

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

***BUDDLEJA THYRSOIDES* LAM.: ESTUDO
MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Janaina Dorneles Mahlke

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**BUDDLEJA THYRSOIDES LAM.: ESTUDO
MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO**

por

Janaina Dorneles Mahlke

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Margareth Linde Athayde

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

***BUDDLEJA THYRSOIDES* LAM.: ESTUDO MORFOANATÔMICO,
FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO**

elaborada por
Janaina Dorneles Mahlke

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Margareth Linde Athayde
(Presidente/Orientadora)

Celso Figueiredo Bittencourt (UFSM)

Ademir Farias Morel (UFSM)

Santa Maria, 19 de dezembro de 2007.

*Dedico esta dissertação aos meus pais,
Edmar e Lorete Mahlke pelo imenso amor,
incansável dedicação, incentivo e compreensão,
e enorme carinho e paciência.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Margareth Linde Athayde pela orientação, apoio e amizade, de maneira indispensável, durante todos os passos para a realização desta dissertação, dedico meu carinho e admiração.

As minhas irmãs, Séfora e Anna Rudá, que mesmo estando longe, sempre me ajudaram com uma palavra amiga e através de rezas... muitas rezas...

A minha irmã Tirzá e ao meu cunhado João Carlos um especial agradecimento, pois sem a força e a coragem passada por palavras e ações, talvez eu não teria conseguido chegar até aqui.

As minhas sobrinhas Bárbara e Maria Eugênia, as quais eu amo muito.

Ao meu namorado Flávio, que de maneira incansável sempre ficou ao meu lado dando-me carinho, atenção e muito amor.

Aos meus tios Deodoro e Fany Dorneles pelas várias coletas da planta e por todo o esforço e carinho dedicados a mim e a esse trabalho.

Ao Professor Doutor Ruy Ruver Beck pela colaboração nos momentos precisos e também por sua amizade.

À Professora Doutora Thais do Canto Dorow, pela identificação do material vegetal e pela disponibilidade em sempre atender as minhas solicitações.

Ao Doutor Gilberto Zanetti, pela imprescindível e inestimável colaboração e também pela enorme paciência que teve durante o tempo em que trabalhamos juntos, quero expressar o meu obrigada.

Ao Professor Doutor Sidnei Hartz Alves e sua aluna Tatiana Spader pela cessão do seu laboratório para que fosse possível a realização de uma etapa tão importante deste trabalho, os testes microbiológicos.

Aos Professores Doutores Celso F. Bittencourt, Ademir F. Morel e Rafael Noal Moresco por aceitarem fazer parte da banca examinadora desta dissertação de mestrado.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disponibilidade e atenção.

Aos amigos Adiene Fernandes, Lenise, Cristiani Walker (principalmente durante esse último ano), Viviane Garcia, Aline Bolzan e Maikon (por suas palavras de conforto e sempre de grande ajuda) e em especial ao colega e amigo Michel pelo companheirismo, amizade, paciência e colaboração durante esses dois anos de convivência...vou sentir saudades de todos...

Aos estagiários e ex-estagiários de laboratório Aline, Ticiani, Bruna e Mariani pelo convívio, amizade, colaboração e aprendizado.

Aos funcionários do Departamento de Farmácia Industrial, Vera Pagliarin e Renato, pela ajuda e colaboração, e à funcionária Graziela e Ica pelos momentos de diversão no laboratório.

A todos, que mesmo não citados, participaram e colaboraram para a realização desse trabalho os mais sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: a. estípulas membranáceas; b. estípulas reduzidas a uma linha	22
FIGURA 2: Tipos morfológicos das folhas do gênero <i>Buddleja</i>	22
FIGURA 3: Variações morfológicas das folhas da espécie <i>Buddleja campestris</i>	22
FIGURA 4: <i>Buddleja thyrsoides</i> Lam.: 1. ramo florístico; 2. coma; 3. flor aberta; 4. fruto	23
FIGURA 5: Mimengosídeo B	27
FIGURA 6: Vaniloil ajugol	28
FIGURA 7: Aucubina	28
FIGURA 8: Verbascosídeo	28
FIGURA 9: Buddlejona	29
FIGURA 10: Estabilização dos radicais livres pelos compostos fenólicos	95
FIGURA 11: Enantiômeros do germacreno D	103

LISTA DE TABELA

TABELA 1: Concentração Inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), concentração fungicida mínima (CFM) obtida para o extrato bruto e frações diclorometano (CH ₂ Cl ₂), acetato de etila (AcOEt) e butanólica (BuOH) de <i>Buddleja thyrsoides</i> Lam.	98
--	----

ANEXO

Espectros do germacreno D de cromatografia gasosa e de espectrometria de massas	119
---	-----

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVEATURAS

Ach - acetilcolina

AchE - acetilcolinesterase

AcOEt – acetato de etila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APG – Angiosperm Phylogeny Group

BuOH – butanólica

CBM – concentração bactericida mínima

CFM – concentração fungicida mínima

CG – cromatografia gasosa

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CH₂Cl₂ – diclorometano

CIM – concentração inibitória mínima

CIM₅₀ – concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 50% dos Microrganismos

CL₅₀ – concentração letal necessária para matar 50%

DA – doença de Alzheimer

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

ed. – edição

EM – espectrometria de massas

ERO – Espécie reativa de oxigênio

Fig. - figura

g – grama(s)

MeOH - metanol

min. – minutos

MPP – 1-metil-4-fenilpiridina

NCCLS – (do inglês) “National Committee for Clinical Laboratory Standards”, atualmente denominado CLSI (“Clinical and Laboratory Standards Institute”)

NIST – (do inglês) “National Institute of Standards and Technology”

OMS – Organização Mundial de Saúde

pág. – página

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	19
2.1. Geral	20
2.2. Específicos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1. Descrição da Família Scrophulariaceae	22
3.2. Descrição Morfológica do gênero <i>Buddleja</i>	22
3.3. Descrição Morfológica da espécie <i>Buddleja thyrsoides</i>	24
3.4. Informações Etnofarmacológicas: uso popular	26
3.5. Metabólitos secundários do gênero <i>Buddleja</i> e atividades relacionadas	28
3.5.1. <i>Buddleja madagascariensis</i> Lank	29
3.5.2. <i>Buddleja parviflora</i>	30
3.5.3. <i>Buddleja scordioides</i>	30
3.5.4. <i>Buddleja cordata</i>	31
3.5.5. <i>Buddleja tucumanensis</i>	31
3.5.6. <i>Buddleja albiflora</i>	31
3.5.7. <i>Buddleja globosa</i>	31
3.5.8. <i>Buddleja myriantha</i>	32
3.5.9. <i>Buddleja asiática</i>	32
3.5.10. <i>Buddleja officinalis</i>	32
3.5.11. <i>Buddleja yunanensis</i>	33
3.6. Atividades Tóxicas e Biológicas	33
3.6.1. Ensaio de Toxicidade	33
3.6.2. Ensaio Biológicos	34
3.6.2.1. Ação Antiplaquetária	34
3.6.2.2. Ação inibitória da enzima acetilcolinesterase	34
3.6.2.3. Ação Antimicrobiana	35
3.7. Óleos essenciais	35
3.8. Atividades Farmacológicas	36
3.8.1. Atividade Antioxidante	36

3.8.2. Avaliação de Fenólicos Totais	37
4. ARTIGOS	38
4.1. Artigo 1: Morphoanatomical and Phytochemical Study of <i>Buddleja thyrsoides</i> Lam. Leaves (SCROPHULARIACEAE)	39
4.2. Artigo 2: <i>In vitro</i> antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from <i>Buddleja thyrsoides</i> Lam leaves.	55
4.3. Artigo 3: <i>In vitro</i> , Toxicity action, Antiplatelet and Acetylcholinesterase Inhibition of the <i>Buddleja thyrsoides</i> Lam. Leaves.	73
4.4. Artigo 4: Composition of the essential oil from <i>Buddleja thyrsoides</i> Lam. Leaves from Brazil	84
5. DISCUSSÃO GERAL	92
6. CONCLUSÕES	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

BUDDLEJA THYRSOIDES LAM.: ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO

AUTORA: Janaina Dorneles Mahlke

ORIENTADORA: Margareth Linde Athayde

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 19 de dezembro de 2007.

A família Scrophulariaceae é composta por cerca de 25 gêneros e mais de 1200 espécies. O gênero *Buddleja*, amplamente distribuído pelo mundo, atualmente, pertence a esta família. A espécie *Buddleja thyrsoides* Lam., objeto de estudo neste trabalho, encontra-se distribuída na região sul do Brasil e é conhecida popularmente por barbasco e cambarazinho-do-campo. A decocção das flores e folhas é utilizada para bronquite, asma e tosse. Este trabalho objetiva em identificar morfoanatomicamente as folhas de *B. thyrsoides*, bem como analisar alguns parâmetros farmacológicos e biológicos para esta espécie. As folhas apresentam formato linear-lanceolado, face adaxial lisa, margem serreada até subinteira e pouco revoluta próxima à base. A epiderme é uniseriada, com as células epidérmicas da face adaxial maiores do que na face abaxial, estômatos e tricomas na face abaxial. O mesofilo é heterogêneo, bifacial e apresenta braquiblastos e cristais na forma de drusas. O sistema vascular é do tipo colateral aberto. Na análise fitoquímica foram detectados alcalóides, flavonóides, cumarinas, ácidos orgânicos, heterosídeos antociânicos, saponinas e óleos voláteis. O extrato bruto (de um macerado etanólico a 70 %) e frações diclorometano, acetato de etila e butanólica de *Buddleja thyrsoides* foram investigados quanto à atividade antioxidante, conteúdo de fenólicos totais, atividade antimicrobiana, ação antiagregante, inibição da enzima acetilcolinesterase e quanto à toxicidade. O conteúdo de fenólicos totais variou de 214,07 a 438,4 mg/g. O CI_{50} da atividade antioxidante para o extrato bruto e frações em ordem crescente de polaridade (186,04; 137,70; 146,89; 165,71 $\mu\text{g/mL}$). Foi observada uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais, onde as frações acetato de etila e diclorometano apresentaram os melhores resultados em ambas análises. Na avaliação da atividade antimicrobiana, a fração butanólica foi efetiva contra *S. cerevisiae* (62,5 $\mu\text{g/mL}$ para CIM e CFM). As frações diclorometano e acetato de etila foram eficazes contra o *S. aureus* (250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ para CIM e CBM), respectivamente. O extrato bruto e as frações de *B. thyrsoides* não apresentaram toxicidade frente *Artemia salina*. As frações (em ordem crescente de polaridade) e extrato bruto mostraram ação antiagregante plaquetária (42,35; 40,68; 43,57 e 41,52 %, respectivamente), sendo que o AAS apresentou 58,36 % de inibição. O extrato bruto inibiu em 22,77 % a enzima acetilcolinesterase após 24 horas. Os componentes majoritários do óleo essencial são Germacreno D (27,16%), 1,10-di-epi-Cubenol (13,37 %) e α -Cadinol (12,95 %), Bicyclgermacreno (9,00 %), δ -cadineno (8,59 %) e Cariofileno E (5,26%).

Palavras-chave: *Buddleja thyrsoides*, estudo morfoanatómico, polifenóis, antioxidante, atividade antimicrobiana, antiplaquetária, anticolinesterásica, citotoxicidade, óleos essenciais.

ABSTRACT

***Buddleja thyrsoides* LAM.: MORPHOANATOMIC, PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDY**

AUTHOR: Janaina Dorneles Mahlke

ADVISER: Margareth Linde Athayde

Presentation date: Santa Maria, December 19th 2007.

The Scrophulariaceae family is composed of some 25 genera and more than 1200 species. The genus *Buddleja*, widely distributed around the world, belongs to this family presently. *Buddleja thyrsoides* Lam. species, object of study in this work, is distributed in the southern of Brazil region and is popularly known by barbasco and cambarazinho-do-campo. Flowers and leaves decoction are used to treat bronchitis, asthma and cough. The first step of this was the morphoanatomical study of *B. thyrsoides* leaves aiming to established the identity of the species. The leaves present lanceolate-linear shape, straight adaxial face, serrata to sub-entire margin and little revolute close to the basis. The epidermis is uniseriate, with the epidermal cells of the adaxial face bigger than those of abaxial face, stomata and trichomes in abaxial face. The mesophyll is heterogeneous, bifacial and presents brachiblasts and crystals in druse form. The vascular system is of the open collateral type. Phytochemical screening showed alkaloids, flavonoids, cumarins, organic acids, antocyanic heterosides, saponins and volatile oils. The antioxidant activities, total phenolic contents, antimicrobial activities, antiplatelet action, acetylcholinesterase enzyme inhibition and toxicity of the crude extract (70% ethanol macerate) and dichloromethane, ethyl acetate and butanolic fractions of *Buddleja thyrsoides* were investigated. Total phenolic contents varied from 214.07 to 438.4 mg / g. The crude extract and fractions in order of increasing polarity exhibited scavenging activity with IC₅₀ equal to 186.04, 137.70, 146.89, 165.71 µg/mL. A positive correlation between antioxidant activity and total phenolic contents was observed, where the ethyl acetate and dichloromethane fractions had the best results in both tests. The butanolic fraction was effective against *S. cerevisiae* (62.5 µg / mL for MIC and MFC) in the assessment of antimicrobial activity. The dichloromethane and ethyl acetate fractions were effective against *S. aureus* (250 and 500 µg / mL for CIM and CBM), respectively. The crude extract and the fractions of *B. thyrsoides* did not shown toxicity against *Artemia salina*. The fractions (in order of increasing polarity) and crude extract showed antiplatelet action (42.35, 40.68, 43.57 and 41.52% respectively), whereas the AAS afforded 58.36% of inhibition. The crude extract inhibited in 22.77% the acetylcholinesterase enzyme after 24 hours. The major components of the essential oil were germacreno D (27.16%), 1,10-di - epi-cubenol (13.37%) and α - Cadinol (12.95%), biciclogermacreno (9.00%), δ - cadineno (8.59%) and cariofileno E (5.26%).

Keywords: *Buddleja thyrsoides*, morphoanatomical study, polyphenols, antioxidant, antimicrobial activity, antiplatelet, acetylcholinesterase inhibition, *Artemia salina*, essential oil.

1. INTRODUÇÃO

Há milhares de anos, o homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Há relatos, por exemplo, do uso de plantas com finalidades terapêuticas por volta de 3.000 a.C. pelos povos orientais (WAGNER, FARNSWORTH, 1990; CHANG, BUT, 1986-1987). Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular. Algumas destas plantas passaram a fazer parte das farmacopéias alopáticas e homeopáticas a partir do século XIX, quando se começou a investigar suas bases terapêuticas (ELVIN-LEWIS, 2001). A partir de estudos clínicos, farmacológicos e químicos das plantas, baseados na medicina tradicional, que surgiram os primeiros fármacos utilizados pelo homem, como o ácido acetilsalicílico, digoxina, morfina, quinina e pilocarpina (BUTLER, 2004).

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microorganismos. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (DIAS, 1996). Mais da metade dessas espécies encontra-se nas florestas tropicais, cuja área corresponde a apenas 7% da superfície da terra (SOEJARTO, 1996). Só a floresta tropical amazônica brasileira abriga 17% da biodiversidade do país. Já a floresta atlântica contém aproximadamente 35% das Angiospermas do mundo, e mais de 8% das Pteridófitas. O maior número de espécies encontra-se nas regiões equatoriais da América do Sul, da África e da Ásia e o máximo de diversidade global encontra-se na flora da Colômbia, Equador e Peru. Em todo o território dos Estados Unidos e Canadá, a magnitude da diversidade genética vegetal nativa limita-se a 700 espécies. Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais. Destas, 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização (GUERRA, NODARI, 2003).

Até o ano de 2015, entre 4 e 8% de todas as espécies vivas presentes nas florestas tropicais podem desaparecer. A exploração de plantas de uso medicinal da flora nativa através da extração direta nos ecossistemas tropicais tem levado a

reduções drásticas das populações naturais dessas espécies, seja pelo processo predatório de exploração, seja pelo desconhecimento dos mecanismos de perpetuação das mesmas. Um aspecto menos discutido na questão da devastação das florestas tropicais refere-se à perda do conhecimento, acumulado por milênios, sobre o uso medicinal tradicional das plantas destas florestas pelas populações a elas associadas. Esta devastação provoca a migração destas comunidades, normalmente para centros urbanos, provocando o rompimento do fluxo de conhecimento adquirido e acumulado ao longo do tempo (BAUR, SCHMID, 1996).

Atualmente, cerca de 25% dos fármacos empregados nos países industrializados advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas superiores (YUNES, 2001). Estimativas revelam que o mercado mundial de produtos farmacêuticos movimenta U\$ 320 bilhões/ano, dos quais U\$ 20 bilhões são originados de substâncias ativas derivadas de plantas (ROBBERS apud SIMÕES *et al.*, 2003). Apesar do Brasil possuir uma das mais ricas e diversificadas floras do mundo, sua tecnologia em fabricação de medicamentos, ainda depende em grande escala, de matérias-primas farmacêuticas do exterior.

Embora as drogas sintéticas continuem maioria na farmácia caseira, os medicamentos à base de plantas – os fitoterápicos – ganham um espaço cada vez maior nas prateleiras.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que no ano de 2020 a população mundial chegará a 7,5 bilhões de pessoas e que destas cerca de 75% viverão em países em desenvolvimento, os quais consomem hoje menos de 15% do mercado total de medicamentos. Estas observações indicam que, no futuro, esta população deverá depender mais ainda das plantas medicinais. Por conseguinte, a OMS visando diminuir o número de excluídos dos sistemas governamentais de saúde, recomenda aos órgãos responsáveis pela saúde pública de cada país, que procedam levantamentos regionais das plantas usadas na medicina popular tradicional e identifique-as botanicamente, estimulando e recomendando o uso daquelas que tiverem comprovadas sua eficácia e segurança terapêuticas (LORENZI, MATOS, 2002). Paralelamente, o Ministério da Saúde do Brasil estipulou Diretrizes e Prioridades de Investigação em Saúde (Portaria no 212, de 11/09/81) incluindo as plantas medicinais.

Em 1988, a Comissão Nacional Interministerial de Planejamento e Coordenação (CIPLAN) implantou a fitoterapia como prática oficial de medicina e orientou as Comissões Interinstitucionais de Saúde a buscarem a inclusão da mesma nos serviços primários de saúde através do Sistema Único de Saúde (SUS) (MIGUEL, MIGUEL, 2004).

Segundo a RDC 48/2004, o produto “fitoterápico é descrito como medicamento obtido, empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas de vegetais, caracterizado pelo conhecimento científico da eficácia e dos riscos de seu uso, bem como pela responsabilidade e constância de sua qualidade, sendo esta avaliada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização e documentações tecnocientíficas”. Levando-se em consideração esse conceito, fica clara a importância da fitoquímica no setor acadêmico e empresarial. É nesse contexto social que as plantas medicinais e os fitoterápicos adquirem relevância como agentes terapêuticos, sendo prioritariamente analisados (LAPA *et al.*, 1999).

Para o estudo das substâncias ativas dos vegetais são necessárias etapas importantes como: a seleção da planta, sua correta identificação botânica, preparação dos extratos, separação, purificação, identificação dos constituintes químicos e as posteriores modificações estruturais e correlações entre estrutura química e atividade biológica (YUNES; 2001).

Várias substâncias foram isoladas do gênero *Buddleja* segundo a literatura, das quais algumas com atividades farmacológicas já testadas. Até o momento, não há relatos de estudos científicos sobre a espécie de *Buddleja thyrsoides*, sabe-se apenas do seu uso popular como antitussígeno, antibronquica e antiasmática (UPHOF apud HOUGHTON, 1984).

Tendo em vista o crescente interesse e necessidade pela pesquisa de plantas, especialmente aquelas espécies ainda não estudadas, e a necessidade do desenvolvimento de novos agentes no tratamento das mais diversas doenças, foi objetivo deste trabalho realizar um estudo morfoanatômico e fitoquímico das folhas de *Buddleja thyrsoides* Lam., bem como avaliar a sua atividade antimicrobiana, antiplaquetária, anticolinesterásica e toxicidade.

Esta dissertação apresenta seus resultados na forma de artigos científicos (dois

submetidos e dois em preparação), sendo estes formatados de acordo com seus periódicos a que foram ou serão submetidos. Contempla um item de discussão geral, no qual os resultados são interpretados em conjunto.

2. OBJETIVOS

2.1 – Geral:

O objetivo principal desta dissertação foi o estudo morfológico, fitoquímico e biológico das folhas de *Buddleja thyrsoides* Lam.

2.2 – Específicos:

Caracterização botânica dessa espécie.

Extração de óleo essencial das folhas da planta;

Identificação química do(s) constituinte(s) do óleo essencial por CG-EM.

Avaliação da atividade antimicrobiana com o extrato bruto e frações do extrato desta planta.

Avaliação da capacidade antioxidante do extrato bruto e das frações do extrato desta planta.

Avaliação da concentração de fenólicos totais no extrato bruto e frações.

Avaliação da toxicidade, *in vitro*, frente a *Artemia salina*.

Avaliação dos efeitos do extrato bruto sobre a enzima acetilcolinesterase humana *in vitro*.

Avaliação do potencial antiagregante plaquetária, *in vitro*, do extrato bruto e das frações em soro humano.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Descrição da Família Scrophulariaceae

A família Scrophulariaceae possui distribuição cosmopolita. Após recentes estudos filogenéticos, vários gêneros pertencentes a esta família foram transferidos para outras famílias, assim como gêneros que antigamente eram inclusos em outras famílias, hoje fazem parte das Scrophulariaceae, como é o caso do gênero *Buddleja* (SOUZA, LORENZI, 2005).

Atualmente, essa família está composta por cerca de 25 gêneros e 1200 espécies. No Brasil é representada apenas por quatro gêneros, dos quais três são encontrados nas regiões nordeste e central do Brasil e uma na região sul (SOUZA, LORENZI, 2005).

Caracteriza-se por ser composta por ervas, arbustos e árvores, freqüentemente com indumento piloso. As folhas são de inserção completamente variáveis, até mesmo na mesma espécie e na mesma exsicata (METCALFE, CHALK, 1988; SCHULTZ, 1985; SOUZA, LORENZI, 2005). Apresentam-se dispostas de forma alternadas ou opostas, simples e sem estípulas. A margem mostra-se inteira, dentadas ou serreada, muitas vezes lanceoladas ou linear-lanceoladas (SOUZA, LORENZI, 2005).

A descrição da inflorescência segue tal qual descrito por Souza e Lorenzi (2005).

Inflorescências cimosa ou racemosa, com flores geralmente vistosas, bissexuadas, zigomórficas ou actinomórficas; cálice 4-5-mero, gamossépalo ou dialissépalo, prefloração imbricada; corola 4-5-mera, gamopétala, raramente bilabiada; estames (2-)4(-5), com estaminóidio às vezes presente, epipétalos, anteras rimosas; ovário súpero, bilocular, com placentação axial, geralmente pluriovulado. Fruto geralmente cápsula (SOUZA, LORENZI, 2005).

3.2. Descrição Morfológica do Gênero *Buddleja*

Diferenças na morfologia do pólen e de tricomas foram observadas anteriormente como documento comprobatório para a separação de *Buddleja* da tribo Loganiaceae (BISSET *et al.* apud HOUGHTON *et al.*, 2003).

A presença de triterpenóides do tipo mimengosídeo encontrado em *Buddleja* (EMAM *et al.*, 1997), bem como dos iridóides aucubina, os quais são características de Scrophulariaceae, são algumas provas quimiotaxonomicas que apóiam fortemente a

exclusão da *Buddleja* das Loganiaceae, e sua inclusão na família das Scrophulariaceae, posição recentemente consolidada por estudos envolvendo fitogenética (BACKLUND *et al.*, 2000).

Atualmente tem-se o sistema proposto pelo Angiosperm Phylogeny Group (APG) o qual integrou a família Buddlejaceae à família Scrophulariaceae, na ordem Lamiales (APG, 2003).

Buddleja, em homenagem ao botânico inglês Adam Buddle (KISSMANN e GROTH, 1999), freqüentemente chamada Buddleia, é um gênero de distribuição pantropical, presente no sul da Ásia, África e América. São conhecidas em torno de 100 espécies, 50 são distribuídas na América, as quais 15 crescem no México. Leeuwenberg (1979) afirma que existe em torno de 16 na África e 21 na Ásia. A maioria são pequenos arbustos, entretanto, algumas espécies americanas têm entre 20 e 30 metros de altura, porém a maioria das espécies raramente ultrapassa 5 metros de altura. Ocorrem espécies perenes e decíduas. Elas são nativas de regiões quentes do Novo Mundo desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Chile, e amplamente distribuída na África e as regiões mais quentes da Ásia. As espécies foram divididas em dois grupos com base em seus tipos florais, as da América são dióicas, já as da África e Ásia são monóicas (HOUGHTON, 1984).

