

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PAOLA APARECIDA RAESKI

AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA, QUÍMICA E CARDIOVASCULAR DE *Baccharis
artiulata* (Lam.) Pers. (ASTERACEAE)

PONTA GROSSA
2024

PAOLA APARECIDA RAESKI

AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA, QUÍMICA E CARDIOVASCULAR DE *Baccharis
artiulata* (Lam.) Pers. (ASTERACEAE)

Tese apresentada para obtenção do título de doutora na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron.

Coorientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Júnior.

PONTA GROSSA

2024

R135 Raeski, Paola Aparecida
Avaliação microscópica, química e cardiovascular de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) / Paola Aparecida Raeski. Ponta Grossa, 2024.
94 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jane Manfron.
Coorientador: Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Junior.

1. Anti-hipertensivo. 2. *Baccharis articulata*. 3. Carqueja. 4. Microscopia. 5. Toxicologia. I. Manfron, Jane. II. Gasparotto Junior, Arquimedes. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615

	PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Associação Ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta Grossa	
---	--	---

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO **07/2024** DA DOUTORANDA **PAOLA APARECIDA RAESKI**, REALIZADA NO DIA 29 DE MAIO DE 2024, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e nove dias do mês de maio de dois mil e vinte e quatro, às 14h, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), em sessão aberta, por videoconferência, sob a presidência da Professora Doutora Jane Manfron, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da doutoranda **PAOLA APARECIDA RAESKI**, na linha de pesquisa: Avaliação Química e Biológica de Produtos Naturais, constituída pela Professora Doutora JANE MANFRON e demais Doutores (membros titulares): FABIANE FORTES (UNESPAR/PR); GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO (UEPG/PR); PAULO VITOR FARAGO (UEPG/PR); e VERA LUCIA

PEREIRA DOS SANTOS (UNINTER/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores, para arguição. O título do trabalho foi: “**AValiação MICROSCÓPICA, QUÍMICA E CARDIOVASCULAR DE ESPÉCIES DE BACCHARIS (ASTERACEAE)**”. Encerrada a defesa, a banca considerou aprovada a tese, considerada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 30 (trinta) dias, a versão definitiva da Tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: ☒ sim ☐ não

Novo título: Avaliação microscópica, química e cardiovascular de Baccharis articulata (Lam.) Pers. (Asteraceae).



JANE MANFRON
(UEPG)
Presidente



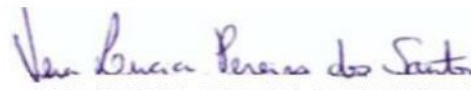
FABIANE FORTES
(UNESPAR/PR)
Titular



GUILHERME DOS ANJOS CAMARGO
(UEPG/PR)
Titular



PAULO VITOR FARAGO
(UEPG/PR)
Titular



VERA LUCIA PEREIRA DOS SANTOS
(UNINTER/PR)
Titular

Dedico a Deus, aos meus pais Jorge Luís e Maria Raeski e ao meu esposo Lucas Andrey.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo sustento, fé e sabedoria até o presente momento.

À profa. Dra. Jane Manfron, pelo tempo dedicado, apoio e incentivo a sempre buscarmos além. Por toda orientação e cuidado como mãe na pesquisa.

Ao prof. Dr. Arquimedes Gasparotto, pela coorientação e apoio nos experimentos e desenvolvimento da pesquisa.

À prof. Dra. Andressa Novatski pelo auxílio e direcionamento na pesquisa frente as análises realizadas.

Ao pesquisador Gustavo Heiden, pela identificação das amostras e esclarecimento de dúvidas durante a pesquisa.

À Luciane Mendes Monteiro e à Gabrielly Ayres, pela amizade e auxílio durante o desenvolvimento da pesquisa.

À Vanessa Chagury, técnica do C-LABMU pelo processamento das amostras e auxílio nas análises de microscopia e EDS.

Aos meus pais Jorge Luís e Maria Raeski, pelas orações, por serem meu exemplo de dedicação, força, e por sempre incentivarem na busca pelo melhor.

Ao meu esposo Lucas Andrey, pelas orações, apoio emocional, incentivo, carinho e companheirismo nas coletas e noites de trabalho.

Aos meus sogros Nádia M. F. da Silva, Devanil Pereira da Silva e minha cunhada e concunhado Evanyse Palhano e Rafael Palhano, pelas orações, carinho, apoio e incentivo.

Aos meus pastores, Miss. Adriana Jamier e Pr. João Jamier, pelas orações e palavras de ânimo e acalento.

Aos meus familiares e amigos, que sempre estiveram presentes me apoiando e me incentivando a não desistir.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, que tornaram possível esta pesquisa.

Ao C-LABMU pelo processamento e análise das amostras.

Ao National Center for Natural Products Research, da Universidade do Mississippi, especialmente ao prof. Dr. Vijayasankar Raman pelo processamento das amostras e apoio durante a pesquisa.

Ao Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular da Universidade Federal da Grande Dourados, pela parceria e desenvolvimento de parte da pesquisa.

Ao Laboratório de Pesquisa Pré-clínica de Produtos Naturais da Universidade Paranaense de Umuarama, especialmente ao Prof. Dr. Emerson Luiz, pelo processamento e liofilização das amostras.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudos durante o período de pesquisa.

À banca examinadora que se dispôs e aceitou ao convite como avaliadores deste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para
todo o propósito debaixo do céu”. (Eclesiastes 3:1).

RESUMO

O gênero *Baccharis* compreende cerca de 440 espécies, sendo muitas delas utilizadas na medicina popular para o tratamento das mais diversas afecções. Dentre as espécies do gênero, destaca-se *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., popularmente conhecida como carqueja, carquejinha ou carqueja-doce, utilizada na medicina tradicional como diurética, digestiva e antidiabética. Trata-se de uma espécie arbustiva, com coloração verde-claro a verde-acinzentado, de ramos bialados. Devido as suas semelhanças morfológicas pode ser facilmente confundida com outras espécies que possuem a mesma denominação popular. Embora seja muito utilizada popularmente, poucos são os estudos referentes à atividade farmacológica e tóxica de *B. articulata*. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar microscopicamente a espécie, a fim de evidenciar marcadores botânicos que auxiliem na diferenciação desta frente as demais carquejas, bem como sua caracterização fitoquímica, seu potencial toxicológico e sua capacidade na terapêutica cardiovascular como hipotensora. Foram realizadas análises de microscopia de luz, microscopia de luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura, a fim de evidenciar marcadores anatômicos da espécie. Análises de espectroscopia de raios x por energia dispersiva e espectroscopia raman determinaram a composição e do estado de hidratação dos cristais. A caracterização fitoquímica foi obtida através da cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas. O potencial toxicológico foi avaliado através do estudo de toxicidade aguda e genotoxicidade e a avaliação da atividade cardiovascular foi realizada através dos efeitos do extrato na pressão arterial e frequência cardíaca, bem como a avaliação das vias envolvidas no efeito hipotensor. Foram evidenciados onze morfotipos cristalinos, a saber: bipiramidal simples, bipiramidal retangular, piramidal retangular, estiloide, cuneiforme, tabular, drusa, cristal do tipo seta, areia cristalina arredondada, areia cristalina de estiloides e areia tipo gravata borboleta, os quais indicaram a composição química elementar de oxalato de cálcio. Quanto ao tipo de hidratação, tanto cristais monohidratados, quanto dihidratados foram detectados. Treze picos foram identificados na caracterização fitoquímica, sendo eles o ácido quínico, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido 5-O-feruloilquínico, apigenina-C-pentosídeo-C-hexosídeo, ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico, ácido glucuronil-quiláico, ácido cafeoil-glucuronil-trihidroxioleanólico, ácido acetil-cafeoil-glucuronil-dihidroxioleanólico. Quanto à toxicidade, *B. articulata* não apresentou toxicidade na concentração de 2000 mg/kg, nem mutagenicidade nas concentrações de 30, 100 e 300 mg/kg. Frente à análise cardiovascular, observou-se que o extrato aquoso causou uma diminuição na pressão arterial dos ratos SHR. Fornecer dados adicionais aos encontrados na literatura de *B. articulata* são de grande importância na sistemática da espécie, pois servirão de base para estudos futuros envolvendo o grupamento das carquejas, ou até mesmo do gênero *Baccharis*. Além disso comprovar o potencial terapêutico da espécie pode auxiliar em pesquisas frente ao tratamento de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Anti-hipertensivo. *Baccharis articulata*. Carqueja. Microscopia. Toxicologia. Cristais de oxalato de cálcio.

ABSTRACT

The genus *Baccharis* comprises around 440 species, many of them used in folk medicine to treat a wide variety of diseases. *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., popularly known as carqueja, carquejinha or carqueja-doce, is used in traditional medicine as a diuretic, digestive and antidiabetic. It is a shrubby species with a light green to grayish-green color and bialate branches. Due to its morphological similarities, it can be easily confused with other species that have the same popular name of carquejas. Although it is widely used, there are few studies on the pharmacological and toxic activity of *B. articulata*. The aim of this study was therefore to evaluate the species microscopically to identify botanical markers that help differentiate it from other carquejas, as well as its phytochemical characterization, its toxicological potential and its capacity for cardiovascular therapy as a hypotensive. The light microscopy, polarized light microscopy and scanning electron microscopy analyses were carried out in order to highlight anatomical markers of the species. Energy dispersive x-ray spectroscopy and Raman spectroscopy analyses determined the composition and hydration state of the crystals. Phytochemical characterization was obtained using ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The toxicological potential was assessed through acute toxicity and genotoxicity studies and the cardiovascular activity was evaluated through the effects of the extract on blood pressure and heart rate, as well as assessing the pathways involved in the hypotensive effect. New morphoanatomical features were revealed, such as the presence of eleven crystalline morphotypes, namely: bipyramidal simple, bipyramidal rectangular, rectangular pyramidal, styloid, cuneiform, tabular, druse, arrow-type crystal, rounded crystalline sand, styloid crystalline sand, and bow-tie sand, which indicated the elemental chemical composition of calcium oxalate. As for the type of hydration, both monohydrated and dihydrated crystals were detected. Thirteen peaks were identified in the phytochemical characterization, namely: quinic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, 5-O-feruloilquinic acid, apigenin-C-pentoside-C-hexoside, 3,4-di-O-caffeoylquinic acid, 4,5-di-O-caffeoylquinic acid, glucuronyl-quillaic acid, caffeoyl-glucuronyl-trihydroxyoleanolic acid, acetyl-caffeoyl-glucuronyl-dihydroxyoleanolic acid. In terms of toxicity, *B. articulata* did not appear to be toxic at a concentration of 2000 mg/kg, nor did it prove to be mutagenic at concentrations of 30, 100 and 300 mg/kg. In the cardiovascular analysis, we observed that the aqueous extract caused a decrease in blood pressure in SHR rats. Providing additional data to that found in the literature on *B. articulata* are of great importance in the systematics of the species, as they will serve as a basis for future studies involving the carquejas group, or even the genus *Baccharis*. In addition, proving the therapeutic potential of the species could help in research into the treatment of cardiovascular diseases.

Keywords: Antihypertensive. *Baccharis articulata*. Calcium oxalate crystals. Carqueja. Microscopy. Toxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	- Morfologia e distribuição brasileira de <i>B. articulata</i> -----	24
FIGURA 2	- Fluxograma dos materiais e métodos aplicados em <i>B. articulata</i> -----	26
FIGURA 3	- Caracteres anatômicos observados nas alas dos cladódios de <i>B. articulata</i> -----	38
FIGURA 4	- Caracteres anatômicos observados no eixo dos cladódios de <i>B. articulata</i> -----	39
FIGURA 5	- Exemplo esquemático de prismas -----	41
FIGURA 6	- Exemplo esquemático de cristal estiloide -----	42
FIGURA 7	- Exemplo esquemático de ráfide -----	42
FIGURA 8	- Exemplo esquemático de drusa -----	43
FIGURA 9	- Exemplo esquemático de areias cristalinas -----	43
FIGURA 10	- Exemplo esquemático de cristais bipiramidais -----	44
FIGURA 11	- Exemplo esquemático de cristais cuneiformes -----	45
FIGURA 12	- Exemplo esquemático de cristais piramidais -----	45
FIGURA 13	- Exemplo esquemático de cristal tabular -----	46
FIGURA 14	- Exemplo esquemático de cristal tipo seta -----	46
FIGURA 15	- Exemplo esquemático de cristal tipo gravata borboleta ----	47
FIGURA 16	- Cristais do sistema tetragonal encontrados em <i>B. articulata</i> -----	48
FIGURA 17	- Cristais do sistema monoclinico encontrados em <i>B. articulata</i> -----	49
FIGURA 18	- Areias cristalinas encontradas em <i>B. articulata</i> -----	50
FIGURA 19	- Drusas encontradas em <i>B. articulata</i> -----	51
FIGURA 20	- Microscopia de luz polarizada de cristais encontrados em <i>B. articulata</i> -----	52
FIGURA 21	- EDS dos cristais de <i>B. articulata</i> -----	56
FIGURA 22	- Raman dos cristais de <i>B. articulata</i> -----	58
FIGURA 23	- Microfotografias representativas de material histológico obtido de diferentes órgãos de ratas tratadas com uma dose única do EABA (2000 mg/g) ou com o veículo -----	66

FIGURA 24	- Efeitos do tratamento com o EABA (30, 100 e 300 mg/kg) e com a ciclofosfamida (C+) sobre os eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) e sobre o índice de dano e frequência de dano -----	68
FIGURA 25	- Envolvimento da via óxido nítrico/GMP e ativação do canal de K ⁺ no efeito anti-hipertensivo do EABA -----	73
FIGURA 26	- Efeitos anti-hipertensivos sustentados do EABA -----	74
FIGURA 27	- Ausência do envolvimento da via da prostaglandina/AMPc no efeito anti-hipertensivo do EABA -----	75
FIGURA 28	- Envolvimento da via óxido nítrico/GMPc e ativação do canal de K ⁺ no efeito anti-hipertensivo do EABA -----	76
QUADRO 1	- Morfotipos cristalinos observados em <i>B. articulata</i> : definição e localização na espécie -----	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Composição fitoquímica do extrato aquoso de <i>B. articulata</i> obtida por análise LC-MS -----	60
TABELA 2	- Aparência geral e alterações comportamentais de ratos fêmeas tratadas agudamente com o EABA durante as primeiras 8 horas após a administração -----	63
TABELA 3	- Efeitos do tratamento agudo com o EABA sobre o peso absoluto (g) e relativo (%) de órgãos e peso corporal final de ratos fêmeas após 14 dias da exposição -----	64
TABELA 4	- Mutagenicidade do EABA com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica para duas linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> (TA98 e TA100) -----	69
TABELA 5	- Razão de mutagenicidade (RM) do EABA com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica para duas linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> (TA98 eTA100) -----	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	PLANTAS MEDICINAIS	19
3.2	FAMÍLIA ASTERACEAE	21
3.3	GÊNERO <i>Baccharis</i> L.	22
3.4	<i>Baccharis articulata</i> (Lam.) Pers.	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	27
4.1.1	Material Vegetal	27
4.1.2	Microscopia de Luz (ML)	27
4.1.3	Microscopia de Luz Polarizada (LP)	27
4.1.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	28
4.1.5	Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva (EDS)	28
4.1.6	Espectroscopia Raman (ER)	28
4.2	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	28
4.3	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA	29
4.3.1	Medicamentos, Sais e Soluções Utilizados	29
4.3.2	Preparo do Extrato Aquoso	29
4.3.3	Animais	30
4.3.4	Estudo de Toxicidade de Dose Única (Toxicidade Aguda)	30
4.3.4.1	Observações clínicas	31
4.3.4.2	Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos	31
4.3.4.3	Análise histopatológica de órgãos vitais	31
4.3.5	Estudo de Genotoxicidade em Ratos	32
4.3.5.1	Teste do micronúcleo	32
4.3.5.2	Ensaio cometa	33
4.3.5.3	Teste AMES	34
4.3.6	Avaliação dos Efeitos do Extrato na Pressão Arterial e na Frequência Cardíaca	34

4.3.6.1	Avaliação das vias envolvidas nos efeitos hipotensivos do EABA -----	35
4.3.7	Análise Estatística -----	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	37
5.1	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE <i>B. articulata</i> -----	37
5.1.1	Descrição Anatômica -----	37
5.1.2	Avaliação dos Cristais Presentes em <i>B. articulata</i> -----	40
5.1.2.1	Caracterização morfológica -----	40
5.1.2.1.1	<i>Cristais prismáticos</i> -----	41
5.1.2.1.2	<i>Cristais estiloides</i> -----	42
5.1.2.1.3	<i>Cristais ráfides</i> -----	42
5.1.2.1.4	<i>Cristais drusas</i> -----	43
5.1.2.1.5	<i>Areia cristalina</i> -----	43
5.1.2.1.6	<i>Cristais bipiramidais</i> -----	44
5.1.2.1.7	<i>Cristais cuneiformes</i> -----	44
5.1.2.1.8	<i>Cristais piramidais</i> -----	45
5.1.2.1.9	<i>Cristais tabulares ou romboidal</i> -----	45
5.1.2.1.10	<i>Cristais tipo seta</i> -----	46
5.1.2.1.11	<i>Cristais do tipo gravata borboleta</i> -----	46
5.1.2.2	Micromorfologia encontrada em <i>B. articulata</i> -----	47
5.1.2.3	Composição química -----	55
5.1.2.4	Estado de hidratação -----	57
5.2	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA -----	59
5.3	AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA -----	61
5.3.1	Estudos de Toxicidade em Dose Única (Toxicidade Aguda) em Ratos -----	62
5.3.1.1	Aparência geral, alterações comportamentais e taxa de mortalidade -----	62
5.3.1.2	Peso corporal final, ganho de peso corporal, padrão de alimentação e consumo de água -----	62
5.3.1.3	Peso relativo e absoluto dos órgãos alvo -----	62
5.3.1.4	Necropsia e histopatologia -----	65
5.3.2	Ensaio de Genotoxicidade -----	67

5.3.2.1	Teste do micronúcleo -----	67
5.3.2.2	Ensaio cometa -----	67
5.3.2.3	Teste de AMES -----	67
5.3.3	Avaliação dos Efeitos do EABA na Pressão Arterial e na Frequência Cardíaca em Ratos SHR -----	71
5.3.3.1	Avaliação das vias envolvidas nos efeitos hipotensivos do EABA -----	72
6	CONCLUSÃO -----	79
	REFERÊNCIAS -----	81
	APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NA MICROSCOPY RESEARCH & TECHNIQUE -----	92
	APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO NA BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY -----	93
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- -----	94

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais tem feito parte da evolução humana. Previamente a qualquer forma de escrita, o homem já fazia uso de plantas tanto para fins alimentícios como terapêuticos, pois dependia disso para a sua sobrevivência, principalmente das plantas medicinais para curar-se. Os Egípcios se tornaram famosos pelos seus conhecimentos com incensos, resinas, gomas e mucilagens que faziam parte da arte da mumificação (Almeida, 2011; Bonil; Bueno, 2017). A eficácia das plantas medicinais é fato desde as mais remotas civilizações, trata-se de uma prática que vem sendo passada de geração em geração como um recurso medicinal alternativo e mais acessível no tratamento de diversas enfermidades (Almeida, 2011; Carneiro *et al.*, 2014).

Ao longo da história, o uso terapêutico das espécies medicinais se baseou no conhecimento intuitivo e especulativo, passando por sucessos e fracassos ao se utilizar determinadas plantas que poderiam curar, matar, provocar dores ou até mesmo alucinações, levando o homem a aprender a diferenciar espécies vegetais benéficas, de plantas tóxicas à saúde, na prática (Bonil; Bueno, 2017; Ferreira *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2020).

A utilização de plantas medicinais é feita na maioria das vezes por adultos e principalmente idosos que buscam complementar o tratamento de alguma doença, acreditando que as plantas são uma alternativa isenta de efeitos adversos, bem como devido a fatores socioeconômicos, como o custo de medicamentos e a dificuldade de acesso aos serviços de saúde (Carneiro *et al.* 2014; Barbosa *et al.*, 2023).

Essa crença de que as plantas já foram testadas e não acarretam riscos, é, de certa forma, equivocada, pois assim como os medicamentos, o uso de plantas medicinais deve considerar as indicações, doses, posologias e possíveis interações, tanto com medicamentos, como com outras espécies vegetais. Devemos mensurar até que ponto a ausência de evidências de toxicidade frente ao uso popular pode considerar uma planta como segura, pois somente a ausência de efeitos adversos não deve ser considerada, levando em conta que sintomas agudos como distúrbios gastrointestinais e dermatológicos, muitas vezes passam despercebidos e não são associados ao uso das plantas (Pedroza, 2023).

As observações populares sobre o uso e a eficácia das plantas medicinais são importantes pois contribuem na divulgação e no despertar dos pesquisadores a saber

mais sobre os efeitos benéficos e possíveis efeitos adversos, mas não se deve pautar a segurança e a eficácia apenas nessas observações (Maciel, *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, 2014;).

Por muitas vezes a população não sabe que as plantas medicinais dispõem de efeitos adversos e as utilizam mesmo sem ter certeza de sua identificação. A maioria dos efeitos adversos ocorre devido à identificação errônea da espécie, o que acarreta em equívocos na coleta (Oliveira Filho *et al.*, 2023). Por se tratar de plantas conhecidas popularmente, é comum que elas sejam identificadas de maneira errônea, uma vez que a nomenclatura popular não corresponde à nomenclatura botânica, o que pode acarretar intoxicações, ou ausência do efeito esperado (Colet *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2020; Oliveira Filho *et al.*, 2023).

A exemplo disso temos o gênero *Baccharis* L. (Asteraceae) que abrange cerca de 440 espécies, distribuídas desde o Canadá até a região sul da América do Sul. Este gênero é de grande importância pois suas espécies são muito utilizadas na medicina tradicional. Espécies essas comumente conhecidas por vassouras, as que apresentam caules e folhas, ou por carquejas, as que apresentam caules alados (cladódios) e podem ou não apresentar folhas (Heiden *et al.*, 2019; Manfron *et al.*, 2021).

A utilização das carquejas é muito difundida pela população devido ao seu uso medicinal como digestivo e diurético, a exemplo de *Baccharis microcephala* (Less.) DC., *Baccharis pentaptera* (Less.) DC., *Baccharis trimera* (Less.) DC., entre várias outras. Dentre as carquejas, destaca-se *Baccharis articulata*, popularmente conhecida como carqueja, carquejinha, carqueja-doce, utilizada como tônica, digestiva e diurética nas regiões do sul do Brasil, Uruguai e Argentina, enquanto no Paraguai é utilizada como anti-hipertensiva e antidiabética (Heiden *et al.*, 2006; Abad; Bermejo, 2007; Fachineto; Tedesco, 2009). Trata-se de uma espécie alada, por isso também é conhecida como carqueja e facilmente confundida a outras espécies desse grupamento, como por exemplo com *B. pentaptera*, a qual no início do seu crescimento apresenta-se muito similar a *B. articulata*. A similaridade morfológica que as espécies do grupamento das carquejas apresentam pode trazer confusão até mesmo para especialistas do gênero. Quimicamente é composta por flavonoides e diterpenos que apresentam efeito antioxidante e imunomodulador (Oliveira *et al.*, 2003; Abad; Bermejo, 2007; Manfron *et al.*, 2021).

Devido à dificuldade de identificação e falta de comprovações farmacológicas, estudos filogenéticos, morfoanatômicos, químicos e farmacológicos têm sido conduzidos, com o intuito de evidenciar marcadores anatômicos que auxiliem na identificação dessas espécies, evidenciar efeitos adversos, bem como a eficácia terapêutica de modo a garantir a segurança da utilização popular dessas espécies.

Considerando a similaridade das carquejas, o seu amplo uso popular nas comunidades da América do Sul e os escassos estudos comprobatórios frente à eficácia e à toxicidade dessas espécies, o presente estudo objetivou avaliar a morfoanatomia, química e etnofarmacologia, a fim de auxiliar na identificação e na avaliação toxicológica e eficácia de *B. articulata*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Fornecer caracteres microscópicos e histoquímicos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. que possam ser utilizados como marcadores botânicos de identificação da espécie, bem como testar a toxicidade do extrato aquoso e a eficácia terapêutica cardiovascular frente a hipertensão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar microscopicamente os cladódios de *B. articulata*;

Determinar os padrões morfológicos dos cristais presentes em *B. articulata* por microscopia de luz, de polarização e eletrônica de varredura;

Avaliar a composição química dos cristais por energia dispersiva de raios X;

Verificar o estado de hidratação dos cristais por espectroscopia Raman;

Avaliar o perfil fitoquímico do extrato aquoso de *B. articulata*;

Avaliar o efeito anti-hipertensivo do extrato aquoso de *B. articulata*;

Determinar a toxicidade e a genotoxicidade de *B. articulata*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso das plantas medicinais remonta a história da civilização humana, sendo transmitido de geração em geração. As plantas eram e são utilizadas para fins alimentícios, medicinais e cosméticos (Ferreira *et al.*, 2019). Os documentos mais antigos da história, que relatam a utilização das plantas medicinais no tratamento de doença, são os tratados da medicina chinesa, datados por volta de 3700 a.C. Sequencialmente, no decorrer da história, temos os papiros egípcios, principalmente o *Papíro de Ebers*, de 1500 a.C., o qual continha a descrição de diversas espécies vegetais utilizadas com efeito terapêutico, como por exemplo o látex do Olíbano para inflamações bucais, a mirra com efeito anti-inflamatório e adstringente, ou o sândalo como antidiarreico (Almeida, 2011; Rodrigues *et al.*, 2020).

No Brasil, a terapia dos povos indígenas se baseava no uso de plantas medicinais. Com a colonização portuguesa os padres ficaram encarregados de estabelecer contato e registrar a utilização dessas plantas medicinais. A chegada da família real fez com que vários naturalistas europeus viessem a contribuir para a documentação das plantas nativas e seu uso popular pelos povos indígenas (Fagg *et al.*, 2015; Pedroza, 2023).

O interesse na biodiversidade brasileira sempre foi muito evidente, ainda mais por inúmeras espécies serem utilizadas na medicina tradicional (Rodrigues *et al.*, 2020). Os boticários fizeram uso dessa biodiversidade tratando doenças através de produtos de origem vegetal. Eles desempenharam um trabalho muito importante na disseminação das práticas terapêuticas e do conhecimento das plantas medicinais no Brasil. Por volta de 1640, os boticários foram reconhecidos como estabelecimentos comerciais, em seguida, ao final do século XIX essas boticas foram substituídas por pequenas farmácias que lidavam com as prescrições medicamentosas e comercialização de medicamentos industrializados, compostos, na maioria das vezes, por extratos vegetais (Fernandes, 2004; Pedroza, 2023).

