

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Juliana Zamboni

**ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E PAINEL MICROBIOLÓGICO DO COMPOSTO
BIOATIVO DA *Rhamnus purshiana* (CÁSCARA SAGRADA) EM
MODELO *IN VITRO***

Santa Maria, RS

2022

Juliana Zamboni

**ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E PAINEL MICROBIOLÓGICO DO COMPOSTO BIOATIVO DA *Rhamnus purshiana*
(CÁSCARA SAGRADA) EM MODELO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Pr^a Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann

Santa Maria, RS

2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Zamboni, Juliana
ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E PAINEL MICROBIOLÓGICO DO COMPOSTO BIOATIVO
DA Rhamnus purshiana (CÁSCARA SAGRADA) EM MODELO IN
VITRO / Juliana Zamboni.- 2022.
96 f.; 30 cm

Orientadora: Pr^a Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2022

1. Rhamnus purshiana 2. Plantas medicinais 3.
Fitoterápicos I. Bauermann, Pr^a Dr^a. Liliane de Freitas
II. Título.


Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, JULIANA ZAMBONI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Juliana Zamboni

**ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
E PAINEL MICROBIOLÓGICO DO COMPOSTO BIOATIVO DA *Rhamnus purshiana*
(CÁSCARA SAGRADA) EM MODELO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Desenvolvimento e Avaliação de Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.



Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a (UFSM)
(Orientador)



Gilberti Helena Hübscher Lopes, Dr^a (UFSM) (Parecer)



Amanda Leitão Gindri, Dr^a (URI/Santiago)

Santa Maria, RS

2022

DEDICATÓRIA

A minha família, minha mãe, meu pai José Roque Zamboni (in memoriam), que sempre esteve ao meu lado, sendo minha fortaleza e hoje segue em meus pensamentos e lembranças mais lindas. Dedico também ao meu namorado.

A eles todo meu amor e gratidão!

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho ocorreu, principalmente, pelo apoio, contribuição e esforço de muitas pessoas. Reconheço a todos, que de alguma forma, auxiliaram para que este estudo fosse concluído, em especial, agradeço:

- A Deus, por tudo que Ele tem feito em minha vida;
- A minha mãe Salete Terezinha Zamboni, que nunca me desamparou, sempre esteve ao meu lado, me aconselhando, transmitindo boas energias, alegrias e torcendo por mim;
- Ao meu namorado Yuri Masaharo Adachi, pelo amor incondicional, pela paciência, pelo respeito e companheirismo e por ser o maior incentivador dos meus projetos de vida e de carreira profissional;
- A minha orientadora Pr^a. Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann, pela oportunidade concedida a mim de fazer parte da família da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por todo apoio, dedicação, carinho e zelo. Não esquecerei nunca de toda a sua bondade que refletiu de forma brilhante no meu projeto, na minha vida profissional e pessoal;
- A Pr^a. Dr^a. Gilberti Helena Hübscher Lopes, pelos ensinamentos adquiridos;
- Ao Laboratório de Fisiologia Experimental - LAFEx, o meu agradecimento especial a todos os que me ensinaram muito sobre o papel importantíssimo de um pesquisador e que o desenvolvem com maestria;
- Ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral (LAPEMICRO) e ao Laboratório de Investigações Fitoquímicas (LABINFITO), pelo auxílio na realização dos testes desta dissertação;
- A Universidade Federal de Santa Maria - UFSM/RS, Universidade Pública, com ensino de qualidade, pela oportunidade de desenvolver e concluir este projeto;
- Aos professores e funcionários da UFSM/RS, por todo conhecimento e troca de experiências, vocês foram fundamentais para meu desenvolvimento e concretização deste estudo;
- A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Por fim, o meu mais sincero agradecimento a todas as pessoas que são essenciais para eu ser, a cada dia, um ser humano melhor.

“Farmacêuticos, em todos os tempos e lugares, trazem mesmo lições de amor às pessoas. Aliás, para o farmacêutico, amar não é apenas o verbo transitivo direto que se aprende a conjugar, nas escolas. Amar é ação, a ação de servir, a qualquer hora, de qualquer dia e em qualquer lugar. É cuidar, é promover a saúde, é salvar vidas!”

(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

ESTUDO DA CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PAINEL MICROBIOLÓGICO DO COMPOSTO BIOATIVO DA *Rhamnus purshiana* (CÁSCARA SAGRADA) EM MODELO *IN VITRO*

AUTORA: Juliana Zamboni

ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

Sabe-se que há cerca de 150 mil anos o homem já utilizava de plantas medicinais para tratar os males e problemas em saúde. O consumo “*in natura*” das plantas ou mesmo na forma de produtos derivados está diretamente ligado às reações adversas, justificado pelo crescente uso delas. Dentre todas as espécies encontradas está a *Rhamnus purshiana*, também conhecida popularmente como Cáscara Sagrada, sendo utilizada devido ao seu efeito laxativo. No entanto, ainda existem poucos estudos relacionados ao seu uso. O presente trabalho teve por objetivo, através do extrato bruto das cascas da *Rhamnus purshiana*, realizar a análise *in silico* dos compostos majoritários citados na literatura, e prever a biodisponibilidade oral, o potencial toxicológico e os dados farmacocinéticos da Cáscara Sagrada pelos softwares *Molinspiration*, *Protox II* e *AdmetSAR*. Além destes, realizar a quantificação dos metabólitos secundários e a capacidade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH e microbiológico através do ensaio de disco difusão e concentração inibitória mínima. O extrato de *Rhamnus purshiana* após as análises apresentou boa biodisponibilidade por via oral, além de probabilidade imunotóxica e mutagênica. Já a excreção, apresentou boa eliminação, quando o composto já está biotransformado. Quanto a determinação de polifenóis e flavonoides apresentou concentrações de $4,00 \pm 0,27$ mg/g e $2,98 \pm 0,11$ mg/g de extrato que foram determinadas por dosagens fitoquímicas, respectivamente. A *Rhamnus purshiana* mostrou-se capaz de capturar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com capacidade antioxidante de $IC_{50}=1,78 \pm 0,10$ mg/ml. A atividade antimicrobiana não foi significativa frente à *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*. Desta forma, através dos resultados positivos, pode-se sugerir o uso de *Rhamnus purshiana* de forma eficaz e segura.

Palavras-chave: *Rhamnus purshiana*, Plantas Medicinais, Laxativo, RENISUS.

ABSTRACT

STUDY OF THE PHYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND MICROBIOLOGICAL PANEL OF THE BIOACTIVE COMPOUND FROM *Rhamnus purshiana* (CASCARA SAGRADA) IN IN VITRO MODEL

AUTHOR: Juliana Zamboni

ADVISOR: Liliane de Freitas Bauermann

It is known that about 150 thousand years ago man already used medicinal plants to treat ills and health problems. The “in natura” consumption of plants or even in the form of derived products is directly linked to adverse reactions, justified by their increasing use. Among all the species found is *Rhamnus purshiana*, also popularly known as Cascara Sagrada, being used due to its laxative effect. However, there are still few studies related to its use. The present work aimed, through the crude extract of the barks of *Rhamnus purshiana*, to carry out the *in silico* analysis of the major compounds mentioned in the literature, and to predict the oral bioavailability, the toxicological potential and the pharmacokinetic data of Cascara Sagrada using the Molinspiration, Protox software. II and AdmetSAR. In addition to these, perform the quantification of secondary metabolites and the antioxidant capacity by the DPPH radical capture method and microbiological through the disk diffusion assay and minimum inhibitory concentration. The *Rhamnus purshiana* extract after the analysis showed good oral bioavailability, in addition to immunotoxic probability and mutagenicity. Excretion, on the other hand, showed good elimination, when the compound is already biotransformed. As for the determination of polyphenols and flavonoids, it showed concentrations of 4.00 ± 0.27 mg/g and 2.98 ± 0.11 mg/g of extract, which were determined by phytochemical dosages, respectively. *Rhamnus purshiana* was able to capture reactive oxygen and nitrogen species with an antioxidant capacity of $IC_{50}=1.78 \pm 0.10$ mg/ml. Antimicrobial activity was not significant against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*. In this way, through the positive results, it can be suggested the use of *Rhamnus purshiana* in an effective and safe way.

Keywords: *Rhamnus purshiana*, Medicinal Plants, Laxative, RENISUS.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Espécie <i>Rhamnus purshiana</i> em seu habitat natural.....	32
FIGURA 2 – Folhas e frutos da <i>Rhamnus purshiana</i>	32
FIGURA 3 – Cascas da <i>Rhamnus purshiana</i>	32
FIGURA 4 – Lista da RENAME.....	34
FIGURA 5 – Estrutura química da antraquinona e seus compostos derivados.....	35
FIGURA 6 – Formação da antraquinona.....	36
FIGURA 7 – Cascarosídeos A, B, C, D	36
FIGURA 8 – Homeostase redox e estresse oxidativo	42
FIGURA 9 - Curva de calibração construída com ácido gálico (a) utilizado para quantificar o teor de polifenóis totais (A); e a construída para quantificar os flavonóides (B).	58
FIGURA 10 - Curva de calibração que relaciona a porcentagem de inibição do radical DPPH com a concentração de extrato de <i>Rhamnus purshiana</i> responsável por esta inibição.	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.....	24
TABELA 2 - Volumes pipetados para a análise do teor de polifenóis totais	46
TABELA 3 - Volumes pipetados para a análise do teor de flavonóides totais	47
TABELA 4 - Procedimento realizado para a análise do teste de antioxidantes.	49
TABELA 5 - Propriedades moleculares dos componentes majoritários da <i>Rhamnus purshiana</i> , calculadas no software Molinspiration	53
TABELA 6 - Parâmetros toxicológicos calculados através do software <i>ProTox II</i> da <i>Rhamnus purshiana</i>	53
TABELA 7 - Propriedades previstas e classificação AdmetSAR, para os compostos majoritários da <i>Rhamnus purshiana</i>	56
TABELA 8 - Equação da reta e valor de “r” para cada metabólito secundário pesquisado.....	58
TABELA 9 - Teores de polifenóis e flavonóides no extrato bruto de <i>Rhamnus purshiana</i>	58
TABELA 10 - Resultado do valor das absorbâncias obtidas <i>versus</i> concentração da solução.....	61

LISTA DE SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios Não-Esteroidais
AICI3	Cloreto de Alumínio
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATC	Sistema de Classificação Anatômica Terapêutica Química
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPase	Adenosinatrifosfatases
CIM	Concentração Inibitória Mínima
FFFB	Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
K+	Potássio
MFFB	Memento de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira
MS	Ministério da Saúde
MT	Medicina Tradicional
Na	Sódio
Na2CO3	Carbonato de Sódio a 20%
OMS	Organização Mundial da Saúde
O3	Ozônio
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
ROOH	Hidroperóxidos Orgânicos
SUS	Sistema Único de Saúde
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria/RS

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	antes de Cristo
Dr.	doutor
EB	extrato bruto
XIX	numeral romano correspondente a dezenove
VI	numeral romano correspondente a seis ou sexto
US\$	dólar, moeda oficial americana

LISTA DE SÍMBOLOS

DL 50	Dose letal 50%
g	Gramas, unidade de medida de massa
mg	Miligramas, unidade de medida de massa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 HISTÓRICO DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	15
1.1.2 Uso de plantas medicinais no Brasil	18
1.2 A PRÁTICA DA FITOTERAPIA	20
1.2.1 Conceito	20
1.2.2 O Sistema Único de Saúde (SUS) e a fitoterapia	22
1.2.3 Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS)	23
1.2.4 Importância econômica relacionada ao uso das plantas medicinais	25
1.2.5 Farmácia Viva	26
1.2.6 Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB)	27
1.2.7 Memento de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (MFFB)	27
1.2.8 Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)	28
1.3 DESCRIÇÃO DA FAMÍLIA RHAMNACEAE	29
1.3.1 Gênero <i>Rhamnus</i>	30
1.3.2 Espécie <i>Rhamnus purshiana</i>	31
1.3.3 Composição química da <i>Rhamnus purshiana</i>	34
1.3.4 Ações farmacológicas da <i>Rhamnus purshiana</i>	37
1.3.5 Contraindicações de uso da <i>Rhamnus purshiana</i>	38
1.3.6 Atividade antimicrobiana da <i>Rhamnus purshiana</i>	39
1.3.7 Toxicidade da <i>Rhamnus purshiana</i>	40
1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS PLANTAS	41
2 JUSTIFICATIVA	44
3 OBJETIVOS	44
3.1 OBJETIVO GERAL	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO VEGETAL	45
4.2 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS MAJORITÁRIOS.....	45
4.2.1 Determinação <i>In sílico</i>	45
4.3 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	46
4.3.1 Determinação do teor de Polifenóis Totais	46

4.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA <i>Rhamnous purshiana</i>	47
4.4.1 Método radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)	47
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	49
4.5.1 Microrganismos e condições de cultura	49
4.5.2 Disco difusão	49
4.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	50
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 ENSAIOS <i>IN SÍLICO</i>	52
5.1.1 Molinspiration	52
5.1.2 ProTox II	53
5.1.2 AdmetSAR	55
5.2 DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	57
5.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE	60
5.3.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método do 1,1-difenil, 2-picrilidrazila (DPPH)	60
5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	62
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICE	75
APÊNDICE A – MANUSCRITO 1	77
APÊNDICE B – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO A REVISTA REGULARY TOXICOLY AND PHARMACOLOGY	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS

Desde os primórdios, o homem tem buscado cuidar de sua saúde e sobrevivência com os recursos oriundos da natureza, isto porque, culturas ancestrais de épocas passadas já faziam uso da medicina tradicional (MT) com o objetivo de recuperar a qualidade de vida que por algum motivo possa ter sido afetada por doenças. Neste contexto, o saber popular e a crença local, transmitida de geração em geração, de países em desenvolvimento, definiu que, a preservação da saúde está relacionada ao uso de plantas medicinais (RODRIGUES, SANTOS, AMARAL, 2006).

As plantas medicinais são significativas e seu uso é variável: tanto para fins terapêuticos, nas infusões e preparações de chás, quanto por proporcionar a matéria-prima para a biossíntese de drogas novas (NUNES-PINHEIRO, *et al*, 2003). Os relatos indicam que o início da utilização e o conhecimento empírico destas foram através das sociedades chinesa, indiana, egípcia, grega, esquimó e africana. Hoje, servem também de base para os avanços farmacológicos na área fitoterápica (BORGES; SALES, 2018).

Foi no período de 2838-2698 a.C. que os primeiros relatos do uso de fitoterápicos surgiram através de um imperador chinês chamado Shen Nung. Este fichou 365 venenos e ervas medicinais que eram utilizadas pela inspiração do considerado deus da criação Pan Ku (FRANÇA, *et.al*, 2007). Já no Egito é possível encontrar o herbário mais antigo, denominado papiro de Erbs, com 811 receitas e 125 plantas medicinais pautadas, sendo algumas destas utilizadas pelos egípcios, na prática de embalsamento das múmias (BRAGA, 2011).

Ainda, a base da medicina hindu encontrava-se anunciada nos seguintes textos sagrados: *Ayurveda* (Aprendizado de Longa Vida) e *Veda* (Aprendizado), em meados dos anos 1500 a.C, quando Sushruta dispunha de 760 plantas medicinais, entre elas, *Rauwolfia serpentina* (sedativo), ao qual Mathatma Gandhi, libertador da Índia, fez uso até sua morte. Além desta, *Cannabis indica* (indutor de sono). Demais relatos do passado indicam que o papiro de Erbs, no Ocidente em 1553-1550 a.C., descreveu 700 plantas com finalidade terapêutica, bem como o uso do ópio (suco da cápsula da *Papaver somniferum*), mencionado por Hipócrates e transportado por Alexandre, o Grande (VALE, 2002).

O Pai da Medicina, assim conhecido Hipócrates, no tempo de 460 - 377 a.C., fez sua análise e pesquisa baseado nas respostas que cada indivíduo ou paciente apresentava frente uma doença, empregando além disto a própria capacidade curativa de todo ser humano. Esta observação possibilitou a individualização terapêutica de medicamento, dose unitária, repouso e uso das plantas medicinais (BRASIL, 2019).

Estudos com 500 espécies de plantas medicinais foram realizados por Pedanius Dioscórides, médico grego militar, que viveu entre os anos 20 e 40 d.C, na era cristã (BRAGA, 2011). Seus registros foram catalogados em uma obra chamada “Matéria Médica”, e esta foi consagrada até o Renascimento, quando já descreveu o uso do ácido acetilsalicílico, para dor, também do ópio, como veneno e como medicamento (BRANDELLI, 2017).

Porém, todo este conhecimento foi ignorado, uma vez que, a Igreja Católica, no período da Idade Média impôs que pesquisas neste contexto fossem abandonadas, pelo fato de a mesma não conceber o conhecimento científico (BRAGA, 2011).

Entretanto, neste mesmo período a medicina árabe foi instituída, marcada pela obra de Avicena (980-1037), profissional que pregava o uso da erva-cidreira (*Melissa officinalis*, a noz-vômica (*Strychnos nux vomica*), a cânfora, o óleo de cróton (*Codiacum variegatum*) (VALE, 2002).

Civilizações e povos antigos da Roma, Grécia e Egito, faziam uso das plantas medicinais para consumo, como alimento, ou como remédios, ou seja, um recurso que servia para evitar, restabelecer e recuperar a saúde das pessoas que possuíam determinada doença. Ocorre que, a utilização destas ervas nem sempre produziam o efeito terapêutico desejado, e sim trazia efeitos colaterais, isto pela falta de conhecimento científico baseado nas propriedades essenciais e nocivas de determinada espécie, sendo observadas apenas por hábitos de comportamento e consumo que os animais faziam, por exemplo. A consequência mais grave nestes casos é a morte (BRANDELLI, 2017).

A medicina científica ao longo dos anos, através dos químicos, desenvolveu-se de forma gradual e muitas substâncias importantes foram sintetizadas. Foi o caso dos anestésicos locais, barbitúricos, anestésicos, antiparasitários, as sulfas, o antibiótico e as vitaminas (SCHENKEL, *et al*; 1985).

A atropina, isolada da beladona (*Atropa belladonna* L), foi explorada em 1819 e seu uso está relacionado com enfermidades do sistema nervoso. Já o quinino, de 1820, é um fármaco referido ao uso contra a malária proveniente da casca de uma planta chamada *Cinchona* sp. do Peru. Este foi estudado antes de outra substância potencial contra náuseas, a emetina da ipecacuanha (*Psychotria ipecacacuanha* Mull), potente emético. Na sequência, no ano de 1860,

surge a extração das folhas de *Erithroxylum coca* Lam, ou também conhecida como coca, tendo seu isolado cocaína identificado para atuar como anestésico local (BRASIL, 2019).

Por sua vez, Adolph von Bayer sintetizou em 1864, a malonil-uréia, conhecido por ácido barbitúrico, e mais tarde auxiliou no achado de moléculas com características mais lipossolúveis como os anticonvulsivantes, hipnóticos e anestésicos indutores (MENDES, 2016).

Nos anos de 1874 a planta *Pilocarpus jaborandi* foi explorada pelo Dr. Sinfrônio Olímpio César Coutinho utilizada para tratar glaucoma, devido a presença do alcaloide pilocarpina. Já Gillette, em 1877, empregava morfina em mulheres que estavam em trabalho de parto. Este fármaco analgésico utilizado pela via oral, substituiu o álcool antes utilizado, nas suas diversas formas, fermentado ou destilado, única escolha até então para anestésias em condições cirúrgicas. O primeiro antibiótico surgiu quando o médico bacteriologista escocês Fleming isolou o fungo *Penicillium*, revelando ao mundo a penicilina e seu poder terapêutico, em 1928 (VALE, 2002).

No século XIX a prática empírica do uso de plantas medicinais sofreu com o avanço de novas tecnologias da química experimental e da medicina científica transformando o conhecimento popular em comprovações laboratoriais baseadas no desenvolvimento e fabricação de novos fármacos, ao passo que os médicos foram substituindo a fitoterapia pelo uso de drogas sintéticas (TUROLLA, NASCIMENTO, 2006).

A revolução industrial e tecnológica que ocorreu neste mesmo século, além das guerras mundiais e da produção de equipamento bélico que estavam acontecendo, ocasionou na suspensão da fabricação dos medicamentos sintéticos e no retorno do emprego das plantas medicinais (BRAGA, 2011).

Apesar da complexidade de opções que o mercado disponibiliza em substâncias sintéticas para o tratamento terapêutico das doenças, nos últimos anos verificou-se um aumento pela busca de alternativas e as ervas medicinais surgem como tendência, no Brasil e no mundo. Estas podem ser consumidas na forma fresca, em preparações e ainda como fitoterápicos (SANTOS, ALMEIDA; 2016).

Existe uma diferença básica entre planta medicinal e o fitoterápico. Ocorre que, a planta medicinal, geralmente preparada na forma de chá e infusão, precisa ser industrializada para a obtenção de um medicamento, que resultará no fitoterápico. Este processo de industrializá-la irá evitar possíveis contaminações por agentes desconhecidos e agregará individualidade aos usuários, uma vez que, irá padronizar a forma e a quantidade correta de uso. Os fitoterápicos precisam ser registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2020).

Dentre as plantas medicinais utilizadas pela população está a *Rhamnus purshiana*, conhecida como cáscara sagrada. Utilizada predominantemente como laxante, possui também atividade antifúngica, anti-inflamatória e antineoplásica. Verifica-se, porém que, o conhecimento do metabolismo desta, ainda não é bem esclarecido, se comparado com o uso que é feito da mesma. Este é um fato que traz preocupação, uma vez que, por ser planta medicinal, a população associa somente aos benefícios, não se atentando aos riscos impostos pelo uso inadequado (PINHEIRO, *et al*, 2020).

Lamentavelmente, muitos fitoterápicos e plantas medicinais que estão disponíveis para a utilização por parte da população não têm o seu efeito farmacodinâmico e toxicológico bem definido (CAMPOS, CAMPANA, ALMEIDA; 2016).

1.1.2 Uso de plantas medicinais no Brasil

No Brasil, o histórico envolvendo o uso de plantas medicinais é antigo e anterior ao Período Colonial. Perpetuou-se ao longo dos anos graças aos indígenas, que espalharam o seu saber por dentre as tribos que habitavam o país, auxiliando no uso das ervas locais para o tratamento de doenças, com finalidade alimentícia e cosmética. A espécie, urucum (*Bixa orellana* L.) foi mencionada na Carta de Caminha como uma das plantas aqui utilizadas na época. No ano de 1587 surge o “Tratado Descritivo do Brasil”, assinado por Gabriel Soares de Souza, agricultor, empresário português e historiador brasileiro, que irá intitular como “árvores e ervas da virtude” todas aquelas utilizadas pelos povos indígenas do Brasil (ROCHA, *et al*, 2015).

