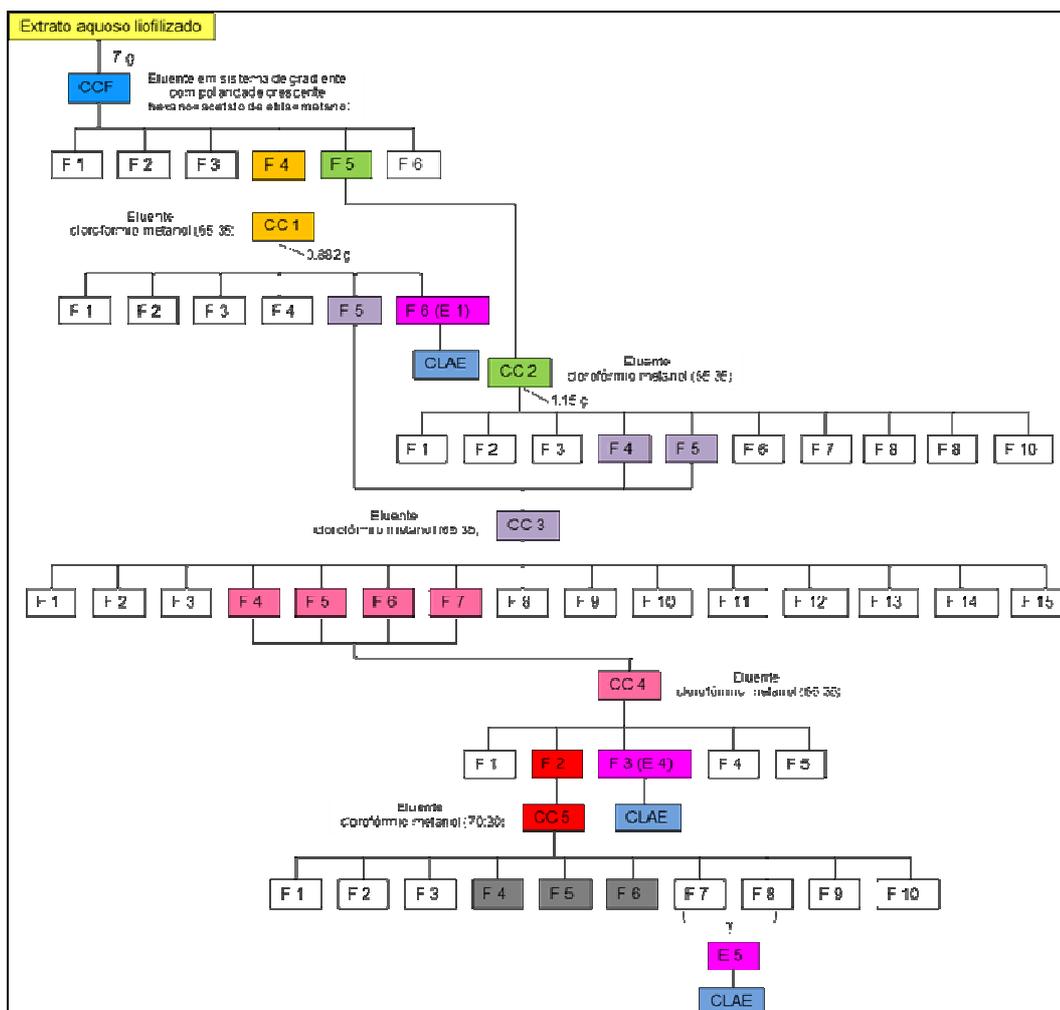


Figura 8 – Esquema das frações obtidas por CCF e CC a partir do EAB de *Tripodanthus acutifolius*

Legenda: CCF: cromatografia em coluna do tipo flash; F: fração; CC: cromatografia em coluna; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência. Fonte: esquema elaborado pela autora.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Análise da técnica de extração e rendimento do EAB

A operação extrativa utilizada para a obtenção do EAB foi a maceração, sendo classificada, segundo sua eficiência, como uma operação de extração parcial. Isso ocorre devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Variações dessa operação objetivam o aumento da eficiência de extração, como é o caso da remaceração, onde a operação é repetida utilizando o mesmo material vegetal renovando-se apenas o líquido extrator (SONAGLIO et al., 2004), sendo este o processo seguido para a obtenção do EAB.

A preparação do extrato bruto da planta é o ponto de partida para uma posterior purificação e a escolha do solvente para a extração é um fator limitante desta etapa, sendo que o sucesso ou fracasso nas técnicas de extração podem ser observados posteriormente nos processos de purificação. Para obter uma extração eficiente é necessário usar solventes puros e condições brandas, utilizando sempre que possível os de baixa reatividade, nunca devendo ser descartada a formação de artefatos (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2003).

Os solventes de escolha nas técnicas de extração de compostos fenólicos são o etanol, metanol, acetato de etila, hexano e a água. No estudo, a água foi utilizada como solvente, no intuito de reproduzir a forma como a planta é utilizada na medicina popular, se for considerada a utilização das folhas na forma de chá (SILVA; CONCEIÇÃO; ALMEIDA, 2010).

A partir de 100 g de material vegetal seco foram obtidos 30,016 g de extrato aquoso bruto seco, o que corresponde a um rendimento de 30%.

4.3.2 Desenvolvimento do método analítico por CLAE-DAD para avaliação do EAB de *Tripodanthus acutifolius* e quantificação da catequina

No desenvolvimento do sistema cromatográfico a ser aplicado para avaliação do perfil fitoquímico do EAB de *T. acutifolius* várias condições cromatográficas foram testadas e alteradas, como a programação do sistema gradiente, o tipo de ácido utilizado na fase A, o fluxo de eluição e a temperatura de acondicionamento da coluna. Dessa forma, o sistema cromatográfico que melhor se aplicou ao extrato de *T. acutifolius* foi o sistema 6 (Tabela 2 do item 4.2.3), onde foi possível observar uma melhora na eficiência de separação dos picos, optando-se por este sistema para o desenvolvimento do método. Para uma possível identificação dos compostos majoritários foram realizadas análises utilizando padrões. A partir das comparações dos tempos de retenção e dos espectros de absorção no UV, além de comparação por sobreposição de espectros, pode-se observar a provável presença de três núcleos polifenólicos distintos: uma catequina (1); dois flavonóis: rutina (2) e quercetina (3); e um núcleo flavona: provavelmente a 7-hidróxi-flavona (4) (Figura 9).

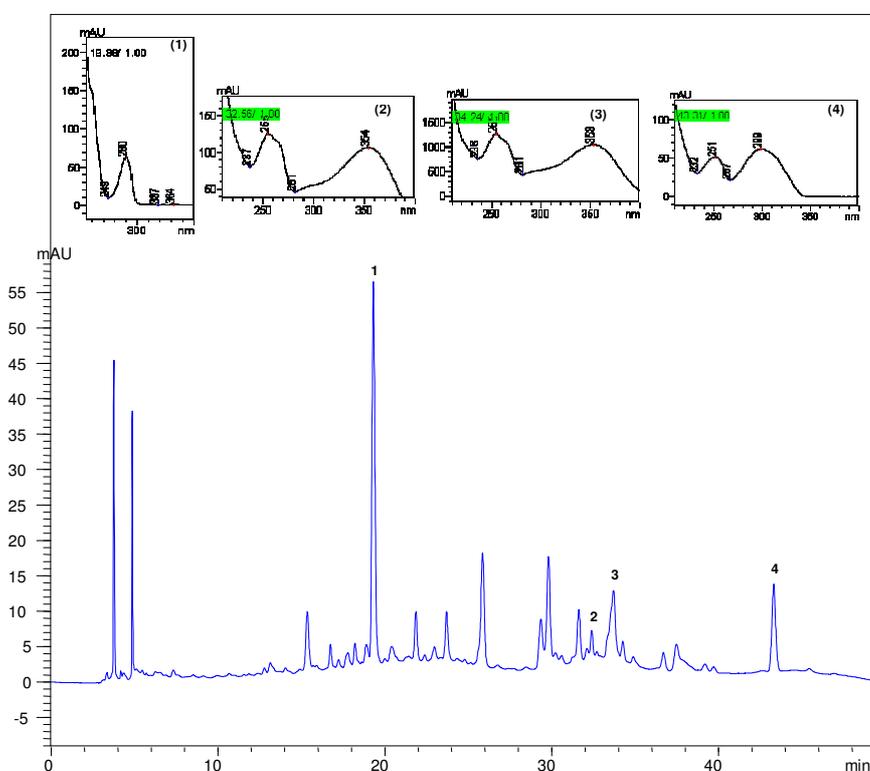


Figura 9 - Cromatograma obtido por CLAE do EAB de *Tripodanthus acutifolius*, evidenciando os espectros de alguns compostos obtidos no UV.

Legenda: (1) Catequina; (2) Rutina, (3) Quercetina e (4) 7-hidroxi-flavona. Condições Cromatográficas: FM A - H₂O: TFA (0,01%); FM B - ACN: TFA (0,08%); Fluxo: 0,8 mL/min; λ 270 nm.

Uma forma de sugerir a presença de alguns compostos é por meio de comparação de espectros de absorção no UV. De modo geral, pode-se observar comparando com substâncias padrões a possível presença de catequina, rutina, quercetina e 7-hidroxi-flavona no EAB de *T. acutifolius*, uma vez que os dois maiores picos de absorção destes polifenóis, especialmente das flavonas e dos flavonóis, ocorrem na região de 240–380 nm. Estes dois picos são designados de Banda I (comprimentos de onda na faixa de 300-385 nm), relacionada ao anel B do núcleo flavonoídico e Banda II (faixa de 240-280 nm), obtida a partir do anel A (MABRY MARKHAM; THOMAS, 1970; ZUANAZZI; MONTANHA, 2004).

A julgar o primeiro espectro pela banda de absorção máxima em torno de 280 nm, supõe-se a presença de catequina (1). Isto porque, esses valores coincidem com relatos na literatura, apresentando pico máximo próximo a 280 nm (WANG; KEITH; XIAOQING, 2000).

