

ELAINE CRISTINA ANDRIGO GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS EM DOENÇAS
DO TRATO DIGESTÓRIO: *Baccharis trimera* (LESS.)
DC. E *Casearia sylvestris* SWARTZ**

Araraquara
2012

ELAINE CRISTINA ANDRIGO GONÇALVES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
ESPÉCIES VEGETAIS UTILIZADAS EM DOENÇAS
DO TRATO DIGESTÓRIO: *Baccharis trimer* (LESS.)
DC. E *Casearia sylvestris* SWARTZ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab.

Araraquara
2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre sanar meus questionamentos nos momentos de dúvidas mostrando o melhor caminho a seguir para conquistar meus objetivos e sonhos.

Aos meus pais, Isabel Cristina e Moacir pelo amor incondicional e confiança depositada em mim e em meus planos.

À Minha avó Rosa por ter proporcionado uma infância muito saudável e pelas palavras de conforto na juventude.

À UNESP, principalmente a Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela adequada estrutura e espaço oferecido para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao meu orientador e professor André, o meu muito obrigado pela confiança em meu trabalho, pela consideração, paciência e dedicação ao passar seus conhecimentos e contribuir de forma exemplar na minha formação tanto profissional como pessoal.

À Minha coorientadora Taís por tornar possível grande parte do projeto oferecendo ótima estrutura e seus conhecimentos, os quais de forma decisiva enriqueceram meu trabalho.

Aos vários amigos que conquistei e que fizeram parte do meu convívio nesses anos de graduação e também aos queridos amigos que mesmo distantes estiveram sempre presentes.

Aos amigos que contribuíram de forma direta na iniciação científica desenvolvido, principalmente á Elaíse, pela amizade e grande apoio no projeto, à Josyane, pela parceria no desenvolvimento da pesquisa, ao Leonardo, pela atenção e por passar seus conhecimentos, às queridas amigas Mariana e Michele, pela amizade tornando

melhor os dias difíceis com simples gestos de carinho e pela grande ajuda no decorrer dos experimentos realizados, às técnicas Marisa e Néia, pela cooperação e por me socorrerem nos momentos de dúvidas ao aprender as novas técnicas desenvolvidas no projeto, ao Eduardo, pela ajuda e pelos momentos de alegria.

“O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a veemência e perseverante energia de sua alma a um fim, vencerá os obstáculos, e, se não atingir o alvo fará, pelo menos, coisas admiráveis.”

Dale Carnegie

“Por mais longa que seja a caminhada o mais importante é dar o primeiro passo.”

Vinícius de Moraes

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO, 11

1.1. *Baccharis trimera* (Less.) DC, 12

1.2. *Casearia sylvestris* Swartz, 16

2. OBJETIVO GERAL, 20

2.1. Objetivos específicos, 20

3. MATERIAIS E MÉTODOS, 21

3.1. Coleta-*B. trimera* e *C. sylvestris*, 21

3.2. Preparo do material vegetal, 21

3.3. Extração, 21

3.4. Purificação e secagem dos extratos, 23

3.5. Fracionamento do extrato etanólico de *C. sylvestris*, 24

3.6. Obtenção do extrato acetato de etila de *B. trimera* em maior escala e seu fracionamento, 24

3.7. Análise de frações obtidas de extratos de *C. sylvestris* e de *B. trimera*, 25

3.8. Isolamento dos diterpenos clerodânicos, 25

3.9. Preparo das soluções estoque dos extratos, frações e substâncias para avaliação da atividade antibacteriana, 26

3.10. Ensaio de atividade antibacteriana, 28

3.10.1. Amostras das cepas padrões, 28

3.10.2. Estocagem e manutenção das cepas bacterianas, 28

3.10.3. Padronização da suspensão bacteriana, 28

3.10.4. Preparo das soluções contendo substâncias de referências para o controle positivo, 29

3.10.5. Avaliação da atividade antibacteriana, 29

3.10.6. Realização da leitura utilizando resazurina, 31

3.10.7. Interpretação geral dos resultados dos controles e testes das amostras após revelação com resazurina, 32

4. RESULTADOS, 34

4.1. Fitoquímica, 34

4.2. Ensaio de atividade antibacteriana, 36

4.2.1. Avaliação da atividade antibacteriana-Teste de diluição em microplaca para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), 36

5. DISCUSSÃO, 41

6. CONCLUSÃO, 44

7. REFERÊNCIAS, 46

RESUMO

Baccharis trimera (Less.) DC. Asteraceae e *Casearia sylvestris* Swartz Salicaceae são plantas nativas do Brasil e de uso tradicional em doenças do trato digestório. Seus extratos e substâncias purificadas apresentaram diversas atividades farmacológicas (ex. antiulcerogênica, antimicrobiana) e baixa toxicidade. O *Helicobacter pylori* (bacilo gram-negativo) coloniza o estômago humano, associada ao maior risco de incidência de várias doenças (úlceras pépticas, linfomas e adenocarcinomas gástricos). Com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana de diferentes extratos, frações e substâncias de ambas as plantas medicinais, extratos de partes aéreas de *B. trimera* e de folhas de *C. sylvestris* foram preparados utilizando-se técnicas de maceração, obtendo-se o extrato acetato de etila e etanólico de *C. sylvestris* e acetato de etila, etanólico, etanol 70% e hexânico de *B. trimera*. Estes foram fracionados e analisados por técnicas cromatográficas. Os extratos e suas frações e substâncias foram submetidos a ensaios para avaliação da atividade antibacteriana para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O método utilizado para os ensaios foi a diluição em microplacas usando as bactérias *Helicobacter pylori* ATCC 43504, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. A partir do fracionamento do extrato acetato de etila de *B. trimera* e do extrato etanólico de *C. sylvestris* foram obtidas oito frações distintas do EAcBt e a fração de diterpenos do EEtCs. A análise em CCD demonstrou a presença de casearina X, B e caseargrewiina F na fração de diterpenos (EFSCs₂). Os extratos da *B. trimera* EAcBt, EEtBt e EEt70Bt e da *C. sylvestris* EAcCs e EEtCs apresentaram atividade anti-*H. pylori*, com valores de CIM de 250, 500, 500, 125 e 750 µg/mL, respectivamente. Os

valores de CIM que demonstraram ação bacteriana anti-*S. aureus* para os extratos EAcBt e EAcCs foram de 62,5 e 31,25 µg/mL, respectivamente. Entretanto, nenhuma amostra testada exibiu tal atividade anti-*E. coli*. Além disso, a EFSCs2 mostrou atividade antibacteriana somente em ensaios com *S. aureus*. As frações obtidas do EAcBt bem como os diterpenos clerodânicos isolados (casearina X e caseargrewiina F) não exibiram atividade bacteriana anti-*H. pylori* e anti-*S. aureus*. Os resultados apresentados sugerem uma possível ação sinérgica de substâncias presentes nos extratos de *B. trimera*. A EFSCs2 além dos diterpenos contém outras substâncias que não foram analisadas e poderiam ser responsáveis pela ação antibacteriana em testes com as bactérias utilizadas.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*; *Casearia sylvestris*, *Baccharis trimera*; atividade antibacteriana; fitoquímica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma que esquematiza o processo de preparação dos extratos de *B. trimera* e *C. sylvestris*, 23