São arbustos de 1 a 4m de altura, ramos jovens tomentosos, folhas e inflorescências geralmente recobertos com um denso tomento de pêlos estrelados, às vezes, entremeados com pêlos glandulares capitados. Ramos cilíndricos ou quadrangulares. As folhas são simples, inteiras ou subinteiras, sendo mais freqüentemente serradas, crenadas ou denteadas, raramente lobadas. A base foliar pode apresentar forma atenuada, cuneada ou auriculada, raramente perfoliadas na base (Fig. 1). Encontram-se dispostas de forma oposta. O ápice varia de agudo até acuminado (FERREIRA, 1991).

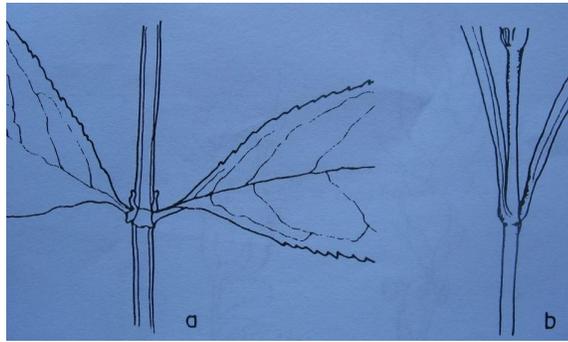


Figura 1: a. estípulas membranáceas; b. estípulas reduzidas a uma linha (Fonte: FERREIRA, 1991)

Marquand (1930) afirma que as folhas de certas espécies de *Buddleja* L. exibem uma ampla variação no tamanho, devido às condições ambientais, especialmente a umidade do solo. A forma da folha também sofre ampla variação (Fig. 2), podendo ocorrer até mesmo em uma mesma espécie. Um exemplo desta variação foi verificado com a espécie *B. campestris* (Fig. 3) (FERREIRA, 1991).

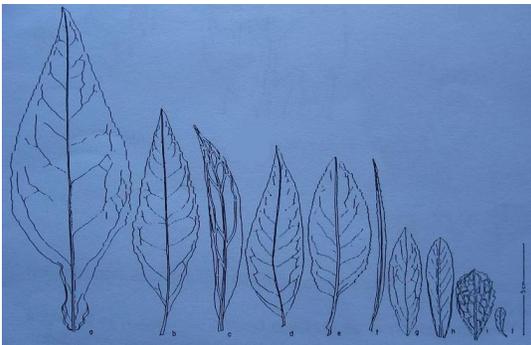


Figura 2: Tipos morfológicos das folhas do gênero *Buddleja*. (Fonte: FERREIRA, 1991)

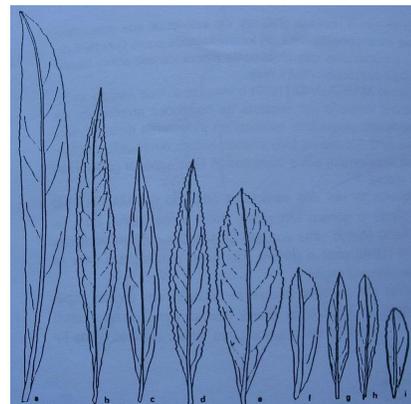


Figura 3: Variações morfológicas das folhas da espécie *B. campestris*. (Fonte: FERREIRA, 1991)

3.3. Descrição Morfológica da espécie *Buddleja thyrsoides* Lam.

Buddleja thyrsoides Lam. é um arbusto dióico, de 1 a 4 metros de altura. Possui córtice pálido-castanho, os ramos jovens são cobertos por um tomento alvo. As folhas são sésseis ou subsésseis; apresentam estípulas reduzidas a uma linha. O formato da lâmina foliar é do tipo linear ou linear-lanceolada, acuminada no ápice, atenuada na

base, medindo de 4 a 14 cm de comprimento. A margem apresenta-se subinteira até serrada, pouco revoluta na base. A face abaxial possui consistência alvo-tomentosa e a face adaxial cedo glabra. A inflorescência mostra-se em forma de tirso (Fig. 4), com coloração das flores roxo-pálido (SMITH *et al.*, 1976; FERREIRA, 1991). A época de floração fica entre os meses de agosto e novembro e frutifica em outubro (SMITH *et al.*, 1976)

Segundo Smith e colaboradores (1976), *Buddleja thyrsoides* Lam. apresenta como sinônimas:

- *Buddleja salicifolia* Vahl.;
- *Buddleja cambara* Arech e;
- *Buddleja chloroleuca* Kränzl.

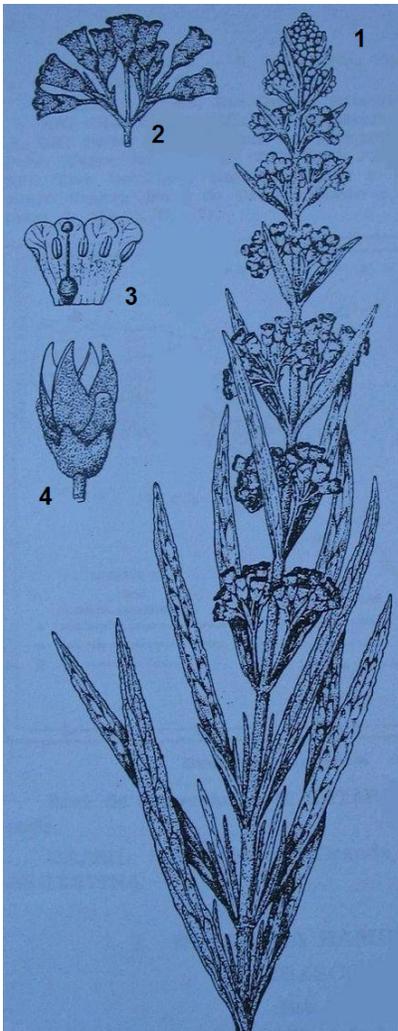


Figura 4: *Buddleja thyrsoides* Lam.: 1. ramo florístico; 2. cima; 3. flor aberta; 4. fruto. (Fonte: SMITH *et al.*, 1976)

3.4. Informações Etnofarmacológicas: uso popular

A seguir são citados os usos populares de algumas espécies do gênero *Buddleja*. Deve-se levar em consideração que, muitas vezes, o termo utilizado para designar uma enfermidade pode não ser o termo científico apropriado, e que freqüentemente, a palavra utilizada está relacionada a alguma sintomatologia e não à enfermidade em si. Adicionalmente, é comum a utilização do mesmo nome popular para designar espécies diferentes.

Várias espécies do gênero *Buddleja*, ao longo dos anos, têm sido utilizadas na medicina popular em muitas partes do mundo tais como América do Norte e Sul, África e Ásia. Raízes, cascas, flores e folhas das plantas deste gênero são usadas em diferentes tipos de enfermidades como disenteria, inflamações nos olhos e pele e como agentes diuréticos e antisépticos entre outras (HOUGHTON, 1984).

Kissmann e Groth (1999) relataram o uso de *Buddleja brasiliensis* Jacq., conhecida popularmente como barbasco, verbasco, calça-de-velho e cesarina, em humanos e animais. Atribui-se a ela propriedades emolientes, anti-helmínticas, sudoríficas, anti-hemorroidais, antiartríticas e anti-catarrais. Em animais é utilizada para lavagem de olhos e tratamento de pisaduras de eqüinos.

No México, a *Buddleja cordata* é utilizada para curar abscessos, misturada com banha de porco, é colocada sobre feridas ou machucados, e também como antipirético. As folhas picadas com carbonato e banha são utilizadas para infecções estomacais; em infecções renais como diuréticos (GALLARDO-VASQUEZ, 1996).

Na Bolívia, *Buddleja tucumanensis*, um arbusto nativo da província de Quillacollo – Cochabamba é popularmente conhecida por 'yuraq-wasa'. Suas folhas e flores são utilizadas na medicina popular para lavagem de feridas e para tratar úlceras e doenças urinárias (SAGASETA apud LORENZO *et al.*, 2006).

As folhas da *Buddleja parviflora*, largamente distribuída no México - o extrato é usada na medicina popular como agente diurético (GALLEGO *et al.* apud HOUGHTON, 1984), e antireumático (CORTÉZ *et al.*, 2006). *Buddleja madagascariensis* Lank., um arbusto originário de Madagascar é extensamente distribuído no Egito. Popularmente é usada para tratamento de asma, bronquite e tosse, e suas folhas como um substituto

de sabão (HOUGHTON, 1984).

Planta endêmica no Chile e Argentina, as folhas de *Buddleja globosa* são utilizadas por índios Mapuche para tratamento de feridas (HOUGHTON, MANBY, 1985). No Chile as folhas pulverizadas servem para o tratamento de úlceras há muitos anos (MURILLO apud MENSAH et al., 2001). Em 1886 as folhas da *B. globosa* foram incluídas na primeira edição da Farmacopéia Chilena (IMBESI apud MENSAH et al., 2001).

Conhecida na China por “Mi Meng Hua”, a *Buddleja officinales*, com registro na Farmacopéia Chinesa, possui atividade antiinflamatória e antibacteriana. É usada para tratar infecções nos olhos (GUO et al., 2004). Também chinesa mas cultivada em muitas partes do mundo por ser uma planta ornamental, o pó das folhas e talos de *Buddleja davidii* é recomendado como ingrediente para estimular a cicatrização de feridas, para tratar úlceras de pele e para curar lesões associadas a leprose (HOUGHTON, 1984).

As raízes, caules e folhas da *Buddleja asiatica*, conhecida na China como “Bai-Yu-Wei”, tem seu uso na medicina popular chinesa para tratar febre, dor contínua, diarreia e reumatismo articular (JIANGSU NEW MEDICAL COLLEGE apud CHEN et al., 2005). *Buddleja scordioides*, conhecida popularmente, no México, como escovinha, ramo-de-borboleta, salvinha, sálvia-real e mato, é muito usada para tratamento de diarreia, cólicas estomacais e doenças gastrointestinais (MÁRQUEZ et al., 1999).

No México, a *Buddleja perfoliata*, conhecida como salvia-chiquita, salvia-do-campo, erva-de-manita (HOUGHTON, 1984), é utilizada popularmente no tratamento de tuberculose, bem como para catarro, ptialismo e dor de cabeça (CORTÉS et al., 2006). Em 1930, esta espécie foi reconhecida pela Farmacopéia Mexicana por sua atividade anti-sudorífica (HOUGHTON, 1984).

A espécie *Buddleja thyrsoides* Lam, objeto de estudo neste trabalho é conhecida popularmente por barbasco, cambará e cambarazinho-do-campo. A decocção das flores e folhas é utilizada para bronquite e tosse (www.brazilian-plants.com/br/search.cfm, 2006; UPHOF apud HOUGHTON, 1984).

3.5. Metabólitos secundários do gênero *Buddleja* e atividades relacionadas

Enzimas, coenzimas e organelas produzem, transformam e acumulam substâncias não necessariamente de forma direta à manutenção da vida de organismos vegetais, microorganismos e, em menor escala, animais. Nesse grupo, encontra-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, com bioquímica e metabolismos específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização (SIMÕES *et al.*, 2003).

A todo este conjunto metabólico é definido como metabolismo secundário. O produto desse metabolismo, nem sempre essenciais à sobrevivência do organismo, garantem vantagens à sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema (SANTOS apud SIMÕES *et al.*, 2003).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos (taninos hidrolizáveis, alcalóides derivados desses aminoácidos e fenilpropanóides) (SANTOS apud SIMÕES *et al.*, 2003).

O elevado número e a grande diversidade dos metabólitos secundários despertam interesse em vários campos da ciência, os quais acreditam ser fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (SANTOS apud SIMÕES *et al.*, 2003).

Várias espécies de *Buddleja* têm sido extensivamente pesquisadas quanto aos seus metabólitos secundários, resultando no isolamento de inúmeras e diversas substâncias, como terpenóides (HOUGHTON *et al.*, 1996), flavonóides (ARCINIEGAS *et al.*, 1997), iridóides (MIYASE *et al.*, 1991), feniletanóides (YAMAMOTO *et al.*, 1993), fenilpropanóides (HOUGHTON, 1984), sesquiterpenos (YOSHIDA *et al.*, 1976, 1978a,b), lignanas (YAMAMOTO *et al.*, 1991) e saponinas (DING *et al.*, 1992; EMAM *et al.*, 1996; YAMAMOTO *et al.*, 1991).

Segundo a literatura, foram isolados diversos metabólitos secundários de espécies de *Buddleja*, dos quais alguns com atividades farmacológicas já testadas.

Alguns destes compostos têm mostrado efeito inibidor sobre a geração de

eicosanóides de leucócitos (LIAO *et al.*, 1999), atividades anti-hepatotóxica (HOUGHTON, HIKINO, 1989), antifúngica (MENSAH *et al.*, 2000), antibacteriana (ARCINIEGAS *et al.*, 1997) e antiprotozoária (EMAM *et al.*, 1996).

3.5.1. *Buddleja madagascariensis* Lank

Nas folhas da *Buddleja madagascariensis* isolou-se β -sitosterol, estigmasterol, amirina (KAPOOR *et al.* apud EMAM *et al.*, 1997), saponinas, dois iridóides (aucubosídeo e metoxicatalpol), flavonóides triglicosídeos (hesperetina e diosmetina 7-*o*-(2'',6''-di-*o*- α -ramnopiranosil)- β -D-glicopiranosídeo e escutelareina 7-*O*- β -D-glicopiranosídeo (EMAM *et al.*, 1996), saponina triperpenóide como mimengosídeo B (EMAM *et al.*, 1997), além de uma mistura de n-alcanos.

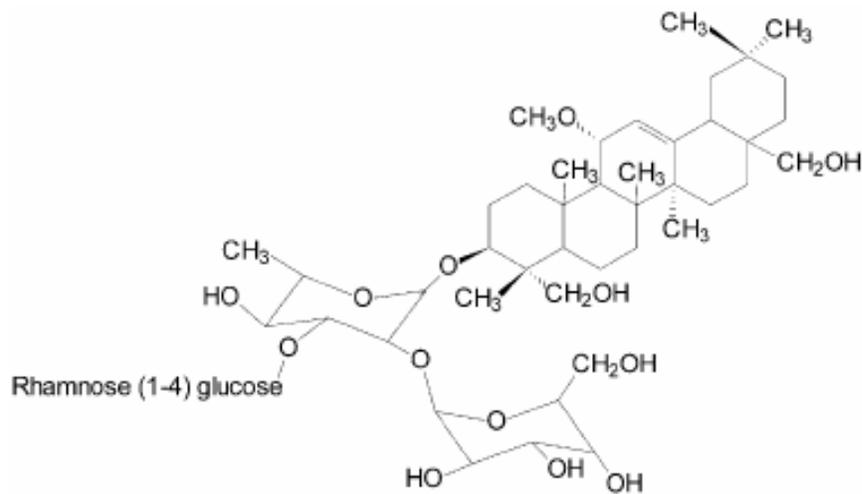


Figura 5: Mimengosídeo B (Fonte: EMAM *et al.*, 1997)

O uso da infusão de suas folhas para o tratamento de asma, tosse e bronquite, é devido provavelmente, a ação expectorante causada por estimulação da secreção no trato respiratório. Sabe-se que vários terpenos e saponinas têm esse efeito, por exemplo, o uso do óleo de Turpentina em remédios para tosse na medicina ocidental, bem como a presença de mimengosídeo B em *Buddleja* pode explicar esta atividade. O mimengosídeo B isolado por Emam e colaboradores (1997) permitiu a correlação da atividade da substância com as propriedades terapêuticas descritas para esta planta.

3.5.2. *Buddleja parviflora*

Do extrato hexânico de *Buddleja parviflora* isolou-se β -sitosterol e estigmasterol; do extrato acetato de etila obteve-se vaniloil ajugol, verbascosídeo, glicosperetina, e pinacantosídeo (ARCINIEGAS *et al.*, 1997).

Do extrato metanólico foi isolado o *O*-metil-catalpol, aucubina, verbascosídeo, glicosperetina, pinacantosídeo e linarina (ARCINIEGAS *et al.*, 1997).

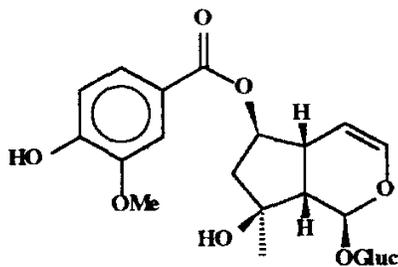


Figura 6: vaniloil ajugol (Fonte: ARCINIEGAS *et al.*, 1997)

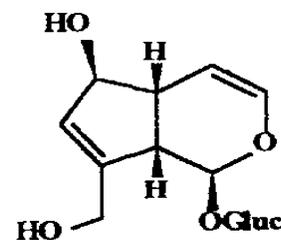


Figura 7: aucubina (Fonte: ARCINIEGAS *et al.*, 1997)

3.5.3. *Buddleja scordioides*

De *Buddleja scordioides* são conhecidas saponinas triterpênicas e fenilpropanóides, como siringina (ÁVILA, DE VIVAR, 2002). Em estudos realizados por Acevedo e colaboradores (2005), o extrato metanólico, bem como os compostos isolados deste extrato, verificaram atividade fotoprotetora, tanto do extrato como do verbascosídeo e linarina, justificando o uso das folhas para proteção solar.

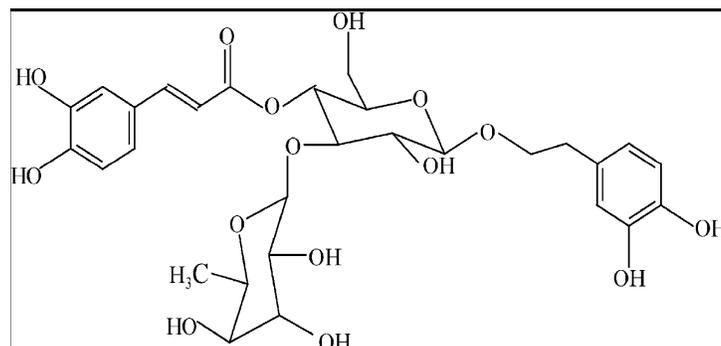


Figura 8: verbascosídeo (Fonte: SHENG *et al.*, 2002)

3.5.4. *Buddleja cordata*

Entre os componentes isolados de *B. cordata* estão os flavonóides, como a linarina com efeito diurético, iridóides como a acubina o qual possui efeito antisséptico e sesquiterpenos com efeitos pesticidas (HOUGHTON, 1984;).

3.5.5. *Buddleja tucumanensis*

Compostos como tujeno, pineno, p-cineno, trans-bergamoteno e cariofileno, foram identificados, em maior concentração, na composição do óleo essencial de *B. tucumanensis*, representando 81% da composição total da planta (LORENZO et al., 2006).

3.5.6. *Buddleja albiflora*

Originária da China, o extrato clorofórmico de *Buddleja albiflora* extraído das raízes apresentou um diterpeno, nomeado Buddlejona (7-hidroxi-7,9,12-abietrien-14-ona) (HOUGHTON et al., 1996).

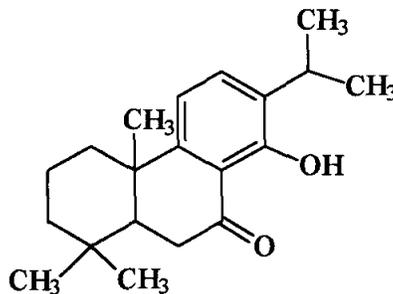


Figura 9: Buddlejona (Fonte: HOUGHTON et al., 1996)

3.5.7. *Buddleja globosa*

Do extrato aquoso da *Buddleja globosa* isolou-se verbascosídeo, equinosídeo, linarina, luteolina e 6-hidroxluteolina. Foi conferida forte atividade antioxidante aos compostos fenilpropanóides e flavonóides presentes no extrato aquoso, bem como um efeito simultâneo do extrato sobre o crescimento de fibroblastos. A atividade antiinflamatória e a estimulação do crescimento de fibroblastos também são atribuídas a esses flavonóides, justificando o uso de infusão da *Buddleja globosa* para curar ferimentos (MENSAH et al., 2001).

Do extrato clorofórmico das raízes de *B. globosa* isolou-se buddledina A, B e C, zerumbone e três compostos terpenóides, diidrobuddledina A, buddledona A e B (LIAO et al., 1999). Em um estudo sobre a atividade contra enzimas da cascata do ácido araquidônico, foi demonstrado por Liao e colaboradores (1999) que o extrato clorofórmico inibiu a enzima 5-lipoxigenase. Segundo Mensah e colaboradores (2000) foram relatados inibição de microorganismos dermatofíticos pelos compostos Buddledina A e B.

3.5.8. *Buddleja myriantha*

Os extratos clorofórmico e metanólico dos talos de *B. myriantha* foram testados quanto a capacidade de inibição das enzimas cicloxigenases e 5-lipoxigenases, onde apenas o extrato clorofórmico mostrou ser ativo (LIAO et al., 1999).

3.5.9. *Buddleja asiatica*

Uma lactona ciclopentanóide, buddledina, foi isolada da *Buddleja asiatica* (CHEN et al., 2005). Testes inibitórios da enzima 5-lipoxigenase mostraram um percentual de inibição (IC₅₀) de 15 e 35% nos extratos clorofórmico e metanólico, respectivamente. Esse resultado confirma a atividade antiinflamatória uma vez que essa enzima é uma das enzimas chave para o metabolismo do ácido araquidônico, o qual gera prostaglandinas e eicosanóides, que são mediadores de inflamação (LIAO et al., 1999).

3.5.10. *Buddleja officinalis*

Estudos com verbascosídeo, isolado de *Buddleja officinalis*, de indução da apoptose com íon 1-metil-4-fenilpiridina (MPP) e estresse oxidativo em células neuronais PC-12 mostrou significativo efeito contra o MPP, reduzindo a morte celular por apoptose ou morte necrótica via disfunção mitocondrial e obteve-se um significativo aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio extracelular (SHENG et al., 2002).

Do extrato n-butanólico de *B. officinalis* cinco saponinas denominadas mimengosídeos C, D, E, F e G, quatro feniletanóides (acteosídeo, feniletil-2-glicosídeo, equinocosídeo e feniletil álcool 8-o-β-D-glicopiranoil-(1→2)-β-D-glicopiranosídeo). As cinco saponinas apresentaram atividade citotóxica contra células leucêmicas HL-60

(GUO *et al.*, 2004).

Liao e colaboradores (1999) também isolaram metabólitos das flores de *B. officinalis*, tais como: do extrato clorofórmico δ -amirona e acetina, e do extrato metanólico vários componentes, entre eles o verbascosídeo.

O extrato clorofórmico e metanólico das flores, assim como o verbascosídeo, apresentaram atividade contra as duas enzimas da cascata do ácido araquidônico testadas por Liao e colaboradores (1999).

3.5.11. *Buddleja yunanensis*

Foram isolados do extrato clorofórmico dos talos desta espécie β -sitosterol e 11,14-diidroxi-8,11,13-abietatrieno-7-ona. Já do extrato metanólico foi isolado verbascosídeo, metilcatalpol, equinacosídeo, entre outros. Liao e colaboradores (1999) verificaram atividade inibitória contra a cicloxigenase apenas do extrato clorofórmico, além do verbascosídeo já mencionado anteriormente.

3.6. Atividades Tóxicas e Biológicas.

Diante do uso indiscriminado de plantas medicinais, tornam-se necessários experimentos que avaliem a eficácia e garantam a segurança do seu uso, visando esclarecer a população quanto aos riscos e benefícios oferecidos por essa terapia e guiar pesquisadores na descoberta de compostos bioativos para a obtenção de outros fármacos.

3.6.1. Ensaio de Toxicidade

É cada vez maior a utilização de ensaios *in vitro*, de baixo custo, de fácil e rápida execução em laboratórios de produtos naturais, e o ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* é um deles (SIQUEIRA *et al.*, 1998).

Artemia salina é um micro crustáceo que se desenvolve em habitats marinhos de alta salinidade. São abundantes em seu habitat natural sendo suscetíveis à poluição e toxinas do ambiente marinho, consideradas assim indicadoras biológicas de poluição marinha (COLEGATE, MOLYNEUX, 1993).

Algumas espécies de plantas medicinais têm alta toxicidade, como o confrei (*Symphytum officinale* L.), cujo chá e suco já foi utilizado largamente pela população. Estudo científico comprovou que esse vegetal sintetiza alcalóides pirrolizidínicos, substâncias causadoras de necrose centro-lobular, levando a lesões hepáticas graves. Hoje, o uso do confrei se limita a produtos de uso externo, de aplicação tópica

Tendo em vista a vasta utilização do gênero *Buddleja*, sendo algumas delas tóxicas, como mencionado anteriormente, foi objetivo deste estudo a verificação da toxicidade do extrato bruto e frações diclorometano, acetato de etila e butanólico das folhas de *B. thyrsoides* através de um ensaio, *in vitro*, onde foram utilizados larvas de *Artemia salina*.

Sabe-se que esse ensaio de toxicidade é muito preliminar, porém pode-se ter uma noção da toxicidade da planta, uma vez que *Artemia salina* é extremamente sensível.

