

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

ESTUDO QUÍMICO- FARMACOLÓGICO DE *Operculina macrocarpa*
L. Urb. (CONVOLVULACEAE)

DANIELE CARVALHO MICHELIN

Araraquara - SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

**ESTUDO QUÍMICO-FARMACOLÓGICO DE *Operculina macrocarpa*
(L.) Urb. (CONVOLVULACEAE)**

DANIELE CARVALHO MICHELIN

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. WAGNER VILEGAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara - SP

2008

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M623e Michelin, Daniele Carvalho
Estudo químico-farmacológico de *Operculina macrocarpa* (L) Urb.
(Convolvulaceae). / Daniele Carvalho Michelin. – Araraquara, 2008.
144 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

Co-orientador: Wagner Vilegas

1.Operculina macrocarpa. 2.Convolvulaceae. 3.Batata-de-purga.
4.Laxante. 5.Antioxidante. I.Salgado, Hérica Regina Nunes,
orient..II.Vilegas, Wagner, co-orient.. Título.

CDD: 615.1

CAPES: 40300005

DANIELE CARVALHO MICHELIN

ESTUDO QUÍMICO-FARMACOLÓGICO DE *Operculina macrocarpa* (L.)
Urb. (CONVOLVULACEAE)

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado

Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud

Profa. Dra. Dominique Corine Hermine Fischer

Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima

Araraquara, 28 de janeiro de 2008.

DEDICATÓRIA

A Deus:

“Agradeço pela vida, pela proteção e pela oportunidade de realizar mais esse sonho.”

“Que eu não perca a vontade de ser grande, mesmo sabendo que o mundo é pequeno...

E acima de tudo, que eu jamais me esqueça que Deus me ama infinitamente!

Que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois...

A VIDA É CONSTRUÍDA NOS SONHOS E CONCRETIZADA NO AMOR.”

Francisco Cândido Xavier

Aos meus pais, Luci e Luiz Antonio, e ao meu irmão Danilo, meus pilares de sustentação:

“Mãe..., minha linda, quero agradecer primeiramente pelo seu amor incondicional, por entender a minha ausência nesses anos todos, agradecer também por todos os momentos que passamos juntas e que me fizeram uma pessoa mais determinada, e ainda pelo colo nos momentos de tristeza, ansiedade e desânimo. Agradeço a Deus por ter você como minha mãe”.

“Pai... nesse momento fica difícil encontrar palavras que expressem a minha gratidão por tudo que sempre fez por mim. Dedico toda a minha alegria desse momento a você, que sempre me incentivou e me deu forças para continuar lutando mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo amor, carinho e pela sua dedicação para me ver sempre feliz. Você é o melhor pai do mundo!”

“Danilo... Lô... não poderia deixar de dedicar esse meu trabalho a você, meu querido e amado irmão, que esteve sempre ao meu lado, me fazendo rir e me dando forças para continuar lutando pelos meus objetivos. Jamais me esquecerei de tudo que sempre fez para me ajudar a realizar meus sonhos. Obrigada pelo amor, carinho e compreensão. Amo você!”

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, minha querida orientadora, pelos valiosos ensinamentos, pela dedicação a esse trabalho e principalmente pela sua amizade.

“Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório, por ter acreditado em mim e no meu trabalho e principalmente pela contribuição ao meu crescimento profissional. Levarei sempre comigo seu exemplo de determinação e profissionalismo. Do fundo do meu coração, muito obrigada, devo muito do que sou hoje a você”.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, meu co-orientador, pela amizade, pela força, pelos preciosos conhecimentos transmitidos e por ter abraçado esse trabalho com tanto entusiasmo.

“Serei eternamente grata a tudo que fez por mim e por esse trabalho, colocando nele um pouco de você. Muito obrigada!”

À Dra. Miriam Sannomiya, pela paciência em ensinar química a uma farmacêutica com tanto carinho e dedicação, por todos os momentos que passamos juntas e principalmente pela sua amizade tão especial.

“Jamais me esquecerei da sua alegre companhia no laboratório, nos congressos e viagens. Foram momentos muito especiais; você é única!”

Obrigada por existir na minha vida!”

À Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos, pela dedicação, entusiasmo e pelo amor que dedica a tudo que faz e principalmente pela sua amizade.

“Levarei por toda minha vida o exemplo de amor, dedicação e perseverança que você me deu, obrigada por tudo!”

Ao Prof. Dr. Luis Vitor Silva Sacramento, pela orientação nas análises botânicas e principalmente pela amizade.

“Sua alegria contagiante sempre me deu forças para continuar perseverando apesar das dificuldades, obrigada!”

Ao Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud, por ter me apresentado ao mundo da pesquisa, pelo constante incentivo e por ter se tornado um amigo tão especial.

“Obrigada pela confiança em mim depositada, e pelo constante incentivo para que eu continuasse na pesquisa, valeu a pena!”

À Maria de Fátima Rodrigues, técnica do Laboratório de Controle Biológico de Fármacos e Medicamentos pela ajuda imprescindível na realização deste trabalho e pela sincera amizade.

“Muito obrigada pelas palavras doces nos momentos mais difíceis e pelos conselhos de amiga. Sem a sua ajuda eu não teria chegado até aqui!”

Ao querido amigo Daniel Rinaldo, doutorando do Instituto de Química, pela valiosa ajuda nas análises por HPLC e principalmente pela amizade.

“Obrigada pela paciência, pelos conhecimentos transmitidos e por todos os momentos de descontração que passamos juntos no laboratório”.

À minha querida prima **Cibele Michelin Fabrice**, pela amizade em todos esses anos que estamos juntas, pelo seu amor, carinho, compreensão e dedicação.

“Jamais me esquecerei da sua mão estendida nos momentos em que eu mais precisei de ajuda e de todas as suas risadas que tornaram esses anos da minha vida mais alegres”.

À amiga **Andrea Cristina de Lima**, por estar sempre ao meu lado, desde a iniciação científica, dividindo comigo todos os momentos de angústia e de desânimo me dando forças e também por compartilhar comigo os momentos de alegria.

“Obrigada por estar sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando, sua amizade me fortalece!”

Às minhas amigas **Cristina Maria Franzini** e **Luana Cardoso de Oliveira** por todos os momentos que passamos juntas na faculdade e na nossa casa, pelo carinho, compreensão e principalmente pela sincera amizade.

“Obrigada por tornarem todos os momentos mais doces; são amigas muito especiais, nunca me esquecerei da força que me deram quando precisei.”

“Amigos são anjos que nos deixam em pé quando nossas asas têm problemas em se lembrar como voar...”

Sylene Rayub

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, especialmente aos meus avós, Anísio (*in memorian*) e Judith, Guilherme e Regina, pelo amor, carinho e por suas orações que sempre me fortaleceram.

A todos os meus tios, em especial à minha tia e madrinha “Tata” pelo exemplo de determinação e coragem e por me fazer acreditar que esse sonho poderia ser real.

A todos os meus queridos primos, especialmente à minha prima Marina pela alegria dos momentos de descontração.

À tia Gelza, pelo amor de “mãe” e pelas orações que iluminam o meu caminho.

Às amigas Carol Querino, Déa Maria, Ludmilla, Mariana e Silvinha, sempre presentes apesar da distância, e à Carol Ribeiro e Nina por me permitirem fazer parte de suas famílias.

Aos amigos Thiago, Gabi e Diana pelo carinho e principalmente pela amizade.

Aos meus “sobrinhos” Matheus Bonazzi e Matheus Sannomiya de Mello, pela alegria que trouxeram à minha vida.

Aos queridos amigos Rose, Otair, Letícia e Rafael, por terem compartilhado comigo os momentos de felicidade e principalmente pela força em todos os momentos que precisei.

Ao Eduardo, pelo constante incentivo e principalmente pelos momentos que passamos juntos.

Aos amigos dos meus pais, meus queridos “tios”, pela torcida para mais esta conquista.

À toda equipe da Flores & Ervas Produtos Naturais Ltda, pelo apoio e compreensão.

Aos meus amigos da pós-graduação, Ana Luisa, Andréa, Arnóbio, Cris, Cristiani, Fabrício, Flávia, Giselle, Greici, Gustavo, Juliana, Karen, Kelly, Ketylin, Mariana, Marlus, Priscila, Priscileila, Rubiana, Tatiane, Thalita e Traudi por transformarem os desafios da pesquisa em força e determinação, as quais foram indispensáveis para conclusão desse trabalho.

Um agradecimento carinhoso às minhas amigas Cristina, Helen, Luana e Mara pela convivência e pela companhia tão agradável.

Aos meus amigos do Instituto de Química, Adriana, Ana Lúcia, Carol, Clenilson, Daniele, Juliana Rodrigues, Juliana Severi, Luis Fernando, Marcelo, Márcio, Roberta, Tâmara e Viviane pela agradável convivência e pela ajuda no Laboratório de Fitoquímica.

Às estagiárias Danielli Kumagai e Suellen Finatti, pela preciosa ajuda e pela amizade.

Aos técnicos de laboratório Angélica, Luis Eduardo, Margareth e Valéria, pela ajuda essencial na realização deste trabalho.

Aos professores Dra. Sonia Piacente e Dr. Cosimo Pizza, da Universidade Degli Studi di Salerno, Itália, pela realização dos experimentos de MS.

À Dra Virginia Carbone do Centro de Spettrometria di Massa Proteomica e Biomolecolare, Istituto dell'Alimentazione, Avellino, Itália, pelos espectros de massas.

Ao Prof. Dr. João Olímpio Tognolli, pelas análises estatísticas, pela paciência e pela ajuda.

Ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, pelas análises bioquímicas.

Aos professores que fizeram parte da banca do exame de qualificação, Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello e Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos, pelas sugestões que foram de grande valia para o enriquecimento deste trabalho.

Aos professores que participaram da banca de defesa pelo tempo e atenção dedicados à leitura deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca e secretaria do Departamento, Ana, Irani, Maximiliano, Moacir e Queila, pelo carinho com que nos atendem.

À Cláudia, Laura e Sônia, da secretaria de Pós-Graduação, pela dedicação e paciência.

À CAPES, pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização de mais este sonho,
o meu sincero reconhecimento. Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	16
LISTA DE TABELAS.....	19
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	21
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
I – INTRODUÇÃO.....	23
II – REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1. Sistemática vegetal.....	29
2.1.1. A família Convolvulaceae	29
2.1.2. O gênero <i>Operculina</i>	31
2.1.3. A espécie <i>Operculina macrocarpa</i>	32
2.2. Extratos.....	34
2.2.1. Processos extrativos.....	36
2.2.1.1. Maceração	36
2.2.1.2. Percolação	37
2.2.1.3. Decocção	37
2.3. Controle de qualidade.....	38
2.4. Constipação intestinal.....	39
2.5. Avaliação de atividade na motilidade intestinal.....	43
2.5.1. Trânsito intestinal.....	44
2.6. Toxicidade de plantas medicinais	45
2.6.1. Ensaio toxicológicos.....	46
2.7. Atividade antioxidante.....	47
2.7.1. Formação de radicais livres e antioxidantes	48
2.8. Fitoquímica	49
2.8.1. Substâncias fenólicas	53
2.8.1.1. Ácidos fenólicos	55
2.8.1.2. CLAE	55
2.8.1.3. Espectrometria de massas	56
III – OBJETIVOS	57
IV - MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1. Material.....	58
4.1.1. Equipamentos.....	58
4.1.2. Softwares.....	59
4.1.2. Solventes, reagentes e soluções	59
4.2. Métodos.....	61
4.2.1. Preparo do material vegetal.....	61
4.2.2. Caracterização macroscópica.....	61
4.2.4. Controle de qualidade da droga vegetal	63
4.2.4.1 Controle físico-químico	63

4.2.4.1.1	Análise granulométrica	63
4.2.4.1.2	Determinação da densidade aparente	63
4.2.4.1.3	Perda por dessecação	63
4.2.4.1.4	Determinação do pH	64
4.2.4.1.5	Determinação do teor de cinzas totais	64
4.2.4.1.6	Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido	64
4.2.4.1.7	Prova de identificação	65
4.2.4.1.8	Determinação do teor de extrativos	65
4.2.4.2	Controle microbiológico	66
4.2.4.2.1	Contagem total de microrganismos	66
4.2.4.2.2	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp e <i>Escherichia coli</i>	66
4.2.4.2.3	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
4.3	Otimização do processo extrativo	68
4.3.1.2	Determinação do teor de resíduo seco	68
4.3.1.3	Determinação do teor de fenólicos totais (GLASL, 1983)	69
4.3.1.4	Obtenção do extrato	70
4.3.1.5	Obtenção do chá	70
4.3.1.6	Obtenção da resina	70
4.3.1.6.1	Obtenção da dispersão sólida contendo a resina	71
4.4	Perfil cromatográfico (CLAE – UV – DAD)	72
4.6	Espectrometria de massas	73
4.7	Avaliação da atividade laxante	74
4.7.1	Animais	74
4.7.1.1	Trânsito intestinal com carvão ativo	74
4.7.1.1.2	Análise estatística	75
4.5.1.2	Trânsito intestinal com carvão ativo modificado	75
4.7.1.2.1	Análise estatística	76
4.7.1.3	Trânsito intestinal em gaiola metabólica	76
4.7.1.3.1	Análise estatística	76
4.8	Avaliação Toxicológica	77
4.8.1	Animais	77
4.8.2	Toxicidade aguda – dose única	77
4.8.3	Toxicidade aguda – doses repetidas	78
4.8.3.1	Determinação das transaminases séricas (AST e ALT)	79
4.8.3.2	Análise estatística	79
4.7	Avaliação da Atividade Antioxidante	80
V	RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1	Caracterização macroscópica	83
5.3	Controle de qualidade da droga vegetal	86
5.4	Otimização do processo extrativo	91
5.4.1	Determinação do resíduo seco	93
5.4.2	Determinação do teor de fenólicos totais	95
5.3	Obtenção do extrato	97
5.4	Obtenção do chá	97
5.5	Obtenção da resina	98
5.6	Perfil cromatográfico (CLAE– UV – DAD)	99
5.6.1	Determinação quantitativa de ácidos fenólicos presentes em <i>Operculina macrocarpa</i> (CLAE– UV – DAD)	104
5.7	Perfil por espectrometria de massas (EM)	108
4.7	Avaliação da atividade laxante	118
4.7.1	Trânsito intestinal com carvão ativo	119

4.7.2. Trânsito intestinal com carvão ativo modificado	121
4.7.3. Trânsito intestinal em gaiola metabólica	122
4.8. Avaliação Toxicológica	124
4.8.1. Toxicidade aguda – dose única	124
4.8.2. Toxicidade aguda – doses repetidas	125
4.8.3. Determinação das transaminases séricas (ASL e ALT).....	126
4.9. Avaliação da atividade antioxidante.....	128
VI – CONCLUSÕES	130
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

LISTA DE FIGURAS

ITEM		PÁGINA
Figura 1	Distribuição geográfica da família Convolvulaceae.....	29
Figura 2	Fotografias da <i>O. macrocarpa</i> e <i>O. alata</i>	32
Figura 3	Fotografia da batata de <i>O. macrocarpa</i>	33
Figura 4	Representação da reação de doação de hidrogênios para uma substância seqüestradora de radicais livres usando o reagente de DPPH.....	48
Figura 5	Metabólitos secundários isolados de espécies da família Convolvulaceae.....	51
Figura 6	Glicorresinas isoladas de <i>Ipomoea tricolor</i> (A) e <i>Ipomoea murucoides</i> (B) (Convolvulaceae).....	52
Figura 7	Esquema do método usado na determinação da atividade antioxidante utilizando o reagente de DPPH.....	81
Figura 8	Aspecto macroscópico de <i>O. macrocarpa</i>	83
Figura 9	Aspecto macroscópico do pó de <i>O. macrocarpa</i>	83
Figura 10	Características anatômicas da raiz de <i>O. macrocarpa</i> (L.) Urban...	85
Figura 11	Teor de resíduo seco (%) totais de acordo com os diferentes métodos e solventes utilizados. (Métodos: 1 – maceração 3 dias; 2 – maceração 5 dias; 3 – percolação; 4 – decocção. Solventes: 1 - EtOH 70%; 2 - EtOH 96%; 3 – água).....	94
Figura 12	Teor de fenólicos totais (%) totais de acordo com os diferentes métodos e solventes utilizados. (Métodos: 1 – maceração 3 dias; 2 – maceração 5 dias; 3 – percolação; 4 – decocção. Solventes: 1 - EtOH 70%; 2 - EtOH 96%; 3 – água).....	96

Figura 13	Cromatograma de separação por CLAE, em modo analítico (210 nm), do EEtOH de <i>O. macrocarpa</i> 1 = ácido clorogênico; 2 = ácido caféico e 3 = Dímero; 4 = Não identificado 1, 5 = Não identificado 2.....	101
Figura 14	Cromatograma de separação por CLAE, em modo analítico (210 nm), do chá de <i>O. macrocarpa</i> 1 = ácido clorogênico; 2 = ácido caféico e 3 = Dímero; 4 = Não identificado 1, 5 = Não identificado 2.....	101
Figura 15	Estruturas dos ácidos fenólicos identificados por HPLC no EEtOH e no chá de <i>O. macrocarpa</i>	102
Figura 16	Espectros de ultravioleta dos ácidos fenólicos identificados no EEtOH e no chá de <i>O. macrocarpa</i> 1 = ácido clorogênico; 2 = ácido caféico e 3 = Dímero; 4 = Não identificado 1, 5 = Não identificado 2.....	103
Figura 17	Curva analítica do ácido caféico.....	105
Figura 18	Curva analítica do ácido clorogênico	105
Figura 19	Curva analítica do dímero do ácido caféico	106
Figura 20	Espectro de massas do EEtOH de <i>O. macrocarpa</i> em modo full-scan avaliado no modo negativo. Faixa de íons com m/z de 100-1200 Da	110
Figura 21	Espectro de massas do chá de <i>O. macrocarpa</i> em modo full-scan avaliado no modo negativo. Faixa de íons com m/z de 200-2000 Da.....	111
Figura 22	Espectro de massas da resina de <i>O. macrocarpa</i> em modo full-scan avaliado no modo negativo. Faixa de íons com m/z de 200-2000 Da.....	112

Figura 23	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 179, obtido no modo negativo.....	113
Figura 24	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 191, obtido no modo negativo.....	114
Figura 25	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 207, obtido no modo negativo.....	115
Figura 26	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 353, obtido no modo negativo.....	116
Figura 27	Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 515, obtido no modo negativo.....	117
Figura 28	Atividade antioxidante do EEtOH (azul) e do chá (amarelo) de <i>O. macrocarpa</i>	129

LISTA DE TABELAS

ITEM		PÁGINA
Tabela 1	Causas de constipação.....	42
Tabela 2	Classificação das substâncias fenólicas de acordo com o esqueleto básico.....	53
Tabela 3	Sistema eluente usado na separação dos metabólitos presentes no EEtOH de <i>O. macrocarpa</i> . Fluxo de 1,0 ml min ⁻¹	72
Tabela 4	Análise granulométrica do pó da raiz de <i>O. macrocarpa</i>	86
Tabela 5	Resultados obtidos nas análises de controle de qualidade da droga vegetal.....	87
Tabela 6	Análise microbiológica do pó da raiz de <i>O. macrocarpa</i>	90
Tabela 7	Determinação do teor de resíduo seco.....	93
Tabela 8	Determinação do teor de fenólicos totais.....	95
Tabela 9	Rendimento do extrato e do chá preparados com <i>O. macrocarpa</i> ..	98
Tabela 10	Dados de calibração dos ácidos fenólicos	106
Tabela 11	Quantidade de ácidos fenólicos determinada nos extratos e chá de <i>O. macrocarpa</i>	107
Tabela 12	Íons moleculares e compostos detectados através das análises por EM com injeção direta dos EEtOH e do chá de <i>O. macrocarpa</i>	109
Tabela 13	Porcentagem da distância percorrida pelo carvão ativo no intestino dos camundongos tratados com <i>O. macrocarpa</i>	120
Tabela 14	Porcentagem da distância percorrida pelo carvão ativo no intestino dos camundongos tratados com os ácidos caféico, ferúlico e clorogênico.....	121
Tabela 15	Tempo de eliminação das fezes com marcador dos camundongos	

	tratados com <i>O. macrocarpa</i>	122
Tabela 16	Peso das fezes eliminadas pelos camundongos tratados com <i>O. macrocarpa</i>	122
Tabela 17	Peso dos órgãos dos animais, toxicidade aguda- dose única.....	124
Tabela 18	Peso dos órgãos dos animais, toxicidade aguda – doses repetidas.....	125
Tabela 19	Dosagem das transaminases séricas em camundongos tratados com <i>O. macrocarpa</i> , toxicidade aguda – dose única	127
Tabela 20	Dosagem das transaminases séricas em camundongos tratados com <i>O. macrocarpa</i> , toxicidade aguda – doses repetidas.....	127

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BHA	butil hidroxianisol
BHT	butil hidroxitolueno
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos (<i>Diode array detector</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-picril hidrazil
EtOH	Etanol
EEtOH	Extrato etanólico
EM	Espectrometria de massas
F. Bras.	Farmacopéia brasileira
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i> (Análise por injeção em fluxo ou análise por inserção direta da amostra)
GL	Gay Lussac
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
m/z	Relação massa carga
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MeOH	Metanol
OMS	Organização Mundial da Saúde
PG	propil galato
SM	Solução-mãe
TBHQ	<i>tert</i> -butil hidroquinona
T_r	Tempo de retenção
UFC	Unidade formadora de colônia

UV Ultravioleta

WHO *World Health Organization*

RESUMO

Operculina macrocarpa (L.) Urb., Convolvulaceae, popularmente conhecida como batata-de-purga ou jalapa, é utilizada pela população como laxante e no tratamento da leucorréia. O objetivo deste trabalho foi realizar o controle de qualidade da droga vegetal, otimizar o processo extrativo desta espécie, avaliar a atividade laxante e antioxidante da raiz desta planta, realizar ensaios toxicológicos e ainda caracterizar fitoquimicamente a espécie por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) e EM (Espectrometria de Massas). Foram realizados testes farmacopéicos de controle de qualidade, que comprovaram a autenticidade e a qualidade da droga vegetal. Avaliou-se a atividade laxante de *O. macrocarpa* através de diferentes modelos experimentais de trânsito intestinal utilizando o extrato hidroetanólico, o chá, a resina e os ácidos caféico, clorogênico e ferúlico. Verificou-se que o extrato hidroetanólico, o chá e os ácidos fenólicos apresentaram atividade laxante no modelo experimental avaliado e para atividade antioxidante foi observada uma discreta atividade para o extrato, o chá e a resina comparados com o padrão de ácido caféico. Na avaliação toxicológica o extrato hidroetanólico e o chá apresentaram uma diminuição nos valores das transaminases séricas AST (Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanina aminotransferase), sugerindo hepatotoxicidade. Foi traçado o perfil químico do extrato hidroetanólico, do chá e da resina onde foram identificados os ácidos caféico, ferúlico, clorogênico, metil-ferúlico, quínico, dicafeoil-quinico e dímero do ácido caféico por CLAE e EM. Os ácidos fenólicos identificados foram quantificados por CLAE. Os resultados obtidos neste estudo químico-farmacológico de *Operculina macrocarpa* são fundamentais para o futuro desenvolvimento de um produto farmacêutico com padrões de eficácia e segurança de uso pela população.

PALAVRAS-CHAVE: *Operculina macrocarpa*, Convolvulaceae, batata-de-purga, laxante, antioxidante, toxicidade, CLAE, EM, ácidos fenólicos.

ABSTRACT

Operculina macrocarpa (L.) (Urb.), Convolvulaceae, popularly known as 'batata-de-purga', is used by the population as a laxative and for the treatment of leucorrhoea. The aim of this work was to carry out the quality control of vegetal drug, evaluate the antioxidant and laxative activity of the root of this plant, to carry out toxicology assays and phytochemical characterization by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and MS (Mass Spectrometry) of this specie. Pharmacopeial tests of quality control had confirmed the authenticity and quality of sample. The laxative activity was evaluated by different experimental models for the hydromethanolic extract, tea, resin, and caffeic, chlorogenic and ferulic acid. The results showed that hydroethanolic extract, tea and phenolic acids had significant activity in experimental model tested. The results showed a little antioxidant activity for the extract, resin and tea when compared with standart caffeic acid. In the toxicological evaluation hydroethanolic extract and tea had presented alterations in the seric levels of transaminases ALT (Alanine aminotransferase) and AST (Aspartate aminotransferase) suggesting hepatotoxicity. Chemical profile of ethanolic extract, tea and resin was carried out by HPLC and MS and these techniques could identify caffeic, ferulic, chlorogenic, methylferulic, quinic, dicaffeoylquinic acids and a caffeic acid dimer. The phenolic acids were quantificated by HPLC.

The results obtained in the chemical-pharmacological study of *Operculina macrocarpa* are fundamental for the future development of a pharmaceutical product with standarts of safety and efficacy of use for the population.

KEYWORDS: *Operculina macrocarpa*, Convolvulaceae, 'batata-de-purga', laxative, antioxidant, toxicity, HPLC, MS, phenolic acids.

I – INTRODUÇÃO

Sabe-se que o uso de plantas em terapia data dos primórdios da humanidade, sendo que estas sempre tiveram um papel preponderante para a manutenção da saúde das comunidades ao longo do tempo. Nesse sentido, o Brasil tem enorme biodiversidade, possuindo uma das mais ricas floras do mundo e os poucos estudos existentes deste material justificam a busca de maior desenvolvimento nesta área.

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são as melhores fontes para a obtenção de fármacos. Todavia, é importante ressaltar que a comercialização e a utilização indiscriminadas de tais produtos com fins medicinais são um sério tema para discussão pela saúde pública, devido também à falta de órgãos regulatórios voltados para este problema. Assim como no restante do mundo, o consumo de plantas medicinais na Europa ocidental praticamente dobrou na última década. Isto prova o crescente interesse pela 'medicina verde'.

Conseqüentemente, o número de drogas oficiais originárias de plantas descrito nas farmacopéias aumentou consideravelmente, bem como o comércio das plantas medicinais. Exigências internacionais têm sido estabelecidas a fim de assegurar a qualidade, segurança e eficácia de tais produtos.

As plantas medicinais são uma importante ferramenta nas culturas e tradições dos brasileiros. Atualmente, a maioria da população urbana, assim como as comunidades rurais, utilizam a fitomedicina para tratamentos medicinais.

A avaliação das substâncias ativas nas plantas medicinais, como também o controle de qualidade de matérias-primas assume um importante papel nas indústrias farmacêuticas e cosméticas. Além disto, o controle de qualidade de fitoterápicos

necessita do desenvolvimento de processos extrativos para a caracterização e quantificação dos compostos ativos, que determinam procedimentos complexos. O maior problema atualmente é a enorme variedade da qualidade destes produtos.

Os diversos tipos de preparações são chamados de fitoterápicos e são preparados utilizando plantas coletadas, secas e embaladas sem controle sanitário adequado. Conseqüentemente, as matérias-primas vegetais são carreadoras de contaminantes, freqüentemente originários do próprio solo de cultivo. Técnicas de plantio, manuseio, colheita, produção e armazenamento causam as contaminações microbianas adicionais.

A certificação de pureza de fitoterápicos é uma exigência necessária no controle de qualidade destes compostos. Procedimentos que obtenham quantidades apreciáveis de substâncias puras são também necessários para a avaliação farmacológica das substâncias ativas.

Atualmente, produtos naturais são responsáveis diretamente ou indiretamente por cerca de 40% dos fármacos disponíveis no mercado, sendo 70% antibióticos e antitumorais (YUNES; CALIXTO, 2001).

As informações do uso popular são de extrema importância quando se procura obter substâncias ativas de plantas. Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso popular do que em plantas escolhidas ao acaso. Como a constituição química, na maioria dos casos, difere significativamente em relação às distintas partes das plantas, parece mais viável estudar inicialmente o farmacógeno empregado na medicina popular e, posteriormente, as outras partes, que também podem conter princípios ativos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

O grande número de informações sobre o uso popular de centenas de plantas em diversos lugares do mundo implica na necessidade do desenvolvimento de

métodos que facilitem a tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico das espécies.

