

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

SAYONARA MENDES

ESTUDO QUÍMICO E BIOATIVIDADE DE *Baccharis semiserrata* DC.

PONTA GROSSA
2007

SAYONARA MENDES

ESTUDO QUÍMICO E BIOATIVIDADE DE *Baccharis semiserrata* DC.

Dissertação apresentada para a obtenção do grau em Mestre em Química Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Mariza Boscacci Marques

Coorientador:

Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes

PONTA GROSSA
2007

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

M538e Mendes, Sayonara
Estudo químico e bioatividade de Baccharis Semiserrata
DC. / Sayonara Mendes. Ponta Grossa, 2007.
78f.

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

Orientador: Prof.^a Dr.^a Mariza Boscacci Marques.

1. Baccharis Semiserrata. 2. Óleo essencial. 3. Extratos.
4. Composição química. 5. Bioatividade. I. Mariza, Boscacci
Marques. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em
Química Aplicada. III.T.

CDD: 589.2

Dedico à minha mãe, Lucia, cujo amor e incentivo possibilitou a realização deste trabalho. À
minha irmã especial, Madiorie. Ao meu irmão, Temístocles, que mesmo muito distante
transmitiu apoio através de suas palavras. Ao meu amor, Tiago, que sempre esteve ao meu
lado diante desta caminhada.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão da bolsa e ajuda financeira para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa.

À orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Mariza Boscacci Marques, e ao coorientador, Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes, pela orientação e pela confiança em mim depositada, por abrir as portas que possibilitaram a melhoria do trabalho e pelo rigor científico em conduzir a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Caetano Zurita da Silva *in memoriam*, ex-coordenador do Curso de Pós-Graduação em Química Aplicada.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada e à todos professores da área pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

À Prof^ª. Dr^ª. Rosângela Capuano Tardivo, do Departamento de Biologia Geral – UEPG, pela classificação botânica.

Ao Prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau – IPT-FURB-SC, pelos dados fornecidos das análises por CG-EM.

À Prof^ª. Dr^ª. Elizabete Brasil dos Santos, do Laboratório de Microbiologia Clínica – UEPG, pela colaboração na realização das análises microbiológicas.

Ao Prof. Dr. Armino Antonio Alves, do Instituto de Biologia – UNICAMP-SP, pela colaboração em alguns ensaios de bioatividade efetuados.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub, do Laboratório de Biotecnologia – UEPG, que favoreceu a utilização do espectrofotômetro nas leituras das amostras.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica – UFPR, do qual resultaram dados para as análises em MEV.

Aos servidores e funcionários do CIPP e da UEPG.

Aos ex-professores da graduação em Farmácia, pelas sugestões ao trabalho e pelo carinho demonstrado.

Aos colegas de mestrado cuja amizade que se formou permitiu a conquista desta vitória.

Aos amigos e familiares pelo apoio e incentivo no decorrer desta caminhada.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

E acima de tudo agradeço a Deus que me concedeu capacidade física, emocional e intelectual para realizar este trabalho, além de iluminar meu caminho em todos os momentos.

“Concordo que talvez não haja maior alegria na vida do que encontrarmos meios para vencer nossas fraquezas. Nós todos conhecemos a embriaguez da vitória e a agonia da derrota. Encontramos um pouco de loucura e alguma crença em nós mesmos, podemos dar grandes passos na direção da conquista de nossos objetivos. O maior fracasso é não tentar. Muitos com certeza desistiram quando, com um pouco mais de persistência, teriam chegado lá. Quase sempre, quando tudo parece perdido, quando tudo indica fracasso, nesse momento abre-se o caminho.”

(Leo Buscaglia)

RESUMO

Os metabólitos secundários presentes em extratos de folhas, cascas do caule e lenho de *Baccharis semiserrata* DC. (Asteraceae) obtidos em aparelho Soxhlet com a seqüência de solventes clorofórmio, acetato de etila e metanol, foram investigados usando técnicas de CCD e UV. As análises indicaram que os compostos fenólicos presentes nos extratos orgânicos são principalmente ácidos arilpropenóicos ou derivados, que se concentram no extrato acetato de etila das folhas. O óleo essencial das folhas obtido por arraste de vapor foi analisado por CG-EM e apresentou espatulenol 25,8%, δ -cadineno 16,7%, valenceno 14,9% e aromadendreno 13,8% como principais componentes. Os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas de espécimes feminino (0,13%) e masculino (0,45%) de *Baccharis semiserrata*, coletadas no Estado do Paraná - Brasil, foram analisados em detalhe por CG e CG-EM. Ambas as amostras têm baixo teor de monoterpenos e apresentam o sesquiterpeno espatulenol como principal componente, atingindo 50,75% no óleo do espécime masculino e 42,65% no do feminino. As atividades antimicrobianas dos extratos orgânicos foram avaliadas contra cepas das bactérias *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*, e da levedura *Candida albicans*, utilizando técnicas de difusão em meio sólido, com resultados apenas moderados. Os extratos de cascas mostraram, de maneira geral, maior atividade, especialmente o extrato metanólico contra *S. aureus*. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas do óleo essencial por diluição em caldo contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* e *C. albicans* (50 $\mu\text{L/mL}$). O extrato aquoso das folhas de *B. semiserrata* feminina apresentou saponinas e proteínas (4,963 mg/mL). A análise bioquímica da interação de eritrócitos humanos ABO⁺ com 1110 $\mu\text{g/mL}$ do extrato aquoso demonstrou um efeito lítico padrão de $\pm 80\%$, enquanto 550 $\mu\text{g/mL}$ gerou graus variados de hemólise. Para a tipagem O⁻ a lise atingiu apenas 35% em presença da maior concentração testada. Tais resultados sugerem fortemente o envolvimento das porções antigênicas do sistema ABO (monossacarídeos) e da proteína Rhesus (Rh⁺ e Rh⁻) nos efeitos observados. O extrato aquoso quando testado em presença de H₂O₂ e sorotipo A⁺, apresentou um pequeno efeito redutor sobre a hemoglobina liberada; para O⁻ nenhum efeito pode ser observado. Porém, o extrato aquoso mostrou uma capacidade seqüestradora de radicais DPPH a 100 μM bastante significativa: $1,5 \times 10^{-1}$ e $7,8 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$ do extrato reduziram 15% e 20% da amostra, respectivamente.

Palavras-chave: *Baccharis semiserrata*, óleo essencial, extratos, composição química, bioatividade.

ABSTRACT

The secondary metabolites found in leaves, stem bark and log extracts of *Baccharis semiserrata* DC. (Asteraceae) obtained in a Soxhlet apparatus with the sequence of solvents chloroform, ethyl acetate and methanol, were investigated using TLC and UV techniques. The analyses indicated that the phenolic compounds present in the organic extracts are mainly arylpropenoic acids or derivatives, that concentrate on the leaves ethyl acetate extract. The essential oil from the leaves obtained by steam distillation was GC-MS analyzed, and has spathulenol 25.8%, δ -cadinene 16.7%, valencene 14.9% and aromadendrene 13.8% as the main components. The essential oils obtained by hydrodistillation from leaves of the feminine (0.13%) and masculine (0.45%) specimens of *Baccharis semiserrata*, collected in the Paraná State - Brazil, were analyzed in detail by GC and GC-MS. Both samples have low monoterpene content and they present the sesquiterpene spathulenol as the main component, reaching 50.75% in the oil of the masculine specimen and 42.65% in the feminine one. The antimicrobial activities of the organic extracts were measured against strains of the bacteria *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus*, and of the microfungus *Candida albicans*, using diffusion techniques in solid mean, that resulted in moderate activity. The stem bark extracts usually were more active, especially the methanol extract against *S. aureus*. The minimum inhibitory concentrations of the essential oil were determined using the technique of dilution in broth, against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* (50 $\mu\text{g/mL}$). The aqueous extract from leaves of feminine *B. semiserrata* showed the presence of saponins and proteins (4.963 mg/mL). The biochemical analysis of the interaction of human erythrocytes ABO⁺ with 1110 $\mu\text{g/mL}$ of the aqueous extract demonstrated an effect lithic pattern of $\pm 80\%$, while 550 $\mu\text{g/mL}$ generated varied degrees of hemolysis. For the O⁻ blood type the break only reached 35% in presence of the largest tested concentration. Such results suggest strongly the involvement of the antigenic portions of the system ABO (monosaccharides) and of the Rhesus protein (Rh⁺ and Rh⁻) in the observed effects. The aqueous extract when tested in presence of H₂O₂ and the serotype A⁺, showed a small reducer effect upon the liberated hemoglobin; for O⁻ none effect could be observed. However, the scavenging capacity of the the aqueous extracts against DPPH radicals at 100 μM was enough significant: 1.5×10^{-1} and 7.8×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$ of the extract reduced 15% and 20% of the sample, respectively.

Keywords: *Baccharis semiserrata*, essential oil, extracts, chemical composition, bioactive.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Estrutura do artemillin C	16
Figura 2 –	Estruturas de compostos voláteis que aparecem no gênero <i>Baccharis</i>	17
Figura 3 –	Extração do óleo essencial por hidrodestilação	24
Figura 4 –	Extração do óleo essencial por arraste a vapor	25
Figura 5 –	Aparelho de Soxhlet utilizado para extração por seqüência de solventes com polaridade crescente	26
Figura 6 –	Cromatograma dos componentes do óleo essencial	29
Figura 7 –	Padrão de n-alcenos C ₁₀ -C ₂₅	29
Figura 8 –	Cromatograma dos componentes do óleo essencial (CG-DIC)	30
Figura 9 –	Difusão em disco	31
Figura 10 –	Obtenção do precipitado de hemácias	35
Figura 11 –	Fluxograma do estudo químico e da bioatividade de <i>Baccharis semiserrata</i>	39
Figura 12 –	Espectros UV do ácido caféico padrão (a) e do extrato AcOEt das folhas de <i>B. semiserrata</i> (b), utilizando em ambos MeOH como solvente	41
Figura 13 –	Estruturas dos principais componentes identificados no óleo essencial por arraste a vapor de <i>B. semiserrata</i>	45
Figura 14 –	CIM do óleo essencial extraído por arraste a vapor para os microrganismos testados <i>S. aureus</i> (a), <i>P. aeruginosa</i> (b) e <i>C. albicans</i> (c)	47
Figura 15 –	Estruturas de alguns principais componentes dos óleos essenciais das folhas de espécimes feminino e masculino de <i>B. semiserrata</i> , obtidos por hidrodestilação	49
Figura 16 –	Sistema ABO	52
Figura 17 –	Modelo da proteína Rhesus Rh positivo	53
Figura 18 –	Perfil da interação do extrato aquoso de <i>B. semiserrata</i> com tipagem A ⁺	54

Figura 19 –	Perfil da interação do extrato aquoso de <i>B. semiserrata</i> com tipagem B ⁺	55
Figura 20 –	Perfil da interação do extrato aquoso de <i>B. semiserrata</i> com tipagem O ⁺	56
Figura 21 –	Perfil da interação do extrato aquoso de <i>B. semiserrata</i> com tipagem O ⁻	57
Figura 22 –	Efeito do extrato aquoso de <i>B. semiserrata</i> em eritrócitos A ⁺ íntegros ...	58
Figura 23 –	Efeito do extrato aquoso de <i>B. semiserrata</i> em eritrócitos O ⁻ íntegros ...	59
Figura 24 –	Diferenças na morfologia das hemácias	60
Figura 25 –	Fotomicrografias de eritrócitos A ⁺ incubados com extrato aquoso de <i>B. semiserrata</i> em baixa concentração	61
Figura 26 –	Fotomicrografias de eritrócitos A ⁺ incubados com extrato aquoso de <i>B. semiserrata</i> em elevada concentração	62
Figura 27 –	Atividade do extrato aquoso de <i>B. semiserrata</i> em eritrócitos A ⁺ frente a H ₂ O ₂	64
Figura 28 –	Atividade do extrato aquoso de <i>B. semiserrata</i> em eritrócitos O ⁻ frente a H ₂ O ₂	65
Figura 29 –	Atividade do extrato aquoso de <i>B. semiserrata</i> em eritrócitos O ⁻ íntegros frente a H ₂ O ₂	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Freqüência relativa do sistema ABO em doadores de sangue*	20
Tabela 2 –	Rendimentos dos extratos orgânicos: distribuição dos metabólitos secundários na planta	40
Tabela 3 –	Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Baccharis semiserrata</i> (halo de inibição em mm)	43
Tabela 4 –	Componentes do óleo essencial das folhas obtido por arraste de vapor	44
Tabela 5 –	Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>B. semiserrata</i> obtido por arraste a vapor (halos de inibição em mm)	46
Tabela 6 –	Componentes dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas de <i>B. semiserrata</i> feminina (♀) e masculina (♂)	48
Tabela 7 –	Porcentagem de DPPH seqüestrado em presença do extrato aquoso liofilizado de <i>B. semiserrata</i>	66

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AcOEt – acetato de etila

BSA – soro albumina bovina

CCD – cromatografia em camada delgada

CG – cromatografia gasosa

CG-DIC – cromatografia gasosa com detector de ionização de chama

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CIM – concentração inibitória mínima

DMSO – dimetilsulfóxido

DPPH – 1,1-difenil-2-picrilidrazil

HM – hemólise mecânica

HT – hemólise total

IK – ndice de Kováts

MeOH – metanol

MEV – microscopia eletrônica de varredura

PBS – tampão fosfato salino

Rf – fator de retenção

rpm – rotações por minuto

UV – ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	21
2.1	Geral	21
2.2	Específicos	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1	Reagentes	22
3.2	Coleta e identificação botânica	22
3.3	Preparo dos materiais vegetais	22
3.4	Obtenção de amostras de óleo essencial	23
3.4.1	Amostras analíticas por hidrodestilação	23
3.4.2	Amostra preparativa por arraste a vapor	24
3.5	Obtenção de extratos orgânicos	25
3.6	Análises por cromatografia em camada delgada – CCD	26
3.7	Análises dos óleos essenciais por cromatografia gasosa – CG	27
3.8	Análise microbiológica do óleo essencial	30
3.8.1	Método de difusão em disco	30
3.8.2	Concentração inibitória mínima – CIM	31
3.9	Análise microbiológica dos extratos orgânicos	32
3.10	Análise bioquímica	33
3.10.1	Extratos aquosos de <i>B. semiserrata</i>	33
3.10.2	Detecção de saponinas	33
3.10.3	Dosagem de proteínas	34

3.10.4	Obtenção do precipitado de hemácias	34
3.10.5	Perfil hemolítico	35
3.10.6	Ensaio em MEV	36
3.10.7	Bioatividade frente a H ₂ O ₂	36
3.10.8	Atividade frente a DPPH	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	Análise química dos extratos	40
4.2	Atividade microbiológica dos extratos	42
4.3	Análise do óleo essencial obtido por arraste a vapor	43
4.4	Atividade microbiológica do óleo essencial de <i>B. semiserrata</i>	46
4.5	Amostras analíticas de óleos essenciais de <i>B. semiserrata</i>	47
4.6	Análises bioquímicas	50
4.6.1	Detecção de saponinas	50
4.6.2	Dosagem de proteínas	51
4.6.3	Perfil hemolítico	51
4.6.4	Ensaio em MEV	59
4.6.5	Bioatividade frente a H ₂ O ₂	63
4.6.6	Atividade frente a DPPH	66
5	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO - Lista de comunicações em congressos	77

1 INTRODUÇÃO

Uma revisão recente sobre aspectos químicos, econômicos e biológicos do gênero *Baccharis* destacou a presença de flavonóides e terpenóides como substâncias responsáveis por diversas atividades biológicas, muitas vezes relacionadas a usos tradicionais (VERDI *et al.*, 2005). O gênero *Baccharis* apresenta mais de 500 espécies encontradas principalmente na América do Sul e na América Central. Cerca de 120 espécies do gênero estão descritas para o Brasil, em sua maior parte encontradas nas regiões sul e sudeste. Muitas espécies *Baccharis* são arbustos dióicos com altura variando entre 0,5 e 4,0 m, sendo algumas delas utilizadas na medicina popular para controle ou tratamento de problemas de estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças da próstata e desintoxicação do organismo (MOREIRA *et al.*, 2003).

Estudos demonstraram que os perfis químicos e microbiológicos da chamada "própolis verde" e da *B. dracunculifolia* têm franca correlação. Leitão e colaboradores (2004) demonstraram que tanto os extratos dos brotos de *B. dracunculifolia* como os extratos da própolis produzida pela *Apis mellifera*, apresentam efeitos inibitórios similares sobre os fatores cariogênicos de *Streptococcus mutans*. Park e colaboradores (2004), analisaram o extrato dos brotos mais tenros da planta por HPLC e compararam com o extrato da própolis, observando em ambos a ocorrência dos mesmos flavonóides e ácidos arilpropenóicos como o artepillin C, em porcentagens bem elevadas. A descoberta do artepillin C como responsável por importantes propriedades biológicas da própolis brasileira (AGA *et al.*, 1994), resultou nas várias aplicações patenteadas para produtos farmacêuticos, veterinários, dermatológicos, cosméticos e alimentares (SATO *et al.*, 2005; TAZAWA *et al.*, 2004), de forma que a pesquisa fitoquímica de espécies do gênero *Baccharis* é plenamente justificada pela possibilidade de encontrar novas fontes vegetais de substâncias dessa classe. Os ácidos 3-prenil-p-cumárico e 3,5-diprenil-p-cumárico (artepillin C) (Figura 1) encontrados em *B.*

grisebachii, foram identificados como responsáveis por parte das atividades desta espécie vegetal contra fungos que causam infecções cutâneas, validando um uso tradicional (FERESIN *et al.*, 2003).