Já o segundo espectro obtido apresenta duas bandas de absorção máxima em 255 e 354 nm, que ao comparar com uma substância padrão é possível sugerir a presença de rutina (2), onde o padrão apresentou absorção em 255 e 353 nm. O terceiro espectro obtido apresenta bandas de absorção máxima em 256 e 368 nm indicando possivelmente, quando comparado ao padrão, a presença de quercetina (3), onde este apresentou absorção em 254 e 368 nm. Estes valores coincidem com a literatura, no qual apresentam para a rutina, bandas de absorção em uma faixa de 259-359 nm, e para quercetina bandas de absorção entre 255-370 nm. O espectro do composto (4) forneceu bandas características de flavonas, apresentando máximos de absorção em 251 e 299nm, muito próximos ao do padrão 7-hidróxi-flavona (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

Entretanto, os resultados encontrados até o presente momento estão de acordo com os achados de outros autores. Utilizando o extrato metanólico de *T. acutifolius*, Soberón e colaboradores (2010a) identificaram a presença de constituintes químicos polifenólicos, onde quatro glicoflavonoides foram identificados como rutina, nicotiflorina, hiperosídeo e isoquercetrina. Em outro estudo, foi identificada a presença de catequina, epicatequina, catequina- 4-β-ol e ainda proantocianidina (RICCO et al., 2008). Sendo assim, é possível inferir que a composição química de *T. acutifolius* é intrínseca à sua espécie e não sofre alteração de acordo com seus hospedeiros, já que todos os demais autores também

citam a presença destes compostos fenólicos. Para comprovar esta afirmação de que os compostos fenólicos presentes em *T. acutifolius* são próprios do seu metabolismo secundário, foi realizado um estudo para avaliar a atividade antioxidante de cinco extratos de *T. acutifolius* coletados sob diferentes hospedeiros. Os resultados deste estudo encontram-se no ANEXO C.

4.3.2.1 Análise quantitativa da catequina no EAB de *Tripodanthus acutifolius*

Levando-se em consideração a Equação da reta ($y = 9328052,95x + 148662,40$), bem como seu coeficiente de correlação ($R^2 = 1,00$), a concentração da catequina identificada no EAB de *Tripodanthus acutifolius* foi de $0,058 \pm 0,004$ mg/mL de extrato, o que corresponde a 5,8% desta no EAB.

4.3.3 Isolamento dos constituintes do EAB de *Tripodanthus acutifolius*

A partir do EAB liofilizado de *T. acutifolius* realizou-se a CCF buscando-se um fracionamento preliminar dos compostos presentes no EAB, no intuito de encontrar compostos oriundos do metabolismo secundário que possam compor o perfil fitoquímico desta espécie. O fracionamento foi realizado utilizando-se solventes com polaridade crescente (hexano<acetato de etila<metanol), onde foram obtidas 22 frações que foram monitoradas por CCD (Figura 10). Após o monitoramento, algumas frações foram reunidas conforme a semelhança cromatográfica de seus constituintes.

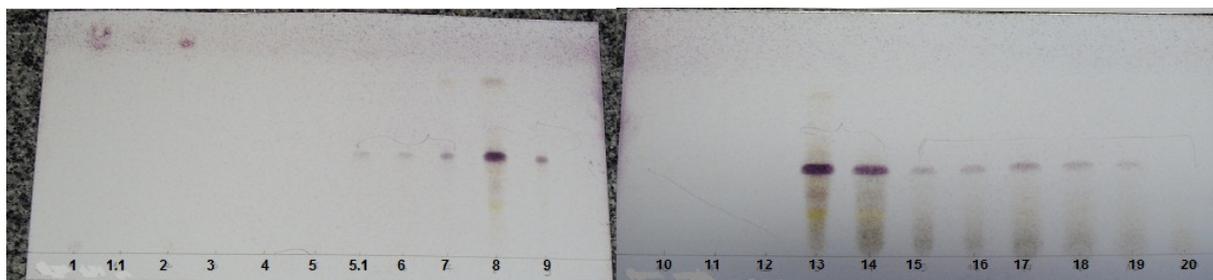


Figura 10 – Perfil cromatográfico obtido por CCD do EAB após fracionamento por CCF

Legenda: 1 a 20: frações obtidas na CCF. Condições cromatográficas: eluente: acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10); revelador: anisaldeído ácido-sulfúrico; observação sob luz visível.

Optou-se por trabalhar com as frações 5, 5.1, 6 e 7 (onde as mesmas foram reunidas e chamada de fração 4 CCF) e 8 – 14 (chamada de 5 CCF). Para estas frações, o sistema que melhor separou os componentes foi constituído por clorofórmio:metanol (65:35), sendo as mesmas submetidas a CC, buscando-se o isolamento dos compostos. Após diversas colunas, foi possível separar um composto da CC4 codificado como E4 (Figura 11). Após análise por CLAE, verificou-se um pico majoritário, com um tempo de retenção de 22,275 minutos (Figura 12) e na análise por IV observou-se um composto com as seguintes bandas: $\nu_{\text{máx.}}(\text{cm}^{-1})$: 3600-3200: deformação axial O-H; 1625-1475: aromáticos C=C; 1350-910: deformação axial das ligações C-O-C; 910-625: deformações angulares de ligações C-H fora do plano de anéis aromáticos (Figura 13).

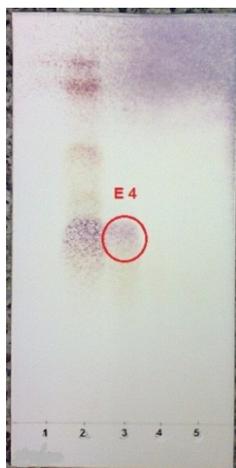


Figura 11 – Perfil cromatográfico obtido por CCD da fração 3 da CC 4

Legenda: 1 a 5: frações obtidas após fracionamento na CC 4. Condições cromatográficas: eluente: clorofórmio:metanol (65:35); revelador: anisaldeído ácido-sulfúrico; observação sob luz visível.

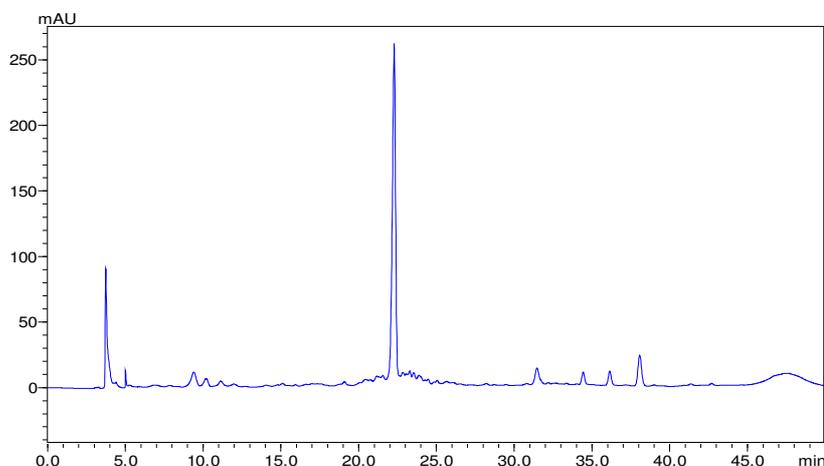


Figura 12 – Cromatograma obtido por CLAE da fração E4

Sistema cromatográfico composto por fase A: solução aquosa de ácido trifluoracético (TFA) 0,01% e fase B: acetonitrila e TFA 0,08%; fluxo: 0,8 mL/min; λ : 270 nm.

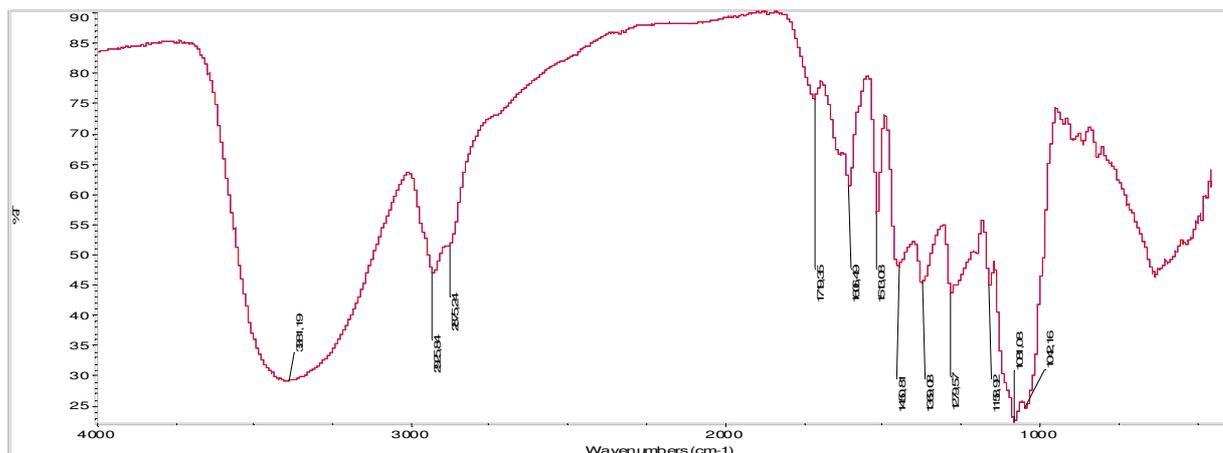


Figura 13 – Espectro de IV da Fração E4

Ainda buscando os constituintes dessa fração de interesse, realizou-se uma nova CC (CC 5) com a fração 2 da CC 4. Nesta CC observou-se semelhança nas frações 4, 5 e 6, optando-se por reuni-las, nomeando-as de fração 4, bem como nas frações 7 e 8, nomeando-as de fração 5. Desta CC pode-se separar uma fração possivelmente isolada, a fração 5, que foi posteriormente codificada como E5 (Figura 14), e após analisada por CLAE, demonstrando um pico majoritário em 19,964 minutos (Figura 15), muito próximo ao da catequina (19,344 minutos, Figura 9). Entretanto, o composto E5 também não apresentou-se isolado no CLAE e, portanto não foi analisado no IV. Após análise por comparação e sobreposição de espectros, o mesmo foi identificado como catequina (Figura 15).

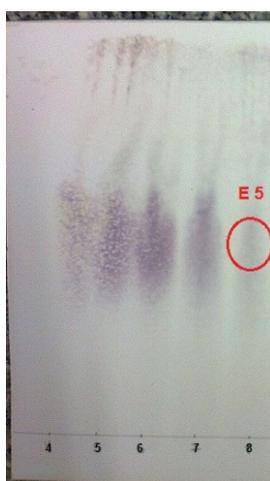


Figura 14 – Perfil cromatográfico obtido por CCD das frações 4, 5, 6, 7 e 8 da CC 5

Legenda: 4 a 8: frações obtidas após fracionamento na CC 5. Condições cromatográficas: eluente: clorofórmio:metanol (70:30); revelador: anisaldeído ácido-sulfúrico; observação sob luz visível.