Assim, a literatura relata inúmeros métodos de extração e isolamento de compostos de plantas. O número de pesquisas envolvendo a busca de moléculas ativas em plantas, organismos marinhos, insetos e microrganismos vem crescendo. Esta observação pode ser vista tanto na área acadêmica como na industrial. A diversidade molecular encontrada em estudos de plantas é tão grande que o isolamento e a determinação destas estruturas tornam-se um grande desafio para os químicos (HAMBURGER; HOSTETTMAN, 1991).

No entanto, esta busca por substâncias ativas se torna realmente interessante quando se trata do isolamento de compostos bioativos e não somente de uma estrutura de um composto inédito. Tal fato vem ao encontro da necessidade de estudos fitoquímicos biodirecionados e, portanto, na multidisciplinariedade que envolve botânicos, químicos, farmacólogos e toxicólogos (HAMBURGER; HOSTETTMAN, 1991).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes tem sido objeto de interessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

A segurança e a eficácia na utilização dos fitoterápicos devem sustentar-se na existência de literatura científica relevante sobre a demonstração de sua atividade farmacológica e sua eficácia clínica, assim como da sua toxicidade. Quanto à segurança, o conhecimento que garante o uso de muitos fitoterápicos provém da medicina tradicional e do conhecimento etnomedicinal acumulado durante séculos (CARVALHO, 2005).

Portanto estudos farmacológicos, toxicológicos, fitoquímicos e também tecnológicos são de grande importância no desenvolvimento de um novo medicamento fitoterápico.

Assim sendo, *Operculina macrocarpa* L. Urban (Convolvulaceae), popularmente conhecida como batata-de-purga ou jalapa, comum no Nordeste brasileiro, a qual é amplamente utilizada pela população devido à sua atividade laxante, purgativa, 'depurativa' contra moléstias da pele e no tratamento da leucorréia (MATOS, 1982; MARTINS et al., 2000) mostrou-se uma espécie interessante para um estudo químico-farmacológico.

II – REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Sistemática vegetal

Operculina macrocarpa (L.) Urb. é uma trepadeira pertencente à família Convolvulaceae, popularmente conhecida como batata-de-purga ou jalapa.

2.1.1. A família Convolvulaceae

A família Convolvulaceae, constituída por, aproximadamente, 55 gêneros e cerca de 1.930 espécies (AUSTIN, 1997) possui distribuição geográfica cosmopolita (Figura 1) (HEYWOOD, 1993).



Figura 1. Distribuição geográfica da família Convolvulaceae

Fonte: HEYWOOD (1993)

Apresenta-se subdividida em dois grupos baseados nas características da ornamentação da exina do grão de pólen: "Echinoconiae" com pólenes espinhosos; "Psiloconiae" com pólenes lisos ou granulados. É considerada monofilética, sendo

reconhecida assim, tanto por características morfológicas quanto por características moleculares (AUSTIN, 1997).

Uma das características mais marcantes das convolvuláceas é a presença de fileiras de células secretoras de resinas glicosídicas em tecidos foliares e, especialmente em suas raízes. Estas resinas constituem uma das características quimiotaxonômicas desta família, e o emprego na medicina tradicional de alguns gêneros (*Convolvulus*, *Exogonium*, *Ipomoea*, *Merremia* e *Operculina*) está associado às propriedades purgantes de suas resinas (ARGÁEZ; PÉREZ-AMADOR, 1997; PEREDA-MIRANDA, 2003; PEREDA-MIRANDA, 2006).

O nome desta família deriva do latim *convolvere*, que significa 'entrelaçar-se', e refere-se, em termos gerais, à forma do seu crescimento, já que um grande número destas plantas são trepadeiras volúveis, que crescem enroscadas em um suporte (PEREDA-MIRANDA et al., 2003).

Do ponto de vista econômico, a mais importante espécie é *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (batata doce). Há centenas de variedades desta espécie, algumas conhecidas, incorretamente, como inhame, que são cultivadas por todas as regiões tropicais (HEYWOOD, 1993).

Muitas espécies desta família também possuem usos alimentares e como medicinais. As raízes de *Convolvulus scammonia* L. e *Ipomoea purga* (Wender.) Hayne (jalapa) são usadas na medicina como catártico. Um grande número de espécies, particularmente do gênero *Ipomoea* e *Convolvulus* são ornamentais, notavelmente a glória da manhã (*Ipomoea purpurea* (L.) Roth) (HEYWOOD, 1993).

As glicorresinas são metabólitos característicos da família Convolvulaceae (ARGÁEZ; PÉREZ-AMADOR, 1997; HUEZA et al., 2005; CHÉRIGO; PEREDA-MIRANDA et al., 2006; ESCOBEDO-MARTINEZ; PEREDA-MIRANDA, 2007;

MIRÓN-LÓPEZ et al., 2007), além delas vale ressaltar a presença dos ácidos fenólicos e de substâncias polifenólicas nas convolvuláceas (ISLAM et al., 2002; YOSHIMOTO et al., 2005; DINI et al., 2006; TRUONG et al., 2007)

Porém nesta família é encontrada uma grande variedade de metabólitos secundários de baixo peso molecular contendo grupo –N, tais como: ergolinas, pirrolidinas, tropanos lipofílicos e hidrofílicos, alcalóides indolizidínicos e pirrolizidínicos, glicosídeos cianogênicos, diferentes tipos de amidas (SCHIMMING et al., 1998; TOFERN et al., 1999; SCHIMMING et al., 2005) e flavonóides (MANN et al., 1999).

2.1.2. O gênero *Operculina*

Operculina macrocarpa (L.) Urb. (Convolvulaceae) é popularmente conhecida como batata-de-purga ou jalapa-do-Brasil. O nome popular de batata-de-purga corresponde também à outra espécie silvestre, *Operculina alata* (Ham.) Urb., muito comum no nordeste brasileiro. Ambas possuem raízes tuberosas, grandes, amiláceas e lactescentes. São encontradas no comércio para fins medicinais.

Estas espécies são trepadeiras de aspecto ornamental, especialmente pelos seus frutos. Cada fruto contém 1 a 4 sementes duras e pretas. A espécie *O. macrocarpa* é bienal, isto é, sua parte aérea morre a cada dois anos, tem folhas palmatiformes, flores brancas e frutos mais arredondados, enquanto que a espécie *O. alata* é anual, tem folhas inteiras, flores amarelas e frutos de forma estrelada e mais escuros (LORENZI; MATOS, 2002).

A figura 2 apresenta fotografias de ambas as espécies, nas quais observa-se a coloração diferente das flores.



Figura 2. Fotografias da *O. macrocarpa* e *O. alata*

Fonte: MATOS, 2000.

2.1.3. A espécie *Operculina macrocarpa*

Existem citações referentes ao ano de 1917 da utilização de “jalapa” (Pharmacopéia Paulista, 1917).

A batata-de-purga ou jalapa é amplamente utilizada pela população devido à sua atividade laxante, purgativa, “depurativa” contra moléstias da pele e no tratamento da leucorréia (MATOS, 1982; MARTINS et al., 2000; LORENZI; MATOS, 2002; LARINI, 2008).

É usada na forma de refresco preparado com a batata fresca, ralada com água, ou na forma de pó feito com a fécula retirada artesanalmente da batata fresca, conhecida localmente como goma-de-batata ou, ainda, na forma de pílulas feitas manualmente com o resíduo resinoso extraído da batata (MATOS, 1994; LORENZI, 2002). A figura 3 apresenta a fotografia da batata.



Figura 3. Fotografia da batata de *O. macrocarpa*

Fonte: LORENZI & MATOS, 2002

As doses utilizadas são de 0,1 a 0,4 g de pó como laxante e de 1 a 2 g como purgante; 0,25 a 0,50 g de resina como purgante e 0,02 a 0,10 g como laxante (TESKE; TRENTINI, 2001).

Todas as preparações caseiras ou industriais da batata-de-purga devem ser usadas com cuidado, pois em doses mais altas do que as recomendadas, podem causar intoxicação severa, traduzida por cólicas fortes e diarreia intensa, com risco de rápida desidratação (LORENZI; MATOS, 2002).

Apesar de constar em farmacopéias (Farmacopéia Brasileira 1929 e 1959), seu estudo fitoquímico ainda está incompleto. Contém como componentes a fécula e 12% de resina, que é formada pela mistura complexa de substâncias de natureza glicosídica polimérica, de propriedade purgativa, sendo reconhecida como laxante ou, em doses maiores, como purgativo drástico e anti-helmíntico (LORENZI; MATOS, 2002).

Em estudos anteriores foram isolados e identificados os ácidos caféico e protocatecúico e um dímero do ácido caféico a partir do extrato etanólico de *O. macrocarpa* através de técnicas fitoquímicas convencionais (MICHELIN, 2004).

2.2. Extratos

Uma série de fatores interfere no processo de extração tais como características do material vegetal, o seu grau de divisão, o líquido extrator (solvente) e o método. O grau de divisão do material irá influenciar diretamente a eficiência da extração. Como o poder de penetração dos solventes depende, entre outros fatores, da consistência dos tecidos do material a extrair, é necessário considerar que quanto mais rígido for o material menor deve ser sua granulometria (SOARES et al., 1998; SIMÕES et al., 2003).

O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível. É graças à seletividade que se pode extrair apenas as substâncias desejadas ou em maior quantidade. Como a seletividade depende da polaridade, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair determina o solvente ou mistura de solventes que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração. Em análises fitoquímicas, quando não se conhece previamente o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material vegetal a sucessivas extrações, com solventes de polaridade crescente, conseguindo-se, assim, uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridade também crescente (SIMÕES et al., 2003).

Para localizar os princípios ativos, todos os extratos semipuros devem ser testados e, aquele que apresentar efeito biológico mais pronunciado, deverá ser

submetido aos procedimentos cromatográficos para o isolamento e a purificação dos compostos. Se, eventualmente, a maioria das frações apresentar efeitos de interesse, sugere-se iniciar os estudos com a fração que apresenta o maior rendimento ou que forneceu o melhor perfil cromatográfico. Recomenda-se sempre utilizar, grandes quantidades de planta (de 3 a 5 kg), pois assim é possível determinar também os constituintes presentes em baixas concentrações (YUNES; CALIXTO, 2001).

Outros fatores relacionados aos métodos de extração dizem respeito à agitação, temperatura e ao tempo necessário para executá-los. Levando-se em conta que os processos de extração dependem, em grande parte, de fenômenos de difusão e que a renovação do solvente em contato com as substâncias a dissolver desempenha um papel de grande influência na velocidade da dissolução, pode-se concluir que a agitação pode abreviar consideravelmente a duração de um processo extrativo (SIMÕES *et al.*, 2003).

O aumento da temperatura provoca um aumento da solubilidade de algumas substâncias, motivo pelo qual os métodos de extração a quente são sempre mais rápidos do que aqueles realizados à temperatura ambiente. Entretanto, o calor nem sempre pode ser empregado, já que muitas substâncias são instáveis em altas temperaturas (PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

O tempo de extração varia em função da rigidez dos tecidos do material vegetal, do seu estado de divisão, da natureza das substâncias a extrair, do solvente e do emprego ou não de temperatura e/ou agitação (PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do

processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. Como a composição química das plantas é extremamente complexa, muito freqüentemente ocorre a extração concomitante de vários tipos de substâncias, farmacologicamente ativas ou não, desejadas ou não. Por isso, deve-se primeiramente definir, com a maior precisão possível, o que se deseja obter. De acordo com essa definição e levando-se em consideração os fatores envolvidos no processo extrativo, pode-se escolher o método e o solvente que serão empregados (COSTA, 1994; SIMÕES et al., 2003).

2.2.1. Processos extrativos

2.2.1.1. Maceração

Maceração designa a operação na qual a extração de matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, com temperatura ambiente, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional sem renovação do líquido extrator. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula.

Esse processo, que não esgota os ativos presentes nas plantas, gera a forma farmacêutica líquida conhecida como tintura, que pode ser comercializada dessa forma ou serve como forma intermediária para tipos de produtos.

As drogas vegetais mais indicadas para serem extraídas por maceração são aquelas ricas em substâncias ativas que não apresentam na sua estrutura celular, gomas, resinas, alginatos. Líquidos muito voláteis são raramente utilizados, não se

recomendando, por outro lado, o emprego de água ou de misturas hidroalcoólicas inferiores a 20%, dadas as circunstâncias favoráveis à proliferação de microbiota (PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

2.2.1.2. Percolação

Este grupo de operações tem como característica comum a extração exaustiva das substâncias ativas. Na percolação, a droga vegetal moída é colocada em um recipiente cônico ou cilíndrico (percolador), de vidro ou de metal, através do qual é feito passar o líquido extrator. O produto obtido denomina-se percolado (PRISTA *et al.*, 1996).

Diferentemente da maceração, a percolação é uma operação dinâmica, indicada na extração de substâncias farmacologicamente muito ativas, presentes em pequenas quantidades ou pouco solúveis e quando o preço da droga é relevante (PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000; SIMÕES *et al.*, 2003).

2.2.1.3. Decocção

É um tipo de extração à quente em sistema aberto. Consiste em manter o material vegetal em contato, durante certo tempo, com um solvente (normalmente água) em ebulição. É uma técnica de emprego restrito, pois muitas substâncias ativas são alteradas por um aquecimento prolongado e costuma-se empregá-la com materiais vegetais duros e de natureza lenhosa (SIMÕES *et al.*, 2003).

A decocção pode ser leve ou branda, carregada ou concentrada, conforme sua duração (de apenas alguns minutos a várias horas) e a saturação do líquido

empregado (SIMÕES et al., 2003).

2.3. Controle de qualidade

O aumento na procura de plantas medicinais frente à oferta insuficiente das mesmas conduziu a uma queda de sua qualidade. Muitos produtores desconhecem os cuidados que se deve ter nas diversas etapas para a obtenção de matérias-primas e/ou produtos de qualidade adequada e não contam com a orientação de profissionais capacitados (ZARONI et al., 2004).

A identificação e a pureza da droga, vegetal, assim como a avaliação de seus princípios ativos, são tarefas indispensáveis àqueles que buscam obter produtos de boa qualidade (ZARONI et al., 2004).

Apesar do grande consumo de plantas medicinais e seus derivados no Brasil, estes não eram controlados, pois não havia nenhuma regulamentação em vigor. Em 1995, o Ministério da Saúde instituiu a Portaria MS/SNVS nº 6, de 31 de janeiro de 1995, (BRASIL, 1995) que regulamentava o registro de produtos fitoterápicos para fins comerciais; depois veio a RDC 17 (BRASIL, 2000) e, mais recentemente, a RDC 48 (BRASIL, 2004), que reafirma, definitivamente, que fitoterápicos são medicamentos e, desta forma, resgata a necessidade da existência de estudos de segurança, eficácia e qualidade, prévios ao registro desses produtos.

A identificação e a pureza da droga vegetal, assim como a avaliação de seus princípios ativos, são tarefas indispensáveis àqueles que buscam obter produtos de boa qualidade (ZARONI et al., 2004). Devem ser considerados diversos aspectos para a garantia da qualidade de um material vegetal, como os aspectos físico-químicos e microbiológicos (MIGLIATO et al., 2006).

2.4. Constipação intestinal

O hábito intestinal varia entre as pessoas, sendo difícil o estabelecimento de padrões de normalidade. Duas evacuações por dia é o que se considera normal (DANTAS, 2004).

A modificação dos hábitos alimentares, proveniente da ocidentalização e industrialização, tem introduzido um elevado consumo de alimentos refinados desprovidos de fibras alimentares, contidas em maior quantidades em frutas, vegetais e cereais integrais. Por esse motivo, atualmente, existe uma elevada incidência de doenças que eram pouco freqüentes no passado, as chamadas “doenças de civilização”, fazendo parte deste elenco a constipação intestinal (ANDRE et al., 2000; COTA; MIRANDA, 2006).

Vários fatores podem levar à constipação. É sabido que o sintoma é mais freqüente nas mulheres do que nos homens, sem que haja explicação para isso. Os mais idosos também têm maior freqüência de constipação do que os mais jovens, o que pode ser associado à menor ingestão alimentar, perda da mobilidade, fraqueza das musculaturas abdominais e pélvica e medicações (DANTAS, 2004).

A constipação tem-se estabelecido mais freqüentemente em mulheres, principalmente naquelas com inatividade física diária, pouca renda, educação de qualidade inferior, baixo consumo de líquidos e alimentos ricos em fibras (COTA; MIRANDA, 2006).

A presença de constipação está associada à falta de resíduos dentro do cólon, perda de sensibilidade dos órgãos que desencadeiam os mecanismos da defecação, perda das contrações dos músculos envolvidos com a defecação e

obstrução mecânica. Muito da clínica e o exame físico são correspondentes às várias situações relacionadas com tais mecanismos de constipação (DANTAS, 2004).

Há uma variedade de opiniões individuais sobre o que se pode considerar constipação. Alguns se sentem constipados quando não conseguem evacuar diariamente, outros quando as fezes são duras, ou ainda quando a evacuação é dolorosa. A história clínica do paciente são peças-chave para se avaliar a constipação intestinal, sendo que uma boa anamnese é imprescindível (ANDRE et al., 2000; DANTAS, 2004; COTA; MIRANDA, 2006; JOHANSON; KRALSTEIN, 2007).

Menos do que três evacuações por semana são consideradas quadro de constipação. Geralmente, o paciente refere dificuldade para evacuar, fezes duras, urgência sem que consiga evacuar, baixa frequência de evacuações e sensação de evacuação incompleta (MELO et al, 2003; DANTAS, 2004; WANNMACHER, 2005).

De acordo com os “Critérios de Roma”, para se diagnosticar a constipação intestinal funcional, é necessário que o indivíduo apresente por pelo menos três meses, em pelo menos 1/4 do tempo, dois ou mais dos seguintes sintomas: esforço para evacuar, fezes endurecidas ou fragmentadas, sensação de evacuação incompleta e/ou duas ou menos evacuações por semana (ANDRE, 2000; COTA; MIRANDA, 2006; JOHANSON; KRALSTEIN, 2007). Porém, cabe ressaltar que isto é um pequeno entendimento de sua definição, pois há grandes variações de hábitos normais intestinais, não existindo um padrão fisiológico comum para definir um funcionamento intestinal normal (COTA; MIRANDA, 2006).

Em condições alimentares e de vida normais, um indivíduo evacua fezes formadas a intervalos que variam entre 6 e 72 horas. Ao paciente que procura o

médico com queixa de constipação deve ser perguntado o que houve no início do sintoma e sua evolução. O início pode ser insidioso ou abrupto, e, na evolução, pode ocorrer piora progressiva. É importante o conhecimento das circunstâncias ligadas ao início do sintoma, à história alimentar, quanto ao volume, tipo de alimento ingerido, à ingestão de fibras, e ao volume de água consumido por dia. A comparação entre o hábito intestinal, atual e o remoto, e o uso atual de drogas, são informações indispensáveis (DANTAS, 2004).

A constipação pode ter causa motora, por distúrbios da motilidade enterocólica, conseqüente a condições metabólicas, miopatias e neuropatias, ou causa mecânica, por suboclusão intestinal. Entre as causas motoras, estão a síndrome do cólon irritável, uso crônico de laxativos, megacólon, alimentação inadequada, lesões neurológicas, sedentarismo, desequilíbrio hidroeletrolítico, fatores psicogênicos, hipotireoidismo e efeito colateral de medicamentos, como antiácidos (com cálcio e alumínio), antiespasmódicos, diuréticos, analgésicos, anticonvulsivantes e antidepressivos. Entre as causas mecânicas estão os tumores benignos e malignos, diverticulite, colite isquêmica e compressão extrínseca. Devem ser consideradas, também, as afecções proctológicas, como fissuras, hemorróidas e proctite, que dificultam a evacuação (Tabela 1) (DANTAS, 2004).

Constipação é um sintoma e não uma doença. Pode estar associada, sem que possamos estabelecer a relação causa-efeito, com infecção urinária, enurese noturna e incapacidade de contrair a bexiga. A incidência é três vezes maior nos homens obesos, e duas vezes maior nas mulheres obesas, do que na população com peso normal. Não podemos esquecer que a causa mais freqüente é a funcional, mas, para que possamos ter certeza desse diagnóstico, as causas orgânicas devem ser excluídas (DANTAS, 2004).

Tabela 1. Causas de Constipação

Funcional

Efeito de fármacos

Obstrução mecânica:

Câncer do cólon

Compressão extrínseca

Estenoses: divertículo ou pós-isquemia

Retocele

Pós-operatória

Megacólon

Fissura anal

Metabólica:

Diabetes Melito

Hipotireoidismo

Hipercalcemia

Hipercalemia

Hipomagnesemia

Uremia

Intoxicação com metais pesados

Miopatias:

Amiloidose

Esclerodermia

Neuropatias:

Doença de Parkinson

Lesão da medula

Tumor na medula

Doença cérebro-vascular

Esclerose múltipla

Outras condições:

Depressão

Doença articular degenerativa

Neuropatia autonômica

Prejuízo cognitivo

Imobilidade

Doença cardíaca

Fonte: (DANTAS, 2004).

No contexto da constipação crônica, medidas não-medicamentosas constituem a primeira escolha para manejo inicial, com ênfase em abordagem dietética e de hábitos de vida. Dependendo do mecanismo gerador do problema, outras abordagens não-medicamentosas são propostas. Os laxativos estão indicados quando as primeiras alternativas falham, não demonstrando diferença significativa de eficácia entre eles, sobretudo por longo prazo. Quando usados em esquemas recomendados, sua segurança se equivale (WANNMACHER, 2005).

2.5. Avaliação de atividade na motilidade intestinal

O esvaziamento gástrico é uma das mais importantes funções motoras do trato gastrointestinal. Ele regula a velocidade de absorção de nutrientes e fármacos por controlar as inter-relações complexas de mecanismos miogênicos neurais e hormonais. O esvaziamento gástrico de líquidos e sólidos é controlado por diferentes partes do estômago. A pressão fúndica intraluminal controla o esvaziamento de líquidos, enquanto que as contrações da região antral controlam o esvaziamento de sólidos (LAPA et al., 2003).

2.5.1. Trânsito intestinal

A velocidade do trânsito intestinal é um dos fatores que determina a intensidade de absorção do conteúdo luminal e regula a biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral. Assim sendo, a medida da velocidade do trânsito é etapa obrigatória no estudo de novos medicamentos e também é utilizada na pesquisa de compostos inibitórios ou estimulatórios da atividade peristáltica. Os métodos clássicos descritos na literatura envolvem a administração de diferentes marcadores coloridos e a avaliação do trajeto dos mesmo no intestino (LAPA et al., 2003).

A atividade laxante de extratos da raiz de *O. macrocarpa* foi avaliada através do teste sobre a motilidade intestinal com carvão ativo. Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo da motilidade intestinal dos camundongos quando comparados com o grupo controle (MICHELIN; SALGADO, 2004).

RAMESH e colaboradores (1998) compararam o efeito laxativo de uma preparação líquida contendo 21 espécies vegetais diferentes, dentre elas *Operculina turpethum* (L.) J. Silva Manso, comparando com um comprimido laxante

convencional. Não houve diferença estatisticamente significativa no grau de ação laxante entre a preparação com os extratos e o comprimido convencional. A preparação líquida contendo os extratos devido ao seu baixo custo é uma escolha para a profilaxia da constipação induzida por opióides.

2.6. Toxicidade de plantas medicinais

Toda substância, segundo a toxicologia, pode ser considerada um agente tóxico dependendo das condições de exposição, como a dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias pela qual é administrada. A toxicidade de uma substância pode ser considerada como a capacidade de causar dano grave ou morte (BARROS; DAVINO, 2003).

Do ponto de vista toxicológico deve-se considerar que uma planta medicinal ou um fitoterápico não tem somente efeitos imediatos e facilmente correlacionados com a sua ingestão, mas principalmente efeitos que se instalam em longo prazo e de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos. Portanto, o uso popular e mesmo tradicional não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como recursos terapêuticos eficazes e seguros (SIMÕES et al., 2003).

Nesse sentido, as plantas medicinais não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético e sua preconização, ou autorização oficial do seu uso medicamentoso, devem ser fundamentadas em evidências experimentais, comprovando de que o risco a que se expõem aqueles que a utilizam é suplantado pelos benefícios que possam advir (SIMÕES et al., 2003).

A avaliação da segurança, ou seja, a avaliação da relação risco/benefício é a finalidade dos estudos farmacodinâmicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos de medicamentos. Se a intenção é utilizar uma planta medicinal com finalidades terapêuticas, ela deve ser previamente validada, isto é, ter sua ação comprovada e sua toxicidade potencial avaliada cientificamente na espécie humana, como qualquer outro medicamento (SIMÕES et al., 2003).

2.6.1. Ensaios toxicológicos

Inúmeras pesquisas estão sendo realizadas a fim de verificar a toxicidade de extratos vegetais. HUEZA e colaboradores (2005) avaliaram aos efeitos tóxicos da fração aquosa de *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae) e de seus alcalóides individualmente em ratos durante 14 dias. Os resultados mostraram que alguns alcalóides não produziram nenhum efeito tóxico, enquanto a fração aquosa apresentou a formação de vacúolos em diferentes órgãos avaliados. Nenhum efeito neurotóxico foi observado.

A segurança de *Dimorphandra mollis* Benth. (Caesalpiniaceae), popularmente conhecido como faveira ou fava d'anta, foi avaliada por FÉREZ e colaboradores (2006) através da avaliação da toxicidade aguda e crônica do extrato seco. Os resultados demonstram que o extrato seco desta espécie é seguro na dose de 1000 mg/kg.

RAMÍREZ e colaboradores (2007) avaliaram a toxicidade aguda e subaguda do extrato aquoso *Salvia scutellarioides* (Lamiaceae) em camundongos e ratos e não foi observado nenhum sinal de toxicidade nas doses de 1 ou 2 g/kg.

2.7. Atividade antioxidante

A oxidação lipídica, uma das principais causas de deterioração de alimentos e medicamentos, pode ser prevenida pela adição de antioxidantes, dos quais os sintéticos BHA (butil hidroxianisol), BHT (butil hidroxitolueno), PG (propil galato) e TBHQ (*terc*-butil hidroquinona) são os mais utilizados. Porém, estão sendo levantados questionamentos a respeito da inocuidade destes compostos, motivando assim a busca de antioxidantes naturais que possam substituir os sintéticos (MELO et al., 2003; MACHADO, 2005).

O radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) tem sido amplamente utilizado para avaliar a capacidade de antioxidantes naturais em seqüestrar radicais livres (SANCHEZ-MORENO et al., 1998, ROESLER et al., 2007).

Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando o difenil-picrilhidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento de absorção, monitorado pelo decréscimo de absorbância (Figura 4).

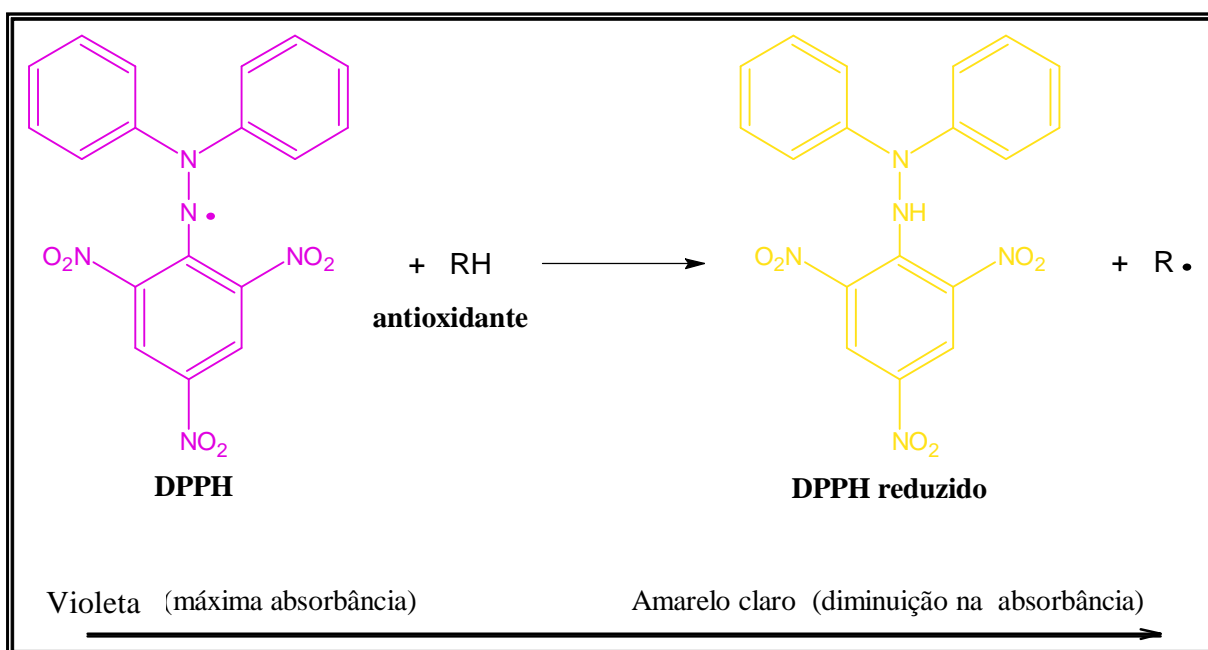


Figura 4. Representação da reação de doação de hidrogênios para uma substância seqüestradora de radicais livres usando o reagente de DPPH.