No que se refere ao uso medicinal, os produtos de origem vegetal serviram de base para o tratamento das mais diversas enfermidades, seja tradicionalmente ou pela utilização de espécies como fonte de extração de moléculas e formação de novos fármacos. Grande parte dos fármacos empregados vieram de uma fonte natural, sendo principalmente oriundos de plantas (Funari; Ferro, 2005).

As ações terapêuticas provenientes das plantas se devem aos princípios ativos nelas contidos. Quando estes são administrados acarretam uma resposta fisiológica do organismo. Esses princípios ativos têm sido o foco de estudos químicos e farmacológicos, com o intuito de elucidar dúvidas em relação a utilização dessas plantas na terapêutica (Rocha *et al.*, 2021).

O desenvolvimento da ciência e de tecnologias em saúde possibilitaram que as plantas medicinais tivessem seu valor terapêutico reconhecido, visto que as utilizadas pela população, sejam elas nas suas necessidades básicas de saúde, devendo ter sua eficácia terapêutica comprovada e complementada por estudos toxicológicos. Nesse contexto, a pesquisa científica vem validando os saberes tradicionais e cotidianos, mantendo vivo o saber popular, mas atrelando estudos farmacodinâmicos e toxicológicos que avaliem a dosagem, o risco e os benefícios de uso de espécies medicinais (Lorenzi; Matos, 2002; Pedroso *et al.*, 2021).

Dessa forma tem crescido o interesse na comunidade científica, uma vez que uma planta com uma indicação medicinal pode se tornar um medicamento inovador. Através da indicação popular os pesquisadores dispõem de uma possível atividade biológica, encurtando parte do percurso da pesquisa (Ferreira *et al.*, 2019). Entretanto a segurança e a eficácia de uma planta medicinal devem ser estudadas e ressaltadas, visto que ela pode apresentar desde efeitos benéficos, como também efeitos tóxicos. Nesse sentido tem se tornado primordial o investimento na pesquisa e desenvolvimento de novas tecnologias, a fim de encontrar fármacos de origem vegetal que possuam efeito medicinal, bem como tecnologias que auxiliem na identificação e diferenciação correta das mais diversas plantas medicinais (Carvalho; Silveira, 2010).

A identificação correta de uma planta é um dos primeiros aspectos a ser levado em consideração para que não ocorram efeitos indesejados devido a coleta de uma espécie similar que possa ser tóxica (Oliveira Filho *et al.*, 2023; Pedroza, 2023). Na sabedoria comum a nomenclatura popular é muito utilizada, cada comunidade sabe identificar suas plantas nativas, entretanto quando comparadas a comunidades distantes sua nomenclatura popular pode mudar, onde uma mesma planta pode acabar tendo 10 nomes distintos. Tendo em vista que a nomenclatura popular muitas vezes não corresponde à nomenclatura botânica, a consulta a um botânico, ou um taxonomista experiente, se faz necessária a fim de garantir a identificação correta através de uma análise minuciosa da morfologia, das estruturas da planta em questão (Colet *et al.*, 2015; Oliveira Filho *et al.*, 2023). A falta de identificação, ou até mesmo

a identificação errônea pode anular todo o trabalho, como também gerar informações incorretas e conclusões errôneas frente a eficácia e terapêutica da espécie em estudo (Verdam *et al.*, 2010; Colet *et al.*, 2015).

3.2 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae pertence a ordem Asterales, uma das mais diferenciadas dentro da filogenia de Angiospermas. Ela constitui uma das maiores famílias de plantas vasculares e com flores do mundo, representando cerca de 10% do total da flora de Angiospermas, com cerca de 24.000 a 30.000 espécies (Savoldi, 2023). Sua distribuição é cosmopolita, ou seja, está presente em quase todo o mundo, exceto na região da Antártica (Rivero, 2020). Essa ampla distribuição é caracterizada pela sua alta produção de sementes, com uma estrutura que facilita a sua dispersão (Flores; Toledo, 2022).

No Brasil ocorrem aproximadamente 2.100 espécies, distribuídas em 290 gêneros. Estando em todas as regiões do Brasil, desde a caatinga, campos de altitude, cerrado, florestas, restingas, floresta amazônica, vegetação aquática, vegetação sobre afloramentos rochosos. Entretanto, são principalmente encontradas no Cerrado e na Mata Atlântica (Roque; Teles; Nakajima, 2017; Savoldi, 2023).

É representada por arbustos, subarbustos e raramente por árvores, ou lianas. São de ambientes geralmente terrestres, mas alguns casos podem ocorrer em ambientes aquáticos. Possuem caule geralmente cilíndrico, podendo apresentar ramos alados, os cladódios. As folhas variam de inteiras a ligeiramente dentadas, podendo ser alternadas, verticiladas ou opostas, as quais podem possuir tricomas tectores ou glandulares, sendo estes últimos secretores de óleos essenciais, bem como dutos secretores presentes no tecido foliar e caulinar (Bobek *et al.*, 2016; Budel *et al.*, 2018; Manfron *et al.*, 2021). Apresentam inflorescências do tipo capítulo, que são características da família, as quais podem possuir coloração variada e folhas simples que chamam a atenção de polinizadores (Savoldi, 2023).

Trata-se de uma família de grande importância devido ao seu grande valor comercial, desde espécies utilizadas com fins alimentícios, como a alface, *Lactuca sativa* L. e o girassol, *Helianthus annuus* L., até mesmo espécies com fins ornamentais como a gérbera, *Gerbera* sp. L. e o crisântemo, *Chrysanthemum* sp. L. Entretanto essa família também possui um valor negativo devido ao grande número de espécies

consideradas como daninhas, as quais são consideradas agressivas em ambientes com lavoura, como é o caso do picão-preto, *Bidens pilosa* L. e da mio-mio *Baccharis coridifolia* DC. (Ferreira, 2023).

3.3 GÊNERO *Baccharis* L.

O gênero *Baccharis* compreende um dos maiores gêneros da família Asteraceae, com aproximadamente 440 espécies as quais estão distribuídas nas regiões das Américas, desde o Canadá até a região sul da América do Sul, constituindo numerosas formações vegetais, principalmente na América do Sul, com cerca de 90% de ocorrência (Budel *et al.*, 2005; Frade 2020). Os principais centros de diversidades do gênero se encontram nas regiões dos Andes e nas regiões montanhosas do Uruguai, sudeste do Brasil e leste do Paraguai. A grande concentração de espécies na região do Brasil e dos Andes é indicativa de que esta área seja o provável centro de origem do gênero. No Brasil ocorrem 179 espécies distribuídas em quase todos os estados do país, exceto Amapá (Budel *et al.*, 2005; Muller, 2006; Heiden *et al.*, 2019; Re flora, 2019).

A maior parte das espécies do gênero tem porte arbustivo, variando de 0,5 a 4 m de altura, são espécies geralmente ramificadas, com o caule e ramos cilíndricos, podendo variar de áfilos (folhas atrofiadas) ou folhosos. Quando há presença de folhas, estas são geralmente alternadas e variáveis na forma e tamanho, com texturas papiráceas (espessura mediana), membranáceas (mais finas, lembrando a consistência de uma membrana), ou coriáceas (espessas, rígidas, mas flexíveis lembrando a consistência de couro), quanto à nervura podem ser de uninérveas (com uma nervura visível) a trinérveas (com três nervuras principais) ou ainda peninérveas (nervuras ramificadas partindo de uma nervura central mais espessa). Além disso, as folhas podem ser glabras (sem presença de tricomas) ou pilosas (com tricomas) (Barroso; Bueno, 2002; Lorenzi; Matos, 2002).

A importância do gênero está caracterizada economicamente por sua utilização na medicina tradicional no tratamento de diversas enfermidades, como distúrbios gastrointestinais, dores musculares, anemia, reumatismo, diabetes, resfriados, dentre outras (Burgos *et al.*, 2020). No combate à erosão, na utilização ocasional como plantas ornamentais, bem como importância ecológica na formação de habitats para diferentes espécies de insetos, além de ser uma das principais fontes

botânicas para a produção de própolis, a exemplo de *Baccharis dracunculifolia* DC., principal origem botânica da própolis verde. Todavia, algumas espécies podem ser vistas como pragas por causarem intoxicação ao gado e serem de difícil eliminação das pastagens reduzindo a área disponível para forrageamento do gado (Budel *et al.*, 2005; Panis, 2008; Sforcin *et al.*, 2012; Ferreira, 2023).

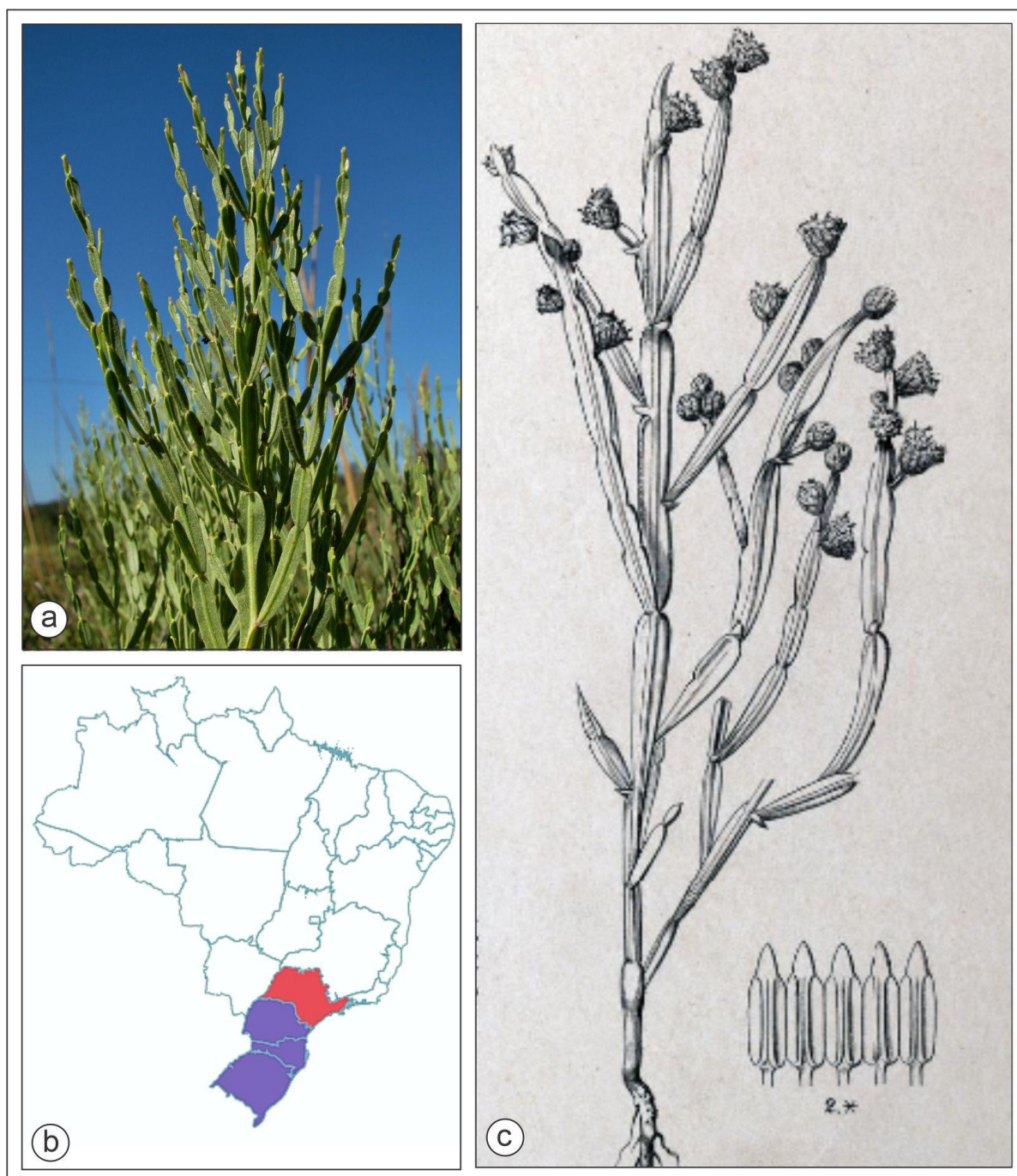
3.4 *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.

Encontrada principalmente em terrenos secos e pedregosos, ocorrendo de forma rara em ambientes como bordas de matas e rios, *B. articulata* é popularmente conhecida como carqueja, carquejinha e carqueja-doce. É encontrada principalmente nas regiões da Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e nas regiões sul e sudeste do Brasil (Figura 1 b). É utilizada popularmente no tratamento digestivo e como diurética nas regiões do sul do Brasil e Uruguai (Abad; Bermejo, 2007, Heiden *et al.*, 2009). Na Argentina acredita-se que tenha atividade no tratamento da impotência sexual masculina e na esterilidade feminina. Já no Paraguai é utilizada como antidiabética e anti-hipertensiva (Fachineto; Tedesco, 2009; Garlet, 2019). Além desses, *B. articulata* possui outros usos, como tônica, antifebril e no combate de dispepsias atônicas, debilidade orgânica e anemia (Fachineto; Tedesco, 2009).

Apesar de sua vasta utilização popular não existem evidências científicas que sejam robustas e validem doses e uma utilização segura sem efeitos adversos. O que se sabe é que sua utilização pode acarretar contrações uterinas, não sendo indicada para mulheres grávidas. Deve-se evitar no caso de pacientes que fazem uso de medicamentos para hipertensão e diabetes, pois a utilização concomitante com o chá de *B. articulata* pode ocasionar em hipotensão ou hipoglicemia (Garlet, 2019; Rio Grande do Sul, 2022).

Trata-se de uma espécie arbustiva, de caules e ramos eretos, com coloração de verde-clara a verde-acinzentada, tendo seus ramos bialados, escamiformes e obtusos (Figura 1 a, c). (Heiden *et al.*, 2009). Por possuir grande similaridade a outras espécies de *Baccharis* contidas no grupamento das carquejas, pode ser facilmente confundida com outras espécies assim conhecidas, como é o caso da *B. pentaptera* que possui cerca de 5 alas na base, 3 alas na região medial da planta e 2 alas nas extremidades, entretanto, esta quando está em fase de crescimento apresenta-se bialada, o que acarreta a fácil confusão.

FIGURA 1 – Morfologia e distribuição brasileira de *B. articulata*



Fonte: Heiden, G. *Baccharis* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB5158>>.

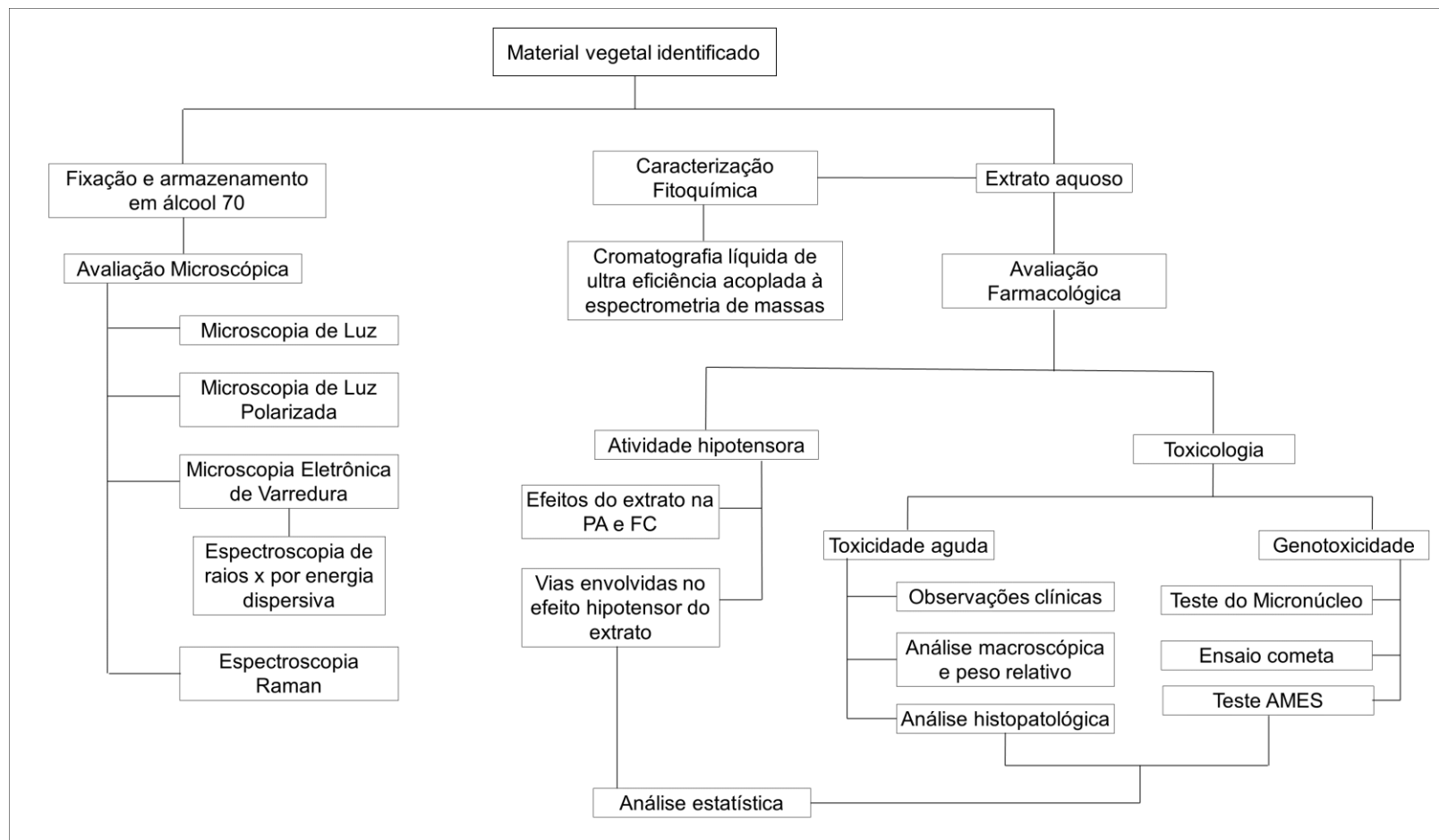
Notas: *Baccharis articulata* no seu habitat natural (a); distribuição geográfica no Brasil (b); representação ilustrativa de *B. articulata* (c).

Quimicamente possui principalmente flavonoides e diterpenos, compostos estes que têm demonstrado promissoras atividades antioxidantes e imunomodulatórias (Oliveira *et al.*, 2003). Estudos farmacológicos comprovaram

potencial atividade antidiabética com papel anti-hiperglicêmico e secretagogo de insulina (Kappel *et al.*, 2012). Seus extratos etanólicos apresentam atividade antiviral na inibição da infectabilidade do vírus Vero Cells-pseudorabeis e atividade antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* (Garlet, 2019).

4 MATERIAL E MÉTODOS

FIGURA 2 – Fluxograma dos materiais e métodos aplicados em *B. articulata*



Fonte: A autora.

Notas: (PA) Pressão Arterial; (FC) Frequência Cardíaca

4.1 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

4.1.1 Material Vegetal

Foram coletadas partes vegetativas aéreas de *B. articulata* em novembro de 2009 na região de Turuçu, Rio Grande do Sul e depositadas no Herbário Clima Temperado da EMBRAPA, sob o número de registro ECT 154, e em junho de 2022 na região Metropolitana de Curitiba e depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), sob o número de registro HUPG 20595. O acesso ao patrimônio genético foi autorizado e licenciado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) e encontra-se sob o código AFEEC2B.

Após a coleta, os cladódios foram fixados em solução de FAA 70 (aldeído fórmico, ácido acético e álcool 70) por um período de três dias, lavado com água e estocado em álcool 70% para armazenamento e conservação (Johansen, 1940; Berlyn; Miksche, 1976).

4.1.2 Microscopia de Luz (ML)

Secções transversais dos cladódios de *B. articulata* foram submetidas a coloração de azul de Astra e fucsina básica (Kraus *et al.*, 1998), azul de toluidina (O'Brien *et al.*, 1964), cloreto férrico (5%) e floroglucina clorídrica (Johansen, 1940), acondicionadas em lâmina de vidro com glicerina 50% (Berlyn; Miksche, 1976), cobertos por lamínula e esmaltados com base transparente para lutagem.

4.1.3 Microscopia de Luz Polarizada (LP)

As amostras foram mantidas em solução de hipoclorito de sódio por um período de 12 h, ou até que ficassem translúcidas. Em seguida, foram lavadas por seis vezes com água destilada, neutralizadas com ácido acético 5% (Shobe; Lersten, 1967) e coradas com safranina. A montagem das lâminas foi feita com glicerina 50% e as fotomicrografias foram realizadas por meio de um microscópio polarizado Nikon E600 POL equipado com sistema de câmera Nikon DSFiv e software de imagem Nikon Elements, do National Center of Natural Products Research (NCNPR), da Universidade do Mississippi, Oxford, USA

4.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As secções transversais realizadas para a MEV foram acondicionadas em suportes metálicos, submetidas à metalização em ouro (Souza, 1998), no equipamento Quorum SC 7620 e analisadas em alto vácuo pelo equipamento Mira 3 Teskan, localizado no Complexo de Laboratório de Multiusuários (C-LABMU) da UEPG.

4.1.5 Espectroscopia de Raios X por Energia Dispersiva (EDS)

As análises referentes à composição química elementar dos cristais foram realizadas por meio de EDS, conduzidas em células contendo cristais e em células vazias para controle (Machado *et al.*, 2019). As amostras foram submetidas a um detector de raios-X acoplado ao MEV mantido nas mesmas condições operacionais utilizadas para a captura das eletromicrografias.

4.1.6 Espectroscopia Raman (ER)

O estado de hidratação dos cristais foi observado através de um espectrômetro LabRAM HR Evolution da Horiba, com um laser de excitação com comprimento de onda de 785 nm, grade de 300 linhas/mm, detector Synapse, acoplado a um microscópio ótico, localizado no laboratório de nanofotônica e imagens da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Para cada medida foram realizadas 30 médias, com tempo de exposição de 15 s, na faixa de 100 a 1600 cm^{-1} (Edwards *et al.*, 1992; Frost, 2004; Shippey, 1980).

4.2 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

A análise foi realizada com cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC; Acquity, Waters) acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (HR-MS; Xevo, Waters). A separação cromatográfica foi realizada usando um dispositivo BEH C18 (Waters; 100 x 2,1 mm, tamanho de partícula de 1,7 μm) a 40 °C com um gradiente de solvente composto de água ultrapura (MilliQ- Millipore) e acetonitrila

(Merck-Sigma) que foram acidificadas com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente foi desenvolvido a 400 μ L/min, com uma proporção inicial de 95:5 (v/v, água:acetonitrila). Isso foi mantido por 1 minuto e, em seguida, a concentração de acetonitrila foi aumentada para 30% em 7 minutos e depois para 95% em 15 minutos. A proporção inicial foi retornada em 16 minutos, com um período de reequilíbrio de 2 minutos (Souza, *et al.* 2019). Durante a caracterização fitoquímica os compostos foram detectados no íon negativo e positivo no modo centroide MSe.

A espectrometria de massas foi realizada em uma temperatura de fonte de 150 °C e temperatura de dessolvatação de 350 °C. O nitrogênio foi usado a uma taxa de fluxo de 50 L/h no cone e 500 L/h para dessolvatação da amostra. A configuração de energia no modo de íons positivos foi de 3 kV no capilar, 30 V no cone e 60 V no deslocamento da fonte. Para íons negativos, a configuração foi de 3 kV, 40 V e 80 V, respectivamente. A massa foi escaneada em uma faixa de 100 a 1400 m/z e a configuração da energia de fragmentação foi de 30 a 50 V. A calibração de massa foi realizada pela coinjeção de leu-encefalina como padrão (m/z 556,2771, 278,1141 [M]⁺ e m/z 554,2615, 236,1035 [M]⁻).

4.3 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

4.3.1 Medicamentos, Sais e Soluções Utilizados

A heparina foi comprada da Hipolabor em Belo Horizonte, MG, Brasil. A xilazina e o cloridrato de cetamina foram obtidos da Syntec em São Paulo, SP, Brasil. O inibidor da guanilil ciclase azul de metileno, o inibidor da adenilato ciclase 2',5'-dideoxiadenosina (DDa), o inibidor da ciclooxygenase indometacina, o bloqueador não seletivo do canal de K⁺ sensível ao cálcio tetraetilamônio (TEA) e o inibidor não seletivo da óxido nítrico sintetase (NO) N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) foram obtidos da Sigma-Aldrich em St. Louis, MO, Estados Unidos.

4.3.2 Preparo do Extrato Aquoso

Partes vegetativas aéreas secas e fragmentadas da espécie foram submetidas ao processo de extração por infusão, onde a cada 100 g de *B. articulata* foi acrescido 1 L de água fervente, conforme preconizado pelo uso popular (Lorenzi; Matos, 2008). A extração foi realizada até que infusão atingisse temperatura ambiente.

Em seguida, realizou-se a separação do extrato por filtração, o qual foi tratado com etanol P.A. na proporção de (1:3) a fim de que as proteínas e polissacarídeos fossem precipitados, proporcionando o sobrenadante etanólico do infuso, o qual foi rotaevaporado em evaporador rotatório, em seguida liofilizado e armazenado em freezer para conservação e até a realização das análises (Klinder, 2009). O extrato final utilizado na administração e realização dos experimentos, será chamado de extrato aquoso de *B. articulata* (EABA).

4.3.3 Animais

Para o estudo de toxicidade e genotoxicidade foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da variedade Wistar, fêmeas, com idade de 14 semanas. Para a avaliação do efeito anti-hipertensivo do extrato aquoso de *B. articulata* foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR), machos, pesando entre 310 e 340 g. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Previamente ao início dos estudos, todos foram testados de acordo com as recomendações da Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA) e estavam completamente livres dos microrganismos patogênicos listados (Nicklas *et al.*, 2002). Até a realização dos experimentos, os animais tiveram livre acesso à ração e água. A temperatura ambiente foi mantida em $22 \pm 2^\circ \text{C}$, com ciclo claro/escuro de 12 h. O número de animais por grupo foi de 6 (seis) indivíduos. Este número foi estimado com base em protocolos reconhecidos internacionalmente por diferentes agências reguladoras (OECD, 2001; ANVISA, 2013). Todos os procedimentos foram previamente submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Grande Dourados (Licença número 07/2020).

