



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NOS CONSTITUINTES  
QUÍMICOS, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE  
DAS PARTES AÉREAS DE *Baccharis articulata* (Lam) Pers E  
*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.**

---

**Verciane Schneider Cezarotto**

**PPGQ**

**Santa Maria, RS – Brasil**

**2009**

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NOS CONSTITUINTES  
QUÍMICOS, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE  
DAS PARTES AÉREAS DE *Baccharis articulata* (Lam) Pers E  
*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.**

---

**por**

**Verciane Schneider Cezarotto**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Química, Área de Química Analítica, da Universidade Federal  
de Santa Maria (RS), como requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Química Analítica**

**PPGQ**

**Santa Maria, RS – Brasil**

**2009**

Dedico este trabalho a minha mãe Carla,  
que me ensinou a amar, mas esqueceu de me  
ensinar de que não somos imortais.

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes da nossa responsabilidade, é saber que os outros crêem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos”.

(Albert Einstein)

Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE NOS CONSTITUINTES  
QUÍMICOS, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE  
DAS PARTES AÉREAS DE *Baccharis articulata* (Lam) Pers E  
*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.**

elaborada por

**VERCIANE SCHNEIDER CEZAROTTO**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

**Mestre em Química**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Érico Marlon de Moraes Flores – Orientador (UFSM-RS)

---

Juliano Smanioto Barin (UFSM-RS)

---

Sandro Rogério Giacomelli (URI-RS)

Santa Maria, 16 de setembro de 2009

## **AGRADECIMENTOS**

---

A UFSM – Universidade Federal de Santa Maria e ao PPGQ – Programa de Pós-graduação em Química pela possibilidade de execução deste trabalho.

Ao professor Érico, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, pelo discernimento, conselhos, lições e orientações relevantes a realização deste trabalho.

Ao professor Sandro, pela orientação neste trabalho e também pelo exemplo de profissionalismo, pelo convívio e pela amizade.

Ao professor Juliano, amigo que acreditou em mim, abrindo os caminhos que levaram a concretização deste trabalho.

A URI - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, *Campus* de Frederico Westphalen, RS, pelo apoio e por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) pelo fornecimento dos dados meteorológicos de grande valia neste trabalho.

Aos meus pais, Carla (*in memoriam*) e Rogério pela vida, pelo incentivo, pela compreensão e apoio e a minha irmã Caroll pelo carinho.

Ao Carlos, pelo amor e dedicação incondicionais e pela paciência e compreensão nos momentos em que não pude estar presente.

Aos colegas e amigos, pela convivência, pela amizade e pelos bons conselhos.

Aos bolsistas da URI, Paulo, Jociel, Vinicius e Lucélia pela ajuda nesta pesquisa.

A equipe do Setor de Química Ambiental e Industrial, SQIA-UFSM, pelo companheirismo.

## SUMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Plantas medicinais.....	4
2.2. Família Asteraceae.....	6
2.2.1. <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) D.C.....	6
2.2.1.1. Descrição botânica.....	7
2.2.1.2. Usos populares.....	7
2.2.1.3. Constituintes químicos.....	8
2.3.1.4. Atividades biológicas comprovadas.....	9
2.3.1.5. Toxicologia.....	11
2.2.2. <i>Baccharis articulata</i> (Lam) Pers.....	11
2.2.2.1. Descrição botânica.....	13
2.2.2.2. Usos populares.....	13
2.2.2.3. Constituintes químicos.....	14
2.2.2.4. Atividades biológicas comprovadas.....	15
2.2.2.5. Toxicologia.....	15
2.3. Metabólitos secundários.....	16
2.3.1. Óleos essenciais.....	16
2.3.2. Flavonóides.....	18
2.4. Atividades farmacológicas.....	20
2.4.1. Atividade citotóxica.....	20
2.4.2. Atividade antioxidante.....	21
2.4.3. Atividade antibacteriana.....	23
2.5. Variação sazonal.....	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. Materiais.....	28
3.1.1. Coleta e pré-tratamento do material vegetal.....	28
3.1.2. Reagentes.....	29
3.2. Métodos.....	29

3.2.1.	Controle de qualidade do material vegetal.....	30
3.2.1.1.	Determinação de substância extraível por álcool.....	30
3.2.1.2.	Perda por dessecação.....	30
3.2.1.3.	Cinzas totais.....	31
3.2.1.4.	Cinzas insolúveis em ácidos.....	31
3.2.1.5.	Determinação de óleos fixos.....	32
3.2.1.6.	Determinação do índice de espumas.....	33
3.2.1.7.	Determinação do teor de óleos essenciais.....	33
3.2.1.8.	Doseamento de flavonóides.....	34
3.2.2.	Obtenção do óleo essencial.....	35
3.2.2.1.	Análise cromatográfica dos óleos essenciais.....	36
3.2.2.1.1.	Cromatografia gasosa.....	36
3.2.2.1.2.	Cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas.....	36
3.2.2.1.3.	Identificação dos compostos.....	36
3.2.3.	Preparação dos extratos brutos.....	37
3.2.4.	Determinação da atividade antioxidante dos extratos brutos .....	37
3.2.5.	Atividades biológicas.....	38
3.2.5.1.	Ensaio de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> .....	38
3.2.5.2.	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	39
3.2.5.2.1.	Preparação do inóculo.....	39
3.2.5.2.2.	Preparação dos óleos a serem testados.....	39
3.2.5.2.3.	Preparação de solução padrão.....	39
3.2.5.2.4.	Incubação.....	40
3.2.5.2.5.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	40
3.2.6.	Análise estatística.....	40
<b>4.</b>	<b>APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
4.1.	Controle de qualidade de <i>A. satureioides</i> .....	42
4.2.	Teores e caracterização dos óleos essenciais de <i>A. satureioides</i> .....	45
4.3.	Doseamento de flavonóides para <i>A. satureioides</i> .....	50
4.4.	Preparação dos extratos brutos de <i>A. satureioides</i> .....	52
4.5.	Determinação da atividade antioxidante para <i>A. satureioides</i> .....	53
4.6.	Atividades biológicas para <i>A. satureioides</i> .....	56
4.6.1.	Ensaio de toxicidade frente <i>Artemia salina</i> para <i>A. satureioides</i> .....	56
4.6.2.	Avaliação da atividade antimicrobiana para <i>A. satureioides</i> .....	58
4.7.	Controle de qualidade de <i>B. articulata</i> .....	62
4.8.	Teores e caracterização dos óleos essenciais de <i>B. articulata</i> .....	65



4.9. Doseamento de flavonóides para <i>B. articulata</i> .....	70
4.10. Atividades biológicas para <i>B. articulata</i> .....	71
4.10.1. Ensaio de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> para <i>B. articulata</i> ....	71
4.10.2. Avaliação da atividade antimicrobiana para <i>B. articulata</i> .....	74
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>77</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	94

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC.....	6
Figura 2.	Estruturas químicas: (1) Quercetina (3, 5, 7, 3', 4', - pentaidroxiflavona); (2) 3-O-metilquercetina (isoramnetina); e (3) Luteolina (5,7,3',4' - tetraidroxiflavona).....	9
Figura 3.	<i>Baccharis articulata</i> (Lam.) Pers.....	13
Figura 4.	Biossíntese de terpenos (IPP - Isopentilpirofosfato; DMAPP - Dimetil-alil-pirofosfato).....	17
Figura 5.	Biossíntese dos flavonóides.....	18
Figura 6.	<i>Artemia salina</i> visualizada em microscópio.....	21
Figura 7.	Modelo para avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH•.	23
Figura 8.	Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta.....	27
Figura 9.	Diagrama das análises realizadas no material vegetal.....	30
Figura 10.	Aparelho extrator de Soxhlet.....	32
Figura 11.	Aparelho de <i>Clevenger</i> .....	34
Figura 12.	Cromatograma do óleo essencial obtido no verão de <i>A.</i> <i>satureioides</i> .....	47
Figura 13.	Cromatograma do óleo essencial obtido no outono de <i>A.</i> <i>satureioides</i> .....	47
Figura 14.	Cromatograma do óleo essencial obtido na primavera de <i>A.</i> <i>satureioides</i> .....	48
Figura 15.	Cromatograma do óleo essencial obtido no inverno de <i>A.</i> <i>satureioides</i> .....	48
Figura 16.	Espectro de massa típico obtido para o limoneno a partir do óleo essencial de <i>A. satureioides</i> .....	49
Figura 17.	Espectro de massa típico obtido para o $\alpha$ -humuleno a partir do óleo essencial de <i>A. satureioides</i> .....	49
Figura 18.	Espectro de massa típico obtido para o $\alpha$ -pineno a partir do óleo essencial de <i>A. satureioides</i> .....	49
Figura 19.	Espectro de massa típico obtido para o ( <i>E</i> )-cariofileno a partir do óleo essencial de <i>A. satureioides</i> .....	50
Figura 20.	Complexos de compostos flavonoídicos com $AlCl_3/H^+$ . (1) Flavonas e (2) Flavonóis. ....	50
Figura 21.	Teores de flavonóides para <i>A. satureioides</i> nas diferentes estações do ano.....	51

Figura 22.	Atividade antioxidante expressa em concentração eficiente (CE <sub>50</sub> ) método de capacidade de captura <i>in vitro</i> do radical livre DPPH· (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) para <i>A. saturoioides</i> nas diferentes estações do ano.....	53
Figura 23.	Correlação sazonal entre os teores de flavonóides totais (linhas) e atividade antioxidante (barras) obtidos para <i>A. saturoioides</i> .....	55
Figura 24.	Ensaio de toxicidade frente à <i>A. salina</i> , realizada com o extrato bruto de <i>A. saturoioides</i> obtido na primavera (a), verão (b), outono (c) e inverno (d) .....	57
Figura 25.	Espectro de massa típico obtido para o $\alpha$ -pineno a partir do o óleo essencial de <i>B. articulata</i> .....	68
Figura 26.	Teores de flavonóides para <i>B. articulata</i> nas diferentes estações do ano.....	70
Figura 27.	Ensaio de toxicidade frente à <i>A. salina</i> realizado com óleo essencial de <i>B. articulata</i> .....	72
Figura 28.	Ensaio de toxicidade frente à <i>A. salina</i> realizado com a fração hexano (a) diclorometano (b), acetato de etila (c) e extrato bruto metanólico (d) de <i>B. articulata</i> .....	73

**LISTA DE TABELAS**

---

---

Tabela 1.	Classes de flavonóides e algumas características conhecidas.....	19
Tabela 2.	Resultados da análise farmacognóstica de <i>A. satureioides</i> .....	42
Tabela 3.	Constituição química do óleo essencial de <i>A. satureioides</i> obtidos por análise de GC/MS.....	45
Tabela 4.	Teor de flavonóides totais para <i>A. satureioides</i> .....	51
Tabela 5.	Ensaio de toxicidade frente a <i>A. salina</i> , realizada com o extrato bruto de <i>A. satureioides</i> nas diferentes estações.....	56
Tabela 6.	CL <sub>50</sub> referente a ensaio de toxicidade frente à <i>A. salina</i> , realizada com amostras de frações de <i>A. satureioides</i> .....	57
Tabela 7.	Variação sazonal na atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>A. satureioides</i> .....	60
Tabela 8.	Resultados da análise farmacognóstica de <i>B. articulata</i> .....	62
Tabela 9.	Teores do óleo essencial das partes aéreas de <i>B. articulata</i> .....	65
Tabela 10.	Constituintes químicos do óleo essencial de <i>B. articulata</i> obtidos por análise de GC/MS.....	67
Tabela 11.	Teor de flavonóides para <i>B. articulata</i> .....	70
Tabela 12.	Ensaio de toxicidade frente a <i>A. salina</i> , realizada com óleo de <i>B. articulata</i> e controles positivo e negativo.....	71
Tabela 13.	Ensaio de toxicidade frente à <i>A. salina</i> , realizada com o extrato bruto metanólico e as frações hexano, diclorometano e acetato de etila de <i>B. articulata</i> .....	72
Tabela 14.	CL <sub>50</sub> referente a ensaio de toxicidade frente à <i>A. salina</i> , realizada com amostras de frações de <i>B. articulata</i> .....	73
Tabela 15.	Variação sazonal na atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>B. articulata</i> .....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

---

---

1. BHA, butilhidroxitolueno.
2. BHT, butilhidroxianisol.
3. CE<sub>50</sub>, concentração capaz de inibir 50% dos radicais livres *in vitro*.
4. CIM, Concentração Inibitória Mínima.
5. CL<sub>50</sub>, concentração letal para 50% dos animais vivos.
6. DPPH, 1,1-difenil-picrilidrazila.
7. F. Bras, Farmacopéia Brasileira.
8. g, gramas.
9. GC, cromatografia a gás, do inglês, *Gas Chromatography*.
10. GC/MS, cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas, do inglês, *Gas Chromatography Mass Spectrometry*.
11. INMET, Instituto Nacional de Meteorologia.
12. mL, mililitro.
13. mg, miligramas.
14. nm, nanômetro.
15. NCCLS, comitê nacional de padronização para laboratórios clínicos, do inglês, *National Committee for Clinical Laboratory Standards*.
16. p/V, relação peso/volume.
17. ROS, espécies reativas de oxigênio, do inglês *Reactive Oxygen Species*.
18. SMDB, Santa Maria Departamento de botânica.
19. SR, Solução Reagente.
20. TRAP, potencial reativo antioxidante total, do inglês, *Total Reactive Antioxidant Potential*.
21. TBARS, espécies reativas do ácido barbitúrico, do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Species*.
22. UFC, Unidade Formadora de Colônia.
23. UV, Ultravioleta.
24. V/V = relação volume/volume.
25. °C, graus Celsius.
26. µL, microlitros.

## RESUMO

---

Neste estudo investigou-se o teor e caracterização dos óleos essenciais, atividade antioxidante, toxicidade frente a *Artemia salina* e atividade antimicrobiana, das partes aéreas da *Achyroclines satureoides* e *Baccharis articulata* de acordo com a variação sazonal. Os resultados demonstraram elevados teores de óleos essenciais, obtidos por hidrodestilação, na primavera (0,10%; m/m) e inverno (0,43%; m/m) para *A. satureoides* e *B. articulata*, respectivamente. Após análise dos óleos essenciais por GC/MS, os constituintes majoritários identificados em todas as estações foram  $\alpha$ -pineno (28,5 a 41,7%) e (*E*)-cariofileno (29,8 a 38,5%) para *A. satureoides* e para *B. articulata* foram  $\beta$ -pineno (24,0 a 32,1%), limoneno (8,45 a 11,2%), espatulenol (9,31 a 10,9%) e (*E*)-cariofileno (4,61 a 7,80%). Uma variação sazonal significativa ( $p < 0,05$ ) no teor de flavonóides totais, expressos em quercetina e atividade antioxidante avaliada através do método de capacidade de captura *in vitro* do radical livre DPPH $\cdot$  (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) pode ser observada em ambas espécies estudadas. Em relação ao ensaio de toxicidade, pode-se verificar que as menores CL<sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram obtidas na primavera, onde os teores de flavonóides totais apresentaram-se elevados para *A. satureoides*, enquanto que o óleo essencial e o extrato bruto metanólico, obtidos das partes aéreas de *B. articulata*, foram considerados atóxicos. A atividade antimicrobiana avaliada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) apresentou variação significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com a estação. Os resultados obtidos no outono e inverno foram significativos em relação as demais estações para *A. satureoides*, com CIM de 37,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (outono) e 38,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (inverno) frente a cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC11228; 37,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (outono) e 76,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (inverno) frente a cepa de *Bacillus cereus* ATCC11778; e 37,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (outono) e 76,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (inverno) frente a cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883. Para *B. articulata*, o inverno (CIM 312  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi a estação que apresentou atividade significativa frente a cepa de *Bacillus cereus* ATCC117, quando o óleo essencial também apresentou-se efetivo na concentração de 78,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  frente a cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883.

**Palavras chaves:** variação sazonal; *A. satureoides*; *B. articulata*

## ABSTRACT

---

---

In this study seasonal variation on oil yields and composition, antioxidants activities, toxicity from *Artemia salina* and antimicrobial activities, from aerial parts of *Achyroclines satureioides* and *Baccharis articulata* were investigated. Maximum amount of the hydro-distilled essential oils in spring (0.10%; m/m) and winter (0.43%; m/m) were observed to *A. satureioides* and *B. articulata*, respective. Essential oils were analyzed by GC/MS. The compounds  $\alpha$ -pinene (28.5 a 41.7%) and (*E*)-caryophyllene (29.8 a 38.5) were the most abundant component in the all season for *A. satureioides*. The  $\beta$ -pinene (23.1% a 32.1%), limonene (8.45 a 11.2%), espatulenol (9.31 a 10.9%) and (*E*)-caryophyllene (4.61 a 7.80%) were the most abundant component for *B. articulata*. For both species a variation was observed in the total flavonoids content, express in quercetin and antioxidant activity as measurements by DPPH $\cdot$  (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical-scavenging ability. Regarding to toxicity, the minor CL<sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) was observed in the spring, where the major total flavonoids contents to *A. satureioides*. To *B. articulata*, the essential oil and raw methanolic extract were considered non-toxic. Antimicrobial activity measurement of determination of minimum inhibitory concentration (MIC) varied significantly ( $p < 0,05$ ) with different seasons. Autumn and winter were more significant than other season (MIC 37.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in autumn and 38.4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in winter) against bacterial strains *Staphylococcus epidermidis* ATCC11228; 37.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (autumn) and 76.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (winter) against bacterial strains *Bacillus cereus* ATCC11778 and 37.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (autumn) and 76.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (winter) against bacterial strains *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 to *A. satureioides*. For *B. articulata*, the major antimicrobial activity occurred in winter (312  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) against bacterial strains *Bacillus cereus* ATCC117, when essential oils showed be effective against bacterial strains *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 in the concentration of 78.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Keywords:** seasonal variation; *A. satureioides*; *B. articulata*

# 1. INTRODUÇÃO

O uso empírico de plantas medicinais, com fins curativos, trata-se de uma prática bastante comum, principalmente na faixa populacional de baixo poder aquisitivo, onde muitas vezes, há dificuldade de acesso aos tratamentos alopáticos.<sup>4, 27, 95, 111</sup>. Esta prática contribui de forma significativa para divulgar as potencialidades terapêuticas dos vegetais, sendo prescritos com freqüência, mesmo que a grande parte das plantas utilizadas popularmente não tenha ainda seus constituintes químicos definidos<sup>117</sup>.

O Brasil, neste quesito, é privilegiado, pois apresenta um variado número de espécies em sua flora, com uma enorme coleção de plantas, sendo que no Rio Grande do Sul, vem ocorrendo o desenvolvimento de trabalhos visando o resgate do conhecimento popular do uso das plantas medicinais<sup>111</sup>. Tal fato é comprovado pela evidencia de que hoje cerca de 25% dos fármacos prescritos no mundo são obtidos direta ou indiretamente de plantas. Além disso, cerca de 49% dos fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2002 foram obtidos a partir de produtos naturais, ou análogos semi-sintéticos ou ainda compostos sintéticos baseados em produtos naturais<sup>100</sup>.

Dentro deste contexto, pode-se destacar duas plantas pertencentes à família Asteraceae amplamente utilizadas na medicina tradicional. A primeira refere-se a *Achyroclines satureioides* (Lam.) DC. (*A. satureioides*), nativa da América do Sul, conhecida popularmente como macela<sup>47</sup> e que possui amplo espectro de propriedades farmacológicas, medicinais e terapêuticas<sup>153</sup>. A segunda trata-se da *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (*B. articulata*), conhecida popularmente como carqueja, sendo extensivamente usada no tratamento ou prevenção de diversas

<sup>4</sup> Albuquerque, H. N. *et al.* Rev. Biol. Ciênc. Terra. 4 (2004) 1-9.

<sup>27</sup> Brasil, Ministério da Saúde. Brasília, Série B. Textos Básicos de Saúde, 2006.

<sup>47</sup> Cosentino, M. *et al.* J. Ethnopharmacol. 116 (2008) 501-507.

<sup>95</sup> Jacoby, C. *et al.* Rev. Ciênc. Ex. Nat. 4 (2002) 79-89.

<sup>100</sup> Koehn, F.E.; Carter, G.T. Nat. Rev. Drug Discov. 4 (2005) 206-220.

<sup>111</sup> Lima, S. M. G.; Lima, A. F.; Donazzolo, J. Rev. Bras. Agroecol. 2 (2007) 256-259.

<sup>117</sup> Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Jr., V. F. Quím. Nova. 25 (2002) 429-438.

<sup>153</sup> Rivera, F.; Gervazb, E.; Serec, C.; Dajas, F. J. Ethnopharmacol. 95 (2004) 359-362.



patologias <sup>194</sup>.

Tais atividades biológicas atribuídas a estas plantas estão correlacionadas a presença de compostos químicos, particularmente metabólitos secundários, biossintetizados pelas mesmas, sendo que a presença destes compostos pode auxiliar no prognóstico de alguns usos tradicionais <sup>150</sup>.

Porém, além de estudos voltados à elucidação destes constituintes químicos, os fatores expostos, tais como composição do solo, índice pluviométrico, altitude, radiação UV, sazonalidade, temperatura, ritmo circadiano devem ser monitorados, pois podem afetar o conteúdo final de metabólitos secundários em plantas medicinais. Por exemplo, a estação e/ou o número de horas que a planta recebe de radiação pode influenciar a fitoquímica das plantas, sendo que alguns compostos podem estar acumulados em períodos particulares respondendo a alterações ambientais <sup>80</sup>. Além disso, plantas coletadas em diferentes períodos do ano podem conter novos compostos possíveis com uma bioatividade diferente <sup>62</sup>.

Estas variações na composição química influenciam diretamente no controle de qualidade das plantas usadas medicinalmente e, conseqüentemente no valor terapêutico podendo ser observadas através da análise sazonal, ramo da farmacognosia ainda a ser estudada, mas que mostra-se de indiscutível importância e aplicabilidade, reduzindo custos e maximizando produção e eficácia das drogas vegetais <sup>40</sup>.

Sendo assim, neste estudo, investigou-se a influência da variação sazonal sobre o teor e caracterização dos óleos essenciais, bem como as atividades antimicrobianas e antioxidantes, bem como toxicidade frente a *Artemia salina* (*A. salina*) para *A. satureioides* e *B. articulata*.

---

<sup>40</sup> Chicourel, E. L. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 7/8 (1997) 59-66.

<sup>62</sup> Eloff, J. N. J. Ethnopharmacol. 67 (1999) 355-360.

<sup>80</sup> Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. L. Quím. Nova. 30 (2007) 375-381.

<sup>150</sup> Rasoanaivo, P.; Ratsimamanga-Urverg, S. Napreca, Madagascar, 1993.

<sup>194</sup> Verdi, L. G.; Brighente, I. M. C.; Pizzolatti, M. G. Quím. Nova. 28 (2005) 85-94.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

*A revisão bibliográfica aqui apresentada encontra-se subdividida em cinco partes, compreendendo os principais assuntos abordados neste trabalho. Na primeira parte, procurou-se demonstrar a importância das plantas medicinais como benefício na prevenção e tratamento de certas enfermidades. A segunda parte refere-se às características das plantas em estudo, destacando-se usos populares, composição química e atividades biológicas comprovadas das mesmas, bem como dados toxicológicos, quando disponíveis. A terceira parte aborda, de maneira mais detalhada, os principais metabólitos secundários encontrados nas plantas em estudo e a quarta parte as atividades farmacológicas que serão tratadas neste estudo. A quinta parte destaca a influência da variação sazonal sobre a composição dos metabólitos secundários, bem como no controle de qualidade de plantas empregadas para fins terapêuticos.*

## 2.1 Plantas medicinais

Segundo Simões *et al.*<sup>176</sup> plantas medicinais podem ser definidas como todos os vegetais empregados com fins terapêuticos, baseado no conhecimento popular e/ou científico, independentemente da forma em que são empregadas.

O uso de preparações à base de plantas medicinais, tanto a base de chás ou emplastos, é tão antigo quanto à civilização e, por muito tempo, plantas e extratos vegetais constituíram o único arsenal terapêutico<sup>151, 176</sup>. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de preparados à base de plantas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais<sup>195</sup>, sendo que inúmeros relatos literários elucidam os benefícios terapêuticos das fontes naturais, especialmente das plantas<sup>137</sup>.

Em função disso, todo um saber empírico sobre quais plantas deveriam ser utilizadas para determinadas enfermidades, partes a serem empregadas (raiz, folhas, flores), modo de preparo e época de coleta foram assim acumulados, primeiro pela transmissão destes conhecimentos verbalmente e, logo que surgiu a escrita, tornado permanente pela produção de manuscritos que o perpetuassem<sup>50</sup>.

Entretanto, com o desenvolvimento da química orgânica, os medicamentos de origem sintética foram se tornando prioritários nos tratamentos das enfermidades e os recursos oriundos de fontes naturais passaram a serem vistos como alternativas terapêuticas relacionadas às populações de menor poder aquisitivo ou a crenças religiosas e culturais<sup>151</sup>. No entanto, as plantas continuam sendo um importante recurso terapêutico contribuindo significativamente, tanto como fonte de diferentes classes químicas as quais originarão fármacos, de distintas categorias terapêuticas ou como matéria-prima direta no emprego de cosméticos, alimentos ou no tratamento de enfermidades<sup>147</sup>.

Neste contexto, o Brasil que possui a maior biodiversidade do mundo,

<sup>50</sup> Cunha, C. P.; Silva, A. P. Fundação Calouste Gerbenkian, 2004, 310p.

<sup>137</sup> Oliveira, A. H. Berretta, A. A. Rev. Eletr. Farm. 4 (2007) 169-174.

<sup>147</sup> Pinto, A. C. *et al.* Quím. Nova. 25 (2002) 45-61.

<sup>151</sup> Rates, S. M. K. Rev. Bras. Farmacogn. 11 (2001) 57-69.

<sup>176</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.

<sup>195</sup> Viegas Jr, C.; Bolzani, V. S. Quím. Nova. 29 (2006) 326-337.

comportando um grande patrimônio genético, vem adquirindo um valor econômico-estratégico inestimável, especialmente na área de pesquisa de novos fármacos<sup>31, 49</sup>. E, apesar de nosso país apresentar uma ampla biodiversidade, apenas uma pequena fração das plantas nativas foram devidamente estudadas<sup>6</sup>. Acredita-se que apenas 10%, de aproximadamente 250.000 espécies de plantas existentes na flora brasileira, têm sido investigadas química e farmacologicamente, e destas, somente uma das partes, como folha, raiz ou caule, ou ainda, somente um tipo de preparação como óleo essencial ou extrato foram estudados na maioria das plantas<sup>57, 158</sup>.

Nesta perspectiva, plantas medicinais que se destacam pela amplo emprego na medicina popular pode-se citar *A. satureioides* e *B. Articulata*, ambas da família Arteraceae, grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas.

Contudo, apesar de serem plantas amplamente difundidas, necessitam de maior investigação científica para comprovação de suas propriedades química e farmacológica de modo a garantir qualidade, eficácia e segurança de uso.

---

<sup>6</sup> Almeida, M. M. B. *et al.* Cienc. Tecnol. Alimen. 22 (2002) 94-97.

<sup>31</sup> Calixto, J. B. Ciência e Cultura. 55 (2003) 37-39.

<sup>49</sup> Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. J. Nat. Prod. 60 (1997) 52-60.

<sup>57</sup> Duarte, M. C. T. Universidade Estadual de Campinas. 7 (2006) 1-7.

<sup>158</sup> Ruffa, M. J. *et al.* J. Ethnopharmacol. 79 (2002) 335-339.

## 2.2 Família Asteraceae

A família Asteraceae refere-se ao grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies<sup>91</sup>. Cerca de 98% dos gêneros desta família são constituídos por plantas de pequeno porte, sendo encontrados em todos os tipos de *habitat*, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul<sup>96</sup>.

### 2.2.1 *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

Dentre as plantas empregadas intensamente na medicina popular na região sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e Argentina destaca-se a *A. satureioides*<sup>11, 47, 126, 153, 177</sup>.



**Figura 1.** *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.

- 
- <sup>11</sup> Arredondo, M. F. *et al.* J. Ethnopharmacol. 91 (2004) 13-20.  
<sup>47</sup> Cosentino, M. *et al.* J. Ethnopharmacol. 116 (2008) 501-507.  
<sup>91</sup> Heywood, V. H. Oxford University Press: New York, 1993.  
<sup>96</sup> Joly, A. B. São Paulo: Cia. Editora Nacional, 1967.  
<sup>126</sup> Ming, L. C. Universidade Estadual Paulista, 1998.  
<sup>153</sup> Rivera, F. *et al.* J. Ethnopharmacol. 95 (2004) 359-362.  
<sup>177</sup> Simões, C.M. *et al.* J. Ethnopharmacol. 22 (1988) 281-293.

Para esta planta, as denominações populares no Brasil variam para *A. satureioides*, dependendo da região onde são encontradas, incluindo, macela, macelinha, carrapichinho-de-agulha, camomila-nacional, marcela-do-campo, alecrim de parede, marcela-galega, marcela-da-terra, macela-amarela, macela-do-sertão, chá-de-lagoa, losna-do-mato<sup>5, 44, 113, 140, 145</sup>, marcela-fêmea e marcela-macho<sup>171</sup>.

### 2.2.1.1 Descrição botânica

*A. satureioides* é uma planta anual, aromática, de porte herbáceo, monóico, ramificada, de até 1,5 m de altura, caule cilíndrico coberto de pilosidade branca, cor amarelo ouro e odor aromático e agradável, com sabor levemente amargo<sup>66</sup>. Possui folhas externas inteiras, sésseis, lineares a lanceoladas, de até 12,0 cm de comprimento por 1,8 cm de largura. Os capítulos são formados por dois tipos de flores, reunidas em panícula corimbosa. As flores são amarelo-douradas, as centrais hermafroditas, de corola tubulosa, em número de uma a duas e as flores marginais, quatro ou cinco, femininas, de corola filiforme. Os frutos são do tipo aquênio indeiscente, 0,7 a 0,8 mm de comprimento, obovóide, glabro, pardo, papus alvo, uniseriado, com cerca de 4,0 mm de comprimento e 20 cerdas<sup>44, 77, 174</sup>.

### 2.2.1.2 Usos populares

Na medicina popular, *A. satureioides* é comumente utilizada para os mais variados tratamentos, tais como problemas digestivos, hepáticos, eupépticos, carminativos, antiespasmódicos e antidiarréicos, também como diurético, sedativo, antiinflamatório, antiarterosclerótico, hipoglicemiante, fortificante, emagrecedor, bem como nas desordens do sistema nervoso, na letargia, dores de cabeça e dente febre, gripe, ansiedade, epilepsia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, no

<sup>5</sup> Almeida, E. R. São Paulo: Hemus, 1993, p. 341.

<sup>44</sup> Corrêa Junior, C.; Ming, L. C.; Scheffer, M. C. 2ed. FUNEP, Jaboticaba, 1994.

<sup>66</sup> Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

<sup>77</sup> Giangualani, R. N. Darwiniana. 20 (1976) 549-576

<sup>113</sup> Lorenzi, H. 2ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 1991, p. 440.

<sup>140</sup> Oliveira, F.; Akisue, M. K.; Akisue, G. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.

<sup>145</sup> Panizza, S. 26ed. São Paulo: Editora Ibrasa, 2000.

<sup>171</sup> Silva, F. G. *et al.* J. Braz. Soc. 18 (2007) 990-997

<sup>174</sup> Simões, C. M. O. *et al.* Porto Alegre: UFRGS, 1989.

tratamento do *Pediculus capitis*, entre outros usos <sup>26, 55, 63, 158, 171, 172, 193</sup>.

Na grande maioria das indicações *A. saturoioides* é utilizada sob a forma de chás e/ou infusões de suas inflorescências <sup>148, 175</sup>.

### 2.2.1.3 Constituintes químicos

Devido a sua ampla utilização na medicina popular, *A. saturoioides* vem sendo amplamente estudada do ponto de vista químico. Dentre os metabólitos secundários, destacam-se os flavonóides <sup>70, 82, 97</sup>, terpenóides, carotenóides, cumarinas, esteróides e os óleos essenciais <sup>82, 97</sup>, componentes derivados de fenilpirona <sup>172</sup>, componentes derivados do tiofeno <sup>116</sup> e ácidos caféico, clorogênico e isoclorogênico <sup>53, 97</sup>. Dentre os flavonóides presentes no extrato etanólico das inflorescências, destacam-se a quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina <sup>70</sup> (Figura 2).

De acordo com Gillij *et al.* <sup>78</sup> o terpineno é o constituinte majoritário do óleo essencial de *A. saturoioides*, seguido do limoneno e do  $\alpha$ -pineno. O alto teor de  $\alpha$  e  $\beta$  pinenos coloca a espécie como uma fonte potencial destas substâncias importantes para a síntese de medicamentos e cosméticos, além de seu largo uso na síntese de produtos utilizados na produção de compostos aromáticos <sup>19</sup>.

<sup>19</sup> Bauer, L. Rev. Bras. Farm. 60 (1979) 97-100.

<sup>26</sup> Borges, D. B. Dissertação (Mestrado em Farmácia) UFSC, Florianópolis-SC, 2005.

<sup>53</sup> Desmarchelier, C.; Coussio, J. Ciccía, G. Braz. J. Med. Biol. Res. 31 (1998) 1163-1170.