Assim que os europeus chegaram ao Brasil, para aqui viverem, entenderam que as informações da qual os pajés transmitiam acerca das plantas poderia ser útil a eles na busca de pedras preciosas, que ocorria no interior dos sertões do país quando estes indígenas eram apreendidos com este fim e tornavam-se uma espécie de instrutor, guiando-os pelos sertões do país. E assim fizeram, atraíram para si todos os dados que os nativos tinham, associaram com o conhecimento próprio das plantas da Europa, e o resultado foi uma maior conexão com a flora brasileira (LORENZI, MATOS, 2002).

Sem comprovação científica, e informadas apenas pelo nome habitual indígena, as plantas eram utilizadas com finalidade terapêutica sem a validação de sua eficácia. Guilherme Piso, que era um médico e colonizador, realizava alguns experimentos posterior às averiguações que fazia junto dos "brasilíndios", como eram chamados e mesmo que o resultado não fosse

legítimo, as farmacopeias europeias e portuguesas foram criadas a partir de todas estas referências (HOFFMANN, ANJOS, 2018).

Branco, negro e indígena uniam-se culturalmente no ano de 1.500 quando os europeus, mais precisamente os portugueses, chegam ao Brasil para colonizá-lo. Este processo de povoar as terras brasileiras fez com as características e especificidades locais se perdessem no processo de estabelecimento de novos princípios, e o avanço esperado pelos colonizadores não ocorreu de forma prevista. Tentativas frustradas de ocupação e escassos empreendimentos ocorreram no ano de 1.500 a 1.530. Sem muitas frentes conquistadas novas estratégias foram implementadas. Consta-se neste período a existência de do pau-brasil (BARBOSA, LEMOS, KERNTOPF, FERNANDES, 2016).

Os jesuítas, padres pertencentes à Companhia de Jesus que surgiu em agosto de 1.534, por Inácio de Loyola, chegaram ao Brasil em 1.549 com o objetivo missionário de catequizar os índios. O objetivo destes era o de propagar o Cristianismo por entre os povos e este compromisso era realizado por intermédio das missões que aconteciam pelo mundo. Os padres precisavam se planejar para compreenderem os hábitos e costumes locais além da língua nativa falada para que obtivessem êxito. Também no Brasil a missão era atrair mais fiéis, expandindo a religião. Não apenas evangelizar, mas também alfabetizar. Com a criação de uma escola, os jesuítas alfabetizaram os indígenas aproximando-os mais dos costumes do homem branco. Os padres permaneceram no Brasil até o ano que foram expulsos, em 1.759 (OLIVEIRA, COSTA, 2011).

O legado deixado pelos jesuítas enriqueceu a história do País. Muitos eram médicos e por isso estiveram presentes na criação de instituições destinadas à saúde, além de que prestavam auxílio na assistência em saúde, realizando pequenas cirurgias, partos e sangrias. Com relação às plantas medicinais, dedicaram alguns escritos a respeito da vasta flora aqui encontrada, importante para os estudos e embasamento científico farmacopeicos (BARBOSA, LEMOS, KERNTOPF, FERNANDES, 2016).

No século XVI surgiram as boticas, ou seja, eram os locais permitidos para a venda de medicamentos e drogas. O Jesuíta José de Anchieta foi o primeiro boticário de Piratininga, localizado na cidade de São Paulo, vendendo fármacos a base de plantas medicinais como: ipeca (*Psychotria ipecacuanha*), copaíba (*Copaifera langsdorffii*), rosa (*Rosa* sp), sene (*Cassia angustifolia*) e manacá (*Brunfelsia uniflora*). Mais tarde, em 1812, proposto por Dom João VI, expedições pelo Brasil foram realizadas com a finalidade de se obter novas informações acerca das possibilidades terapêuticas da flora brasileira dos mais variados estados do país. Após, em 1838, o princípio ativo alcaloide pereirinha da casca do pau-pereira (*Geissospermum vellosii*)

foi isolado para ser utilizado contra a malária e febre. Por fim, a 1ª Farmacopeia Brasileira surge no ano de 1926, descrevendo 183 espécies de plantas medicinais brasileiras com suas descrições macro e microscópicas das drogas (BRASIL, 2019).

Desde então, com a evolução nas pesquisas que elucidaram o uso adequado da maioria das plantas medicinais, a população as tem empregado com finalidade terapêutica e adequando ao estilo de vida equilibrado que desejam ter se compararmos com a medicina tradicional, que em muitos casos é motivo de desgosto por parte dos pacientes, mesmo sendo mais próspera e indicada (ARGENTA; ARGENTA; GIACOMELLI; CEZAROTTO, 2011).

1.2 A PRÁTICA DA FITOTERAPIA

1.2.1 Conceito

A palavra fitoterapia origina-se do grego, “therapeia”, que significa tratamento e “phyton” que denota vegetal (BRITO, *et al*, 2014). Dessa forma, pode-se conceituar a fitoterapia como a sabedoria que irá envolver o uso de plantas medicinais, e as diversas formas farmacêuticas, como prática terapêutica, no intuito de tratar determinada patologia, possibilitando ao usuário e paciente ter disponível ao seu alcance esta como primeira escolha ou se decidir, somá-la ao método tradicional da medicina (KISHI, *et.al*, 2019).

O interesse é promover uma sociedade consciente com sua condição de saúde, e que consiga atuar fortemente na prevenção dos agravos, e na promoção da saúde com alternativas mais viáveis e menos nocivas como é o caso do exagero no uso dos medicamentos (BRITO, *et al*, 2014).

Existe uma crença popular que diz que “o que é natural não faz mal” baseada no consumo que a população faz das plantas medicinais e dos fitoterápicos. Isto se deve ao acesso facilitado e escassez de estudos científicos específicos sobre tais compostos. Porém, este conceito é falso, uma vez que, dados relacionados com a segurança, uso adequado, e a dosagem recomendada da grande maioria dos compostos listados hoje, ainda não está totalmente comprovada tecnicamente e reações adversas cutâneas, irritações e intoxicações podem ocorrer, *idem*, problemas hepáticos e cardíacos (LANINI, ALMEIDA, NAPO, CARLINI, 2009).

Definindo de forma simples e objetiva, a planta medicinal é aquela encontrada na natureza, estudada por cientistas, e que apresenta a capacidade de abrandar ou curar notável mal-estar. Isto irá ocorrer graças às principais propriedades farmacológicas encontradas que pode ser: antifúngica, anti-inflamatória, anti-helmíntica, antibacteriana, antimicrobiana,

antisséptica e antitumoral (NUNES-PINHEIRO, *et al*, 2003). Por sua vasta diversidade é possível prepará-las de diferentes formas como: infusões, chás, macerações, compressas, decocções, gargarejos, xaropes, pós, tinturas, extratos e utilizá-las via oral ou tópica (GARLET, 2019).

Para conceituar um fitoterápico é preciso compreender que ele só será denominado um, quando uma planta medicinal que será a base deste, for industrializada e se tornar um medicamento. Este processo é fundamental e importantíssimo no controle da propagação de substâncias estranhas e demais microrganismos que possam contaminar a formulação final de um medicamento. Esta metodologia irá conferir segurança ao paciente, pois a dose usualmente recomendada deverá estar descrita, e o fitoterápico registrado na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), critério para ser comercializado. Vale ressaltar que profissionais farmacêuticos que optarem por manipular em seus estabelecimentos fitoterápicos, necessitaram de autorização da Vigilância Sanitária, não carecendo do registro na Anvisa neste caso (ANVISA, 2020).

Braga e Silva (2021), em pesquisa realizada com 151 pessoas, demonstraram que o consumo de plantas medicinais é recorrente. Isto se deve ao fato de possíveis indicações médicas, de amigos, familiares e redes sociais. A média de uso declarada de chás e infusões foi de até 2 vezes na semana, sendo que as mais citadas dentre as 77 listadas foram: hortelã, camomila, gengibre, canela, alho, alecrim, hibiscos e boldo. Adicionalmente, estas eram adquiridas nos mais diversos locais como feiras, mercados, das plantações comunitárias e próprias. No caso dos fitoterápicos, ao compararmos com as plantas, a pesquisa revelou que o consumo da população estudada no que tange a ingestão de xaropes, extratos, cápsulas, florais, foi maior, cerca de 6 a 7 vezes na semana, quando a queixa principal exigiu uma indicação médica, se contraposto ao que familiares ou amigos apontassem. Evidenciou-se no estudo citado que a farmácia foi o estabelecimento dominante para a compra desses insumos.

No que se refere ao acesso à saúde e de condições financeiras que cada indivíduo dispõe para o consumo da fitoterapia, 80% da população do mundo ainda faz uso das práticas tradicionais ofertadas pela atenção primária. Portanto, a terapêutica acerca das plantas é predominante dos países em desenvolvimento, quando 67% das espécies vegetais são geradas nestes locais. Além disso, no mundo inteiro 85% da população faz uso desta terapia primária, com base nos ativos encontrados nos vegetais (RODRIGUES, SANTOS, AMARAL, 2006).

1.2.2 O Sistema Único de Saúde (SUS) e a fitoterapia

O uso de plantas medicinais e da fitoterapia deve ser utilizado com segurança, e para isso o conhecimento científico relacionado a estas, precisa ser notório. Desta forma, em 1978 a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu o uso de fitoterápicos com o efeito profilático, curativo e paliativo e passou a divulgar informações importantes relacionadas ao consumo e que contribuíram para o desenvolvimento da Assistência Farmacêutica na esfera sanitária (RODRIGUES, SANTOS, AMARAL, 2006).

O reconhecimento da OMS ocorreu na 1ª Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde, na capital do Cazaquistão, chamada Alma-Ata, no qual resultou em uma Declaração que apontou a saúde das pessoas a nível mundial como direito absoluto dentre as metas globais, além de objetivar a redução das desigualdades encontradas nos países em desenvolvimento e desenvolvidos nas áreas econômicas e sociais até o ano 2000 para que a saúde fosse possível para toda a população, sem distinção (MENDES, 2004).

Enquanto isso, a discussão aqui no Brasil, iniciou no ano de 1986, na marcante 8ª Conferência Nacional de Saúde, que representou um passo muito importante aos brasileiros, uma vez que suas discussões foram a base para institucionalizar o SUS pela Constituição Federal de 1988. Ainda nesta Conferência, a sugestão era a implantação de métodos de cura mais populares na assistência de saúde. Certos disso, em 1996, na 10ª Conferência Nacional de Saúde, com o SUS já criado, mais uma vez, foi preconizado pelos gestores e população a inserção da homeopatia e da fitoterapia no atendimento público, pois, esta inserção poderia reduzir o exagero da medicalização, o que era prioritário (BRUNING, MOSEGUI, VIANNA, 2012).

Perante o exposto, os esforços necessários para viabilizar formas de tratamento alternativas procederam a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) em 2006 (FIGUEREDO, GURGEL, JUNIOR, 2014). A finalidade foi juntar a força de órgãos governamentais e não governamentais com o intuito de consolidar a área nos seus diversos eixos como: evolução do desenvolvimento do setor de plantas medicinais e fitoterápicos, juntamente com o manejo adequado das técnicas de cultivo, cadeia produtiva e distribuição das mesmas em um processo que finalize no acesso adequado ao consumidor final. Todos estes aspectos e diretrizes foram pontuados e transformados no Decreto Presidencial nº 5.813, em 22 de junho de 2006 (RODRIGUES, SANTOS, AMARAL, 2006).

Já na sequência da consolidação da PNPMF e da promulgação do Decreto, surge uma nova frente neste âmbito que foi a criação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e

Fitoterápicos (PNPMF) acatado em 09 de dezembro de 2008 que posterior forma o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RODRIGUES, SIMONI, 2012). Tanto a PNPMF quanto o Programa dispõem da obrigação de fazer cumprir com os objetivos iniciais propostos que é garantir o acesso da população às práticas terapêuticas que abrangem as plantas medicinais e os fitoterápicos além do controle de toda a cadeia produtiva. Controlando todo este trabalho está o Comitê, representado pelo Governo e pela Sociedade Civil e que além de monitorá-los sinaliza a expansão de todas as atividades perante ao SUS (PROGRAMA, 2021).

Toda a história do Brasil fundamentada no uso dos fitoterápicos e das plantas medicinais, desde os primórdios, com a cultura e hábitos indígenas e também de todos os povos do mundo de épocas milenares, resultou na criação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC), através da portaria do Ministério da Saúde (MS) GM/MS nº 971 no ano de 2006, com a finalidade de implantar outras opções de práticas terapêuticas diversas, que incluiu além da fitoterapia, a medicina antroposófica, a homeopatia, a medicina tradicional chinesa, a acupuntura e o termalismo (FIGUEREDO, GURGEL, JUNIOR, 2014). As diretrizes contempladas na PNPIC acolhem o desejo da OMS de tornar estas práticas seguras, com a garantia de eficácia, excelência e desenvolvê-las cada dia mais com embasamento de equipes de gestão fundamentadas em normas nacionais e internacionais e de congressos de saúde (RODRIGUES, SIMONI, 2012).

A PNPIC agregou um valor incalculável para a oferta de tratamentos disponíveis no SUS, deixando evidente o quanto é uma política que necessita ser aceita em todos os municípios em prol dos habitantes locais. Porém, ainda há aí a dificuldade de implementação, uma vez que, recursos financeiros e profissionais não estão sendo disponibilizados de acordo e com a demanda necessária. Para frisar a magnitude da PNPIC, entre 2017 e 2018 novas opções de tratamento foram incluídas, como: ozonioterapia, musicoterapia, meditação, ayurveda, apiterapia, reiki, imposição das mãos, aromaterapia, yoga, shantala, dança, terapia de florais, quiropraxia, constelação familiar, dentre outros (SILVA, *et al*, 2019).

1.2.3 Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS)

Conhecer cientificamente as propriedades terapêuticas de uma planta medicinal é essencial para que um tratamento tenha o efeito desejado, sem reações adversas graves correspondentes. Avaliando isto, em 2009, surge a RENISUS, criada pelo MS (MUNIZ, 2012).

A RENISUS é um documento que contempla 84 espécies vegetais, destas 42 nativas do Brasil, 26 são consideradas exóticas, 13 são naturalizadas e 3 são cultivadas. Importante

esclarecer que, estas são algumas das plantas já utilizadas pela população, conforme parâmetro que municípios e estados possuem baseados nos serviços de saúde que oferecem e estimativas conhecidas. Desta forma o intuito é financiar novos estudos, quando, as informações preliminares que se dominam não são suficientes para indicar o uso despreocupado destas espécies vegetais, garantindo segurança e eficácia (SANTOS, CARVALHO, 2018).

Dados de 2011 apontam que o consumo de fitoterapia no Brasil foi de R\$1,1 bilhão, confirmando o interesse do consumidor nesta terapia alternativa na atenção primária em saúde, sendo que desde 2007 o SUS já oferece alguns medicamentos derivados de plantas medicinais. Para reiterar, o maior interesse é ofertar aos pacientes uma terapia de baixo custo, eficaz e que todo novo conhecimento gere novos produtos ao SUS (MARMITT, REMPEL, GOETTERT, SILVA, 2015).

Fazem parte da RENISUS, espécies vegetais como: *Allium sativum*, *Bidens Pilosa*, *Ananas comosus*, *Mentha spp*, *Rhamnus purshiana*, *Passiflora spp*, *Psidium guajava*, além da *Rhamnus purshiana*, destacada no item 79, conforme RENISUS (2014) dentre outros (Tabela 1) (SANTOS, CARVALHO, 2018).

Tabela 1 – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS	
Espécies vegetais	
1	<i>Achillea millefolium</i>
2	<i>Allium sativum</i>
3	<i>Aloe spp*</i> (<i>A. vera</i> ou <i>A. barbadensis</i>)
4	<i>Alpinia spp*</i> (<i>A. zerumbet</i> ou <i>A. speciosa</i>)
5	<i>Anacardium occidentale</i>
6	<i>Ananas comosus</i>
7	<i>Apuleia ferrea</i> = <i>Caesalpinia ferrea</i> *
8	<i>Arrabidaea chica</i>
9	<i>Artemisia absinthium</i>
10	<i>Baccharis trimera</i>
11	<i>Bauhinia spp*</i> (<i>B. affinis</i> , <i>B. forficata</i> ou <i>B. variegata</i>)
12	<i>Bidens pilosa</i>
13	<i>Calendula officinalis</i>
14	<i>Carapa guianensis</i>
15	<i>Casearia sylvestris</i>
16	<i>Chamomilla recutita</i> = <i>Matricaria chamomilla</i> = <i>Matricaria recutita</i>
17	<i>Chenopodium ambrosioides</i>
18	<i>Copaifera spp*</i>
19	<i>Cordia spp*</i> (<i>C. curassavica</i> ou <i>C. verbenacea</i>)*
20	<i>Costus spp*</i> (<i>C. scaber</i> ou <i>C. spicatus</i>)
21	<i>Croton spp</i> (<i>C. cajucara</i> ou <i>C. zehntneri</i>)
37	<i>Lippia sidoides</i>
38	<i>Malva sylvestris</i>
39	<i>Maytenus spp*</i> (<i>M. aquifolium</i> ou <i>M. ilicifolia</i>)
40	<i>Mentha pulegium</i>
41	<i>Mentha spp*</i> (<i>M. crisper</i> , <i>M. piperita</i> ou <i>M. villosa</i>)
42	<i>Mikania spp*</i> (<i>M. glomerata</i> ou <i>M. laevigata</i>)
43	<i>Momordica charantia</i>
44	<i>Morus sp*</i>
45	<i>Ocimum gratissimum</i>
46	<i>Orbignya speciosa</i>
47	<i>Passiflora spp*</i> (<i>P. alata</i> , <i>P. edulis</i> ou <i>P. incarnata</i>)
48	<i>Persea spp*</i> (<i>P. gratissima</i> ou <i>P. americana</i>)
49	<i>Petroselinum sativum</i>
50	<i>Phyllanthus spp*</i> (<i>P. amarus</i> , <i>P. niruri</i> , <i>P. tenellus</i> e <i>P. urinaria</i>)
51	<i>Plantago major</i>
52	<i>Plectranthus barbatus</i> = <i>Coleus barbatus</i>
53	<i>Polygonum spp*</i> (<i>P. acre</i> ou <i>P. hydropiperoides</i>)
54	<i>Portulaca pilosa</i>
55	<i>Psidium guajava</i>
56	<i>Punica granatum</i>
57	<i>Rhamnus purshiana</i>

1.2.4 Importância econômica relacionada ao uso das plantas medicinais

A indústria farmacêutica expandiu nacionalmente ao utilizar as espécies vegetais como insumos primários para a produção de seus medicamentos, apesar de muitas matérias-primas serem provenientes do exterior, por extrativismo. É fundamental mencionarmos que as espécies vegetais representam condição significativa e contribuinte para o desenvolvimento financeiro do país. O café, a soja e a cana-de-açúcar são exemplos concretos deste crescimento que ao longo dos anos se solidifica e traz novas oportunidades de emprego aos produtores locais, de vários estados (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

Dados do Ministério do Meio Ambiente, notificam que existe no Brasil, a maior biodiversidade do planeta e apesar disto apenas uma pequena parte das espécies vegetais é explorada cientificamente quanto as suas potencialidades terapêuticas, produção de corantes, extratos vegetais e inseticidas. O foco está na Amazônia, com cerca de 120 mil categorias catalogadas, duas mil são plantas medicinais, segundo a população, e apenas 10 % estão cientificamente estudadas quanto ao seu poder químico-farmacológico (BARRETO, MACIEL, GARCIA, 2020).

O entendimento que a população possui sobre os benefícios de utilizar as plantas medicinais está baseado nos conhecimentos populares, no saber indígena ou quilombola, e por publicações oficiais dos canais de saúde vinculados ao SUS, caracterizando cerca de 82% de brasileiros que usam esta alternativa no dia a dia. Com base neste levantamento a OMS, estima que 80% da população mundial faz uso de compostos naturais com o intuito de atender algumas urgências primárias relacionadas ao bem-estar (DRESH, LIBÓRIO, CZERMAINSKI, 2019).

No ano de 2019 o Brasil, foi o 7º colocado no ranking das 20 principais economias mundiais, na área do mercado farmacêutico, representando 2% do mercado global. Isso significa que, o mercado farmacêutico movimentou R\$ 69,04 bilhões de reais, ou US\$ 17,50 milhões de dólares, um aumento de 10,74% em reais em relação a 2018 (SINDUSFARMA, 2020). Já no ano de 2020, segundo a Sindusfarma (2021), o mercado brasileiro farmacêutico girou em torno de R\$ 76,98 bilhões de reais, ou US\$ 15,02 bilhões de dólares e seguiu sendo o 7º colocado em faturamento comparado com o ranking das outras 20 economias. Se correlacionarmos com a América Latina, o Brasil é o mercado predominante, pois na sequência está o México, Colômbia e Argentina (SINDUSFARMA, 2021).

Os números do ano de 1996 estimaram que dos US\$ 8 bilhões de reais faturados na indústria farmacêutica, 25% destes foram dos medicamentos originários das plantas medicinais,

apresentando aumento anual de 10% e alcançando o valor de US\$ 550 milhões no ano de 2001 (BRASIL, 2016). Já em 2015, a área farmacêutica estimou crescimento de 12%, resultado de R\$ 84,3 bilhões de reais faturados em vendas de medicamentos, US\$ 20 milhões de dólares foram apenas do mercado de fitoterápicos, que está ainda em ascensão, quando em 2015 cresceu 8% comparado ao ano anterior (FEBRAFAR, 2016).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2017, aproximadamente 3,9 milhões de propriedades rurais podiam ser classificadas como agricultura familiar no país, ou seja, cerca de R\$107 bilhões de reais são advindos desta forma de trabalho no Brasil (CONAB, 2021). Portanto, através das Políticas Públicas já existentes envolvendo o uso de plantas medicinais e a cadeia produtiva disponível nos estados brasileiros, conclui-se que por intermédio de órgãos governamentais e não governamentais é evidente o crescente desenvolvimento do setor (BORGES; SALES, 2018) e as vantagens em se cultivar espécies vegetais, principalmente as plantas medicinais visto sua enorme biodiversidade, terras e mão de obra disponíveis, conhecimento agrário reconhecido e experiência obtida pela prática (BRASIL, 2016).

1.2.5 Farmácia Viva

No ano de 1984, surge na Universidade Federal do Ceará, um projeto criado pelo professor Abreu de Matos, que tinha como propósito instruir a população local a utilizar as plantas medicinais de forma correta, associando o conhecimento popular com o cultivo adequado destas (BRASIL, 2019).

Esta proposta se tornou a Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010, que instituiu a Farmácia Viva no âmbito do SUS. Visando elucidar o correto cultivo, preparação e fornecimento das plantas medicinais, o exposto proporciona maior acesso da população à saúde, com opções diversas de tratamento, além de fomentar a preservação das espécies vegetais pela educação e conscientização dos usuários dos sistemas de saúde e atenção básica. Outra característica importante é que o projeto Farmácia Viva, agora portaria, estimula a questão econômica, quando famílias auxiliam no cultivo e manejo destas plantas (PRADE, 2019).