Figura 2. Esquema de organização das unidades experimentais empregados no teste de microplaca para avaliação da atividade antibacteriana das amostras nos ensaios com os microrganismos testados, 31

Figura 3. Cromatoplaça resultante da análise das frações de *C. sylvestris* (EFSCs1, EFSCs2 e EFSCs3), 35

Figura 4. Cromatoplaça resultante da análise das frações de *B. trimera* (EFSBt de 1 a 8), 36

Figura 5. Resultado de microplaca de alguns ensaios de atividade antibacteriana, reveladas utilizando-se resazurina, 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporções usadas de solventes no preparo das soluções estoque para testes de atividade bacteriana anti-*E. coli* e anti-*S. aureus* e as respectivas concentrações finais, 26

Tabela 2. Proporções usadas de solventes no preparo das soluções estoque para testes de atividade anti-*H. pylori* e as respectivas concentrações finais, 27

Tabela 3. Determinação da CIM pelo método de diluição em microplaca, 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CBM	concentração bacteriostática mínima
CCD	cromatografia em camada delgada
CIM	concentração inibitória mínima
EAcBt	extrato acetato de etila de <i>Baccharis trimera</i>
EAcCs	extrato acetato de etila de <i>Casearia sylvestris</i>
EEtBt	extrato etanólico de <i>Baccharis trimera</i>
EEt70Bt	extrato etanol 70% de <i>Baccharis trimera</i>
EEtCs	extrato etanólico de <i>Casearia sylvestris</i>
EFS	extração por fase sólida
EFSBt	frações de <i>Baccharis trimera</i>
EFSCs1	fração 1 de <i>Casearia sylvestris</i>
EFSCs2	fração 2 de <i>Casearia sylvestris</i>
EFSCs3	fração 3 de <i>Casearia sylvestris</i>

1. INTRODUÇÃO

As espécies vegetais objeto deste estudo possuem diversas características comuns que foram determinantes em sua escolha. Ambas são plantas nativas do Brasil e de uso tradicional confirmado por estudos etnofarmacológicos, sendo utilizadas popularmente em doenças do trato digestório (ex. úlceras, gastrites, dispepsias), dentre outras aplicações. São encontradas em diferentes regiões de nosso país e passíveis de domesticação, já havendo produtores agrícolas que as cultivam. Seus extratos e mesmo substâncias purificadas apresentaram diversas atividades farmacológicas (ex. antiulcerogênica, antimicrobiana) e baixa toxicidade. Vários metabólitos secundários foram isolados e/ou identificados em extratos destas espécies, incluindo sesquiterpenos, diterpenos e flavonóides. A própria ANVISA reconheceu a importância destas plantas medicinais ao incluí-las no Anexo I da Resolução n. 10/2010, que trata da notificação de drogas vegetais (isentas de prescrição médica) para o uso na forma de infusão, decocção ou maceração com água (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010). As informações relevantes sobre *B. trimera* e *C. sylvestris* são apresentadas na forma de revisão bibliográfica nos itens 1.1 e 1.2, respectivamente.

O uso tradicional em doenças do trato digestório, bem como a atividade antimicrobiana apresentada por seus extratos, justifica a avaliação da atividade em *Helicobacter pylori* de extratos, frações e substâncias purificadas a partir destas espécies. O *H. pylori* é um bacilo gram-negativo que coloniza o estômago humano e sua presença está associada ao maior risco de incidência de várias doenças, incluindo úlceras pépticas, linfomas gástricos e adenocarcinomas gástricos, a

segunda causa de mortes por câncer no mundo (ATHERTON; BLASER, 2009; COVER; BLASER, 2009; HATAKEYAMA, 2009).

1.1. *Baccharis trimera* (Less.) DC.

O gênero *Baccharis* é um dos maiores em número de espécies na família Asteraceae, sendo representado por mais de 500 exclusivamente do continente americano, distribuídas desde o sul dos Estados Unidos da América até a Argentina e Chile (ABAD; BERMEJO, 2007; GIULIANO, 2001).

Baccharis trimera (Less.) DC. é um subarbusto perene com caules alados (cladódios) com ramos verdes de expansões trialadas, com 50-80 cm de altura. É conhecida popularmente como carqueja, carqueja-amargosa, carqueja-do-mato, carquejinha, tiririca-de-balaio e cacália, sendo nativa do sul e sudeste do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002). *Molina trimera* Less. e *Baccharis genistelloides* var. *trimera* (Less.) Baker são consideradas suas sinónimas botânicas (GIULIANO, 2001).

O amplo uso medicinal popular de *B. trimera* pode ter origem em sua utilização há séculos por povos indígenas (LORENZI; MATOS, 2002). Em estudo etnobotânico realizado com raizeiros em Campo Grande-MS verificou-se que constava entre as 5 espécies mais indicadas e/ou comercializadas (NUNES et al., 2003). As indicações descritas na literatura em artigos científicos de etnobotânica/etnofarmacologia e em obras clássicas sobre plantas medicinais incluem: digestivo, estomáquico, anti-helmíntico, depurativo do sangue, tônico, antitérmico, tratamento de gastrites e úlceras, doenças hepáticas (ex. dores no fígado e hepatite), doenças do intestino, diarreia, impotência sexual masculina, esterilidade feminina, inflamações, reumatismo, diabetes, doenças renais, anemias, gripe, obesidade,

lepra e na cicatrização de feridas; a forma de preparo mais citada é a infusão (AGRA; FRANÇA; BARBOSA-FILHO, 2007; CAMINHOÁ, 1877; CORREA, 1931; MACEDO et al., 2007; MORS; RIZZINI; PEREIRA, 2000; NUNES et al., 2003; PEREIRA; OLIVEIRA; LEMOS, 2004; RITTER et al., 2002).

O uso tradicional de *B. trimeria* tem estimulado o interesse científico sobre esta espécie. Estudos fitoquímicos das partes aéreas da planta resultaram no isolamento e/ou na identificação de diversos metabólitos secundários, incluindo: a) flavonóides: especialmente flavonas do tipo aglicona, além de flavonóis glicosilados ou não e de uma flavanona (BORELLA et al., 2006; GIANELLO et al., 2000; HERZ et al., 1977; KUROYANAGI et al., 1985; NAKASUGI; KOMAI, 1998; SILVA et al., 2006a; SIMÕES-PIRES et al., 2005a; SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987; SUTTISRI et al., 1994); b) diterpenos, principalmente do tipo clerodânico (GIANELLO et al., 2000; HERZ et al., 1977; JANUÁRIO et al., 2004; KUROYANAGI et al., 1985; TORRES et al., 2000); c) derivados do ácido quínico (SIMÕES-PIRES et al., 2005b); d) mistura de saponinas, cuja principal genina identificada foi o ácido equinocístico ou seu enantiômero (GENÉ et al., 1996); e) monoterpenos e sesquiterpenos componentes do óleo essencial das partes aéreas (LAGO et al., 2008a; LAGO et al., 2008b; PALÁCIO et al., 2007; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2006b; SIMÕES-PIRES et al., 2005a; VARGAS et al., 2006).

Diversos estudos farmacológicos foram realizados com extratos de partes aéreas de *B. trimeria*. A avaliação farmacológica dos extratos etanólico 70% (v/v) e aquoso através dos modelos de indução de úlceras em ratos por ácido clorídrico em etanol 60% ou somente por etanol, respectivamente, demonstrou que estes extratos possuem atividade antiulcerogênica (DIAS et al., 2009; GONZALES et al., 2000).