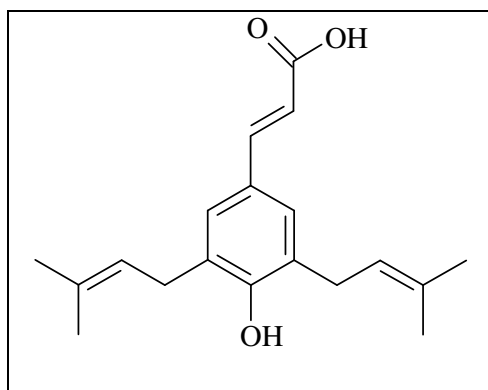


Figura 1 – Estrutura do artepillin C

No gênero *Baccharis* é alta a ocorrência de flavonóides e terpenos, substâncias estas que exercem atividades biológicas relevantes como por exemplo efeitos antioxidantes. O emprego de flavonóides em terapêutica é vasto e ainda empírico, uma vez que a prática de uso é mais antiga que o desenvolvimento de análises farmacológicas. Embora apenas alguns terpenos apresentem ação redutora significativa, são considerados compostos importantes por representarem um grande número de constituintes ativos, sendo subdivididos em várias subclasses, como monoterpenos (10 unidades de carbono), sesquiterpenos (15 unidades de carbono), diterpenos (20 unidades de carbono) e triterpenos (30 unidades de carbono) (SIMÕES *et al.*, 2000).

Os óleos essenciais de espécies do gênero *Baccharis* são constituídos por monoterpenos e sesquiterpenos e apresentam atividades antimicrobianas moderadas, como é o caso da essência de *B. notoserghila*, que tem α -pineno, limoneno, β -cariofileno e espatulenol como constituintes principais (Figura 2) (COBOS *et al.*, 2001). No levantamento bibliográfico foram encontradas 25 espécies deste gênero que tiveram a composição de seus óleos

essenciais estudados por CG-EM, muitas vezes à procura de novas fontes de produtos químicos voláteis (ISI, 2006). Duas amostras de *B. semiserrata* coletadas no estado de Rio Grande do Sul, em locais e épocas diferentes, produziram óleos essenciais com baixos rendimentos (~0,1%) e com grandes diferenças nas composições, tendo espatulenol como principal constituinte em proporções de 15,5 e 25,5% e, teores de monoterpenos de 14,5 e 35,6% (AGOSTINI *et al.*, 2005). Orsini e colaboradores (1993) isolaram o espatulenol de *Baccharis semiserrata* e fizeram estudos de modelagem molecular.

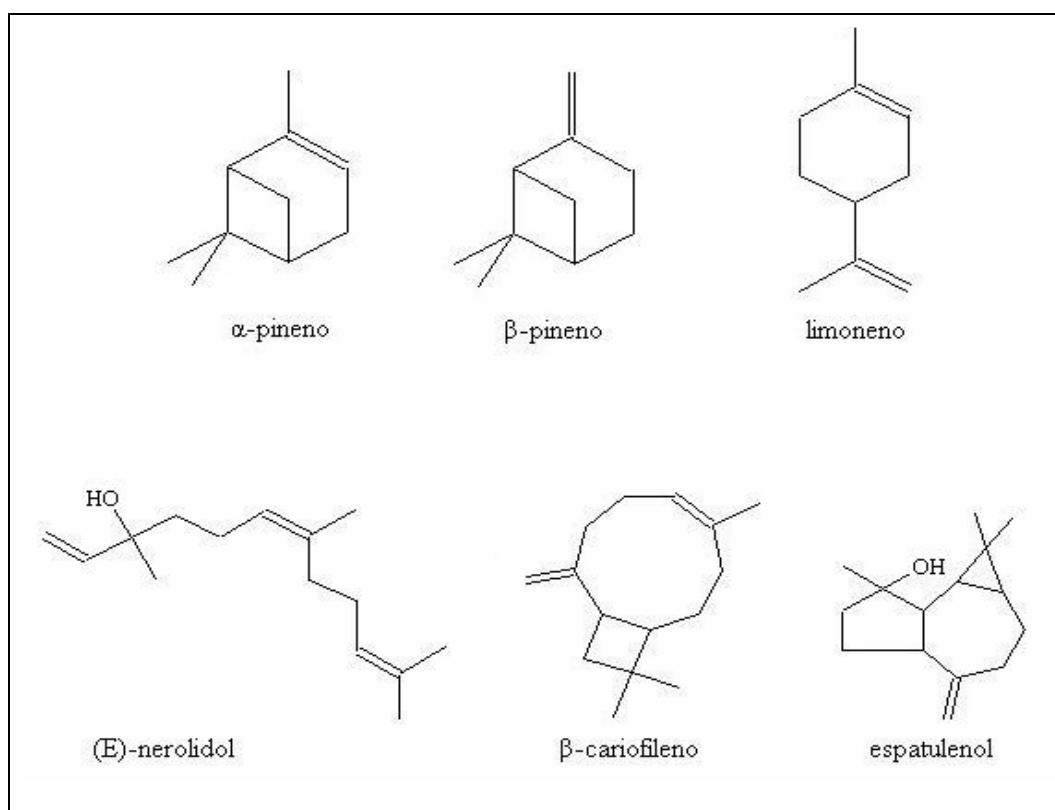


Figura 2 – Estruturas de compostos voláteis que aparecem no gênero *Baccharis*

Na análise sistemática de óleos essenciais de espécies *Baccharis* brasileiras, Ferracini e colaboradores (1995) compararam os óleos essenciais de espécimes masculinos e femininos, observando grandes variações entre componentes principais, como em *B. dracunculifolia* (feminino/masculino): (E)-nerolidol (20,80% / 12,02%) e em *B. erioclada*

(feminino/masculino): β -pineno (21,44% / 1,16%), limoneno (15,16% / 2,68%), β -cariofileno (4,21% / 10,70%) e espatulenol (6,61% / 12,57%) (Figura 2).

Diversas outras classes de metabólitos secundários podem estar envolvidas com atividades biológicas, entre elas as lectinas-glicoproteínas que apresentam diferentes especificidades por oligo ou monossacarídeos, podendo causar aglutinação celular ou mesmo precipitação de glicoconjugados ou polissacarídeos (RÜDIGER, 1998). Ou ainda as saponinas, que em solução aquosa formam espuma persistente e abundante, proveniente como nos demais detergentes, do fato de apresentarem uma porção lipofílica, denominada aglicona, e uma parte hidrofílica, constituída por um ou mais açúcares. Podem apresentar diferentes grupos ligados à aglicona: um núcleo esteroidal (saponinas esteroidais) ou um núcleo triterpênico (saponinas triterpênicas). O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídeos de membrana determinam um número variado de propriedades biológicas, entre elas a ação sobre membranas celulares, alterando a sua permeabilidade ou causando sua destruição (ATAMANOVA *et al.*, 2005; HAMERSKI *et al.*, 2005; SCHENKEL *et al.*, 2000).

Não há relato de uso de *B. semiserrata* na medicina popular brasileira, espécie classificada botanicamente na seção Nitidae e série Lanuginosae do gênero *Baccharis* (GIULIANO, 2005), sendo conhecida pelo nome de “tupixaba” ou “vassoura-do-campo” no sudeste e sul do Brasil. A floração já foi observada no período entre abril e outubro, com a presença de vários insetos, como as abelhas *Apis mellifera* que a visitam para coletar pólen e néctar (PIRANI; CORTOPASSI-LAURINO, 1994). Assim, *B. semiserrata* apresenta-se como um foco promissor para estudo, podendo ser considerada uma fonte natural alternativa à biossíntese da própolis, justificando o isolamento de metabólitos secundários e a detecção de algumas bioatividades.

Tais especificidades, entre tantas outras, devem ser consideradas quando produtos naturais são ensaiados em modelos biológicos, e eritrócitos constituem um modelo clássico e exaustivamente estudado, sobre o qual podem ser inferidas diversas correlações entre estrutura e função (YULDASHEVA *et al.*, 2005; ZIEGLER *et al.*, 2004; HEMKER *et al.*, 2003; VERMEHREN, HANSEN, 1998; SCHEMELLER *et al.*, 1997).

O eritrócito humano, célula vermelha do sangue, é uma célula anucleada de forma discóide bicôncava que contém hemoglobina em concentração elevada, cerca de 5mM / célula. Para cumprir a função de transportar a hemoglobina e levar oxigênio a todas as células, o eritrócito percorre todos os vasos sanguíneos do organismo aproximadamente 500.000 vezes, durante sua vida média de 120 dias (BULL *et al.*, 1990) e é capaz de transpor capilares e sinusóides de diâmetros de 3 a 4 μm , que correspondem à metade de seu próprio diâmetro, de 7 a 9 μm (BULL *et al.*, 1990; SCHERIER, 1985;). Tais fenômenos só são possíveis graças à extrema resistência e deformabilidade da membrana do eritrócito (LUX, 1988).

A membrana eritrocitária, devido à sua facilidade de obtenção e isolamento, tem sido extensivamente estudada e constitui, portanto, um ótimo modelo para o estudo de membranas mais complexas e de outros tipos de células (LAURIALT; OBRIEN, 1991).

O sangue apresenta diferenças na composição química que ultrapassam o trivial, uma vez que são considerados mais de 200 antígenos, sendo o sistema ABO apenas o mais conhecido entre os 19 já caracterizados (LEE *et al.*, 1998) e o mais importante na medicina clínica transfusional (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003). Essa diferença na composição química da superfície das células vermelhas sanguíneas é extremamente significativa se considerada sua frequência nas diferentes populações, conforme Tabela 1.

O sistema Rhesus (Fator Rh) é um grupo sanguíneo altamente imunogênico e polimórfico com mais de 45 antígenos definidos sorologicamente. Antígenos Rh podem apresentar um papel fisiológico na manutenção da estabilidade da membrana celular, na

regulação da morfologia e fisiologia dos eritrócitos (VAN KIM *et al.*, 2006; CONROY *et al.*, 2005).

Tabela 1 – Frequência relativa do sistema ABO em doadores de sangue*

População	% do total
O	49,23
A	33,71
B	13,39
AB	3,13

*Fundação Pró-Sangue- Hemocentro de São Paulo
Fonte: Adaptado de Batissoco e Novaretti (2003)

A avaliação das atividades biológicas de compostos químicos ou extratos obtidos de produtos naturais requer muitos ensaios *in vivo* e *in vitro*, sendo seus resultados complementares para elaboração de um perfil químico-biológico para possíveis aplicações terapêuticas. Dessa maneira, este projeto optou por eritrócitos humanos como modelo biológico, para iniciar a análise de atividades de extratos aquosos de *B. semiserrata*, tais como ação lítica/protetora e antioxidante, interação com hemoglobina isolada, entre outros. O presente estudo de *Baccharis semiserrata* DC. faz parte do programa de pesquisa química e biológica sobre os metabólitos secundários de espécies vegetais, além de analisar a composição química dos óleos essenciais provenientes das folhas de espécimes feminino e masculino coletadas no segundo planalto do Paraná. Os resultados irão contribuir para a formação de um banco de dados químicos e de bioatividades de *B. semiserrata*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a composição química e avaliar bioatividades do óleo essencial e de extratos das folhas, cascas e lenho de *Baccharis semiserrata* DC.

2.2 Específicos

- obter o óleo essencial das folhas para a execução de testes químicos e de bioatividade;
- determinar a composição dos óleos essenciais de espécimes feminino e masculino de *B. semiserrata* através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM);
- obter extratos de folhas, cascas e lenho utilizando uma seqüência de três solventes com polaridade crescente;
- identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos das folhas, cascas e lenho por meio de análises cromatográficas (CCD) e espectrométricas (UV);
- avaliar propriedades microbiológicas do óleo essencial e dos extratos das folhas, cascas e lenho;
- realizar análises bioquímicas com o extrato aquoso das folhas, que consistirão em detecção de saponinas, dosagem de proteínas, perfil hemolítico e atividade antioxidante;
- correlacionar resultados de composição química e bioatividade;
- iniciar um banco de dados químicos e de bioatividades de *B. semiserrata*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Para as avaliações químicas foram utilizados solventes e reagentes com especificação PA, sem tratamentos prévios. Para as análises microbiológicas e bioquímicas foram utilizados 1,1-difenil-2-picrilidrazil - DPPH (D9132-5G, Sigma Co), soro albumina bovina - BSA, Ágar Mueller-Hinton (M173, Himedia), cloranfenicol 30 µg (Cecon) e nistatina 100 U.I. (1283, Cecon).

3.2 Coleta e identificação botânica

Em agosto de 2005 foram coletados cerca de 6 kg de material vegetal bruto de um espécime de *Baccharis semiserrata* DC. localizado na rodovia Ponta Grossa – Itaiacoca. Foi preparada uma exsicata botânica deste espécime feminino, utilizando um ramo contendo folhas e flores, seguindo indicações da literatura (FIDALGO; BONONI, 1989), e a amostra foi depositada no Herbário da UEPG (HUPG) sob o número 13104.

Em fevereiro de 2006, aproximadamente 2 kg de material vegetal contendo folhas de um espécime masculino foi coletado na área urbana de Ponta Grossa - PR. Uma exsicata também foi preparada e o espécime masculino foi depositado no herbário HUPG sob o número de registro 13578. Ambas exsicatas foram identificadas como espécimes masculino e feminino, respectivamente, pela Prof^a. Dr^a. Rosângela Capuano Tardivo do Departamento de Biologia Geral da UEPG.

3.3 Preparo dos materiais vegetais

Folhas, cascas e lenho de *B. semiserrata* foram secos à temperatura ambiente por um período de 7 dias, selecionados visualmente e separados. Foram excluídas partes contendo partículas de sujeira agregada ou atacadas por insetos ou microrganismos. Os materiais

vegetais secos foram fragmentados com o auxílio de um triturador e armazenados em recipientes herméticos, acondicionados à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até o momento de sua utilização.

3.4 Obtenção de amostras de óleo essencial

Foram utilizados dois métodos de extração de óleo essencial: hidrodestilação para amostras analíticas e destilação por arraste a vapor de água para um maior rendimento do óleo (amostra preparativa).

3.4.1 Amostras analíticas por hidrodestilação

Os óleos essenciais de espécimes feminino e masculino de *B. semiserrata* foram obtidos das folhas por hidrodestilação em aparelho de vidro Pyrex (STAHL; SCHILD, 1981), conforme mostra Figura 3, utilizando cerca de 80 g de cada material seco e fragmentado em 800 mL de água destilada, por um período de 4 horas e 30 minutos. Os óleos foram separados com éter etílico, sendo a fase orgânica seca com Na₂SO₄ anidro, e o restante filtrado e evaporado à baixa temperatura em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Os óleos essenciais foram posteriormente analisados e comparados CG e CG-EM.



Figura 3 – Extração do óleo essencial por hidrodestilação

3.4.2 Amostra preparativa por arraste a vapor

O óleo essencial das folhas do espécime feminino de *B. semiserrata* foi obtido de 1,4 kg do material vegetal seco, por destilação por arraste de vapor d'água em um período de 3 horas. A destilação foi realizada em equipamento, com peças de alumínio e vidro, confeccionado no Laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Naturais – UEPG, em um projeto piloto conforme mostra a Figura 4. O primeiro recipiente de alumínio que se encontra em cima de um suporte de apoio, foi preenchido com H₂O destilada, enquanto que no segundo foi colocado o material vegetal, através do aquecimento da H₂O o vapor irá extrair o óleo essencial do vegetal por arraste. O óleo essencial obtido após a separação da fase aquosa com éter etílico, foi seco com Na₂SO₄ anidro e concentrado em evaporador rotativo. Com um rendimento total de 5,06 g (0,36% p/p), este óleo essencial de coloração amarela e odor característico foi utilizado para testes biológicos e analisado por CG e CG-EM.



Figura 4 – Extração do óleo essencial por arraste a vapor

3.5 Obtenção de extratos orgânicos

Aproximadamente 20 g de cada material vegetal de folhas, cascas e lenho do espécime feminino, após secagem e trituração, foram extraídos exaustivamente em aparelho Soxhlet (Figura 5) por 20 a 40 horas, utilizando uma seqüência de solventes de polaridade crescente: clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), totalizando nove extratos (COLLINS *et al.*, 1997). Na etapa final, os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a vácuo, sendo registrados os rendimentos percentuais. Foram efetuados os espectros de ultravioleta (UV) dos extratos obtidos com AcOEt e MeOH de folhas, cascas e lenho, usando como solvente o MeOH.



Figura 5 – Aparelho de Soxhlet utilizado para extração por seqüência de solventes com polaridade crescente

3.6 Análises por cromatografia em camada delgada - CCD

O óleo essencial e os extratos de folhas, cascas e lenho obtidos com solventes orgânicos tiveram seu perfil cromatográfico determinado por CCD para identificar a presença das principais classes de metabólitos secundários, que foram analisados utilizando placas de sílica HF₂₅₄ Merck (0,2 mm de espessura) e diversos eluentes. Após o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas foram secas, visualizadas em luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 e 360 nm e reveladas com reagentes específicos para diversas classes de compostos.

Os extratos obtidos foram eluídos com dois diferentes sistemas: CHCl₃ / MeOH (9:1) ou AcOEt / HCOOH / H₂O (10:0,2:0,27). Após a obtenção dos cromatogramas, as manchas foram visualizadas por fluorescência em luz UV em 254 e 360 nm e, em seguida, como revelador cromatográfico foi usado FeCl₃ (5% em MeOH) para compostos fenólicos e H₂SO₄

/ MeOH (1:1) seguido de aquecimento a 100°C para revelar substâncias orgânicas em geral. As manchas foram identificadas através de comparação de seus fatores de retenção (Rfs) com aqueles obtidos para as substâncias padrão. Os extratos orgânicos CHCl₃, AcOEt e MeOH foram diluídos em seus respectivos solventes até uma concentração de 5,0 mg/mL, sendo aplicados à placa 15 µL.

No extrato AcOEt das folhas de *B. semiserrata* feminina foi observado um precipitado cristalino formado na redissolução, que foi separado por decantação (~30 mg), analisado por CCD para detectar presença de aminoácidos. Como eluentes foram usados n-butanol / acetona / ácido acético / H₂O (35:35:10:20) ou o sistema AcOEt / MeOH / H₂O (6:3:1). Ninhidrina foi o reagente utilizado para revelar aminoácidos e aminas, com a identificação de cores violeta-vermelho e vermelho-marrom (WAGNER *et al.*, 1983). Os padrões de aminoácidos testados foram os seguintes: L-cisteína, L-arginina, L-leucina, L-asparagina, L-alanina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-glutamina e L-prolina. Para observar a presença de açúcares, as amostras foram submetidas às mesmas condições citadas acima, sendo os padrões utilizados L-sorbose, D-glucose, D-frutose, L-arabinose, L-ramnose.

3.7 Análises dos óleos essenciais por cromatografia gasosa - CG

Para a determinação qualitativa e quantitativa dos componentes químicos foram utilizados dados obtidos em colaboração com o Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau, IPT-FURB, Blumenau – SC.