<sup>55</sup> Dickel, M. L.; Rates, S. M.; Ritter, M. R. J. Ethnopharmacol. 109 (2007) 60-71.

<sup>63</sup> Fachinetto, J. M. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 17 (2007) 49-54.

<sup>70</sup> Ferraro, G.E.; Norbedo, C.; Coussio, J.D. Phytochem. 20 (1981) 2053-2054.

<sup>78</sup> Gillij, Y. G.; Gleiser, R. M.; Zygadlo, J. A. Biores. Technol. 99 (2008) 2507-2515.

<sup>82</sup> Gugliucci, A.; Menini, T. Life Science 71 (2002) 693-705.

<sup>97</sup> Kadarian, C. *et al.* Pharmacol. Res. 45 (2002) 57-61.

<sup>116</sup> Macedo, M. E. *et al.* Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 92 (1997) 565-570.

<sup>148</sup> Pio Corrêa, M. Minist. Agric. Instit. Bras. Desenv. Flor. 1974.

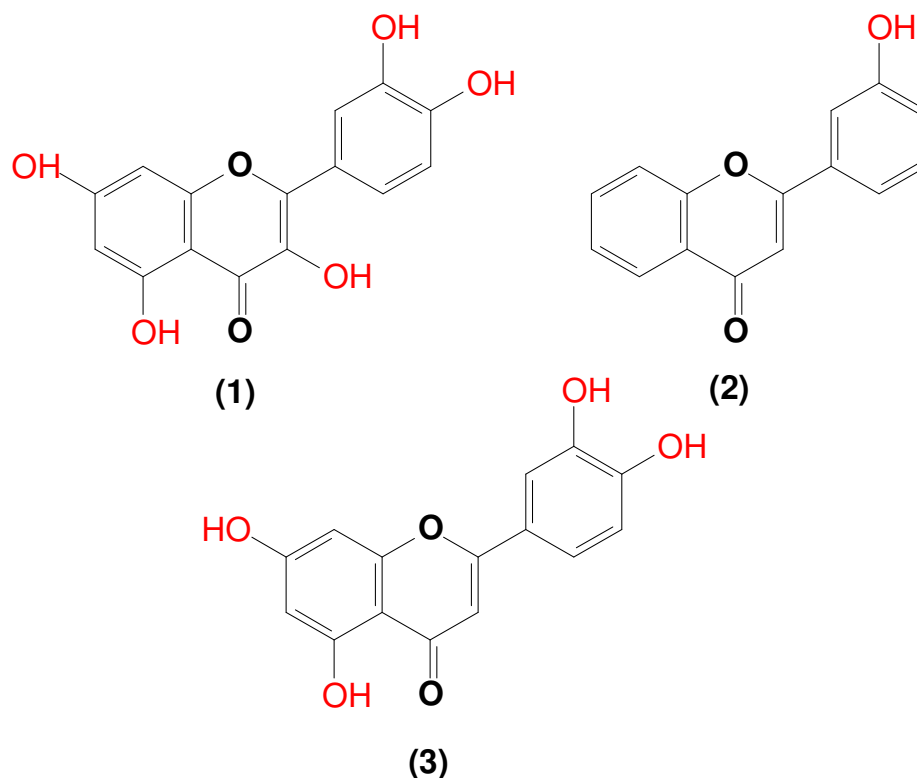
<sup>158</sup> Ruffa, M. J. *et al.* J. Ethnopharmacol. 79 (2002) 335-339.

<sup>171</sup> Silva, F. G. *et al.* J. Braz. Soc. 18 (2007) 990-997.

<sup>172</sup> Simões, C. M. Fitoterap. 59 (1988) 419-421.

<sup>175</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 5ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998.

<sup>193</sup> Vendruscolo, G. S.; Rates, S. M. K.; Mentz, L. A. Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2005) 361-372.



**Figura 2.** Estruturas químicas: (1) Quercetina (3, 5, 7, 3', 4', - pentaidroxiflavona); (2) 3 - O - metilquercetina (isoramnetina); e (3) Luteolina (5, 7, 3', 4'-tetraidroxiflavona). Fonte: Silva *et al.*<sup>169</sup>

#### 2.2.1.4 Atividades biológicas comprovadas

Segundo Rivera *et al.*<sup>153</sup> *A. saturoioides* possui um amplo espectro de atividades farmacológicas e, pesquisas têm demonstrado o uso do óleo essencial e extrato em diversas enfermidades. Nos estudos realizados, foram comprovadas farmacologicamente as atividades antiespasmódica, sedativa<sup>177</sup>, antimicrobiana, imunoestimuladora de linfócitos T CD8<sup>9, 14, 32</sup>, citoprotetora<sup>11, 53, 82, 97</sup>, moduladora da lipoproteína de baixa densidade (LDL)<sup>82</sup>, citotóxica contra carcinoma hepatocelular

<sup>9</sup> Anesini, C.; Perez, C. J. *Ethnopharmacol.* 39 (1993) 119–128.

<sup>11</sup> Arredondo, M. F. *et al.* *J. Ethnopharmacol.* 91 (2004) 13-20.

<sup>14</sup> Asolini, F. C.; Tedesco, A. M.; Carpes, S. T. *Braz. J. Food Technol.* 9 (2006) 209-215.

<sup>32</sup> Calvo, D. *et al.* *Rev. Latinoamerican. Microbiol.* 48 (2006) 247-255.

<sup>53</sup> Desmarchelier, C.; Coussio, J. Ciccía, G. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31 (1998) 1163-1170.

<sup>82</sup> Gugliucci, A.; Menini, T. *Life Science* 71 (2002) 693-705.

<sup>97</sup> Kadarian, C. *et al.* *Pharmacol. Res.* 45 (2002) 57-61.

<sup>153</sup> Rivera, F.; Gervazb, E.; Serec, C.; Dajas, F. J. *Ethnopharmacol.* 95 (2004) 359-362.

<sup>169</sup> Silva, T.M.S. *et al.* *Quím. Nova.* 26 (2003) 517-522.

<sup>177</sup> Simões, C.M. *et al.* *J. Ethnopharmacol.* 22 (1988) 281-293.



humano<sup>149, 158</sup>, hepatoprotetor e colerética<sup>97</sup>, hipoglicemiante<sup>36, 82</sup>, anti-hemética, antiinflamatória, analgésica<sup>172</sup>, antiviral<sup>21, 155, 200</sup>, antioxidante<sup>11, 53, 82, 149</sup>, relaxante da musculatura lisa<sup>177</sup>, inseticida e tripanocida<sup>157</sup> e fotoprotetora após aplicação tópica<sup>128</sup>.

Além disso, análises de citotoxicidade dos extratos aquosos das inflorescências recém coletadas e após armazenamento de 30 meses de *A. satureioides*, utilizando o sistema teste vegetal de *Allium cepa*, demonstraram que os extratos apresentam potencial terapêutico para inibição do ciclo celular, indicando a atividade anti-proliferativa e citotóxica desta espécie<sup>63</sup>. Estudos *in vitro* realizados mostraram que extratos aquosos das inflorescências desta planta inibiram em 67% o desenvolvimento de células cancerosas<sup>10</sup>.

*A. satureioides* tem demonstrado atividade mutagênica *in vitro* contra *Salmonella* e *Escherichia coli*, atribuída principalmente à quercetina, o que pode explicar o seu uso popular em diarréias e infecções intestinais<sup>149, 172, 186</sup>. A capacidade inibitória significativa contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* do extrato etanólico das sementes foi constatada cerca de 20 anos atrás<sup>122</sup>. A pesquisa pré-clínica realizada com o intuito de avaliar farmacologicamente o extrato aquoso de *A. satureioides* confirmou a ação antiinflamatória, verificada pelo aumento da permeabilidade vascular<sup>27</sup>. O estudo realizado com a infusão das inflorescências da *A. satureioides* demonstrou que o mesmo pode exercer efeitos imunomoduladores severos com seu uso tradicional<sup>47, 52</sup>.

<sup>10</sup> Arisawa, M. Nat. Med. 48 (1984) 338-347.

<sup>11</sup> Arredondo, M. F. et al. J. Ethnopharmacol. 91 (2004) 13-20.

<sup>21</sup> Bettega, J.M. et al. Phytother. Res. 18 (2004) 819-823.

<sup>27</sup> Brasil, Brasília. Textos Básicos de Saúde, 2006.

<sup>36</sup> Carney, J.R. et al. J. Nat. Prod. 65 (2002) 203-205.

<sup>47</sup> Cosentino, M. et al. J. Ethnopharmacol. 116 (2008) 501-507.

<sup>52</sup> De Souza, K.C.; Bassani, V.L.; Schapoval, E.E. Phytomedic. 14 (2007) 102-108.

<sup>53</sup> Desmarchelier, C.; Coussio, J. Ciccía, G. Braz. J. Med. Biol. Res. 31 (1998) 1163-1170.

<sup>63</sup> Fachineto, J. M. et al. Rev. Bras. Farmacogn. 17 (2007) 49-54.

<sup>82</sup> Gugliucci, A.; Menini, T. Life Science 71 (2002) 693-705.

<sup>97</sup> Kadarian, C. et al. Pharmacol. Res. 45 (2002) 57-61.

<sup>122</sup> Martins, D. G. et al. Resumos. São Paulo: EPM, n.29, 1988

<sup>128</sup> Morquio, A.; Rivera-Megret, F.; Dajas, F. Phytother. Res. 19 (2005) 486-490.

<sup>149</sup> Polydoro, M. et al. Life Scienc. 74 (2004) 2815-2826.

<sup>155</sup> Robinson, W. E. et al. Proceed. Nat. Academ. Scienc., USA. 93 (1996) 6326-6331.

<sup>157</sup> Rojas De Arias, A. et al. J. Ethnopharmacol. 45 (1995) 35-41.

<sup>158</sup> Ruffa, M. J. et al. J. Ethnopharmacol. 79 (2002) 335-339.

<sup>172</sup> Simões, C. M. Antiinflammatory Fitoter. 59 (1988) 419-421

<sup>177</sup> Simões, C.M. et al. J. Ethnopharmacol. 22 (1988) 281-293.

<sup>186</sup> Souza, K. C. B. et al. J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 771-777.

<sup>200</sup> Zanon, S.M. et al. Rev. Latinoamerican. Microbiol. 41 (1999) 59-62.

### 2.2.1.5 Toxicologia

*A. saturoioides* tem sido objeto de estudos farmacológicos e clínicos desde os anos 80 visando a sua validação. Em experiências com animais, têm sido comprovadas suas propriedades analgésica, antiinflamatória, relaxante muscular externo e interno (músculos gastrintestinais), sem nenhum efeito colateral tóxico<sup>172, 177</sup>.

Gutkind *et al.*<sup>83</sup>, Simões<sup>173</sup> e Sonaglio<sup>183</sup>, afirmam que os extratos aquosos a frio, a quente e etanólico, não causaram mudanças comportamentais ou morte em animais de laboratório após 48 horas de administração endovenosa. O macerado hidroalcoólico não apresentou toxicidade mesmo após ter sido submetido à degradação térmica. Vargas *et al.*<sup>191</sup>, não encontrou atividade mutagênica direta dos extratos brutos de *A. saturoioides*. O mesmo autor detectou mutagenicidade positiva em microorganismos na presença de ativação microsomal.

Rivera *et al.*<sup>153</sup> testaram a toxicidade aguda (níveis de doses de 30-300 mg kg<sup>-1</sup>) do extrato aquoso da *A. saturoioides*, administrados intraperitonealmente e oralmente em ratos. O extrato apresentou baixa toxicidade quando administrado intraperitonealmente e nenhuma toxicidade quando administrado oralmente. A CL<sub>50</sub> (concentração letal para 50% dos animais vivos) dos extratos aquosos demonstrou ser maior que 5 g kg<sup>-1</sup> quando administrado por via gástrica.

### 2.2.2 *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.

O gênero *Baccharis* é caracterizado botanicamente por apresentar espécies na forma de arbustos ou como pequenas árvores<sup>79</sup>. Está representado por mais de 500 espécies, distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas<sup>119</sup>. Como recentemente revisado por

<sup>79</sup> Giuliano, D.A. Darwiniana. 39 (2001) 131-154.

<sup>83</sup> Gutkind, G.O. *et al.* Fitoter. 5 (1981) 213-218.

<sup>119</sup> Malagarriga Herras, R. D. P. Mem. Soc. Cienc. Nat. 23 (1976) 129-224.

<sup>153</sup> Rivera, F. *et al.* J. Ethnopharmacol. 95 (2004) 359-362.

<sup>172</sup> Simões, C. M. Fitoter. 59 (1988) 419-421.

<sup>173</sup> Simões, C. M. O. Dissertação. (Mestrado em Farmácia) UFRGS, Porto Alegre-RS, 1984.

<sup>177</sup> Simões, C.M. *et al.* J. Ethnopharmacol. 22 (1988) 281-293.

<sup>183</sup> Sonaglio, D. Dissertação (Mestrado em Farmácia) UFRGS, Porto Alegre, 1987.

<sup>191</sup> Vargas, V. M. F. *et al.* Mutation Res. 240 (1990) 13-18.

Verdi *et al.*<sup>194</sup> no Brasil estão descritas, pelo menos, 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte localizada na região sudeste do país, utilizadas na forma de chás na medicina popular para controle e/ou tratamento de várias doenças, apresentando elevado valor sócio-econômico<sup>45, 71, 89, 101, 194</sup>.

De modo geral, as espécies amplamente reconhecidas na medicina alternativa e mais estudadas parecem ser a *B. trimera* seguida de *B. articulata*, espécies aladas usadas indistintamente na medicina popular como diurética e estomáquica<sup>29, 30, 46</sup>.

A *B. articulata* (Figura 3) é nativa nos campos do sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e norte e centro da Argentina. Apresenta como nomes populares carqueja-doce, carquejinha, carqueja-do-morro, carqueija, carqueja-miúda ou vassoura<sup>7, 18, 45, 129, 170</sup>. Esta espécie também pode ser encontrada com as seguintes sinónímias *Conyza articulata* (Lam.), *Molina articulata* (Lam.) Less<sup>180</sup>.

<sup>7</sup> Alonso, J. R. Buenos Aires: Isis, 1998.

<sup>18</sup> Barroso, G. M. Rodriguésia. 28 (1976)1-273.

<sup>29</sup> Budel, J. M. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 14 (2004) 41-48.

<sup>30</sup> Budel, J. M. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2005) 268-271.

<sup>45</sup> Corrêa, M. P. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, vol. 1-6.

<sup>46</sup> Cortadi, A. *et al.* Pharm. Biol. 37 (1999) 357-365.

<sup>71</sup> Franco, I. J. 5ed. Imprimax: Chapecó, 1995.

<sup>89</sup> He, K. *et al.* Phytochem. 41(1996) 1123-1127.

<sup>101</sup> Korb, C. V. 48ed. Grafit: Francisco Beltrão, 1995.

<sup>129</sup> Mors, W. B.; Izzini, C. T.; Pereira, N. A. Michigan: Reference Publications, 2000.

<sup>170</sup> Silva Júnior, A. A. Itajaí: Epagri, 1997. CD-ROOM.

<sup>180</sup> Siqueira, N. C. S.; Alice, C. B.; Thiesen, F. V. Cad. Farm. 4 (1988) 63-76.

<sup>194</sup> Verdi, L. G.; Brighente, I. M. C.; Pizzolatti, M. G. Quím. Nova. 28 (2005) 85-94.



**Figura 3.** *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.

### 2.2.2.1 Descrição botânica

*B. articulata* é encontrada como um arbusto pequeno, ramificado, muito variável na altura com ramos sem folhas, dialados, com alas interrompidas alternadamente, de forma desigual, estreita ou larga, planas e levemente onduladas, verdes, às vezes brilhantes, membranosas a levemente coriáceas<sup>174</sup>. A presença dos ramos da *B. articulata* com alas articulatas e extremidades arredondadas são características morfológicas que as diferencia de *B. trimera*. Além disso, microscopicamente, é verificada a presença de muitos cristais de oxalato de cálcio. Na caracterização da secção transversal das alas verifica-se, nas depressões epidérmicas, a inserção de pêlos glandulares, unicelular e com 2 ou 3 células sobrepostas e aplastadas contendo essência<sup>180</sup>.

### 2.2.2.2 Usos populares

No Rio Grande do Sul, é utilizada em substituição a *B. trimera*, principalmente na forma de chás com indicações para males do estômago, fígado, anemias,

<sup>174</sup> Simões, C. M. O. *et al.* Porto Alegre: UFRGS, 1989. 176 p.

<sup>180</sup> Siqueira, N. C. S.; Alice, C. B.; Thiesen, F. V. *Cad. Farm.* 4 (1988) 63-76.

inflamações, diabetes, doenças na próstata, úlceras, anti-helmíntico, afrodisíaco, para o processo de desintoxicação do organismo <sup>44, 101</sup>, febrífuga, diurética, hepatoprotetora, antianêmica e colagoga e, para uso externo, como anti-séptica e secante de úlceras <sup>7, 45, 170</sup>. Na Argentina, acredita-se que *B. articulata* apresenta atividade no tratamento da impotência sexual masculina e da esterilidade feminina. No Paraguai é usada como anti-hipertensiva <sup>188</sup>. Além de medicinal, vem sendo utilizada também na fabricação de cerveja como substituinte do lúpulo <sup>18</sup>.

### 2.2.2.3 Constituintes químicos

Investigações fitoquímicas e biológicas em cerca de 120 espécies desse gênero resultaram principalmente no isolamento de flavonóides agliconas com o grupo flavonas mais freqüentemente encontrado <sup>23, 76, 167, 194</sup>, diterpenos e terpenos do grupo clerodano e labdano <sup>51, 74, 76, 194</sup>, taninos <sup>142, 160</sup>, triterpeno, óleos essenciais <sup>68, 73, 108, 142</sup>, princípios amargos (lactonas) e saponinas (que estimulam a secreção gástrica) <sup>23, 142, 163, 175</sup>, além de resina, vitaminas, polifenóis,  $\alpha$  e  $\beta$ -cardieno, calameno, eledol e eudesmol <sup>139</sup>.

A análise farmacognóstica de *B. articulata* mostrou a presença de flavonóides, heterosídeos cardiotônicos, taninos <sup>180</sup>, diterpenos <sup>51</sup> e outros compostos fenólicos <sup>141</sup>.

<sup>7</sup> Alonso, J. R. Bueno Aires: Isis, 1998.

<sup>18</sup> Barroso, G. M. Rodriguésia. 28 (1976)1-273.

<sup>23</sup> Bianchi, N. R. *et al.* Rev. Bras. Farm. 74 (1993) 79-80.

<sup>44</sup> Corrêa Junior, C.; Ming, L. C.; Scheffer, M. C. 2ed. FUNEP, Jaboticaba, 1994.

<sup>45</sup> Corrêa, M. P. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, vol. 1-6.

<sup>51</sup> Dai, J. *et al.* Phytoch. 34 (1993) 1087-1090.

<sup>68</sup> Ferracini, V. L. *et al.* J. Essent. Oil Res. 7 (1995) 355-367.

<sup>73</sup> Frizzo, C. D. *et al.* Flav. Fragr. J. 16 (2001) 286-288.

<sup>74</sup> Fullas, F. *et al.* Tetrahedron. 47 (1991) 8515-8522.

<sup>76</sup> Gianello, J. C. *et al.* Acta Farm. Bonaer. 19 (2000) 99-103.

<sup>101</sup> Korbes, C. V. 48ed. Grafit: Francisco Beltrão, 1995.

<sup>108</sup> Lawrence, B. M.; Company, R. J. R. T. Perfum. Flav. 24 (1999) 53-63, 1999.

<sup>139</sup> Oliveira, F.; Akisue, G. 2ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

<sup>141</sup> Oliveira, S. Q. D. *et al.* Free Rad. Res. comun. 37 (2003) 555-559.

<sup>142</sup> Ortins, G. M. M.; Akisue, G. Lecta. 18 (2000) 9-32.

<sup>160</sup> Sá, M. F. A.; Neves, L. J. Rev. Bras. Farm. 77 (1996) 88-96.

<sup>163</sup> Santos, C. A. M.; Torres, K. R.; Leonart, R. 2ed. São Paulo: Ícone, 1988.

<sup>167</sup> Sharp, H. *et al.* Biochem. System. Ecol. 29 (2001) 105-107.

<sup>170</sup> Silva Júnior, A. A. Itajaí: Epagri, 1997. CD-ROOM.

<sup>175</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 5ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998

<sup>180</sup> Siqueira, N.C.S.; Alice, C.B.; Thiesen, F. V. Cad. Farm. 4 (1988) 63-76.

<sup>188</sup> Takeda, I. J. M.; Farago, P. V. Curitiba, Serzegrat, 2001.

<sup>194</sup> Verdi, L. G.; Brighente, I. M. C.; Pizzolatti, M. G. Quím. Nova. 28 (2005) 85-94.

A ocorrência de diversos terpenóides, principalmente monoterpenos ( $\alpha$ -pireno,  $\beta$ -pireno,  $\delta$ -pineno) e sesquiterpenos (carquejol, ésteres terpênicos), foi observada nos óleos essenciais de *B. articulata*<sup>3, 68, 105, 178, 203</sup>.

#### 2.2.2.4 Atividades biológicas comprovadas

Dentre as atividades biológicas pode-se destacar a capacidade antiviral *in vitro*<sup>200</sup> e antioxidante *in vitro*<sup>141</sup>. A atividade antioxidante do extrato bruto, etanólico e aquoso, juntamente com as frações diclorometano, acetato de etila e n-butanólica obtidas a partir do extrato aquoso de *B. articulata* foram determinadas usando os ensaios TRAP e TBARS (potencial reativo antioxidante total, do inglês, *Total Reactive Antioxidant Potential* e espécies reativas do ácido barbitúrico, do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Species*). A fração n-butanólica demonstrou ser a mais efetiva e seu composto majoritário foi isolado e identificado como 4' - O -  $\beta$  - d - glicopiranosil - 3' , 5' - dimetoxibenzil – caffeate<sup>141</sup>.

#### 2.2.2.5 Toxicologia

Na literatura, não foram encontrados dados referentes à toxicologia desta espécie, porém, Ruiz *et al.*<sup>159</sup> citam que o consumo do chá de carqueja deve ser proibido para gestantes (risco comprovado de aborto) e para pacientes que utilizam drogas para tratamento de problemas pressóricos (ação hipotensora). Além disso, o mesmo autor refere-se à necessidade de um maior conhecimento sobre as plantas medicinais utilizadas popularmente, não apenas para a confirmação das atividades descritas pelo uso tradicional, mas também para que o uso seguro seja estabelecido.

<sup>3</sup> Agostini, F. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2005) 215-220.

<sup>68</sup> Ferracini, V. L. *et al.* J. Essent. Oil Res. 7 (1995) 355-367.

<sup>105</sup> Lago, J. H. G. *et al.* Biochem. System. Ecol. 36 (2008) 737-740.

<sup>141</sup> Oliveira, S. Q. D. *et al.* Free Rad. Res. commun. 37 (2003) 555-559.

<sup>159</sup> Ruiz, A. L. T. G. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 18 (2008) 295-300.

<sup>178</sup> Simões-Pires, C. A. *et al.* Plant. Syst. Evol. 253 (2005) 23-32.

<sup>200</sup> Zanon, S.M. *et al.* Rev. Latinoamerican. Microbiol. 41 (1999) 59-62.

<sup>203</sup> Zunino, M. P. *et al.* J. Essent. Oil Res. 16 (2004) 61-63.

## 2.3 Metabólitos secundários

### 2.3.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos complexos naturais e voláteis, caracterizados pelo forte odor característico, sendo produzidos por plantas aromáticas como metabólito secundário. Desde a Idade Média, têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular devido suas propriedades bactericidas, antivírus, antifúngica, medicinais e aromáticas, sendo empregados na preservação de alimentos e como antimicrobiano, analgésico, sedativo, antiinflamatório, espasmolítico e anestésico local <sup>17, 130</sup>.

No presente momento são conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais, e destes, 300 são comercialmente importantes, especialmente nas indústrias farmacêuticas, agrônômicas, alimentícias, cosméticas, e de perfumes <sup>17</sup>. Além disso, estudos estabeleceram que aproximadamente 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e que 35% apresentam propriedades antibacterianas <sup>12, 22, 84, 110</sup>.

Os compostos dos óleos voláteis incluem dois grupos com base na origem biossintética, os derivados dos terpenóides formados pela via do ácido mevalônico-acetato e derivados do fenilpropanóide, compostos aromáticos formados pela via do ácido chiquímico. Os compostos terpênicos, derivados dos terpenóides, constituem a maioria dos óleos essenciais. Sua biossíntese (Figura 4) consiste na síntese do precursor isopentanildifosfato (IPP), seguida da formação do esqueleto terpênico e modificações enzimáticas secundária (reação redox) do esqueleto para atribuir propriedades funcionais aos diferentes terpenos <sup>17</sup>.

<sup>12</sup> Arruda, T. A. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 16 (2006) 307-311.

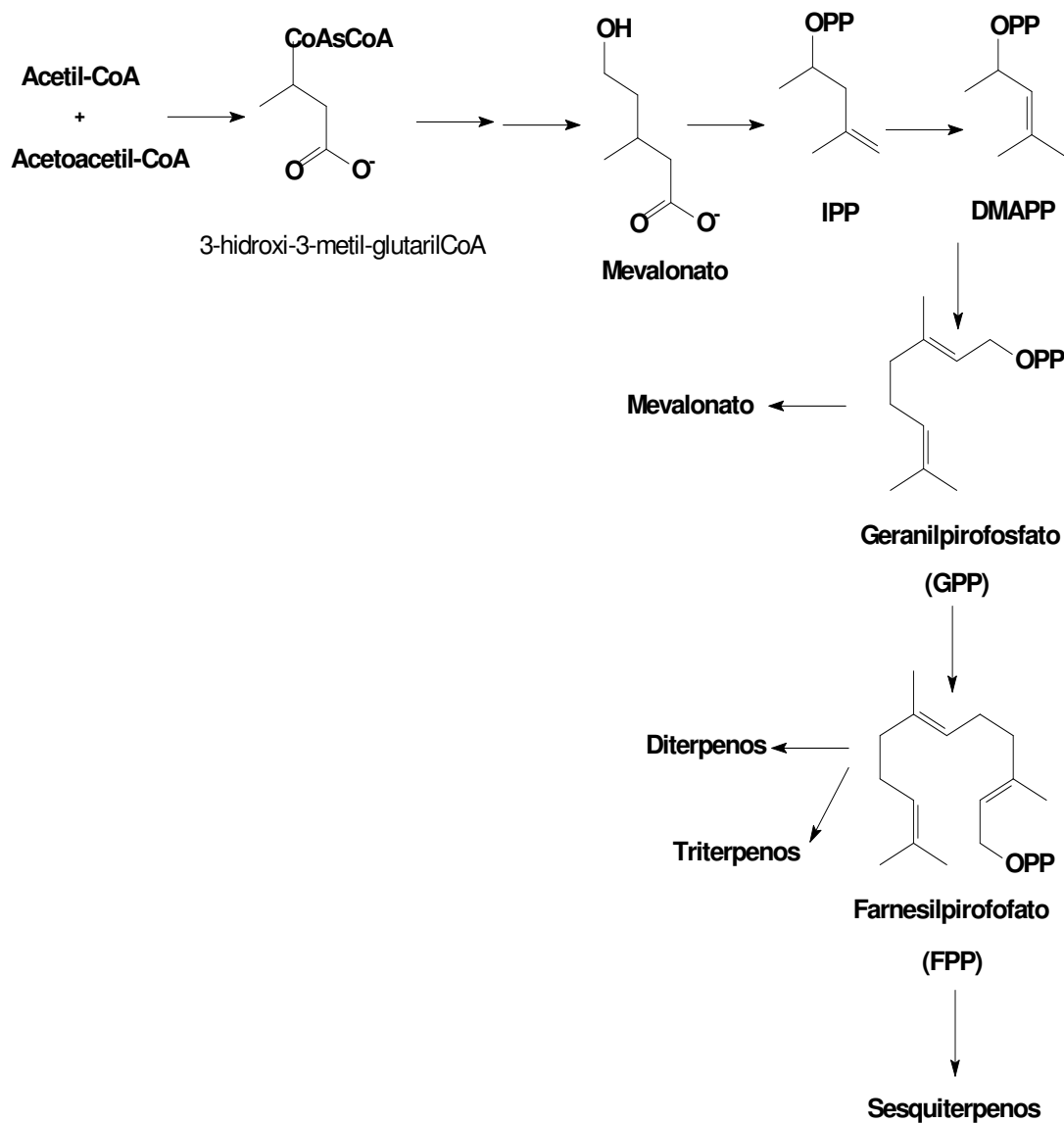
<sup>17</sup> Bakkali, F. *et al.* Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 446-475.

<sup>22</sup> Bhavanani, S. M.; Ballow, C. H. Curr. Opin. Microbiol. 3 (2000) 528-534.

<sup>84</sup> Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. J. App. Microb. 86 (1999) 985-990.

<sup>110</sup> Lima, I. O. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 16 (2006) 197-201.

<sup>130</sup> Nascimento, P. F. C. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 17 (2007) 108-113.



**Figura 4.** Biossíntese de terpenos (IPP-Isopentilpirofosfato; DMAPP-Dimetil-alil-pirofosfato). Fonte: Harbone<sup>85</sup>

Estes compostos podem ser classificados como hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ) e tetraterpenos ( $C_{40}$ ), sendo os dois primeiros encontrados preferencialmente. Os terpenos que contêm oxigênio são chamados de terpenóides<sup>17</sup>.

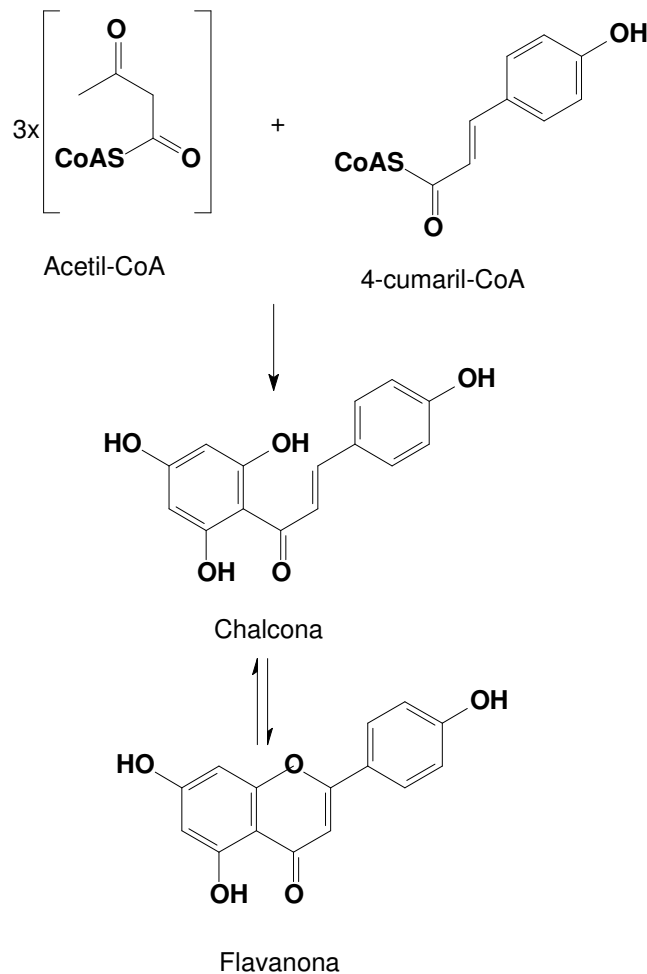
<sup>17</sup> Bakkali, F. *et al.* Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 446-475.

<sup>85</sup> Harbone, J. B. 4ed. London: Academic, Press 1993.



### 2.3.2 Flavonóides

Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides (Figura 5), constituem uma importante classe de polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais <sup>176</sup>.



**Figura 5.** Biossíntese dos flavonóides. Fonte: Simões *et al.* <sup>176</sup>

Esta classe de metabólitos secundários representa um papel de defesa das plantas frente à radiação ultravioleta (UV) da luz solar, pois absorvem a radiação eletromagnética na faixa do UV e do visível. Além disso, podem representar uma

<sup>176</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.

barreira química de defesa contra microorganismos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros. Porém, os flavonóides também atuam em relacionamentos harmônicos entre plantas e insetos, atraindo e orientando esses animais até o néctar, contribuindo enormemente para a polinização <sup>190</sup>. Além disso, esta classe de compostos desempenha um importante papel na saúde humana por apresentarem atividade antioxidante <sup>195</sup>. Foi demonstrado, que a ingestão de maiores quantidades de flavonóides, encontrados em alimentos de origem vegetal tais como verduras, frutas, chás, mel, favorece uma considerável redução no risco de morte por acidentes cardiovasculares <sup>100</sup>. Neste sentido, há um interesse econômico crescente em plantas medicinais que apresentam alto teor de flavonóides decorrente de suas diferentes propriedades, farmacológica, como por exemplo, anticarcinogênica, antiinflamatória, antialérgica, antiulcirogênica, antivirais entre outros <sup>176</sup>. As classes de flavonóides e algumas características conhecidas destacando a importância dos mesmos estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Classes de flavonóides e algumas características conhecidas.