Ainda, o extrato aquoso de *B. triptera* Mart., considerada pelos autores como sinonímia de *B. trimeria*, apresentou ação antiulcerogênica em modelo de

imobilização de ratos a 4°C; verificou-se também a diminuição do trânsito intestinal e da secreção gástrica e aumento do pH gástrico. Não foi constatada ação antiulcerogênica utilizando-se o modelo de indução de úlceras por indometacina. Estes dados sugerem que o extrato deve agir por inibição da secreção gástrica e diminuição da motilidade gastrointestinal. O mesmo extrato não apresentou ações analgésica e anti-inflamatória (GAMBERINI et al., 1991).

Em outro estudo o extrato aquoso apresentou ação anti-inflamatória (GENÉ; MARIN; ADZET, 1996). O fracionamento biomonitorado da fração n-butanólica do extrato aquoso conduziu a uma mistura de saponinas com ação anti-inflamatória, cuja principal genina identificada foi o ácido equinocístico ou seu enantiômero. A fração n-butanólica, além da ação anti-inflamatória, apresentou ações analgésica e ulcerogênica, o que sugere mecanismo relacionado à inibição de ciclooxigenases (GENÉ et al., 1996).

A administração do extrato aquoso reverteu parcialmente os efeitos danosos induzidos pelas toxinas de *Dirphia* sp. em ratos, reduzindo a contagem de leucócitos totais e polimorfonucleares e a atividade da lactato desidrogenase (LEITE et al., 2007). O diterpeno clerodânico 7 α -hidróxi-3,13-clerodadieno-16,15:18,19-diolideo, isolado do extrato CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v), inibiu as atividades hemorrágica, fibrinogenolítica e caseinolítica de metaloproteases isoladas dos venenos de *Bothrops neuwiedi* e *B. jararacussu*. O edema de pata induzido em ratos também foi parcialmente inibido por esta substância, não tendo sido observado efeito anticoagulante (JANUÁRIO et al., 2004).

A atividade antimicrobiana do extrato aquoso foi verificada em ensaios realizados com *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* (AVANCINI; WIEST; MUNDSTOCK, 2000; AVANCINI et al., 2008; BETONI et al., 2006).

O extrato etanólico de *Baccharis trimera* mostrou atividade bacteriana

anti-*S. aureus* (método de difusão em ágar com disco de papel) e a partir do extrato etanólico de *B. trimera* foi obtida uma concentração bacteriostática mínima (CBM) igual a 25 mg/mL (OLIVEIRA et al., 2005).

O extrato etanólico 90% (v/v) demonstrou atividade antiprotozoária moderada em formas amastigota axênica e promastigota de *Leishmania amazonensis* e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. De outro lado, o mesmo extrato foi citotóxico para eritrócitos de carneiro – ação hemolítica (LUIZE et al., 2005).

O extrato etanólico 70% (v/v) das partes aéreas, bem como suas frações clorofórmica e acetato de etila apresentaram ação antioxidante (DIAS et al., 2009). Derivados do ácido quínico identificados no extrato aquoso de *B. trimera* também apresentaram atividade antioxidante (SIMÕES-PIRES et al., 2005b).

Uma fração aquosa do extrato etanólico reduziu a glicemia em ratos diabéticos, sugerindo ação antidiabética de *B. trimera* (OLIVEIRA et al., 2005).

A partir do extrato clorofórmico foi isolado um diterpeno clerodânico dilactônico com ação relaxante sobre a musculatura lisa vascular de ratos (TORRES et al., 2000).

Não foram verificados sinais de alteração aparente no ensaio de toxicidade aguda em camundongos com a administração do extrato etanólico 70% (DIAS et al., 2009). O mesmo tipo de extrato administrado a ratas grávidas não produziu alterações nos parâmetros hematológicos observados nem sinais de toxicidade clínica; de outro lado, foi observada toxicidade hepática e renal, reversível com a descontinuação do tratamento (GRANCE et al., 2008).

O extrato aquoso não produziu efeito mutagênico ou citotóxico em células de medula óssea de ratos (PERON et al., 2008). Porém, em outro estudo o extrato aquoso produziu efeitos genotóxicos (Ensaio Cometa) e mutagênicos (Ensaio de Micronúcleos), mas também foi eficaz na redução de genotoxicidade induzida por

H₂O₂, provavelmente devido a sua ação antioxidante (RODRIGUES et al., 2009). O extrato metanólico apresentou atividade antimutagênica e seu fracionamento biomonitorado permitiu identificar como substâncias responsáveis por tal atividade as flavonas genkwanina, cirsimarina, hispidulina e apigenina (NAKASUGI; KOMAI, 1998).

1.2. *Casearia sylvestris* Swartz

Casearia sylvestris Swartz (seção *Crateria* Benthham) está classificada na tribo *Samydeae*, família *Salicaceae* e ordem *Malpighiales* (CHASE et al., 2002; THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003). Trata-se de uma espécie vegetal arbórea ou subarborescente (1,5-15 m de altura) com ampla distribuição no Brasil, apresentando uma série de nomes comuns: guaçatonga, chá-de-bugre, erva-de-bugre, erva-de-lagarto, cafezinho-do-mato, cambroé, paratudo, etc. É encontrada em quase todas as formações florestais e sua ocorrência foi relatada em 22 estados e no Distrito Federal (ABSY; HOEHNE, 1939; LORENZI, 1992; MARQUETE, 2001). A família *Salicaceae* possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 50 gêneros e 1.000 espécies. O gênero *Casearia* Jacquin (tribo *Samydeae*) possui cerca de 180 espécies com distribuição pantropical (SLEUMER, 1980; TORRES; YAMAMOTO, 1986). Segundo Record e Hess (1942 apud BASILE et al., 1990) ,70 espécies do gênero ocorrem no Brasil.

C. sylvestris tem uma história rica nos sistemas de medicina tradicional no Brasil, estando até hoje incluída no arsenal da “fitoterapia popular”. Na medicina indígena da Amazônia utilizavam-se suas folhas, cascas e raízes como antitérmico (JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985). A espécie está incluída na *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil* 1ª edição (HERVA DE BUGRE), constando como

parte utilizada suas folhas (SILVA, 1926). As indicações como antiofídico, antitérmico, cicatrizante e no tratamento de úlceras e gastrites são as mais comuns. Na maioria das vezes é citado o uso das folhas na forma de chás ou “garrafadas” - preparações hidroalcoólicas de uso tópico (CAMINHOÁ, 1877; COIMBRA, 1958; HOEHNE, 1939; LORENZI; MATOS, 2002; PEREIRA et al., 1992).

A grande diversidade de usos populares de *C. sylvestris* no Brasil despertou desde há muitos anos o interesse de grupos de pesquisadores, especialmente botânicos, etnobotânicos, farmacologistas e fitoquímicos. Como consequência, há diversos artigos publicados na literatura tratando da avaliação farmacológica de seus extratos. A maior parte das pesquisas verificou as atividades antiofídica (BORGES et al., 2000; CAVALCANTE et al., 2007; RASLAN et al., 2002), antiulcerogênica (BASILE et al., 1990; SERTIÈ; CARVALHO; PANIZZA, 2000; USP; FAPESP; UNESP, 2009), anti-inflamatória (PEREIRA et al., 1992; SILVA et al., 2004) e cicatrizante (CAMARGO et al., 1996; GOMES et al., 2005), todas relacionadas ao uso medicinal popular.