Os componentes dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e arraste a vapor foram analisados por CG e CG-EM em um Cromatógrafo Gasoso Varian[®] CP-3800 acoplado ao detector de ionização de chama ou ao Espectrômetro de Massas Saturn[®] 2000, utilizando o software de gerenciamento Saturn[®] GC-MS Workstation 5.51. Tanto na análise por CG com Detector de Ionização de Chama (CG-DIC) como na CG-EM, foi utilizada uma coluna apolar

CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS (30 m x 0,25 mm) e filme com espessura de 0,25 µm. O fluxo do gás de arraste foi de 1,0 mL/min, a temperatura do injetor foi mantida em 250°C e a do detector a 200°C. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 60°C, permanecendo aí por 3 min, subindo 5°C/min até 220°C e permanecendo na temperatura final por 15 min.

A identificação dos compostos individuais foi realizada inicialmente pelo cálculo do Índice de Kováts (IK) de cada componente, através da comparação do tempo de retenção da amostra (Figura 6) em relação a padrões de n-alcenos (Figura 7), o que pode ser chamado de Índice de Retenção, proposto por Kováts em 1958 como um parâmetro para identificação de solutos em cromatogramas (SKOOG, 2002). O IK relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos. Tais índices permitem uma comparação melhor dos dados sendo calculados pela fórmula abaixo (CAZES; DEKKER, 2004).

Fórmula para o cálculo dos Índices de Kováts

$$KI_x = 100y + 100(z-y) \frac{t(r)_x - t(r)_y}{t(r)_z - t(r)_y}$$

Onde:

y = nº de carbonos do padrão à esquerda;

z = nº de carbonos do padrão à direita;

t(r)_x = tempo de retenção do composto considerado;

t(r)_y = tempo de retenção do padrão à esquerda;

t(r)_z = tempo de retenção do padrão à direita.

A seguir, os espectros de massas de cada componente foram comparados com os fornecidos pelo banco de dados do sistema. Para a quantificação dos compostos foram

utilizados as percentagens do detector DIC, comparando-se os IK inicialmente calculados, com os obtidos com os dados fornecidos pelo detector (Figura 8).

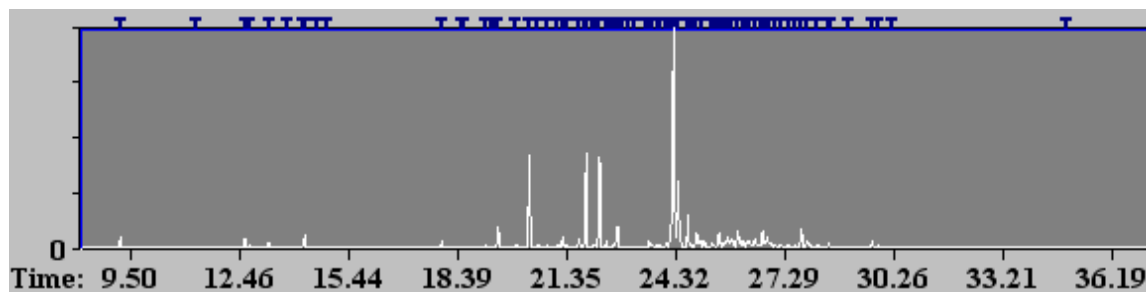


Figura 6 – Cromatograma dos componentes do óleo essencial

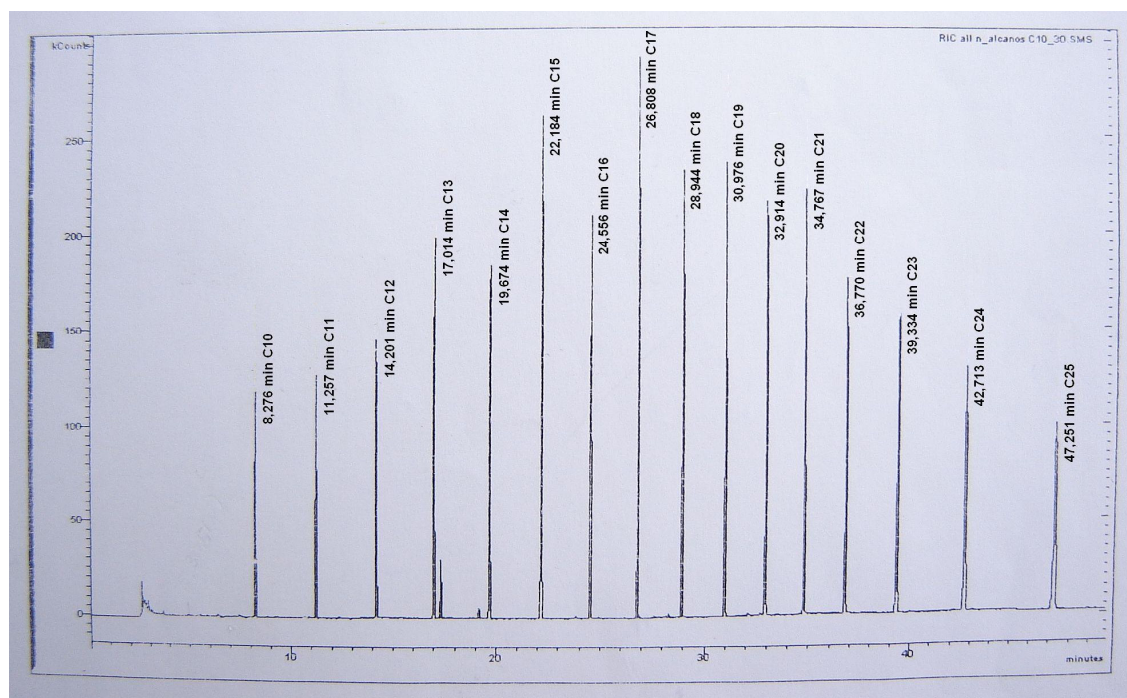


Figura 7 – Padrão de n-alcenos C₁₀ – C₂₅

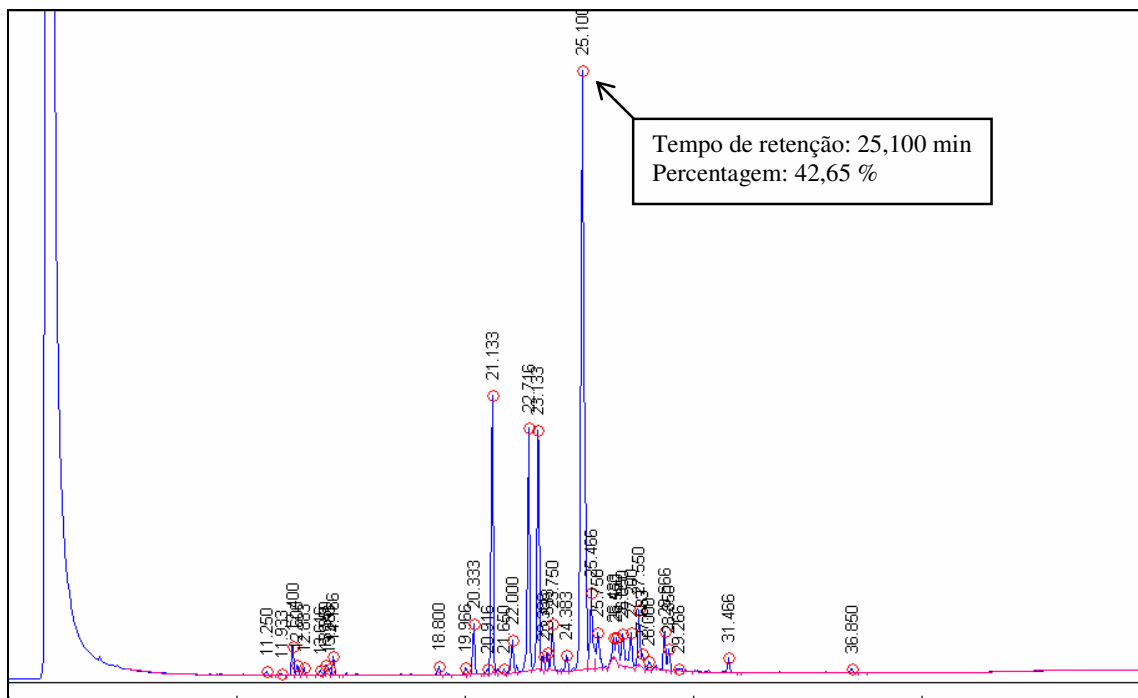


Figura 8 – Cromatograma dos componentes do óleo essencial (CG-DIC)

3.8 Análise microbiológica do óleo essencial

As análises microbiológicas do óleo essencial obtido por arraste a vapor do espécime feminino, foram realizadas sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Brasil dos Santos, no Laboratório de Microbiologia Clínica - UEPG. A avaliação da atividade antimicrobiana utilizou várias cepas de bactérias e leveduras envolvidas em patologias humanas.

3.8.1 Método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi avaliada pelo método de difusão em disco (KONEMAN *et al.*, 2001; RIOS *et al.*, 1988). As suspensões bacterianas de *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922, bem como *Bacillus cereus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans* (levedura) isolados da clínica foram preparadas e padronizadas em suspensões de 10^8 células/mL.

Alíquotas de 0,1 mL foram semeadas em triplicata, em placas contendo ágar Mueller-Hinton, sendo as placas incubadas a 37°C por 10 min para secagem. O óleo essencial foi suspenso em Tween-80 na proporção 6:4, sendo os discos de papel de filtro com 6 mm de diâmetro esterilizados e impregnados com 2 µL da suspensão acima e colocados sobre o material semeado. Como controle positivo foram usados discos de cloranfenicol (30 µg) e nistatina 100 UI para leveduras e, como controle negativo, disco estéril impregnado com Tween-80. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas, sendo realizadas as medidas (em mm) dos halos de inibição do crescimento microbiano formados ao redor do disco, conforme ilustra a Figura 9.

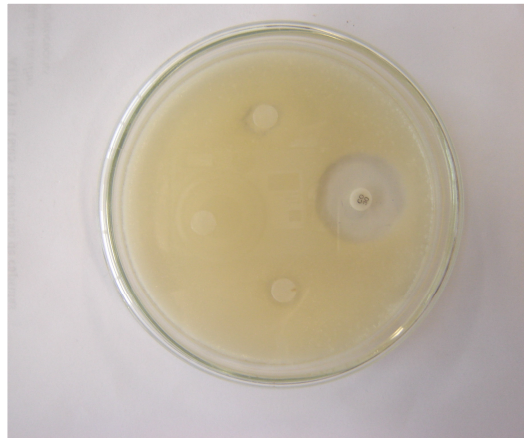


Figura 9 – Difusão em disco

3.8.2 Concentração inibitória mínima - CIM

A CIM do óleo essencial foi determinada pelo ensaio de diluição em caldo, seguindo metodologia descrita por Koneman e colaboradores (2001) e Rios e colaboradores (1988), com experimentos feitos em triplicata. O óleo essencial foi suspenso em Tween-80 para obtenção de uma suspensão estoque, a qual foi transferida para o primeiro tubo, e diluições seriadas foram preparadas em 5 tubos com as concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12

$\mu\text{L/mL}$ diluídas em caldo de Mueller-Hinton. Cloranfenicol e nistatina foram novamente utilizados como controles positivos e Tween-80 como controle negativo. Após incubação a 35°C durante 18 horas os tubos foram examinados visualmente para verificar a ocorrência de turvação.

3.9 Análise microbiológica dos extratos orgânicos

Os ensaios microbiológicos com os extratos CHCl_3 , AcOEt, MeOH das folhas, cascas e lenho do espécime feminino de *B. semiserrata* foram efetuados no Laboratório de Microbiologia Clínica – UEPG. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em meio sólido por cavidade/placa (CLEELAND, SQUIRES, 1991; RIOS *et al.*, 1988), utilizando as mesmas cepas microbianas citadas anteriormente. Cada suspensão foi previamente preparada em soro fisiológico, padronizado pelo tubo 0,5 da escala McFarland, correspondendo a aproximadamente 10^8 células/mL. A semeadura foi feita em placas de Petri contendo o meio ágar Mueller-Hinton, com 0,1 mL das suspensões microbianas, incubadas a 37°C por 10 minutos para secagem. Foram feitas cavidades com 7 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade nas placas, as quais foram preenchidas com 40 μL de solução contendo 1 mg de cada extrato dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Foram utilizados como controles positivos cloranfenicol para as bactérias e nistatina para leveduras, e DMSO como controle negativo. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata, sendo a média (em mm) das leituras consideradas como resultado final, sendo realizado da mesma maneira que o método de difusão em disco as medidas em mm dos halos de inibição do crescimento microbiano, formados ao redor de cada cavidade.

3.10 Análise bioquímica

Os métodos bioquímicos foram ensaiados com extrato aquoso padronizado das folhas de *B. semiserrata* feminina e também extrato aquoso liofilizado.

3.10.1 Extratos aquosos de *B. semiserrata*

Os extratos aquosos foram obtidos a partir de 2 g das folhas secas e trituradas em um processador para aumentar a superfície de contato, sendo submetidas a dois diferentes processos:

- a) extração exaustiva com 300 mL de H₂O como solvente, realizada em aparelho Soxhlet, com extração contínua por 25 horas;
- b) do extrato acima obtido, 250 mL foram submetidos à liofilização, com um rendimento final de 453 mg (22,65% p/p), permitindo o cálculo da concentração do extrato aquoso utilizado nos testes bioquímicos.

Para os ensaios *in vitro*, os extratos foram utilizados indistintamente em concentrações que variaram de 22 a 1110 µg/mL, sendo que as mesmas foram selecionadas por não apresentarem espectro de absorção na região visível.

3.10.2 Detecção de saponinas

A detecção de saponinas foi realizada pelo teste de ação superficial com extrato aquoso obtido a partir do decocto do vegetal. Após agitação enérgica do extrato filtrado em tubo de ensaio, a formação de espuma que persiste com a adição de um ácido mineral diluído (no caso HCl) indica a presença de saponinas (SCHENKEL *et al.*, 2000).

3.10.3 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína total foi conduzida pelo método de Lowry (1951), com curva padrão de soro albumina bovina (BSA). O método de Lowry fundamenta a determinação quantitativa de proteínas pelo uso do reagente de Folin-Ciocalteu, que sofre redução na presença de proteínas em solução, gerando cromóforos azuis com absorção característica na faixa de 700-750 nm. Os principais cromóforos são as ligações peptídicas, resíduos aromáticos de aminoácidos Triptofano e Tirosina e as cadeias polares. Para este ensaio, o extrato aquoso liofilizado das folhas de *B. semiserrata* foi testado em diluições de 1000x, 500x e 250x.

3.10.4 Obtenção do precipitado de hemácias

Sangue controle de tipagens sanguíneas A⁺, B⁺, O⁺ e O⁻ foram obtidas do Banco de Sangue da Santa Casa de Misericórdia de Ponta Grossa. Os concentrados de hemácias foram lavados em PBS isotônico (tampão fosfato de potássio 5 mM, NaCl 154 mM, pH 7,4) submetidos a sucessivas centrifugações (Centrífuga HT Centribio, TDL 80-2B) a 700xg por 10 minutos até obtenção do sobrenadante límpido e precipitado contendo um hematócrito de 100% (Figura 10).

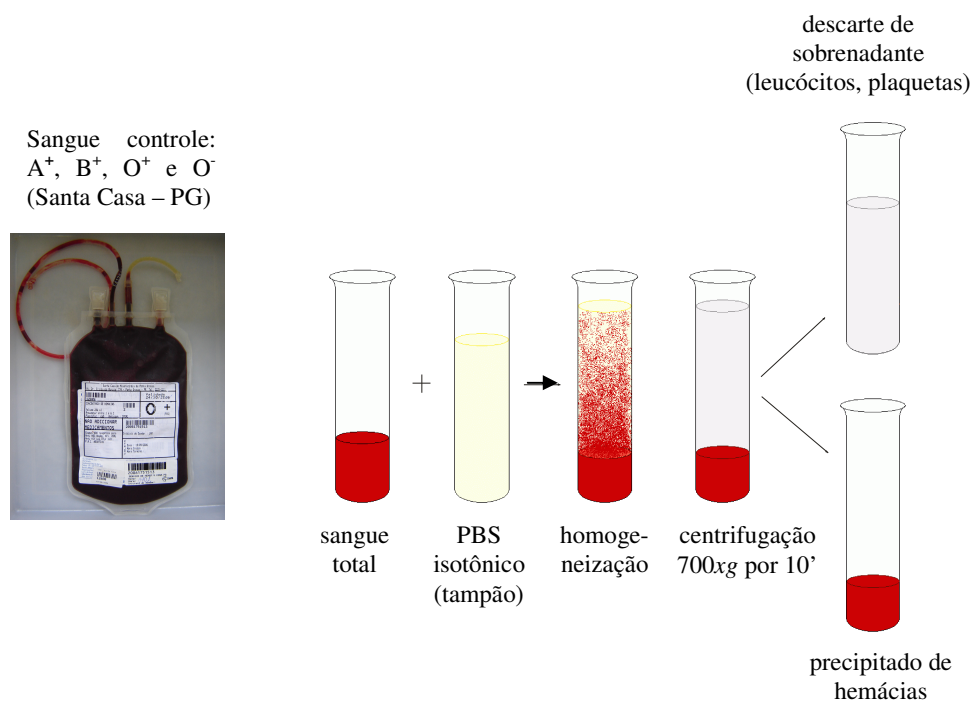


Figura 10 – Obtenção do precipitado de hemácias

3.10.5 Perfil hemolítico

As diversas concentrações do extrato aquoso foram incubadas com hematócrito 0,8% a 37°C por 45 minutos, sob constante agitação (150 rpm) (Incubator Shaker – New Brunswick Scientific – Modelo: Classic C 24). Após incubação as amostras foram novamente submetidas à centrifugação, sob as mesmas condições citadas anteriormente, para então serem conduzidas as leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV – 1650PC UV – visible spectrophotometer). Os ensaios foram conduzidos em PBS isotônico, tendo como controle hemólise total (HT) – solubilização de eritrócitos em água destilada, causando a ruptura total das células e a hemólise mecânica (HM) – hematócrito em tampão fisiológico, nesse caso, lise mínima. As medidas hemolíticas foram obtidas por espectrofotometria de absorção UV-Vis, em 540 nm para acompanhamento da hemoglobina liberada, ou seja, da ruptura parcial ou total da

membrana eritrocitária; enquanto a razão 630nm / 540 nm forneceu uma medida da oxidação parcial da hemoglobina (ANTONINI *et al.*, 1971).