4.3.4 Estudo de Toxicidade de Dose Única (Toxicidade Aguda)

A toxicidade de dose única (aguda) foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados pela OECD (2001) e ANVISA (2013). Após um período de jejum de 6 h, o peso corporal dos animais foi determinado. Uma única dose do EABA (2000 mg/kg) foi administrada pela via oral com auxílio de uma sonda de gavagem. Outro grupo de ratas foi tratada com o veículo (água filtrada; 5 mL/kg) e

foram considerados como grupo controle. A alimentação foi fornecida aos animais cerca de uma hora após os tratamentos. Os animais foram cuidadosamente observados quanto a quaisquer indícios de toxicidade dentro das primeiras oito horas após o tratamento, e diariamente durante um período de 14 dias. No 15º dia todos os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico (2-3% de isoflurano) seguido de decapitação (exsanguinação) em guilhotina. As investigações anatomopatológicas foram realizadas no 15º dia após os tratamentos (Gasparotto Junior *et al.*, 2009).

4.3.4.1 Observações clínicas

Todos os animais foram pesados diariamente e as observações quanto a mortalidade, fraqueza, agressividade, padrão de alimentação, consumo de água, diarreia, salivação, alterações visuais e auditivas, respiração, lesões cutâneas, dor, mudanças na atividade locomotora, convulsões, coma ou quaisquer sinais de alteração comportamental foram cuidadosamente monitorados durante todo o período experimental (Malone; Robichaud, 1962). O peso corporal final foi registrado (para cada animal) no dia da eutanásia para o cálculo do peso relativo de órgãos.

4.3.4.2 Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos

Os órgãos vitais como os rins, o baço e o fígado foram autopsiados e macroscopicamente examinados visando identificar quaisquer lesões ou anormalidades. O peso corporal e o peso absoluto dos órgãos alvo de todos os animais dos diferentes grupos experimentais foram determinados e registados. O peso relativo dos órgãos de cada animal foi calculado através da seguinte equação:

$$\frac{(\text{peso absoluto do órgão}) \times 100}{(\text{peso corporal absoluto no dia da eutanásia})}$$

4.3.4.3 Análise histopatológica de órgãos vitais

Todos os órgãos vitais (rins, baço e fígado) isolados a partir de cada um dos animais foram fixados em formalina (10%; v/v), rotineiramente processados e

embebidos em parafina. Secções de espessura de 5,0 µm foram cortadas utilizando um micrótomo rotativo, fixado em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina para o exame histológico. As lâminas foram analisadas por um patologista veterinário credenciado utilizando um microscópio óptico (Olympus Optical Co., Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera e a um software de captura de imagem. As amostras foram analisadas quanto a mudanças estruturais gerais, alterações degenerativas, evidências de necrose e sinais de inflamação.

4.3.5 Estudo de Genotoxicidade em Ratos

4.3.5.1 Teste do micronúcleo

Para a realização do teste do micronúcleo, diferentes grupos de ratos fêmeas (n = 6) receberam, pela via oral, três doses do EABA (30, 100 e 300 mg/kg), uma vez ao dia, por dois dias. O grupo controle negativo recebeu o veículo por gavagem. O controle positivo foi tratado com ciclofosfamida monohidratada (20 mg/kg – Sigma-Aldrich) pela via intraperitoneal (em dose única).

Após 24 (ciclofosfamida) e 48 h (EABA e veículo) do término dos tratamentos, os animais foram eutanasiados por decapitação (SCHMID, 1976). Os fêmures foram removidos, a epífise proximal foi retirada para expor o canal medular e, com o auxílio de uma agulha 13 x 4,5 mm e 3 mL de solução de NaCl (150 mM), a medula foi retirada, lavando-se o canal medular com solução de NaCl. O material foi transferido para tubos de vidro e centrifugados a 1000 rpm/5 min. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante, e o sedimento foi ressuspenso com solução de formaldeído 4% e levemente homogeneizado com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

Uma gota desta suspensão celular foi colocada em uma lâmina limpa e seca, e depois, realizou-se o esfregaço. As lâminas foram secas à temperatura ambiente e, após 24 h, coradas com Leishman eosina-azul de metileno e submetidas à análise microscópica. Para determinação do número de micronúcleos foram contados 2000 eritrócitos policromáticos por animal (1000 em cada lâmina) utilizando-se microscópio óptico, no aumento de 400x. A análise das lâminas foi cega e realizada por um único avaliador (Gasparotto Junior, *et al.*, 2009).

4.3.5.2 Ensaio cometa

A realização do ensaio cometa seguiu os mesmos procedimentos de separação dos grupos de ratos fêmeas, bem como o mesmo procedimento de administração do EABA, pela via oral, nas mesmas dosagens (30, 100 e 300 mg/kg), uma vez ao dia, por dois dias. O grupo controle negativo e o controle positivo recebeu o mesmo tratamento citado no teste do micronúcleo anteriormente. Após 24 h para o controle positivo e 48 h para o EABA e o controle negativo, do término dos tratamentos, foram coletadas amostras de sangue periférico por decapitação (Schmid, 1976).

A obtenção das lâminas com as células corridas em gel de eletroforese para a avaliação de danos ao DNA foi realizada de acordo com a técnica descrita por Klaude *et al.* (1996). Um total de 10 µL da suspensão celular obtida pela mistura com 120 µL de agarose LMP 5% a 37 °C, foi depositada sobre uma lâmina pré-coberta com agarose normal (1,5%) e levada para refrigeração a 4 °C por 10 min (cobertas com lamínula) para endurecimento da agarose. Após a adição das células na lâmina foi evitada a exposição à luz direta (irradiação) para prevenção de danos adicionais no DNA. As lamínulas foram retiradas cuidadosamente e as lâminas acondicionadas na solução de lise em refrigerador (4 °C) durante 1 h. Após o tempo da lise, as lâminas foram removidas e colocadas na cuba horizontal de eletroforese, o tampão alcalino de eletroforese foi adicionado de modo a cobrir as mesmas, em seguida a cuba foi mergulhada em um recipiente com gelo (4 °C), durante 25 min para desnaturação do DNA. Então, foi iniciada a corrida de eletroforese com 25 volts e 300 mA. O tempo de corrida foi de aproximadamente 25 min. Após eletroforese as lâminas foram retiradas e neutralizadas com 5 mL de solução tampão durante 5 min, este procedimento foi repetido mais duas vezes. Após a secagem as lâminas, estas foram fixadas com etanol durante 5 min e estocadas na geladeira até a análise. Para análise, as lâminas foram coradas com 100 µL de brometo de etídio, cobertas com lamínula, e analisadas após aproximadamente 5 min. Para visualização dos danos ao DNA, as lâminas foram observadas em aumento de 400x usando microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. Foram analisadas 100 células de cada animal.

4.3.5.3 Teste AMES

Para o teste de AMES foram utilizadas as linhagens TA 100 e TA 98 de *Salmonella typhimurium*. A linhagem TA 100, que detecta mutagênicos causadores da substituição de pares de bases no DNA, contém uma mutação no gene *hisG* (*hisG46*), que codifica para a primeira enzima da biossíntese da histidina, tendo o par CG como ponto preferencial para a reversão. A cepa TA 98 apresenta mutação no gene *hisD* para a reversão oito resíduos repetitivos de GC e detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA.

De acordo com a metodologia de incorporação direta em placas, desenvolvida por Maron e Ames (1983), diferentes concentrações do EABA (375, 250, 125 e 62,5 µg/placa) foram misturados a 0,1 mL da cultura de bactérias e 2 mL de ágar superfície (top agar), suplementado com traços de histidina e biotina. Para os ensaios com ativação metabólica, foram adicionados também 0,5 mL da fração microssomal S9 homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com um agente indutor enzimático, arocloror 1254) (MOLTOX – Molecular Toxicology, USA). Como controle negativo foi utilizado a água bidestilada (veículo). Utilizou-se como controle positivo para a TA98, a 4-nitrofenilenodiamina (NPD) dissolvida em DMSO, numa concentração de 10 µg/placa. Para a cepa TA100, utilizou-se azida sódica, dissolvida em água bidestilada, numa concentração de 1,25 µg/placa, em ensaios sem ativação metabólica. Nos ensaios com ativação metabólica foi usada 2-antramina (2-ANTR) como mutágeno, numa concentração de 3 µg/placa para TA100 e TA98.

O conteúdo de cada tubo foi levemente homogeneizado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosilado. Após a solidificação do top agar, as placas foram incubadas por 48 h, a 37 °C. Após esse período, procedeu-se a contagem do número de colônias revertentes por placa. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.6 Avaliação dos Efeitos do Extrato na Pressão Arterial e na Frequência Cardíaca

Para avaliar os efeitos agudos do extrato aquoso de *B. articulata* (EABA), ratos SHR machos (n = 6) foram anestesiados por meio de injeção intramuscular de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg), com doses adicionais administradas em

intervalos de 45 a 60 minutos. Além disso, uma única injeção intraperitoneal de heparina (50 UI) administrada. Traqueostomias foram realizadas para permitir a respiração natural dos animais.

A artéria carótida esquerda foi canulada e conectada a um transdutor de pressão, ligado ao software Chart 4.1 do sistema de registro PowerLab (ADI Instruments, Castle Hill, Austrália), para registrar a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC). Após esse procedimento, diferentes grupos de ratos ($n = 6$) receberam EABA nas concentrações de 30, 100 ou 300 mg/kg, ou receberam hidroclorotiazida 25 mg/kg por via intraduodenal. O grupo controle recebeu a administração intraduodenal de uma solução salina a 0,9%, em um volume constante de 100 μ L por 100g de peso corporal. As alterações na pressão arterial (PA) e na frequência cardíaca foram registradas durante 35 minutos após os tratamentos.

Para avaliação dos efeitos anti-hipertensivos após o tratamento prolongado, diferentes grupos de ratos ($n = 6$) foram tratados por via oral uma vez ao dia com EABA nas concentrações de 30, 100 ou 300 mg/kg, hidroclorotiazida 25 mg/kg ou por um veículo, no caso água filtrada 100 μ g para cada 100 g de peso corporal, pelo período de 7 dias. No oitavo dia os ratos foram anestesiados e submetidos ao mesmo protocolo cirúrgico descrito anteriormente. As alterações na PA e na FC foram registradas por 35 minutos.

Tanto no tratamento agudo, quanto no tratamento prolongado, cada rato recebeu apenas uma das substâncias em estudo. Ao final dos experimentos, os ratos foram sacrificados com uma overdose de isoflurano.

4.3.6.1 Avaliação das vias envolvidas nos efeitos hipotensivos do EABA

A veia femoral esquerda foi canulada em diferentes grupos de ratos SHR ($n = 6$) e conectada a uma bomba de infusão (EFF 311, Insight, Ribeirão Preto, Brasil). Em seguida foi infundido continuamente L-NAME 7 mg/kg/min ou azul de metileno 150 nmol/kg/min ou administrados uma única injeção de DDA 0,1 mg/kg, indometacina 3 mg/kg ou TEA 400 μ mol/kg por via intraperitoneal. Em seguida, foi injetado EABA 30 mg/kg no intestino delgado e avaliada a pressão arterial.

O volume total injetado nos animais durante o período de infusão foi de 1.000 μ L.

4.3.7 Análise Estatística

Para os testes de toxicidade e genotoxicidade os resultados estão expressos como a média $\pm$ erro padrão ou desvio padrão da média (teste de AMES) de cada grupo experimental. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett's. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Foram calculadas, também, as razões de mutagenicidade para cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo. A amostra é considerada positiva quando a razão de mutagenicidade for maior ou igual a 2, em pelo menos uma das doses testadas e, quando houver uma relação dose-resposta igual a 2, em pelo menos uma das doses testadas e, quando houver uma relação dose-resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Para as análises da atividade hipotensora, a estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. Os resultados são apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

Os gráficos foram construídos e a análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 9.4.1. para mac-OS (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE *Baccharis articulata*

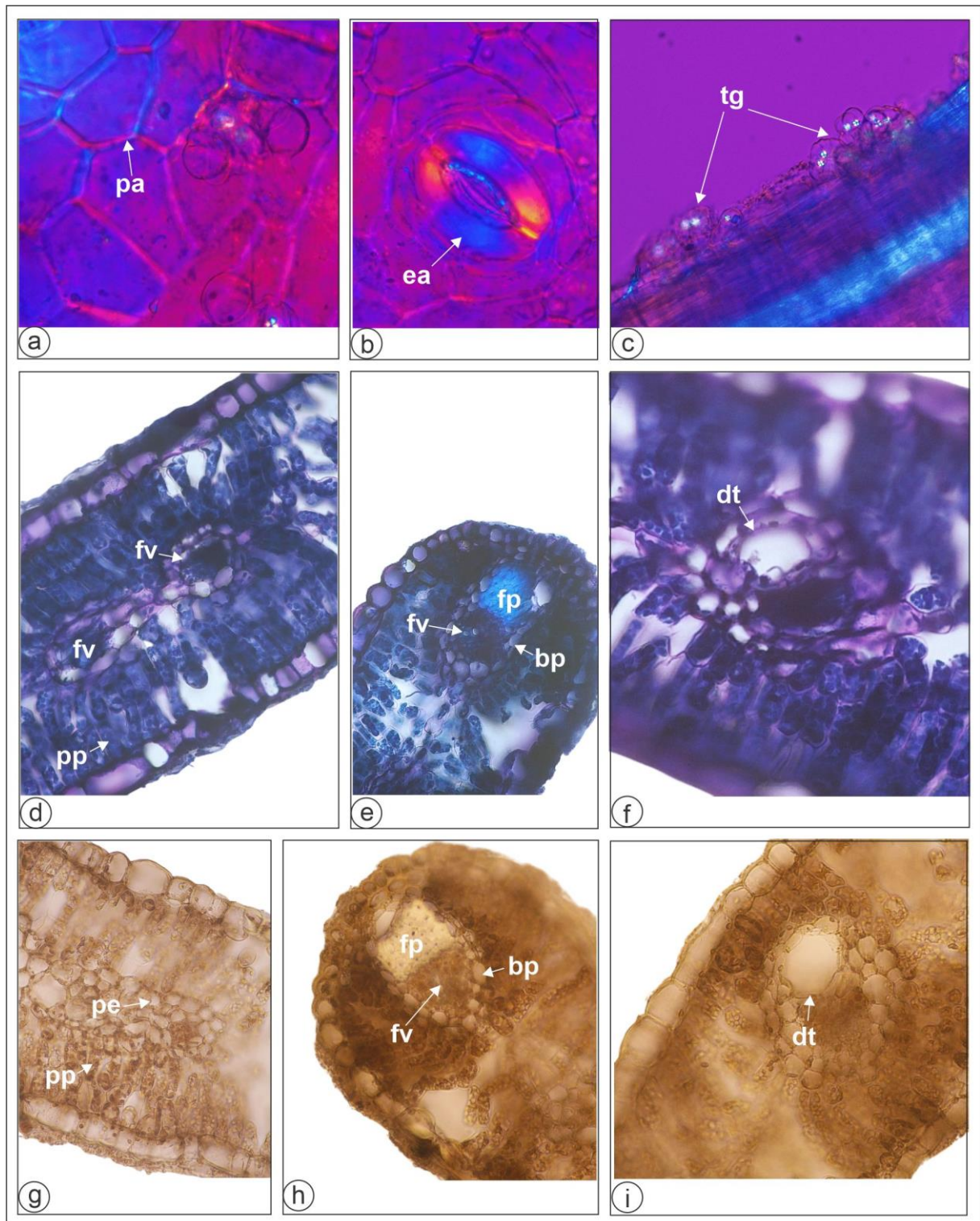
5.1.1 Descrição Anatômica

Anatomicamente, os cladódios de *B. articulata* apresentam, em vista frontal, células epidérmicas com parede anticlinal espessa (Figura 3 a) e estômatos anomocíticos (Figura 3 b).

Em secção transversal, a epiderme das alas é unisseriada e revestida por cutícula estriada e delgada. Tufos de tricomas glandulares bisseriados, contendo drusas nas células apicais são observados em pequenas depressões na epiderme (Figura 3 c e 5 f). A organização dos parênquimas fotossintetizantes se apresenta isobilateral, com cerca de três camadas de parênquima paliádico e duas camadas de parênquima esponjoso (Figura 3 d, g). Feixes vasculares colaterais de pequeno porte estão mergulhados no parênquima esponjoso (Figura 3 d). Nos bordos das alas encontra-se um feixe vascular, envolto por uma bainha parenquimática, com uma calota de fibras perivasculares apostas ao floema (Figura 3 e, h).

O eixo dos cladódios apresenta formato ovalado (Figura 4 a, d) e podem ser observados cordões de clorênquima subjacentes ao tecido de revestimento. Cerca de quatro a cinco feixes vasculares com calotas de fibras perivasculares encontram-se distribuídos ao entorno do eixo (Figura 4 b, c, e, f). Dutos secretores, contendo material lipofílico, podem ser observados tanto nas alas, quanto no eixo dos cladódios (Figura 3 f, i; Figura 4 b, c, f).

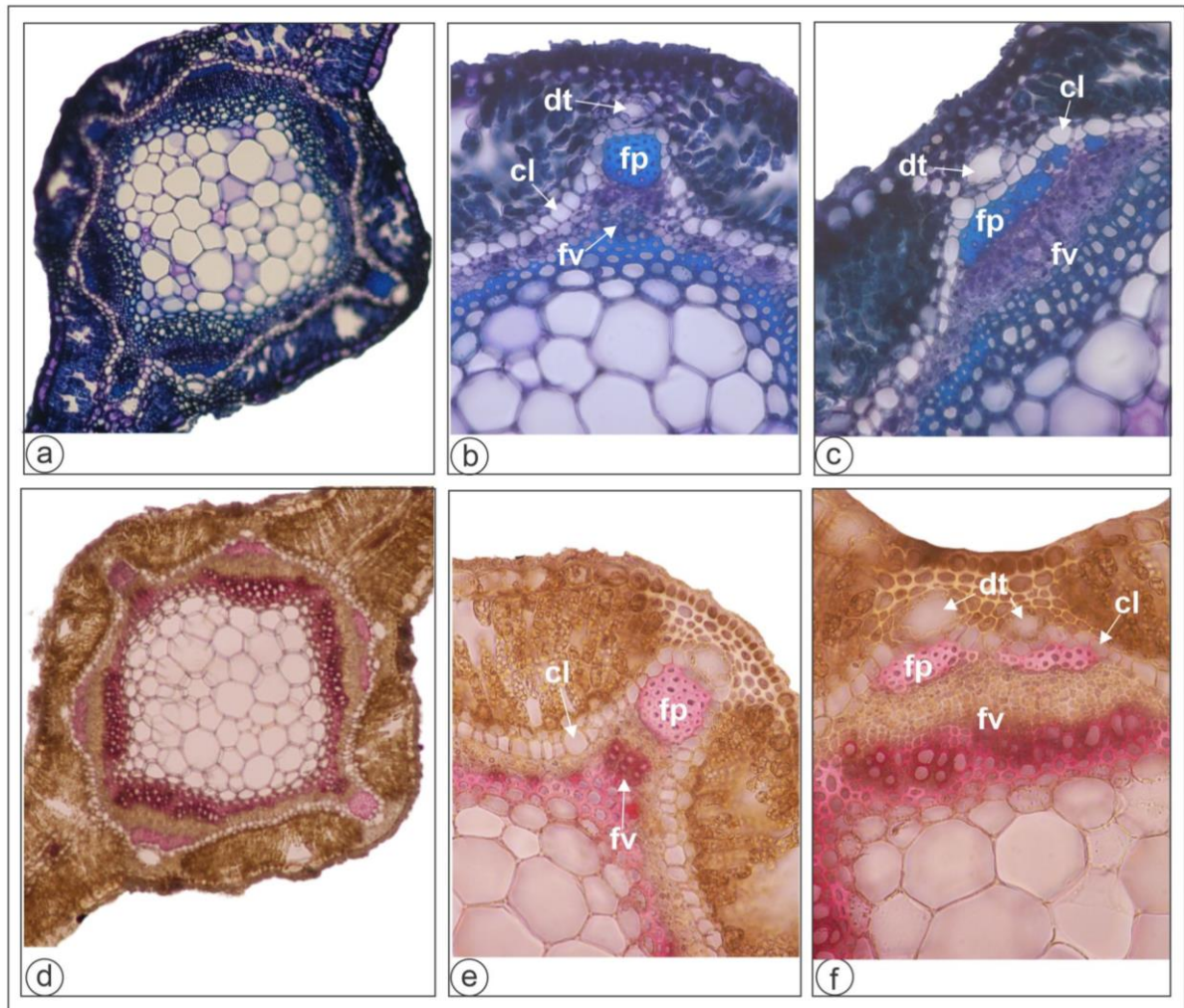
Estas descrições vão de encontro ao descrito por Budel (2003). Entretanto quando comparada à descrição morfoanatômica de Siqueira *et al.* (1988), observa-se algumas discrepâncias, pois este cita a presença de estômatos em face abaxial, visto que *B. articulata* possui cladódios, os quais são considerados como caules alados, e não folhas, não há a possibilidade de identificar essa presença de estômatos em faces, pois no caule não temos essa diferenciação.

FIGURA 3 – Caracteres anatômicos observados nas alas dos cladódios de *B. articulata*

Fonte: A autora

Notas: Vista Frontal (a-b) e Secção Transversal (ST) dos cladódios de *B. articulata* (c-i) [LP (a-c); Azul de toluidina (d-f); Cloreto férrico (g-i)] [pa – parede anticlinal espessa; ea – estômato anomocítico; tg – tufo de tricomas glandulares; fv – feixe vascular; pp – parênquima paliçádico, fp – fibras perivasculares; bp – bainha parenquimática; dt – duto secretor; pe – parênquima esponjoso].

FIGURA 4 – Caracteres anatômicos observados no eixo dos cladódios de *B. articulata*



Fonte: A autora

Notas: ST dos cladódios de *B. articulata* (a-f) [Azul de toluidina (a-c); Floroglucina (d-f)] [dt – duto secretor, cl – cordão de clorênquima, fp – fibras perivasculares, fv – feixe vascular].

Existe uma grande confusão na identificação das espécies do gênero *Baccharis* até mesmo por especialistas, principalmente no grupamento das carquejas, pois tratam-se de espécies morfológicamente e anatomicamente similares (Budel *et al.*, 2004; Ming, 2022). Em literatura recente, Manfron *et al.* (2021) evidenciaram os caracteres microscópicos e destacaram os tipos de tricomas e os estômatos como marcadores anatômicos para as carquejas, contudo destacaram a importância de se determinar caracteres adicionais, a exemplo de morfotipos cristalinos, além de testes microquímicos. Por conta disso o desenvolvimento de estudos sobre o gênero é de grande valia, pois quanto mais marcadores anatômicos descritos, melhor será a diferenciação dessas espécies.

Vale ressaltar que com o passar dos anos técnicas e equipamentos surgiram para auxiliar ainda mais na descrição morfoanatômica das espécies, como é o caso das colorações histoquímicas, microscopia de luz polarizada e microscopia eletrônica de varredura.

5.1.2 Avaliação dos Cristais Presentes em *B. articulata*

Diversas espécies de plantas produzem uma variedade de estruturas mineralizadas, formadas a partir de suas células. Essas estruturas são denominadas como cristais inorgânicos, os quais podem apresentar as mais diversas formas, bem como diferentes composições e até mesmo diferentes estados de hidratação (Franceschi; Horner, 1980; Konyar *et al.*, 2014; Capacio; Belonias, 2018).

A forma e a localização desses cristais dentro de uma determinada espécie são frequentes e específicas, podendo, esses cristais, serem utilizados como marcadores anatômicos de uma espécie, de uma seção ou até mesmo de um gênero (Franceschi; Nakata, 2005; He *et al.*, 2012).

5.1.2.1 Caracterização morfológica

Os cristais vegetais apresentam uma variedade de morfologias, entretanto compreender a estrutura e o polimorfismo dos cristais é algo desafiador, visto que a forma cristalográfica é determinada através de comparações dos ângulos, retas e formatos encontrados, fazendo com que termos técnicos e não técnicos sejam aplicados e na maioria das vezes não haja uma descrição convencional aplicada (Al-Rais *et al.*, 1971; Franceschi; Horner, 1980; Webb, 1990; Zaho *et al.*, 2016).

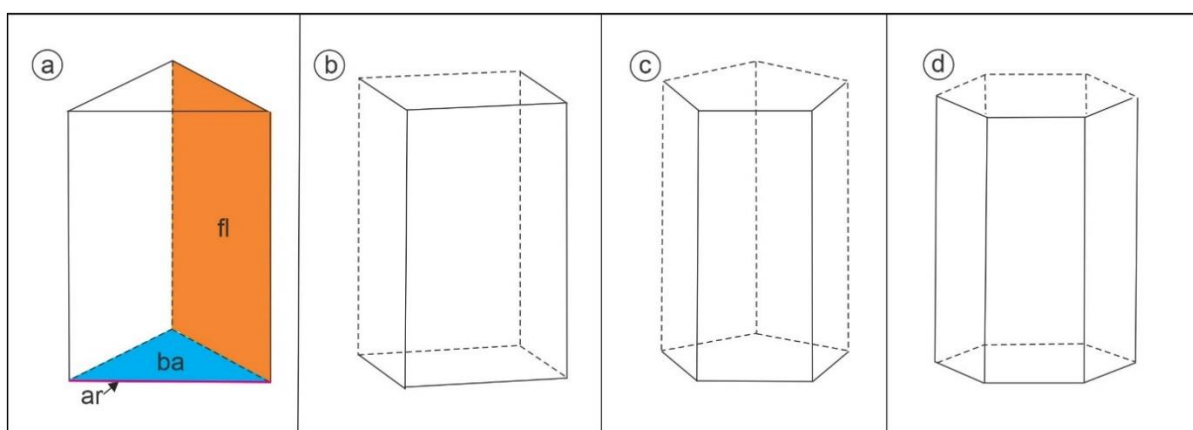
Até pouco tempo os cristais eram classificados em cinco grupos principais com base na sua morfologia, sendo eles prismas, estiloides, ráfides, drusas e areia cristalina. Atualmente novos formatos têm sido descritos mais detalhadamente com base na estrutura geométrica encontrada sendo eles cristais bipiramidais, cuneiforme piramidais, tabulares (romboidais) e tipo seta (Franceschi; Nakata, 2005; Raman *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015; Webb, 1999).

5.1.2.1.1 Cristais prismáticos

Antigamente eram tidos como todos os cristais que abrangiam formas prismáticas regulares, sem uma definição mais aprofundada (Webb, 1999). Atualmente podemos separar os cristais prismáticos de acordo com a base que eles apresentam.