O óleo essencial das folhas inibiu o crescimento das bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus*, *Shigella flexnerii*, *Enterobacter*, *Staphylococcus epidermitis*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*, sendo mais eficaz contra as bactérias gram-positivas (SCHNEIDER et al., 2006). Dois ésteres derivados do ácido gálico (IGDE e MGDE) isolados a partir do extrato etanólico das folhas apresentaram atividade antimicrobiana em *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, com ação mais pronunciada nas bactérias gram-positivas *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* (SILVA et al., 2006b). Em outro estudo envolvendo testes para avaliar a ação antibacteriana do extrato de *C. sylvestris*, realizado através do método de difusão em ágar, com disco de papel, verificou-se que o extrato apresentou no antibiograma ação inibitória em *S. aureus*, *S. mutans*, *S.*

saluvarius, e resistência para *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. typhimurium*, na concentração testada (0,74 mg/mL). No teste de diluição seriada em tubos, os valores de CIM para *S. typhimurium*, *E. coli* e *S. aureus* foram de 3,7 mg/mL e para *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *S. salivarius* de 1,85 mg/mL; a CBM foi de 5,55mg/mL para *E. coli* e *S. typhimurium*, de 3,7 mg/mL para *S. aureus* e *P. aeruginosa* e de 1,85 mg/mL para *S. mutans* e *S. salivarius* (NARDI et al., 2004).

Os ensaios toxicológicos realizados têm demonstrado baixa toxicidade via oral de extratos de *C. sylvestris* (BASILE et al., 1990; FAPESP; UNESP; USP, 2003; SANTOS, 2008). Há cinco patentes depositadas de produtos farmacêuticos à base de *C. sylvestris*, relacionadas às atividades antitumoral, antiulcerogênica e com aplicação no tratamento do herpes (FAPESP; UNESP; USP, 2003; KIRIN BREWERI, 1987; UNESP, 2008; UNICAMP, 2006; USP; FAPESP; UNESP, 2009).

Metabólitos secundários isolados e/ou identificados em *C. sylvestris* incluem monoterpenos e sesquiterpenos componentes do óleo essencial das folhas (SANTOS, 2008; SCHNEIDER et al., 2006), *nor*-isoprenóides (SANTOS, 2008; WANG et al., 2009a) triterpenos, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido vanílico, lapachol (RASLAN et al., 2002), flavonóides (RASLAN et al., 2002; JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985), neolignanas (WANG et al., 2010), derivados do ácido elágico com ação inibitória sobre o veneno de *Bothrops jararacussu* (SILVA et al., 2006a), ésteres derivados do ácido gálico (IGDE e MGDE) que apresentaram, além da atividade antimicrobiana já citada, ação antitumoral (SILVA et al., 2009).

Diversos diterpenos clerodânicos e *ent*-kauranos foram isolados de *C. sylvestris*, dentre os quais 28 diterpenos clerodânicos típicos do gênero *Casearia*: casearinas A-X (CARVALHO et al. 1998; ITOKAWA et al. 1990; MORITA et al. 1991; SANTOS et al. 2010; WANG et al. 2009b) e caseargrewiina F (SANTOS et al. 2010), isolados de folhas; casearvestrinas A-C, isoladas de folhas e ramos (OBERLIES et

al. 2002); *rel-19S-acetoxi-18R-butanoiloxi-18,19-epoxi-6S-hidroxi-2R-(2-metilbutanoiloxi)-5S,8R,9R,10S-cleroda-3,13(16),14-trieno*, isolado das raízes (ESPÍNDOLA et al. 2004). Alguns destes diterpenos exibiram atividade citotóxica em células tumorais, antiulcerogênica, tripanossomicida e antifúngica (ITOKAWA et al., 1990; OBERLIES et al., 2002; SANTOS, 2008; SANTOS et al., 2010).

Em um estudo de fracionamento biomonitorado com foco na ação antiulcerogênica, o extrato etanólico, sua fração de diterpenos e as casearinas B, D, O, X e a caseargrewiina F reduziram em até 100% o número de lesões gástricas agudas em úlceras induzidas por etanol em ratos. A administração da casearina X (inicialmente chamada de casearina U em SANTOS, 2008) na dose de 172,0 mg/kg, cerca de 100 vezes maior do que a DE_{100} para a ação antiulcerogênica (1,68 mg/kg), não produziu nenhum tipo de alteração nos animais nos ensaios de toxicidade aguda via oral, indicando, preliminarmente, bom índice terapêutico. A casearina X e a caseargrewiina F foram quantificadas por CLAE-UV, apresentando teores de 8,6 e 4,0% (m/m), respectivamente, no extrato etanólico de folhas. O teor diterpenos totais do tipo das casearinas em relação à caseargrewiina F foi determinado como 18,0% (m/m) através de CLAE-DAD (SANTOS, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

A presente pesquisa teve como objetivo geral avaliar a atividade antibacteriana de plantas medicinais usadas popularmente no tratamento de doenças do trato digestório.

2.2. Objetivos específicos

Os objetivos específicos para o desenvolvimento do trabalho foram os seguintes:

- Avaliar a atividade antibacteriana de diferentes extratos de partes aéreas de *B. trimera* e de folhas de *C. sylvestris* usando o *H. pylori* e outras bactérias.
- Realizar o fracionamento biomonitorado dos extratos que exibiram ação contra bactérias através de técnicas cromatográficas.
- Caracterizar quimicamente as frações que exibiram atividade antibacteriana.
- Avaliar a atividade antibacteriana de substâncias purificadas a partir de frações dos extratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta - *B. trimera* e *C. sylvestris*

O material vegetal foi coletado no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas "Profa. Dra. Célia Cebrian de Araujo Reis" da FCF-UNESP: partes aéreas para *B. trimera* (nos dias 20 e 27 de outubro e 03 de novembro de 2009) e folhas para *C. sylvestris* (no dia 15 de janeiro e dia 01 de março de 2010). A exsicata do espécime de *C. sylvestris* está depositada no herbário "Maria Eneida P. Kaufmann" do Instituto Botânico do Estado de São Paulo, sob o código AGS 101. O espécime de *B. trimera* cultivado no horto pertence a uma variedade desenvolvida e fornecida pelo CPQBA-UNICAMP, tendo sido identificada pelo Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento do Laboratório de Farmacobotânica da FCF-UNESP, colaborador deste projeto.

3.2. Preparo do material vegetal

As partes aéreas da *B. trimera* e as folhas da *C. sylvestris* foram submetidas ao processo de secagem em estufa com circulação de ar à 40° C, durante o período de 7 dias. Em seguida, o material seco foi fragmentado em moinho de facas.