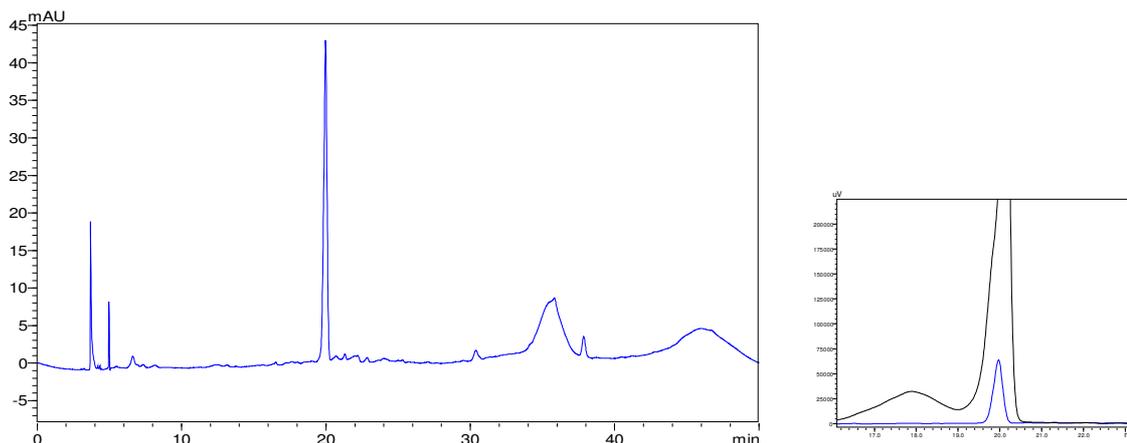


Figura 15 – Cromatograma obtido por CLAE da fração E 5 e sobreposição de espectro com a catequina

Sistema cromatográfico composto por fase A: solução aquosa de ácido trifluoracético (TFA) 0,01% e fase B: acetonitrila e TFA 0,08%; fluxo: 0,8 mL/min; λ : 270 nm.

4. 4 Conclusão

Após diferentes sistemas cromatográficos serem testados foi possível desenvolver um método de separação por CLAE dos compostos presentes no EAB de *T. acutifolius*, sugerindo a presença de catequina (componente majoritário), rutina, quercetina e 7-hidróxi-flavona no mesmo. Não foi possível analisar a estrutura do composto E4 por RMN ^1H e ^{13}C , tendo em vista que o mesmo degradou. Um fracionamento do extrato bioguiado através de suas propriedades biológicas e/ou farmacológicas seria o próximo passo para identificar os compostos bioativos presentes no extrato aquoso bruto de *Tripodanthus acutifolius*.

5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE E DA
TOXICIDADE DE *Tripodanthus*
acutifolius

5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE E DA TOXICIDADE DE *Tripodanthus acutifolius*

Artigo 1 – Cytotoxic, genotoxic, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Tripodanthus acutifolius* aqueous extract

A ser submetido ao periódico Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology

O conteúdo presente no *Artigo 1* desta tese de doutorado refere-se a resultados ainda não publicados, motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.

6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
GASTROPROTETORA DE *Tripodanthus*
acutifolius

6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GASTROPROTETORA DE *Tripodanthus acutifolius*

Artigo 2 - Gastroprotective activity against ethanol effects in rats and chemical profile of aqueous extract of the leaves of *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Tiegh.

Submetido ao periódico Archives of Pharmacal Research

O conteúdo presente no *Artigo 2* desta tese de doutorado refere-se a resultados ainda não publicados, motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.

7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA DE *Tripodanthus*
acutifolius

7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Tripodanthus acutifolius*

Artigo 3 – Antibacterial and amebicidal activity of aqueous extract of *Tripodanthus acutifolius* parasitizing *Ligustrum lucidum*

Submetido ao periódico Current Microbiology

O conteúdo presente no *Artigo 3* desta tese de doutorado refere-se a resultados ainda não publicados, motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.

Artigo 4 – Atividade antibacteriana do extrato aquoso de *Tripodanthus acutifolius* frente a *Staphylococcus aureus*

Aceito na Revista Jovens Pesquisadores

O conteúdo presente no *Artigo 4* desta tese de doutorado encontra-se publicado no periódico científico Revista Jovens Pesquisadores (Souza TK, Silva CM, Benitez LB, von POser GL, Zuanazzi JAS. Atividade antibacteriana do extrato aquoso de *Tripodanthus acutifolius* frente a *Staphylococcus aureus*. Revista Jovens Pesquisadores, v. 4, n. 1, p. 6-18, 2014), motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.

8 DISCUSSÃO GERAL

8 DISCUSSÃO GERAL

O presente trabalho foi delineado tendo como referência o relato do uso popular da “erva-de-passarinho”, botanicamente classificada como *Tripodanthus acutifolius*, no combate e tratamento de várias enfermidades. Além disso, este hemiparasita despertou grande interesse pelo fato de que, por ser derivada das autotróficas, é considerada uma espécie em transição, sendo encontrada tanto na forma escandente sob outras plantas, como na forma de arbusto ereto terrestre, o que a torna uma espécie muito resistente, invasora e amplamente distribuída (ROTTA, 2004; CAIRES et al., 2009).

Devido a estas características, *T. acutifolius* também é muito conhecida por causar danos às plantações as quais parasita, apresentando importância econômica devido aos prejuízos que provoca (CAZETTA; GALLETTI, 2003). No Brasil, a infestação por este hemiparasita é muito comum, prejudicando o crescimento de árvores ornamentais e também acarretando em perdas na produção de várias árvores frutíferas (FERREIRA, 1989). Além disso, sua ocorrência em meio urbano, quando em desequilíbrio, pode comprometer a arquitetura das árvores, por reduzir o vigor destas devido à competição por espaço de crescimento e luz solar (ROTTA, 2001).

Ao mesmo tempo em que estes hemiparasitas podem causar prejuízos quando estão em desequilíbrio, as ervas-de-passarinho são muito importantes em ecossistemas naturais como fonte de alimento para os pássaros, sendo também consideradas como espécies chave para os animais que consomem seus frutos e néctar (AUKEMA, 2003). Além disso, estas espécies parasitas têm sido há muito tempo, reconhecidas pelas suas propriedades terapêuticas (VENTURELLI, 1981). Várias espécies de ervas-de-passarinho são muito utilizadas na medicina popular, assim como diversos estudos científicos estão sendo realizados a fim de demonstrar suas propriedades biológicas.

A etapa inicial do trabalho destinou-se à coleta e beneficiamento do material vegetal, para obtenção de um extrato aquoso bruto (EAB) liofilizado a partir da técnica de maceração. A escolha do extrato aquoso deve-se à tentativa de

representação do uso caseiro desta espécie na forma de chá, conforme é relatada na literatura. Para obter um maior rendimento do extrato, a técnica de maceração sofreu modificações, sendo o solvente renovado diariamente por cinco dias consecutivos, agitando-se vigorosamente a proveta pelo menos uma vez ao dia. Dessa forma, foi possível obter o EAB liofilizado com um rendimento de 30% a partir da droga seca.

Na sequência, após obtenção do EAB liofilizado, o mesmo foi fracionado por cromatografia em coluna do tipo flash (CCF) e cromatografia em coluna (CC), na tentativa de isolar compostos bioativos presentes no mesmo. Optou-se por trabalhar com a fração acetato de etila da CCF, pelo fato desta reunir uma maior concentração de compostos polifenólicos, acreditando serem estes os componentes bioativos presentes no extrato. Sendo assim, foi possível isolar dois constituintes (E4 e E5); um caracterizado através de comparação com padrão e pelo perfil de bandas de absorção no UV como catequina (E5), sendo o constituinte majoritário do extrato; e o outro (E4), ainda não elucidado, sendo que, nenhum dos padrões avaliados apresentou o mesmo perfil de absorção no UV e nos tempos de retenção do que a molécula em questão.

A CC consiste no método preparativo mais utilizado devido à sua simplicidade, eficiência e baixo custo. Em muitos casos, se obtêm compostos puros usando somente CC ou utilizando a CCF. A CCF é similar a CC, diferindo apenas pelo emprego de sílica com granulometria mais fina e a utilização de uma bomba de pressão para eluição dos compostos. Embora vantagens do uso da CC e CCF sejam evidentes, apresentam também algumas desvantagens, como a adsorção irreversível de alguns compostos na fase estacionária e a possibilidade de degradação de substâncias pouco estáveis (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

Com o intuito de estabelecer parâmetros de controle de qualidade do extrato de *T. acutifolius* e objetivando ainda a quantificação dos compostos polifenólicos presentes no mesmo, desenvolveu-se um método por CLAE-DAD. A partir deste método foi possível caracterizar e quantificar a catequina, tornando-se um bom marcador para o extrato, uma vez que várias atividades farmacológicas descritas para a espécie estão relacionadas aos compostos fenólicos, inclusive a catequina. Além da catequina, os compostos polifenólicos rutina, quercetina e uma flavona também foram identificados no extrato aquoso.

Os compostos fenólicos são capazes de sequestrar radicais livres que estão envolvidos no processo inflamatório (SOBERÓN et al., 2010b; SOBERÓN et al., 2010c). Além disso, evidências indicam que doenças causadas por reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas através da ingestão de antioxidantes naturais da dieta, sendo os compostos fenólicos os principais agentes protetores (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2004).

Os flavonoides têm recebido uma maior atenção nos últimos anos, devido ao fato de estarem sendo alvo de diversos estudos que comprovem suas propriedades farmacológicas. Os estudos realizados foram iniciados a partir de observação em grupos humanos que faziam consumos consideráveis de alimentos ricos em flavonoides, sendo que estas pessoas possuíam índices baixos de doenças coronárias, câncer e outras (ANDERSEN; MARKHAM, 2006). A partir disto, um maior interesse foi demonstrado por pesquisadores, devido à importância de suas propriedades antioxidantes presentes nos polifenóis, flavonoides e catequinas (COOK; SAMNAM, 1996; CONTRERAS, 2007).

Os flavonoides apresentam uma estrutura adequada para que ocorra o sequestro de radicais, sendo que os antioxidantes são mais efetivos que as próprias vitaminas C e E. No entanto, a atividade antioxidante dos flavonoides vai depender da sua estrutura, podendo ser determinada através de cinco fatores, tais como a reatividade quando sendo agente doador de hidrogênio e elétrons, a estabilidade do radical flavanoil formado, a reatividade frente a outros antioxidantes, a capacidade de quelar metais de transição e solubilidade e ainda a interação com membranas. Deste modo, quanto maior o número de hidroxilas, maior será a atividade com agente doador de H e de elétrons (BARREIRO; DAVID; DAVID, 2006; ALVEZ et al., 2007).

Com intuito de avaliar algumas das propriedades farmacológicas descritas a partir da utilização popular, o EAB foi testado quanto às atividades anti-inflamatória, genotóxica, mutagênica, gastroprotetora e antimicrobiana.

A atividade anti-inflamatória foi confirmada pelo edema de pata induzido por carragenina em camundongos, um modelo amplamente utilizado para estudar substâncias anti-inflamatórias. A carragenina desencadeia um estado inflamatório decorrente da liberação de prostaglandinas, serotonina e outros mediadores

inflamatórios (DI ROSA, 1972; NANTEL et al., 1999; SEIBERT et al., 1999). No presente estudo, o tratamento oral com o extrato aquoso de *T. acutifolius* inibiu significativamente o edema na dose de 400 mg/Kg, em 3 horas ($P < 0,01$) e 4 horas ($P < 0,01$) após a administração de carragenina. Esta evidência sugere que as ações antiedematogênicas deste extrato possam estar inibindo a biossíntese de prostaglandinas (FARSAM et al., 2000).

