

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

JOCIANI ASCARI

ESTUDO QUÍMICO E BIOATIVIDADES DE *Baccharis uncinella* DC.

PONTA GROSSA
2007

JOCIANI ASCARI

ESTUDO QUÍMICO E BIOATIVIDADES DE *Baccharis uncinella* DC.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Mariza Boscacci Marques

PONTA GROSSA
2007

Ascari, Jociani

A811e Estudo químico e bioatividades de *Baccharis uncinella* DC.

Jociani Ascari. Ponta Grossa, 2007.

75 f.

Dissertação (Mestrado em Química Aplicada), Universidade Estadual de Ponta Grossa -PR.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariza Boscacci Marques.

1. *Baccharis uncinella*. 2.-óleo essencial. 3. - ácidos arilpropenóicos.
4.- atividade antimicrobiana. 5.- efeitos em eritrócitos. I. Nunes, Domingos Sávio. II. Marques, Mariza Boscacci. III.T.

CDD: 540

TERMO DE APROVAÇÃO

JOCIANI ASCARI

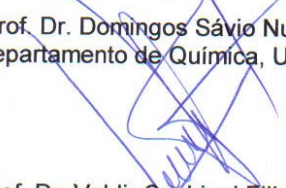
"ESTUDO QUÍMICO E BIOATIVIDADES DA *BACCHARIS UNCINELLA* DC."

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

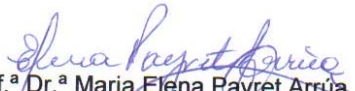
Orientador:



Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes
Departamento de Química, UEPG/PR



Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho
Curso de Farmácia, UNIVALI/SC



Prof.ª Dr.ª Maria Elena Payret Arrua
Departamento de Química, UEPG/PR

Ponta Grossa, 28 de fevereiro de 2007.

Dedico este trabalho,
aos meus pais, em
reconhecimento ao esforço e dedicação em favor
da minha educação. Vocês são meus eternos
orientadores!

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Domingos Sávio Nunes, pela orientação, amizade, e pelos ensinamentos transmitidos.

À professora Mariza, pela coorientação, conhecimentos transmitidos, apoio e amizade.

Aos meus familiares e amigos, por mais belas que sejam as palavras ditas, sempre serão insuficientes para traduzir meus sentimentos em relação a vocês.

Às amigas Juliane e Liliam, companheiras de moradia, pela paciência, pelo apoio de todas as horas, pela divisão de responsabilidades e por todos os bons momentos de convivência.

Ao Moisés, agradeço pela paciência, compreensão, ajudando-me a alcançar este objetivo.

A todos os meus amigos da pós-graduação, que estiveram ao meu lado durante esta etapa, tornando nossa jornada muito mais agradável.

Aos funcionários desta instituição, que possibilitaram meu trabalho e minha convivência em um ambiente sempre muito agradável.

E a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram na elaboração desta dissertação.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Meus sinceros agradecimentos.

"O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".

Fernando Pessoa

RESUMO

Baccharis uncinella (Asteraceae), popularmente conhecida como vassoura, é pouco conhecida do ponto de vista químico, havendo apenas dois trabalhos científicos anteriores sobre seus metabólitos secundários - os constituintes voláteis. No presente estudo, o óleo essencial das folhas de *B. uncinella* e nove extratos obtidos em Soxhlet com solventes orgânicos a partir das folhas, cascas e lenho foram analisados por CCD, UV e IV e submetidos a testes de atividade contra microrganismos; além disto, foram também analisadas as interações de extrato aquoso das folhas com células eritrocitárias humanas dos tipos sanguíneos O⁺, O⁻, A⁺ e B⁺. Nos testes antimicrobianos, foram usados o microfungo *Candida albicans*, as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *S. saprophyticus* e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo essencial apresentou ação contra *B. cereus*, *S. aureus* e *C. albicans*, da mesma forma que todos os extratos orgânicos, mas o crescimento de *S. saprophyticus* não foi inibido por nenhum deles. Os extratos das cascas, quando comparados com os obtidos de outras partes da planta, foram ativos contra o maior número de microrganismos e apresentaram as mais fortes atividades. A concentração inibitória mínima do óleo essencial foi determinada como 50 µL/mL tanto contra *S. aureus* como contra *C. albicans*, podendo ser considerada uma atividade antimicrobiana moderada. Foram isoladas pequenas quantidades dos três compostos fenólicos majoritários, cujas análises indicam trata-se de derivados de ácidos hidroxiarilpropenóicos, encontrados pela primeira vez nesta espécie vegetal. As análises de CG-EM do óleo essencial produzido por hidrodestilação a partir de folhas coletadas no segundo planalto do Paraná, apresentaram baixo teor de monoterpenos (2,29%) e os seguintes sesquiterpenos como principais componentes: espatulenol 17,20%, cariofileno óxido 16,20%, trans-cariofileno 10,48%, α -eudesmol 7,55%, germacreno D 6,28% e α -cadinol 5,18%. Outra amostra de óleo obtida nas mesmas condições, mas a partir de folhas coletadas na região serrana de Santa Catarina, também apresentou

espatulenol como principal componente (15,83%), mas quase 36% em monoterpenos, uma composição muito similar às publicadas sobre amostras da Serra Gaúcha. Foram analisadas as interações entre extrato aquoso das folhas com células eritrocitárias humanas dos tipos sanguíneos O⁺, O⁻, A⁺ e B⁺, sendo que o extrato apresenta uma atividade não-lítica nas concentrações analisadas de 22, 110 e 220 µg/mL, similar para todas tipagens analisadas. Os sorotipos A⁺ e O⁻ testados apresentaram um padrão similar de oxidação da Hb livre em solução e, o mesmo perfil foi observado na ressuspensão dos precipitados. Na análise de MEV foram verificados aspectos qualitativos a respeito da interação do extrato aquoso com a arquitetura da célula eritrocitária. Baixas concentrações do extrato, $1,5 \times 10^{-4}$ e $7,8 \times 10^{-5}$ mg/mL, apresentaram atividade redutora em presença de DPPH, de 20,10% e 9,25% respectivamente.

Unitermos: *Baccharis uncinella*, composição química, atividade antimicrobiana, óleo essencial, extratos orgânicos, bioatividade, hemólise, antioxidante.

ABSTRACT

Baccharis uncinella (Asteraceae), popularly known as vassoura, is little known from the chemical point of view, with only two earlier scientific works on their secondary metabolites - the volatile constituents. In the present study, the essential oil from the leaves of *B. uncinella* and nine extracts obtained in a Soxhlet apparatus with organic solvents starting from the leaves, barks and log were analyzed by CCD, UV and IV and submitted to activity tests against microorganisms; besides, the interactions between the aqueous extract of the leaves with human erythrocytary cells of the sanguine types O⁺, O⁻, A⁺ and B⁺ were also analyzed. In the antimicrobial tests, the microfungus *Candida albicans*, as well as the Gram-positive *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *S. saprophyticus* and the Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* were used. The essential oil showed action against *B. cereus*, *S. aureus* and *C. albicans*, in the same way as all of the organic extracts, but the growth of *S. saprophyticus* was not inhibited by no one of the extracts. The extracts of the barks, when compared with those obtained from other parts of the plant, were active against the largest number of microorganisms and presented the more strong activities. The minimum inhibitory concentration of the essential oil was estimated as 100 µL/mL against *S. aureus* as well as against *C. albicans*, wich could be considered a moderate antimicrobial activity. We have isolated small amounts of the three major phenolic components found in the leaves, and the analysis of their UV- and IR-spectra showed the structural features of hydroxyl-aryl-propenoic acids for these compounds that were found for the first time in this plant species. The analyses of GC-MS of the essential oil produced by hydrodistillation of the leaves collected at the Paraná State presented low monoterpene content (2.29%) and the following sesquiterpenes as the main components: spathulenol 17.20%, caryophyllene oxide 16.20%, *trans*-caryophyllene 10.48%, α -eudesmol 7.55%, germacrene D 6.28% and α -cadinol 5.18%. Another oil sample was obtained using the same conditions, but starting with leaves collected in the highland area of Santa Catarina, also presented spathulenol as the main component (15.83%), but it contained 36% in

monoterpenes, a very similar composition to those published for samples from the State of Rio Grande do Sul. The interactions among the aqueous extract of the leaves with human erythrocytes isolated from the sanguine types O⁺, O⁻, A⁺ and B⁺, being verified that the extract presents a non-lytic activity in the analyzed concentrations of 22, 110 and 220 µg/mL. This non-hemolytic profile was observed as similar for all tested blood types. The serological types A⁺ and O⁻ presented a similar pattern of free Hb oxidation in solution, and the same profile was observed in the new suspension of the precipitate. In the analysis of MEV we observed the qualitative aspects regarding the interaction of the aqueous extract with the architecture of the erythrocyte. In the assays of DPPH with low concentrations, 1.5×10^{-4} and 7.8×10^{-5} mg/mL, it was possible to quantify a partial reduction in the free radicals concentration of 20.10% and 9.25% respectively.

Keywords: *Baccharis uncinella*, chemical composition, antimicrobial activity, essential oil, solvent extracts, bioactivity, hemolysis and antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Compostos majoritários presentes no óleo essencial das espécies <i>B. uncinella</i> , <i>B. trinervis</i> e <i>B. notoserigila</i>	16
Figura 2 -	Estruturas dos ácidos 3-prenil-p-cumárico e 3,5-diprenil-p-cumárico, importantes antioxidantes de <i>Baccharis spp.</i> e da própolis verde.....	17
Figura 3 -	Flavonóides comuns em espécies <i>Baccharis</i>	18
Figura 4 -	Principal componente do óleo essencial da <i>B. dracunculifolia</i> , grande interesse da indústria de perfumes.....	19
Figura 5 -	Ledol e acetato de carquejila do óleo essencial de <i>B. trimera</i>	20
Figura 6 -	<i>Baccharis uncinella</i> DC. encontrada na área da Escarpa Devoniana - região de Ponta Grossa.....	21
Figura 7 -	Representação das tipagens sangüíneas do sistema ABO.....	24
Figura 8 -	Modelo da proteína Rhesus	25
Figura 9 -	Aparelho Soxhlet.....	29
Figura 10	Aparelho utilizado para obtenção de óleo essencial por arraste com vapor d'água.....	31
Figura 11	Aparelho analítico utilizado para obtenção de óleos essenciais por hidrodestilação.....	32
Figura 12	Espectros de ultravioleta dos extratos orgânicos de <i>B. uncinella</i> ...	44
Figura 13	Espectros de absorção de UV e de IV das substâncias BF1, BF4 e BF7.....	45
Figura 14	Atividade antimicrobiana pelo método CIM: para diluições seriadas do óleo essencial (μL / mL de solução) frente a (a) <i>S. aureus</i> e (b) <i>C. albicans</i>	49
Figura 15	CCD das amostras dos óleos essenciais de <i>B. uncinella</i>	52
Figura 16	Componentes principais dos óleos essenciais de <i>B. uncinella</i>	54
Figura 17	Interação do extrato aquoso de <i>B. uncinella</i> com eritrócitos de tipagem A ⁺	57

Figura 18	Interação do extrato aquoso de <i>B. uncinella</i> com eritrócitos de tipagem B ⁺	57
Figura 19	Interação do extrato aquoso de <i>B. uncinella</i> com eritrócitos de tipagem O ⁺	58
Figura 20	Interação do extrato aquoso de <i>B. uncinella</i> com eritrócitos de tipagem O ⁻	58
Figura 21	Efeito do extrato aquoso de <i>B. uncinella</i> em eritrócitos de tipagem A ⁺ íntegros.....	59
Figura 22	Efeito do extrato aquoso de <i>B. uncinella</i> em eritrócitos de tipagem O ⁻ íntegros.....	59
Figura 23	Interação do extrato aquoso de <i>B. uncinella</i> com eritrócitos de tipagem O ⁻ frente a H ₂ O ₂	61
Figura 24	Interação do extrato aquoso de <i>B. uncinella</i> com eritrócitos de tipagem A ⁺ frente a H ₂ O ₂	61
Figura 25	Interação do extrato aquoso de <i>B. uncinella</i> com eritrócitos de tipagem O ⁻ íntegros frente a H ₂ O ₂	62
Figura 26	Fotomicrografias da interação de extrato aquoso de <i>B. uncinella</i> e eritrócitos: (a) células íntegras e (b) em presença do extrato.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Coleta das amostras de <i>B. uncinella</i> utilizadas neste estudo..	28
Tabela 2 -	Reunião das frações obtidas da coluna flash.....	33
Tabela 3 -	Esquema do procedimento utilizado na dosagem de proteína	39
Tabela 4 -	Rendimentos dos extratos e distribuição dos metabólicos secundários na planta.....	43
Tabela 5 -	Atividade antimicrobiana dos extratos pelo método de difusão em meio sólido em cavidade.....	47
Tabela 6 -	Atividade antimicrobiana do óleo essencial pelo método de difusão em meio sólido em disco.....	49
Tabela 7 -	Componentes do óleo essencial de <i>B. uncinella</i> BU1 obtido por arraste de vapor, que foi submetido aos testes antimicrobianos	51
Tabela 8 -	Componentes dos óleos essenciais analíticos de <i>B. uncinella</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	soro albumina bovina
CCD	cromatografia de camada delgada
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM	concentração inibitória mínima
DIC	detector de ionização de chama
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
IV	infravermelho
Hb	hemoglobina
HM	hemólise mecânica
HT	hemólise total
MEV	microscopia eletrônica de varredura
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRAP	potência total antioxidante
UV	ultravioleta
VIS	visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1	REAGENTES E EQUIPAMENTOS.....	27
2.2	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	27
2.3	PREPARO DO MATERIAL.....	28
2.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	29
2.5	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CCD.....	29
2.6	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	30
2.6.1	Destilação por arraste com vapor d'água.....	30
2.6.2	Hidrodestilação.....	31
2.7	ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS.....	32
2.8	ANÁLISES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	34
2.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	35
2.9.1	Microrganismos testados.....	35
2.9.2	Preparo do inóculo inicial.....	36
2.9.3	Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial.....	36
2.9.3.1	Método por difusão em disco.....	36
2.9.3.2	Concentração inibitória mínima (CIM) em meio líquido.....	37
2.9.4	Atividade antimicrobiana dos extratos vegetais.....	37
2.9.4.1	Método por difusão em cavidade.....	37
2.10	ENSAIOS BIOQUÍMICOS.....	38
2.10.1	Obtenção do extrato aquoso.....	38
2.10.2	Dosagem de Proteínas.....	38
2.10.3	Deteção de Saponinas.....	39
2.10.4	Isolamento de eritrócitos.....	40
2.10.5	Ensaio de Hemólise.....	40
2.10.6	Ensaio frente a H ₂ O ₂	41
2.10.7	Ensaio em MEV.....	42
2.10.8	Medida de atividade antioxidante frente a DPPH.....	42
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1	ANÁLISES QUÍMICAS DOS EXTRATOS DAS FOLHAS, CASCAS E LENHO.....	43

3.2	ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DE <i>B. uncinella</i>	46
3.3	AMOSTRAS ANALÍTICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	50
3.4	BIOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE <i>B. uncinella</i>	55
3.4.1	Dosagem de proteína.....	55
3.4.2	Detecção de saponinas.....	55
3.4.3	Perfil hemolítico.....	56
3.4.4	Atividade frente a H ₂ O ₂	60
3.4.5	Análise em MEV.....	62
3.4.6	Medida de atividade antioxidante frente a DPPH.....	64
4	CONCLUSÕES	65
5	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

A grande maioria das 500 espécies *Baccharis* (ASTERACEAE) são originárias da América do Sul e são estimadas, em pelo menos 120 as espécies brasileiras deste gênero. Os metabólitos secundários mais encontrados nas espécies estudadas são os flavonóides e diterpenos, geralmente responsáveis por atividades biológicas alegadas por usuários de medicinas tradicionais (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Também começam a ganhar importância na literatura atual sobre metabólitos secundários de espécies *Baccharis*, os óleos essenciais e os ácidos arilpropenóicos e seus derivados. Da revisão completa de 454 referências sobre o gênero *Baccharis*, pelo menos 25 espécies já tiveram a composição química de seus óleos essenciais estudada, dos quais apenas cinco foram também avaliados biologicamente contra microrganismos e, pelo menos, sete espécies foram reportadas como contendo derivados dos ácidos arilpropenóicos (ISI, 2006).

Os estudos sobre os óleos essenciais de espécies *Baccharis* são geralmente realizados com o objetivo de pesquisar novas matérias primas para a indústria de fragrâncias (FERRACINI *et al.*, 1995; CASSEL *et al.*, 2000) ou para avaliar suas interações com microrganismos (COBOS *et al.*, 2001; DEMO *et al.*, 2005) e insetos (GARCIA *et al.*, 2005). Como exemplo de pesquisa relacionada à procura de novas matérias primas, foi feito um estudo sobre a composição do óleo essencial das folhas da própria *Baccharis uncinella*, cujos principais constituintes são: α -pineno, α -tujeno, β -pineno, limoneno, óxido de cariofileno, espatulenol e globulol entre outros (Figura 1) (FRIZZO *et al.*, 2001; AGOSTINI *et al.*, 2005).