3.6.2. Ensaio Biológico

Segundo observações feitas por Houghon (2000), ao longo dos últimos 20 anos estudos etnofarmacológicos incluído, cada vez mais, estudos de bioensaios *in vitro* como um substituto de experimentos utilizando animais ou tecidos desse . Isto é devido, em parte, aos problemas éticos e comerciais da utilização de animais, e também da inadequação de tais práticas para guiar o fracionamento dos compostos responsáveis por determinadas atividades. Estes procedimentos podem ser baseados em cultura de células, estudo de enzima ou receptores, entre outros.

3.6.2.1. Ação Antiplaquetária

Levando em consideração a enorme procura de plantas medicinais para diferentes sintomas, principalmente, circulatórios, verificou-se para o extrato e frações das folhas de *B. thyrsoides* uma possível ação antiplaquetária.

3.6.2.2. Ação inibitória da enzima acetilcolinesterase

A doença de Alzheimer (DA) é uma desordem neurodegenerativa com sintomas de perda de memória e diminuição da capacidade cognitiva e emocional, de grande

impacto sócio-econômico, responsável por cerca de 50-60% do número total de casos de demência dentre pessoas acima de 65 anos (VEIGAS *et al.*, 2004).

Essa desordem em nível celular, está associada à redução das taxas de acetilcolina (Ach) no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica cortical, além de outros neurotransmissores (LI *et al.*, 2003; MARSTON *et al.*, 2002).

Os fármacos inibidores da acetilcolinesterase (AchE) vêm sendo, atualmente, a alternativa mais comumente empregada por apresentar melhores resultados no controle sintomático da DA (SHARMA apud VINUTHA *et al.*, 2007). Na busca de novos candidatos ao tratamento dessa doença, o campo fitoquímico vem sendo muito estimulado, principalmente devido a nossa grande biodiversidade, para fornecer inibidores da AchE. O extrato bruto de *B. thyrsoides* foi analisado frente à enzima acetilcolinesterase visando determinar uma possível atividade anticolinesterásica.

3.6.2.3. Ação Antimicrobiana

As doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas são ainda a maior ameaça à saúde pública a pesar do progresso da medicina humana. Seu impacto é particularmente grande em países em desenvolvimento devido à inviabilidade relativa de medicamentos e a emergente resistência dos microorganismos às drogas em uso (OKEKE *et al.*, 2005).

Inúmeras pesquisas tem sido desenvolvidas objetivando a determinação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais, assim como de seus compostos isolados (FERREZIN *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2001; RAMESH *et al.*, 2002). Estes extratos são reconhecidos por suas substâncias ativas como é o caso dos compostos fenólicos, óleos essenciais, e taninos (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Foi realizado neste trabalho, o ensaio de ação antimicrobiana, principalmente devido a poder antimicrobiano exercido pelo compostos fenólicos, os quais estão presentes em todas as espécies de *Buddleja* já estudadas.

3.7. Óleos essenciais

Os óleos essenciais, de maneira geral, são misturas complexas de substâncias

voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES *et al.*, 2003), podendo conter normalmente até 100 compostos, sendo que um, dois ou algumas vezes três destes, dominam em termos de porcentagem (TISSERAND, 1996). Os terpenos e seus derivados de baixo peso molecular aparecem nas plantas como constituintes principais dos óleos essenciais. Os terpenóides mais freqüentes nos óleos essenciais são os monoterpenóides (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenóides (SIMÕES, SPITZER, 2003).

Além de serem responsáveis pelo odor agradável e característico de muitos vegetais, os óleos essenciais apresentam funções biológicas variadas, tais como inibição do crescimento de outras espécies (alelopatia), proteção contra predadores e atração de polinizadores (INOUYE, 2003; SIMÕES, SPITZER, 2003) entre outras. Por apresentarem ações biológicas e características físicas e organolépticas variadas são empregados industrialmente em gêneros alimentícios, medicamentos, cosméticos, perfumes e produtos de limpeza, sendo também empregados na aromaterapia, devido às suas propriedades farmacológicas (PAULI, 2001).

Para os óleos essenciais são relatadas as atividades repelente, inseticida (MENDONÇA *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2006), antimicrobiana (PONCE *et al.*, 2003), antioxidante (HUI *et al.*, 2006), antiviral (KHAN *et al.*, 2005), antileishmaniose (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006), entre muitas outras. O amplo espectro antibiótico apresentado pelos óleos essenciais não se dá somente contra vírus, bactérias e fungos, mas também contra protozoários, ácaros, insetos e plantas (INOUYE, 2003).

Existem vários estudos que mostram as atividades inibitórias apresentadas por óleos essenciais e por constituintes de estrutura terpênica sobre o crescimento de microrganismos (PAULI, 2001; BURT, 2004)

Entre as espécies de *Buddleja* somente o *Buddleja tucumanensis* teve a composição química de seu óleo essencial estudada (LORENZO *et al.*, 2006).

3.8. Atividades Farmacológicas

3.8.1 Atividade Antioxidante

De acordo com Mensor e colaboradores (2001), as substâncias antioxidantes

presentes nos vegetais neutralizam a ação dos radicais livres. O consumo diário destas substâncias pode fortalecer o sistema imunológico, além de reduzir o risco de uma série de doenças como o desenvolvimento de câncer através da ação prolongada dos radicais livres no organismo, os quais são combatidos pelos antioxidantes.

Um método simples para estimar a capacidade antioxidante de uma amostra é pela aplicação do método fotolorimétrico utilizando DPPH, o qual se apresenta na forma de um radical livre, relativamente estável, que produz coloração violácea em etanol. A redução da coloração é explicada pela redução da molécula de DPPH, após ter entrado em contato com uma substância com poder antioxidante.

Conforme mostrado no item 3.5, várias espécies do gênero *Buddleja* possuem ação antioxidante. A fim de verificar essa mesma ação para *Buddleja thyrsoides*, o teste do DPPH foi realizado para o extrato bruto e fração da planta conforme descrito por Choi e colaboradores (2002).

3.8.2. Avaliação de Polifenólicos totais

Como foi relatada para o gênero *Buddleja*, uma grande quantidade de compostos polifenólicos foram isolados para diversas espécies, inclusive a explicação para a maior parte das atividades antioxidantes exibidas para o gênero, advém de compostos polifenólicos.

Com intuito de verificar a quantidade de polifenólicos totais para a espécie deste trabalho, foi aplicado o ensaio utilizando Folin-Ciocalteu, descrito por Chandra e Mejia (2004).

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 1: MORPHOANATOMICAL AND PHYTOCHEMICAL STUDY OF *BUDDLEJA THYRSOIDES* Lam. LEAVES (SCROPHULARIACEAE)

Submetido à Latin American Journal of Pharmacy (Acta Farmacéutica Bonaerense)

**MORPHOANATOMICAL AND PHYTOCHEMICAL STUDY OF
BUDDLEJA THYRSOIDES Lam. LEAVES (SCROPHULARIACEAE)**

Janaina D. MAHLKE¹, Michel M. MACHADO¹, Gilberto D. ZANETTI², Melânia P. MANFRON², Margareth L. ATHAYDE^{2*}.

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Santa Maria, RS, Brasil. CEP:97105-900*

²*Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, Prédio 26, sala 1115, Santa Maria, Rio Grande do Sul, CEP 97105-900, Brasil.*

ABSTRACT

This work deals with foliar morphology, anatomy and phytochemical profile of *Buddleja thyrsoides* Lam. (Scrophulariaceae) leaves. The leaves present a lanceolate-linear shape, straight adaxial face; the margin is serrate to sub-entire and little revolute close to the basis. The epidermis is uniseriate, with the epidermal cells of the adaxial face bigger than those of abaxial face, stomata and trichomes in abaxial face. The mesophyll is heterogeneous, bifacial and presents brachiblasts and crystals in druse form. The vascular system is of the open collateral type. These characters are significant in the botanical quality control of this species. Phytochemical screening revealed alkaloids, flavonoids, cumarins, anthocyanic heterosides, and saponins.

RESUMEN. “Morfoanatomía y estudio fitoquímico de las hojas de *Buddleja thyrsoides* Lam (Scrophulariaceae)”. Se estudió la morfoanatomía y se determinó el perfil fitoquímico de las hojas de *Buddleja thyrsoides* Lam.. Las hojas presentan forma linear-lanceolado y la cara adaxial plana, márgenes de serradas a poco más o menos enteras y poco revueltas a cerca de la base. La epidermis es uniseriada con las células epidérmicas de la cara adaxial mas grandes do que las de

la cara abaxial y con estomas y tricomas en la cara abaxial. El mesofilo es heterogéneo, con disposición bilateral y con la presencia de braquiblastos y cristales en la forma de drusas. Lo sistema vascular es abierto, de lo tipo colateral. Estos caracteres son significantes en lo controle botánico de esta especie. Lo estudio fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas, heterosidos antocianicos y saponinas.

KEY WORDS: *Buddleja thyrsoides*, Scrophulariaceae, morphoanatomy.

PALABRAS CLAVE: *Buddleja thyrsoides*, Scrophulariaceae, morfoanatomía

*Author to whom correspondence should be addressed: margareth@smail.ufsm.br

INTRODUCTION

The genus *Buddleja* was proposed by Houston in 1737 and published by Linnaeus, in 1753. Jussieu (1789) was the first to consider *Buddleja* as a member from Scrophulariaceae¹. Since the 1790s to 1999s, *Buddleja* passed through several orders and families according to its morphological, anatomic, genetic and phytochemical characteristics. Bethan & Hooker (1876), Solereder (1892) joined to other botanists removed *Buddleja* from Scrophulariaceae family and integrated it to Loganiaceae family². Dahlgren (1975) published the genus *Buddleja* in the family Buddlejaceae, in order Gentianales³. As well as Cronquist (1981), other authors recognized Buddlejaceae within the order Scrophulariales⁴⁻⁶. Nowadays the Angiosperm Phylogeny Group (APG) integrated the Buddlejaceae family into the Scrophulariaceae, in Lamiales order⁷.

Buddleja is a genus of pantropical distribution, present in Southern Asia, Africa and America. It comprises nearly 100 species, and a large number of these species occurs in Americas⁸. In Brazil 14 native species and one exotic (*Buddleja davidii* Franch.) are known with distribution in Southern and Southeastern regions, with the exception of *Buddleja brasiliensis*

which is distributed in Central-Western and Northeastern regions of Brazil². Several species of this genus have been utilized in traditional medicine in many parts of the world. Roots, barks, flowers and leaves of the plants of this genus are used in different diseases as dysentery, eye and skin inflammation, as diuretic agents, antiseptics, and antirheumatic and in asthma, bronchitis and cough^{9,10}. Researches of some species of the genus *Buddleja* resulted in the isolation of terpenoids¹¹, flavonoids¹², iridoids¹³, phenylethanoids¹⁴, sesquiterpenes¹⁵⁻¹⁷, lignans¹⁸ and saponins¹⁸⁻²⁰. Several of these chemical compounds have shown inhibitor effect on the generation of eicosanoids of leucocytes²¹, antihepatotoxic²², antifungal²³, antibacterial¹⁰, and antiprotozoan²⁰ activities.

The species *Buddleja thyrsoides* Lam., object of this study, present in these countries – Argentina, Brazil, Uruguay and Paraguay²⁴ – is popularly known as barbasco and cambarazinho-do-campo. This plant is a shrub that reaches one meter tall, but it can grow up to four meters high. It blossoms between the months of August and November and fructifies in October²⁴. Due to the importance of cambarazinho-do-campo as a medicinal plant of wide traditional use, the purpose of this work was to determine the morphoanatomical characteristics of the leaves, useful in the quality botanical control, and to obtain a qualitative chemical profile of the constituents present in this vegetal organ through an preliminary phytochemical screening.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The leaves of *Buddleja thyrsoides* Lam. were collected in the countryside of the municipality of São Luiz Gonzaga, state of Rio Grande do Sul, Brazil, and a sample of the flowering vegetal material was identified by Dr. Thais Scotti do Canto-Dorow and stored in the Herbarium of Biology Department of the Federal University of Santa Maria, according to exsiccate SMDB 10125. The anatomical analysis was carried out with samples of 2 x 2 mm of

leaves, fixed in glutaraldehyde at 2 %, and kept at 4° C. For the qualitative phytochemical analysis the material was dehydrated in a circulating-air greenhouse at 36° C and pulverized in a knife-mill, obtaining 50 g of a powder. This material was stored in amber vial for posterior extraction.

Determination of macro and microscopical features

The macroscopically characteristic determination was accomplished through naked-eye observations and with help of a stereomicroscope (amplifying 10 x)²⁵. For the study of venation the vegetal material was diaphanized and dyed with saphrin at 0.1 % in ethylic alcohol at 50 %, dehydrated and mounted in glycerin²⁶⁻²⁸. In the microscopically characterization, the apical-median region of adult-leaf blades²⁹⁻³¹ was analyzed. The foliar epidermis study, in the abaxial and adaxial faces, was carried out in semi permanent blades, with paradermic sections obtained by freehand from fresh material, dyed with methylene blue at 0.1 %³². For the analysis of the transversal section the preserved material was dehydrated in ascendant ethylic range, at the graduations of 50°,60°, 70° and 96° GL, for an hour in each solution, and included in hydroxide ethyl methacrilate blocks^{33,34}. Sections of 4 µm were obtained in rotation microtome, taken to histological bath, repassed to the blade, dyed with toluidine blue at 0.1 %^{35,36} and assembled in synthetic balsam. The permanent blades were stored in the Pharmacognosy Laboratory of Industrial Pharmacy Department of the Federal University of Santa Maria. The determination of organoleptic, and macroscopic and microscopic characters of fractures, as well as the granulometry of the pulverized leaves were carried out for sieving and in semipermanent blades, utilizing as a dye, methylene blue at 0.1 %^{37,38}. Fifty grams of the ground drug were submitted to a forced passage by vibration, through a range of sieves with opening of the nets that vary from 71 to 2.500 µm, utilizing a vibratory device. The fractions taken away in each sieve, were weighed and the fraction percentages of passage (P) and of retention (R) were calculated. The

values were represented in percentage (% p/p)³⁹. The medium diameter of powder particles was obtained by probits.

Phytochemical screening

The qualitative chemical analysis was accomplished in ethanolic extract at 70 % obtained in cold, according to Moreira (1979)⁴⁰. After this analysis, the extract was dried and resuspended in water for subsequent partition in organic solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and butanol, 3x 15 mL each fraction).The chromatographic profile of the crude extract and the fractions was obtained by thin layer chromatography (TLC) over chromate sheets of silica gel G60 F₂₅₄, utilizing dichloromethane, ethyl acetate, methanol and water in the proportions of 6:3:2:0,5 v/v/v/v, respectively. Sulphuric anisaldehyde (110 °C, 10 minutes) was used as a chromogenic reagent.

RESULTS AND DISCUSSION

A great phenotypical plasticity was found in *Buddleja thyrsoides* leaves. The margin varies from serrate to sub-entire, being little revolute near the base, with a laceolate-linear shape. In the transversal section, the median portion of the foliar blade is slightly re-entering in the adaxial face and exhibits convex outline in the abaxial face. The leaves of the genus *Buddleja* presents significant morphological variation among the species, with serrate, crenate or dentate margin, seldom lobate and the linear to obovate limb form². The found data are similar to those obtained by Smith et al. (1976) and differ from *B. oblonga*²⁴ and *B. brasiliensis Jacq.*⁴¹ that present crenate margin. The laceolate-linear form found in *B. thyrsoides* is a relevant feature, since the limb form in *B. vetula* and *brasiliensis* is obovate, elliptical-erect in *B. cestriflora* and oblong to lanceolate in *B. campestris*²⁴ (Figure 1 and Table 1).



Figure 1: General aspect of the *Buddleja thyrsoides* Lam. leaves. **1A.** Adaxial face. **1B.** Abaxial face.

Table 1. Macroscopic Features of *Buddleja thyrsoides* Lam. leaf

CARACTERS		CARACTERIZATION
PETIOLE		Unpetiolate
L	Number	Simple
	Form	Lanceolate-linear
	Size	11.05 x 0.9 cm (9.0 x 0.7 – 13.0 x 1.1)
I	Edge	Serrate to sub-entire Slightly revolute near the basis
	Apex	Acuminate
	Base/Basis	Cuneate/Atenuate
M	Colo	Dark green in the adaxial face and little bright whitish-gray in the abaxial face
	Texture	Straight at adaxial face Lightly velvety at the abaxial face
B	Consistence	Membranaceous
	Venation	Pinnate, camptodrome of eucamptodrome type
	Stipule	Reduced to a line
	Phylotaxy	Crossed-opposite

The epidermis is uniseriate. The epidermal cells, in a paradermic view, present hexagonal form in the adaxial face and in the abaxial face (Figure 2).

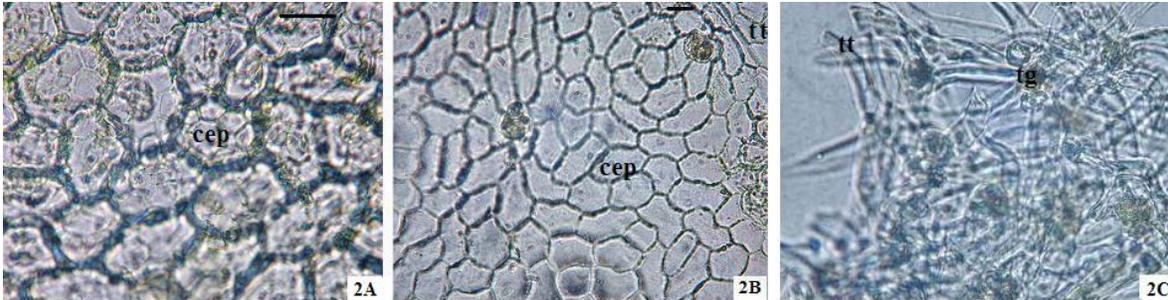


Figure 2: Paradermic section of the *Buddleja thyrsoides* Lam. leaves. **2A.** Adaxial face. **2B** and **2C** Abaxial face. Legend: **cep:** epidermal cell; **tt:** tector thricome; **tg.** glandular thricome. Scale: 10 µm.

In the transversal section, the adaxial face epidermal cells present a nucleus dislocated from central region, near the plasmatic membrane that is opposite to the cuticle. The anticlinal wall size is larger than the periclinal wall (15 µm x 10 µm) and the cellular wall opposite to upper face is lightly curve (Figure 3A).

The epidermal cells of the abaxial face present an ovoid (3 µm x 2 µm) or rectangular (4 µm x 5 µm) shape, and in the regions of vascular bundles of second order and central present a round form (3µm x 3µm) (Figure 3). In the adaxial face the cuticle is straight and thick without epicuticular formations. In the abaxial face the cuticle is plicate and less thick than in the adaxial face (Figure 3A and 3B). The presence of glandular and tector thricomes (Figure 2C and 3C) and hygrophytic type of stomata were verified only in the abaxial face (Figure 3D).

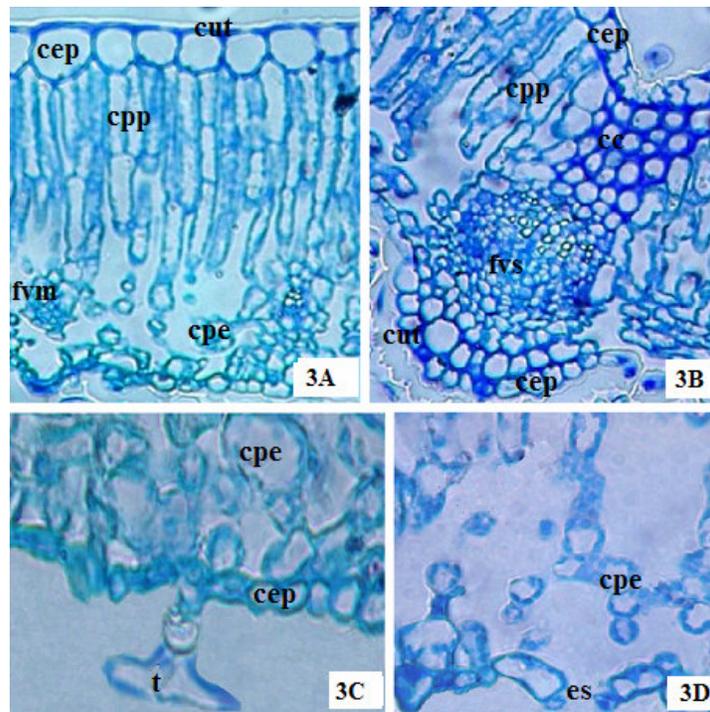


Figure 3: Transversal section of the *Buddleja thyrsoides* Lam. leaves. **3A** side region of the mesophyll. **3B**. region of a vascular bundle of second order. **3C**. detail of the side region evidencing thricome in the abaxial face of the epidermis. **3D**. detail of the side region evidencing stomata in the abaxial face of the epidermis. Legend: **cep**. epidermical cells; **cut**. cuticle; **cpp**. cell of the palisade parenchyma; **cpe**. cell of the spongy parenchyma; **fvm**. vascular bundle of minor order; **fvs**. vascular bundle of second order. **cc**. collenchymatics cells; **t**. thricome; **es**. hygrophytic stomata. Scale: 15 μ m.

Metcalf & Chalk (1972) reported the genus *Buddleja* in the Loganiaceae family evidencing the presence of stomata just in the abaxial face³⁰, which is in agreement with *B. thyrsoides* analysis. On the other hand these authors pointed out the lack of thricomes³⁰, being discordant to the abaxial face of the analyzed material. According to Metcalf & Chalk (1972), in the Scrophulariaceae family the stomata are present in both faces, which wasn't evidenced in *B.*

thyrsoides, and the tector trichomes are often numerous. Oliveira et al. (1993) pointed out the trichomes as characters of great value in the diagnosis of vegetal drugs⁴². For their turn, Metcalfe & Chalk (1988) mentioned the trichome type classification as a consistent feature in the determination of a given vegetal species⁴³.

The mesophyll is heterogeneous, assuming a bifacial disposition (Figure 3A), which is according to Metcalfe & Chalk (1972) a common characteristic for the Scrophulariaceae³⁰. *Eriobotya japonica*⁴⁴ and *Camellia sinensis*⁴⁵, despite of belonging to distinct families, also present the same mesophyll pattern. For their turn, the leaves of *Calea uniflora* present isobilateral mesophyll⁴⁶. The cells that constitute *Buddleja thyrsoides* mesophyll possess chloroplasts close to plasmatic membrane, as reported for the *Syzygium cumini* L. leaves by Alberton et al. (2001)³⁹, and prominent nucleus, generally displaced from the central region, making implicit the existence of a large intracellular vacuole (Figure 3A and 3B). The palisade parenchyma located adjacently to adaxial face epidermis, possesses from two to three layers of juxtaposed cells, the first layer presenting bigger cells than the others (Figure 3A). This kind of palisade parenchyma also can be observed in the *Digitalis lanata* (Scrophulariaceae) leaves³⁸. The palisade index was determinate in 6.12.

The spongy parenchyma possesses about 5 layers of cells. The brachiblasts occur thereupon the palisade parenchyma and close to the abaxial epidermis the cells are ovoid to spherical (Figure 4A). The presence of brachiblasts in the spongy parenchyma, reported by Metcalfe & Chalk (1972) for Scrophulariaceae³⁰, was verified in this microscopical analysis of *Buddleja thyrsoides* leaves. The intracellular space in the spongy parenchyma is of the chamber and lacuna type (Figure 3C, 3D; Figure 4A). Both the palisade parenchyma median layer and some spongy parenchyma cells possess little and fragile crystals, in druse form (Figure 4B).

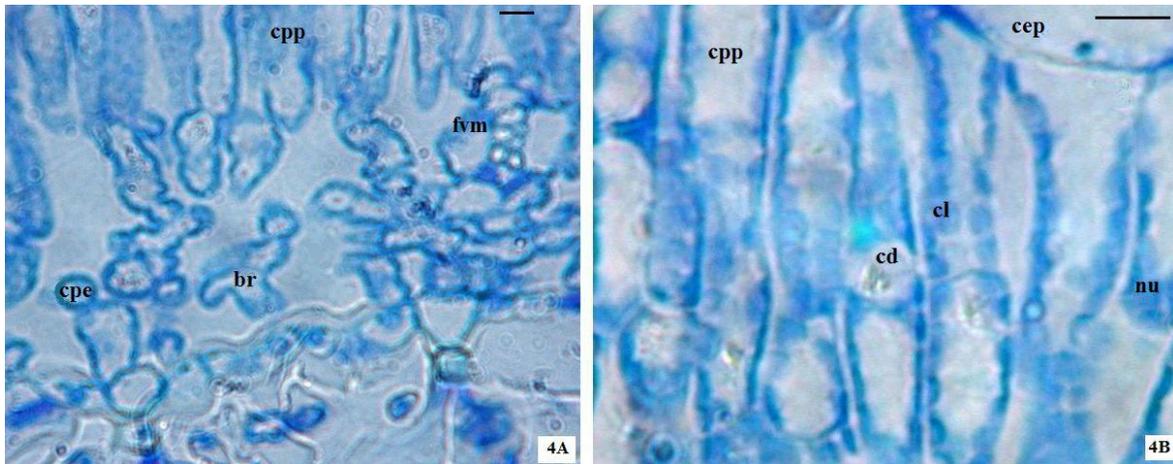


Figure 4: (A-B) Transversal section of the *Buddleja thyrsoides* Lam. leaves evidencing the mesophyll in detail. Legend: **cpp** cells of the palisade parenchyma; **cpe**. spongy parenchyma cells; **br**. brachiblast; **fvm**. vascular bundle of minor order; **cd**. crystal in druse form; **cl**. chloroplast; **cep**. Epidermal cell; **nu**. nucleus. Scale: 4 μ m.