Prismas são poliedros formados por duas faces congruentes, ou seja, que apresentam a mesma forma e tamanho, contidas em planos paralelos, rodeadas por paralelogramos, chamados de faces laterais (Dolce; Pompeo, 2013). A classificação dos prismas é dada conforme o número de arestas da base, podendo ser triangular, ou trigonal, quando a base é um triângulo, quadrangular quando a base é um quadrado, pentagonal quando a base é um pentágono, hexagonal quando a base é um hexágono (Figura 5 a-d). A classificação do prisma será conforme o formato da base (Pinho *et al.*, 2010; Machado, 2013).

FIGURA 5 – Exemplo esquemático de prismas



Fonte: A autora

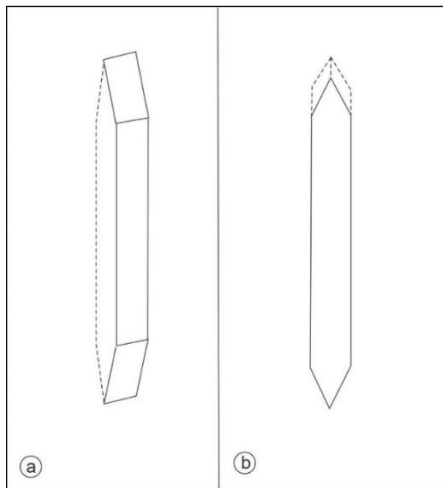
Notas: Prisma triangular (a); prisma quadrangular (b); prisma pentagonal (c); prisma hexagonal (d).
[ar – aresta; ba – base; fl – face lateral].

De uma forma geral os cristais prismáticos já foram observados em grande parte de plantas, a exemplo de *Theobroma cacao* L. (Mendes, 2010) e *Triphasia trifolia* (Burm. F.) P. Wilson (Soares *et al.*, 2022).

5.1.2.1.2 Cristais estiloides

São cristais comumente encontrados em plantas. Apresentam-se como alongados, com as extremidades pontiagudas em vista frontal, ou truncados, quando vistos pela face lateral (Figura 6 a, b) (Franceschi; Horner, 1980; Raman *et al.*, 2014).

FIGURA 6 – Exemplo esquemático de cristal estiloide



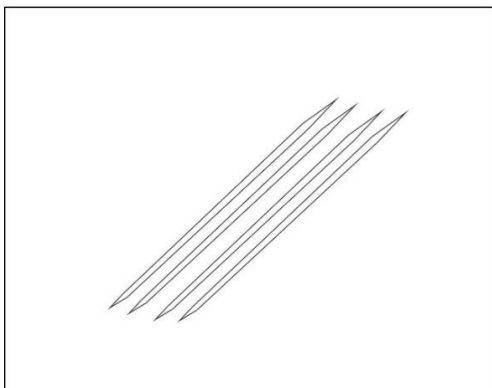
Fonte: A autora

Notas: Cristal estiloide vista lateral (a); cristal estiloide vista frontal (b).

5.1.2.1.3 Cristais ráfides

Normalmente ocorrem em feixes de muitos cristais, os quais se assemelham a agulhas, devido a sua espessura (Figura 7) (Aguiar; Veiga Júnior, 2021; Franceschi; Horner, 1980).

FIGURA 7 – Exemplo esquemático de ráfide

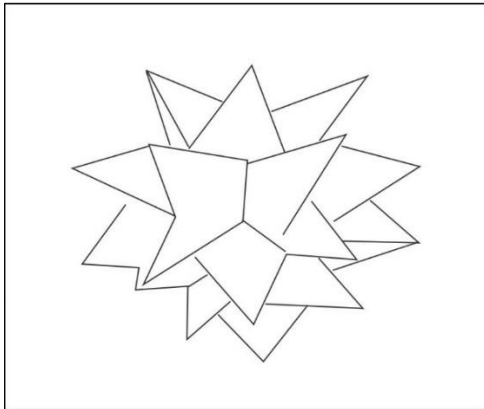


Fonte: A autora

5.1.2.1.4 Cristais drusas

São agregados esféricos de cristais (Figura 8), formados nos idioblastos cristalinos que possuem como característica membranas que irradiam em torno de um núcleo central onde é formado o agregado esférico que originará a drusa (Francschi; Horner, 1980; Webb, 1999; Aguiar; Veiga Júnior, 2021).

FIGURA 8 – Exemplo esquemático de drusa

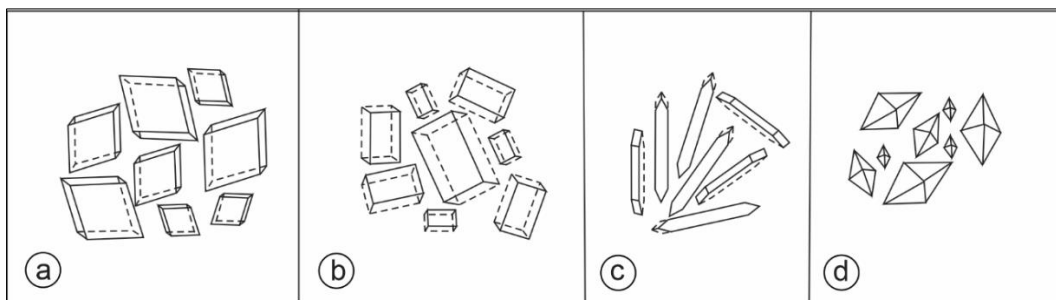


Fonte: A autora

5.1.2.1.5 Areia cristalina

Trata-se de uma massa de muitos pequenos cristais individualizados, dentro de uma única célula, os quais podem apresentar diversos formatos (Figura 9 a-d) (Franceschi; Horner, 1980; Silva *et al.*, 2014). Os tamanhos podem variar, mas geralmente são inferiores a 3 μm e não passam de 5 μm .

FIGURA 9 – Exemplo esquemático de areias cristalinas



Fonte: A autora

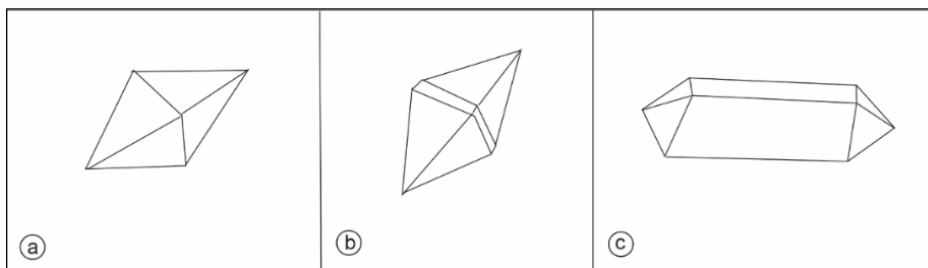
Notas: Areia cristalina tabular (a); areia cristalina prismática (b); areia cristalina de estiloide (c); areia cristalina de bipirâmide (d).

Antes tanto os cristais, como o formato da areia cristalina era tida como apenas um achado, um artefato, hoje em dia sabe-se que essa também passa por um controle genético, pode possuir diversas formas e auxiliando na diferenciação das espécies.

5.1.2.1.6 Cristais bipiramidais

São cristais caracterizados pela união de duas pirâmides, geralmente quadrangulares (de base quadrada). A união dessas pirâmides pode ser direta, classificado como simples, ou pode possuir um entre meio fino, ou um mais espesso, se assemelhando a um retângulo (Figura 10 a-c) (Uloth *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015;).

FIGURA 10 – Exemplo esquemático de cristais bipiramidais



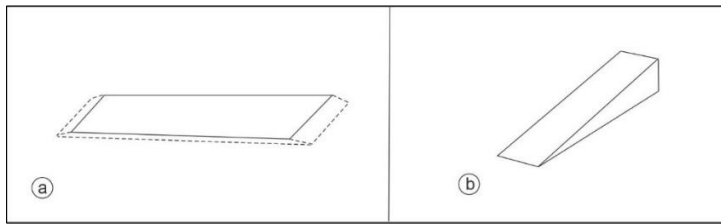
Fonte: A autora

Notas: Cristal bipiramidal simples (a); cristal bipiramidal de entre meio fino (b), cristal bipiramidal de entre meio retangular (c).

5.1.2.1.7 Cristais cuneiformes

O cristal cuneiforme tem esse nome por ser semelhante a um prisma retangular, entretanto possuir as extremidades afiladas (Figura 11 a), o que faz com que ele parece uma cunha (Figura 11 b), instrumento de metal ou madeira utilizado para fender, calçar ou nivelar alguma peça (Silva *et al.*, 2014).

FIGURA 11 – Exemplo esquemático de cristais cuneiformes



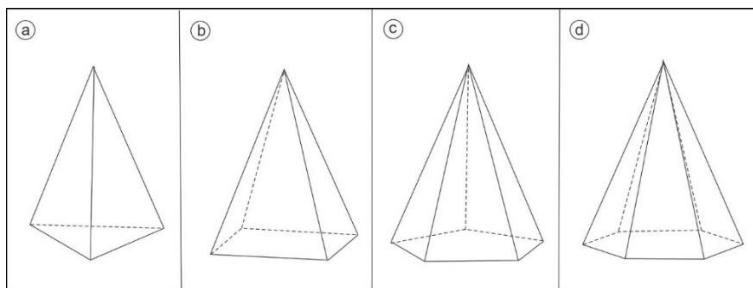
Fonte: A autora

Notas: Cristal cuneiforme (a); exemplo esquemático de uma cunha (b).

5.1.2.1.8 Cristais piramidais

Uma pirâmide é definida como um poliedro, qual possui as faces laterais, todas triangulares, unidas por um vértice e com base composta de um polígono. A classificação da pirâmide se dá conforme o número de arestas da base, podendo ser um quadrado, um retângulo, ou até mesmo um hexágono (Figura 12 a – d) (Dolce; Pompeo, 2013).

FIGURA 12 – Exemplo esquemático de cristais piramidais



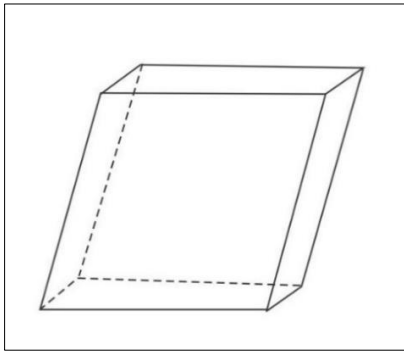
Fonte: A autora

Notas: Cristal piramidal triangular (a); cristal piramidal retangular (b); cristal piramidal pentagonal (c); cristal piramidal hexagonal (d).

5.1.2.1.9 Cristais tabulares ou romboidais

Um romboide trata-se de um paralelogramo equilátero de lado adjacentes diferentes e ângulos oblíquos (Figura 13). No caso dos cristais tabulares, eles são assim chamados por serem semelhantes a um pedaço de tábua (Dolce; Pompeo, 2013; Silva *et al.*, 2014).

FIGURA 13 – Exemplo esquemático de cristal tabular

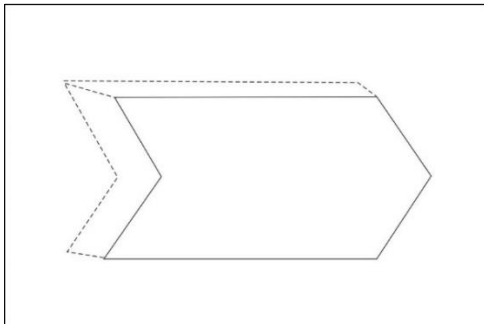


Fonte: A autora

5.1.2.1.10 Cristais tipo seta

Trata-se de um cristal que lembra a ponta de uma seta, o qual possui uma reentrância em formato de V em uma das extremidades e a outra com formato pontiagudo (Figura 14) (Raeski, 2020).

FIGURA 14 – Exemplo esquemático de cristal tipo seta

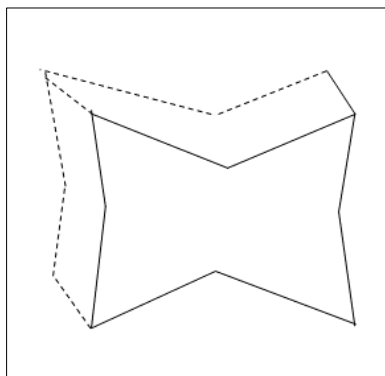


Fonte: A autora

5.1.2.1.11 Cristais do tipo gravata borboleta

Esse tipo de cristal foi encontrado pela primeira vez no presente estudo, o qual foi descrito e denominado como cristal do tipo gravata borboleta, por se tratar de um cristal que possui semelhança visual ao desenho de uma gravata borboleta, com leves reentrâncias em “V” na parte superior e inferior do cristal (Figura 15) (Raeski, 2020).

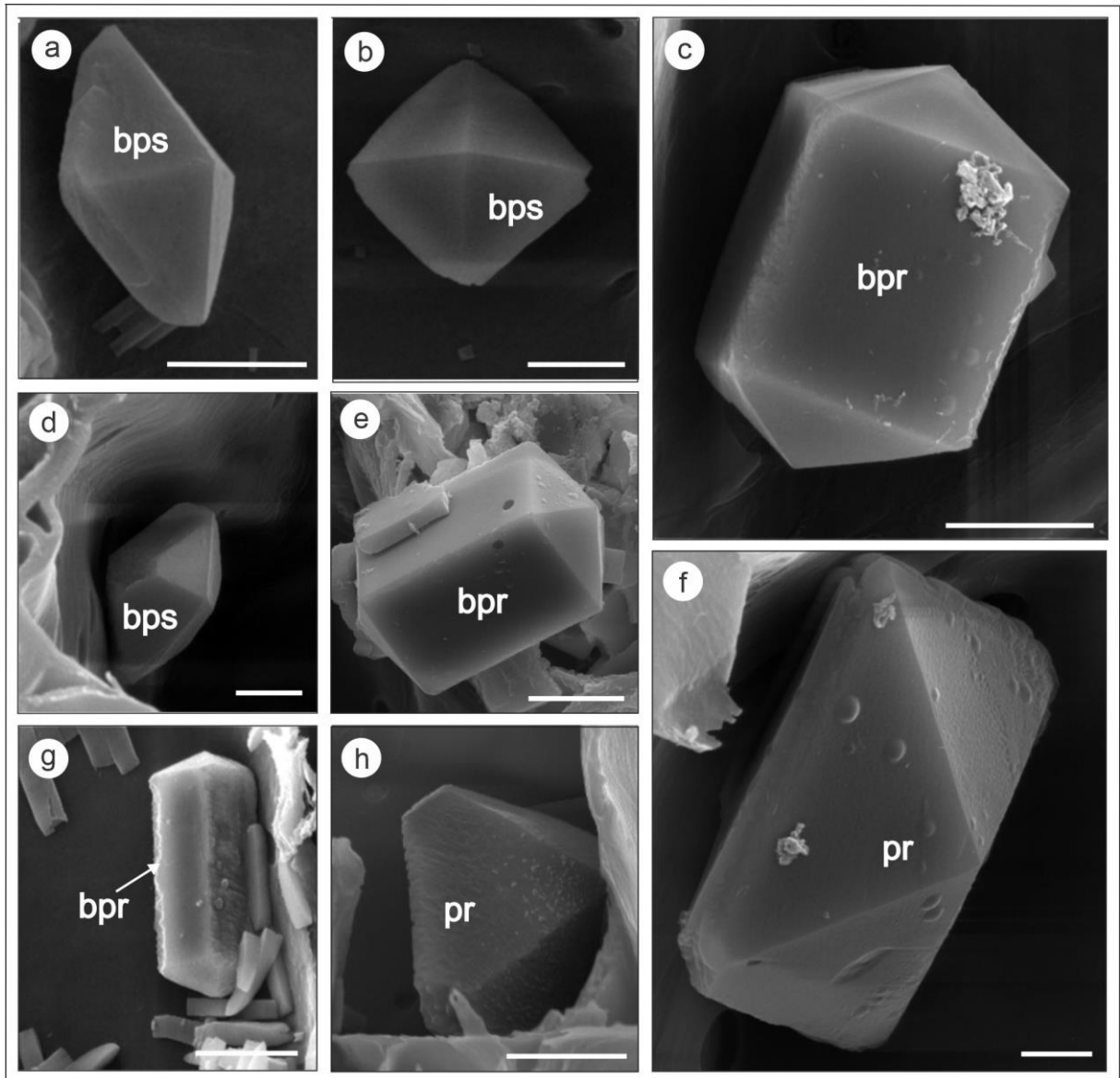
FIGURA 15– Exemplo esquemático de cristal tipo gravata borboleta



Fonte: A autora

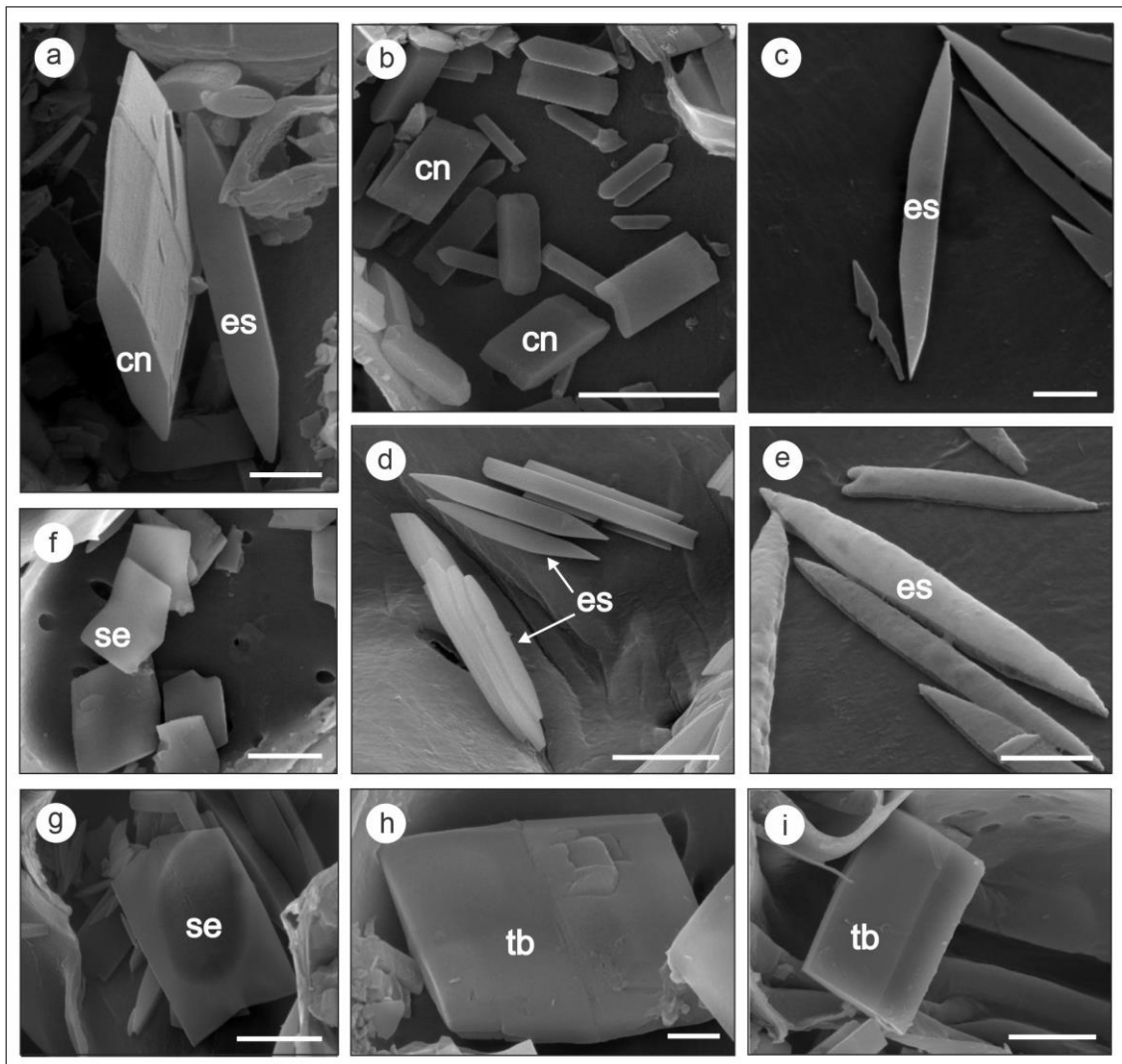
5.1.2.2 Micromorfologia encontrada em *B. articulata*

Onze morfotipos cristalinos foram encontradas em *B. articulata*, estando distribuídos no eixo dos cladódios, na epiderme e nos tricomas glandulares, sendo eles: bipiramidal simples (bps) (Figura 16 a, b, d; 20 b-d), bipiramidal retangular (bpr) (Figura 16 c, e, g; 20 e), piramidal retangular (pr) (Figura 16 f, h), cuneiforme (cn) (Figura 17 a, b), drusa (dr) (Figura 19 a-f), estiloide (es) (Figura 17 c-e; 20 a, f), tabular ou romboidal (tb) (Figura 17 h, i), cristal tipo seta (se) (Figura 17 f, g; 19 f), areia cristalina arredondada (aca) (Figura 18 a, b), areia cristalina de estiloide (ace) (Figura 18 c, d) e areia cristalina tipo gravata borboleta (agb) (Figura 18 e, f). A presença dos cristais foi observada primeiramente na microscopia de luz e sequencialmente as suas micromorfologias foram melhor avaliadas e descritas pela MEV.

FIGURA 16 – Cristais do sistema tetragonal encontrados em *B. articulata*

Fonte: A autora

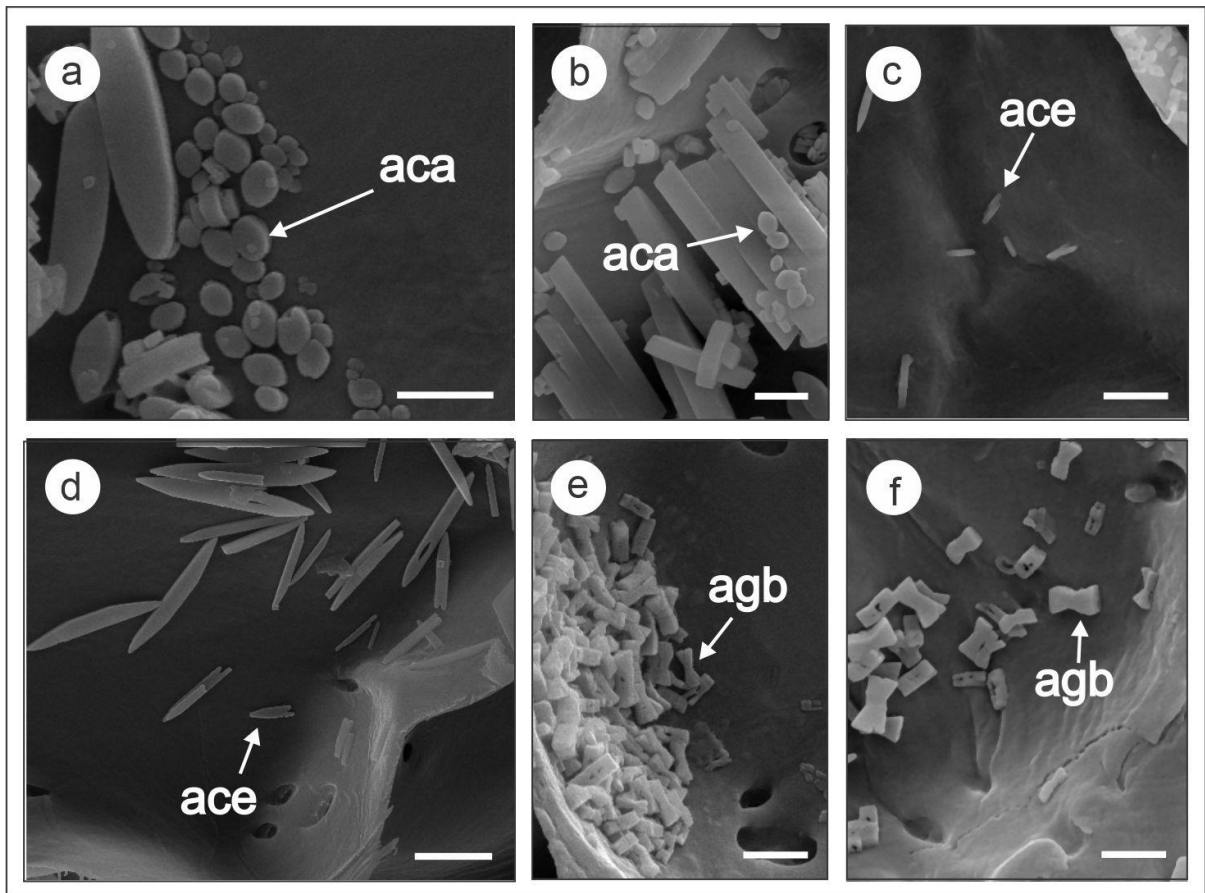
Notas: Secção Transversal (ST) do caule de *B. articulata* [MEV (a-f)] [bps – cristal bipiramidal simples; bpr – cristal bipiramidal retangular; pr – piramidal retangular] Barras de escala: f = 2µm; b, c, d, e, g = 5 µm; a = 10 µm.