Resultados semelhantes foram verificados por Daud e colaboradores (2006) que avaliaram a atividade anti-inflamatória, analgésica e antipirética do extrato aquoso e etanólico das flores de *T. acutifolius*. Os resultados mostraram que o extrato aquoso reduziu significativamente o edema induzido por carragenina dentro de 1 - 5 horas após a administração em todas as doses utilizadas. A diferença entre os dois trabalhos é que na atual pesquisa o extrato bruto foi elaborado a partir das folhas, enquanto que no ensaio de Dau et al. (2006) a partir de suas flores. Pode-se, portanto, inferir que tanto as folhas quanto as flores desta espécie sejam detentoras desta propriedade.

A referida atividade anti-inflamatória também pode ser justificada pela presença dos compostos fenólicos encontrados no extrato, principalmente pela presença dos compostos flavonoídicos, que são compostos relatados na literatura com potencial atividade anti-inflamatória e antioxidante.

Segundo Coutinho et al. (2009), há alguns fatores estruturais importantes para a atividade anti-inflamatória de flavonoides, tais como a insaturação no anel C (posições 2-3), o número e a posição de grupamentos hidroxilas (Anel B) e a carbonila em C-4 (Anel C). Sendo assim, os glicosídeos da quercetina (hiperosídeo, rutina e isoquercetrina) isolados por Soberón e colaboradores (2010b) mostraram maior atividade inibitória de hialuronidase que a nicotiflorina (um glicosídeo do canferol), confirmando os estudos de relação estrutura atividade descritos.

Quanto ao potencial genotóxico investigado para *T. acutifolius*, observou-se que o mesmo não demonstrou esta propriedade nas células sanguíneas de camundongos. De maneira interessante, um efeito protetor sobre as quebras espontâneas na molécula de DNA, causadas entre outras, pelo próprio estresse do animal durante a experimentação, pode ser observada após tratamento com a dose de 100 mg/kg. Entretanto, esta diminuição do índice e da frequência de danos basais não foi significativa estatisticamente e mais estudos são necessário para

confirmar este possível efeito antigenotóxico. Este efeito protetor também pode estar relacionado com a atividade antioxidante do extrato, podendo assim, o mesmo apresentar um efeito antigenotóxico devido à presença de compostos polifenólicos presentes na espécie.

Esses resultados são contraditórios aos observados por Soberón e colaboradores (2010a), que observaram um efeito genotóxico da infusão e do extrato metanólico de *T. acutifolius*. No entanto, o referido estudo foi realizado a partir de um modelo experimental *in vitro*, diferenciando-se do modelo *in vivo* delineado no presente ensaio, não sendo possível a comparação dos resultados, uma vez que o processo de metabolização que ocorre em bactérias é totalmente diferente do que acontece em células animais.

Porém, quando o extrato foi testado frente a células de *Saccharomyces cerevisiae* e células de mamíferos (V79), observou-se um efeito citotóxico e genotóxico nas concentrações superiores a 250 µg/mL, conferindo segurança de uso em concentrações inferiores a esta. No entanto, o mesmo não induziu mutagenicidade nas concentrações testadas. Observou-se ao contrário, um efeito protetor contra a mutagênese induzida por H₂O₂ em concentrações subletais, além de um efeito antioxidante nas concentrações mais baixas (10 a 100 µg/mL).

No teste de citotoxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, observou-se letalidade das larvas em concentrações superiores a 400 µg/mL, expressando um valor da Concentração Letal Mediana (CL₅₀) de 11.482,29 µg/mL, mostrando-se atóxico nestas condições experimentais. Vários autores estabeleceram uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL₅₀, apresentada por extratos de plantas sobre larvas de *A. salina* (MEYER et al., 1982; BUSSMANN et al., 2011; NGUTA et al., 2011). Desde então, considera-se que quando são verificados valores acima 1000 µg/mL, estes, são considerados atóxicos.

Até o presente momento, não há dados na literatura sobre a presença de constituintes químicos que apresentem características tóxicas em *T. acutifolius*, uma vez que os constituintes majoritários já descritos para a espécie são os compostos polifenólicos, dentre eles flavonoides e taninos, que destacam-se na literatura por apresentarem propriedades farmacológicas tais como antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antimicrobiana, hormonal e antialérgica (FLÓREZ et al., 2002; SANTOS; MELLO, 2004; MONTEIRO et al., 2005).

Entretanto, estudos feitos por Macedo et al. (2012) demonstraram que os extratos de *Pthirusa stelis*, uma espécie de Loranthaceae, apresentaram citotoxicidade para *A. salina*, com as doses letais (DL₅₀) de 524,38 e 451,73 µg/mL, que pode estar relacionada ao teor de fenóis totais obtidos.

Já um estudo realizado por Gonçalves (2012), constatou que os taninos de *M. arenosa* não foram tóxicos para as linhagens de *Salmonella* Typhimurium na concentração de 500 µg/mL, onde estes não foram capazes de induzir mutações. Entretanto, na concentração de 1000 µg/mL foi observado um acentuado aumento no número de colônias revertentes indicando que os taninos apresentam potencial para induzir mutações gênicas. Há que se investigar estas moléculas de forma mais específica e detalhada, uma vez que podem atuar tanto como protetoras de sistemas vivos, quanto como potencialmente citotóxicas.

O efeito gastroprotetor do EAB também pôde ser confirmado através da redução dos parâmetros ulcerosos (perda de muco e focos hemorrágicos) das lesões gástricas induzidas por etanol absoluto e da acidez da secreção ácida gástrica a valores próximos ao controle positivo, contribuindo para a integridade da mucosa local. O extrato apresentou um efeito progressivamente maior com o aumento da dose de 200 para 400 mg/kg, onde atingiu proteção máxima ($P < 0,0001$), declinando na dose de 600 mg/kg a valores próximos da menor dosagem. Portanto, esta atividade detectada não estabeleceu relação dose-dependente.

Caso semelhante já havia sido descrito por Intersimone e colaboradores (2005), que verificaram maior propriedade diurética de *T. acutifolius* em ratos tratados com 200 mg/kg dos extratos aquoso e alcoólico da planta do que na dose de 400 mg/kg. A provável justificativa para o efeito seria o fato de que os extratos brutos constituem-se de diferentes substâncias que podem interferir entre si à medida que a concentração aumenta, alterando a absorção, distribuição e ligação dos compostos ativos aos receptores celulares.

No que se refere aos valores de pH, além do pantoprazol sódico, o aumento de pH mais expressivo e confiável ($P < 0,0001$) foi notado para o EAB na concentração de 400 mg/kg. Estes resultados revelam que *T. acutifolius* possui provável atividade antissecretora ácida, possivelmente devido à presença de quercetina na planta, que já teve sua atividade antiulcerogênica descrita, e atua por inibir a produção de ácido gástrico, e conseqüentemente elevar seu pH. Isto sugere

que os flavonoides presentes no extrato possam ser os principais ativos para as atividades gastroprotetora e antissecretora. Outros estudos também relataram mesma atividade para outras espécies da família Loranthaceae, sobretudo ligados aos flavonoides presentes nestas plantas (GHEDINI; ALMEIDA, 2007).

Os taninos, por sua vez, também podem estar envolvidos neste efeito gastroprotetor, pela sua capacidade de se complexarem com proteínas. Portanto, pode-se supor que a camada de muco formada sobre a mucosa gástrica seja resultado de uma possível reação entre os taninos com os mucopolissacarídeos provindos da secreção local (LUCK et al., 1994).

Já a partir do estudo da atividade antimicrobiana de *T. acutifolius* foi possível concluir que o EAB da espécie possui compostos com atividade antimicrobiana que inibem o crescimento de bactérias Gram+ e Gram-. A partir dos resultados obtidos pode-se inferir que dentre as bactérias testadas, as cepas de *Staphylococcus aureus* foram as mais sensíveis à ação do extrato da planta, seguidas das de *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli*.

A partir dos resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que todos os isolados de *S. aureus*, tanto os resistentes quanto os sensíveis à meticilina, tiveram seu crescimento afetado pelo extrato aquoso de *T. acutifolius*. A cepa de *S. aureus* 25923 (padrão ATCC) teve o seu crescimento inibido pela menor concentração do extrato aquoso (0,5 mg/mL) enquanto que ambas as cepas de MRSA e MSSA foram inibidas pelas concentrações de 15 e 2,5 mg/mL.

A atividade antibacteriana exibida pela “erva-de-passarinho” frente às cepas MRSA e MSSA torna esta planta interessante para estudos complementares de isolamento e identificação dos seus componentes ativos e de possíveis modificações químicas capazes de aumentar seu potencial antimicrobiano para que possa ser usada como medicamento fitoterápico no tratamento de múltiplas infecções.

Inúmeros estudos associam a atividade antimicrobiana de plantas a compostos fenólicos, especialmente os flavonoides (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; SOBERÓN et al., 2010b). Soberón et al. (2007) isolaram de infusões de *T. acutifolius* três compostos ativos: flavonas glicosiladas (rutina e isoquercetrina) e um composto de natureza terpenóide. Segundo os autores, como os flavonoides são sintetizados pelas plantas em resposta às infecções microbianas se poderia inferir que eles