2.7.1. Formação de radicais livres e antioxidantes

O organismo humano produz constantemente radicais livres, os quais são moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem elétrons livres ou não pareados. Sendo assim, essas moléculas se tornam altamente reativas e podem atacar componentes celulares como DNA e RNA, membrana celular e outras substâncias oxidáveis, acelerando o envelhecimento e podendo contribuir para a instalação de doenças degenerativas (MACHADO, 2005).

O organismo humano possui um mecanismo de defesa formado por diferentes antioxidantes (superóxido dismutase, glutathione, catalase) e outros, por exemplo, a vitamina E, o ácido ascórbico, o β -caroteno que provêm da dieta alimentar (MACHADO, 2005; PODSEDEK, 2007).

Quando a concentração de radicais livres é maior do que a capacidade antioxidante da célula, ocorre ataque oxidativo a lipídeos de membrana, a proteínas estruturais e funcionais e a ácidos nucleicos. Esse ataque é denominado estresse oxidativo (ANDREOLI, 2000).

Os antioxidantes são classificados em primários e secundários, de acordo com seu tipo de ação e, em sintéticos ou naturais de acordo com a origem. A atividade antioxidante é evidenciada em pequenas concentrações, quando comparados com o substrato oxidável, prevenindo significativamente a ação do mesmo (MACHADO, 2005).

A atividade antioxidante é uma propriedade fundamental para a vida humana, uma vez que muitas das funções biológicas, incluindo antimutagenicidade, anticarcinogenicidade e antienvelhecimento, entre outras, são originárias dessa propriedade (CAI et al., 2004).

Os compostos fenólicos agem seqüestrando radicais livres e muitos já possuem atividade antioxidante comprovada (CAI et al., 2004; TUNG et al., 2007; PODSEDEK, 2007).

Na família Convolvulaceae encontram-se diversas espécies com atividade antioxidante comprovada, dentre as quais vale ressaltar *Ipomoea batatas*, da qual foram isolados diferentes polifenóis a partir extrato metanólico e hidrometanólico, os quais foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante utilizando o método do DPPH. A atividade de um dos compostos foi maior do que todos os padrões testados na mesma concentração (DINI et al., 2006).

ANBUSELVAM e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antioxidante do extrato metanólico de *Operculina turpethum*. Foram avaliadas mudanças nos níveis de peroxidação lipídica e no sistema antioxidante além do desenvolvimento do tumor. Os resultados sugerem que o extrato metanólico mostrou atividade antioxidante, ativando a proteção contra o câncer induzido.

2.8. Fitoquímica

Conforme já discutido anteriormente, a família Convolvulaceae possui uma grande diversidade de metabólitos, porém as glicorresinas e as substâncias fenólicas são os metabólitos característicos desta família. Além de metabólitos secundários de baixo peso molecular contendo grupos nitrogenados, tais como: ergolinas, pirrolidinas, tropanos lipofílicos e hidrofílicos, alcalóides indolizidínicos e pirrolizidínicos, glicosídeos cianogênicos, diferentes tipos de amidas e flavonóides que também já foram descritos na família.

Diferentes glicosídeos foram isolados de *Operculina aurea* (Kellogg) House, uma convolvulácea originária do México (CANONICA et al., 1976; CANONICA et al., 1977).

No gênero *Ipomoea* foram encontradas lignanas (PASKA et al., 1999), antocianinas (GODA et al., 1997; PALE et al., 1998; TERAHARA et al., 2000; PALE et al., 2003), cianidinas (SAITO et al., 1995), bonaspectinas e sesquilignanas (TOFERN et al., 2000) e pentasacarídeos (BAH et al., 2007).

Alguns metabólitos secundários isolados de espécies da família Convolvulaceae (CANONICA et al., 1977; YAHARA et al., 1994; MANN et al., 1999; KRAFT et al., 2002; JENETT-SIEMS et al., 2003) são apresentados na figura 5.

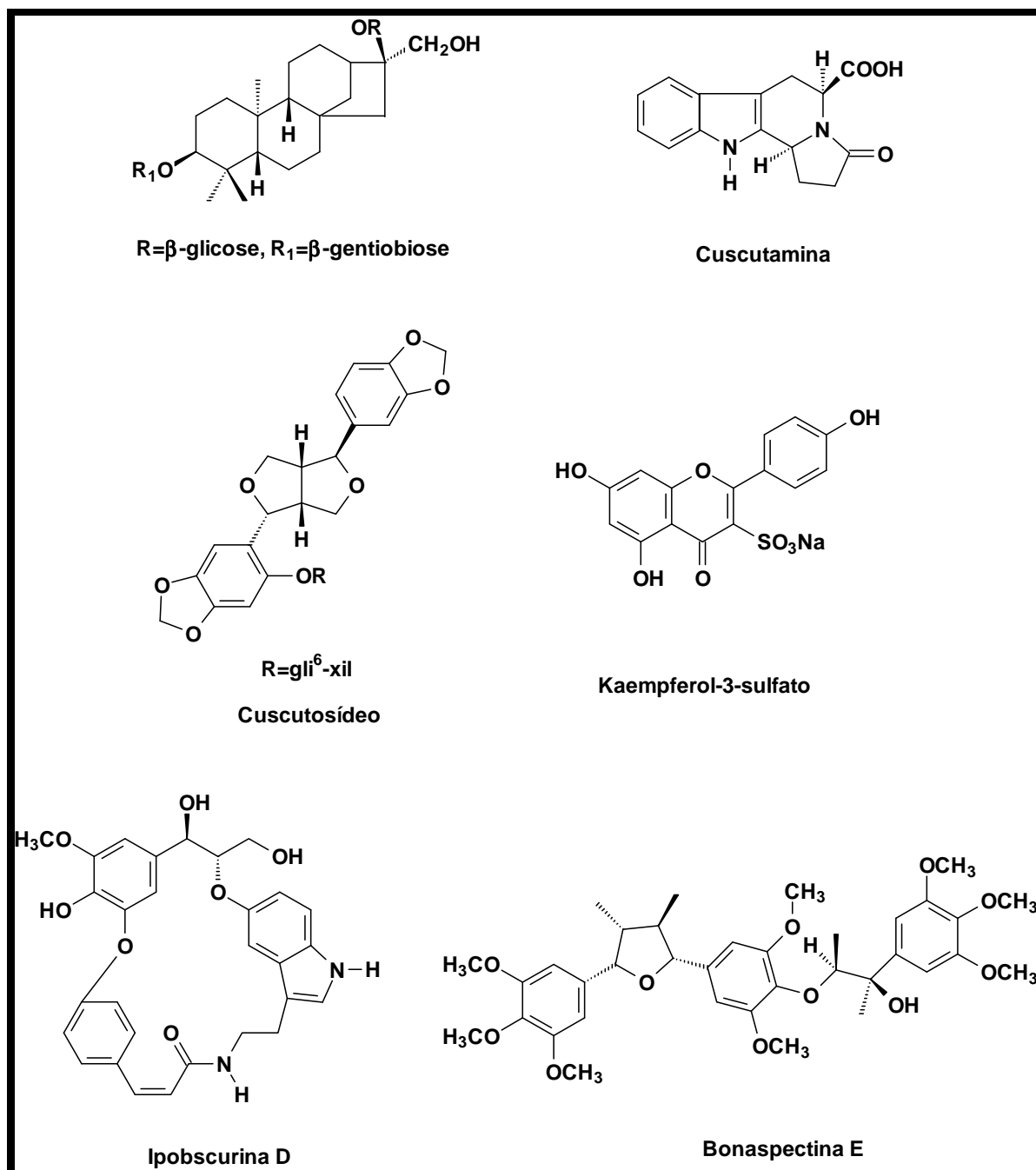


Figura 5. Metabólitos secundários isolados de espécies da família Convolvulaceae.

A figura 6 apresenta uma glicorresina isolada de *Ipomoea tricolor* (A) (PEREDA-MIRANDA; BAH, 2003) e glicoresinas isoladas de *Ipomoea murucoides* (B) (CHÉRIGO et al., 2006).

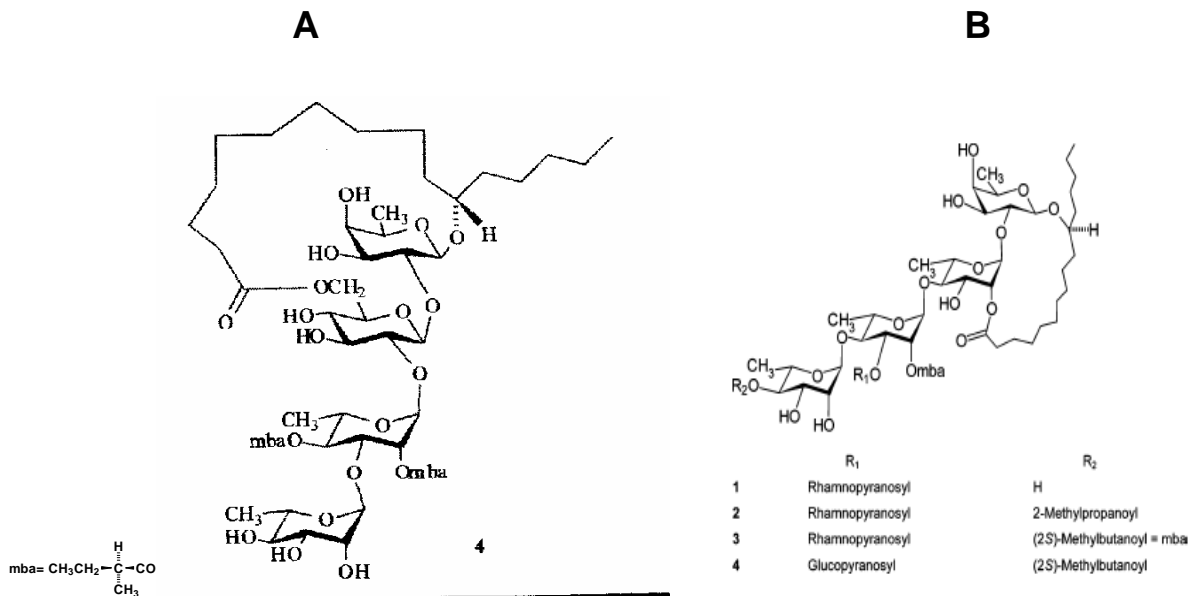


Figura 6. Glicorresinas isoladas de *Ipomoea tricolor* (A) e *Ipomoea murucoides* (B) (Convolvulaceae)

Diferentes ácidos fenólicos já foram descritos para espécies de convolvuláceas. Dentre eles ácido caféico, ácido clorogênico e o ácido dicafeoilquínico (YOSHIMOTO et al., 2004; TRUONG et al., 2007).

2.8.1. Substâncias fenólicas

Quimicamente as substâncias fenólicas podem ser definidas como substâncias que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES et al., 2003; CAI et al., 2004). Estão amplamente distribuídas no reino vegetal e nos microrganismos, fazendo parte também do metabolismo animal. Dentre as substâncias fenólicas pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais são encontradas estruturas variadas como: ácidos fenólicos, derivados da cumarina, pigmentos hidrossolúveis das flores, dos frutos e das folhas, além de ligninas, taninos, polímeros e ainda proteínas, alcalóides e terpenóides (SIMÕES et al., 2003).

Podem ser classificadas segundo o tipo de esqueleto principal e à cadeia substituinte conforme ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação das substâncias fenólicas de acordo com o esqueleto básico

Esqueleto básico	Classe de substâncias fenólicas
C6	fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	ácidos fenólicos
C6-C2	acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides e isoflavonóides

(C6-C3) ₂	Lignanás
(C6-C3-C6) ₂	Diflavonóides
(C6) _n	melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	taninos condensados

Fonte: SIMÕES et al., 2003.

As substâncias fenólicas podem ser formadas através de duas rotas biogénéticas: pela via do ácido chiquímico a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato. A origem biogénética determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa maneira, pela via do ácido chiquímico obtém-se compostos com grupos hidroxilas em posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas em posição *meta*. Estas substâncias podem ser obtidas a partir de um extrato etanólico do material fresco ou seco (SIMÕES et al., 2003).

As substâncias fenólicas contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses economicamente importantes. Para alguns derivados dos ácidos fenólicos tem sido relatada atividade antioxidante, como para o ácido clorogênico, para o ácido caféico e seus ésteres com esteróis e triterpenos, o que tem sugerido que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos podem ser retardadas pela ingestão de antioxidantes naturais encontrados na dieta, principalmente de compostos fenólicos (SIMÕES et al., 2003).

Foram relatados efeitos sinérgicos para atividade antioxidante entre uma mistura de compostos fenólicos obtidos da batata-doce e uma mistura de aminoácidos, considerando que essa proteção é maior para essas duas misturas

quando testadas em associação do que quando empregadas separadamente (SIMÕES et al., 2003).

2.8.1.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos constituem a maior classe de fenólicos, ocorrendo comumente no mundo das plantas. Os ácidos fenólicos incluem ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatecúico, ácido vanílico) e os ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico, ácido caféico, ácido cumárico, ácido clorogênico, ácido cinâmico). Estes podem ser identificados utilizando HPLC-DAD através da comparação com padrões de referência (CAI et al, 2004).

IMBERT & WILSON (1972) avaliaram os efeitos dos ácidos caféico e clorogênico de preparações de batata-doce (*Ipomoea batatas* – Convolvulaceae) na IAA oxidase. Os resultados obtidos mostraram que ambos os ácidos podem inibir ou estimular a enzima, dependendo da concentração do substrato, dos fenólicos usados e do pH da reação.

2.8.1.2. CLAE

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é o sistema escolhido em estudos de metabólitos secundários vegetais, combinada com detector UV-visível para identificação e isolamento de metabólitos de interesse. É uma técnica analítica que compreende uma grande variedade de modos de separação, os quais podem ser escolhidos segundo a natureza química dos compostos, sendo assim possível

otimizar um sistema de separação através da combinação correta entre as diversas fases móveis e estacionárias que esse sistema permite (YUNES & CALIXTO, 2001).

Diversos estudos vêm sendo realizados utilizando CLAE na identificação e/ou separação de compostos fenólicos (CAI et al., 2004; GOVINDARAJAN et al., 2007; JIMÉNEZ et al., 2007; KRIZMAN et al., 2007; TUNG, 2007; YE et al., 2007).

2.8.1.3. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica que consiste na introdução dos compostos de interesse no espectrômetro, a ionização destes compostos sob a forma de cátion ou ânion, sua separação de acordo com a relação m/z e a detecção (YUNES & CALIXTO, 2001).

Na literatura são encontrados vários estudos utilizando EM na detecção e elucidação estrutural de metabólitos secundários (CHARROUF et al., 2007; YE et al., 2007), inclusive de compostos polifenólicos (SANNOMIYA et.al., 2005).

III – OBJETIVOS

Devido à utilização popular de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. e considerando que existem poucos estudos na literatura com esta espécie, os objetivos deste trabalho foram:

- Caracterizar macro e microscopicamente a raiz de *Operculina macrocarpa*;
- Avaliar as características físicas, físico-químicas, químicas e microbiológicas da raiz de *O. macrocarpa*;
- Otimizar as condições do processo extrativo por diferentes técnicas de extração e solventes;
- Traçar o perfil cromatográfico do extrato, do chá e da resina obtidos da raiz de *O. macrocarpa* por CLAE-UV-DAD e por EM;
- Quantificar os ácidos fenólicos no extrato e no chá da raiz de *O. macrocarpa* por CLAE-UV-DAD;
- Avaliar a atividade laxante, utilizando diferentes modelos experimentais, do extrato, do chá e da resina obtidos da raiz de *O. macrocarpa*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato, do chá e da resina da raiz de *O. macrocarpa*;
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato, do chá e da resina da raiz de *O. macrocarpa*;

IV - MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Equipamentos

- Autoclave vertical PHOENIX[®]
- Balança analítica BEL MARK[®]
- Câmara de CO₂ SOLAB[®]
- Contador de colônias PHOENIX[®]
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de foto diodos (CLAE-HPLC-UV-DAD) modelo *ProStar 210/330* VARIAN[®]
- Espectrofotômetro UV/VIS Cary 1E VARIAN[®]
- Espectrômetro de massas LCQ Deca (ESI-IT-MSⁿ) THERMO FINNIGAN[®]
- Evaporador rotativo MA 120 – MARCONI[®]
- Estufa para esterilização 400/ 5 SD NOVA ÉTICA[®]
- Estufa agitadora para cultura MARCONI[®]
- Estufa para cultura bacteriológica 1.2 digital ECB ODONTOBRÁS[®]
- Liofilizador CHRISTH APPHA[®]
- Microscópio óptico CH 20 OLYMPUS[®]
- Micrótomo LEICA[®]
- Moinho de bolas TECNAL[®]
- Potenciômetro MICRONAL[®]
- Tamisador vibratório PRODUTEST[®]

4.1.2. Softwares

- Excel MICROSOFT®
- Minitab MINITAB INC®
- Star chromatography Workstation VARIAN®
- Xcalibur THERMO FINNIGAN®

4.1.2. Solventes, reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes, exceto quando especificado, possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.), sendo SIGMA®, MERCK® ou SYNTHLAB®.

- 2,2 difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)
- Acetonitrila grau HPLC
- Ácido clorídrico
- Ácido clorídrico diluído
- Ácido caféico
- Ácido clorogênico
- Ácido ferúlico
- Ácido trifluoracético (TFA) grau HPLC
- Ágar bismuto-sulfito
- Ágar eosina azul de metileno (EMB) DIFCO®
- Ágar Mac Conkey
- Ágar Sabouraud ACUMEDIA®
- Ágar tioglicolato DIFCO®
- Ágar tríplice açúcar ferro (TSI) DIFCO®
- Ágar verde brilhante DIFCO®

- Ágar Vogel Johnson (VJ) DIFCO®
- Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) DIFCO®
- Caldo lactosado DIFCO®
- Caldo selenito-cistina DIFCO®
- Caldo soja caseína DIFCO®
- Caldo tetracionato DIFCO®
- Carbonato de sódio
- Carvão ativo
- Cloreto férrico
- Clorofórmio
- Etanol
- Éter etílico
- Goma arábica
- Kit Historesina LEICA®
- kit reagente BAYER®
- Metanol
- Polivinilpirrolidona
- Reagente Fenólico de Folin-Ciocalteau 2N
- Sulfato de sódio anidro
- Tampão fosfato pH 7,2

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo do material vegetal

As raízes de *O. macrocarpa* foram coletadas no município de Ilhéus, Estado da Bahia no mês de março de 2005. A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Luis Vitor Silva Sacramento do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara.

As raízes foram previamente rasuradas e submetidas à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de 45 °C até peso constante, e moídas em moinho de bolas para reduzir o tamanho das partículas.

4.2.2. Caracterização macroscópica

A droga vegetal e o pó da droga foram dispostos em placa de Petri e analisados macroscopicamente.

4.2.3. Caracterização microscópica

Para análise microscópica da espécie foram preparadas lâminas permanentes através da inclusão do material em historresina.

As raízes foram mantidas em glicerina e água 1:1 (V/V) durante 7 dias e, foram seccionadas em fragmentos de aproximadamente 0,5 cm de largura e 1,0 cm de altura, que foram submetidos à desidratação conforme a seqüência:

- Etanol 50° GL 2 h
- Etanol 70 °GL 2 h
- Etanol 96 °GL 2 h
- Etanol absoluto 2 h

Em seguida, o material foi mantido por 2 h em uma mistura de etanol absoluto/resina líquida (1:1) para pré-infiltração. Para infiltração o material foi mantido em uma mistura com 0,01 g de pó ativador e 1 mL de resina líquida por 24 h.

Para polimerização foi preparada uma mistura com 15 mL da solução de infiltração e 1 mL de Hardner (agente endurecedor), que foi colocada nos moldes de polietileno e os fragmentos dispostos conforme orientação desejada. A placa de moldes foi levada à estufa a 40 °C até o endurecimento do material. Retirou-se o material dos moldes para montagem em blocos de madeira.

Os cortes anatômicos foram obtidos em micrótomo na espessura de 8 µm e transferidos para lâminas de vidro, as quais permaneceram à temperatura ambiente até secagem. A coloração foi realizada utilizando-se azul de toluidina.

4.2.4. Controle de qualidade da droga vegetal

Foram realizados testes de controle de qualidade do material vegetal de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1926, 1959, 1988).

4.2.4.1 Controle físico-químico

4.2.4.1.1 Análise granulométrica

Com o objetivo de padronizar a granulometria do pó das raízes moído foi submetido à passagem forçada por vibração, através de tamises com abertura de malhas correspondentes e o coletor, 0,125; 0,177; 0,420; 0,840; 2,00 mm, utilizando tamisador vibratório, na escala dez do aparelho, durante trinta minutos. Após este processo, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor e quantificadas quanto às suas proporções.

4.2.4.1.2 Determinação da densidade aparente (MARTINS; SACRAMENTO, 2004).

Para determinar a densidade aparente do pó, foram amostrados 50 g do pó, os quais foram distribuídos em encapsulador contendo 25 cápsulas de tamanho 00. Em seguida, o peso foi determinado e a densidade calculada pela relação massa/volume do pó. Este procedimento foi repetido três vezes com três amostras distintas.

4.2.4.1.3 Perda por dessecação

Amostras de 1 g da droga vegetal moída, exatamente pesada, foram submetidas ao aquecimento a 110 °C durante 5 horas. Em seguida a amostra foi

pesada e o valor foi expresso em porcentagem através da média de três determinações.

4.2.4.1.4 Determinação do pH

Foi preparado um decocto a 1% com a droga vegetal moída, a solução extrativa foi filtrada e após resfriamento foi feita leitura do pH em potenciômetro previamente calibrado. O resultado foi expresso através da média de três determinações.

4.2.4.1.5 Determinação do teor de cinzas totais

Foi calcinado previamente o cadinho de porcelana em mufla à 450 °C por 30 min. O mesmo foi resfriado em dessecador (30 min) e seu peso foi determinado em balança analítica. Foram pesados exatamente 3,0 g do material vegetal triturado, os quais foram incinerados e, posteriormente, submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450 °C por 2 h. Foi deixado em dessecador para arrefecimento durante 2 h e pesagem posterior. Foi repetida a técnica até peso constante. O resultado foi expresso em porcentagem em peso de cinza na droga (% p/p) e representando a média de três determinações.

4.2.4.1.6 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

Os resíduos obtidos na determinação de cinzas totais foram aquecidos à ebulição durante 5 minutos com 25mL de ácido clorídrico 7% (p/V) em cadinhos cobertos com vidro de relógio. Em seguida, o vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente e essa água transferida para o cadinho. O resíduo insolúvel em ácido foi recolhido em papel de filtro isento de cinzas, e lavado com água quente até que o

filtrado se mostrasse neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, o mesmo foi seco em chapa quente e incinerado à 500 °C até peso constante. Foi, então, calculada a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga. A análise foi realizada em triplicata.

4.2.4.1.7 Prova de identificação

Cerca de 0,1 g da droga em pó foi transferida para um tubo de ensaio e acrescentada de 10 mL de água destilada. O tubo foi agitado energicamente 20 vezes, deixado em repouso por 15 minutos e foi observada a formação de espuma.

4.2.4.1.8 Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1 g da droga vegetal moída, exatamente pesado, foi submetido à decocção com 100 mL de água, durante 10 min. Após resfriamento, o volume foi completado para 100 mL em balão volumétrico. A solução foi filtrada em papel de filtro, e os primeiros 20 mL foram desprezados. Do restante do filtrado, foi pesada uma alíquota equivalente a 20 g, em pesa-filtro previamente tarado, e foi evaporado até secura em banho-maria, sob agitação constante. O resíduo foi colocado em estufa, à 105 °C durante 3 horas, e em seguida resfriado em dessecador e pesado. O teor de extrativos foi calculado em massa percentual pela média de três determinações.

4.2.4.2 Controle microbiológico

4.2.4.2.1. Contagem total de microrganismos

Foram transferidos, assepticamente, 10 g da droga vegetal para 90 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, para a contagem dos microrganismos totais. A amostra 1:10 foi submetida à agitação durante 10 min. Após a homogeneização, foi pipetado 1 mL da amostra 1:10 e adicionados 20,0 mL ágar tioglicolato para bactérias e ágar Sabouraud para leveduras, a 47 °C em placa de Petri, seguindo a técnica “pour plate” que foram colocadas em estufa a 35 °C por 24 h e 25 °C por 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de contador de colônias, calculando o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

4.2.4.2.2 Pesquisa de *Salmonella* sp e *Escherichia coli*

Foram transferidos, assepticamente, 10 g da droga vegetal para 90 mL de caldo lactosado, para pesquisa de *Salmonella* sp e *E. coli*, incubados a 35 °C durante 24 a 48 h. Após este período, 1 mL do caldo lactosado foi transferido para dois tubos contendo caldo tetrionato ou caldo selenito cistina, que foram incubados a 35 °C por 24 h. Após este período, a amostra foi semeada do caldo tetrionato para tubo contendo ágar verde brilhante e placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e ágar bismuto sulfito. Foi realizado da mesma forma com a amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferindo para os três meios, os quais foram incubados a 35 °C por 24 h. O crescimento e as características das colônias foram observados. As colônias suspeitas foram semeadas com alça reta em tubo contendo ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) e incubado a 35 °C por 24 h. A confirmação

Material e métodos
da *Salmonella* sp foi feita pelo método de Gram. Na pesquisa de *E. coli*, 1,0 mL do caldo lactosado foi transferido para placa contendo ágar Mac Conkey e incubado a 35 °C por 24 h. As colônias suspeitas foram semeadas em ágar eosina azul de metileno (EMB) e incubadas a 35 °C por 24 h. A confirmação da *E. coli* foi realizada através de método de Gram.

4.2.4.2.3 Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Foram transferidos, assepticamente, 10 g da droga vegetal para 90 mL de caldo soja-caseína, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e incubados a 35 °C por 24 a 48 h. Após este período, foi semeado em ágar Vogel Johnson, para a pesquisa de *S. aureus* e ágar cetrimida, para a pesquisa de *P. aeruginosa* a 35 °C por 24 h. As características das colônias foram observadas e a confirmação foi realizada através de método de coloração de Gram.

4.3. Otimização do processo extrativo

Foi realizado um planejamento experimental completo com 2 fatores, sendo um dos fatores o método em 4 níveis (maceração 3 dias, maceração 5 dias, percolação e decocção) e o outro fator o solvente em 3 níveis (água, etanol 50 °GL e etanol 70 °GL) totalizando 12 experimentos, os quais foram realizados em duplicata.

Utilizou-se o software MINITAB para o processo de aleatorização dos experimentos executados e posterior processamento realizando análise de variância (ANOVA).