A configuração horto, ou seja, um modelo de horta comunitária inicia-se com o plantio das espécies e cultivo delas. Isto será importante para que se obtenha proveito ao formular-se algum medicamento (RUFINO, 2015). A intenção foi basear-se nos conhecimentos farmacológicos, botânicos e químicos que o professor Dr. Francisco José de Abreu Matos e sua equipe possuíam para avaliarem inicialmente o comportamento de espécies vegetais

padronizadas, como a ambientação das plantas nos locais de plantio e avaliá-las no sentido de fundamentar o efeito terapêutico inicialmente descrito (BIANCHI, 2012).

Logo após estas análises feitas e observadas, a distribuição destas plantas medicinais era feita às organizações e entidades públicas que quisessem participar do projeto incentivando a ampliação das Farmácias Vivas, também em outras comunidades, desde que, seguissem a padronização deste programa auxiliando na assistência farmacêutica, através das preparações farmacológicas que distinguem uma Farmácia Viva da outra, atendendo ao usuário com xaropes, pomadas ou cápsulas. Neste sentido, este projeto de medicina social consegue fortalecer a produção local, evitando o desperdício de plantas que não serão utilizadas, resultando no maior controle e qualidade das plantas que realmente são necessárias (RANDAL, BEHRENS, PEREIRA, 2016).

1.2.6 Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB)

Outra conquista importante foi a elaboração do primeiro FFFB, no ano de 2011. O objetivo da criação foi auxiliar as indústrias, através da padronização da fabricação de medicamentos fitoterápicos, de acordo com normas e processos exigidos por este guia, uma vez que, estão descritas neste documento 83 monografias que contemplam xaropes, pomadas e infusões (ANVISA, 2011). Já na segunda edição, de 11 de fevereiro de 2021, constam 85 monografias, com 85 espécies, e 236 formulações (ANVISA, 2021).

Com o apoio do MS, de universidades federais, estaduais, além da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), esta obra apresenta informações baseadas em conhecimento científico acerca das plantas mencionadas e recomendadas ao uso (ANVISA, 2011), uma vez que estão registradas as referências corretas para possíveis formulações, suas indicações e contraindicações (ANVISA, 2011).

1.2.7 Memento de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (MFFB)

Através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 60 de 10 de novembro de 2011, publicou-se o MFFB a fim de, esclarecer e orientar profissionais sobre a prescrição de plantas medicinais e fitoterápicos de forma apropriada. Neste documento constam dados relevantes, fundados na literatura científica e úteis na diferenciação de cada espécie, como: nomenclatura científica e popular, indicação de uso, efeitos adversos, contraindicações, possíveis interações

medicamentosas, além da parte que deve ser utilizada, formas farmacêuticas, vias de administração, prescrição, superdosagem, segurança e eficácia (SANTOS, REZENDE, 2019).

O MFFB, compilação de informações de acesso rápido, foi criado com o objetivo de amparar os serviços que ofertam a fitoterapia e auxiliar as Farmácias Vivas, espalhadas pelo país, de forma a elucidar eventuais dúvidas que ainda possam não estar sanadas com relação aos fitoterápicos e plantas medicinais no que se refere ao uso racional desta terapia (ANVISA, 2016).

1.2.8 Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)

Acompanhando o marco dos avanços na área da Assistência Farmacêutica está a RENAME, desenvolvida inicialmente como lista modelo de medicamentos pela OMS em 1978, passando a ser atualizada e revisada constantemente para maior promoção ao uso racional de medicamentos, graças a constituição da chamada Comissão Técnica e Multidisciplinar de atualização da RENAME (Comare), através do Ministério da Saúde, ainda sob responsabilidade do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos (DAF) (BRASIL, 2015).

Esta lista foi criada com o intuito de promover o uso racional de medicamentos, disponibilizando à população fármacos que possam atender as necessidades prioritárias para o tratamento em saúde, certificando-se da eficácia dos mesmos e assegurando o desenvolvimento da estratégia da política de medicamentos da OMS, que a RENAME faz parte e hoje revisada por incumbência da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde - CONITEC, criado pela Lei nº 12.401, de 28 de abril de 2011 (RENAME, 2021).

O acesso e o financiamento a estes medicamentos são de encargo de todos os entes (União, estados e municípios), obedecendo assim com a Resolução da Comissão Intergestores Tripartite (CIT) nº 1, de 17 de janeiro de 2012, que torna todo o processo transparente. Ainda, após a homologação do Decreto n 7.508, de 28 de junho de 2011, o MS comprometeu-se a atualizar a RENAME no período de cada 2 anos, publicando-o na sequência, assim como do Formulário Terapêutico Nacional (BRASIL, 2020).

Para melhor entendimento, a RENAME oferta medicamentos que são essenciais para o tratamento do agravo da população do país (JUNIOR, 2015). No exemplar de 2020, constam as seguintes seções: A, constituindo os medicamentos do componente básico, estratégico, especializado, além da relação nacional de insumos e de uso hospitalar. Já na seção B, estão listados os itens de acordo com o Sistema de Classificação Anatômica Terapêutica Química (ATC). Na sequência está a seção C com a listagem do componente de financiamento da

assistência farmacêutica, pelos códigos descritos em ATC. E por fim, está a seção D, com as modificações feitas em função da edição anterior. Importante salientar que, a Cáscara Sagrada faz parte da RENAME, na seção dos fitoterápicos (BRASIL, 2020).

1.3 DESCRIÇÃO DA FAMÍLIA RHAMNACEAE

A família Rhamnaceae é encontrada principalmente em regiões temperadas e subtropicais do hemisfério Norte, incluindo-se a ela 52 gêneros e mais de 900 espécies (ANVISA, 2014). No Brasil é pouco representada, ou seja, há apenas 14 gêneros e em torno de 50 espécies (SALES, 2013). A distribuição neste caso está nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (MOREIRA, 2012). O fato de serem encontradas em regiões diferentes confere hábitos dos mais variados à planta da família Rhamnaceae, desde ervas até árvores ou lianas, uma vez que, serão reconhecidas ao compartilharem de características florais como as sépalas com nervura mediana proeminente na face adaxial, as pétalas convolutas, cuculadas ou conchiformes e os estames opostos às pétalas (SOUSA, 2016).

As espécies irão apresentar folhas simples, de tamanho variável, pecioladas, alternando-se entre sobrepostas ou opostas. O bordo serrado ou inteiro, trinérveas ou peninérvias, glabras ou pilosas, podendo ter ou não estípulas, glândulas dispersas no limbo ou na extremidade de cada dente. Já as flores podem ser actimorfas, tetrâmeras ou pentâmeras e simétricas. O cálice será formado por sépalas coriáceas de perfloração valvar, a corola será por pétalas pequenas, côncavas ou culadas que poderão envolver os estames opostos ou de número igual. Quanto aos frutos, estes são pequenos e drupáceos e as sementes diminutas, brilhantes e lisas (MOREIRA, 2012).

Um dos fatores importantes desta família é o econômico que é aplicado em algumas espécies que possuem sementes ou frutos comestíveis. São elas: *Callisthene microphylla*, *Rhammus caroliniana*, *Zizyphus jujuba*, *Condalia hookeri*, *Zizyphus joazeiro* e *C. buxifolia*. Também, é possível fabricar corantes com as espécies *Rhamnus dahurica* e *Rhammus tinctoria*. Na lavagem de tecidos as responsáveis são *Reissekia smilacina*, *Zizyphus joazeiro*, *Discaria chacaye* e *Discaria trinervis*. O preparo de bebidas alcoólicas fermentadas é responsabilidade das espécies *Condalia buxifolia* e *Rhammus inebrians*, seguindo pela marcenaria está a *Colubrina grandulosa* e finalmente a alimentação de animais será devido a *Zizyphus joazeiro* (SALES, 2013).

Do ponto de vista fitoquímico, diversas classes de substâncias químicas são relatadas como presentes na família Rhamnaceae. É relatado na literatura: saponinas, flavonóides, e alcaloides ciclopeptídicos (SOUSA, 2016).

Alguns aspectos farmacológicos são citados por Moreira (2012), sendo que muitas espécies da família Rhamnaceae por possuírem características hipotensivas, digitalóides e diuréticas, são utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, no tratamento de asma, no combate à febre, além de, serem utilizadas como tônico, também apresentam atividade terapêutica na condição laxativa.

Para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, as espécies *Gouania ulmifolia*, *Reissekia smilacina*, *Scutia buxifolia*, *Discaria americana* apresentam poder medicinal eficaz, sendo empregadas inclusive para tratar de doenças infecciosas (SALES, 2013).

As atividades antimicobacteriana, antiplasmódica, seguindo por propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas, antilipidêmicas e antidiabéticas estão associadas ao gênero *Ziziphus* por exemplo, que se caracteriza como planta multiuso e que possui potencial etnofarmacológico (SOUSA, 2016).

1.3.1 Gênero *Rhamnus*

O gênero *Rhamnus*, é identificado em mais de 125 espécies, especialmente nas regiões do hemisfério Norte, principalmente as subtropicais e temperadas. Inicialmente nos anos de 1873-1974 ele fez parte dos únicos 3 gêneros reconhecidos na época pertencentes à família Rhamaceae. No Brasil, o gênero pode ser encontrado no Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Goiás, Bahia, São Paulo, Roraima, Distrito Federal (MOREIRA, 2012) e existem 6 espécies nativas (ANVISA, 2014).

Muito conhecidas e utilizadas no Brasil, estão as espécies *R. frangula* e *R. purshiana* que fazem parte do gênero *Rhamnus*. A importância química e farmacológica de ambas está associada às propriedades laxativas devido aos compostos presentes nestas plantas. São eles: antraquinonas livres (emodol, crisofanol), C-heterosídeos, sais minerais, O-heterosídeos (emodina-antrona), princípios amargos e taninos (MOREIRA, 2012).

Ainda, outras espécies deste mesmo gênero são identificadas na literatura. A planta *Rhamnus alaternus* possui a capacidade de induzir a apoptose em células cancerígenas, bem como atuar de forma antioxidante, laxativa, hipotensiva, antibacteriana, antigênica (AMMAR, 2011) isso, pois, presente em sua composição química estão as antraquinonas, taninos e emodina (LONGO; VASAPOLLO; RESCIO, 2005).

Quanto a espécie *R. lycioides*, seu principal mecanismo de ação é inibir a enzima conversora de angiotensina I – ECA, tornando a atividade hipotensora uma das mais fortes desta planta. Em sua composição química estão as catequinas, taninos, açúcares, flavonóides, esteróides, triterpenos e antraquinonas (TERENCIO, 1990; TERENCIO, 1991).

A espécie *R. nepalensis* pode ser utilizada para o tratamento de herpes e também como hipotensivo, uma vez que, sua composição química é formada por esteroides, isoflavona, triterpenos, antraquinonas, flavonoides e principalmente a emodina (MOREIRA, 2012).

A planta *R. alpinus* apresenta propriedades antitumoral, antioxidante, antifúngica e ação no sistema gastrointestinal. Sua composição é de antraquinona aloemodina, emodina, crisofanol, fisciona e reína (GENOVESE, *et al*, 2010). Na sequência encontramos a *Rhamnus* catártica, usada como purgativa, apesar de sua toxicidade (LICHTENSTEIGER, 1997).

Por fim, o vegetal *R. nakaharai* trata a constipação intestinal e asma, além de, possuir propriedades antitumoral, antioxidante anti-inflamatória e inibição da agregação plaquetária e a planta *Rhamnus formosana* que possui atividade anti-inflamatória (MOREIRA, 2012).

1.3.2 Espécie *Rhamnus purshiana*

Nos primórdios a planta *Rhamnus purshiana* (Figura 1) foi inicialmente utilizada pelos indígenas norte-americanos, porém, logo o consumo expandiu-se a nível mundial (LOBO, 2012). É uma espécie vegetal que se origina no noroeste do Pacífico dos Estados Unidos da América e no sudoeste do Canadá (ANVISA, 2014). O período de maior abundância desta é de maio até início de dezembro, quando suas folhas sem mucilagem, com seu formato ovalado e a presença de frutos pequenos permitem sua identificação (LOBO, 2012). Há relatos, de que na Europa também é possível encontrá-la (BARROS, 2017).

É conhecida na nomenclatura popular como cáscara sagrada, *cascara bulkthorn*, *bulkthorn*, *sacred bark*, *bitter bark*, *bearwood*, *cascara*, *chitem bark*. Esta espécie pode ser encontrada como um arbusto ou mesmo uma árvore pequena que irá medir de 4,5 a 10m, sendo suas flores de cor esverdeadas, suas folhas em formato elíptico com frutos negros e avermelhados (Figura 2). A casca do caule e dos ramos que é a parte utilizada da planta possui cor marrom-avermelhada (Figura 3) (ANVISA, 2014). Esta deve ser seca por pelo menos 1 ano antes de seu uso (ANVISA, 2016).

FIGURA 1 – Espécie *Rhamnus purshiana* em seu habitat natural



FONTE: ANVISA (2014).

FIGURA 2 – Folhas e frutos da *Rhamnus purshiana*



FONTE: NASCIMENTO (2020).

FIGURA 3 – Cascas da *Rhamnus purshiana*



FONTE: SANTOS (2019).

Caracterizada como planta medicinal, sua propriedade terapêutica vem da antiguidade, sendo empregada por mais de 2.000 anos, devido ao seu efeito laxativo. Os compostos desta planta atuam nos movimentos peristálticos do intestino, favorecendo a evacuação (LOBO, 2012).

A principal via de administração é a oral. A posologia indicada é de 20 a 30 mg de derivados hidroxiantracênicos expressos em cascarosídeos A, na forma de cápsulas. Pode ser ingerida à noite ou pela manhã e noite, caso o paciente opte por dividir a dose. Se for tintura (ANVISA, 2016), na dosagem de 25 a 50 gotas, uma vez ao dia (FLORIEN, 2016) e por decocção, em 150 ml de água usar 0,3 a 1g da casca da planta, tomando 1 xícara antes de dormir (GOUVEIA, SIMIONATO, 2018). Quanto ao tempo de utilização não é indicado que se ultrapasse duas semanas, uma vez relatado possibilidade de causar perdas graves de minerais, vitaminas e desequilíbrio eletrolítico (ANVISA, 2016).

Ou seja, os níveis de cloreto, sódio e potássio podem ficar anormais no organismo, resultado da eliminação desordenada dos fluidos corporais e até mesmo pela baixa ingestão de água. O cloreto (Cl⁻) possui funções importantes no organismo como regular o potássio, fundamental para a correta contração muscular, balancear o pH do sangue, além do fluxo de água dentro e fora das células. Em função deste desequilíbrio, o potássio provavelmente também estará alterado, consequência disto pode ocorrer a hiperclorêmia (níveis elevados de cloreto), podendo acentuar nos indivíduos casos de hipertensão, fraqueza, sede e irritação gastrointestinal. Contrário a isso, pode ocorrer também a hipoclorêmia, isto é, níveis baixos de cloreto, levando em determinados casos a acidose hiperclorêmica, devido à instabilidade de ácido-base (CARVALHO, WELTER, SOARES, WOLKMER, 2020).

Com relação ao sódio (Na), sua principal função ao organismo é favorecer a transmissão de impulsos nervosos e a contração muscular. Alterações deste eletrólito podem ocasionar hiponatremia, que é a perda excessiva de sódio, causa da retenção hídrica, ou a hipernatremia, que é o aumento da osmolaridade do plasma, causa de grande concentração sérica de sódio. Para este desequilíbrio um importante marcador é o estímulo da sede que irá sinalizar esta disfunção, apenas não sendo eficaz quando o reconhecimento de sede não acessar a água (NEGREIROS, 2013).

Já o potássio (K⁺), é um íon com funcionalidade importantíssima ao corpo humano quando executa a excitabilidade dos nervos e das células musculares, além dos cardiomiócitos (GOMES, PEREIRA, 2021). Então, sua baixa concentração irá causar a hipocalemia, ocorrendo devido a baixa suplementação através da dieta, ou por perdas na urina e com o aumento para o meio intracelular. Isto tudo causa fraqueza muscular, níveis de irritabilidade e, com menores

chances, paradas cardíacas. Por sua vez, níveis elevados de K⁺ caracterizam a chamada hipercalemia, que ocorre em situações como queimaduras graves, insuficiência renal, cetoacidose diabética, desidratação (LABINFORMA, 2015).

Em síntese, as antraquinonas presentes na cáscara sagrada possuem a facilidade de se acumularem no tecido renal, conseqüentemente, pacientes com insuficiência renal, não devem fazer uso de cáscara sagrada (ANVISA, 2014).

A cáscara sagrada faz parte da RENISUS e da RENAME (Figura 4), que foi criada pelo MS, com o objetivo de atender a população prioritária através do acesso de medicamentos necessários aos tratamentos em saúde (BORGES; SALES, 2018).

FIGURA 4 – Lista da RENAME

Denominação genérica	Concentração/Composição	Forma farmacêutica	Código ATC	Componente
aroeira (<i>Schinus terebinthifolia raddi</i>)	1,932 mg de ácido gálico (dose diária)	gel vaginal	NC	Básico
	1,932 mg de ácido gálico (dose diária)	óvulo vaginal	NC	Básico
babosa (<i>Aloe vera</i> (L.) Burm. f.)	10%-70% gel fresco	creme	HD02WA 5001*	Básico
	10%-70% gel fresco	gel	HD02WA 5001*	Básico
cáscara-sagrada (<i>Rhamnus purshiana</i> DC.)	20 a 30 mg de derivados hidroxiantracênicos expressos em cascarosídeo A (dose diária)	cápsula	HA06AB 5014*	Básico
	20 a 30 mg de derivados hidroxiantracênicos expressos em cascarosídeo A (dose diária)	tintura	HA06AB 5014*	Básico

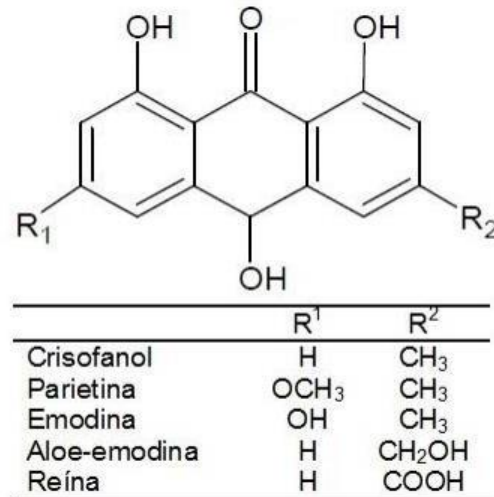
FONTE: BRASIL (2022).

1.3.3 Composição química da *Rhamnus purshiana*

A planta *Rhamnus purshiana* é composta predominantemente por antraquinonas livres e glicosiladas, assim como substâncias fenólicas e ácidos graxos de cadeia longa (NASCIMENTO, 2020). As antraquinonas possuem um núcleo chamado antraceno, formadas por três anéis benzênicos conjugados, sendo que em cada anel central é possível encontrar um grupo carbonila (carbono + dupla ligação + oxigênio), formando assim a quinona (Figura 5). Nas plantas, as antraquinonas são representadas por glicosídeos e no caso da cáscara sagrada, são chamados de cascarosídeos (SAAD, LÉDA, SÁ, SEIXLACK, 2016). Existem ainda, outros

compostos derivados da antraquinona como: aloe-emodina, flavonoides, taninos, crisofanol, emodina e naftalidas (BARROS, 2017).

FIGURA 5 – Estrutura química da Antraquinona e seus compostos derivados

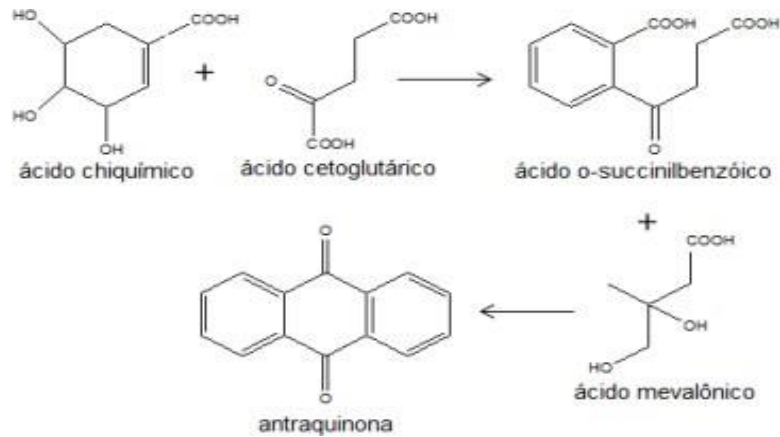


FONTE: SILVA (2019).

Outra característica importante das antraquinonas é que elas se apresentam na forma cristalina, nas cores vermelha, laranja e amarela. A maioria está presente nas espécies vegetais, sendo possível também encontrá-las em certos tipos de fungos como *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Quanto a sua formação, ocorre quando o ácido chiquímico reage com o ácido α -cetoglútarico formando o ácido *o*-succinilbenzoico, que ao entrar em contato com o ácido mevalônico forma a antraquinona (Figura 6) (SILVA, 2019).

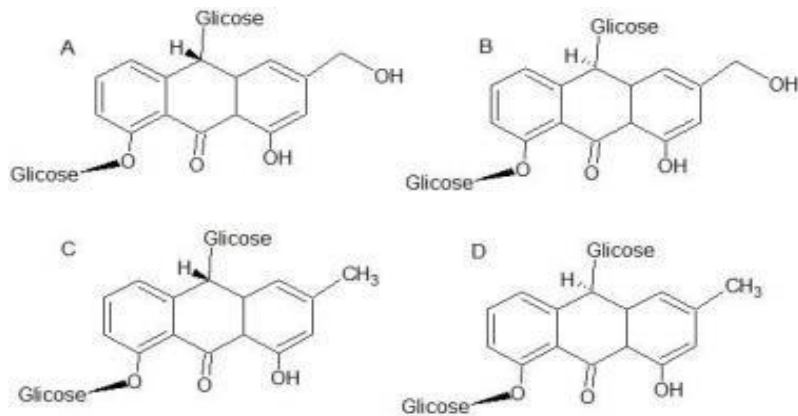
O efeito laxativo da cáscara sagrada deve-se à presença dos cascarosídeos A, B, C e D (Figura 7), que são os constituintes ativos majoritários e derivados da barbaloína e da crisaloína, que estão na forma de C-heterosídeos. Estes apresentam atividade farmacológica maior, sendo ela, purgativa enérgica (SILVA, *et al*, 2014). Isso se deve ao fato da ligação da molécula de glicose à antrona central, pelo átomo de carbono e uma segunda glicose ligada por oxigênio tanto no C-heterosídeos (SAAD, LÉDA, SÁ, SEIXLACK, 2016).

FIGURA 6 – Formação da Antraquinona



FONTE: SILVA (2019)

FIGURA 7 – Cascarosídeos A, B, C, D



FONTE: BARROS (2017).