O efeito hemolítico (% de Hemólise) pode ser acompanhado medindo a concentração de hemoglobina no sobrenadante de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{A_a - A_{HM}}{A_{HT} - A_{HM}}$$

Onde, A_a , A_{HM} e A_{HT} são respectivamente as absorvâncias da amostra, dos controle de HM e HT.

3.10.6 Ensaios em MEV

Foram retiradas alíquotas de 50 μL da maior e menor concentração ensaiada e também do controle (HM), foi realizado o esfregaço em lamínulas previamente esterilizadas, colocadas para secar, sendo fixadas e coradas pelo método de coloração de células May-Grünwald-Giemsa (MOURA, 1987). As lamínulas foram metalizadas com Au e submetidas à microscopia eletrônica de varredura – MEV (JEOL JSM-6360 LV SCANNING ELECTRON MICROSCOPE), sendo de 14.000x o aumento máximo e 20 kV a tensão máxima utilizada para estas análises.

3.10.7 Bioatividade frente a H_2O_2

Este método permite detectar a atividade redutora dos extratos frente a um agente oxidante, o H_2O_2 . Em uma primeira etapa, os ensaios foram preparados com alíquotas de 50 μL de hematócrito 0,8% em PBS isotônico, às quais foram adicionados 5 μL de azida, cuja função é inibir a catalase – uma das enzimas responsáveis pela degradação do H_2O_2 – sendo incubados à 37°C por 15 minutos, sob agitação (150 rpm). Na segunda etapa, foram

acrescentadas as diversas concentrações dos extratos aquosos e novamente incubados à mesma temperatura por 30 minutos, sob agitação. Finalmente, na terceira etapa foram colocados 5 μ L de H₂O₂ 240 mM como agente oxidante, retornando à incubação nas mesmas condições por 15 minutos. Após a última incubação, as amostras foram centrifugadas a 700xg por 10 minutos, sendo em seguida submetidas às leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV – 1650PC UV – visible spectrophotometer), tendo como controles: 1) HT, 2) HM, 3) PBS + azida + H₂O₂, 4) PBS + azida + hematócrito, 5) PBS + azida + H₂O₂ + hematócrito, 6) PBS + H₂O₂ + hematócrito, 7) PBS + azida + hematócrito + concentração do extrato aquoso mais elevada. As medidas da atividade antioxidante foram obtidas por espectro de absorção entre 220 e 700 nm, a razão dos valores em 540 e 630 nm considerada como indicativa de oxidação parcial da hemoglobina.

3.10.8 Atividade frente a DPPH

Esta análise foi efetuada em colaboração com o prof. Dr. Armindo Antonio Alves, do Instituto de Biologia, da UNICAMP-SP.

O seqüestro do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) tem sido bastante utilizado para avaliar o potencial redutor de extratos vegetais, alimentos, entre outros (BANERJEE *et al.*, 2005; TAPIA *et al.*, 2004; SCHMEDA-HIRSCHMANN *et al.*, 2003; BRACA *et al.*, 2001). Aqui, o extrato aquoso liofilizado de *B. semiserrata* foi utilizado para detectar a possível atividade redutora em presença do DPPH segundo o método descrito por Tapia *et al.* (2004). Foram testadas concentrações variando entre $1,92 \times 10^3$ μ g/mL e $7,8 \times 10^{-2}$ μ g/mL. O padrão de DPPH foi preparado em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, sendo o branco constituído de 0,5 mL de DPPH 500 μ M, 1,0 mL de acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 e 1,0 mL de etanol PA. A absorbância em 517 nm foi determinada em espectrofotômetro (GENESYS 10S SCANNING 10V) logo após a adição de alíquotas da solução estoque 50

mg/mL do extrato aquoso liofilizado de *B. semiserrata*. A porcentagem de atividade inibitória foi calculada a partir da fórmula:

$$[(A_o - A_e) / A_o] * 100$$

Onde, A_o = absorvância sem adição de extrato e A_e = absorvância com adição de extrato.

Na seqüência é apresentado um fluxograma da metodologia que ilustra o estudo químico, microbiológico e bioquímico desenvolvido para a espécie *B. semiserrata* feminina e masculina da região dos Campos Gerais (Figura 11).

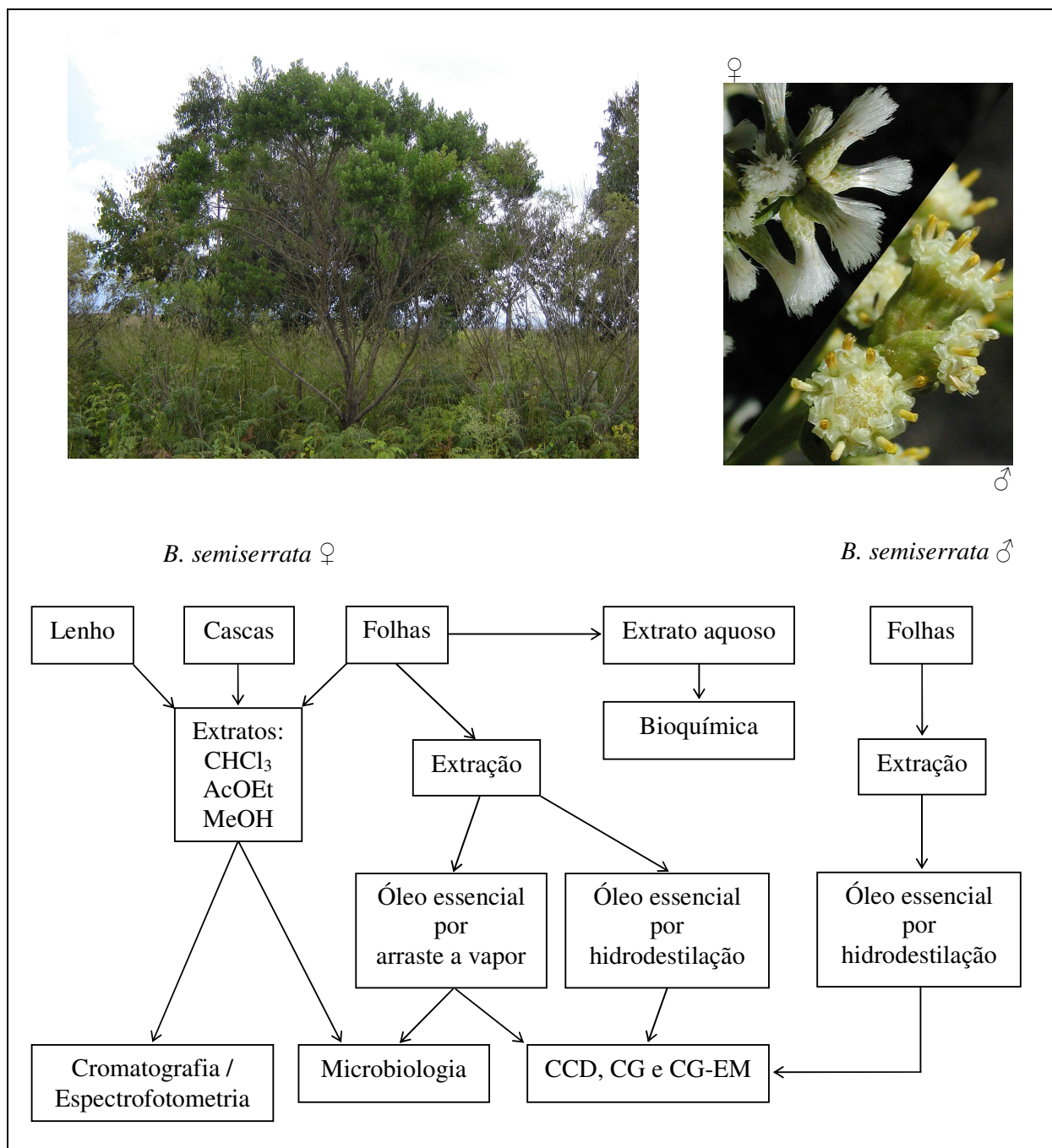


Figura 11 – Fluxograma do estudo químico e da bioatividade de *Baccharis semiserrata*

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise química dos extratos

Com o objetivo de traçar um perfil químico para a espécie vegetal *Baccharis semiserrata*, foram obtidos extratos de polaridades diferentes a partir das principais partes aéreas da planta: folhas, cascas e lenho, com os rendimentos mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Rendimentos dos extratos orgânicos: distribuição dos metabólitos secundários na planta

	extrato CHCl₃	extrato AcOEt	extrato MeOH
folha	5,77 %	8,13 %	10,38 %
casca	2,34 %	0,16 %	21,20 %
lenho	0,19 %	0,27 %	2,25 %

O lenho pode ser facilmente cortado enquanto está fresco, é branco, leve e seus três extratos da seqüência de solventes CHCl₃, AcOEt e MeOH renderam um total de apenas 2,7% em metabólitos secundários, polares em sua maior parte. Já quando considerado o total extraído pelos três solventes, tanto a partir das folhas como das cascas, os rendimentos totais atingiram em torno de 24%. Enquanto que os 24,28% extraídos das folhas se distribuem nos três extratos obtidos com solventes de polaridade crescente, os 23,7% extraídos das cascas são em sua maioria substâncias polares extraídas ao final da série pelo MeOH.

A avaliação cromatográfica do extrato CHCl₃ das folhas demonstrou a presença de compostos terpênicos, alguns destes também detectados no óleo essencial; no extrato MeOH do lenho foram detectados traços de compostos fenólicos. Quatro principais compostos fenólicos foram encontrados nos extratos de folhas, cascas e lenho obtidos com AcOEt,

enquanto que nos extratos MeOH foi observada a ocorrência apenas das duas substâncias fenólicas mais polares. Comparando todas as análises, foi possível detectar que o extrato obtido com AcOEt a partir das folhas concentra a maior parte dos compostos fenólicos da planta, além de apresentar um bom rendimento.

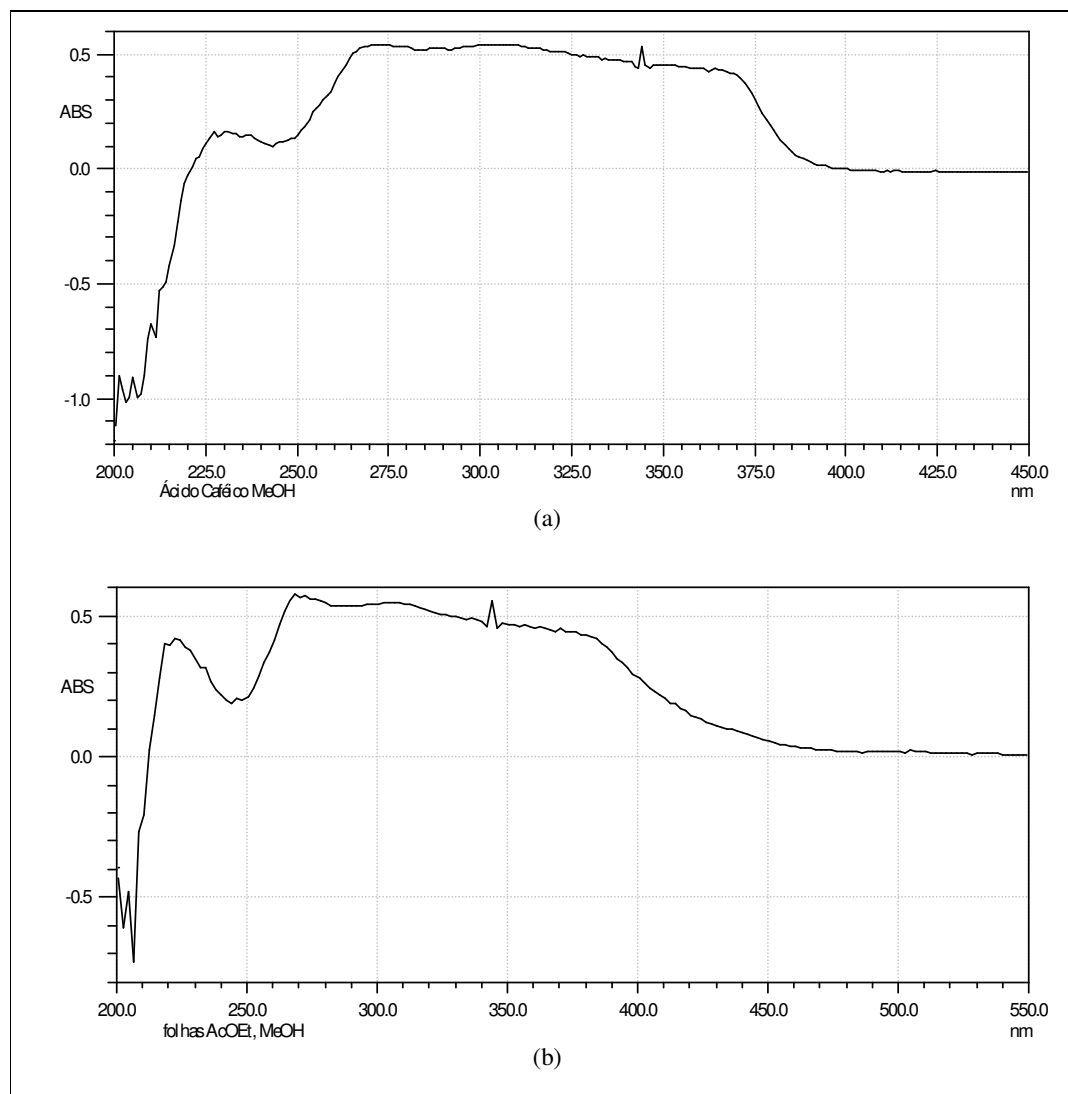


Figura 12 – Espectros UV do ácido caféico padrão (a) e do extrato AcOEt das folhas de *B. semiserrata* (b), utilizando em ambos MeOH como solvente

Os espectros de UV dos extratos obtidos de folhas, cascas e lenho usando AcOEt e MeOH apresentaram máximos de absorbâncias muito similares (λ_{max}): ~230 nm, ~270 nm, ~305 nm e ~370 nm. Foi observado também, que tais máximos de absorção correspondem aos

obtidos para substâncias contendo o cromóforo dos ácidos arilpropenóicos. A Figura 12 permite comparar o espectro de UV do extrato obtido com AcOEt a partir das folhas, com o do ácido caféico padrão, sugerindo que os cromóforos são os mesmos. Outros ácidos arilpropenóicos já encontrados em várias espécies do gênero *Baccharis* (*p*-cumárico, ferúlico e cinâmico) também apresentam espectros de UV similares a estes.

Os extratos foram também analisados por CCD, utilizando várias combinações de eluentes e fases estacionárias, em comparação com os padrões dos ácidos arilpropenóicos, não tendo sido possível identificá-los entre os componentes majoritários dos extratos.

No extrato AcOEt das folhas de *B. semiserrata* feminina foi observado um precipitado cristalino, que analisado por CCD para detectar presença de aminoácidos e açúcares, com ninhidrina para revelar padrões e amostras, não apresentou similaridade com os padrões.

4.2 Atividade microbiológica dos extratos

O método de difusão em meio sólido por cavidade/placa foi utilizado para avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos de folhas, cascas e lenho, cujos resultados são resumidos na Tabela 3.

Os extratos das folhas mostraram bastante especificidade em suas atividades: o extrato obtido com AcOEt inibiu o crescimento de *S. aureus* e *B. cereus*; o extrato MeOH, além de *S. aureus* e *B. cereus*, também foi ativo contra *E. coli*; e o extrato CHCl₃ das folhas foi ativo contra *B. cereus* e *E. coli*. Nenhum dos extratos de folhas mostrou atividade inibitória contra as cepas testadas de *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. saprophyticus*, *K. pneumoniae* ou *C. albicans*.

Todos os extratos da casca mostraram ação inibitória contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*. O resultado de maior valor no halo de inibição de crescimento bacteriano foi observado no extrato MeOH da casca frente ao *S. aureus*.

O extrato do lenho obtido com CHCl_3 foi efetivo contra as bactérias *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. cereus* e *K. pneumoniae* e também contra *C. albicans*. Já os extratos do lenho obtidos com AcOEt e MeOH foram ativos apenas para *K. pneumoniae* e *C. albicans*.

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana dos extratos de *Baccharis semiserrata* (halo de inibição em mm)

		Microrganismos testados*							
		<i>E.f.</i>	<i>S.a.</i>	<i>P.a.</i>	<i>B.c.</i>	<i>S.s.</i>	<i>E.c.</i>	<i>K.p.</i>	<i>C.a.</i>
Folha	Extrato CHCl_3	0	0	0	11,5	0	9	0	0
	Extrato AcOEt	0	13,5	0	12,5	0	0	0	0
	Extrato MeOH	0	13	0	11	0	11	0	0
	Controles	a b	20 -	18 -	27 -	26 -	18 -	25 -	16 -
Casca	Extrato CHCl_3	0	12	10,5	10	0	0	11,5	10,5
	Extrato AcOEt	0	15	10	9,5	0	0	11	10,5
	Extrato MeOH	0	20	10	9,5	0	0	10	10
	Controles	a b	17 -	21 -	17 -	25 -	17 -	25 -	22 -
Lenho	Extrato CHCl_3	11	11	0	12	0	0	10,5	12
	Extrato AcOEt	0	0	0	0	0	0	8,5	8
	Extrato MeOH	0	0	0	0	0	0	8	8
	Controles	a b	17 -	21 -	17 -	25 -	17 -	25 -	22 -

* *E.f.* = *Enterococcus faecalis*; *S.a.* = *Staphylococcus aureus*; *P.a.* = *Pseudomonas aeruginosa*; *B.c.* = *Bacillus cereus*; *S.s.* = *Staphylococcus saprophyticus*; *E.c.* = *Escherichia coli*; *K.p.* = *Klebsiella pneumoniae*; *C.a.* = *Candida albicans*;

^a Cloranfenicol 30 μg (controle positivo); ^b Nistatina 100 U.I. (controle positivo).