efetivamente agiriam como antimicrobianos contra um grande número de microorganismos.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- Foi possível desenvolver um método de separação por CLAE dos compostos presentes no EAB de *T. acutifolius*, identificando a presença de catequina, rutina, quercetina e 7-hidroxi-flavona no mesmo;
- A catequina foi identificada como o constituinte majoritário no extrato, quantificada numa concentração de 5,8% no EAB de *T. acutifolius*;
- Foi comprovada uma atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimutagênica no EAB de *T. acutifolius* nos diferentes ensaios realizados, bem como um efeito citotóxico in vivo nas doses superiores a 250 µg/mL;
- O EAB de *T. acutifolius* apresentou uma atividade gastroprotetora importante, diminuindo expressivamente os parâmetros ulcerosos (perda de muco e focos hemorrágicos) e a acidez da secreção ácida gástrica nas doses testadas, sendo a dose de 400 mg/kg a mais expressiva;
- Foi possível concluir que o EAB de *T. acutifolius* possui compostos com atividade antimicrobiana que inibem o crescimento de bactérias Gram+ e Gram-, comprovando-se assim o potencial antimicrobiano da planta, sendo que a espécie bacteriana que apresentou melhores resultados de inibição no crescimento foi *Staphylococcus aureus*.
- Todas as cepas de *Staphylococcus aureus* testadas neste estudo foram sensíveis à ação do EAB de *T. acutifolius*, sendo que as que se mostraram mais sensíveis ao extrato foram *S. aureus* 25923 (padrão AATC), 055 A (MRSA) e 017 A (MSSA).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALVEZ, Q. C. et al. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. *Diálogos e Ciência*, n. 12, dez. 2007.
- AMICO, G.C; VIDAL-RUSSELL, R; GARCIA, M.A; NICKRENT, D.L. Evolutionary history of the South American mistletoe *Tripodanthus* (Loranthaceae) using nuclear and plastid markers. *Systematic Botany*, v.37, p.218-225, 2012.
- AMICO, G.C.; VIDAL-RUSSEL, R.; NICKRENT, D.L. A molecular phylogeny of the mistletoe genus *Tripodanthus* (Loranthaceae). *Darwiniana* v.5, p.61-63, 2007.
- ANDERSEN, M.; MARKHAM, K.R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 2006.
- AOKI S. et al. Six new secoiridoids from the dried fruits of *Ligustrum lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* v.60, n.2, p.251—256,2012.
- AQUINO NETO, F. R. de; NUNES, D. da S. e S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: *Interciência*, 2003.
- ARRUDA, R.; CARVALHO, L.N. Especificidade de hospedeiros por *Struthanthus polyanthus* (Loranthaceae) em uma área de cerrado do parque estadual da serra de Caldas Novas, GO, Brasil. *Bioscience Journal*, v.20, n.2, p.21-36, 2004.
- ARRUDA, R.; CARVALHO, L.N.; DEL-CLARO, K. Host specificity of a Brazilian mistletoe, *Struthanthus* aff. *Polyanthus* (Loranthaceae), in cerrado tropical savanna. *Flora*, v.201, p.127–134, 2006.
- AUKEMA, J. Vectors, viscin, and Viscaceae: mistletoes as parasites, mutualists, and resources. *Frontiers in Ecology and the Environment*, v. 1, n. 3, p. 212-219, 2003.
- BARCIK, C. et al. Análise do comportamento das sementes de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pav.) Thiegh. (erva-de-passarinho) na arborização das ruas de Curitiba – PR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARBORIZAÇÃO URBANA, 6, 2002.
- BARREIRO, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Extresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. *Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos*. Itajaí: UNIVALI, 2003.
- BUSSMANN, R. W. et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology*. v.137, p.121-140, 2011.

CAIRES, C.S. et al. Frugivoria de larvas de *Neosilba* McAlpine (Diptera, Lonchaeidae) sobre *Psittacanthus plagiophyllus* Eichler (Santalales, Loranthaceae) no sudoeste de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v.53, n.2, p.272–277, 2009.

CAIRES, C.S.; DETTKE, G.A. *Loranthaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8726>>. Acessado em: 06/02/2014.

CALVIN, C.L.; WILSON, C.A. Comparative morphology of epicortical roots in Old and New World Loranthaceae with reference to root types, origin, patterns of longitudinal extension and potential for clonal growth. *Flora*, v.201, p.51-64, 2006.

CANNELL, R. J.P. *Natural Products Isolation: methods in biotechnology*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1988.

CARVALHO, J.C; GOSMANN, G; SCHENKEL, E. Compostos fenólicos. . In: SIMÕES, M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p.443-459, 2004.

CAZETTA, E; GALETTI, M.E. Ecologia das ervas-de-passarinho. *Ciência Hoje*, São Paulo, v.3, n.94, p.72-74, 2003.

CAZETTA, E; GALETTI, M.E. Frugivoria e especificidade por hospedeiros na erva-de-passarinho *Phoradendron rubrum* (L.) Griseb. (Viscaceae). *Revista Brasil. Bot.*, v.30, n.2, p.345-351, abr.-jun, 2007.

CHENG, Q.; YANG L.; ZHANG, G.; WANG, F. Bioactivity-guided isolation of antiosteoporotic compounds from *Ligustrum lucidum*. *Phytotherapy Research* v.27, p.973–979, 2013.

CONTRERAS, P. D. *Desenvolvimento de bebida à base de subprodutos da indústria da Erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.) e verificação de sua atividade antioxidante*. 2007. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

COOK, N. C.; SAMNAM, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *Journal of Nutrition Biochemistry*, v. 7, p. 66-76, 1996.

CORTEZ, D. A. G.; QUEIROZ NETO, A. de; HÜBNER, D. V.; MELITO, I. Contribuição ao estudo fitoquímico do *Phoradendron latifolium* (SW) Griseb. (erva-de-passarinho). *Supl. Acta Amazonica*, v.18, n.1-2, p.433-438, 1988.

COUTINHO, M.A.S; MUZITANO, M.F; COSTA, S.S. Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual Química*, v. 1, n.3, p. 241-25, 2009.

- CRUZ, M. G. De La. *O acesso aos fitoterápicos e Plantas Medicinais e a inclusão Social – Diagnóstico situacional da cadeia produtiva no estado do Mato Grosso*. Secretaria do Estado de Saúde, 2005.
- DAUD, A; GALLO, A; RIERA, S. Antimicrobial properties of *Phrygilanthus acutifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, p.193-197, 2005.
- DAUD, A.; HABIB, N.; RIERA, A.S. Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic effects of extracts of *Phrygilanthus acutifolius* flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, v.108, p.198–203, 2006.
- DEVKOTA, M.P. Biology of mistletoes and status in Nepal Himalaya. *Himalayan Journal of sciences*, Himalaya, v.3, n.5, p.85-88, 2005.
- DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. *The journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 24, p. 89-102, 1972.
- ELISABETSKY, E.; SOUZA, G. C. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC. p.107-122, 2004.
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I. In: SIMÕES. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p.229-245, 2004.
- FARSAM, H.; AMANLOU, M.; DEHPOUR, A.R.; JAHANIANI, F. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, p.443-447, 2000.
- FERNANDEZ, T. et al. Study of na Argentine mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.62, p.25-34,1998.
- FERREIRA, Francisco Alves. *Patologia Florestal: principais doenças florestais no Brasil*. Viçosa, MG: Sociedade de Investigações Florestais, 1989.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5. ed., Vol I. Brasília, 2010.
- FLÓREZ, S.M.; GALLEGO, J.G.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, v.17, n.6, p.271-278, 2002.
- GAO, D.; LI, Q.; LI, Y.; LIU, Z.H.; LIU, Z.W.; FAN, Y.S.; HANS, Z.S.; LI, J.; LI, K. Antidiabetic potential of oleanolic acid from *Ligustrum lucidum* Ait. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* v.85, 1076–1083, 2007.

GHEDINI, P. C.; ALMEIDA, C. E. Butanolic Extract os *Aster squamatus* Aerial Parts is the Active Fraction responsables to the Antiulcer and Gastric Acid Antisecretory Effects. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.26, n.6, p.889-892, 2007.

GONÇALVES, G. F. Avaliação das atividades citotóxica e genotóxica de taninos de *Mimosa arenosa* (Willd.) Poir. (Mimosaceae), Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos, João Pessoa, PB, 2012.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v.55, p.481-504, 2000.

HARRIS, R. W. *Arboriculture: integrated management of landscape trees, shrubs and vines*. New Jersey: Prentice-Hall, 1992. 674p.

HE, Z.D. et al. Secoiridoid constituents from the fruits of *Ligustrum lucidum*. *Phytochemistry*. v.56, p.327-330, 2001.

INTERSIMONE, N.H, THOENE, A.D.; RIERA, A.S. Efecto diurético de extractos acuosos y alcohólicos de flores de *Phrygilanthus acutifolius* (corpo) en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v.10, p.3-4, 2005.

JUDD, W.S; CAMPBELL, C. S; KELLOGG, E. A; STEVENS, P. F; DONOGHUE, M. J. *Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético*. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2009. 632p.

LEAL, L, BUJOKAS, W.M.; BIONDI, D. Análise da infestação de erva-de-passarinho na arborização de ruas de Curitiba, PR. *Floresta*, v.36, n.3, 2006.

LIU, X et al., Chemical constituents from the fruits of *Ligustrum lucidum*. *Chemistry of Natural Compounds*. v.46,n.5, p.701-703, 2010.

LORENZI, Harri. *Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2003.

LUCK G, LIAO H, MURRAY NJ, GRIMMER HR, WARMINSKI EE, WILLIAMSON MP, LILLEY TH, HASLAM E. Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*. v.37, p.357-371, 1994.

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

MACEDO, M.S.; GUIMARAES, A.C.; TAKEARA, R.; RIBEIRO, E.M.; VEIGA JUNIOR, V.F.; LIMA, E.S. Estudo dos fenólicos e atividade citotóxica *Pthirusa stelis*, uma espécie de Loranthaceae da Amazônia, parasitando *Citrus sp* e *Syzygium cumini*. *52º Congresso Brasileiro de Química*, Recife, PE, Outubro de 2012.

MARVIER, M.A; SMITH, D.L. Conservation implications of host use for rare parasitic plants. *Conservation Biology*, v.11, p.839-848, 1997.

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 Med.* v.45, p.31-34, 1982.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C. Taninos: uma abordagem da química a ecologia. *Química Nova*, v.28, n.5, p.892-896, 2005.

MOURÃO, F. A et al. Effects of the parasitismo of *Struthanthus flexicaulis* (Mart.) Mart.(Loranthaceae) on the fitness of *Mimosa Calodendron* Mart. (Fabaceae), an endemic shrub from rupestrian fields over ironstone outcrops, Minas Gerais State, Brazil. *Acta Botanica Brasílica*, v.23, n.3, p.820-825, 2009.

NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K. M.; CHAN, C. C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of Pharmacology*, v.128, p.853–859, 1999.

NETO, A. Q et al. Avaliação Farmacológica de princípios ativos na chá de erva-de-passarinho *Phoradendron latifolium* (SW) Griseb. Supl. *Acta Amazônica*, p. 197-202, 1988.

NGUTA, J. M. et al. Biological screening of kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). *Pharmacology online*, v.2, p.458-78, 2011.

NICKRENT, D.L.; MALÉCOT, V.; VIDAL-RUSSEL, R.; DER, J.P. A revised classification of Santalales. *Taxon*, v.59, p.538-558. 2010.

NORTON, D.A; CARPENTER, M.A. Mistletoes as parasites: host specificity and speciation. *Trends in Ecology and Evolution*, v.13, p.101-105, 1998.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. *Fundamentos de farmacobotânica*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

PILLAR, V. D. Interações entre organismos, fatores de ambiente e formação de comunidades vegetais. UFRGS, Departamento de Botânica, 1994.

RICCO, R.A., et al. Modificación en el perfil de polifenoles de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz et Pav.) Tiegh. (Loranthaceae) infectado por “cochinilla” (Homoptera - Lecanidae). *Latin American Journal of Pharmacy*. v.27, n.2, p.258-62, 2008.

RIZZINI, C. T. **Lorantaceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues (Flora Ilustrada Catarinense) p. 44, 1968.