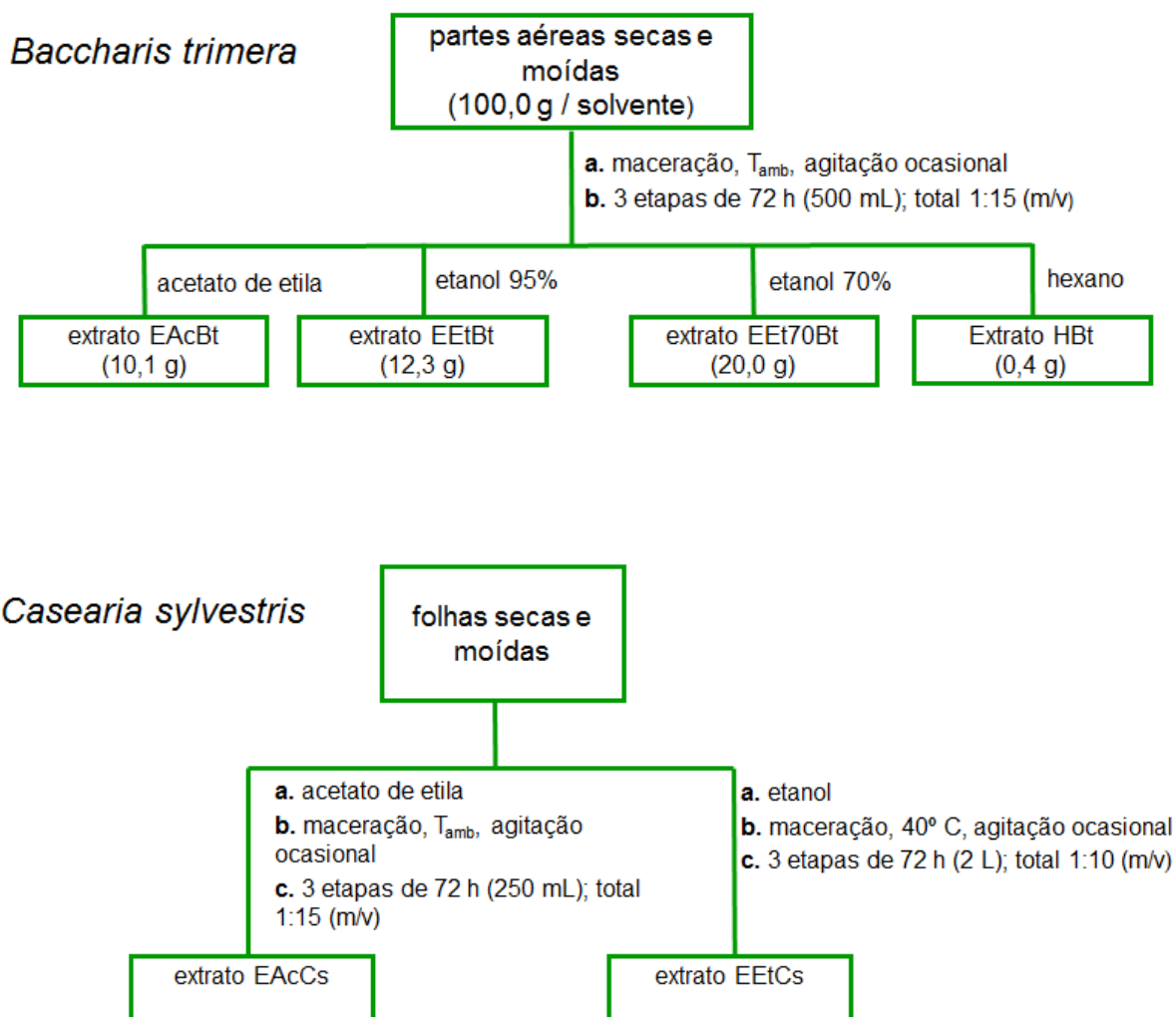
3.3. Extração

B. trimera: a extração com solventes orgânicos foi realizada através do método de maceração à temperatura ambiente e sob agitação ocasional, em 3 etapas de 72 h cada. A massa de droga vegetal, obtida a partir das partes aéreas da *B. trimera*, utilizada para cada extração foi de 100,0 g e o volume total de solvente (dividido nas 3 etapas de extração) foi de 1.500 mL. Portanto, a relação droga vegetal/solvente utilizada foi de 1:15 (m/v). Como solventes extratores foram

utilizados: a) hexano, b) acetato de etila, c) etanol 95% e d) etanol 70%. O extrato aquoso foi preparado utilizando-se 500,0 g de droga vegetal e 4,4 L de água deionizada, permanecendo à 40° C durante 12 h (2 etapas de 6 h, com 3,25 L na primeira e 1,15 na segunda etapa), com agitação de 30 em 30 minutos. Dessa forma, a relação droga vegetal/solvente utilizada foi de 1:8,8 (m/v) (Figura 1).

C. sylvestris: O extrato acetato de etila da droga vegetal foi produzido através do mesmo método utilizado para os extratos de *B. trimera* obtidos com solventes orgânicos. O extrato etanólico de folhas secas e moídas de *C. sylvestris* foi preparado com 2,0 Kg da droga vegetal, utilizando-se o método de maceração à 40° C com agitação ocasional e etanol (20 L) como líquido extrator na proporção 1:10 (m/v), durante o período de 7 dias (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma que esquematiza o processo de preparação dos extratos de *B. trimera* e *C. sylvestris*



3.4. Purificação e Secagem dos extratos

As soluções extrativas obtidas foram separadas do material vegetal por filtração simples, submetidas à concentração em evaporador rotativo, secas sob fluxo de ar em capela e, finalmente, em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida, com exceção do extrato aquoso de *B. trimera* que foi apenas liofilizado.

3.5. Fracionamento do extrato etanólico de *C. sylvestris*

Esta parte do trabalho foi realizado em colaboração com aluna de doutorado Elaise Gonçalves Pierri do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, sob orientação do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos. Foi realizada uma extração em fase sólida (EFS) com 20,0 g de extrato etanólico seco de folhas de *C. sylvestris*. O extrato foi misturado com a fase estacionária (1:1, m/m) e aplicado em coluna de vidro contendo sílica gel (60-200 μm) e carvão ativo em pó (20 x 5 cm). A eluição ($V_{\text{eluyente}} = 700,0 \text{ mL}$) foi realizada sob vácuo com os seguintes eluentes: 1. hexano/acetato de etila 95:05 (v/v) (fração EFS1); 2. acetato de etila (fração EFS2); 3. metanol (fração EFS3). As frações foram concentradas em evaporador rotativo e, em seguida, secas sob fluxo de ar em capela e em dessecador com sílica gel sob vácuo.

3.6. Obtenção do extrato acetato de etila de *B. trimera* em maior escala e seu fracionamento

O método de extração utilizado foi maceração com aquecimento a 35° C, com agitação ocasional e renovação do líquido extrator (remaceração). Para isso, foram pesados em balança semi-analítica cerca de 500 g de droga vegetal, a qual foi intumescida com 1000 mL de acetato de etila. Posteriormente, adicionou-se mais 1000 mL de acetato de etila dando início ao processo de extração. No total, foram realizadas três etapas (1000 mL cada) com duração de 8, 24 e 72 h. Este procedimento foi realizado três vezes e inclui uma etapa de intumescimento. Após a reunião dos extratos líquidos obtidos resultou um total de 4.000 mL.