Classes	Número aproximado de estruturas conhecidas	Características
Flavonas, flavonóis e seus O-heterosídeos	1660	Co-pigmentação em flores; protetores contra raios UV nas folhas
C-heterosídeos	303	-
Antocianos	256	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	197	Pigmentação amarela
Auronas	29	Pigmentação amarela
Di-hidro-flavonóis	110	Estão presentes freqüentemente em tecidos de madeiras
Flavanonas	319	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	71	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	309	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonóides	630	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas
Neoflavonóides	70	-
Biflavonóides	134	Propriedades antifúngicas
Outras estruturas	100	-

Fonte: Simões *et al.* <sup>176</sup>

<sup>100</sup> Koehn, F.E.; Carter, G.T. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 206-220.

<sup>176</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.

<sup>190</sup> Van Vuuren, S. F. *et al.* *J. Botan.* 73 (2007) 441-448.

<sup>195</sup> Viegas Jr. C.; Bolzani, V. S. *Quím. Nova.* 29 (2006) 326-337.

## 2.4 Atividades Farmacológicas

### 2.4.1 Atividade citotóxica

Todas as vantagens do uso de plantas no combate a doenças, sejam pelo uso na medicina popular, ou pela semi-síntese em laboratórios, não podem servir apenas como prova irrefutável de eficácia e segurança. Deve-se lembrar que a planta utilizada como medicamento é um xenobiótico, ou seja, um produto estranho ao organismo. Como todo o corpo estranho, os produtos de sua biotransformação podem ser potencialmente tóxicos <sup>176</sup>.

Sendo assim, um dos ensaios preliminares que tem sido empregado para avaliar a toxicidade destas plantas refere-se ao bioensaio de toxicidade utilizando *A. salina*.

*A. salina* (Figura 6) é um crustáceo da classe Anostracea, que vive em águas salgadas em todo o mundo, possui alguns mecanismos de adaptação que as tornam cosmopolitas, como a osmorregulação, presença de pigmentos respiratórios como a hemoglobina e a disponibilidade de alternativas reprodutivas que facilitam a dispersão e perpetuação da espécie <sup>132</sup>. Sabe-se que a *A. salina* após eclosão e fornecimento dos náupilos (forma mais evoluída) necessitam retirar do meio salino seus nutrientes para alimentação e sobrevivência. Essa retirada consiste na constante passagem do líquido salino com nutrientes, pelo organismo do náupilo que funciona desse modo como um pequeno filtro de nutrientes <sup>133</sup>.

Nesse sentido, o ensaios de toxicidade frente a *A. salina* avalia a presença de compostos tóxicos no extrato a ser testado que inevitavelmente levariam a morte do animal durante o ensaio <sup>133</sup>.

---

<sup>132</sup> Niero, R. UFSC, Florianópolis – SC, 1991.

<sup>133</sup> Noschang, L. TCC, Universidade Comunitária Regional de Chapecó. Chapecó-SC, 2003.

<sup>176</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.



**Figura 6.** *Artemia salina* visualizada em microscópio.

Além disso, o bioensaio de toxicidade usando *A. salina* tem sido amplamente empregado para a detecção de toxinas fúngicas, toxicidade de extratos de plantas, metais pesados, toxinas de cianobactérias e pesticidas <sup>35</sup>, porém, os dados não podem ser extrapolados diretamente ao homem, tendo em vista que trata-se de organismos diferentes <sup>133</sup>.

#### **2.4.2 Atividade antioxidante**

O oxigênio molecular e seus radicais são os reagentes mais importantes na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbicas. O termo “espécies reativas de oxigênio” (ROS, sigla do inglês, *reactive oxygen species*) inclui os radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroxila ( $HO^\cdot$ ), o radical peroxila ( $ROO^\cdot$ ) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), os quais são frequentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou por fatores exógenos que podem causar um grande número de desordens celulares ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Estas espécies estão envolvidas tanto no processo de envelhecimento, como também em muitas complicações biológicas, incluindo inflamação crônica, problemas respiratórios, doenças neurodegenerativas, *Diabetes mellitus*, Aterosclerose, doenças auto-imunes das glândulas endócrinas,

<sup>35</sup> Carballo, J. L. *et al.* Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Madrid – Espanha, 2002.

<sup>133</sup> Noschang, L. TCC, Universidade Comunitária Regional de Chapecó. Chapecó-SC, 2003.

carcinogênese e mutagênese <sup>8</sup>.

Neste sentido, os antioxidantes são substâncias utilizadas para inibir, prevenir ou retardar os danos provocados pelos processos oxidativos, podendo atuar através da inibição dos radicais livres (antioxidante primário) ou por outro mecanismo que não envolva a inibição direta dos radicais livres (antioxidante secundário) <sup>120</sup>. A atividade antioxidante é uma característica individual de cada substância, definida como a soma dos mecanismos endógenos e exógenos disponíveis para garantir o equilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes <sup>24</sup>. Antioxidantes sintéticos como o butil-hidroxitolueno (BHT) e butil-hidroxianisol (BHA) têm sido amplamente empregados. Porém, acredita-se que estes antioxidantes possam estar associados aos processos de carcinogênese. As dúvidas em relação à segurança destes compostos incentivam o consumo de antioxidantes de origem natural, bem como a pesquisa por novos agentes antioxidantes naturais, que tenham a mesma função e eficiência dos antioxidantes sintéticos <sup>118, 146</sup>.

Desta forma, a natureza química e a atividade de antioxidantes naturais têm sido investigadas, sendo que os antioxidantes isolados de diversas plantas são os polifenóis, os quais também demonstraram atividades biológicas como antibacteriana, anticarcinogênica, antiinflamatória, antialérgica, antioxidante e antiviral <sup>107</sup>. A atividade antioxidante dos polifenóis é atribuída principalmente as suas propriedades redutoras, onde doam hidrogênio, neutralizando os radicais de oxigênio <sup>16</sup>. Os compostos intermediários, formados pela ação de antioxidantes fenólicos, são estáveis devido à presença do anel aromático, o qual entra em ressonância, estabilizando a estrutura <sup>88</sup>. Acredita-se que a grande concentração e a diversidade de antioxidantes presentes nas plantas devem-se ao fato de que as mesmas precisam se proteger dos radicais livres gerados pelo estresse oxidativo, provocado pelos raios solares e pela exposição ao oxigênio <sup>103</sup>.

<sup>8</sup> Andrade, C. A. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 17 (2007) 231-235.

<sup>16</sup> Atoui, A. K. *et al.* Food Chem. 89 (2005) 27-36.

<sup>24</sup> Biesalski, H. K. *et al.* Clinic. Nutr. 16 (1997) 151-155.

<sup>88</sup> Haslam, E. J. Nat. Prod. 59 (1996) 205-215.

<sup>103</sup> Kwiecinski, M. R. Dissertação (Mestrado em Farmácia) UFSC Florianópolis-SC, 2007.

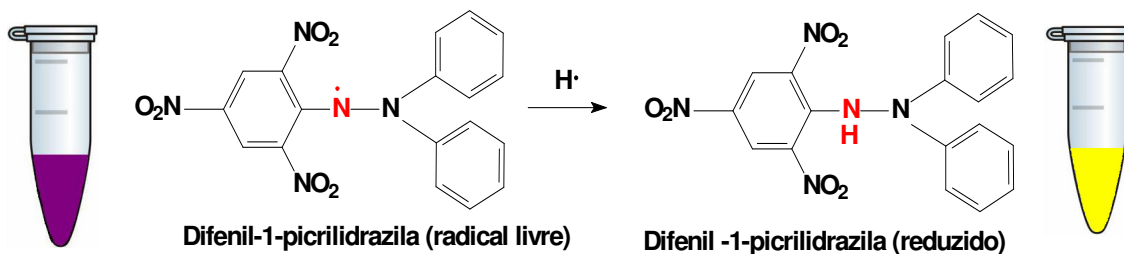
<sup>107</sup> Larson, R. A. Phytochem. 27 (1988) 969-978.

<sup>118</sup> Madsen, H. L.; Bertelsen, G. Tr. Food Scienc. Techn. 6 (1995) 271-277.

<sup>120</sup> Mariutti, L. R. B.; Bragagnolo, N. Braz. J. Food Technol. 10 (2007) 96-103.

<sup>146</sup> Passotto, J. A.; Penteado, M. V. C.; Mancini-Filho, J. Ciênc. Tecn. Alimen. 18 (1998) 68-72.

Vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a atividade antioxidante de diferentes amostras, sendo que alguns métodos determinam a capacidade dos antioxidantes em seqüestrar radicais livres gerados no meio reacional e outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica. Dentre os diferentes métodos existentes, destaca-se o método do DPPH• (2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazil) <sup>124</sup> que vem sendo amplamente empregado por ser considerado simples, rápido e sensível quando comparado a outros métodos, permitindo a realização de um “*screening*” de amostras com diferentes polaridades <sup>13, 156</sup>. Este método baseia-se na redução dos radicais DPPH•, ou seja, na capacidade do radical livre em reagir com substâncias doadoras de H (Figura 7) <sup>13, 61, 192</sup>. A solução de DPPH possui uma coloração roxa intensa e a ação antioxidante de um extrato pode ser visualizada pelo progressivo descoloramento da solução, ao final do qual a mesma torna-se amarelada.



**Figura 7.** Modelo para avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH•.

### 2.4.3 Atividade antibacteriana

Existem diversas razões que incentivam a realização de estudos referentes à atividade antimicrobiana de plantas. A primeira delas está relacionada ao fenômeno de resistência dos microrganismos aos antibióticos tradicionalmente usados na prática médica, que aumenta a cada ano. A segunda é a rapidez com que muitas

<sup>13</sup> Ascoli, B. *et al.* Anais da XIV Jornada de Jovens Pesquisadores da AUGM, 2006.

<sup>61</sup> Duarte-Almeida, J. M. *et al.* Cienc. Tecnol. Alim. 26 (2006) 446-452.

<sup>124</sup> Melo, E. A. *et al.* Ciênc. Tecnol. Alim. 26 (2006) 639-644.

<sup>156</sup> Roesler, R. *et al.* Ciênc. Tecnol. Alimen. 27 (2007) 53-63.

<sup>192</sup> Vedana, M. I. S. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) UFPr, Curitiba-Pr, 2008.

espécies não investigadas de plantas têm sido extintas nos últimos anos, sendo que várias estruturas promissoras possam estar sendo perdidas. Além disso, a maioria dos agentes antimicrobianos utilizados na atualidade provém de fontes naturais, grande parte sendo produtos do metabolismo secundário de microrganismos. Plantas, uma vez que não podem afastar-se de predadores e microrganismos, desenvolvem, em sua trajetória evolutiva, mecanismos químicos de defesa, incluindo substâncias antifúngicas e antibacterianas<sup>54</sup>. Neste sentido, óleos e extratos de plantas há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações na medicina popular. Tal realidade serviu de base para diversas investigações científicas, com vistas na confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais<sup>12, 135</sup>.

Para tanto, tem-se desenvolvido métodos de investigação *in vitro* que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados<sup>130</sup>. Os métodos comumente usados são o de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no ágar, diluição em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima – CIM<sup>33, 42, 134, 187</sup>. De modo geral, os métodos de diluição em caldo parecem ser mais adequados para testar constituintes terpênicos<sup>39</sup> e tem se mostrado o que melhor disponibiliza dados quantitativos<sup>130</sup>.

Contudo, essa tarefa tem sido dificultada, em especial aos óleos essenciais, pelas peculiaridades que os mesmos apresentam, tais como volatilidade, insolubilidade em água e complexidade, características que interferem significativamente nos resultados<sup>130</sup>. Sendo assim, alguns fatores devem ser levados em consideração: a técnica usada, o meio de cultura, densidade do inóculo, o tempo de leitura do teste, o óleo essencial e o emulsificador utilizado<sup>54, 130</sup>. Por exemplo, como a maioria dos derivados terpênicos de baixo peso molecular são voláteis, existe a possibilidade da concentração de terpenos aplicados ao disco reduzir, principalmente se forem incubados por um grande período de tempo. Por apresentarem caráter lipofílico, há

---

<sup>12</sup> Arruda, T. A. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 16 (2006) 307-311.

<sup>33</sup> Canillac, N.; Mourey, Food Microbiol. 18 (2001) 261-268.

<sup>39</sup> Chand, S. *et al.* J. Antibiot. 47 (1994) 1295-1304.

<sup>42</sup> Cimanga, K. *et al.* J. Ethnopharmacol. 79 (2002) 213-220.

<sup>54</sup> Deuschle, R. A. N. Dissertação (Mestrado Ciênc. Tecnol. Farmac.) UFSM, Santa Maria-RS, 2003.

<sup>130</sup> Nascimento, P. F. C. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 17 (2007) 108-113.

<sup>134</sup> Nostro, A. *et al.* FEMS Microbiol. Lett. 230 (2004) 191-195.

<sup>135</sup> Nunes, X. P. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 16 (2006) 642-644.

<sup>187</sup> Takaisi-Kikuni, N. B.; Tshilanda, D.; Babady, B. Fitoter. 71 (2000) 69-71.

a possibilidade de não se difundirem nos meios sólidos, que são polares<sup>39</sup>.

Por este motivo, os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela NCCLS (Comitê Nacional de Padronização para Laboratórios Clínicos, do inglês, *National Committee for Clinical Laboratory Standards*) e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos. Nos testes de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, a metodologia proposta pelo NCCLS não pode ser seguida à risca, devido às propriedades químicas que estes apresentam. Dessa forma, feitas modificações esses métodos podem ser usados em algumas situações. Na maioria dos estudos, as zonas de inibição formadas pelos óleos são comparadas com aquelas obtidas pelos antibióticos, no entanto, é importante destacar que esses resultados não devem ser simplesmente comparados, pois as particularidades apresentadas pelos óleos, bem como, outras variáveis (técnica usada, o meio de crescimento, o microrganismo teste) devem ser levadas em consideração<sup>41, 59, 134, 161</sup>.

Sendo assim, em testes de susceptibilidade microbiana sem padronização é praticamente impossível elucidar a verdadeira bioatividade, o potencial terapêutico e a utilidade clínica dos óleos essenciais, bem como fazer uma comparação direta entre eles. Portanto, é necessário definir e adotar uma metodologia adequada e bem padronizada<sup>130</sup>.

---

<sup>39</sup> Chand, S. *et al.* J. Antibiot. 47 (1994) 1295-1304.

<sup>41</sup> Christoph, F.; Kaulfers, P-M.; Stahl-Biskup, E. Planta Med. 66 (2000) 556-560.

<sup>59</sup> Duarte, M. C. T. *et al.* J. Ethnopharmacol. 97 (2005) 302-311.

<sup>130</sup> Nascimento, P. F. C. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 17 (2007) 108-113.

<sup>134</sup> Nostro, A. *et al.* FEMS Microbiol. Lett. 230 (2004) 191-195.

<sup>161</sup> Saeed M. A.; Sabir, A. W. Fitoter. 75 (2004) 204-208.



## 2.5 Variação sazonal

A maior parte das propriedades medicinais das plantas é conferida por produtos oriundos do metabolismo secundário. Estes são produtos que embora não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie <sup>58</sup>. Atualmente, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio, tais como defesa contra animais herbívoros e microrganismos, proteção contra a radiação UV, a atração de polinização ou animais dispersores de semente <sup>176</sup>.

Sendo assim, os metabólitos secundários das plantas podem variar consideravelmente dependendo de vários fatores tais como sazonalidade, índice pluviométrico, radiação solar, altitude, ritmo circadiano, altitude dentre outros como demonstrado na Figura 8, sendo que a constância de concentração de metabólitos secundários é praticamente uma exceção <sup>80</sup>. Neste sentido, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante <sup>103</sup>.

De acordo com Eloff <sup>62</sup>, o material vegetal, coletado em diferentes épocas do ano, pode conter possíveis compostos novos com atividades biológicas diferentes. Por exemplo, plantas aromáticas que contêm frações voláteis e não voláteis pode apresentar a composição química destas duas frações influenciada pelas mudanças sazonais <sup>98</sup>. Além disso, alguns dos fatores apresentam correlação entre si e não atuam isoladamente, podendo influenciar em conjunto no metabolismo secundário, como por exemplo, desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico e sazonalidade; temperatura e altitude <sup>80</sup>.

<sup>58</sup> Duarte, M. C. T. *et al.* Rev. Bras.Farmacogn. 14 (2004) 06-08.

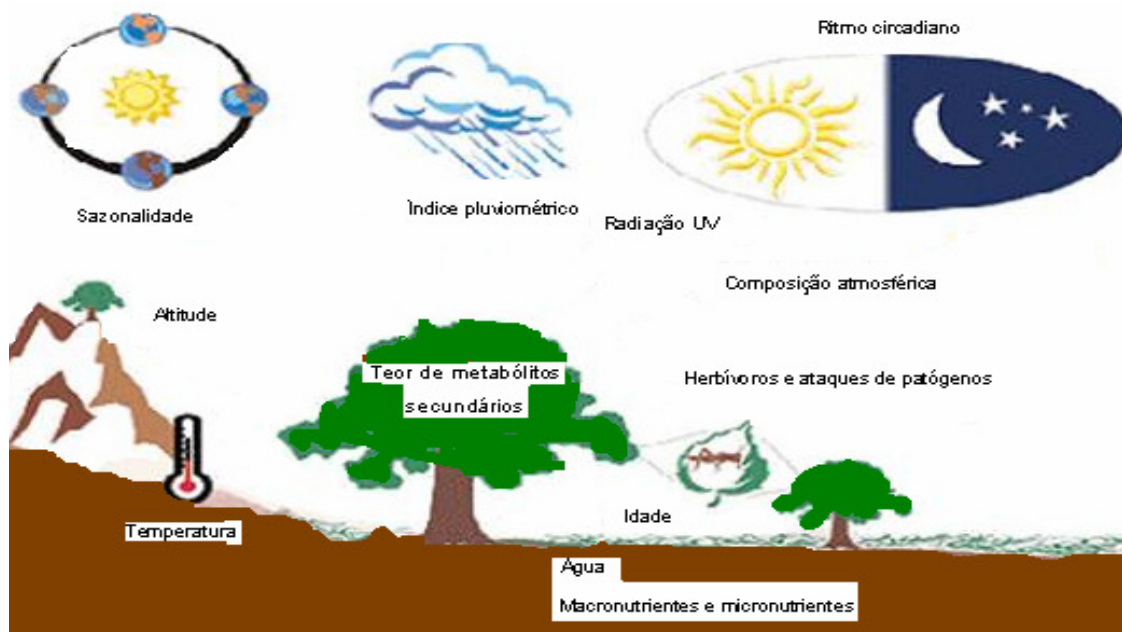
<sup>62</sup> Eloff, J. N. J. Ethnopharmacol. 67 (1999) 355–360.

<sup>80</sup> Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. L. Quím. Nova. 30 (2007) 375-381.

<sup>98</sup> Kamatou, G. P. P. *et al.* South African J. Bot. 74 (2008) 230–237.

<sup>103</sup> Kwiecinski, M. R. Dissertação (Mestrado em Farmácia) UFSC, Florianópolis-SC, 2007.

<sup>176</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.



**Figura 8.** Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas. Fonte: Adaptado de Gobbo-Neto & Lopes<sup>80</sup>

Atualmente, tem sido relatada variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais<sup>112, 165, 171</sup>, lactonas sesquiterpênicas<sup>92, 164, 202</sup>, ácidos fenólicos<sup>202</sup>, flavonóides<sup>15, 28, 81, 182</sup>, saponinas<sup>25</sup>, alcalóides<sup>19, 154</sup> e taninos<sup>67, 143, 162</sup>. Sabendo-se dos inúmeros fatores que podem levar a variações no conteúdo de metabólitos secundários, fica clara a necessidade de estudos neste sentido<sup>80</sup>.

<sup>15</sup> Atkinson, P.; Blakeman, J. P. *New Phytol.* 92 (1982) 63-74.

<sup>19</sup> Bauer, L. *Rev. Bras. Farm.* 60 (1979) 97-100.

<sup>25</sup> Borella, J. C. *et al.* *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (2006) 557-561.

<sup>28</sup> Brooks, J. S.; Feeny, P. *Biochem. Syst. Ecol.* 32 (2004) 769-782.

<sup>67</sup> Feeny, P. *Ecology.* 51 (1970) 565-581.

<sup>80</sup> Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. L. *Quím. Nova.* 30 (2007) 375-381.

<sup>81</sup> Grace, S. C.; Logan, B. A.; Adams, L. W. W. *Oecol.* 116 (1998) 9-17.

<sup>92</sup> Holzkea, C. *et al.* *Atmosph. Environm.* 40 (2006) 3174-3185.

<sup>112</sup> Lopes, N. P. *et al.* *Phytochem.* 46 (1997) 689-693.

<sup>143</sup> Osier, T. L.; Hwang, S. Y.; Lindroth, R. L. *Biochem. Syst. Ecol.* 28 (2000) 197-208.

<sup>154</sup> Robinson, T. *Scienc.* 184 (1974) 430-435.

<sup>162</sup> Salminen, J. P. *et al.* *Phytochem.* 57 (2001) 15-22.

<sup>164</sup> Schmidt, T. J.; Bomme, U.; Alfermann, A. W. *Planta Med.* 64 (1998) 268-270.

<sup>165</sup> Schwob, I. *et al.* *Biochem. Syst. Ecol.* 32 (2004) 735-745.

<sup>171</sup> Silva, F. G. *et al.* *J. Braz. Soc.* 18 (2007) 990-997.

<sup>182</sup> Solar, A. *et al.* *Plant Science.* 170 (2006) 453-461.

<sup>202</sup> Zidorn, C.; Stuppner, H. *Taxon.* 50 (2001) 115-133.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Coleta e pré-tratamento do material vegetal

As partes aéreas de *Baccharis articulata* (Lam) Pers. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C foram coletadas em 12 de Janeiro de 2008 (verão), 14 de Abril de 2008 (outono), 16 de Julho de 2008 (inverno) e 15 de Outubro de 2008 (primavera), no Polo de Modernização Tecnológica da Universidade Regional Integrada do Alto Ururuquai e das Missões, na cidade de Frederico Westphalen, RS (S 27° 22'; W 53° 25', altitude 490 m). A identificação do material botânico foi realizada através de comparação com amostra existente no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil. Um *Voucher* do material testemunha está depositado neste mesmo herbário sob o número SMDB 12.062 e SMDB 12.063 para *B. articulata* e *A. satureioides*, respectivamente.

Os valores médios das temperaturas máximas e mínimas (°C) para os meses de Janeiro (2008), Abril (2008), Julho (2008) e Outubro (2008) foram: 29,9 e 18,5 (média 24,2); 24,9 e 13,8 (média 19,35); 24,0 e 12,6 (média 18,3), 24,8 e 15,7 (média 20,25), respectivamente. (INMMET, 2009 – Anexo E)

A umidade relativa e a precipitação total nos meses de Janeiro (2008), Abril (2008), Julho (2008) e Outubro (2008) foram 70% e 35,6 mm; 75% e 334,2 mm; 73% e 36 mm; 78% e 387,6 mm, respectivamente. Os valores de radiação global (W/m<sup>2</sup>) para os meses de Janeiro (2008), Abril (2008), Julho (2008) e Outubro (2008) foram: 1718,1; 1162,3; 1111,9; 1182,4, respectivamente. (INMMET, 2009 – Anexo E)

Após a coleta do material vegetal, os mesmos foram secos em estufa Tecnal (modelo TE-394/3), com circulação forçada de ar a uma temperatura controlada de 30 ± 5 °C até peso constante, triturados em moinho de facas Tecnal, tipo Cróton (modelo TE 625), embalados, identificados e armazenados sob refrigeração.

### 3.1.2 Reagentes

Os solventes e reagentes utilizados foram de grau P.A. (Merck e Vetec). Em certos casos, aplicaram-se técnicas específicas de purificação de solventes, obtendo-se, dessa maneira, produtos com maior grau de pureza.

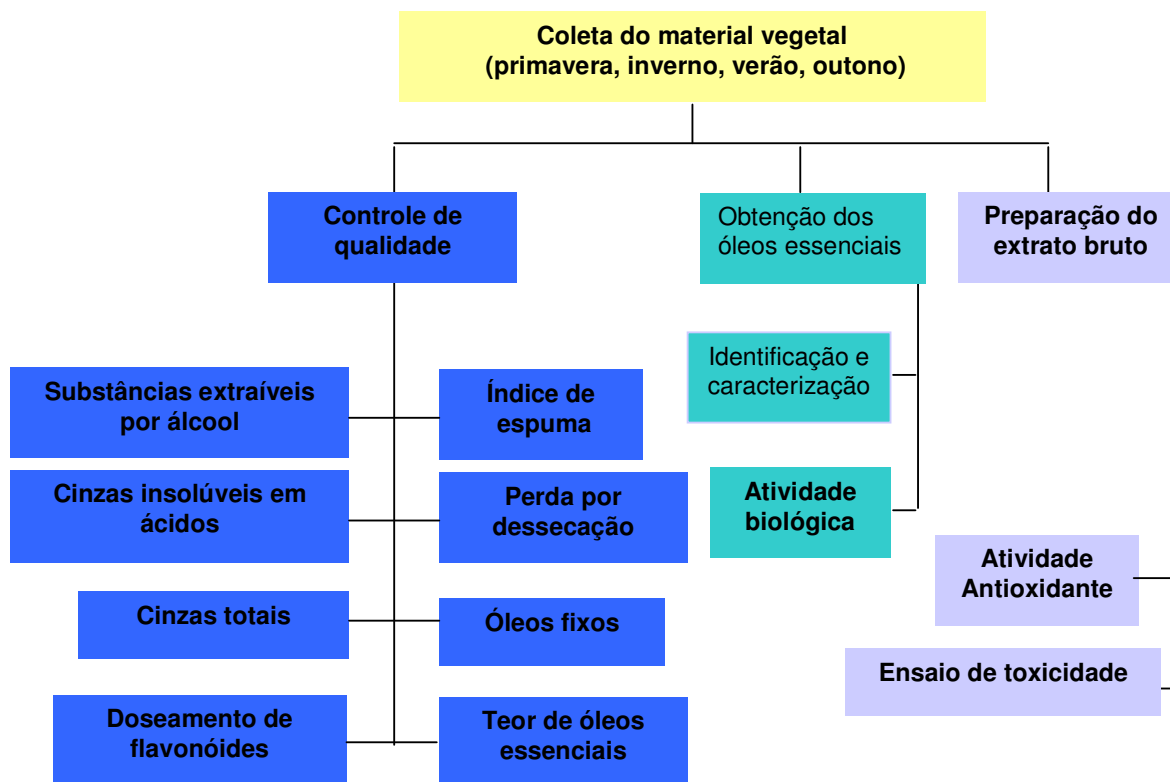
Durante o doseamento de flavonóides foram utilizados os seguintes reagentes: solução reagente (SR) de cloreto de alumínio (2 g de cloreto de alumínio em 100 mL de solução metanólica de ácido acético); solução metanólica de ácido acético (5 mL de ácido acético em 100 mL de metanol); hexametilenotetramina a 0,5% (p/V) (0,5 g de hexametilenotetramina em 100 mL de água).

### 3.2 Métodos

Após tratamento inicial, o material vegetal foi dividido em três partes (Figura 9). Uma parte foi submetida a ensaios de controle de qualidade, tais como substâncias extraíveis por álcool, índice de espuma, determinação de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácidos, teores de óleos fixos e óleos essenciais, perda por dessecação e doseamento de flavonóides.

Com a segunda parte, foram obtidos os óleos essenciais por hidrodestilação, empregando aparelho de *Clevenger* modificado, sendo então realizado a identificação e caracterização dos mesmos por GC/MS (cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas, do inglês, *Gas Chromatography Mass Spectrometry*), bem como, avaliação da atividade antimicrobiana.

Além disso, com uma terceira parte do material vegetal seco e pulverizado conduziu-se à extração com metanol, sob refluxo, para a obtenção dos extratos brutos metanólicos a fim de realizar os ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e atividade antioxidante.



**Figura 9.** Diagrama das análises realizadas com o material vegetal.

### 3.2.1 Controle de qualidade do material vegetal

#### 3.2.1.1 Determinação de substância extraível por álcool

Transferiram-se cerca de 2 g de material vegetal para cartucho de celulose do extrator de soxhlet, previamente tarado e seco. Introduziram-se, no balão do extrator, cerca de 200 mg de hidróxido de sódio e etanol absoluto, em quantidade suficiente para a extração. Após 5 horas de extração, o cartucho com o resíduo foi retirado e seco em estufa a 105 °C por 30 minutos. O teor de substâncias extraíveis por etanol foi calculado pela diferença entre o peso da amostra e o peso do resíduo seco.

#### 3.2.1.2 Perda por dessecação

A determinação de água do material vegetal foi realizada pelo método gravimétrico (perda por dessecação). Para tanto, transferiram-se, cerca de 2 g de

material vegetal, para pesa-filtro chato previamente dessecado por 30 minutos nas mesmas condições empregadas na determinação. O pesa-filtro contendo a amostra foi pesado, tampado e agitado brandamente a fim de distribuir a amostra da maneira uniforme, a uma profundidade de 5 mm. Após esse procedimento, colocou-se o pesa-filtro na estufa a 105 °C, retirou-se a tampa, deixando-a também na estufa. Após o período de 5 horas, os pesa-filtros foram retirados da estufa, resfriados a temperatura ambiente em dessecador e pesados. A operação foi repetida até peso constante.

A porcentagem de perda por dessecação foi calculada com base na Equação 1, onde  $P_a$  refere-se ao peso da amostra,  $P_u$  é o peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação e  $P_s$ , peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

$$\frac{(P_u - P_s) \times 100}{P_a}$$

Equação 1

### 3.2.1.3 Determinação de cinzas totais

Para a determinação do teor de cinzas totais, foram pesados e transferidos, para cadinho de porcelana previamente calcinado, resfriado e pesado, exatamente 3 g da droga pulverizada. A amostra foi distribuída uniformemente, incinerada, aumentando-se gradativamente a temperatura, até que todo o carbono fosse eliminado. O cadinho contendo a amostra foi resfriado em dessecador e pesado. Calculou-se a porcentagem de cinzas em relação à droga seca ao ar.

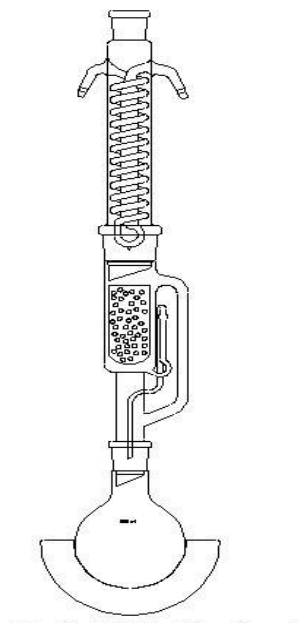
### 3.2.1.4 Determinação de cinzas insolúveis em ácido

Para a determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido, adicionaram-se 25 mL de ácido clorídrico 7% (p/V) em cadinho de porcelana contendo as cinzas totais obtidas no ensaio descrito no item 3.2.1.3. O cadinho foi coberto com vidro de relógio e o conteúdo submetido à fervura suavemente, durante 5 minutos. O vidro de relógio foi lavado com 5 mL de água quente e a água de lavagem foi transferida para o cadinho. O resíduo insolúvel em ácido foi recolhido sobre papel de filtro isento de cinza, lavando-o com água quente até o filtrado estar em pH neutro. Após esse

procedimento, o papel filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, seco em chapa quente e incinerado em mufla a cerca de 500 °C até peso constante. A porcentagem de cinzas insolúveis em ácido foi determinada em relação à quantidade de droga utilizada para esse procedimento (determinação de cinzas totais).

### 3.2.1.5 Determinação de óleos fixos

Foram transferidos para cartucho de celulose, cerca de 10 g do material vegetal, obtido na determinação da perda por dessecação, e colocou-se em aparelho extrator de Soxhlet (Figura 10), cobrindo-o com algodão desengordurado. Pesou-se o balão extrator limpo e seco e adicionou-se éter de petróleo em quantidade suficiente para realizar três sifonagens.



**Figura 10.** Aparelho extrator de Soxhlet. Fonte: F. Bras.<sup>64</sup>

Procedeu-se à extração, sob aquecimento suficiente para manter o solvente em ebulição, durante 4 horas. Concluída a extração, aguardou-se o resfriamento e,

<sup>64</sup> Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

então, o conteúdo do cartucho foi transferido para almofariz de porcelana onde adicionou-se quantidade aproximadamente igual de areia limpa e seca. Após a pulverização da droga, transferiu-se novamente, para o interior do cartucho. A extração da amostra foi realizada nas condições previamente descritas, por período adicional de 2 horas. O solvente foi evaporado e o balão foi transferido para estufa a 105 °C por um período de 30 minutos. Em seguida, aguardou-se o resfriamento em dessecador e pesou-se. A operação foi repetida até peso constante. A percentagem de óleos fixos na droga foi calculada com base na diferença entre massa inicial e a do resíduo no balão.