FIGURA 17 – Cristais do sistema monoclínico encontrados em *B. articulata*

Fonte: A autora

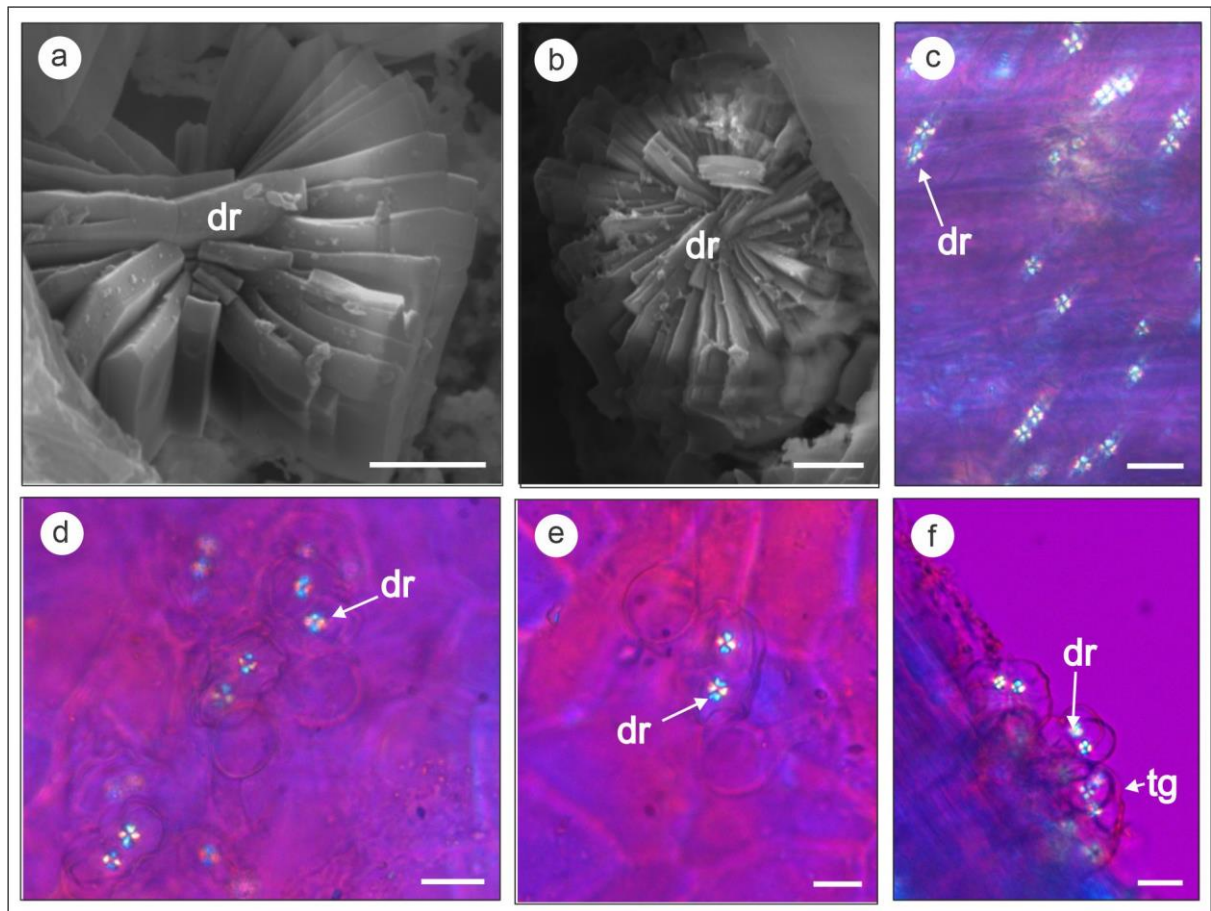
Notas: ST do caule de *B. articulata* [MEV (a-i)] [cn – cristal cuneiforme; es – cristal estiloide; se – cristal tipo seta; tb – cristal tabular] Barras de escala: a, c, e, h = 2µm; d, f, g, i = 5 µm; b = 10 µm.

FIGURA 18 – Areias cristalinas encontradas em *B. articulata*



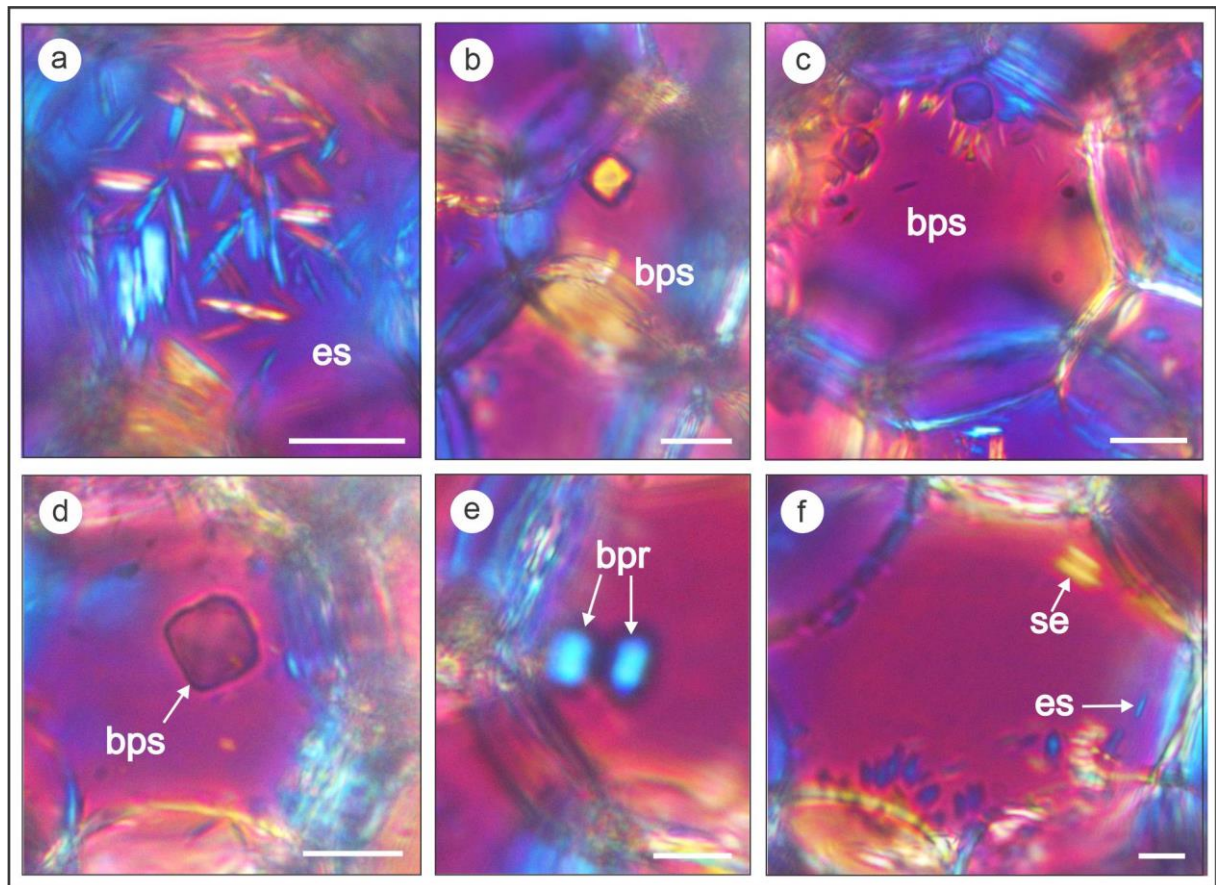
Fonte: A autora

Notas: ST do caule de *B. articulata* [MEV (a-f)] [aca – areia cristalina arredondada; ace – areia cristalina de estiloide; agb – areia cristalina tipo gravata borboleta] Barras de escala: a, b, e, f = 2 μm; c, d = 5 μm.

FIGURA 19 – Drusas encontradas em *B. articulata*

Fonte: A autora

Notas: ST do caule de *B. articulata* (a-b); epiderme foliar (c); tricoma glandular (d-f) [MEV (a-b); LP (c-f)] [dr – cristal do tipo drusa; tg – tricoma glandular em tufos] Barras de escala: a-b = 2 μ m; c-f = 20 μ m.

FIGURA 20 – Microscopia de luz polarizada de cristais encontrados em *B. articulata*

Fonte: A autora

Notas: ST do caule de *B. articulata* [LP (a-f)] [es – cristal estiloide; bps – cristal bipiramidal simples, bpr – cristal bipiramidal retangular; se – cristal tipo seta] Barras de escala: e-f = 5 μ m; a-d = 10 μ m.

A produção dos cristais inorgânicos pode variar consideravelmente na sua morfologia de espécie para espécie. Do ponto de vista da genética, uma espécie em particular poderá produzir um determinado tipo de cristal, ou até mesmo um subconjunto de diferentes cristais e isto poderá diferenciá-la de outras espécies do gênero (Franceschi; Nakata, 2005).

A hipótese para a formação e controle desses cristais está no controle regulatório da expansão celular, na síntese de oxalato de cálcio, na absorção de cálcio pela planta e no acúmulo dele por células especializadas, chamadas de idioblastos cristalinos.

Do mesmo modo que uma espécie pode produzir um morfotipo específico, um gênero também pode possuir um morfotipo cristalino comum para ele, ou seja, as espécies daquele gênero terão aquele morfotipo em comum (Al-Rais; Watson, 1971; Franceschi; Nakata, 2005).

No gênero *Baccharis* o cristal mais comumente encontrado é o estiloide, podendo ser sugestivo como cristal característico do gênero. Ele aparece em *Baccharis gaudichaudiana* DC. (Budel *et al.*, 2003), *Baccharis rufescens* Spreng. var. *tenuifolia* (DC.) Baker (Souza *et al.*, 2013), *Baccharis cylindrica* (Less.) DC. (Budel *et al.*, 2004) e entre muitas outras.

Nenhum outro estudo na literatura caracterizou micromorfológicamente os cristais apresentados em *B. articulata*. Até pouco tempo esses cristais eram tidos como achados e não eram levados em consideração na diferenciação das espécies. Atualmente sabe-se que por passarem por controle genético podem servir como marcadores anatômicos, diferenciando assim as espécies.

Como o gênero *Baccharis* possui muitas espécies semelhantes, quanto mais marcadores anatômicos descritos na literatura, mais segura será a identificação dessas espécies.

Assim como a morfologia, a genética pode atuar sobre a localização do morfotipo cristalino na planta, variando consideravelmente de espécie para espécie (Al-Rais; Watson, 1971; Franceschi; Nakata, 2005). A localização dos cristais em *B. articulata* foi avaliada tanto por MEV quanto por LP, a qual evidenciou, através da birrefringência dos cristais, a presença destes tanto no eixo dos cladódios, como na epiderme das alas e nas células apicais dos tricomas glandulares. As definições dos morfotipos cristalinos e localização estão sumarizados no Quadro 1.

QUADRO 1 – Morfotipos cristalinos observados em *B. articulata*: definição e localização na espécie

		Morfotipo cristalino	Localização	Definição	Referências
Sistema cristalino	Sistema tetragonal	Bipiramidal simples	Eixo dos cladódios	São cristais caracterizados pela união direta de duas pirâmides.	CHVÁTAL, 2007; ULOTH <i>et al.</i> , 2014; SUN <i>et al.</i> , 2015
		Bipiramidal retangular	Eixo dos cladódios	Esses cristais possuem uma base consideravelmente espessa, semelhante a um retângulo, a qual faz a união das duas pirâmides das extremidades.	
		Piramidal retangular	Eixo dos cladódios	Apresenta-se como uma pirâmide a qual possui a base em formato de retângulo.	CHVÁTAL, 2007
	Sistema monoclinico	Cuneiforme	Eixo dos cladódios	São cristais semelhantes a um prisma retangular, porém suas extremidades são afiladas. Recebem essa nomenclatura por se assemelharem a uma cunha.	SILVA <i>et al.</i> , 2014
		Drusa	Eixo dos cladódios, epiderme foliar e células apicais do tricoma glandular	É tido como um agregado esférico de cristais, podendo ser de diferentes formas (tabular, estiloide) depositados individualmente.	FRANCESCHI & HORNER, 1980; HE <i>et al.</i> , 2012
		Estiloide	Eixo dos cladódios, epiderme foliar	Apresentam-se como cristais alongados, de extremidades pontiagudas em vista frontal, ou truncadas em face lateral.	FRANCESCHI & HORNER, 1980; RAMAN <i>et al.</i> , 2014
		Tabular ou romboidal	Eixo dos cladódios	Trata-se de um paralelogramo cujos lados adjacentes são desiguais. Recebe o nome de tabular pois assemelham-se a uma tábua	MACEDO, 211; SILVA <i>et al.</i> , 2014
		Cristal tipo seta	Eixo dos cladódios	É caracterizado por possuir uma extremidade pontiaguda e a oposta com uma reentrância em “V”, se assemelhando a ponta de uma seta.	RAESKI, 2020
	Areia cristalina	Areia cristalina arredondada	Eixo dos cladódios	Retratada como uma massa de pequenos cristais individuais, inferiores a 3 µm. Podem assumir diversas formas, aqui são apresentadas como: arredondadas; semelhante a cristais estiloides; e uma com formato não descrito na literatura semelhante a uma gravata borboleta.	FRANCESCHI & HORNER, 1980
		Areia cristalina de estiloide	Eixo dos cladódios		
		Areia cristalina tipo gravata borboleta	Eixo dos cladódios		

Fonte: A autora

5.1.2.3 Composição química

O controle genético da proporção de cálcio e a presença de substâncias contaminantes como metais pesados podem influenciar na determinação da morfologia dos cristais (Franceschi; Nakata, 2005).

De uma maneira geral, a composição química dos cristais poderá variar em função da composição química do solo onde a planta habita. A presença de sódio, potássio, cálcio, alumínio, cobre e sulfato em grandes quantidades no solo podem alterar o desenvolvimento dos morfotipos cristalinos, alterando a sua composição química (Bosqueiro, 1995; Webb, 1999).

Quimicamente, a formação desses cristais ocorre a partir do ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) sintetizado endogenamente. A partir daí os idioblastos cristalinos irão compactar e formar os morfotipos cristalinos. A forma química mais comumente encontrada é a de oxalato de cálcio (CaC_2O_4), entretanto, outras formas também podem aparecer, como é o caso do carbonato de cálcio ($CaCO_3$) (Bosqueiro, 1995).

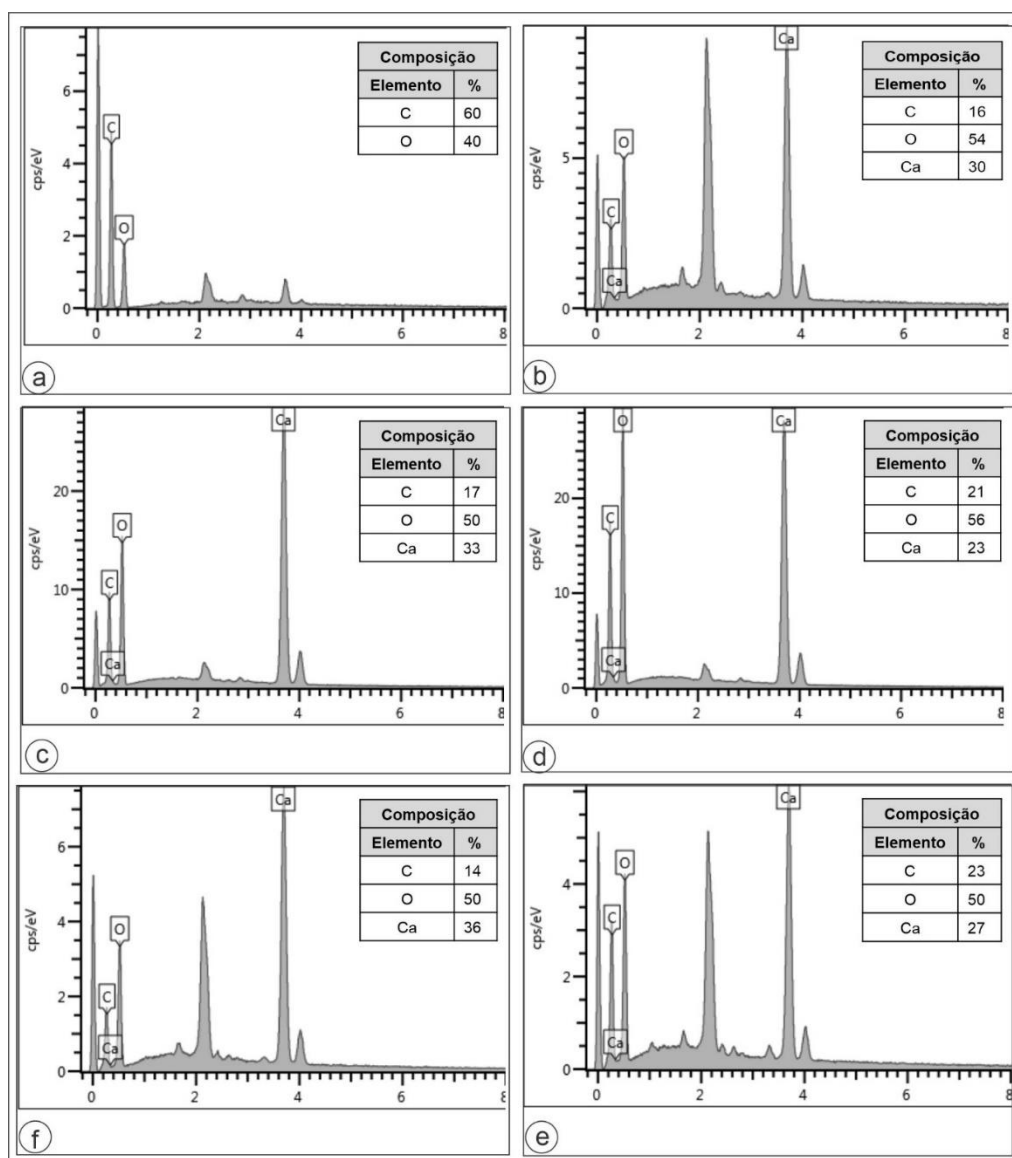
Os cristais de oxalato de cálcio aparecem em mais de 215 famílias botânicas distintas, e encontram-se distribuídos em quase todos os órgãos e tecidos vegetais, desde caules a raízes, estruturas foliares e sementes. Na maioria das vezes esses cristais se caracterizam por apresentarem formas bem delimitadas, exceto quando apresentam outros contaminantes em suas estruturas podendo assumir uma forma amorfa (Franceschi; Horner, 1980).

Um dos papéis importantes na função dos cristais é a detoxicação de metais como o alumínio e metais pesados, os quais são absorvidos pelas plantas devido a presença no solo. Como mecanismo de defesa, os metais acabam sendo eliminados do metabolismo vegetal por meio da associação com os cristais formados pela planta, caracterizando a detoxificação da espécie vegetal. Entretanto a associação destes contaminantes pode fazer com que o cristal assuma um formato amorfo e perca a sua característica genética previamente constituída (Franceschi; Horner, 1980; Franceschi; Nakata, 2005).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a identificação da composição química dos cristais, entretanto as mais comuns são a difração de raios-X e EDS. Os cristais observados em *B. articulata* foram submetidos a análise da composição química elementar por EDS, onde todos os espectros dos cristais evidenciaram picos de cálcio (Ca), carbono (C) e oxigênio (O).

A presença desses três componentes na proporção 1:2:4 evidenciam que estes cristais apresentam a composição de oxalato de cálcio. A Figura 21 b-e, exemplifica os picos encontrados em alguns cristais. Como forma de controle negativo uma célula vazia foi testada, apresentando apenas picos de carbono e oxigênio, elementos da composição química celular natural, garantindo confiabilidade a análise (Figura 21 a) (Raman *et al.*, 2014).

FIGURA 21 – EDS dos cristais de *B. articulata*



Fonte: A autora

Notas: [a - EDS controle em célula vazia; b-c - EDS de cristal bipiramidal retangular; d-e - EDS de cristal piramidal retangular; f - EDS de cristal tipo seta]

Recentemente, muitos trabalhos têm evidenciado a composição química dos cristais por EDS (Lersten; Horner, 2011; Saulle *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2020; Pauzer *et al.*, 2021) os quais demonstram predominância de cristais de oxalato de cálcio nas espécies.

Todo o conteúdo aquoso de um solo tem relação direta com a absorção de nutrientes em uma planta, com isso solos ricos em cálcio tendem a garantir a formação de cristais de oxalato de cálcio, contudo a presença de contaminantes ou outros compostos tendem a levar a adesão destes aos cristais, modificando assim a sua morfologia (Heinrichs, 2010). No caso de *B. articulata*, a tendência é que o solo onde a espécie habitava tinha predominância de cálcio sem contaminantes, pois nenhum destes foi observado nos espectros avaliados.

5.1.2.4 Estado de hidratação

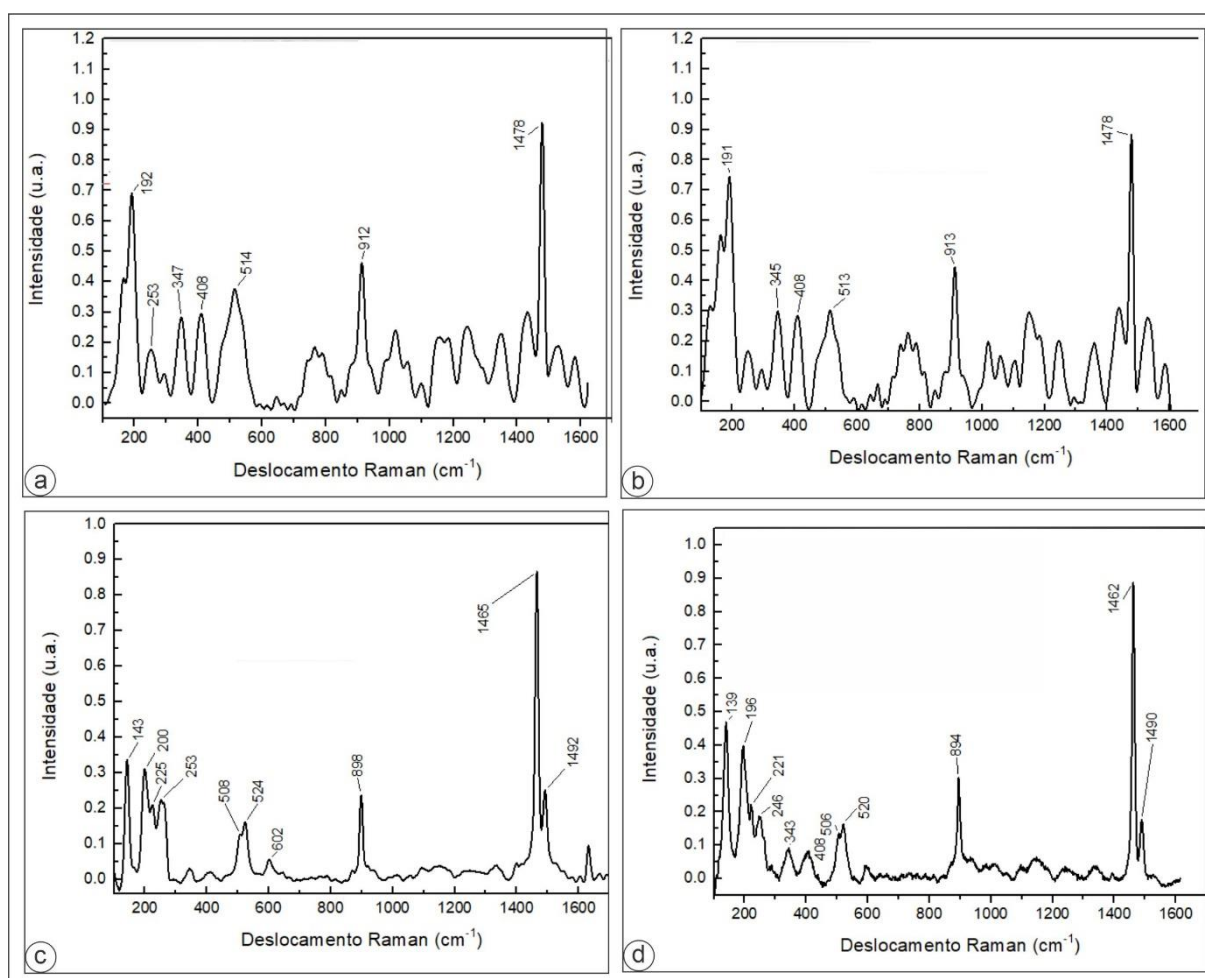
Bem como a composição química, o estado de hidratação dos cristais pode influenciar significativamente no desenvolvimento da morfologia dos cristais. Dois estados de hidratação são descritos, sendo eles a forma monohidratada (wewellite) e a forma dihidratada (weddelite). Dependendo da concentração de cálcio presente na planta, estas duas formas de hidratação poderão aparecer, contudo sempre mediadas por controle genético (Franceschi; Horner, 1980; Raman *et al.*, 2014).

A forma monohidratada geralmente ocorre em cristais ditos como do sistema monoclínico, os quais são cristais que possuem três eixos de comprimento diferentes, sendo eles cristais estiloides, tabulares, cuneiformes, enquanto a forma dihidratada compreende os cristais que fazem parte do sistema conhecido como tetragonal, o qual caracteriza-se por possuir três eixos mutuamente perpendiculares. Fazem parte deste grupo os cristais do tipo bipiramidal, piramidais e prismáticos (Franceschi; Nakata, 2005; Ishii, 1991).

Apesar da correlação entre a morfologia e o estado de hidratação denotar importância no desenvolvimento de algumas formas cristalinas, outras podem apresentar os dois estados de hidratação, como é o caso dos morfotipos cristalinos na forma de drusas, os quais podem se apresentar tanto na forma monohidratada, quanto na forma dihidratada. Esse fato pode ocorrer pois as drusas são formadas por uma deposição de cristais de diferentes formas, formando aglomerados (Franceschi; Nakata, 2005).

Em *B. articulata* ambos os estados de hidratação foram observados, sendo o estado dihidratado identificados nos cristais bipiramidais (Figura 22 a,b) e piramidais, enquanto o estado monohidratados nos cristais estiloides (Figura 22 c, d), cuneiforme, drusa, tabular e tipo seta. Todavia, os cristais do tipo areia cristalina não puderam ser analisados pelo equipamento devido seu tamanho ser inferior a 5 μm .

FIGURA 22 – Raman dos cristais de *B. articulata*



Fonte: A autora

Notas: Raman de cristais dihidratados (weddelita) (a-b); Raman de cristais monohidratados (wewelita) (c-d) [a-b – cristal bipiramidasi simples; c-d – cristal estiloide].

A diferença do estado de hidratação nos espectros Raman está principalmente relacionada às bandas de deslocamento em 1400 a 1600 cm^{-1} . Cristais dihidratados apresentam uma única banda em torno de 1475 a 1479 cm^{-1} , enquanto os cristais monohidratados tende a apresentar duas bandas em torno de 1460 a 1465 cm^{-1} e 1490 a 1495 cm^{-1} , em ambos os casos essas bandas de deslocamento representam uma assimetria de C=O (Shippey, 1980; Frost; Weier, 2003; Frost, 2004).

Um fator importante a observar na formação dos cristais de oxalato de cálcio é a concentração de cálcio presente, visto que quando a proporção de cálcio é maior, a quantidade e o tamanho dos cristais expressados pela planta serão maiores. Contudo, quando a quantidade de cálcio no solo é reduzida, tanto o tamanho quanto a quantidade de cristais expressados pela planta serão reduzidos (Faheed *et al.*, 2013).