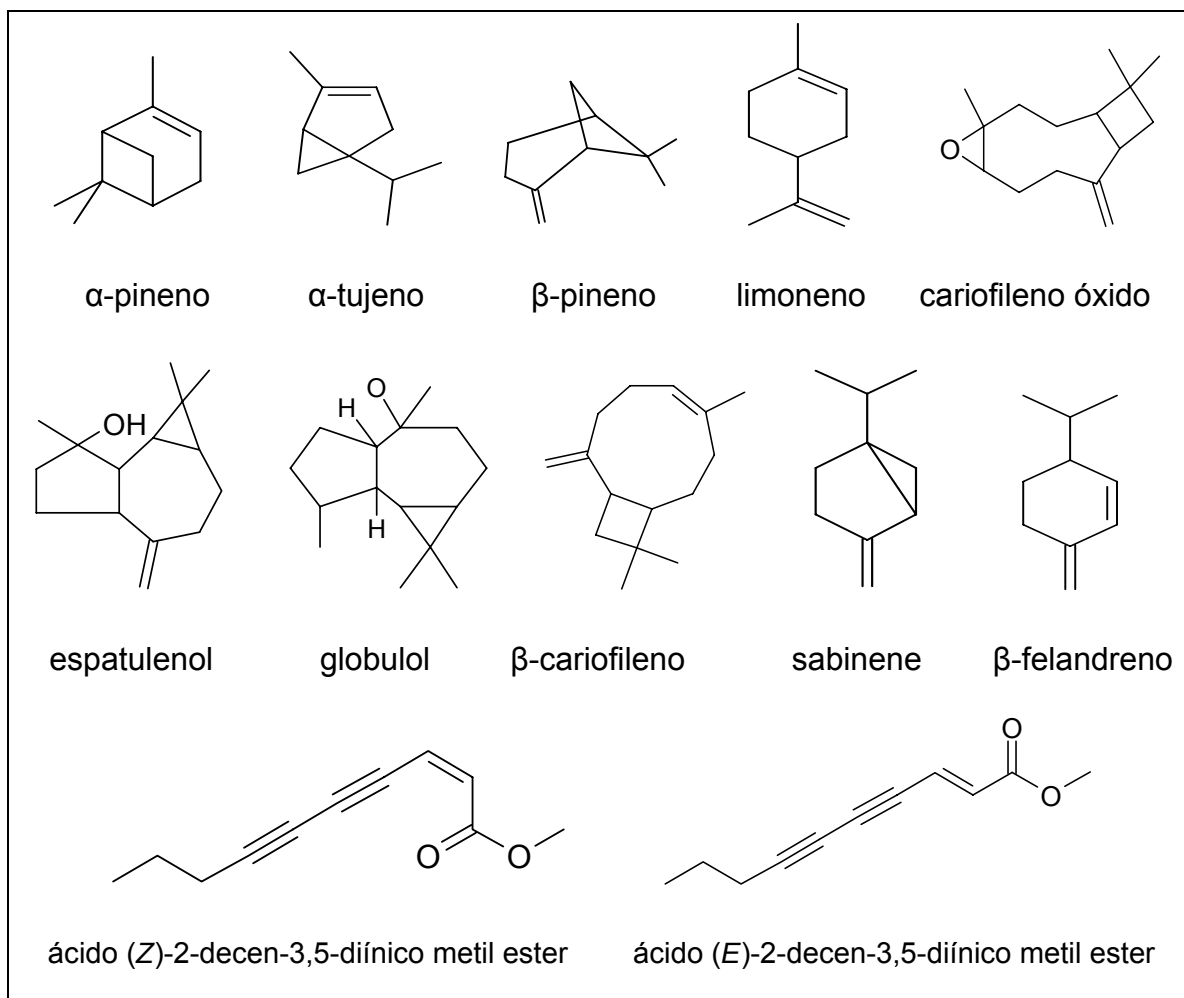


Figura 1 - Compostos majoritários presentes no óleo essencial das espécies *B. uncinella*, *B. trinervis* e *B. notoserigila*

Poucos estudos referentes à atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Baccharis* são encontrados na literatura. O óleo essencial das partes aéreas da *B. notoserigila* que tem como principais constituintes α -pineno, limoneno, β -cariofileno e espatulenol (Figura 1), apresentou atividade moderada contra oito bactérias (COBOS *et al.*, 2001). O óleo essencial da espécie *B. trinervis* mostrou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Candida albicans*, apresentando como principais constituintes α -tujeno, α -pineno, sabineno, β -felandreno e os isômeros *E* e *Z* dos ésteres metílicos do ácido 2-decen-3,5-diínico (Figura 1), descritos pela primeira vez para o gênero *Baccharis* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2004).

Como exemplo do potencial antimicrobiano dos metabólitos secundários das *Baccharis* brasileiras, citamos as avaliações feitas com extratos e frações de *B. usterii*, *B. trimera* e *B. spicata*, através de medidas de concentrações bactericida mínima contra várias cepas (de OLIVEIRA *et al.*, 2005). Dois ácidos, o 3-prenil-p-cumárico e o 3,5-diprenil-p-cumárico (Figura 2) isolados de *B. grisebacchii*, da mesma forma que o exudato resinoso da planta, o qual é utilizado na medicina tradicional na Argentina para tratar dermatoses, apresentaram ótima atividade contra fungos causadores de afecções da pele (FERESIN *et al.*, 2003). O ácido 3,5-diprenil-p-cumárico é o artepillin C, descoberto como substância antimicrobiana (AGA *et al.*, 1994) e antitumoral (AHN *et al.*, 2007) da própolis verde brasileira e, posteriormente, nas folhas tenras dos brotos de *B. dracunculifolia*, sua fonte vegetal (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; KUMAZAWA *et al.*, 2003). O artepillin C (Figura 2) apresenta ainda muitas outras importantes bioatividades, baseadas principalmente em sua poderosa atividade antioxidante, sendo hoje utilizado em preparações cosméticas e farmacêuticas (UTO *et al.*, 2002).

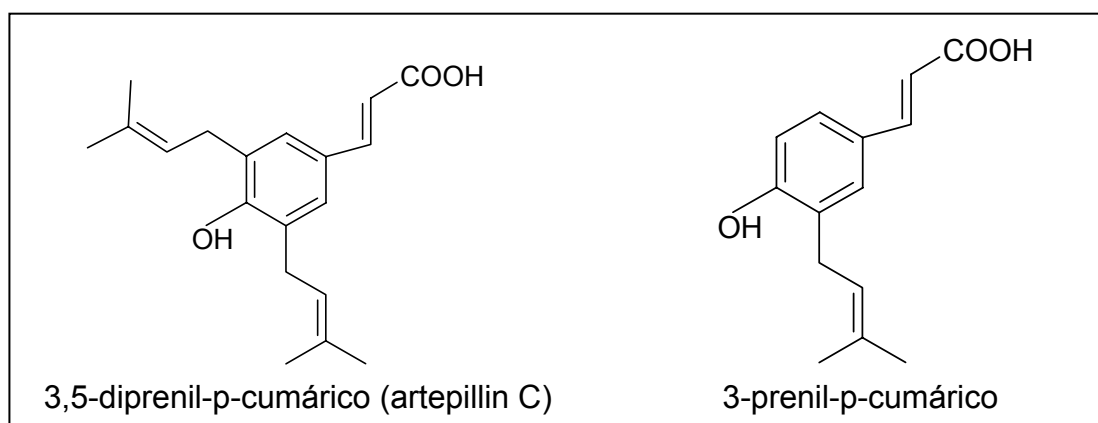


Figura 2 - Estruturas dos ácidos 3-prenil-p-cumárico e 3,5-diprenil-p-cumárico, importantes antioxidantes de *Baccharis* spp. e da própolis verde

As atividades antimicrobianas de várias espécies *Baccharis* têm sido

relacionadas à presença de flavonóides, isoflavonóides e biflavonas (VERÁSTEGUI *et al.*, 1996; FERENSIN *et al.*, 2001;). Flavonóides comuns tanto em *Baccharis* quanto em própolis como canferol e quercetina (Figura 3), apresentaram forte atividade *in vitro* contra uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (XU & LEE, 2001); apigenina e gencawanina, por exemplo, são potentes agentes antimicrobianos encontrados em extratos de *B. articulata* (GIANELLO & GIORDANO, 1984).

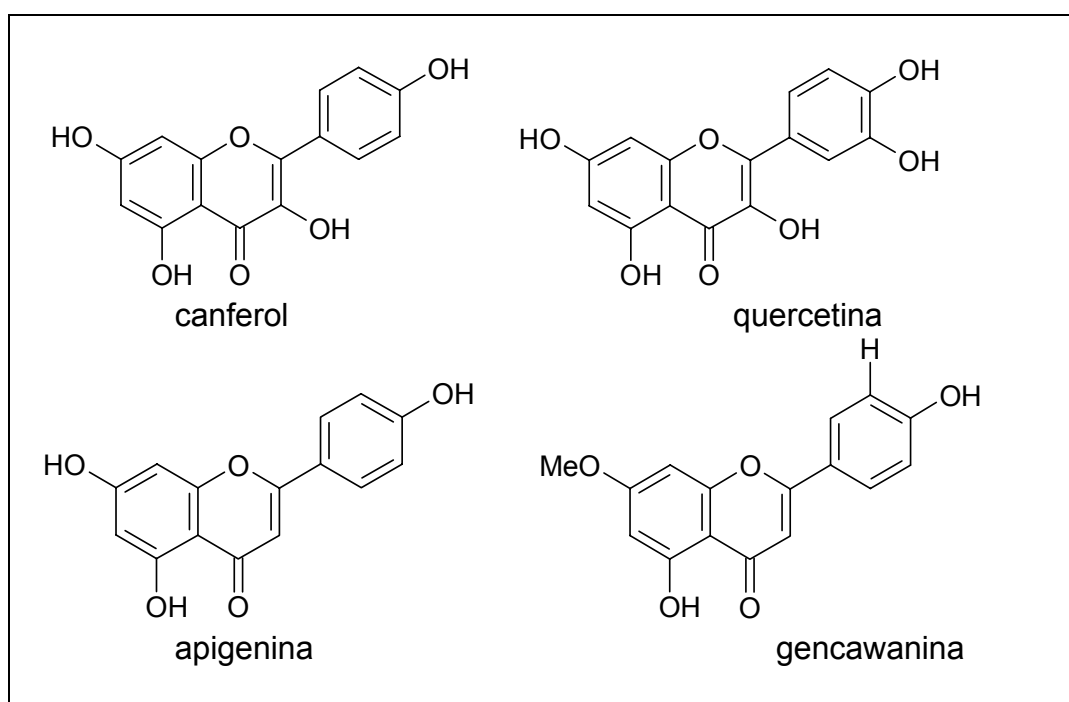


Figura 3 - Flavonóides comuns em espécies *Baccharis*.

A primeira pesquisa sistemática sobre a composição química dos óleos essenciais de *Baccharis* incluiu sete espécies coletadas em área de cerrado do estado de São Paulo (*B. caprariaefolia*, *B. dracunculifolia*, *B. erioclada*, *B. myriocephala*, *B. platipoda*, *B. tridentata* e *B. vincaefolia*) e, apresentou variações na composição dos voláteis presentes em espécimes masculinos e femininos (FERRACINI *et al.*, 1995). O sesquiterpeno espatulenol foi encontrado em todas

as amostras analisadas, geralmente entre os componentes principais, atingindo 21,2 %, mas nos óleos de *B. dracunculifolia* o (*E*)-nerolidol (Figura 4) é o mais importante componente, com até 20,8 % em espécimes femininos. Outro estudo desta época descreveu em detalhes os óleos de *B. dracunculifolia*, *B. salicifolia* e *B. latifolia* coletadas na Bolívia (LOAYZA *et al.* 1995) e, neste caso são pequenas as porcentagens destes dois sesquiterpenos em todas as amostras. Óleos extraídos de *B. dracunculifolia* de diversas proveniências têm sido analisados à procura da presença de (*E*)-nerolidol para aplicações na indústria de perfumes (MOTL; TRKA, 1983; QUEIROGA; FUKAI; MARSAIOLI, 1990; CASSEL *et al.*, 2000).

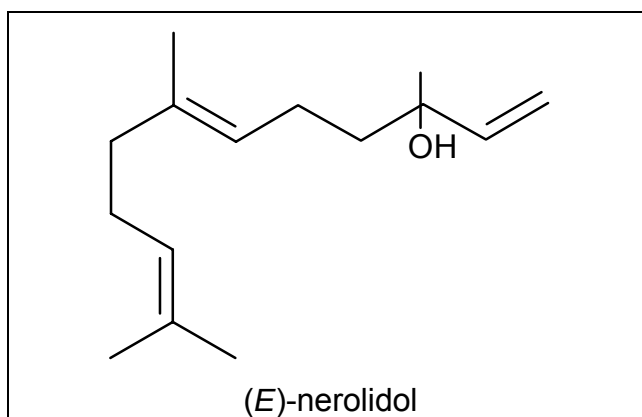


Figura 4 - Principal componente do óleo essencial da *B. dracunculifolia*, grande interesse da indústria de perfumes.

Recentemente, os óleos essenciais de oito espécies *Baccharis* pertencentes à seção *Caulopterae* coletadas no Brasil e na Argentina (*B. articulata*, *B. crispa*, *B. microcephala*, *B. milleflora*, *B. myriocephala*, *B. stenocephala*, *B. trimera* e *B. usterii*) foram analisados com o objetivo de verificar correlações biossintéticas nas composições. Apesar das semelhanças morfológicas, as espécies da seção botânica *Caulopterae* não apresentaram um perfil homogêneo e algumas delas mostraram alto grau de diferenciação, como *B.*

trimera, a única contendo o acetato de carquejila entre 35 e 68%, em contrabalanço com proporções de ledol entre 5,9 e 24,2% (Figura 5). A presença do acetato de carquejila somente em *B. trimera*, e nunca em *B. crispa*, foi demonstrada por análises de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), duas espécies morfologicamente muito similares (SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005).

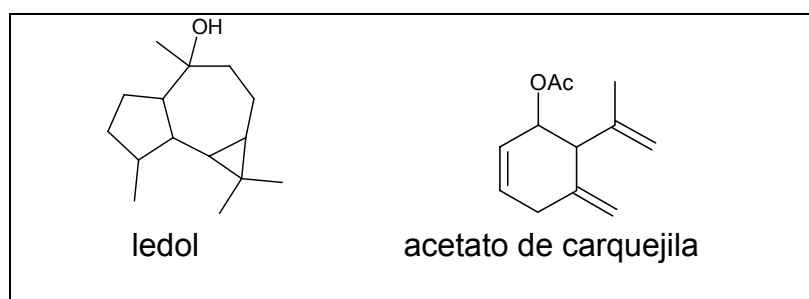


Figura 5 - Ledol e acetato de carquejila do óleo essencial de *B. trimera*.

Dois estudos foram publicados sobre a composição de amostras de óleos essenciais de *B. uncinella*. No primeiro, uma amostra coletada em abril de 2001 na região de Caxias do Sul - RS, apresentou 0,23% de um óleo essencial contendo α -pineno (16,1%), β -pineno (15,5%), limoneno (13,1%) e espatulenol (9,8%) como principais componentes (FRIZZO *et al.*, 2001). Mais recentemente, duas amostras coletadas em locais não muito distantes da Serra Gaúcha, em novembro de 2002, continham 8,1 e 12,9% de α -pineno, 10,2 e 9,8% de β -pineno, 16,8 e 14,2% de limoneno e 47,7 e 23,1% de espatulenol (AGOSTINI *et al.*, 2005). Apesar da desproporção, principalmente no caso do espatulenol, as três amostras guardam uma semelhança muito grande, perceptível inclusive nos componentes minoritários.

Dentre as espécies *Baccharis* que ocorrem na região dos Campos Gerais

no Paraná, três delas têm estrutura de arbusto e são conhecidas como “vassouras”: *B. uncinella*, *B. dracunculifolia* e *B. semiserrata*. Nas épocas de floração, todas são visitadas por abelhas *Apis mellifera*, sendo possível que seus componentes façam parte do mel e da própolis produzida nesta região (NUNES; SENS; SWITALA, 2001).

B. uncinella apresenta distribuição espontânea nas áreas mais elevadas da região sul do Brasil e é utilizada na medicina tradicional dos índios Laklaño de Ibirama - Santa Catarina, na forma de chá calmante e hipotensor (SENS, 2002). *B. uncinella* (Figura 6) é facilmente encontrada no planalto catarinense, inclusive sobre áreas com altos teores de bauxita, locais em que pode absorver quantidades consideráveis de alumínio (4750 ppm), titânio (220 ppm) e zircônio (540 ppm) (CUNHA; DANI; FORMOSO, 1990).



Figura 6 - *Baccharis uncinella* DC. encontrada na área da Escarpa Devoniana - região de Ponta Grossa.

Estudos anteriores relatam a identificação de flavonóides, diterpenos e saponinas em *B. trimera*, demonstrando atividades hepatoprotetora, antiinflamatória, analgésica, antimutagênica e relaxante vascular (HERZ *et al.*, 1977; ZDERO *et al.*, 1989; NAKASUGI & KOMAI, 1998; TORRES *et al.*, 2000).

Tem crescido muito o interesse pela detecção de substâncias antioxidantes em materiais vegetais e outros, uma vez que pode ser relevante a relação da incidência em nutrientes e seu papel na saúde e na doença. Várias patologias do trato gastrointestinal têm sido induzidas pelo estresse oxidativo. A ação de radicais livres de oxigênio tem sido estudada na injúria gástrica aguda e de mucosa esofágica induzida por isquemia, drogas antiinflamatórias ou etanol (OH *et al.*, 2001).

O estresse oxidativo tem sido apontado como um fator em uma variedade de distúrbios que contribuem para aterosclerose, câncer, isquemia, hipertensão, doenças inflamatórias crônicas, Mal de Parkinson e Alzheimer, geralmente resultantes de carência de defesas antioxidantes (HALLIWELL & GUITTERIDGE, 1999). Diante de tais circunstâncias, a busca de novos agentes antioxidantes tem aumentado nos últimos anos, e o interesse maior está na investigação de extratos de plantas.

Após uma revisão na literatura, foi constatado que não havia nenhum trabalho avaliando o potencial antioxidante em extrato aquoso da espécie de *B. uncinella*. Por outro lado, alguns poucos trabalhos avaliaram a atividade antioxidante de espécies de *Baccharis*: *B. trinervis* apresentou uma potente atividade contra a peroxidação lipídica induzida por FeCl_3 - ascorbato em microssomas (HERAS *et al.*, 1998); para *B. coridifolia* a atividade antioxidante foi atribuída aos extratos aquosos (MONGELLI *et al.*, 1997) enquanto que *B.*

grisebachii mostrou potencial antioxidante em diversos extratos inclusive o aquoso (TAPIA *et al.*, 2004).