Os glicosídeos antraquinônicos são pró-fármacos, ou seja, precisam ser hidrolisados no intestino, pelas bactérias lá existentes, para se transformarem em metabólitos farmacologicamente ativos que possuem a capacidade de acelerar o trânsito intestinal (GALLO, et.al, 2010), promovendo o efeito laxativo, assim que um dos açúcares da antraquinona ficar livre após a transformação da glicose no cólon pelas bactérias. É na casca que se encontram os compostos antraquinônicos sendo que, cerca de, 80% são os C-heterosídeos das antrons (BARROS, 2017).

Cabe salientar que a terapia medicamentosa a ser empregada para atuar na função intestinal, diretamente na quantidade, forma e consistência das fezes é classificada como laxante, e são compostos mais brandos, suaves, com início de ação entre 6 horas até 3 dias, como exemplo, podemos citar aqui a Cáscara Sagrada. Já os denominados purgantes irão agir de forma rápida, ou seja, em até 3 horas (JÚNIOR, 2003).

1.3.4 Ações farmacológicas da *Rhamnus purshiana*

A constipação intestinal é caracterizada pela dificuldade de defecação, quando ocorre uma redução no número de evacuações ou de forma incompleta, com fezes endurecidas e em volume menor, além da sensação de desconforto abdominal, necessitando muitas vezes de formas que auxiliem o bolo fecal ser eliminado. Pessoas acometidas por estes sintomas ainda relatam náuseas, vômitos e hiporexia (falta de apetite) (BRASIL, 2009).

A principal causa do chamado “intestino preso” está relacionada com a dificuldade em expulsão do bolo fecal ao seu destino que é no reto e canal anal. E em 85% dos casos está associada a má alimentação, como déficit de fibras alimentares e baixa ingestão de água. Neste caso a constipação é caracterizada como primária. Outros fatores ainda podem prejudicar a prisão de ventre, como a falta de exercício físico, depressão, sedentarismo adiar a ida ao banheiro além de possíveis efeitos adversos a determinados medicamentos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE COLOPROCTOLOGIA, 2009).

A população mais atingida envolve crianças, mulheres em idade reprodutiva e idosos. Estes buscarão por auxílio médico, caso os sintomas não se resolvam por si só. Nestes casos, o tratamento para constipação intestinal será através de agentes farmacológicos, com o uso de laxantes, ou então, na mudança de hábitos alimentares, sendo alcançados com terapias não farmacológicas. Ela inclui novos hábitos alimentares, maior consumo de fibras e de líquidos e a prática de exercícios físicos (PINHEIRO, *et al*, 2018).

Porém, a constipação intestinal pode em determinados casos estar associada com doenças mais graves, sendo importante analisar caso a caso, quando houver dor, perda de peso, sangramento, anemia e falta de apetite (SOCIEDADE BRASILEIRA DE COLOPROCTOLOGIA, 2009).

A motilidade do cólon funciona pelo processo de peristaltismo que é a movimentação da musculatura do intestino com a finalidade de impelir o bolo fecal até o reto. Esta ação fisiológica é involuntária e ocorre, pois, o lúmen será distendido pelas fezes. A movimentação do cólon pode ser por mistura, quando há a absorção de eletrólitos e água, ou propulsiva, com

a finalidade de condução das fezes do intestino até o sigmoide, local de depósito antes mesmo de serem evacuadas. Este último espasmo, o de propulsão, é um sinalizador para o desejo de evacuar e isto ocorre na frequência de até duas vezes ao dia. É adequado mencionar que esta frequência não é indicativa de condição desejada normal do intestino, uma vez que isto se altera de indivíduo para indivíduo (BRASIL, 2009).

A quantidade de evacuações normais para uma pessoa se altera, podendo ser de uma a duas vezes ao dia, ou três vezes na semana, quando sinaliza um possível risco constipação. É neste momento que uma intervenção medicamentosa pode ser incluída na rotina deste paciente, caso a opção dietética não surtir efeito (SANTOS, 2021).

Recomenda-se o uso da cáscara sagrada para casos de prisão de ventre, pois a atividade farmacológica exercida por esta espécie vegetal é mantida após o uso contínuo (SILVA, *et al*, 2014). São os compostos majoritários denominados antracênicos, que promovem o efeito laxativo da *R. purshiana*, o que ocorre por três motivos. O primeiro mecanismo é o fato de ocorrer uma mudança na mobilidade do colón, acelerando o intestino e assim, causando alteração na absorção e secreção de água intestinal devido ao acúmulo de fluido no mesmo (ANVISA, 2014).

Seguindo, há uma redução na produção de adenosina trifosfato (ATP), pois acontece o desacoplamento mitocondrial, caracterizando-se este o segundo mecanismo. E por fim, o terceiro, quando ocorre uma baixa no gradiente de íons, causada pela inibição da bomba sódio-potássio ($Na^+ / K^+ + ATPase$) e a pouca concentração de ATP. Isso irá dificultar a absorção de água e sódio do lúmen para o sangue, o que poderá provocar o aumento da eliminação de água e eletrólitos no lúmen intestinal, uma vez que as células do epitélio ali localizadas foram influenciadas (PINHEIRO, *et al*, 2018).

Os efeitos pós-administração orais das formulações que contenham o fitoterápico em estudo, acontecem entre 6 e 8 horas de seu uso (SANTOS, 2019). Além da propriedade laxativa, outros efeitos secundários podem surgir, já a partir da segunda administração de cáscara sagrada, como: diarreias severas, náuseas, cólicas abdominais e o mais frequente e intenso é a dor de estômago (PINHEIRO, *et al*, 2018). Podem surgir, inclusive, acidose metabólica, perda de peso, hematúria, albuminúria e comprometer a absorção de nutrientes (ANVISA 2016). Por estes fatores, o indicado é usar a cáscara sagrada somente esporadicamente, auxiliando nos casos de constipação intestinal (ANVISA, 2018).

1.3.5 Contraindicações de uso da *Rhamnus purshiana*

É contraindicado usar a cáscara sagrada em casos de doenças inflamatórias intestinais agudas, íleo paralítico, cólon irritável, apendicite, nefrites, constipação crônica, diverticulite e transtornos hidroeletrólíticos, motivo pelo qual as antraquinonas podem reduzir os mecanismos de defesa do epitélio do cólon. Aos portadores de insuficiência hepática e cardíaca também não são aconselhados a fazerem uso (ANVISA, 2018).

Uma consequência ruim para os pacientes portadores de doenças cardiovasculares, quando se faz uso ampliado do laxante em questão, é o aumento das arritmias e potencialização de efeitos tóxicos dos digitálicos. Isso ocorre em função da perda de potássio, mais um efeito negativo que a cáscara sagrada provoca. Em resumo, não é possível associar esta classe de medicamento ao fitoterápico *Rhamnus purshiana*. Outro exemplo, alguns anti-inflamatórios não esteroidais – AINEs e a indometacina, possivelmente terão o efeito desejado diminuído, isso, pois, associá-los com a cáscara sagrada, leva a inibição da prostaglandina E2 (ANVISA, 2018).

Às grávidas e lactantes também não se recomenda o uso, uma vez que a cáscara sagrada pode causar o aborto e comprometer o bebê com diarreia, uma vez que os compostos deste fitoterápico passam da mãe para a criança através da amamentação. Ainda, é contraindicado nos períodos menstruais, em episódios de inflamação intestinal, nas cistites e para crianças menores de seis anos (FLORIEN, 2016).

Outra curiosidade, é que ao ser eliminada pela urina, a cáscara sagrada pode apresentar coloração alaranjada, fator este de preocupação ao indivíduo, justamente por não ser algo comum e rotineiro, mas, clinicamente não é pertinente, apenas nos casos de exames de urina, quando podem acusar falso positivo (SANTOS, 2019).

Este fitoterápico é vendido nos estabelecimentos comerciais sem receita médica, na grande maioria dos casos, e isto favorece a automedicação e todos os problemas associados com esta prática. Isto requer atenção, ainda mais quando a cáscara sagrada é utilizada com a finalidade emagrecedora, mesmo sem evidências científicas (LOBO, 2012).

1.3.6 Atividade antimicrobiana da *Rhamnus purshiana*

Preocupação global de pesquisadores e profissionais de saúde, a resistência microbiana envolvendo o uso de medicamentos continua associada com elevados casos de mortes ocasionados por doenças infecciosas que não foram tratadas a tempo (AMPARO, et.al 2017).

Bactérias e fungos são os microrganismos causadores de infecções que acometem a população brasileira e mundial. Dada à enfermidade é preciso combatê-la com o auxílio de

antibiótico que será o responsável em garantir a cura dos indivíduos, cessando a ação dos patógenos, atuando como composto inibidor (REMPEL, *et al*, 2019).

Apesar do avanço da indústria farmacêutica em pesquisas complexas envolvendo a criação de novos antimicrobianos com a finalidade de combater tais bactérias multirresistentes, o novo desafio são as bactérias pan-resistentes, o que exige fármacos mais potentes, uma vez que estas não respondem a nenhuma classe medicamentosa existente. Neste sentido, as plantas medicinais podem ser uma alternativa, para novos estudos envolvendo o conhecimento científico dos seus metabólitos e se comprovada eficácia, podem ser úteis para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos (SILVA, NOGUEIRA, 2020).

Países como México, Brasil, Índia e Cuba já relataram propriedades antimicrobianas em substâncias presentes nos óleos essenciais e nos extratos de algumas plantas nativas devido ao metabolismo secundário delas. Estas confirmações tendem a se multiplicar a partir do momento em que a seleção e escolha das plantas ocorra em paralelo com estudos aprofundados de seus componentes majoritários. Mas na prática, ainda não existem análises experimentais com riqueza de detalhes que possam confirmar o potencial antimicrobiano de muitas plantas medicinais (DUARTE, 2006).

1.3.7 Toxicidade da *Rhamnus purshiana*

A Organização Mundial da Saúde (OMS) confirma que, apesar de a medicina moderna hoje, estar avançada, ainda grande parte da população faz uso de plantas medicinais associadas aos cuidados pessoais em saúde. O fato é que, estas mesmas produzem metabólitos que irão atuar farmacologicamente tanto quanto na forma tóxica. A interação que irá ocorrer no sistema biológico dos indivíduos, devido ao uso de uma ou mais substâncias químicas, é denominada intoxicação. Desta forma, a gravidade será resultado do tempo de exposição, quantidade administrada, via de administração e interação com outras possíveis substâncias (PINHEIRO, *et al*, 2020).

Assim sendo, as plantas produzem metabólitos secundários que ao entrarem em contato com humanos ou animais, nas formas inaladas, ingeridas ou através do contato poderão causar alterações leves ou mais graves, levando ao óbito, em consequência do modo de preparo da mesma, da parte da planta que foi utilizada e da quantidade, na sua dose letal DL 50. Considerando estes fatores, é importantíssimo o conhecimento relacionado ao potencial tóxico das espécies, tanto para prevenção de acidentes, quanto para o desenvolvimento de novos fármacos (CAMPOS, *et.al*, 2016).

Mello, *et al* (2009) investigou a formulação fitoterápica Lipotrom® que contém *Quassia amara* (quina), *Aloe ferox* (aloé), *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada), *Gentiana lutea* (genciana), *Cynara scolymus* (alcachofra), *Valeriana officinalis* (valeriana), *Paumus boldus* (boldo) e *Solanum paniculatum* (jurubeba), na qual, seu uso é indicado para distúrbios digestivos ocasionados por doenças do fígado, casos de insuficiência hepática, atuando como colagoga e laxativo.

O objetivo da análise foi investigar possíveis efeitos tóxicos em ratos Wistar (por 44 dias, representando à gestação e amamentação), coelhos Nova Zelândia (fêmeas e machos) e ratos Wistar, por 30 dias. O resultado não apresentou quaisquer alterações sejam elas comportamentais, de ritmo e frequência respiratória e de deambulação. Quanto à gestação e à prole, não foi relatada nenhuma interferência. Em relação aos coelhos e ratos o resultado foi o mesmo, nenhuma modificação ou variante. Importante, o consumo de água e ração permaneceu inalterado. Em síntese, a formulação foi considerada não tóxica (ANVISA, 2014).

Rempel, *et al* (2018) menciona que, derivados antracênicos que estão presentes nas drogas laxantes, podem apresentar efeitos tóxicos e adversos quando utilizados por um tempo prolongado. As alterações serão no cólon e reto tais como, fissuras anais, hemorroidas e prolapsos, e quando mais severas, irão necessitar de intervenção cirúrgica.

Certos disto, profissionais de saúde devem estar atentos a possíveis problemas de saúde ocasionados pelo uso abusivo deste composto (LOBO, 2012). Nisto podem surgir espasmos, atonia, intestino lento e o mais grave que é o risco de desenvolvimento de câncer intestinal (ANVISA, 2018).

Relatos escassos que existem estão relacionados com a presença da emodina e aloína (ANVISA, 2014), que por serem glicosídeos antracênicos metabolizados no intestino, o uso prolongado pode ocasionar câncer no colorretal (MARANHÃO, 2010).

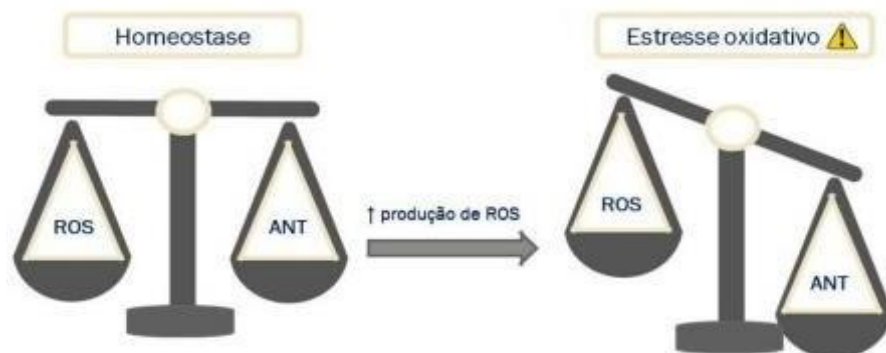
Quanto a *Rhamnus purshiana* existe carência nos estudos de toxicidade pré-clínica dos seus cascarosídeos. Apenas casos de hepatotoxicidade e danos hepatocelulares, devido ao surgimento de icterícia em pacientes após 45 dias de interrupção de uso foram mencionados (ANVISA, 2014).

1.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS PLANTAS

As espécies reativas de oxigênio (ROS) abrangem um grupo de moléculas que são formadas por reações de oxidação-redução (redox) ou por excitação eletrônica em condições

fisiológicas e patológicas a partir do processo de respiração celular. Elas podem ser classificadas em radicais livres, quando possuem pelo menos um elétron livre e espécies não radicais. Radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil ($\bullet OH$), radical peroxil ($ROO\bullet$) e alcoxil ($RO\bullet$) são exemplos de radicais livres. Por sua vez, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxidos orgânicos ($ROOH$), oxigênio molecular singlete (1O_2) e ozônio (O_3) exemplificam algumas das espécies reativas não- radicais (SIES; JONES, 2020). As ROS são produzidas de forma endógena por mais de 50 enzimas distintas (SIES; JONES, 2020). Em concentrações fisiológicas atuam na sinalização e regulação celular em resposta a tensões ou perturbações externas (SIES; JONES, 2020). Estão envolvidas em diversas funções celulares, como a regulação da migração celular e dos ritmos circadianos, sinalização para a proliferação de células-tronco, neurogênese, dentre outras. Sendo, portanto, essenciais pra a manutenção da homeostase (Figura 8) (DICKINSON; CHANG, 2011; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Figura 8- Homeostase redox e estresse oxidativo



FONTE: Maria Isabel da Costa Araldi (2022)

Além de fontes intracelulares, as ROS são geradas como consequência da exposição ambiental cumulativa, o que inclui determinados tipos de alimentos, drogas, agentes tóxicos e

Compostos fenólicos são caracterizados por terem em seu grupo os chamados ácidos fenólicos, que possuem um anel benzênico, grupamento hidroxila, carboxílico e metoxila na estrutura. As propriedades conferidas a eles são de antioxidantes, na qual são encontradas em nosso organismo, assim como em alimentos atuando em benefício de doenças como as cardiovasculares e também no tratamento e prevenção de câncer (SOARES, 2002). A síntese destes compostos é feita principalmente por duas rotas metabólicas, a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os antioxidantes são capazes de impedir e adiar a oxidação dos lípidios e de outras moléculas, conseqüentemente as reações em cadeia não serão propagadas. Isto é possível, uma vez que, a propriedade de óxido-redução faz parte dos compostos fenólicos e isto será importante para a neutralização e absorção dos radicais livres. Ocorre então que, o oxigênio siglete e triplete será quelado e os peróxidos decompostos. Doenças como, diabetes, malária, aterosclerose, artrite, câncer, doenças cardiovasculares, podem estar interligadas com a presença de radicais livres, ou com formas de oxigênio muito reativas. Neste caso, dietas à base de antioxidantes estão sendo um excelente auxílio no combate aos processos oxidativos que ocorrem de forma natural no organismo (DEGÁSPARI, WASZCYNKYJ, 2004).

A oxidação pode acontecer de forma endógena que tem início nos processos normais e biológicos do organismo, como na redução de tióis e flavinas, peroxidases, cicloxigenases, presença de metais de transição e no transporte dos elétrons. Já na forma exógena, a produção de radicais livres é resultado da poluição do ar, uso de pesticidas, anestésicos, tabaco (SOARES, 2002). Quanto às plantas, os compostos fenólicos que encontramos são os seguintes: cumarinas, flavonóides, taninos hidrolisáveis e condensados, ligninas e lignanas, fenóis simples e estilbenos (SOUSA, *et al*, 2007).

As espécies vegetais ainda produzem aquilo que chamamos de metabólitos, que são elementos orgânicos classificados em primários e secundários. Os metabólitos primários possuem a capacidade de acumular energia, além de função estrutural e plástica (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010). Realiza a síntese das proteínas, lipídeos, açúcares, celulose e ligninana (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Por sua vez, os metabólitos secundários além de apresentarem função ecológica, apresentam envolvimento na área da farmacologia, devido ao potencial biológico e efeito medicinal agregado, com o uso de antimicrobianos, antidepressivos, anestésicos, sedativos. Nas plantas estão os terpenos, alcaloides e compostos fenólicos (VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010).

SOUSA *et al* (2007) menciona alguns exemplos de plantas medicinais que possuem propriedades antioxidantes. A *Cenostigma macrophyllum*, conhecida popularmente como canela de velho ou caneleiro, apresentou em estudo químico-farmacológico a presença de triterpenóides pentacíclicos e bisflavonas e sua indicação terapêutica comprovada como antiulcerogênica, antibacteriana e anti-inflamatória. A *Terminalia brasiliensis* ou cerne-amarelo, capitão-do-campo, mussambé é utilizada para casos de “barriga inchada” ou “disenteria”. O estudo aqui evidenciou a presença de taninos gálicos e triterpenóides pentacíclicos.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar de a *Rhamnus purshiana* fazer parte da RENISUS, até o momento não foram detalhados estudos efetivos complementares relacionados a atividade fitoquímica, antioxidante e antimicrobiana. Apenas sua composição química, efeitos farmacológicos e efeitos adversos foram descritos. Desta forma, estudos mais qualificados são necessários para justificar e garantir segurança aos usuários que fizerem uso desta planta. A fim de complementar, os ensaios *in vitro* propostos são um ótimo método para esclarecer o consumo pelo ser humano.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e caracterizar quimicamente compostos bioativos presentes no extrato da casca da *Rhamnus purshiana* em modelo *in vitro* e analisar os metabólitos majoritários descritos na literatura *in silico*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os metabólitos majoritários de forma *in silico* através dos softwares *Molinspiration*, *ProTox II* e *AdmetSAR*;
- Quantificar o painel fitoquímico através do doseamento de polifenóis e flavonóides por análises espectrofotométricas;
- Avaliar a atividade antioxidante através da técnica de captura do radical DPPH;
- Avaliar o painel microbiológico através do ensaio de disco difusão e concentração inibitória mínima.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO VEGETAL

O extrato bruto (EB), na forma de pó, da planta *Rhamnus purshiana*, foi obtido através da empresa Pharma e Cia (30.017264389669357, 51.19792601777418), localizada no município de Porto Alegre no estado do Rio Grande do Sul. Este pó foi identificado pela Prof^a Dra. Liliane de Freitas Bauermann (docente da UFSM), sendo devidamente acondicionado e armazenado para análises posteriores.

4.2 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS MAJORITÁRIOS

4.2.1 Determinação *In silico*

Estão disponíveis diferentes plataformas e softwares computacionais para *análise in silico*, sendo que as moléculas da *Rhamnus purshiana* analisadas foram: cascarosídeos, aloínas, aloe-emodina, frangulina, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido málico.

Para a predição das propriedades moleculares e bioativas foi utilizado o software *Molinspiration*. Fundado em 1986 na Eslováquia, pela Universidade de Bretislava, ao qual possibilita compreender a capacidade de biodisponibilidade pela via oral do ativo em questão, a cáscara sagrada. Já para a previsão de níveis toxicológicos, utilizou-se o servidor web *ProTox II*, que se baseia em 33 modelos de prováveis desfechos nas áreas de toxicidade aguda, citotoxicidade, mutagenicidade, imunotoxicidade, hepatotoxicidade e carcinogenicidade (SCANDELAI, 2021).

Para a análise das propriedades farmacocinéticas foi utilizado o programa *admetSAR*, que irá prever informações relacionadas a absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade do fármaco, uma vez que, poderá indicar o potencial de o medicamento chegar ao órgão-alvo desempenhando seu efeito terapêutico usual. Este software é mantido pela Universidade de Ciência e Tecnologia da China Oriental (DIAS, 2018).

4.3 DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

4.3.1 Determinação do teor de Polifenóis Totais

O método colorimétrico seguido, com modificações, objetivou avaliar o conteúdo de polifenóis totais, baseado na metodologia empregada por Folin-Ciocalteu (CHANDRA; MEJIA, 2004). Pesou-se 0,025g de extrato de *R. purshiana*, que transferidos para um balão volumétrico de 25 mL foram solubilizados em água. Transferiu-se do balão uma alíquota de 100 µL, 500 µL e 1000 µL e adicionou-se 1 ml do reativo Folin-Ciocalteu, sendo que em seguida a solução foi deixada no escuro por cinco minutos. Após este período foi acrescido aos tubos, 2 ml de carbonato de sódio a 20% (Na₂CO₃) e uma nova incubação no escuro foi realizada, desta vez por 10 minutos. O branco foi preparado utilizando o processo descrito anteriormente, porém, não foi utilizada amostra do extrato, apenas a água e os reagentes. Ao final, realizou-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro e o comprimento de onda utilizado foi de 730 nm. As amostras e seus pontos na curva foram analisados em triplicata e a concentração da amostra de *Rhamnus purshiana* foi de 0,1%.

A Tabela 2 demonstra os volumes pipetados e utilizados para a análise do teor de polifenóis totais.

Tabela 2 – Volumes pipetados para a análise do teor de polifenóis totais

Tubo	Amostra da <i>Rhamnus purshiana</i>	H₂O	FOLIN	Na₂CO₃
1	Branco	1000 µL	1 ml	2 ml
2	Branco	1000 µL	1 ml	2 ml
3	100 µL	900 µL	1 ml	2 ml
4	500 µL	500 µL	1 ml	2 ml
5	1000 µL	-	1 ml	2 ml

FONTE: Autora (2022).

O ácido gálico é utilizado como substância de referência para fazer a curva de calibração, de acordo com Chandra & De Mejia (2004), nas concentrações de 15; 22,5; 27,5; 32,5; 37,5 e 45 µg/mL. Desta forma foi construída uma curva de calibração, obtendo-se uma equação da reta e a partir desta foi possível calcular o teor de polifenóis totais presentes na amostra de *Rhamnus purshiana*.

4.3.2 Determinação de Flavonóides

O teor de flavonóides determinou-se pelo método descrito por Rio (1996). A solução de Cloreto de Alumínio (AlCl₃) 5% foi utilizada e a leitura feita em espectrofotômetro a 425 nm. Preparou-se o pó do extrato de *Rhamnus purshiana* na concentração de 0,4% em metanol.

Pesou-se 0,1g de extrato de *R. purshiana*, que transferidos para um balão volumétrico de 25 mL foram solubilizados em metanol 70%. Transferiu-se do balão uma alíquota de 100 µL, 500 µL e 1000 µL e adicionou-se novamente o metanol acima mencionado. Na sequência, acrescentou-se 75 µL de AlCl₃ e 4 ml de metanol 70%. Ao final, as alíquotas foram incubadas por 10 minutos e a leitura das absorbâncias realizadas. O ensaio e seus pontos na curva foram analisados em triplicata e o cálculo do teor de flavonóides realizado através de uma curva de calibração, ou seja, através da equação da reta, utilizando quercetina como padrão nas concentrações de 10; 20; 30; 40; 50 e 60 µg/mL.

A Tabela 3 demonstra os volumes pipetados e utilizados para a análise do teor de flavonóides totais.

Tabela 3 – Volumes pipetados para a análise do teor de flavonóides totais

Tubo	Amostra da <i>Rhamnus purshiana</i>	Metanol 70%	ALCL3 5%	Metanol 70%
1	Branco	1000 µL	75 µL	4 ml
2	Branco	1000 µL	75 µL	4 ml
3	100 µL	900 µL	75 µL	4 ml
4	500 µL	500 µL	75 µL	4 ml
5	1000 µL	-	75 µL	4 ml

FONTE: Autora (2022).

4.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

4.4.1 Método radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

O extrato da *Rhamnus purshiana* foi analisado utilizando o método foto-colorimétrico do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), com modificações (CHOI et al., 2002). Este método tem por fundamento a transferência de elétrons pelo sequestro de radicais livres e leva ácido ascórbico como substância padrão, por possuir atividade antioxidante comprovada.

O elétron livre na molécula de DPPH está representado pela cor púrpura com absorção em metanol ou etanol a 515-520 nm e ao ser reduzido em difenil-picril-hidrazina, transforma-se na cor amarela. Como consequência, a reação pode ser controlada pelo decréscimo da absorbância em espectrofotômetro.

Para o preparo da amostra pesou-se 15g de extrato de *Rhamnus purshiana* e dilui-se em 90 ml de H₂O. Em seguida, deixou-se em repouso por 30 minutos. Já para a solução DPPH, foi necessário pesar 0,00400g de DPPH, homogeneizar em metanol, transferindo na sequência para um balão volumétrico de 100 ml até completar. Deixou-se em repouso por 30 minutos.

Continuando, a solução controle foi realizada com 500 uL de metanol mais 2.500 uL de DPPH. Já para as amostras, foram utilizados 6 tubos e para prepará-los foi adicionado 500 uL da solução mais 500 uL de metanol. Em seguida, pipetou-se 500 uL do primeiro tubo (transferiu-se para o segundo), adicionou-se 500 uL de DPPH e repetiu-se este passo até o último tubo. Então foi adicionado em todos eles 2.500 de DPPH, homogeneizou-se todos, e por 30 minutos, no escuro, os tubos ficaram em repouso. O branco do aparelho foi o próprio metanol.

Após, procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 517nm. Para determinar o potencial em eliminar o radical DPPH (% atividade antioxidante) utilizou-se o cálculo abaixo:

Atividade Antioxidante (%): $(Ac - Aam / Ac) \times 100$

Em que:

Ac = absorbância da solução de DPPH sem a amostra.

Aam = absorbância da amostra com o DPPH.

Após a leitura, construiu-se a curva padrão de DPPH plotando-se o valor médio das absorbâncias obtidas do extrato bruto de *Rhamnus purshiana* versus a concentração do padrão, possibilitando a análise da capacidade antioxidante do extrato bruto de Cáscara Sagrada quando a curva padrão e do próprio extrato atingirem 50% de atividade sequestrante de radicais livres DPPH (IC₅₀).

A Tabela 4 demonstra o procedimento realizado para a análise do teste de antioxidantes.

Tabela 4 – Procedimento realizado para a análise do teste de antioxidantes.

Preparo da amostra	
Amostra de <i>Rhamnus purshiana</i>	H2O
15g	90ml
Solução DPPH	
Amostra de DPPH	Homogeneização
0,00400g	Metanol
Solução Controle	
Metanol	DPPH
500UI	2.500UI
Branco: Metanol	
Procedimento	
8 tubos	500uL solução + 500 uL de metanol
*último tubo (pipetar e descartar)	

FONTE: Autora (2022).

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.5.1 Microrganismos e condições de cultura

Para a realização dos ensaios foram utilizadas as cepas *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Serratia marcescens* (Isolado clínico), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Candida albicans* (ATCC 14053 e ATCC 24433) pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral (LAPEMICRO). Estes microrganismos foram mantidos em meio de cultura com glicerol e congelados a -80 °C. Então descongelou-se e inoculou-se em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubou-se por 24 horas. Após, foram semeadas em agar Nutriente e Sabouraud (para as leveduras) e novamente incubada por 24 horas a 37 °C.

4.5.2 Disco difusão

O teste de disco-difusão proposto por Bauer et al. (1966) em ágar Mueller Hinton foi utilizado para realizar o ensaio de suscetibilidade preliminar. Os inóculos (0,5 na escala *Mcfarland*) contendo as diferentes cepas foram semeados em placas de petri contendo ágar

Mueller Hinton. Após, 10 µl da solução contendo o extrato (nas concentrações de 2, 5 e 10 mg/ml) foram adicionados aos discos que por sua vez foram depositados na placa. Incubou-se a placa por 24 horas a 37 °C em estufa bacteriológica e após este período, os halos foram medidos (em mm). O ensaio foi realizado em duplicata.

4.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A técnica para determinar a concentração inibitória ínima para o extrato da *Rhamnus purshiana* frente às cepas de *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* foi realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços (CLSI, 2015) com modificações. Foi feita uma diluição seriada do extrato de Cáscara Sagrada (5 – 0,039 mg/ml) em caldo Mueller Hinton e após, na placa de Elisa, foi adicionado 15 µl do inóculo contendo o microrganismo. O controle positivo de crescimento foi considerado poço com inóculo em caldo e o controle negativo somente caldo sem inóculo. O ensaio foi realizado em triplicata. A placa foi incubada por 24 horas a 37°C e após a incubação, o ensaio foi revelado com cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos serão expressos como média \pm desvio padrão. Os resultados serão analisados através de ANOVA de uma via, seguida de Tukey como teste post-hoc. As diferenças serão consideradas significativas quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS *IN SILICO*

A análise farmacológica *in silico* teve seu início nos anos de 1970 através de métodos computacionais que permitiu simular um sistema biológico de um organismo com o objetivo de desenvolver estudos envolvendo as propriedades toxicológicas e farmacológicas de algum fármaco, e, possibilitar conhecer o seu efeito terapêutico. Com uma abordagem diversa das *in vivo* e *in vitro*, a *in silico* torna-se vantajosa uma vez que reduz custos, tempo e testes experimentais, sendo então muito utilizadas nas áreas de Química Medicinal e Farmacêutica (SCANDELAI, 2021).

Na delimitação do estudo de novos fármacos, alguns parâmetros são empregados para a análise do mesmo, como a propriedade *ADMET*, que é a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Também é possível avaliar a predição dos prováveis metabólitos e qual a toxicidade de determinado fármaco, e para isto se utilizam as seguintes ferramentas: *Molinspiration*, *Swiss Target Prediction*, *ACD/ChemSketch*, *admetSAR*, *MetaTox* e *iGEMDOCK* (LAGORCE et al., 2017).

5.1.1 Molinspiration

Segundo Lipinski et al. (1997), para que um fármaco tenha boa disponibilidade via oral, é necessário seguir a Regra dos Cinco”, ou seja, quando alguns dos parâmetros analisados se tornam relevantes para predizer a biodisponibilidade seguindo: coeficiente de partição octanol/água calculado (MiLogP) menor ou igual a 5; TPSA (área superfície polar topológica) menor ou igual 140; MW (massa molar) menor ou igual a 500 g/mol; nON (número de aceptores de ligação de hidrogênio) menor ou igual a 10; nOHNH (número de doadores de ligação de hidrogênio) menor ou igual a 5. As propriedades moleculares dos componentes majoritários da *Rhamnus purshiana*, calculadas no software Molinspiration, são representadas na Tabela 5.

Tabela 5– Propriedades moleculares dos componentes majoritários da *Rhamnus purshiana*, calculadas no software Molinspiration

Moléculas Testadas	miLogP	TPSA	MW	nON	nOHNH
Cascarosídeos	-2,08	247,05	580,54	14	10
Aloínas	0,18	167,9	418,4	9	7
Aloe-Emodina	2,42	94,83	270,24	5	3
Frangulina	2,23	153,75	416,38	9	5
Ácido Tartárico	-2,49	115,05	150,09	6	4
Ácido Cítrico	-1,98	132,12	192,12	7	4
Ácido Málico	-1,57	94,83	134,09	5	3

Fonte: Autora (2022).

As substâncias majoritárias da *Rhamnus purshiana* apresentam na sua maioria boa biodisponibilidade por via oral, pois, estão de acordo com a “Regra dos Cinco” de Lipinski et al. (1997), que preconiza em seu conceito que moléculas que atendem quatro das “cinco regras” satisfazem a ideia já mencionada. Segundo dados obtidos e demonstrados acima, apenas os cascarosídeos e a aloína podem ter seus níveis de biodisponibilidade afetados.

5.1.2 ProTox II

A Tabela 6 apresenta os dados obtidos do software ProTox II, que criou modelos baseados em dados reais, com o objetivo de prever o potencial toxicológico da *Rhamnus purshiana*.

Tabela 6– Parâmetros toxicológicos calculados através do software *ProTox II* da *Rhamnus purshiana*

Moléculas Testadas	Classificação	Predição	Probabilidade
Cascarosídeos	Imunotoxicidade	Ativo	0,99
Aloínas	Mutagenicidade	Ativo	0,70
Aloe-Emodina	Mutagenicidade	Ativo	0,85
Frangulina	Imunotoxicidade	Ativo	0,99
Ácido Tartárico	-	Inativo	-
Ácido Cítrico	-	Inativo	-
Ácido Málico	-	Inativo	-

Fonte: Autora (2022).

Muitos agentes toxicológicos, mesmo que em pequenas concentrações podem causar efeitos indesejados ao nosso sistema imune. Porém, quando em níveis elevados nossos órgãos tendem a ficar suscetíveis a potenciais tóxicos graves, o que poderá resultar em doenças, alergias, infecções e o surgimento de determinados cânceres. Avaliar tais agentes em exposição, e a toxicidade que causam a longo prazo ao organismo é o papel da imunotoxicologia, seja ela proveniente de agentes ambientais ou biológicos (LATORRE, 2016).

Segundo dados obtidos do software ProTox II, os cascarosídeos e a frangulina apresentaram probabilidades imunotóxicas, ou seja, o usuário que fizer uso prolongado de cáscara sagrada, segundo literatura, pelo prazo superior de 9 a 12 meses pode vir a desenvolver câncer de cólon retal (FLORIEN, 2016).

Também mencionado por Nakasone e Tokeshi (2015), o uso elevado de cáscara sagrada foi investigado em um paciente com colangiocarcinoma extra-hepático, após detecção de lesão hepática traduzidos em exames de imagem e sangue, provenientes do consumo exacerbado deste laxante antraquinônicos, que apresenta cascarosídeo e a frangulina como compostos majoritários.

Com relação ao potencial mutagênico sabe-se que as células humanas, ao logo dos anos, sofrem com mudanças tênues e graduais na sequência do DNA, sendo possível relacionar a exposições indevidas aos agentes mutagênicos ou até mesmo aos erros de duplicação. O resultado de uma mutação gênica irá resultar na troca de informações nos genes e ocasionar a síntese de uma proteína diversa da prevista, ou até mesmo, faça que nem ocorra tal síntese. Sejam elas induzidas ou espontâneas, as mutações gênicas, causadas por agentes mutagênicos, irão causar alterações na base do DNA e proporcionar o surgimento de neoplasias, pois, no momento da modificação gênica, ocorre o crescimento e multiplicação desta célula, possibilitando a expansão de um clone originário desta mesma. Pode-se afirmar que efeitos mutagênicos e carcinogênicos estão associados (ORSOLIN, 2011).

Quanto as moléculas de aloína e aloe-emodina ambas apresentaram probabilidade mutagênica, isto porque, sendo elas compostos majoritários da *Rhamnus purshiana* atuam estimulando a motilidade do cólon intestinal, acelerando o trânsito do mesmo. Apesar de estimulantes, são classificados também como irritantes e desta forma, não se indica o uso de derivados antraquinônicos para grávidas, lactantes, além de crianças menores de dez anos de idade.

O efeito mutagênico pode ser ocasionado uma vez que, o paciente, ao perceber a redução do efeito laxante que a *Rhamnus purshiana* propicia ao longo dos dias, devido a paralisia da musculatura intestinal, uma vez, baixo os níveis de potássio, aumenta-se a dose, na intenção de reverter os efeitos do fármaco. Assim, os danos ocasionados pelo consumo

exagerado deste derivado antraquinônicos torna-se irreversível sobre a membrana e mucosa intestinal propiciando o surgimento de câncer (JÚNIOR, 2003).

Quanto as moléculas de ácido tartárico, cítrico e málico não foram detectadas nenhuma predição de capacidade tóxica pela análise do software ProTox II.

5.1.2 AdmetSAR

A Tabela 7 a seguir irá abordar as propriedades previstas para os compostos majoritários referentes aos dados farmacocinéticos (AdmetSAR), incluindo a absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade.

Sabe-se que, a absorção de alguns fármacos é dependente do tempo em que ele manteve contato com a mucosa intestinal, podendo ser afetado pelo seu tempo de trânsito, que ao aumentar, pela motilidade, pode ser caracterizado como uma barreira ao ser absorvido. Além dela, estão as atividades enzimáticas, sais biliares presentes, pH instável, presença de muco, lúmem, epitélio e células epiteliais, servindo de obstáculo para uma absorção esperada (FREIRE, PODZECK, SOUSA, VEIGA, 2006). Ao analisar as propriedades mencionadas na tabela acima, é possível concluir que todos os compostos, com exceção do ácido cítrico são absorvidos pelo intestino humano, mas níveis abaixo de 30% são considerados baixos e pouco absorvidos.

Com relação a distribuição temos a atividade do substrato da glicoproteína P, e apenas os cascarosídeos, aloína, aloe-emodina e a frangulina apresentaram potencial inibitório. A glicoproteína-P (gp-P) é uma glicoproteína de superfície que está relacionada a resistência que muitos fármacos apresentam. Encontrada na membrana citoplasmática, faz parte da família ABC (ATP – *binding cassette*), tem a função de eliminar toxinas e xenobióticos para fora das células. Expressa fortemente nas células epiteliais, agem revestindo o cólon, os hepatócitos, ductos pancreáticos e biliares, intestino delgado, além da glândula adrenal. Assim ao inibir a função da gp-P, fármacos podem ter sua biodisponibilidade aumentada, antineoplásicos podem ser mais eficazes e a recepção do fármaco ao local alvo ocorrer de forma mais enfática (ARAÚJO, 2015).

Tabela 7 – Propriedades previstas e classificação AdmetSAR, para os compostos majoritários da *Rhamnus purshiana*

	Probabilidade						
	Cascarosídeos	Aloína	Aloe-Emodina	Frangulina	Ácido Tartárico	Ácido Cítrico	Ácido Málico
Absorção							
Absorção Intestinal Humana	10,67%	42,80%	74,18%	57,11%	3,71%	0%	13,83%
Substrato da Glicoproteína P	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não
Permeabilidade ao Caco-2	-	0,25	-	0,546	-	-	-
Distribuição							
Volume de Distribuição	0,489	0,86	0,671	1,199	-	-	-
Fração Não Ligada (humana)	0,34	0,335	0,226	0,121	0,65	0,51	0,652
Metabolismo							
Substrato CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Substrato CYP3A4	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor CYP1A2	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não
Inibidor CYP2C19	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor CYP2C9	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Inibidor CYP3A4	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Excreção							
Clearance Total	0,573 ml/min/kg	0,356 ml/min/kg	0,008 ml/min/kg	0,104 ml/min/kg	0,885 ml/min/kg	0,895 ml/min/kg	0,81 ml/min/kg
Toxicidade							
Dose humana máxima tolerada	0,433 mg/kg	0,425 mg/kg/dia	-	0,283 mg/kg/dia	1,212 mg/kg/dia	0,749 mg/kg/dia	1,212 mg/kg/dia
Toxicidade aguda oral em ratos (LD50)	2,511 mol/kg	2,712 mol/kg	2,329 mol/kg	2,38 mol/kg	1,744 mol/kg	2,148 mol/kg	1,818 mol/kg/dia
Toxicidade crônica oral em ratos (LD50)	5,018 mg/kg/dia	3,316 mg/kg/dia	1,878 mg/kg/dia	2,691 mg/kg/dia	3,769 mg/kg/dia	3,698 mg/kg/dia	3,104 mg/kg/dia

Fonte: Autora (2022).

Apenas aloína e frangulina apresentaram permeabilidade às células Caco-2, que são provenientes do adenocarcinoma do cólon humano. Usualmente faz-se o cultivo destas em placa com cultura multiposços com a finalidade de estudar e avaliar a absorção de fármacos, uma vez que, estas células desenvolvem um mecanismo de transporte e podem adquirir particularidades das células da mucosa intestinal. Com isto, apesar de derivarem de um tipo neoplásico, o seu cultivo irá conferir funcionalidade e morfologia de células saudáveis e normais, assim chamadas de enterócitos e poderá beneficiar na identificação daqueles compostos que podem ser absorvidos pelo epitélio intestinal (MATOS, 2016).

Outra análise feita foi a do volume de distribuição (VD_{ss}), que representa um parâmetro de disposição dos fármacos em diversos tecidos in vivo. Resultados abaixo de 0,71 L/kg são considerados baixos, assim, as únicas moléculas consideravelmente positivas foram a aloína e frangulina. Já a fração não ligada, indicou que todas as moléculas apresentaram valores correspondentes a sua atividade de atravessar as membranas para então exercer o efeito farmacológico ativo, já que está disponível para interação com receptores desses medicamentos (Han et. al, 2019).

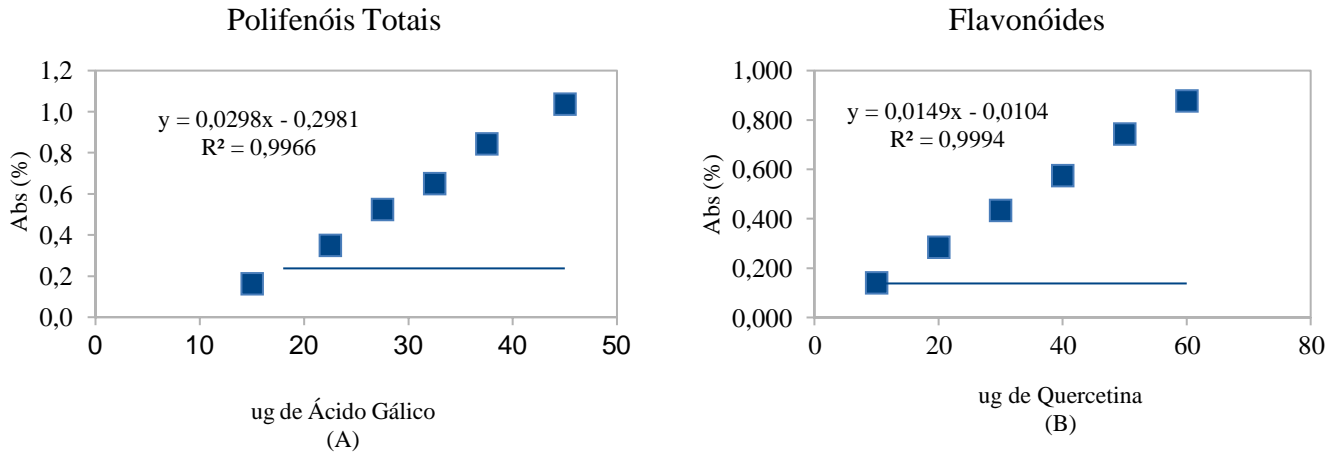
Metabolicamente, aloína é inibidora apenas da CYP1A2 e não inibidora das demais CYP avaliadas, nem mesmo dos substratos testados. Isoenzima do Citocromo P450 a CYP1A2 atua na metabolização de alguns fármacos, isto porque, atua nas reações de demetilação, hidroxilação e dealquilação destes. Ainda, apresenta fatores endógenos e exógenos característicos, como aumento ou diminuição de sua atividade, além da alteração em seu funcionamento, respectivamente (MASCARENHAS, R. C. G, 2010).

Para o parâmetro de excreção, os compostos majoritários apresentaram concentrações de clearance total, ou seja, é a capacidade que o organismo possui para eliminar o fármaco, já biotransformado nos rins, fígado e pulmões. É a junção do clearance renal, com o hepático e o pulmonar. Por fim, baseado na dose letal média (DL50), parâmetro usado para informar a dose letal mediana, ao qual 50% dos indivíduos que expostos a um determinado composto irão morrer. Desta forma, as moléculas aqui testadas, baseadas na toxicidade aguda oral, podem ser classificadas em classe 1: fatal se ingerido ($LD_{50} \leq 5$) (Han et. al, 2019).

5.2 DETERMINAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A determinação dos metabólitos secundários, polifenóis totais e flavonóides totais quantificadas no extrato bruto de *Rhamnus purshiana* foram calculados a partir das curvas de calibração das substâncias padrão para cada metabólito. A Figura 9 demonstra a curva de calibração construída com Ácido Gálico e para a Quercetina.

FIGURA 9 – Curva de calibração construída com ácido gálico (a) utilizado para quantificar o teor de polifenóis totais (A); e a construída para quantificar os flavonóides (B).