ROBERTS II, L.J; MORROW, J.D. Analgésico-antipiréticos, agentes anti-inflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill do Brasil, 2004.

ROTTA, E. *Erva-de-passarinho (Loranthaceae) na arborização urbana: Passeio Público de Curitiba, um estudo de caso*. Curitiba. 135f. Tese (Doutorado em

Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ROTTA, E. *Autotrofia em Tripodanthus acutifolius (Ruiz & Pav.) Thiegh (erva-de-passarinho) um registro*. Comunicado Técnico, ISSN 1517-5030. Embrapa. Colombo (PR), 2004.

ROTTA, E., et al. *Reconhecimento prático de cinco espécies de erva-de-passarinho na arborização de Curitiba, PR*. Colombo: Embrapa Florestas, 2005.

ROTTA, E.; ARAUJO, A. J. de; OLIVEIRA, Y. M. M. de. *A Infestação da Vegetação Arbórea do Passeio Público de Curitiba, Paraná, por Erva-de-passarinho: Um Estudo de Caso*. Colombo: Embrapa, 2006.

RUSSEL, R.V; NICKRENT, D.L. Evolutionary relationships in the showy mistletoe family (Loranthaceae). *American Journal of Botany*, v.95, n.8, p.1015-1029, ago, 2008.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES. M.O.; SCHENKEL, E P; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p.615-656, 2004.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.54, p.7–10, 1999.

SILVA, F.N. dos S; CONCEIÇÃO, G.M. da; ALMEIDA, D.B. de. Ocorrência da Família Loranthaceae no Município de Caxias, Maranhão, Brasil. *Caderno de Geociências*. v.7, n.2, p.131-135, 2010.

Sistema APG III – Disponível em [http://pt.wikipedia.org/wiki/Sistema APG III](http://pt.wikipedia.org/wiki/Sistema_APG_III); Acessado em 06/02/2014.

SOBERÓN, J.R., et al. *Tripodanthus acutifolius* and *Psittacanthus cuneifolius*: Loranthaceae. Sources of natural antimicrobials. *Molecular Medicinal Chemistry*, v.11, p. 24-25, 2006.

SOBERÓN, J.R., et al. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, v.102, p.1450-1461, 2007.

SOBERÓN, J.R., et al. Purification and identification of antibacterial phenolics from *Tripodanthus acutifolius* leaves. *Journal of Applied Microbiology*, v.108, p.1757-1768, 2010a.

SOBERÓN, J.R., et al. Study of antiinflammatory activity of metabolites isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *Molecular Medicinal Chemistry*, v.21, p.88-90, 2010b.

SOBERÓN, J.R., et al. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.130, p.329-333, 2010c.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p.289-326, 2004.

TAINTER, F. H 2002. What does mistletoes have to do with Christmas? Feature Story. St. Paul: Disponível em: <<http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Mistletoe.aspx>> Acessado em: agosto 2010.

TATTAR, T. A. *Diseases of Shade Trees*. New York: Academic, 361 p., 1978.

TAVARES JÚNIOR, J.B. *Avaliação da potencialidade de sensores remotos na detecção da Loranthaceae (erva-de-passarinho)*. Dissertação (Mestrado em Ciências Geodésicas – Setor de Ciências da Terra) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.42, n.2, p.290-306, 2006.

VENTURELLI, M. Estudos sobre *Struthanthus vulgaris* Mart.: Anatomia do fruto e semente e aspectos de germinação, crescimento e desenvolvimento. *Revista brasileira de Botânica*, São Paulo, v.4, n.2, p.131-47, 1981.

VIEIRA, O.M.C.; et al. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15, n.2, p.149-154, 2005.

XIA, E.Q., WANG, B.W., XU, X.R., ZHU, L., SONG, Y., LI, H.B. Microwave-Assisted Extraction of Oleanolic Acid and Ursolic Acid from *Ligustrum lucidum* Ait. *Int. J. Mol. Sci.* v.12, p.5319-5329, 2011.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2. ed. Berlin: Springer, 1995.

WANG, H; KEITH, H; XIAOQING, Y. Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in Green tea using HPLC. *Food Chemistry*. p.115-121, 2000.

YANG, N.Y. et al. Secoiridoid Constituents from the Fruits of *Ligustrum lucidum*. *Helvetica Chimica Acta*. v.93, p.65-71, 2010.

ZANGH, Y. et al. New secoiridoids from the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait with triglyceride accumulation inhibitory effects. *Fitoterapia*. v.91, p.107-112, 2013.

ZUANAZZI, J. A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES. M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, p.577-614, 2004.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – Cópia da autorização para coleta de *Tripodanthus acutifolius*




Município de Santa Cruz do Sul
Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Saneamento
 Rua Galvão Costa 708, – Fone (51) 3902-3511 – Cep 96810-193 - Centro - Santa Cruz do Sul - RS
semmas@santacruz.rs.gov.br

AUTORIZAÇÃO PARA MANEJO DA ARBORIZAÇÃO URBANA Nº 282/2010/SEMMA

A Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Saneamento, criada pela Lei complementar Nº 376 de 15/02/08, e conforme Lei Ambiental Municipal Nº 3.705 de 17/05/01, no uso das atribuições que lhe confere a Resolução CONAMA Nº 237, de 19/12/97, alterando a Lei Nº 6.938, de 31/08/81, que dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, regulamentada pelo Decreto Nº 99.274, 06/06/90 e com base na Resolução CONSEMA Nº 102, de 24/05/05, definindo o licenciamento ambiental de impacto local, conforme convenio firmado entre o Município e a Fundação Estadual de Proteção Ambiental – FEPAM de 03/09/07 definindo a ampliação nas atribuições do licenciamento ambiental e de acordo com análise prévia, conforme solicitação e após vistoria realizada, autoriza **Chana Medeiros da Silva** o seguinte:

Tipo de manejo: coleta

Quantidade: ilimitado

Espécie: erva de passarinho (*Tripodanthus* sp.)

Localização: área

Telefone: 3717-7399 e 9989-7067

4. ENCAMINHAMENTO:
 PARECER COM VISTÁS A(O): (x) AUTORIZAÇÃO PARA COLETA () INDEFERIMENTO

VISTO OS SEGUINTE MOTIVOS:

- Fins de pesquisa em fitoquímicos e farmacológicos

CONDIÇÕES E RESTRIÇÕES:

- Fica autorizada a coleta de *Tripodanthus* sp. (erva-de-passarinho) na área urbana de Santa Cruz do Sul.
- Na remoção do material coletado não poderá ser danificada a vegetação próxima. Porém, fica autorizada a remoção das porções de árvores desvitalizadas, caso não seja possível realizar a coleta de outra forma – neste caso, os resíduos deverão ser recolhidos e encaminhados pelo coletor.

Santa Cruz do Sul, 04 de outubro de 2010.


 José Francisco Antunes
 Secretário de Meio Ambiente e Saneamento Executivo
 SEMMA

1

ANEXO B - Exsicata de *Tripodanthus acutifolius* depositada no Instituto de Ciências Naturais (ICN) da UFRGS



ANEXO C – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* ATRAVÉS DO MÉTODO DE DPPH DE *Tripodanthus acutifolius* (RUIZ & PAV.) TIEGH. EM DIFERENTES HOSPEDEIROS

Camila de Aguiar Melo^a; Jéssica Elena Severo^b; Juliana Maria Grunner^b; Chana de Medeiros da Silva^{c,d}, Lisianne Brittes Benitez^c; Dinara Jaqueline de Moura^c; Gilsane de Lino Von Poser^d; José Ângelo Silveira Zuanazzi^d

^aCurso de Ciências Biológicas, Universidade de Santa Cruz do Sul, Av. Independência, 2293, Bairro Universitário, CEP: 96815-900, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

^bCurso de Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul, Av. Independência, 2293, Bairro Universitário, CEP: 96815-900, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

^cDepartamento de Biologia e Farmácia, Universidade de Santa Cruz do Sul, Av. Independência, 2293, Bairro Universitário, CEP: 96815-900, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.

^dPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 1º andar, CEP: 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract

EVALUATION *IN VITRO* OF ANTIOXIDANT ACTIVITY BY DPPH METHOD OF *Tripodanthus acutifolius* (RUIZ & PAV.) TIEGH. ON DIFFERENT HOSTS

The present study analyzed the antioxidant activity of five samples of *Tripodanthus acutifolius* and their respective hosts, aiming to establish a correlation between the activity of hemiparasitics and their hosts. The antioxidant activity of extracts was evaluated using the DPPH assay system in 30 minutes, at concentrations of 500, 250, 125, 50, 25, 10 and 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, using as the positive control ascorbic acid. *T. acutifolius* presented satisfactory antioxidant activity with IC_{50} values near to the positive control, with no influences of the activity attributed to the hosts.

Keywords: *Tripodanthus acutifolius*, DPPH, antioxidant activity, hosts

1 INTRODUÇÃO

Os radicais livres são átomos ou moléculas que perderam um elétron de sua camada mais externa, conferindo a estes uma característica de alta reatividade.¹ As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas à partir da redução incompleta do oxigênio até a formação de água, podendo ocasionar danos às macromoléculas biológicas devido a sua redução incompleta.^{2,3} Os antioxidantes são substâncias que, presentes em baixas concentrações, possuem a função de inibir ou atrasar a oxidação de substratos oxidáveis.⁴

Podem ser de origem endógena, onde as enzimas superóxido-dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) agem de forma preventiva, impedindo ou controlando a formação de radicais livres.^{3,5} Além dos antioxidantes enzimáticos, participam do sistema de defesa os antioxidantes exógenos, que são produtos naturais ou sintéticos incorporados à dieta, como as vitaminas C e E, os flavonóides e carotenóides.⁴ Um dos métodos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante é através do método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Quando em contato com um agente antioxidante ou uma espécie radicalar, o DPPH (coloração violeta) é reduzido, formando difenil-picril-hidrazila (coloração amarela), com conseqüente desaparecimento da absorção, sendo monitorado pelo decréscimo da absorvância.^{6,7}

Tripodanthus acutifolius, família Loranthaceae, é uma espécie popularmente conhecida como “Erva-de-passarinho”, por ter os pássaros como principal agente disseminador de suas sementes.⁸ É uma planta hemiparasita, ou seja, possui folhas normais com estômatos e clorofila, capaz de realizar fotossíntese e metabolizar as substâncias orgânicas necessárias para o seu desenvolvimento; além de absorver os elementos minerais da planta hospedeira, utilizando-se da seiva bruta desta, por meio de seus haustórios.⁸ Os pássaros utilizam os frutos para sua alimentação e após regurgitação ou defecação, a semente liberada adere-se a planta hospedeira por possuir uma camada de substância mucilaginosa, denominada vicina, germinando imediatamente e emitindo uma radícula que se transformará nos haustórios.^{9,10,11} A infestação intensa da “Erva-de-passarinho” causa ao seu hospedeiro perda da qualidade, baixa produção de frutos, podendo ocasionar a morte prematura, sendo que a única forma de controle sem grandes prejuízos ao hospedeiro é através de sua poda.^{11,12,13} Apesar dos efeitos danosos ocasionados aos seus hospedeiros *T.acutifolius* é muito utilizada na cultura popular para o tratamento de diferentes enfermidades. Com base nesta utilização popular, diferentes grupos de pesquisa intensificaram os estudos com esta planta, atribuindo-lhe até o momento, as propriedades diurética, antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante.^{14,15,16,17,18,19,20,21}