De Oliveira e colaboradores (2003) analisaram a atividade antioxidante de *B. articulata* no extrato etanólico, frações obtidas com acetato de etila, diclorometano e n-butanol. Os métodos usados foram: potencial total antioxidante (TRAP), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) induzida por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e determinação da proteção das células de Sertolli contra a indução do dano celular provocada por H_2O_2 . Posteriormente, de Oliveira e colaboradores (2004) avaliaram as frações mais polares de *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii* as quais apresentaram atividade antioxidante elevada e similar quando ensaiadas pelos métodos de TRAP e de TBARS.

No estudo e detecção de bioatividades de extratos e substâncias isoladas de materiais vegetais e outros, é de fundamental importância a análise *in vitro*, num primeiro momento, e *in vivo* na sequência. Para tanto, eritrócitos costumam ser utilizados como modelo biológico, quer pela facilidade de obtenção, quer pela essencialidade da função biológica, qual seja o transporte de O_2 . A própria medida hemolítica é um fator determinante na atividade biológica, através desta pode ser verificada a funcionalidade dos eritrócitos quando estes interagem com a droga testada, a qual pode ser um álcool (SEEMAN *et al.*, 1970; CHI & WU, 1991), surfactantes (HELENIUS & SIMONS, 1975; GALEMBECK, 1998), antielmínticos (MALHEIROS; MEIRELLES; de PAULA, 2000) e anestésicos locais (MALHEIROS; MEIRELLES; de PAULA, 2000; SEEMAN, 1972).

Eritrócitos humanos constituem um bom modelo biológico para a detecção das potenciais atividades biológicas de extratos ou substâncias isoladas de materiais vegetais e, no estudo de suas aplicações terapêuticas e mecanismos de

ação. O formato de disco bicôncavo apresentado pelo eritrócito está adaptado a sua função fisiológica, visto que permite à célula sofrer as deformabilidades estruturais necessárias para que possa fluir bem inclusive nos capilares (VERMEHREN & HANSEN, 1998; ENOMOTO *et al.*, 2001; GUYTON & HALL, 2002; ZIEGLER *et al.*, 2004). As células vermelhas não apresentam organelas citoplasmáticas e contêm em seu interior uma solução de proteínas e eletrólitos, sendo que a Hemoglobina (Hb) constitui mais de 95% das proteínas intracelulares (LEE *et al.*, 1998).

A membrana eritrocitária em humanos é constituída por moléculas que funcionam como antígenos determinantes da diferentes tipagens sangüíneas. As diferenças estruturais entre as tipagens sangüíneas são complexas, uma vez que são considerados mais de 200 antígenos, sendo o sistema ABO (Figura 7) o mais conhecido entre os 19 já caracterizados (LEE *et al.*, 1998) e o mais importante na medicina clínica transfusional (BATISSOCO & NOVARETTI, 2003).

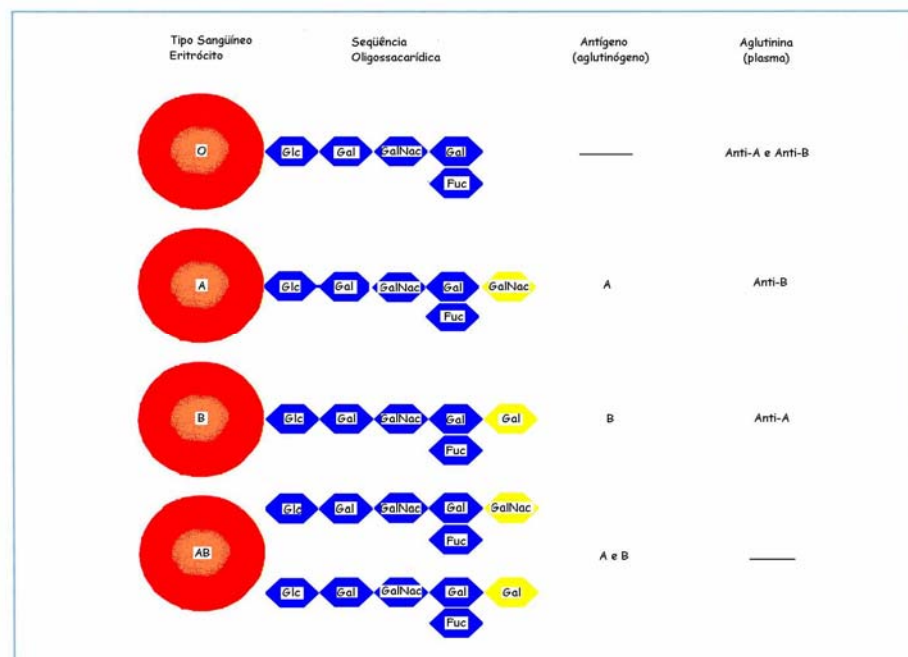


Figura 7 - Representação das tipagens sangüíneas do sistema ABO.
Fonte: Adaptado de CARVALHO & RECCO-PIMENTEL (2001)

As proteínas Rhesus (Rh) (Figura 8) presentes em eritrócitos humanos são clinicamente importantes pois suas funções estão relacionadas à incompatibilidade das transfusões sangüíneas e na gravidez (CONROY *et al.*, 2005). O sistema de classificação Rhesus (Fator Rh) é altamente imunogênico e polimórfico com mais de 45 antígenos definidos sorologicamente. Os antígenos Rh podem apresentar um papel fisiológico na manutenção da estabilidade da membrana celular e na regulação da morfologia dos eritrócitos (HEMKER *et al.*, 2003; VAN KIM; COLIN; CARTRON, 2006).

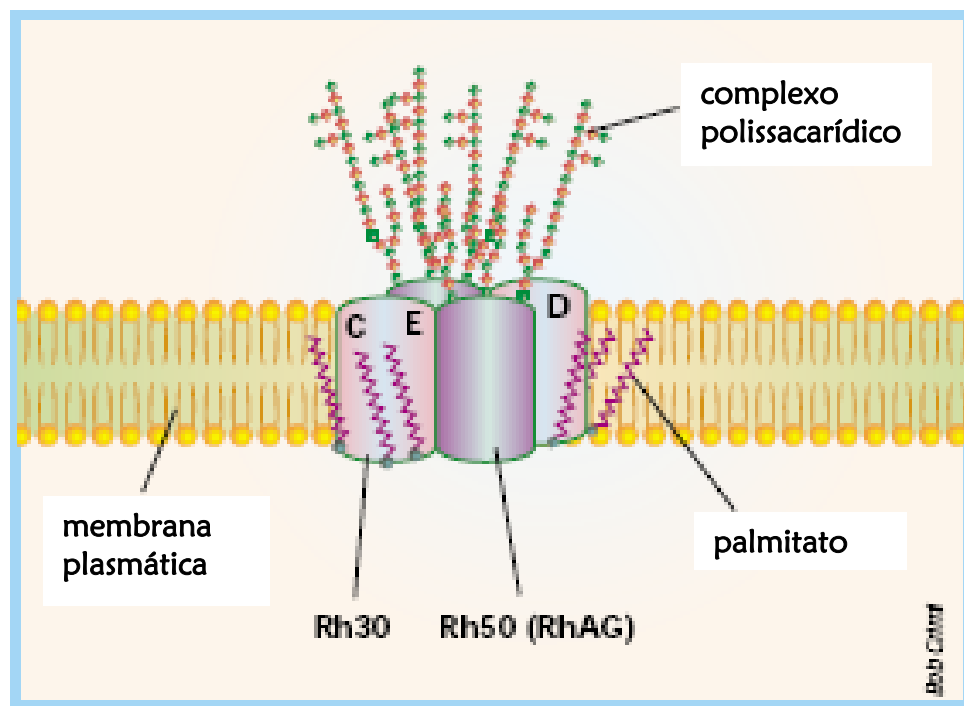


Figura 8 - Modelo da proteína Rhesus.

Fonte: Adaptado de HEITMAN & AGRE (2000).

Quando as hemácias são submersas em soluções hipotônicas ou em água destilada, a hb sai das células e se difunde para o meio. Esse fenômeno, denominado hemólise, pode também ser produzido por diversas substâncias, tais como saponinas (VILLELA ; BACILA; TASTALDI, 1978).

Algumas atividades biológicas podem ser exercidas por outros metabólitos secundários tais como as saponinas (ATAMANOVA *et al.*, 2005), que em solução aquosa formam espuma persistente e abundante. A atividade provém, como nos demais detergentes, do fato de apresentarem em sua estrutura, uma parte lipofílica, denominada aglicona e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares. Podem ser divididas de acordo com o grupo ligado ao núcleo fundamental de aglicona: as que apresentam um núcleo esteroidal ou triterpênico. Outra classificação utiliza o número de cadeias de açúcar ligadas à aglicona, assim saponinas monodesmosídicas possuem uma cadeia de açúcar, enquanto saponinas bidesmosídicas apresentam duas cadeias de açúcares. O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas, destacando-se a ação sobre membranas celulares, alterando a sua permeabilidade, ou causando sua destruição (SCHENKEL *et al.*, 2000; HAMERSKI *et al.*, 2005; YULDASHEVA *et al.*, 2005).

A revisão bibliográfica sobre os diversos aspectos do gênero *Baccharis* e, mais especificamente, da espécie *B. uncinella* mostrou uma gama de determinações e caracterizações de princípios ativos *ainda por fazer*, os quais podem estar envolvidos em atividades farmacológicas significativas verificadas para o gênero *Baccharis* (ISI, 2006).

Para tanto, este estudo se propôs a estabelecer um perfil químico-bioquímico e microbiológico para *B. uncinella*, através da análise química e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas e dos extratos orgânicos de folhas, cascas e lenho, bem como verificar atividades bioquímicas do extrato aquoso das folhas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os reagentes utilizados foram de diversas marcas, todos de grau analítico (PA), utilizados sem tratamento prévio.

Os espectros ultravioleta-visível (UV-VIS) e as medidas dos experimentos bioquímicos foram medidos em espectrofotômetros Multispec – 1501 Shimadzu.

Os espectros de infravermelho (IV) foram medidos num espectrofotômetro FTIR 8400, Fourier Transform - Shimadzu, equipado com detector DLATGS na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando pastilhas de KBr grau espectroscópico.

A microscopia eletrônica (MEV) foi feita em um aparelho Jeol JSM – 6360 LZ, Scanning Electron Microscope, do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

Análises por CG e CG/EM foram feitas em um Cromatógrafo Gasoso Varian® CP-3800 acoplado a um Detector de Ionização de Chama (DIC) ou a um Espectrômetro de Massas Saturn® 2000, utilizando o software de gerenciamento Saturn® GC-MS Workstation 5.51. Para a determinação qualitativa e quantitativa dos componentes do óleo essencial foram utilizados dados analíticos obtidos em parceria com o Instituto de Pesquisas Tecnológicas da Universidade de Blumenau, IPT-FURB, Blumenau – SC.

2.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Amostras de partes de *Baccharis uncinella* DC. foram coletados em três momentos distintos, conforme especificado na Tabela 1.

Tabela 1 - Coleta das amostras de *B. uncinella* utilizadas neste estudo.

Código	Parte e quantidade coletada	Localização	Data de coleta
BU1	3 Kg de folhas 100 gramas de cascas 100 gramas de madeira	Ponta Grossa Paraná	Julho 2005
BU2	100 gramas de folha		Novembro 2005
BU3	400 gramas de folhas	Vacas Gordas Sta. Catarina	Julho de 2006

Uma amostra com flores, representativa de *Baccharis uncinella* DC., foi coletada junto com as amostras BU1, sendo preparada uma exsicata conforme as indicações técnicas da literatura (DI STASI, 1996). Um ramo com folhas e flores de aproximadamente 30 cm de comprimento foi colocado em jornais e acondicionado para transporte entre folhas de papelão presas por barbantes. Esta foi prensada e secada a uma temperatura de 37 °C por 24 horas, sendo depois montada em cartolina, numerada e depositada no herbário da Universidade Estadual de Ponta Grossa. A identificação botânica foi feita pela professora Dra. Rosângela Capuano Tardivo, do Departamento de Biologia Geral, depositando-se a exsicata no Herbário da UEPG sob o número 13105.

2.3 PREPARO DO MATERIAL

Logo após as coletas, as amostras foram espalhadas sobre uma bancada para secar à temperatura ambiente, durante 7 dias. As folhas, as cascas e o lenho foram separados e fragmentados com auxílio de uma faca manual e de um triturador.

2.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Amostras de 20 g de cada parte vegetal moída e seca (folhas, cascas e lenho) foram pesadas em balança analítica e submetidas à extração em aparelho Soxhlet (Figura 9) por 30 horas com cada um dos seguintes solventes: clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH).



Figura 9 - Aparelho Soxhlet

Entre as trocas de solventes, o extrator foi totalmente evaporado a 40 °C em estufa. Os nove extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo (vácuo de 580 mmHg e temperatura máxima de 50 °C), sendo calculados os rendimentos quantitativos.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CCD

Os extratos foram analisados por CCD em placas de sílica gel GF₂₅₄ e HF₂₅₄ usando várias fases móveis: Hexano:AcOEt (6:4) para os extratos CHCl_3 ;

AcOEt:HCOOH:H₂O (10:0,2:0,27 ou 10:0,2:0,1) e AcOEt:MeOH:H₂O (6:4:0,5 ou 7:3:0,5) para os extratos obtidos com AcOEt e MeOH. As composições dos extratos foram comparadas semiquantitativamente, com a aplicação de 15 µL de soluções das amostras a 10 mg/mL. Os cromatogramas observados sob luz UV em 254 e 360 nm e revelados com reagentes específicos: FeCl₃ (5 % em MeOH) para compostos fenólicos e H₂SO₄:MeOH (1:1, seguido de aquecimento a 110 °C por 5 a 10 min) para substâncias orgânicas em geral. Foram medidos os espectros de UV qualitativos dos extratos obtidos com AcOEt e MeOH das folhas, cascas e lenho, sendo metanol o solvente.

2.6 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

2.6.1 Destilação por arraste com vapor d'água

O óleo essencial das folhas da amostra BU1 foi obtido pelo método de destilação por arraste com vapor d'água, em aparelho confeccionado no próprio laboratório utilizando peças de alumínio e vidro (Figura 10). O aparelho foi construído com duas panelas de pressão adaptadas uma sobre a outra. No recipiente 1 a água destilada é aquecida para a produção de vapor, por uma resistência de 150 W. O vapor chega ao recipiente 2 e passa através do material vegetal, arrasta os componentes voláteis do óleo e sai por um tubo de cobre (parte 3) que conduz ao primeiro condensador (de tubo reto, parte 4), que se liga a um segundo condensador (de serpentina, parte 5), descendo até o recipiente onde são coletados o óleo e a água condensada. O sistema de refrigeração de circulação contínua é constituído por uma bomba elétrica e água gelada (parte 6).

Este aparelho protótipo foi construído com a finalidade de obter amostras de óleo essencial em quantidade suficiente para testes farmacológicos e microbiológicos, podendo processar até 3 kg de material vegetal moído e seco em cada extração. Neste caso, a destilação foi realizada com 1180 gramas de folhas durante 4 horas, com rendimento de 9,5917 g (0,81 % p/p).

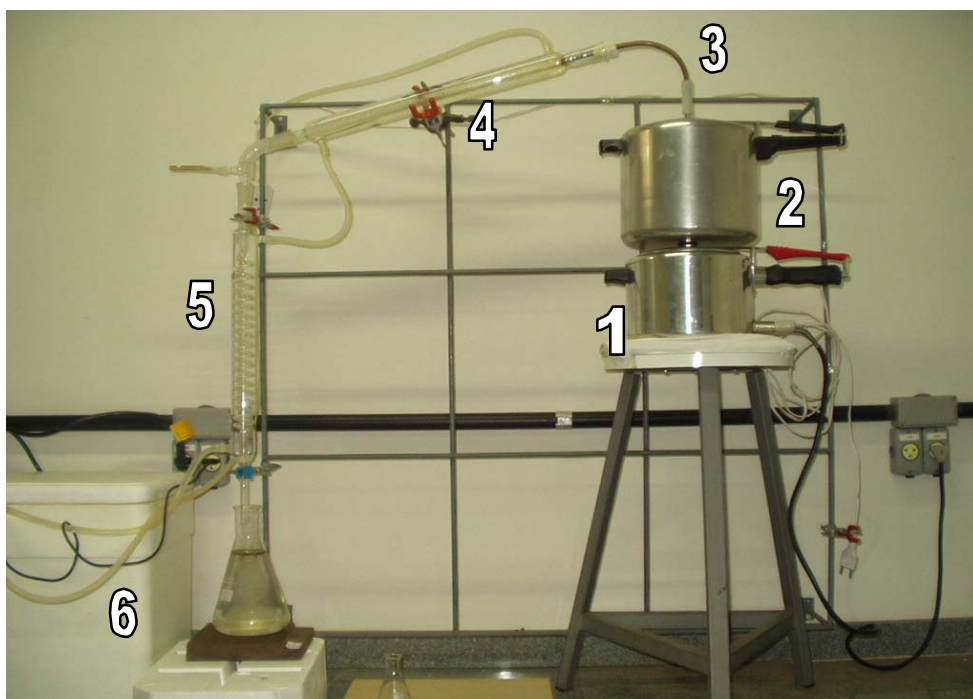


Figura 10 - Aparelho utilizado para obtenção de óleo essencial por arraste com vapor d'água. Partes 1 - 6, vide texto.