Ainda não está claramente definido o mecanismo de controle genético e regulação química e de hidratação na formação dos cristais, entretanto sabe-se que esses passam por um rigoroso controle genético, e que cada espécie poderá produzir um morfotipo cristalino ou um subconjunto de morfotipos, que a diferenciarão de outras espécies. No caso de *B. articulata*, o conjunto dos cristais encontrados podem auxiliar na descrição morfoanatômica da espécie, bem como atuar como marcadores botânicos da espécie, diferenciando-a das demais, auxiliando na identificação, contribuindo para o controle da qualidade e para o desenvolvimento de futuras pesquisas.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

O Extrato de *B. articulata* foi analisado por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, a qual revelou 16 picos, dentre os quais, 13 foram identificados sendo: ácido quínico, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido 5-O-feruloilquínico, apigenina-C-pentosídeo-C-hexosídeo, ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico, ácido glucuronil-quiláico, ácido cafeoil-glucuronil-trihidroioleanólico, ácido acetil-cafeoil-glucuronil-dihidroioleanólico. A Tabela 1 demonstra os compostos encontrados no extrato.

TABELA 1. Composição fitoquímica do extrato aquoso de *B. articulata* obtida por análise LC-MS.

Pico	tR	MS ¹ -	MS ² -	Identificação
1	0.37	191.0556	-	Ácido quínico
2	1.33	353.0862	191.0557, 179.0344, 135.0443	Ácido neoclorogênico
3	2.63	191.0551	-	Ácido clorogênico
4	2.85	179.0345	135.0442	Ácido cafeico
5	3.79	447.1518	401.1458, 269.1033, 161.0454	n.i.
6	4.32	367.1025	193.0498, 173.0476	Ácido 5-O-feruloilquínico
7	4.70	563.1411	473.1084, 443.0975, 383.0767, 353.0667	Apigenina-C-pentosídeo-C-hexosídeo
8	4.96	563.1400	473.1073, 443.0966, 383.0776, 353.0668	Apigenina-C-pentosídeo-C-hexosídeo
9	5.76	515.1184	353.0857, 191.0552, 179.0342, 173.0449	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico
10	6.26	515.1184	353.0874, 191.0554, 179.0342, 173.0450	Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico
11	6.70	555.2448	-	n.i.
12	7.29	839.3904	631.3320	n.i.
13	7.91	661.3644	175.0235	Ácido glucuronil-quiláico
14	8.75	841.4012	679.3697, 503.3398, 175.0252, 161.0239	Ácido cafeoil-glucuronil-trihidroxioleanólico
15	9.64	867.4172	705.3856, 645.3644, 487.3416, 161.0241	Ácido acetil-cafeoil-glucuronil-dihidroxioleanólico
16	9.88	867.4183	705.3862, 645.3641, 487.3415, 161.0242	Ácido acetil-cafeoil-glucuronil-dihidroxioleanólico

Fonte: A autora

Notas: tR: tempo de retenção; n.i.: não identificado.

Os ácidos identificados no extrato fazem parte dos ácidos fenólicos, os quais apresentam a carboxila como um grupamento funcional. Esses ácidos podem ser divididos em duas classes, a dos ácidos hidroxibenzoicos que são componentes das estruturas dos taninos hidrolisáveis e encontram-se menos abundantes nos alimentos consumidos pelos humanos e os ácidos hidroxicinâmicos, os quais estão presentes em vários alimentos de origem vegetal, como é o caso do café e da erva mate (OLIVEIRA; BASTOS, 2011). Alguns exemplos dessa classe são os seguintes ácidos *trans*-cinâmicos: o ácido cafeico, *p*-cumárico, ferúlio e o ácido sinápico, os quais na maioria dos alimentos encontram-se esterificados com o ácido quínico (Garambone; Rosa, 2007; Oliveira; Bastos, 2011).

A esterificação do ácido quínico com os ácidos *trans*-cinâmicos resulta na formação dos ácidos clorogênicos, os quais são classificados de acordo com o tipo, número e posição dos resíduos de acila, podendo ser mono ésteres, como os ácidos cafeoilquínicos, feruloilquínicos ou cumaroilquínicos; podem ser di, tri e tetra ésteres; ou podem ser ésteres mistos do ácido cafeico e ácido ferúlico, como os ácidos cafeoilferuloilquínicos (Clifford, 2000; Oliveira; Bastos, 2011).

Estudos tem demonstrado que os ácidos clorogênicos além de apresentarem uma boa capacidade antioxidante, também podem diminuir significativamente a pressão arterial, sem efeito colateral aparente. Esse efeito hipotensor está relacionado à vasodilatação mediada pelo óxido nítrico (Watanabe *et al.*, 2006).

A ingestão, principalmente do ácido clorogênico pode melhorar a biodisponibilidade de óxido nítrico, visto que seus metabólitos podem tanto apresentar efeitos hipotensores, mas também auxiliar na eliminação de ânions superóxidos, os quais demonstram-se elevados em pacientes hipertensos (Suzuki *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2006). Esses ânions superóxidos reduzem a biodisponibilidade de óxido nítrico no tecido endotelial, e essa deficiência de óxido nítrico pode ser uma das causas da hipertensão arterial, visto que nesses pacientes a dilatação mediada pelo óxido nítrico é reduzida (Calver *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 2006).

5.3 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou os fitoterápicos como medicamentos convencionais que precisam apresentar dados

em estudos farmacológicos e toxicológicos, a fim de garantir eficácia e segurança da população (Brasil, 2009).

Da mesma forma é de grande importância estudar as atividades farmacológicas e tóxicas de plantas medicinais, visto que elas são utilizadas de maneira ampla pela população, mas apresentarão valores medicinais apenas se usadas da forma correta, além de poderem fornecer riscos toxicológicos (Carneiro *et al.*, 2014).

5.3.1 Estudos de Toxicidade em Dose Única (Toxicidade Aguda) em Ratos

5.3.1.1 Aparência geral, alterações comportamentais e taxa de mortalidade

Os efeitos da administração aguda do EABA sobre a aparência geral e alterações comportamentais estão apresentados na Tabela 2. Não foram observadas quaisquer alterações significativas na aparência ou no padrão de comportamento geral até o final dos 14 dias de observação. A DL₅₀ do EABA não foi estipulada porque nenhuma morte foi observada nos animais tratados com doses de até 2000 mg/kg.

5.3.1.2 Peso corporal final, ganho de peso corporal, padrão de alimentação e consumo de água

O peso corporal final de ratos fêmeas tratadas pela via oral com o EABA (2000 mg/kg) ou com o veículo estão apresentados na Tabela 3. O peso corporal final e os ganhos de peso corporal, ao longo de todo o período de tratamento, foram semelhantes entre os grupos que receberam o placebo ou o EABA. Além disso, o consumo diário de ração e água nos animais tratados com o EABA seguiram o mesmo padrão do observado para os animais tratados apenas com o veículo.

5.3.1.3 Peso relativo e absoluto dos órgãos alvo

Não houve diferenças significativas no peso absoluto (g) ou relativo (%) de todos os órgãos isolados de ratos fêmeas tratadas com o EABA ou com veículo após 14 dias do tratamento (Tabela 3).

TABELA 2 - Aparência geral e alterações comportamentais de ratos fêmeas tratadas agudamente com o EABA durante as primeiras 8 horas após a administração

Parâmetros	Veículo (8 h)	EABA (2000 mg/kg) (8 h)
<i>Alimentação</i>	Normal	Normal
<i>Agressividade</i>	Ausente	Ausente
<i>Visão</i>	Normal	Normal
<i>Audição</i>	Normal	Normal
<i>Convulsões</i>	Ausente	Ausente
<i>Salivação</i>	Ausente	Ausente
<i>Atividade</i>	Normal	Normal
<i>Respiração</i>	Normal	Normal
<i>Frequência cardíaca</i>	Normal	Normal
<i>Diarreia</i>	Ausente	Ausente
<i>Coma</i>	Ausente	Ausente
<i>Lesão tecidual</i>	Ausente	Ausente

Fonte: A autora

TABELA 3 - Efeitos do tratamento agudo com o EABA sobre o peso absoluto (g) e relativo (%) de órgãos e peso corporal final de ratos fêmeas após 14 dias da exposição

Órgão	Veículo	EABA (2000 mg/kg)
Peso corporal (g)	213 ± 12	215 ± 11
Peso relativo (%)		
<i>Fígado</i>	3,52 ± 0,03	3,45 ± 0,05
<i>Rins</i>	0,54 ± 0,01	0,44 ± 0,01
<i>Baço</i>	0,31 ± 0,01	0,21 ± 0,01
Peso absoluto (g)		
<i>Fígado</i>	6,87 ± 0,31	7,22 ± 0,39
<i>Rins</i>	1,24 ± 0,06	1,22 ± 0,05
<i>Baço</i>	0,65 ± 0,01	0,52 ± 0,01

Fonte: A autora

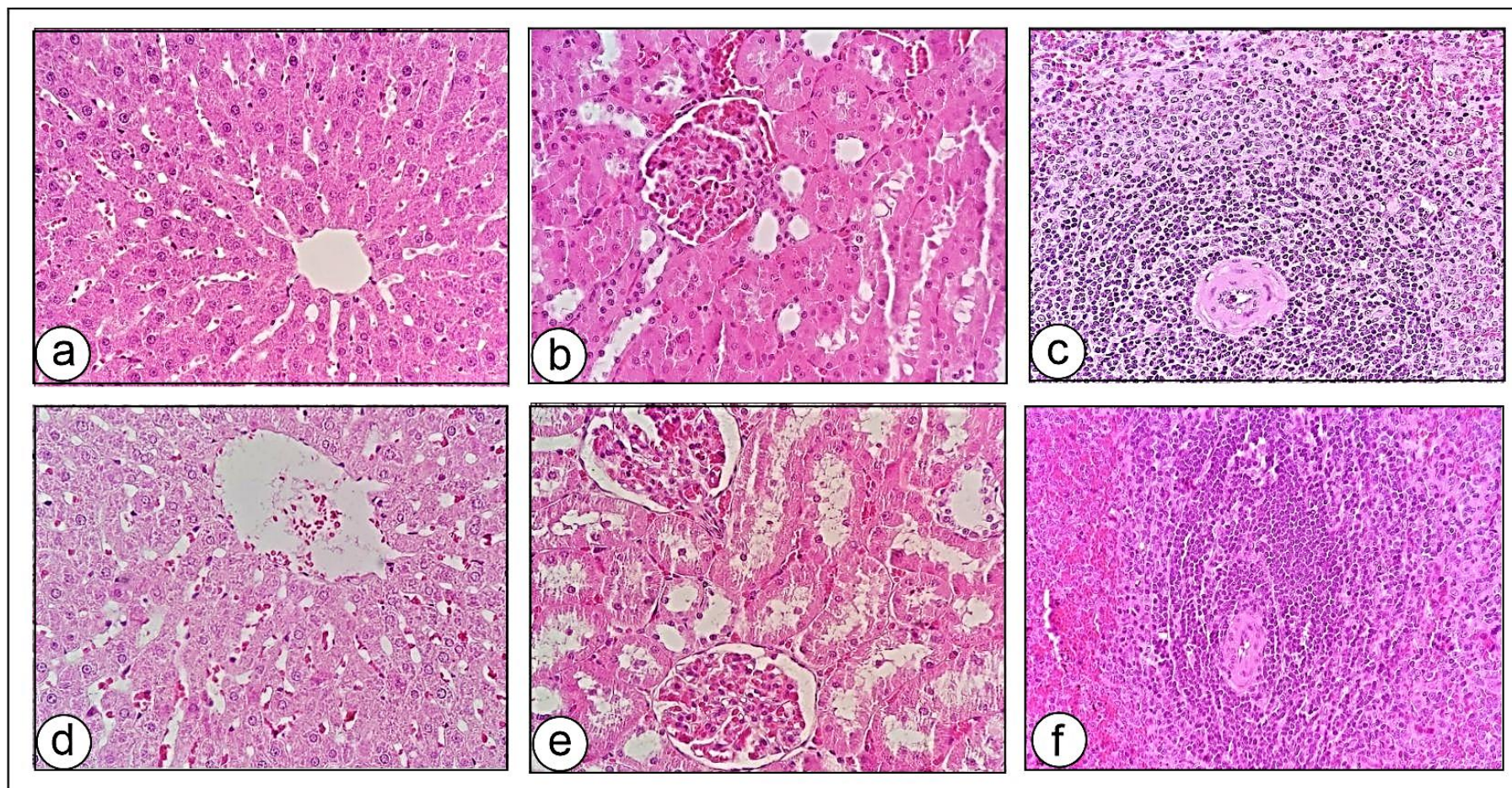
Notas: Peso relativo (%) = (peso absoluto do órgão x 100)/peso corporal final. Os valores estão expressos como a média ± erro padrão da média (n = 6). ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett's.

5.3.1.4 Necropsia e histopatologia

O exame macroscópico dos órgãos vitais não revelou nenhuma anormalidade entre todos os grupos experimentais. Não foram observados quaisquer sinais de inflamação, hemorragia, acúmulo de líquido ou outras alterações sugestivas de lesões em todos os tecidos estudados.

Nas análises histopatológicas, nenhuma alteração significativa foi identificada (Figura 23 a-f), sugerindo ausência de toxicidade aguda para o EABA nas doses utilizadas. No tecido hepático, o espaço porta, e a disposição radial dos hepatócitos (divididos em zona 1 e 2) apresentaram-se dentro dos padrões de normalidade para a espécie. Nos rins, não se observou quaisquer alterações nos corpúsculos renais, túbulos proximais, distais e pelve renal. A cápsula de tecido conjuntivo do baço, entre todos os grupos avaliados, apresentou morfologia normal. Além disso, a poupa vermelha não mostrou quaisquer sinais de alterações morfológicas; e na polpa branca, não se evidenciou nenhuma alteração no centro germinativo.

FIGURA 23 - Microfotografias representativas de material histológico obtido de diferentes órgãos de ratas tratadas com uma dose única do EABA (2000 mg/g) ou com o veículo.



Fonte: A autora

Notas: Material histológico do fígado (a, d); material histológico do rim (b,e); material histológico do baço(c,f). [a-c – tratamento com veículo; d-f – tratamento com EABA] Todas as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

5.3.2 Ensaio de Genotoxicidade

5.3.2.1 Teste do micronúcleo

A Figura 24 (A) mostra o número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) entre os diferentes grupos experimentais. Todos os animais que receberam o EABA (2000 mg/kg) apresentaram o número de EPCMN de maneira similar ao encontrado para os animais tratados apenas com o veículo (C-). Por outro lado, os animais tratados com a ciclofosfamida (C+) apresentaram um expressivo aumento no número médio de EPCMN, mostrando o potencial mutagênico desta substância. O tratamento com o EABA não acarretou quaisquer alterações significativas neste parâmetro quando comparado aos animais tratados apenas com o veículo.

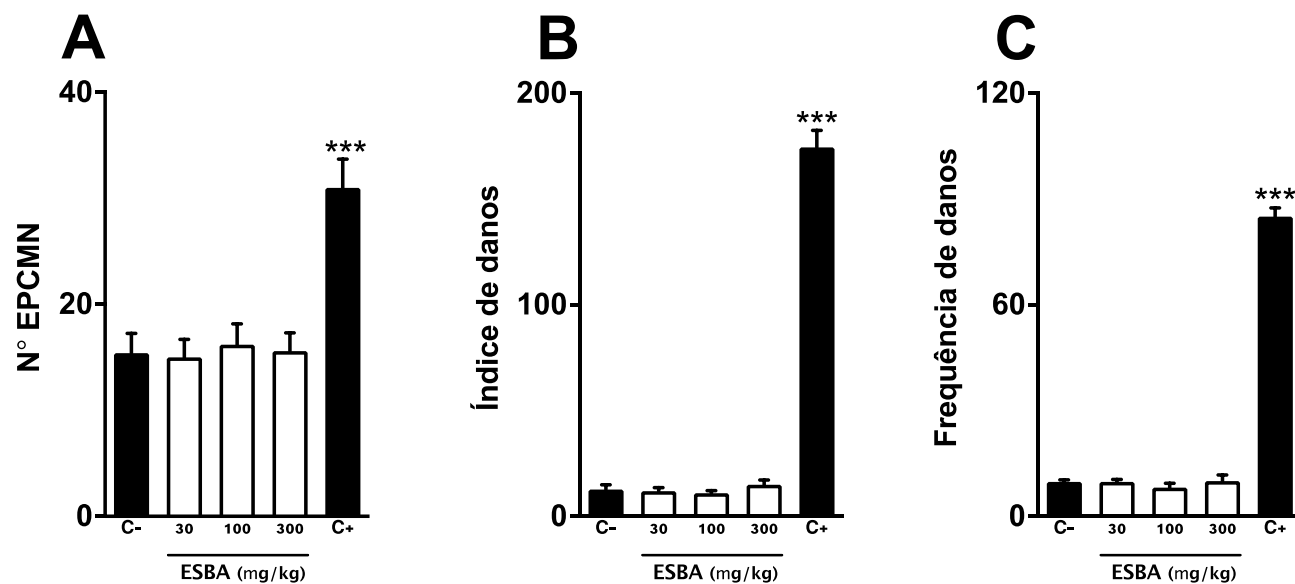
5.3.2.2 Ensaio cometa

A Figura 24 mostra os efeitos do tratamento agudo com o EABA e ciclofosfamida sobre índice de dano (B) e frequência de dano (C) ao DNA de ratos fêmeas. Nenhuma das doses testadas do EABA induziu qualquer alteração significativa ao DNA quando comparado aos animais tratados com o controle negativo (veículo). Por outro lado, a ciclofosfamida foi capaz de induzir um aumento significativo no índice e na frequência de dano em todos os animais testados.

5.3.2.3 Teste de AMES

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos, indicando média e desvio padrão do número de revertentes his+/placa, para os grupos controles (C+ e C-) e EABA, nas diferentes concentrações testadas, com linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100, na presença e ausência de ativação metabólica. A Tabela 5 apresenta as razões de mutagenicidade (RM). Verifica-se que não ocorreram aumentos na frequência de mutantes revertentes com o incremento da concentração do EABA e as razões de mutagenicidade foram todas menores que 2, indicando ausência de atividade mutagênica.

FIGURA 24 - Efeitos do tratamento com o EABA (30, 100 e 300 mg/kg) e com a ciclofosfamida (C+) sobre os eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) e sobre o índice de dano e frequência de dano



Fonte: A autora

Notas: Eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) (A); índice de dano (B) (tipo de dano multiplicado pelo número de células com o dano); frequência de dano (C) (número de células com danos, em 100 células avaliadas) ao DNA de ratos. [Os animais do controle negativo receberam apenas o veículo. Cada barra representa a média $\pm$ E.P.M. de seis animais. Asteriscos denotam o nível de significância em comparação com os animais do controle negativo (C-)] (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett's) (***) $p < 0,001$.

TABELA 4 - Mutagenicidade do EABA com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica para duas linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA100).

Tratamento ($\mu\text{g/placa}$)	TA98		TA100	
	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉
C-	21 $\pm$ 2,2	20 $\pm$ 3,1	151 $\pm$ 7,5	221 $\pm$ 13,1
EABA 62,5 $\mu\text{g/placa}$	19 $\pm$ 2,0	19 $\pm$ 3,1	153 $\pm$ 9,5	218 $\pm$ 7,1
EABA 125 $\mu\text{g/placa}$	20 $\pm$ 3,3	21 $\pm$ 5,2	151 $\pm$ 7,7	215 $\pm$ 9,9
EABA 250 $\mu\text{g/placa}$	19 $\pm$ 5,1	20 $\pm$ 6,3	149 $\pm$ 7,1	218 $\pm$ 8,1
EABA 375 $\mu\text{g/placa}$	19 $\pm$ 6,5	22 $\pm$ 7,3	155 $\pm$ 9,1	215 $\pm$ 9,5
C+	2021 $\pm$ 222***	2066 $\pm$ 295***	1926 $\pm$ 199***	2101 $\pm$ 215***

Fonte: A autora

Notas: Valores apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Controle negativo (C-) = água bidestilada; Controle positivo (C+) = TA98 (-S₉) nitrofenilenodiamina; TA98 (+S₉) 2-antramina; TA100 (-S₉) azida sódica; TA100 (+S₉) 2-antramina. *** $p < 0,001$ (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett's).

TABELA 5 - Razão de mutagenicidade (RM) do EABA com (+S₉) e sem (-S₉) ativação metabólica para duas linhagens de *Salmonella typhimurium* (TA98 e TA100).

Tratamento (µg/placa)	TA98		TA100	
	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉
<i>EABA 62,5 µg/placa</i>	0,84	0,91	0,96	0,93
<i>EABA 125 µg/placa</i>	0,85	0,90	0,94	0,99
<i>EABA 250 µg/placa</i>	0,80	0,90	0,92	0,96
<i>EABA 375 µg/placa</i>	0,82	0,88	0,90	0,98

Fonte: A autora

Apesar do uso terapêutico difundido, algumas espécies de *Baccharis* podem apresentar efeitos adversos e riscos à saúde, visto que podem apresentar substâncias que desencadeiem efeitos deletérios, resultando em casos clínicos problemáticos, como é o caso de *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers., também conhecida como carqueja, utilizada tradicionalmente como diurética e tônica, apresenta como principal efeito tóxico a indução do aborto (Grupta, 1995; Alonso, 1998; Dias *et al.*, 2009). Alguns estudos trabalham com a utilização crônica de carquejas, as quais podem apresentar uma ação inibitória na diferenciação de células neuronais a longo prazo (Losqui *et al.*, 2009; Hocayen *et al.*, 2012).

Frente aos estudos toxicológicos, *B. articulata* não se apresentou tóxica e nem mutagênica nos testes avaliados no presente trabalho. Todavia, vale ressaltar que a utilização indiscriminada por grupos específicos, como é o caso de gestantes e crianças, deve ser trabalhada com cautela, bem como a sua utilização de maneira crônica.

5.3.3 Avaliação dos Efeitos do EABA na Pressão Arterial e na Frequência Cardíaca em Ratos SHR

Após 15 minutos de estabilização e antes da administração de qualquer substância, a PAS, PAD e PAM basais observadas foram respectivamente $157,3 \pm 4,0$, $97,2 \pm 3,1$ e $119,3 \pm 3,4$ mm Hg, já a FC foi de 366 ± 35 batimentos por minuto (bpm).

A administração do EABA intraduodenal em uma dose de 300 mg/kg reduziu a PAS e a PAM em aproximadamente 25 mm Hg (Figura 25 A, B e C). Nenhum dos medicamentos influenciou a FC (Figura 25 D). Não houve diferença estatística nos dados registrados após a administração da hidroclorotiazida 25 mg/kg em comparação com a administração do EABA na dosagem de 300 mg/kg.

A administração prolongada do EABA resultou na redução significativa da pressão arterial no grupo dos ratos SHR. Nos animais controle, a PAS, PAD E PAM foram medidas como $157,2 \pm 4,1$, $98,2 \pm 4,8$ e $119,6 \pm 4,6$ mm Hg, respectivamente. Entretanto, nos animais que receberam um tratamento de 300 mg/kg de EABA, os valores da PAS, PAD e PAM diminuíram para $123,4 \pm 4,3$, $88,5 \pm 6,2$ e $93,1 \pm 3,3$ mm Hg, respectivamente (Figura 26 A-C). Não foram observadas alterações na FC em nenhum dos tratamentos (Figura 26 D). Os SHR tratados com hidroclorotiazida

apresentaram redução significativa na pressão arterial, comparável à observada nos animais que receberam a dose mais alta de EABA.

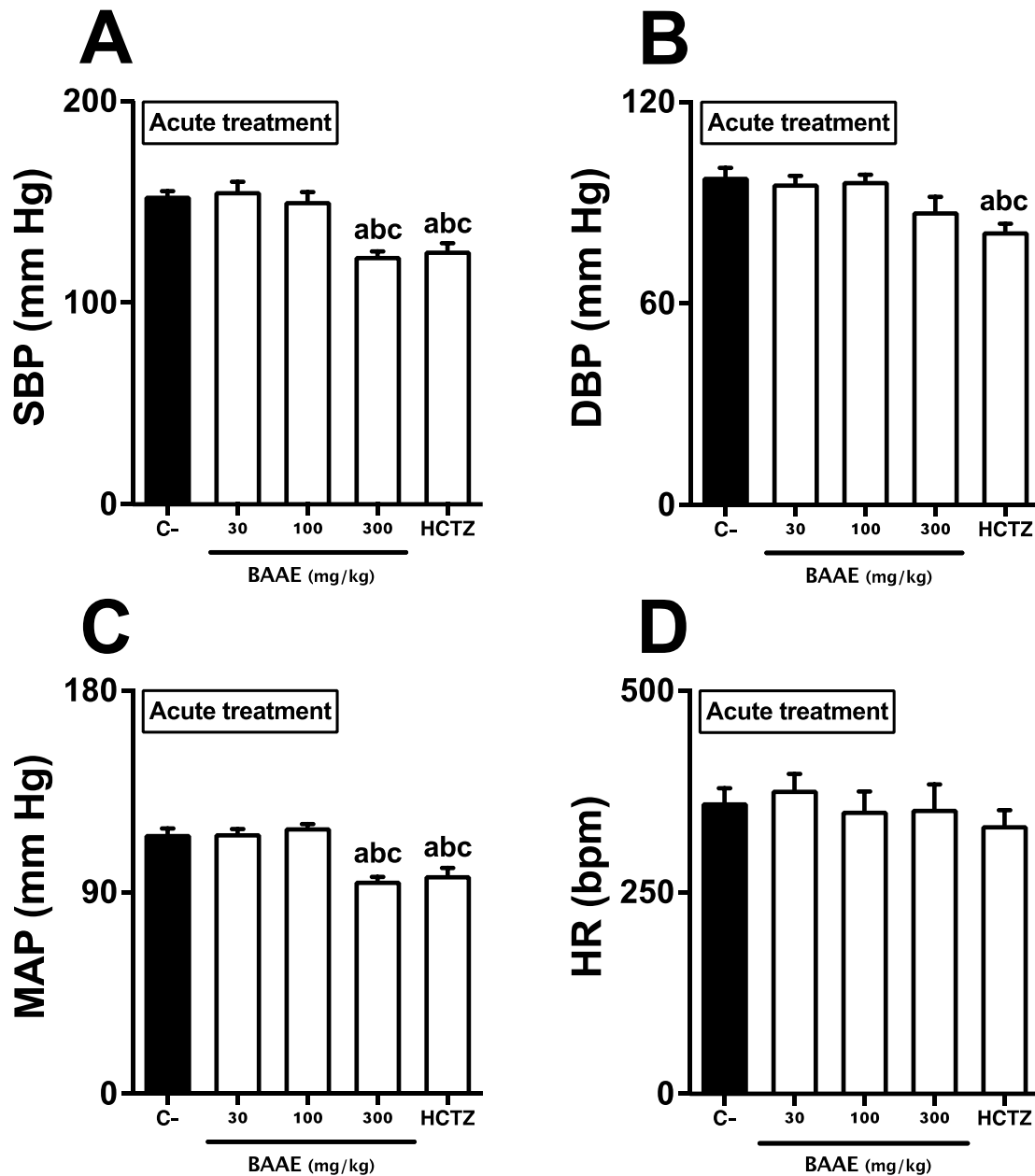
5.3.3.1 Avaliação das vias envolvidas nos efeitos hipotensivos do EABA

A resposta hipotensiva do EABA não envolveu a via da prostaglandina/adenosina monofosfato cíclica. A diminuição da pressão arterial causada pelo EABA não foi afetada quando tratada com indometacina (Figura 27 A-B) e DDA (Figura 27 C-D). A administração de indometacina e DDA também não ocasionou alteração na PAS ou PAM em nenhum dos grupos experimentais.