### 3.2.1.6 Determinação do índice de espuma

Pesou-se 1,0 g do material vegetal pulverizado e transferiu-se para erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de água fervente e manteve-se sob ebulição moderada em banho-maria, durante 30 minutos. Após o resfriamento, filtrou-se e transferiu-se o filtrado para balão volumétrico de 100 mL, sendo o papel de filtro submetido a lavagens com quantidade de água suficiente para completar o volume. Transferiram-se alíquotas de 1 a 10 mL do decocto para uma série de 10 tubos de ensaios com dimensões de 16 mm x 16 cm, providos de tampa. Agitaram-se os tubos no sentido longitudinal, com duas agitações por segundo, durante 15 segundos, deixou-se em repouso durante 15 minutos e mediu-se a altura da coluna de espuma. Verificou-se em qual tubo de ensaio houve a formação de um anel de espuma persistente de aproximadamente 1,0 cm de altura. O índice de espuma (IE) foi calculado empregando a Equação 2, em que *a* refere-se ao volume (mL) do decocto usado para preparação da diluição no tubo onde a espuma foi observada.

$$IE = \frac{1000}{a}$$

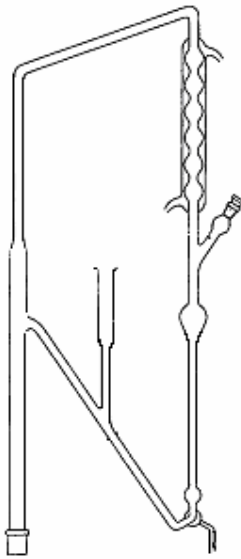
Equação 2

### 3.2.1.7 Determinação do teor de óleos essenciais

A determinação do teor de óleos essenciais presentes nos vegetais em estudo foi realizada por hidrodestilação empregando um aparelho de *Clevenger*



modificado (Figura 11), conforme determinado pela F. Bras.<sup>64</sup>. Em balão de fundo redondo de 2000 mL, foram colocados aproximadamente 30 g da planta pulverizada (800  $\mu\text{m}$ ) com quantidade de água destilada suficiente para encobrir a droga vegetal. Em seguida, adaptou-se o aparelho de *Clevenger* ao balão, onde foi preenchido com água destilada a parte do tubo graduado e do tubo retorno. Em seguida, foi promovido o aquecimento do balão através de uma manta térmica, deixando destilar por 4 horas. Ao final do ensaio, os óleos essenciais destilados foram secos com sulfato de sódio anidro, filtrados e estocados em frasco tipo *vial* sob refrigeração a 4 °C.



**Figura 11.** Aparelho de *Clevenger*. Fonte: F. Bras.<sup>64</sup>

### 3.2.1.8 Doseamento de flavonóides

Para a determinação do teor de flavonóides, pesou-se exatamente cerca de 0,4 g da droga pulverizada (800  $\mu\text{m}$ ) e colocou-se em balão de fundo redondo de 100 mL. Acrescentou-se 1 mL de solução aquosa de hexametilenotetramina SR, 20 mL de acetona e 2 mL de ácido clorídrico. Aqueceu-se em manta térmica, sob refluxo, por 30 minutos. Em seguida, filtrou-se a mistura em algodão, para balão volumétrico de 100 mL, retornando o resíduo da droga e o algodão ao mesmo balão de fundo redondo, adicionando-se 20 mL de acetona. Colocou-se sob refluxo, por 10

<sup>64</sup> Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

minutos. Após o resfriamento a temperatura ambiente, filtrou-se a solução para o balão volumétrico de 100 mL e a operação foi repetida. Em seguida, completou-se o volume do balão volumétrico com acetona e, em funil de separação, transferiu-se 20 mL desta solução, 20 mL de água e extraiu-se com 15 mL de acetato de etila, repetindo se por três vezes a operação, com 10 mL de acetato de etila. As fases acetato de etila foram reunidas em funil de separação e tratadas com duas porções de 50 mL de água destilada. As fases acetatos foram transferidas para balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com acetato de etila, sendo denominada de solução-mãe. Em seguida, pipetou-se 10 mL da solução-mãe, adicionou-se 1 mL do cloreto de alumínio SR, diluindo-se em balão volumétrico de 25 mL com solução metanólica de ácido acético SR. Preparou-se o branco diluindo-se 10 mL da solução-mãe em balão volumétrico de 25 mL com o mesmo diluente. Após 30 minutos, a absorvância das soluções foi determinada em 425 nm utilizando um espectrofotômetro de UV/Vis Perkin Elmer (modelo Lambda 25) e cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Os resultados foram expressos em porcentual ponderal calculado como quercetina ( $C_{15}H_{10}O_7$ ) pela média de três determinações empregando-se a Equação 3, a qual baseia-se na extinção específica da mesma a 425 nm,  $E^{1\%}_{1cm} = 500$ .

Equação 3

$$TFT = \frac{A \times Fd}{500 \times p \times (100 - t)}$$

Onde:

TFT = Teor de flavonóides totais calculados como quercetina (%; m/m);

A = absorvância medida da amostra;

Fd = fator de diluição (62500)

p= massa da droga (g);

t = perda por dessecação (%; m/m).

### 3.2.2 Obtenção dos óleos essenciais para análise cromatográfica

Os óleos essenciais foram extraídos do material vegetal fresco, submetido à hidrodestilação em aparelho de *Clevenger* modificado. Em balão de fundo redondo de 2000 mL, foram colocados aproximadamente 500 g do material vegetal com

quantidade de água destilada suficiente para encobrir a droga vegetal. Em seguida, foi promovido o aquecimento do balão através de uma manta térmica, deixando destilar por 4 horas. Ao final do ensaio, os óleos essenciais destilados foram estocados em frasco tipo *vial* sob refrigeração a 4 °C.

### **3.2.2.1 Análise cromatográfica dos óleos essenciais**

#### **3.2.2.1.1 Cromatografia gasosa**

Os óleos essenciais foram analisados por GC utilizando um cromatógrafo a gás (Varian, modelo 3800) e uma coluna capilar VF-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As condições de operação do GC foram as seguintes: as temperaturas do injetor e do detector foram de 220 e 290 °C, respectivamente. O volume de amostra injetado foi de 1 µL com injeção automática e razão de *split* de 1:30. O fluxo de gás na coluna foi de 1 mL min<sup>-1</sup>. A programação de aquecimento do forno partiu de 50 °C, seguido de 3 °C min<sup>-1</sup> até 250 °C, permanecendo 5 min nesta temperatura. Utilizou-se hélio 99,99% de pureza como gás de arraste.

#### **3.2.2.1.2 Cromatografia a gás acoplado a espectrometria de massas**

A análise por GC/MS dos óleos essenciais foi realizada utilizando um Cromatógrafo a gás, modelo Varian 3800, equipado com um detector de massas seletivo, modelo (Saturno 2200 (MS/MS) e um amostrador automático, modelo (CP8400 Varian). As condições cromatográficas foram às mesmas descritas acima. Para a detecção de massas, um modo de ionização eletrônica, com energia de ionização de 70 eV foi usado. O injetor e o *transfer line* foram mantidos em 220 e 250 °C, respectivamente.

#### **3.2.2.1.3 Identificação dos compostos**

A identificação dos constituintes voláteis foi baseada na comparação de seus índices de retenção linear (índice de Kovats) obtidos experimentalmente com valores tabelados, comparando seus espectros de massas com o banco de dados do sistema (NIST 62 lib) ou com o emprego de padrões certificados.

Para o cálculo do índice de Kovats, uma mistura de padrões de alcanos (C9 a C24) foi adicionada aos isolados e 2 µL injetados no equipamento de GC/MS nas mesmas condições cromatográficas acima citadas, aplicando-se a equação de Van den Dool e Kratz (Equação 4).

$$I_R = 100n + 100 (t_x - t_n) / (t_{n+1} - t_n) \quad \text{Equação 4}$$

Onde n, refere-se ao número de carbonos do alcano que elui antes de x e  $t_x$ ,  $t_n$  e  $t_{n+1}$  referem-se aos tempos de retenção do composto x e dos alcanos que eluíram antes e após o composto x.

### 3.2.3 Preparação dos extratos brutos

Para a preparação dos extratos brutos, o material vegetal (0,250 g) seco e pulverizado (800 µm), foi submetido à extração com metanol, sob refluxo (5 vezes, 4 horas cada). A solução obtida foi filtrada e pré-concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, a temperatura de até 50 °C. Em seguida, o mesmo foi ressuspendido em pequena quantidade de solvente e liofilizado, obtendo-se assim o extrato bruto metanólico.

### 3.2.4 Determinação da atividade antioxidante dos extratos brutos

Para avaliar a atividade antioxidante do extrato de *A. saturoioides* utilizou-se o método de capacidade de captura *in vitro* do radical livre DPPH• (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), de acordo com Germano *et al.*<sup>76</sup> Para a execução deste ensaio, preparou-se soluções dos extratos secos nas concentrações de 10 a 350 (µg mL<sup>-1</sup>) em metanol. Em seguida, transferiu-se 0,5 mL de cada diluição da amostra para tubos de ensaio e então, adicionou-se 3 mL da solução de DPPH 0,1 mmol L<sup>-1</sup> em metanol. Após 30 minutos, as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro de UV/Vis Perkin Elmer (modelo Lambda 25) em 517 nm. Como padrão, utilizou-se ácido ascórbico, nas concentrações de 0,2 a 10 (µg mL<sup>-1</sup>). A porcentagem de inibição do radical DPPH• foi calculada através da fórmula demonstrada na Equação 5, onde AC(0) é a absorbância da solução controle de

DPPH no  $t = 0$  minutos e  $AA(t)$  = absorvância após a adição da amostra teste no  $t = 30$  minutos.

$$\% \text{ inibição} = \frac{A_{C(0)} - A_{A(t)}}{A_{C(0)}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

### 3.2.5 Atividades biológicas

#### 3.2.5.1 Ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente a *A. salina* foi realizado de acordo com metodologia proposta por Meyer *et al.*<sup>125</sup> e Dolabela<sup>56</sup>. Para eclosão dos ovos foram preparados 2 L de solução salina com cloreto de sódio 26,30 g L<sup>-1</sup>, cloreto de potássio 0,75 g L<sup>-1</sup>, cloreto de cálcio 1,11 g L<sup>-1</sup>, cloreto de magnésio 5,10 g L<sup>-1</sup>, brometo de sódio 0,08 g L<sup>-1</sup>, bicarbonato de sódio 0,21 g L<sup>-1</sup> e sulfato de magnésio 6,20 g L<sup>-1</sup>. Essa solução foi colocada em aquário e areada por, no mínimo, 2 horas. Logo após, ajustou-se o pH e a temperatura entre 6,0 e 7,0 e 26 e 28 °C, respectivamente, até a eclosão dos ovos de *A. salina*.

A diluição das amostras foi realizada com solução salina de modo a obter concentrações de 10; 100 e 1000 µg mL<sup>-1</sup> de amostra no tubo de teste, sendo que o volume de adição no tubo foi de 100 µL. Os tubos de ensaio e as ponteiras foram colocados de molho em hipoclorito 5% (v/v) por 24 horas, lavados em água corrente, água destilada e álcool sendo, em seguida, autoclavados.

Foram transferidos para cada tubo de ensaio 10 náupleos com 400 µL de solução salina, e 100 µL de amostra. Como controle negativo e positivo foram empregados solução salina e solução de dicromato de potássio 0,04 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os tubos de ensaio foram mantidos sob temperatura controlada e após 24 horas foram feitas as leituras do número de sobreviventes ou mortos e o número total de náupleos, sendo consideradas mortas as larvas que se mantiveram sem movimento por mais de 10 segundos. A DL<sub>50</sub> foi obtida por regressão linear empregando Microsoft Excel XP.

<sup>56</sup> Dolabela, M. F. Dissertação (Mestrado) UFMG. Belo Horizonte-MG, 1997.

<sup>125</sup> Meyer, B.N. *et al.* Planta Médica. 45 (1982) 31-34.

### 3.2.5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana (NCCLS M7-A6<sup>131</sup>, adaptado)

A atividade antimicrobiana foi determinada através do teste da microdiluição em caldo. Os microorganismos testados incluíram as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 11228), *Shigella* (ATCC 288), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883).

#### 3.2.5.2.1 Preparação do Inóculo

As bactérias testadas foram incubadas em meio ágar Mueller Hinton a 37 °C durante 24 horas. Após esse período, preparou-se uma suspensão dos microorganismos em meio caldo Mueller Hinton ajustando-se a turvação de acordo com o tubo número 0,5 da escala McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). A partir desse tubo, a suspensão foi diluída a 1:100 no meio. Dessa suspensão pipetou-se 100 µL em cada poço com 100 µL das diferentes concentrações dos óleos ou padrões a serem testados.

#### 3.2.5.2.2 Preparação dos óleos a serem testados

Após os óleos terem sido secos e pesados preparou-se uma solução estoque de acordo com a densidade do óleo (aproximadamente 3 mg mL<sup>-1</sup>). Para o preparo da solução estoque foi utilizado metanol numa concentração máxima de 5% (p/v) e caldo Mueller Hinton. A partir da solução estoque foram preparadas diluições seqüenciais (oito diluições), com concentrações pela metade, em caldo Mueller Hinton.

#### 3.2.5.2.3 Preparação de Soluções Padrão

A solução padrão estoque de cloranfenicol foi preparada numa concentração de 80 µg mL<sup>-1</sup>. Após foram feitas as diluições seqüenciais até uma concentração de

---

<sup>131</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards) Approved standard M7-A6, 2003.

---

0,156  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Das soluções com concentrações intermediárias foram pipetados 50  $\mu\text{L}$  de cada concentração nos respectivos poços da microplaca.

#### **3.2.5.2.4 Incubação**

As placas de microdiluição, inoculadas foram incubadas a 37 °C durante 16 a 20 horas. A fim de manter a mesma temperatura de incubação para todas as culturas, as placas foram empilhadas até um número máximo de quatro placas por pilha.

#### **3.2.5.2.5 Determinação Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Para leitura do teste, foi realizada comparação visual do crescimento das bactérias ocorrido nos poços. A CIM foi a menor concentração testada que inibiu completamente o crescimento do organismo nos poços de microdiluição conforme detectado a olho nu.

#### **3.2.6 Análise estatística**

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. Foi utilizado o teste t de Student para a comparação entre médias e análise da variância (ANOVA). O teste foi aplicado com o uso do software InStat® 3.00. As médias foram consideradas significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ . Os dados estão apresentados como as médias dos valores e o desvio padrão, calculados a partir das triplicatas.

## 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

---

*Os resultados deste trabalho estão apresentados em duas partes: a primeira trata-se dos resultados obtidos para *A. saturoioides*. Os mesmos encontram-se subdivididos em ensaios de controle de qualidade (substâncias extraíveis por álcool, teores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, perda por dessecação, saponinas, óleos fixos e teor de flavonóides), teores e caracterização dos óleos essenciais e atividades biológicas, tais como determinação da atividade antioxidante dos extratos brutos metanólicos, ensaio de toxicidade frente a *A. salina* e atividade antimicrobiana. A segunda parte refere-se aos resultados da *B. articulata*, os quais seguem a mesma subdivisão adotada para a *A. sauroioides*.*



#### 4.1 Controle de qualidade de *A. saturoioides*

A qualidade de um fitoterápico é determinada por vários aspectos, em especial por aqueles relacionados com a qualidade da matéria-prima vegetal. Existem vários fatores que determinam esta qualidade. Entre eles encontra-se os referentes à coleta, a qual deve ser realizada em período definido, correspondente a um máximo esperado de substâncias ativas do vegetal <sup>166</sup>. Nesse sentido, estudos relacionados à variação sazonal dos teores de substâncias ativas mostram-se de extrema relevância uma vez que os teores de metabólitos secundários variam em função de diversos fatores.

Com esta finalidade, foram realizadas análises farmacognóstica, tais como substâncias extraíveis por álcool, teores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido (Tabela 2), perda por dessecação, saponinas e teor de óleos fixos nas amostras sazonais de *A. saturoioides*. Todos os resultados representam os valores médios das triplicatas.

**Tabela 2.** Resultados da análise farmacognóstica de *A. saturoioides*

Estação	Substâncias extraíveis por álcool (%; m/m)	Cinzas totais (%; m/m)	Cinzas insolúveis em ácido (%;m/m)	Teor de óleos essenciais (m/m)
Inverno	75,9 ± 0,6 <sup>a</sup>	6,04 ± 0,59 <sup>b</sup>	6,68 ± 2,31 <sup>c</sup>	0,05%
Primavera	80,0 ± 1,3	6,25 ± 1,33 <sup>b</sup>	2,77 ± 1,40	0,10%
Verão	68,0 ± 0,5 <sup>a</sup>	6,66 ± 0,22 <sup>b</sup>	4,02 ± 5,94	0,05%
Outono	79,6 ± 3,4	6,03 ± 0,46 <sup>b</sup>	5,80 ± 6,39 <sup>c</sup>	0,03%

Sendo que: m/m – massa/massa.

<sup>a, b, c</sup> Médias não diferiram significativamente entre si (p>0,05).

Considerando a variação sazonal do teor de substâncias extraíveis por álcool de *A. saturoioides*, observou-se que o verão, estação que apresentou os menores

<sup>166</sup> Senna, E. M. T. L. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) UFRGS Porto Alegre-RS, 1993.

teores ( $68,0 \pm 0,5\%$ ), apontou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a primavera e o outono, estações que exprimiram os maiores teores, ( $80,0 \pm 1,3\%$ ;  $79,6 \pm 3,4\%$ , respectivamente), não diferindo do inverno. Com relação à determinação do teor de cinzas totais para *A. saturoioides* não houve diferença significativamente entre as estações do ano ( $p > 0,05$ ). Todos os resultados cumprem o especificado pela F. Bras.<sup>66</sup> de 8% para este teor.

Em relação ao ensaio de cinzas insolúveis em ácido, não houve diferença significativa entre inverno e outono ( $p > 0,05$ ) estações que apresentaram os mais elevados teores para este ensaio.

A perda por dessecação refere-se a perda em massa, por secagem, condições especificadas, de água e outros componentes residuais voláteis<sup>64</sup>. A importância da perda por dessecação está ligada a estabilidade microbiológica da droga, como expressão de sua suscetibilidade ao desenvolvimento de bactérias e fungos e estabilidade química, representada especialmente pelos processos de hidrólise<sup>196</sup>. A perda por dessecação pode fornecer dados a cerca do rendimento de extração, uma vez que a secagem tem grande influência no estado de integridade das estruturas celulares, expondo-as mais ou menos ao contato com solventes<sup>86</sup>. As porcentagens encontradas para este ensaio foram  $0,12 \pm 0,01\%$  (primavera),  $0,14 \pm 0,01\%$  (verão),  $0,12 \pm 0,04\%$  (outono) e  $0,15 \pm 0,04\%$  (inverno), não apresentando diferença significativa entre si ( $p > 0,05$ ). A partir desses resultados, pode-se observar que os mesmos encontram-se de acordo com os parâmetros estabelecidos pela F. Bras.<sup>66</sup> para esta planta, a qual especifica valores inferiores a 1%.

Uma característica das saponinas é, em solução aquosa, formar espuma persistente e abundante, atividade esta que provém do fato das mesmas apresentarem na sua estrutura uma parte lipofílica (denominada aglicona ou sapogenina) e uma hidrofílica constituída por um ou mais açúcares<sup>176</sup>. Sendo assim, não foi possível determinar o índice de espuma nas amostras de *A. saturoioides*, uma vez que a droga vegetal não apresentou a formação de espuma persistente,

<sup>64</sup> Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

<sup>66</sup> Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

<sup>86</sup> Harbone, J. B.; Mabry, H. Chapman and hall, London, 1975.

<sup>176</sup> Simões, C. M. O. *eyt al.* 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.

<sup>196</sup> World Health Organization. Geneva: WHO (1992) 20-22.

caracterizando ausência de saponinas ou presença em concentrações abaixo do limite de detecção deste método.

Os teores de óleos fixos apresentaram índices de  $17,2 \pm 2,4\%$  (outono),  $16,8 \pm 3,6\%$  (inverno),  $17,7 \pm 1,1\%$  (primavera) e  $16,4 \pm 1,6\%$  (verão) não diferenciando estatisticamente entre as estações ( $p > 0,05$ ). Os óleos fixos compreendem uma mistura de substâncias lipídicas<sup>176</sup>, cuja determinação baseia-se na sua extração por solvente que, após evaporação, deixa como resíduo o óleo cuja quantidade é determinada por pesagem<sup>64</sup>.

#### 4.2 Teores e caracterização dos óleos essenciais de *A. satureioides*

Na determinação dos teores de óleos essenciais para *A. satureioides* por hidrodestilação, empregando aparelho de *clevenger* modificado, pode-se observar que os maiores e menores teores dos constituintes voláteis ocorreram na primavera e outono (0,10% e 0,03%; m/m, respectivamente) (Tabela 2).

Vários fatores podem explicar a variação sazonal nos teores de óleos essenciais, tais como as altas temperaturas, o ritmo circadiano, a idade e o estágio de desenvolvimento da planta<sup>80</sup>, uma vez que na primavera, onde foram obtidos os maiores teores, coincide com o estágio de desenvolvimento vegetativo acentuado desta planta.

Hussain *et al.*<sup>94</sup> ao avaliar a variação sazonal do óleo essencial de *Ocimum basilicum* empregado a mesma metodologia, obteve maiores rendimentos dos óleos essenciais no inverno (0,8%) e menores no verão (0,5%). Os autores justificaram os menores rendimentos ocorridos no verão às altas temperaturas e, conseqüentemente, a parcial evaporação de alguns constituintes do óleo. Em outro estudo empregando *A. satureioides*, os teores encontrados para os óleos essenciais foram de 0,44% (m/m)<sup>60</sup>, diferindo dos valores encontrados neste estudo provavelmente devido as diferentes condições climáticas e edáficas a que foram submetidas.

<sup>60</sup> Duarte, M. C. T. *et al.* J. Ethnopharmacol. 111 (2007) 197-201.

<sup>64</sup> Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

<sup>80</sup> Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. L. Quím. Nova. 30 (2007) 375-381.

<sup>94</sup> Hussain, A. L. *et al.* Food Chem. 108 (2008) 986-995.

<sup>176</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.

Após análise cromatográfica dos constituintes voláteis (Tabela 3 e Figuras 12, 13, 14 e 15) podemos observar que não houve variabilidade em sua composição nas diferentes estações, apenas na proporção dos mesmos.

**Tabela 3.** Constituição química do óleo essencial de *A. saturoioides* obtidos por análise de GC/MS.

Constituintes	t <sub>R</sub>	IR <sup>cal</sup>	Estações (%)				Identif.
			Primavera	Verão	Outono	Inverno	
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos</b>							
A-pineno	7,18	933	41,7	28,5	31,1	30,1	a, b, c
B-pineno	8,75	978	1,71	1,04	1,14	1,87	a, b, c
Mirceno	9,15	989	0,73	0,52	0,25	0,70	a, b
A-terpineno	10,2	1017	0,12	-	-	0,47	a, b
Limoneno	10,8	1029	4,51	6,24	6,10	13,8	a, b, c
Z-Ocimeno	11,0	1036	2,20	1,82	1,02	4,45	a, b
E-Ocimeno	11,5	1046	0,49	0,65	0,51	0,35	a, b
γ-pineno	11,9	1058	0,24	0,39	0,25	0,58	a, b
Terpinoleno	13,1	1086	0,37	0,26	0,25	0,47	a, b
			52,1	39,4	40,6	52,8	
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</b>							
A-copaeno	25,9	1375	3,42	3,64	4,70	3,86	a, b
(E)-cariofileno	27,7	1419	29,9	38,5	36,3	29,8	a, b, c
Aromadendreno	28,5	1438	0,37	0,52	0,63	0,47	a, b
A-humuleno	29,2	1455	3,54	5,59	3,94	4,91	a, b, c
allo-aromadendreno	29,4	1460	0,73	0,91	1,02	0,70	a, b
Γ-muuroloeno	30,0	1475	0,85	1,17	1,14	0,94	a, b
cis-β-guaieno	30,6	1488	0,73	1,04	1,02	0,58	a, b
Ledeno	30,7	1491	0,37	0,65	0,25	0,23	a, b
A-muuroloeno	31,0	1499	0,49	1,17	0,63	0,58	a, b
Γ-cadineno	31,6	1513	1,59	1,30	1,40	0,94	a, b
δ-cadineno	31,9	1523	1,10	1,56	2,03	1,40	a, b
Cadina-1,4-dieno	32,3	1533	0,73	0,65	0,51	0,47	a, b
A-cadineno	32,5	1537	0,61	0,65	0,63	0,47	a, b
A-calacoreno	32,7	1541	0,49	0,65	0,63	0,47	a, b
			44,9	57,9	54,8	45,8	
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>							
Óxido de cariofileno	34,3	1583	0,73	2,47	3,43	1,17	a, b
Total			97,7	99,8	98,9	99,8	

a = identificação baseado no tempo de retenção e padrão de fragmentação observado nos espectros de massas.

b = identificação baseada no índice de retenção linear (índice de Kovats) calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de n-alcenos (IK).

c = identificação baseada em padrão.

Um total de 24 compostos foram identificados, representando (97,7 a 99,8%) do óleo, onde o α-pineno (28,5 a 41,7%) e o (E)-cariofileno (29,8 a 38,5%) foram os constituintes majoritários em todas as estações. O aumento no teor de limoneno é evidenciado no inverno (13,8%).

Os hidrocarbonetos monorpênicos que apresentaram maior porcentagem foram o α-pineno (28,5 a 41,7%) e o limoneno (4,51 a 13,8%). Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos que apresentaram maior porcentagem foram (E)-cariofileno (29,8 a

38,5%) e o  $\alpha$ -humuleno (3,54 a 5,59%). O único sesquiterpeno oxigenado identificado foi o óxido de cariofileno (0,73 a 3,43%). A literatura relata que os sesquiterpenos,  $\beta$ -cariofileno e óxido de cariofileno possuem atividade anticarcinogênica <sup>201</sup>. Neste sentido, a identificação de monoterpênos e sesquiterpênos aponta para uma significativa potencialidade farmacológica deste óleo essencial. Os óleos essenciais analisados consistiram predominantemente de hidrocarbonetos monoterpênicos (39,4 a 52,8%) e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (44,9 a 57,9%).

Liendro *et al.* <sup>109</sup> em estudos com *A. hyperchlora*, uma das oito espécies do gênero *Achyrocline* descritas na América do Sul, juntamente com *A. alata* (Kunth) DC., *A. flaccida* (Weinm), *A. ramosissima* (Sch.Bip), *A. rupestris* Cabrera, *A. satureioides* (Lam) DC., *A. tomentosa* Rusby e *A. venosa* Rusby obtiveram porcentagens de 1,05% para hidrocarbonetos monoterpênicos, 17,4% para monoterpênos oxigenados, 17,3% para hidrocarbonetos sesquiterpênicos e 11,9% para sesquiterpenos oxigenados e rendimentos de óleos essenciais de 0,09% (p/v) apontando diferenças nas proporções dos constituintes voláteis entre algumas espécies deste gênero.

Retta *et al.* <sup>152</sup> avaliando a composição dos óleos essenciais de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. de diferentes regiões da Argentina, obteve rendimentos de óleos essenciais que variaram de 0,1 a 0,8% (p/v). A análise identificou um total de 83 compostos sendo o  $\alpha$ -pineno (25,5 a 55,2%) e  $\beta$ -cariofileno (12,2 a 30,7%) os compostos mais abundantes para todas as amostras. Além destes dois compostos majoritários, outros componentes foram identificados tais como o limoneno (2,5 a 15,0%),  $\alpha$ -humuleno (1,2 a 12,1%),  $\alpha$ -copaeno (0,6 a 2,9%), cis- $\beta$ -ocimeno (0, a 2,8%),  $\delta$ -cadineno (1,0 a 3,0%),  $\beta$ -pineno (0,4 a 1,0%) e cis- $\beta$ -guaino (0,5 a 2,2%).

<sup>109</sup> Liendro, M. N. *et al.* Biochem. System. Ecol. 35 (2007) 720-724.

<sup>152</sup> Retta, D. *et al.* Biochem. System. Ecol. 36 (2009) 877-881.

<sup>201</sup> Zheng, G. Q.; Kenney, P. M.; Lam, L. K. T. J. Nat. Prod. 55 (1992) 999-1003.

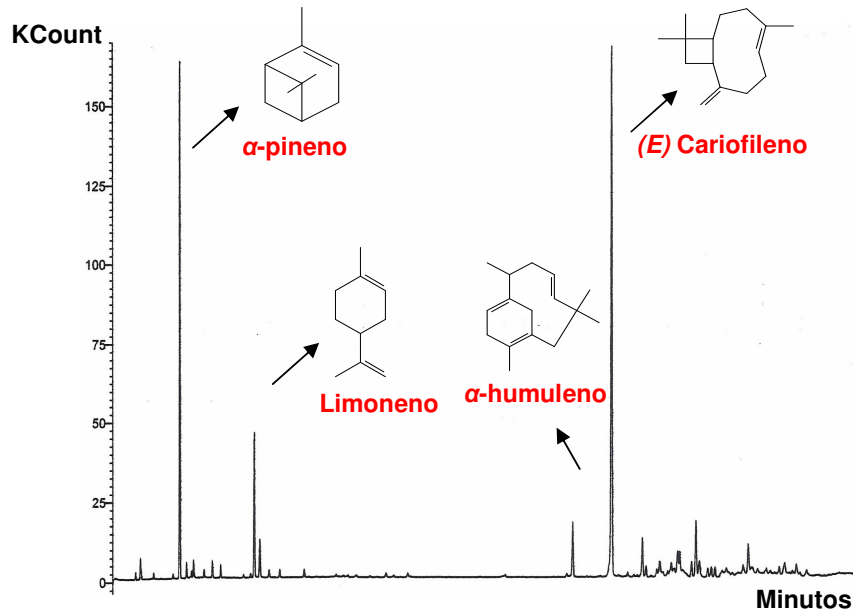


Figura 12. Cromatograma do óleo essencial obtido no verão de *A. satureoides*.

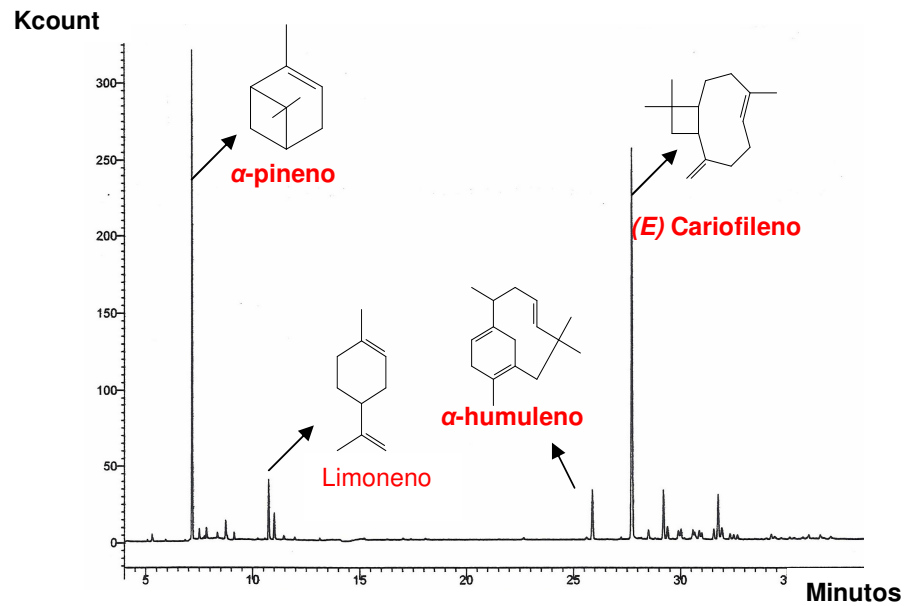


Figura 13. Cromatograma do óleo essencial obtido no outono de *A. satureoides*

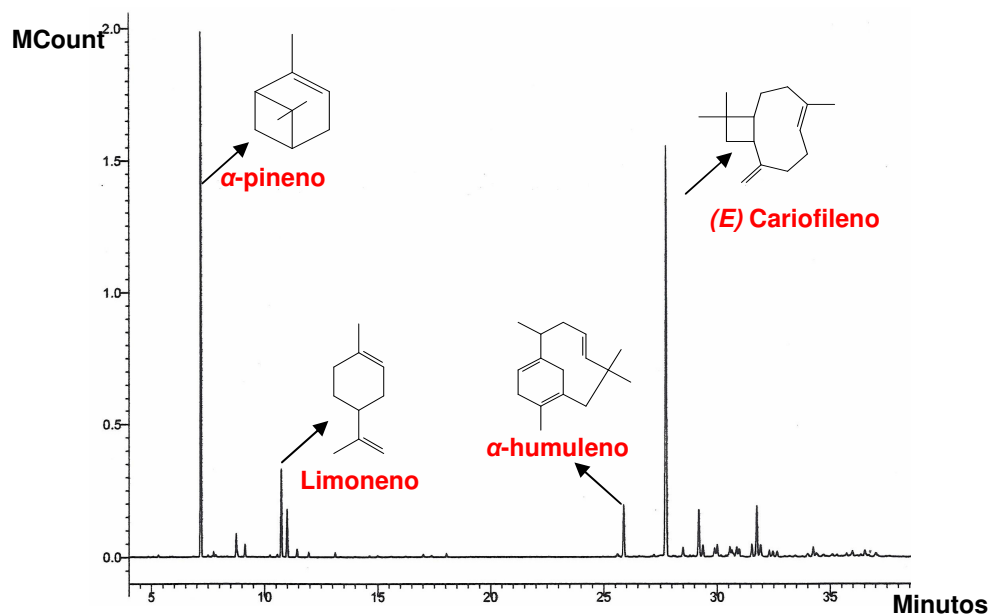


Figura 14. Cromatograma do óleo essencial obtido na primavera de *A. saturioides*.