2.6.2 Hidrodestilação

Os óleos voláteis das amostras BU2 e BU3 foram obtidos pelo método de hidrodestilação, com a aparelhagem de vidro PYREX (STAHL & SCHILD, 1981) mostrada na Figura 11. Neste método as folhas secas e moídas (100 g em cada caso) foram imersas em 1 L de água destilada, num balão de fundo redondo de 2 L de capacidade. Ambas amostras foram extraídas por hidrodestilação por 4

horas com rendimentos de 0,27 g (0,27%) para a amostra BU2 e de 0,468 g (0,47%) para a amostra BU3.



Figura 11 - Aparelho analítico utilizado para obtenção de óleos essenciais por hidrodestilação

2.7 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

O extrato aquoso da amostra BU2, restante no balão do extrator ao final da hidrodestilação, foi filtrado, sendo a fase aquosa extraída sucessivamente por 3 vezes com 100 mL de CHCl_3 e 3 vezes com 100 mL AcOEt . As fases orgânicas foram secas com Na_2SO_4 anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotativo a vácuo e em baixa temperatura. O rendimento do extrato CHCl_3 foi de 1,23 g (1,2%) e o do extrato AcOEt foi de 2,359 g (2,4%). O extrato AcOEt foi fracionado em coluna de gel de sílica 60 (partículas de 0,04 – 0,63 mm) empacotada com AcOEt num fluxo de 25 mL/min e pressão de 3 a 5 psi. A amostra foi aplicada na forma de pastilha, preparada pela adição de 6 g de sílica à amostra. A coluna foi

eluída inicialmente com uma mistura AcOEt/HCOOH (10:0,2), com um fluxo de 15 mL/min e coletadas 33 frações de 50 mL cada, que foram agrupadas segundo seus perfis cromatográficos em CCD (Tabela 2).

Tabela 2 - Reunião das frações obtidas da coluna *flash*.

Frações	Massa (mg)	Principais substâncias
F1	19,8 mg	BF1
F2	28,5 mg	BF2
F3	22,7 mg	BF3
F4 a F8	80,3 mg	BF4
F9 a F18	65,2 mg	BF5
F19 a F23	25,3 mg	BF6
F24 a F33	26,4 mg	BF7

As análises por CCD das frações da coluna e das substâncias BF1, BF4 e BF7 foram eluídas com AcOEt:HCOOH:H₂O (10:0,2:0,27) e reveladas para fenóis com FeCl₃ a 5 % em MeOH.

Substância BF1 (19,8 mg): O material obtido nesta fração apresentou com aspecto de resina seca de coloração amarelada. A análise por CCD mostrou a presença de duas substâncias fenólicas, uma majoritária com R_f 0,85 e uma impureza com R_f 0,92. A substância minoritária com R_f 0,92 revelou sobre a placa como uma mancha de coloração amarelada na reação com H₂SO₄/MeOH a quente, sendo identificada como quercetina em comparações com um padrão autêntico. Espectro de UV (MeOH, λ_{max}): 230, 295 e 330 nm. Espectro de IV (KBr, cm⁻¹): 3380, 3180, 2932, 1658, 1606, 1512, 1439, 1373, 1282, 1250, 1169, 1117, 1036, 978, 831 e 804.

Substância BF4 (80,3 mg): A fração teve aspecto de sólido amarelado, com um componente majoritário de Rf 0,73 visível sob luz UV e com reação positiva para fenol. Espectro de UV (MeOH, λ_{max}): 230, 255, 300 e 330 nm. Espectro de IV (KBr, cm^{-1}): 3348, 2933, 1695, 1602, 1519, 1446, 1369, 1278, 1178, 1118, 1034, 979, 854 e 814.

Substância BF7 (26,4mg): A fração teve um aspecto sólido amarelado mais escuro, com um componente majoritário de Rf 0,66 visível sob luz UV e com reação positiva para fenol. Espectro de UV (MeOH, λ_{max}): 230, 255, 300 e 330 nm. Espectro de IV (KBr, cm^{-1}): 3404, 2929, 1701, 1628, 1601, 1522, 1448, 1375, 1273, 1161, 1116, 1041, 979.

2.8 ANÁLISES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os componentes do óleo essencial foram identificados por CG-EM, sendo a quantificação dos componentes realizada por CG-DIC. Idênticas condições de análise foram utilizadas, tanto na CG-EM como na CG-DIC: coluna capilar apolar CP-Sil-8 CB Low Bleed/MS (30 m, 0,25 mm) com filme de espessura 0,25 μm . A temperatura do injetor foi de 250°C, a programação de temperatura do forno de 60°C por 3 min, subindo 5°C/min até 220°C e permanecendo nesta temperatura por 15 min. He foi utilizado como gás de arraste (CG-EM) e H₂ (CG-DIC) em um fluxo constante de 1,0 mL/min.

A identificação dos compostos foi feita primeiramente pelo cálculo do índice de Kováts de cada componente pela fórmula abaixo (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963), comparando com dados publicados (ADAMS, 1995).

$$KI_x = 100_y + 100(z-y)(t_{(r)x} - t_{(r)y}) / (t_{(r)z} - t_{(r)y})$$

onde:

KI_x = índice de retenção do composto considerado;

y = número de carbonos do padrão à esquerda;

z = número de carbonos do padrão à direita;

$t_{(r)x}$ = tempo de retenção do composto considerado;

$t_{(r)y}$ = tempo de retenção do padrão à esquerda;

$t_{(r)z}$ = tempo de retenção do padrão à direita.

Após o cálculo do índice de Kováts de cada componente, os espectros de massas de foram comparados com aqueles fornecidos pelo banco de dados da espectroteca NIST-98 que integra o sistema CG-EM. As identificações foram também confirmadas pelo estudo dos fragmentos de massa observados em cada espectro. Para a quantificação dos compostos foram utilizadas as percentagens do detector DIC, sendo os índices de Kováts inicialmente calculados comparados aos dados fornecidos pelo detector.

2.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.9.1 Microrganismos testados

Os testes foram feitos contra os seguintes microrganismos: (Gram positivos) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus saprophyticus* e *Bacillus cereus*, provenientes de isolados clínicos; (Gram negativos) *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Klebsiella pneumoniae* (isolado clínico) e com a levedura *Candida albicans*, isolada de candidose bucal.

2.9.2 Preparo do inóculo inicial

O inóculo inicial foi preparado na forma de uma suspensão em 5 mL de solução salina estéril (0,9%) contendo 10^8 células/mL, sendo a padronização realizada por medida espectrofotométrica em 580 nm. Após homogeneização das suspensões, alíquotas de 0,1 mL do inóculo foram espalhadas uniformemente por todas as placas contendo ágar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas a 37 °C por 10 minutos para secagem.

2.9.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial

2.9.3.1 Método por difusão em disco

O método empregado para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial foi difusão em meio sólido por disco (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988; KONEMAN et al., 2001). Discos de papel estéril de 5 mm de diâmetro impregnados com 2 µL do óleo essencial em Tween-80, foram distribuídos sobre a placa semeada com o auxílio de uma pinça estéril. Discos de cloranfenicol (30 µg) e nistatina (100UI) foram usadas como controle positivo e, os impregnados com Tween-80 como controle negativo. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e as zonas de inibição de crescimento das bactérias (halos de inibição), ao redor de cada disco, determinadas com o auxílio de uma régua apropriada e expressa como mm. O experimento foi realizado em triplicata.

2.9.3.2 Concentração inibitória mínima (CIM) em meio líquido

Para a determinação da CIM foram utilizados os microrganismos que apresentaram melhores resultados pelo método de difusão em disco. Para a avaliação da atividade do óleo, 5 diluições de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12 $\mu\text{L/mL}$ foram preparadas e diluídas em caldo ágar Mueller-Hinton. O óleo essencial foi novamente suspenso em Tween-80 e alíquotas de 10 μL do inóculo inicial, padronizadas em 10^8 células/mL, foram distribuídas nos tubos contendo as amostras a serem analisadas. Os tubos inoculados foram incubados à 37 °C por 24 horas e a turvação resultante analisada visualmente. Foram realizados três tipos de controles: Tween-80 (controle negativo), cloranfenicol (controle positivo para bactérias) e nistatina (controle positivo para fungos). Os valores de CIM foram determinados pelas menores concentrações de óleo que inibiram completamente o crescimento dos microrganismos, sendo todos os experimentos realizados em triplicata (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988; KONEMAN *et al.*, 2001).

2.9.4 Atividade antimicrobiana dos extratos vegetais

2.9.4.1 Método por difusão em cavidade

A atividade antimicrobiana dos extratos das folhas, cascas e lenho foi examinada pelo método de difusão em meio sólido por cavidade-placa (CLEELAND & SQUIRES, 1991). Após a semeadura do inóculo foram confeccionados poços no ágar, medindo 7 mm de diâmetro por 5 mm de profundidade. Os poços foram preenchidos com 40 μL de uma suspensão

contendo 1 mg de cada extrato, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). Como controles positivos foram utilizados o cloranfenicol (30 µg) e a nistatina (100 UI); DMSO como controle negativo. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e o diâmetro dos halos de inibição foram medidos e expressos em mm, sendo os experimentos realizados em triplicata.

2.10 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

2.10.1 Obtenção do extrato aquoso

O extrato aquoso foi obtido a partir de 2 gramas das folhas secas e moídas, que foram extraídas com 300 mL de água destilada por 20 horas em aparelho Soxhlet. Foi utilizado 250 mL do extrato aquoso para fazer a liofilização, obtendo um rendimento do extrato liofilizado foi de 22,42%. As concentrações ensaiadas foram escolhidas por não apresentarem absorbância significativa na região do espectro correspondente ao VIS.

2.10.2 Dosagem de proteínas

Existem vários métodos de detecção e dosagem de proteínas em materiais biológicos. Entretanto, o mais utilizado na detecção específica e medida quantitativa de proteínas é o método de Lowry e colaboradores (1951), cujo reagente de Folin (ácidos mistos fosfomolibdico – tungstíco) sofre redução na presença de proteínas em solução, gerando cromóforos azuis com absorção característica na faixa de 700-750 nm. Os principais cromóforos são as ligações peptídicas, resíduos aromáticos triptofano e tirosina e as cadeias polares.

Para dosagem de proteínas foi elaborada uma curva padrão com soro albumina bovina (BSA) a partir de alíquotas de uma solução estoque 1 mg/mL em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4. As seguintes soluções foram utilizadas segundo a Tabela 3:

- solução A : Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1 M
- solução B : $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 1% em H_2O destilada
- solução C : tartarato de Na e K 2% em H_2O destilada
- solução D : 1:1:100 (C:B:A)
- solução E : reagente de Folin-Ciocalteu.

Tabela 3 - Esquema do procedimento utilizado na dosagem de proteínas

Tubos	Água Destilada (μL)	BSA (μL)	Solução D (μL)	Tempo* (min)	Solução E (μL)	Tempo* (min)
B	400	0	2000	30	200	10
1	390	10	2000	30	200	10
2	380	20	2000	30	200	10
3	370	30	2000	30	200	10
4	360	40	2000	30	200	10
Amostra						
1 :100	-	-	2000	30	200	10
1: 250	-	-	2000	30	200	10
1: 500	-	-	2000	30	200	10

* ausência de luz. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 700 nm.

2.10.3 Detecção de saponinas

A detecção de saponinas foi realizada através do teste de ação superficial onde é utilizado o extrato aquoso obtido a partir do decocto do vegetal. Após agitação enérgica do extrato filtrado em tubo de ensaio, a formação de espuma que não desaparece com a adição de um ácido mineral diluído, indica a presença de saponinas (SCHENKEL *et al.*, 2000).

2.10.4 Isolamento de eritrócitos

Bolsas de sangue foram obtidas do Banco de Sangue da Santa Casa de Misericórdia de Ponta Grossa, sendo que as diferentes tipagens sangüíneas foram utilizadas de acordo com sua disponibilidade. Os eritrócitos foram lavados sucessivamente em PBS isotônico (tampão fosfato de potássio 5 mM, NaCl 154 mM, pH 7,4) a 700xg por 10 minutos, até obtenção do sobrenadante límpido, removido por aspiração e descartado, e um precipitado contendo um hematócrito de 100 % (LEE *et al.*, 1998).

2.10.5 Ensaio de Hemólise

Concentrações de até 1,10 mg/mL de *B. uncinella* foram incubadas com hematócrito 0,8% a 37 °C por 45 minutos, sob constante agitação (150 rpm). Após a incubação as amostras foram novamente submetidas à centrifugação, sob as mesmas condições citadas anteriormente, para então serem conduzidas as leituras em espectrofotômetro. Foram escolhidas condições isotônicas, por garantirem a integridade da membrana celular, tendo como controle hemólise total (HT) – solubilização de eritrócitos em água destilada, o que resulta na ruptura total das membranas eritrocitárias e conseqüente extravasamento de Hb contida nestes e, hemólise mecânica (HM) – onde tem-se o hematócrito em tampão fisiológico, nesse caso, lise mínima. As medidas hemolíticas foram obtidas por espectrofotometria de absorção UV-VIS, em 540 nm para acompanhamento da hb liberada, ou seja, do resultado da ruptura parcial ou total da membrana eritrocitária; enquanto a razão 630 nm / 540 nm fornece uma medida da oxidação

parcial da hb (ANTONINI & BRUNORI, 1971; GALEMBECK; ALONSO; MEIRELLES, 1998; MALHEIROS; de PAULA; MEIRELLES, 1998; MALHEIROS; MEIRELLES; de PAULA, 2000)

2.10.6 Ensaio frente a H_2O_2

Amostras com sorotipos A^+ e O^- e hematócrito 0,8% em PBS foram incubadas sob agitação constante (150 rpm) a 37 °C, sucessivamente com: 0,5 μ M de azida por 15 minutos; concentrações crescentes do extrato aquoso das folhas de *B. uncinella* por uma hora; 400 μ M de H_2O_2 por 15 minutos.

Após a incubação final, as amostras foram submetidas à centrifugação a 700xg por 10 minutos. Para o acompanhamento da oxidação parcial da Hb livre em solução (sobrenadante) na presença de extrato aquoso de *B. uncinella*, foi calculada a razão A_{630nm}/A_{540nm} e os valores comparados com os obtidos no controle contendo apenas azida e H_2O_2 . O precipitado foi ressuspensão em H_2O destilada, para que ocorresse lise total da membrana e liberação da Hb contida nos mesmos, sendo a medida de absorvância novamente inferida nos mesmos comprimentos de onda. Estes ensaios tiveram como objetivo quantificar a oxidação parcial tanto da Hb liberada quanto da Hb que permaneceu no meio intracelular (precipitado). Em ambos os testes foram utilizados dois controles: um controle experimental, contendo azida e H_2O_2 , e o controle fisiológico fornecido pela taxa de oxidação da Hb na célula íntegra.

2.10.7 Ensaios em MEV

Foram retiradas alíquotas de 50 µL das concentrações 0,22 mg/mL e 1,10 mg/mL e também do controle HM, foi realizado o esfregaço em lamínulas previamente esterilizadas, colocadas para secar, sendo fixadas e coradas pelo método de May-Greenwald-Giensa (MOURA, 1987). As lamínulas foram metalizadas com Au e submetidas à microscopia, sendo o aumento máximo de 14.000x.

2.10.8 Medida de atividade antioxidante frente a DPPH

A possível atividade redutora do extrato aquoso de *B. uncinella* foi detectada em presença do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) segundo o método descrito por Tapia e colaboradores (2004). Foram testadas concentrações variando entre 1,92 mg/mL e 78×10^{-5} mg/mL. O padrão de DPPH foi preparado em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, sendo o branco constituído de 0,5 mL de DPPH 500 mM, 1,0 mL de acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e 1,0 mL de etanol PA. A absorbância em 517nm foi determinada logo após a adição de alíquotas do extrato aquoso de *B. uncinella*, sendo a porcentagem de atividade antioxidante calculada a partir da fórmula (BRACA *et al.*, 2001):

$$\% \text{ inibitória} = [(A_o - A_e)/A_o] \times 100$$

Sendo:

A_o= absorbância do DPPH sem adição de extrato

A_e= absorbância com adição de extrato.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISES QUÍMICAS DOS EXTRATOS DAS FOLHAS, CASCAS E LENHO

A Tabela 4 compara os rendimentos dos extratos de folhas, cascas e lenho, com a seqüência de solventes de polaridade crescente CHCl_3 , AcOEt e MeOH. As folhas produzem acima de 32 % de metabólitos secundários, enquanto que das cascas são extraídos ~18 % da massa e do lenho apenas ~3 %. O extrato CHCl_3 das folhas (~15,8 %) provavelmente contém a maioria dos componentes do óleo volátil (~0,8 %) e uma proporção elevada de corantes verdes e resina, sendo difícil visualizar sobre os cromatogramas analíticos os monoterpenos e sequiterpenos do óleo essencial. Uma proporção elevada de resina é similarmente observada no extrato CHCl_3 das cascas. O lenho é branco e acumula uma proporção relativamente mais baixa de metabólitos, sendo eles em sua maioria polares, extraídos pelo MeOH.

Tabela 4 - Rendimentos dos extratos e distribuição dos metabólitos secundários na planta

	CHCl_3	AcOEt	MeOH
folha	15,78 %	2,63 %	14,02 %
casca	8,84 %	0,83 %	8,54 %
lenho	0,39 %	0,19 %	2,44 %

Em análises feitas por CCD com uso de AcOEt / HCOOH / H_2O (10:0,2:0,27) como eluente sobre placas de sílica HF_{254} foi possível observar que os principais compostos fenólicos presentes nos extratos de folhas, casca e lenho obtidos com AcOEt e MeOH tem R_f 0,11, 0,33 e 0,57; os extratos de folhas obtidos com estes solventes apresentaram também uma substância fenólica com

R_f 0,80. Os espectros UV qualitativos dos extratos AcOEt e MeOH das folhas, cascas e lenho obtidos por extração com sequência de solventes com polaridade crescente, apresentaram absorções similares (MeOH, λ_{max}): 230, 255, 300 e 330 nm, e estão apresentados na Figura 12.