A via do óxido nítrico/glunilato ciclase e os canais de potássio (K^+) demonstraram-se envolvidos na redução da pressão arterial causada pelo EABA. A infusão contínua de L-NAME resultou em um aumento na PAS de $158,3 \pm 4,3$ mm Hg para $192,2 \pm 9,1$ mm Hg e um aumento na PAM de $119,2 \pm 4,2$ mm Hg para $146,4 \pm 8,3$ mm Hg. A infusão de L-NAME impediu a capacidade do EABA 300 mg/kg de reduzir a PAS e a PAM, enquanto os efeitos da hidroclorotiazida foram ligeiramente impedidos (Figura 28 A-B). A infusão de azul de metileno teve um impacto significativo na hipotensão induzida pelo EABA, contudo não afetou os efeitos da hidroclorotiazida (Figura 28 C-D).

Os efeitos hipotensores do EABA e da hidroclorotiazida foram completamente anulados em ratos que foram previamente tratados com o bloqueador de canal de K^+ não específico TEA (Figura 28 E-F).

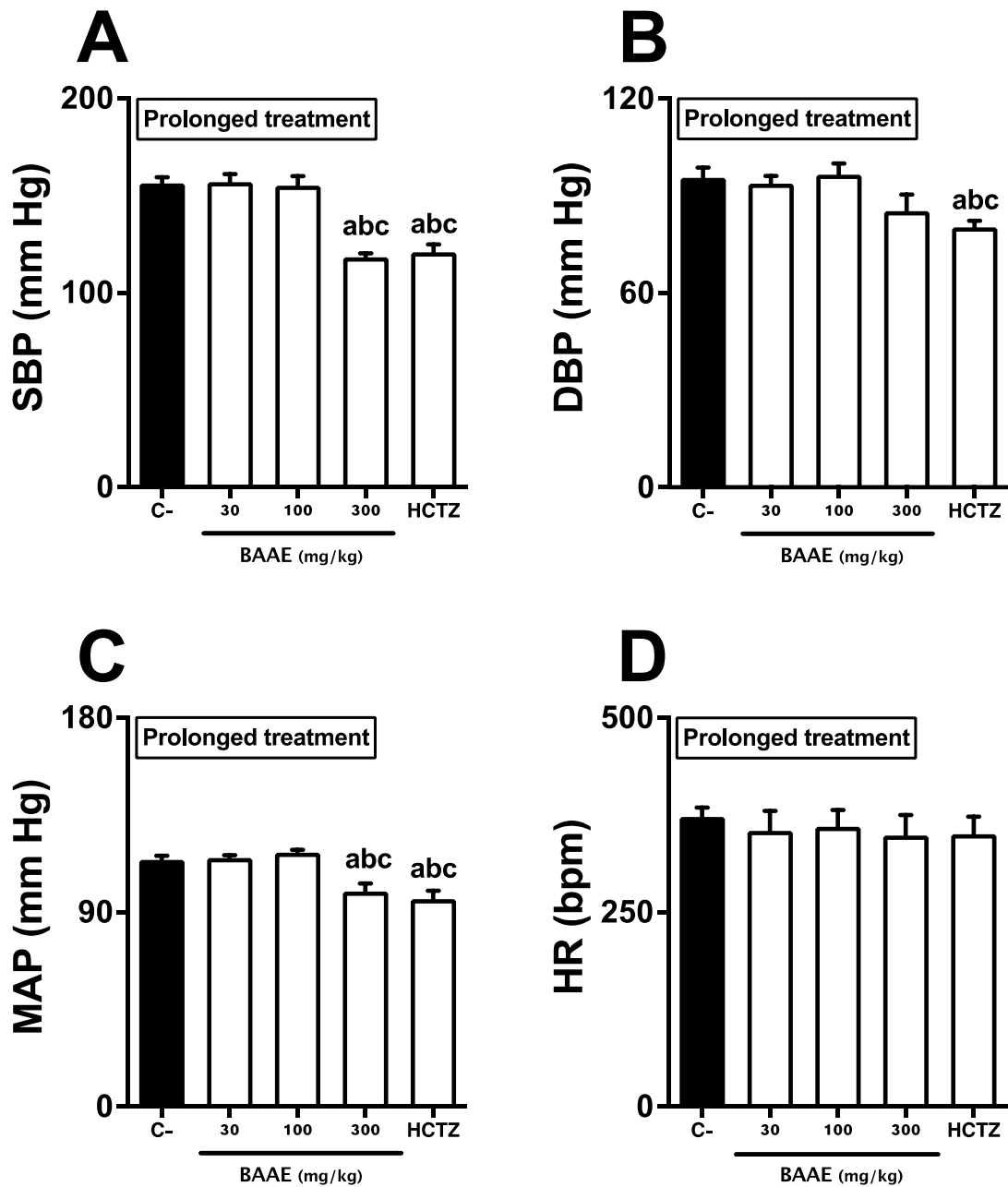
FIGURA 25 – Efeito anti-hipertensivo agudo do EABA.



Fonte: A autora

Notas: EABA foi administrado por via intraduodenal em ratos anestesiados. C-, efeito do veículo de controle (salina 0,9%, 200 µl). Os resultados foram expressos como média ± SEM (n = 6/grupo). ^ap < 0,05, comparado respectivamente com o grupo controle; ^bp < 0,05, comparado com 30 mg/kg de EABA; ^cp < 0,05, comparado com 100 mg/kg de EABA (ANOVA seguido de teste de post hoc de Bonferroni). DBP, pressão arterial diastólica; HR, frequência cardíaca; MAP, pressão arterial média; SBP, pressão arterial sistólica.

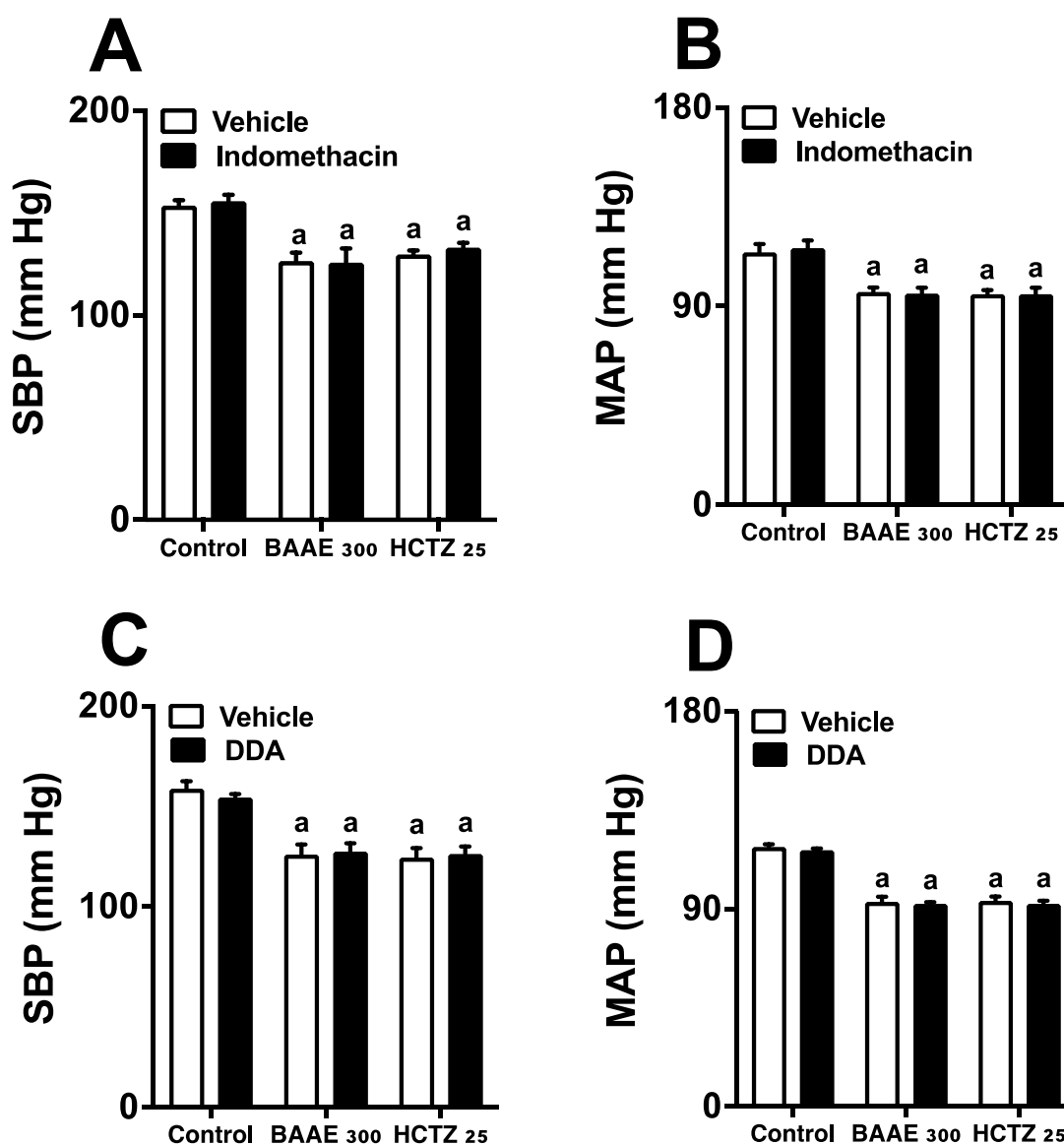
FIGURA 26 - Efeitos anti-hipertensivos sustentados do EABA.



Fonte: A autora

Notas: O EABA foi administrado diariamente por via oral durante 7 dias. C, efeito do controle do veículo (água filtrada, 300 µl). Os resultados são expressos como média ± SEM (n = 6/grupo). ^ap < 0,05, em comparação com o respectivo grupo de controle; ^bp < 0,05, em comparação com 30 mg/kg de EABA; ^cp < 0,05, em comparação com 100 mg/kg de EABA (ANOVA seguido de teste de post hoc de Bonferroni). DBP, pressão arterial diastólica; HR, frequência cardíaca; MAP, pressão arterial média; SBP, pressão arterial sistólica.

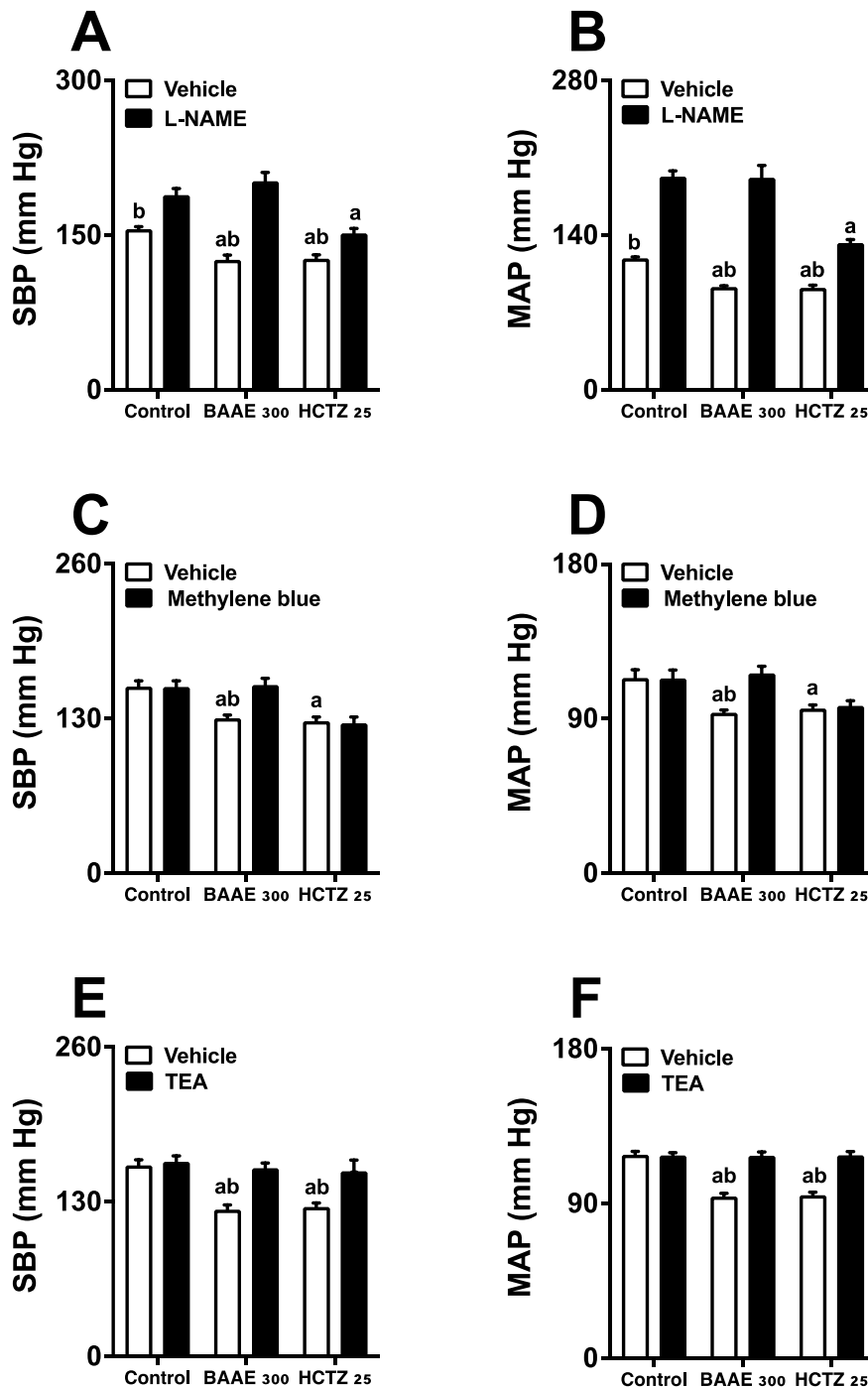
FIGURA 27 – Ausência do envolvimento da via da prostaglandina/AMPC no efeito anti-hipertensivo do EABA.



Fonte: A autora

Notas: Os animais receberam EABA (300 mg/kg, intraduodenal) na presença e na ausência de uma injeção intraperitoneal de indometacina (3 mg/kg) (A, B) ou DDA (0,1 mg/kg) (C, D). $p < 0,05$, em comparação com o respectivo grupo de controle (ANOVA seguido pelo teste post hoc de Bonferroni). DDA, 2',5'-dideoxiadenosina; DBP, pressão arterial diastólica; HR, frequência cardíaca; MAP, pressão arterial média; SBP, pressão arterial sistólica.

FIGURA 28 - Envolvimento da via óxido nítrico/GMPc e ativação do canal de K⁺ no efeito anti-hipertensivo do EABA.



Fonte: A autora

Notas: Os animais receberam EABA (300 mg/kg, intraduodenal) na presença e ausência de uma infusão contínua de L-NAME (7 mg/kg/min) (A, B), uma infusão contínua de azul de metileno (150 nmol/kg/min) (C, D) ou uma injeção intraperitoneal de tetraetilamônio (400 μ mol/kg) (E, F). Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM ($n = 6$ /grupo). ^a $p < 0,05$, em comparação com o respectivo grupo de controle; ^b $p < 0,05$, em comparação com o respectivo inibidor (ANOVA seguido pelo teste post hoc de Bonferroni). L-NAME, éster metílico de N ω -Nitro-L-arginina; MAP, pressão arterial média; SBP, pressão arterial sistólica; TEA, tetraetilamônio.

O extrato aquoso de *B. articulata* demonstrou ter efeito na pressão arterial, atuando contra a hipertensão. Frente ao seu efeito cardiovascular pode-se observar que os efeitos do extrato envolvem a via do NO/guanosina monofosfato cíclica (GMPc) e a abertura de canais de K^+ .

As células endoteliais desenvolvem diversas funções, incluindo a troca capilar, a secreção de substâncias e a regulação da pressão arterial. O endotélio normal desempenha um papel protetor, mantendo a vasodilatação e a proliferação de células musculares lisas. Em condições normais, esse endotélio mantém a homeostase vascular liberando fatores que controlam o tônus vascular. O NO é um dos fatores relaxantes, bem como o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI₂).

A PGI₂ causa ativação da adenilato ciclase nas células musculares lisas, levando a um aumento nas concentrações de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), a qual causa relaxamento vascular. A função do EDHF não está totalmente compreendida, todavia varia de acordo com a espécie animal e o tipo de vaso sanguíneo. Dentre os EDHF mais conhecidos temos o K^+ que promove a hiperpolarização das células do músculo liso devido a ativação de canais retificadores de K^+ ou até mesmo Na^+/K^+ ATPase. Esse processo envolve a transferência desta hiperpolarização por meio das junções de gap mioendoteliais, permitindo que atinja as células musculares lisas e, conseqüentemente, cause o relaxamento vascular (Edwards *et al.*, 1998; Shimokawa, 2010; Oliveira, 2013).

Em contrapartida, a via do óxido nítrico é conhecida por seus efeitos anti-inflamatórios, antiproliferativo e vasodilatador. Este se difunde pelas células musculares lisas adjacentes e estimula a guanilato ciclase (GC) a produzir GMPc, a qual se trata de um potente vasodilatador. Adicionalmente, o NO pode ativar diretamente os canais de K^+ cálcio dependentes, nas células do músculo liso vascular (Moncada; Higgs, 2006; Souza Junior *et al.*, 2012).

A resposta hipotensiva induzida pelo EABA não demonstrou ser afetada por inibidores da via PGI₂/AMPc, mas sim completamente suprimida por inibidores da via do óxido nítrico sintetase e da guanilato ciclase. Isso sugere que o EABA induz o relaxamento vascular por meio de mecanismos dependentes do endotélio, possivelmente envolvendo a via NO/GMPc. Outro efeito hipotensor do EABA está relacionado à abertura de canais de K^+ . Quando um bloqueador clássico não específico de canais de K^+ chamado TEA foi administrado, observou-se uma redução

total no efeito hipotensor do EABA, isso é indicativo da participação direta dos canais de K^+ na resposta hemodinâmica do extrato, portanto os canais de K^+ parecem desempenhar um papel nos efeitos dependentes do NO, visto que a via do NO nos vasos sanguíneos incluem a abertura de canais de K^+ .

CONCLUSÃO

Microscopicamente *B. articulata* apresenta células epidérmicas com parede anticlinal espessa e estômatos anomocíticos. Sua epiderme é unisseriada e revestida por cutícula estriada e delgada. Tricomas glandulares bisseriados contendo drusas nas células apicais podem ser observados em tufo na epiderme. Cordões de clorênquima podem ser observados subjacentes ao tecido de revestimento do eixo. Feixes vasculares e dutos secretores estão presentes tanto nas alas quanto no entorno do eixo.

Onze morfotipos cristalinos foram observados na espécie, sendo eles: bipiramidal simples, bipiramidal retangular, piramidal retangular, cuneiforme, drusa, estiloide, tabular, cristal tipo seta, areia cristalina arredondada, areia cristalina de estiloide e areia cristalina tipo gravata borboleta. Todos os morfotipos foram encontrados no eixo dos cladódios. Cristais estiloides e drusas também foram encontrados na epiderme foliar, bem como drusas foram identificadas nos tricomas glandulares. A composição química dos cristais foi de oxalato de cálcio, enquanto ambos estados de hidratação foram encontrados, sendo o monohidratado para cristais do sistema monoclinico (estiloides) e os dihidratados para cristais tetragonais (bipiramidais).

Quanto a caracterização fitoquímica, 13 picos foram identificados, a saber: ácido quínico, ácido neoclorogênico, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido 5-O-feruloilquínico, apigenina-C-pentosídeo-C-hexosídeo, ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico, ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico, ácido glucuronil-quiláico, ácido cafeoil-glucuronil-trihidroioleanólico, ácido acetil-cafeoil-glucuronil-dihidroioleanólico. Dentre esses destacam-se principalmente os ácidos clorogênicos, os quais tem demonstrado uma capacidade hipotensora mediada pelo óxido nítrico. Alguns estudos têm demonstrado que a ingestão de ácidos clorogênicos melhoram a biodisponibilidade de óxido nítrico acarretando o efeito de vasodilatação e consequentemente no efeito anti-hipertensivo.

Levado em conta a capacidade anti-hipertensiva o EABA causou diminuição na pressão arterial de ratos SHR, diminuição esta dependente da abertura de canais de K⁺ nas células musculares lisas induzidas pelo óxido nítrico. Esse resultado é sugestivo da participação dos ácidos clorogênicos no efeito anti-hipertensivo de *B. articulata*.

Frente a toxicidade aguda, *B. articulata* não se apresentou tóxica, visto que não foram observadas alterações na aparência e nem de comportamento dos animais no período de testes. Nenhuma morte foi observada até a concentração de 2000 mg/kg. Nenhum sinal de inflamação, hemorragia, ou lesões foram observados nos tecidos estudados.

Além disso, a administração do extrato de *B. articulata* nessa concentração não acarretou aumento, nem alterações significativas, dos eritrócitos policromáticos micronucleados, como também nenhuma das doses testadas induziu qualquer alteração significativa no DNA e as frequências de mutantes revertentes não apresentaram nenhum aumento, indicando que a administração de *B. articulata* não acarreta atividade mutagênica.

Fornecer características microscópicas adicionais às previamente descritas na literatura é de grande importância, pois podem servir como marcadores anatômicos, bem como determinar a toxicidade, genotoxicidade e comprovar a terapêutica é de suma relevância, pois podem servir de base para estudos futuros, para a espécie, para o gênero ou até mesmo para o grupamento das carquejas. Além disso, comprovar o efeito terapêutico de *B. articulata* pode auxiliar também no desenvolvimento de pesquisas relacionadas a doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Archive for Organic Chemistry**, v. 2, n. 7, p. 76-96, 2007.

AGUIAR, A. T. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F. O jardim venenoso: a química por trás das intoxicações domésticas por plantas ornamentais. **Química nova**, v. 44, n. 8, p. 1093-1100, 2021.

ALMEIDA, M. Z. **Plantas Medicinais**. Salvador: EDUFBA, 2011, 221p.

ALMEIDA V. P., RAMAN V., RAESKI P. A., URBAN A. M., SWIECH J. N., MIGUEL M. D., FARAGO P. V., KHAN I. A., BUDEL J. M. Anatomy, micromorphology, and histochemistry of leaves and stems of *Cantinoa althaeifolia* (Lamiaceae). **Microscopy Research and Technique**, v. 83, n. 5, p. 551-557, 2020.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: ISIS Ediciones, 1998. 354 p.

AL-RAIS, A. H.; MYERS, A.; WATSON, L. The isolation and properties of oxalate crystals from plants. **Annals of Botany**, v. 35, p. 1213-1218, 1971.

ALVES JÚNIOR, A. S.; MELO, E. S. P.; GONDIM, J. M. S.; NASCIMENTO, V. A. Plantas medicinais e fitoterápicos regulamentados no Brasil: risco de toxicidade por metais pesados. **Research Society and Development**, v. 11, n. 1, 2022.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasil, 2013.

ARGENTA, S. C.; ARGENTA, L. C.; GIACOMELLI, S. R.; CEZAROTTO, V. S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**, v. 7, n. 12, p. 51-60, 2011.

ASSIS, R. S. **A importância de estudos sobre fitoterápicos da Amazônia: seis exemplos de medicamentos extraídos da região**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação Bacharelado em Farmácia) – Faculdade de Educação e Meio Ambiente, Ariquemes, 2021.

BARBOSA, A. S.; LEAL, E. L. V.; MARTINS, I. M.; STEFANELLO, S. T.; DOBRACHINSKI, L. Uso de plantas medicinais nativas do cerrado pela população idosa da região oeste do estado da Bahia: um estudo etnofarmacobotânico. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 23, n. 4, p. 1-14, 2023.

BOBEK, V. B.; HEIDEN, G.; OLIVEIRA, C. F.; ALMEIDA, V. P.; PAULA, J. P. P.; FARAGO, P. V.; NAKASHIMA, T.; BUDEL, J. M. Comparative analytical micrographs of “vassouras” (*Baccharis*, Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 665-672, 2016.

BARROS, F. M. C.; PEREIRA, K. N.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M. Plantas de uso medicinal no município de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 652-662, 2007.

BARROSO, G. M.; BUENO, O. L. Compostas – Subtribo *Baccharidinae*. **Flora Ilustrada Catarinense**. p. 1-302, 2002.

BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976. 326 p.

BOGO, C. A.; ANDRADE, M. H.; PAULA, J. P.; FARAGO, P. V.; BOSCARDIN, P. M. D.; BUDEL, J. M. Comparative analysis of essential oils of *Baccharis* L.: a review. **Revista Stricto Sensu**, Ponta Grossa, v. 1, n. 2, p. 1-11, 2016.

BONIL, L. N.; BUENO, S. M. Plantas medicinais: benefícios e malefícios. **Revista Científica UNILAGO**, p. 1-12, 2017.

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

BORGES, J.; XAVIER, C. A. G.; MOURA, D. J.; RICHTER, M. F.; SUYENAGA, E. S. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 12-17, 2010.

BOSQUEIRO, A. L. D. Metabólitos Secundários Em Plantas. **Revista Ciência e Educação**, v. 13, n. 2, p. 91-96, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BUDEL, J. M. **Estudo farmacognóstico de espécies de carqueja: *Baccharis dracunculifolia* DC., *B. articulata* (Lam.) Pers., *B. cylindrica* (Less.) DC. e *B. gaudichaudiana* DC., Asteraceae**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2003.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, P. V. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Acta Farmacêutica Bonaraense**, v. 23, n. 4, p. 477-483, 2004.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, P. V.; MATZENBACHER, N. I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*,

Asteraceae: I – Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 3, p. 268-271, 2005.