Para otimização do processo extrativo foram preparados extratos pelos processos de maceração 3 dias, maceração 5 dias, decocção e percolação a 10 % (p/V) utilizando diferentes proporções do líquido extrator (água, etanol 50 °GL e etanol 96 °GL).

Os extratos foram preparados de acordo com a ordem de execução fornecida pelo planejamento experimental e analisados de acordo com os itens 4.3.1.2 e 4.3.1.3.

4.3.1.2. Determinação do teor de resíduo seco

Uma amostra de 20 g da solução extrativa foi exatamente pesada em pesa-filtro previamente tarado e evaporada até secagem em banho-maria, sob agitação constante. O pesa-filtro foi colocado em estufa por 3 horas a 105 °C, resfriado em dessecador e pesado. O resultado foi expresso em relação a 100 g do extrato, pela média de três determinações.

4.3.1.3. Determinação do teor de fenólicos totais (GLASL, 1983)

Uma amostra equivalente a 0,750 g de droga vegetal, exatamente pesada, foi transferida para erlenmeyer com 150 mL de água, e mantidos durante 30 min em banho-maria à temperatura de 80-90 °C. Após, o erlenmeyer foi resfriado em água corrente, sendo seu conteúdo transferido, para balão volumétrico de 250 mL, sendo lavado e completando-se o volume com água. Filtrou-se 80 mL do extrato, desprezando os primeiros 50 mL. O filtrado foi denominado solução-mãe (SM).

Para a determinação de fenólicos totais (PT), 5 mL da SM foram diluídos com água em balão volumétrico de 25 mL. Dois mililitros dessa solução foram transferidos e adicionados de 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteau 2/N) e 10 mL de água para balão volumétrico de 25 mL, sendo completado o volume com solução de carbonato de sódio a 14,06%. Após a adição da última solução foram esperados 30 min e foi medida a absorvância a 691 nm, sendo empregada água como branco.

4.3.1.4. Obtenção do extrato

Foram utilizados 200 g do pó da raiz de *O. macrocarpa*, que foram previamente umedecidos com EtOH 70 °GL e deixados em repouso durante 2 h. Em seguida, o pó foi acomodado no percolador e submetido à extração com EtOH 70 °GL. Foram obtidos 2 L de percolado, o qual foi concentrado em evaporador rotatório e, posteriormente, congelado e liofilizado. Após este processo foram obtidos 36 g de extrato etanólico (EEtOH) seco.

4.3.1.5. Obtenção do chá

Foram utilizados 200 g da raiz seca e triturada, os quais foram transferidos para um béquer de vidro, onde foi adicionado 2 L de água e levados a ebulição durante 10 min. Após resfriamento e filtração foi obtido 1,5 L de decocto. Em seguida este foi congelado e liofilizado, obtendo-se assim 46,2 g de chá liofilizado (Tabela 9).

4.3.1.6. Obtenção da resina

A resina foi obtida a partir do **EEtOH**, o qual foi preparado por percolação com EtOH 70 °GL, e posteriormente concentrado em evaporador rotatório. Após a eliminação do EtOH houve a precipitação da resina por decantação. Em seguida a resina foi mantida em estufa a 40 °C para secagem.

O **EEtOH** do qual foi precipitada a resina foi posteriormente rotaevaporado e liofilizado, sendo denominado extrato sem a resina, o qual também foi avaliado química e farmacologicamente.

4.3.1.6.1. Obtenção da dispersão sólida contendo a resina

Considerando a insolubilidade em água da resina, preparou-se uma dispersão sólida com a mesma para administração oral em camundongos no teste de motilidade intestinal.

A dispersão sólida foi preparada solubilizando-se a resina em solução etanólica de polivinilpirrolidona. O etanol foi evaporado em rotaevaporador a 50 °C. A dispersão sólida foi obtida na concentração final de 12,5 mg/mL de resina.

4.4. Perfil cromatográfico (CLAE – UV – DAD)

A análise do perfil químico do extrato de *O. macrocarpa* foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de foto diodos (CLAE-CLAE-UV-DAD) da marca Varian[®] modelo *ProStar* 210/330 com coluna analítica de fase reversa C₁₈ [Luna (2), Phenomenex[®]] de 250 x 4,6 mm x 5 µm e poro com diâmetro interno de 100 Å, e uma coluna de guarda (Phenomenex[®]) de 4 x 3 mm x 5 µm. Amostras e padrões foram injetados através de um injetor Rheodyne[®] 7125 com *loop* de 20 µL.

A avaliação por CLAE do **EEtOH** *O. macrocarpa* foi realizada através da identificação de alguns dos seus metabólitos, com auxílio dos dados espectroscópicos de UV, por comparação do tempo de retenção e, principalmente, por co-injeção de padrões comerciais ou por aqueles isolados de fontes vegetais.

As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Sistema eluente usado na separação dos metabólitos presentes no EEtOH de *O. macrocarpa*. Fluxo de 1,0 mL/min.

Solvente A	Solvente B	Gradiente	
		Tempo (min)	%B
H ₂ O + 0,05% TFA	ACN + 0,05% TFA	0-20	28-40
		20-21	40-70
		21-31	70-100
		31-40	100

4.5. Determinação quantitativa de ácidos fenólicos presentes em *Operculina macrocarpa* por CLAE-UV-DAD

O método proposto foi aplicado para a quantificação de ácidos fenólicos presentes no EEtOH 70%, EEtOH sem resina e Chá das raízes de *O. macrocarpa* usando o mesmo procedimento adotado na construção do perfil cromatográfico descrito no item 4.4.

Essa metodologia tem como objetivo fornecer informações que possam levar ao entendimento de uma provável relação entre a quantidade de ácidos fenólicos presentes com as atividades farmacológicas apresentadas pelos extratos ou chá.

4.6. Espectrometria de massas

Foi realizada a injeção direta do **EEtOH**, do **chá** e da **resina** de *O. macrocarpa*, no modo negativo visando caracterizar os metabólitos secundários presentes nessas amostras através da comparação com padrões autênticos.

4.7. Avaliação da atividade laxante

Nos ensaios de trânsito intestinal foram utilizados o **EEtOH** e o chá de *O. macrocarpa*, e os ácidos caféico, clorogênico e ferúlico.

O EEtOH e o chá foram ressuspensos em água destilada a 30 mg/mL, e os ácidos a 1 mg/mL em água destilada.

4.7.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos, com 30 dias de idade, pesando entre 22 e 30 g, os quais foram adaptados ao biotério experimental por 5 dias antes do início dos ensaios biológicos. Os animais, mantidos em livre acesso à alimentação e à água, foram mantidos em ambiente com temperatura de 20 ± 1 °C, umidade monitorada e fotoperíodo de 12 h claro/escuro. No dia do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 3 h e recebendo água *ad libitum*.

Os animais utilizados são procedentes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu.

Os procedimentos foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta faculdade através do Parecer nº25/2006.

4.7.1.1. Trânsito intestinal com carvão ativo

Os animais foram aleatoriamente separados em grupos de 10 animais cada e receberam o tratamento por via oral através de cânula de gavage.

Após 45 min, os animais receberam a suspensão de carvão ativo 10% em solução de goma arábica 5%, 0,5 mL/animal, também através de cânula de gavage.

Após 45 min, os camundongos foram sacrificados em câmara de CO₂ e foi realizada a extirpação imediata do intestino desde o piloro até o início do ceco. Assim, foi feita a medida do comprimento total do intestino delgado e da distância percorrida pela suspensão de carvão ativo. O resultado foi expresso em porcentagem do comprimento total do intestino delgado. Os intestinos foram pesados individualmente em balança analítica.

A atividade sobre o trânsito intestinal foi determinada segundo JANSSEN & JAGENEAU (1957) e WONG & WAI (1981).

4.7.1.1.2. Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste-*t* de Student ($P < 0,05$) (DE MUTH, 1999).

4.5.1.2. Trânsito intestinal com carvão ativo modificado (MARONA & LUCCHESI, 2004).

Os animais foram aleatoriamente separados em grupos de 10 animais cada e receberam o tratamento por via oral através de cânula de gavage.

Após 90 min, os animais receberam a suspensão de carvão ativo 10% em solução de goma arábica 5%, 0,3 mL/animal, também através de cânula de gavage.

Após 60 min, os animais voltaram a ter acesso à água e ração.

Os camundongos foram observados durante 4 h de 5 em 5 min, e foi medido o tempo em as primeiras fezes com carvão ativo foram eliminadas.

4.7.1.2.1. Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste-*t* de Student ($P < 0,05$) (DE MUTH, 1999).

4.7.1.3. Trânsito intestinal em gaiola metabólica

Os animais foram aleatoriamente separados em grupos de 10 animais cada e receberam o tratamento por via oral através de cânula de gavagem.

Os animais foram então colocados em uma gaiola metabólica, e após 4 h as fezes foram pesadas e comparadas com o grupo controle.

4.7.1.3.1. Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos em média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo teste-*t* de Student ($P < 0,05$) (DE MUTH, 1999).

4.8. Avaliação Toxicológica

4.8.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), machos e fêmeas, com 60 dias de idade, pesando entre 45 e 60 g, os quais foram adaptados ao biotério experimental por 5 dias antes do início dos ensaios biológicos. Os animais, mantidos em livre acesso à alimentação e à água, foram mantidos em ambiente com temperatura de 20 ± 1 °C, umidade monitorada e fotoperíodo de 12 horas claro/escuro. No dia do experimento, os animais foram mantidos em jejum por 3 horas e recebendo água *ad libitum*.

4.8.2. Toxicidade aguda – dose única

Foi avaliada a toxicidade aguda – dose única do chá de *O. macrocarpa*. O EEtOH já foi avaliado anteriormente (MICHELIN, 2004).

Os animais foram divididos em grupos de dez animais, cinco machos e cinco fêmeas cada. O grupo controle recebeu solução fisiológica e os outros grupos receberam diferentes doses do extrato. Após a administração, os animais foram observados 0,5; 1; 2; 4; 12 e 24 h em relação à alteração de pêlos, pele e mucosas, sistemas respiratório e circulatório, sistemas nervosos central e periférico, atividade somatomotriz, comportamento e especial atenção a sintomas, tais como: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia e coma (BRITO, 1996).

Os animais foram pesados no início e ao fim do experimento.

No 14^o dia os animais de cada grupo foram sacrificados por decaptação, em seguida foi coletado 1 mL de sangue de cada animal para dosagem das transaminases séricas (AST e ALT) realizada no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti.

Foi realizada ainda a pesagem individual dos órgãos dos animais, tais como coração, pulmão, fígado e rins.

4.8.3. Toxicidade aguda – doses repetidas

Foram avaliados o chá e o EEtOH de *O. macrocarpa*.

Os animais foram divididos em grupos de dez animais, cinco machos e cinco fêmeas cada. O grupo controle recebeu solução fisiológica e os outros grupos receberam diferentes doses do extrato.

Os animais receberam os extratos em dias alternados durante 14 dias e foram observados diariamente até 14 dias após o fim do experimento em relação aos mesmo parâmetros observados para a toxicidade aguda – dose única (BRITO, 1996).

Os animais foram pesados no início e ao fim do experimento.

No 14^o dia após o final da administração dos extratos os animais de cada grupo foram sacrificados por decaptação, em seguida foi coletado 1 mL de sangue de cada animal para dosagem das transaminases séricas (AST e ALT) realizada no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti.

Foi realizada ainda a pesagem individual dos órgãos dos animais, tais como coração, pulmão, fígado e rins.

4.8.3.1. Determinação das transaminases séricas (AST e ALT)

Aspartato aminotransferase (AST) foi determinada de acordo com método cinético descrito por BERGMAYER e colaboradores (1977), utilizando kit reagente BAYER®.

Alanina aminotransferase (ALT) foi determinada por método cinético descrito por WRÓBLENSKI & LADUE (1956) e RECOMMENDATION (1972), utilizando kit reagente BAYER®.

4.8.3.2. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste-*t* de Student ($P < 0,05$) (DE MUTH, 1999).

4.7. Avaliação da Atividade Antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante foi realizado o ensaio com 2,2 di-fenil-2-picril-hidrazil (DPPH). O DPPH é um radical livre estável com falta de um elétron em sua estrutura, sendo usado para testar o potencial de doação de elétrons de outros compostos, como os compostos fenólicos. Uma substância ao doar um elétron para o DPPH, faz com que este mude sua cor, permitindo o monitoramento da reação pelo espectrofotômetro (GAO et al., 1999).

O espectrofotômetro foi calibrado com metanol (MeOH), na faixa de absorvância de 517 nm. As amostras de *Operculina macrocarpa* foram diluídas em MeOH e adicionadas em concentrações finais diferentes (5, 10, 20, 40, 80 e 160 µg/mL), à solução de DPPH (4 mg de DPPH em 100 mL de MeOH), completando um volume final de 3 mL. Após este procedimento, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente, protegidas da luz por 30 minutos, e depois foi feita a leitura a 517 nm. A leitura do branco (A_0) foi feita com 2 mL de solução de DPPH adicionada em 1 mL de MeOH. Os cálculos foram feitos pela fórmula descrita abaixo:

$$\% \Delta_0 = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100$$

Em que:

$\% \Delta_0$ = variação da absorvância

A_0 = absorvância do DPPH em metanol

A = absorvância da amostra após 30 min de reação

Foi utilizado padrão de ácido caféico, o qual foi submetido ao mesmo procedimento experimental. Os valores medidos das absorvâncias foram plotados em um gráfico de variação da absorvância ($\% \Delta$) *versus* concentração da amostra.

A figura 7 mostra um esquema do método utilizado para determinação da atividade antioxidante.

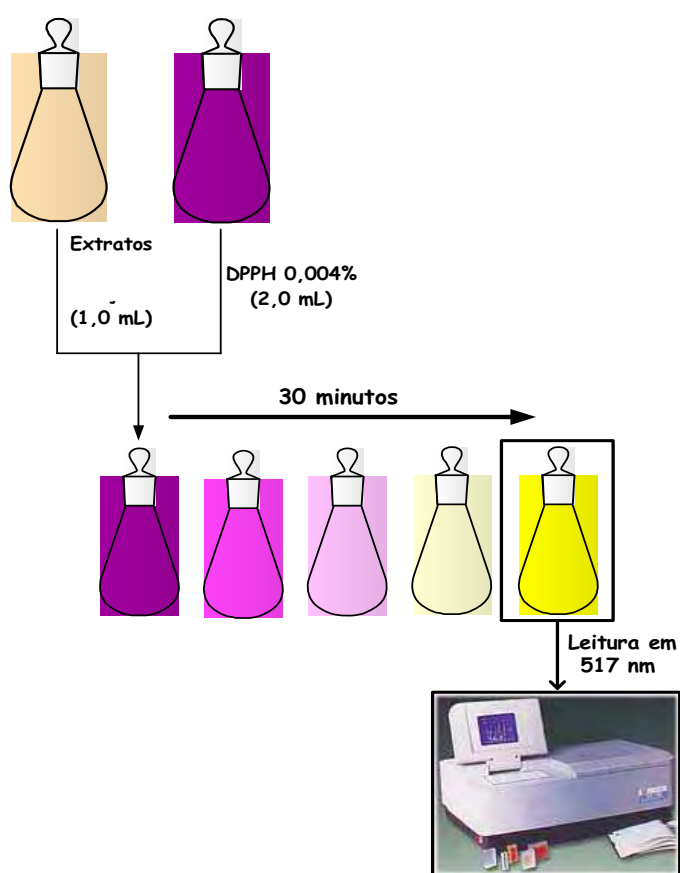


Figura 7. Esquema do método usado na determinação da atividade antioxidante utilizando o reagente de DPPH.

V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

O emprego de plantas medicinais na medicina tradicional existe há centenas de anos, e o grande problema é que os vegetais são utilizados indiscriminadamente pela população e, muitas vezes, essas plantas não têm ação comprovada e podem também apresentar riscos de toxicidade.

A maioria das pessoas não tem conhecimento de que plantas também podem causar danos à saúde. Por exemplo, a *Digitalis purpurea* L., que contém glicosídeos cardiotônicos e é utilizada para tratamento de insuficiência cardíaca, possui dose terapêutica muito próxima da dose tóxica. Uma dose um pouco mais elevada que a terapêutica pode causar intoxicação e provocar até a morte por parada cardíaca (GALINA, 2003).

Muitos estudos vêm sendo realizados no sentido de garantir a eficácia e a segurança dos fitoterápicos. Uma grande dificuldade na identificação das plantas medicinais é o uso do nome popular ao invés do nome científico, pois uma mesma espécie pode apresentar diferentes nomes populares e dificultar sua identificação.

No caso da espécie em estudo, *Operculina macrocarpa* é popularmente conhecida como batata-de-purga ou jalapa, mas outra espécie, *O. alata*, também é conhecida com os mesmos nomes populares. A jalapa também pode se referir a *Ipomoea purga*. Dessa forma, o presente trabalho possui como um dos seus objetivos o controle de qualidade da droga vegetal em estudo, a raiz de *O. macrocarpa*.

Após a identificação, etapa importante no controle de qualidade de um fitoterápico, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa com ar circulante à temperatura de 45 °C até estabilização. A secagem do material vegetal tem por finalidade a conservação da droga vegetal, uma vez que a retirada de água impede

possíveis reações de hidrólise e o crescimento de microrganismos (SIMÕES et al., 2003).

5.1. Caracterização macroscópica

Com a observação macroscópica é possível analisar a droga vegetal, verificar as condições gerais do produto, detectando-se a presença de materiais estranhos, de outras partes do mesmo vegetal ou até mesmo de outras espécies. A análise macroscópica permite ainda verificar indícios de contaminação e de deterioração, como o desenvolvimento de bolores ou perfurações no material. (GIL, 2007).

Na análise macroscópica foi observado que as túberas apresentam-se cortadas em rodela transversais, a cor nas superfícies da secção aparece branco-acinzentada, e para dentro do súber observam-se 3 a 8 círculos estreitos e escuros como apresentado na figura 8. Os resultados obtidos estão de acordo com as especificações da monografia de *O. macrocarpa*, o que indica a identidade da droga.

Na análise macroscópica, o pó da batata-de-purga apresenta-se fino e de cor castanho-clara como mostrado na figura 9.



Figura 8. Aspecto macroscópico de *O. macrocarpa*

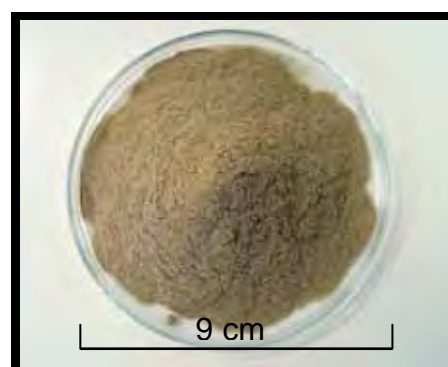


Figura 9. Aspecto macroscópico do pó de *O. macrocarpa*

5.2. Caracterização microscópica

A análise microscópica baseia-se na verificação da existência de determinados tipos celulares e na seqüência de tecidos encontrados em um determinado órgão, estando descritos em farmacopéias ou literaturas especializadas (GIL, 2007).

Na análise microscópica realizada nos cortes realizados com *O. macrocarpa* foram encontradas esclereídes (Figura 10A, 10B e 10F), inúmeras unidades de grãos de amido simples e compostos (Figura 10C, 10D e 10E), em geral, agrupados em duas ou três e até doze unidades, além de grãos gêmeos, com fendas em forma de til, as quais são características. Foram encontradas também drusas de oxalato de cálcio (Figura 10B, 10C e 10G) e fileiras de células parenquimáticas, sendo uma delas com parede celular espessada com conteúdo fenólico. Sugere-se que esta célula seja um idioblasto resinoso (Figura 10I).

As estruturas encontradas nas secções anatômicas conferem com descrição microscópica da monografia (Farmacopéia Brasileira, 1959), mostrando a autenticidade da amostra estudada.

Relacionando os caracteres macroscópicos com os microscópicos pode-se dizer que os anéis estreitos e escuros dizem respeito às porções contendo as esclereídes, drusas e as células resinosas, nas imediações dos anéis esbranquiçados, os quais se referem ao parênquima de reserva de amido (Figura 10D e 10H).

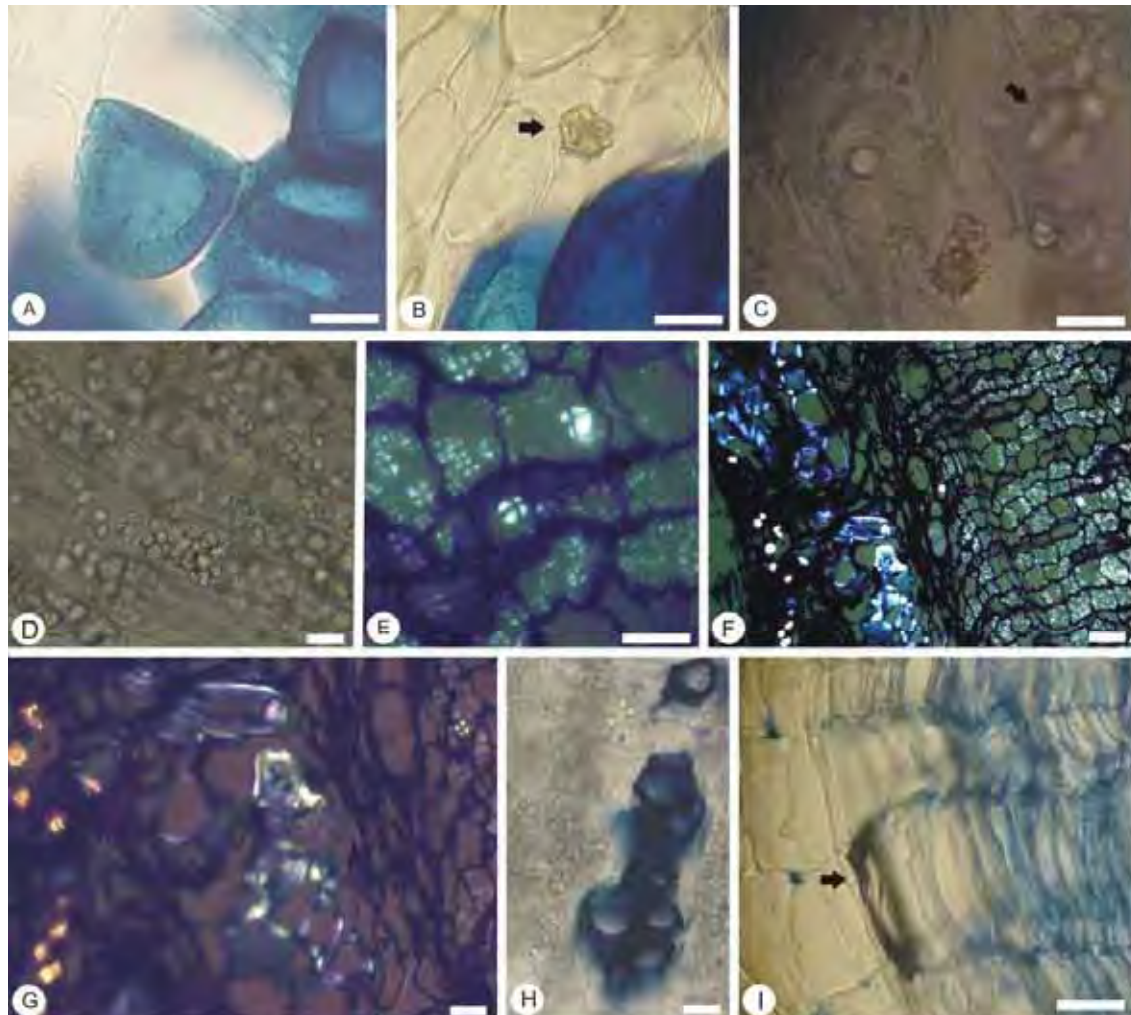


Figura 1. Características anatômicas da raiz de *Operculina macrocarpa* (L.) Urban. A: esclereídes com pontoações (barra: $30\mu\text{m}$); B: drusa (seta) (barra: $10\mu\text{m}$); C: drusas e grãos de amido (seta) (barra: $10\mu\text{m}$); D: aspecto geral do parênquima de reserva mostrando os grãos de amido poliédricos (barra: $100\mu\text{m}$); E: detalhe do parênquima de reserva em luz polarizada (barra: $50\mu\text{m}$); F e G: distribuição das drusas, das esclereídes e dos grãos de amido no tecido radicular em luz polarizada (barra: $10\mu\text{m}$); H: detalhe do parênquima de reserva mostrando um dos pólos de xilema (barra: $100\mu\text{m}$); I: célula com depósito de fenólicos na parede celular (seta) (barra: $30\mu\text{m}$).

5.3. Controle de qualidade da droga vegetal

A moagem possibilitou reduzir mecanicamente o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o para a próxima etapa, a extração. Partículas com pequenas dimensões aumentam a área de contato entre o material sólido e o líquido extrator, tornando, desta forma, mais eficiente a extração (SIMÕES et al., 2003).

Para a raiz de *O. macrocarpa* foi utilizada a moagem em moinho de facas.

A avaliação granulométrica do material moído é um parâmetro imprescindível a ser estabelecido, pois representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo. Os resultados da avaliação da granulometria encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Análise granulométrica do pó da raiz de *O. macrocarpa*

Tamanho da malha (mm)	Amostra		
	1	2	3
2	0,97	0,54	1,25
0,840	9,55	9,99	8,56
0,420	8,79	9,65	9,08
0,177	5,19	5,82	5,45
0,125	9,15	9,21	8,50
Coletor	16,60	15,41	18,24

Após análise dos dados apresentados na Tabela 3 foi possível detectar um diâmetro médio das partículas de 0,169 mm.

Vários ensaios foram realizados com o objetivo de controlar a qualidade da droga vegetal. As análises físico-químicas envolveram a determinação da perda por dessecação, determinação do pH, determinação do teor de cinzas totais, determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido, e determinação do teor de extrativos. Com relação à análise química, realizou-se uma prova de identificação encontrada na monografia da droga (Farmacopéia Brasileira, 1959).

Os resultados do controle de qualidade físico-químico da droga vegetal são apresentados na Tabela 5 e estão de acordo com as especificações encontradas na Farmacopéia Brasileira e demonstram que a droga vegetal está aprovada para o uso na preparação dos extratos.

Tabela 5. Resultados obtidos nas análises de controle de qualidade da droga vegetal.

Análise	Resultado
Diâmetro médio das partículas	0,169 mm
Densidade aparente	0,28 g/mL
Perda por dessecação	8,09%
Determinação do pH	5,7
Determinação do teor de cinzas totais	7,82%
Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido	0,98%
Determinação do teor de extrativos	1,07%
Prova de identificação	Positivo

A determinação da perda por dessecação do pó da raiz de *O. macrocarpa* apresentou um valor de 8,09% quando ocorreu estabilização do processo. Esse resultado encontrado está de acordo com as especificações, uma vez que a F. Bras. (2000) preconiza um valor na faixa de 8 – 14 % para drogas vegetais.

Este tipo de análise é importante uma vez que pode oferecer informações importantes com referência ao armazenamento da droga vegetal. A água residual encontrada na droga vegetal seca está diretamente relacionada com o seu correto armazenamento, que pode acarretar na perda do material por contaminação microbiana ou degradação dos constituintes químicos (MIGLIATO, 2005).

O valor de pH do extrato da droga vegetal foi 5,7 utilizando água com pH de 6,25, o que sugere a presença de substâncias ácidas no farmacógeno estudado.

Quanto à determinação do teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, os teores encontrados foram de 7,82 e 0,98 %, respectivamente. A droga vegetal foi aprovada também quanto a esse parâmetro avaliado, uma vez que o preconizado na monografia da droga (Farmacopéia Brasileira, 1959) é de, no máximo, 14% para cinzas totais e no máximo 3% para cinzas insolúveis em ácido.

A determinação do teor de cinzas totais é muito importante para o controle de qualidade uma vez que o objetivo do mesmo é verificar a presença de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar contaminando a droga vegetal (Farmacopéia Brasileira, 2000; SIMÕES et al., 2003).

A determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido é preconizada para raízes uma vez que essas podem conter contaminantes como resíduos de terra e areia, que são detectados nesse ensaio (SIMÕES et al., 2003).