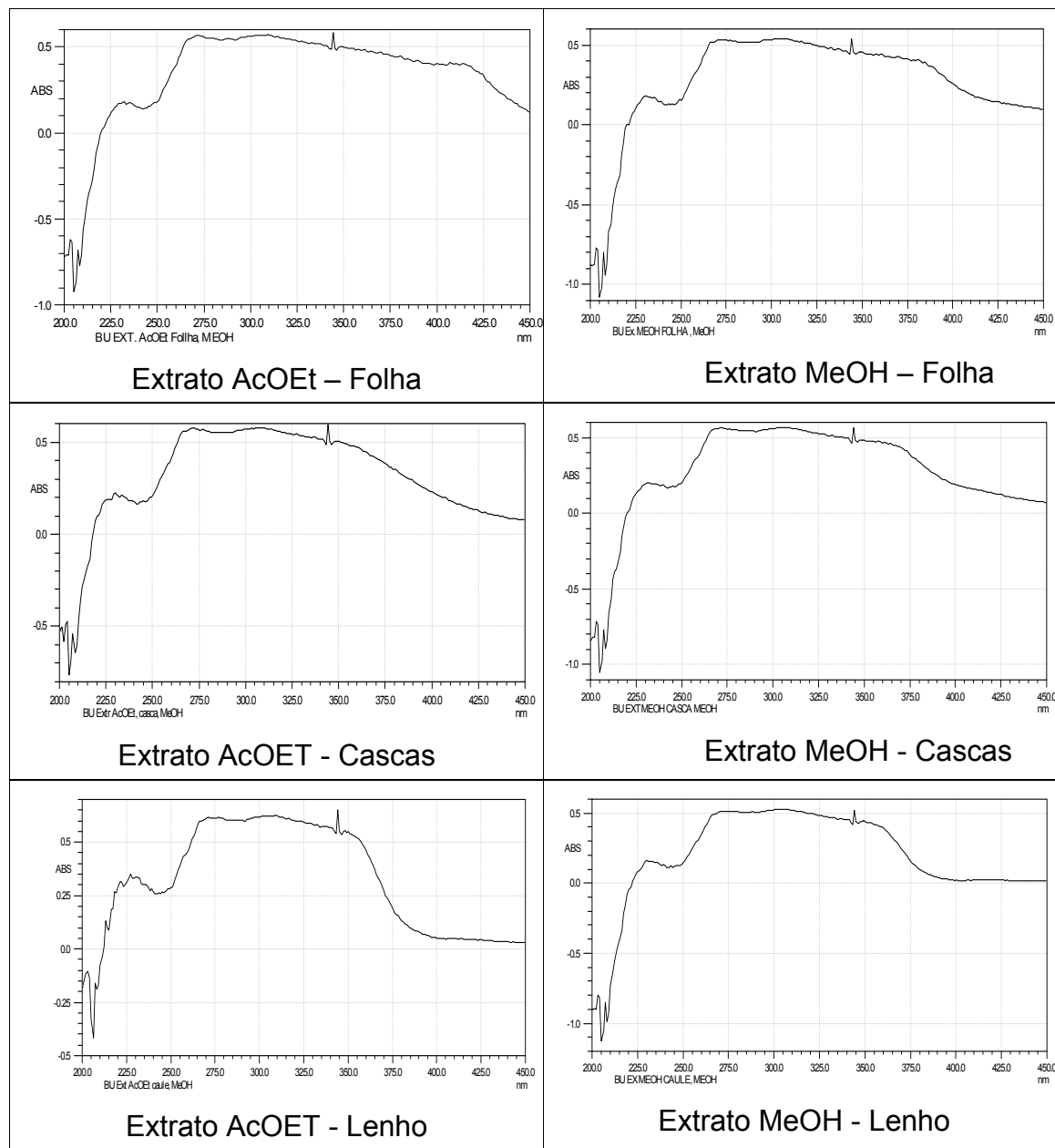


Figura 12 - Espectros de UV dos extratos orgânicos de *B. uncinella*.

Com o objetivo de esclarecer a natureza das substâncias fenólicas de *B.*

uncinella fracionamos o extrato aquoso das folhas por extrações líquido-líquido com CHCl_3 e em seguida com AcOEt, concentrando os fenóis nesta segunda fração. A cromatografia da fração fenólica em coluna de sílica rápida, usando condições similares às da técnica conhecida como *flash chromatography* (STILL; KAHN; MITRA, 1978), permitiu obter três frações reunidas, codificadas como BF1, BF4 e BF7 (Tabela 2, página 33) contendo substâncias principais, em graus de pureza suficiente, para avaliação preliminar das estruturas químicas presentes.

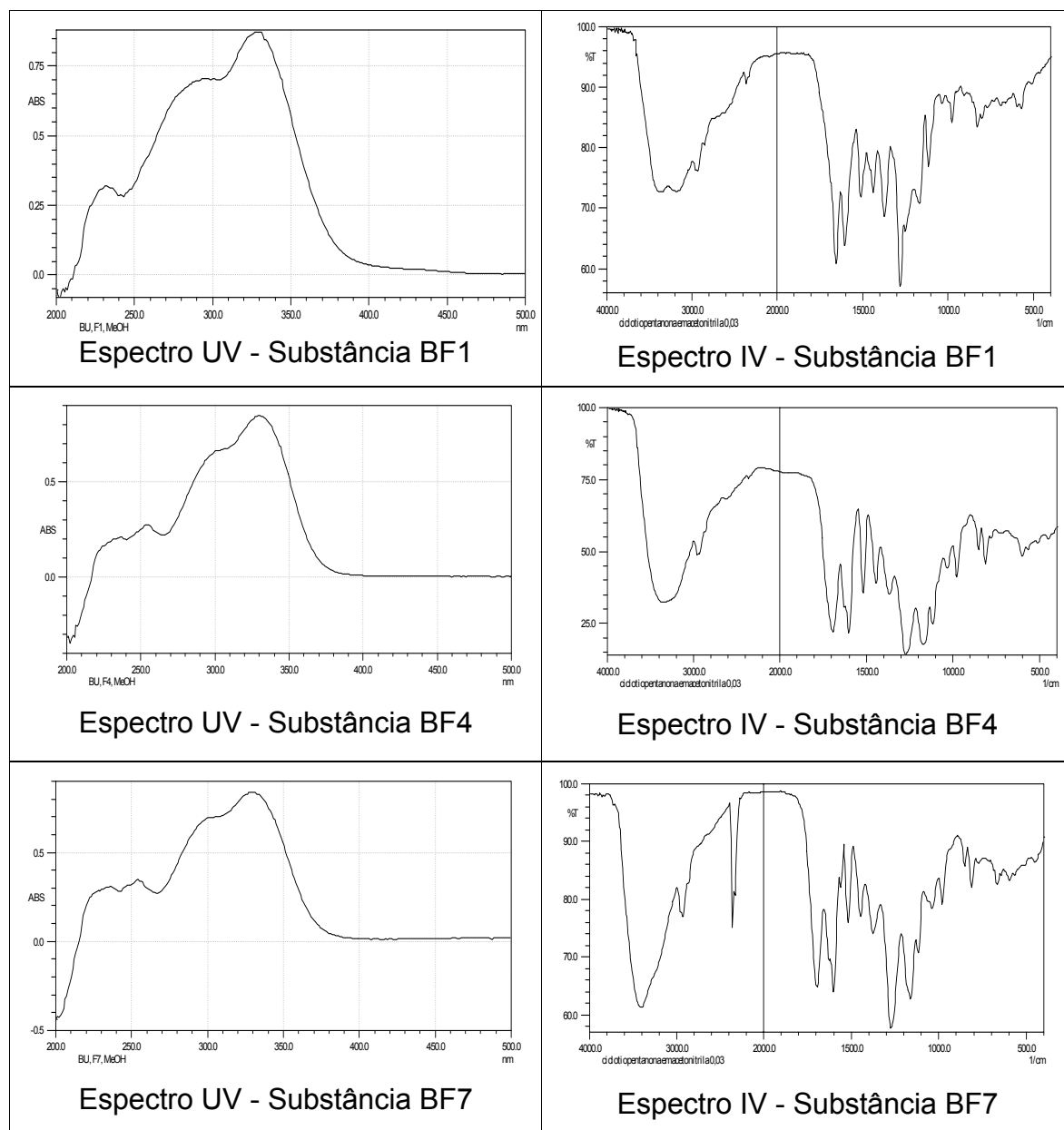


Figura 13- Espectros de absorção de UV e de IV das substâncias BF1, BF4 e BF7

Na fração menos polar BF1, foi detectada a presença de dois compostos fenólicos, sendo um deles provavelmente o flavonóide quercetina como componente minoritário presente, por comparação direta com padrão autêntico em análises de CCD.

As duas outras frações BF4 e BF7 apresentaram compostos fenólicos principais bem distintos entre si nos cromatogramas, mas com espectros de absorção de UV e IV muito similares (Figura 13). A análise detalhada dos espectros de IV indicou a presença de derivados de ácidos arilpropenóicos (SDBS, 2006), o que foi confirmado pelos espectros de UV. Em análises por CCD foi comparado as três frações com os ácidos caféico, ferúlico, cinâmico e p-cumárico, porém apenas o ácido caféico foi observado como possível componente minoritário da fração de polaridade intermediária BF4. Estes resultados sugerem, pela primeira vez, *B. uncinella* como fonte de derivados de ácidos arilpropenóicos.

3.2 ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DE *B. uncinella*

Pesquisas relacionadas à atividade antimicrobiana de plantas medicinais têm encontrado problemas por causa da diversidade de critérios, técnicas empregadas e propriedades lipofílicas de algumas amostras a serem testadas. Rios e colaboradores (1988) publicaram uma revisão sobre as diferentes técnicas e métodos aplicados ao estudo das atividades microbiológicas de extratos vegetais e substâncias isoladas, diferenciando três modos de aplicação: difusão, diluição e bioautografia. Um grande número de fatores pode influenciar os resultados: método de extração, volume do inóculo, composição do meio de

cultura, pH e temperatura de incubação, entre outros. Os métodos de difusão (disco, cavidade e cilindro) são mais freqüentemente empregados na pesquisa apesar das dificuldades, pois apresentam baixa confiabilidade para amostras com dificuldade de difusão. As vantagens dos métodos de difusão estão no pequeno volume das alíquotas utilizadas e na possibilidade de testar vários compostos, simultaneamente, contra o mesmo microrganismo. No entanto, tais métodos não são empregados para amostras lipofílicas ou para determinações de CIM, para as quais os métodos de diluição em meio sólido ou líquido são indicadas.

Assim sendo, os diâmetros das zonas de inibição provocadas pelos nove extratos de *B. uncinella* analisados pelo método de cavidade em meio sólido, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana dos extratos pelo método de difusão em meio sólido em cavidade.

Extrato	Bc	Ca	Ef	Ec	Kp	Sa	Ss	Pa
FOLHA - CHCl ₃	14	11	13	11	0	9	0	0
FOLHA - AcOEt	13	0	0	13	0	12	0	0
FOLHA - MeOH	11	9	12	0	0	12	0	0
Cloranfenicol*	26	-	20	25	16	18	18	17
Nistatina**	-	20	-	-	-	-	-	-
CASCA - CHCl ₃	11	16	0	0	12	13	0	12
CASCA - AcOEt	12	14	0	0	15	20	0	14
CASCA - MeOH	10	12	0	0	14	32	0	14
Cloranfenicol*	25	-	17	25	22	21	17	17
Nistatina**	-	20	-	-	-	-	-	-
LENHO - CHCl ₃	12	12	0	0	7	7	0	0
LENHO - AcOEt	12	13	0	0	9	8	0	0
LENHO - MeOH	8	9	0	0	8	0	0	0
Cloranfenicol*	25	-	17	25	22	21	17	17
Nistatina**	-	20	-	-	-	-	-	-

Halos de inibição em mm; *B. cereus* (Bc), *C. albicans* (Ca), *E. faecalis* (Ef), *E. coli* (Ec), *K. pneumoniae* (Kp), *S. aureus* (Sa), *S. saprophyticus* (Ss), *P. aeruginosa* (Pa); (-) não testado; * 30µg ** 100UI.

Nenhum dos extratos mostrou atividade contra *S. saprophyticus* e, de forma geral, os dois microrganismos mais afetados foram *B. cereus*, susceptível

aos nove extratos e *C. albicans*, que apresentou resistência apenas ao extrato obtido com acetato de etila das folhas. Todos os extratos da casca foram ativos contra *P. aeruginosa* e apresentaram atividade crescente contra *S. aureus* segundo a polaridade do extrato testado: CHCl₃ 13 mm, AcOEt 20 mm e MeOH 32 mm, sendo que estes dois últimos apresentaram os valores de halos de inibição mais significativos observados em todos os experimentos. Porém, as análises químicas e cromatográficas realizadas neste trabalho não permitiram identificar as substâncias presentes nas cascas são responsáveis por tal atividade. Os extratos das cascas também mostraram boa atividade contra *K. pneumoniae*.

Metabólitos secundários estão presentes em quantidades significativas (~15%) nas folhas se comparados os rendimentos dos extratos (Tabela 4, página 43), e apresentaram atividade inibitória contra cinco dos microrganismos testados. O extrato clorofórmico contém grande proporção de material resinoso, sugerindo fortemente que as atividades antimicrobianas observadas para este extrato sejam desempenhadas por diterpenóides.

Em ensaios destinados a avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *B. uncinella*, foram utilizados métodos preconizados por Koneman e colaboradores (2001). O método da difusão em disco foi aplicado para medir o efeito do óleo contra a levedura *C. albicans* e contra as bactérias *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Mesmo com alíquotas tão pequenas quanto 2 µL do óleo essencial, foi possível observar uma boa atividade contra *C. albicans* e uma atividade moderada contra *S. aureus* e *B. cereus*, como mostrado na Tabela 6.

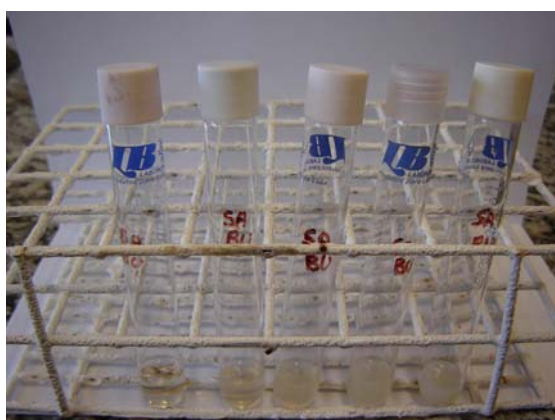
Conforme a turvação das soluções observada na Figura 14, a concentra-

ção inibitória mínima do óleo essencial foi determinada como 50 $\mu\text{L/mL}$ tanto contra *S. aureus* como contra *C. albicans*, podendo ser considerada uma atividade antimicrobiana moderada.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial pelo método de difusão em meio sólido com disco

Microorganismos	Óleo essencial	Cloranfenicol	Nistatina
<i>E. faecalis</i>	0	22	-
<i>S. saprophyticus</i>	0	20	-
<i>S. aureus</i>	9*	22	-
<i>B. cereus</i>	10*	25	-
<i>E. coli</i>	0	19	-
<i>K. pneumoniae</i>	0	17	-
<i>P. aeruginosa</i>	0	19	-
<i>C. albicans</i>	16*	-	17

(-) não testado; * Halos de inibição em mm;



(a) 50 25 12,5 6,25 3,12



(b) 50 25 12,5 6,25 3,12

Figura 14 - Atividade antimicrobiana pelo método CIM: para diluições seriadas do óleo essencial ($\mu\text{L} / \text{mL}$ de solução) frente a (a) *S. aureus* e (b) *C. albicans*.

Há grande semelhança nas composições químicas dos óleos essenciais de folhas de *B. notoserigila* e de *B. uncinella* disponíveis na literatura: os compostos majoritários de *B. notoserigila* foram α -pineno 25,9%, limoneno 19,7%, β -cariofileno 16,9% e espatulenol 6,7% (COBOS *et al.*, 2001), enquanto que as três

amostras de *B. uncinella* apresentaram como principais componentes α -pineno (16,1; 8,1 e 12,9%), limoneno (13,1; 16,8 e 14,2%), β -cariofileno (1,7; 1,6 e 1,5%) e espatulenol (9,8; 47,7 e 23,1%) (FRIZZO *et al.*, 2001; AGOSTINI *et al.*, 2005).

O óleo da amostra BU1, utilizado nos testes de ação antimicrobiana, foi obtido pelo método de destilação por arraste com vapor d'água, em aparelho confeccionado no próprio laboratório (Figura 10, página 31). Sua composição química, apresentada na Tabela 7 (página 51), mostrou ser diferente dos dados publicados para amostras analíticas. Os compostos majoritários do óleo BU1 foram o espatulenol (32,93%), óxido de cariofileno (27,78%), α -cadinol (2,42%), α -calacoreno (2,23%) e γ -cadineno (2,3%).

Comparando os resultados da bioatividade da nossa amostra de óleo essencial de *B. uncinella* com os dados publicados para o óleo de *B. notoserghila*, ambas utilizando o método de difusão em meio sólido com disco, verifica-se uma correlação das bioatividades observadas, principalmente no que se refere à inibição do crescimento de *B. cereus*, *S. aureus*, e *C. albicans* (COBOS *et al.*, 2001), porém com quantidades de óleo essencial de *B. notoserghila* de 5 a 25 vezes maiores do que a quantidade de óleo utilizada no teste com a amostra de *B. uncinella* BU1. Embora a composição química obtida para a amostra BU1 seja bem diferente da amostra de óleo da *B. notoserghila*, a atividade microbiológica destes óleos apresentaram similaridade.