4.3 Análise do óleo essencial obtido por arraste a vapor

O óleo essencial de coloração amarela e odor característico obteve um rendimento total de 5,06 g (0,36% p/p).

A identificação dos componentes da amostra de óleo essencial, extraído por arraste a vapor, das folhas de *B. semiserrata* de espécime feminino apresentada na Tabela 4 foi realizada com base na comparação de seus Índices de Kováts (IK) com dados publicados (ADAMS, 1995) e, na comparação de seus espectros de massas com os fornecidos pela

biblioteca de espectros do sistema CG-EM. Os dados quantitativos apresentados na Tabela 4 provêm de análise feita com DIC.

Foram identificados 29 compostos no óleo essencial das folhas de *B. semiserrata* obtido por arraste de vapor, o que representa 91,4% da massa total. Destes, 89,57% são sesqui-

Tabela 4 – Componentes do óleo essencial das folhas obtido por arraste de vapor

Componentes	IK	%
limoneno	1031	0,19
linalool	1100	0,54
<i>trans</i> -pinocarveol	1145	0,56
<i>cis</i> -verbenol	1150	0,13
pinocarvona	1167	0,16
mirtenal	1200	0,22
α -cubebeno	1350	0,47
α -copaeno	1374	0,19
α -cedreno	1398	0,72
α -gurjuneno	1412	0,22
β -cariofileno	1426	2,71
aromadendreno	1444	13,80
α -humuleno	1462	0,19
γ -muuroleno	1477	1,75
germacreno D	1480	0,73
valenceno	1502	14,90
δ -cadineno	1523	16,72
cadina-1,4-dieno	1538	1,77
α -calacoreno	1548	3,67
elemol	1554	0,11
espatulenol	1587	25,81
cariofileno óxido	1591	0,19
α -muurolol	1649	2,05
α -cadinol	1664	1,57
α -santalol	1678	0,48
cedren-13-ol	1684	0,56
farnesol	1704	0,24
aristolona	1743	0,44
lanceol	1750	0,24
Total	-	91,40

terpenos e apenas 1,82% são monoterpenos. Os quatro principais componentes identificados ultrapassam os 71% da massa do óleo: espatulenol 25,8%, δ -cadineno 16,7%, valenceno 14,9% e aromadendreno 13,8% (Figura 13). Estes resultados diferem fortemente dos dados

publicados para duas amostras de óleos essenciais de folhas de *B. semiserrata* coletadas no Rio Grande do Sul (AGOSTINI *et al.*, 2005). Nos dados publicados, os monoterpênos aparecem com 14,5 e 35,6% do total, enquanto que na amostra apresentada neste trabalho não ultrapassam 2%. Além disto, dos quatro principais componentes presentes nesta amostra, somente o espatulenol foi encontrado em proporção similar às das duas amostras publicadas: dos outros três componentes principais, que totalizam 45,4% em nosso óleo, somente foi citado na publicação o aromadendreno, mas abaixo de 0,8%.

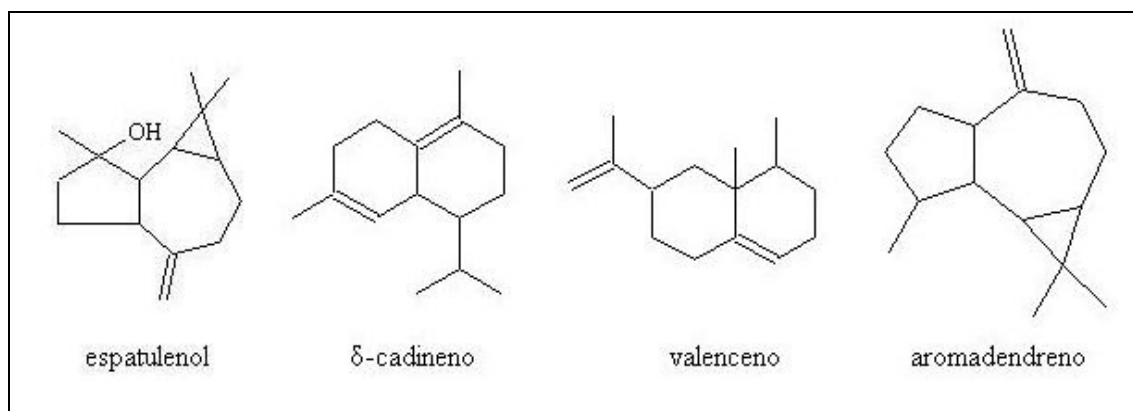


Figura 13 – Estruturas dos principais componentes identificados no óleo essencial por arraste a vapor de *B. semiserrata*

As diferenças observadas na composição do óleo essencial podem ser causadas por diversos fatores: variações genéticas no material coletado, origem geográfica, condições climáticas, época de coleta e processo extrativo utilizado (FRIZZO, 2001). Também são observadas diferenças na composição de óleos essenciais advindos de espécimes femininos e masculinos (FERRACINI *et al.*, 1995). Para esta amostra, o primeiro fator importante a considerar como causa da diferença na composição química do óleo essencial é a técnica de obtenção utilizada, arraste de vapor, cuja composição não pode ser diretamente comparada com outras que foram obtidas por hidrodestilação. Considerando também as observações realizadas sobre a fenologia das espécies *Baccharis* que crescem em nossa região: a floração de *B. semiserrata*, por exemplo, deveria ocorrer entre abril e outubro (PIRANI;

CORTOPASSI-LAURINO, 1994), mas apenas poucas flores foram observadas durante a coleta em agosto de 2005. Porém, mais tarde foi verificada a ocorrência de três fortes floradas em espécimes femininos e masculinos de *B. semiserrata* na região dos Campos Gerais: no início de novembro, em meados de dezembro e fim de janeiro, o que sugere a ocorrência de variações metabólicas e poderia contribuir para a explicação da composição química diferenciada encontrada para o óleo essencial.

4.4 Atividade microbiológica do óleo essencial de *B. semiserrata*

O método de difusão em disco (KONEMAN *et al.*, 2001) foi utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana da amostra de óleo essencial das folhas de *B. semiserrata* extraído por arraste a vapor, contra os mesmos microrganismos testados anteriormente com os extratos orgânicos. Na Tabela 5, o óleo apresentou atividade antimicrobiana contra a levedura *C. albicans* com o maior halo de inibição e contra as bactérias *S. aureus*, *B. cereus*, *P. aeruginosa* com menores índices de inibição. Sugere que o óleo essencial seja mais seletivo para a parede celular fúngica do que para as bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Tabela 5 – Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *B. semiserrata* obtido por arraste a vapor (halos de inibição em mm)

Microrganismos	Óleo essencial	Cloranfenicol	Nistatina
Gram-positivo: <i>E. faecalis</i>	0	22	-
<i>S. saprophyticus</i>	0	20	-
<i>S. aureus</i>	9	22	-
<i>B. cereus</i>	10	25	-
Gram-negativo: <i>E. coli</i>	0	19	-
<i>K. pneumoniae</i>	0	17	-
<i>P. aeruginosa</i>	11	19	-
Levedura: <i>C. Albicans</i>	15	-	17

Foi determinada a CIM do óleo essencial capaz de inibir completamente o crescimento de microrganismos, pelo método de diluição em caldo (KONEMAN *et al.*, 2001), sendo determinado o valor de 50 µL/mL para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* e para a

levedura *C. albicans* (Figura 14). Estes resultados sobre a atividade antimicrobiana do óleo de *B. semiserrata* são muito similares aos encontrados para o óleo essencial de *B. notoserigila* (COBOS *et al.*, 2001).

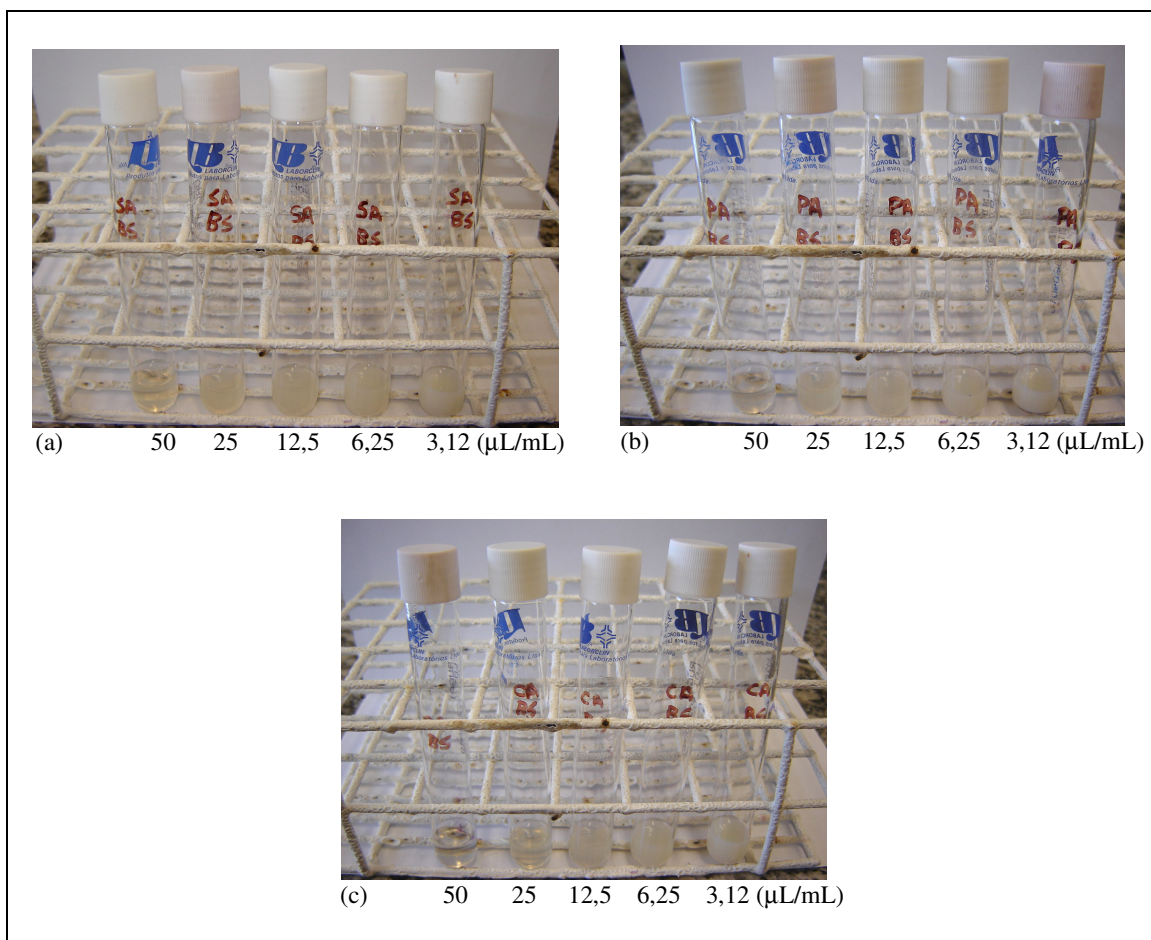


Figura 14 – CIM do óleo essencial extraído por arraste a vapor para os microrganismos *S. aureus* (a), *P. aeruginosa* (b) e *C. albicans* (c)

4.5 Amostras analíticas de óleos essenciais de *B. semiserrata*

A Tabela 6 mostra os resultados de análises por CG e CG-EM dos componentes dos óleos essenciais das folhas de espécimes feminino e masculino de *B. semiserrata*, obtidos por hidrodestilação com respectivos rendimentos de 0,13% (p/p) e 0,45% (p/p). A identificação foi realizada primeiramente por comparação dos IK de cada componente com dados publicados

(ADAMS, 1995), seguida da comparação de seus espectros de massas com os fornecidos pelas bibliotecas de espectros NIST do sistema.

As duas amostras de óleo são semelhantes por conterem proporções de monoterpenos abaixo de 3 % e altas porcentagens do sesquiterpeno espatulenol, que ultrapassa 50% no óleo

Tabela 6 – Componentes dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas de *B. semiserrata* feminina (♀) e masculina (♂)

Componentes	♀ (%)	♂ (%)	IK coluna apolar
limoneno	-	0,17	1032
linalool	0,21	0,36	1101
sabinol	1,01	0,36	1147
<i>cis</i> -verbenol	0,35	0,12	1151
4-terpinol	traço	0,17	1185
<i>p</i> -cimen-8-ol	0,28	0,33	1192
pinocarveol	0,31	-	1194
mirtenal	0,67	-	1201
eugenol	0,32	traço	1357
β -elemeno	traço	0,15	1394
α -gurjuneno	1,78	0,86	1413
aromadendreno	9,61	2,33	1446
α -humuleno	0,15	0,16	1463
cinamato de etila	-	0,69	1473
germacreno D	1,86	-	1481
valenceno	8,88	-	1503
α -muuroleno	-	2,38	1503
γ -cadineno	-	3,93	1520
δ -cadineno	9,52	traço	1524
cadina-1,4-dieno	0,50	-	1530
elemol	-	0,26	1555
espatulenol	42,65	50,75	1588
cariofileno óxido	4,43	4,83	1593
α -cadinol	1,65	2,54	1653
α -eudesmol	-	5,47	1665
Total	84,19	75,66	-

do espécime masculino. O espatulenol atinge 42,65% no óleo da planta feminina, onde ainda sobressaem três outros sesquiterpenos: 9,61% de aromadendreno, 8,88% de valenceno e

9,52% de δ -cadineno. Comparando o óleo proveniente das folhas do espécime feminino, obtido pelo processo de arraste a vapor, foi observado que os componentes principais são os mesmos: espatulenol, aromadendreno, valenceno e δ -cadineno. Além disto, as duas amostras analíticas apresentaram ainda um conteúdo similar em cariofileno óxido (4,43 e 4,83%) e o espécime masculino tem o α -eudesmol (Figura 15) como seu segundo componente principal, mas com apenas 5,47%.

Assim, as diferenças observadas nos dados publicados para as amostras de *B. semiserrata* do Rio Grande do Sul (AGOSTINI *et al.*, 2005), quando comparados com os dados obtidos para nossas amostras, coletadas no segundo planalto do Paraná, podem ser atribuídas muito mais a fatores ambientais, genéticos ou climáticos do que ao processo de extração. Convém salientar mais uma vez, que foram feitas observações sobre as variações fenológicas das espécies *Baccharis* na nossa região, incluindo *B. semiserrata*, que podem ajudar a entender diferenças na composição dos metabólitos secundários.

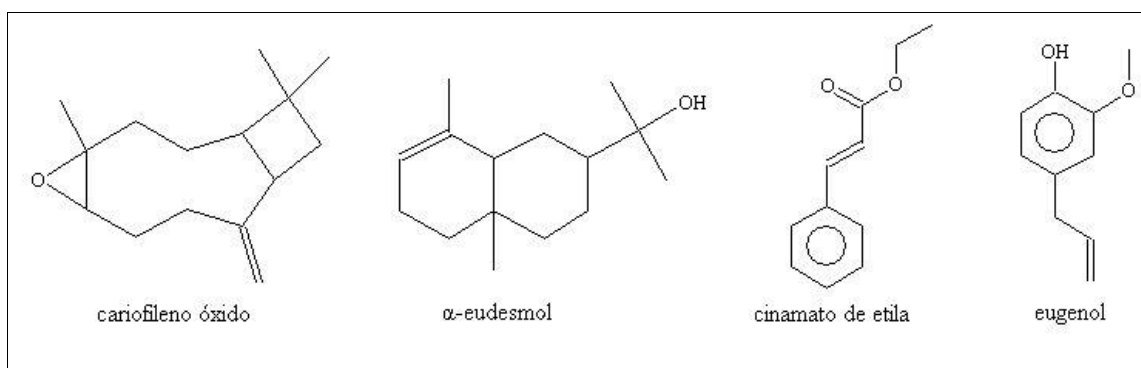


Figura 15 – Estruturas de alguns principais componentes dos óleos essenciais das folhas de espécimes feminino e masculino de *B. semiserrata*, obtidos por hidrodestilação

Merece destaque a presença de eugenol nos dois óleos, mesmo que em baixa porcentagem, e de cinamato de etila no óleo do espécime masculino, pois sua origem biossintética é diferente dos terpenóides (Figura 15). Em outra fase deste trabalho utilizando

folhas de *B. semiserrata* ♀ foi observado, pela primeira vez nesta espécie vegetal, a ocorrência de derivados de ácidos hidroxiarilpropenóicos, que são substâncias com o mesmo esqueleto carbônico.

Diversas outras espécies do gênero *Baccharis* contêm espatulenol como componente principal ou, pelo menos, contado entre os principais componentes de seus óleos essenciais (AGOSTINI *et al.*, 2005; FERRACINI *et al.*, 1995). O estudo da citotoxicidade do espatulenol como constituinte de *B. gaudichaudiana* mostrou que a substância tem atividade moderada contra a maioria das linhagens de células cancerígenas humanas testadas (FULLAS *et al.*, 1994), sugerindo que as espécies *Baccharis* utilizadas medicinalmente podem apresentar atividades farmacológicas relacionadas a este sesquiterpeno.

4.6 Análises bioquímicas

4.6.1 Detecção de saponinas

Saponinas estão presentes no extrato aquoso de *B. semiserrata*, com a formação de espuma persistente após intensa agitação, provavelmente isso contribua com a hipótese alçada para um perfil mais lítico do extrato, já que algumas saponinas apresentam propriedades envolvidas na desorganização das membranas das células sanguíneas (ação hemolítica). Para melhores esclarecimentos da identificação de saponinas, no que tange à atividade lítica, poderia ser estabelecido um perfil cromatográfico através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SCHENKEL *et al.*, 2000).

As saponinas são constituintes comuns de plantas que exibem um largo espectro de atividades biológicas e, freqüentemente, possuem além da atividade hemolítica, ação citolítica e bactericida. Além disso, saponinas têm atividade hipocolesterolêmica e são amplamente utilizadas como um componente de potentes adjuvantes para aumentar a resposta imune, principalmente quando complexadas com colesterol (YULDASHEVA *et al.*, 2005).

4.6.2 Dosagem de proteínas

No que se refere às proteínas, os experimentos confirmaram a presença das mesmas no extrato aquoso liofilizado das folhas de *B. semiserrata*, contendo em média $4,963 \pm 1,890$ mg/mL.