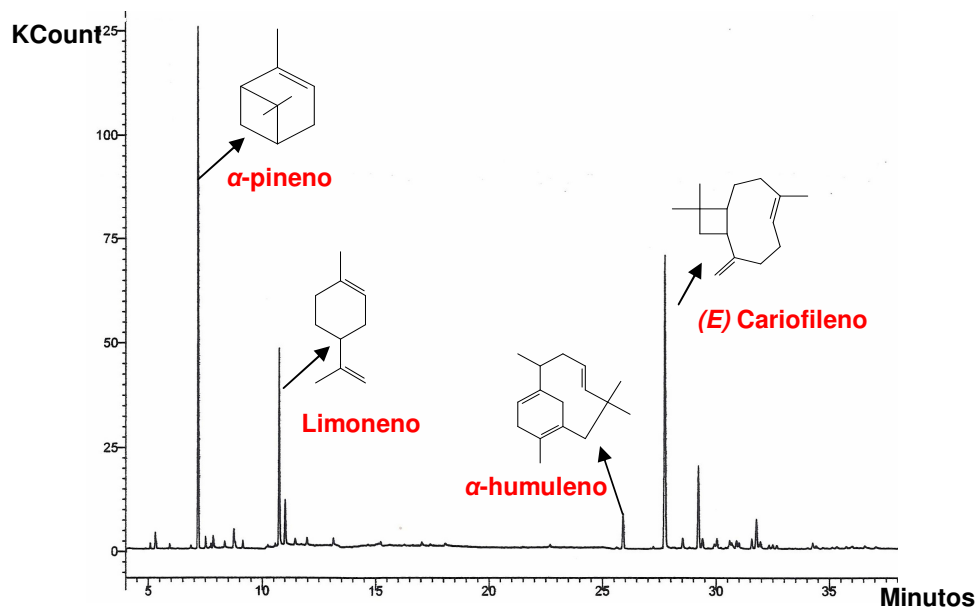


Figura 15. Cromatograma do óleo essencial obtido no inverno de *A. saturioides*.

Após análise dos óleos essenciais por GC/MS, os compostos foram identificados e autenticados comparando seus espectros de massas com o banco de dados do sistema. Deste modo, como exemplo, estão demonstrados os espectros de

massa típicos do limoneno (Figura 16),  $\alpha$ -humuleno (Figura 17),  $\alpha$ -pineno (Figura 18) e (*E*)-cariofileno (Figura 19), compostos identificados nos óleos essenciais de *A. satureoides*.

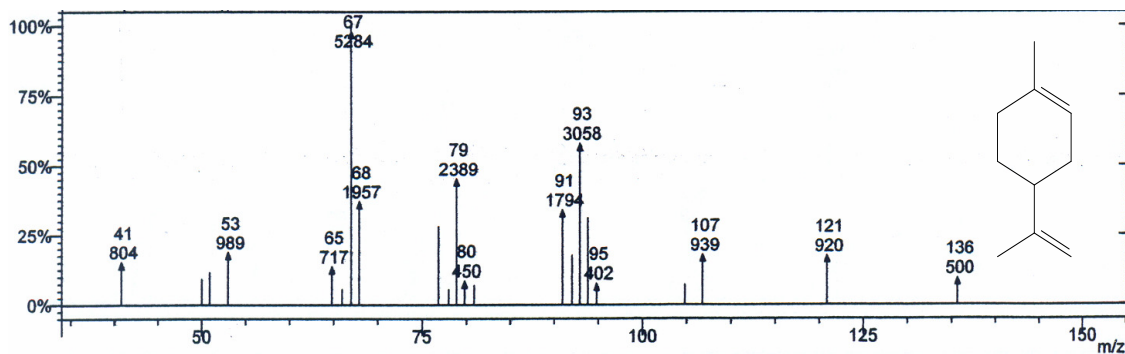


Figura 16. Espectro de massa típico obtido para o limoneno a partir do óleo essencial de *A. satureoides*.

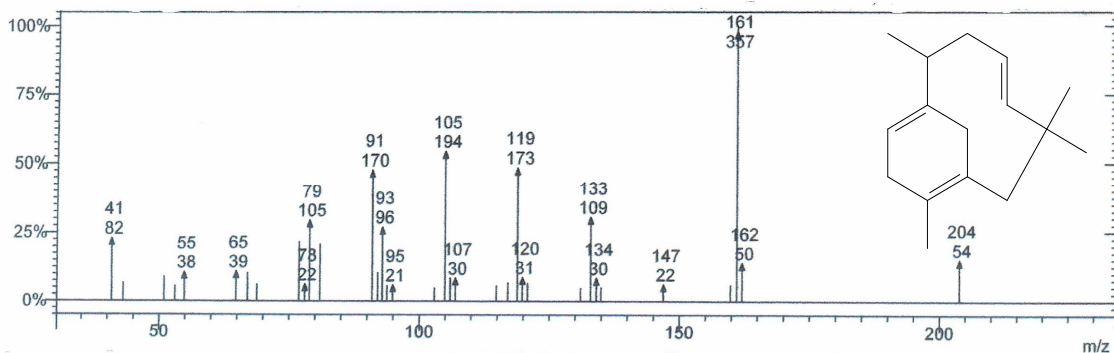


Figura 17. Espectro de massa típico obtido para o  $\alpha$ -humuleno a partir do óleo essencial de *A. satureoides*.

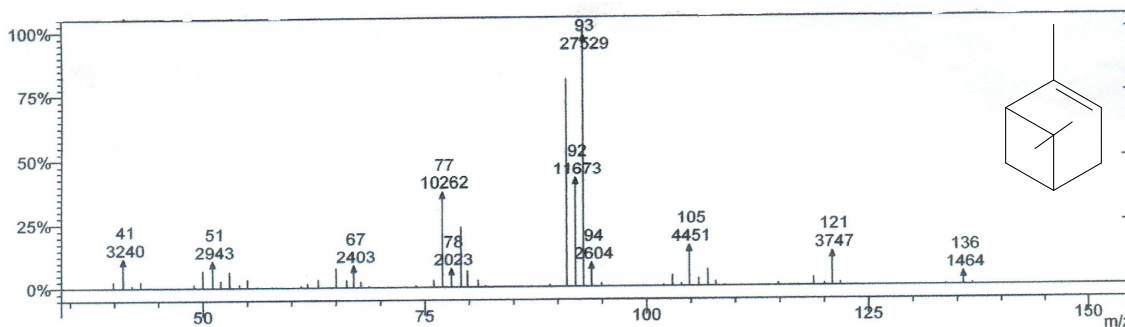
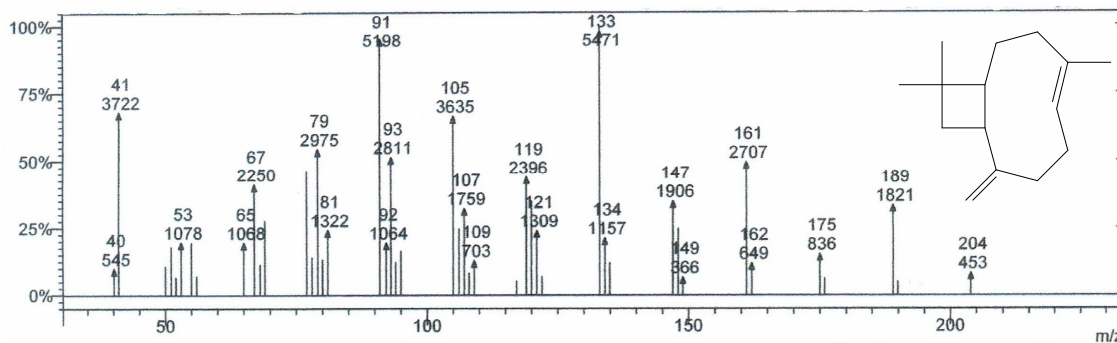


Figura 18. Espectro de massa típico obtido para o  $\alpha$ -pineno a partir do óleo essencial de *A. satureoides*.

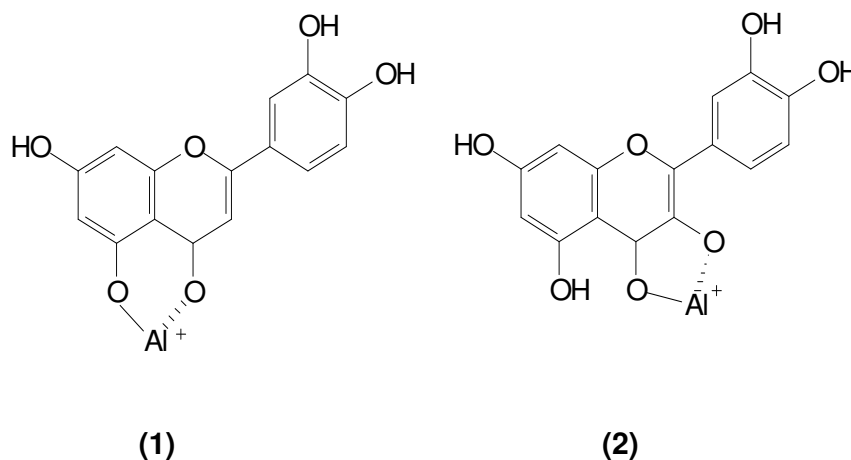




**Figura 19.** Espectro de massa típico obtido para o (*E*)-cariofileno a partir do óleo essencial de *A. satureioides*.

### 4.3 Doseamento de flavonóides para *A. satureioides*

O método utilizado para a determinação de flavonóides, baseado na F. Bras.<sup>66</sup> consiste na extração das agliconas flavonoídicas por um solvente orgânico, após hidrólise ácida e determinação espectrofotométrica em 425 nm, após reação de complexação. Durante a hidrólise uma substância básica, a hexametilenotetramina, é adicionada para complexar leucocianidinas possivelmente presentes no vegetal. Para o doseamento, o agente complexante utilizado é o cloreto de alumínio, que forma complexo com grupamentos cetônicos e hidroxílicos vicinais presentes nos compostos flavonoídicos<sup>121</sup> (Figura 20).



**Figura 20.** Complexos de compostos flavonoídicos com  $\text{AlCl}_3/\text{H}^+$ . (1) Flavonas e (2) Flavonóis. Fonte: Markham<sup>121</sup>.

<sup>66</sup> Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

<sup>121</sup> Markham, K. R. London: Academic, 1982.

Com base neste princípio, as amostras sazonais *A. saturoioides* foram submetidas a ensaio de doseamento de flavonóides totais (Tabela 4 e Figura 21).

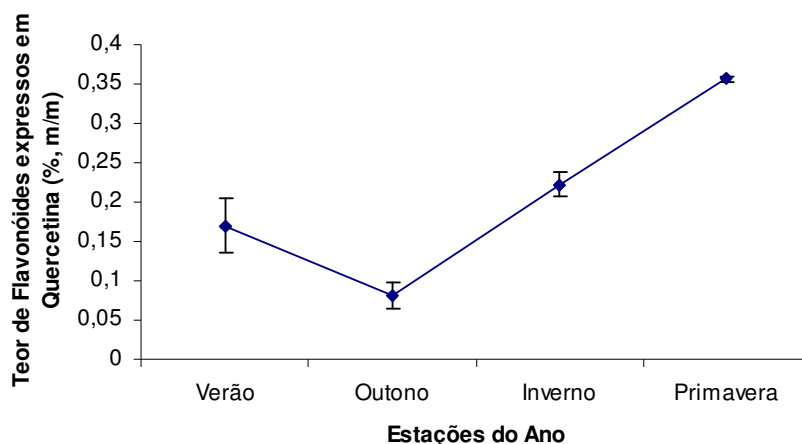
**Tabela 4.** Teor de flavonóides totais para *A. saturoioides*

Estação	Teor de Flavonóides Totais <sup>*a</sup>
Verão	0,17 ± 0,03
Outono	0,08 ± 0,02
Inverno	0,22 ± 0,02
Primavera	0,36 ± 0,01

\*Teor de flavonóides totais calculados como quercetina (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>) (% m/m).

<sup>a</sup> Todas as amostras diferiram estatisticamente entre si (p<0,05).

Pode-se verificar, a partir dos resultados, uma diferença sazonal significativa no teor de flavonóides totais (p<0,05), sendo que na primavera ocorreram os maiores teores de flavonóides totais, expressos em quercetina (0,36 ± 0,01%) e os menores no outono (0,08 ± 0,02%).



**Figura 21.** Teores de flavonóides para *A. saturoioides* nas diferentes estações do ano.

Oliveira *et al.*<sup>138</sup> determinaram o teor de flavonóides em diversas soluções extrativas preparadas a partir de inflorescências de *A. saturoioides*, levando em consideração diferentes teores alcoólicos, tempo de maceração a frio e presença de

<sup>138</sup> Oliveira, A. L. *et al.* Cad. Farm. 17 (2001) 33 - 38.

$\beta$ -ciclodextrinas, obtendo teores que variaram de  $0,050 \pm 0,004$  a  $0,129 \pm 0,002$ , resultados semelhantes aos obtidos neste estudo.

Diversos autores citam a quercetina como um dos principais flavonóides presentes em *A. satureioides*, possuindo potente ação antioxidante capaz de inibir a peroxidação lipídica pela captura de ROS e metais quelantes responsáveis pela geração de ROS<sup>87, 136, 149, 198</sup>. Estes resultados demonstram fortes indícios de atividade antioxidante para esta planta, especialmente na primavera. Porém, não é apenas o conteúdo de flavonóides totais dos extratos que determina a capacidade antioxidante, mas também a razão entre os compostos<sup>149</sup>, tais como conteúdo de polifenóis totais, tornando-se indispensáveis ensaios específicos para atestar a atividade antioxidante dos mesmos.

Outro fato importante que cabe ressaltar, refere-se a coleta desta espécie, que por questões de misticismo e religiosidade é realizada durante a semana santa, durante a época de floração (meses de março e abril, no outono)<sup>166</sup>. Porém, pode-se observar, a partir dos resultados, que este período coincide com o menor teor de flavonóides indicando que não se trata de uma época favorável para tal atividade.

#### 4.4 Preparação dos extratos brutos para *A. satureioides*

Em relação aos rendimentos dos extratos brutos metanólicos obteve-se 14,5% (p/p) no verão, 12,0% (p/p) no outono, 4,8% (p/p) no inverno e 14,6% (p/p) na primavera, destacando-se um menor rendimento no inverno. Na literatura não foram encontrados dados referentes ao rendimento sazonal dos extratos brutos de *A. satureioides*. Duarte *et al.*<sup>60</sup>, obtiveram rendimento de 32,7% (p/p) para o extrato etanólico de *A. satureioides*. Lucas *et al.*<sup>115</sup>, obtiveram rendimentos de 5,85% empregando soxhlet usando hexano como solvente extrator. Os mesmos autores citam que empregando condições brandas (maceração ou ultra-som) os rendimentos são menores quando comparados a soxhlet ou sonda ultrassônica.

<sup>60</sup> Duarte, M. C. T. *et al.* J. Ethnopharmacol. 111 (2007) 197-201.

<sup>87</sup> Harborne, J.B.; Williams, C. A. Phytochem. 55 (2000) 481-504.

<sup>115</sup> Lucas, D. A. P. *et al.* Anais da 32<sup>o</sup> Reunião Anual da SBQ, 2008.

<sup>136</sup> Ohshima, H. *et al.* Free Rad. Biol. Med. 25 (1998) 1057-1065.

<sup>149</sup> Polydoro, M. *et al.* Life Scienc. 74 (2004) 2815-2826.

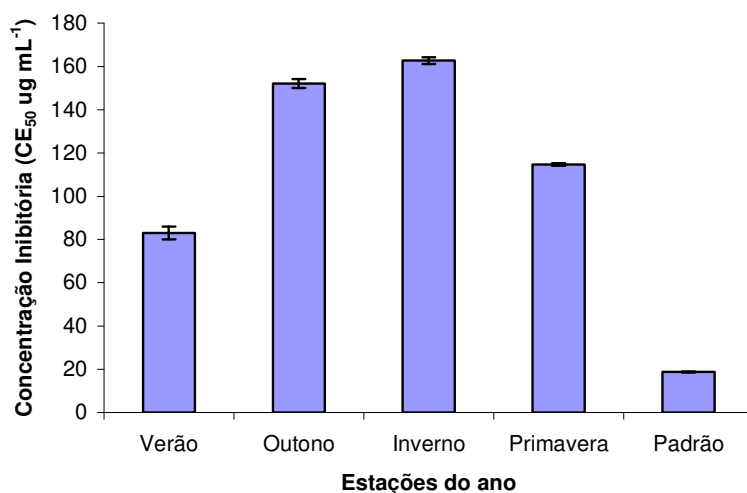
<sup>166</sup> Senna, E. M. T. L. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas). UFRGS Porto Alegre-RS, 1993

<sup>198</sup> Yamamoto, N. *et al.* Arch. Biochem. Biophysics. 372 (1999), 347-354.

#### 4.5 Determinação de atividade antioxidante para *A. satureioides*

Várias pesquisas têm avaliado a natureza química e a atividade de antioxidantes de plantas. Estes antioxidantes isolados apresentaram como constituintes principalmente os polifenóis, os quais demonstraram amplas atividades biológicas como antibacteriana, anticarcinogênica, antiinflamatória, antialérgica, antioxidante e antiviral<sup>107</sup>. A atividade antioxidante dos polifenóis pode ser atribuída principalmente as suas propriedades redutoras, os quais doam hidrogênio, neutralizando os radicais de oxigênio<sup>16</sup>. Os compostos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes fenólicos, são estáveis devido à presença do anel aromático, o qual entra em ressonância, estabilizando a estrutura<sup>88</sup>.

Para este estudo, pode-se observar a nítida variação sazonal ( $p < 0,05$ ), onde as menores atividades antioxidantes (Figura 22), que apresentam os maiores valores para  $CE_{50}$  (concentração capaz de capturar 50% dos radicais livres *in vitro*), foram observados no inverno ( $163 \pm 2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e outono ( $152 \pm 2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e as maiores no verão ( $83,0 \pm 3,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Como padrão empregou-se o ácido ascórbico apresentando uma  $CE_{50}$  de  $18,7 \mu\text{g mL}^{-1} \pm 2,1$  ( $y = 2,6458x + 0,462$ ;  $R^2 = 0,9971$ ).



**Figura 22.** Atividade antioxidante expressa em concentração eficiente ( $CE_{50}$ ) método de capacidade de captura *in vitro* do radical livre DPPH $\cdot$  (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) para *A. satureioides* nas diferentes estações do ano.

<sup>16</sup> Atoui, A. K. *et al.* Food Chem. 89 (2005) 27-36.

<sup>88</sup> Haslam, E. J. Nat. Prod. 59 (1996) 205-215.

<sup>107</sup> Larson, R. A. Phytochem. 27 (1988) 969-978.

Na literatura não foram encontrados valores de referência de  $CE_{50}$  para esta droga vegetal, empregando esta metodologia, apenas Souza *et al.*<sup>185</sup> relata que, quanto maior for o consumo de DPPH pela amostra, maior será a sua atividade antioxidante e menor será a sua  $CE_{50}$ . Ferraro *et al.*<sup>69</sup>, em estudo sobre a atividade antioxidante do extrato metanólico das inflorescências de *A. satureioides*, coletada na Argentina, empregando a mesma metodologia, demonstrou que a atividade antioxidante apresentou grande variabilidade dependendo da origem das amostras, com a  $CE_{50}$  variando de 4,5 a 23,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Podemos observar que os resultados obtidos neste estudo diferiram do autor supracitado, demonstrando uma menor atividade antioxidante indicando a necessidade de observar o local e período da coleta a fim de assegurar a uniformidade e sua qualidade.

Acredita-se que a grande concentração e a diversidade de antioxidantes presentes nas plantas devem-se ao fato de que as mesmas precisam se proteger dos radicais livres gerados pelo estresse oxidativo, provocado pelos raios solares e pela exposição ao oxigênio<sup>176</sup> sugerindo que as maiores atividades antioxidantes sejam devido as maiores incidências de radiação solar a qual a planta tenha sido exposta. Esta afirmação pode ser confirmada pelo fato do verão ter apresentado a maior incidência de radiação global, ou seja, 1718  $\text{W m}^{-2}$  e o inverno e o outono os menores (1112  $\text{W m}^{-2}$  e 1162  $\text{W m}^{-2}$ , respectivamente).

Em estudo realizado por Asolini *et al.*<sup>14</sup>, a atividade antioxidante dos extratos aquosos e etanólicos das folhas da *A. satureioides*, dentre outras plantas medicinais, foi avaliada através do método de descoloração do  $\beta$ -caroteno. Neste estudo, os extratos aquosos e etanólicos da macela apresentaram atividade antioxidante superior a 97% e 98%, respectivamente, após três horas de reação, sendo uma das melhores atividades obtidas dentre as plantas analisadas.

Na pesquisa realizada por Ferraro *et al.*<sup>69</sup> verificou-se a existência de correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos presentes no extrato da macela e a sua atividade antioxidante. Com base no exposto, é provável que a atividade antioxidante demonstrada neste estudo esteja relacionada à presença de compostos fenólicos, dentre os quais se destacam os flavonóides<sup>70</sup>.

<sup>14</sup> Asolini, F. C.; Tedesco, A. M.; Carpes, S. T. Braz. J. Food Techn. 9 (2006) 209-215.

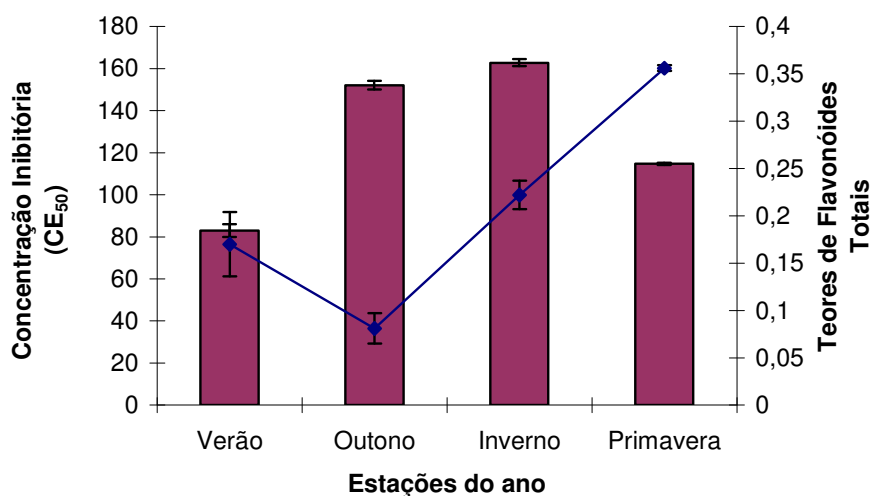
<sup>69</sup> Ferraro, G. *et al.* Latin. American. J. Pharm. 27 (2008) 626-628.

<sup>70</sup> Ferraro, G. E. *et al.* 20 (1981) 2053-2054.

<sup>176</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.

<sup>185</sup> Souza, C. M. M. *et al.* Quím. Nova. 30 (2007) 351-355

Correlacionado a atividade antioxidante com o teor de flavonóides totais expressos em teor de quercetina (Figura 23) podemos observar que a primavera apresentou alta atividade antioxidante coincidindo com os maiores teores de flavonóides totais, e no verão, onde as menores atividades antioxidantes foram obtidas, observou-se os menores teores de flavonóides totais. Porém, no inverno foram observados altos teores de flavonóides totais e uma menor atividade antioxidante.



**Figura 23.** Correlação sazonal entre os teores de flavonóides totais (linhas) e atividade antioxidante (barras) obtidos para *A. saturoioides*.

Este resultado pode estar associado ao fato dos flavonóides presentes nas plantas, estarem desempenhando outra função na planta neste período, tendo em vista que, além da proteção dos vegetais contra a incidência de radiação ultravioleta e visível e antioxidante, os flavonóides exercem a função de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atraentes de animais com finalidade de polinização; controle de ação de hormônios vegetais agentes alelopáticos e inibição de enzimas

176

## 4.6 Atividades biológicas para *A. saturoioides*

### 4.6.1 Ensaio de toxicidade frente a *A. salina* para *A. saturoioides*

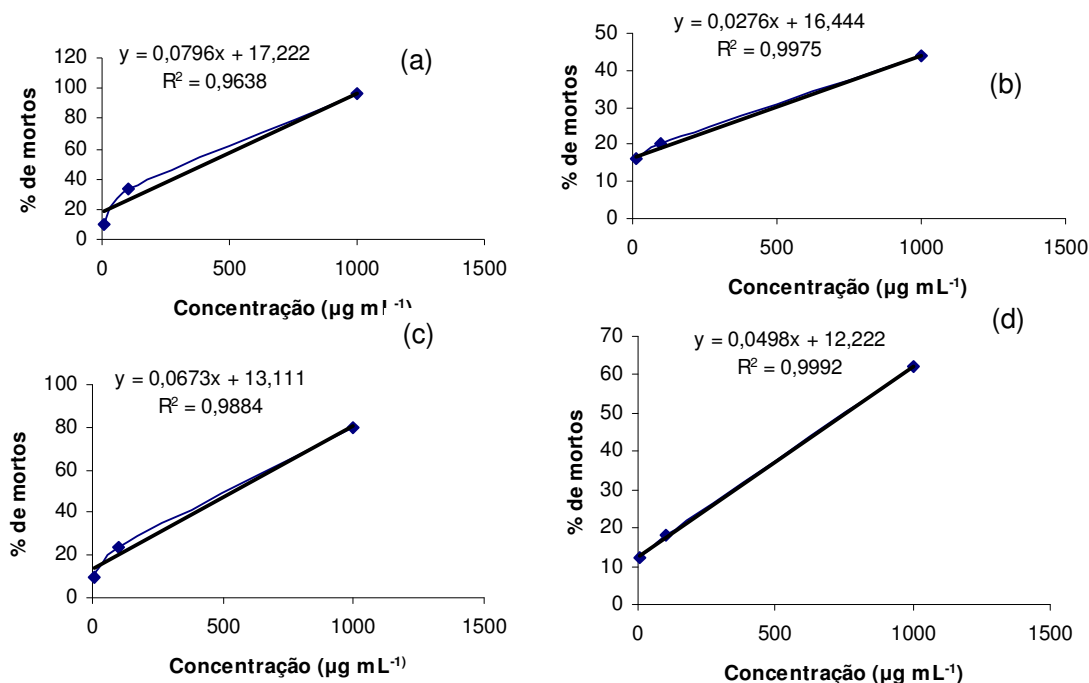
Dolabela <sup>56</sup> em seus estudos estabeleceu um critério de classificação de extratos com base nos níveis de CL<sub>50</sub> (concentração capaz de matar 50% dos náuplios) em *A. salina*, sendo que extratos com CL<sub>50</sub> menor que 80 µg mL<sup>-1</sup> eram considerados altamente tóxicos, CL<sub>50</sub> entre 80 µg mL<sup>-1</sup> e 250 µg mL<sup>-1</sup>, moderadamente tóxicos e CL<sub>50</sub> maior que 250 µg mL<sup>-1</sup>.

Com base nesta classificação, a letalidade frente a *A. salina* para os extratos brutos das partes aéreas obtidas nas diferentes estações de *A. saturoioides* foi realizada (Tabela 5 e Figuras 24).

**Tabela 5.** Ensaio de toxicidade frente a *A. salina*, realizada com o extrato bruto de *A. saturoioides* nas diferentes estações.

Concentração µg mL <sup>-1</sup>	Número de mortos					Média	% de Mortos
<b>Primavera</b>							
10	0	0	2	3	0	1	16
100	3	4	3	4	3	3,4	34
1000	10	10	10	10	8	9,6	96
<b>Verão</b>							
10	0	1	1	3	3	1,6	16
100	2	2	3	2	1	2	20
1000	6	4	3	4	5	4,4	44
<b>Outono</b>							
10	2	0	1	3	0	1,2	12
100	1	3	1	2	2	1,8	18
1000	9	6	6	6	4	6,2	62
<b>Inverno</b>							
10	0	0	0	2	3	1	10
100	2	1	4	2	3	2,4	24
1000	8	10	8	7	7	8	80

<sup>56</sup> Dolabela, M. F. Dissertação (Mestrado) UFMG, Belo Horizonte-MG, 1997.



**Figura 24.** Ensaio de toxicidade frente à *A. salina*, realizada com o extrato bruto de *A. satureioides* obtido na primavera (a), verão (b), outono (c) e inverno (d).

A partir da equação da reta, foram calculadas as  $CL_{50}$  ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para cada amostra (Tabela 6). Considerando a classificação de Dolabela<sup>56</sup>, pode-se afirmar que os extratos obtidos na primavera ( $411 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), outono ( $758 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e inverno ( $548 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) podem ser considerados como de baixa toxicidade.

Os extratos obtidos no verão foram considerados inativos com base na classificação de Meyer *et al.*<sup>125</sup> que consideram inativos os extratos onde todos os náuplios sobrevivem a uma concentração maior que  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Tabela 6.**  $CL_{50}$  obtidas no ensaio de toxicidade frente a *A. salina*, realizada com amostras de *A. satureioides*.

Estação	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Primavera	411
Verão	> 1000
Outono	758
Inverno	548

A análise dos dados demonstrou variação na toxicidade para as quatro estações. As atividades biológicas de uma mesma planta, coletada em diferentes

<sup>56</sup> Dolabela, M. F. Dissertação (Mestrado) UFMG, Belo Horizonte-MG, 1997.

<sup>125</sup> Meyer, B.N. *et al.* Planta Médica. 45 (1982) 31-34.



períodos do ano, demonstram significativa variação, o qual podem ser atribuído as alterações na quantidade de compostos ativos presentes em cada planta em diferentes estações. Alterações na composição químicas podem ser explicadas em termos de ação termoreguladora dos compostos hidrofóbicos, o qual podem proteger a planta da desidratação. Além disso, compostos polares (triterpenos, flavonóides, diterpenos) presentes na planta podem agir como barreira física para prevenir este processo<sup>86, 168</sup>. Sendo assim, haveria a necessidade de uma análise mais detalhada na composição dos extratos nas diferentes estações a fim de justificar esta variação, apesar de autores atribuir estes resultados a efeitos antagônicos ou sinérgicos entre componentes majoritários e minoritários, bem como outras moléculas presentes na planta<sup>98</sup>.

Além disso, as menores CL<sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram observadas na primavera, onde os maiores teores de flavonóides totais foram observados. Cao *et al.*<sup>34</sup> propôs que a citotoxicidade dos extratos pode ser devido ao potencial pró-oxidante. Sabe-se que flavonóides agem como antioxidantes contra radicais livres, porém os mesmos têm demonstrado ação pró-oxidante quando metais de transição, tais como ferro e cobre, estão disponíveis. Neste sentido, extratos de plantas medicinais que contém alta concentração de flavonóides e demonstram alta proteção antioxidante *in vitro* nem sempre podem produzir os maiores benefícios<sup>149</sup>.

Rojas de Arias *et al.*<sup>157</sup> em estudos com plantas do gênero Asteraceae do Paraguai obteve CL<sub>50</sub> 668  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para os extratos hexânicos das sementes e folhas de *A. satureioides* e das inflorescências CL<sub>50</sub> 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Para os extratos etanólicos das folhas, inflorescências e sementes os valores encontrados foram superiores a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Por outro lado, para os extratos etanólicos das raízes os valores para CL<sub>50</sub> foram de 57,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  apresentando toxicidade frente a *A. salina*.

#### 4.6.2 Atividade Antimicrobiana para *A. satureioides*

A atividade biológica de plantas medicinais tem sido objeto de intensa

<sup>34</sup> Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. Free Radic. Biol. Med. 22 (1997) 749–760.

<sup>86</sup> Harbone, J. B.; Mabry, H. Chapman and hall, London, 1975.

<sup>98</sup> Kamatou, G. P. P. *et al.* South African J. Bot. 74 (2008) 230–237.

<sup>149</sup> Polydoro, M. *et al.* Life Scienc. 74 (2004) 2815-2826.

<sup>157</sup> Rojas De Arias, A. *et al.* J. Ethnopharmacol. 45 (1995) 35–41.

<sup>168</sup> Sikkema, J. *et al.* J. Biol. Chem. 269 (1994) 8022-8028.

investigação científica. Plantas superiores e aromáticas são amplamente utilizadas na medicina popular, uma vez que apresentam amplo espectro de atividade e inibição comprovada contra bactérias e fungos<sup>93</sup>. A maioria dessas propriedades é conferida por produtos do metabolismo secundário, como terpenóides e compostos fenólicos, que também na forma pura exibem atividade<sup>2</sup>. Trabalhos recentes sobre a atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais mostram o grande potencial de aplicação de plantas nativas de diversas regiões do mundo. No Brasil, estudos com a mesma finalidade são de grande importância, uma vez que plantas medicinais são utilizadas em várias áreas da saúde como forma alternativa de tratamento. Além disso, nosso país apresenta uma rica biodiversidade, devendo-se considerar o custo mais baixo destas formas terapêuticas em relação a medicamentos industrializados

58

A análise antimicrobiana (Tabela 7) revelou que o óleo de *A. saturoioides*, quando testado frente a sete cepas bacterianas ATCC, apresentou uma atividade de 340  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (primavera), 637  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (verão) e 37,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (outono) e 38,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (inverno) frente a cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 11228; 755,88  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (primavera), 37,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (outono) e 76,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (inverno) frente a cepa de *Bacillus cereus* ATCC11778 e 604  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (primavera), 159  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (verão), 37,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (outono) e 76,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (inverno) frente a cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Frente a *E. coli* todos os valores de MIC foram maiores que 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concordando com resultados obtidos por Duarte *et al.*<sup>60</sup>.

Aligiannis *et al.*<sup>1</sup> propuseram uma classificação para materiais de plantas, baseado nos resultados de CIM (Concentração Inibitória Mínima). Fortes inibidores – CIM inferiores a 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$ ; inibidores moderados – CIM entre 0,6 e 1,5  $\text{mg mL}^{-1}$ ; e inibidores fracos – CIM acima de 1,6  $\text{mg mL}^{-1}$ . Porém, Duarte *et al.*<sup>59</sup> caracterizaram o extrato como potencialmente antimicrobiano aquele onde a inibição em concentrações vegetais foi de até 2  $\text{mg mL}^{-1}$ .

<sup>1</sup> Aligiannis, N. *et al.* J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 4168-4170.

<sup>2</sup> Adam, K. *et al.* J. Agric. Food Chem. 46 (1998) 1739-1745.

<sup>58</sup> Duarte, M. C. T. *et al.* Rev. Bras.Farmacogn. 14 (2004) 06-08.

<sup>59</sup> Duarte, M. C. T. *et al.* J. Ethnopharmacol. 97 (2005) 302-311.

<sup>60</sup> Duarte, M. C. T. *et al.* J. Ethnopharmacol. 111 (2007) 197-201.

<sup>93</sup> Hulin, V. *et al.* Sciences des Aliments.18 (1998) 563-582.

**Tabela 7.** Variação sazonal na atividade antimicrobiana do óleo essencial de *A. saturoioides*.

Cepas	Estação do ano (MIC expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*				
	Padrão de cloranfenicol	Verão	Outono	Inverno	Primavera
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	40	>1275	>1213	>1228	>1209
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	30	>1275	>1213	>1228	>1209
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 11228	1,25	637	37,9	38,4	340
<i>Shigella</i> ATCC 288	1,25	>1275	>1213	>1228	>1209
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	1,25	>1275	37,9	76,8	755
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	3,75	>1275	>1213	>1228	>1209
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	1,25	159,4	37,9	76,8	604

\* Médias do teste em duplicata.

Pode-se observar que as mais significativas atividades antimicrobianas foram obtidas no outono e inverno. Estes resultados concordam com Hussain *et al.*<sup>94</sup> que relata que, os óleos essenciais do outono e inverno exibem uma maior atividade antimicrobiana. Porém, estes autores atribuem esta maior atividade a presença de altos teores de compostos oxigenados nas amostras, resultados que discordam com os obtidos neste estudo, uma vez que o único sesquiterpêno oxigenado identificado foi o óxido de cariofileno (0,73 a 3,43%).

Além disso, as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais parecem estar associadas a altos teores de hidrocarbonetos monoterpênicos, especialmente  $\alpha$ -pineno. A atividade antimicrobiana destes compostos foi relatada através da capacidade de destruir a integridade celular, inibição da respiração e processo de transporte iônico e aumento da permeabilidade da membrana das células<sup>48, 179</sup>. Sendo assim, podemos inferir que a atividade antimicrobiana pode estar relacionada aos hidrocarbonetos monoterpênicos (39,4 a 52,8%) obtidas neste estudo, especialmente o  $\alpha$ -pineno (28,5 a 41,7%) e o limoneno (4,51 a 13,8%), compostos que mostraram-se em maiores proporção nas amostras analisadas.

Análise de variância revela uma variação sazonal ( $p < 0,05$ ) sobre a atividade antimicrobiana. Estas variações podem ser atribuídas a diferente composição

<sup>48</sup> Cox, S. D. *et al.* J. Appl. Microbiol. 88 (2000) 170-175.

<sup>94</sup> Hussain, A. L. *et al.* Food Chem. 108 (2008) 986-995.

<sup>179</sup> Siqueira, N. C. S. *et al.* Rev. Bras. Farm. 3 (1985) 36-39.

química dos óleos. Alguns autores demonstram que alterações na composição química dos óleos essenciais afetam diretamente suas atividades biológicas<sup>38, 190</sup>. Neste sentido, a atividade antibacteriana varia de acordo com o período da coleta da planta, atribuídas as alterações sazonais na temperatura e umidade, bem como os diferentes estágios de desenvolvimento da planta. Sendo assim, as plantas podem ser usadas como fontes de material para a produção de medicamentos e cosméticos, porém considerando as variações sazonais, o material vegetal deve ser continuamente avaliado, antes do seu emprego<sup>90, 94</sup>.

Em outros estudos Gillij *et al.*<sup>78</sup> analisaram os constituintes do óleo essencial de *A. saturoioides*. Dentre os terpenos, o terpineno apresentou-se como o constituinte majoritário, seguido do limoneno e do  $\alpha$ -pineno. Lorenzo *et al.*<sup>114</sup> pesquisando os constituintes de óleos essenciais de *A. saturoioides* de amostras provenientes do Brasil e Uruguai obteve hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos em maior porcentagem (38,8 e 48,7%; 57,3 e 22,1% para Brasil e Uruguai, respectivamente). O  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -pineno foram os constituintes majoritários das amostras de ambas regiões, mas a concentração relativa apresentou variações.

---

<sup>38</sup> Celiktas, O. Y. *et al.* Food Chem. 100 (2007) 553-559.

<sup>78</sup> Gillij, Y. G. *et al.* Biores. Technol. 99 (2008) 2507-2515.

<sup>90</sup> Hess, S. *et al.* Quím nova. 30 (2007) 370-373.

<sup>94</sup> Hussain, A. L. *et al.* Food Chem. 108 (2008) 986-995.

<sup>114</sup> Lorenzo, D. *et al.* Planta Médica, Janeiro, p. 476-477, 2000.

<sup>190</sup> Van Vuuren, S. F. *et al.* South. African. J. Botan. 73 (2007) 441-448.

#### 4.7 Controle de qualidade de *B. articulata*

As plantas medicinais constituem importantes recursos terapêuticos para o tratamento de doenças, principalmente das populações das nações em desenvolvimento. Servem tanto à conhecida "medicina caseira", que faz parte da cultura popular destes países, como de matéria-prima para elaboração de medicamentos fitoterápicos ou extração de compostos químicos com atividade terapêutica<sup>72</sup>. Porém, a fitoterapia existe principalmente no mercado informal, o que representa grande perigo à saúde da população, pois neste caso, sua comercialização ocorre desconsiderando os aspectos relativos ao controle de identidade e/ou pureza. Portanto, é indiscutível a necessidade de um controle, pois os fitoterápicos representam uma alternativa economicamente viável à população<sup>20</sup>. Sendo assim, os ensaios preconizados pela F. Bras.<sup>64</sup> para o controle de qualidade de plantas medicinais (substâncias extraíveis por álcool, cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido, índice de espuma, perda por dessecação, teor de óleos fixos e teor de flavonóides) foram realizados para *B. articulata* (Tabela 8). Todos os resultados obtidos foram expressos em valores médios das triplicatas.

**Tabela 8.** Resultados da análise farmacognóstica de *B. articulata*.

	Substâncias Extraíveis por Álcool (%)	Cinzas Totais (%)	Cinzas Insolúveis em Ácido (%)	Índice de Espuma (mL)
Inverno	35,7 ± 0,6	2,87 ± 0,08	0,24 ± 0,01	266 ± 17 <sup>b</sup>
Primavera	20,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,40 ± 0,04	0,18 ± 0,01	250 ± 27 <sup>b</sup>
Verão	18,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,54 ± 0,21	0,14 ± 0,01	250 ± 31 <sup>b</sup>
Outono	58,0 ± 4,7	4,46 ± 0,05	0,15 ± 0,00	250 ± 13 <sup>b</sup>

Sendo que: m/m – massa/massa.

<sup>a</sup> e <sup>b</sup> = valores apresentaram-se estatisticamente semelhantes entre si ( $p > 0,05$ ).

Considerando o teor de substâncias extraíveis por álcool, das partes aéreas

<sup>64</sup> Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

<sup>72</sup> Freitas, P. C. D. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, 1999

de *B. articulata*, pode-se observar que o mesmo apresentou o maior índice no outono ( $58,0 \pm 4,7\%$ ) e o menor índice no verão ( $18,1 \pm 0,3\%$ ). Apesar dos elevados teores terem sido verificados no outono, o conteúdo de substâncias extraíveis por álcool não indica que no resíduo encontram-se os constituintes ativos da planta. Este parâmetro apenas estabelece algumas condições adicionais para o controle de qualidade da matéria-prima vegetal, úteis por sua praticidade e baixo custo <sup>123</sup>.

O conteúdo de cinzas totais estabelece a qualidade de substância residual não volátil no processo de incineração. As cinzas totais constituem-se das cinzas fisiológicas e não-fisiológicas e, quando se acrescenta ácido sulfúrico, as cinzas fisiológicas ou orgânicas são consumidas restando os constituintes silicosos e sílica presente no material <sup>43</sup>. Neste sentido, a determinação do teor de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes. Com relação a esta análise para *B. articulata*, os valores apresentados foram superiores no outono ( $4,46 \pm 0,05\%$ ) e inferiores no verão ( $1,54 \pm 0,21\%$ ), possivelmente pela irregularidade do índice pluviométrico característico deste período. A partir desses dados, pode-se observar uma correlação entre os teores de substâncias extraíveis por álcool e cinzas totais, os quais foram ambos superiores no outono e inferiores no verão. Budel; Duarte; Santos <sup>29</sup> realizando estudos com *B. articulata*, *B. cylindrica*, *B. dracunculifolia*, *B. gaudichaudiana*, encontraram valores de  $5,67 \pm 0,11\%$ ;  $4,00 \pm 0,21\%$ ;  $4,56 \pm 0,07\%$ ; e  $3,45 \pm 0,22\%$ , respectivamente, para os teores de cinzas totais.

Os resultados obtidos para as cinzas insolúveis em ácido no inverno ( $0,24 \pm 0,01\%$ ), primavera ( $0,18 \pm 0,01\%$ ), verão ( $0,14 \pm 0,01\%$ ) e outono ( $0,15 \pm 0,00\%$ ), demonstram que houve variações nas diferentes estações do ano ( $p < 0,05$ ). Budel; Duarte & Santos <sup>29</sup> obtiveram resultados superiores ( $0,84 \pm 0,02\%$ ) aos encontrados neste estudo. Ortins & Akisue <sup>142</sup>, em estudos realizados, apresentaram teores de cinzas insolúveis de 1,77% e 0,9% nos extratos obtidos pelos processos A e C da Farmacopéia Brasileira, respectivamente. Através da comparação dos resultados obtidos neste estudo e os obtidos pelos autores citados, observa-se menores teores para cinzas totais e cinzas insolúveis em ácidos, demonstrando menor presença de

<sup>29</sup> Budel, J. M.; Duarte, M. R.; Santos, C. A. M. Rev. Bras. Farmacogn. 14 (2004) 41-48.

<sup>43</sup> Cirio, G. M. et al. Visão Acadêmica. 4 (2003) 67-76.

<sup>123</sup> Mello, J. C. P.; Petrovick, P. R. Act. Farmac. Bonaer. 19 (2000) 211-215.

<sup>142</sup> Ortins, G. M. M.; Akisue, G. Pers. Lecta. 18 (2000) 9-32.

impurezas inorgânicas não-voláteis.

De acordo com a literatura, não existem teores máximos para cinzas totais e insolúveis em ácido estabelecidos oficialmente para a espécie em estudo. Entretanto, seus índices apresentaram-se menores em relação aos apresentados em outras espécies, como *Centella asiatica*, *Malva sylvestris* (11 e 16%, respectivamente) e, além disso, baixos teores de cinzas totais seriam indicativos de cuidados observados na obtenção dessas matérias-primas<sup>29, 65</sup>.

Em relação à perda por dessecação os valores encontrados foram de  $10,2 \pm 0,01\%$  (primavera),  $9,82 \pm 0,01\%$  (verão),  $10,13 \pm 0,02\%$  (outono) e  $10,9 \pm 0,1\%$  (inverno). Os resultados obtidos encontram-se entre 8,0 a 14,0% preconizado pela F. Bras.<sup>64</sup> indicando que não há excesso de umidade na matéria-prima vegetal. A avaliação estatística permitiu verificar que não houve diferença significativa entre as amostras ( $p > 0,05$ ). Estes resultados estão em concordância com Budel; Duarte & Santos<sup>29</sup>, os quais encontraram resultados para teor de umidade e perda por dessecação de 8,1 e 10,8 (mL 100 g<sup>-1</sup>), respectivamente para a mesma planta.

Apesar dos resultados obtidos indicarem uma variação sazonal nos teores de cinzas e cinzas totais para *B. articulata*, Chicourel *et al.*<sup>40</sup> avaliando os teores de umidade e cinzas em função das estações do ano para três espécies de *Baccharis* incluindo a *B. trimeria* DC., evidenciaram que esses teores não se alteram sazonalmente para as espécies estudada.

Com relação aos valores do índice de espuma aferidos durante as análises realizadas nas amostras de *B. articulata*, percebeu-se que, após tratamento estatístico, não houve diferença entre as estações, sugerindo que, para substâncias com potencial afrogrêncio, principalmente as saponinas, esta espécie vegetal não é sensível às alterações sazonais, no que se refere a biossíntese deste tipo de metabólito, dados que concordam com Borella *et al.*<sup>25</sup>.

Os teores de óleos fixos apresentaram índices de  $2,49 \pm 0,26\%$  (primavera),  $1,94 \pm 0,17\%$  (verão),  $2,16 \pm 0,09\%$  (outono) e  $2,15 \pm 0,32\%$  (inverno), não diferindo estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ). A presença de óleos fixos nas partes aéreas de *B.*

<sup>25</sup> Borella, J. C. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 16 (2006) 557-561.

<sup>29</sup> J. M.; Duarte, M. R.; Santos, C. A. M. Rev. Bras. Farmacogn. 14 (2004) 41-48.

<sup>40</sup> Chicourel, E.L. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 7/8 (1997) 59-66.

<sup>64</sup> Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

<sup>65</sup> Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

*articulata* possibilita a incorporação do extrato em formulações dermatológicas devido às suas propriedades emolientes.

#### 4.8 Teores e caracterização dos óleos essenciais de *B. articulata*

Em relação ao teor de óleo essencial (Tabela 9), do ponto de vista quantitativo, das partes aéreas de *B. articulata*, pode-se observar que os maiores teores de óleo essencial apresentaram-se no inverno ( $0,43 \pm 0,05\%$ ) e primavera ( $0,41 \pm 0,03\%$ ) o qual reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) no verão ( $0,22 \pm 0,01\%$ ).

**Tabela 9.** Teores do óleo essencial das partes aéreas de *B. articulata*.

Estação	Proporção (m/m;%)
Primavera	$0,41 \pm 0,03$
Verão	$0,22 \pm 0,01$
Outono	$0,29 \pm 0,02$
Inverno	$0,43 \pm 0,05$

Os baixos rendimentos do óleo essencial no verão podem ser atribuídos as altas temperaturas e, por este motivo pode ser esperado a evaporação parcial de alguns constituintes voláteis da planta<sup>94</sup>. Estes resultados estão em concordância com Simões *et al.*<sup>176</sup> que cita que a coleta deve ser realizada nos períodos onde a exposição ao sol é menor, uma vez que a alta exposição ao sol pode provocar uma perda quantitativa importante dos constituintes voláteis existente nos vegetais. Além disso, os altos teores de óleo essencial obtido na primavera podem ser explicados pelo fato da planta estar no período de floração. Durante este período, as plantas podem produzir uma quantidade substancial de óleo essencial a fim de atrair polinizadores<sup>144</sup>. Budel; Duarte & Santos<sup>29</sup> realizando estudos com plantas do gênero *Baccharis* (*B. articulata*, *B. cylindrica*, *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana*), obtiveram bons rendimentos de óleo essencial (0,5 mL/100 g; 0,6 mL/100 g; 0,8 mL/100 g; 0,1 mL/100 g), sendo que os autores atribuíram os bons rendimentos em

<sup>29</sup> Budel, J. M.; Duarte, M. R.; Santos, C. A. M. Rev. Bras. Farmacogn. 14 (2004) 41-48.

<sup>94</sup> Hussain, A. L. *et al.* Food Chem. 108 (2008) 986-995.

<sup>144</sup> Palá-Paúl, J. *et al.* Biochem. System. Ecol. 69 (2001) 663-672.

<sup>176</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.



parte devido à correta obtenção dessas drogas vegetais, destacando-se a coleta pouco antes da floração, quando o conteúdo de óleo deve ser máximo. Em outros estudos, os teores de óleos essenciais para *B. articulata* variaram de 0,5% <sup>178</sup> a 0,2% <sup>204</sup>.

Os óleos essenciais são misturas naturais bastante complexas, contendo cerca de 20 a 60 compostos em diferentes proporções. Caracterizam-se por apresentar dois ou três compostos majoritários em concentrações razoavelmente altas (20 a 70%) quando comparado aos demais componentes presentes em quantidades traço <sup>17</sup>.

Uma análise detalhada utilizando-se GC/MS do óleo essencial de *B. articulata* (Tabela 10 e Anexo A, B, C e D) revelou proporções e/ou constituição distinta nas diferentes estações do ano.

Um total de 28 compostos representando 99,24 a 99,97% do óleo foram identificados. O  $\beta$ -pineno foi o principal constituinte apresentado pelo óleo essencial (24,0 a 2,05%), seguido do limoneno (8,45 a 11,2%), espatulenol (9,31 a 10,9%) e (*E*)-cariofileno (4,61 a 7,80%). Os óleos essenciais analisados consistiram principalmente de hidrocarbonetos monoterpênicos (41,8 a 52,8%), seguido de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (20,4 a 31,5%) e sesquiterpenos oxigenados (23,5 a 27,7%). Estes resultados concordam com Lago *et al.* <sup>104</sup>, o qual cita que, apesar das pesquisas com *B. trimera* terem apresentado maior porcentagem de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, normalmente os monoterpênicos têm sido observados como derivados majoritários em muitas espécies de *Baccharis*. Porém, Silva *et al.*, <sup>171</sup> relata que, embora os constituintes principais dos óleos essenciais da espécie *Baccharis* possam apresentar variações sazonais, sesquiterpenos oxigenados são normalmente a classe predominante.

---

<sup>17</sup> Bakkali, F. *et al.* Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 446-475.

<sup>104</sup> Lago, H. G. *et al.* J. Braz. Chem. Soc. 17 (2006) 1334-1338.

<sup>171</sup> Silva, F. G. *et al.* J. Braz. Soc. 18 (2007) 990-997

<sup>178</sup> Simões-Pires, C. A. *et al.* Plant. Syst. Evol. 253 (2005) 23-32.

<sup>204</sup> Zunino, M.P. *et al.* Planta Medica 64 (1998) 86-87.

**Tabela 10.** Constituintes químicos do óleo essencial de *B. articulata* obtidos por análise de GC/MS.

Constituintes	T <sub>R</sub>	IR <sup>cal</sup>	Estações				Identif.
			Primavera (%)	Verão (%)	Outono (%)	Inverno (%)	
<b>Hidrocarbonetos monoterpênicos</b>							
α-Pineno	7,02	939	4,58	5,62	6,02	4,89	a, b, c
β-Pineno	8,30	980	25,34	24,23	32,05	24,02	a, b
Mirceno	8,48	991	1,76	2,18	2,07	2,18	a, b
Limoneno	9,68	1032	8,45	9,15	11,19	10,19	a, b,c
β-Ocimeno	10,0	1050	1,67	1,77	1,50	1,46	a, b
			<b>41,80</b>	<b>42,95</b>	<b>52,83</b>	<b>42,74</b>	
<b>Monoterpenos oxigenados</b>							
γ-Terpineol	10,4	1189	<b>1,32</b>	<b>1,66</b>	<b>2,54</b>	<b>1,77</b>	a, b
<b>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</b>							
δ-Elemeno	11,2	1875	3,43	3,54	2,63	5,72	a, b
β-Elemeno	11,6	1398	7,92	0,73	0,56	1,56	a, b
<i>E</i> -Cariofileno	12,2	1418	4,75	6,03	4,61	7,80	a, b,c
Aromadendreno	12,40	1439	0,00	0,94	0,28	0,00	a, b
A-Humuleno	12,90	1456	1,41	1,87	1,13	0,00	a, b
γ-Muurolo	13,5	1477	0,35	0,08	0,07	0,31	a, b
Germacreno D	13,8	1480	1,32	3,33	2,16	2,39	a, b
Viridiflore	14,0	1490	2,55	1,56	1,50	2,50	a, b
Biciclogermacreno	15,5	1494	4,05	4,99	3,57	3,64	a, b
γ- <i>Epi</i> -α-Selineno	17,4	1503	0,97	0,83	0,66	0,83	a, b
γ-Cadineno	17,6	1515	3,43	3,64	3,20	3,85	a, b
			<b>31,50</b>	<b>27,54</b>	<b>20,37</b>	<b>28,60</b>	
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>							
Espatuleno	21,6	1576	9,42	10,71	9,31	10,92	a, b
Globulol	21,7	1583	0,88	1,66	1,13	0,94	a, b
Viridiflorol	21,7	1590	3,87	6,03	4,23	3,74	a, b
Guaiol	21,9	1595	3,96	4,37	4,23	4,58	a, b
Eudesmol	22,0	1656	1,06	1,14	1,50	1,56	a, b
<i>Epi</i> -α-cadinol	23,5	1640	2,38	1,56	1,69	2,08	a, b
<i>Epi</i> -α-muurolo	23,8	1641	0,44	0,21	-	0,10	a, b
Cubeno	24,3	1642	0,18	0,62	-	-	a, b
Valeraniol	24,5	1653	0,53	-	-	-	a, b
γ- <i>Epi</i> -α-Eudesmol	24,8	1661	1,06	-	-	0,94	a, b
Eudesmol	24,9	1684	1,58	1,35	1,41	1,46	
			<b>25,34</b>	<b>27,66</b>	<b>23,50</b>	<b>26,31</b>	
Total			99,97	99,82	99,24	99,42	

a = identificação baseado no tempo de retenção e padrão de fragmentação observado nos espectros de massas;

b = identificação baseada no índice de retenção linear (índice de Kovats) calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de n-alcenos (IK);

c = identificação baseada em padrão.

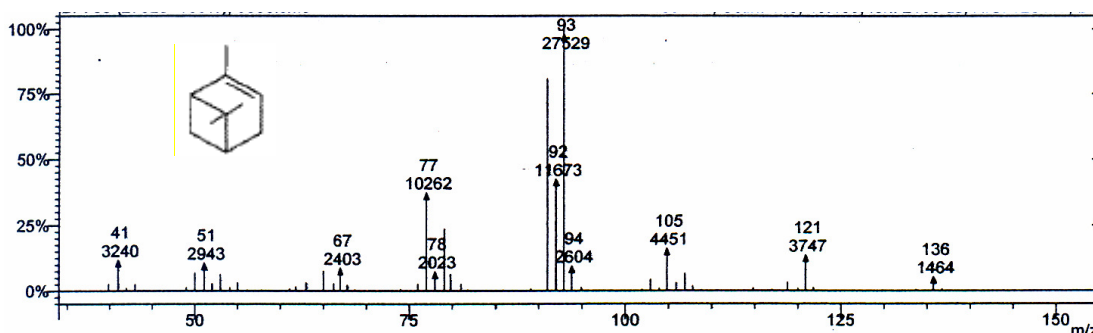
Os monoterpenos que apresentaram maior porcentagem, neste estudo foram o β-pineno (24,0 a 32,0%), limoneno (8,45 a 11,2%) e α-pineno (4,58 a 6,02%). O γ-terpineol (1,32 a 2,54%) foi o único monoterpeneo oxigenado identificado. Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos que apresentaram maior porcentagem foram (*E*-cariofileno (4,61 a 7,80%), biciclogermacreno (3,57 a 4,99%), γ-cadineno (3,20 a

3,85%) e  $\delta$ -elemeno (2,63 a 5,72%) e os sesquiterpenos oxigenados o espatulenol (9,31 a 10,9%), guaiol (3,96 a 4,58%) e viridiflorol (3,74 a 6,03%).

Em relação às estações do ano, uma maior porcentagem de hidrocarbonetos monoterpênicos foi verificada no outono (52,8%), seguido dos teores obtidos na primavera (42,7%), verão (42,9%) e inverno (41,8%). Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos apresentaram maiores porcentagens na primavera (31,5%), seguido dos teores obtidos no inverno (28,6%), verão (27,5%) e outono (20,4%). Em relação aos sesquiterpenos oxigenados identificou-se na primavera (25,3%), verão (27,7%), inverno (26,3%) e outono (23,5%).

A alta proporção de monoterpenos é importante uma vez que nas plantas, os terpenos e derivados de baixo peso molecular são responsáveis pelo odor agradável e característico de muitos vegetais, e suas funções incluem defesa do organismo contra predadores e patógenos, interações alelopáticas, antioxidantes, bioregulatórias e atração de polinizadores pelo aroma<sup>176</sup>.

Após análise dos óleos essenciais por GC/MS, os compostos foram identificados e autenticados comparando seus espectros de massas com o banco de dados do sistema. Como exemplo, a Figura 25 demonstra um espectro de massas típico do  $\alpha$ -pineno.



**Figura 25.** Espectro de massa típico obtido para o  $\alpha$ -pineno a partir do óleo essencial de *B. articulata*.

Dados referentes à variação sazonal do óleo essencial de *B. articulata* não foram encontrados na literatura até o presente momento. Somente, Agostini *et al.*<sup>3</sup>, em estudos com o gênero *Baccharis* incluindo a *B. articulata*, demonstraram resultados semelhantes, onde as três amostras de *B. articulata* estudadas

<sup>3</sup> Agostini, F. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2005) 215-220.

<sup>176</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.

apresentaram como composto majoritário o  $\beta$ -pineno, em concentrações que variaram de 41,4 a 52,8%, seguido do limoneno (4,0 a 17,6 %) e espatulenol (1,4 a 10,4%). Os hidrocarbonetos monoterpênicos apresentaram-se em maior proporção (61,1 a 67%). Os maiores rendimentos também foram observados para *B. articulata* com 0,5% (p/v).

Análise sazonal realizada com amostras de *B. trimeria* coletadas em áreas de Cerrado e Mata Atlântica demonstraram que a constituição química manteve-se praticamente inalterada. O carquejol foi o componente majoritário em todas as amostras. Outros componentes que ocorreram em concentrações maiores que 10% foram o acetato de carquejila,  $\alpha$ -pineno, germacreno-D, biciclogermacreno, germacreno-B,  $\beta$ -cariofileno, aromadendreno e espatulenol<sup>37</sup>.

Lago *et al.*<sup>106</sup> avaliaram o óleo essencial das partes aéreas de seis espécies do gênero *Baccharis*, extraídos empregando hidrodestilação e analisados por GC e GC/MS (*B. dracunculifolia*, *B. microdonta*, *B. regnelli*, *B. schultzii*, *B. trimeria* e *B. uncinella*). Os autores observaram a predominância de sesquiterpenos em todos os óleos estudados com  $\beta$ -elemeno em *B. dracunculifolia* e *B. regnelli*,  $\alpha$ -humuleno em *B. trimeria*, g-gurjuneno em *B. schultzii*, biciclogermacreno em *B. regnelli*,  $\gamma$ -cadineno em *B. regnelli* e *B. uncinella*, espatulenol em *B. schultzii*, cariofileno em *B. microdonta* e guaiol em *B. uncinella*. Contudo, uma grande quantidade de monoterpênicos também foi observada em *B. uncinella* ( $\alpha$ -pineno), *B. regnelli* (d-car-3-eno) e *B. schultzii* (limoneno).

Pode-se observar que a composição química do óleo essencial de *B. articulata* apresentou variações consideráveis em relação às estações do ano. Neste sentido, a pesquisa de seus constituintes químicos, bem como a variabilidade sazonal do mesmo, mostra-se extremamente relevante uma vez que a composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente, durante o desenvolvimento do vegetal, de acordo com a época de coleta, condições climáticas (temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos) e o tipo de solo alterando significativamente suas características e atividades farmacológicas<sup>176</sup>.

<sup>37</sup> Carreira, R. C. Tese de doutorado. Instit. Botan. Secret. Meio Ambiente, São Paulo, 2007.

<sup>106</sup> Lago, J. H. G. *et al.* Quím. Nova. 31 (2008) 727-730.

<sup>176</sup> Simões, C. M. O. *et al.* 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.

#### 4.9 Doseamento de flavonóides

Com relação ao doseamento de flavonóides (Tabela 11 e Figura 26), ficou evidente a grande variabilidade do teor dessa classe de compostos no decorrer do período ( $p < 0,05$ ).

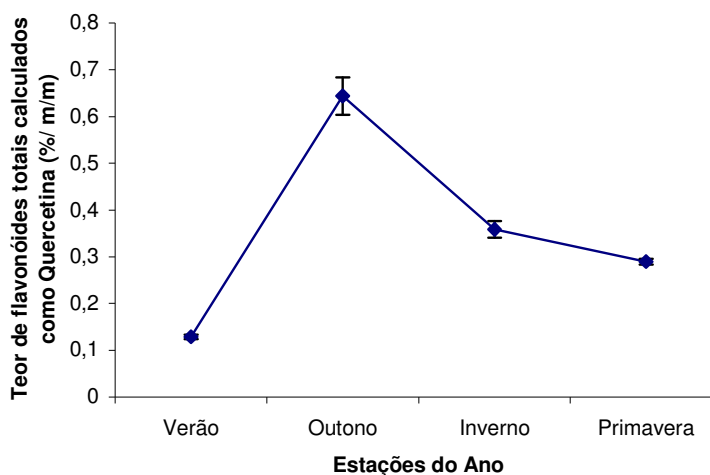
**Tabela 11.** Teor de flavonóides para *B. articulata*.

Estação	Teor de Flavonóides* <sup>a</sup>
Inverno	0,36 ± 0,02
Primavera	0,29 ± 0,01
Verão	0,13 ± 0,01
Outono	0,64 ± 0,04

\*Teor de flavonóides totais calculados como quercetina ( $C_5H_{10}O_7$ ) (% m/m)

<sup>a</sup>Todos os valores apresentaram diferença significativa entre si ( $p < 0,05$ )

Pode-se verificar, um menor teor de flavonóides totais expressos como quercetina (% m/m) apresentado no verão, com posterior aumento expressivo de teor nos meses subseqüentes, possivelmente devido à radiação solar intensa, característica desta estação. Além disso, esta variação pode ter ocorrido pela mudança de estação (verão-outono) aliada a fatores, tais como climático, (ocorrência de chuvas), estágio fenológico e presença ou não de patógenos.



**Figura 26.** Teores de flavonóides para *B. articulata* nas diferentes estações do ano.

Yariwake *et al.*<sup>199</sup> cita uma tendência geral, tanto dos flavonóides totais como dos fenóis totais, serem produzidos em menores concentrações em estações com fotoperíodo bem definidos: inverno (dias curtos e noites longas) e verão (dias longos e noites curtas), enquanto que maior produção destes metabólitos está correlacionada com as estações que apresentam diferença menos nítida na duração dos dias e noites (primavera e outono). Esta tendência mostrou-se coerente parcialmente neste estudo, com exceção a primavera.

#### 4.10 Atividades biológicas para *B. articulata*

##### 4.10.1 Ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*

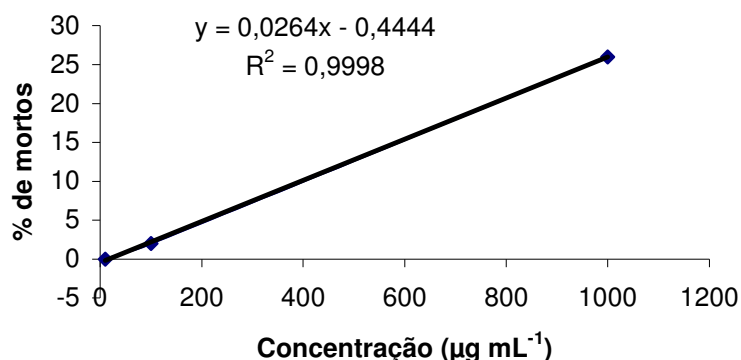
Recentes trabalhos têm demonstrado que em células eucariontes, os óleos essenciais podem agir como pró-oxidantes afetando a membrana das células e organelas tais como as mitocôndrias. Dependendo do tipo e concentração, os óleos essenciais podem exibir efeitos citotóxicos sobre as células vivas<sup>17</sup>. Sendo assim, o óleo essencial de *B. articulata* foi submetido a ensaio de toxicidade frente à *A. salina* (Tabela 12 e Figura 27).

**Tabela 12.** Ensaio de toxicidade frente a *A. salina*, realizada com óleo de *B. articulata* e controles positivo e negativo.

Grupos	Número de mortos					Média	% de mortes
Óleo 10 µg mL <sup>-1</sup>	0	0	0	0	0	0	0
Óleo 100 µg mL <sup>-1</sup>	0	0	1	0	0	0,2	0,2
Óleo 1000 µg mL <sup>-1</sup>	2	3	3	2	3	2,6	2,6
Controle negativo	0	0	0	0	0	0	0
Controle positivo (K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0,04 mg mL <sup>-1</sup> )	5	6	5	5	4	5	5

<sup>17</sup> Bakkali, F. *et al.* Food Chem. Toxicol. 46 (2008) 446-475.

<sup>199</sup> Yariwakel, J. H. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2005) 162-168.