Quanto aos seus constituintes químicos, quatro glicoflavonóides (rutina, nicotiflorina, hiperosídeo e isoquercetrina), juntamente com uma raro fenilbutanóide glicosilado (tripodantosídeo) foram isolados e purificados a partir desta espécie, sendo estes os prováveis compostos ativos relacionados às suas propriedades.¹⁹

O presente estudo visou avaliar e comparar o potencial antioxidante das amostras de *Tripodanthus acutifolius*, bem como de seus cinco diferentes hospedeiros através do método de sequestro do radical DPPH, para verificar uma possível relação do potencial antioxidante dos hospedeiros para com esta planta hemiparasita.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.2 Obtenção dos extratos

Os extratos metanólicos brutos (EMB) das cinco amostras de *Tripodanthus acutifolius* e de seus respectivos hospedeiros (Tabela 1) foram obtidos através da técnica de maceração na concentração de 1:10 (droga:solvente) por um período de cinco dias. Após, os líquidos extrativos foram filtrados, concentrados em evaporador rotatório (Marconi[®] MA120) e em seguida liofilizados (Eduards[®] Modulyo 4K).

Tabela 1. Classificação das amostras de *T. acutifolius* e de seus respectivos hospedeiros

| Nº | Hemiparasita | Hospedeiro |
|----|----------------------|-------------------------------------|
| 01 | <i>T.acutifolius</i> | <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck |
| 02 | <i>T.acutifolius</i> | <i>Citrus aurantium</i> L. |
| 03 | <i>T.acutifolius</i> | <i>Ligustrum lucidum</i> W.T.Ainton |
| 04 | <i>T.acutifolius</i> | <i>Pyrus communis</i> L |
| 05 | <i>T.acutifolius</i> | <i>Melia azedarach</i> L. |

2.3 Preparo das amostras

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi determinada seguindo a metodologia descrita na literatura,^{7,22} com pequenas modificações. Primeiramente, foram preparados 250 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram realizadas soluções estoques dos EMBs de *T. acutifolius* e de seus hospedeiros na concentração de 500 µg/mL, sendo diluídas nas concentrações de 250 µg/mL, 125 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 10 µg/mL e 5 µg/mL.

As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,6 mL de cada extrato nas diferentes concentrações e 5,4 mL da solução estoque de DPPH) foram lidas em duplicata em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1601) a 515 nm, no tempo 30 minutos após o acréscimo do reagente, sendo que, durante este período as amostras foram mantidas ao abrigo da luz. O branco específico das amostras foi determinado usando-se da mistura de metanol (5,4 mL) e dos extratos (0,6 mL) em todas as concentrações analisadas. Como controle negativo foi utilizado 5,4 mL de DPPH em 0,6 mL de metanol, e como controle positivo foi utilizado a vitamina C nas mesmas concentrações (0,6 mL de Vit. C e 5,4 mL de DPPH).

2.4 Análise da atividade antioxidante

Os valores de absorvância das amostras registrados em todas as concentrações testadas no tempo de 30 minutos foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) determinada pela seguinte equação:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right\}$$

A concentração inibitória, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CI₅₀) foi determinada a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abscissa as concentrações das amostras (µg/mL) ou do controle positivo, e na ordenada a atividade antioxidante (%).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade antioxidante de *Tripodanthus acutifolius*

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos EMBs das cinco amostras de *T. acutifolius* nas diferentes concentrações determinada pelo ensaio do DPPH, atribuiu a esta hemiparasita um importante potencial antioxidante com valores superiores a 94% na concentração de 500 µg/mL (Figura 1). Tanto para as amostras de *T. acutifolius* como para o controle positivo (Vit. C) foi possível observar um acréscimo da atividade proporcional à concentração caracterizando-as como DPPH dose-dependente, ou seja, um aumento da proteção antioxidante com o aumento da concentração da amostra.

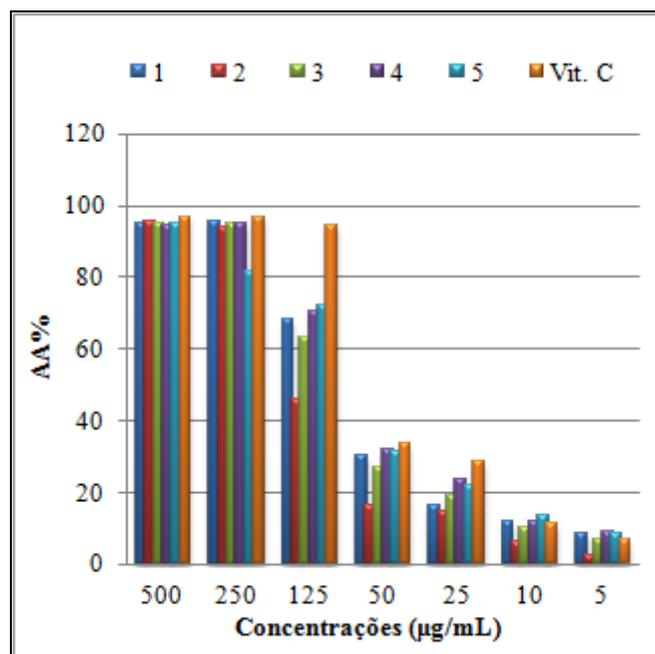


Figura 1. Potencial antioxidante (AA%) do extrato metanólico bruto das amostras de *T. acutifolius*

Legenda: 1) *T. acutifolius* de *Citrus sinensis*; 2) *T. acutifolius* de *Citrus aurantium*; 3) *T. acutifolius* de *Ligustrum lucidum*; 4) *T. acutifolius* de *Pyrus communis*; 5) *T. acutifolius* de *Melia azedarach*

Sendo o DPPH um radical próton com característica de absorção diminuindo significativamente quando exposto a um composto que sequestre este radical, a porcentagem de atividade antioxidante corresponde a quantidade do radical consumida pela amostra.²³ Desta forma, os resultados apresentados na Figura 1 mostram que os extratos de *T. acutifolius* possuem atividade sequestradora do radical DPPH, pois quando comparados com a vitamina C apresentaram boa capacidade de redução do mesmo, com valores que variaram de 94,5% a 95,4% entre os cinco extratos *versus* 96,7% da vitamina C na concentração de 500 µg/mL.

A potencial ação antioxidante de *T. acutifolius* pode ser atribuída aos compostos fenólicos descritos para a espécie, sendo estes, quatro flavonóides (rutina, nicotiflorina, hiperosídeo, isoquercetrina) e um raro fenilbutanóide glicosilado (tripodantosídeo).^{19,20,21} Estes polifenóis são compostos oriundos do metabolismo secundário das plantas, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, sendo quimicamente doadores de elétrons, por apresentarem estruturas químicas conjugadas em anéis, ricos em grupos hidroxila, capazes de reagirem ou inativarem os radicais livres através da doação de H⁺.²⁴

Algumas variações dos valores da atividade antioxidante (AA%) apresentados nas concentrações de 125 µg/mL e de 250 µg/mL podem dever-se ao fato de que estas espécies vegetais foram coletadas em lugares e períodos do ano diferentes, e fatores como

sazonalidade, período de desenvolvimento, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, dentre outros está intimamente relacionada à produção de metabólitos secundários, o que possivelmente originou tais variações.²⁵

A quantidade de extrato das diferentes amostras de *T. acutifolius* necessárias para inibir a atividade do radical DPPH em 50% (CI₅₀) (Tabela 2), variou de 4,1 a 4,6 µg/mL, com um valor de 3,9 µg/mL para a vitamina C. Em um estudo anterior foram registrados valores de CI₅₀ que variaram de 2,7 a 6,3 µg/mL para os diferentes compostos fenólicos isolados de *T. acutifolius*.²⁰

Tabela 2. Valores de CI₅₀ do extrato metanólico bruto das amostras de *T. acutifolius*

| Amostras | Eq. Reta | CI ₅₀ (µg/mL) |
|------------|---|-----------------------------|
| 01 | y = 17,057x - 21,629 R ² = 0,9042 | 4,2 |
| 02 | y = 17,304x - 29,929 R ² = 0,862 | 4,6 |
| 03 | y = 17,018x - 22,771 R ² = 0,9089 | 4,3 |
| 04 | y = 16,732x - 18,857 R ² = 0,9214 | 4,1 |
| 05 | y = 15,957x - 17,443 R ² = 0,9322 | 4,2 |
| Vitamina C | y = 18,064x - 19,714 R ² = 0,8829 | 3,9 |

Legenda: 1) *T. acutifolius* de *Citrus sinensis*; 2) *T. acutifolius* de *Citrus aurantium*; 3) *T. acutifolius* de *Ligustrum lucidum*; 4) *T. acutifolius* de *Pyrus communis*; 5) *T. acutifolius* de *Melia azedarach*.

3.2 Atividade antioxidante dos hospedeiros

A partir da avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos EMBs dos cinco respectivos hospedeiros de *T. acutifolius* (*C. sinensis*, *C. aurantium*, *L. lucidum*, *P. communis* e *M. azedarach*), foi possível detectar atividade sequestradora do radical DPPH nas amostras 03 (*L. lucidum*) e 04 (*P. communis*), principalmente na concentração de 500 µg/mL, não sendo possível observar os mesmos resultados nas amostras 01 (*C. sinensis*), 02 (*C. aurantium*) e 05 (*M. azedarach*) (Figura 2). Já nas subseqüentes concentrações das amostras 03 e 04, houve um decréscimo significativo desta atividade não compatível com o da vitamina C; apesar deste declínio, estas amostras também puderam ser classificadas

como DPPH dose-dependente, pois obtiveram um aumento da atividade proporcional à concentração.