A solução extrativa foi filtrada em papel de filtro e concentrada em rota-evaporador sobre pressão reduzida (530-540 atm) à 45 °C. Foi realizada uma EFS com 30,0 g do extrato acetato de etila seco de partes aéreas de *B. trimera*. O extrato

foi aplicado (solubilizado no eluente inicial) em coluna de vidro contendo sílica gel (74-250 μm) (12 x 10,5 cm). A eluição (V_{eluente} : 1.800 mL) foi realizada sob vácuo como segue: 1. hexano/ acetato de etila 95:05 (v/v) (frações 1 e 2); 2. acetato de etila (frações 3 e 4); 3. acetato de etila/metanol 1:1 (v/v) (frações 5 e 6); 4. metanol (frações 7 e 8). As frações foram concentradas em evaporador rotativo e, em seguida, secas sob fluxo de ar em capela e em dessecador com sílica gel sob vácuo. Esta etapa do trabalho foi realizada pela aluna de mestrado Josiane Clarice Claudino do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, sob orientação do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos.

3.7. Análise de frações obtidas de extratos de *C. sylvestris* e de *B. trimera*

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) das frações obtidas para *C. sylvestris* e *B. trimera* (5,0 mg/mL, acetato de etila ou metanol) foi desenvolvida em placas cobertas com sílica gel G60 Merck® (20 x 20 cm x 0,25 mm), utilizando como FM hexano/acetato de etila/isopropanol 70:28:02 (v/v) e anisaldeído sulfúrico como revelador. Para *C. sylvestris* foram utilizados como padrões os diterpenos caseargrewiina F, casearinas B e X (1,0 mg/mL, acetato de etila).

3.8. Isolamento dos diterpenos clerodânicos

Os diterpenos clerodânicos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana foram obtidos por SANTOS (2008) em seu trabalho de doutorado, conforme descrito a seguir. As folhas secas e pulverizadas de *C. sylvestris* foram extraídas com etanol em extrator de aço inoxidável, com recirculação do solvente, durante cerca de 24 h a 40 ° C. O extrato bruto foi concentrado sob pressão reduzida e depois submetido a secagem. Uma parte do extrato foi fracionado por EFS em sílica (60-200 μm) /

carvão ativado (1:1, m / m) por eluição com hexano / acetato de etila (95: 5, v / v), acetato de etila e metanol, para se obter três frações (EFSCs1, 2 e 3). EFSCs2 foi submetido à cromatografia em coluna de fase normal (sílica gel; 40-63 µm), eluindo com um gradiente de hexano / acetato de etila / isopropanol com polaridade crescente produzindo 45 frações. Algumas frações foram submetidas a CLAE preparativo de fase reversa (C18) com metanol: água como fase móvel para obter os compostos casearina X e caseargrewiina F. Os compostos foram identificados por análise de espectrometria de (RMN, EM, IV, UV), como descrito por Santos et al. (2010) e Santos (2008).

3.9. Preparo das soluções estoque dos extratos, frações e substâncias para avaliação da atividade antibacteriana

As soluções estoque dos extratos e frações utilizadas na avaliação da atividade bacteriana anti-*Escherichia coli* e anti-*Staphylococcus aureus* foram preparadas como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Proporções usadas de solventes no preparo das soluções estoque para testes de atividade bacteriana anti-*E. coli* e anti-*S. aureus* e as respectivas concentrações finais.

Extratos	Solventes			
	Metanol : água	Metanol : água: tween 80	Concentração (µg/mL)	Concentração inicial testada (µg/mL)
EACs	20:80	—	2.000	1.000
EFSCs2	—	20: 78: 02	2.000	1.000
EACBt	15:85	—	500	250
EETbT	10:90	—	500	250
EET70Bt	10:90	—	500	250

Os extratos avaliados nos testes com *H. pylori* foram preparados de modo a obter-se uma solução estoque de concentração igual a 2.000 µg/mL. As soluções estoque dos extratos foram preparadas como descrito na tabela 2.

Tabela 2. Proporções usadas de solventes no preparo das soluções estoque para testes de atividade bacteriana anti-*H. pylori* e as respectivas concentrações finais:

Extratos	Solventes			
	Metanol : água	Metanol : água: tween 80	Concentração (µg/mL)	Concentração inicial testada (µg/mL)
EAcCs	—	20: 78: 02	2.000	1.000
EEtCs	—	20: 78: 02	2.000	1.000
EAcBt	—	20: 78: 02	2.000	1.000
EEtBt	20:80	—	2.000	1.000
EEt70Bt	20:80	—	2.000	1.000

As frações obtidas do extrato acetato de *B. trimera* foram preparadas em uma solução estoque de concentração igual a 1.000 µg/mL. A mistura de solventes composta por de metanol: água: tween 80 (20 : 78 : 02, v/v) foi utilizada na solubilização das frações (EFSBt de 1 a 8). Os compostos casearina X e caseargrewiina F isoladas da fração de diterpenos de *C. sylvestris* (EFSCs2) foram preparados da mesma forma. Portanto, as concentrações iniciais testadas dessas frações e compostos foram todas iguais a 500 µg/mL.

3.10. Ensaio da atividade antimicrobiana

Os ensaios foram realizados no laboratório de Fisiologia de Micro-organismos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP/Araraquara, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Taís Maria Baub.

3.10.1 Amostras das cepas padrões

De acordo com ATCC (*American Type Culture Collection*), as seguintes cepas padrões foram utilizadas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Helicobacter pylori* ATCC 43504.

3.10.2 Estocagem e manutenção das cepas bacterianas

As cepas bacterianas, com exceção do *H. pylori*, foram mantidas em caldo Mueller-Hinton (CMH) acrescido de 50% de glicerol e mantido a -20°C. Para uso, as cepas foram repicadas em CMH (2 mL), incubados por 24h a 37°C.

A cepa de *H. pylori* foi mantida em CMH contendo 50% de soro fetal bovino (SFB) acrescido de 50 % de glicerol e mantido a -20°C. Para o uso, o *H. pylori* foi repicado em CMH acrescido de 50% de SFB e incubado a 37°C, por 72 h em 10% de CO₂ e umidade.

3.10.3 Padronização da suspensão bacteriana

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em CMH, para as bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella sp* e *P. aeruginosa*, adicionando-se Solução Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2 estéril até atingir uma turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm

para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, na qual foi utilizada nos ensaios.

Para *H. pylori*, a suspensão foi padronizada a partir de uma cultura em ágar Sangue (AS) de 72 horas com 10% de CO₂, adicionando-se caldo Mueller-Hinton (CMH) acrescido de 50% de SFB até atingir uma turvação igual à suspensão do tubo 2 da escala McFarland (aproximadamente 6×10^8 UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 570nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH acrescido de 50% de SFB, obtendo-se uma suspensão de 6×10^7 UFC/mL, na qual foi utilizada nos ensaios.

3.10.4 Preparo das soluções contendo substâncias de referência para o controle positivo (SANCHES, 2004)

Foi utilizado como controle positivo o cloridrato de ciprofloxacino na concentração de 35 µg/mL ou ampicilina na concentração de 16 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para *Helicobacter pylori* foi utilizado como controle positivo omeprazol na concentração de 64 µg/mL ou amoxicilina na concentração de 0,12 µg/mL.

3.10.5 Avaliação da atividade antibacteriana: Método de diluição em microplaca com determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (ELLOF, 1998; CLSI, 2007)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita

segundo a norma M7-A6 do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003) para as bactérias aeróbicas e adaptada para as fastidiosas.