**Figura 27.** Ensaio de toxicidade frente à *A. salina*, realizada com óleo essencial de *B. articulata*.

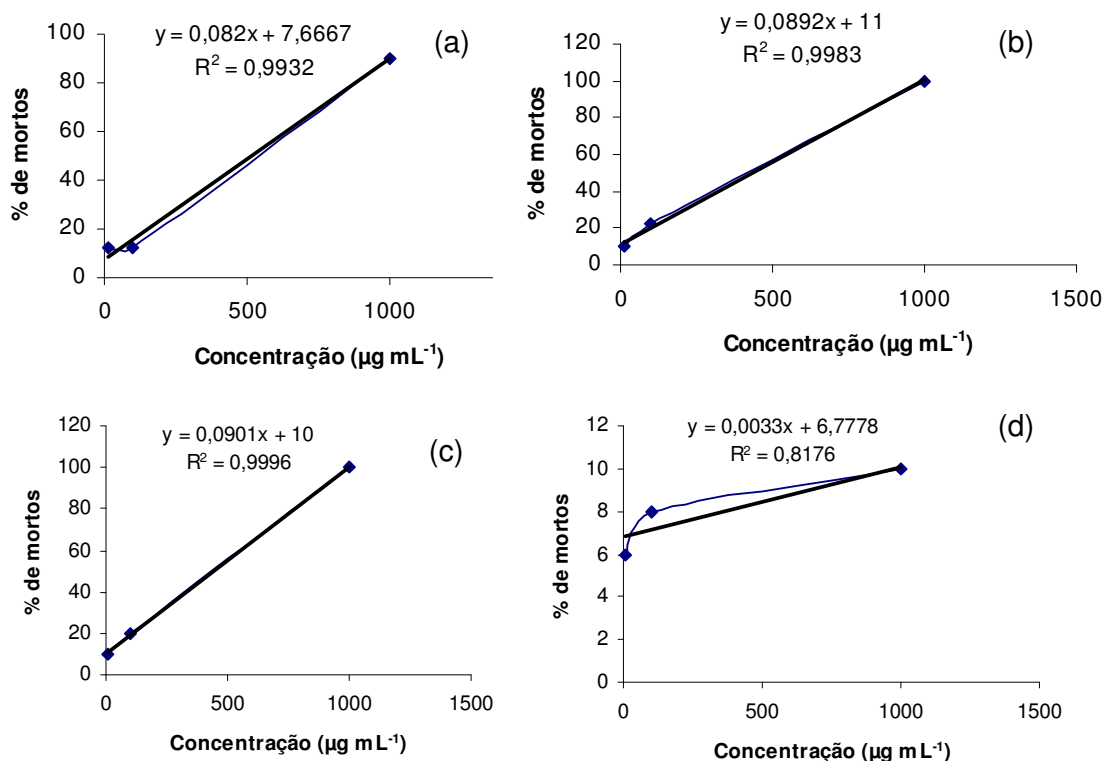
Souza *et al.*<sup>184</sup> avaliando a toxicidade de folhas de *Eremanthus erythropappus*, planta da família Asteraceae, obteve  $CL_{50}$  de  $9,60 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $9,25 \text{ mg mL}^{-1}$ , para óleos essenciais obtidos de folhas jovens e adultas, respectivamente. Estes óleos essenciais demonstraram ser 52 vezes mais potentes que o timol ( $CL_{50} = 480 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Adicionalmente, o ensaio de toxicidade frente à *A. salina* foi realizado com o extrato bruto metanólico e nas frações hexano, diclorometano e acetato de etila de *B. articulata* (Tabela 13 e na Figura 28).

**Tabela 13.** Ensaio de toxicidade frente à *A. salina*, realizada com o extrato bruto metanólico e as frações hexano, diclorometano e acetato de etila de *B. articulata*.

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Número de mortos					Média	% de Mortos
Fração hexano							
10	2	1	1	1	1	1,2	12
100	1	1	2	0	2	1,2	12
1000	10	9	10	8	8	9	90
Fração diclorometano							
10	1	0	0	2	2	1	10
100	1	3	1	3	3	2,2	22
1000	10	10	10	10	10	10	100
Fração acetato de etila							
10	2	2	0	0	1	1	10
100	2	2	2	2	2	2	20
1000	10	10	10	10	10	10	100
Extrato bruto metanólico							
10	0	1	0	1	1	0,6	6
100	1	0	1	1	1	0,8	8
1000	1	1	1	1	1	1	10

<sup>184</sup> Sousa, O. V. *et al.* Rev. Bras. Farm. 89 (2008) 113-116.



**Figura 28.** Ensaio de toxicidade frente à *A. salina*, realizada com a fração hexano (a), diclorometano (b), acetato de etila (c) e extrato bruto metanólico (d) de *B. articulata*.

Posteriormente, com base nas equações de reta, foram calculadas as  $CL_{50}$  para cada amostra (Tabela 14).

**Tabela 14.**  $CL_{50}$  referente a ensaio de toxicidade frente à *A. salina*, realizada com amostras de frações de *B. articulata*.

Amostra	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Óleo essencial	> 1000
Fração hexano	516
Fração diclorometano	437
Fração acetato de etila	444
Extrato bruto metanólico	> 1000

De acordo com Meyer *et al.*<sup>125</sup> são considerados ativos os extratos que apresentarem  $CL_{50}$  menor que  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , portanto, o óleo essencial e o extrato bruto metanólico, obtido de partes aéreas de *B. articulata*, podem ser considerados

<sup>125</sup> Meyer, B.N. *et al.* Planta Médica. 45 (1982) 31-34.



como não tóxicos. As demais frações (frações hexano, diclorometano e acetato de etila), podem ser classificadas como substâncias de baixa toxicidade com base nos estudos realizados por Dolabela <sup>56</sup>, que classifica como altamente tóxicos as substâncias com  $CL_{50}$  menores que  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; moderadamente tóxicos, com  $CL_{50}$  entre  $80 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; e com baixa toxicidade ou não tóxicos, substâncias com  $CL_{50}$  maiores que  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Outros estudos com o gênero *Baccharis* com os extratos em clorofórmio e em metanol de folhas da espécie *Baccharis pseudotenuifolia* foram submetidos ao bioensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS), sendo que ambos foram considerados ativos ( $TAS < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). A maior atividade concentrou-se no extrato clorofórmico ( $TAS = 115 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no qual detectou-se a presença do triterpeno ácido oleanólico. Este resultado é indicativo da presença de um importante componente citotóxico na fração clorofórmica <sup>127</sup>.

#### 4.10.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode constituir a base de muitas aplicações, incluindo aplicações como conservantes na indústria farmacêutica, ou como alternativa medicinal em terapias naturais. Sendo assim, várias pesquisas a fim de explorar o potencial de alguns óleos essenciais para o tratamento de doenças infecciosas que venha substituir medicamentos farmacêuticos têm sido realizadas <sup>38, 181</sup>.

Por este motivo, a capacidade de inibir o crescimento de microorganismos representa uma atividade muito visada em plantas medicinais, especialmente em óleos essenciais extraídos das mesmas. Neste sentido, os óleos essenciais de *B. articulata* obtidos por hidrodestilação nas diferentes estações do ano foram testados frente a diferentes microorganismos (Tabela 15).

<sup>38</sup> Celiktas, O. Y. *et al.* Food Chem. 100 (2007) 553-559

<sup>56</sup> Dolabela, M. F. Dissertação (Mestrado) UFMG. Belo Horizonte-MG, 1997, 128p.

<sup>127</sup> Moreira, F. P. M. *et al.* Quím. Nova. 26 (2003) 309-311.

<sup>181</sup> Sokovic, M. *et al.* Europ. J. Plant. Pathol. 116 (2006) 211-224.

**Tabela 15.** Variação sazonal na atividade antimicrobiana do óleo essencial de *B. articulata*.

Cepas	Estação do ano (MIC expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$ )*				
	Padrão de cloranfenicol	Verão	Outono	Inverno	Primavera
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027)	40	>1193	>1240	>1250	>1258
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	30	>1193	>1240	>1250	>1258
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 11228)	1,25	>1193	>1240	>1250	>1258
<i>Shigella</i> (ATCC 288)	1,25	>1193	>1240	>1250	>1258
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	1,25	>1193	465	312,5	314
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11775)	3,75	>1193	>1240	>1250	>1258
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	1,25	>1193	>1240	78,1	>1258

Médias do teste em duplicata.

De acordo com os resultados pode-se observar que, frente às sete cepas ATCC testadas, o óleo essencial de *B. articulata* apresentou variabilidade sazonal. Verifica-se uma atividade de  $314 \mu\text{g mL}^{-1}$  (primavera),  $465 \mu\text{g mL}^{-1}$  (outono) e  $312 \mu\text{g mL}^{-1}$  (inverno) frente a cepa de *Bacillus cereus* ATCC 11778. A maior atividade ocorreu no inverno, quando o óleo essencial também apresentou-se efetivo na concentração de  $78,1 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente a cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Baixas atividades foram observadas para os demais microrganismos.

As menores atividades antimicrobianas ocorreram no verão, onde os teores de óleo essencial apresentaram-se reduzidos. As maiores atividades antimicrobianas foram observadas no inverno e primavera, estações onde os teores de óleo essencial também foram superiores ( $0,43 \pm 0,05\%$  e  $0,43 \pm 0,05\%$  no inverno e primavera, respectivamente). Esta variação sazonal observada neste estudo corrobora com a recente revisão realizada por Nascimento *et al.*<sup>130</sup> os quais relatam que, dentre os fatores que afetam a composição química dos óleos, podendo provocar alterações na atividade antimicrobiana, pode-se destacar clima, solo, época e forma de plantio, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tempo e condições ambientais, proveniência do material da planta (fresco ou seco), técnicas de extração, fonte botânica, variação geográfica (latitude e longitude).

Uma tentativa de correlacionar a atividade antimicrobiana e a porcentagem

<sup>130</sup> Nascimento, P. F. C. *et al.* Rev. Bras. Farmacogn. 17 (2007) 108-113.

---

dos constituintes químicos apresentados em cada estação não obteve sucesso. Podemos inferir, a partir disso que, possivelmente não são compostos isolados os responsáveis pela atividade biológica, mas a relação existente entre os mesmos, fato recentemente observado por Kamatou *et al.*<sup>98</sup>.

---

<sup>98</sup> Kamatou, G. P. P. *et al.* South African J. Bot. 74 (2008) 230–237.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que, comparando ambas espécies estudadas *A. saturoioides* e *B. articulata*, alguns parâmetros de controle de qualidade (índice de espuma, cinzas totais, perda por dessecação e óleos fixos), preconizados pela Farmacopéia Brasileira (1988) não sofrem variação sazonal, sugerindo que os mesmos não devem ser os únicos ensaios a serem realizados durante estudos desta natureza. Além disso, os mesmos não são indicativos dos teores de substâncias ativas, apenas fornecem informações adicionais sobre as condições corretas do manejo da planta.

Por outro lado, os teores de flavonóides, mostraram-se expressivamente sujeitos a esta variação em *A. saturoioides* e *B. articulata* demonstrando que os flavonóides são metabolizados claramente em resposta aos estímulos do meio ambiente com as necessidades da planta, uma vez que os mesmos desempenham diversas funções na planta, como de defesa frente à radiação ultravioleta, barreira química de defesa contra microorganismos, insetos e outros animais herbívoros e para a polinização. Os teores de óleos essenciais obtidos das partes aéreas por hidrodestilação e a porcentagem da constituição química quando os mesmos foram analisados por GC/MS também mostraram-se suscetíveis a esta variação.

Além disso, as atividades biológicas, tais como atividade antioxidante avaliada através do método de capacidade de captura *in vitro* do radical livre DPPH, ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* e atividade antimicrobiana determinada pela determinação da concentração inibitória mínima apresentaram variação significativa de acordo com a estação do ano.

Uma tentativa de correlacionar as atividades biológicas e a porcentagem dos constituintes químicos dos óleos voláteis, apresentados em cada estação, não obteve sucesso sugerindo que, possivelmente não são compostos isolados os responsáveis pela atividade biológica, mas a relação existente entre os mesmos.

Deste modo, pode-se observar que a produção de compostos fitoquímicos é freqüentemente governada por fatores externos como composição do solo, índice pluviométrico, altitude, radiação UV, sazonalidade, temperatura, ritmo circadiano.

Desta forma, a composição química da planta é assim, sujeita a variações tanto qualitativas quanto quantitativas e, tendo em vista, que a atividade biológica depende da composição química, são similarmente afetadas por estas variações.

Sendo assim, pode-se concluir, portanto, a necessidade de estudos sobre a variação sazonal na composição química e atividades biológicas de plantas bem como a importância da discussão sobre a padronização dos princípios ativos e da estabilidade desses produtos para a eficácia terapêutica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4168-4170.
2. Adam, K.; Sivropoulou, A.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia* and *Salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 1739-1745.
3. 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, *Rev. Bras. Farmacogn.* 15 (2005) 215-220.
4. Albuquerque, H. N.; Albuquerque, I. C. S.; Monteiro, J. A.; Barbosa, A. R.; Souza, S. M.; Cavalcanti, M. L. F. Uso de plantas medicinais no tratamento de répteis em cativeiro: um estudo preliminar, *Rev. Biol. Ciênc. Terra.* 4 (2004) 1-9.
5. Almeida, E. R. Plantas medicinais brasileiras, conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993, p. 341.
6. Almeida, M. M. B.; F. G.; Nogueira, C. M. D.; Magalhães, C. E. C.; Morais, N. M. T. Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais, *Cienc. Tecnol. Alimen.* 22 (2002) 94-97.
7. Alonso, J. R. Tratado de fitomedicina-bases clínicas e farmacológicas. Bueno Aires: Isis, 1998.
8. Andrade, C. A.; Costa, C. K.; Bora, K.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G.; Kerber, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae, *Rev. Bras. Farmacogn.* 17 (2007) 231-235.
9. Anesini, C.; Perez, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity, *J. Ethnopharmacol.* 39 (1993) 119-128.
10. Arisawa, M. Cell growth inhibition of KB cells by plant extracts, *Nat. Med.* 48 (1984) 338-347.
11. Arredondo, M. F.; Blasina, F.; Echeverry, C.; Morquio, A.; Ferreira, M.; Abin-Carriquiry, J. A.; Lafon, L.; Dajas, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress, *J. Ethnopharmacol.* 91 (2004) 13-20.
12. Arruda, T. A.; Antunes, R. M. P.; Catão, R. M. R.; Lima, E. O.; Souza, D. P.; Nunes, X. P.; Pereira, M. S. V.; Barbosa-Filho, J. M.; Cunha, E. V. L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues, *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (2006) 307-311.
13. Ascoli, B.; Bernardi, A. P. M.; Poser, G. L.; Lissi, E.; Bridi, R. Estudo do potencial antioxidante de *Hypericum polyanthemum* através do método DPPH. Anais da XIV

- Jornada de Jovens Pesquisadores da AUGM - Empreendedorismo, Inovação Tecnológica e Desenvolvimento Regional, p.428, 2006.
14. Asolini, F. C.; Tedesco, A. M.; Carpes, S. T. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás, *Braz. J. Food Techn.* 9 (2006) 209-215.
  15. Atkinson, P.; Blakeman, J. P.; Seasonal Occurrence of an Antimicrobial Flavanone, Sakuranetin, Associated with Glands on Leaves of *Ribes nigrum*, *New Phytol.* 92 (1982) 63-74.
  16. Atoui, A. K.; Mansouri, A.; Boskou, G.; Kefalas, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile, *Food Chem.* 89 (2005) 27-36.
  17. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils - a review, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 446-475.
  18. Barroso, G. M. Compositae - subtribo baccharidinae Hoffmann - Estudo das espécies ocorrentes no Brasil, *Rodriguésia.* 28 (1976)1-273.
  19. Bauer, L. Contribuição a análise dos óleos essenciais de *Eupatorium ligulifolium* H.A. e *Achyrocline satureioides* DC. do Rio Grande do Sul, *Rev. Bras. Farm.* 60 (1979) 97-100.
  20. Bendazzoli, W. S. Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica, *Mundo saúde.* 24 (2000) 123-126.
  21. Bettega, J. M.; Teixeira, H.; Bassani, V. L.; Barardi, C. R.; Simões, C. M. Evaluation of the antiherpetic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*, *Phytother. Res.* 18 (2004) 819-823.
  22. Bhavanani, S. M.; Ballow, C. H. New agents for Gram-positive bacteria, *Curr. Opin. Microbiol.* 3 (2000) 528-534.
  23. Bianchi, N. R.; Silva, M. O.; Spiassi, L.; Bergonci, J. I.; Machado, C. A. Ensaio de toxicidade excessiva e screening fitoquímicos de algumas espécies do gênero *Baccharis* L. (Asteraceae), *Rev. Bras. Farm.* 74 (1993) 79-80.
  24. Biesalski, H. K.; Bohles, H.; Esterbauer, H.; Furst, P.; Gey, F.; Hundsdorfer, G.; Kasper, H.; Sies, H.; Weisburger, J. Antioxidant vitamins in prevention, *Clinic. Nutr.* 16 (1997) 151-155.
  25. Borella, J. C.; Duarte, D. P.; Novaretti, A. A. G.; Menezes Jr., A.; França, S. C.; Rufato, C. B.; Santos, P. A. S.; Veneziani, R. C. S.; Lopes, N. P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (carqueja) e isolamento de flavona, *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (2006) 557-561.
  26. Borges, D. B. Comparação de metodologias analíticas para ensaios de pureza no controle de qualidade de matérias-primas farmacêuticas de origem vegetal. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2005, 167p.
  27. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. A

- fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília, Série B. Textos Básicos de Saúde, 2006.
28. Brooks, J. S.; Feeny, P. Seasonal variation in *Daucus carota* leaf-surface and leaf-tissue chemical profiles, *Biochem. Syst. Ecol.* 32 (2004) 769-782.
  29. Budel, J. M.; Duarte, M. R.; Santos, C. A. M. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae), *Rev. Bras. Farmacogn.* 14 (2004) 41-48.
  30. Budel, J. M.; Duarte, M. R.; Santos, C. A. M.; Farago, P. V.; Matzenbacher, N. I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - Estudos botânicos, *Rev. Bras. Farmacogn.* 15 (2005) 268-271.
  31. Calixto, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos, *Ciência e Cultura.* 55, (2003) 37-39.
  32. Calvo, D.; Cariddi, L. N.; Grosso, M.; Demo, M. S.; Maldonado, A. M. *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): Antimicrobial activity on *Staphylococcus* ssp. and immunomodulation effects on human lymphocytes, *Rev. Latinoamerican. Microbiol.* 48 (2006) 247-255.
  33. Canillac, N.; Mourey, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria, *Food Microbiol.* 18 (2001) 261-268.
  34. Cao, G., Sofic, E., Prior, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radic. Biol. Med.* 22 (1997) 749-760.
  35. Carballo, J. L.; Hernández-Inda, Z. L.; Pérez, P.; García-Grávalos, M. D. A comparasion between two brine shrimp assays to detect in vitro citotoxicity in marine natural products. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM. Madrid – Espanha, 2002.
  36. Carney, J. R.; Krenisky, J. M.; Williamson, R. T.; Luo, J. Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant *Achyrocline satureioides*, *J. Nat. Prod.* 65 (2002) 203-205.
  37. Carreira, R. C. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica. Tese de doutorado apresentado ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.
  38. Celiktas, O. Y.; Kocabas, E. E. H.; Bedir, E.; Sukan, F. V.; Ozek, T.; Baser, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of *Rosmarinun officinalis*, depending on location and seasonal variation, *Food Chem.* 100 (2007) 553-559.
  39. Chand, S.; Lusunzi, I.; Veal, D. A.; Williams, L. R.; Karuso, P. Rapid screening of antimicrobial activity of extracts and natural products, *J. Antibiot.* 47 (1994) 1295-1304.
  40. Chicourel, E. L.; Pimenta, D. S.; Jorge, L. I. F.; Ferro, V. O. Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais, *Rev. Bras. Farmacogn.* 7/8 (1997) 59-66.



41. Christoph, F.; Kaulfers, P-M.; Stahl-Biskup, E. A comparative study of the in vitro antimicrobial activity of tea tree oils s.l. with special reference to the activity of b-triketones, *Planta Med.* 66 (2000) 556-560.
42. Cimanga, K.; Kambu, K.; Tona, L.; Apers, S.; De Bruyne, T.; Hermans, N.; Totté, J.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo, *J. Ethnopharmacol.* 79 (2002) 213-220.
43. Cirio, G. M.; Doni Filho, L.; Miguel, M. D.; Miguel, O. G.; Zanin, S. M. W. Interrelação de parâmetros agrônômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*, Mart ex. Reiss (Espinheira-santa) como insumo para indústria farmacêutica, *Visão Acadêmica.* 4 (2003) 67-76.
44. Corrêa Junior, C.; Ming, L. C.; Scheffer, M. C. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. 2. ed. FUNEP, Jaboticaba, 1994, 162p.
45. Corrêa, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, vol. 1-6.
46. Cortadi, A.; Di Sapia, O.; McCargo, J.; Scandizzi, A.; Gattuso, S.; Gattuso, M. Anatomical studies of *Baccharis articulata*, *Baccharis crispa* and *Baccharis trimera*, "Carquejas" used in folk medicin, *Pharm. Biol.* 37 (1999) 357-365.
47. Cosentino, M.; Bombelli, R.; Carcano, E.; Luini, A.; Marino, F.; Crema, F.; Dajas, F.; Lecchini, S. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. infusion: A study on human leukocytes, *J. Ethnopharmacol.* 116 (2008) 501-507.
48. Cox, S. D.; Mann, C. M.; Karkham, J. L.; Bell, H. C.; Gustafson, J. E.; Warmington, J. R.; Wyllie, S. G. The mode of microbiological action of oil essential of *Malaleuca alternifolia* (tea tree oil), *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 170-175.
49. Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. Natural products in drug discovery and development, *J. Nat. Prod.* 60 (1997) 52-60.
50. Cunha, C. P.; Silva, A. P. Plantas e produtos vegetais em cosméticos e dermatologia. Lisboa, Po: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004, 310p.
51. Dai, J.; Suttisri, R.; Bordas, E.; Soejarto, D. D.; Kinghorn, D. Clrodane diterpenoids from *Baccharis articulata*, *Phytoch.* 34 (1993) 1087-1090.
52. De Souza, K. C.; Bassani, V. L.; Schapoval, E. E. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. extracts by oral route, *Phytomedic.* 14 (2007) 102-108.
53. Desmarchelier, C.; Coussio, J. Ciccica, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"), *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31 (1998)1163-1170.
54. Deuschle, R. A. N. Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica de *Senecio desiderabilis* VELLOZO (Asteraceae). Dissertação (Mestrado em Ciências e tecnologia Farmacêutica). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2003, 124p.

55. Dickel, M. L.; Rates, S. M.; Ritter, M. R. Plants popularly used for losing weight purpose in Porto Alegre, South Brazil, *J. Ethnopharmacol.* 109 (2007) 60-71.
56. Dolabela, M. F. Triagem *in vitro* para a atividade antitumoral e anti *T. cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte-MG, 1997, 128p.
57. Duarte, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *MultiCiência: Construindo a História dos Produtos naturais* Universidade Estadual de Campinas. 7 (2006) 1-7.
58. Duarte, M. C. T.; Figueira, G. M.; Pereira, B.; Magalhães, P. M. Delarmelina, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos de espécies da coleção de plantas medicinais, *Rev. Bras.Farmacogn.* 14 (2004) 06-08.
59. Duarte, M. C. T.; Figueira, G. M.; Sartoratto, A.; Rehder, V. L. G.; Delarmelina, C. Anti-candida activity of brazilian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.* 97 (2005) 302-311.
60. Duarte, M. C. T.; Leme, E. E.; Delarmelina, C.; Soares, A. A.; Figueira, G. M.; Sartoratto, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escheria coli*, *J. Ethnopharmacol.* 111 (2007) 197-201.
61. Duarte-Almeida, J. M.; Santos, R. J.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. D Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•, *Cienc. Tecnol. Alim.* 26 (2006) 446-452.
62. Eloff, J. N. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants, *J. Ethnopharmacol.* 67 (1999) 355–360.
63. Fachinetto, J. M.; Bagatini, M. D.; Durigon, J.; Silva, A. C. F.; Tedesco, S. B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 17 (2007) 49-54.
64. Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
65. Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 2000.
66. Farmacopéia Brasileira. 4ed. São Paulo: Atheneu, 2001.
67. Feeny, P. Seasonal Changes in Oak Leaf Tannins and Nutrients as a Cause of Spring Feeding by Winter Moth Cater, *Ecology.* 51 (1970) 565-581.
68. Ferracini, V. L.; Paraiba, L. C.; Leitão Filho, H. F.; Silva, A. G. D.; Nascimento, L. R.; Marsaioli, A. J. Essential oils of seven Brazilian Baccharis species, *J. Essent. Oil Res.* 7 (1995) 355-367.
69. Ferraro, G.; Anesini, C.; Ouvina, A.; Retta, D.; Filip, R.; Gattuso, M. Gattuso, S.; Hnatyszyn, O.; Bandoni, A. Total phenolic content and antioxidant activity of extracts of *Achyrocline satureioides* flowers from different zones in Argentina, *Latin. American. J. Pharm.* 27 (2008) 626-628.
70. Ferraro, G. E.; Norbedo, C.; Coussio, J. D. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*, *Phytochem.* 20 (1981) 2053-2054.

71. Franco, I. J. Ervas e plantas: a medicina dos simples, 5ed. Imprimax: Chapecó, 1995.
72. Freitas, P. C. D. Atividade antioxidante de espécies medicinais da família Piperaceae: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq e *Piper regnellii* (Miq.) CDC. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 1999. 115p.
73. Frizzo, C. D.; Serafini, L. A.; Dellacassa, E., Lorenzo, D.; Moyna, P. Essential of the *Baccharis uncinella* DC. From Southern Brazil, Flav. Fragr. J. 16 (2001) 286-288.
74. Fullas, F.; Hussai, R. A.; Bordas, E.; Pezzuto, J. M.; Soerjato, D. D.; Kinghorn, A. D. Gaudichaudiosides A-E, five novel diterpene glycoside constituents from the sweet-tasting plant, *Baccharis gaudichaudiana*, Tetrahedron. 47 (1991) 8515-8522.
75. Germanò, M. P.; D'angelo, V.; Biasini, T.; Miano, T. C.; Braca, A. De Leo, M.; De Pasquale, R.; Sanogo, R. Anti-ulcer, anti-inflammatory and antioxidant activities of the n-butanol fraction from *Pteleopsis suberosa* stem bark. J. Ethnopharmacol. 115 (2008) 271-275.
76. Gianello, J. C.; Ceñal, J. P.; Giordano, O. S.; Tonn, C. E.; Petenatti, M. E.; Petenatti, E. M.; Del Vitto, L. A. Medicamentos herbários en el centro-oeste Argentino "Carqueja": Control de la calidad de las drogas oficinales y sustituyentes, Acta Farm. Bonaer. 19 (2000) 99-103.
77. Giangualani, R. N. Las especies argentinas del género *Achyrocline* (Compositae), Darwiniana. 20 (1976) 549-576.
78. Gillij, Y. G.; Gleiser, R. M.; Zygadlo, J. A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina, Biores. Technol. 99 (2008) 2507-2515.
79. Giuliano, D. A. Clasificación infragenerica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae), Darwiniana. 39 (2001) 131-154.
80. Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. L. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quím. Nova. 30 (2007) 375-381.
81. Grace, S. C.; Logan, B. A.; Adams L. W. W. Seasonal differences in xanthophyll cycle characteristics and antioxidants in *Mahonia repens* growing in different light environments, Oecol. 116 (1998) 9-17.
82. Gugliucci, A.; Menini, T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited *in vitro* by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*, Life Science 71 (2002) 693-705.
83. Gutkind, G. O.; Martino, V.; Graúa, N.; Coussio, J. D.; De Torres, R. A. Screening of South American Plants for Biological Activities: Antibacterial and Antifungal Activity, Fitoter. 5 (1981) 213-218.
84. Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extract, J. App. Microb. 86 (1999) 985-990.
85. Harbone, J. B. Ecological biochemistry. 4ed. London: Academic, Press 1993.
86. Harbone, J. B.; Mabry, H. The flavonoids. Chapman and hall, London, 1975.

87. Harborne, J. B.; Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochem.* 55 (2000) 481-504.
88. Haslam, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action, *J. Nat. Prod.* 59 (1996) 205-215.
89. He, K.; Montenegro, G.; Hoffmann, J. J.; Timmermann, B. N. Diterpenoids from *Baccharis linearis*, *Phytochem.* 41(1996) 1123-1127.
90. Hess, S.; Peres, M. T. L.; Batista, A. L.; Rodrigues, J. P.; Tivirol, S. C.; Oliveira, L. G. L.; Santos, C. W. C.; Fedel, L. E. S.; Crispim, S. M. A.; Smania, A.; Smania, E. F. A.; Flach, A.; Pantaroto, S. Evaluation of seasonal changes in chemical composition and antibacterial activity of *Elyonurus muticus* (Sprengel) O. Kuntze (Gramineae), *Quím nova.* 30 (2007) 370-373.
91. Heywood, V. H. Flowering plants of the world, Oxford University Press: New York, 1993.
92. Holzkea, C.; Hoffmannb, T.; Jaegerc, L.; Koppmanna, R.; Zimmer, W. Diurnal and seasonal variation of monoterpene and sesquiterpene emissions from Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), *Atmosph. Environm.* 40 (2006) 3174–3185.
93. Hulin, V.; Mathot, A. G.; Mafart, P.; Dufossé, L. - Les propriétés anti-microbiennes des huiles essentielles et composés d'arômes. *Sciences des Aliments.* 18 (1998) 563-582.
94. Hussain, A. L.; Anwar, F.; Sherazi, S. T. H.; Przybylski, H, S. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations, *Food Chem.* 108 (2008) 986-995.
95. Jacoby, C.; Coltro, E. M.; Sloma, D. C.; Muller, J.; Dias, L. A.; Luft, M.; Beruski, P. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade rural de Guamirim, Município de Irati, PR, *Rev. Ciênc. Ex. Nat.* 4 (2002) 79-89.
96. Joly, A. B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. 7ed. São Paulo: Cia. Editora Nacional, 1967.
97. Kadarian, C.; Broussalis, A. M.; Mino, J.; Lopez, P.; Gorzalczany, S.; Ferraro, G.; Acevedo, C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C., *Pharmacol. Res.* 45 (2002) 57-61.
98. Kamatou, G. P. P.; Van Zyl, R. L.; Vuuren, S. F.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L.G.; Viljoen, A. M. Seasonal variation in essential oil composition, oil toxicity and the biological activity of solvent extracts of three South African *Salvia* species, *South African J. Bot.* 74 (2008) 230–237.
99. Kinsella, J. E.; Frankel, E.; German, B.; Kanner, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods, *Food Technol.* 47 (1993) 85-89.
100. Koehn, F. E.; Carter, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 206-220.
101. Korbes, C. V. Manual de plantas medicinais, 48 ed. Grafit: Francisco Beltrão, 1995.

102. Kutchan, T. M.; Ecological Arsenal and Developmental Dispatcher. The Paradigm of Secondary Metabolism, *Plant. Physiol.* 125 (2001) 58-60.
103. Kwiecinski, M. R. Avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e antitumoral do extrato bruto hidroetanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2007, 134p.
104. Lago, H. G.; Favero, O. A.; Romoff, P. Microclimatic Factors and Phenology Influences in the Chemical Composition of the Essential Oils from *Pittosporum undulatum* Vent. Leaves, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 1334-1338.
105. Lago, J. H. G.; Romoff, P.; Favero, O. A.; Souza, F. O.; Soares, M. G.; Baraldi, P. T.; Correa, A. G. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils, *Biochem. System. Ecol.* 36 (2008) 737-740.
106. Lago, J. H. G.; Romoff, P.; Fávero, O.; Soares, M. G.; Baraldi, P. T.; Correa, A. G.; Souza, F. O. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de "Campos de Altitude" da mata atlântica paulista. *Quím. Nova.* 31 (2008) 727-730.
107. Larson, R. A. The antioxidants of higher plants, *Phytochem.* 27 (1988) 969-978.
108. Lawrence, B. M.; Company, R. J. R. T. Progress in essential oils, *Perfum. Flav.* 24 (1999) 53-63, 1999.
109. Liendro, M. N.; Uriburu, M. L.; Viturro, C. I.; Gil, R. R.; Novara, L. J.; Fuente, J. R. Flavonoids and volatile constituents from *Achyrocline hyperchlora*, *Biochem. System. Ecol.* 35 (2007) 720-724.
110. Lima, I. O.; Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O.; Farias, N. M. P.; Souza, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 16 (2006) 197-201.
111. Lima, S. M. G.; Lima, A. F.; Donazzolo, J. Resgate do conhecimento popular e uso de plantas medicinais na promoção da saúde em Sananduva – RS, *Rev. Bras. Agroecol.* 2 (2007) 256-259.
112. Lopes, N. P.; Kato, M. J.; Andrade, E. H. A.; Maia, J. G. S.; Yoshida, M.; Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves, *Phytochem.* 46 (1997) 689-693.
113. Lorenzi, H. Plantas daninhas do Brasil: Terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. 2ed. Nova Odessa, Instituto Plantarum, 1991, 440p.
114. Lorenzo, D.; Atti-Serafini, L.; Santos, A. C.; Frizzo, C. D.; Paroul, N.; Paz D.; Dellacassa E.; Moyna, P. *Achyrocline satureioides* essential oils from Southern Brazil and Uruguay, *Planta Médica.* 1 (2000) 476-477
115. Lucas, D. A. P.; Alves, G. H. A.; Pereira, C. M. P.; Rodrigues, M. R. A. Constituintes químicos de extratos de *Achyrocline satureioides* Lam. DC obtidos por Soxhlet, ultra-som (banho e sonda) e maceração, via GC-MS. Anais da 32<sup>o</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2008.