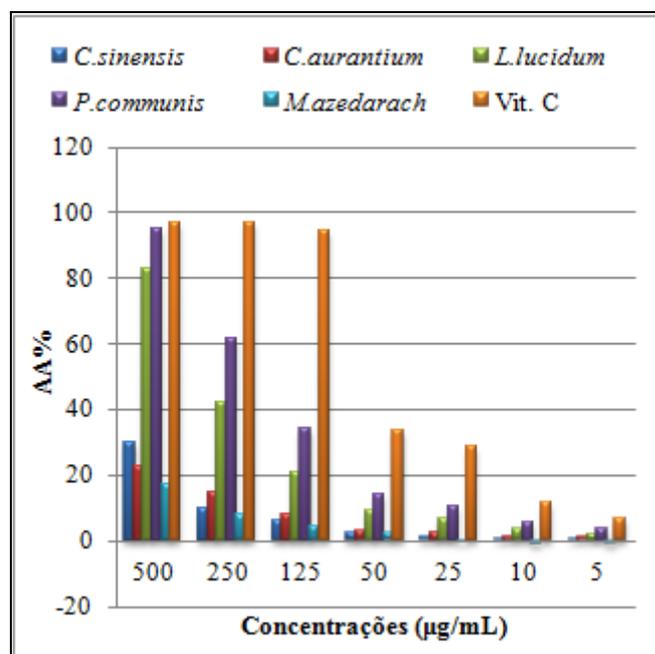


Figura 2. Potencial antioxidante (AA%) do extrato metanólico bruto dos hospedeiros de *T. acutifolius*

A potencial ação antioxidante de *P. communis* pode ser atribuída à vitamina C, aos flavonóides e ácidos fenólicos presentes na espécie.²⁶ Já *L. lucidum* é muito utilizada como chá terapêutico na cultura popular chinesa, e estudos farmacológicos atribuíram a diferentes espécies de *Ligustrum* as atividades antioxidante, antimutagênica, hepatoprotetora e neuroprotetora; atividades estas atribuídas principalmente aos fenilpropanóides e flavonóides presentes.²⁷

A quantidade de extrato dos diferentes hospedeiros necessária para inibir a atividade do radical DPPH em 50% (CI_{50}) apresentou-se mais elevada do que a CI_{50} dos extratos de *T. acutifolius*, apresentando valores superiores a 14,0 µg/mL (Tabela 3), caracterizando-os com uma baixa capacidade sequestradora do radical DPPH. A exceção deve-se as amostras de *L. lucidum* com 6,2 µg/mL, e *P. communis* com 5,2 µg/mL que obtiveram os melhores valores frente aos demais hospedeiros, mas quando comparado com a vitamina C e com os EMBs de *T. acutifolius*, ainda apresentaram um baixo potencial antioxidante.

Tabela 3. Valores do CI_{50} do extrato metanólico bruto dos hospedeiros de *T. acutifolius*

| Amostras | Eq. Reta | CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|------------|--|-----------------------------------|
| 01 | $y = 4,0321x - 9$ $R^2 = 0,6772$ | 14,6 |
| 02 | $y = 3,45x - 6,1$ $R^2 = 0,8295$ | 16,3 |
| 03 | $y = 11,886x - 23,629$ $R^2 = 0,7611$ | 6,2 |
| 04 | $y = 14,618x - 26,314$ $R^2 = 0,8398$ | 5,2 |
| 05 | $y = 2,7643x - 6,9143$ $R^2 = 0,8128$ | 20,6 |
| Vitamina C | $y = 18,064x - 19,714$ $R^2 = 0,8829$ | 3,9 |

Legenda: 1) *Citrus sinensis*; 2) *Citrus aurantium*; 3) *Ligustrum lucidum*; 4) *Pyrus communis*; 5) *Melia azedarach*.

3.3 Relação Hemiparasita X Hospedeiro

Apesar da relação ecológica estabelecida entre *T. acutifolius* e seus hospedeiros, a partir dos resultados do potencial antioxidante das amostras (Figura 3), observou-se que tal atividade é um fator intrínseco a hemiparasita, ou seja, o incremento da atividade do hospedeiro, e por consequência, a maior concentração de compostos antioxidantes destes, não influenciou diretamente na quantidade dos constituintes químicos da planta hemiparasita.

CONCLUSÃO

Os diferentes extratos metanólicos brutos de *Tripodanthus acutifolius* apresentaram uma importante capacidade sequestradora do radical DPPH, atingindo valores de atividade superiores a 94% e com valores de CI_{50} próximos aos da vitamina C.

Entre os hospedeiros de *T.acutifolius*, somente as amostras 03 (*L.lucidum*) e 04 (*P.communis*) apresentaram consideráveis valores de atividade antioxidante na concentração de 500 µg/mL. Já as amostras 01(*C.sinensis*), 02 (*C.aurantium*) e 05 (*M.azedarach*) não obtiveram valores satisfatórios em nenhuma das concentrações analisadas, concluindo-se, portanto que o potencial antioxidante da hemiparasita *T. acutifolius* não sofreu influência de seus hospedeiros.

A partir dos resultados obtidos, fica evidente a necessidade de estudos adicionais e *in vivo* para confirmar a potencial ação antioxidante dos constituintes de *T.acutifolius*, bem como definições de doses efetivas, afim de que esta espécie possa ser utilizada como futuro medicamento para uso na terapêutica em seres humanos. Ainda, sugerem-se estudos para avaliar a atividade antioxidante em diferentes estações do ano, para observar possíveis interferências do fator sazonalidade nos constituintes ativos da planta.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CNPq, CAPES e FAPERGS pelo apoio financeiro proporcionado.

REFERÊNCIAS

- 1- Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S.; *Rev. Assoc. Med. Bras.* **1997**, *43*, 61.
- 2 - Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.;; *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.
- 3 – De Las Heras, N.; Sanz-Rosa, D.; Miana, M.; Martín, B.; Cachofeiro, V.; Lahera, V.; *Clin. Invest. Arterioscl.* **2005**, *17 supl.*, 23.
- 4 - Bianchi, M. L. P.; Antunes, L. M. G.; *Rev. Nutr.* **1999**, *12*, 123.
- 5- Barbosa, K. B. F.; Costa, N, M, B.; Alfenas, R. C. G.; Paula, S. O.; Minim, V. P. R.; Bressan, J. *Rev. Nutr.* **2010**, *23*, 629.
- 6 –Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E; Berset, C; *Lebensm. – Wiss. Technol.* 1995, *28*, 25.
- 7 - Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr, 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.; *Quim. Nova*, **2007**, *30*, 351.

- 8 - Rotta, E; Oliveira, Y. M. M; Araújo, A.J.; Inoue, M. T. *Reconhecimento prático de cinco espécies de Erva-de-passarinho na arborização de Curitiba, PR*. Colombo: Embrapa Florestas, 2005.
- 9 - Barcik, C.; Vashchenko, Y.; Favoreto, D. E.; Biondi, D. *Congresso Brasileiro de Arborização Urbana*, 6, Goiânia: SBAU, Brasil, 2002.
- 10 - Cazetta, E; Galetti, M.; *Revista Brasil.Bot.*, **2007**, *30*, 345.
- 11 - Leal, L.; Bujocas, W. M.; Biondi, D. *Floresta*, **2006**, *36*, 323.
- 12- Arruda, R.; Carvalho, L, N.; Del-Claro, K.; *Flora*. **2006**, *201*, 127.
- 13 - Caires, C. S.; Uchôa-Fernandes, M. A.; Nicácio, J.; Strikis, P. C. *Revista Brasileira de Entomologia*, **2009**, *53*, 272.
- 14 - Intersimone, N. H; Thoene, A. D; Riera, A. S. *Rev. Cubana Plant. Med.* **2005**, *10*, 3.
- 15 - Daud, A; Gallo, A; Riera, A.S. *Journal of Ethnopharmacology*, **2005**, *99*, 193.
- 16 - Daud, A; Habib, N; Riera, A. S. *Journal of Ethnopharmacology*, **2006**, *108*, 198.
- 17 - Soberón, J. R.; Sgariglia, M. A.; Sampietro, D. A.; Quiroga, E. N.; Vattuone, M. A. *Molecular Medicinal Chemistry*, **2006**, *11*, 24.
- 18 - Soberón, J. R.; Sgariglia, M. A.; Sampietro, D. A.; Quiroga, E. N.; Vattuone, M. A. *Journal of Applied Microbiology*, **2007**, *102*, 1450.
- 19 - Soberón, J. R.; Sgariglia, M. A.; Sampietro, D. A.; Quiroga, E. N.; Sierra, M. G.; Vattuone, M. A. *Journal of Applied Microbiology*, **2010**, *108*, 1757.
- 20 - Soberón, J. R.; Sgariglia, M. A.; Sampietro, D. A.; Quiroga, E. N.; Vattuone, M. A. *Journal of Ethnopharmacology*, **2010**, *130*, 329.
- 21 - Soberón, J. R.; Sgariglia, M. A.; Sampietro, D. A.; Quiroga, E. N.; Vattuone, M. A. *Molecular Medicinal Chemistry*, **2010**, *21*, 88.
- 22 - Luzia, D.M. M; Jorge, N. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **2010**, *30*, 489.
- 23 - Barbosa, D. B. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil, 2008.
- 24 - Machado, H.; Nagem, T. J.; Peters, V. M.; Fonseca, C. S.; Oliveira, T. T. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, **2008**, *27*, 33.
- 25 – Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. *Quim. Nova*, **2007**, *30*, 374.
- 26- Bof, C. M. J.; Fontana, R. C.; Piemolini-Barreto, L. T.; Sandri, I. G. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2012**, *55*, 107.
- 27 - Wu, C.; Lin, W.; Hseu, Y.; Lien, J.; Lin, Y.; Kuo, T.; Ching, H. *Food Chemistry*, **2011**, *127*, 564.

ANEXO D - Protocolo das atividades anti-inflamatória e genotóxica de *Tripodanthus acutifolius* aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL – UNISC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPPG
COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISC

PARECER DA CEUA - UNISC

Prezado Professor,

Após análise da atividade acadêmica submetida como projeto de pesquisa, intitulada “Análise do Perfil Fitoquímico e das Atividades Anti-inflamatórias e Genotóxica de *Tripodanthus acutifolius*” e protocolada sob o número 03/2011, a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNISC considera o **protocolo aprovado** no que se refere o cumprimento do disposto na legislação nacional aplicável à utilização de animais para o ensino e a pesquisa.

Atenciosamente,

Coord. Comitê de Ética no Uso de Animais
UNISC

Santa Cruz do Sul, 18 de maio de 2011.

ANEXO E – Protocolo da atividade antiúlcera gástrica de *Tripodanthus acutifolius* aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SANTA CRUZ DO SUL – UNISC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPPG
COMISSÃO DE ÉTICA PARA USO DE ANIMAIS – CEUA/UNISC

PARECER DA CEUA - UNISC

Prezado Professor,

Após análise da atividade acadêmica submetida como projeto de pesquisa, intitulada “Avaliação da atividade antiúlcera gástrica de *Tripodanthus acutifolius* (Ruiz & Pavón) Tieghem em ratos” e protocolada sob o número 11/2012, a Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNISC considera o **protocolo aprovado** no que se refere o cumprimento do disposto na legislação nacional aplicável à utilização de animais para o ensino e a pesquisa.

Atenciosamente,


Coord. Comitê de Ética no Uso de Animais
UNISC

Santa Cruz do Sul, 06 de Dezembro de 2012.