O teste foi realizado utilizando as colunas das microplacas (colunas de 1 a 12). Aos orifícios das linhas de A até H das colunas de 1 a 12 foram adicionados 80 μL de CMH para *S. aureus* e *E. coli* e 80 μL de CMH acrescido de 50% de SFB para *H. pylori*. Aos orifícios da coluna 3 da linha de A a H foram adicionados 100 μL da solução-estoque do controle positivo (antibiótico adequado para cada bactéria utilizada). Aos orifícios das colunas de 4 a 9 apenas na linha A foram adicionados 100 μL das amostras 1 e 2, sendo que das colunas de 4 a 6 uma amostra em triplicata e nas colunas de 7 a 9 outra amostra também em triplicata. Da linha A até H (nas colunas de 4 a 9) foi realizada uma diluição sucessiva transferindo 100 μL de cada orifício para o subsequente, assim foi obtido um volume final de 80 μL nesses orifícios da microplaca com as concentrações finais das amostras de 1.000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 $\mu\text{g/mL}$ (no caso de amostras de solução estoque de concentração igual a 2.000 $\mu\text{g/mL}$). Aos orifícios da coluna 10 entre as linhas A até H foram adicionados 100 μL da mistura de solventes (controle negativo). Por fim, aos orifícios das colunas 11 e 12, linha A foram adicionados 100 μL das amostras vegetais sendo a homogeneização idêntica aos das colunas 4 a 9 (controle das amostras).








Subsequentemente foram adicionados 20 μL da suspensão bacteriana de 10^7 UFC/mL em cada orifício, exceto nos orifícios da coluna 1 (branco) e nos orifícios de controle da amostra (colunas 11 e 12). As microplacas foram incubadas à 37° C por 24 h (*S. aureus* e *E. coli*) e para *H. pylori* as microplacas foram incubadas à 37° C por 72 h sob condições de microaerofilia com 10% de CO₂ e umidade.

A Figura 2 esquematiza a realização do teste em microplacas

3.10.6 Realização da leitura utilizando resazurina como revelador

A resazurina (fenoxazin-3-ona) é um corante indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado na determinação da atividade antibacteriana. Foram pipetados 50 μL de solução de resazurina a concentração de 0,0005 mg/5mL nos orifícios das microplacas que foram incubadas em temperatura ambiente por 2 h ou até que ocorresse mudança de coloração. A manutenção da cor azul nos orifícios é interpretada como ausência de crescimento bacteriano. O crescimento dos microrganismos é revelado pela demonstração da redução do meio com a resazurina, que passa de azul para róseo. A CIM foi definida como a menor concentração de amostra vegetal sem a mudança de coloração para róseo (COLLINS e FRANZBLAU, 1997; MONTEJANO, 2005; PALOMINO *et al.* 2002).

Figura 2. Esquema de organização das unidades experimentais empregadas no teste de microplacas para avaliação da atividade antibacteriana das amostras nos ensaios com os microrganismos testados.

-  **Coluna 1:** Meio de cultura Muller- Hinton.
-  **Coluna 2:** Meio de cultura + bactérias.
-  **Coluna 3:** Controle positivo: meio de cultura + antibiótico + bactérias.
-  **Colunas 4 a 6:** Teste em triplicata: meio de cultura + extratos 1 + bactérias.
-  **Colunas 7 a 9:** Teste em triplicata: meio de cultura + extratos 2 + bactérias.
-  **Coluna 10:** Controle negativo: meio de cultura + Mistura de solventes adequada para cada extrato + bactérias
-  **Colunas 11 e 12:** Controle das amostras: meio de cultura + extratos 1 e 2, respectivamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

3.10.7 Interpretação geral dos resultados dos controles e testes das amostras após revelação com resazurina

Na coluna 1 foi adicionado somente o meio Caldo Mueller-Hinton (CMH), após o processo de revelação a manutenção da cor azul indica que o meio de cultura não apresentava nenhum tipo de contaminação que poderia gerar erros na interpretação dos resultados. Contudo, o aparecimento da cor rósea indica que o meio de cultura está contaminado e pode gerar erros nos resultados.

Na coluna 2 foi adicionado meio de cultura CMH e quantidade adequada da suspensão bacteriana. Após o processo de revelação o aparecimento da cor rósea, nos orifícios, indica que a suspensão bacteriana usada estava viável.

Na coluna 3 foi preparado o controle positivo e, portanto a manutenção da cor azul indica que o antibiótico usado teve atividade antibacteriana.

Nas colunas de 4 a 9 foram preparados os testes com as amostras 1 e 2 (extratos vegetais, frações e substâncias solubilizadas em mistura de diluentes adequado). Após a revelação (coluna de 4 a 9) a manutenção da cor azul indicou que as amostras testadas apresentaram atividade antibacteriana. Por outro lado,

diante do aparecimento de cor rósea o resultado foi negativo, ou seja, indica que o extrato, fração ou substância não demonstraram atividade antibacteriana.

Na coluna 10 foi preparado o controle negativo com adição da mistura de solventes. Dessa forma, após o processo de revelação a manutenção da cor azul indica que a mistura de solventes teve ação antibacteriana. Nesse caso, a mistura de solventes (usada para o preparo da solução estoque da amostra testada) pode interferir na determinação dos resultados. Portanto, outro teste deve ser feito trocando a mistura de solventes da amostra para outra que não interfira nos resultados.

Nas colunas 11 e 12 foi preparado o controle das amostras, uma vez que adicionou-se somente CMH e as amostras. Diante disso, a manutenção da cor azul indica que a solução estoque das amostras testadas não apresentam contaminação. Por outro lado, o aparecimento da cor rósea indica que as amostras estavam contaminadas, o que pode interferir na interpretação dos resultados.