Existe a possibilidade de que lectinas estejam presentes no extrato, uma vez que são glicoproteínas presentes em plantas de várias espécies e que possuem funções de defesa contra microrganismos ou insetos invasores e predadores. Tais funções também podem ser atribuídas a enzimas contaminantes da fase preparatória (RÜDIGER, 1998).

Lectinas demonstram especificidade por mono ou oligossacarídeos, entre eles N-acetilgalactosamina e galactose, responsáveis pela antigenicidade dos sorotipos sanguíneos A, B e AB (RÜDIGER, 1998).

4.6.3 Perfil hemolítico

A membrana eritrocitária apresenta moléculas que atuam como antígenos determinantes das tipagens sanguíneas. As diferenças estruturais entre as tipagens sanguíneas são altamente complexas, uma vez que são considerados mais de 200 antígenos. O sistema ABO (Figura 16) é o mais conhecido entre 19 já caracterizados (LEE *et al.*, 1998) e o mais importante na medicina clínica transfusional (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003). Neste sistema, o parâmetro de classificação utilizado é a porção antigênica constituída de monossacarídeos presentes na superfície da membrana eritrocitária, sendo que:

- o sorotipo O carece de antígenos específicos;
- o sorotipo A apresenta o antígeno N-acetilgalactosamina;
- o sorotipo B a galactose;
- o sorotipo AB apresenta tanto o antígeno encontrado em A quanto em B.

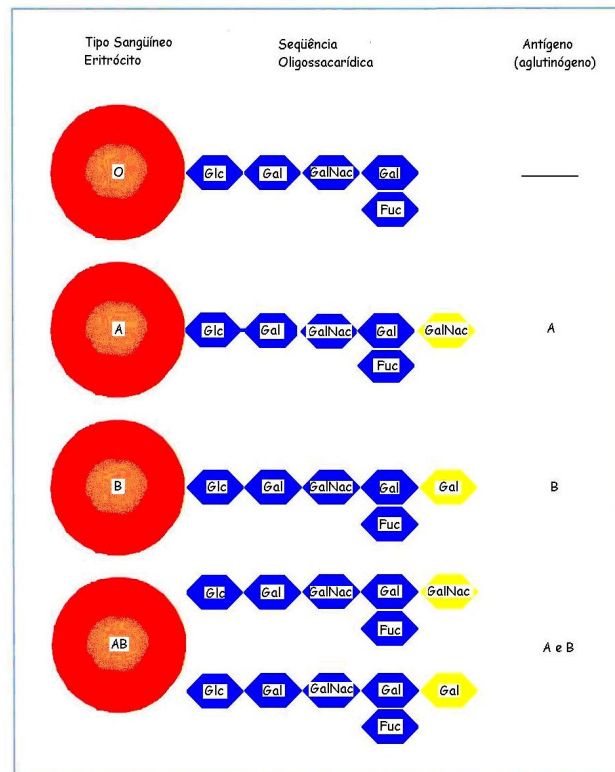


Figura 16 – Sistema ABO

Fonte: Adaptado de Carvalho e Recco-Pimentel (2001)

O sistema Rhesus (fator Rh) classifica a proteína Rhesus quanto à composição do tetrâmero, das 4 subunidades duas são denominadas Rh50 (Rh AG geneticamente) e outras duas denominadas Rh30, sendo que estas ainda se subdividem em subunidade CE e subunidade D. O que realmente as diferencia é o fato de Rh negativo ser composto por duas subunidades CE, enquanto o Rh positivo (Figura 17) é constituído por uma subunidade CE e outra D (HEITMAN; AGRE, 2000), cuja topologia e seqüenciamento de aminoácidos estão elucidados (CONROY *et al.*, 2005).

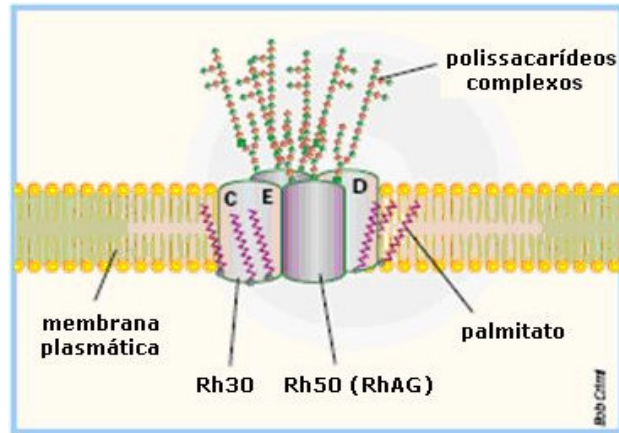


Figura 17 – Modelo da proteína Rhesus Rh positivo

Fonte: Adaptado de Heitman e Agre (2000)

Nas tipagens sanguíneas A^+ , B^+ , O^+ e O^- os valores de hemólise são relativos, uma vez que são definidos a partir da hemólise mecânica (lise mínima) e hemólise total (lise máxima).

A Figura 18 apresenta os resultados obtidos para a tipagem A^+ , na qual as menores concentrações do extrato aquoso (até 220 $\mu\text{g/mL}$) não causam lise celular significativa, enquanto concentrações mais elevadas causam uma lise concentração-dependente.

O perfil hemolítico, em condições isotônicas para a tipagem A^+ apresenta um comportamento sigmoidal característico. Em baixas concentrações, a membrana eritrocitária é capaz de absorver uma determinada quantidade do extrato sem que a lise ocorra, o que corresponde ao primeiro platô da curva. A partir de 330 $\mu\text{g/mL}$ a membrana principia um processo de saturação crescente com conseqüente lise, até atingir praticamente a solubilização, algo em torno de 85%.

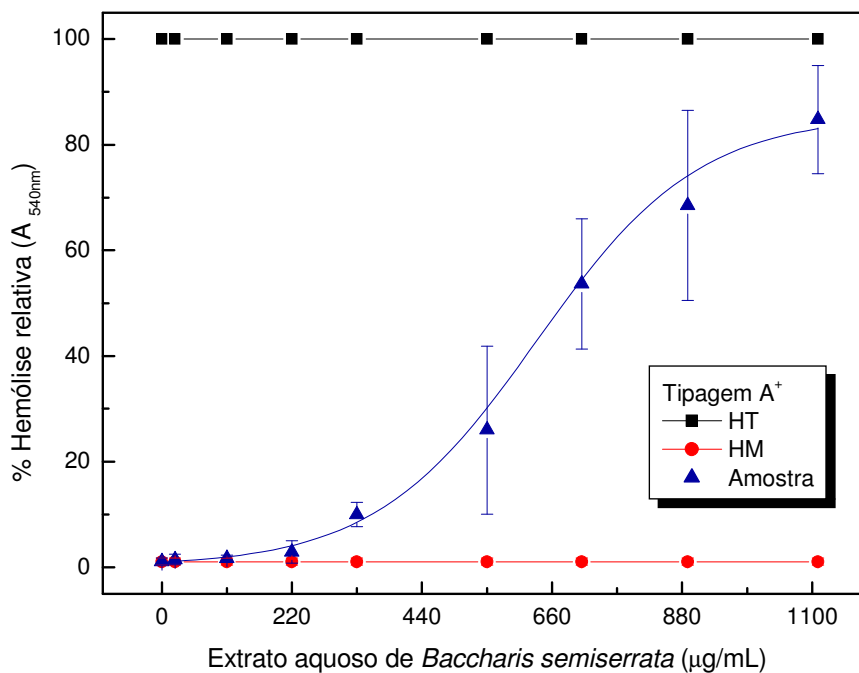


Figura 18 – Perfil da interação do extrato aquoso de *B. semiserrata* com tipagem A⁺: hematócrito 0,8% em PBS isotônico, incubação a 37°C por 45 minutos, sob constante agitação

Para a tipagem B⁺ (Figura 19), a curva apresenta um mecanismo diferenciado, no qual uma mesma concentração de extrato, como por exemplo 550 $\mu\text{g/mL}$, origina uma liberação drasticamente maior de hemoglobina que a correspondente na tipagem A⁺, sendo que a maior concentração testada causa o mesmo efeito hemolítico. A presença do antígeno galactose (N-acetilgalactosamina para a tipagem A⁺), muito provavelmente faz parte desta biointeração, já que ambas amostras sanguíneas são Rh⁺.

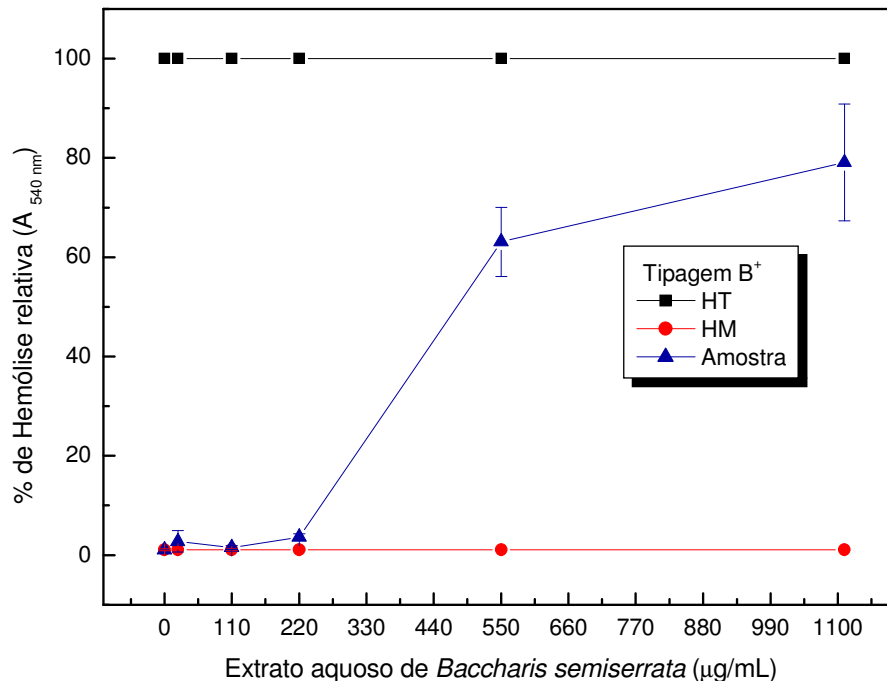


Figura 19 – Perfil da interação do extrato aquoso de *B. semiserrata* com tipagem B⁺: hematócrito 0,8% em PBS isotônico, incubação a 37°C por 45 minutos, sob constante agitação

Na Figura 20, a interação entre o extrato aquoso de *B. semiserrata* e a tipagem O⁺ apresenta um perfil similar aos anteriores, diferindo novamente apenas para a concentração intermediária de 550 µg/mL, a qual gera uma liberação de $\pm 30\%$ do conteúdo intracelular, ou seja, 35% a menos que o observado para o sorotipo B e praticamente igual ao detectado para o sorotipo A. Em analisando exclusivamente esta concentração, a ausência de antigenicidade na superfície do sorotipo O e a presença de N-acetilgalactosamina na tipagem A são insuficientes para a elaboração de uma correlação. Os resultados obtidos para a tipagem A foram significativamente diferentes para a 1^a e para 2^a bolsa de sangue utilizadas, pelo menos para a concentração mencionada, como pode ser verificado pelos dados abaixo:

- 1^a bolsa de A⁺: valor médio $12,86 \pm 3,98$;
- 2^a bolsa de A⁺: valor médio $39,10 \pm 11,69$.

O que resulta em um valor médio que pouco difere do observado para a tipagem O⁺.

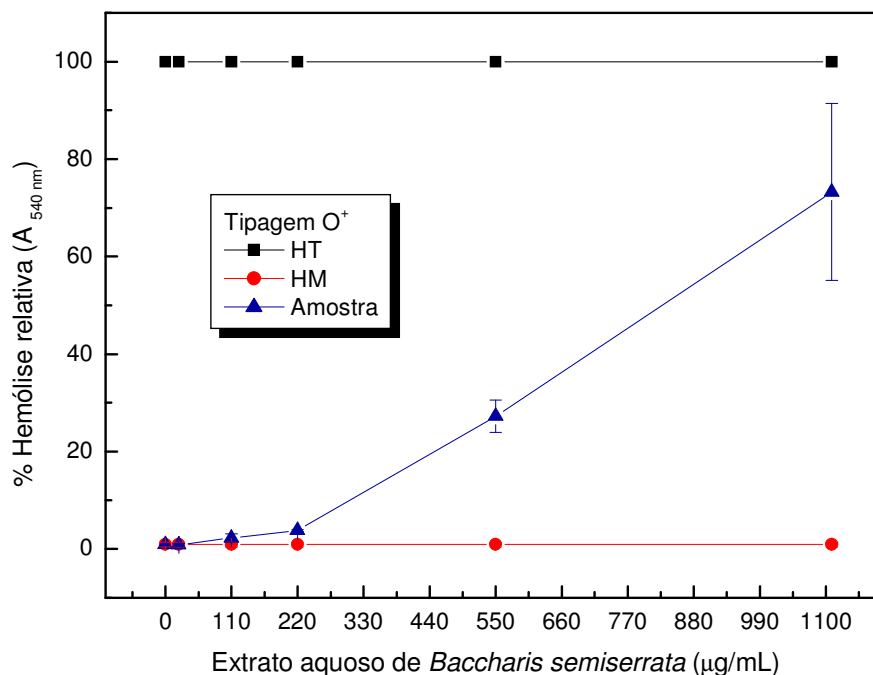


Figura 20 – Perfil da interação do extrato aquoso de *B. semiserrata* com tipagem O⁺: hematócrito 0,8% em PBS isotônico, incubação a 37°C por 45 minutos, sob constante agitação

De maneira geral, uma interação não-lítica pode ser observada para as menores concentrações do extrato, enquanto que a maior causa uma lise média de 80% para as três tipagens testadas. Um efeito diferenciado só acontece em presença de 550 µg/mL. Como são inúmeras as classificações dos eritrócitos e este trabalho só considera o sistema ABO e Rh, é possível que ocorra o envolvimento dos antígenos na interação.

Nos eritrócitos da tipagem O⁻ que carecem do antígeno N-acetilgalactosamina e da galactose, a lise acontece em apenas 35% da amostra em presença de 1110 µg/mL em comparação com as tipagens de Rh positivo, conforme a Figura 21. Este fato indica que a subunidade D da proteína Rhesus, presente ou ausente nas amostras O⁺ e O⁻ incubadas com extrato aquoso de *B. semiserrata* pode vir a ser um interferente nesta interação, como mostram as diferenças nos percentuais dos resultados hemolíticos.

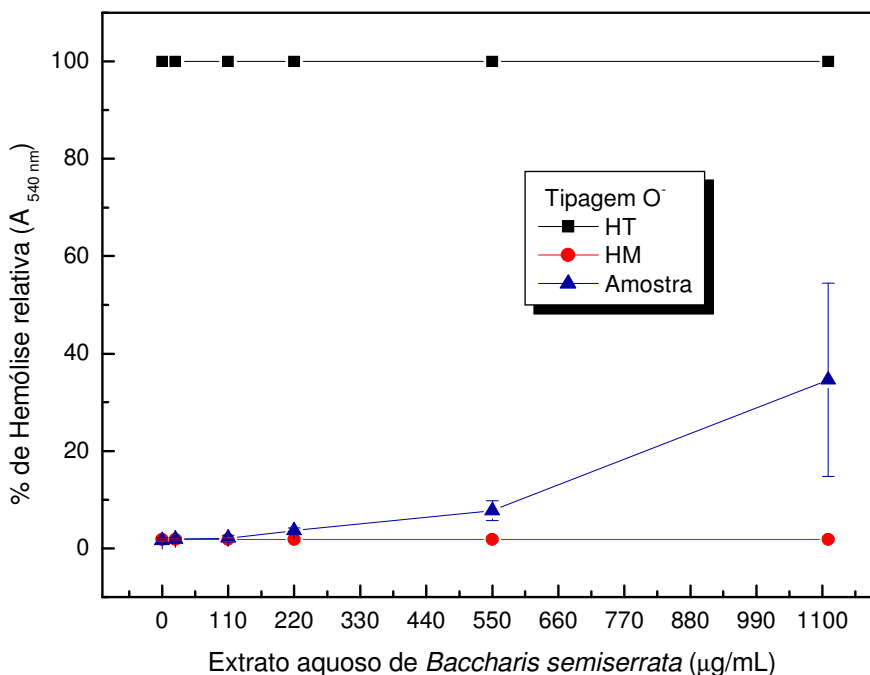


Figura 21 – Perfil da interação do extrato aquoso de *B. semiserrata* com tipagem O: hematócrito 0,8% em PBS isotônico, incubação a 37°C por 45 minutos, sob constante agitação

Ensaio com extrato aquoso de *B. semiserrata* e tipagem O mostram um perfil fortemente lítico do extrato para Rh⁺ e moderadamente lítico para Rh⁻, evidenciando o papel fundamental da presença/ausência da subunidade D da proteína Rhesus, nas possíveis interações e, conseqüentemente nas potenciais bioatividades exercidas por produtos naturais em modelos biológicos *in vitro*.

Considerando as diferenças moleculares entre as proteínas Rh positivo e negativo (Fator Rh), e os monossacarídeos antigênicos do sistema ABO, os resultados quantitativos fornecem indícios marcantes ao envolvimento qualitativo deste comprometimento na biointeração.

A Figura 22 mostra a razão de 630 nm/540 nm para a hemoglobina não liberada, ou seja, que permaneceu nos eritrócitos que não sofreram lise, sugerindo que mesmo sem lisar a

membrana eritrocitária do sorotipo A⁺, o extrato aquoso causa uma oxidação parcial do conteúdo intracelular em 16%, o que corresponde a 4,8% da hemoglobina total para a maior concentração do extrato. Há, portanto, comprometimento da funcionalidade da célula eritrocitária.