BUDEL, J. M.; RAMAN, V.; MONTEIRO, L. M.; ALMEIDA, V. P.; BOBEK, V. B.; HEIDEN, G.; TAKEDA, I. J. M.; KHAN, I. A. Foliar Anatomy and microscopy of six Brazilian species of *Baccharis*. **Microscopy Research and Technique**, p. 1-30, 2018.

BURGOS, C.; ALFONSO, L.; FERRO, E.; LANGJAHR, P. Actividad inmunomoduladora de espécies de género *Baccharis*. **Revista Paraguaya de Reumatologia**, v. 8, n. 1, p. 45-50, 2022.

CALVER, A.; COLLIER, J.; MONCADA, S.; VALLANCE, P. Effect of local intra-arterial NG-monomethyl-L-arginine in patients with hypertension: the nitric oxide dilator mechanism appears abnormal. **Journal of Hypertension**, v. 10, n. 9, p. 1025-1031, 1992.

CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R. V.; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 373-382, 2016.

CAMPOS, A. C. T. **Solução hidroalcoólica e extrato de carqueja doc para o controle de gorgulho em grãos de milho**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação Bacharel em Agronomia) – Universidade Federal da Fronteira do Sul., Erechim, 2015.

CAPACIO, A. F. Z.; BELONIAS, B. S. Occurrence and variation of calcium oxalate crystals in selected medicinal plant species. **Annals of Tropical Research**, v. 40, n. 2, p. 45-60, 2018.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência**, Iporá, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CHVÁTAL, M. **Mineralogia para principiantes: Cristalografia**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Geologia, 2007. 232 p.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and Other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolismo. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 1033-1043, 2000.

COLET, C. F.; DAL MOLIN, G. T.; CAVINATTO, A. W.; BAIOTTO, C. S.; OLIVEIRA, K. R. Análises das embalagens de plantas medicinais comercializadas em farmácias e drogarias do município de Ijuí/RS. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 2, p. 331-339, 2015.

DIAS, L. F. T.; MELO, E. S.; HERNANDES, L. S.; BACCHI, E. M. Atividade antiúlcera e antioxidante de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 309-314, 2009.

DOLCE, O.; POMPEO, J. N. **Fundamentos de matemática elementar: geometria espacial posição e métrica**. São Paulo: Atual editora, 2013. 484 p.

EDWARDS, H. G. M.; FARWELL, D. W.; JENKINS, R.; SEAWARD, M. R. D. Vibrational Raman spectroscopic studies of calcium oxalate monohydrate and dehydrate in lichen encrustations on renaissance frescoes. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 23, n. 3, p. 185-189, 1992.

EDWARDS, G. K⁺ is an endothelium-derived hyperbolarizing factor in tat arteries. **Nature**, v. 396, n. 6708, p. 269-272, 1998.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 360-367, 2009.

FAGG, C. W.; LUGHADHA, E. N.; MILLIKEN, W.; HIND, D. J. N.; BRANDÃO, M. G. L. Useful brazilian plants listed in the manuscripts and publications of the Scottish medic and naturalista Geroqe Gardner (1812-1849). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 18-29, 2015.

FAHEED, F.; MAZEN, A.; ABD ELMOHSEN, S. Physiological and ultrastructural studies on calcium oxalate crystal formation in some plants. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, n. 1, p. 139-152, 2013.

FERNANDES, T. M. **Plantas Medicinais: memória da ciência do Brasil**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2004, 260p.

FERREIRA, E. T.; SANTOS, E. S.; MONTEIRO, J. S.; GOMES, M. S. M.; MENEZES, R. A. O.; SOUZA, M. J. C. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos: uma revisão integrativa sobre a atuação do enfermeiro. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 2.; n. 3, p. 1511-1523, 2019.

FERREIRA, N. C. **Identificação, morfometria e morfologia da ferrugem da erva-grossa (*Elephantopus mollis*-ASTERACEAE)**. 2023. Monografia (Bacharelado em Agronomia) – Instituto Federal Goiano, Urutaí, 2023.

FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL Jr. G. D. A política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 381-400, 2014.

FLORES, D. E. G. **Evaluación de la producción y características de semillas de Asteraceae de páramo de Zhurucay em épocas de alta y baja precipitación**. 2022. Monografia (Bacharelado em Engenharia Agrônoma) – Faculdade de Ciências Agropecuárias, Universidade de Cuenca, Cuenca, 2022.

FRADE, A. C. M. **Fitoquímica e avaliação do efeito sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias de espécies do gênero *Baccharis***. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

FRANCESCHI, V. R.; HORNER, H. T. Calcium oxalate crystals in plants. **The Botanical Review**, v. 46, n. 4, p. 361-416, 1980.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: Formation and function. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p. 41-71, 2005.

FROST, R. L.; WEIER, M. L. Raman spectroscopy of natural oxalates at 298 and 77 K. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 34, n. 10, p. 776-785, 2003.

FROST, R. L. Raman spectroscopy of natural oxalates. **Analytica Chimica Acta**, v. 517, n. 1-2, p. 207-214, 2004.

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.18, n.2, p.229-235, 2007.

GARLET, T. M. B. **Plantas medicinais nativas de uso popular no Rio Grande do Sul**. Santa Maria: UFSM PRE, 2019, 104p.

GASPAROTTO JUNIOR, A.; BOFFO, M. A.; LOURENÇO, E. L.; STEFANELLO, M. E.; KASSUYA, C. A.; MARQUES, M. C. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 517-522, 2009.

GRUPTA, m. p. **Plantas medicinales iberoamericanas**. Santafé de Bogotá: Editora Presencia Ltda, 1995, 79 p.

HAEFFNER, R.; HECK, R. M.; CEOLIN, T.; JARDIM, V. M. R.; BARBIERI, R. L. Plantas medicinais utilizadas para o alívio da dor pelos agricultores ecológicos do Sul do Brasil. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 14, n. 3, p. 596-602, 2012.

HE, H.; BLEBY, T. M.; VANEKLAAS, E. J.; LAMBERS, H.; KUO, J. Morphologies and elemental compositions of calcium crystal in phyllodes and branchlets of *Acacia roborum* (Leguminosae: Mimosidae). **Annals of Botany**, n. 109, p. 887 – 896, 2012.

HEIDEN, G.; MACIAS, L.; BOBROWSKI, V. L.; IGANCI, J. R. V. Comercialização de carqueja por evateiros da zona central de Pelotas, Rio Grande do Sul. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 2, p. 50-57, 2006.

HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V. L.; MACIAS, L. Biogeografia de *Baccharis* sect. *Caulopterae* (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 58, n. 4, p. 787-796, 2007.

HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; MACIAS, L. *Baccharis* sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 943-983, 2009.

HEIDEN, G.; ANTONELLI, A.; PIRANI, A. A. J. R. (2019). A novel phylogenetic infrageneric classification of *Baccharis* (Asteraceae: Astereae), a highly diversified American genus. **Taxon**, v. 58, n. 5, p. 1048-1081, 2019.

HEINRICHS, R. **Composição do Solo**. São Paulo: Universidade Estadual Paulista Campus de Dracena, 2010.

HOCAYEN, P. A. S.; CAMPOS, L. A.; POCHAPSKI, M. T.; MALFATTI, C. R. M. Avaliação da toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis drunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **INSULA Revista de Botânica**, Florianópolis, n. 41, p. 23-31, 2012.

ISHII, Y. Three kinds of calcium oxalate hydrates. **Nippon kagaku kaishi**, n. 1, p. 63-70, 1991.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Books, 1940. 523 p.

KAPPEL, V. D. **Estudo de atividade biológica de *Baccharis articulata*, *Musa x paradisíaca* e rotina na homeostasia da glicose em modelos experimentais in vivo e in vitro**. 2012. Tese (Doutorado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

KARAM, T. K.; DALPOSSO, L. M.; CASA, D. M.; DE FREITAS, G. B. L. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 280-286, 2013.

KLAUDE, M., ERIKSSON, S., NYGREN, J., AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, v. 363, n. 2, p. 89-96, 1996.

KLINDER, L. M. **Avaliação farmacobotânica e farmacológica de *Cuphea calophylla* Cham. & Schtdl. subsp *mesostemon* (Koehne) Lourteig**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019.

KONYAR, S. T.; OZTURK, N.; DANE, R. Occurrence, types and distribution of calcium oxalate crystals in leaves and stems of some species of poisonous plants. **Botanical Studies**, v. 55, n. 32, p. 1-9, 2014.

KRAUS, J. E.; SOUSA, H. C.; REZENDE, M. H., CASTRO, N. M.; VECCHI, C.; LUQUE, R. Astra Blue and Basic Fuchsin Double Staining of Plant Materials. **Biothechnic & Histochemistry**, v. 73, n. 5 p. 235-243, 1998.

LOSQUI, Y. R.; ROZTE, F. S. S.; ALMEIDA, M. B.; BITTENCOURT, A. H.; PEREIRA, S. P. Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) DC., (Asteraceae) sobre cultura de células in vivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 931-936, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. **Instituto plantarum**, Nova Odessa, p. 512, 2008.

MACEDO, M. A. **Construções Geométricas e Geometria Dinâmica**: Licenciatura em Matemática. Fortaleza: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, 2011. 93 p.

MACHADO, P. A. F. **Fundamentos da geometria espacial**. Belo Horizonte: CAED-UFMG, 2013. 120 p.

MACHADO C. D.; RAMAN V.; REHMAN J. U.; MAIA, B. H.; MENEGHETTI, E. K.; ALMEIDA, V. P.; SILVA, R. S.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A.; BUDEL, J. M. *Schinus molle*: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 1-10, 2019.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Journal of Natural Products**, v. 25, n. 4, p. 320-331, 1962.

MANFRON, J.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A.; RAMAN, V. Morpho-anatomical characteristics of species of *Baccharis*. In: FERNANDES, G. W.; OKI, Y.; BARBOSA, M. **Baccharis: From evolutionary and ecological aspects to social uses and medicinal applications**. Springer, Cham. 2021. p. 217-237.

MARON, D.M., AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3-4, p. 173-215, 1983.

MENDES, J. S. **Análises proteômicas da matriz protéica de cristais de oxalato de cálcio em *Theobroma cacao* e *Sansevieria* sp.** 2010. Dissertação. (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2010.

MING, L. C. *Baccharis*: de filho de Júpiter a vassoura e carqueja: uma visão botânica e etnobotânica histórica e os problemas de produtos comercializados. **Scientia Naturalis**, Rio Branco, v. 4, n. 1, p. 264-286, 2022.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 193-201, 2006.

NICKLAS, W.; BANEUX, P.; BOOT, R.; DECELLE, T.; DEENY, A. A.; FUMANELLI, M.; ILLGEN-WILCKE, B.; FELASA. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. **Laboratory Animals**, v. 36, n. 1, v. 20-42, 2002.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 367-373, 1964.

OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development). **Guideline 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure**. Guideline for testing of chemicals. Paris: OECD editors, p. 1-26, 2001.

OLIVEIRA, F. Q.; GONÇALVES, L. A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 36-41, 2006.

OLIVEIRA, S. Q. **Composição química e análise biológica de espécies do gênero *Baccharis***. 2008. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácido fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, A. B. **Avaliação dos mecanismos envolvidos na vasodilatação dependente do endotélio em aorta de camundongos tratados com isoproterenol**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

OLIVEIRA, M. C. B.; CRUZ, C. K. S.; ROCHA, G. M. M.; BRITO, M. G. A.; OLIVEIRA, G. A. L. Toxicidade e atividade antibacteriana de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças respiratórias: revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. 1-29, 2020.

OLIVEIRA FILHO, L. F. C.; SILVA, T. B.; SOUZA, L. E. V.; ALVES, P. P.; SILVA, M. J.; SANTANA, A. C.; BATISTA, E. N. S.; LORENZO, V. P.; SOUZA, E. E. M.; VILAR, F. C. R. **Importância da identificação taxonômica das plantas medicinais: revisão narrativa**. Editora Científica Digital, 2023, 10p.

PANIS, C. Plantas do Gênero *Baccharis* em Fitoterapia. Uso Popular X Comprovação Científica. **Infarma**, v. 20, n. 5-6, p. 30-33, 2008.

PAUZER, M. S., BORSATO, T. O., ALMEIDA, V. P., RAMAN, V., JUSTUS, B., PEREIRA, C. B., FLORES, T. B., MAIA, B. H. N. S., MENEGUETTI, E., KANUNFRE, C. C., PAULA, J. F. P., FARAGO, P. V. & BUDEL, J. M. *Eucalyptus cinerea*: Microscopic profile, chemical composition of essential oil and its antioxidant, microbiological and cytotoxic activities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 64, p. 1-19, 2021.

PEDROZA, R. H. S. **O risco do uso inadequado das plantas medicinais**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2023.

PEDROSO, R. S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 1-19, 2018.

PINHEIRO, J. A. S.; ALVES, D. B.; PASSOS, X. S.; MAIA, Y. L. M. Hepatotoxicidade de plantas medicinais e produtos herbais. **Revista Referências em Saúde – Faculdade Estácio de Sá Goiás**, Goiás, v. 3, n. 1, p. 132-137, 2020.

PINHO, J. L. R.; BATISTA, E.; CARVALHO, N. T. B. **Geometria I**. Florianópolis: EAD/UFSC/CED/CFM, 2010, 330 P.

RAESKI, P. A. **Caracterização microscópica de cristais de *Baccharis* (Asteraceae): uma contribuição para a diferenciação das espécies**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2020.

RAMAN, V.; HORNER, H. T.; KHAN, I. A. New and unusual forms of calcium oxalate raphide crystals in the plant kingdom. **Journal of Plant Research**. v. 127, n. 6, p. 721-730, 2014.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica. Divisão de Fomento à Qualificação da Assistência Farmacêutica. Política Intersetorial e Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Rio Grande do Sul. **Memento de chás medicinais da política intersectorial de plantas medicinais e fitoterápicos do Rio Grande do sul**. Porto Alegre: ESP/SES/RS, 2022.

ROCHA, L. P. B.; ALVES, J. V. O.; AGUIAR, I. F. S.; SILVA, F. H.; SILVA, R. G.; ARRUDA, L. G.; NASCIMENTO FILHO, E. J.; BARBOSA, B. V. D. R.; AMORIM, L. C.; SILVA, P. M.; SILVA, M. V. Uso de plantas medicinais: histórico e relevância. **Research, Society and Development**, v. 10, n.1, p.1-10, 2021.

RODRIGUES, T. A.; LEANDRO NETO, J.; CARVALHO, T. A. R.; BARBOSA, M. E.; CARVALHO, A. V. A valorização das plantas medicinais como alternativa à saúde: um estudo etnobotânico. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 1, p. 411-428, 2020.

ROQUE, N.; TELES, A. M.; NAKAJIMA, J. N. **A família Asteraceae no Brasil: classificação e diversidade**. Salvador: EDUFBA, 2017. 260 p.

SAULLE, C. C.; RAMAN, V.; OLIVEIRA, A. V. G.; MAIA, B. H. L. N.; MENEGHETTI, E. K.; FLORES, T. B.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A.; BUDEL, J. M. Anatomy and volatile oil chemistry of *Eucalyptus saligna* cultivated in south Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 2, p. 125-134, 2018.

SAVOLDI, E. C. **Asteraceae na vegetação campestre do campus Laranjeiras do Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul, Paraná, Brasil**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Laranjeiras do Sul, 2023.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. *In*: HOLLAENDER, A. **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**. New York: Plenum Press, 1976. cap. 36, p.31-53.

- SCHNEIDER, A. A. **Estudo taxonômico de *Baccharis* L. sect. *Caulopterae* DC. (Asteraceae: Astereae) no Brasil**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.
- SENIGALIA, R. L. C.; FERREIRA, A. L. S.; KRATZ, D.; COELHO, M. F. B.; SANTOS, A. S. R. M.; CASTRO, D. A. Toxicidade de extratos vegetais de plantas do cerrado de uso medicinal. **Brazilian Journal os Development**, Curitiba, v. 6, n. 8, p. 55308-55317, 2020.
- SFORCIN, J. M.; SOUZA, J. P. B.; SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; BÚFALO, M. C.; TONUCCI, L. R. S. ***Baccharis dracunculifolia* uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira**. São Paulo: Editora UNESP, 2012.
- SHIMOKAWA, H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 915-922, 2010.
- SHIPPEY, T. A. Vibrational studies of calcium oxalate monohydrate (whewellite) and an anhydrous phase of calcium oxalate. **Journal of Molecular Structure**, v. 63, n. 2, p. 157-166, 1980.
- SHOBE, W. R., LERSTEN, N. R. A techniques for clearing and staining Gymnosperm leaves. **Botanical Gazette**, v. 128, n. 2, p. 150-152, 1967.
- SILVA, R. F. F.; AGUIAR-DIAS, A. C. A.; MENDONÇA, M. S. Rosetas e concreções cristalinas silicificadas em *Piper* (Piperaceae): registros inéditos de macropadrões. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 435-446, 2014.
- SIQUEIRA, N. C. S.; ALICE, C. B.; THIESEN, F. V. Aspectos farmacognósticos perfil cromatográfico dos constituintes de *Baccharis articulata* Lam. (Pers.), Compositae. **Caderno de Farmácia**, v. 4, n. 1-2, p. 63-76, 1988.
- SOARES, F. M.; TORQUILHO, H. S.; MARQUES, C. A. Aspectos anatômicos da composição do óleo essencial da folha de *Triphasia trifolia* (Burm. F.) P. Ilson (Rutaceae). **Revista Fitos**, 2022.
- SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica; 1998, 179p.
- SOUZA, T. M.; SÁ, C. C.; FAVARO, E. T.; CÓRDOBA, G. M. C.; RAMOS, A. C. S.; NOBRE, J. A. S. Análise comparative entre o teor de cafeína informado no rótulo de suplementos para atletas em relação ao quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista de Nutrição Esportiva**, v. 13, n. 78, p. 265-271, 2019.
- SOUZA JUNIOR, T. P.; ASANO, R. Y.; SALES, M. P. M.; COELHO, J. M. O.; SIMÕES, H. G. Óxido nítrico e exercício: uma revisão. **Revista da Educação Física UEM**, v. 23, n. 3, p. 469-481, 2012.

SUN, X. Y.; OUYANG, J. M.; ZHU, W. Y.; LI, Y. B.; GAN, Q. Z. Size-dependent toxicity and interactions of calcium oxalate dehydrate crystals on vero renal epithelial cells. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 3, p. 1864-1878, 2015.

SUZUKI, A.; KAGAWA, D.; OCHIAI, R.; TOKIMITSU, I.; SAITO, I. Green coffee bean extract and its metabolites have a hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension Research**, v. 25, n.1, p.99-107, 2002.

ULOTH, M. B.; CLODE, P. L.; YOU, M. P.; BARBETTI, M. J. Calcium oxalate crystals: An integral component of the *Sclerotinia sclerotiorum*/ *Brassica carinata* Pathosystem. **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 1-15, 2015.

WATANABE, T.; ARAI, Y.; MITSUI, Y.; KUSAURA, T.; OKAWA, W.; KAJIHARA, Y.; SAITO, I. The blood pressure-lowering effect and safety of chlorogenic acid from green coffee bean extract in essential hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 28, n. 5, p.439-449, 2006.

WEBB, M. A. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. **The Plant Cell**, v. 11, p. 751-761, 1999.

ZAHO, W.; SHARMA, N.; JONES, F.; RAITERI, P.; GALE, J. D.; DEMICHELIS, R. Anhydrous calcium oxalate polymorphism: a combined computational and synchrotron X-ray diffraction study. **Crystal Growth e Design**, v. 16, p. 5954-5965, 2016.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA MICROSCOPY RESEARCH & TECHNIQUE

Received: 26 January 2023 | Revised: 19 April 2023 | Accepted: 15 May 2023
DOI: 10.1002/jemt.24363

RESEARCH ARTICLE

MICROSCOPY
RESEARCH & TECHNIQUE WILEY

Calcium oxalate crystal macropattern and its usefulness in the taxonomy of *Baccharis* (Asteraceae)

Paola Aparecida Raeski^{1,2}  | Gustavo Heiden³ | Andressa Novatski² |
Vijayasankar Raman⁴  | Ikhlas Ahmed Khan⁴ | Jane Manfron^{1,2,4} 

¹Pharmaceutical Sciences Graduate Program, State University of Ponta Grossa, Paraná, Brazil

²Health Science Graduate Program, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brazil

³Laboratory of Genetic Resources, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Brazil

⁴National Center for Natural Products Research, School of Pharmacy, The University of Mississippi, Mississippi, USA

Correspondence

Paola Aparecida Raeski, Pharmaceutical Sciences Graduate Program, State University of Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Paraná, Brazil.
Email: paola.ap.raeski@gmail.com

Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Review Editor: Mingying Yang

Abstract

This study provides a comprehensive account of the various types of calcium oxalate crystals found in the genus *Baccharis* and assesses the exceptional value of crystal macropatterns for the taxonomy of the genus. The morphotype, occurrence, and chemical composition of the crystals found in the stems and leaves are studied. The 44 species included in this study were selected based on a broad phylogeny-based sampling covering seven subgenera and 31 sections. These species were chosen to represent all the main phylogenetic lineages of *Baccharis*; thus, the sampling also represents a comprehensive coverage concerning evolutionary significance for such a large and environmentally and economically important plant group. The samples were analyzed by light microscopy, scanning electron microscopy (SEM), and energy-dispersive x-ray spectroscopy (EDS). Several morphotypes of crystals, including druses, crystal sand, styloids and prisms, were present. Based on their chemical composition, the crystals were classified as pure calcium oxalate, mixtures of oxalates and sulfates, and mixtures of oxalates, sulfates, and silica. The crystal macropatterns observed in this study aid in species identification and provide novel data for the taxonomy of *Baccharis*.

Research Highlights

Most species of *Baccharis* have a specific crystalline pattern. Each species produces a crystal morphotype or a set of morphotypes specific to it. The crystals observed are formed by calcium oxalate.

KEYWORDS

crystal shapes, energy-dispersive x-ray spectroscopy, light microscopy, polarized light microscopy, scanning electron microscopy

1 | INTRODUCTION

Crystals of calcium oxalate are common in Angiosperms and occur in most tissues and organs in the plant. They are formed from endogenously synthesized oxalic acid and calcium taken from the environment, shaped, and accumulated in species-specific morphologies (Meric, 2009). The morphotypes of crystals and their locations (crystal macropatterns) are determined by gene expression and are often

species-specific (Horner et al., 2012). Therefore, these features are applicable in plant systematics, ecophysiological, and phylogenetic studies (Lersten & Horner, 2011; Silva et al., 2014).

The most common minerals formed by plants are calcium oxalate, calcium carbonate, and silica (Bouropoulos et al., 2001). The excess calcium is usually precipitated in calcium salts such as carbonate, citrate, malate, oxalate, phosphate, and silicate (Weiner & Dove, 2003). Calcium sulfate crystals are rare in plants (He et al., 2012).

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY

Vol.66(spe): e23230078, 2023
<https://doi.org/10.1590/1678-4324-ssbfar-2023230078>
 ISSN 1678-4324 Online Edition
 II South-Brazilian Symposium on Pharmacognosy



Article - Health Science/Pharmacognosy

Applications of Calcium Oxalate Crystal Microscopy in the Characterization of *Baccharis articulata*

Paola Aparecida Raeski^{1*}
<https://orcid.org/0000-0002-8481-4612>

Gabrielly de Oliveira Ayres²
<https://orcid.org/0000-0001-5480-079X>

Luciane Mendes Monteiro¹
<https://orcid.org/0000-0003-2896-8147>

Gustavo Heiden³
<https://orcid.org/0000-0002-0046-6500>

Andressa Novatski⁴
<https://orcid.org/0000-0002-8327-6285>

Vijayasankar Raman⁵
<https://orcid.org/0000-0001-7368-9644>

Ikhlas Ahmed Khan⁵
<https://orcid.org/0000-0001-5464-4643>

Emerson Luiz Botelho Lourenço⁶
<https://orcid.org/0000-0002-1798-7871>

Arquimedes Gasparotto Junior⁷
<https://orcid.org/0000-0003-3433-5098>

Paulo Vitor Farago¹
<https://orcid.org/0000-0002-9934-4027>

Jane Manfron¹
<https://orcid.org/0000-0003-1873-2253>

¹Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Ponta Grossa, Paraná, Brasil; ²Universidade Estadual de Ponta Grossa, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Ponta Grossa, Paraná, Brasil; ³Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil; ⁴Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Ponta Grossa, Paraná, Brasil; ⁵National Center for Natural Products Research, University of Mississippi, University, MS, USA; ⁶Universidade Paranaense, Laboratório de Pesquisa Pré-clínica de Produtos Naturais, Umuarama, Paraná, Brasil; ⁷Universidade Federal da Grande Dourados, Laboratório de Eletrofisiologia e Farmacologia Cardiovascular, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Editor-in-Chief: Yasmine Mendes Pupo
 Associate Editor: Sinvaldo Baglie

Received: 24-Jan-2023; Accepted: 25-May-2023

*Correspondence: paola.ap.raeski@gmail.com; Tel.: +55-42-3220-3124

HIGHLIGHTS

- Eleven crystalline morphotypes were found in *Baccharis articulata*.
- Calcium oxalate is the chemical composition of the crystals.
- Both monohydrate and dihydrate types were found in *B. articulata* crystals.
- Crystal morphotypes can be used as anatomical markers.

Abstract: *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., popularly known as carqueja, carquejinha or carqueja-doce, is a plant widely used in traditional medicine as a diuretic, digestive and antidiabetic. Due to its similar morphology with other species of the "carqueja group", especially *Baccharis pentaptera* (Less.) DC., it can be easily confused even by specialists. Thus, this study aimed to characterize micromorphology of the crystals present in *B. articulata* to show botanical markers that can help differentiate this species from other

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Dourados-MS, 8 de outubro de 2021.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"PROSPECÇÃO ETNOFARMACOLÓGICA DE ESPÉCIES NATIVAS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ APLICADA ÀS DOENÇAS CARDIOVASCULARES"**, registrada sob o protocolo de nº 07/2020, sob a responsabilidade de *Arquimedes Gasparotto Junior* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal Da Grande Dourados, em reunião de 19/06/2020.

<i>Finalidade</i>	() Ensino (X) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	01/01/2021 a 31/12/2024
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus</i> , <i>Wistar</i> e da linhagem <i>Spontaneously Hypertensive Rats (SHR)</i>
<i>Nº de animais</i>	195 – 135 <i>Wistar</i> e 60 <i>SHR</i>
<i>Peso/idade</i>	90 dias
<i>Sexo</i>	Machos – 45 <i>Wistar</i> e 60 <i>SHR</i> / Fêmeas 90 <i>Wistar</i>
<i>Origem</i>	Biotério Central UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA