
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS COMO PARÂMETROS NO CONTROLE DE QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*

PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERISTICS AS PARAMETERS FOR QUALITY CONTROL OF PLANT MATERIAL *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*

Thais Fernanda Moreira¹, Daniella Maria Soares de Oliveira², Maria Fernanda Cordeiro Arruda¹, Cristiane Bezerra da Silva², Patricia Maria Stuelp Campelo³, Marilis Dallarmi Miguel⁴, Obdulio Gomes Miguel⁵

¹Aluna de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

²Aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

³Professor Adjunto de Bioquímica do Curso de Farmácia PUCPR

⁴Professor Adjunto de Farmacotécnica do Curso de Farmácia UFPR.

⁵Professor Adjunto de Fitoquímica do Curso de Farmácia UFPR.

e-mail para correspondência: tf.moreira@yahoo.com.br

RESUMO:

A espécie vegetal *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, que é nativa no Brasil, apresenta um grande potencial farmacológico por ser enquadrada no gênero *Rhamnus*, e possui poucos estudos relatam suas propriedades biológicas, e ainda não foram descritos os parâmetros físico-químicos para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal desta espécie. Sendo assim, neste trabalho, os parâmetros físico-químicos, como o teor de umidade, cinzas totais e insolúveis em ácido foram determinados pela primeira vez para esta espécie. Também foi realizada a prospecção fitoquímica, que indentificou a presença marcante de compostos antraquinônicos, que podem ser utilizados como marcadores químicos. Análises microquímicas também foram realizadas, e confirmaram características estruturais presentes em caules e folhas, que já haviam sido descritas na literatura em análises morfonatômicas. Os extratos e frações de caules e folhas deste vegetal também não apresentaram toxicidade em métodos preliminares em *Artemia salina* e hemólise, sendo, de maneira geral, considerados atóxicos nestes métodos, o que permite a sequência com estudos farmacológicos e toxicológicos que comprovem a segurança e eficácia destes extratos, para a obtenção de medicamentos fitoterápicos.

Palavras-chave: *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, controle de qualidade, antraquinonas.

ABSTRACT

The plant species *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, which is native to Brazil, has great potential for pharmacological be framed in the genus *Rhamnus*, and few studies have reported their biological properties, and are not yet described the physicochemical parameters for quality control of raw material plant of this species. Therefore, in this study, the physicochemical parameters such as humidity content, total ash and acid insoluble ash were determined for the first time for this species. We also carried out a phytochemical tests that identified anthraquinones, which can be used as chemical markers. Analyzes were also performed and confirmed the structural features present in stems and leaves, which had been described in the literature. The extracts and fractions of stems and leaves of this vegetable also showed no toxicity in primary methods *Artemia salina* and hemolysis, allowing the sequence with pharmacological and toxicological studies proving the safety and efficacy these extracts, to obtain herbal medicines.

KEYWORDS: *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, quality control, anthraquinones.

1. INTRODUÇÃO

Os medicamentos fitoterápicos são obtidos por meio do uso exclusivo de matérias-primas vegetais, e devem ser caracterizados por sua eficácia e segurança comprovadas, além da reprodutibilidade de sua qualidade. Desta maneira, a identidade botânica, o processo de coleta, estabilização e secagem, e o método de extração são fatores que devem ser controlados para garantir a qualidade do medicamento. Além destes fatores importantes, a natureza e a quantidade de princípios ativos presentes em plantas medicinais, também devem ser consideradas, pois, variam de acordo com a época de coleta, temperatura, umidade, solo e ritmo circadiano do vegetal (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Sendo assim, a padronização de um método de extração garante a reprodutibilidade do medicamento fitoterápico, no caráter químico e biológico, desde que a produção e coleta do material vegetal estejam padronizadas, pois a reprodução das propriedades biológicas de interesse depende diretamente da composição química.

Esta grande possibilidade de variações contribue para a dificuldade na elaboração de extratos e medicamentos fitoterápicos padronizados. Além disso, atualmente ainda existe a necessidade de estudos relacionados a plantas medicinais brasileiras, pois, apesar do grande números de trabalhos neste campo, muitas espécies carecem de estudos para comprovação da sua eficácia e segurança e/ou para a identificação de seus compostos.

Dentro deste contexto está a espécie vegetal *Rhamnus sphaerosperma* var.

pubescens, que é nativa no Brasil, não endêmica, comum aos biomas Cerrado e Mata Atlântica. É encontrada na região sul e popularmente conhecida como Cangica ou Fruto-de-pombo. Apresenta como sinônimos botânicos relevantes os seguintes nomes: *Rhamnus pubescens* var. *chrysophylla* e *Rhamnus pubescens* var. *glabrescens* (LIMA, 2010).

Este vegetal pertence a família Rhamnaceae, que é descrita pelo potencial terapêutico de suas espécies, sendo as espécies *Rhamnus purshiana* e *Rhamnus frangula* as mais conhecidas no Brasil, as quais são utilizadas principalmente por suas propriedades laxativas, devido a sua composição rica em antraquinonas (SYDISKIS et al., 1991). O gênero *Rhamnus* inclui ainda espécies com grande importância farmacológica, que são amplamente utilizadas na medicina popular como antiinflamatórias, antihipertensivas e no tratamento do câncer (TERENCIO et al., 1991; WEI et al., 2001; NG et al., 2007; AMMAR et al., 2008; AMMAR et al. 2011; BHOURI et al., 2011).

Rhamnus sphaerosperma var. *pubescens* apresenta um grande potencial farmacológico por ser enquadrada no gênero *Rhamnus*, entretanto poucos estudos relatam suas propriedades biológicas, e ainda não foram descritos os parâmetros físico-químicos para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal desta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal, extração e fracionamento

As folhas e caules de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* foram coletados na cidade de Curitiba/PR, em maio de 2011. A identificação botânica foi realizada através da exsicata de número 243989, no Museu Botânico Municipal de Curitiba, pelo curador Osmar dos Santos Ribas. O material vegetal seco e moído (2Kg) foi submetido a extração com etanol absoluto em aparelho de Soxhlet modificado. O extrato etanólico bruto obtido foi seco e particionado com hexano, clorofórmio e acetato de etila, em aparelho de Soxhlet modificado, originando as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila (KALEGARI, et al., 2012).

2.2 Análise do teor de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido

As metodologias utilizadas para a determinação da umidade (perda por dessecação), cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido foram realizadas conforme descrito na Farmacopéia brasileira V. O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi utilizado para a determinação das cinzas insolúveis em ácido. As porcentagens de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido foram calculadas em relação à matéria-prima

vegetal seca. Todas as análises foram realizadas em sextuplicata e os resultados estão apresentados como média±desvio padrão.

2.3 Ensaio sistemático de prospecção fitoquímica

O ensaio sistemático tem como objetivo a identificação dos principais grupos do metabolismo secundário das espécies vegetais, através da identificação por reações de precipitação ou coloração. Foram utilizados os extratos aquoso 20% (m/v) e hidroalcoólico 20% (m/v), ambos obtidos por maceração, para pesquisa da presença dos grupos químicos:

Extrato Aquoso: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogenéticos, taninos condensados, taninos hidrolizáveis, aminogrupos e flavonóides.

Extrato hidroalcoólico: glicosídeos flavônicos, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos (MOREIRA, 1979; MIGUEL, 2003).

2.4 Análises microquímicas

Os testes microquímicos foram realizados para a verificação de componentes químicos marcadores nos tecidos vegetais. Para a realização dos testes, amostras frescas de folhas e caules, obtidas a 5 cm do ápice dos ramos, foram coletadas e fixadas em solução de formaldeído, ácido acético e álcool (FAA). Posteriormente foram realizados cortes transversais a mão livre para a confecção das lâminas. Através de reações de identificação com reagentes químicos específicos, foram pesquisados compostos fenólicos (cloreto férrico), substâncias lipofílicas (Sudam III), amiloplastos (lugol) e lignina (floroglucina clorídrica) (KRAUS; ARDUIN, 1997). O material foi observado em microscópio óptico, no aumento de 200 vezes, e fotografado com o auxílio de câmera fotográfica para microscópio óptico, modelo TCA - 1.3, marca ALLTION®.