Fonte: Autora (2022).

A partir das curvas de calibração dos padrões foram mensuradas as equações da reta obtidas para cada composto testado, conforme Tabela 8.

Tabela 8 – Equação da reta e valor de “r” para cada metabólito secundário pesquisado

Metabólitos Secundários	Equação da Reta	Valor de "r"	Padrão
Polifenóis Totais	$y = 0,0298x - 0,2981$	$R^2 = 0,9966$	Ácido Gálico
Flavonóides	$y = 0,0149x - 0,0104$	$R^2 = 0,9994$	Quercetina

FONTE: Autora (2022).

A partir dessas equações pode-se calcular a quantidade de cada metabólito secundário presente na amostra. A Tabela 9 a seguir demonstra esses resultados.

Tabela 9 – Teores de polifenóis e flavonóides no extrato bruto de *Rhamnus purshiana*

Extrato de <i>Rhamnus purshiana</i>	Polifenóis Totais (mg/g)	Flavonóides (mg/g)
Extrato Bruto da casca	4,00	2,98

Fonte: Autora (2022).

Compostos orgânicos, os polifenóis apresentam em sua estrutura múltiplas unidades estruturais de fenol, sendo possível encontrá-los em chás, café, vinho tinto, frutas, legumes, chocolates, sucos. Sua ingestão diária, através da alimentação colabora com a qualidade de vida e saúde e equilibra a falta de antioxidantes ao organismo, ocasionado pelo aumento das moléculas de radicais livres (FURLAN, RODRIGUES, 2016).

O ácido gálico, composto derivado dos ácidos hidroxibenzoicos, e da via do ácido chiquímico é definido como tanino, uma vez que, possui três hidroxilas em sua estrutura química. Interposto ao metabolismo secundário e encontrado em plantas, se destaca graças a sua funcionalidade antioxidante e antimelanogênico, importante para a pele. Ainda, possui atividade anti-inflamatória, antimutagênica e antitumoral (LIMA, 2014).

Desta forma, com o objetivo de avaliar a presença de polifenóis totais no extrato da *Rhamnus purshiana*, foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como substância padrão para esta quantificação. Assim, é possível observar uma coloração que irá modificar, do azul tungstênio para uma mais transparente, sinalizando que quanto maior for esta diferença na coloração, maior a quantidade de polifenóis.

Ainda, a concentração da amostra precisou estar dentro do limiar da curva padrão, sendo que, a mesma não pode ficar muito concentrada, já que poderia não ser possível quantificá-la. Quanto aos resultados da amostra da *Rhamnus purshiana*, os mesmos foram, 0,284, 0,286, 0,243 respectivamente, e o valor final estimado foi de $4,0 \pm 0,27$ mg/g.

O resultado da dosagem de polifenóis obtidos do extrato bruto da Cáscara Sagrada deste estudo, foi comparado com o de Nascimento e Kavamoto (2015), que encontraram o resultado de 9,179 mg/g como valor final para o teor de polifenóis totais (valor 2,29 vezes superior ao obtido neste estudo), sendo que utilizaram o mesmo teste, o de Folin-Ciocalteu. Um novo estudo, desta vez com *Scutia buxifolia*, conhecida popularmente como coronilha, espécie pertencente à família Rhamnaceae, mesma da Cáscara Sagrada, com função diurética, hipotensora e cardiotônica, avaliou o teor de polifenóis que resultou em $102,2 \pm 0,71$ mg/g (valor 25,5 vezes superior ao obtido neste estudo) (BOLIGON *et al*, 2009).

Descoberto no ano de 1930, os flavonóides foram isolados e hoje representam um dos grupos mais diversos dentre os de origem vegetal encontrados. Acreditava-se que eles faziam parte da família das laranjas e por isso seriam classificados como vitaminas, porém, após este equívoco, ficou comprovado que sua função está atribuída a ação antioxidante, alelopática, conferem proteção contra raios ultravioleta e aos microorganismos patógenos (MACHADO, NAGEM, PETERS, FONSECA, OLIVEIRA, 2008).

A quercetina, é um flavonóide que está presente na dieta humana, principalmente na maçã, cebola e brócolis. Antioxidante e presente nos alimentos na forma glicosilada, possui capacidade de influir na sua própria absorção, sendo mais eficaz em humanos. Aglucona da rutina, possui ação farmacológica com propriedades imunológicas, antiviral, anti-inflamatória e gastroprotetora (BEHLING et al, 2004). Deste modo, a avaliação do teor de flavonóides totais no extrato da *Rhamnus purshiana*, foi realizada usando a quercetina como substância padrão.

Após quantificação realizada, o teor de flavonoídes encontrados no extrato bruto da *Rhamnus purshiana* foi de $2,98 \pm 0,11$ mg/g, não apresentando valor quantitativo satisfatório se compararmos com a análise da casca da *Ziziphus joazeiro* Mart., conhecida popularmente como joazeiro, que expressou valor 5,34 vezes maior que a da Cáscara Sagrada, ou seja, $15,94 \pm 0,47$ mg/g. Com valor significativo também está o da *Scutia buxifolia* que apresentou valor de $83,47 \pm 0,93$ (SILVA, 2009).

Muitos são os fatores que podem afetar a concentração destes metabólitos secundários e isto pode explicar a diferença destas comparações de resultados citados acima, pois, o preparo do extrato vegetal, a época em que o composto em questão foi colhido, o local desta coleta e o método empregado para análise dos polifenóis totais podem intervir na quantificação do metabólito da *Rhamnus purshiana*. Porém, apesar de todas estas interferências serem um viés importante e que podem estar associados ao extrato em análise, os resultados obtidos foram considerados baixos e pouco significativos, ainda que com pequeno potencial.

5.3 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA *Rhamnus purshiana*

5.3.1 Determinação da capacidade antioxidante pelo método do 1,1-difenil, 2-picrilidrazila (DPPH)

Somos capazes de produzir radicais de oxigênio e ânion, uma vez que estes são importantes para as reações fisiológicas e bioquímicas do nosso organismo. Ocorre que, em excesso, nas situações patofisiológicas e sem a utilização de antioxidantes, que possam impedir sua propagação, doenças e diversos danos podem ser iniciados (DUARTE ALMEIDA, et al, 2005). Antioxidantes são caracterizados como substâncias impeditivas ou inibitórias da oxidação de moléculas oxidáveis, estas podendo ser enzimáticas ou não enzimáticas. Assim, seu consumo diário, presente em compostos fenólicos, alimentos e plantas são capazes de atuar retardando o estresse oxidativo ocasionado pelos radicais livres (GALLEGO, 2017).

A análise do potencial antioxidante foi realizada pelo método de sequestro de radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Esta técnica possibilita a verificação da capacidade antioxidante de compostos diferentes e está fundamentada na redução ou na neutralização do radical. A partir do valor das absorbâncias obtidas e da concentração da solução (Tabela 10) uma curva de calibração para o DPPH foi plotada e calculou-se a IC50 (concentração inibitória capaz de sequestrar 50% do radical DPPH) do extrato bruto de *Rhamnus purshiana* conforme Figura 10.

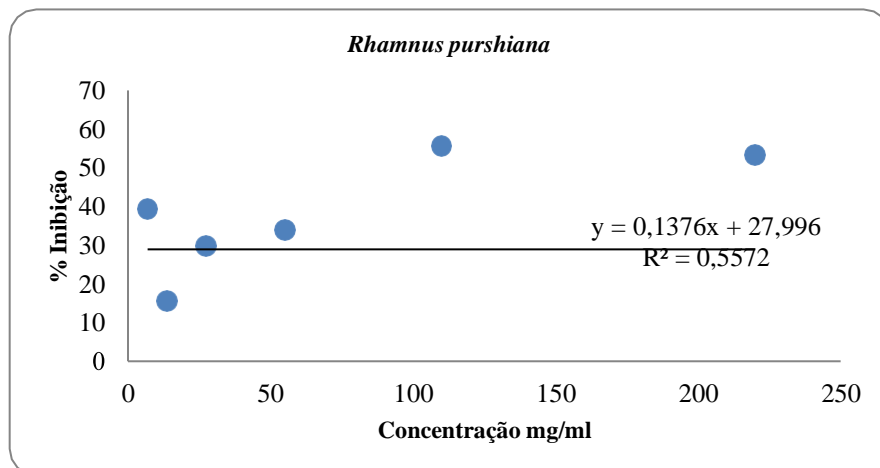
Tabela 10 - Resultado do valor das absorbâncias obtidas *versus* concentração da solução

Concentração mg/ml	Absorbância	% Inibição
220	0,459	53,2229376
110	0,435	55,6374245
55	0,65	34,0076459
27,5	0,692	29,7822938
13,75	0,833	15,5971831
6,875	0,508	39,3264957
Controle	0,936	

FONTE: Autora (2022).

Trataram-se os dados por Regressão Linear Simples, através do gráfico, conforme mostra a Figura 10.

FIGURA 10 – Curva de calibração que relaciona a porcentagem de inibição do radical DPPH com a concentração de extrato de *Rhamnus purshiana* responsável por esta inibição



FONTE: Autora (2022).

Os resultados apresentaram para o extrato de *Rhamnus purshiana* um IC50 em $1,78 \pm 0,10$ mg/ml. Desta forma, fica claro que, sendo a porcentagem de atividade antioxidante equivalente à quantidade de DPPH consumida, quanto maior for o consumo de DPPH pela amostra, maior será a capacidade antioxidante esperada. Assim, conclui-se que, quanto maior for à concentração da amostra e menor a absorbância, maior será o consumo de DPPH o que torna o extrato de *Rhamnus purshiana* um bom antioxidante.

Estudo com a espécie *Ziziphus guaranitic*, também da família Rhmnaceae, igual a Cáscara Sagrada, detalhou que, o valor de IC50 para a análise realizada com suas cascas do caule foi de 64 mg/ml, sendo a menor das concentrações testadas e com redução de 50% dos radicais livres (SOUSA, 2016). *Scutia buxifolia* também demonstrou resultados positivos para a atividade antioxidante, com IC50 em 34,57 mg/ml. Autores afirmam que há ligação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante, isso quando se usa o Folin-Ciocalteau e o DPPH para os testes (Bolignon, *et al.* 2009). Mesmo que em concentrações baixas, ambos marcadores são encontrados na Cáscara Sagrada.

5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Na prática de microbiologia clínica, testar a suscetibilidade antimicrobiana é um dos métodos essenciais para que diferencie os agentes causadores de doenças e possibilita aos profissionais da saúde o direcionamento correto ao tratamento adequado com a finalidade da eficácia terapêutica. Ainda, assim, a resistência bacteriana é recorrente, fazendo com que as grandes indústrias farmacêuticas lancem cada dia mais opções medicamentosas para tentarem conter esse problema de saúde pública. Sabemos que esta tática é também mercantilista, uma vez que, antimicrobianos desempenharam seu potencial farmacológico se forem específicos e adequados (TURNIDGE, J.D.; JORGENSEN, J.H., 1999).

Bauer *et al* (1966), desenvolveu o método de disco difusão que se caracteriza na técnica de impregnar um antimicrobiano em um disco de papel-filtro, pela difusão em ágar. Esta difusão formará então um halo de inibição de crescimento bacteriano, sendo que o diâmetro deste halo será proporcional à concentração inibitória mínima (CIM). O resultado deste método permite classificar a amostra em suscetível, intermediária, resistente ou antimicrobiano.

Com relação à CIM, também denominada de diluição em tubos, o método é baseado em avaliar a atividade de um agente antimicrobiano em sua concentração inibitória mínima de crescimento e é realizada através de tubos de cultura onde serão inoculadas concentrações

diversas do microrganismo-teste em cada tubo para posterior análise visual de provável crescimento ou não, através da presença de turbidez e assim, aquele que apresentar a menor concentração do agente com capacidade para inibir o crescimento do microrganismo-teste determina a CIM (OLIVEIRA, 2009).

Desta forma, após o período de incubação, pelo teste de disco difusão, não se verificou a formação de zonas de inibição. O extrato não foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados nas concentrações de 2, 5 e 10 mg/ml pela técnica de disco difusão. Já para a determinação da concentração inibitória mínima, o método revelou que o extrato não inibiu o crescimento microbiano visível nas concentrações testadas (5 – 0,039 mg/ml).

A atividade antimicrobiana foi avaliada também para a espécie *Rhamnus sphaerosperma* var *pubescens*, popularmente conhecida como Cangica e Fruto-de-pombo. Através do método de microdiluição, as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC® 25293™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228™, *Salmonella thyphimurium* ATCC® 14028™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™ e *Candida albicans* SC5314 foram repicadas em caldo BHI e incubadas por 24 horas a 37°C. A análise de turbidez indicou que não houve inibição de crescimento das cepas testadas, apenas na maior concentração analisada, que foi de 400 µg/mL para o caule da Canjica, resultou em inibição do crescimento da *Salmonella thyphimurium* e *Escherichia coli* (MOREIRA, 2012).

Sousa (2016) também avaliou a atividade antibacteriana das cascas do caule da espécie *Ziziphus guaranítica* Malme pelo método de CIM para as cepas *Enterococcus faecalis*, e *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e o resultado demonstrou ser parecido com o da *Rhamnus purshiana*, uma vez que, não inibiu o crescimento das linhagens testadas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A análise foi realizada também com o extrato das cascas do joazeiro, todavia, não houve inibição de crescimento do microrganismo-teste.

Uma pesquisa realizada com a finalidade de avaliar o efeito antimicrobiano das plantas foi feita através da análise de 97 artigos completos, na qual, foi utilizado o nome das plantas mais o termo ‘antimicrobial’. A *Rhamnus purshiana* era parte integrante desta avaliação e não foram encontrados dados relevantes a respeito de seu potencial antimicrobiano, desta forma, novos estudos e atualizações são necessários para a comprovação do mesmo (REMPEL, *et al*, 2019).

6 CONCLUSÃO

Considerando o aumento do consumo pela população global de plantas medicinais e fitoterápicas, com o objetivo terapêutico no alívio de sintomas, tratamento de doenças e cuidados paliativos, é necessária a atualização constante de estudos científicos relacionados com as atividades farmacológicas e toxicológicas destes compostos naturais para garantir aos profissionais da saúde segurança ao indicarem ou prescreverem estes medicamentos.

O presente trabalho objetivou determinar os metabólitos majoritários da *Rhamnus purshiana*, também conhecida popularmente como Cáscara Sagrada, além de caracterizar o painel fitoquímico, a atividade antioxidante e o painel microbiológico. Os resultados obtidos foram relevantes e conferem a eficácia deste extrato, assim é possível afirmar:

- Quanto a análise *in sílico*, o extrato de *Rhamnus purshiana* apresentou boa biodisponibilidade por via oral; probabilidade imunotóxica e mutagêncica com consumo excessivo do composto, porém, sendo o uso não indicado por mais de duas semanas, os riscos de desenvolvimento de câncer serão diminuídos. Já a excreção, apresentou boa eliminação, quando o composto já estiver biotransformado;
- O extrato apresentou em sua composição fenóis totais ($4,00 \pm 0,27$ mg/g) e flavonóides ($2,98 \pm 0,11$ mg/g);
- Apresentou ação antioxidante ($IC_{50}=1,78$ mg/g) com capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio;
- Não apresentou atividade antimicrobiana comprovada frente à *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

Desta forma, baseado nos resultados apresentados e referenciados nesta dissertação, reafirma-se que, a espécie *Rhamnus purshiana* é um bom fitoterápico e possui atividade terapêutica. Assim, é importante que os estudos a cerca dela sejam periodicamente atualizados para continuar a conferir segurança e eficácia aos indivíduos que dela necessitarem para o tratamento de seus males. Como perspectiva futura realizar a avaliação da toxicidade aguda e de doses repetidas do extrato *Rhamnus purshiana* em modelo animal, bem como as enzimas antioxidantes e o balaço eletrolítico.

REFERÊNCIAS

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

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

AMPARO, T. R. *et al.* Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma**, Universidade Federal de Ouro Preto, 2017. DOI: 10.14450/2318-9312.v30.e1.a2018.pp50-59.

ANVISA aprova o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Universidade Federal de Goiás, 2011. Disponível em: <<https://farmacia.ufg.br/n/23153-anvisa-aprova-o-formulario-de-fitoterapicos-da-farmacopeia-brasileira>>. Acesso em: 05 nov. 2021.

ANVISA. Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais. 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterapicos>>. Acesso em: 02 nov. 2021.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: 2011.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira - 1ª edição**. Brasília, 2016.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Monografia da espécie *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada)**. Brasília, 2014.

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Primeiro Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 1ª edição, 2018.

ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. Plantas Medicinais: Cultura Popular Versus Ciência. Vivências: **Revista Eletrônica de Extensão da URI**. Vol.7, N.12: p.51-60, Maio/2011.

BARBOSA, M. de. O.; LEMOS, I. C. S.; KERNTOPF, M. R.; FERNANDES, G. P. A prática da medicina tradicional no Brasil: um resgate histórico dos tempos coloniais. **RIES**, ISSN 2238-832X, Caçador, v.5, nº 1, p. 65-77, 2016.

BARRETO, J. M. B.; MACIEL, N. F.; GARCIA, D. S. S. **13 plantas medicinais e covid-19: expectativas de investimento em produção de fitoterápicos no cenário pós-pandemia no brasil**. 16º Seminário Internacional - Governança e Sustentabilidade. Universidade do Vale do Itajaí. Brasil, nov. 2020.

BARROS, Y. Y. de. **Avaliação das interações entre receptor pregnano x e medicamentos fitoterápicos de interesse ao SUS**, 2017. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília. Brasília, 2017.

Bauer, A.W. et al. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** Am. J. Clin. Microbiol., 40: 2413-5, 1966.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. **Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas.** Alim. Nutr., araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BIANCHI, R. V. **Farmácia da Natureza: um modelo eficiente de Farmácia Viva**, 2012, 55p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Gestão da Inovação em Fitomedicamentos) - Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos / FIOCRUZ. Rio de Janeiro, 2012.

BOLIGON, A. A. Potencial antioxidante in vitro, conteúdo de fenóis e flavonóides nos ramos de scutia buxifolia reissek. **Saúde**, Santa Maria, vol 35, n 1: p 34-38, 2009.

BORGES F. V.; SALES, M. D. C. Políticas Públicas de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: sua história no sistema de saúde. **Pensar Acadêmico**, Manhauçu, v. 16, n. 1, p. 13-27, janeiro-junho, 2018.

BRAGA, C. de. M. **Histórico da Utilização de Plantas Medicinais**, 2011. 55.p. Monografia (Grau pelo Consórcio Setentrional de Educação a Distância) - Universidade Estadual de Goiás. Brasília, 2011.

BRAGA, J. C. B.; SILVA, L. R. da. Consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: perfil de consumidores e sua relação com a pandemia de COVID-19. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v.4, n.1, p.3831-3839 jan./feb. 2021. DOI:10.34119/bjhrv4n1-303.

BRANDELLI, C. L. C. Farmacobotânica. In: _____. Capítulo 1 - Plantas Medicinais: Histórico e Conceitos. **Artmed**, 2017.

BRASIL. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. Departamento de Apoio Técnico e Educação Permanente. Comissão Assessora de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2019. 4ª edição. 86 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. **Constipação intestinal no câncer avançado. Rio de Janeiro: INCA**, 2009. Disponível em: <<https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/constipacao.pdf>> Acesso em: 09 fev. 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME**, 2014, 9. ed. rev. e atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 230 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2020**. Brasília: 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais Rename 2022**. Brasília: 2022.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p.

BRITO, *et al.* Fitoterapia: uma alternativa terapêutica para o cuidado em Enfermagem - relato de experiência. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 4, n. 4, p. 15-20, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n4p15-20>.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. de. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, 17(10):2675-2685, 2012.

CAMPOS, S. C. *et al.* Toxicidade de espécies vegetais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.373-382, 2016.

CARVALHO, E.; WELTER, H. I. I.; SOARES, L. B.; WOLKMER, P. Desequilíbrio eletrolítico em equinos. **XXV Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão. Desafios da Ciência em Tempos de Pandemia**. Cruz Alta – RS, 2020.

CÁSCARA SAGRADA. **Florien**: 2016. Bula de remédio.

CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinonereductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguayensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 3583-3589, 2004.

CHOI, C. W. *et al.* Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v.63, p.1161-1168, 2002.

CLSI, C. L. S. I. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. CLSI document M07-A9. **Clinical and Laboratory Standars Institute**, v. 32, n. 2, 2015.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Boletim da Agricultura Familiar**. Brasília, DF, v. 1, n. 1, jul. 2021. Disponível em: <[file:///C:/Users/juliz/Downloads/Boletim-da-Agricultura-Familiar-Julho-2021%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/juliz/Downloads/Boletim-da-Agricultura-Familiar-Julho-2021%20(1).pdf)>. Acesso em: 05 jan. 2022.

DAVE, S. *et al.* Inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis and lipolysis by stem bromelain in 3T3-L1 adipocytes. **PLoS ONE**, v. 7(1): e30831. 2012, doi:10.1371/journal.pone.0030831.

DEGÁSPARI, C. H; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, Jan.- Jun. 2004.

DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 8, p. 504–511, ago. 2011.

DRESCH, R. R.; LIBÓRIO, Y. B.; CZERMAINSKI, S. B. C. Compilação de levantamentos de uso de plantas medicinais no Rio Grande do Sul. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 31(2), e310219, 2021.

DUARTE-ALMEIDA, *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais $dpph\cdot$ 1. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(2): 446-452, abr.-jun. 2006.

DUARTE, M. C. T. **Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil**. MultiCiência, Campinas, SP: 2006.

FEBRAFAR. **Febrafar fala sobre fitomedicamentos no Guia das Farmácias**, 2016. Disponível em: < <https://www.febrafar.com.br/febrafar-fitomedicamentos-farmacias/>>. Acesso em: 20 mai. 2021.

FIGUEREDO, C. A. de.; GURGEL, I. G. D.; JUNIOR, G. D. G. A política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, 24 [2]: 381-400, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-73312014000200004>.

FRANÇA, I. S. X. de. *et al.* Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Rev Bras Enferm**, Brasília 2008, mar-abr; 61(2): 201-8.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. In: ENZYMOLOGY, L.P.B.T.-M. IN (Ed.). **Oxygen Radicals in Biological Systems**. [S.l.] Academic Press, v. 105, p. 114-120, 1984.

GALLEGO, Tatiane Barberá. **Potencial antioxidante do chá da *Artemisia annua* em diferentes modos de preparo. 2017. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos)** - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2017.

GALLO, L. *et al.* Influence of spray-drying operating conditions on *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) extract powder physical properties. **Powder Technology**, 208 (2011) 205–214.

GARLET, T. M. B. **Plantas medicinais nativas de uso popular no Rio Grande do Sul** [recurso eletrônico]. Santa Maria, RS: UFSM, PRE, 2019. 1 e-book: il. 104. p.