3.3 AMOSTRAS ANALÍTICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

As placas de CCD foram eluídas com diclorometano e clorofórmio e posteriormente reveladas com $\text{H}_2\text{SO}_4\text{:MeOH}$ (1:1, seguido de aquecimento a 110

°C por 5 a 10 minutos). Com estes resultados foi possível traçar um perfil prévio

Tabela 7 – Componentes do óleo essencial de *B. uncinella* BU1 obtido por arraste de vapor, que foi submetido aos testes antimicrobianos.

Composto	BU1	
	%	IK
terpinen-4-ol	0,31	1186
α -cubebeno	tr	1352
α -copaeno	0,27	1375
β -cubebeno	0,32	1381
β -elemeno	0,22	1393
α -gurjuneno	tr	1414
<i>trans</i> -cariofileno	0,92	1427
aromadendreno	0,51	1446
cupareno	tr	1449
α -neocloveno	tr	1458
α -humuleno	tr	1464
γ -gurjuneno	1,81	1468
β -chamigreno	0,25	1486
germacreno D	tr	1481
<i>cis</i> - β -guaieno	tr	1489
α -muuroleno	1,34	1499
γ -cadineno	2,30	1505
sesquifelandreno	tr	1521
δ -cadineno	0,44	1525
<i>trans</i> -calameneno	0,56	1529
α -calacoreno	2,23	1550
ledol	tr	1572
espatulenol	32,93	1588
óxido de cariofileno	27,78	1593
viridiflorol	5,29	1605
α -cadinol	2,42	1654
bulnesol	0,32	1666
cadaleno	0,40	1683
cedren-13-ol,8-	0,90	1694
aristoleno	0,72	1758
cedrane-8,13-diol	1,12	1896
Total	83,36%	

da polaridade dos componentes presentes nos óleos essenciais de *B. uncinella*.

A partir desta análise foi verificada uma mancha intensa com coloração violeta, possivelmente esta mancha seja o espatulenol, que segundo a análise por GC-EM é o composto majoritário presente em nas amostras BU1 e BU2 e BU3. Na figura 15 está representada a análise das amostras dos óleos essenciais por CCD eluídas com CHCl_3 , as quais apresentaram melhor resolução.

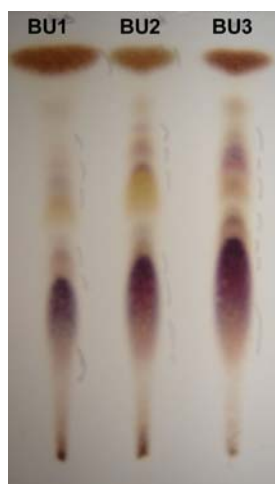


Figura 15 - CCD das amostras dos óleos essenciais de *B. uncinella*

Para avaliar a composição química das amostras dos óleos essenciais de *B. uncinella*, através das análises por CG-EM, foi realizado um estudo comparativo entre os óleos essenciais das amostras analíticas BU2 e BU3 com dados publicados.

A Tabela 8 apresenta os resultados da análise da composição química de óleos essenciais obtidos de folhas *B. uncinella* coletadas nos campos do segundo planalto paranaense (amostra BU2, com rendimento de 0,27%) e na Serra Catarinense (amostra BU3, com rendimento de 0,47%). Foram identificados 34 componentes na amostra BU2 e 39 em BU3, representando cerca de 90% das massas de cada óleo.

Tabela 8 – Componentes dos óleos essenciais analíticos de *B. uncinella*.

Composto	BU2 %	IK	BU3 %	IK
α -tujeno	-	-	1,43	933
α -pineno	tr	940	12,90	940
β -pineno	tr	982	5,25	982
α -terpineno	-	-	0,94	1019
limoneno	tr	1032	9,90	1032
γ -terpineno	-	-	1,03	1061
terpinoleno	-	-	0,12	1088
linalool	0,53	1101	-	-
fenchol	-	-	0,23	1124
<i>trans</i> -pinocarveol	0,40	1140	0,20	1146
borneal	-	-	0,27	1178
terpinen-4-ol	0,41	1182	2,78	1185
<i>p</i> -cimen-8-ol	-	-	0,12	1192
α -terpineol	0,63	1195	0,99	1200
mirtenal	0,22	1202	-	-
ciclosativeno	-	-	0,14	1374
β -bourboneno	tr	1389	0,11	1389
β -elemeno	tr	1394	1,64	1393
metileugenol	1,13	1401	-	-
α -gurjuneno	3,43	1413	0,20	1412
<i>trans</i> -cariofileno	10,48	1427	0,48	1426
α -himachaleno	tr	1445	4,15	1445
α -humuleno	0,40	1463	-	-
allo-aromadendreno	tr	1468	0,48	1462
valenceno	-	-	1,33	1480
germacreno D	6,28	1481	0,32	1487
ar-curcumeno	-	-	0,51	1485
viridifloreno	1,35	1497	1,20	1497
<i>trans</i> - β -guaieno	0,81	1503	1,54	1502
cupareno	1,61	1510	-	-
β -curcumeno	3,23	1515	-	-
γ -cadineno	tr	1520	5,39	1519
δ -cadineno	tr	1524	0,27	1524
cadina-1,4-dieno	0,73	1539	1,56	1539
α -calacoreno	0,43	1549	2,30	1548
germacreno B	-	-	0,85	1554
elemol	1,36	1555	-	-
<i>cis</i> -nerolidol	-	-	0,37	1564
β -calacoreno	0,54	1570	-	-
espatulenol	17,20	1587	15,83	1586
cariofileno óxido	16,20	1593	2,91	1591
viridiflorol	-	-	3,54	1603
γ -eudesmol	-	-	1,45	1633
cubenol	-	-	2,20	1636
α -cadinol	5,18	1653	-	-
α -muurolol = torreyol	-	-	1,40	1655
α -eudesmol	7,55	1665	1,92	1665
α -santalol	2,23	1679	-	-
cadaleno	-	-	0,50	1681
aristoleno	0,33	1749	-	-
<i>cis</i> -nuciferol	0,18	1765	-	-
Total	82,84%		88,75%	

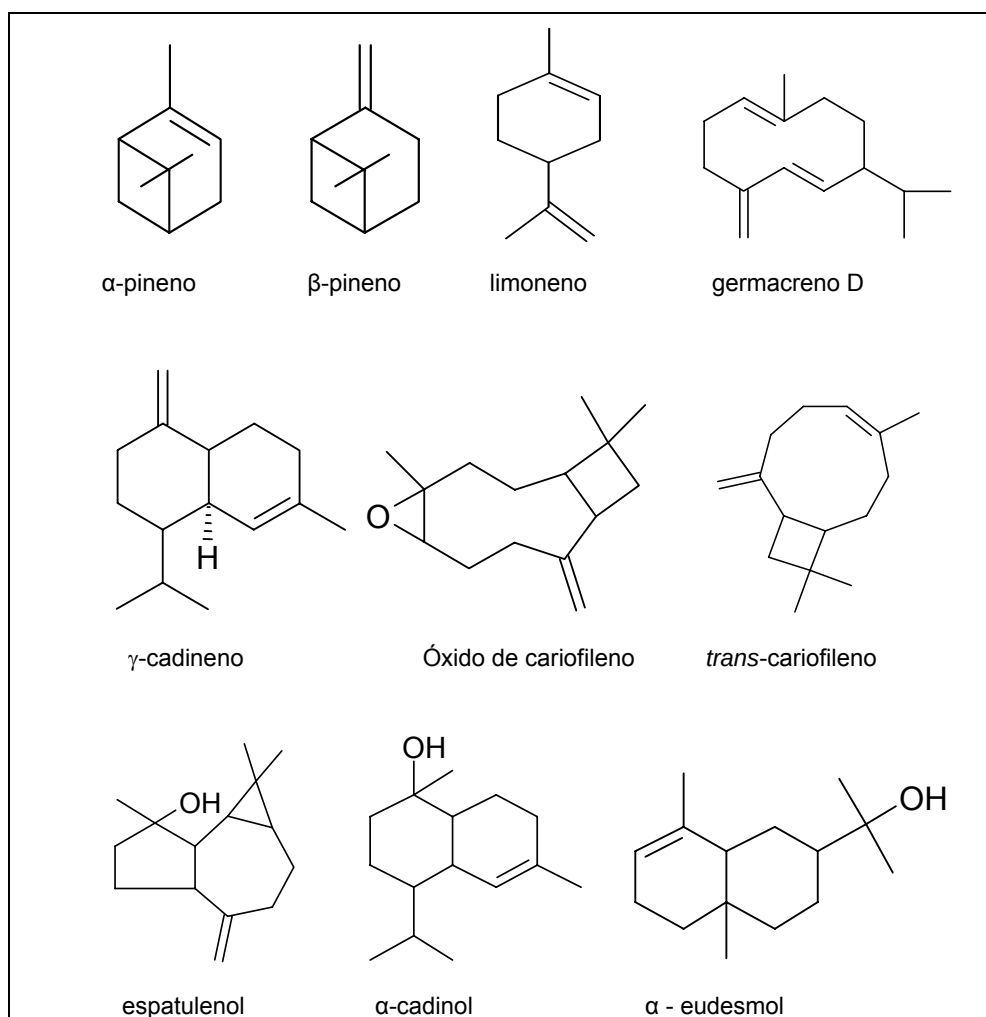


Figura 16 - Componentes principais dos óleos essenciais de *B. uncinella*.

A composição de BU3 apresentou um perfil muito semelhante ao observado para os três óleos advindos de coletas na Serra Gaúcha, inclusive quando comparados os compostos minoritários (FRIZZO *et al.*, 2001; AGOSTINI *et al.*, 2005). No entanto, o óleo essencial BU2 tem somente sesquiterpenos como componentes principais, resultando em uma composição completamente diferente das demais: 17,20% de espatulenol, 16,20% de cariofileno óxido, 10,48% de *trans*-cariofileno, 7,55% de α -eudesmol, 6,27% de germacreno D e 5,18% de α -cadinol. É bastante rara a ocorrência de arilpropenóides em *Baccharis*, tanto de derivados voláteis

como o metileugenol encontrado no BU2 (1,13%), quanto não-voláteis como os ácidos arilpropenóicos, estes encontrados nas folhas de *B. uncinella* conforme observado por análises de UV e IV (Figura 13, página 45). As estruturas químicas dos componentes principais das amostras analíticas BU2 e BU3 de *B. uncinella* estão representados na Figura 16.

3.4 BIOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *B. uncinella*

3.4.1 Dosagem de proteína

O extrato aquoso liofilizado apresentou $1,136 \pm 0,221$ mg de proteína total/mL de solução (LOWRY *et al.*, 1951).

3.4.2 Detecção de saponinas

A presença de saponinas no extrato aquoso de *B. uncinella* foi confirmada pela formação de espuma persistente após intensa agitação e adição de HCl diluído (SCHENKEL *et al.*, 2000; HAMERSKI *et al.*, 2005; YULDASHEVA *et al.*, 2005).

3.4.3 Perfil hemolítico

Neste trabalho, foram analisadas as possíveis interações entre extrato aquoso das folhas de *B. uncinella* com células eritrocitárias humanas dos tipos sanguíneos O⁺, O⁻, A⁺ e B⁺, cuja composição de membrana difere nas porções oligossacarídicas e estrutura molecular da proteína Rhesus.

A classificação das tipagens sanguíneas segundo os sistemas ABO e Rhesus é representativa de distintas composições químicas de membrana, sendo os antígenos que apresentam maior incidência na população e os mais utilizados em transfusões sanguíneas.

Na análise das figuras 17, 18, 19 e 20 foi verificado que o extrato aquoso apresentou uma atividade não-lítica, ou seja, não causou um aumento da permeabilidade da membrana eritrocitária que permitisse o extravasamento do conteúdo intracelular (medido pela liberação de Hb no sobrenadante) nas concentrações analisadas de 22, 110 e 220 µg/mL. Este perfil não-hemolítico é similar para as tipagens A⁺, B⁺, O⁺ e O⁻.

É provável que o extrato aquoso das folhas de *B. uncinella* interaja com os antígenos A, B e O e não consiga atingir a estrutura membranar o suficiente para lisá-la, resultando em proteção da mesma. Da mesma maneira, é possível sugerir a presença de um mecanismo de interação concentração-independente, visto que o perfil protetor foi similar em todas as concentrações ensaiadas.

O precipitado do teste hemolítico foi analisado com o objetivo de avaliar a integridade da Hb, cuja função biológica essencial - transporte de O₂ - só acontece se o Fe do grupamento heme estiver na forma Fe⁺² (LEE *et al.*, 1998). Assim, foi observado que a interação do extrato aquoso com a membrana da célula eritrocitária, apesar de não romper a estrutura membranar, causou uma oxidação parcial da hemoglobina, comprometendo portanto o desempenho da função. Em ambas as tipagens analisadas, A⁺ e O⁻ (Figura 21 e 22), em média 2% da hemoglobina foi oxidada, o diferencial observado para estas duas tipagens foi que o extrato aquoso interagiu gradativamente com a membrana eritrocitária da tipagem A⁺, enquanto que este mesmo valor de oxidação parcial foi obtido com o

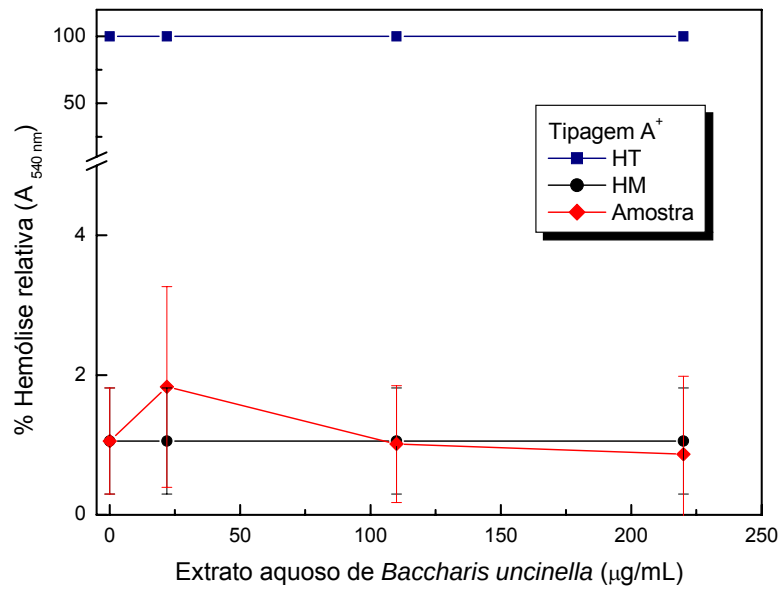


Figura 17 - Interação do extrato aquoso de *B. uncinella* com eritrócitos de tipagem A⁺ : hematócrito de 0,8% em PBS, incubação por 45 min a 37°C, sob agitação constante.

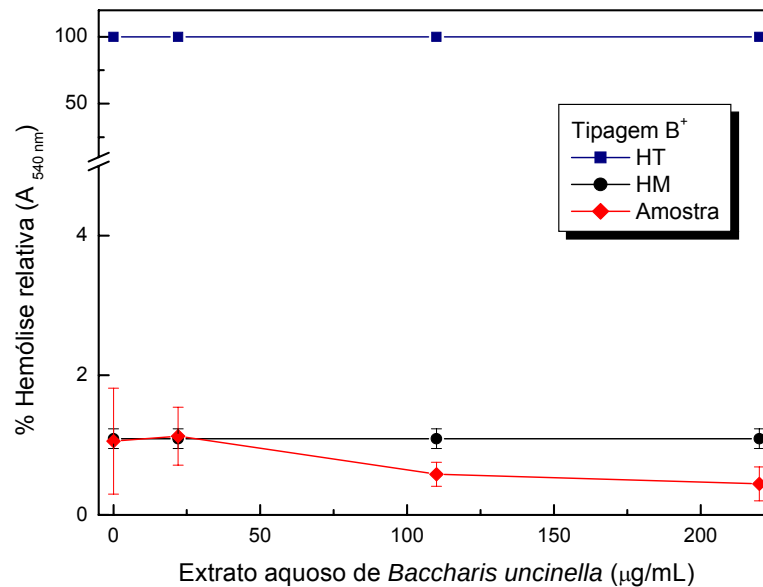


Figura 18 - Interação do extrato aquoso de *B. uncinella* com eritrócitos de tipagem B⁺ : hematócrito de 0,8% em PBS, incubação por 45 min a 37°C, sob agitação constante.

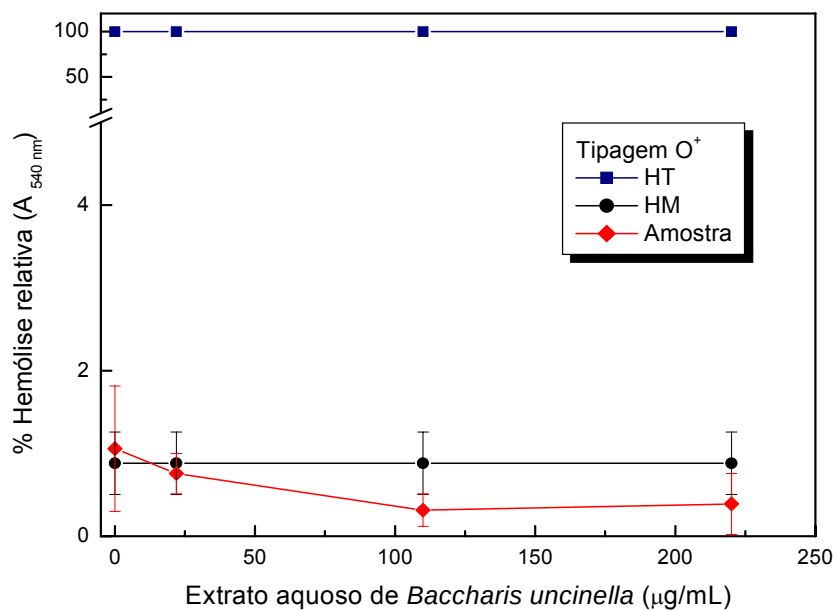


Figura 19 - Interação do extrato aquoso de *B. uncinella* com eritrócitos de tipagem O⁺: hematócrito de 0,8% em PBS, incubação por 45 min a 37°C, sob agitação constante.