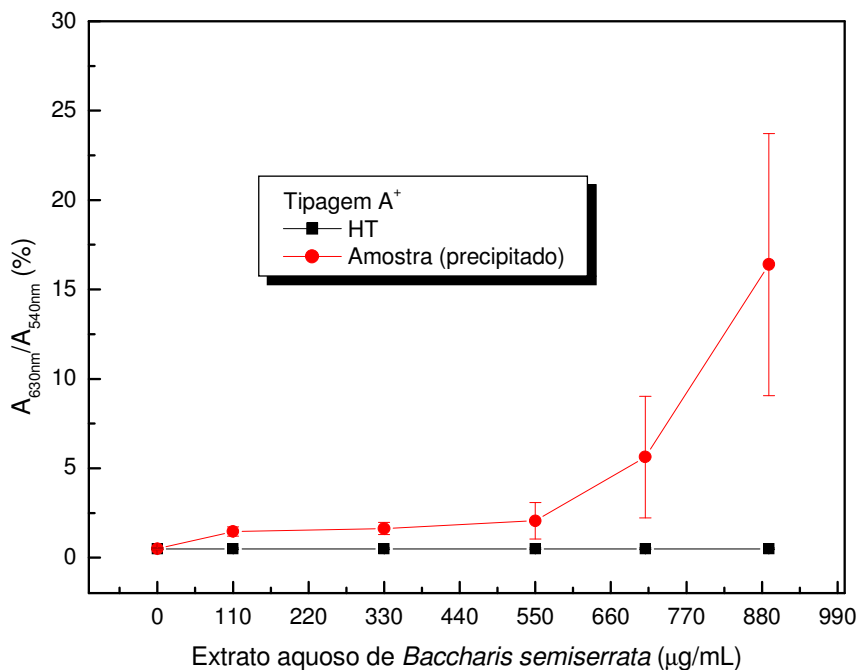


Figura 22 – Efeito do extrato aquoso de *B. semiserrata* em eritrócitos A⁺ íntegros: hematócrito 0,8% em PBS isotônico, 37°C por 45 minutos, sob agitação

A mesma análise, considerando a influência da área de superfície celular íntegra disponível, foi realizada para a tipagem O⁻ e neste caso (Figura 21) a porcentagem de lise foi significativamente inferior (35%) às tipagens Rh positivo. Na Figura 23, também foi analisada a razão de 630 nm/540 nm para a hemoglobina não liberada, ou seja, a que permaneceu dentro da célula, supondo que sem o efeito de lise, o extrato aquoso causa uma oxidação parcial do conteúdo intracelular em 2,3%, o que resulta uma medida de 1,5% da hemoglobina total para a correspondente concentração mais elevada do extrato aquoso.

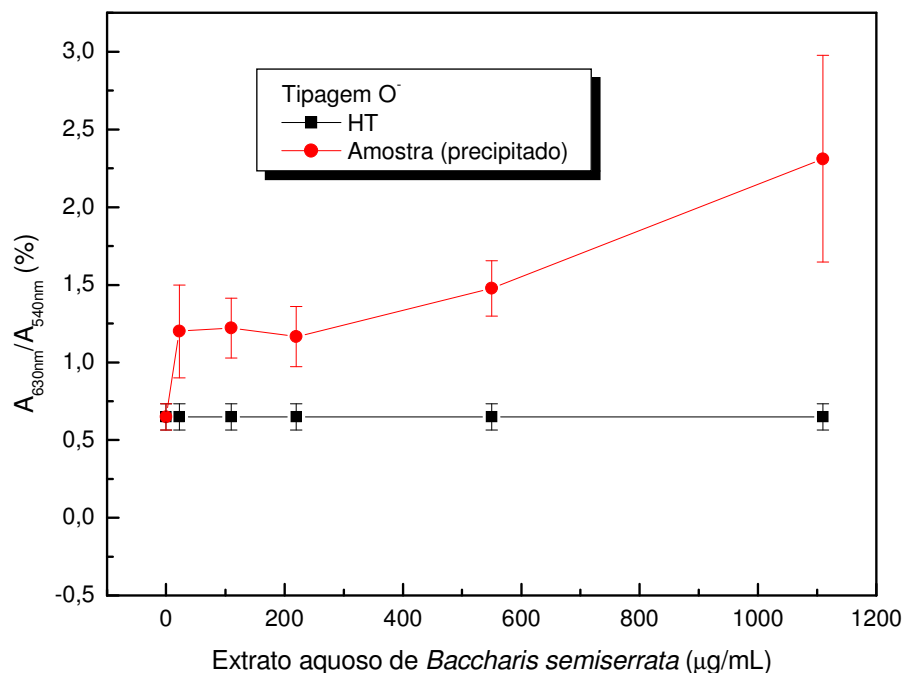


Figura 23 – Efeito do extrato aquoso de *B. semiserrata* em eritrócitos O⁻ íntegros: hematócrito 0,8% em PBS isotônico, 37°C por 45 minutos, sob agitação

Os antígenos ABO não estão restritos apenas à membrana dos eritrócitos, podendo ser encontrados também em uma grande variedade de células como linfócitos, plaquetas, endotélio capilar venular e arterial, células sinusoidais do baço, medula óssea, mucosa gástrica, além de secreções e outros fluidos como saliva, urina e leite (BATISSOCO; NOVARETTI, 2003). Tais características conferem maior importância às diferenças obtidas para as interações do extrato aquoso de *B. semiserrata* com as tipagens sanguíneas ABO e Rh, uma vez que podem ser amplificadas e diversificadas se considerarmos o organismo vivo como um todo complexo e interativo.

4.6.4 Ensaios em MEV

Os eritrócitos possuem forma de disco bicôncavo (discócito), sendo que a membrana eritrocitária contém lipídeos, proteínas e carboidratos. Os lipídeos são fosfolipídeos cujo papel

é importante na manutenção da flexibilidade e da deformabilidade celular. A inserção de fosfolípidos exógenos em eritrócitos com forma discóide pode resultar em mudanças morfológicas, tais como formação de eritrócitos crenados (*crenators*) ou na forma de xícara (*cupformers*) (SHEETZ e SINGER, 1974). Na Figura 24, a incorporação de uma substância química (agente externo) pode ocasionar diferentes modificações na forma discóide do eritrócito, dependentes da localização na membrana. Assim, se a localização preferencial for na monocamada externa, a forma intermediária resultante será o equinócito, caso contrário o resultado será uma forma de estomatócito. Portanto, ambas as formas podem ser transformadas em esferócitos com conseqüente ruptura na membrana, pelo acréscimo de incorporações de substâncias exógenas (VERMEHREN e HANSEN, 1998).

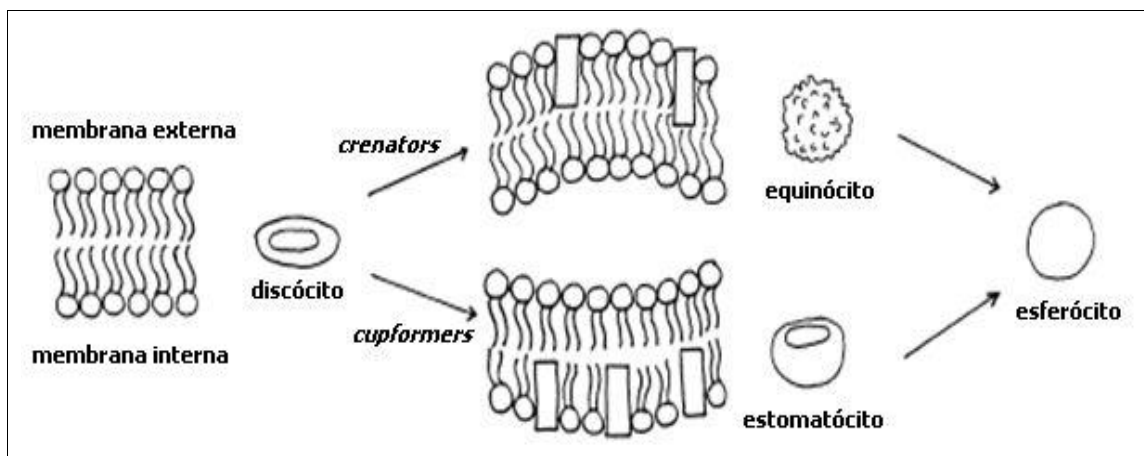


Figura 24 – Diferenças na morfologia das hemácias

Fonte: Adaptado de Vermehren e Hansen (1998)

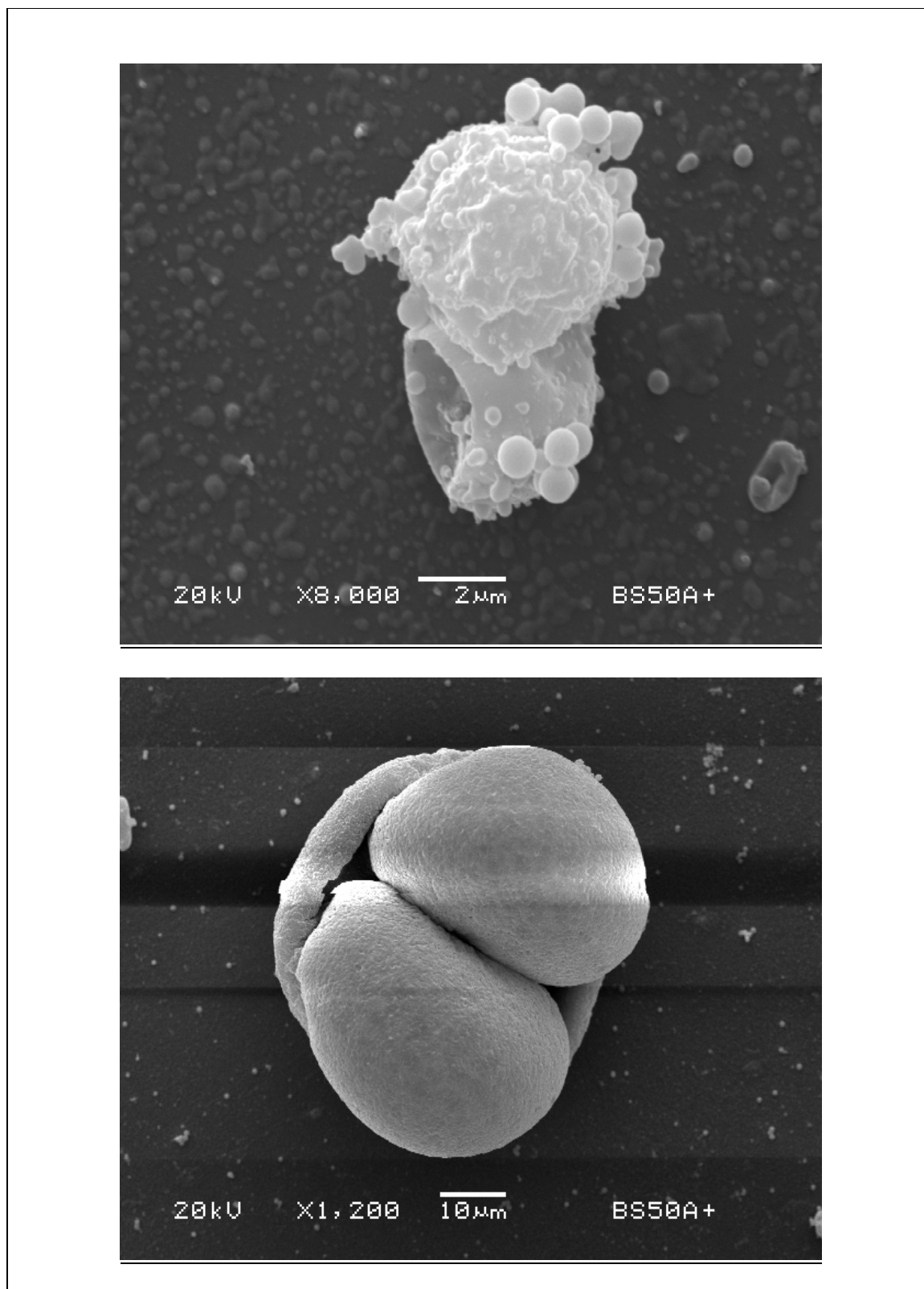


Figura 25 – Fotomicrografias de eritrócitos A⁺ incubados com extrato aquoso de *B. semiserrata* em baixa concentração

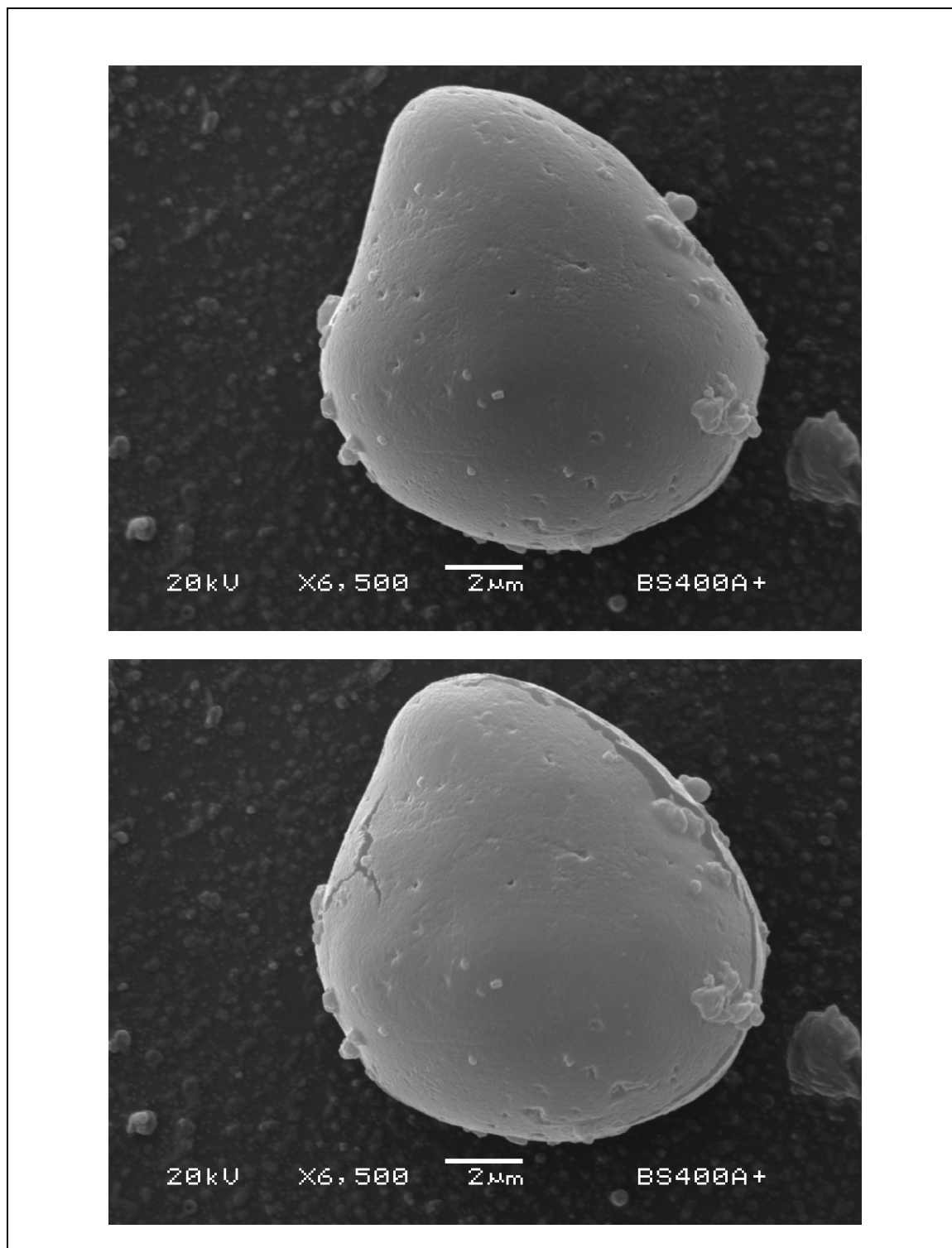


Figura 26 – Fotomicrografias de eritrócitos A⁺ incubados com extrato aquoso de *B. semiserrata* em elevada concentração

Devido às mudanças de formas na membrana eritrocitária, os resultados preliminares obtidos por MEV refletiram uma alteração morfológica na arquitetura membranar quando em

presença do extrato aquoso, como verificado pela identificação de hemácias rompidas e, conseqüentemente hemoglobina liberada, como era de se esperar dado o perfil lítico do extrato aquoso de *B. semiserrata* (Figuras 25 e 26). É claro que tais interações não decorrem exclusivamente da presença de lipídeos de membrana, proteínas integrais ou de superfície, ou ainda os complexos polissacarídicos muito provavelmente estão envolvidos nas alterações de arquitetura celular.

Conforme ilustra a Figura 25, a mudança na forma dos eritrócitos de tipagem A⁺ para a forma estomatocítica, pré-requisito ao mecanismo de endovesiculação, confirma a interação da membrana celular com a menor concentração (não lítica) do extrato aquoso da espécie *B. semiserrata*.

Já na Figura 26, pode ser observado que em concentrações ainda mais elevadas do extrato a estrutura da bicamada colapsa, em conseqüência de um provável mecanismo crescente de incorporações de moléculas na célula. A célula eritrocitária é lisada ocorrendo liberação de hemoglobina, sendo que antes da ruptura o eritrócito atingiu um formato quase que esferócito. Os resultados obtidos com eritrócitos A⁺ em presença do extrato aquoso de *B. semiserrata*, podem indicar qualitativamente a biointeração e a presença da ação hemolítica.

4.6.5 Bioatividade frente a H₂O₂

O extrato aquoso de *B. semiserrata* frente a H₂O₂ em eritrócitos da tipagem A⁺ (Figura 27), apresentou para todas as concentrações do extrato, um efeito redutor, verificado pelo valor de $\pm 25\%$, praticamente constante quando comparado ao controle tratado com H₂O₂. É possível que os resultados encontrados sejam decorrentes da interação preferencial do extrato de *B. semiserrata* com a membrana eritrocitária, e não com a hemoglobina liberada.