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

GOMES, E. B.; PEREIRA, H. C. P. Distúrbios do Potássio. **Vittalle** – Revista de Ciências da Saúde v. 33, n. 1 (2021) 232-250.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J; DAVID, M. M. Determination of sérum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**.;v. 177, n. 2, p. 751-66, 1949.

GOUVEIA, G. D. A.; SIMIONATO, C. **Memento fitoterápico para prática clínica na AB** [recurso eletrônico]. Universidade Federal de Santa Catarina, Núcleo Telessaúde Santa Catarina – Florianópolis: CCS/UFSC, 2019. 87 p : ils. Disponível em: < https://ares.unasus.gov.br/acervo/html/ARES/13389/1/Memento_FINAL.pdf>. Acesso em 15 jan. 2022.

HOFFMANN, R.; ANJOS, M. de. C. R. dos. Construção histórica do uso de plantas medicinais e sua interferência na socialização do saber popular. **Guaju**, Matinhos, v.4, n.2. p. 142-163, jul./dez. 2018.

JÚNIOR, J. M. N. *et al.* Avanços e perspectivas da RENAME após novos marcos legais: o desafio de contribuir para um SUS único e integral. **Revista Eletrônica Gestão & Saúde**. Vol. 6 (Supl. 4). Outubro, 2015 p.3354- 71.

JÚNIOR, J. C. M. dos. S. Laxantes e purgativos - o paciente e a constipação intestinal. **Rev bras Coloproct**, 2003;23(2):130-134.

LABINFORMA. **Dosagem de potássio e interferentes pré-analíticos**. Informativo Digital . Nº 1 . Março/2015. Disponível em: < <https://labrede.com.br/portal/files/labinforma-potassio.pdf>>. Acesso em: 28 dez. 2021.

LANINI, J.; ALMEIDA, J. M. D.; NAPPO, S.; CARLINI, E. A. “O que vêm da terra não faz mal” - relatos de problemas relacionados ao uso de plantas medicinais por raizeiros de Diadema/SP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19(1A): 121-129, Jan./Mar. 2009.

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

LIMA, K. G. **Avaliação do efeito do ácido gálico no tratamento de células de hepatocarcinoma HEPG2**. 2014. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2014.

LOBO, C. R. Cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*): Uma Revisão de Literatura. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**. 2012; Julho-Dezembro (2): 171-178.

LONGO, L.; VASAPOLLO, G.; RESCIO, L. Identification of Anthocyanins in *Rhamnus alaternus* L. Berries. **J. Agric. Food Chem**. 2005, 53, 1723-1727.

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

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MARANHÃO, H. M. de. L. **Avaliação toxicológica reprodutiva da resina de *Aloe ferox miller em ratas wistar***. 2010, 57. p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M. I.; SILVA, A. do. C. **Revisão sistemática sobre a produção científica de plantas medicinais da Rénisus voltadas ao Diabetes Mellitus**. Caderno pedagógico, Lajeado, v. 12, n. 1, p. 87-99, 2015. ISSN 1983-0882.

MELLO J. R. B. de.; MELLO F. B. de.; LANGELOH, A. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Aloe ferox*, *Quassia amara*, *Cynara scolymus*, *Gentiana lutea*, *Peumus boldus*, *Rhamnus purshiana*, *Solanum paniculatum* e *Valeriana officinalis*. **Lat. Am. J. Pharm.** 28 (1): 183-91 (2009).

MENDES, I. A. C. Desenvolvimento e saúde: A declaração de Alma-Ata e movimentos posteriores. **Rev Latino-am Enfermagem**, 2004, maio-junho; 12(3):447-8.

MENDES, M. R. de. V. **Síntese, caracterização e estudo espectroscópico de novo ligante derivado do ácido barbitúrico e isoniazida e seus compostos de coordenação com os íons de metais de transição Zn(II) e Cu(II)**. 2016, 191. p. Dissertação (Mestrado em Química) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC-RIO. Rio de Janeiro, 2016.

MOREIRA, T. F. **Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Rhamnus shaerosperma var. pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. (Rhamnaceae)**. 2012. 96 p. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

MUNIZ, R. M. C. C, *et al.* Plantas medicinais da Rénisus de atuação central. **Infarma**, v. 24, nº 1-2, 2012.

NASCIMENTO, M. A. P. do. **Interação medicamentosa entre fitoterápicos oferecidos pelo sistema único de saúde e medicamentos convencionais**. [manuscrito]. 2020. 91 f.

NEGREIROS, D. de. O. **Desequilíbrios do sódio: importância e terapia**. Seminário apresentado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

NUNES-PINHEIRO, D. C. S. *et al.* Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: Perspectivas em medicina veterinária. Campus do Itaperi, Fortaleza, Ce. **Ciência Animal**, 13(1):23-32, 2003.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, A. M. B.de.; COSTA, C. J. **Os jesuítas no Brasil do século XVI. Seminário de Pesquisa do PPE**. Universidade Estadual de Maringá, 2011.

OLIVEIRA, T. F. **Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 16 p.

PEREIRA, I. C. Estudo ecotoxicológico do fitoterápico cáscara-sagrada (*rhamnus purshiana*) empregando daphnia similis (cladocera:crustacea). **Anais do Conic-Semesp**. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. das. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **J. Biotec. Biodivers**. v. 3, N.4: pp. 146-152, Nov. 2012.

PINHEIRO, *et al.* Constipação intestinal: tratamento com fitoterápicos. **Rev Cient FAEMA: Revista da Faculdade de Educação e Meio Ambiente - FAEMA, Ariquemes**, v. 9, n. ed esp, p. 559-564, maio-jun, 2018.

PINHEIRO, J.A.S. *et al.* Hepatotoxicidade de plantas medicinais e produtos herbais. **Rev. Ref. Saúde - FESGO**. Vol.03, n.1, pp. 132-137 (Jan – Jul) 2020.

PRADE, A. C. K. Gestão do programa “Farmácia Viva”. **[Webpalestra disponibilizada em 10 de abril de 2019, a Internet]**. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=dSJy9fsGhiA>. Acesso em 14 nov. 2021.

PROGRAMA de fitoterápico e plantas medicinais. Ministério da Saúde. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/acao-a-informacao/acoes-e-programas/programa-de-fitoterapico-e-plantas-medicinais>>. Acesso em 11 nov. 2021.

RANDAL, V. B.; BEHRENS, M.; PEREIRA, A. M. S. Farmácia da Natureza: um modelo eficiente de farmácia viva. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol, 10(1), 1-93, Jan-Mar 2016. DOI 10.5935/2446-4775.20160007.

REMPEL, C. *et al.* Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.10, n.4, p.57-82, 2019.

RENAME. **Conselho Federal de Farmácia**. Disponível em: <<https://www.cff.org.br/pagina.php?id=140>>. Acesso em: 18 nov. 2021.

RENISUS. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2014. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/scctie/daf/plantas-medicinais-e-fitoterapicas/ppnmpf/arquivos/2014/renisus.pdf>>. Acesso em 04 fev. 2022.

RIO, R.G.W. 1996. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROCHA, D. K. *et al.* A importância de plantas medicinais em cabo-verde. Estudo de caso: conhecimento tradicional das plantas medicinais de são vicente, meio urbano versus rural. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v.2, n. 1 (2018).

ROCHA, F. A. G.; *et al.* O uso terapêutico da flora na história mundial. **HOLOS**, Ano 31, Vol. 1. DOI: 10.15628/holos.2015.2492.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; AMARAL, A. C. F. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos.** In: _____. Capítulo 1 - Políticas Públicas em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p. 9-28.

RODRIGUES, A. G.; SIMONI, C. de. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica.** In: _____. Capítulo 3: Políticas públicas à inserção das plantas medicinais e fitoterapia nos cuidados primários em saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p. : il.

RUFINO, L. L. **Farmácias Vivas: O contexto do uso de plantas medicinais e fitoterápicos por meio dos atores sociais no município de Fortaleza,** 2015. 118. p. Dissertação (Mestrado em Economia Rural) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2015.
 SAAD, G.de.A.; LÉDA, P.H.de.O.; SÁ, I.M.de.; SEIXLACK, A.C. **Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica.** In: _____. Capítulo 4 – Fitoquímica e Farmacologia Aplicada. Guanabara Koogan, 2016.

SALES, Q. S. **Estudo fitoquímico da *Ampelozizyphus amazonicus* (RHAMNACEAE).** 2013.106 p. Monografia (Licenciatura em Química) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2013.

SANTOS, J. S. dos; ALMEIDA, C.C.O.F. de. Das plantas medicinais à fitoterapia: uma ciência em expansão. Brasília: **Editora IFB**, 2016. 214 p.

SANTOS, K. M. dos. **Avaliação dos aspectos dietéticos e investigação do uso de senna alexandrina no tratamento de quadros de constipação intestinal.** 2021. 64.p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal do Tocantins – Palmas, 2021.

SANTOS, J. S. **Estudo da espécie *Rhamnus purshiana* dc conhecida Cáscara sagrada.** 2019. 34 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) - Universidade de Uberaba Uniube. Uberaba – MG, 2019.

SANTOS, M. G.; CARVALHO, A. C. B. **Plantas medicinais: saberes tradicionais e o sistema de saúde.** In: SANTOS, M.G., and QUINTERO, M., comps. Saberes tradicionais e locais: reflexões etnobiológicas [online]. Rio de Janeiro: EDUERJ, 2018, pp. 72-99.

SANTOS, M.R.G. dos.; REZENDE, M.de.A. Prescrição de fitoterápicos na atenção primária de saúde no Brasil e a contribuição do memento fitoterápico aos profissionais prescritores. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro. 2019. DOI: 10.32712/2446-4775.2019.794.

SCHENKEL, E. P. *et al.* O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **Caderno de Farmácia**, v. 1, n. 2, p. 65-72, 1985.

SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 7, p. 363–383, jul. 2020.

SILVA, D. H. da. **Métodos cromatográficos para avaliação de antraquinonas, hpa's, atividade antioxidante e composição fenólica como instrumento de controle de qualidade do processamento alternativo de erva-mate.** 2019, 116. p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.

SILVA, G. K. F. da. *et al.* Política nacional de práticas integrativas e complementares: trajetória e desafios em 30 anos do SUS. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 30(1), e300110, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-73312020300110>.

SILVA, J. S. de. *et al.* Análise da qualidade de cápsulas de cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*) provenientes de farmácias magistrais de Teresina-PI. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 85-93, abr./jun, 2014.

SILVA, L. O. P. da.; NOGUEIRA, J.M.da.R. Resistência bacteriana: potencial de plantas medicinais como alternativa para antimicrobianos. FIOCRUZ – Manguinhos, Rio de Janeiro – RS, Brasil, 2020.

SILVA, T. C. L. **Avaliação comparativa de cascas e folhas de Ziziphus joazeiro Mart (RHAMNACEAE) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.** 75. P. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Unjversidade Federal de Pernambuco – Recife, 2009.

SINDUSFARMA. **Perfil da Indústria Farmacêutica.** 2020. Disponível em: <https://sindusfarma.org.br/uploads/Publicacoes/Perfil_IF2020_PORT.pdf>. Acesso em: 03 de jan. 2022.

SINDUSFARMA. **Perfil da Indústria Farmacêutica.** 2021. Disponível em: <https://sindusfarma.org.br/uploads/files/229d-gerson-almeida/Publicacoes_PPTs/Perfil_da_IF_2021_SINDUSFARMA_po.pdf>. Acesso em: 03 de jan. 2022.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, 15(1):71-81, jan./abr., 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE COLOPROCTOLOGIA. **Constipação.** Folhetos Informativos, 2009. Disponível em:< <https://www.sbcop.org.br/pdfs/publico/constipacao.pdf>>. Acesso em: 13 dez. 2021.

SOUSA, C. M. D. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

SOUSA, I. de. **Estudo fitoquímico e biológico *in vitro* da espécie Ziziphus guaranitica Malme (rhamnaceae).** 2016 – 172 p. Dissertação (Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco. Petrolina, 2016.

SOUZA NETO, Manoel André de. **Ziziphus joazeiro Martius: estudo fitoquímico do extrato hidroetanólico das folhas, fracionamento bioguiado anti-Candida e avaliação do efeito protetor em modelo de doença inflamatória intestinal.** 2016. 261f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

SPITZ, D. R.; Oberley, L. W. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. **Analytical Biochemistry**, v. 179, n. 1, p. 8-18, 1989.

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

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

TUROLLA, M. S. dos. R.; NASCIMENTO, E.de.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 42, n. 2, abr./jun., 2006.

TURNIDGE, J.D. & Jorgensen, J.H. **Antimicrobial susceptibility testing: General considerations.** In: Murray, R.P. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1999, p. 1469-71.

VALE, N. B. do. A Farmacobotânica, Ainda tem Lugar na Moderna Anestesiologia?. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. Vol. 52, Nº 3, Maio - Junho, 2002.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G.E.B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado**. Pelotas, 2010. 16 p.

WOISKY, R. G; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures or chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 6, 1421-1428, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000600037>

APÊNDICE

APÊNDICE A – MANUSCRITO 1	77
APÊNDICE B – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO A REVISTA REGULARY TOXICOLY AND PHARMACOLOGY	94

NOTA

O manuscrito exposto a seguir foi elaborado seguindo as normas específicas da revista a que foi submetido. O manuscrito 1 foi submetido na revista **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, com fator de impacto em 3,271.

APÊNDICE A - MANUSCRITO 1

Phytochemical study and evaluation of the antioxidant and antimicrobial potential of the crude extract of *Rhamnus purshiana*

Juliana Zamboni ¹, Liliane de Freitas Bauermann²

¹ Graduate student of the Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria

² Professor of the Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria

ABSTRACT

It is known that about 150 thousand years ago man already used medicinal plants to treat illness and health problems. Among all the species is *Rhamnus purshiana*, also popularly known as Cascara sagrada, being used due to its laxative effect. However, there are still few studies related to its use. The present work aimed to obtain the crude extract of *Rhamnus purshiana* bark and perform the phytochemical analysis, identify and quantify compounds present in the extract, evaluate and identify the antioxidant and microbiological panel. The *Rhamnus purshiana* extract after the analysis showed concentrations of 4.00 ± 0.27 mg/g and 2.98 ± 0.11 mg/g of extract, which were determined by phytochemical assays for total polyphenols and total flavonoids, respectively. *Rhamnus purshiana* was able to capture reactive oxygen and nitrogen species with antioxidant capacity with $IC_{50} = 78 \pm 0.10$ mg/ml. Antimicrobial activity was not significant against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*. In this way, through the positive results, it can be suggested the use of *Rhamnus purshiana* in an effective and safe way.

Keywords: *Rhamnus purshiana*, Medicinal Plants, Laxative.

1 INTRODUCTION

Since the beginning, man has sought to take care of his health and survival with resources from nature, this is because ancestral cultures of past times already made use of

traditional medicine (TM) with the aim of recovering the quality of life that for some reason may have been affected by disease. In this context, popular knowledge and local belief, transmitted from generation to generation, in developing countries, defined that the preservation of health is related to the use of medicinal plants (RODRIGUES, SANTOS, AMARAL, 2006).

Medicinal plants are significant and their use is variable: both for therapeutic purposes, in infusions and tea preparations, and for providing the raw material for the biosynthesis of new drugs (NUNES-PINHEIRO, *et al*, 2003). The reports indicate that the beginning of the use and the empirical knowledge of these were through the Chinese, Indian, Egyptian, Greek, Eskimo and African societies. Today, they also serve as the basis for pharmacological advances in the phytotherapeutic field (BORGES; SALES, 2018).

Among the medicinal plants used by the population is *Rhamnus purshiana*, known as cascara sagrada, cascara bulkthorn, bulkthorn, sacred bark bitter _ bark, bearwood, cascara, chitem bark. It belongs to the genus *Rhamnus* and the family *Rhamnaceae*. Used predominantly as a laxative, it also has antifungal, anti-inflammatory and antineoplastic activity. It appears, however, that the knowledge of its metabolism is still not well clarified, if compared with the use that is made of it. This is a fact that causes concern, since, as it is a medicinal plant, the population only associates it with the benefits, not paying attention to the risks imposed by inappropriate use (PINHEIRO, *et al*, 2020).

Characterized as a medicinal plant, its therapeutic property comes from antiquity, being used for more than 2,000 years, due to its laxative effect. The compounds of this plant act in the peristaltic movements of the intestine, favoring the evacuation (LOBO, 2012).

The main route of administration is oral. The recommended dosage is 20 mg to 30 mg of hydroxyanthracene derivatives expressed in A-casinosides, in the form of capsules. It can be taken in the evening or in the morning and evening, if the patient chooses to split the dose. If it is a tincture (ANVISA, 2016), in the dosage of 25 to 50 drops, once a day (FLORIEN, 2016) and by decoction, in 150 ml of water use 0.3 to 1g of the plant bark, taking 1 cup before sleeping (GOUVEIA, SIMIONATO, 2018). As for the time of use, it is not recommended that it exceeds two weeks, since it has been reported to cause serious loss of minerals, vitamins and electrolyte imbalance (ANVISA, 2016).

To Rhamnus purshiana is predominantly composed of free and glycosylated anthraquinones, as well as phenolic substances and long-chain fatty acids (NASCIMENTO, 2020). Anthraquinones have a nucleus called anthracene, formed by three conjugated benzene rings, and in each central ring it is possible to find a carbonyl group (carbon + double bond + oxygen), thus forming the quinone. In plants, anthraquinones are represented by glycosides and

in the case of cascara sagrada, we call them cascarosides (SAAD, LÉDA, SÁ, SEIXLACK, 2016). There are also other compounds derived from anthraquinone such as: aloe-emodin, flavonoids, tannins, chrysophanol, emodine and naphthalides (BARROS, 2017).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 OBTAINING THE GROSS VEGETABLE EXTRACT

Crude extract (EB), in powder form, of the *Rhamnus plant purshiana*, was obtained from the company Pharma e Cia (30.017264389669357, 51.19792601777418), located in the city of Porto Alegre in the state of Rio Grande do Sul. This powder was identified, properly packaged and stored for further analysis.

2.2 DETERMINATION OF SECONDARY METABOLITES

2.2.1 Determination of Total Polyphenols Content

Organic compounds, polyphenols present in their structure multiple structural units of phenol, being possible to find them in teas, coffee, red wine, fruits, vegetables, chocolates, juices. Its daily intake, through food, contributes to the quality of life and health and balances the lack of antioxidants in the body, caused by the increase in free radical molecules (FURLAN, RODRIGUES, 2016).

The colorimetric method followed, with modifications, aimed to evaluate the content of total polyphenols, based on the methodology used by Folin-Ciocalteu (CHANDRA; MEJIA, 2004). 0.025g of *R. purshiana extract* was weighed, transferred to a 25 mL volumetric flask and dissolved in water. An aliquot of 100 μL , 500 μL and 1000 μL was transferred from the flask and 1 ml of Folin-Ciocalteu reagent was added, after which the solution was left in the dark for five minutes. After this period, 2 ml of 20% sodium carbonate (Na_2CO_3) was added to the tubes and a new incubation in the dark was performed, this time for 10 minutes. The blank was prepared using the process described above, however, no extract sample was used, only water and reagents. At the end, the absorbances were read in a spectrophotometer and the wavelength used was 730 nm. The samples and their points on the curve were analyzed in triplicate and the concentration of the *Rhamnus* sample *purshiana* was 0.1%.

Table 1 shows the volumes weighed and used for the analysis of the total polyphenol content.

Table 1 - Weighted volumes for the analysis of total polyphenols content

Pipe	<i>Rhamnus sample purshian</i>	H ₂ O	FOLIN	Na ₂ CO ₃
1	White	1000 µL	1 ml	2 ml
2	White	1000 µL	1 ml	2 ml
3	100 µl	900 µL	1 ml	2 ml
4	500 µL	500 µL	1 ml	2 ml
5	1000 µL	-	1 ml	2 ml

Methodology used to perform the determination of total polyphenols.

Gallic acid is used as a reference substance to make the calibration curve, according to Chandra & De Mejia (2004), at concentrations of 15; 22.5; 27.5; 32.5; 37.5 and 45 µg / mL. In this way, a calibration curve will be constructed, obtaining an equation of the straight line and from this it was possible to calculate the content of total polyphenols present in the *Rhamnus purshiana*.

2.2.2 Determination of Flavonoids

Discovered in 1930, flavonoids were isolated and today represent one of the most diverse groups among those of plant origin found. It was believed that they were part of the orange family and therefore would be classified as vitamins, however, after this misconception, it was proved that their function is attributed to the antioxidant, allelopathic action, they provide protection against ultraviolet rays and pathogenic microorganisms (MACHADO, NAGEM, PETERS, FONSECA, OLIVEIRA, 2008).

The flavonoid content was determined by the method described by Rio (1996). A 5% Aluminum Chloride (AlCl₃) solution was used and the reading was taken in a spectrophotometer at 425 nm. *Rhamnus* extract powder was prepared *purshiana* at a concentration of 0.4% in methanol.

0.1g of *R. purshiana* extract was weighed, transferred to a 25 mL volumetric flask and solubilized in 70% methanol. An aliquot of 100 µL, 500 µL and 1000 µL was transferred from the flask and the aforementioned methanol was added again. Next, 75 µL of AlCl₃ and 4 ml of 70% methanol were added. At the end, the aliquots were incubated for 10 minutes and the

absorbance reading was performed. The assay and its points on the curve were analyzed in triplicate and the calculation of the flavonoid content was carried out through a calibration curve, that is, through the equation of the straight line, using quercetin as a standard at concentrations of 10; 20; 30; 40; 50 and 60 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Table 2 shows the volumes weighed and used for the analysis of the total flavonoid content.

Table 2 - Weighted volumes for the analysis of total flavonoid content

Pipe	<i>Rhamnus sample purshian</i>	70% methanol	ALCL3 5%	70% methanol
1	White	1000 μL	75 μL _	4 ml
2	White	1000 μL	75 μL _	4 ml
3	100 μl	900 μL	75 μL _	4 ml
4	500 μL	500 μL	75 μL _	4 ml
5	1000 μL	-	75 μL _	4 ml

Methodology used to perform the determination of total flavonoids.

2.3 DETERMINATION OF *Rhamnus ANTI-OXIDANT POTENTIAL purshian*

2.3.1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical method

Our organism is a producer of oxygen and anion radicals, since these are important for the physiological and biochemical reactions of our organism. It happens that, in excess, in pathophysiological situations and without the use of antioxidants, which can prevent its propagation, diseases and various damages can be initiated (DUARTE ALMEIDA, *et al*, 2005). Antioxidants are characterized as substances that prevent or inhibit the oxidation of oxidizable molecules, which can be enzymatic or non-enzymatic. Thus, its daily consumption, present in phenolic compounds, foods and plants are able to act by delaying the oxidative stress caused by free radicals (GALLEGO, 2017).