The vascular system is composed by bundles of open collateral type. The xylem presents itself forming a radial system with interxylematic parenchymatic cells. The phloem is well developed (Figure 5). The vascular bundle has numerous characteristics that help in the medicinal plant diagnosis. In addition to be very constant among the individuals of same species, one verifies a range of variations in the anatomical patterns. In *Camellia sinensis* and *Calea uniflora*, for instance, one can observe a biconvex vascular bundle^{45,46} and in *Eriobotrya japonica*, other medicinal plant, the vascular bundle is of anticrival type⁴⁴.

A parenchymatic formation with about 10 layers of cells fills the central region. These cells assume minor dimensions over the central vascular bundle (Figure 5). There is a lacunal collenchyma formation subjacent the epidermis of the adaxial face. This formation is composed by nearly 5 cell layers (Figure 5A). There is also a lacunal collenchyma formation, with up to 3 cell layers, in the region subjacent to the abaxial face (Figure 5B). The vascular bundles of minor

order are situated thereupon the cell layers in palisade and are surrounded by parenchymatic cells, which tend to form an irregular vascular and little prominent sheath (Figure 3A).

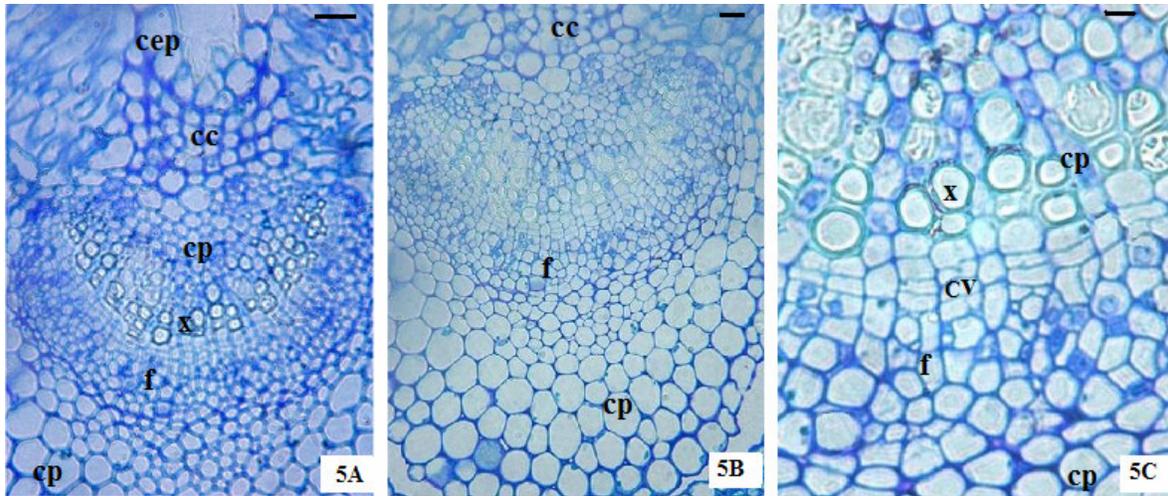


Figure 5: (A-C) transversal section of the central vascular bundle region of the *Buddleja thyrsooides* Lam. leaves. Legend: **cep**. epidermic cell; **cc**. collenchymatic cell; **cp**. parenchymatic cell; **x**. xylem; **f**. phloem; **cv**. vascular cambio. Scale: 10 μm .

Metcalf & Chalk (1972) characterized the mesophyll of the Loganiaceae leaves as simple dorsiventral, mentioning the presence of mucilaginous cells³⁰, features that weren't observed in *Buddleja thyrsooides*. Yet, the same authors pointed out a great anatomical variety in the mesophyll of Scrophulariaceae, as well as the presence of little crystals and a revolute margin³⁰, characteristics which also approximate *Buddleja thyrsooides* to this family.

Drug Characterization and Phytochemical Screening

Drug characterization is necessary to establish the technological parameters of a vegetal drug. For this, the granulometric evaluation is an indispensable parameter to be established, because it reflects directly the extraction optimization. When the powder has the medium diameter of a very little particle (smaller than 200 μm) it may compromise the filtration and

consequently, the active(s) substance(s) content(s). In the same way, if the medium diameter is very large (over than 800 μm) it can prejudice the extraction because it difficult the penetration of extractor liquid in all cells⁴⁷. Both situations can lead to the compromising of the quality of the extract obtained, which won't present the chemical content uniformity. The evaluation of the leaf granulometric behavior allowed to detect a medium diameter of particle equal to 440 μm . The powder obtained from *B. thyrsoides* leaves fits in the heterogeneous and moderately rough, once the most fractures 84.5 % remained in sieve with net 297 - 500 μm . The vegetal powdered material presented predominantly whitish-green coloration, *sui generis* odor and sweetened taste.

The extractive content determination is another important parameter for the extractive capacity evaluation of the active substances present in the drug. For *B. thyrsoides* the yield of the dry extract was of 16.28 % to the ethanolic extract at 70% and to the hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanolic fractions were 1.34 %, 3.11 %, 4.86 % and 6.93 %, respectively.

Phytochemical screening of the ethanolic extract at 70 % showed positive reactions to alkaloids, flavonoids, coumarins, anthocyanins, saponins and volatile oils. Tannins and cardio active substances were not detected. These results are in agreement with to the chemical groups of isolated compounds reported in literature⁹. The TLC profile established for the crude extract and fractions allowed to perceive the presence of the principal groups of substances⁴⁹ revealed in the phytochemical screening (data not shown).

CONCLUSIONS

The form, texture and margin of *Buddleja thyrsoides* leaf which possesses the peculiarity of being serrate and revolute near the base, are morphological characteristics that contribute for the morphodiagnosis of this species. The anatomical characters, like the epidermic cells of the

adaxial face larger than the abaxial face, the presence of hygrophytic stomata and tector and glandular trichomes in the abaxial face, bifacial mesophyll, vascular bundles of the open collateral type with a xylem radially arranged, when analyzed together, help in the authenticity of the leaves as pharmaceutical drug and approximate *Buddleja thyrsoides* to the Scrophulariaceae family. The high yield of the ethanolic extract at 70 % could be attributed to the great concentration of high polarity constituents, confirmed by the qualitative phytochemical screening.

ACKNOWLEDGEMENTS. The authors would like to thank Prof^a Dr^a Thais Scotti do Canto-Dorow, Botanical Department of Federal University of Santa Maria for providing the identification of *B. thyrsoides*.

REFERENCES

1. Aguiar-Rodriguez, S.& T. Terrazas (2001) *Madera y Bosques* **7**: 63-85.
2. Ferreira, H. D. (1991) “*Flora do Estado de Goiás*” - Buddlejaceae. Coord. José Ângelo Rizzo, Ed. CEGRAF/UFMG, Goiânia, Goiás.
3. Dahlgren, R. (1975) *Botanical Noticer* **128**: 119-147.
4. Carlquist, S. (1992) *Annals of the Missouri Botanical Garden* **79**: 303-332.
5. Struwe, L. & V. A. Albert (1997) “Floristics, cladistics, and classification: three case studies in Gentianales”. In: J. M. Dransfield, J. E. Coade y D. A. Simpson, eds. “*Plant diversity in Malesia*”. Third International Flora Malesiana. Symposium 1995. *Flora Malesiana*. p. 321-352.
6. Oxelman, B.; M. Backlund & B. Bremer (1999) *Syst. Bot.* **24**: 164-182.
7. The Angiosperm Phylogeny Group (2003) An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **141**, p. 399-436.
8. Mabberley, D. J. (1987) “*The plant-book*”. Cambridge University Press. Cambridge p. 707.
9. Houghton, P. J. 1984. *J. Ethnopharmacol.* **11**: 293-308.
10. Arciniegas A., A. Avendaño, A. L. Pérez-Castorena & A. Romo de Vivar (1997) *Biochem. Syst. Ecol.* **25**: 185-186.

11. Houghton, P.J., T.Z. Woldemariam, M. Candau, A. Barnardo, O. Khen-alafun & S. Li, (1996). *Phytochemistry* **42**:485-488.
12. Guo, H., K. Koike, W.Li, T. Satou, D. Guo & T. Nikaido (2004) *J. Nat. Prod.* **67**:10-13.
13. Miyase, T., C.Alkaori, H. Kohsaka & A. Ueno (1991) *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 2944-2951.
14. Yamamoto, A., S. Nitta, T. Miyase, A. Ueno & L. Wu (1993) *Phytochemistry* **32**: 421-425.
15. Yoshida, T., J. Nobuhara, M. Uchida & T. Okuda (1976) *Tetrahedron Letter* 3717-3720.
16. Yoshida, T., J.Nobuhara, M. Uchida & T. Okuda (1978)a. *Chem. Pharm. Bul.* **26**: 2535-2542.
17. Yoshida, T., J. Nobuhara, N. Fujii & T. Okuda (1978)b. *Chem. Pharm. Bull.* **26**: 2543-2549.
18. Yamamoto, A., T. Miyase, A. Ueno & T. Maeda (1991) *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 2764-2766.
19. Ding, N., S. Yahara & T. Nohara (1992) *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 780-782.
20. Emam, A. M., A. M. Moussa, R. Faure, A. Favel, F. Delmas, R. Elias & G. Balansara (1996) *Planta Med.* **62**: 92-93.
21. Liao, Y. H., P.J. Houghton & J.R.S. Hoult (1999) *J. Nat. Prod.* **62**: 1241-1245.
22. Houghton, P. J. & H. Hikino (1989) *Planta Med.* **55**: 123-126.
23. Mensah, A.Y., P.J. Houghton, S. Bloonfield, A. Vlietinck & D. Vander Berghe (2000) *J. Nat. Prod.* **63**: 1210-1213.
24. Smith, L. B., E. F. Guimarães, J.F. Pereira & E.M. Norman (1976) “*Flora Ilustrada Catarinense*”. Itajaí, SC, Brasil.
25. Vidal, W.N. & M.R.R. Vidal. (1986) “*Botânica - organografia; quadros sinópticos ilustrados de fanerógamas*” 3.ed., Viçosa: UFV, p. 144.
26. Marchiori , J.N.C. (1995) “*Elementos de dendrologia*” Santa Maria: UFSM, p. 173.
27. Hickey, L.J. (1974) *Bol. Soc. Arg. Bot.***16**: 1-26.
28. Felipe, G.M. & F.M.M.R. Alencastro (1966) *Am. Acad. Brasil. Ciênc.* **38**:125-57.
29. Stritmatter, C. G. D. (1973) *Bol. Soc. Arg. Bot.* **15**:126-9.
30. Metcalfe, C. R. & L. Chalk (1972) “*Anatomy of the dicotyledons*” Oxford: Claredon Press, v. 2, p. 925-933 and p. 978-988.
31. Dickison, W. C. (2000) “*Integrative Plant Anatomy*” Harcourt Academic Press, San Diego, p. 533.
32. Paoli, A. A. S. (2003) “*Anatomia vegetal*” Viçosa: Editora UFV, p. 438.
33. Oliveira, F. & G. Akissue (1989) “*Fundamentos de farmacobotânica*” Ed. Atheneu, São Paulo, p. 216.

34. Gerrits, P.O. & L. Smid (1983) *J. Microsc.* **132**: 81-5.
35. Ruetze, M. & U. Schimitt (1986) *Eur. J. For. Path.* **16**: 321-4.
36. Gerlach, D. (1977) “*Botanische mikrotechnik*” 2. ed., Stuttgart, Georg-Thieme Verlag, p. 211.
37. Costa, A. F. (1982) “*Farmacognosia*” 2. ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, v. 3, p. 1032.
38. Oliveira, F., G. Akisue & M.K. Akisue (1991) “*Farmacognosia*” Ed. Atheneu, São Paulo, p. 74-75 e 412.
39. Alberton, J. R., A. Ribeiro, L.V.S. Sacramento, S.L. Franco & M.A.P. Lima (2001) *Rev. Bras. Farmacog.* **11**: 37-50.
40. Moreira, E. A. (1979) *Tribuna Farmacêutica* **47**: 13-39.
41. Kissmann, K. G. & D. Groth (1999). “*Plantas infestantes e nocivas*” 2^a ed. S. São Paulo, p. 552-555.
42. Primo, R. F. (1946) “*Flora do Rio Grande do Sul*” Ed. Oficinas-Gráficas da Imprensa Oficial, Porto Alegre, p. 79-84.
43. Oliveira, F., M. Lúcia & L.O. Garcia (1993) “*Farmacognosia*” Ed. Lecta, v. 11, p. 63-100.
44. Metcalfe, C.R. & L. Chalk (1988) “*Anatomy of the dicotyledons*”. Claredon Press, Oxford, v. 1, 2^a ed, p. 276.
45. Souza, W. M., C.A.M. Santos, M.R. Duarte & D. Bardal (2003) *Rev. Bras. Farmacog.* **13**: 41-49.
46. Duarte, M. R. & D.O. Menarim (2006) *Braz. J. Pharmacog.* **16**: 545-551.
47. Budel, J. M., M.R. Duarte, P.V. Farago & I.J.M.Takeda (2006) *Braz. J. Pharmacog.* **16**: 53-60.
48. Voigt, R. & M. Bornschein (1982) “*Tratado de Tecnologia Farmacêutica*”. 3 ed. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 170.
- 49 Wagner, H., S. Bladt, S. & E.M. Zgainski (1983) “*Plant Drug Analysis A thin Layer Chromatography Atlas*”. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

Artigo 2: *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from *Buddleja thyrsoides* Lam leaves.

Submetido à Química Nova

In vitro antimicrobial and antioxidant activities of a crude extract and fractions from *Buddleja thyrsoides* Lam leaves.

Janaina Dorneles Mahlke , Aline Augusti Boligon, Michel Mansur Machado, Tatiana Borba Spader , Sydney Hartz Alves, Thais do Canto- Dorow and Margareth Linde Athayde^{*}
Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde,
Campus Camobi, Santa Maria, CEP 97105-900, Brasil.

^{*} e-mail : margareth@smail.ufsm.br

ABSTRACT

Crude extract and fractions of *Buddleja thyrsooides* were investigated regarding antioxidant activities by DPPH, total phenolic contents by Folin-Ciocalteu and antimicrobial activity by the broth microdilution method. Total phenolics varied from 214.07 ± 3.6 to 438.4 ± 0.3 mg g⁻¹. Crude extract, ethyl acetate, dichloromethane and butanolic fractions exhibited a weak scavenging activity ($SC_{50} = 186.04 \pm 10.8$, 137.70 ± 8.5 , 146.89 ± 9.0 and 165.71 ± 3.2 µg mL⁻¹, respectively). A correlation between the antioxidant activities and total phenolic contents could be shown ($r = 0.857$, $p < 0.01$). The lowest value of MIC was observed with butanolic fraction against *Saccharomyces cerevisiae* (MIC and MFC 62.5 µg mL⁻¹). Dichloromethane and ethyl acetate fractions were effective against *Staphylococcus aureus* with MIC value at 250 and 500 µg mL⁻¹ respectively.

Keywords: *Buddleja thyrsooides*, antimicrobial, antioxidant.

INTRODUCTION

Buddleja is a genus with pan tropical distribution that occurs on South Asia, Africa and America. There are around one hundred species known, 50 are distributed in America, 16 species in Africa and 21 in Asia¹. The majority are small shrubs; however some American species have between 20 and 30 meters of height. The flowers, leaves and roots of various species of *Buddleja* are used in traditional medicine in several parts of the world, evidencing the importance of this genus². Various bioactivities, including antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, anti-rheumatic, anti-hepatotoxic, antifungal and antiprotozoal properties of crude extracts fractions or isolates compounds from this genus were reported³. The leaves of a number of species of *Buddleja* are reported to be applied topically as a poultice or lotion for healing of wounds⁴.

Buddleja thyrsoides Lam., commonly known as “Barbasco” or “Cambará” belongs to the Scrophulariaceae family. It is a perennial herbaceous plant widely distributed in Southern of South America. In Brazilian folk medicine, the leaves and flowers of this plant are taken by drinking an infusion made with hot water (tea) for the treatment of bronchitis and cough⁵. However this plant is still unknown on the chemical and pharmacology point of view, and no phytochemical study have been carried out on this species.

Considering the antimicrobial activity and the wound-healing properties associated to this genus, one of the objectives of this study was to evaluate the antimicrobial properties of *Buddleja thyrsoides* crude extract and dichloromethane, ethyl acetate and n-butanolic fractions against various microorganisms including Gram-negative and Gram-positive bacteria, the yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata*, the fungi *Saccharomyces cerevisiae* and the algae *Prototheca zopfii* using the broth microdilution method to achieve the Minimal Inhibition Concentration (MIC) and the Minimal Microbicidal Concentration (MMC), Minimal Fungicidal Concentration (MFC) and Minimal Algaecidal Concentration (MAC). In vitro tests

are well accepted and widely employed in ethnopharmacological research because their usefulness in bioactive-guided fractionation and determination of active compounds.

Additionally, in view of the increasing demand for information about radical scavenging activities and their role in several diseases and inflammatory processes, the second objective was evaluate the scavenging capacity of the crude extract and fractions of the plant through the DPPH method and, finally, to determine the total phenolic contents of the extract and fractions looking for a possible correlation between phenolic contents and antioxidant activities. At the same time, a phytochemical screening was made, with the purpose of provide an idea about the main classes of constituents presents in the plant which may assist the results obtained in this study as well indicate the fractions which must be investigated in deep.

EXPERIMENTAL

Instruments and chemicals

All the chemicals were of analytical grade. Solvents for the extractions, *L*-ascorbic acid and pyrogalllic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Folin-Ciocalteu phenol reagent 2N and DPPH radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Spectrophotometric analysis was carried out on SHIMADZU-UV-1201, Kyoto, Japan. UV spectra of dichloromethane, ethyl acetate and butanolic fractions (200 to 600 nm) were recorded in MeOH.

Plant material

Leaves of *Buddleja thyrsoides* were harvested in São Luiz Gonzaga, State of Rio Grande do Sul, Brazil, on July of 2006. Samples of the collected material were identified by Botanist Dr.

Thais Scott do Canto Dorow and archived as voucher specimens in the herbarium of Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMDB 10125.

Extraction and partition of the leaves

Air dried powdered leaves of *Buddleja thyrsoides* (420g) were extracted with ethanol (70%) at room temperature for seven days with daily agitation. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure to remove the ethanol in order to obtain an aqueous suspension. The aqueous suspension was partitioned successively with dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol (3 x 100 mL for each solvent), yielding dichloromethane (13.06 g, 3.11%), ethyl acetate (12.85 g, 3.06%), and *n*-butanol (21.55g, 5.13%) soluble fractions respectively. At the same time 100 g of the dried and powdered leaves was extracted with ethanol (70%) at room temperature for seven days and after filtration the extract was evaporated under reduced pressure to obtain the crude extract.

Preliminary phytochemical screening

Phytochemistry tests of the crude extract were carried out as described by Moreira et al.⁶.

Radical-scavenging activity - DPPH assay

The antioxidant activity of the crude extract and fractions was evaluated by monitoring its ability in quenching the stable free radical DPPH, according to a slightly modified method⁷. Spectrophotometric analysis was used to measure the free radical scavenging capacity (RSC) and to determine the scavenging concentration (SC₅₀) of the crude extract and fractions. The DPPH quenching ability was expressed as SC₅₀ (the concentration required to inhibit radical formation by 50%). Six different ethanol dilutions of each fraction (2.5 ml), at 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 and 7.81 µg ml⁻¹ were mixed with 1.0 ml of a 0.3 mM DPPH ethanol solution. Ethanol (1.0 ml) plus plant extract solution (2.5 ml) was used as a blank. The

absorbance was measured at 518 nm by UV–VIS spectrophotometer after 30 min of reaction at room temperature. The radical was prepared daily and protected from light. Relative activities were calculated from the calibration curve of *L*-ascorbic acid standard solutions working in the same experimental conditions. Scavenging capacity in percent (SC%) was calculated in following way, according to the equation:

$$\text{SC\%} = 100 - [(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100 / \text{Abs}_{\text{control}}]$$

where $\text{Abs}_{\text{sample}}$ is the absorbance of the test compound and $\text{Abs}_{\text{control}}$ is the absorbance of the control reaction (containing all reagents except the test compound). SC% was plotted against sample concentration, and a linear regression curve was established in order to calculate the SC_{50} . Tests were carried out in triplicate. Correlation coefficients were optimised.

Determination of total polyphenol content

The crude extract and the fractions (0.5 g of each) were dissolved in 10 mL of ethanol and the volume adjusted to 100 mL with water. An aliquot of 3 mL of each solution was dissolved in 100 mL of water. Final concentration of each fraction was 0.15 mg mL^{-1} . The total polyphenol concentration in crude extract and fractions was measured spectrophotometrically as described by modified Folin-Ciocalteu method⁸. Briefly, 0.5 mL of 2 N Folin-Ciocalteu was added to a 1 mL of each sample (0.15 mg mL^{-1}), and this mixture was allowed to stand for 5 min before the addition of 2 mL of 20% Na_2CO_3 . The solution was then allowed to stand for 10 minutes before reading at 730 nm in a spectrophotometer. The estimation of phenolic compounds in the crude extract and fractions was carried out in triplicate. The total polyphenol content was expressed as milligram equivalents of pyrogalllic acid per gram of dry fraction.

Antimicrobial screening

The crude extract and the fractions were individually tested against *Candida albicans* ATCC 28367, *Candida glabrata* (clinical isolate), *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 28952, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 2792 and the algae *Prototheca zopfii* (clinical isolate). Bacterial strains were cultured overnight at 37 °C in Mueller-Hinton Agar (MHA). Yeasts were cultured overnight at 30 °C in Sabouraud dextrose agar.

Broth microdilution method for MIC determination

The MICs of the crude extract and fractions were determined by the broth microdilution method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS)⁹. Tests were performed in duplicate. Eight different dilutions of each fraction (4000, 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 and 31.25 µg mL⁻¹) in DMSO were prepared. Crude extract was tested at 2500, 1.250, 625, 312.5, 156.25, 78.125, and 39.06 µg mL⁻¹) in DMSO. Bacteria were inoculated into Mueller–Hinton agar and, after overnight growth; four or five colonies were directly suspended in saline solution so that the turbidity matched the turbidity of the McFarland standard (≈10⁸ cfu/mL). By further progressive dilutions with the test medium, the required concentrations were obtained. The suspension was diluted by 1:100 in saline followed by a new dilution of 1:20 in Mueller–Hinton broth, resulting in a final inoculum concentration of 5× 10⁴ cfu per well. Yeasts like fungi were inoculated into potato dextrose agar. Tests were performed in sterile U-bottom 96-well plates. The first column of the plates was reserved for negative control wells (without inoculants) and the last column, for the

positive growth control wells (without antimicrobial agents). The plates were incubated at 35 °C for 24 h for bacteria and *Candida*; 72 h for *S. cerevisiae*. Growth or a lack thereof in the antimicrobial agent containing wells was determined by comparing with the growth control, indicated by turbidity. The lowest concentration that completely inhibited visible growth of the organism was recorded as the MIC. Subcultures were made from the clear wells which did not show any growth after incubation during the MIC assays on Muller-Hinton agar for bacteria and Sabouraud agar for fungi in order to achieve Minimal Microbicidal Concentration (MMC), Minimal Fungicidal Concentration (MFC) and Minimal Algaecidal Concentration (MAC). The lowest concentrations that yielded no growth after this sub-culturing were taken as the MMC, MFC and MAC. Standard antibiotics (Ampicillin, Imipenem and Cephoperazone) were used to control the sensitivity of the tested bacteria, whereas Fluconazole and Amphotericin B were used as control against the tested fungi and the algae.

Determination of antimicrobial percent activity (A%), total antimicrobial activity (TAA) and bacterial susceptible index (BSI)

These parameters were determined according to the equations listed below¹⁰.

$$A\% = \frac{100 \times \text{no. of susceptible strains to a specific extract}}{\text{Total n}^\circ \text{ of tested strains}}$$

$$TAA = \frac{\text{quantity of material extracted from 1 g of plant material}}{\text{MIC}}$$

$$BSI = \frac{100 \times \text{no. of extracts effective against each bacterial strain}}{\text{No. of total samples}}$$

Statistical analysis

The results were expressed as the mean \pm s.d. of at least three independent experiments. SC_{50} was calculated from the concentration/effect linear regression lines.

RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemistry screening allowed a general view of the chemical groups of the plant and showed the presence of alkaloids, phenols, coumarins, organic acids, anthocyanic heterosids and saponins.

The results obtained in the analysis of the antimicrobial activity showed that crude extract and fractions differed in antimicrobial activity (Table 1). The fungi *S. cerevisiae* presented a BSI= 100%, with a great sensibility for the dichlorometane, ethyl acetate and butanolic fractions with all fractions pursuing the same values for the MIC and MFC (125, 250 and 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively), nevertheless the crude extract presented moderate activity. This result is in agreement with the antifungal activity of some isolated products from other *Buddleja* species reported in literature⁴. Dichlorometane, and ethyl acetate fractions showed great activity against *S. aureus* (BSI=75%). Avila et al.³ identified the phenylethanoid verbascoside in *Buddleja cordata*, as the antimicrobial agent against *Staphylococcus aureus*. This compound had already been isolated from *Buddleja globosa* which is endemic to Chile and Argentina, the leaves being used by the indigenous Mapuche for the treatment of ulcers and wounds² and also showed biological activity against this bacterium. Pardo et al.¹¹ reported MIC at 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and MBC at 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for verbascoside. The results obtained in the present study with *Buddleja thyrsoides* fractions are, consequently, better than those found by Pardo et al.¹¹ working with *Buddleja globosa* isolate compounds. The presence of phenylethanoids in *B. thyrsoides* in this study was inferred by the UV spectra of

dichloromethane, ethyl acetate and butanolic fractions that showed absorption maxima at ca 220, 280 and 320-330 nm, the characteristic pattern of phenylethanoids derivatives¹².

Dichlorometane fraction presented moderate antibacterial action against *B. subtilis* (BSI=50%). All tested samples were ineffective against *Candida albicans* (BSI=0), whereas the ethyl acetate fraction showed antifungal activity (MIC and MFC at 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) against *C. glabrata* (BSI= 50%). Concerning the Gram-negative bacteria, *E. coli* (BSI= 0) was resistant to all tested samples, whereas against *P. aeruginosa* (BSI=50%), dichloromethane and ethyl acetate fractions showed a weak activity only at the highest concentration tested. These results were to some extent expected, because beside the efflux pumps, Gram-negative bacteria presents some other characteristic particularities in their outer membrane like the polysaccharides that contributes to cell surface properties, such as membrane permeability and antibiotic susceptibility¹³.

Only ethyl acetate fraction was effective against *Prototheca zopfii* (BSI= 25%) at 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. This pathogen is difficult to eradicate, there is no standard treatment protocol and this algae may exhibit importance in immunocompromised patients, i.e. AIDS, cancer or patients under immunosuppressive therapy¹⁴. To our knowledge, this is the first assay involving this plant and the algae *Prototheca zopfii*.

Percentual activity and total antimicrobial activity are very useful tools which may help to choose the better plant, extract or fraction to be study in deep. Percentual activity followed the subsequently decreasing order: dichloromethane and ethyl acetate fractions (62.5%), crude extract and butanolic fraction (25%). Total antimicrobial activity (TAA) indicate the largest volume to which biologically active compounds in 1 g of plant material can be diluted and still inhibits the growth of bacteria¹⁰. Butanolic fraction showed TAA of 848 mL g^{-1} against *S. cerevisiae*, indicative that the inhibitory compounds of this fraction could be diluted in 848

mL of solvent and even provoke the inhibition of this fungus. In the same line, dichloromethane fraction exhibit TAA of 249 mL g⁻¹, and ethyl acetate showed TAA of 120 mL g⁻¹ against *S. cerevisiae*. In respect to *S. aureus*, the highest TAA were obtained from dichloromethane (TAA= 124.4 mL g⁻¹) and ethyl acetate (TAA= 62.2 mL g⁻¹) fractions.

Partition between immiscible solvents is an adequate approach for the preliminary separation of complex plant matrices because this procedure permits discrimination between polar and non-polar fractions activities. The importance of a preliminary fractionation could be clearly seeing in the case of *S. cerevisiae*, *S. aureus*, *B. subtilis* and *C. glabrata*, through the comparison between crude extract and fractionated extract activities against these microorganisms (Table 1). It is mainly probable that the low concentration of the active(s) compounds may prejudice their activity detection in crude extracts. In this study, dichlorometane and ethyl acetate fractions were found to be more effective than the crude extract and butanolic fraction against all the microorganisms tested, however, butanolic fraction demonstrated the highest antifungal activity.

The free radical scavenging capacity of the crude extract and fractions was assessed by the decolouration of the ethanolic solution of DDPH. In the presence of an active radical scavenger, the absorption vanishes and the resulting decolourization is stoichiometric at a selected range with respect to the degree of reduction. An ethanolic solution of DPPH served as a control and a calibration curve made with *L*-ascorbic acid was used to compare the activities, as a positive control, since *L*-ascorbic acid antioxidant activity is well established. DPPH scavenging activity has been largely used as a quick and reliable parameter to assess the in vitro general antioxidant of plant extracts, which has been assigned mainly to phenolic compounds. *L*-ascorbic acid showed SC₅₀= 6.31 ± 0.08 µg mL⁻¹ (y = 2.0805x +36.898, r = 0.894) and SC% = 97.1% at 31.25 µg mL⁻¹, whereas ethyl acetate fraction exhibit SC₅₀=

12

137.70 ± 8.5 µg mL⁻¹ (y = 0.2947x + 9.5557, r = 0.994) and SC%= 81.43% , the dichloromethane fraction showed SC₅₀= 146.89 ± 9.0 µg mL⁻¹ (y = 0.2982x + 6.3122, r=0.991) and SC%= 79.26%, the butanolic fraction revealed SC₅₀= 165.71 ± 3.2 µg mL⁻¹ (y = 0.283x + 3.1087, r =0.992) with SC%=74.03%, and crude extract SC₅₀= 186.04 ±10.8 µg mL⁻¹ (y=0.2343+6.5057 r = 0.938) and SC% < 60% at 250 µg mL⁻¹, all in a dose-dependent manner. The better antioxidant activity exhibited by ethyl acetate fraction may be due for the high presence of phenolic compounds in this fraction. Similar findings were related by Silva et al.¹⁵, analyzing different fractions of *Sida galheirensis*.

Total polyphenol contents were determined by the Folin-Ciocalteu method using pyrogalllic acid as standard. The equation obtained for standard curve of pyrogalllic acid in the range of 0.005 – 0.030 mg mL⁻¹ was y = 34.443x – 0.0942 (r = 0.994). Total polyphenol contents expressed as pyrogalllic acid equivalents varied from 214.07 ± 3.6 to 438.4 ± 0.3 mg g⁻¹ dry fraction (Table 2). Polyphenol contents were higher in the ethyl acetate and dichloromethane fractions, followed by butanolic fraction and crude extract. Many researches describe a positive correlation between phenolic contents and antioxidant activity^{8,16} with DPPH and Folin-Ciocalteu as analytical methods. In the present study, looking at the possibly correlations between the amount of phenolic compounds of the extract and fractions and the antioxidant activities of these samples, a positive correlation could be established (r= 0.857, p<0.01). Therefore, ethyl acetate and dichloromethane fractions, that furnish the highest phenolic content, were the same fractions that exhibited better scavenger activity in the DPPH assay and butanolic and crude extract fractions that afforded the lowest phenolic contents showed also the smaller scavenging activity.

In conclusion, the results obtained in this study are the first report for this species and suggest that ethyl acetate and dichloromethane fractions from *Buddleja thyrsoides* were the

most effective agents for scavenging free radicals in the DPPH method and presented highest phenolic contents. Concerning microbiological activities, the better results were evidenced for butanolic (the highest polar) fraction against *S. cerevisiae* and dichloromethane (the less polar fraction) against *S. aureus*.

From these results we can presume that the antioxidant and antimicrobial activities in *B. thyrsoides* may in part be due to the presence of flavonoids, phenols and phenylethanoids, which were found in the phytochemistry screening and UV measurements. Although there are no reports from *B. thyrsoides* use in would heal in Brazil, some perspectives can be evidenced from this study, based mainly in the antimicrobial activities and secondary, in the antioxidant properties. From this previous work other phytochemical and pharmacological investigations will be indispensable to explain and explore these results with more details and also a further purification and characterization of the actives principles from the dichloromethane, ethyl acetate and butanolic fractions will provide a better understanding of the probably antimicrobial and antioxidant mechanisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to FIPE/CCS/UFSM and Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Universidade Federal de Santa Maria) for financial support to the project.

REFERENCES

1. Mabberley, D.J. In: *The plant-book*. Cambridge University Press: Cambridge, 1987, p. 707; Leeuwenberg, A.J.M.; *Landbouwhogeschool Wageningen*, **1979**, 79, 1.
2. Houghton, P.J.; *J. Ethnopharmacol.* **1984**, 11, 293; Houghton, P.J.; Manby, J.; *J. Ethnopharmacol.* **1985**, 13, 89.
3. Avila, J.G.; Liverant, J.G.; Martinez, A.; Martinez, G.; Munoz, J.L.; Arciniegas, A.; Vivar, A.R.; *J. Ethnopharmacol.* **1999**, 66, 75; Arciniegas, A.; Avendaño, A.; Pérez-

- Castorena, A.L.; Vivar, A. R.; *Biochem. Systematic and Ecology* **1997**, *25*, 185;
- Houghton, P.J.; Hikino, H.; *Planta Med.* **1989**, *55*, 123; Mensah, A.Y.; Houghton, P.J.; Bloonfield, S.; Vlietinck, A.; Vander Berghe, D.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1210;
- Houghton, P.J.; Abrahan, Y.; Mensah, A.Y.; Yong-Hong, L.; *Phytochemistry* **2003**, *64*, 385; Emam, A.M.; Moussa, A.M.; Faure, R.; Favel, A.; Delmas, F.; Elias, R.; Balansara, G.; *Planta Med.* **1996**, *62*, 92.
4. Mensah, A.Y.; Sampson, J.; Houghton, J.P.; Hylands, J.P.; Westbrook, J.; Dunn, M.; Hughes, M.A.; Cherry, G.W.; *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *77*, 219; Houghton, P.J.; Hylands, P.J.; Mensah, A.Y.; Hensel, A.; Deters, A.M.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 100.
- 5..*Plantas brasileiras*. Available in: <www.brazilian-plants.com/br/search.cfm>accessed in September 2007.
6. Moreira, E.A.; *Tribuna Farmacêutica* **1979**, *47*, 13.
7. Choi, C.W.; Kim, S.C.; Hwang, S.S.; Choi, B.K.; Ahn, H.J.; Lee, M.Y.; Park, S.H.; Kim, S.K.; *Plant Sci.* **2002**, *163*, 1161.
8. Chandra, S.; Mejia, E.G.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3583; Verza, S.G.; Kreinecker, M.T.; Reis, V.; Henriques, A.T.; Ortega, G.G. *Quim. Nova* **2007**, *30*, 815.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Approved standard M27-A2. **2002a**. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved standard; document M7-A5 5th ed. **2002b**. Wayne, PA.
10. Ellof, J.N.; *Phytomedicine* **2004**, *11*, 370; Rangasamy, O.; Raelison, G.; Rakotoniriana, F.E.; Cheuk, K.; Urverg-Ratsimamanga, S.; Quetin-Leclercq, J.; Gurib-Fakim, A.; Subratty, A.H.; *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 331.

11. Pardo, F.; Perich, F.; Villaroel, L.; Torres, R.; *J. Ethnopharmacol.* **1993**, *39*, 221.
12. Li, L.; Tsao, R.; Liu, Z.; Liu, S.; Yang, R.; Young, J.C.; Zhu, H.; Deng, Z.; Xie, M.; Fu, Z.; *J. Chromatography A* **2005**, *1063*, 161; Gormann, R.; Kaloga, M.; Ferreira, D.; Marais, J.P.J.; Kolodziej, H.; *Phytochemistry* **2006**, *67*, 805.; Martin, F.; Hay, A.; Corno, L.; Gupta, M.P.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **2007**, *68*, 1307.
13. Charbonnier, F.; Kohler, T.; Pechere, J.C.; Ducruix, A.; *Protein Expression and Purification* **2001**, *23*, 121; Yokota, S.; Fujii, N.; *Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis.* **2007**, *30*, 97.
14. Lass-Flörl, C.; Fille, M.; Gunsilius, E.; Gastl, G.; D. Nachbaur, D.; *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 4907; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G.; Câmara, L.M.C.; Brilhante, R.S.N.; Diógenes, M.J.N.; Oliveira, A.M.A.; *Clinical Microbiology Newsletter* **2003**, *25*, 69.
15. Silva, D.A.; Silva, T.M.S.; Lins, A.C.S.; Costa, D.A.; Cavalcante, J.M.S.; Matias, W.N.; Souza, M.F.V.; Braz Filho, R; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 250.
16. Shyamala, B.N.; Gupta, S.; Lakshmi, A.; Prakash, J.; *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2005**, *6*, 239; Sousa, C.M.M.; Rocha e Silva, H.; Vieira-Jr., G.M.; Ayres, M.C.C.; da Costa, C.L.S.; Araújo, D.S.; Cavalcante, L.C.D.; Barros, E.D.S.; Araújo, P.B.M.; Brandão, M.S.; Chaves, M.H. ; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 351.

Table 1 Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum microbicidal concentration (MMC), minimal fungicidal concentration (MFC) and minimal algaecidal concentration (MAC) for crude extract and fractions of *Buddleja thyrsoides* leaves. Values are expressed in $\mu\text{g mL}^{-1}$.

	Crude extract MIC	Crude extract MMC or MFC	CH ₂ Cl ₂ MIC	CH ₂ Cl ₂ MMC or MFC	AcOet MIC	AcOet MMC or MFC	BuOH MIC	BuOH MMC or MFC	Control $\mu\text{g mL}^{-1}$
<i>E. coli</i>	>2500	*	>4000	*	>4000	*	>4000	*	Amp 8.0
<i>P. aeruginosa</i>	>2500	*	4000	4000	4000	4000	>4000	*	Cef. 16.0
<i>S. aureus</i>	>2500	*	250	500	500	500	2000	2000	Amp 2.0
<i>B. subtilis</i>	2500	2500	1000	*	>4000	*	>4000	*	Imi 0.06
<i>C. albicans</i>	>1250	*	>2000	*	>2000	*	>2000	*	Flu 16
<i>C. glabrata</i>	>1250	*	2000	>2000	1000	1000	>2000	*	Flu 32
<i>S. cerevisiae</i>	1250	1250	125	125	250	250	62.5	62.5	Flu 2.0
<i>P. zopfii</i>	>1250	*	>2000	*	2000	>2000	>2000	*	Amp 0.5

Amp = ampicillin, Ceph= cephalosporin, Imi = imipenem, Flu = fluconazole,

Amph= amphotericin B

* not tested because the MIC was not determinate

Table 2 Total phenolic contents and SC₅₀ determined in crude extract and fractions of *Buddleja thyrsooides* leaves.

Fractions	mg g ⁻¹ DF ¹	² SC ₅₀ µg mL ⁻¹
Ethyl acetate	438.4 ± 0.3 ^a	137.70 ± 8.5 ^{a,b}
Dichlorometane	298.6 ± 1.0 ^b	146.89 ± 9.0 ^a
n-Butanol	231.87 ± 5.9 ^c	165.71 ± 3.2 ^a
Crude extract	214.07 ± 3.6 ^d	186.04 ± 10.8 ^b

Measurements were averaged, and results are given as mean ± standard deviation.

¹Concentration of phenolic compounds expressed as milligram equivalents of pyrogalllic acid per gram of dry fraction (DF). ²Concentration required to inhibit radical formation by 50%.

^{a-d} Different superscripted letters indicate statistical differences in each column ($p < 0.05$).

Artigo 3: *In vitro* Toxicity, Antiplatelet and Acetylcholinesterase Inhibition of the *Buddleja thyrsoides* Lam. Leaves.

Submetido à Química Nova

***In vitro* Toxicity, Antiplatelet and Acetylcholinesterase Inhibition of the *Buddleja thyrsoides* Lam. Leaves.**

J. D. Mahlke^a, M. M. Machado^a, A. A. Boligon^b and M. L. Athayde^{a,c,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Santa Maria, RS, Brasil.

^bCurso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Santa Maria, RS Brasil.

^cDepartamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, sala 1115. Santa Maria, RS, Brasil.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder resulting in impaired memory and behavior of remarkable socio-economic impact. A decrease in cholinergic activity is a key event in the biochemistry of AD. *Buddleja thyrsoides* is a plant widely distributed in Southern of South America. In Brazilian traditional medicine, the infusion its leaves and flowers is used for the treatment of bronchitis and cough. Crude ethanolic (70 %) extract and fractions (dichloromethane, ethyl acetate and n-butanolic) were investigated regarding their toxicity *in vitro*. The antiplatelet action and enzyme acetylcholinesterase inhibition were evaluated to the crude extract. The crude extracts and fractions were evaluated by means of Brine Shrimp Lethality test and showed low activity with DL₅₀ (1698, 2818, 2187 and 3672 µg/mL) for dichloromethane, ethyl acetate, butanolic fractions and crude extract, respectively. *B. thyrsoides* presented great antiplatelet action. The IC₅₀ values obtained for crude extract and dichloromethane, ethyl acetate, butanolic fractions were 361.29, 354.23, 368.75 and 344.30, respectively, while the IC₅₀ for the standard AAS was 257.01 µg/mL. The crude extract showed an inhibition of 22.8 % of the acetylcholinesterase enzyme in 24 hours.

Introduction

Alzheimer's disease (DA) is a neurodegenerative disorder resulting in impaired memory and behavior, of remarkable socio-economic impact, responsible for about 50-60% of the total number of cases of dementia among people over 65¹. According to the World Health Organisation, around 35 million people in industrialized countries will suffer from AD by 2010². The disease is characterized by loss of memory and impairment of multiple cognitive and emotional functions³. This disorder in cellular level, is associated with lower rates of

acetylcholine (ACh) in the synaptic process, reducing cortical cholinergic neurotransmission, and other neurotransmitters as noradrenaline, dopamine, serotonin, glutamate and substance P to a lesser extent^{4,5}.

The drugs inhibiting acetylcholinesterase (AChE) have been, actually, the alternative more commonly employed to present better results in symptomatic control of the AD. In search of new candidates for the treatment of this disease, the field phytochemical has been very stimulated, mainly because of our great diversity, to provide inhibitors AChE^{6,7}. The plants used by the medical are promising resources in the treatment of diseases, mainly when allied to the researches that confirm these therapeutic properties.

The genus *Buddleja* is comprehended in Asia, African and American species^{11,12}. About 50 species are indigenous in America ranging from the southern U.S.A. to Argentina and Chile, about 16 in Africa in the south and east, and about 20 in Asia ranging from Afghanistan to China and down into South-East Asia¹¹. *Buddleja* species are widespread and share some remarkable similarities in their medicinal uses with presence of compounds with particular pharmacological action. Some patterns of these actions are antibacterial¹⁵, antihepatotoxic¹⁶, piscicidal^{17,18}, anti-inflammatory¹⁹, sedative and analgesic²⁰ and diuretic²⁰. The flowers, leaves and roots of various species of *Buddleja* are used in traditional medicine in several parts of the world, evidencing the importance of this genus^{16,17}.

Buddleja thyrsoides Lam., commonly known as “Barbasco” or “Cambará-do-campo” (Scrophulariaceae), previously classified in the Buddlejaceae family²², is a plant widely distributed in Southern of South America. In Brazilian traditional medicine, its leaves and flowers are taken by drinking an infusion made with hot water (tea) for the treatment of bronchitis and cough²¹. However this plant is still unknown on the chemical and pharmacology point of view, and no phytochemical and biological study have been carried out on this species.

Since this plant has no scientific study, in the present paper, we evaluated first the toxicity action, to ensure the safety of its use, as well as platelet aggregation and acetylcholinesterase inhibition.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Leaves of *Buddleja thyrsoides* were harvested in São Luiz Gonzaga, State of Rio Grande do Sul,

Brazil, on July of 2006. Collected material were identified by Dr. Thais Scott do Canto Dorow and archived as voucher specimens in the herbarium of Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMDB 10125.

Extraction and partition of the leaves

Air dried powdered leaves of *Buddleja thyrsoides* (420g) were extracted with ethanol (70 %) at room temperature for seven days with daily agitation. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure to remove the ethanol in order to obtain an aqueous suspension. This suspension was partitioned successively with dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol (3 x 100 ml for each solvent), yielding dichloromethane (13.06g, 3.11%), ethyl acetate (12.85g, 3.06 %) and *n*-butanol (21.55g, 5.13 %) fractions. In parallel 100g of the dried and powdered leaves was extracted with ethanol (70 %) at room temperature for seven days to obtain the crude extract.

Toxicity research

Shrimp eggs were purchased from a Pet Shop, Santa Maria, RS. The bioassay was conducted following the procedure described by Meyer *et al.* (1982)⁸. The eggs were hatched in a glass flask containing 1 L artificial seawater. The flask was well aerated with the aid of an air pump, and kept in a water bath at 29-30 °C. A bright light source was left on and the nauplii hatched within 24 h. The crude extract of the plant was dissolved in artificial seawater to obtain a concentration of 10 mg/mL. This was serially diluted four-times more, and five different concentrations were obtained (10, 5, 1, 0.1 and 0.01 mg/mL). A solution of each concentration (10 mL) was transferred into clean universal vials with pipette and 10 nauplii were transferred into each vial with pipette. A check count was performed and the number alive after 24 h was noted. The negative control was put in a vial with 10 mL of saline solution and 10 naupliis, and as positive control was made a potassium dichromate solution (20 ppm) contained 10 naupliis. LD₅₀s were determined using the Probit analysis method⁹.

Human blood samples

The human blood serum samples were obtained in the Blood Bank of University Hospital of Santa Maria from healthy donors. This Project was approved by th Committee of Ethic in Research of this University (authorization n° 23081.012330/2006-94). All blood samples used

in this experiment were previously tested with the same method for Acetylcholinesterase determination and only the one activity between 8 and 10 UI/mL were kept in the experiment. This selection was made for acquire a higher homogeneity of data.

A platelet-rich plasma (PRP) and one of platelet-poor (PPP) bag were obtained of the Blood Bank of University Hospital to the test of antiplatelet aggregation.

Antiplatelet effect

Aggregation was measured by the spectrophotometer in 490nm, using TP Clot (Bios Diagnostica) Commercial kit for the determination of Protrombin time. The spectrophotometer was calibrated so that the PRP gave 10 % of light transmission while PPP gave 90 % of light transmission. Crude extract and fractions of the plant and Aspirin solutions were prepared in saline solution 0.9 % (300 µg/mL). At each sample (100 µg/mL) were added 400 µg/mL of PRP and after two minutes, the samples were read in spectrophotometer. A solution of PRP (400 µg/mL) with prothrombin calcium (100 µg/mL) was made to present 100 % of the platelet activity³⁴. Tests were carried out in triplicate.

Acetylcholinesterase inhibition

The activity of the acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7) was measured using acetylthiocholine iodide and DTNB (dithiobis nitrobenzoic acid)¹⁰ from *Doles* (Goiânia, Goiás, Brazil). These reagents were obtained from commercial kit for the Acetylcholinesterase determination in human blood serum. The positive control used was Carbofuran 35 %. Tests were carried out in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

The *Artemia salina* lethality assay has been demonstrated to be an effective, robust and rapid assay method for primary screening of extracts and compounds for potential cytotoxic activities⁸. The results obtained in the test of toxicity with *Artemia salina* of *Buddleja thyrsoides* leaves showed not be active ($LD_{50} > 1000$ µg/mL, **Table 1**), namely lesser value of LD_{50} observed was 1698.24 µg/mL for the dichloromethane fraction, as well as the methanolic extracts of *Centaurea urvillei* subs. *armata* and *Centaurea mucronifera* such as were found LD_{50} values of 1155 and 1200 µg/mL, respectively²⁴, while also not are toxic. In a same genus – *Solanum* - 13

different species were studied, concluding that 5 of these species had values of $LD_{50} > 1000$ $\mu\text{g/mL}$ and of others were considered toxicologically bioactives²⁵.

These results were differed of dichloromethane extract of *Baccharis pseudotenuifolia* leaves showed high toxicological activity having a LD_{50} 115 $\mu\text{g/mL}$ ²³. Yoshida *et al.*(1978) have Isolated from the roots bark of *Buddleja davidii* Franch., three sesquiterpenes - buddledin A, B and C - with piscicidal action¹⁷, and the mimengoside A – a triterpenoid saponin isolated of *Buddleja madagascariensis* leaves – presented LD_{100} equal to 100 $\mu\text{g/mL}$ in molluscicidal activity²⁶, in these case it are isolated compounds.

Table 1: *Artemia salina* toxicity activity (Brine Shrimp Lethality assay) of the crude extract and fractions of *Buddleja thyrsooides* Lam.