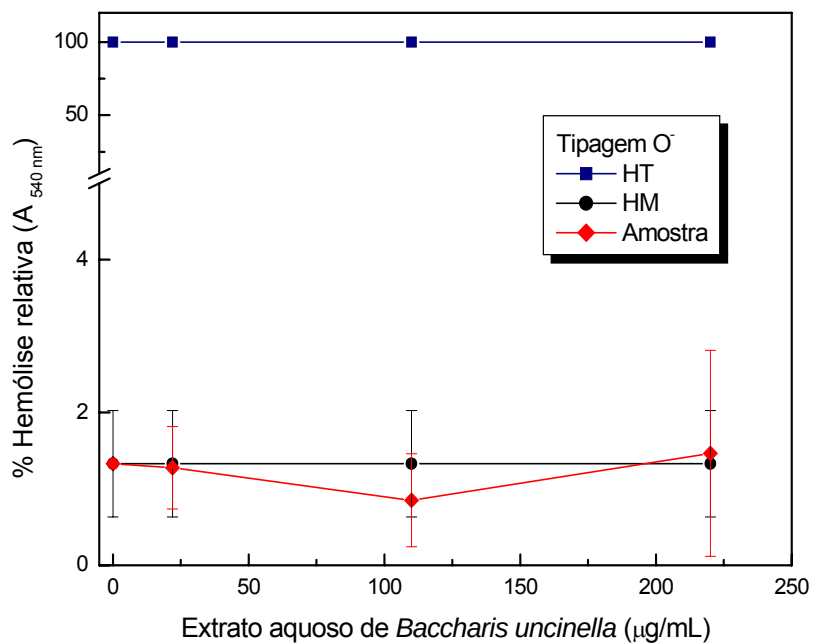


Figura 20 - Interação do extrato aquoso de *B. uncinella* com eritrócitos de tipagem O⁻: hematócrito de 0,8% em PBS, incubação por 45 min a 37°C, sob agitação constante.

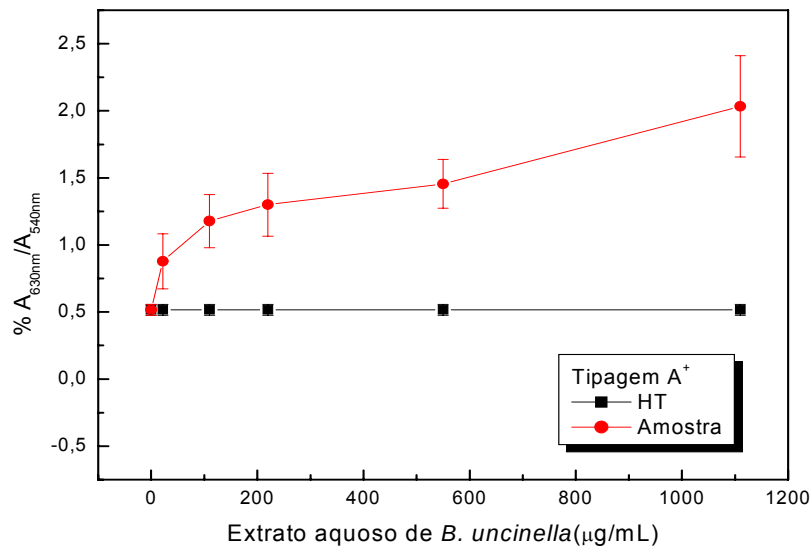


Figura 21 - Efeito do extrato aquoso de *B. uncinella* em eritrócitos de tipagem A⁺ íntegros: leitura do precipitado da incubação com hematócrito de 0,8% em PBS, incubação por 45 min a 37°C, sob agitação constante.

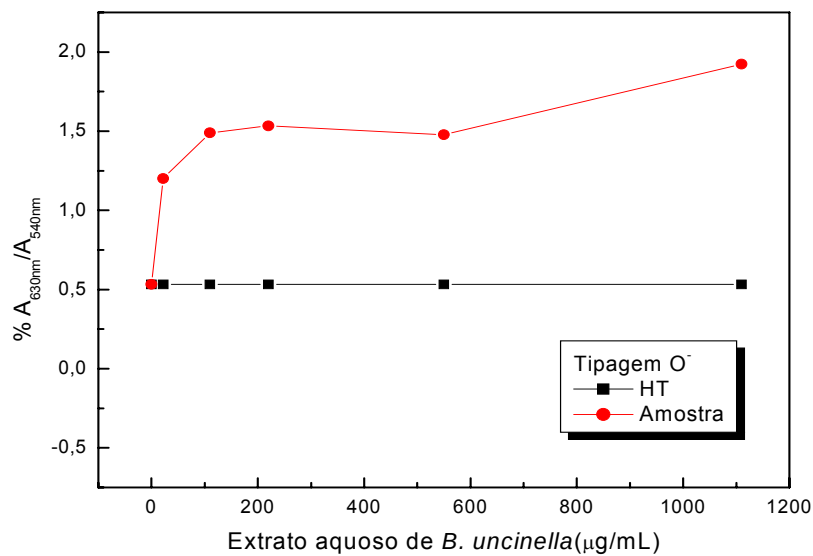


Figura 22 - Efeito do extrato aquoso de *B. uncinella* em eritrócitos de tipagem O⁻ íntegros: leitura do precipitado da incubação com hematócrito de 0,8% em PBS, incubação por 45 min a 37°C, sob agitação constante.

sorotipo O⁻ já com as primeiras concentrações testadas. Logo, é provável que a diferença na composição química da membrana eritrocitária, quer seja a porção

monossacarídica, quer seja a proteína Rh, esteja influenciando a interação droga-célula.

Assim, é possível afirmar que o extrato aquoso de *B. uncinella* não apresenta um caráter hemolítico frente a sorotipos A⁺, B⁺, O⁺ e O⁻, o que poderia sugerir uma ação redutora, no entanto esta perspectiva é contraposta pela oxidação, ainda que em pequeno grau (2%), do conteúdo intracelular representado pela Hb.

3.4.4 Atividade frente a H₂O₂

Os resultados obtidos para os ensaios da atividade do extrato aquoso das folhas de *B. uncinella* frente a H₂O₂ apresentam similaridade. Em ambas tipagens testadas O⁻ e A⁺, 25% da hb liberada (sobrenadante) foi oxidada pelo H₂O₂ (Figura 23 e 24), indicando que o extrato aquoso não reage com todo o H₂O₂ presente na amostra. É possível que os resultados encontrados sejam decorrentes da interação preferencial do extrato aquoso com a membrana eritrocitária (perfil não-lítico), e não com a Hb liberada, uma vez que esta apresenta um espectro de varredura padrão.

Na atividade frente ao H₂O₂, após ressuspender o precipitado foi observado que o extrato aquoso aumenta o efeito oxidante do H₂O₂ em torno de 25%, para a tipagem O⁻ (Figura 25), quando comparado com o controle tratado com H₂O₂. Com base nos dados obtidos e, considerando o alto potencial de difusão que o H₂O₂ apresenta em soluções aquosas, dentro e entre células *in vivo* (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), os resultados mostram uma possível interação entre o extrato aquoso e a membrana, a qual pode estar atuando de maneira a reorgani -

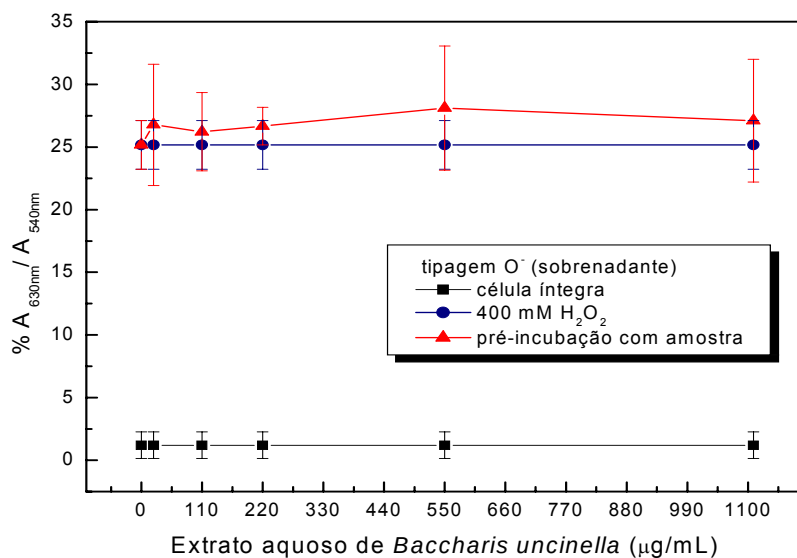


Figura 23 - Interação do extrato aquoso de *B. uncinella* com eritrócitos de tipagem O^- frente a H_2O_2 : com hematócrito de 0,8% em PBS

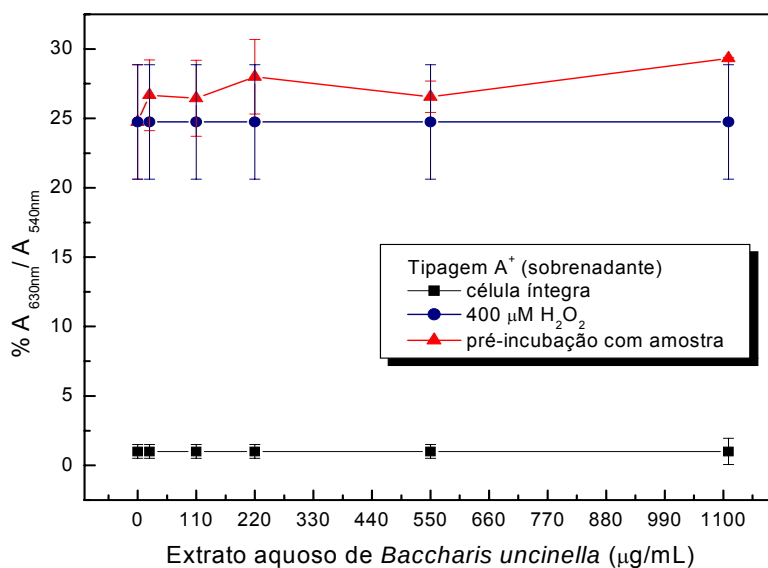


Figura 24 - Interação do extrato aquoso de *B. uncinella* com eritrócitos de tipagem A^+ frente a H_2O_2 : com hematócrito de 0,8% em PBS

zar a bicamada lipídica. Esta reorganização pode estar interferindo de maneira a aumentar a difusão de H_2O_2 para o interior dos eritrócitos encontrados no

precipitado, causando um acréscimo na porcentagem de oxidação de Hb presente neste.

Caso haja interações entre o extrato aquoso e os grupos SH da Hb, estas deixam o Fe do grupo heme mais disponível à oxidação. Possivelmente, estas são as interações que estão causando um aumento de oxidação e, conseqüente perda de função da Hb, visto que para ligar reversivelmente o O₂ o ferro da porção heme deve ser mantido no estado reduzido (Fe²⁺) (LEE et al., 1998).

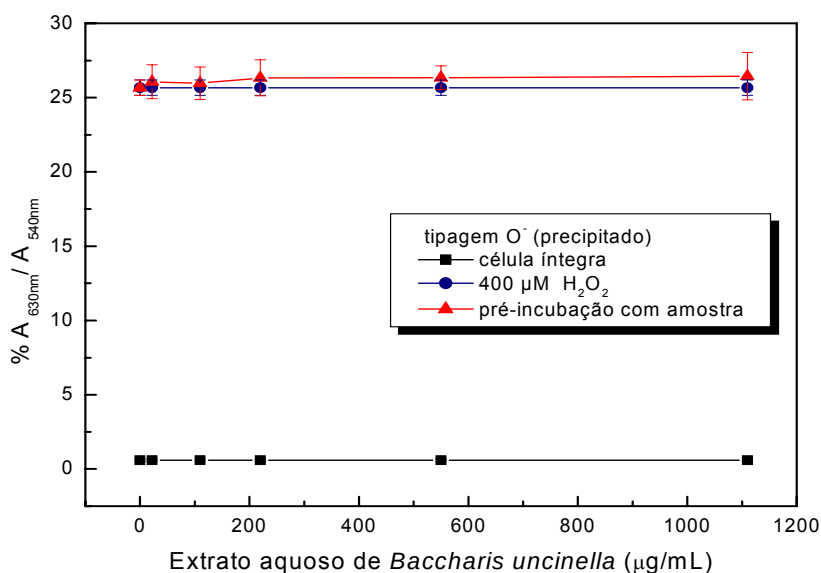


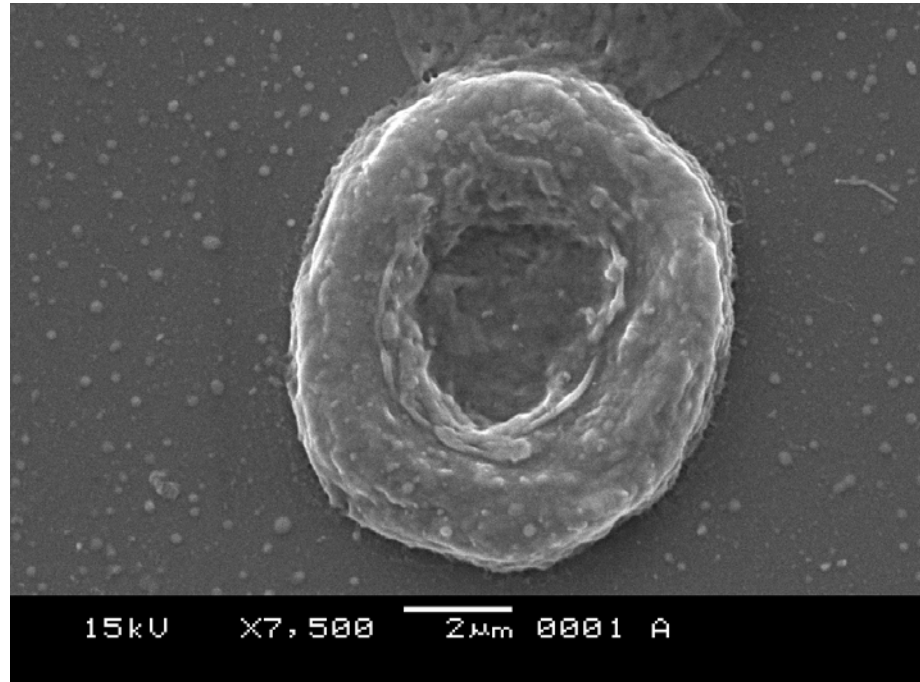
Figura 25 - Interação do extrato aquoso de *B. uncinella* com eritrócitos de tipagem O⁻ íntegros frente a H₂O₂

3.4.5 Análise em MEV

Mesmo carecendo ainda de uma padronização adequada, a técnica contribuiu significativamente para a análise de aspectos qualitativos a respeito da interação do extrato aquoso de *B. uncinella* com a arquitetura membranar do eritrócito, qual seja, confirmando o perfil não-lítico e a interação extrato-célula como observado pela mudança no padrão visual da forma de disco bicôncavo

(Figura 26) (a) para uma forma mais achatada (b) e alteração na superfície da membrana plasmática.

(a)



(b)

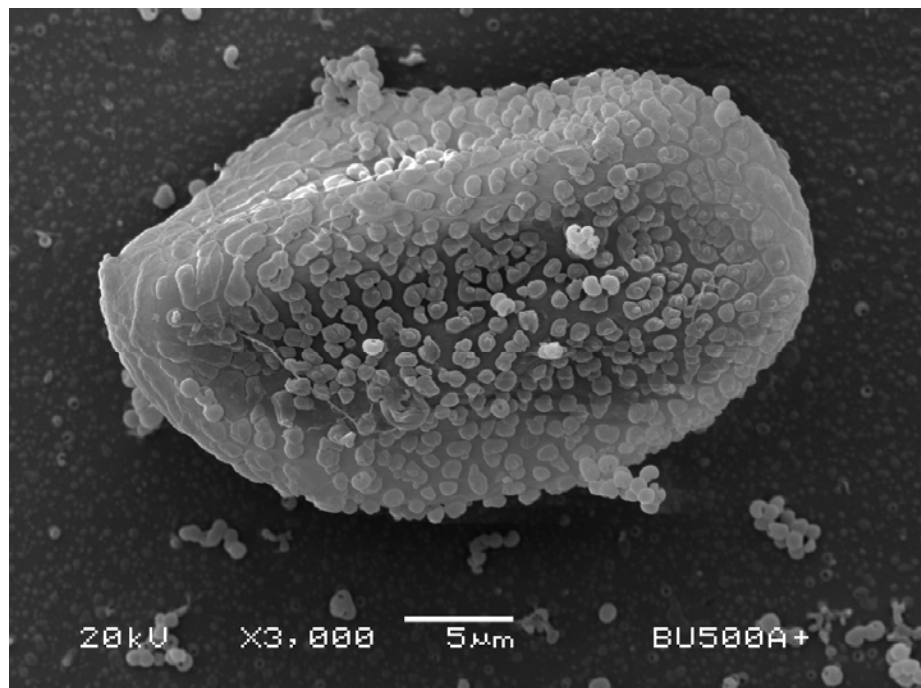
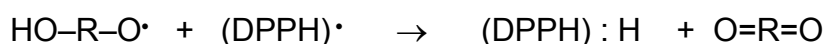
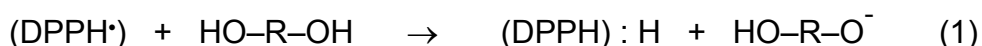


Figura 26 - Fotomicrografias da interação de extrato aquoso de *B. uncinella* e eritrócitos: (a) células íntegras e (b) em presença do extrato

3.4.6 Medida de atividade antioxidante frente a DPPH

O teste de DPPH é um método não enzimático usado para fornecer informação quanto à capacidade dos compostos em seqüestrar radicais livres (BRACA *et al.*, 2003). Esta medida é avaliada por espectrofotometria em 517nm, indicativa da concentração do radical estável, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil em solução. A redução da absorbância do DPPH ocorre quando o elétron desemparelhado do radical é pareado (COTELLE *et al.*, 1996). O mecanismo da reação com o radical DPPH e o antioxidante é o seguinte (LUGASI *et al.*, 1998) :



: significando um par de elétrons (HALLIWELL & GUITTERIDGE, 1999)

Os antioxidantes doam hidrogênio para os radicais livres, essa doação leva à formação de espécies não radicalares e isso causa a interrupção da fase de propagação da oxidação lipídica (LUGASI *et al.*, 1998).