There are many techniques used to evaluate an antioxidant potential. *Rhamnus extract purshiana* was analyzed using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical photo-colorimetric method, with modifications (CHOI *et al.*, 2002). This method is based on the transfer of electrons by scavenging free radicals and takes ascorbic acid as a standard substance, as it has proven antioxidant activity. The free electron in the DPPH molecule is represented by the purple color with absorption in methanol or ethanol at 515-520 nm and when reduced in

diphenyl - picryl -hydrazine, it turns into a yellow color. As a consequence, the reaction can be controlled by decreasing the absorbance in a spectrophotometer.

For sample preparation, 15g of *Rhamnus extract was weighed purshiana* and diluted in 90 ml of H₂O. Then, it was left to rest for 30 minutes. For the DPPH solution, it was necessary to weigh 0.00400g of DPPH, homogenize it in methanol, then transfer it to a 100 ml volumetric flask until complete. It was left to rest for 30 minutes.

Continuing, the control solution was made with 500 uL of methanol plus 2,500 uL of DPPH. As for the samples, 6 tubes were used and 500 uL of the solution plus 500 uL of methanol were added to prepare them. Then, 500 uL of the first tube was pipetted (transferred to the second), 500 uL of DPPH was added and this step was repeated until the last tube. Then 2,500 DPPH was added to all of them, they were all homogenized, and for 30 minutes, in the dark, the tubes were left to rest. The blank of the apparatus was methanol itself.

Afterwards, the reading was carried out in the spectrophotometer at 517nm. To determine the potential to eliminate the DPPH radical (% antioxidant activity) the calculation below was used:

$$\text{Antioxidant Activity (\%): } (\text{Ac-Aam} / \text{Ac}) \times 100$$

Where: Ac = absorbance of the DPPH solution without the sample and Aam = sample absorbance with DPPH.

After reading, the DPPH standard curve was constructed by plotting the average value of the absorbances obtained from the crude extract of *Rhamnus purshiana* versus the standard concentration, enabling the analysis of the antioxidant capacity of the crude Cascara Sagrada extract when the standard curve and the extract itself reach 50% of DPPH free radical scavenging activity (IC₅₀).

Table 3 demonstrates the procedure performed for the analysis of the antioxidant test.

Table 3 – Procedure performed for the analysis of the antioxidant test

Sample Preparation	
<i>Rhamnus sample purshian</i>	H2O
15g	90ml
DPPH Solution	
DPPH sample	Homogenization
0.00400g	Methanol
Control Solution	
Methanol	DPPH
500uL	2,500 UL
White: Methanol	
Procedure	
8 tubes	500uL solution + 500uL of metanol
*last tube (pipette and discard)	

2.4 DETERMINATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Rhamnous EXTRACT purshian*

2.4.1 Microorganisms and culture conditions

The *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Serratia marcescens* (Clinical isolate), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Candida albicans* (ATCC 14053 and ATCC 24433) belonging to the bacterioteca of the Research Laboratory in Oral Microbiology (LAPEMICRO). These microorganisms were maintained in a culture medium with glycerol and frozen at -80 °C. It was then thawed and inoculated into *Brain Heart Infursion* (BHI) broth and incubated for 24 hours. Afterwards, they were seeded on Nutrient and Sabouraud agar (for yeasts) and incubated again for 24 hours at 37 °C.

2.4.2 Diffusion disc

The disk diffusion test proposed by Bauer et al. (1966) on Mueller Hinton agar was used to perform the preliminary susceptibility assay. Inoculums (0.5 on the *Mcfarland scale*) containing the different strains were seeded in petri dishes containing Mueller Hinton agar. Afterwards, 10 µl of the solution containing the extract (at concentrations of 2, 5 and 10 mg/ml) were added to the disks, which in turn were deposited on the plate. The plate was incubated for 24 hours at 37 °C in a bacteriological oven and after this period, the halos were measured (in mm). The assay was performed in duplicate.

2.4.3 Determination of the minimum inhibitory concentration (MIC)

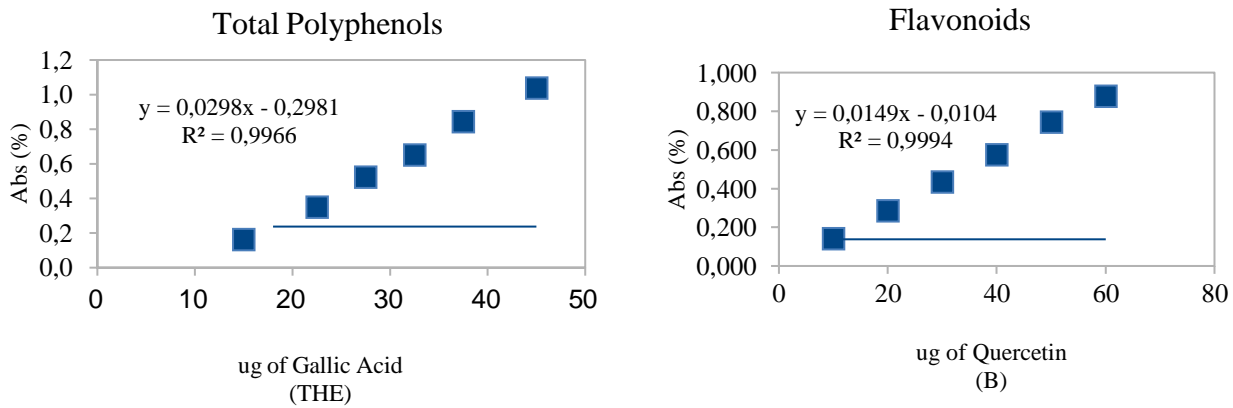
Minimal inhibitory concentration for *Rhamnus extract purshiana* against *Serratia strains marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* was performed by the microdilution method in a 96-well plate (CLSI, 2015) with modifications. A serial dilution of Cascara Sagrada extract (5 - 0.039 mg/ml) was made in Mueller Hinton broth and then 15 µl of the inoculum containing the microorganism was added to the Elisa plate. The positive growth control was considered as a well with inoculum in broth and the negative control as only broth without inoculum. The assay was performed in triplicate. The plate was incubated for 24 hours at 37°C and after incubation, the assay was developed with 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 DETERMINATION OF SECONDARY METABOLITES

The determination of secondary metabolites, total polyphenols and total flavonoids quantified in the crude extract of *Rhamnus purshiana* were calculated from the calibration curves of the standard substances for each metabolite. Figure 1 demonstrates the calibration curve constructed with Gallic Acid and for Quercetin.

FIGURE 1 – Calibration curve constructed with gallic acid (a) used to quantify the content of total polyphenols (A); and the one constructed to quantify flavonoids (B)



From the calibration curves of the standards, the equations of the straight line obtained for each tested compound were measured, according to Table 4.

Table 4 - Equation of the straight line and value of "r" for each secondary metabolite researched

Secondary metabolites	Line Equation	value of "r"	Pattern
Total Polyphenols	$y = 0.0298x - 0.2981$	$R^2 = 0.9966$	Gallic Acid
flavonoids	$y = 0.0149x - 0.0104$	$R^2 = 0.9994$	Quercetin

From these equations, the amount of each secondary metabolite present in the sample can be calculated. Table 5 below demonstrates these results.

Table 5 - Contents of polyphenols and flavonoids in the crude extract of *Rhamnus purshian*

Total Polyphenols		
<i>Rhamnus extract purshian</i>	(mg/g)	Flavonoids (mg/g)
Crude bark extract	4.00	2.98

Gallic acid, a compound derived from hydroxybenzoic acids, and from the shikimic acid pathway is defined as tannin, since it has three hydroxyl groups in its chemical structure. Interposed by secondary metabolism and found in plants, it stands out thanks to its antioxidant and antimelanogenic functionality, which is important for the skin. It also has anti-inflammatory, antimutagenic and antitumor activity (LIMA, 2014).

Thus, in order to evaluate the presence of total polyphenols in the extract of *Rhamnus purshiana*, the Folin-Ciocalteu method was used and gallic acid was used as a standard substance for this quantification. Thus, it is possible to observe a color that will change from tungsten blue to a more transparent one, indicating that the greater this difference in color, the greater the amount of polyphenols.

Still, the concentration of the sample needed to be within the threshold of the standard curve, and it cannot be too concentrated, as it might not be possible to quantify it. As for the *Rhamnus* sample results *purshiana*, they were 0.284, 0.286, 0.243 respectively, and the final estimated value was 4.0 ± 0.27 mg/g.

The result of the dosage of polyphenols obtained from the crude extract of Cascara Sagrada of this study was compared with that of Nascimento and Kavamoto (2015), who found the result of 9.179 mg/g as the final value for the content of total polyphenols (value 2, 29 times higher than that obtained in this study), using the same test, the Folin-Ciocalteu test. A new study, this time with *Scutia buxifolia*, popularly known as coronilha, species belonging to the Rhamnaceae family, same as Cascara Sagrada, with diuretic, hypotensive and cardiotonic functions, evaluated the polyphenol content which resulted in 102.2 ± 0.71 mg/g (value 25.5 times higher than that obtained in this study) (BOLIGON *et al*, 2009).

Quercetin is a flavonoid that is present in the human diet, mainly in apples, onions and broccoli. Antioxidant and present in foods in the glycosylated form, it has the ability to influence its own absorption, being more effective in humans. Rutin aglucone has pharmacological action with immunological, antiviral, anti-inflammatory and gastroprotective properties (BEHLING *et al*, 2004). Thus, the evaluation of the total flavonoid content in the *Rhamnus* extract *purshiana*, was performed using quercetin as a standard substance.

After quantification, the content of flavonoids found in the crude extract of *Rhamnus purshiana* was 2.98 ± 0.11 mg/g, not showing a satisfactory quantitative value when compared with the analysis of the bark of *Ziziphus joazeiro* Mart., popularly known as joazeiro, which expressed a value 5.34 times greater than that of Cascara Sagrada, that is, 15.94 ± 0.47 mg/g. With significant value is also that of *Scutia boxwood* which presented a value of 83.47 ± 0.93 (SILVA, 2009).

There are many factors that can affect the concentration of these secondary metabolites and this may explain the difference in these comparisons of results mentioned above, since the preparation of the plant extract, the time when the compound in question was harvested, the location of this collection and the method used for the analysis of total polyphenols can intervene in the quantification of the metabolite of *Rhamnus purshiana* _ However, despite all

these interferences being an important bias and that may be associated with the extract under analysis, the results obtained were considered low and not very significant, although with little potential.

3.2 DETERMINATION OF *Rhamnus*' ANTIOXIDANT POTENTIAL *purshiana*

3.2.1 Determination of antioxidant capacity by the 1,1-diphenyl, 2-picrylhydrazyl (DPPH) method

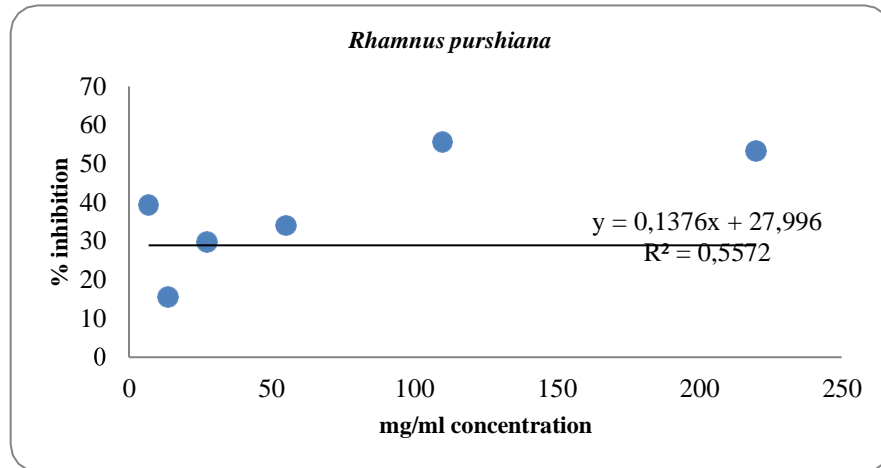
The analysis of the antioxidant potential was performed by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging method. This technique makes it possible to verify the antioxidant capacity of different compounds and is based on the reduction or neutralization of the radical. From the value of the absorbances obtained and the concentration of the solution (Table 6) a calibration curve for the DPPH was plotted and the IC₅₀ (inhibitory concentration capable of scavenging 50% of the DPPH radical) of the crude extract of *Rhamnus was calculated. purshiana* as shown in Figure 2.

Table 6 - Result of the absorbance value obtained *versus* solution concentration

mg/ml concentration	Absorbance	% Inhibition
220	0.459	53.2229376
110	0.435	55.6374245
55	0.65	34.0076459
27.5	0.692	29.7822938
13.75	0.833	15.5971831
6,875	0.508	39.3264957
Control	0.936	

Data were treated by Simple Linear Regression, through the graph, as shown in figure 2.

FIGURE 2 - Calibration curve that relates the percentage of inhibition of the DPPH radical with the concentration of *Rhamnus extract purshiana* responsible for this inhibition



The results presented for the *Rhamnus extract purshiana* an IC50 at 1.78 mg/ml. Thus, it is clear that, since the percentage of antioxidant activity is equivalent to the amount of DPPH consumed, the greater the consumption of DPPH by the sample, the greater the expected antioxidant capacity. Thus, it is concluded that the higher the concentration of the sample and the lower the absorbance, the greater the consumption of DPPH, which makes the *Rhamnus extract purshiana* a good antioxidant.

Study with the species *Ziziphus guaranític*, also from the family Rhmnaceae, the same as Cáscara Sagrada, detailed that the IC50 value for the analysis performed with its stem bark was 64 mg/ml, the lowest of the concentrations tested and with a 50% reduction in free radicals. (SOUSA, 2016). *scutia buxifolia* also showed positive results for antioxidant activity, with an IC50 of 34.57 mg/ml. Authors claim that there is a link between phenolic compounds and antioxidant activity, when using Folin-Ciocalteu and DPPH for tests (Bolignon, *et al.* 2009). Even at low concentrations, both markers are found in Cascara Sagrada.

3.3 DETERMINATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *Rhamnus EXTRACT purshian*

In the practice of clinical microbiology, testing antimicrobial susceptibility is one of the essential methods for differentiating disease-causing agents and enabling health professionals to correctly direct the appropriate treatment for the purpose of therapeutic efficacy. Even so, bacterial resistance is recurrent, causing the large pharmaceutical companies to launch more drug options every day to try to contain this public health problem. We know that this tactic is also mercantilist, since antimicrobials performed their pharmacological potential if they were specific and adequate (TURNIDGE, JD; JORGENSEN, JH, 1999).

Bauer *et al* (1966) developed the disc diffusion method, which is characterized by the technique of impregnating an antimicrobial agent on a filter paper disc, by diffusion in agar. This diffusion will then form a halo of inhibition of bacterial growth, and the diameter of this halo will be proportional to the minimum inhibitory concentration (MIC). The result of this method allows classifying the sample as susceptible, intermediate, resistant or antimicrobial.

Regarding the MIC, also called dilution in tubes, the method is based on evaluating the activity of an antimicrobial agent in its minimum growth inhibitory concentration and is performed through culture tubes where different concentrations of the test microorganism will be inoculated in each tube for further visual analysis of probable growth or not, through the presence of turbidity and thus, the one with the lowest concentration of the agent capable of inhibiting the growth of the test microorganism determines the MIC (OLIVEIRA, 2009).

Thus, after the incubation period, by the disk diffusion test, there was no formation of zones of inhibition. The extract was not able to inhibit the growth of the microorganisms tested at concentrations of 2, 5 and 10 mg/ml by the disk diffusion technique. As for the determination of the minimum inhibitory concentration, the method revealed that the extract did not inhibit visible microbial growth at the concentrations tested (5 – 0.039 mg/ml).

Sousa (2016) also evaluated the antibacterial activity of the stem barks of the species *Ziziphus guaranítica* Malme by the MIC method for *Enterococcus strains. faecalis*, and *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and the result proved to be similar to that of *Rhamnus purshiana*, since it did not inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli strains tested*. The analysis was also performed with the extract of joazeiro bark, however, there was no growth inhibition of the test microorganism.

The antimicrobial activity was also evaluated for the species *Rhamnus sphaerosperm* var *pubescens*, popularly known as Cangica and Fruto-de-pombo. Through the microdilution method, *Staphylococcus aureus* ATCC® 25293™, *Staphylococcus epidermidis* ATCC® 12228™, *Salmonella thyphimurium* ATCC® 14028™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™, *Escherichia coli* ATCC® 25922™ and *Candida albicans* SC5314 were subcultured in BHI broth and incubated for 24 hours at 37°C. The turbidity analysis indicated that there was no growth inhibition of the tested strains, only the highest concentration analyzed, which was 400 µg / mL for the Canjica stem, resulted in growth inhibition of *Salmonella thyphimurium* and *Escherichia coli* (MOREIRA, 2012).

4 CONCLUSION

Considering the increase in consumption by the global population of medicinal and herbal plants, with the therapeutic objective of relieving symptoms, treating diseases and palliative care, it is necessary to constantly update scientific studies related to the pharmacological and toxicological activities of these natural compounds to ensure safety professionals when indicating or prescribing these drugs.

The present work aimed to determine the secondary metabolites of *Rhamnus purshiana*, also popularly known as Cascara Sagrada, in addition to quantifying the phytochemical panel, analyzing the antioxidant activity and the microbiological panel. Relevant results were obtained that certify the safety and efficacy of this extract.

The extract presented in its composition total phenols (4.00 ± 0.27 mg/g) and flavonoids (2.98 ± 0.11 mg/g). It has antioxidant action ($IC_{50}=1.78$ mg/g) with the ability to capture reactive oxygen and nitrogen species. No proven antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Serratia Resumen marcences* *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

Thus, based on the results presented and referenced in this dissertation, it is concluded that the species *Rhamnus purshiana* is a good herbal medicine and has therapeutic activity. Thus, it is important that studies about it are periodically updated to continue to provide safety and efficacy to individuals who need it for the treatment of their ailments.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Cknowledgements

The authors thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Federal University of Santa Maria (UFSM/RS) for their financial support.

5 REFERENCES

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira** - 1ª edição. Brasília, 2016.

BARROS, Y. Y. de. **Avaliação das interações entre receptor pregnano x e medicamentos fitoterápicos de interesse ao SUS**, 2017. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília. Brasília, 2017.

Bauer, A.W. et al. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. Am. J. Clin. Microbiol., 40: 2413-5, 1966.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. **Flavonóide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas**. Alim. Nutr., araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BOLIGON, A. A. Potencial antioxidante in vitro, conteúdo de fenóis e flavonóides nos ramos de *scutia buxifolia reissek*. **Saúde**, Santa Maria, vol 35, n 1: p 34-38, 2009.

BORGES F. V.; SALES, M. D. C. Políticas Públicas de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil: sua história no sistema de saúde. **Pensar Acadêmico**, Manhauçu, v. 16, n. 1, p. 13-27, janeiro-junho, 2018.

CÁSCARA SAGRADA. **Florien**: 2016. Bula de remédio.

CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinonereductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguayensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 3583-3589, 2004.

CHOI, C. W. *et al.* Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v.63, p.1161-1168, 2002.

CLSI, C. L. S. I. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. CLSI document M07-A9. **Clinical and Laboratory Standars Institute**, v. 32, n. 2, 2015.

DUARTE-ALMEIDA, *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais dpph•1. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(2): 446-452, abr.-jun. 2006.

GALLEGO, Tatiane Barberá. **Potencial antioxidante do chá da *Artemisia annua* em diferentes modos de preparo. 2017. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2017.**

GOUVEIA, G. D. A.; SIMIONATO, C. **Memento fitoterápico para prática clínica na AB** [recurso eletrônico]. Universidade Federal de Santa Catarina, Núcleo Telessaúde Santa Catarina – Florianópolis: CCS/UFSC, 2019. 87 p: ils. Disponível em: <https://ares.unasus.gov.br/acervo/html/ARES/13389/1/Memento_FINAL.pdf>. Acesso em 15 jan. 2022.

LIMA, K. G. **Avaliação do efeito do ácido gálico no tratamento de células de hepatocarcinoma HEPG2.** 2014. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2014.

LOBO, C. R. Cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*): Uma Revisão de Literatura. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires.** 2012; Julho-Dezembro (2): 171-178.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução,** Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MOREIRA, T. F. **Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Rhamnus shaerosperma var. puberscens* (Reissek) M.C. Johnst. (Rhamnaceae).** 2012. 96 p. Dissertação (Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

NASCIMENTO, M. A. P. do. **Interação medicamentosa entre fitoterápicos oferecidos pelo sistema único de saúde e medicamentos convencionais.** [manuscrito]. 2020. 91 f.

NUNES-PINHEIRO, D. C. S. *et al.* Atividade imunomoduladora das plantas medicinais: Perspectivas em medicina veterinária. Campus do Itaperi, Fortaleza, Ce. **Ciência Animal**, 13(1):23-32, 2003.

OLIVEIRA, T. F. **Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 16 p.

RIO, R.G.W. 1996. **Métodos de controle químico de amostras de própolis.** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RODRIGUES, A, G.; SANTOS, M. G.; AMARAL, A. C. F. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos.** In: _____. Capítulo 1 - Políticas Públicas em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p. 9-28.

SAAD, G.de.A.; LÉDA, P.H.de.O.; SÁ, I.M.de.; SEIXLACK, A.C. **Fitoterapia contemporânea: tradição e ciência na prática clínica.** In: _____. Capítulo 4 – Fitoquímica e Farmacologia Aplicada. Guanabara Koogan, 2016.

SILVA, T. C. L **Avaliação comparativa de cascas e folhas de Ziziphus joazeiro Mart (RHAMNACEAE) em relação aos perfis fitoquímico e toxicológico e as atividades antioxidante e antimicrobiana.** 2009. 75. P. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Unjversidade Federal de Pernambuco – Recife, 2009.

SOUZA NETO, Manoel André de. **Ziziphus joazeiro Martius: estudo fitoquímico do extrato hidroetanólico das folhas, fracionamento bioguiado anti-Candida e avaliação do efeito protetor em modelo de doença inflamatória intestinal.** 2016. 261f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

TURNIDGE, J.D. & Jorgensen, J.H. **Antimicrobial susceptibility testing: General considerations.** In: Murray, R.P. et al. Manual of Clinical Microbiology. 7. ed. American Society for Microbiology, Washington DC, 1999, p. 1469-71.

APÊNDICE B - COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO AO PERIÓDICO REGULATORY TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY


Regulatory Toxicology and Pharmacology


HOME • LOGOUT • HELP • REGISTER • UPDATE MY INFORMATION • JOURNAL OVERVIEW
MAIN MENU • CONTACT US • SUBMIT A MANUSCRIPT • INSTRUCTIONS FOR AUTHORS • POLICIES

Role: Author | Username: Juliana Zamboni

← Submissions Being Processed for Author

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Results per page 10

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Phytochemical study and evaluation of the antioxidant and antimicrobial potential of the crude extract of <i>Rhamnus purshiana</i>	Jun 26, 2022	Jun 26, 2022	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Results per page 10