Concentration of the samples $\mu\text{g/mL}$	Lethality of <i>Artemia salina</i> in %			
	Crude extract	Dichloromethane	Acetyl Acetate	Butanolic
10000	90.7	88.5	89.5	85.3
5000	64.8	69.0	67.3	64.4
1000	4.6	40.0	27.8	40.8
100	0.0	3.4	9.7	25.9
10	0.0	0.0	0.0	17.1
LD_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	1698.2	2818.0	2187.0	3672.0

Platelet-vessel wall interaction is an important process in physiological hemostasis and pathological thrombosis. In oriental countries, some medicinal plants have been claimed for uses to improve circulation, induce fibrinolysis or prevent thrombosis. In cooperation with chemists using bioassay-based step-by-step purification, some antiplatelet agents were isolated from plant sources²⁷. Antiplatelet activity of the crude extract and (dichloromethane, ethyl acetate and butanolic) fractions on the aggregation of human PRP induced by prothrombin calcium is shown in **Table 2**. When aggregation was inhibited by butanolic fraction, the resulted was 43.57 % compared with standard inhibition (AAS, 58.36 %). This fraction was the best result followed by dichloromethane fraction, crude extract and ethyl acetate fraction, respectively. According to Tognolini (2006), phenylpropanoids compounds presented antiplatelet activity²⁸, and according with literary data knows that the *Buddleja* genus has phenylpropanoids groups¹³, of the same way, the verbascoside substance also shown toxic action²⁹, has been found in this genus too^{30,31}. It may be an explanation for the activity found in the *B. thyrsooides* samples.

Table 2: Effect platelet aggregation inhibition by *Buddleja thyrsoides*.

Concentration 300 µg/mL	IC ₅₀ µg/mL ± SD	Inhibition %*
AAS	258.01 ± 0.003	58.36
Crude extract	361.29 ± 0.047	41.52
Dichloromethane Fraction	354.23 ± 0.048	42.35
Ethyl Acetate Fraction	368.75 ± 0.043	40.68
Butanolic Fraction	344.30 ± 0.032	43.57

* Data compared with standard (AAS);

The percent inhibition of enzyme acetylcholinesterase for crude extract after 24 hours of contamination was 22.8 %, this result was statistically significant (ANOVA). The value obtained in this work for *Buddleja thyrsoides* is the better than the results reported for the ethanolic extract of *Melissa officinalis*, *Lavandula pedunculata* and *Mentha suaveolens*, which were tested with a concentration 500 µg/mL and had 17.8, 16.7, 19.3 % inhibition, respectively³². Research release with plants traditionally used in age related brain disease reported the *Bacopa monieri* L. of the Scrophulariaceae family is used to alleviate dementia in India³³.

Table 3: Effect on acetylcholinesterase activity, % of inhibition, of the crude extract from *Buddleja thyrsoides* Lam.

Group n=10 (per group)	Acetylcholinesterase Activity (UI/mL)	
	Initial Concentration	Concentration after 24H
Negative Control	9.10 ± 0.60	9.10 ± 0.60
Positive Control	8.90 ± 0.39	1.10 ± 0.12
Crude Extract 5%	10.10 ± 1.93	7.83 ± 0.95*

Values are mean ± SD for tem independent analyses in each group

* Statistically different (p < 0.05) compared with the negative control (ANOVA)

CONCLUSION

The results obtained in toxicological assay with *Artemia salina* indicated that the crude extract and the fractions were not cytotoxic against to this microcrustaceous at the concentrations tested, suggesting that the tea leaves used in the traditionally medicine for the bronchitis, asthma and cough treatment, may be well tolerated front to biological system. The presence of

polyphenols, mainly phenylpropanoids detected in the crude extract and dichloromethane, ethyl acetate and butanolic fractions of *B. thyrsoides*, could be a possible reason for the inhibitory action of platelet aggregation verified in this work. The inhibitory effect of acetylcholinesterase enzyme found to crude extract of *B. thyrsoides* should be possible attributed to the alkaloids and coumarins detected in the phytochemical screening of although other constituents not yet detected in the plant could also play a role in this inhibition. Further studies are undergoing in the laboratory.

REFERENCES

1. Atta-ur-Rahman; Choudhary, M. I.; Thomsen, W. J., 2001. Bioassay Techniques for Drugs Development. Harwood Academic Publishers. The Netherlands, p. 142-143.
2. WHO, 2006. Traditional Medicine. Available at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>. Accessed 1, October 10, 2006.
3. Frank, B., Gupta, S., 2005. A review of antioxidants and Alzheimer's disease. *Annals of Clinical Psychiatry* 17, 269–286.
4. Li, P.; Yamakuni, T.; Matsunaga, K.; Kondo, S.; Ohizumi, Y., 2003. Nardosinone enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth in a nitrogen-activated protein kinase- and protein kinase C-dependente manner in PC12D cells. *Journal of Pahrmacology Sciense* 93, 122-125.
5. Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K., 2002. A rapd TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochemical Analisis* 13, 51-54.
6. Enz, A.; Amstutz, R.; Boddeke, H.; Gmelin, G.; Malonowski, J., 1993. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 98: 431-445.
7. Sharma, P. C.; Yelne, M. B.; Dennis, T. J., 2000. Database on Medicinal Plants Used in Ayurveda, vol. 1. Central Council for Research in Ayurvada and Sidha, New Delhi, India.
8. Meyer, B. N.; Ferrigni, R. N.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L. B; Nichols, D. E.; Mclaughlin, J. L., 1982. Brine shrimp - A convenient general bioassay for active plants constituents. *Planta Med* 45: 31-34.
9. Finney D 1971. *Probit analysis*, 3rd ed., Cambridge University Press, Cambridge.
10. Dietz, A. A., Rubinstein, H. M. and Lubrano, T., 1973. Colorimetric determination of serum

cholinesterase and its genetic variant by the propionylthiocholine-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. **Clin. Chem.**, 19, 1309.

11. Leeuwenberg, A. J. M., 1979. The Loganiaceae of África XVIII, *Buddleja* L. II Revision of the African and Asiatic species. **Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen** 79 (6):1-163.

12. Norman, E. M., 1973. The genus *Buddleja* in North América. *Gentes Herbarium* 10:47-114.

13. Houghton, P.J., 1984. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. **Journal of Ethnopharmacology** 11, 293 – 308.

14. Houghton, P.J., Manby, J., 1985. Medicinal plants of the Mapuche. **Journal of Ethnopharmacology** 13, 89 – 103.

15. Arciniegas, A.; Avendaño, A.; Pérez-Castorena, A. L.; Romo de Vivar, A., 1997. Flavonoids from *Buddleja parviflora*. **Biochemical Systematics and Ecology** 25(2): 185-186.

16. Houghton, P. J.; Hikino, H., 1989. Anti-hepatotoxic activity of extracts and constituents of *Buddleja* species. **Planta Med** 55: 123-126.

17. Yoshida, T.; Nobuhara, J.; Uchida, M.; Okuda, T., 1978. Studies on the constituents of *Buddleja* species I. Buddledin A and B. **Chemical & Pharmacology Bulletin** 26(8a): 2535.

18. Yoshida, T.; Nobuhara, J.; Uchida, M.; Okuda, T., 1978. Studies on the constituents of *Buddleja* species II. Buddledin C, D and E, new sesquiterpenes from... **Chemical & Pharmacology Bulletin** 26(8b): 2535.

19. Liao, Y. H.; Houghton, P. J.; Hoult, J. R. S., 1999. Novel and known constituents of *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. **Journal of Natural Products** 62:1241-1245.

20. Houghton, P.J., Abrahan, Y., Mensah, A.Y., Yong-Hong, L., 2003. Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. **Phytochemistry** 64,385 – 393.

21. *BUDDLEJA*. In: PLANTAS brasileiras. Banco de dados – plantas medicinais do Brasil. Disponível em: <www.brazilian-plants.com/br/search.cfm>. Acesso em: 28 ago. 2006.

22. The Angiosperm Phylogeny Group, 2003. Na update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 141:399-436.

23. Moreira, F. de P. M.; Coutinho, V.; Montanher, A. B.; Caro, M. S. B.; Brighente, M. I. C.; Pizzolatti, M. G., 2003. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova** 26(3): 309-311.
24. Shoeb, M.; MacManus, S. M.; Jaspars, M.; Kong-Thoo-Lin, P.; Nahar, L.; Celik, S.; Sarker, S. D., 2007. Bioactivity of two Turkish endemic *Centaurea* species, and their major constituents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 17(2): 155-159.
25. Silva, T. M. S.; Nascimento, R. J. B.; Batista, M. M.; Agra, M. F.; Câmara, S. A., 2007. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 17(1): 35-38.
26. Emam, A. M.; Moussa, A. M.; Faure, R.; Favel, A.; Delmas, F.; Elias, R.; Balansara, G., 1996. Isolation and biological study of a triterpenoid saponin, mimengoside A, from the leaves of *Buddleja madagascariensis*. **Planta Med.** 62: 92-93.
27. Teng, C. M.; Ko, F. N., 1998. Antiplatelet agents isolated from medicinal plants. **Research Communications in Molecular Pathology Pharmacology** 102(3):211-225.
28. Tognolini, M.; Barocelli, E.; Ballabeni, V.; Bruni, R.; Bianchi, A.; Chiavarini, M.; Impicciatore, M., 2006. Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. **Life Sciences** 78: 1419 – 1432.
29. Grice, I. D.; Garhnam, B.; Pierens, G.; Rogers, K.; Tindal, D.; Griffiths, L. R., 2003. Isolation of two phenylethanoid glycosides from *Eremophila gilesii*. **Journal of Ethnopharmacology** 86: 123-125.
30. Yamamoto, A.; Nitta, S.; Miyase, T.; Ueno, A.; Wu, L., 1993. Phenylethanoid and lignaniridoid complex glycosides from roots of *Buddleja davidii*. **Phytochemistry**, 32: 421– 425.
31. Avila, J. G.; Liverant, J. G. de; Martinez, A.; Martinez, G.; Muñoz, J. L.; Arciniegas, A.; Vivar, A. R. de, 1999. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology** 66: 75-78.
32. Ferreira, A.; Proença, C.; Serralheiro, M. L. M.; Araújo, M. E. M., 2006. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. **Journal of Ethnopharmacology** 108(1): 31-37.
33. Adams, M.; Gmünder, F.; Hamburger, M., 2007. Plants traditionally used in age related brain disorders - A survey of ethnobotanical literature. **Journal of Ethnopharmacology** 11: 3363–381.

34. Afifi, F. U.; Aburjai, T., 2004. Antiplatelet activity of *Varthemia iphionoides*. **Fitoterapia** 75: 629-633.

Artigo 4: Composition of the essential oil from *Buddleja thyrsoides* Lam. Leaves from Brazil

Submetido à Fitoterapia

COMPOSITION OF THE ESSENCIAL OIL FROM *Buddleja thyrsoides* Lam. LEAVES FROM BRAZIL

J. D. Mahlke^a, M. M. Machado^a and M. L. Athayde^{a,b*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, Santa Maria, RS, Brasil.

^bDepartamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, sala 1115. Santa Maria, RS, Brasil.

ABSTRACT

The chemical composition of the essential oil obtained from *Buddleja thyrsoides* Lam leaves from south Brazil was analyzed by GC and GC/MS and 12 components were identified. germacrene D (27.16%); 1,10-di-*epi*-cubenol (13.37%); α -cadinol (12.95%); bicyclogermacrene (9.00%), δ -cadineno (8.59%) and caryophyllene E (5.26%) were the main components.

1. Introduction

The *Buddleja* genus currently finds integrated to the Scrophulariaceae family, in order Lamiales as system proposed by Angiosperm Phylogeny Group (APG)¹, so no more belongs to the Buddlejaceae family. *Buddleja* is a genus present in Southern Asia, Africa and America. It comprises nearly 100 species, being that the larger number of these species occurs in Americas². In Brazil 14 native species and are known with distribution in Southern and Southeastern regions, except *Buddleja brasiliensis* which is distributed in Central- Western and Northeastern regions of Brazil². Several species of this genus have been utilized in traditional medicine in many parts of the world^{3,4}.

Ethnopharmacological and chemotaxonomic considerations have led to several investigations of the chemical constituents of the *Buddleja* species in recent years, and the majoritary of uses of this genus are concerned with the leaves and flowers⁴⁻⁶. Researches of some species of the genus *Buddleja* resulted in the isolation of terpenoids⁷, flavonoids^{4,8}, iridoids⁹, phenylethanoids^{4,10}, phenylpropanoids¹¹, sesquiterpens¹²⁻¹⁴, lignans¹⁵ and saponins¹⁵⁻¹⁷. Several of these chemical compounds have shown inhibitor effect on the generation of eicosanoids of leucocytes⁵, antihepatotoxic¹⁸, antifungal⁶, antibacterial¹⁹, antiprotozoan¹⁹, diuretic^{4,20},

antirheumatics¹⁹ and in asthma, bronchitis and cough¹¹. A *Buddleja* specie from Bolivia was evaluated for insecticidal activity^{21,22}, and the oil composition was studied to Lorenzo and collaborators (2006)²³.

Buddleja thyrsoides Lam., commonly known as “Barbasco” or “Cambará-do-campo”, is a plant of distribution in Southern of South America. In Brazilian traditional medicine, its leaves and flowers are taken by drinking an infusion made with hot water (tea) for the treatment of bronchitis and cough²⁴. However there is no still scientific study of this *Buddleja* species. Thus as purpose of this work was study the essential oil composition isolated from leaves of the *Buddleja thyrsoides*.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Buddleja thyrsoides Lam. (Scrophulariaceae) leaves were collected in São Luiz Gonzaga, State of Rio Grande do Sul, Brazil, on July of 2006. It was identified by Botany Dr. Thais Scott do Canto Dorow and archived as voucher specimens in the herbarium of Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMDB 10125.

2.2. Extraction of the essential oil

Air-dried aerial parts of plants collected (100g) were submitted for 4 h to steam distillation using a Clevenger apparatus to produce the essential oil in a yield of 0.2% (v/w). Oil was dried over anhydrous sodium sulphate and, after filtration, stored at -4 °C until test and analysis.

2.3. GC–MS analysis

Oil was analysed by GC and GC/MS. Mass spectra were registered in a HP 5973 MSD connected to a HP 6890 GC and interfaced by a Pentium PC. The CG was equipped with a split-splitless, injector, autosampler, cross-linked HP-5 capillary column (30 m 0.32 mm of internal diameter), and helium was used as the carrier gas. Flow of the carrier gas helium was 2 mL/min; injector and detector temperatures were 280 °C and 250 °C, respectively. The oven temperature was programmed from 50 to 280 °C at a rate of 12 °C/min. Quantitative data were obtained by electronic integration of FID area data without the use of response factor correction. GC/MS

analyses were performed using a Hewlett-Packard 6890 chromatograph combined with HP Chemstation software, equipped with a 5973 Mass Selective Detector and mass spectrometer was operated at 70 eV, scanning speed 1 s over 50–300 amu range and an ion source temperature of 180 °C. Compounds were identified by comparison of GC mass spectra from the Nist98 Mass Spectral Database and by comparison of mass spectra described by Adams (2001)²⁵, as well as by comparison of mass spectra reported in the literature.

3. Results and Discussion

Essential oil with intense odour were obtained from leaves of *Buddleja thyrsoides* by hydrodistillation and analysed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). The components of the oil examined are reported in Table 1. Twelve components, representing 90,4 % of the total composition, were identified. The oil was characterized by a high content of germacrene D (27.16%), 1,10-di-*epi*-cubenol (13.37%), α -cadinol (12.95%), bicyclogermacrene (9.00%), δ -cadinene (8.59%) and caryophyllene E (5.26%). Of the total composition, 35.35% are sesquiterpenos oxygenated. According with the procedure described only sesquiterpenic compounds were registered by GC.

Table 1: Composition of the essential oil from *Buddleja thyrsoides*

Compounds	% ^{a*}	<i>Rt</i> ^{b*}	Mol. Formula
<i>Sesquiterpenes Hydrocarbons</i>			
<i>Cadinene Group</i>			
β -cubebene	1.54	9.80	C ₁₅ H ₂₄
γ -muurolene	1.51	10.73	C ₁₅ H ₂₄
germacrene D	27.16	10.81	C ₁₅ H ₂₄
δ -cadinene	8.59	11.20	C ₁₅ H ₂₄
<i>Caryophyllene Group</i>			
caryophyllene E	5.24	10.17	C ₁₅ H ₂₄
<i>Germacrene Group</i>			
bicyclogermacrene	9.00	10.97	C ₁₅ H ₂₄
<i>Sesquiterpenes Oxigens</i>			
<i>Cadinene Group</i>			
1-10-di- <i>epi</i> -cubenol	13.37	12.39	C ₁₅ H ₂₆ O
α -cadinol	12.95	12.52	C ₁₅ H ₂₆ O

<i>Germacrene Group</i>			
spathulenol	3.61	11.80	C ₁₅ H ₂₄ O
globulol	3.10	11.87	C ₁₅ H ₂₆ O
viridiflorol	2.32	11.96	C ₁₅ H ₂₆ O
<i>Other</i>			
fytol	2.01	16.25	C ₂₀ H ₄₀ O
Identified compounds	90.40		
Grouped components			
Sesquiterpenes hydrocarbons	53.04		
Sesquiterpenes oxigens	35.35		

^a Relative proportions of the essential oil constituents were expressed as percentages obtained by peak-area normalization, all relative response factors being taken as one.

^b Retention time according their order on HP-5.

* Peak identification is based by comparison of GC mass spectra from the Nist98 Mass Spectral Database and by comparison of mass spectra described by Adams (2001)²⁵, as well as by comparison of mass spectra reported in the literature.

The δ -cadinene constituent of the *Buddleja thyrsoides* leaves was related to essential oil of *Buddleja tucumanensis*²³ from Bolivia, meanwhile this substance is three times more concentrated in the *Buddleja thyrsoides* oil. Despite belonging to the same genus, only one component was common to both species. A very significant factor is the difference in climate and altitude, particularly where the plants were cultivated, which are very different, causing a variation in the composition of the oil²⁶.

The analysis of the chemical composition of oil of this plant is the first work described in the literature for this species.

4. Conclusion

A total of 12 components were identified representing 90.4% of *Buddleja thyrsoides* oil. Two groups of identified compounds were sesquiterpene hydrocarbons and oxygenate (53.04 % and 35.35 %, respectively). The major oxygenate components were 1,10-di-*epi*-cubenol (13.37 %) and α -cadinol (12.95 %), and the major hydrocarbons components were germacrene D (27.16 %), bicyclogermacrene (9.00 %), δ -cadinene (8.59 %) and caryophyllene E (5.26 %). The results

observed in this work showed that the chemical composition of the essential oil of two species, *B. thyrsoides* and *B. tucumanensis*, of the same genus, had significant differences, having in common only one of the constituents, δ -cadinene. In turn, plants in the same region, showed a high degree of similarity in the composition of its oils.

References

1. The Angiosperm Phylogeny Group. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**. V. 141, p. 399-436, 2003.
2. Mabberley, D. J. 1987. The plant-book. Cambridge University Press. Cambridge. 707.
3. Houghton, P.J., Manby, J., 1985. Medicinal plants of the Mapuche. **Journal of Ethnopharmacology** 13, 89 – 103.
4. Houghton, P.J., Abraham, Y., Mensah, A.Y., Yong-Hong, L., 2003. Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. **Phytochemistry** 64:385 – 393.
5. Liao, Y. H.; Houghton, P. J.; Houtt, J. R. S., 1999. Novel and known constituents of *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. **Journal of Natural Products**, 62: 1241-1245.
6. Mensah, A.Y., Houghton, P.J., Bloonfield, S., Vlietinck, A., Vander Berghe, D., 2000. Known and Novel Terpenes from *Buddleja globosa* Displaying selective Antifungal Activity Against Dermatophytes. **Journal of Natural Products**, 63: 1210-1213.
7. Houghton, P. J.; Woldemariam, T. Z.; Candau, M.; Barnardo, A.; Khen-alafun, O.; Li, S., 1996. Buddlejone, a diterpene from *Buddleja albiflora*. **Phytochemistry**, 42:485-488.
8. Guo, H.; Koike, K.; Li, W.; Satou, T.; Guo, D.; Nikaido, T. 2004. Saponins from the Flower Buds of *Buddleja officinalis*. **Journal of Natural Products**, 67:10-13
9. Miyase, T.; Alkaori, C.; Kohsaka, H.; Ueno, A., 1991. Acylated iridoid glycosides from *Buddleja japonica* Hemsl.. **Chemical & Pharmacology Bulletin**, 39: 2944-2951.
10. Yamamoto, A.; Nitta, S.; Miyase, T.; Ueno, A.; Wu, L., 1993. Phenylethanoid and lignaniridoid complex glycosides from roots of *Buddleja davidii*. **Phytochemistry**, 32: 421-425.
11. Houghton, P. J., 1984. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. **Journal of**

Ethnopharmacol, 11: 293-308.

12. Yoshida, T.; Nobuhara, J.; Uchida, M.; Okuda, T., 1976. Buddledin A, B and C, piscicidal sesquiterpenes from *Buddleja davidii* Franch. **Tetrahedron Letter**, 3717-3720.
13. Yoshida, T.; Nobuhara, J.; Uchida, M.; Okuda, T., 1978a. Studies on the constituents of *Buddleja* species I. Buddledin A and B. **Chemical & Pharmacology Bulletin**, 26(8): 2535.
14. Yoshida, T.; Nobuhara, J.; Uchida, M.; Okuda, T., 1978b. Studies on the constituents of *Buddleja* species II. Buddledin C, D and E, new sesquiterpenes from... **Chemical & Pharmacology Bulletin**, 26(8): 2535.
15. Yamamoto, A.; Miyase, T.; Ueno, A.; Maeda, T., 1991. Oleanane-triterpene saponins from *Clinopodium urticifolium*. **Chemical & Pharmacology Bulletin**, 39: 2764.
16. Ding, N.; Yahara, S.; Nohara, T., 1992. Structure of mimengosides A and B, new triterpenoid glycosides from Flos *Buddlejae* produced in China ... **Chemical & Pharmacology Bulletin**, 40: 780-782.
17. Emam, A. M.; Moussa, A. M.; Faure, R.; Favel, A.; Delmas, F.; Elias, R.; Balansara, G., 1996. Isolation and biological study of a triterpenoid saponin, mimengoside A, from the leaves of *Buddleja madagascariensis*. **Planta Medica**, 62: 92-93.
18. Houghton, P. J., Hikino, H., 1989. Anti-hepatotoxic activity of extracts and constituents of *Buddleja* species. **Planta Med.**, 55: 123-126.
19. Arciniegas, A., Avendaño, A., Pérez-Castorena, A. L., Romo de Vivar, A., 1997. Flavonoids from *Buddleja parviflora*. **Biochemical Systematic and Ecology**, 25: 185-186.
20. Houghton, P. J., 1982. Dragendorff-positive lignans from *Buddleja davidii*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 34 Supplement, 13P.
21. Chantraine, J. M.; Laurent, D.; Ballivian, C.; Saavedra, G.; Ibañez, R., 1998. INSECTICIDAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS ON AEDES AEGYPTI LARVAE. *Phytochemistry, Reviews.*, 11: 350-354.
22. Laurent, D.; Vilaseca, L. A.; Chantraine, J. M.; Ballivian, C.; Saavedra, G.; Ibañez, R., 1997. Insecticidal activity of essential oils on *Triatoma infestans*. *Phytochemistry, Reviews.*, 11: 285-290.
23. Lorenzo, D.; Loayza, I.; Dellacassa, E., 2006. Composition and chiral characterization of the essential oil of *Buddleja tucumanensis* from Bolivia. *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 95-98.

24. *BUDDLEJA*. In: PLANTAS brasileiras. Banco de dados – plantas medicinais do Brasil. Disponível em: <www.brazilian-plants.com/br/search.cfm>. Acesso em: 28 ago. 2006.
25. Adams, R.P., 2001. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, USA.
26. Simões, C. M. O. (Org.) *et al.*, 2004. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5^a ed. revista e ampliada, Porto alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 465-492.

5. DISCUSSÃO GERAL

A pesquisa de plantas medicinais como estratégia alternativa na procura de novos agentes terapêuticos tem se tornado uma ferramenta bastante útil, principalmente nos países que possuem uma grande diversidade vegetal.

Os produtos de origem natural deram uma contribuição decisiva para o desenvolvimento da terapêutica moderna. Atualmente, no Brasil, a motivação da indústria farmacêutica local e mundial, tem resultado em investimentos na pesquisa de novos medicamentos obtidos de plantas. Além disto, as universidades brasileiras em parceria com órgãos governamentais, baseados principalmente na pesquisa bibliográfica e indicação popular, têm validado o uso de diversas plantas medicinais, demonstrando que é possível investir em pesquisa no Brasil e que nossa biodiversidade poderá resultar em atividades econômicas lucrativas e ainda em desenvolvimento científico.