Com o objetivo de avaliar a quantidade de substâncias extraíveis, denominado de teor de extrativos, e de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998), empregou-se a decocção em água. O rendimento encontrado foi de 1,07%.

No entanto, é importante levar em consideração a substância que se deseja extrair. No caso de compostos fenólicos, estes podem ser extraídos a partir de um extrato etanólico do material fresco ou seco (SIMÕES et al., 2003).

Quando se considera a extração cujo solvente é somente a água, a estabilidade do extrato torna-se ainda mais comprometida, uma vez que o risco de contaminação microbiológica aumenta significativamente (MIGLIATO, 2005).

Plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas e o fazem em diferentes proporções, dependendo do habitat, do regime de chuvas, da insolação, do solo, enfim, das características climáticas-edáficas. Entretanto, algumas substâncias químicas são bastantes características para um determinado vegetal, e desta forma podem servir como parâmetro para sua caracterização e identificação.

Na monografia da espécie em estudo é preconizada uma prova de identificação para o grupo das saponinas, esta foi realizada e o resultado foi positivo. Porém, em estudos anteriores foi observada a presença de ácidos fenólicos na espécie. Assim sendo, foi realizada a determinação do teor de fenólicos totais de acordo com GLASL (1983).

Considerando os diversos aspectos impostos para a garantia da qualidade do material botânico, que englobam não somente os aspectos físico-químicos, mas também o microbiológico, e considerando-se ainda, o fato dos materiais vegetais conterem um grande número de fungos e bactérias, pertencentes à sua microflora natural ou mesmo introduzidas durante a manipulação, contaminação esta que pode ser intensificada com o tempo e não somente comprometer o material em si, mas também o usuário, realizou-se o controle microbiológico do pó da raiz de *O. macrocarpa* (SIMÕES et al., 2003).

Os resultados do controle microbiológico e os limites permitidos são apresentados na Tabela 6, e permitiram observar que não houve crescimento microbiano de *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*,
Daniele Carvalho Michelin

considerados microrganismos patogênicos nas amostras analisadas, porém ocorreu crescimento de bactérias e fungos e de *Escherichia coli*, porém dentro dos limites preconizados.

Na contagem do número total de bactérias houve crescimento de 60 UFC/g e para fungos ocorreu o crescimento de 50 UFC/g.

O controle microbiológico tem como função determinar o número total de microrganismos presentes em preparações não estéreis, cosméticos e drogas vegetais, além de visar a identificação dos patogênicos, tais como *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que não devem estar presentes (Farmacopéia Brasileira, 1988; SIMÕES et al., 2003; WHO, 1998).

Esta análise visa assegurar o consumo de produtos de boa qualidade; ou seja, isentos de microrganismos patogênicos ou potencialmente prejudiciais, permitindo um número limite de microrganismos aceitáveis, assegurando qualidade microbiológica da droga vegetal (MIGLIATO, 2005).

Tabela 6. Análise microbiológica do pó da raiz de *O. macrocarpa*

Microrganismos	Resultados	Recomendações*
Aeróbios viáveis	60 UFC/g	$\leq 10^7$ UFC/g
Fungos	50 UFC/g	$\leq 10^4$ UFC/g
Enterobactérias / Bactérias Gram-negativas	20 UFC/g	$\leq 10^3$ UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	10 UFC/g	$\leq 10^2$ UFC/g
<i>Salmonella</i> sp.	Ausente	Ausência
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente	Ausência

* Fonte: FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000; PINTO et al., 2003; SIMÕES et al., 2003; GIL, 2007.

Tais resultados permitem concluir que a droga vegetal está de acordo com as especificações encontradas na literatura, e, portanto, está aprovada para a preparação dos extratos.

5.4. Otimização do processo extrativo

Pelo fato de não existir padronização do melhor método de extração e o melhor solvente para a espécie em estudo, a otimização do processo extrativo foi realizada. Assim sendo, foram preparados extratos por diferentes métodos e com a utilização de diferentes solventes. Para avaliação do melhor método extrativo foram realizadas a determinação do teor de resíduo seco e a determinação do teor de fenólicos totais.

Utilizou-se o software MINITAB para o processo de aleatorização dos experimentos executados e posterior processamento realizando análise de variância (ANOVA) e assim, foram obtidos os gráficos dos efeitos principais envolvendo os fatores considerados em relação a resposta obtida, que foram a determinação do teor de resíduo seco e a determinação do teor de fenólicos totais, buscando assim a indicação das melhores condições experimentais.

Foram preparados, em duplicata extratos a 10% de droga vegetal, por meio de quatro procedimentos diferentes: (1) maceração 3 dias; (2) maceração 5 dias; (3) percolação; e (4) decocção. Para cada procedimento foram testados os seguintes solventes: (1) etanol a 70 °GL; (2) etanol a 96 °GL; e (3) água. Como parâmetros de avaliação foram utilizados o método de determinação do teor de resíduo seco e a determinação do teor de fenólicos totais.

O solvente escolhido foi baseado na polaridade do grupo de substâncias que se procurou extrair. Buscando a extração de compostos fenólicos foram utilizados EtOH 70 e 96° GL e visando a extração de possíveis saponinas ou alcalóides na

forma de sal utilizou-se a água, que é um dos líquidos extratores mais importantes utilizados na extração de substâncias hidrofílicas (SIMÕES et al., 2003).

Para maceração, foram utilizados recipientes de vidro âmbar, hermeticamente fechados, onde foram acondicionados a droga e o solvente, sendo o conteúdo agitado várias vezes ao dia, durante um período de 3 e 5 dias.

A maceração apresenta o inconveniente de não conduzir ao esgotamento da matéria-prima vegetal, devido à possível saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento do equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. A agitação objetiva contornar estes inconvenientes (SIMÕES et al., 2003).

Para percolação, os inconvenientes referem-se ao empacotamento da droga vegetal no percolador e ao diâmetro das partículas da droga vegetal. O empacotamento deve ser realizado de forma homogênea e não compacta. Com relação ao tamanho das partículas do vegetal, propõe-se que não seja inferior a 1 mm, uma vez que partículas menores que este tamanho podem produzir uma compactação excessiva, reduzindo a velocidade de fluxo (MIGLIATO, 2005).

Para extração por percolação, a droga foi previamente intumescida com o líquido extrator, durante 2 h, fora do percolador. Em seguida, a droga foi empacotada no percolador e iniciou-se o processo de lixiviação.

O inconveniente da técnica de decocção encontra-se na alta temperatura empregada, a qual pode degradar alguns tipos de compostos. Porém é uma técnica muito empregada quando a droga vegetal se trata de material duro, como é o caso da raiz de *O. macrocarpa*.

Para a extração por decocção as raízes foram acomodadas em um béquer de vidro juntamente com o solvente e levados à ebulição durante 10 min quando o solvente utilizado foi água. Quando o solvente tratava-se de uma mistura hidroetanólica foi utilizado um sistema de refluxo.

5.4.1. Determinação do resíduo seco

Os resultados da determinação do teor de resíduo seco são apresentados na Tabela 7 e Figura 11.

Analisando separadamente os resultados pode-se observar que o maior rendimento foi obtido pelo método 3 (percolação) utilizando o solvente 1 (etanol 70 °GL).

Tabela 7. Determinação do teor de resíduo seco.

Método	Solvente	Resíduo seco (%)
Percolação	H ₂ O	2,0
	EtOH 70 °GL	2,1
	EtOH 96 °GL	1,1
Maceração 3 dias	H ₂ O	1,5
	EtOH 70 °GL	1,8
	EtOH 96 °GL	1,0
Maceração 5 dias	H ₂ O	1,4
	EtOH 70 °GL	1,7
	EtOH 96 °GL	1,1
Decocção	H ₂ O	0,5
	EtOH 70 °GL	1,8
	EtOH 96 °GL	1,0

A Figura 11 ilustra a variação observada no teor de resíduo seco de acordo com os diferentes métodos e solventes utilizados. Pode-se observar que para o fator método o nível 3 (percolação) apresentou melhor resultado, já os níveis 1 (maceração 3 dias) e 2 (maceração 5 dias) apresentaram resultados semelhantes, e o nível 4 (decocção) apresentou os piores resultados. Para o fator solvente, o nível 1 (EtOH 70 °GL) apresentou melhor resultado seguido do nível 3 (água) e o nível 2 (EtOH 96 ° GL) apresentou piores condições de extração.

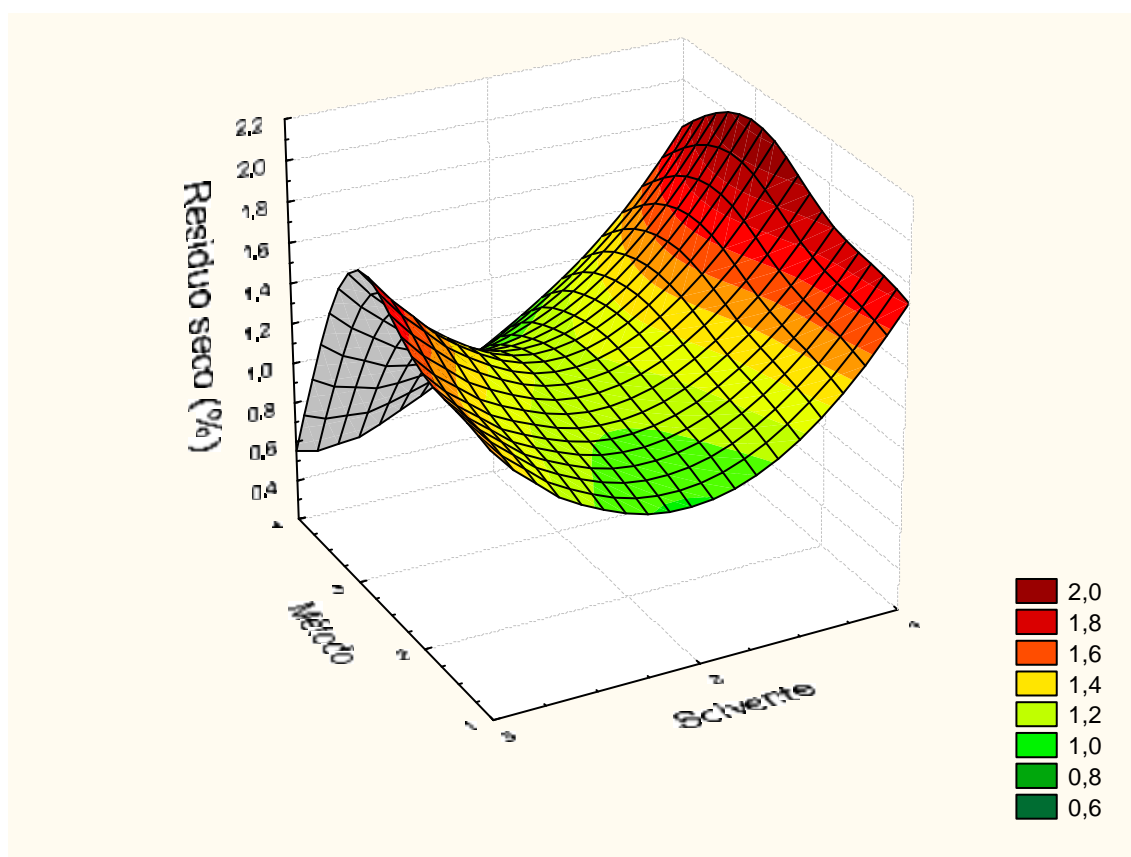


Figura 11: Teor de resíduo seco (%) de acordo com os diferentes métodos e solventes utilizados. (Métodos: 1 – maceração 3 dias; 2 – maceração 5 dias; 3 – percolação; 4 – decocção. Solventes: 1 - EtOH 70 °GL; 2 - EtOH 96 °GL; 3 – água).

5.4.2 Determinação do teor de fenólicos totais

Os resultados da determinação do teor de fenólicos totais são apresentados na Tabela 8 e Figura 12, os quais confirmam os resultados obtidos na determinação do teor de resíduo seco, mostrando que o melhor resultado foi obtido pelo método 3 (percolação) utilizando o solvente 1 (etanol 70 °GL), o qual apresentou 1,758% de fenólicos totais.

Tabela 8. Determinação do teor de fenólicos totais

Método	Solvente	Fenólicos Totais (%)
Percolação	H ₂ O	1,006
Percolação	EtOH 70 °GL	1,758
Percolação	EtOH 96 °GL	0,900
Maceração 3 dias	H ₂ O	0,940
Maceração 3 dias	EtOH 70 °GL	1,058
Maceração 3 dias	EtOH 96 °GL	0,826
Maceração 5 dias	H ₂ O	1,071
Maceração 5 dias	EtOH 70 °GL	1,232
Maceração 5 dias	EtOH °GL	1,063
Decocção	H ₂ O	0,551
Decocção	EtOH 70 °GL	1,303
Decocção	EtOH 96 °GL	1,104

A Figura 12 ilustra a variação observada no teor de fenólicos totais de acordo com os diferentes métodos e solventes utilizados. Pode-se observar que para o fator método o nível 3 (percolação) apresentou melhor resultado, seguido do nível 2 (maceração 5 dias) e do nível 1 (maceração 3 dias). O nível 4 (decoção) apresentou o menor teor de fenólicos totais para o solvente água. Para o fator solvente, o nível 1 (EtOH 70 °GL) apresentou melhor resultado seguido do nível 2 (EtOH 96 ° GL) e o nível 3 (água) apresentou o menor teor de fenólicos totais.

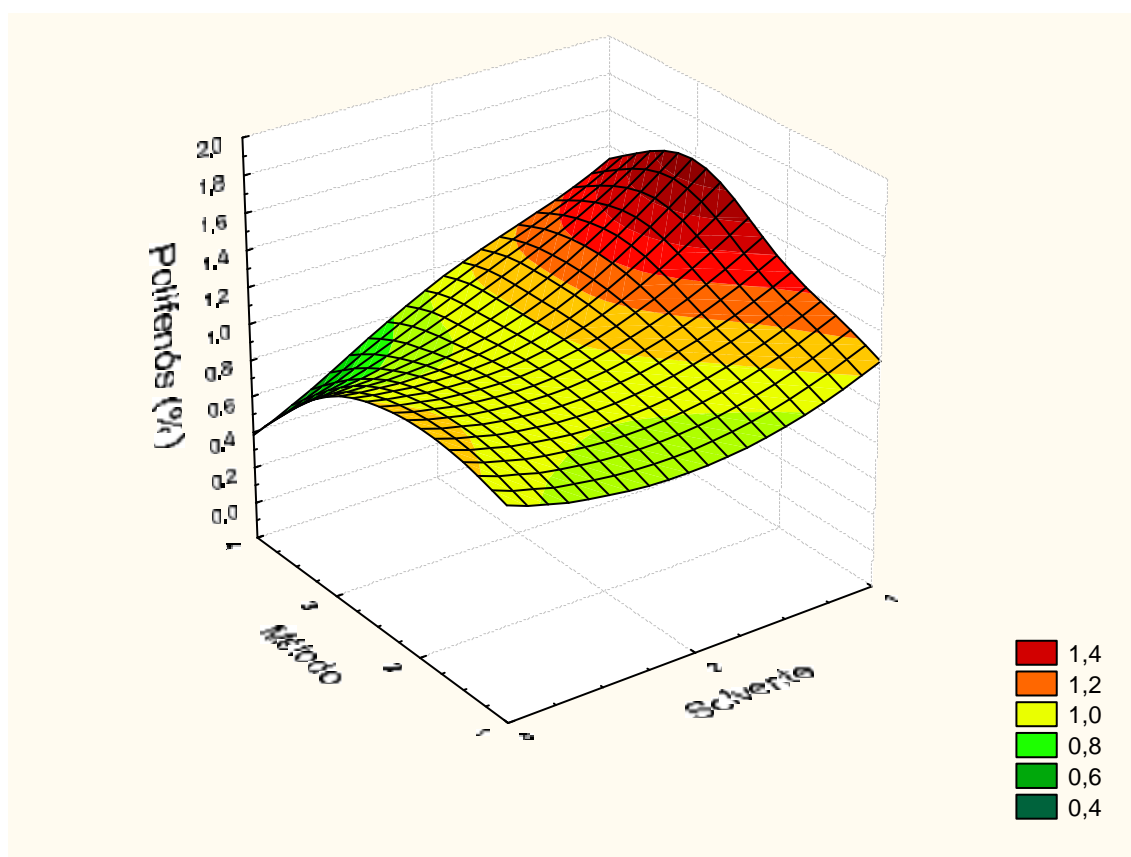


Figura 12. Teor de polifenóis (%) totais de acordo com os diferentes métodos e solventes utilizados. (Métodos: 1 – maceração 3 dias; 2 – maceração 5 dias; 3 – percolação; 4 – decoção. Solventes: 1 - EtOH 70 °GL; 2 - EtOH 96 °GL; 3 – água).

De acordo com determinação do teor de resíduo seco e a determinação do teor de fenólicos totais, foi possível identificar o melhor processo extrativo (percolação) e o melhor solvente ou líquido extrator (EtOH 70 °GL) para a raiz de *O. macrocarpa*.

5.3. Obtenção do extrato

Considerando os resultados obtidos na otimização do processo extrativo o extrato foi preparado através de percolação, utilizando EtOH 70 °GL como líquido extrator.

Foram utilizados 200 g do pó da raiz de *O. macrocarpa*, que foram previamente umedecidos com o solvente e deixados em repouso durante 2 h. Em seguida, o pó foi acomodado no percolador e submetido à extração com EtOH 70 °GL. Foram obtidos 2 L de percolado, o qual foi concentrado em evaporador rotatório e, posteriormente, congelado e liofilizado. Após este processo foram obtidos 36 g de extrato hidroetanólico (**EEtOH**) seco (Tabela 8).

5.4. Obtenção do chá

Considerando a ampla utilização popular da raiz de *O. macrocarpa* preparou-se também um chá para ser avaliado e comparado com o **EEtOH**.

O chá foi preparado da mesma maneira que a população que utiliza o prepara, ou seja, pelo processo de decocção utilizando água como solvente.

Foram utilizados 200 g da raiz seca e triturada, os quais foram transferidos para um béquer de vidro, onde foi adicionado 2 L de água e levados a ebulição durante 10 min. Após resfriamento e filtração foi obtido 1,5 L de decocto. Em seguida

este foi congelado e liofilizado, obtendo-se assim 46,2 g de chá liofilizado (Tabela 9).

5.5. Obtenção da resina

A resina foi obtida a partir do **EEtOH**, o qual foi preparado por percolação com EEtOH 70 °GL, e posteriormente concentrado em evaporador rotatório. Após a eliminação do EtOH houve a precipitação da resina. Em seguida a resina foi mantida em estufa a 40 °C para secagem.

5.5.1. Obtenção da dispersão sólida contendo a resina

A dispersão sólida foi preparada solubilizando-se a resina em solução etanólica de polivinilpirrolidona. O etanol foi evaporado em rotaevaporador a 50 °C. A dispersão sólida foi obtida na concentração de 12,5 mg/mL.

Dispersões sólidas de fármacos pouco solúveis em água com carreadores solúveis farmacologicamente inertes podem ser usados como um meio de aumentar o grau de dissolução de substâncias pouco solúveis. Esta técnica tem o potencial de melhorar significativamente a biodisponibilidade do fármaco quando a absorção é limitada pela sua solubilidade.

Tabela 9. Rendimento do extrato e do chá preparados com *O. macrocarpa*.

	Quantidade de droga em pó (g)	Quantidade de extrato obtido (g)	Rendimento (%)
EEtOH	200	36	18
Chá	200	46,2	23,1
Resina	200	10	5

5.6. Perfil cromatográfico (CLAE– UV – DAD)

O perfil cromatográfico traçado por CLAE-UV-DAD é de grande utilidade no estudo de extratos polares, pois com o perfil é possível determinar a classe de substâncias presentes na espécie em estudo, e ainda identificar substâncias conhecidas através da comparação do tempo de retenção (T_r) e o espectro no UV com padrões autênticos.

Em estudo fitoquímico anterior foram isolados e identificados, da fração acetato de etila do **EEtOH** *O. macrocarpa*, o ácido caféico, um dímero do ácido caféico e o ácido protocatécúico (MICHELIN, 2004).

Assim sendo, surgiu o interesse na busca da classe dos compostos fenólicos, especialmente nos ácidos fenólicos, para traçar o perfil de espécie e posteriormente, avaliar as possíveis atividades dessa classe de compostos.

Foi traçado o perfil químico do **EEtOH** e do chá de *O. macrocarpa* em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de foto diodos (CLAE-UV-DAD).

A avaliação por CLAE do **EEtOH** *O. macrocarpa* foi realizada através da identificação de alguns dos seus metabólitos, com auxílio dos dados espectroscópicos de UV, por comparação do tempo de retenção e principalmente por co-injeção de padrões autênticos ou por aqueles isolados de fontes vegetais.

Foram caracterizados no **EEtOH** substâncias pertencentes à classe dos ácidos fenólicos (bandas intensas nas faixas espectral de 190-220 e 260-280 nm). Através dos experimentos de co-injeção foi possível identificar três metabólitos: **1** = ácido clorogênico; **2** = ácido caféico e **3** = dímero do ácido caféico no EEtOH 70%. (Figura 13). No **chá** foram encontradas as mesmas substâncias, porém em menor quantidade (Figura 14).

As demais substâncias observadas no perfil cromatográfico do **EEtOH** e do chá (4 e 5) que não foram ainda identificadas, são também pertencentes à classe dos ácidos fenólicos, uma vez que apresentam espectros de ultravioleta semelhantes, exceto uma das substâncias que apresenta espectro de ultravioleta característico de saponinas (200-210 nm) (OLESZEK; BIALY, 2006)

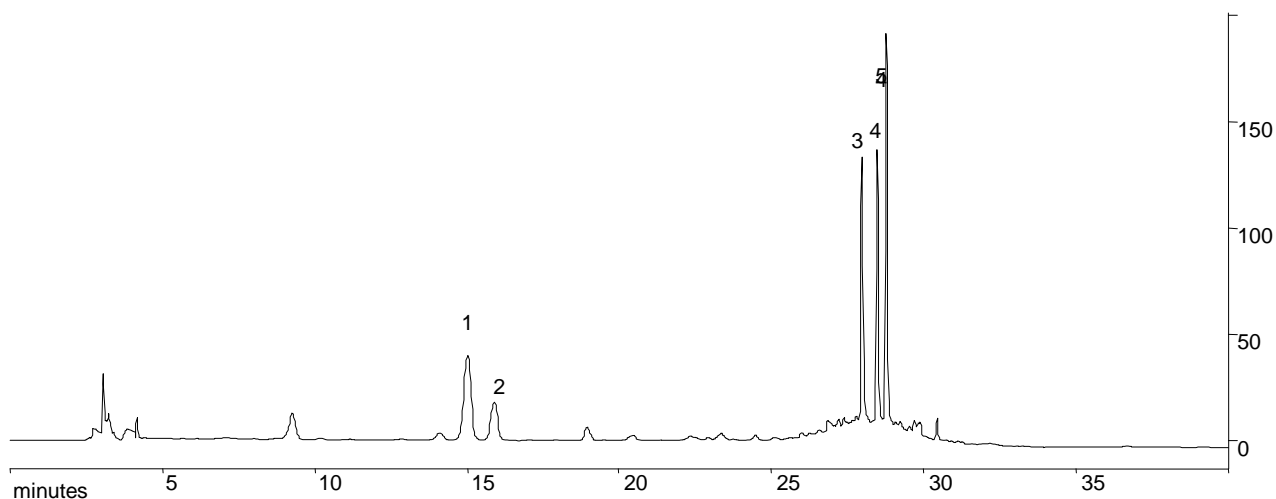


Figura 13. Cromatograma de separação por CLAE, em modo analítico (310 nm), do EEtOH de *O. macrocarpa* **1** = ácido clorogênico; **2** = ácido caféico e **3** = Dímero; **4** = Não identificado 1, **5** = Não identificado 2.

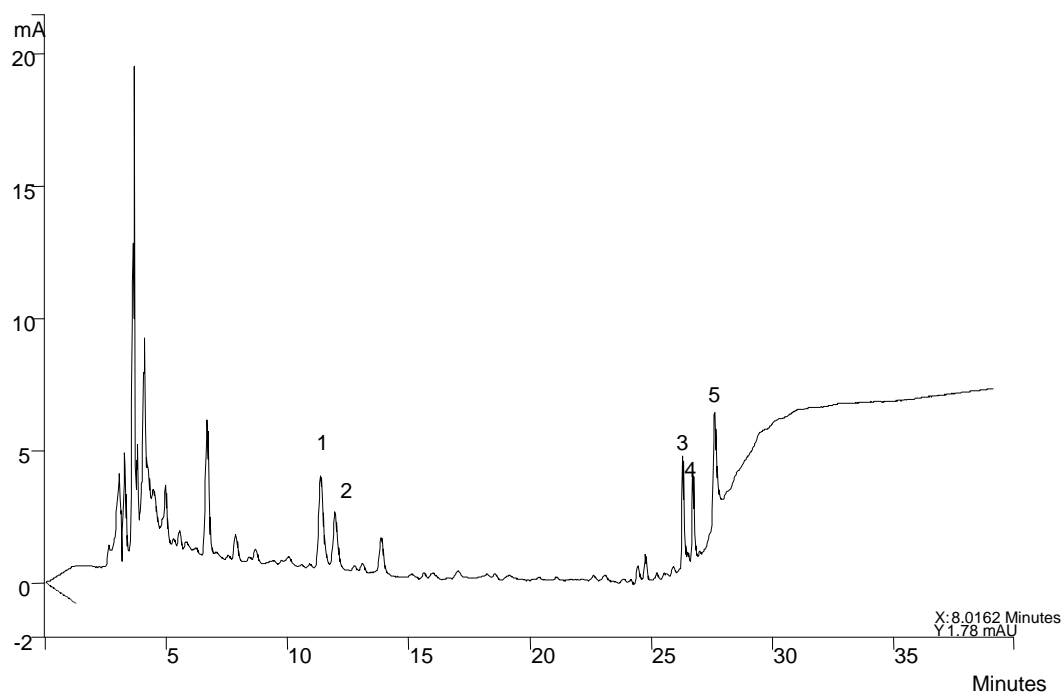


Figura 14. Cromatograma de separação por CLAE, em modo analítico (310 nm), do chá de *O. macrocarpa* **1** = ácido clorogênico; **2** = ácido caféico e **3** = Dímero; **4** = Não identificado 1, **5** = Não identificado 2.

Vale ressaltar que esse perfil químico traçado por CLAE para o **EEtOH** e para o chá de *O. macrocarpa* vem contribuir positivamente para o estudo fitoquímico da espécie, uma vez que existem poucos estudos dessa área na literatura.

Na Figura 15 são ilustradas as estruturas dos ácidos fenólicos identificados no EEtOH e no chá de *O. macrocarpa*.