2.5 Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*

Os ovos de *Artemia salina* foram estimulados a eclodir para a obtenção dos náuplios. Para isso, os ovos (200 mg/400 mL) foram colocados em solução salina (23 g NaCl; 11 g MgCl₂·6H₂O; 4 g Na₂SO₄; 1,3 g CaCl₂·2H₂O ou CaCl₂·6H₂O; 0,7 g KCl, 1000 mL de água destilada, pH 9), sob aeração contínua, exposição à iluminação (20W) e temperatura ambiente durante 48 horas. O ensaio foi realizado para os extratos brutos e suas respectivas frações, das folhas e caules, nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL. As amostras foram diluídas em etanol e colocadas em frascos adequados para

a realização do teste. O solvente foi evaporado em estufa a 50°C, 24 horas antes do teste. Como controle positivo, foi utilizado sulfato de quinidina, nas mesmas concentrações das amostras. Também foi realizado o controle com etanol. Todos os testes foram realizados em triplicata. Foram transferidos 30 náuplios de *Artemia salina* para cada frasco contendo as amostras ou controles e o volume foi ajustado para 2,5 mL. Após 24 horas de contato com as amostras, foi realizada a contagem dos indivíduos mortos. Os dados foram submetidos à análise pelo método estatístico Probitos para a determinação dos valores de DL₅₀ com intervalo de confiança de 95%. As amostras foram consideradas tóxicas quando os valores de DL₅₀ se apresentaram menores que 1000µg/mL (MEYER *et al.*, 1982).

2.6 Análise da atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica das amostras (extratos brutos e frações) foi realizada conforme preconizado no manual de Métodos de Controle de Qualidade para Materiais de Plantas Medicinas divulgado pela Organização Mundial as Saúde (OMS, 1998).

A suspensão de hemácias de sangue de carneiro a 2% (v/v), previamente lavadas, foi preparada em tampão fosfato pH 7,4, e então colocada em contato com as amostras nas concentrações de 50, 100, 250 e 500 µg/mL. Após homogeneização, os tubos foram incubados em repouso, a temperatura ambiente durante 180 minutos. Após o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados por 5 minutos, a 2500 r.p.m., e foi verificada a formação de hemólise total (solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos). Para quantificação da menor concentração com atividade hemolítica, as amostras que causaram hemólise no primeiro ensaio foram testadas em concentrações que variaram de 50 até 500 µg/mL, durante 24 horas em temperatura ambiente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Material vegetal, extração e fracionamento

O rendimento do extrato etanólico bruto, obtido por extração em aparelho de Soxhlet modificado com o solvente etanol, para o caule foi 3,962%±0,169 e para as folhas foi de 16,214%±0,281.

A padronização de um método de extração é necessária para garantir a reprodutibilidade da composição química, e conseqüentemente, da segurança e eficácia terapêutica de medicamentos fitoterápicos. Neste estudo, o método selecionado foi a extração em aparelho de Soxhlet modificado, empregando etanol

como solvente. Este processo utiliza baixas temperaturas de trabalho (não ultrapassam 60°C) e ocorre a solvatação da amostra pelo solvente, o que previne a degradação térmica. Além disso, trata-se de um sistema fechado, onde a perda de componentes voláteis é menor em comparação a outros métodos, como infusão e decocção. Este aparelho é importante também na economia dos solventes utilizados no processo, uma vez que a extração é feita com refluxo, promovendo o reaproveitamento do solvente, e ainda permite a extração até o esgotamento do vegetal (CARVALHO, 2001).

3.2 Análise do teor de umidade, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido

Os parâmetros para as análises do teor de umidade, cinzas totais e insolúveis em ácido estão sendo determinados pela primeira vez para a espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*. Os dados obtidos por meio dessas análises estão sumarizados na tabela 2.

TABELA 2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MATERIAL VEGETAL.

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

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

3.3 Ensaio sistemático de prospecção fitoquímica

Os ensaios fitoquímicos preliminares são utilizados como guias para o isolamento de substâncias, pois informam os principais grupos de metabólitos presentes na amostra.

Os resultados obtidos durante a pesquisa dos grupos de metabólitos secundários para folhas e caules da espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* podem ser observados na tabela 3.

TABELA 3. Classe de metabólitos identificados pela análise sistemática fitoquímica em *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

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

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

3.4 Análises microquímicas

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

A partir da reação de coloração com Sudam III foi observado que a folha é revestida por uma cutícula delgada, de característica lipofílica, e que possui tricomas também revestidos por esta cutícula. Este teste demonstrou a presença de suberina no revestimento do caule, o qual também possui tricomas. Através do teste com floroglucina clorídrica foram observadas estruturas lignificadas no caule e nervura central da folha.

Existem poucos dados relacionados à caracterização de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*. Em um estudo, que realizou a análise microscópica

das folhas e caule deste vegetal, foi constatado que a folha é hipoestomática, com estômatos do tipo anormocítico; possui tricomas tectores longos, pluricelulares e unisseriados predominantes na face abaxial. Foram observadas ainda drusas e células mucilaginosas nas folhas. O caule apresenta epiderme, fibras gelatinosas, fibras lignificadas e um cilindro floemático externo ao xilemático. Foram evidenciados canais secretores, drusas e células com compostos fenólicos na nervura central e pecíolo da folha e no caule (DUARTE, 2008).

Estas análises complementam os resultados obtidos pela prospecção fitoquímica e pelos testes físico-químicos, e são importantes para determinar as características que definem a espécie vegetal. Esses testes são úteis no controle de qualidade da matéria-prima vegetal, pois, uma vez identificadas suas características estruturais e químicas, como por exemplo a presença de compostos fenólicos, amido ou quais estruturas são lignificadas, é possível determinar possíveis trocas da matéria-prima, garantindo o uso correto da planta medicinal.

3.5 Avaliação da toxicidade em *Artemia salina*

No ensaio de toxicidade em *Artemia salina* (microcrustáceo de água salgada) as amostras foram consideradas tóxicas quando os valores de DL_{50} foram menores que 1000 $\mu\text{g/mL}$. Como controle positivo foi utilizado sulfato de quinidina nas mesmas concentrações das amostras. Neste ensaio, nenhuma das amostras testadas de *R. sphaerosperma* var. *pubescens* apresentou toxicidade frente aos microcrustáceos.

Este é um teste preliminar, rápido e eficiente, que determina se a amostra testada possui indícios de toxicidade em apenas 24 horas. Permite ainda o direcionamento de estudos com extratos vegetais, de maneira que substâncias tóxicas para o microcrustáceo podem ser testadas para outros fins, como por exemplo, herbicidas e inseticidas. Por outro lado, compostos que demonstram ausência de toxicidade devem prosseguir para estudos farmacológicos e toxicológicos *in vivo* para comprovação da sua eficácia e segurança (MEYER *et al.*, 1982).

3.6 Análise da atividade hemolítica

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

Para o teste de atividade hemolítica em sangue de carneiro em suspensão a

2%, apenas a fração hexano do caule apresentou atividade hemolítica, sendo 250 µg/mL a menor concentração com capacidade hemolítica. Como o extrato bruto do caule não apresentou atividade hemolítica em nenhuma concentração testada pode-se supor que as substâncias hemolíticas presentes neste extrato apenas exercem este efeito em concentrações elevadas, uma vez que o processo de fracionamento promove a concentração de substâncias na amostra. Ou ainda, pode haver a presença de outros compostos no extrato bruto que são capazes de inibir ou neutralizar a ação hemolítica dos compostos da fração hexano, e assim, a atividade hemolítica não é observada para o extrato bruto do caule.

4. CONCLUSÃO

Neste estudo foram estabelecidos parâmetros que podem ser utilizados no controle de qualidade da matéria-prima vegetal de folhas e caules da espécie *Rhamnus sphaerosperma* var *pubescens* para a produção de medicamentos fitorápicos.

Neste trabalho, parâmetros físico-químicos, como o teor de umidade, cinzas totais e insolúveis em ácido foram determinados pela primeira vez para esta espécie. E na prospecção fitoquímica foi possível indentificar a presença marcante de compostos antraquinônicos, que após a elucidação estrutural, podem ser utilizados como marcadores químicos para matéria-prima vegetal e extratos. As análises microquímicas, testes rápidos úteis para identificar substâncias químicas no material vegetal, confirmaram características estruturais presentes em caules e folhas, que já haviam sido descritas na literatura em análises morfonatômicas.

Os extratos e frações de caules e folhas deste vegetal também não apresentaram toxicidade em métodos preliminares, sendo, de maneira geral, considerados atóxicos nestes métodos, o que permite a sequência com estudos farmacológicos e toxicológicos que comprovem a segurança e eficácia destes extratos, para a obtenção de medicamentos fitoterápicos.

5. REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

KALEGARI M, MIGUEL MD, PHILIPPSEN AF, DIAS JFG, ZANIN SMW, LIMA CP, MIGUEL OG. Antibacterial, allelopathic and antioxidant activity of extracts and compounds from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. V.2(09), p.061-066, 2012.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997. 198 p.

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

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

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

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

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

OMS, Quality Control Methods For Medicinal Plant Material. p. 41, 1998

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

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

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