Apesar da fitoterapia significar uma alternativa ao uso de medicamentos sintéticos, geralmente mais caros e agressivos ao organismo, pode oferecer riscos à saúde quando não utilizada na posologia adequada. Quanto a ser mais barata também é um conceito que nem sempre é verdadeiro como imagina a maioria das pessoas, pois alguns fitoterápicos, dependendo da complexidade de sua produção, podem ter custos similares ou maiores aos dos produtos sintéticos.

Além disso, a automedicação com fitoterápicos tem os mesmos riscos dos medicamentos sintéticos convencionais. Isso ocorre devido à dificuldade de se avaliar a diversidade de princípios ativos contida nas plantas e a interação de suas moléculas com o organismo e outras drogas. Ao mesmo tempo, essa complexidade de princípios ativos pode ser uma das vantagens dos fitoterápicos devido aos efeitos sinérgicos e associação de mecanismos de ação dos vários compostos presentes nos fitoterápicos (YUNES *et al.*, 2001). Assim, devem-se utilizar apenas produtos por indicação médica e com eficácia comprovada cientificamente.

Como etapa primária para a produção de um fitoterápico e para qualquer trabalho científico com plantas, faz-se necessária uma correta e minuciosa identificação botânica através de identificações macroscópicas e microscópicas, bem como a realização de um perfil fitoquímico para identificar os principais grupos de constituintes presentes nessa planta (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Em *Buddleja thyrsoides* Lam., após identificação macroscópica, foi observada uma grande variação fenotípica em suas folhas, com margem variando de serreada até subinteira e pouco revoluta próximo à base, apresentando forma linear-lanceolada. Esses dados estão em conformidade com os relatados por Smith e colaboradores (1976) e por Ferreira (1991). A coloração das folhas, apesar da grande plasticidade fenotípica, é sempre a mesma: verde-escuro e pouco lúzida na face adaxial e cinza-brancacento na face abaxial.

As análises microscópicas apresentaram características significantes para a determinação de uma espécie vegetal, como a presença de estômatos e tricomas apenas na face abaxial. Segundo Metcalfe e Chalk (1988), *Buddleja* pertence à família Loganiaceae. Esses mesmos autores descreveram que as plantas deste gênero possuem também estômatos apenas na face abaxial mas não possuem tricomas; porém, para a família Scrophulariaceae, Metcalfe e Chalk (1988) relatam estômatos em ambas as faces e tricomas em grande quantidade.

Anatomicamente, foi constatado que o mesofilo heterogêneo assumindo uma disposição bifacial, a presença de pequenos cristais, do tipo drusas, no parênquima paliçádico e esponjoso, e células do tipo braquiblastos presentes no parênquima lacunoso observadas neste trabalho são características comuns para a família Scrophulariaceae segundo Metcalfe e Chalk (1988), o que aproximam *Buddleja* dessa família.

O feixe vascular é do tipo colateral aberto e se apresenta no formato côncavo-convexo. O xilema encontra-se disposto de forma radial com células parenquimáticas localizadas entre os raios de xilema. O floema mostrou-se bem desenvolvido. Observou-se a formação de um câmbio. Os feixes vasculares de menor ordem localizam-se logo após as camadas de células em paliçadas, rodeados por células parenquimáticas que tendem a formar uma bainha vascular irregular.

A caracterização da droga vegetal é de fundamental importância para o controle de qualidade de um fitoterápico. Como parâmetros de qualidade, realizou-se uma avaliação granulométrica do pó de *B. thyrsoides*, uma vez que o tamanho da partícula deste pó é diretamente responsável pelo resultado do processo de extração (VOIGT, BORNSCHEIN, 1982). Através de diferentes malhas de tamises, avaliou-se o

comportamento granulométrico do pó das folhas, o que permitiu detectar um diâmetro médio igual a 440 μm . O pó obtido das folhas de *B. thyrsoides* pode ser considerado do tipo grosso, visto que mais de 84% ficou retido nas malhas de 300 – 500 μm . A coloração do pó mostrou-se verde-esbranquiçado, com odor *sui generis*.

De igual relevância para o controle de qualidade, o screening fitoquímico qualitativo também deve ser realizado. No presente trabalho, este processo foi efetivado no extrato hidroalcoólico da planta, onde apresentou reações positivas para grupos químicos como alcalóides, flavonóides, cumarinas, antocianinas, saponinas e óleos voláteis. Os resultados do screening encontram-se em conformidade com os encontrados para o gênero *Buddleja* segundo estudos realizados por Houghthon (1984) e também por Houghthon e colaboradores (2003).

Após ter verificado os principais grupamentos químicos presentes nas folhas de *Buddleja thyrsoides* Lam. e tendo em vista a importância dos mesmos, principalmente através dos dados revistos na literatura, como seqüência ao estudo realizado para esta espécie, realizou-se algumas atividades farmacológicas e biológicas.

As plantas produzem uma variedade de antioxidantes contra danos moleculares provenientes de espécies reativas de oxigênio (ERO), os compostos fenólicos são a maior classe de antioxidantes derivados de plantas. Entre os compostos fenólicos, os flavonóides são talvez o grupo de maior importância. Várias são as atividades relatadas a esse grupo de compostos, entre elas estão antioxidante, antifúngica, antiinflamatória e antitumoral (ZUANAZZI, MONTANHA, 2003).

Como os flavonóides geralmente são hidroxilados, os radicais livres reagem com essas hidroxilas formando radicais estáveis, conforme visualizado na figura 5 (CHO *et al.*, 2003). Desta forma, torna-se um grupo de grande interesse na busca de novos compostos antioxidantes (CHOI *et al.*, 2002).

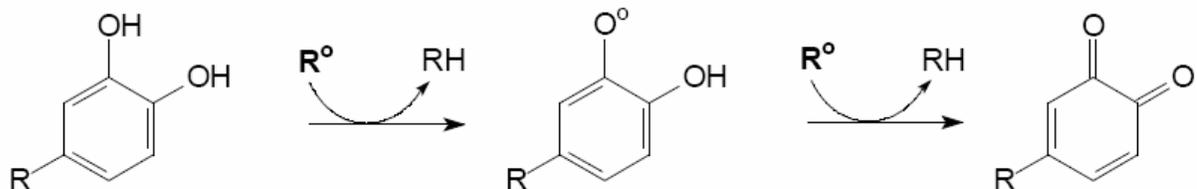


Figura 10: Estabilização dos radicais livres pelos compostos fenólicos

A atividade antioxidante, *in vitro*, do extrato bruto e das frações diclorometano, acetato de etila e butanólica foi avaliada pelo monitoramento de suas capacidades em estabilizar o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), segundo metodologia descrita por Choi e colaboradores (2002) tendo como padrão o ácido ascórbico, o qual possui atividade antioxidante comprovada.

As frações acetato de etila e diclorometano apresentaram os melhores resultados, com CI_{50} de 137,70 e 146,89 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (CI_{50} = concentração necessária para inibir o radical DPPH em 50 %). A fração butanólica obteve um CI_{50} de 165,71 $\mu\text{g/mL}$ e o extrato bruto 186,04 $\mu\text{g/mL}$. A melhor atividade exibida pela fração acetato pode ser explicada principalmente pela presença de compostos fenólicos nesta fração. Segundo Zuanazzi e Montanha (2003) os flavonóides são extraídos parte em clorofórmio ou diclorometano e em maior quantidade em acetato de etila.

Nesta mesma lógica, vários trabalhos relacionam uma maior atividade antioxidante na fração acetato de etila devido à presença de compostos fenólicos nesta fração, como exemplos podem ser citados o estudo com as flores de *Hibiscus sabdariffa* realizado por Tseng e colaboradores (1997) onde a fração acetato de etila apresentou maior porcentagem de inibição. Mensor e colaboradores (2001) e Tung e colaboradores (2006) também obtiveram resultados antioxidantes melhores nessa mesma fração. Resultado similar pode ser verificado no estudo realizado por Silva e colaboradores (2006) com as diferentes frações de *Sida galheirensis*.

Também foram relatadas atividades antioxidante para outras espécies de *Buddleja*, tais como *B. globosa* Lam. (MENSAH *et al.*, 2001) e para *B. scordioides* HBC (Kunth) (ACEVEDO *et al.*, 2005).

Devido à explicação da atividade antioxidante basear-se na presença de compostos fenólicos, resolveu-se determinar a quantidade de conteúdo de fenólicos totais visando estabelecer uma correlação entre atividade antioxidante e conteúdos fenólicos.

O doseamento de polifenóis foi realizado com o extrato bruto e as mesmas frações utilizadas no método do DPPH, empregando-se o reagente Folin-Ciocalteau, conforme metodologia descrita por Chandra e colaboradores (2004), e fenólico de

referência o ácido pirogálico, conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira (FARMACOPEIA BRASILEIRA 4 ed., 1988).

A maior concentração do conteúdo de fenólicos totais foi verificado na fração acetato de etila, seguida pela fração diclorometano, 438,4 e 298,6 mg/g, respectivamente (concentração expressada como mg equivalentes de ácido pirogálico por g de fração seca). Para a fração butanólica e extrato bruto, o teor de polifenóis foi de 231,87 e 214,07 mg/g, respectivamente.

Vários trabalhos que envolvem a determinação da atividade antioxidante e conteúdo total de polifenólicos relatam a existência de uma correlação positiva entre a capacidade antioxidante e o teor de fenólicos (ALONSO *et al.*, 2002; SHYAMALA *et al.*, 2005; CHANDRA *et al.*, 2004; TURKMEN *et al.*, 2006).

Essa mesma correlação também pode ser observada neste trabalho, uma vez que tanto a capacidade antioxidante como a concentração de polifenólicos totais mostrou-se em maior quantidade para as frações acetato de etila e diclorometano, para ambos os métodos e para a fração butanólica e extrato bruto, foram verificados os menores conteúdos fenólicos e atividade antioxidante.

O próximo passo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de *Buddleja thyrsoides* Lam. Segundo dados literários, os produtos naturais são ainda a maior fonte de agentes terapêuticos inovadores para diferentes condições, incluindo doenças infecciosas (CLARDY, WALSH, 2004).

As doenças infecciosas causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas são ainda a maior ameaça à saúde pública a pesar do progresso da medicina humana. Seu impacto é particularmente grande em países em desenvolvimento devido à inviabilidade relativa de medicamentos e a emergente resistência dos microorganismos às drogas em uso (OKEKE *et al.*, 2005).

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada para o extrato bruto e frações diclorometano, acetato de etila e butanólico, pelo método da microdiluição em caldo seguindo os documentos M27-A2 para fungos e leveduras (NCCLS, 2002a) e M7-A5 para bactérias (NCCLS, 2002b). Os resultados encontram-se na tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM), concentração fungicida mínima (CFM) obtida para o extrato bruto e frações diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etila (AcOEt) e butanólica (BuOH) de *Buddleja thyrsoides* Lam.

	Extrato Bruto CIM	Extrato Bruto CBM ou CFM	Fração CH ₂ Cl ₂ CIM	Fração CH ₂ Cl ₂ CBM ou CFM	Fração AcOEt CIM	Fração AcOEt CBM ou CFM	Fração BuOH CIM	Fração BuOH CBM ou CFM	Control µg/ml
E. coli	>2500	*	>4000	*	>4000	*	>4000	*	Amp 8.0
<i>P. aeruginosa</i>	>2500	*	4000	4000	4000	4000	>4000	*	Cef 16.0
<i>S. aureus</i>	>2500	*	250	500	500	500	2000	2000	Amp 2.0
<i>B. subtilis</i>	2500	2500	1000	*	>4000	*	>4000	*	Imi 0.06
<i>C. albicans</i>	>1250	*	>2000	*	>2000	*	>2000	*	Flu 16
<i>C. glabrata</i>	>1250	*	2000	>2000	1000	1000	>2000	*	Flu 32
S. cerevisiae	1250	1250	125	125	250	250	62,5	62,5	Flu 2.0
P. zopfii	>1250	*	>2000	*	2000	>2000	>2000	*	Anf 0,5

Amp = ampicilina, Cef = cefoperazona, Imi = imipenem, Flu = fluconazol, Anf = afotericina B

* Não testado por não ter sido determinado a CIM

Os valores foram referenciados em µg/ml.

De acordo com os resultados da tabela 1, verificou-se que o fungo *S. cerevisiae* apresentou índice de suscetibilidade bacteriana equivalente a 100% frente as amostras testadas, onde as frações butanólica, diclorometano e acetato de etila mostraram grande ação antimicrobiana com valores de CIM iguais aos CFM e iguais a 62,5; 125,0 e 500,0 µg/mL, respectivamente. Já o extrato bruto apresentou uma moderada atividade contra esse mesmo fungo. A fração acetato de etila também mostrou ser ativa contra *Candida glabrata* com valores de CIM e CFM de 1000 µg/mL. Emam e colaboradores (1996) mostraram que tanto o extrato clorofórmico como produtos isolados de *B. madagascariensis* foram efetivos contra fungos e leveduras.

Conforme relatado no trabalho de Mensah e colaboradores (2000) para *B. globosa*, o extrato clorofórmico mostrou a mesma efetividade para uma espécie de *Cândida* e

menor valor para *S. cerevisiae* do que os valores encontrados para a fração acetato de etila e extrato bruto de *B. thyrsoides*.

O grau de inibição exibido contra *S. aureus* foi de (250 µg/mL – CIM e 500 µg/mL – CBM) para a fração diclorometano e (500 µg/mL – CIM e CBM) para a fração acetato de etila. Em 1997, Arciniegas isolou do extrato metanólico de *B. parviflora* um derivado do fenilpropano – Verbascosídeo – e o identificou como um agente antibacteriano. Esse mesmo composto foi identificado de *B. cordata* possuindo também a mesma atividade (AVILA *et al.*, 1999). Pardo e colaboradores (1993) relataram para o verbascosídeo da *B. globosa* um CIM de 400 µg/mL e CBM de 800 µg/mL.

De acordo com os resultados avaliados no presente trabalho, a ação antimicrobiana mostrada pelas frações de *B. thyrsoides* foi melhor do que as relatadas para *B. cordata* e *globosa*. Visando identificar a presença de fenilpropanóides, principalmente a presença de verbascosídeo em *B. thyrsoides*, foi efetuada uma varredura no ultra-violeta (UV) para as frações acetato de etila e butanólica, utilizando metanol:água (1:1, v,v) como solvente, em (200 a 600 nm). Através das observações dos espectros UV para as frações acetato de etila e butanólica, podemos inferir a presença de verbascosídeo nessas frações, uma vez que esse composto apresenta máximas de absorção em 220, 280 e 320-330 nm, característico de derivados fenilpropanóides (LI *et al.*, 2005).

A alga *Prototheca zopfii* é um patógeno hospitalar de difícil erradicação. Até o momento não se tem um protocolo padrão para o tratamento desse microorganismo, o qual pode apresentar uma expressiva ação em pacientes imunodeprimidos, como por exemplo pacientes com AIDS, com câncer ou em tratamento com medicamentos que causam imunossupressão (LASS-FLÖRL *et al.*, 2004; SIDRIN *et al.*, 2003). A fração acetato de etila foi efetiva contra essa alga, exibindo CIM de 2000 µg/mL. Não há relatos, até o momento, de avaliação se atividade envolvendo *Prototheca zopfii* com plantas.

Em uma revisão realizada por Houghthon (1984), constatou-se que várias espécies de *Buddleja*, principalmente nas espécies de origem asiática, são utilizadas popularmente para o tratamento de feridas. Houghthon e colaboradores (2005) relataram que uma possível explicação para justificar esse uso popular seria o impedimento de

ação microbiana sobre o fermento, uma vez que feridas abertas são como portas de entrada para microorganismos infecciosos. Conforme mencionado anteriormente algumas espécies de *Buddleja* possuem ação antimicrobiana, podendo ser este, então, o real mecanismo de ação para o tratamento.

Outra possível explicação, também relatada por Houghthon e colaboradores (2005) seria a capacidade antioxidante exibida por várias espécies de *Buddleja*. Quando ocorre um ferimento, em um curto espaço de tempo, aparece um eritema, dor e edema envolvente a lesão. Estes são os sintomas clássicos da inflamação e são causados pela liberação dos eicosanoides, prostaglandinas e leucotrienos e por espécies reativas de oxigênio. Assim, a inibição da síntese de eicosanoide e as propriedades antioxidantes tanto de extratos como de compostos isolados podem ajudar nesse processo de cura. A inibição de eicosanóides foi verificada, segundo dados literários, para *B. globosa*, *officinalis* e *asiática* (LIAO *et al.*, 1999; MENSAH *et al.*, 2001, 2004) sendo todas explicadas pela ação antioxidante exercidas pelas mesmas.

Devido ao vasto uso de espécies de *Buddleja*, é de suma importância garantir que as espécies utilizadas pela população não sejam tóxicas ao organismo humano e animal. As folhas de *Buddleja thyrsoides* são usadas na forma de chá, principalmente em épocas de clima frio. Como parte deste estudo foi realizado o bioensaio de toxicidade *in vitro* utilizando larvas de *Artemia salina* Leach, segundo metodologia proposta por Meyer e colaboradores (1982).

Após comparação com dados da literatura (MEYER *et al.*, 1982), pode-se afirmar que as amostras de *B. thyrsoides* não apresentaram toxicidade frente a *A. salina*, pois entre as amostras testadas o extrato bruto foi o que apresentou menor valor de CL₅₀ 1698,0 µg/mL.

Há relatos de toxicidade para algumas espécies de *Buddleja*, descritos na literatura. Uma saponina triterpenóide, Mimengosideo A, isolada do extrato clorofórmico de *B. madagascariensis* mostrou-se altamente letal contra *Biomphalaria alexandrina* em uma concentração de 10 µg/mL (EMAM *et al.*, 1996). Yoshida e colaboradores (1976) isolaram das raízes de *B. davidii* três sesquiterpenóides, Buddledin A, B e C, onde relataram atividade tóxica para peixes.

De acordo com os resultados obtidos para *B. thyrsoides*, verificou-se que o chá das folhas utilizado tradicionalmente para o tratamento de bronquite, asma e tosse, pode ser bem tolerado frente ao sistema biológico. Entretanto, estudos mais detalhados para a avaliação da toxicidade empregando outros modelos *in vivo* se fazem necessários.

Devido ao aumento do número de pessoas com doença de Alzheimer (DA), a qual caracteriza-se por ser uma doença neurodegenerativa com sintomas de perda de memória e diminuição da capacidade cognitiva e emocional (FRANK, GUPTA, 2005), cresce o interesse por novas drogas que auxiliem no controle, pelo menos, dos sintomas causados pela DA.

Esses sintomas estão associados com uma baixa taxa de acetilcolina no processo sináptico, reduzindo a neurotransmissão colinérgica cortical (LI *et al.*, 2007; MARSTON *et al.*, 2002). Na busca de que *B. thyrsoides* possa ter ação sobre a acetilcolinesterase (AChE), realizou-se o bioensaio, *in vitro*, para verificar existência de um efeito inibitório do extrato bruto dessa planta sobre a AChE.

O extrato bruto inibiu em 22,8% a enzima AChE, após 24 horas de contaminação. Segundo pesquisas recentes, 12 cumarinas isoladas dos extratos de *Amburana cearensis* e de *Lippia sidoides* apresentaram efeito inibitório sobre a enzima AChE (TREVISAN *et al.*, 2003). Alcalóides da família Amaryllidaceae também mostraram ação anticolinesterásica (LOPEZ *et al.*, 2002) e os derivados alcaloídicos triterpênicos foram isolados de *Buxus hyrcanai* e considerados promissores inibidores da AChE (UR-RAHMAN, CHOUDHARY, 1999). Apesar de ter aparecido no screening fitoquímico alcalóides e cumarinas, não podemos inferir que o resultado inibição da enzima AChE pelo extrato bruto de *B. thyrsoides* deva-se, exclusivamente, a essas classes de compostos.

O crescimento do número de casos de morte decorrente da formação de trombos é um fato importante. Com objetivo de identificar extratos vegetais potencialmente capazes de interferir nos processos da coagulação sanguínea, *in vitro*, realizou-se um estudo de ação antiplaquetária, em plaquetas humanas utilizando protrombina cálcica como indutor de agregação.

Como resultado da inibição da agregação plaquetária, a fração butanólica exibiu o melhor resultado, com um percentual de inibição de 43,57, seguido pela fração diclorometano, extrato bruto e fração acetato de etila (42,35; 41,52 e 40,68, respectivamente), visto que a inibição causada pelo ácido acetilsalicílico (AAS) foi de 58,36 %.

O gênero *Buddleja* é conhecido por apresentar vários compostos polifenólicos (HOUGHTON, 1984). A eles são atribuídos diferentes efeitos biológicos como antioxidante, antiinflamatório, inibição da agregação plaquetária, entre outros. Por sua ação antioxidante, os polifenóis, principalmente os flavonóides, restabelecem a biossíntese e ação de prostaciclina endotelial e fator de relaxamento derivado do endotélio, os quais são inibidos pelos radicais livres (LALE; HERBERT, 1996).

Em pesquisa realizada por Tognolini (2006), descobriu-se que compostos fenilpropanóides apresentaram ação antiplaquetária. Como já foi relatado neste trabalho, fenilpropanóides foram isolados de várias espécies de *Buddleja* (HOUGHTON, 1984), inclusive foi inferido a presença de verbascosídeo, um fenilpropanóide, em *B. thyrsoides*. Greice e colaboradores (2003) verificaram a ação do verbascosídeo (1mg/mL) onde houve inibição de agregação induzida por ADP em 93,6 %. Talvez, essa seja uma possível explicação para a ação inibitória da agregação plaquetária exibida pelo extrato bruto e frações diclorometano, acetato de etila e butanólica de *B. thyrsoides*.

Buddleja thyrsoides é reconhecida, popularmente, pelo seu forte odor agradável que exala onde quer que esteja plantada, e mesmo após ter sido colhida o aroma permanece por alguns dias. Por esse motivo, supusemos a presença de óleo essencial em *Buddleja thyrsoides*. A extração do mesmo foi realizada por hidrodestilação utilizando Clevenger como aparato.

Após 4 horas de extração, o óleo extraído foi analisado por cromatografia gasosa (CG) acoplada a um espectrômetro de massas (EM). A identificação dos constituintes do óleo foi realizada através de comparações de seus espectros de massas com os espectros relatados na literatura e com o banco de dados espectrais *NIST*.

Doze substâncias, representando um total de 90,4 % da composição, foram identificadas. Como constituinte majoritário obteve-se o germacreno D (27,16 %),

seguido por 1,10-di-*epi*-cubenol (13,37 %), α -cadinol (12,95 %), biciclogermacreno (9,0 %), δ -cadineno (8,59 %) e cariofileno E (5,26 %). Com exceção de um constituinte, o fitol, os demais identificados são sesquiterpenos, e a quantidade de sesquiterpenos oxigenados foi de 35,35 % (Espectros germacreno D em Anexo).

Lorenzo e colaboradores (2006) relataram a identificação do óleo essencial para *Buddleja tucumanensis* Griseb. originária da Bolívia. O único composto presente nas duas espécies foi o δ -cadineno, porém este apresentou-se três vezes mais concentrado em *B. thyrsoides*. As diferenças na composição dos óleos entre as duas espécies foram muito marcantes.

Um fato importante que pode explicar essa diferença consiste variabilidade de fatores extrínsecos (ZUANAZZI, MONTANHA, 2003), principalmente, na grande diferença de altitude relatada, visto que *B. tucumanensis* é originária da província de Quillacollo, Chochabamba, a 3000 m de altitude.

Os constituintes do óleo de *Buddleja thyrsoides* foram mais semelhantes aos constituintes do óleo de espécies de *Mircianthes*, uma planta nativa da Região Sul do Brasil (APEL *et al.*, 2006).

O motivo do germacreno D estar em maior concentração *B. thyrsoides* pode ser explicado pelo fato deste composto ser um intermediário comum na biossíntese de outros hidrocarbonetos sesquiterpênicos, que por sua vez, dão origem a derivados de estruturas mais complexas (YOSHIHARA *et al.*, 1969; STEELE *et al.*, 1998; BÜLLOW, KÖENIG, 2000).

O germacreno D é uma molécula quiral, existindo na forma de dois enantiômeros, (+) e (-), bem como a maioria dos sesquiterpenóides existentes na natureza (KOENIG, 2001) (Figura 6).

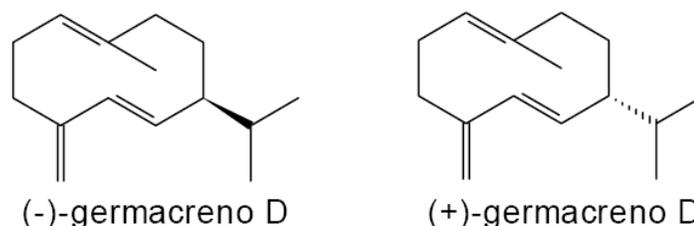


Figura 11: Enantiômeros do germacreno D (Adaptado de STELIOPOULOS *et al.*, 2002)

O germacreno D é um importante constituinte de muitos óleos essenciais. Além disso, é um intermediário chave na rota biossintética dos compostos de esqueleto cadinano. Possivelmente, os γ -isômeros do cadineno, muuroleno e amorfeno, e o α e β -bourboneno são originados unicamente a partir do germacreno D nos vegetais (YOSHIHARA et al., 1969).