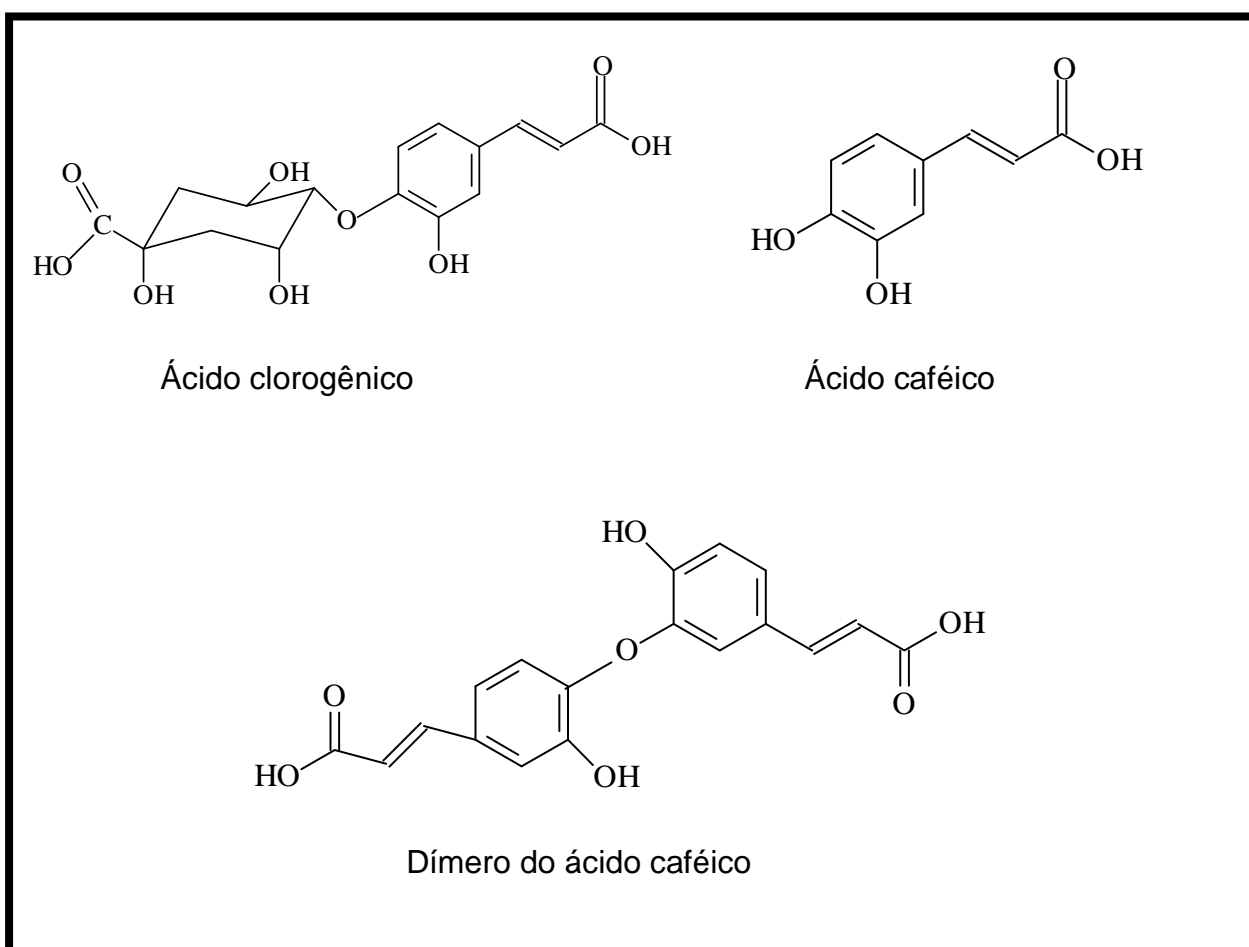


Figura 15. Estruturas dos ácidos fenólicos identificados por CLAE no **EEtOH** e no chá de *O. macrocarpa*.

Na Figura 16 são apresentados os espectros no ultravioleta das quatro substâncias identificadas, os quais a confirmam a presença de ácidos fenólicos no **EEtOH** e no chá de *O. macrocarpa*.

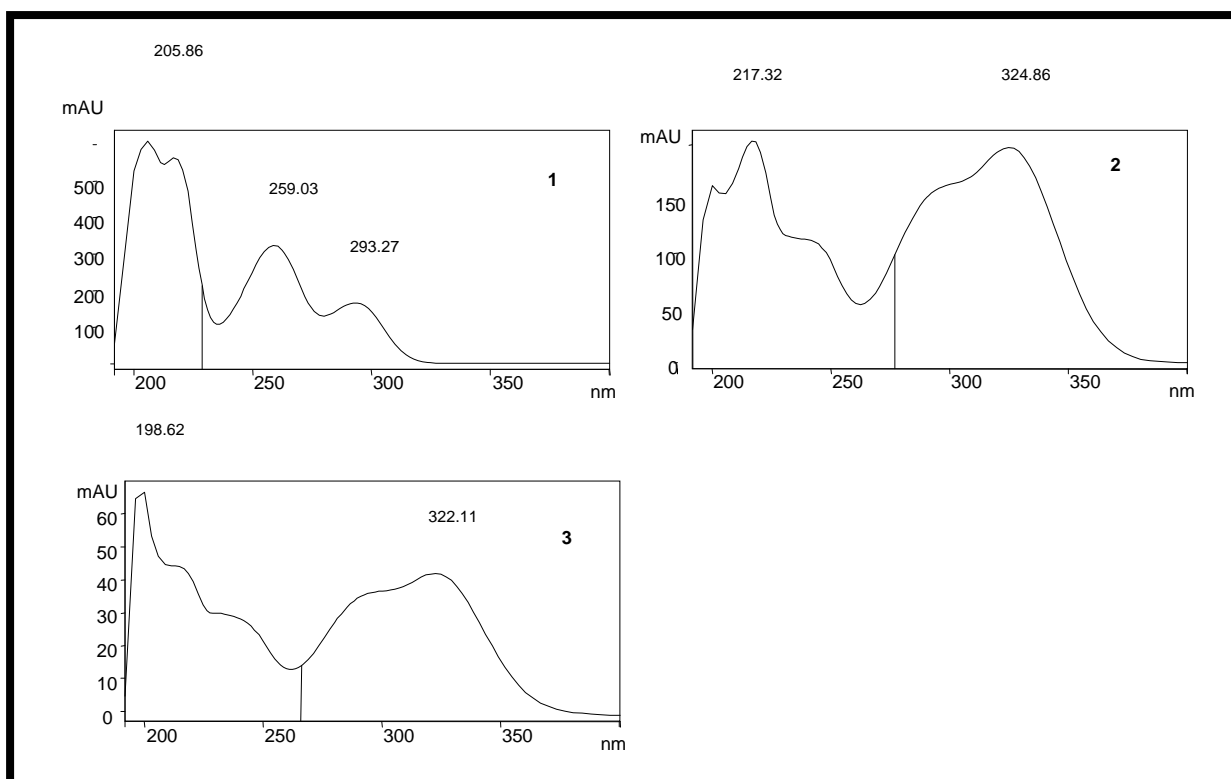


Figura 16. Espectros de ultravioleta dos ácidos fenólicos identificados no EEtOH e no chá de *O. macrocarpa* **1** = ácido clorogênico; **2** = ácido caféico; **3** = dímero do ácido caféico.

5.6.1. Determinação quantitativa de ácidos fenólicos presentes em *Operculina macrocarpa* (CLAE– UV – DAD)

O método proposto foi aplicado para a quantificação de ácidos fenólicos presentes no **EEtOH**, **EEtOH** sem resina e Chá das raízes de *O. macrocarpa* usando o mesmo procedimento adotado na construção do perfil cromatográfico descrito na seção 5.6 Essa metodologia tem como objetivo fornecer informações que possam levar ao entendimento de uma provável relação entre a quantidade de ácidos fenólicos presentes com as atividades farmacológicas apresentadas pelos extratos.

A quantificação dos ácidos fenólicos presentes nos extratos foi realizada por CLAE-UV-DAD, e o comprimento de onda estabelecido para essa determinação foi $\lambda = 310$ nm (figura 10), o qual representa o λ_{\max} , portanto maior sensibilidade para os ácidos fenólicos analisados. Foi utilizado o método de padronização externa, que consistiu na construção de três curvas analíticas, duas com padrões certificados de ácido caféico e ácido clorogênico, e uma com dímero isolado do EEtOH 70 % das raízes de *O. macrocarpa*. Essas curvas foram obtidas através de sete diluições da solução estoque (1000 $\mu\text{g/mL}$) no intervalo de concentração de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$. As diluições foram realizadas em $\text{H}_2\text{O/MeOH}$ (1:1, V/V) e injetadas em triplicada no CLAE-DAD.

Como pode ser observado nas figuras 17 a 19, as curvas analíticas apresentaram boa linearidade no intervalo de concentração estudado e coeficientes de correlação (r) com valores superiores a 0,999 (tabela 10), o que indica que há uma boa correlação entre as áreas e as concentrações estudadas.

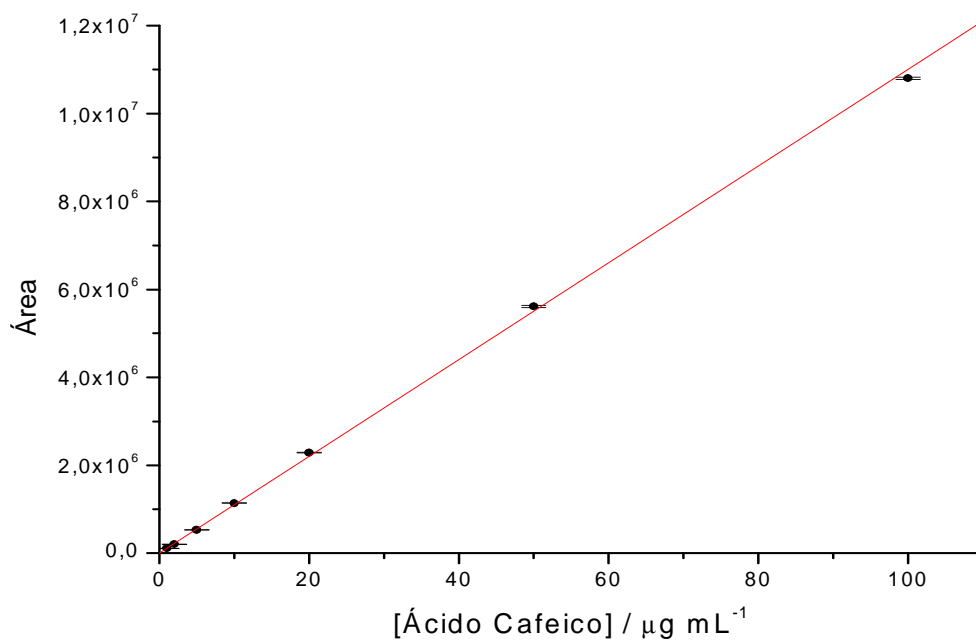


Figura 17. Curva analítica do ácido cafeico.

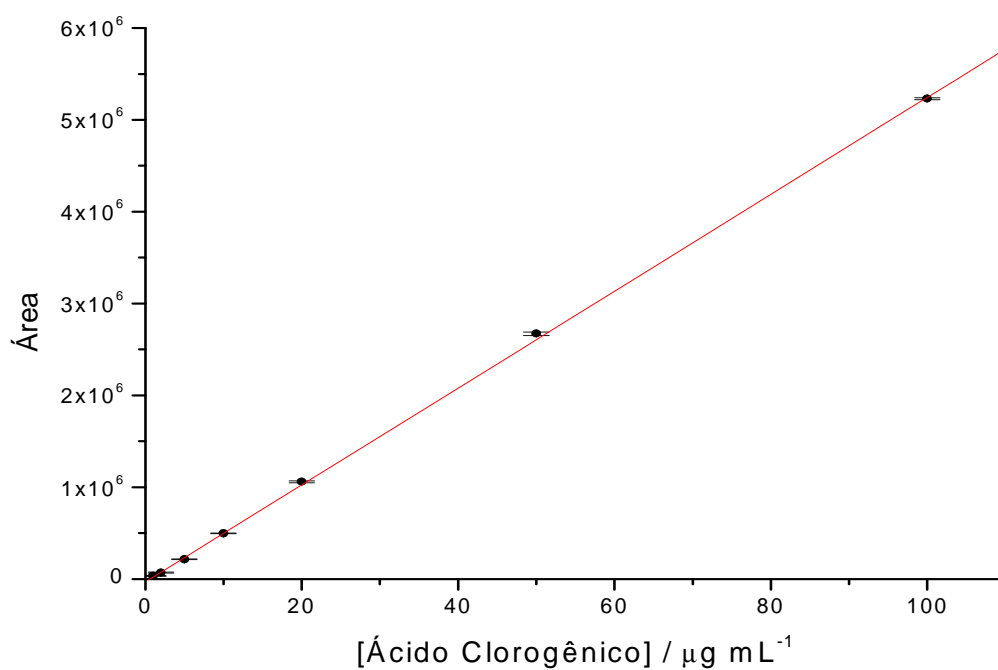


Figura 18. Curva analítica do ácido clorogênico.

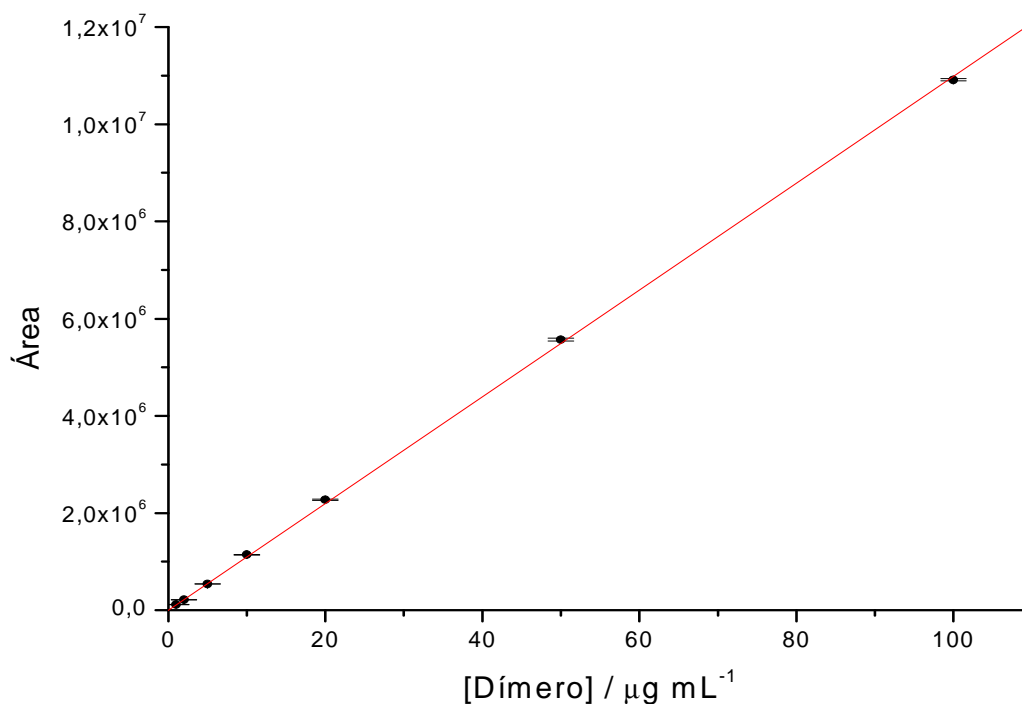


Figura 19. Curva analítica do dímero.

Tabela 10. Dados de calibração dos ácidos fenólicos.

Compostos	Equação da reta $Y = b + ax$	R
Ácido caféico	1495,24+110059,42.[ACaf]	0,99951
Ácido clorogênico	-30631,23+52734,34.[AClor]	0,99989
Dímero	-5343,71+109914,51.[Dim]	0,99979

* Desvio padrão da resposta

O teor dos ácidos fenólicos majoritários encontrado, representa aproximadamente 1,4 % do **EEtOH**, 1,1 % do **EEtOH** sem resina e 0,4 % do chá das raízes de *O. macrocarpa* (tabela 11).

O método proposto mostrou-se simples, rápido, seletivo e sensível para as substâncias analisadas, podendo ser aplicado para padronização de extratos polares de espécies do gênero *Operculina*.

O desenvolvimento de metodologias para quantificação de metabólitos secundários em extratos vegetais mostra-se necessária, não só para garantir a qualidade de fitoterápicos, mas também para um entendimento mais aprofundado sobre as atividades biológicas apresentadas pelos mesmos.

Tabela 11. Quantidade de ácidos fenólicos determinada nos extratos e chá de *O. macrocarpa**.

Substâncias	Concentração (mg/g) ± Desvio Padrão		
	EEtOH 70%	EEtOH sem resina	Chá
Ácido caféico	4,7 ± 2,9	5,1 ± 4,1	2,4 ± 3,1
Ácido clorogênico	1,1 ± 5,1	1,1 ± 9,8	0,4 ± 5,5
Dímero	1,9 ± 2,9	1,5 ± 1,7	0,4 ± 2,9
NI 1	1,2 ± 2,4	1,0 ± 4,2	0,3 ± 1,5
NI 2	2,4 ± 1,2	1,9 ± 4,7	0,3 ± 3,5

* Cada valor representa a média ± coeficiente de variância (%) para 3 experimentos independentes (n=3).

NI = não identificado

5.7. Perfil por espectrometria de massas (EM)

Inúmeros trabalhos encontrados na literatura relatam o uso da espectrometria de massas (EM), geralmente acoplada a um sistema HPLC tem se mostrando uma poderosa ferramenta no estudo químico de produtos naturais. Por outro lado, vários trabalhos vêm demonstrando que análises por EM usando o modo de injeção direta da amostra (FIA), sem a necessidade de complexas etapas de preparação e *clean-up* (resguardando apenas as etapas mais simples que envolvem: filtração, diluição e/ou adição de um modificador para auxiliar a ionização), tem se destacado como a forma mais representativa e rápida de estabelecer a composição química de uma matriz, e essa abordagem vem sendo utilizada no controle de qualidade e na verificação da autenticidade de diversos tipos de amostras, incluindo extratos vegetais (RODRIGUES, 2007).

Sendo assim, foi realizada a injeção direta do **EEtOH**, do **chá** e da **resina** de *O. macrocarpa* visando caracterizar os metabólitos secundários presentes nessas amostras para contribuir com o estudo fitoquímico da espécie em estudo.

Esta análise permitiu identificar 7 compostos pertencentes a classe dos ácidos fenólicos, sendo que destes três já haviam sido detectados nos experimentos de co-injeção com padrão autêntico; um (dímero do ácido caféico) já havia sido isolado e identificado anteriormente (MICHELIN, 2004) e três não haviam sido identificados na espécie em estudo (Tabela 12).

Tabela 12. Íons moleculares e compostos detectados através das análises por EM com injeção direta dos **EEtOH** e do **Chá** de *O. macrocarpa*.

[M-H] ⁻	EEtOH	Chá	Resina	Compostos
179	+	+	+	Ácido caféico
191	+	+	+	Ácido quínico
195	-	+	-	Ácido ferúlico
207	+	-	+	Ácido metil-ferúlico
341	-	+	-	Dímero do ácido caféico
353	+	+	+	Ácido clorogênico
515	+	+	+	Ácido dicafeoil-quínico

(+) presente (-) ausente

Nas figuras 20, 21 e 22 podem ser observados os espectros de massas em *full-scan* apresentando os íons precursores das moléculas desprotonadas ([M-H]⁻) do **EEtOH**, do **chá** e da **resina** de *O. macrocarpa* obtidos por injeção direta no modo negativo.

Operculina macrocarpa msms #1-16 RT: 0,00-0,24 AV: 16 NL: 3,77E6
T: - c ESI Full ms [100,00-1200,00]

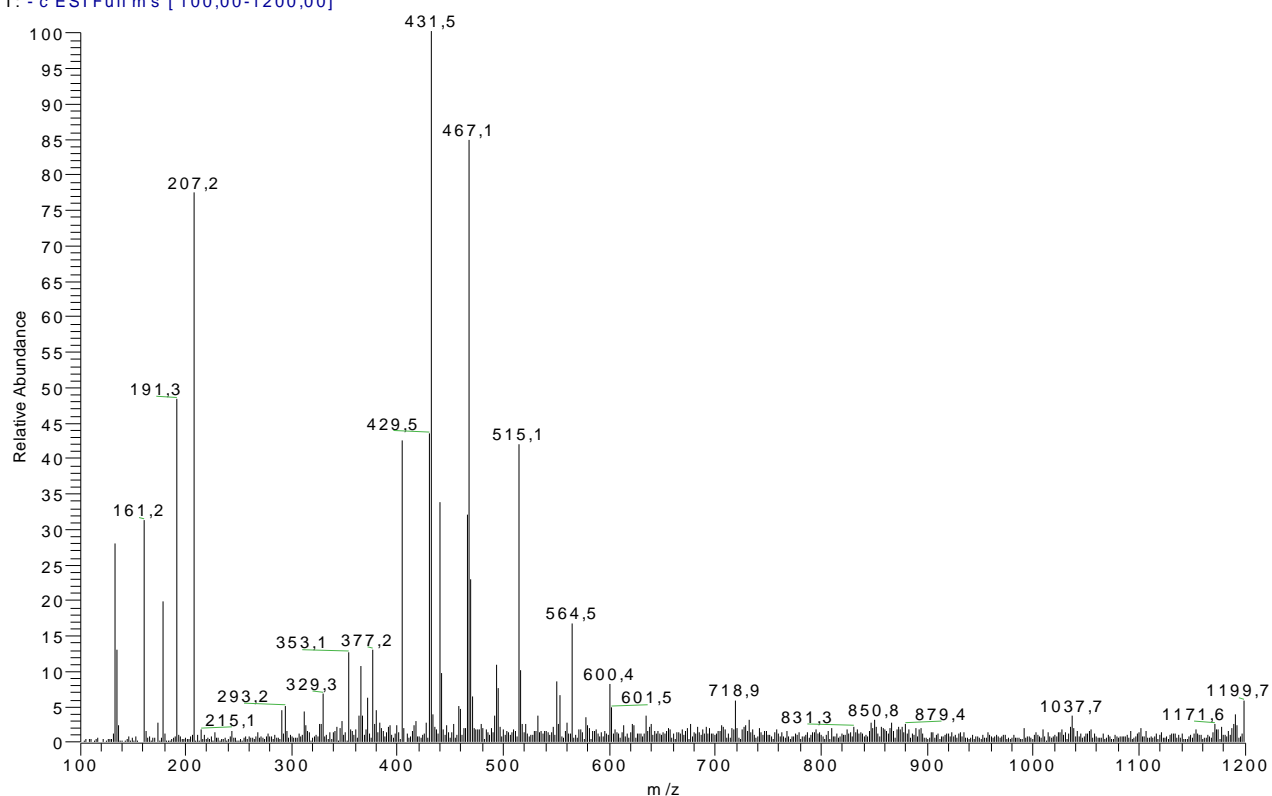


Figura 20: Espectro de massas do **EEtOH** de *O. macrocarpa* em modo *full-scan* avaliado no modo negativo. Faixa de íons com m/z de 100-1200 Da.

Operculina macrocarpa Cha` msms #2-11 RT: 0,05-0,28 AV: 10 NL: 2,72E6
T: - c ESI Full ms [50,00-2000,00]

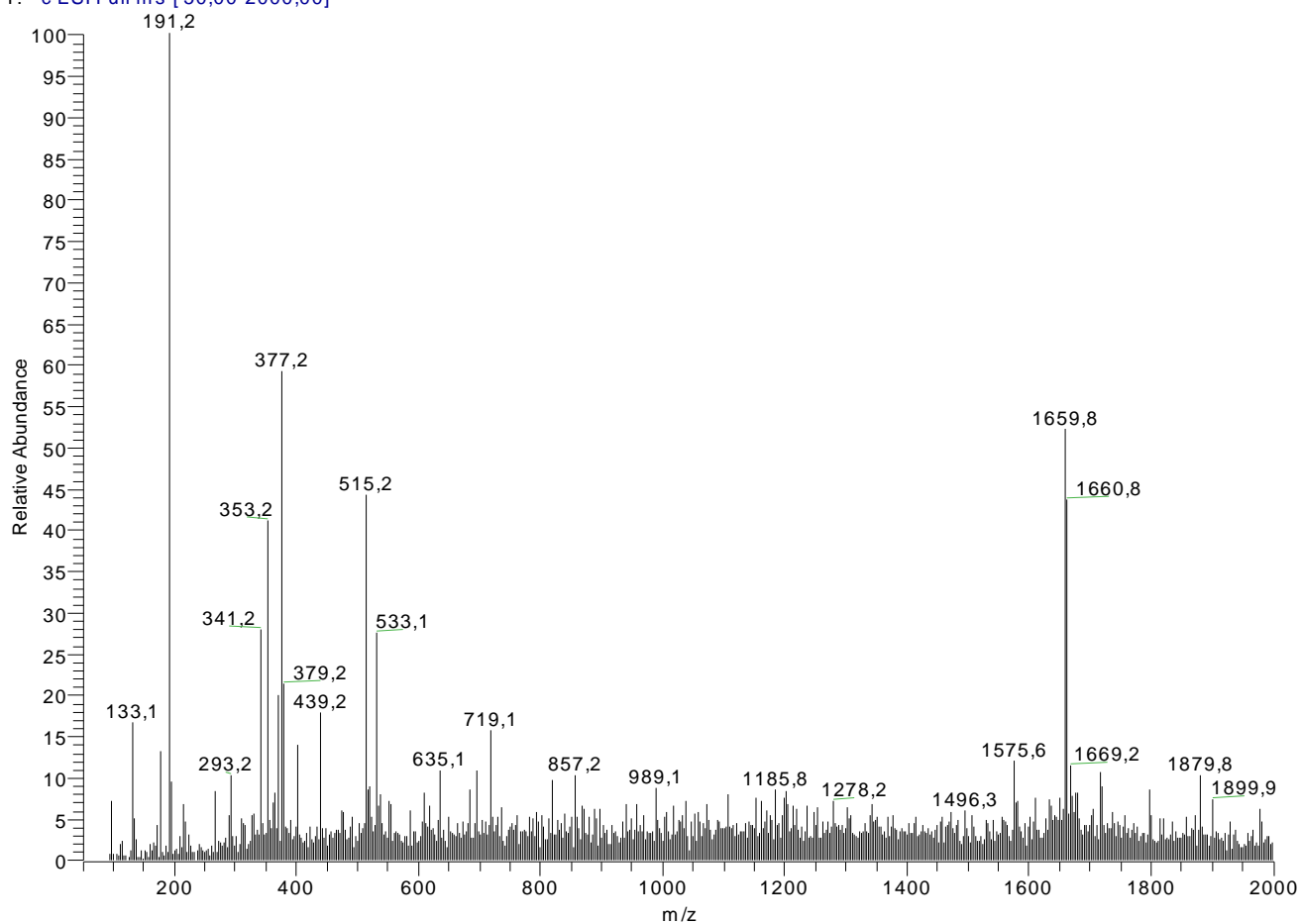


Figura 21: Espectro de massas do chá de *O. macrocarpa* em modo *full-scan* avaliado no modo negativo. Faixa de íons com m/z de 200-2000 Da.

Operculina macrocarpa resina m sms2 #88-104 RT: 8,04-8,45 AV: 17 NL: 2,21E6
T: - c ESI Full ms [50,00-2000,00]

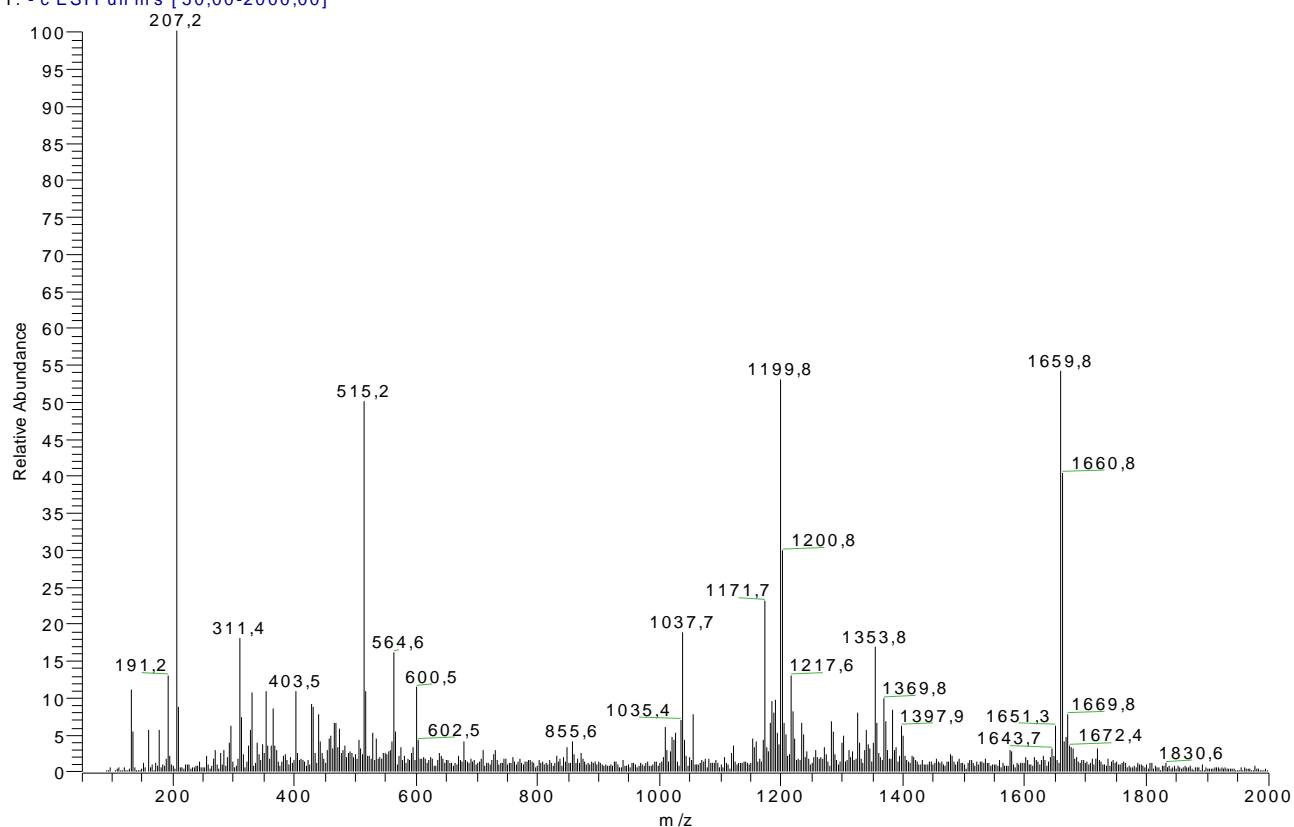


Figura 22: Espectro de massas da resina de *O. macrocarpa* em modo *full-scan* avaliado no modo negativo. Faixa de íons com m/z de 200-2000 Da.

A fragmentação de segunda ordem (MS/MS) para cada um desses íons levou à identificação de diversos metabólitos conforme apresentado na Tabela 9.

O íon em m/z 179 foi atribuído à molécula desprotonada do ácido caféico, cuja fragmentação de segunda ordem levou aos fragmentos de m/z 161 [$M - 18 - H$], e m/z 135 [$M - 44 - H$] correspondente à perda de uma unidade de água e a perda de CO_2 respectivamente. Estas fragmentações são semelhantes àsquelas obtidas com o de padrão de ácido caféico (Figura 23).

Operculina macrocarpa msms #43-56 RT: 6,48-6,77 AV: 14 NL: 2,58E5
F: - c ESI Full ms 2 179,20 @ 30,00 [50,00-1200,00]

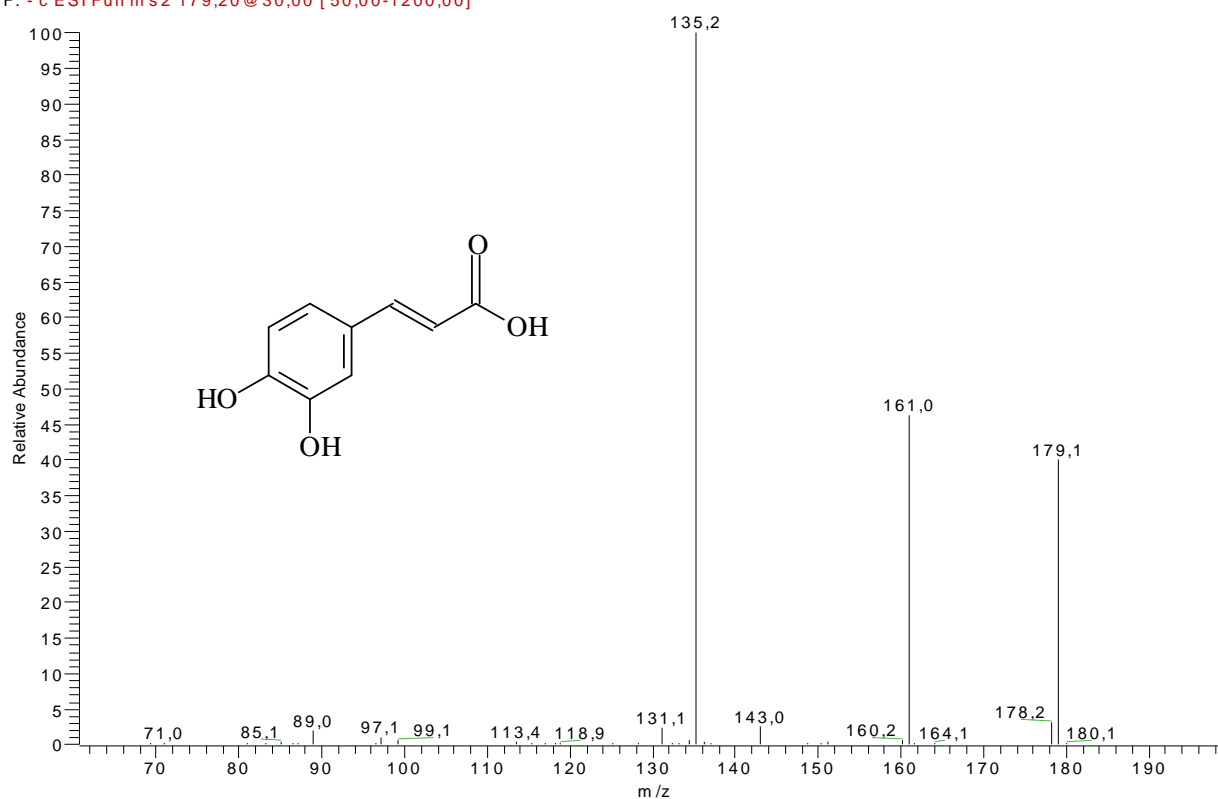


Figura 23: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 179, obtido no modo negativo.

O íon em m/z 191 foi atribuído à molécula desprotonada do ácido quínico, cuja fragmentação de segunda ordem levou ao fragmento de m/z 173 $[M - 18 - H]^-$, correspondente à perda de uma unidade de água. Essa fragmentação é semelhante aquela obtida com o de padrão de ácido quínico (Figura 24).

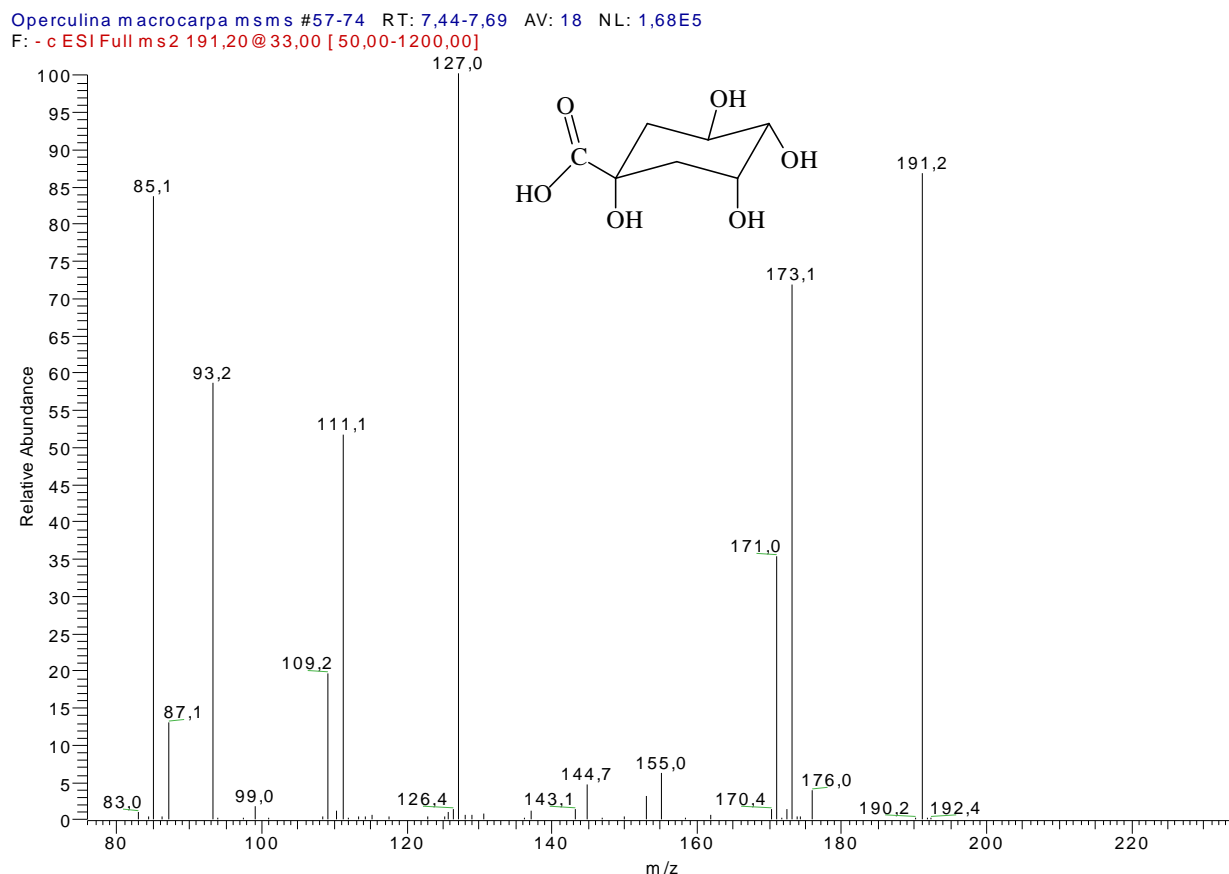


Figura 24: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 191, obtido no modo negativo.

O íon em m/z 195 foi atribuído à molécula desprotonada do ácido ferúlico, identificado durante os experimentos de CLAE que envolveram co-injeção com padrão autêntico.

O íon em m/z 207 foi atribuído à molécula desprotonada do ácido metilferúlico, cuja fragmentação de segunda ordem levou ao fragmento de m/z 189 $[M - 18 - H]^-$ e m/z 179 $[M - 28 - H]^-$ correspondente à perda de uma unidade de água e a perda de CO respectivamente. (Figura 25).

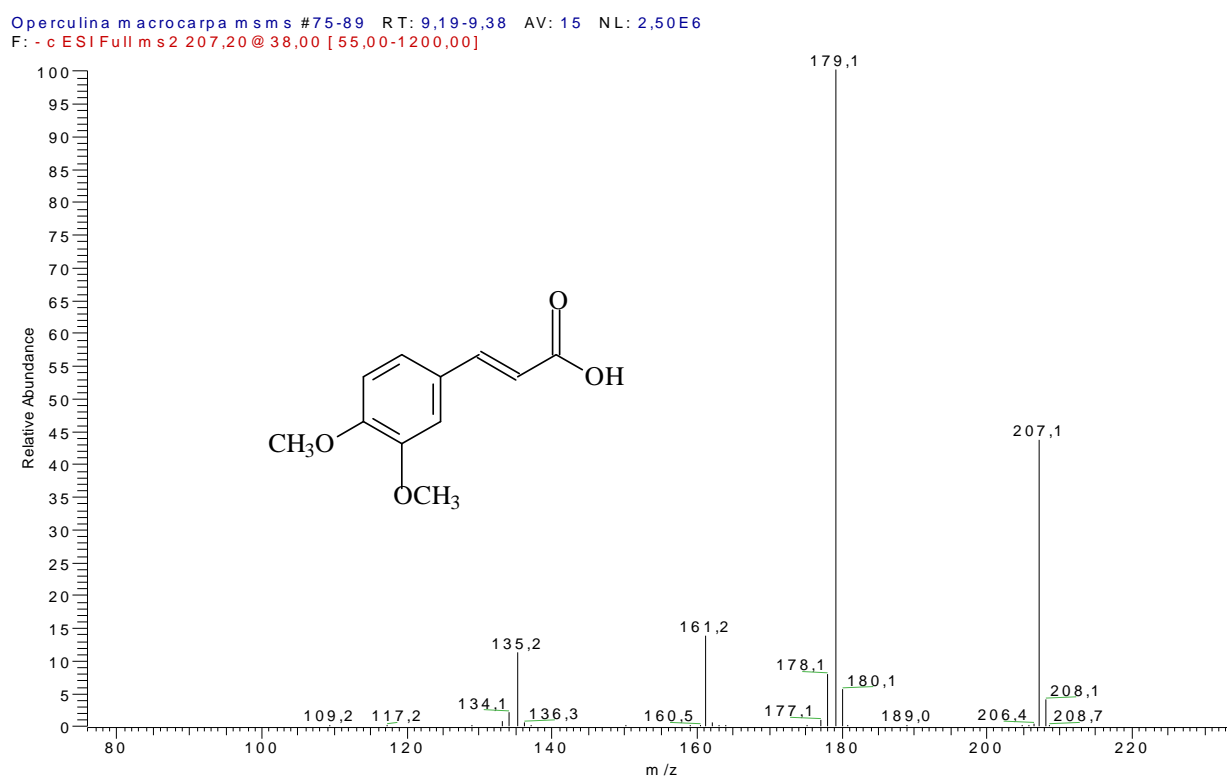


Figura 25: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 207, obtido no modo negativo.

O íon em m/z 341 foi atribuído à molécula desprotonada do dímero do ácido caféico, já isolado e identificado de *O. macrocarpa* anteriormente (MICHELIN, 2004).

A fragmentação em segunda-ordem do íon precursor m/z 353 levou à formação do íon produto de m/z 191 $[M - 162 - H]^-$. Esse resultado sugere a presença de uma estrutura que teve uma unidade de ácido caféico (162 Da) esterificada por uma unidade de ácido quínico (191 Da), o que é compatível com a estrutura do ácido clorogênico, identificado durante os experimentos de co-injeção com padrão autêntico (Figura 26).

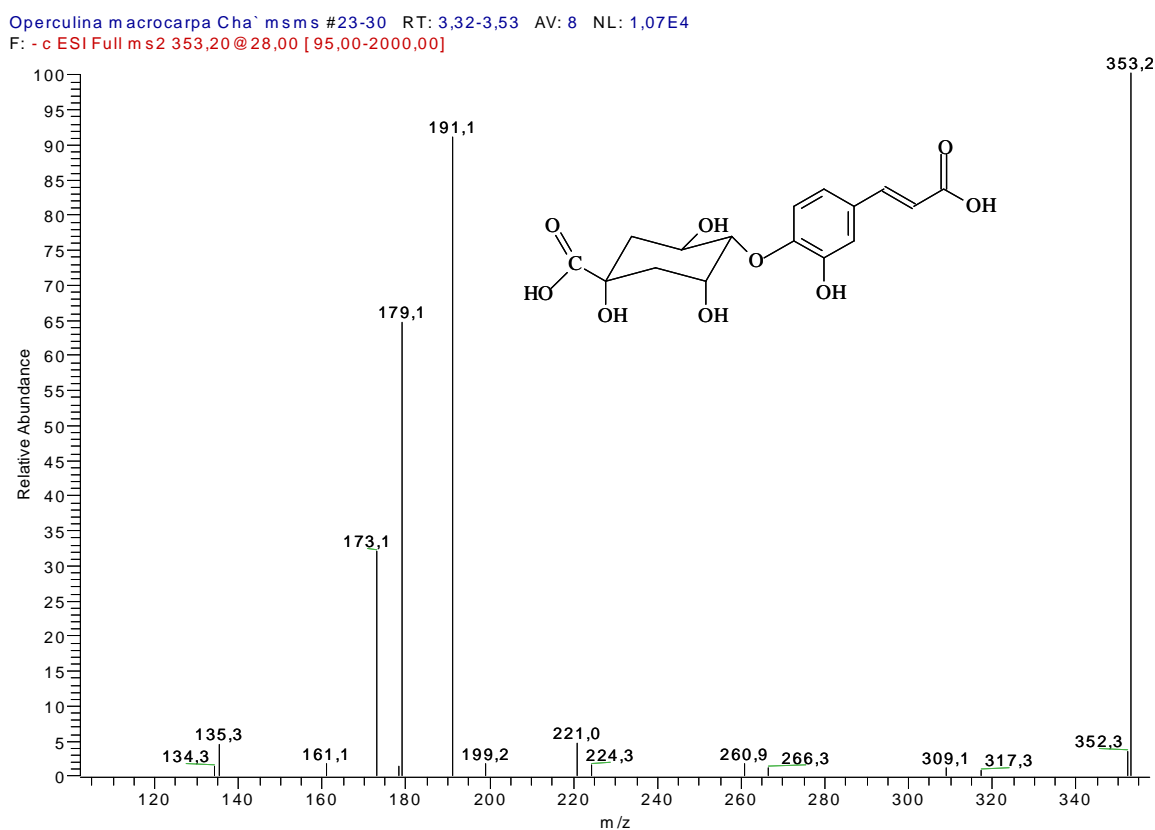


Figura 26: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 353, obtido no modo negativo.

O íon em m/z 515 foi atribuído à molécula desprotonada do ácido dicafeoil-quinico, cuja fragmentação de segunda ordem levou ao fragmento de m/z 353 $[M - 162 - H]^-$, e ao fragmento de m/z 191 correspondente à perda de outra unidade de ácido caféico, ligada à uma unidade de ácido quinico (191 Da) (Figura 27).

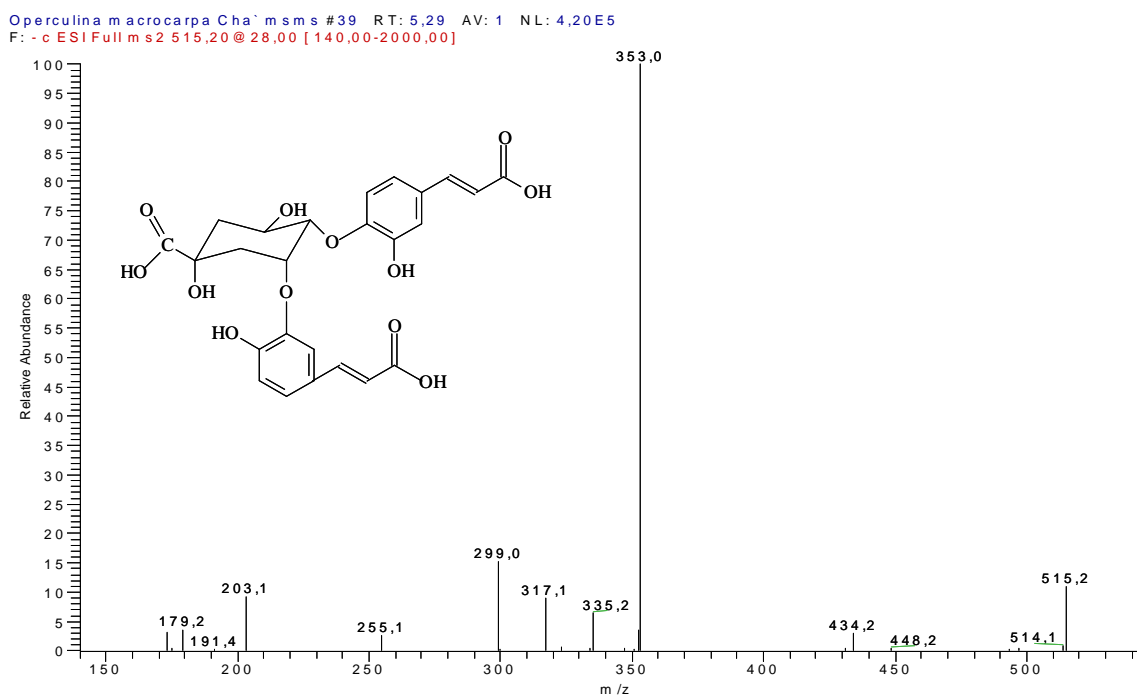


Figura 27: Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de m/z 515, obtido no modo negativo.

Outros picos não puderam ser determinados, mas análise preliminar sugere que sejam moléculas semelhantes a estas apresentadas.

4.7. Avaliação da atividade laxante

Tendo em vista que *O. macrocarpa* é usada pela população como laxante, avaliamos essa atividade através de três modelos experimentais diferentes.

O primeiro modelo avaliado foi o do trânsito intestinal utilizando carvão ativo como marcador, e a atividade é determinada pela distância percorrida pelo marcador no intestino delgado, comparado com o grupo controle. Este método é amplamente utilizado para avaliar a atividade de extratos vegetais (MICHELIN; SALGADO, 2004; FIGUEIREDO et al., 2005; SALGADO et al., 2006).

O segundo modelo, proposto por MARONA; LUCCHESI (2004), utiliza a mesma metodologia do primeiro, porém nesse modelo os animais não são sacrificados, e estes podem ser reutilizados posteriormente, em outro experimento, fato que vem ao encontro do bem-estar animal.

No terceiro modelo utilizado os animais são acomodados em uma gaiola metabólica e a atividade é determinada através da análise do peso das fezes, diferentemente dos modelos anteriores. Nesse modelo os animais também podem ser reaproveitados em outros experimentos uma vez que não há necessidade de sacrificar os mesmos.

Na literatura não são encontrados estudos que avaliam a atividade de *O. macrocarpa* no trânsito intestinal, com exceção de um estudo preliminar anterior a esse realizado pelo nosso grupo de pesquisa (MICHELIN; SALGADO et al., 2004).

4.7.1. Trânsito intestinal com carvão ativo

Este teste foi realizado em 1957 por JANSSEN & JAGENEAU, no qual avaliaram a inibição da propulsão gastrintestinal com suspensão de carvão em camundongos. Posteriormente, WONG & WAY (1981) avaliaram o efeito da aspirina e do paracetamol na inibição da propulsão gastrintestinal induzida por morfina em camundongos.

O ensaio foi realizado segundo modelo experimental desenvolvido por JANSSEN & JAGENEAU (1957) e WONG & WAY (1981).

Com esse modelo experimental foram avaliados o chá e os padrões dos ácidos caféico, clorogênico e ferúlico.

Os resultados são apresentados na Tabela 13, e demonstraram o aumento significativo da motilidade intestinal provocado pelo chá na dose de 1000 mg/kg quando comparado com o grupo controle. Na dose de 500 mg/kg o resultado não foi significativo.

O **EEtOH** foi anteriormente testado na dose de 1000 mg/kg e os resultados mostraram um aumento significativo da motilidade intestinal dos camundongos (69,99%) quando comparados como grupo controle (47,87%) (MICHELIN; SALGADO, 2004; MICHELIN, 2005).

Devido à insolubilidade da resina, foi preparada uma dispersão sólida com a mesma para testá-la nos camundongos; porém a dispersão sólida contendo a resina não apresentou atividade significativa na concentração testada.

Foi testado também o EEtOH após a precipitação da resina, ou seja, sem a resina na dose de 1000 mg/kg, o qual apresentou um aumento significativo da motilidade intestinal.

Na Tabela 14 são apresentados os resultados dos ácidos fenólicos testados. Os três ácidos apresentaram um aumento significativo na motilidade intestinal dos camundongos quando comparados com o grupo controle.

Os ácidos foram testados nas doses de 10 e 20 mg/kg. O ácido caféico apresentou atividade na dose de 20 mg/kg, percorrendo 86,80% do intestino delgado enquanto o grupo controle percorreu 81,53%. O ácido ferúlico apresentou atividade significativa em ambas as doses testadas, tendo percorrido 86,43 e 91,45% do intestino delgado com as doses de 10 e 20 mg/kg, respectivamente.

Finalmente, os resultados obtidos com o ácido clorogênico mostraram-se significantes na dose de 20 mg/kg, com uma distância percorrida de 86,08%.

Com base nesses resultados podemos sugerir que os ácidos fenólicos possuem atividade estimulante da motilidade intestinal, uma vez que estão presentes no **EEtOH** e no chá de *O. macrocarpa*, onde também foi observada essa atividade.

Tabela 13. Porcentagem da distância percorrida pelo carvão ativo no intestino dos camundongos tratados com *O. macrocarpa*

Tratamento	Dose (mg/kg)	Distância percorrida pelo carvão ativo (%)	Peso do intestino (g)
Controle (SF)	10mL/kg	72,01 ± 8,15	2,3983 ± 0,25
Chá	1000	83,74 ± 12,20 *	2,2830 ± 0,28
Chá	500	75,34 ± 7,43	2,3139 ± 0,31
EEtOH sem a resina	1000	91,23 ± 13,22*	2,4160 ± 0,44
Resina	400	60,62 ± 5,79	2,5684 ± 0,28

*p < 0,05

n = 10

Tabela 14. Porcentagem da distância percorrida pelo carvão ativo no intestino dos camundongos tratados com os ácidos caféico, ferúlico e clorogênico

Tratamento	Dose (mg/kg)	Distância percorrida pelo carvão ativo (%)	Peso do intestino (g)
Controle (SF)	10mL/kg	81,53 ± 9,75	1,5632 ± 0,19
Ácido caféico	10	79,70 ± 13,05	1,6160 ± 0,15
Ácido caféico	20	86,80 ± 10,99*	1,6400 ± 0,37
Ácido ferúlico	10	86,43 ± 16,63*	1,4864 ± 0,09
Ácido ferúlico	20	91,65 ± 13,60*	1,5282 ± 0,17
Ácido clorogênico	10	78,62 ± 9,34	1,3862 ± 0,07
Ácido clorogênico	20	86,08 ± 7,16*	1,4385 ± 0,20

*p < 0,05

n = 10

4.7.2. Trânsito intestinal com carvão ativo modificado (MARONA; LUCCHESI, 2004).

Neste modelo foram avaliados o **EEtOH** e o chá de *O. macrocarpa*.

Este um modelo de trânsito intestinal que também utiliza carvão ativo como marcador, como o anterior, mas foi modificado em 2004 por MARONA & LUCCHESI visando o bem-estar animal, uma vez que nesse novo modelo proposto os animais não são sacrificados e podem ser reutilizados em outro experimento.

Os resultados são apresentados na Tabela 15 e mostram uma redução significativa no tempo de eliminação do marcador quando comparado com o grupo controle.

Tabela 15. Tempo de eliminação das fezes com marcador dos camundongos tratados com *O. macrocarpa*

Tratamento	Dose (mg/kg)	Tempo para eliminação das fezes com marcador (min)
Controle (SF)	10 mL/kg	194,6 ± 30,37
EEtOH	1000	156,4 ± 23,29 *
Chá	1000	65,1 ± 4,70*

*p < 0,05

n = 10

4.7.3. Trânsito intestinal em gaiola metabólica

Neste modelo foram avaliados o **EEtOH** e o chá de *O. macrocarpa*.

Vale ressaltar que nesse modelo, os animais são acomodados em uma gaiola metabólica e a atividade é determinada pelo peso das fezes eliminadas no período de observação, portanto, os animais não são sacrificados e podem ser reutilizados em outros experimentos.

Na Tabela 16 são apresentados os resultados, nos quais pode-se observar uma diferença significativa no peso das fezes dos grupos tratados comparados com o grupo controle, indicando que o EEtOH e o chá de *O. macrocarpa* também possuem atividade estimulante do trânsito intestinal nesse modelo testado.

Tabela 16. Peso das fezes eliminadas pelos camundongos tratados com *O. macrocarpa*.

Tratamento	Dose (mg/kg)	Peso das fezes (g)
Controle (SF)	10 mL/kg	1,80 ± 0,23
EEtOH	1000	2,01 ± 0,60*
Chá	1000	3,98 ± 0,71*

*p < 0,05

n = 10

Analisando os resultados obtidos com os três modelos experimentais testados, pode-se concluir que o **EEtOH** e o chá de *O. macrocarpa* possuem atividade laxante, ou seja, aumentam a motilidade intestinal. Esses resultados são de fundamental importância uma vez que confirmam o uso tradicional da espécie em estudo na forma de chá.

Apesar de os resultados da atividade laxante confirmarem a informação popular do uso de *O. macrocarpa* como laxante, a literatura reporta casos de intoxicações provocadas por esta planta (LORENZI & MATOS, 2002), foram realizados testes para avaliar a toxicidade do **EEtOH** e do chá.

4.8. Avaliação Toxicológica

4.8.1. Toxicidade aguda – dose única

Foi avaliado o chá de *O. macrocarpa* nesse experimento. O **EEtOH** já foi testado em estudo anterior e não apresentou sinais de toxicidade nesse mesmo modelo. Foi determinada também a dose letal 50% (DL₅₀) do **EEtOH**, a qual foi de 3800 mg/kg. (MICHELIN, 2004).

Os animais foram tratados com o chá na dose de 1000 e 2000 mg/kg e não apresentaram sinais de toxicidade de acordo com os parâmetros observados durante os 14 dias de experimento. Foi observado apenas diarreia logo após a administração do mesmo, o que já era esperado devido a sua atividade farmacológica.

A pesagem dos órgãos dos animais está representada na Tabela 17 e os resultados mostram que para o chá na dose de 2000 mg/kg houve uma redução significativa no peso do coração e do fígado em relação ao grupo controle.

Tabela 17. Peso dos órgãos dos animais, toxicidade aguda – dose única

Tratamento	Peso dos órgãos (g) ± desvio padrão			
	Rins	Coração	Pulmões	Fígado
Controle (SF)	0,7227 ± 0,12	0,2501 ± 0,04	0,2929 ± 0,04	2,78162 ± 0,52
Chá 1000 mg/kg	0,6900 ± 0,09	0,24151 ± 0,05	0,30981 ± 0,04	2,71645 ± 0,25
Chá 2000 mg/kg	0,6780 ± 0,06	0,19079 ± 0,01*	0,30649 ± 0,01	2,32701 ± 0,22*

*p < 0,05

n = 10

4.8.2. Toxicidade aguda – doses repetidas

Foram avaliados o chá e o **EEtOH** de *O. macrocarpa* nas doses de 1000 e 2000 mg/kg.

Os animais não apresentaram sinais de toxicidade de acordo com os parâmetros observados durante os 14 dias de experimento. No período de 14 dias após a última administração foi observado apenas diarreia logo após a administração da amostra, o que já era esperado devido à sua atividade farmacológica.

A Tabela 18 apresenta o peso dos órgãos dos animais que receberam doses repetidas do chá de *O. macrocarpa*.

Tabela 18. Peso dos órgãos dos animais, toxicidade aguda – doses repetidas

Tratamento	Peso dos órgãos (g) ± desvio padrão			
	Rins	Coração	Pulmões	Fígado
Controle (SF)	0,5180 ± 0,04	0,2136 ± ,03	0,2856 ± 0,07	2,0983 ± 0,29
Chá 1000 mg/kg	0,4484 ± 0,05*	0,1762 ± 0,02*	0,2690 ± 0,07*	1,6698 ± 0,33*
Chá 2000 mg/kg	0,5079 ± 0,05	0,1806 ± 0,05*	0,2821 ± 0,05	1,7898 ± 0,21*
EEtOH 1000 mg/kg	0,4844 ± 0,03	0,1931 ± 0,02	0,2831 ± 0,06	1,9370 ± 0,32*
EEtOH 2000 mg/kg	0,4673 ± 0,06*	0,1803 ± 0,03*	0,3284 ± 0,08*	1,4301 ± 0,56*

*p < 0,05

n = 10

Os resultados mostram que doses repetidas do chá (1000 mg/kg) provocou diminuição significativa no peso dos órgãos testados comparados com o grupo controle, quando administrado em dias alternados durante 14 dias. Já na dose de 2000 mg/kg apresentou uma diminuição significativa no peso do coração e do fígado.

O **EEtOH** na dose de 1000 mg/kg em doses repetidas apresentou diminuição significativa no peso do fígado e na dose de 2000 mg/kg apresentou alteração significativa de peso em todos os órgãos analisados. Foi observada redução significativa do peso dos rins, coração e fígado. No entanto, o peso dos pulmões aumentou significativamente.

As alterações observadas nos grupos tratados com extratos de *O. macrocarpa* podem estar relacionadas com a administração dos extratos, sugerindo assim possíveis sinais de toxicidade nos animais. Torna-se necessária uma análise histopatológica dos órgãos dos animais para conclusão destes possíveis sinais de toxicidade.

4.8.3. Determinação das transaminases séricas (ASL e ALT)

AST e ALT são consideradas marcadores de função do fígado, a análise destes parâmetros é importante considerando que existem diversos relatos de hepatotoxicidade devido ao uso de fitoterápicos (FÉRES et al., 2006).

Os resultados obtidos na determinação das transaminases séricas mostraram que houve uma diminuição significativa dos valores de AST e ALT em todos os grupos avaliados (Tabela 19 e 20).

Porém, estas mudanças nos parâmetros bioquímicos analisadas separadamente não possibilitam uma correlação clínica e devem ser confirmadas através de análises histopatológicas (FÉRES et al., 2006).

Assim sendo, torna-se necessária a realização de análises histopatológicas do fígado dos animais tratados com *O. macrocarpa* para confirmação da possível hepatotoxicidade, para que a população possa utilizá-la com segurança.

Considerando que *O. macrocarpa* pode ser utilizada pela população por tempo indeterminado, outros estudos de toxicidade subcrônica, crônica e estudos em não-

roedores devem ser realizados para confirmação da segurança durante a utilização da mesma.

Tabela 19. Dosagem das transaminases séricas em camundongos tratados com *O. macrocarpa*, toxicidade aguda – dose única.

Tratamento	AST (U/L)	ALT (U/L)
	± desvio padrão	± desvio padrão
Controle (SF)	472,2 ± 137,62	93,5 ± 26,30
Chá 1000 mg/kg	274,4 ± 91,21*	61,4 ± 17,20*
Chá 2000 mg/kg	240,4 ± 210,19*	49,2 ± 21,78*

*p < 0,05

n = 10

Tabela 20. Dosagem das transaminases séricas em camundongos tratados com *O. macrocarpa*, toxicidade aguda – doses repetidas.

Tratamento	AST (U/L)	ALT (U/L)
	± desvio padrão	± desvio padrão
Controle (SF)	230,2 ± 141,54	51,6 ± 16,87
Chá 1000 mg/kg	171,7 ± 42,81*	43 ± 13,10*
Chá 2000 mg/kg	176,4 ± 47,75*	46,6 ± 9,38*
EEtOH 1000 mg/kg	163 ± 25,28*	49,5 ± 9,30*
EEtOH 2000 mg/kg	167,3 ± 47,58*	42,5 ± 8,55*

*p < 0,05

n = 10

4.9. Avaliação da atividade antioxidante

As substâncias com núcleo fenólico, como tocoferol, flavonóides e ácidos fenólicos, apresentam destaque como antioxidantes, por atuarem como eficientes captadores de espécies reativas de oxigênio, além de reduzirem e quelarem íons férricos que catalisam a peroxidação lipídica (ANDRADE et al., 2007).

Na literatura encontram-se relatos de que os ácidos fenólicos possuem atividade antioxidante, antimicrobiana, antimutagênica, entre outras (SIMÕES et al., 2003; PROESTOS et al, 2006; KIM et al., 2006.)

Muitos métodos são utilizados para analisar a atividade antioxidante de materiais biológicos e o método mais simples e comum utilizado para investigar a atividade seqüestradora de compostos fenólicos é a utilização do radical livre estável DPPH como reagente cromógeno (GAO et al, 1999). O mecanismo desta reação consiste no seqüestro, pelo DPPH, de um átomo de hidrogênio de um doador polifenólico (antioxidante). Esta reação envolve mudança de cor do DPPH de violeta para amarelo, proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante presente, que pode ser monitorada pela absorbância a 517 nm (LEBEU et al., 2000; ANDRADE et. al., 2007).

Os experimentos partiram das concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 160 µg/mL. Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos e foram expressos pela porcentagem de redução do DPPH (Figura 28).

Apesar da grande variedade de ácidos fenólicos encontrados na espécie em estudo, os resultados mostraram uma pequena redução do DPPH quando comparados com o padrão de ácido caféico, sendo que o maior valor de redução (24,58%) foi observado para a resina na concentração de 160 µg/mL, comparado com 94,80% para o padrão de ácido caféico na mesma concentração.

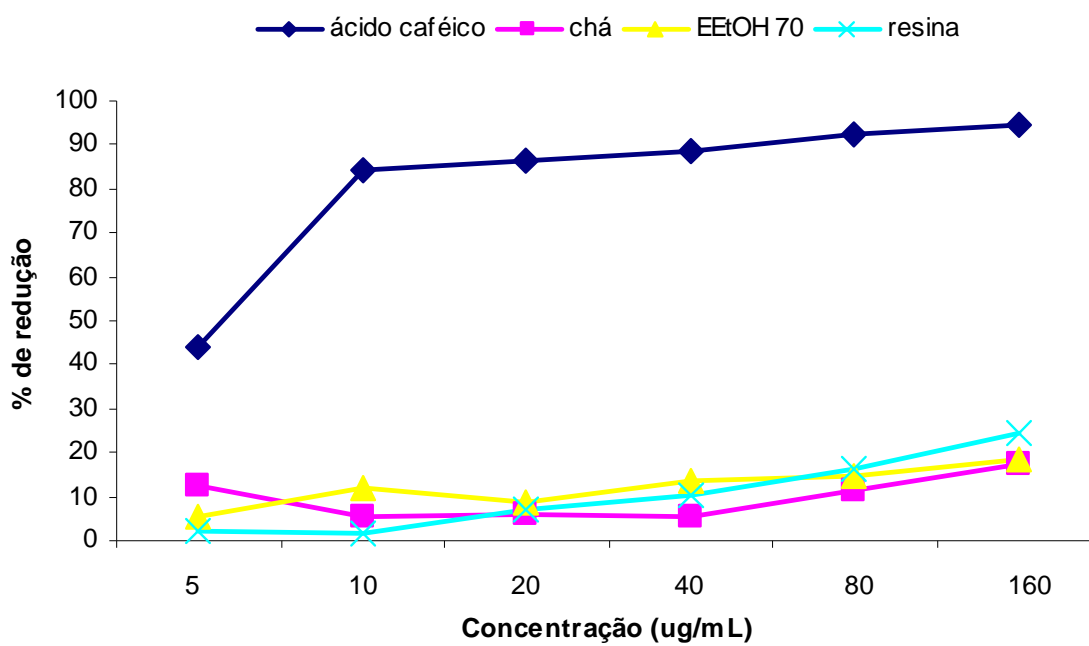


Figura 28. Atividade antioxidante do ácido cafáico, do chá, do EEtOH da resina de *O. macrocarpa*.

VI – CONCLUSÕES

Considerando a ausência de estudos de controle da qualidade, foi traçado o perfil da droga vegetal *Operculina macrocarpa* (L.) Urb., de acordo com as exigências legislativas, que podem comprovar a autenticidade da amostra.

Condições ótimas para a extração foram obtidas empregando-se a percolação como método extrativo, e utilizando-se do etanol 70 °GL como líquido extrator.

As técnicas de CLAE-UV-DAD e EM foram eficientes, pois com microgramas de extratos e com a utilização de padrões foi possível traçar o perfil do **EEtOH**, do chá e da resina, além de verificar que o **EEtOH** e o chá possuem perfis semelhantes.

Através destas técnicas foi realizada ainda a identificação dos principais metabólitos existentes no **EEtOH**, no chá e na resina da espécie *O. macrocarpa*, sendo eles: ácido caféico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido metil-ferúlico, ácido quínico, ácido dicafeoil-quínico e dímero do ácido caféico.

Foi possível quantificar os ácidos fenólicos identificados em no **EEtOH** e no chá de *O. macrocarpa* através das análises de CLAE-UV-DAD, podendo sugerir que a atividade laxante seja devido à presença destes ácidos.

O extrato obtido por percolação utilizando etanol 70 °GL da raiz de *Operculina macrocarpa* e o chá desta espécie apresentaram um aumento da motilidade intestinal dos camundongos nos ensaios de trânsito intestinal, nos três diferentes modelos experimentais testados.

Foi observada, ainda, uma discreta atividade antioxidante para o extrato etanólico, para o chá e para a resina de *O. macrocarpa*, quando comparada com o padrão do ácido caféico, utilizando a modelo experimental do DPPH.

Na avaliação toxicológica foi observada diminuição nos valores das transaminases séricas (AST e ALT) dos grupos tratados com *O. macrocarpa* em

relação ao grupo controle, sugerindo hepatotoxicidade, a qual deve ser confirmada através de estudos histopatológicos.

Diante dos resultados obtidos no estudo químico-farmacológico de *O. macrocarpa*, pode-se pensar no desenvolvimento de um produto farmacêutico, o qual deve ser precedido por estudos de pré-formulação, visando otimizar a ação terapêutica através da tecnologia farmacêutica.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANBUSELVAM, C.; VIJAYAVEL, K.; BALASUBRAMANIAN, M.P. Protective effect of *Operculina turpethum* against 7,12-dimethyl benz(a)anthracene induced oxidative stress with reference to breast cancer in experimental rats. **Chem. Biol. Interact.**, v. 168, n. 3, p. 229-36, 2007.

ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae-Mimosoideae. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 17, n. 2, p. 231-5, 2007.

ANDRE, S.B.; RODRIGUEZ, T. N.; MORAES-FILHO, J. P. P. Constipação intestinal funcional. **Rev. Bras. Med.**, v.57, n.11, p.1240-1252, 2000.

ANDRE, S.B.; RODRIGUEZ, T. N.; MORAES-FILHO, J. P. P. Constipação intestinal. **Rev. Bras. Med.**, v.57, p.53-63, 2000. Edição especial.

ANDREOLI, T.E. Physiology in medicine: Free radicals and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v.108, p. 650-1, 2000.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR, L.V. Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos. 6. ed. São Paulo: Premier, 2000.

ARGÁEZ, A.G.; PÉREZ-AMADOR, M.C. Distribution in the plant of glycoresins and ergoline alkaloids in three species of *Ipomoea* (Convolvulaceae). **Rev. Int. Bot. Exp.**, v.60, n.1-2, p.73-76, 1997.

- AUSTIN, D. F. **Convolvulaceae (Morning Glory Family)**, 1997. Disponível em: <http://www.fau.edu/divdept/biology/people/convolv.htm> (Acesso em 16/05/2007).
- BAH, M.; CHÉRIGO, L.; TAKETA, A.T.; FRAGOSO-SERRANDO, M.; HAMMOND, G.B.; PEREDA-MIRANDA, R. Intrapilosins I-VII, pentasaccharides from the seeds of *Ipomoea intrapilosa*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 7, p. 1153-7, 2007.
- BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 58-67.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 31 jan. 1995. Institui e normaliza o registro de produtos fitoterápicos.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 17. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 24 abr. 2000. Aprova regulamento técnico, normatizando o registro de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 48. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 18 mar. 2004. Dispõe sobre o registro dos medicamentos fitoterápicos.
- BRITO, A.R.M.S. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996.
- CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

- CARVALHO, J.C.T. **Formulário Médico-Farmacêutico de Fitoterapia**. Alfenas: Ciência Brasiliis, 2005.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.
- CHARROUF, Z.; HILALI, M.; JAUREGUI, O.; SOUFIAOUI, M.; GUILLAUME, D. Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1398–1401, 2007.
- CHÉRIGO, L. & PEREDA-MIRANDA, R. Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 4, p. 595-9, 2006.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 4. ed. Lisboa: Fund. Calouste Gulbenkian, v. II, 1994.
- COTA, R.P.; MIRANDA, L.S. Associação entre constipação intestinal e estilo de vida em estudantes universitários. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v.21, n.4, p.296-301, 2006.
- DANTAS, R.O. Diarréia e constipação intestinal. **Medicina**, v.37, p. 262-266, 2004.
- DE MUTH, J.E. **Basic Statistical and Pharmaceutical Statistical Applications**. New York: Dekker, 1999. p.169-191.
- DI STASI, L. N. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Paulista, 1996.
- DINI, I.; TENORE, G.C.; DINI, A. New polyphenol derivative in *Ipomoea batatas* tubers and its antioxidant activity. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n. 23, p. 8733-7,

2006.

ESCOBEDO-MARTINEZ, C. & PEREDA-MIRANDA, R. Resin glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 6, p. 974-8, 2007.

FARMACOPÉIA Brasileira. São Paulo: Siqueira, 1929.

FARMACOPÉIA Brasileira. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FÉRES, C.A.O.; MADALOSSO, R.C.; ROCHA, O.A.; LEITE, J.P.V.; GUIMARÃES, T.M.D.P.; TOLEDO, V.P.P.; TAGLIATI, C.A. Acute and chronic toxicological studies of *Dimorphandra mollis* in experimental animals. **J. Ethnopharmacol.**, v.108, p. 450-456, 2006.

FIGUEIREDO, M.E.; MICHELIN, D.C.; SANNOMIYA, M.; SILVA, M.A.; SANTOS, L.C.; ALMEIDA, L.F.R.; BRITO, A.R.M.S., SALGADO, H.R.N.; VILEGAS, W. Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpigiaceae). **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.41, n.1, p.1-5, 2005.

GALINA, K.J. *Guazuma ulmifolia* Lam., Sterculiaceae: Estudo botânico, químico e microbiológico. 2003. 110f. Dissertação (Mestrado) - UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2003.

GAO, Z.; KAIXUN, H.; YANG,X.; XU, H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from de radix os *Scutellaria bacailensis* Georgi. **Bioch. Et. Bioph. Acta.** 1472: 643-650, 1999.

GARCIA-ÁRGAEZ, A.; PÉREZ-AMADOR, M.C. Distribution in the plant of glycoresins and ergoline alkaloids in three species of *Ipomoea* (Convolvulaceae). **Rev. Int. Bot. Exp.**, v.60, n.1/2, p.73-76, 1997.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

GOVINDARAJAN, R.; SINGH, D.P.; RAWAT, A.K.S. High-performance liquid chromatographic method for the quantification of phenolics in 'Chyavanprash' a potent Ayurvedic drug. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 43, p. 527–532, 2007.

GLASL, H. Zur Photometric in der Drogenstandardisierung- 3. gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 123, p. 1979-1987, 1983.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMAN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3864-3874, 1991.

HEYWOOD, V.H. Flowering plants of the world. New York: Oxford University Press, 1993. p. 229-230. HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 1993. p. 229-230.

HUEZA, I.M.; GUERRA, J.L.; HARAGUCHI, M.; NAOKI, A.; GÓRNIAK, S.L. The roles of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: a study in rats. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 57, n.1, p. 53-8, 2005.

IMBERT, M.P.; WILSON, L.A. Effects of chlorogenic and caffeic acids on IAA oxidase preparations from sweet potato roots. **Phytochemistry**, v.11, p.2671-2676, 1972.

ISLAM, M.S.; YOSHIMOTO, M.; YAHARA, S.; OKUNO, S.; ISHIGURO, K.; YAMAKAWA, O. Identification and characterization of foliar polyphenolic composition

in sweetpotato (*Ipomoea batatas L.*) genotypes. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 13, p. 3718-22, 2002.

JANSSEN, P.; JAGENEAU, A. H. A new series of potent analgesics. Part I – chemical structure and pharmacological activity. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 9, p. 381-400, 1957.

JIMÉNEZ, M.S.; VELARTE, R.; CASTILHOS, J.R. Direct determination of phenolic compounds and phospholipids in virgin olive oil by micellar liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 100, p. 8–14, 2007.

JOHANSON, J.F.; KRALSTEIN, J. Chronic constipation: a survey of the patient perspective. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 25, p. 599–608, 2007.

KIM, K-J.; TSO, R.; YANG, R.; CUI, S.W. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chemistry**, v.95, p.466-476, 2006.

KRIZMAN, M.; BARICEVIC, D.; PROSEK, M. Determination of phenolic compounds in fennel by HPLC and HPLC–MS using a monolithic reversed-phase column. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 43, p. 481–485, 2007.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Porto Alegre: Gráfica Metrópole, 2003.

LARINI, L. **Fármacos e Medicamentos**. Porto Alegre: Artmed, 2008, p.272-305.

LINAJES, A.; RICO-GRAY, V.; CARRIÓN, G. Traditional production system of the root of jalapa, *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), in Central Veracruz, Mexico. **Econ. Bot.**, v.48, n.1, p.84-89, 1994.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p.183-184.

MACHADO, F.A.V. Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart., Leguminosae, Barbatimão. 2005. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São Paulo, 2005.

MARONA, H.R.N.; LUCCHESI, M.B.B. Refining the intestinal motility test in mice to reduce animal stress. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.24, n.1, p.79-82, 2003.

MARONA, H.R.N.; LUCCHESI, M.B.B. Protocol to refine intestinal motility test in mice. **Laboratory Animals**, v.38, p. 1–4, 2004.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000. p.178.

Martins, A.B., Sacramento, L.V.S. Análise microscópica e física para controle de qualidade primário de matéria prima vegetal pulverizada. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 16., 2004, Ilha Solteira. CD ROM... São Paulo: Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, UNESP, 2004.

MANN, P.; TOFERN, B.; KALOGA, M.; EICH, E. Flavonoid sulfates from the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, v.50, p.267-271, 1999.

MATOS, F.J.A. Aproveitamento de plantas medicinais da região nordeste. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.63, n.3-4, p.132-140, 1982.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas**. 2. ed. Fortaleza: EUFC, 1994. p.62-65.

MELO, E.A.; MACINI FILHO, J.; GUERRA, N.B.; MACIEL, G.R. Atividade antioxidante de extratos de Coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.23, p. 195-199, 2003.

MELO, M.C.B.; TORRES, M.R.F.; GUIMARÃES, E.V.; FIGUEIREDO, R.C.P.; PENNA, F.J. Constipação intestinal. **Rev. Med. Minas Gerais**, v.13, n.2, p.35-43, 2003.

MICHELIN, D.C. Análise fitoquímica e ensaios biológicos da raiz de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Convolvulaceae). 2004. 91 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Araraquara, São Paulo, 2004.

MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Avaliação da atividade laxante de *Operculina macrocarpa* L. (Convolvulaceae). **Rev. Bras. Farmacog.**, v.14 n.2, p.105-109, 2004.

MIGLIATO, K.F. *Syzygium cuminii* (L.) Skeels – Jambolão: Estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade anti-séptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato. 2005 140 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.D.; MELLO, J.C.P.; SACRAMENTO, L.V.S.; SALGADO, H.R.N. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.17, n.1, p.94-101, 2006.

MIRÓN-LÓPEZ, G.; HERRERA-RUIZ, M.; ESTRADA-SOTO, S.; AGUIRRE-CRESPO, F.; VAZQUEZ-NAVARRETE, L.; LEÓN-RIVERA, I. Resin glycosides from the roots of *Ipomoea tyrianthina* and their biological activity. **J. Nat. Prod.** v. 70, n. 4, p. 557-62, 2007.

OLESZEK, W. & BIALY, Z. Chromatographic determination of plants saponins – An update (2002-2005). **J. Chromat. A**, v.1112, n.1-2, p.78-9, 2006.

PEREDA-MIRANDA, R.; BAH, M. Biodynamic constituents in the Mexican morning glories: purgative remedies transcending boundaries. **Cur. Top. Med. Chem.**, v.3, p.1-20, 2003.

PEREDA-MIRANDA, R.; FRAGOSO-SERRANO, M.; ESCALANTE-SANCHEZ, E.; HERNANDERS-CARLOS, B.; LINARES, E.; BYE, R. Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. **J. Nat. Prod.** V. 69, n.10, p. 1460-6, 2006.

Pharmacopéia Paulista. São Paulo: Casa Espindola, 1917.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T.; **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. **LWT**, v. 40, p. 1–11, 2007.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4. ed. Lisboa:

Fundação Calouste Gulbenkian, v. I, 1996. p. 1113 – 1115, 1127.

PROESTOS, C.; BOZIARIS, I.S.; NYCHAS, G.J.E.; KOMAITIS, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v.95, p.664-671, 2006.

RAMESH, P.R.; SURESH KUMAR, K.; RAJAGOPAI, M.R.; BALACHANDRAN, P.; WARRIER, P.K. Managing morphine-induced constipation: a controlled comparison of an *Ayurvedic* formulation and *Senna*. **J. Pain Symptom Manage.**, v.16, n.4, p.240-244, 1998.

RAMÍREZ, J.H.; PALACIOS, M.; TAMAYO, O.; JARAMILLO, R.; GUTIÉRREZ, O. Acute and subacute toxicity of *Salvia scutellarioides* in mice and rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 109, p.348-353, 2007.

Recommendation of German society of clinical chemistry. **Klin. Chem. Lin. Biochem.**, v.6, p.37-45, 1972.

RODRIGUES, C.M. Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. 2007. 197 f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Química

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n.1, p. 53-60, 2007.

SALGADO, H.R.N.; RONCARI, A.F.F.; MICHELIN, D.C.; MOREIRA, R.R.D. Evaluation of antidiarrhoeal effects os *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) leaf extract in mice. **Rev. Ciênc. Farm. Bás. Aplic.**, v.27, n.1, p.89-92, 2006.

SANCHEZ-MORENO, C.; LAURRAURI, J. A.; SAURA –CALIXTO, F. A . Procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 76, n. 10, p. 270-276, 1998.

SANNOMIYA, M.; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BRITO, A.R.M.; VILEGAS, W. Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem

mass spectrometry to the analysis of polyphenolics compounds from the infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry.**, v. 19, n. 16, p. 2244-50, 2005.

SCHIMMING, T.; TOFERN, B.; MANN, P.; RICHTER, A.; JENETT-SIEMS, K.; DRAGER, B.; ASANO, N.; GUPTA, M.P.; CORREA, M.D.; EICH, E. Distribution and taxonomic significance of calystegines in the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, v.49, n.7, p.1989-1995, 1998.

SCHIMMING, T.; JENETT-SIEMS, K.; MANN, P.; TOFERN-REBLIN, B.; MILSON, J.; JOHNSON, W.; DEROIN, T.; AUSTIN, D.F.; EICH, E. Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. **Phytochemistry**, v.66, p.469-480, 2005.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

SOARES, L. A. L.; GONZÁLEZ, O. G.; PETROVICK, P. R.; BASANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra) empregando planejamento fatorial. **Cad. Farm.**, v. 14, n. 1,2 , p. 21-26, 1998.

TOFERN, B.; MANN, P.; KALOGA, M.; JENETT-SIEMS, K.; WITTE, L. Aliphatic pyrrolidine amides from two tropical convolvulaceous species. **Phytochemistry**, v.52, p.1437-1441, 1999.

TRUONG, V.D.; MCFEETERS, R.F.; THOMPSON, R.T.; DEAN, L.L.; SHOFRAN, B. Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial

sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars in the United States. **J. Food Sci**, v. 72, n. 6, p. C343-9, 2007.

TUNG, Y-T.; WU, J-H.; KUO, Y-H.; CHANG, S.T. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. **Bioresource Technology**, v. 98, p.1120–1123, 2007.

United States Pharmacopeia. 26th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convection, 2003.

WAGNER, H.M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984. 303p.

WANNMACHER, L. Constipação intestinal crônica no adulto e na criança: quando não se precisa de medicamentos. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**. v.3, n.1, 2005.

World Health Organization, **Good Manufacturing practices for pharmaceutical products. Supplementary guidelines for manufacture of herbal medicinal products**, 1992.

World Health Organization, **Regional office for the western pacific research guidelines for evaluating the safety and efficacy os herbal medicines**. Manila, 1998.

WONG, C.L.; WAY, M.K. Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal or morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.73, p. 11-19, 1981.

WRÓBLENSKI, F.; LADUE, J.S. Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.91, p.569-571, 1956.

YE, M.; HAN, J.; CHEN, H.; ZHENG, J.; GUO, D. Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v. 18, p.82-91, 2007.

YOSHIMOTO, M.; KURATA-AZUMA, R.; FUJII, M.; HOU, D.X.; IKEDA, K.; YOSHIDOME, T.; OSAKO, M. Phenolic composition and radical scavenging activity of sweet potato-derived shochu distillery by-products treated with koji. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 68, n. 12, p. 2477-83, 2004.

YOSHIMOTO, M.; KURATA-AZUMA, R.; FUJII, M.; HOU, D.X.; IKEDA, K.; YOSHIDOME, T.; OSAKO, M. Enzymatic production of caffeic acid by koji from plants resources containing caffeoylquinic acid derivatives. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 69, n. 9, p. 1777-81, 2005.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001.

ZARONI, M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, W.S.M.; FÁVERO, M.L.D.; CORREA JUNIOR, C.; STREMEL, D.P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.14, n.1, p. 29-39, 2004.