116. Macedo, M. E.; Consoli, R. A. G. B.; Grandi, T. S. M.; Anjos, A. M. G.; Oliveira, A. B.; Mendes, N. M.; Queiroz, R. O.; Zani, C. L. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae), Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 92 (1997) 565-570.
117. Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Jr., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares, Quím. Nova. 25 (2002) 429-438.
118. Madsen, H. L.; Bertelsen, G. Spices as antioxidants, Tr. Food Scienc. Techn. 6 (1995) 271-277.
119. Malagarriga Herras, R. D. P. Nomenclator *Baccharidinarum Omnium*, Mem. Soc. Cienc. Nat. 23 (1976) 129-224.
120. Mariutti, L. R. B.; Bragagnolo, N. Revisão: Antioxidantes naturais da família Lamiaceae. Aplicação em produtos alimentícios, Braz. J. Food Technol. 10 (2007) 96-103.
121. Markham, K. R. Techniques of flavonoids identification. London: Academic, 1982.
122. Martins, D. G.; Santos, E. R.; Maciel, G. G. M.; Div, M. B. S.; Nascimento, S. C. Martins, D.G. Estudos toxicológicos, microbiológicos e *in vitro* da *Achyrocline satureioides*. In: Simpósio de plantas medicinais do Brasil. Resumos. São Paulo: EPM, 1988.
123. Mello, J. C. P.; Petrovick, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (LESS.) D.C. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts, Act. Farmac. Bonaer. 19 (2000) 211-215.
124. Melo, E. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, V. L. A. G.; Lela, F. L. L.; Caetano, A. C. S.; Nascimento, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas, Ciênc. Tecnol. Alim. 26 (2006) 639-644.
125. Meyer, B. N.; Ferringni, N. R.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; Mclaughlin, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents, Planta Médica. 45 (1982) 31-34.
126. Ming, L. C. Plantas medicinais, aromáticas e condimentares: Avanço na pesquisa agonomica. Botucatu – SP: Universidade Estadual Paulista, 1998, 2v.
127. Moreira, F. P. M.; Coutinho, V.; Montanher, A. B. P.; Caro, M. S. B.; Brighente, I. M. C.; Pizzolatti, M. G.; Monache, F. D. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*, Quím. Nova. 26 (2003) 309-311.
128. Morquio, A.; Rivera-Megret, F.; Dajas, F. Photoprotection by topical application of *Achyrocline satureioides* (Marcela), Phytother. Res. 19 (2005) 486–490.
129. Mors, W. B.; Izzini, C. T.; Pereira, N. A. Medicinal plants of Brasil. Michigan: Reference Publications, 2000.
130. Nascimento, P. F. C.; Nascimento, A. C.; Rodrigues, C. S.; Antonioli, A. R.; Santos, P. O.; Barbosa Jr., A. M.; Trindade, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev. Bras. Farmacogn. 17 (2007) 108-113.

131. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A6, 2003.
132. Niero, R. Estudos da citotoxicidade em diferentes extratos de *Rubus imperialis* (Rosaceae), biomonitorado sobre *Artemia salina* leach. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 1991.
133. Noschang, L. Avaliação da toxicidade de 6 plantas medicinais biomonitorada por *Artemia salina*. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Comunitária Regional de Chapecó. Chapecó-SC, 2003. 42p.
134. Nostro, A.; Blanco, A. R.; Cannatelli, M. A.; Enea, V.; Flamini, G.; Morelli, I.; Roccaro, A. S.; Alonzo, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol, FEMS Microbiol. Lett. 230 (2004) 191-195.
135. Nunes, X. P.; Maia, G. L. A.; Almeida, J. R. G. S.; Pereira, F. O.; Lima, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L, Rev. Bras. Farmacogn. 16 (2006) 642-644.
136. Ohshima, H.; Yoshie, Y.; Auriol, S.; Gilibert, I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion, Free Rad. Biol. Med. 25 (1998) 1057–1065.
137. Oliveira, A. H.; Berretta, A. A. Avaliação da qualidade de insumos farmacêuticos a base de calêndula e própolis utilizados pelas farmácias magistrais, Rev. Eletr. Farm. 4 (2007) 169-174.
138. Oliveira, A. L.; Padilha, C. D.; Ortega, G. G.; Petrovick, P. R. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (marcela), Asteraceae, avaliação comparativa da droga vegetal e estudos preliminares de otimização da extração, Cad. Farm. 17 (2001) 33-38.
139. Oliveira, F.; Akisue, G. Fundamentos de farmacobotânica. 2ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2000, 178p.
140. Oliveira, F.; Akisue, M. K.; Akisue, G. Farmacognosia. São Paulo: Editora Atheneu, 1998.
141. Oliveira, S. Q. D.; Dal-Pizzol, F.; Gosmann, G.; Guillaume, D.; Moreira, J. C.; Schenkel, E. P. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity, Free Rad. Res. commun. 37 (2003) 555-559.
142. Ortins, G. M. M.; Akisue, G. Estudo morfo-histológico, screening fitoquímico, constantes físicas e análise cromatográfica da droga e do extrato fluido, visando o controle de qualidade da espécie *Baccharis articulata* Pers, Lecta. 18 (2000) 9-32.
143. Osier, T. L.; Hwang, S. Y.; Lindroth, R. L. Within and between year variation in early season phytochemistry of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.) clones, Biochem. Syst. Ecol. 28 (2000) 197-208.

144. Palá-Paúl, J.; Pérez-Alonso, M. J.; Velasco-Negueruela, A.; Palá-Paúl, R.; Sanz, J.; Conejero, F. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. rosmarinifolia, *Biochem. System. Ecol.* 69 (2001) 663–672.
145. Panizza, S. *Plantas que curam*. 26ed. São Paulo: Editora Ibrasa, 2000.
146. Passotto, J. A.; Penteado, M. V. C.; Mancini-Filho, J. Atividade antioxidante do  $\beta$ -caroteno e da vitamina A. Estudo comparativo com antioxidante sintético, *Ciênc. Tecn. Alimen.* 18 (1998) 68-72.
147. Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas, *Quím. Nova.* 25 (2002) 45-61.
148. Pio Corrêa, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura e Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1974, v. 5, p. 687.
149. Polydoro, M.; Souza, K. C. B.; Andrades, M. E.; Silva, E. G.; Bonatto, F.; Heydrich, J.; Dal-Pizzol, F.; Schapoval, E. E. S.; Basan, L.; Moreira, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and citotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts, *Life Scienc.* 74 (2004) 2815-2826.
150. Rasoanaivo, P.; Ratsimamanga-Urverg, S. *Biological evaluation of plants with reference to the Malagasy flora*. Napreca, Madagascar, 1993.
151. Rates, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia, *Rev. Bras. Farmacogn.* 11 (2001) 57-69.
152. Retta, D.; Gattuso, M.; Gattuso, S.; Lira, P. D. L.; Baren, C. V.; Ferraro, G.; Bandoni, A. Essential oil composition of *Achyrocline flaccida* (Weinmm.) DC. (Asteraceae) from different locations of Argentina, *Biochem. System. Ecol.* 36 (2009) 877-881.
153. Rivera, F.; Gervazb, E.; Serec, C.; Dajas, F. Toxicological studies of the aqueous extract from *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Marcela), *J. Ethnopharmacol.* 95 (2004) 359-362.
154. Robinson, T. Metabolism and Function of Alkaloids in Plants, *Scienc.* 184 (1974) 430-435.
155. Robinson, W. E.; Reinecke, M. G.; Abdel-Malek, S.; Jia, Q.; Chow, S. A. Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. *Proceed. Nat. Academ. Scienc., USA.* 93 (1996) 6326-6331.
156. Roesler, R.; Malta, L. G.; Carrasco, L. C.; Holanda, R. B.; Souza, C. A. S.; Partore, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado, *Ciênc. Tecnol. Alimen.* 27 (2007) 53-63.
157. Rojas De Arias, A.; Ferro, E.; Inchausti, A.; Ascurra, M.; Acosta, N.; Rodrigues, E.; Fournet, A. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae, *J. Ethnopharmacol.* 45 (1995) 35–41.
158. Ruffa, M. J.; Ferraro, G.; Wagner, M. L.; Calcagno, M. L.; Campos, R. H.; Cavallaro, L. Cytotoxic effects of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line, *J. Ethnopharmacol.* 79 (2002) 335-339.



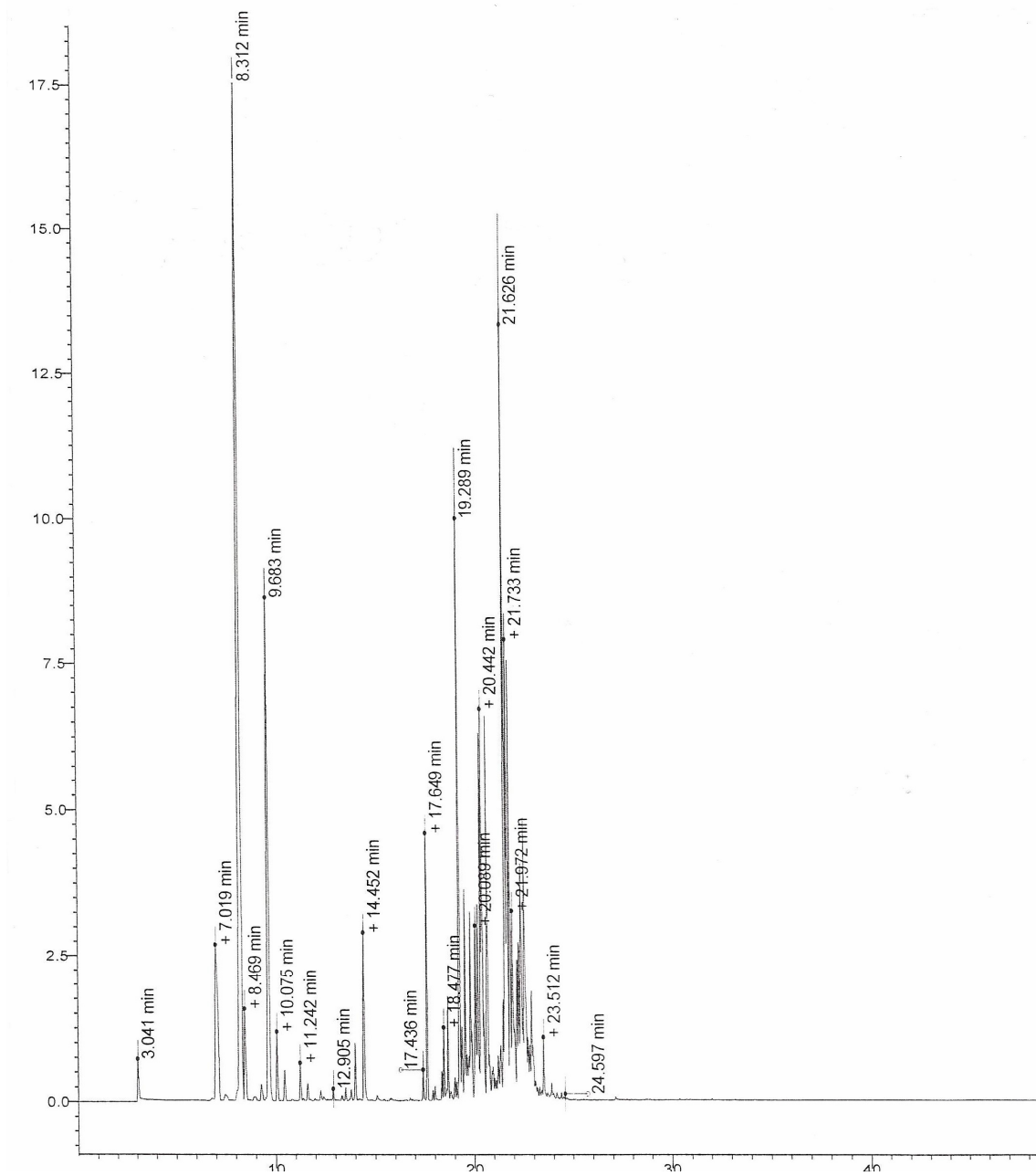
159. Ruiz, A. L. T. G.; Tafarello, D.; Souza, V. H. S.; Carvalho, J. E. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*, Rev. Bras. Farmacogn. 18 (2008) 295-300.
160. Sá, M. F. A.; Neves, L. J. Contribuição aos estudos das plantas medicinais *Baccharis myriocephala* DC., Rev. Bras. Farm. 77 (1996) 88-96.
161. Saeed M. A.; Sabir, A. W. Antibacterial activities of some constituents from oleo-gum-resin of *Commiphora mukul*, Fitoterapia. 75 (2004) 204-208.
162. Salminen, J. P.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Pihlaja, K.; Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*, Phytochem. 57 (2001) 15-22.
163. Santos, C. A. M.; Torres, K. R.; Leonart, R. Plantas medicinais: *herbarium, flora et scientia*. 2 ed. São Paulo: Ícone, 1988. 160p.
164. Schmidt, T. J.; Bomme, U.; Alfermann, A. W. Sesquiterpene lactone content in leaves of *in vitro* and field cultivated *Arnica Montana*, Planta Med. 64 (1998) 268-270.
165. Schwob, I.; Bessiere, J. M.; Masotti, V.; Viano, J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle, Biochem. Syst. Ecol. 32 (2004) 735-745.
166. Senna, E. M. T. L. Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., Compositae (Marcela). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 1993, 140p.
167. Sharp, H.; Bartholomew, B.; Bright, C.; Latif, Z.; Sarker, S. D.; Nash, R. J. 6-Oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae), Biochem. System. Ecol. 29 (2001) 105-107.
168. Sikkema, J.; De Bont, J. A. M.; Poolman, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes, J. Biol. Chem. 269 (1994) 8022-8028.
169. Silva, T. M. S.; De Carvalho, M. G.; Braz, R.; Agra, M. D. Occurrence of flavones and flavonols aglycones and its glycosides in *Solanum* (Solanaceae), Quím. Nova. 26 (2003) 517-522.
170. Silva Júnior, A. A. Plantas medicinais e aromáticas. Itajaí: Epagri, 1997. CD-ROOM
171. Silva, F. G.; Oliveira, C. B. A.; Pinto, J. E. B. P.; Nascimento, V. E.; Santos, S. C.; Seraphin, J. C.; Ferri, P. H. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*, J. Braz. Soc. 18 (2007) 990-997
172. Simões, C. M. Antiinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically, Fitoter. 59 (1988) 419-421
173. Simões, C. M. O. Investigação químico-farmacêutica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcela). Dissertação (Mestrado Farmácia, Tecnologia Farmacêutica) Faculdade de Farmácia da UFRGS, Porto Alegre-RS, 1984. 186p.

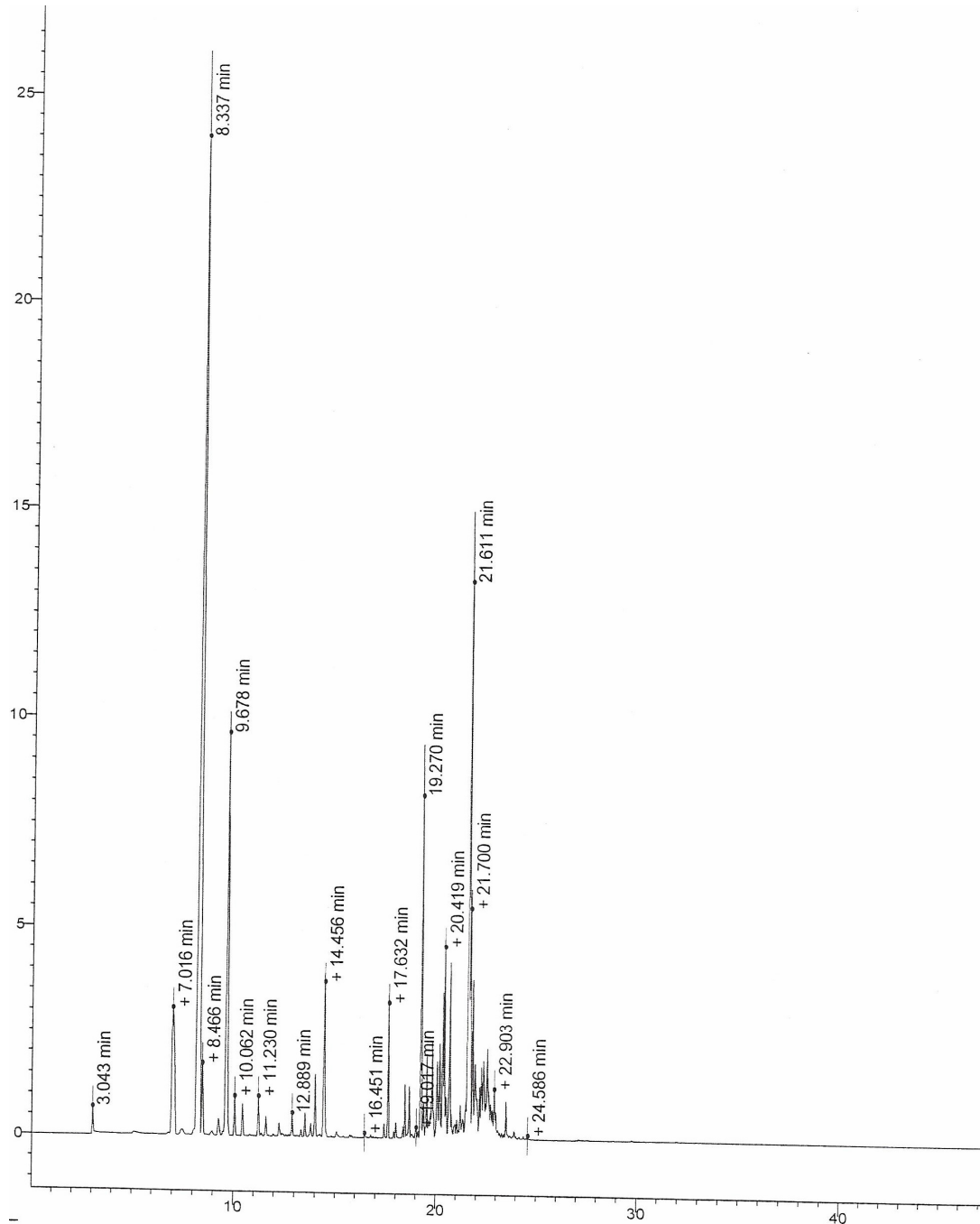
174. Simões, C. M. O.; Mentz, L. A.; Schenkel, E. P.; Irgang, B. E.; Stehmann, J. R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, 1989. 176 p.
175. Simões, C. M. O.; Mentz, L. A.; Schenkel, E. P.; Nicolau, M.; Bettega, Jr. Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul. 5ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998. v.1. 150 p.
176. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, R. P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4ed. Editora: Universidade/UFRGS/UFSC, 2002.
177. Simões, C.M.; Schenkel, E. P.; Bauer, L.; Langeloh, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae. J. Ethnopharmacol. 22 (1988) 281-293.
178. 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. Syst. Evol. 253 (2005) 23–32.
179. Siqueira, N. C. S.; Silva, G. A. A. B.; Alice, C. B.; Nitschke, M. Análise comparativa dos óleos essenciais de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. e *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Compositae), espécies espontâneas no Rio Grande do Sul, Rev. Bras. Farm. 3 (1985) 36-39.
180. Siqueira, N.C.S.; Alice, C. B.; Thiesen, F. V. Aspectos farmacognósticos e perfil cromatográfico dos constituintes de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Compositae, Cad. Farm. 4 (1988) 63-76.
181. Sokovic, M.; Griensven, L. J. L. D. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of cultivated button mushroom *Agaricus bisporus*, Europ. J. Plant. Pathol. 116 (2006) 211–224.
182. Solar, A.; Colaric, M.; Usenik, V.; Stampar, F. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinines in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.), Plant Science. 170 (2006) 453–461.
183. Sonaglio, D. Padronização de extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (marcela). Dissertação (Mestrado Farmácia, Tecnologia Farmacêutica), Faculdade de Farmácia da UFRGS, Porto Alegre, 1987, 163p.
184. Sousa, O. V.; Dutra, R. C.; Yamamoto, C. H.; Pimenta, D. S. Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch, Rev. Bras. Farm. 89 (2008) 113-116.
185. Souza, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chave, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais, Quím. Nova. 30 (2007) 351-355
186. Souza, K. C. B.; Schapoval, E. E. S.; Bassani, V. L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations, J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 771-777.

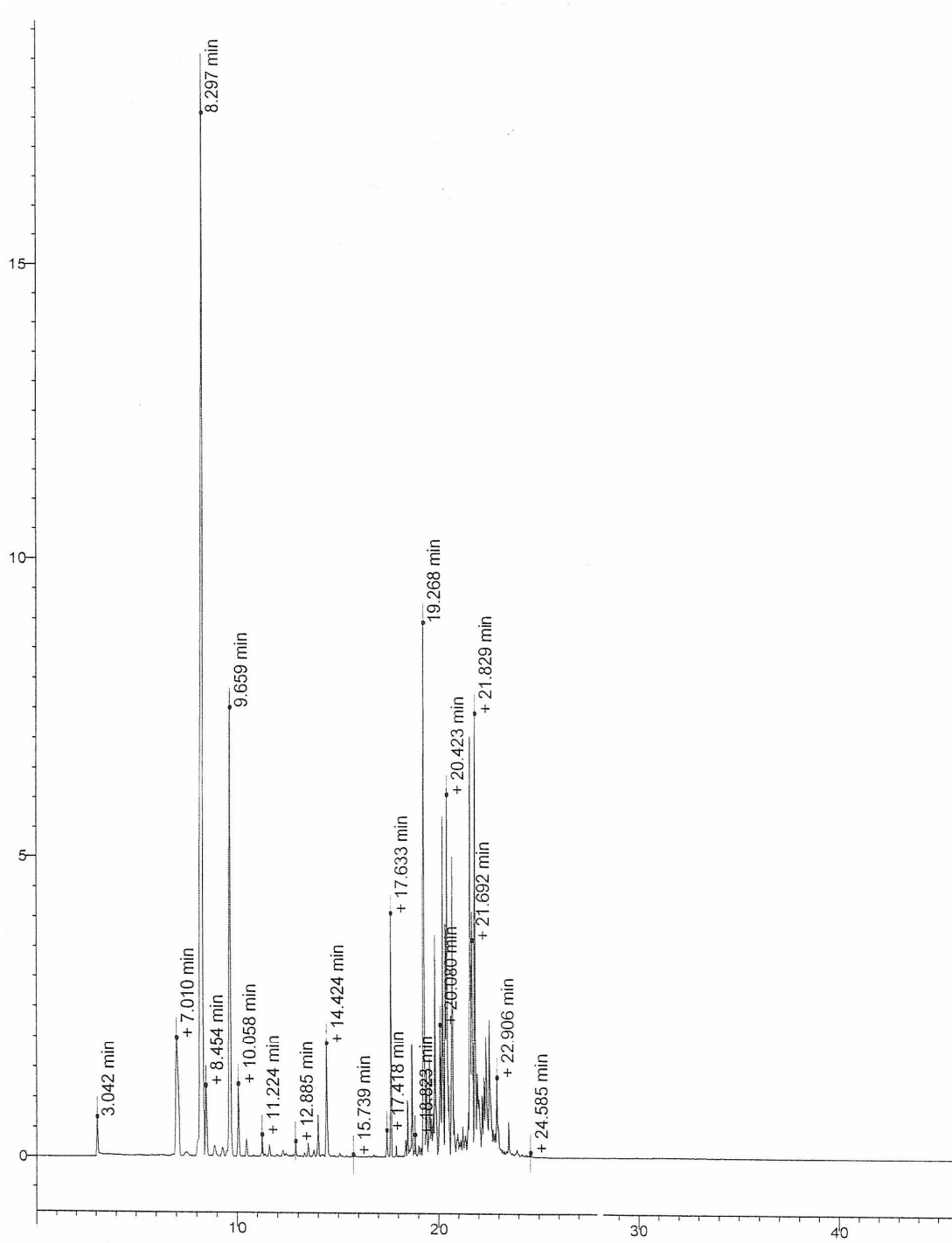
187. Takaisi-Kikuni, N. B.; Tshilanda, D.; Babady, B. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*, Fitoterapia. 71 (2000) 69-71.
188. Takeda, I. J. M.; Farago, P. V. Vegetação do parque estadual de Vila Velha: Guia de campo. Curitiba, Serzgraf, 2001.
189. Tomás – Barberán, F. A.; Ferreres, F.; Valbuena, A. O.; Maeso, M. C. F. Estudio sobre el contenido em flavonoides de las mieles de La Alcarria: su aplicación a la caracterización geográfico – botânica, CSIC, Consejería de agricultura y medio ambiente de La Junta de Comunidades de Castilla – La Mancha, p. 9-12, 1994.
190. Van Vuuren, S. F.; Vijljoen, A. M.; Ozek, T.; Demirici, B.; Baser, K. H. C. Seasonal and geographical variation of *Heteropyxis natalensis* essential oil and the effect thereof on the antimicrobial activity, South. African. J. Botan. 73 (2007) 441-448.
191. Vargas, V. M. F.; Motta, V. E. P.; Leitão, A. C.; Henriques, J. A. P. Mutagenic and genotoxic effects of aqueous extracts of *Achyrocline satureioides* in prokaryotic organisms, Mutation Res. 240 (1990) 13-18.
192. Vedana, M. I. S. Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba-Pr, 2008, 88f.
193. Vendruscolo, G. S.; Rates, S. M. K.; Mentz, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2005) 361-372.
194. Verdi, L. G.; Brighente, I. M. C.; Pizzolatti, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos, Quím. Nova. 28 (2005) 85-94.
195. Viegas, Jr. C.; Bolzani, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna, Quím. Nova. 29 (2006) 326-337.
196. World Health Organization (WHO). Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva: WHO (1992) 20-22.
197. Wu, T. S.; Wang, M. L.; Wu, P. L. Seasonal variations of carbazole alkaloids in *Murraya euchrestifolia*, Phytochem. 43 (1996) 785-789.
198. Yamamoto, N.; Moon, J.; Tsushida, T.; Nagao, A.; Terao, J. Inhibitory Effect of Quercetin Metabolites and Their Related Derivatives on Copper Ion-Induced Lipid Peroxidation in Human Low-density Lipoproteins, Arch. Biochem. Biophysics. 372 (1999), 347-354.
199. Yariwakel, J. H.; Lanças, F. M.; Cappelaro, E. A.; Vasconcelos, E. C.; Tiberti, L. A.; Pereira, A. M. S.; Franca, S. C. Variabilidade sazonal de constituintes químicos (triterpenos, flavonóides e polifenóis) das folhas de *Maytenus aquifolium* Mart. (Celastraceae), Rev. Bras. Farmacogn. 15 (2005) 162-168.
200. Zanon, S. M.; Ceriatti, F. S.; Rovera, M.; Sabini, L. J.; Ramos, B.A. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina, Rev. Latinoamerican. Microbiol. 41 (1999) 59-62.

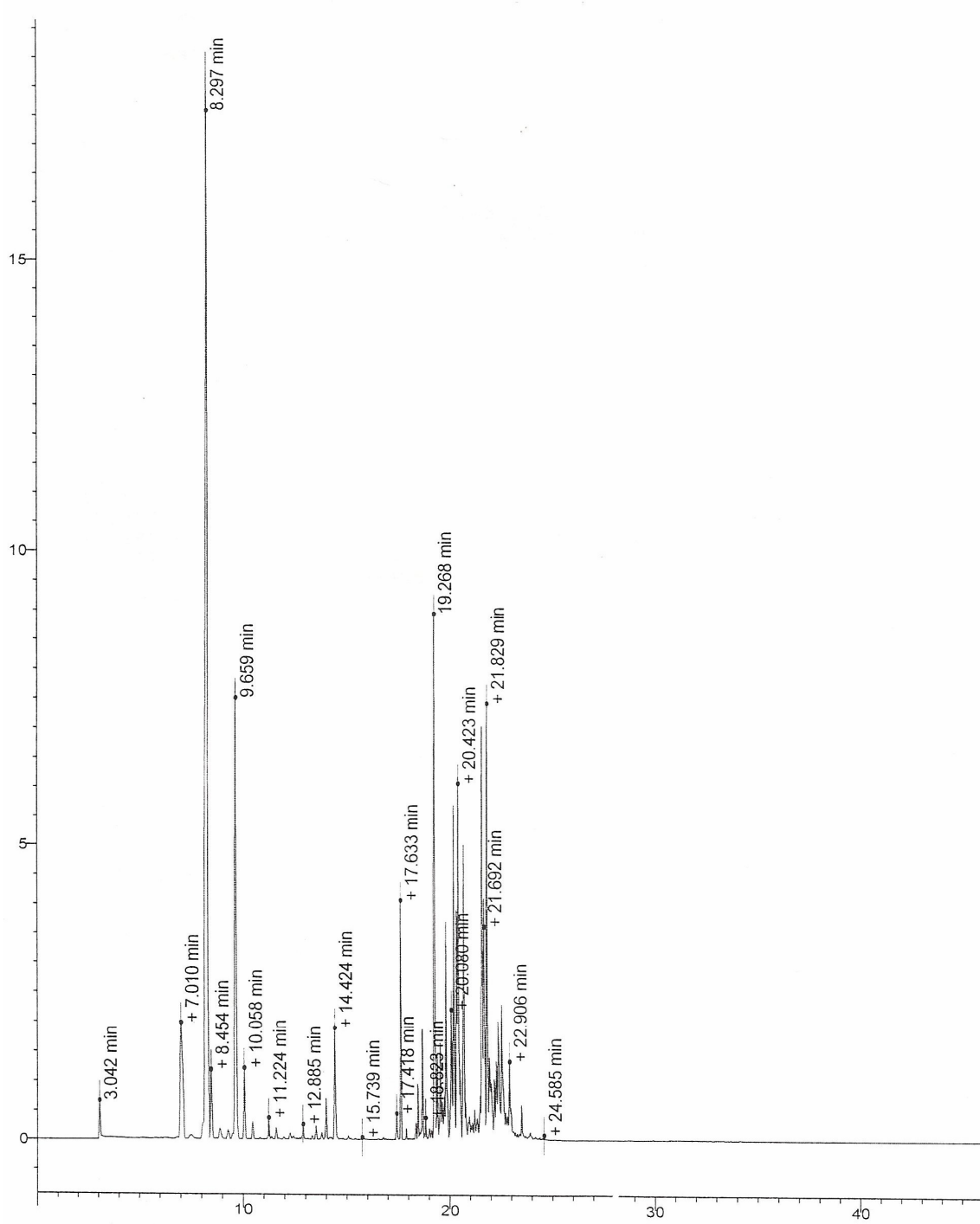
- 
201. Zheng, G. Q.; Kenney, P. M.; Lam, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia-caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents, *J. Nat. Prod.* 55 (1992) 999-1003.
  202. Zidorn, C.; Stuppner, H. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae), *Taxon.* 50 (2001) 115-133.
  203. Zunino, M. P.; Lopes, M. L.; Zygadlo, J. A.; Lopez, A. G. Essential Oil Composition of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers, *J. Essent. Oil Res.* 16 (2004) 61-63.
  204. Zunino, M. P.; Newton, M. N.; Maestri, D. M.; Zygadlo, J. A. Essential oils of three *Baccharis* species. *Planta Medica* 64 (1998) 86-87.

**ANEXO A:** Cromatograma do óleo essencial obtido no verão de *B. articulada*.



**ANEXO B:** Cromatograma do óleo essencial obtido no outono de *B. articulada*.

**ANEXO C:** Cromatograma do óleo essencial obtido na primavera de *B. articulada*.

**ANEXO D:** Cromatograma do óleo essencial obtido no inverno de *B. articulada*.



**ANEXO E: Informações climáticas**



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO-MAPA  
 INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET  
 ESTAÇÃO CLIMATOLÓGICA AUTOMÁTICA DE WETPHALENERS  
 Lat.: 27°23'44" S Long.: 053°24'46" W Alt.: 480 m

**PRECIPITAÇÃO TOTAL TOTAL (mm)**

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2007												162,0
2008	35,6	87,4	57,6	334,2	79,2	202,8	36,4	96,4	97,0	387,6	132,4	55,4

**RADIAÇÃO GLOBAL (MJ/mf)**

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2007												1636,3
2008	1718,1	1557,7	1482,6	1162,3	1094,3	800,5	1111,9	1089,2	1228,6	1182,4	1745,6	1746,4

**TEMPERATURA MÍNIMA (°C)**

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2007												18,3
2008	18,5	18,3	17,4	13,8	10,5	9,0	12,6	12,6	10,6	15,7	16,6	17,6

**TEMPERATURA MÁXIMA (°C)**

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2007												30,2
2008	29,9	30,4	28,5	24,9	21,4	17,9	24,0	22,8	21,6	24,8	28,3	30,5

**UMIDADE RELATIVA DO AR (%)**

Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
2007												70
2008	70	68	74	75	78	83	73	77	70	78	70	63