Este foi o primeiro trabalho a relatar estudos realizados com a espécie *Buddleja thyrsoides* Lam. Porém, estudos aprofundados com o extrato e frações de *Buddleja thyrsoides* Lam., principalmente no que se trata de isolamento dos constituintes químicos dessa espécie, se fazem necessários para poder, melhor e mais detalhadamente, explicar as ações biológicas e farmacológicas realizadas neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

- Artigo 1: Estudo morfoanatômico e fitoquímico das folhas de *Buddleja thyrsoides* Lam. (Scrophulariaceae)

A forma, textura e margem das folhas de *Buddleja thyrsoides* são características morfológicas que contribuem para a morfodiagnose desta espécie. Os caracteres anatômicos, como células epidérmicas da face adaxial maiores do que as da face abaxial, a presença de estômatos higrofíticos e tricomas tectores e glandulares na face abaxial, mesofilo do tipo de colateral aberta, feixes vasculares com um xilema disposto radialmente, quando analisados em conjunto, contribuem para a autenticidade das folhas como drogas farmacêuticas e aproximam *Buddleja thyrsoides* da família Scrophulariaceae.

O alto rendimento do extrato etanólico a 70 % podem ser atribuído à elevada concentração de constituintes de maior polaridade, confirmada pelo screening fitoquímico qualitativo.

- Artigo 2: *In vitro* atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato bruto e frações das folhas de *Buddleja thyrsoides* Lam.

Os resultados indicam as frações acetato de etila e diclorometano como as mais eficazes para a atividade antioxidante pelo método do DPPH. Essas mesmas frações apresentaram as maiores concentrações de fenólicos.

De acordo com as avaliações microbiológicas, o melhor resultado foi evidenciado para a fração butanólica (de maior polaridade) contra *S. cerevisiae* e para a fração diclorometano contra *S. aureus*. Por esses resultados podemos presumir que a atividade antioxidante e antimicrobiana em *Buddleja thyrsoides* pode ser devida à presença de flavonóides, fenóis e fenilpropanóides.

- Artigo 3: Atividade citotóxica, inibição antiplaquetária e anticolinesterásica *in vitro* das folhas de *Buddleja thyrsoides* Lam.

De acordo com os resultados obtidos para *B. thyrsoides* tanto o extrato bruto quanto as frações não apresentaram atividade citotóxica frente a *Artemia salina*. O chá

das folhas utilizado tradicionalmente para o tratamento de bronquite, asma e tosse, pode ser bem tolerado frente ao sistema biológico.

Buddleja thyrsoides apresentou ação inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase, porém mais pesquisas se fazem necessárias para inferirmos uma explicação sobre a inibição pelo extrato.

Quanto à atividade antiplaquetária uma possível explicação para a ação inibitória da agregação plaquetária exibida pelo extrato bruto e frações diclorometano, acetato de etila e butanólica de *Buddleja thyrsoides*, pode ser a presença de polifenóis, principalmente, fenilpropanóides.

- Artigo 4: Composição do óleo essencial das folhas de *Buddleja thyrsoides* Lam. do Brasil.

Um total de 12 componentes foram identificados, representando 90,4 % dos constituintes do óleo essencial de *Buddleja thyrsoides*. Sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados representaram 53,04 % e 35,35 %, respectivamente, da composição química do óleo.

Os principais componentes oxigenados foram 1,10-di-*epi*-cubenol (13,37%) e α -cadinol (12,95%), e os principais componentes hidrocarbonetos foram germacreno D (27,16%), biciclogermacreno (9,00%), δ -cadineno (8,59%) e cariofileno E (5,26%).

Os resultados observados neste trabalho mostraram que a composição química do óleo essencial de duas espécies do mesmo gênero, *Buddleja thyrsoides* e *Buddleja tucumanensis*, apresentaram diferenças marcantes, principalmente devido a fatores extrínsecos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, J. G. A.; CASTAÑEDA, C. M. C.; BENITEZ, F. J. C.; DURÁN, D. A.; BARROSO, V. R.; MARTÍNEZ, C. G.; MUÑOZ, L. J. L.; MARTÍNEZ, C. A.; de VIVAR, R. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 301 – 309, 2005.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÊNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004, Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo; Brasília, DF, 18 de março de 2004.

ALONSO, A. M.; DOMÍNGUEZ, C.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. Determination of antioxidant power of red and White wines by a new eletrochemical method and its correlation with polyphenolic content. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 3112-3115, 2002.

ARCINIEGAS, A.; AVENDAÑO, A.; PÉREZ-CASTORENA, A. L., ROMO DE VIVAR, A. Flavonoids from *Buddleja parviflora*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, nº 2, p. 185 –186, 1997.

APEL, M. A.; SOBRAL, M. HENRIQUES, A. T. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 402-407, 2006.

AVILA, J. G.; de VIVAR, A. R. Triterpenoid saponins and other glycosides from *Buddleja scordioides*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 1003 – 1005, 2002.

AVILA, J. G.; LIVERANT, J.G. de; MARTÍNEZ, A.; MARTÍNEZ, G.; MUÑOZ, J. L.; ARCINIEGAS, A.; VIVAR, A. R. de. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 75-78, 1999.

BAUR, B.; SCHMID, B. Spatial and temporal patterns of genetic diversity within species. In: GASTON, K. J. **Biodiversity, a biology of numbers and differences**. Oxford, Blackwell Science, 1996, p. 169-201.

BACKLUD, M.; OXELMAN, B.; BREMER, B. Phylogenetic relationships within the Gentianales based on ndhF and rbcL sequences, with particular reference to the Loganiaceae. **American Journal of Botany**, v. 87, p. 1029-1043, 2000.

BISSET *et al.*, 1980. Chemical discussion of relationships between taxa inside and with taxa outside the family. In: LEEUWENBERG, A. J. M. , v. 28, 72nd ed. Dunker and Humblot, Berlin, pp. 30-37. In: HOUGHTON, P. J., *et al.* Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. **Phytochemistry**, v. 64, p. 385-393, 2003.

BUDDLEJA. In: PLANTAS brasileiras. Banco de dados – plantas medicinais do Brasil. Disponível em: <www.brazilian-plants.com/br/search.cfm>. Acesso em: 28 ago. 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BÜLOW, N.; KÖNIG, W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v. 55, n. 2, p. 141-168, 2000.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Poliphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of na aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguarensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 11, 2004.

CHANG, H. M.; BUT, P. P. **Pharmacology and applications of Chinese Materia Medica**. vol. 1 (1986) and vol. 2 (1987), Singapore, World Scientific.

CHEN, H.; XU, C.; LIU, D. Q.; AN, S. Q.; TAN, R. X. Buddlin, a new compound from *Buddleja asiatica*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 588 – 589, 2005.

CHO, E. J.; YOKOZAWA, T.; RHIU, D. Y.; KIM, S. C.; SHIBAHARA, N.; PARK, J. C. Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Phytomedicine**, v. 10, p. 544-551, 2003.

CHOI, C, W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829-837, 2004.

COLEGATE, S.M.; MOLYNEUX, R.J. In: Toxicity using the brine shrimp: *Artemia salina*. **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination**, 1993, CRC Press

CORTÉS, A. R.; DELGADILLO, A. J.; HURTADO, M. The antispasmodic activity od *Buddleja scordioides* and *Buddleja perfoliata* on isolated intestinal preparations. **Biological and Pharmacological Bulletin**, v. 29, n. 6, p. 1186-1190, 2006.

DIAS, B.F.S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: André Tosello, 10 pp, 1996.

DING, N.; YAHARA, S.; NOHARA, T. Structure of mimengosides A and B, new triterpenoid glycosides from Flos *Buddlejae* produced in China ... **Chemical & Pharmacology Bulletin**, v. 40, p. 780 – 782, 1992.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti-T.cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Belo Horizonte. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, p. 128, 1997.

ELVIN-LEWIS, Memory. Should we be concerned about herbal medicines? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 141-164, 2001.

EMAM, A. M.; ELIAS, R.; MOUSSA, A. M.; FAURE, R.; DEBRAUWER, L.; BALANSARD, G. Two Flavonoid Triglycosides from *Buddleja madagascariensis*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 739 – 742, 1997.

EMAM, A. M.; MOUSSA, A. M.; FAURE, R.; FAVEL, A.; DELMAS, F.; ELIAS, R.; BALANSARA, G. Isolation and biological study of a triterpenoid saponin, mimengoside A, from the leaves of *Buddleja madagascariensis*. **Planta Médica**, v. 62, p. 92 – 93, 1996.

EMAM, A. M.; MOUSSA, A. M.; FAURE, R.; FAVEL, A.; ELIAS, R.; BALANSARD, G. Isolation of mimengoside B, a triterpenoid saponin from *Buddleja madagascariensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 215 - 217, 1997.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERREIRA, H. D. **Flora do Estado de Goiás. Vol. 14. Buddlejaceae**. . Coord. José Ângelo Rizzo, Ed. CEGRAF/UFMG, Goiânia, Goiás. 1991, p. 1-43.

FERREZIN, G. M. *et al.* Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 103-107, 2001.

FRANK, B., GUPTA, S. A review of antioxidants and Alzheimer's disease. **Annals of Clinical Psychiatry**, v. 17, p. 269–286, 2005.

GALLARDO-VÁSQUEZ, A. C. **Atlas de lãs plantas de la medicina tradicional mexicana III**. México (DF): Instituto Nacional Indigenista, 1994.

GALLEDO, A. J. *et al.* Ensayos farmacologicos preliminares en plantas del herbario l'Amagatall. **Ciência**, V. 29, p. 151-180, 1974. In: HOUGHTON, P. J. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, nº 3, 293 – 308, 1984.

GRICE, I. D.; GARHNAM, B.; PIERENS, G.; ROGERS, K.; TINDAL, D.; GRIFFITHS, L. R. Isolation of two phenylethanoid glycosides from *Eremophila gilesii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 123-125, 2003.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALLAZO-DE-MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, 2a ed., Ed. Universidade-UFRGS, Ed. UFSC, 2003, cap. 1, p. 13-28.

GUO, H.; KOIKE, K.; LI, W.; SATOU, T. GUO, D.; NIKAIDO, T. Saponins from the Flower Buds of *Buddleja officinalis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 10–13, 2004.

HOUGHTON, P. J. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, nº 3, 293 – 308, 1984.

HOUGHTON, P. J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 419-423, 2000.

HOUGHTON, P. J.; ABRAHAM, Y.; MENSAH, A. Y.; YONG-HONG, L. Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. **Phytochemistry**, v. 64, p. 385 – 393, 2003.

HOUGHTON, P. J.; MANBY, J. Medicinal Plants of the Mapuche. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, p. 89 – 103, 1985.

HOUGHTON, P. J.; HIKINO, H. Anti-hepatotoxic activity of extracts and constituents of *Buddleja* species. **Planta Med**, v. 55, p. 123 – 126, 1989.

HOUGHTON, P. J.; HYLANDS, P. J.; MENSAH, A. Y.; HENSEL, A.; DETERS, A. M. In vitro testes and ethnopharmacological investigations: wound healing as a example. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, p. 100-107, 2005.

HOUGHTON, P. J.; WOLDEMARIAM, T. Z.; CANDAU, M.; BARNARDO, A.; KHEN-ALAFUN, O.; LI, S. Buddlejone, a diterpene from *Buddleja albiflora*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 485 – 488, 1996.

HUI, Z. et al. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Research International**, v. 39, n. 8, p. 833-839, 2006.

INBESI, A. Index Plantarum. University Press, Messina, p. 223, 1964. In: MENSAH, A. Y.; SAMPSON, J.; HOUGHTON, J. P.; HYLANDS, J. P.; WESTBROOK, J.; DUNN, M.; HUGHES, M. A.; CHERRY, G. W. Effects of *Buddleja globosa* leaf and constituents relevant to wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 219 – 226, 2001

INOUYE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 2). **The International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 4, p. 173-184, 2003.

JIANGSU NEW MEDICAL COLLEGE. A dictionary of Chinese traditional medicine. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, p. 725, 1977. In: CHEN, H.; XU, C.; LIU, D. Q.; AN, S. Q.; TAN, R. X. Buddlin, a new compound from *Buddleja asiatica*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 588–589, 2005.

KHAN, M. R. *et al.* Antimicrobial activity of *Symplocos cochinchinensis*. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 825-828, 2001.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. 2ª ed. Ed. BASF SA. São Paulo. 1999. p. 552 –555

KOENIG, W. A. Enantioselective gas chromatography in stereochemical studies of natural compounds. **Albany Molecular Research, Inc. - Technical Reports**, v. 6, n. 52, p. 2, 2001. Disponível em: <<http://www.albmolecular.com/chemlinks/reviews/vol06/no52/v06n52.pdf>>. Acesso em: 10 outubro. 2007.

KOOPER, V. K., *et al.* **Fitoterapia**, v. 52, p. 235, 1981. In: EMAM, A. M.; ELIAS, R.; MOUSSA, A. M.; FAURE, R.; DEBRAUWER, L.; BALANSARD, G. Two Flavonoid Triglycosides from *Buddleja madagascariensis*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 739 – 742, 1997.

LALE, A.; HERBERT, J. M. Ability of different flavonoids to inhibit the procoagulant activity of adherent human mono cytes. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 273-276, 1996.

LAPA, A. J. *et al.* **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais** in: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre, Florianópolis: UFECS, UFSC, p. 183-198, 1999.

LASS-FLÖRL, C., FILLE, M., GUNSILIUS, E., GASTL, G., D. NACHBAUR, D. Dissemination infection with *Prototheca zopfii* after unrelated stem cell transplantation for leukemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 4907-4908, 2004.

LI, L., TSAO, R., LIU, Z., LIU, S., YANG, R., YOUNG, J.C., ZHU, H., DENG, Z., XIE, M., FU, Z. Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantagopsyllium* L. by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1063, p. 161–169, 2005.

LI, P.; YAMAKUNI, T.; MATSUNAGA, K.; KONDO, S.; OHIZUMI, Y. Nardosinone enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth in a nitrogen-activated protein

kinase- and protein kinase C-dependente manner in PC12D cells. **Journal of Pahrmacology Science**, v. 93, p. 122-125, 2003.

LIAO, Y. H.; HOUGHTON, P. J.; HOULT, J. R. S. Novel and known constituents of *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 1241 - 1245, 1999.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M. HENRIQUES, A. T. Óleo volátil de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

LIU, C. H. et al. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1969-1973, 2006.

LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae e alkaloids and Narcisus. **Life Science**, v. 71, p. 2521, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas**. Instituto Plantarun de estudos da flora LTDA. São Paulo, 2002.

LORENZO, D.; LOAYZA, I.; DELLACASSA, E. Composition and chiral characterization of the essential oil of *Buddleja tucumanensis* from Bolivia. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 95-98, 2006.

MABBERLEY, D. J. **The plant-book**. Cambridge University Press. Cambrigde. p. 707,1987.

MÁRQUEZ, A. C.; LARA, O. F.; ESQUIVEL, R. B.; MATA, E. R.; LUNA, A. **Plantas Medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica**. Instituto de Biología UNAM, México, 1999.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapd TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analisis**, v.13, p. 51-54, 2002.

MENDONÇA, F. A. C. et al. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7/8, p. 629-636, 2005.

MENSAH, A. Y.; HOUGHTON, P. J.; BLOONFIELD, S.; VLIETINCK, A.; VANDER BERGHE, D. Known and Novel Terpenes from *Buddleja globosa* Displaying selective Antifungal Acticity Against Dermatophytes. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1210–1213, 2000.

MENSAH, A. Y.; SAMPSON, J.; HOUGHTON, J. P.; HYLANDS, J. P.; WESTBROOK, J.; DUNN, M.; HUGHES, M. A.; CHERRY, G. W. Effects of *Buddleja globosa* leaf and

constituents relevant to wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 219 – 226, 2001.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons**. Claredon Press, Oxford, v. 1, 2^a ed, p. 276, 1988.

MEYER, B. N.; *et al.* Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIGUEL, M. G.; MIGUEL, G. O. **Desenvolvimento de fitoterápico**. São Paulo: Robe, 1999.

MIYASE, T.; ALKAHORI, C.; KOHSAKA, H.; UENO, A. Acylated iridoid glycosides from *Buddleja japonica* Hemsl.. **Chemical & Pharmacology Bulletin**, v. 39, p. 2944 – 2951, 1991.

MURILLO, A. Plantas medicinales du Chilli. Exposition Universalle de Paris, Paris, p. 126, 1989. In: MENSAH, A. Y.; SAMPSON, J.; HOUGHTON, J. P.; HYLANDS, J. P.; WESTBROOK, J.; DUNN, M.; HUGHES, M. A.; CHERRY, G. W. Effects of *Buddleja globosa* leaf and constituents relevant to wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 219 – 226, 2001.

NASCIMENTO, G. G. F. *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS)a. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA. 2002.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS)b. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard; document M7-A5 5th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, PA. 2002.

OKEKE, I. N.; LAXMANINARAYAN, R.; BHUTTA, Z. A.; DUSE, A. G.; JENKINS, P.; O'BRIEN, T. F.; PABLOS-MENDEZ, A.; KLUGMAN, K. P. Antimicrobial resistance in developing countries. Part 1: recent trends and current status. **Lancet Infectious Disease**, v. 5, p. 481-493, 2005.

PARDO, F.; PERICH, F.; VILLAROEL, L.; TORRES, R. Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Biddleja globosa* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 3, p. 221-222, 1993.

PAULI, A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 11, n. 3, p. 126-133, 2001.

PONCE, A. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **Lebensmittel-Wissenschaft -Technologie**, v. 36, n. 7, p. 679-684, 2003.

RAMESH, N. et al. Phytochemical and antimicrobial studies of *Begonia melabarica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 1, p. 129-132, 2002.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore: Willians & Wilkins, 1996, p. 337. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALLAZO-DE-MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, 2a ed., Ed. Universidade-UFRGS, Ed. UFSC, 2003, cap. 1, p. 13-28.

ROBERT, W.; SCOTLAND, R. G.; OLMSTEAD, J. R. B. Phylogeny Reconstruction: The Role of Morphology. **Systematic Biology**, Vol. 52, No. 4 (Aug., 2003), p. 539-548.

SAGASETA, J. L. Jampi makikunanchiqpi kasan. La medicina esta en nuestras manos. EG Grafica: La Paz, 1996. In: LORENZO, D.; LOAYZA, I.; DELLACASSA, E. Composition and chiral characterization of the essential oil of *Buddleja tucumanensis* from Bolivia. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 95-98, 2006.

SCHULTZ, A. R. H. **Introdução à Botânica Sistemática**. UFRGS, 5ª ed., Porto Alegre, 1985.

SCHULTZ, A. R. **Flora ilustrada do Rio Grande do Sul**. Ed. Porto Alegre Imprensa Universitária. 1959, p. 76-83.

SHARMA, P. C. et al. Database on Medicinal Plants used in Ayurveda, v. 1-5. Central Council for Research in Ayurveda and Sidha, New Delli, India, 2000. In: VINUTHA, B. et al. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 359-362, 2007.

SHENG, G.; ZHANG, J.; PU, X.; MA, J.; LI, C. Protective effect of verbascoside on 1-metil-4-phenylpyridinium ion – induced neurotoxicity in PC 12 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 45, p. 119 – 124, 2002.

SHYAMALA, B. N.; GUPTA, S.; LAKSHMI, A. J.; PRAKASH, J. Leafy vegetable extracts – antioxidant activity and effect on storage stability on heated Oils. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 239-245, 2005.

SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G., CÂMARA, L.M.C., BRILHANTE, R.S.N., DIÓGENES, M.J.N., OLIVEIRA, A.M.A. Onycholysis Caused by a Mixed Infection of *Prototheca zopfii* and *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 25, p. 69-71, 2003.

SILVA, D. A.; SILVA, T. M. S.; COSTA, D. A.; CAVALCANTE, J. M. S.; MATIAS, W. N.; SOUZA, M. F. V.; BRAZ FILHO, R. Chemical constituents and antioxidant activity of *Sida galheirensis* Ulbr (Malvaceae). **Química Nova**, v. 29, p. 250, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003. p. 537-556.

SIQUEIRA, J. M.; *et al.* Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmaii*-Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, 1998

SMITH, L. B., GUIMARÃES, E. F.; PEREIRA, J. F.; NORMAN, E. M. **Flora Ilustrada Catarinense**. Fasc. Loga. Itajaí, Herbário Barrosa Rodrigues/CNPQ, 1976.

SOERJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefist sharing: perspectives from the field. **Journal of ethnopharmacology**, v. 51, p. 1-15, 1996.

SOUZA, V. C., LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo, 2005, p. 521.

STEELE, C. L. et al. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gammahumulene synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 4, p. 2078-2089, 1998.

STELIOPOULOS, P. et al. Biosynthesis of the sesquiterpene germacrene D in *Solidago canadensis*: ¹³C and ²H labeling studies. **Phytochemistry**, v. 60, n. 1, p. 13-20, 2002.

THE AGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. Na update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**. V. 141, p. 399-436, 2003.

TISSERAND, R. Essential oil safety I. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 7, n. 3, p. 28-32, 1996.

TOGNOLINI, M.; BAROCELLI, E.; BALLABENI, V.; BRUNI, R.; BIANCHI, A.; CHIAVARINI, M.; IMPICCIATORE, M. Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. **Life Sciences**, v. 78, p. 1419 – 1432, 2006.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V.; VAN DE MEENT, M.; RHEE, I. K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da Doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p. 301, 2003.

TSENG, T. H.; KAO, E. S.; CHU, C. Y.; CHOU, F. P.; LIN, H. W.; WANG, C. J. Protective effects of dried flower extract of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, n. 12, p. 1159-1164, 1997.

TUNG, Y. T. *et al.* Antioxidant activities of natural phenolic compounds of *Acacia confuse* bark. **Bioresource Technology**, 2006.

TURKMEN, N.; SARI, F.; VELIOGLU, S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and folin-ciocouteau methods. **Food Chemistry**, v. 99, p. 835-841, 2006.

UEDA-NAKAMURA, T. *et al.* Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99-105, 2006.

UPHOF, J. M. (1968). *In*: HOUGHTON, P. J. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, p. 293-308, 1984.

UR-RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I. Recent studies on bioactive natural products. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p. 1079, 1999.

VAYA, J.; BELINKY, P. A.; AVIRAM, M. Antioxidant Constituents from Licorice Roots: Isolation, Structure Elucidation and Antioxidative Capacity Toward LDL Oxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, Vol. 23, Issue 2, 1997.

VEIGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

VOIGT, R.; M. BORNSCHEIN, M. **Tratado de Tecnologia Farmacêutica**. 3 ed. Zaragoza: Editorial Acribia, p. 170, 1982.

WILHELN, K. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*. *In*: *Ethnopharmacology of some Buddleja Species*. **Journal of Ethnopharmacology**, 11: 293-308, 1984. *Wien*, 1910, p. 90

WAGNER, H; FARNSWORTH, N. R. **Economic and Medicinal Plant Research**. San Diego: Academic Press, 1990.

YAMAMOTO, A.; MIYASE, T.; UENO, A.; MAEDA, T. Oleanane-triterpene saponins from *Clinopodium urticifolium*. **Chemical & Pharmacology Bulletin**, v. 39, p. 2764, 1991.

YAMAMOTO, A.; NITTA, S.; MIYASE, T.; UENO, A.; WU, L. Phenylethanoid and lignaniridoid complex glycosides from roots of *Buddleja davidii*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 421 – 425, 1993

YOSHIDA, T.; NOBUHARA, J.; UCHIDA, M.; OKUDA, T. Buddledin A, B and C, piscicidal sesquiterpenes from *Buddleja davidii* Franch. **Tetrahedron Letter**, 3717 – 3720, 1976.

YOSHIDA, T.; NOBUHARA, J.; UCHIDA, M.; OKUDA, T. Studies on the constituents of *Buddleja* species I. Buddledin A and B. **Chemical & Pharmacology Bulletin**, v. 26, n° 8, p. 2535, 1978a.

YOSHIDA, T.; NOBUHARA, J.; UCHIDA, M.; OKUDA, T. Studies on the constituents of *Buddleja* species II. Buddledin C, D and E, new sesquiterpenes from... **Chemical & Pharmacology Bulletin**, v. 26, n° 8, p. 2535, 1978b.

YOSHIHARA, K. et al. Germacrene D, a key intermediate of cadinene group compounds and bourbonenes. **Tetrahedron Letters**, v. 10, n. 27, p. 2263-2264, 1969.

YUNES, R. A.; FILHO, V. C. **Breve análise histórica da química de plantas medicinais**: sua importância na atual concepção do fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 17-44, 532p, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALLAZO-DE-MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, 2ª ed., Ed. Universidade-UFRGS, Ed. UFSC, 2000, cap. 23, p. 489-516.