As concentrações do extrato aquoso testadas apresentaram potente atividade redutora, tanto que as maiores concentrações (1,92 e 0,98 mg/mL) reduziram instantaneamente o DPPH presente e, somente em concentrações baixíssimas, $1,5 \times 10^{-4}$ e $7,8 \times 10^{-5}$ mg/mL, foi possível quantificar um decréscimo parcial na concentração do radical livre, através da redução no valor de $A_{517\text{nm}}$, de 20,10 % e 9,2%, respectivamente.

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho com a espécie *Baccharis uncinella*, permitiu esboçar um perfil químico, bioquímico e microbiológico das partes aéreas da planta. Os extratos das folhas, cascas e lenho, obtidos com uma seqüência de solventes, foram analisados por CCD e UV, sendo estabelecida uma estratégia para o isolamento dos compostos fenólicos. Três substâncias fenólicas foram isoladas por cromatografia em coluna de baixa pressão, as quais apresentaram espectros de UV e IV compatíveis com a estrutura dos ácidos hidroxiarilpropenóicos e seus derivados; o ácido caféico e o flavonóide quercetina foram identificados como possíveis componentes minoritários. Este é o primeiro registro da ocorrência de ácidos arilpropenóicos como compostos fenólicos majoritários das folhas de *B. uncinella*.

O estudo da composição de amostras dos óleos essenciais de folhas coletadas no segundo planalto paranaense e na Serra Catarinense, permitiu relacionar a composição deste último com a de amostras estudadas no Rio Grande do Sul, mas os componentes principais do óleo proveniente de folhas da nossa região são bem diferentes, com baixo teor de monoterpenos. Observações sobre a ocorrência de grandes variações fenológicas em nossa região, em comparação com outras áreas do Sul do Brasil, podem ajudar a compreender as diferenças que encontramos na composição dos voláteis. Os resultados da análise da composição do óleo das folhas provenientes de Santa Catarina, quando comparados com os dados publicados sobre amostras da Serra Gaúcha (AGOSTINI *et al.*, 2005; FRIZZO *et al.*, 2001), sugerem que *B. uncinella* pode produzir óleos essenciais com composições muito similares, a partir de materiais coletados nestas áreas, com grande independência em relação à época da coleta.

Mas ainda há necessidade de mais estudos sobre os fatores que determinam as diferenças observadas na composição do óleo obtido de folhas coletadas no segundo planalto do Paraná.

A análise das atividades antimicrobianas relativas dos vários extratos e do óleo essencial foi realizada com o objetivo de compará-los quanto a este aspecto da bioatividade, na tentativa de detectar possíveis especificidades dos diversos conjuntos de metabólitos secundários disponíveis, contra microrganismos selecionados, embora considerando as limitações impostas pelos métodos de trabalho mais recomendados. As principais conclusões sobre a atividade dos extratos são: 1) de forma geral, os extratos das cascas foram os mais ativos, inibindo o crescimento da maioria dos microrganismos; 2) o crescimento de *S. saprophyticus* não foi inibido por nenhum dos extratos; 3) os microrganismos mais afetados pelos extratos foram *B. cereus* e *C. albicans*. A determinação da CIM do óleo essencial como 50 µL/mL contra *S. aureus* e *C. albicans*, denota a sua fraca atividade antimicrobiana.

A partir do perfil bioquímico preliminar do extrato aquoso das folhas de *B. uncinella* foi possível observar que as interações químicas que acontecem entre as diferentes concentrações do extrato aquoso de *B. uncinella* e a membrana eritrocitária de tipagens sanguíneas A⁺, B⁺, O⁺ e O⁻, nas concentrações e condições ensaiadas, sugerem uma atividade não-lítica, apesar das diferenças nas composições monossacarídicas e protéicas dos antígenos. Os ensaios da atividade do extrato aquoso das folhas de *B. uncinella* frente a H₂O₂ apresentaram similaridade. Em ambas tipagens testadas O⁻ e A⁺, 25% da hemoglobina liberada (sobrenadante) foi oxidada pelo H₂O₂, indicando que o extrato aquoso não reage com todo o H₂O₂ presente na amostra. A técnica de MEV contribuiu

significativamente para a análise de aspectos qualitativos a respeito da interação do extrato aquoso de *B. uncinella* com a arquitetura membranar do eritrócito, qual seja, confirmando o perfil não-lítico e a interação extrato-célula como observado pela mudança no padrão visual da superfície e forma do disco bicôncavo. Possivelmente as saponinas detectadas nessa amostra sejam do tipo não-hemolítico, uma vez que o extrato causa hemólise na membrana eritrocitária. O extrato aquoso analisado quanto sua atividade antioxidante, mostrou boa ação seqüestradora de radicais livres DPPH, caracterizando potencial redutor.

5 REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography - Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 1995, 469 p.

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.

AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M. R.; ZATTERA, F.; WASUM R., SERAFINI L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (ASTERACEAE) do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n. 3, p. 215-220, 2005.

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1383-1392, 2007.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SOUZA, E. B.; LINS, M. U. D. S.; NOGUEIRA, N. A. P.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. **Arkivoc**, v. 6, p. 59-65, 2004.

ANTONINI, E.; BRUNORI, M. **Hemoglobin and mioglobin and their reactions with ligands**. North Holland Publishing Co., 1971, 14p.

ATAMANOVA, S. A.; BREZHNEVA, T. A.; SLIVKIN, A. I.; NIKOLAEVSKII, V. A.; SELEMENEV, V. F.; MIRONENKO, N. V. Isolation of saponins from table beetroot and primary evaluation of their pharmacological activity. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 39, n. 12, p. 29-31, 2005.

BATISSOCO, A.C.; NOVARETTI, M.C.Z. Aspectos moleculares do sistema sanguíneo ABO. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.25, n. 1, p.47-58, 2003.

BRACA, A.; DE TOMMASI, N.; DI BARI, L.; PIZZA, C.; POLITI, M.; MORELLI, I. Antioxidant principles from *Bauhinia terapotensis*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 892–895, 2001.

BRACA, A.; FICO, G.; MORELLI, I.; SIMONE, F.; TOMÉ, F.; TOMMASI, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of flavonol glycosides from

different *Aconitum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2861, p. 1-5, 2003.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL S. M. **A Célula**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2001. 14p.

CHI, L. M.; WU, W. G. Mechanism of hemolysis of red blood cell mediated by ethanol. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1062, p. 46-50, 1991.

CASSEL, E.; FRIZZO, C. D.; VANDERLINDE, R.; ATTI-SERAFINE, L.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Extraction of *Baccharis* oil by supercritical CO₂. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, p. 4803-4805, 2000.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vivo and in experimental animal infections. In: **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3. ed., Baltimore: William & Wilkins, p.739-786, 1991.

COBOS, M. I.; RODRIGUEZ, J. L.; OLIVA, M. de las M.; DEMO, M.; FAILLACI, S. M.; ZYGADLO, J. A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserigila*. **Planta Medica**, v. 67, p. 84-86, 2001.

CONROY, M. J.; BULLOUGH, P. A.; MERRICK, M., AVENT, N. D. Modelling the human rhesus proteins: implications for structure and function. **Journal of Haematology**, v. 131. p. 543-551, 2005.

COTELLE, N.; BERNIER, J. L.; CATTEAU, J. P.; POMMERY, J.; WALLET, J. C.; GAYDOU, E. M. Antioxidant proprieties of hydroxy-flavones. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 1, p. 35-43, 1996.

CUNHA, M. C. L.; DANI, N.; FORMOSO, M. L. L. A importância do estudo biogeoquímico na mobilidade dos elementos residuais em ambientes supergênico. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 20, p. 173-177, 1990.

DE OLIVEIRA, S. Q.; DAL-PIZZOL, F.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; MOREIRA, J. C. F.; SCHENKEL, E. P. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. **Free Radical Reserch**, v. 37, n. 5, p. 555-559, 2003.

DE OLIVEIRA, S. Q.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 365-368, 2004.

DE OLIVEIRA, S. Q.; TRENTIN, V. H.; KAPPEL, V. D.; BARELLI, C.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F. H. Screening of antibacterial activity of South Brazilian *Baccharis* species. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 5, p. 434-438, 2005.

DEMO, M.; OLIVA, M. D.; LOPEZ, M. L.; ZUNINO, M. P.; ZYGADLO, J. A. Antimicrobial activity of essential oil obtained from aromatic plants of Argentina. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 2, p. 129-134, 2005.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo, ed. UNESP, 1996. p.230.

ENOMOTO, A.; TAKAKUWA, Y.; MANNO, S.; TANAKA, A.; MOHANDAS, N. Regulation of erythrocyte ghost membrane mechanical stability by chlorpromazine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1512, p. 285-290, 2001.

FERESIN, G. E.; TAPIA, A.; LOPEZ, S. N.; ZACCHINO, S. A. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan Province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 1, p. 103-107, 2001.

FERESIN, G. E.; TAPIA, A.; GIMENEZ, A.; RAVELO, A. G.; ZACCHINO, S.; SORTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 73-80, 2003.

FERRACINI, V. L.; PARAIBA, L. C.; FILHO, H. F. L.; DA SILVA, A. G.; NASCIMENTO, L. R.; DA SILVA, A. G. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal Essential Oil Research**, v. 7, p. 355-367, 1995.

FRIZZO, C. D.; SERAFINI, L. A.; DELLACASSA, E.; LORENZO, D.; MOYNA, P. Essential Oil of *Baccharis uncinella* DC. from Southern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 4, p. 286-288, 2001.

GALEMBECK, E.; ALONSO, A.; MEIRELLES, N.C. Effects of polyoxyethylene chain length on erythrocyte hemolysis induced by polyoxy[ethylene (n) nonylphenol] non ionic surfactants. **Chemical Biological Interactions**, v. 113, p. 91-103, 1998.

GARCIA, M.; DONADEL, O. J.; ARDANAZ, C. E.; TONN, C. E.; SOSA, M. E. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. **Pest Management Science**, v. 61, n. 6, p. 612-618, 2005.

GIANELLO, J. C.; GIORDANO, O. S. Examen quimico en seis especies del genero *Baccharis*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 15, p. 84-86, 1984.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002. 103-134; 719-724p.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3^a ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HAMERSKI, L.; CARBONEZI, C. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. DA S.; YOUNG, M. C. M. Y. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (RUBIACEAE). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 601-604, 2005.

HEITMAN, J.; AGRE, P. A new face of the Rhesus antigen. **Nature Genetics**, v. 26, p. 258-259, 2000.

HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubization of membranes by detergents. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 415, p. 29-80, 1975.

HEMKER, M. B.; CHEROUTRE, G.; ZWIETEN, R. V.; WIJK, P. A. M.; ROOS, D.; LOOS, J. A.; SCHOOT E.; VON DEM A. E. G. KR. The Rh complex exports ammonium from human red blood cells. **British Journal of Haematology**, v. 122, p. 333-340, 2003.

HERAS, B.; SLOWING, K.; BENEDÍ, E. C.; CARRETERO, E.; ORTEGA, T.; TOLEDO, C.; BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M. J.; SERRANILLOS, P. G.; LISO, P. A.; VILLAR, A.; CHIRIBOGA, X. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in tradicional medicine in Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 161-166, 1998.

HERZ, W.; PILOTTI, A. M.; SÖDERHOLM, A. C.; SHUHAMA, I. S.; VICHNEWSKI, W. New ent-Clerodane-Type Diterpenoids from *Baccharis trimera*. **Journal Organic Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 3913-3917, 1977.

ISI, 2006. Disponível em: <<http://www.webofscience.com>>. Acesso em: outubro de 2006.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. N.; SCHRECKENBERGER, P. C.;

WASHINGTON, C. W. JUNIOR. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas**. 5^a. ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda. 2001, 1465p.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.

LEE, G. R.; BITHELL, T. C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J. W.; LUKENS, J. N. **Wintrobe- Hematologia Clínica**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1998. 157p.

LOYASA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; JEAN, F. I. Essential oil of *B. salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 2, p. 381-389, 1995.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARRAH, S.; RANDALL, R. J. Protein measurements with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p. 265-275, 1951.

LUGASI, A.; DWORSCHÁK, E.; BLÁZOVICS, A.; KÉRY, Á. Antioxidant and free radical scavenging proprieties of squeezed juice from blanck radish (*Raphanus sativus* L. var *niger*) root. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 502-506, 1998.

MALHEIROS, S. V. P.; de PAULA, E.; MEIRELLES, N. C. Contribution of trifluoperazine / lipid ratio and drug ionization to hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1373, p. 332-340, 1998.

MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C.; de PAULA, E. Pathways involved in trifluoperazine-dibucaine and praziquantel induced hemolysis. **Biophysical Chemistry**, v. 83, p. 89-100, 2000.

MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; TALOU, J. R.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *B. coridifolia* DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 157-163, 1997.

MOTL, O.; TRKA, A. Zusammensetzung des brasilianischen Vassoura-Oils (aus *Baccharis dracunculifolia*). **Parfum. Kosmet.**, v. 64, p. 458-491, 1983.

MOURA, R.A. **Técnicas de laboratório**. 3. ed. Rio de Janeiro, São Paulo: Livraria Atheneu, 1987. 511p.

NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2560-2564, 1998.

NUNES, D. S.; SENS, S. L.; SWITALA, M. Investigação de valores químicos e biológicos de Asteraceae comuns nos Campos Gerais. IX Encontro de Química da Região Sul-SBQ-SUL. **Anais**, Londrina, 2001.

OH, T. Y.; LEE, J. S.; AHN, B. O.; CHO, H.; KIM, W. B.; SURH, Y. J.; CHO, S. W.; HAHM, K. B. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 8, p. 905-915, 2001.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

QUEIROGA, C. L.; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A. J. Composition of essential oil of Vassoura. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 1, p.105-109, 1990.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.

SDBS, 2006. [National Institute of Advanced Industrial Science and Technology \(AIST\)](http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS), Japão, <http://www.aist.go.jp/RIODB/SDBS>, página e banco de dados acessados em outubro de 2006.

SEEMAN, P.; SHAÁFI, R. I.; GALEY, W. R.; SOLOMON, A. K. The effect of anesthetics (Chlorpromazine, ethanol) on erythrocyte permeability to water. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 211, p. 365-368, 1970.

SEEMAN, P. The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. **Pharmacological Reviews**, v. 24, p. 583-655, 1972.

SENS, S. L. **Alternativas para a auto-sustentabilidade dos Xokleng da Terra Indígena Ibirama**. 2002, 365 p. Dissertação - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In:

Farmacognosia: da planta ao medicamento. Organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões e outros, Porto Alegre/ Florianópolis: Editoras Universidade UFRGS/ UFSC, 2000. p.597 – 610.

SIMÕES-PIRES, C. A.; DEBENEDETTI, S.; SPEGAZZINI, E.; MENTZ, L. A.; MATZENBACHER, N. I.; LIMBERGER, R. P.; HENRIQUES, A. T. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, n. 1, p. 23-32, 2005.

STALH, E.; SCHILD, W.. **Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierungen.** Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York. 1981, 461 p.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal Organic Chemistry**, v. 43, p. 2923 – 2925, 1978.

TAPIA, A.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C; LOPEZ, S.; FERESIN, G.E; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebacchi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2, p.155-161, 2004.

TORRES, L. M. B.; GAMBERINI, N. F.; ROQUE, M. T.; LIMA-LANDMAN, M. T.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, p. 617-619, 2000.

UTO, Y.; HIRATA, A.; FUJITA, T.; TAKUBO, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H. First total synthesis of Artepillin C established by O,O'-diprenylation of p-halophenols in water. **Journal Organic Chemistry**, v. 67, p. 2355-2357, 2002.

VAN DEL DOOL, H.; KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VAN KIM, C. L.; COLIN, Y.; CARTRON, J. P. Rh proteins: key structural and functional components of the red cell membrane. **Blood Reviews**, v. 20, n. 2, p. 93-110, 2006.

VERÁSTEGUI, M. A.; SÁNCHEZ, C. A.; HEREDIA, N. L.; GARCIA-ALVARO, J. A. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Dhihuahun Desert. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, n. 3, p. 175-177, 1996.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VERMEHREN, C.; HANSEN, H. S. Shape changes in the erythrocyte membrane induced by the absorption enhancer didecanoylphosphatidylcholine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 174, p. 1-8, 1998.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Bioquímica** 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978, 780p .

XU, H. X.; LEE, S. F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytother. Research**, v. 15, p. 39-43, 2001.

ZDERO, C.; BOHLMANN, J. C.; SOLOMON, R. M.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Ent-clerodanes and other constituents from bolivian *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 28, n.2, p. 531-542, 1989.

ZIEGLER, H. L.; FRANZYK, H.; SAIRAFIANPOUR, M.; TABATABAI, M.; TEHRANI, M. D.; BAGHERZADEH, K.; HAGERSTRAND, H.; STAERK, D.; JAROSZEWSKI, J. W. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure-activity relationships for betulinic acid analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.12, p. 119-127, 2004.

YULDASHEVA, L. N.; CARVALHO, E. B.; CATANHO, M. J. A.; KRASILNIKOV, O. V. Cholesterol-dependent hemolytic activity of *Passiflora quadrangularis* leaves. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1061-1070, 2005.