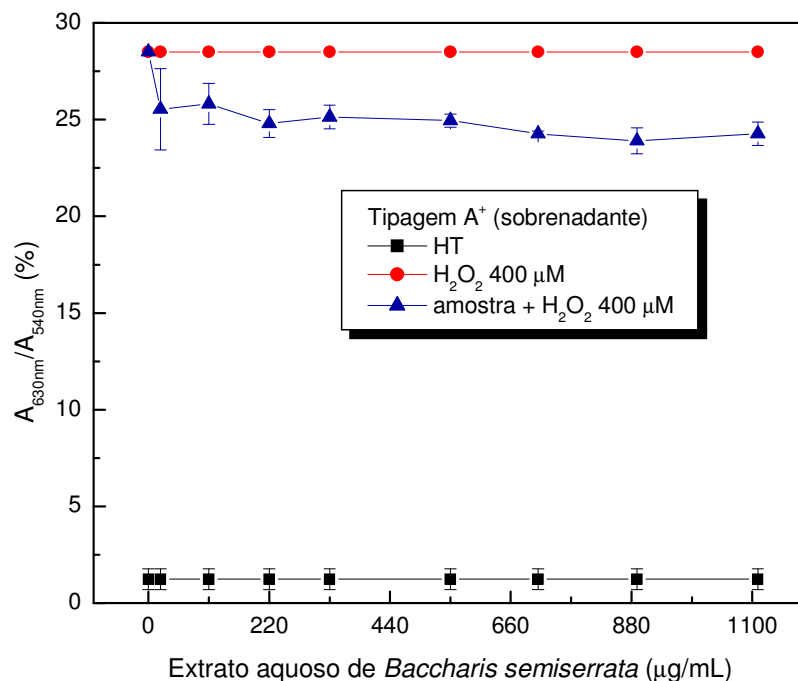


Figura 27 – Atividade do extrato aquoso de *B. semiserrata* em eritrócitos A⁺ frente a H₂O₂: hematócrito 0,8% em PBS isotônico, 37°C por 60', sob agitação

Já para o sorotipo O⁻ (Figura 28) não foi possível observar efeito algum, ou seja, a pré-incubação com o extrato não modificou o perfil de oxidação apresentado pela hemoglobina liberada. É importante lembrar que neste experimento a quantidade de hemoglobina liberada é, praticamente, a metade da observada para eritrócitos A⁺. Muito provavelmente a interação do extrato tenha ocorrido preferencialmente com estruturas da membrana, não interferindo no efeito oxidativo do H₂O₂ sobre a proteína.

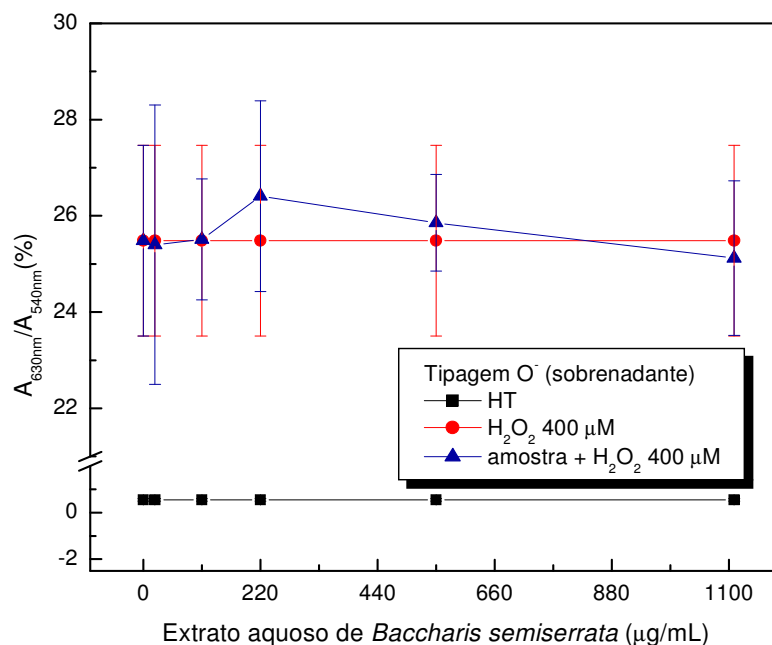


Figura 28 – Atividade do extrato aquoso de *B. semiserrata* em eritrócitos O⁻ frente a H₂O₂: hematócrito 0,8% em PBS isotônico, 37°C por 60', sob agitação

Na ressuspensão dos precipitados da tipagem O⁻ dos ensaios anteriores, nenhum efeito ocorreu de modo a evidenciar uma potencial ação oxidante ou redutora do extrato aquoso (Figura 29) sobre o conteúdo intracelular. Exceção feita para a maior concentração, com a qual pode ser detectado um pequeno acréscimo na razão hemoglobina Fe³⁺/Fe²⁺. Estes dados são sugestivos de uma interação superficial com os componentes de membrana, não reativa o suficiente para alterar o estado de oxidação do Fe²⁺, responsável pelo transporte efetivo de O₂ e, que provavelmente possa haver uma saturação da barreira seletiva com o extrato segundo um modelo concentração-dependente.

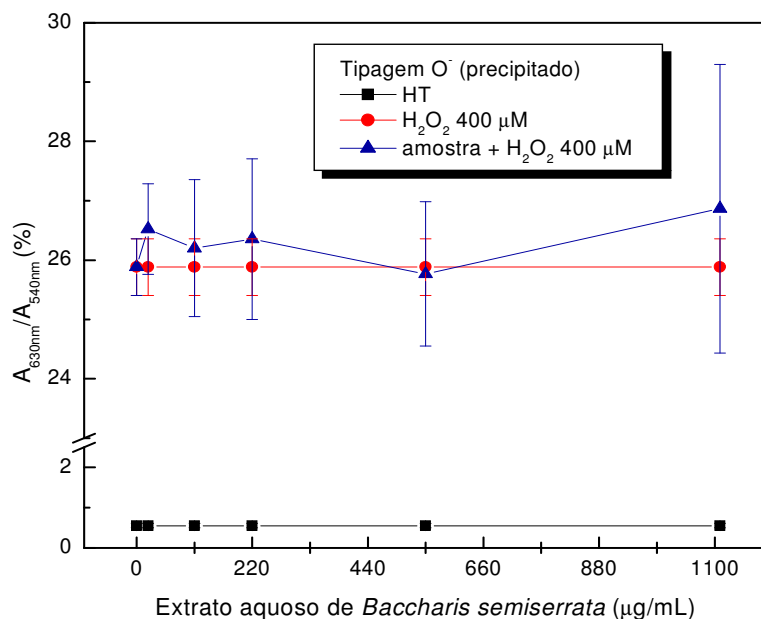


Figura 29 – Atividade do extrato aquoso de *B. semiserrata* em eritrócitos O⁻ íntegros frente a H₂O₂: hematócrito 0,8%, incubados em PBS isotônico, 37°C por 60 minutos, sob agitação

4.6.6 Atividade frente a DPPH

O extrato aquoso liofilizado de *B. semiserrata* apresenta uma forte atividade sequestradora do radical DPPH, como pode ser observado na Tabela 7 abaixo:

Tabela 7 – Porcentagem de DPPH sequestrado em presença do extrato aquoso liofilizado de *B. semiserrata*

	Extrato de <i>B. semiserrata</i> (µg/mL)			
	1,92 x 10 ³	980	1,5 x 10 ⁻¹	7,8 x 10 ⁻²
% sequestro de DPPH (100 µM)	100%	100%	15%	20%

Os valores encontrados são significativamente maiores que os determinados para o extrato aquoso de *B. grisebachii*, cujas concentrações de 100, 50 e 10 µg/mL sequestraram 61, 35 e 8% respectivamente dos radicais DPPH disponíveis (TAPIA et al., 2004).

Este resultado, apesar de importante não contribui para a análise dos resultados de hemólise e atividade frente a H_2O_2 . Logo, é possível deduzir que os mecanismos de interação do extrato aquoso de *B. semiserrata* com eritrócitos envolvem outros mecanismos que não apenas a oxidação dos componentes da membrana celular, mas interações diferenciadas com as estruturas de carboidratos antigênicos e proteínas Rh.

5 CONCLUSÕES

→ O óleo essencial obtido por arraste a vapor e os extratos CHCl₃, AcOEt, MeOH de folhas, cascas e lenho de *Baccharis semiserrata* de espécime feminino mostraram atividade antimicrobiana *in vitro* moderada contra a levedura *C. albicans* e algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas.

→ As análises dos extratos orgânicos indicaram por CCD e UV, que os compostos fenólicos presentes podem ser principalmente ácidos arilpropenóicos.

→ As análises por CG-EM do óleo essencial das folhas do espécime feminino obtido por arraste de vapor mostraram uma composição bastante diferente da disponibilizada por Agostini e colaboradores (2005), que pode ser atribuída a variações fenológicas e a fatores climáticos.

→ As variações na composição qualitativa e quantitativa podem ser atribuídas aos métodos de obtenção dos óleos essenciais (hidrodestilação e destilação por arraste a vapor de água) de *B. semiserrata* feminina.

→ Existem diferenças nos dados analíticos dos espécimes feminino e masculino, obtidos por hidrodestilação.

→ Os óleos essenciais de espécime feminino e masculino de *B. semiserrata*, ambos obtidos através das folhas por hidrodestilação, podem ser considerados uma importante fonte do sesquiterpeno espatulenol, ultrapassando a proporção de 50 % dos componentes na planta

masculina. Outros estudos são necessários a fim de otimizar o rendimento do óleo sem diminuir a proporção de espatulenol.

→ Na interação do extrato aquoso das folhas de *B. semiserrata* feminina com eritrócitos de diversas tipagens sanguíneas A⁺, B⁺, O⁺ e O⁻ pode ser observada, *in vitro*, a bioatividade como um efeito lítico nas concentrações mais elevadas do extrato. Este possível efeito de lise nas hemácias também pode ser observado nos dados obtidos por MEV, que ilustram e confirmam a alteração morfológica da membrana de eritrócitos da tipagem A⁺, quando em presença do extrato. Resultados obtidos com a espécie *B. uncinella*, nas mesmas condições experimentais, diferem fortemente, podendo ser observada uma atividade suavemente protetora da membrana eritrocitária (ASCARI, 2007).

→ O extrato aquoso de *B. semiserrata* apresentou saponinas e proteínas numa concentração de $\pm 4,96$ mg/mL, quase cinco vezes maior que a detectada para *B. uncinella* $\pm 1,14$ mg de proteína/mL (ASCARI, 2007).

→ O extrato aquoso de *B. semiserrata* apresentou um efeito redutor em presença de H₂O₂ para eritrócitos de sorotipo A⁺, o que pode significar que este resultado seja decorrente da interação preferencial do extrato com a membrana da célula eritrocitária, e não com a hemoglobina liberada. Não foi possível observar efeito do extrato sobre o sorotipo O⁻ frente a H₂O₂.

→ O extrato aquoso de *B. semiserrata* apresentou uma forte atividade seqüestradora do radical DPPH.

→ Para a continuidade deste trabalho:

- ✓ é sugerido um estudo mais específico para o isolamento do composto majoritário do óleo essencial, espatulenol, o qual apresentou proporções elevadas tanto no espécime feminino como masculino de *B. semiserrata*;
- ✓ embora não encontre indicações de uso de *B. semiserrata* pela medicina popular, seria interessante um estudo farmacológico *in vivo* detalhado a respeito do mecanismo de ação das principais classes terapêuticas, podendo ser analisado o óleo essencial, a substância isolada, os extratos no geral ou mesmo o extrato aquoso desta espécie vegetal pouco estudada, para melhores esclarecimentos das análises realizadas no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography, mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 1995. 469 p.

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

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

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

ASCARI, J. **Estudo químico e bioatividade de *Baccharis uncinella* DC**. 2007. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa - Paraná.

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

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**. v. 90, p. 727-733, 2005.

BATISSOCO, A.C.; NOVARETTI, M.C.Z. Aspectos moleculares do Sistema Sangüíneo ABO. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. v. 25, n. 1, p. 47-58, 2003.

BRACA, A.; DE TOMMASI, N.; DI BARI, L.; PIZZA, C.; POLITI, M.; MORELLI, I. Antioxidant Principles from *Bauhinia tarapotensis*. **J. Nat. Prod**. v. 64, p. 892-895, 2001.

BULL, B.S.; BRETON-GORIUS, J.; BEUTLER, E. Morphology of the erythron. In: **Hematology**. 4. ed. New York: Mc Graq-Hill, p. 297-316, 1990.

CARVALHO, H.F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A célula 2001**. 1. ed. bras. São Paulo: Manole, 2001. 287 p.

CAZES, J.; DEKKER, M. **Encyclopedia of Chromatography**. 2004 Update Supplement. Ed. Jack Cazes, 2004. 1679 p.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian, V. (Ed.). **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkins. Chapter 21. 1991.

COBOS, M. I.; RODRIGUEZ, J.L; OLIVA, M.D.; DEMO, M.; FAILLACI, S.M; ZYGADLO, J.A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserghila*. **Planta Medica**. v. 67, n. 1, p. 84-86, 2001.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas, SP: UNICAMP, 1997. 279 p.

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

FERRACINI, V.L.; PARAIBA, L.C.; LEITÃO FILHO, H.F.; SILVA, A.G.; NASCIMENTO, L.R.; MARSAIOLI, A.J. Essential oils of seven brazilian *Baccharis* species. **J. Essent. Oil Res.** v. 7, p. 355-367, 1995.

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

FIDALGO, O.; BONONI, V.L.R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1989. 62 p.

FRIZZO, C. D. *Baccharis uncinella* DC. y *Baccharis dracunculifolia* DC., um modelo para el estudio de técnicas de extracción y análisis de mezclas de componentes volátiles. 2001, 144 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidad de La República, Montevideo, 2001.

FULLAS, F.; HUSSAIN, R.A.; CHAI, H.; PEZZUTO, J.M.; SOEJARTO, D.D.; KINGHORN, D. Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. **Journal of Natural Products**. v. 57, n. 6, p. 801-807, 1994.

GIULIANO, D.A. New infragenera in *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). **Novon**. v. 15, n. 4, p. 534-541, 2005.

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

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

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

ISI - Institute of Scientific Information, Web of Knowledge. Disponível em: <<http://www.portal.isiknowledge.com>>. Acesso em: 28 out. 2006.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465 p.

LAURIALT, V.V.M.; O'BRIEN, P.J. Disulfiram may mediate erythrocyte hemolysis induced by diethyldithiocarbamate and 1,4-naphthoquinone-2-sulfonate. **Arch. Bioch. Biophys.** v. 284, p. 207-214, 1991.

LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. **Wintrobe - Hematologia Clínica**. 1. ed. bras. São Paulo: Manole, 1998. 1424 p.

LEITÃO, D.P.S.; FILHO, A.A.S.; POLIZELLO, A.C.M.; BASTOS, J.K.; SPADARO, A.C.C. Comparative evaluation of *in-vitro* effects of brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biol. Pharm. Bull.** v. 27, n. 11, p. 1834-1839, 2004.

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

LUX, S.E. Hereditary in the membrane or metabolism of the red cell. In: Cecil. **Textbook of Medicine**. 18. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. p. 909-917, 1988.

MOREIRA, F.P.M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. **Quim. Nova**. v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.

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

ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; VEROTTA, L. Application of molecular modelling to natural products: a biogenetic study of (+)-spathulenol and (+)-allospathulenol. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**. v. 284, p. 67-74, 1993.

PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern brazilian propolis. **J. Agric. Food Chem**. v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

PIRANI, J.R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. 2. ed. São Paulo: FAPESP, 1994. 192 p.

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

RÜDIGER, H. Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure , and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica**. v.161, p. 130-152, 1998.

SATO, R.; SUZUKI, K.; SASAKI, A. **Immunocompetent cell activators, useful to e.g. prevent feline immunodeficiency virus infections, comprises propolis that activates immunocompetent cell quantitatively and qualitatively**. JP2006213609-A, 01 fev. 2005.

SCHEMELLER, T.; LATZ-BRÜNING, B.; WINK, M. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. **Phytochemistry**. v. 44, n. 2, p. 257-266, 1997.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões e outros, Porto Alegre/ Florianópolis: Editoras Universidade UFRGS/ UFSC, 2000. p. 597-622.

SCHERIER, S.L. Red cell membrane biology. Introduction. **Clin. Haematol**. v. 14, p. 1-12, 1985.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C.; ASTUDILLO, S.L.; FERESIN, G.E.; TAPIA, A. Free radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). **Free Radical Research**. v. 37, p. 447-452, 2003.

SHEETZ, M.P.; SINGER, S.J. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 71, p. 4457-4461, 1974.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2000. 821 p.

SKOOG, D. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.

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

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

TAZAWA, S.; IWATA, F.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S. **Composition for use in foodstuff, comprises preset amount of prenyl cinnamic-acid derivative derived from propolis extract**. JP2006061037-A, 25 aug. 2004.

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

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

VERMEHREN, C.; HANSEN, H.S. Shape changes in the erythrocyte membrane induced by the absorption enhancer didecanoylphosphatidylcholine. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 177, p. 1-8, 1998.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen**. Berlin: Springer-Verlag, 1983. 321 p.

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

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

ANEXO - Lista de comunicações em congressos

Durante o desenvolvimento desse estudo, os resultados parciais atingidos foram apresentados em vários congressos, como listado a seguir:

1. MENDES, S.; NUNES, D.S.; MARQUES, M.B.; TARDIVO, R.C.; WISNIEWSKI JUNIOR, A.; SIMIONATTO, E.L.; CECHINEL FILHO, V. “Composição química do óleo essencial de *Baccharis semiserrata* DC.”. In: 2º Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel e 2º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul, 2006, Cascavel/PR.
2. MENDES, S.; NUNES, D.S.; MARQUES, M.B.; TARDIVO, R.C.; SANTOS, E.B. “Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Baccharis semiserrata* DC. (Asteraceae)”. In: 2º Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel e 2º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul, 2006, Cascavel/PR.
3. MENDES, S.; NUNES, D.S.; MARQUES, M.B.; SANTOS, E.B.; TARDIVO, R.C.; WISNIEWSKI JUNIOR, A.; CECHINEL FILHO, V. “Composição e bioatividade do óleo essencial das folhas de *Baccharis semiserrata* DC. (Asteraceae)”. In: XV Encontro Anual de Iniciação Científica e VI Encontro de Pesquisa da UEPG, 2006, Ponta Grossa/PR.

4. MENDES, S.; NUNES, D.S.; MARQUES, M.B.; SANTOS, E.B.; TARDIVO, R.C.
“Investigação química e microbiológica de extratos de *Baccharis semiserrata* DC.”.
In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2006, Salvador/BA.

5. MENDES, S.; MARQUES, M.B.; NUNES, D.S.; ASCARI, J. “Efeito lítico do extrato aquoso das folhas de *Baccharis semiserrata* DC. (Asteraceae) em eritrócitos humanos”. In: 14º SBQSul - Sociedade Brasileira de Química - Secretarias Regionais do RS, SC, PR, 2006, Erechim/RS.