4. RESULTADOS

4.1. Fitoquímica

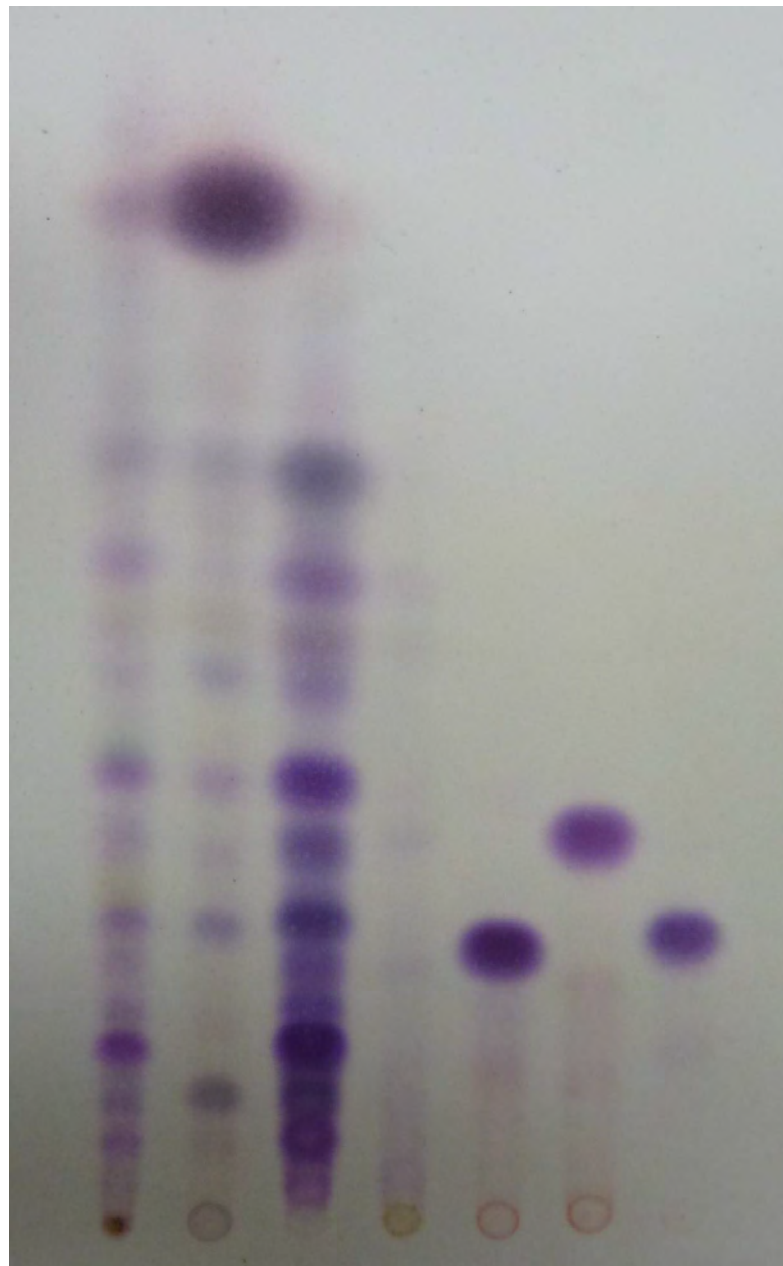
Os valores dos rendimentos das extrações iniciais (100 x massa de extrato seco/massa de droga vegetal) para *B. trimera* foram de 0,4, 10,1, 12,3 e 20,0%, respectivamente para extratos hexânico (**EHBt**), acetato de etila (**EAcBt**), etanol 95% (**EEtBt**) e etanol 70% (**EEt70Bt**). De modo geral, observou-se um aumento do rendimento da extração com o aumento da polaridade do solvente orgânico extrator. O rendimento do extrato aquoso de *B. trimera* (**EAqBt**) foi de 4,8%. O rendimento do extrato etanólico de *C. sylvestris* (**EEtCs**) foi de 11,8%; o rendimento para o extrato acetato de etila produzido em maior escala (**EAcCs**) não foi calculado, pois houveram perdas durante a sua manipulação.

As massas das frações obtidas do extrato acetato de etila de *B. trimera* produzido em maior escala foram: EFSBt1 = 53,7 mg; EFSBt2 = 162,1 mg; EFSBt3 = 1.786,7 mg; EFSBt4 = 7.403,9 mg; EFSBt5 = 12.133,5 mg; EFSBt6 = 2.243,9 mg; EFSBt7 = 1.647,3 mg; EFSBt8 = 3.114,2 mg. No fracionamento do extrato etanólico de *C. sylvestris* foram obtidas as seguintes massas: EFSCs1= 0,773 g, EFSCs2= 5,936 g; EFSCs3= 3,123 g.

A cromatoplaça (Figura 3) obtida a partir da análise das frações do extrato etanólico de *C. sylvestris* demonstra a presença de diterpenos clerodânicos apenas na fração EFSCs2. A fração EFSCs3 não eluiu nas condições de análise utilizadas. Isto demonstra que apenas EFSCs2 contém os diterpenos do extrato etanólico.

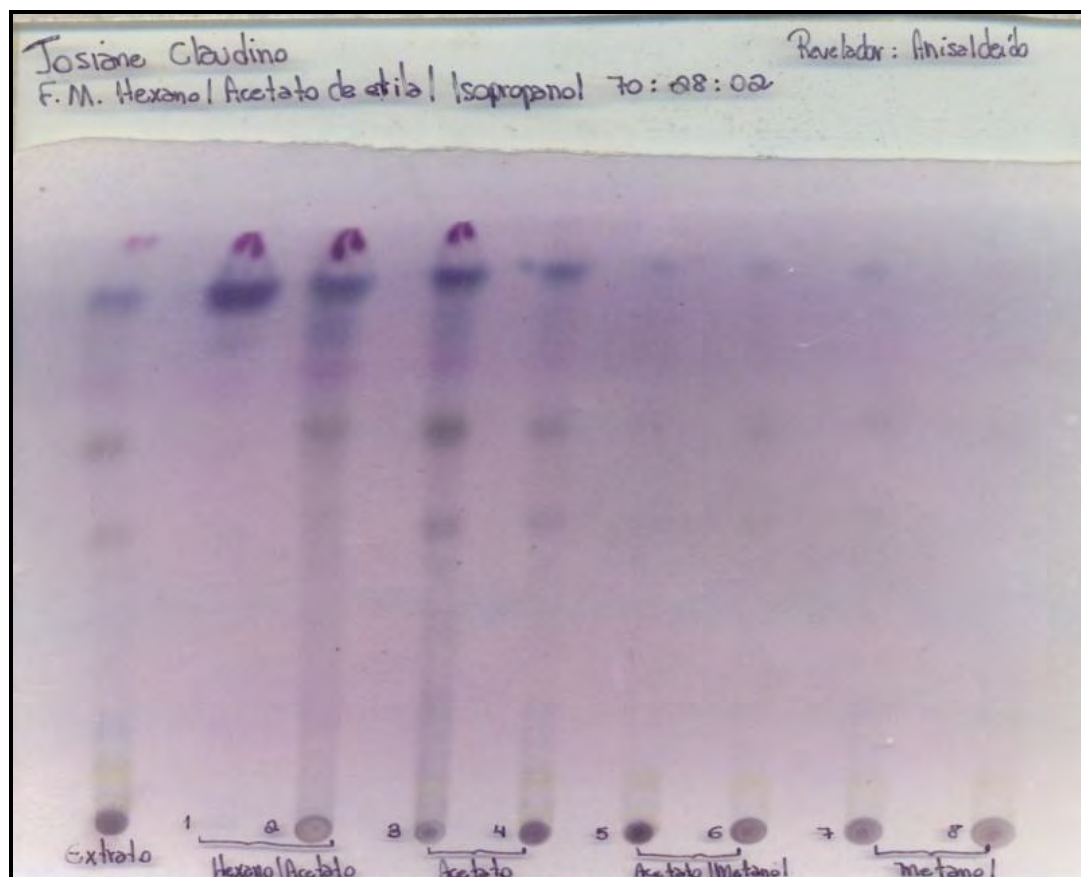
Já o fracionamento do extrato acetato de etila de *B. trimera* demonstrou que foram produzidas frações (EFSBt) com composição química distinta, adequadas para serem testadas segundo a metodologia de Fracionamento Biomonitorado. A cromatoplaça das frações EFSBt é apresentada na Figura 4.

Figura 3: Cromatoplaça (sílica gel) do extrato etanólico (**EEtCs**), das frações (**EFSCs 1**), (**EFSCs 2**), (**EFSCs 3**) (5,0 mg/mL, metanol) e padrões de diterpenos: caseargrewiina F (**CasgwF**), casearina X (**Cas X**), casearina B (**Cas B**) (1,0 mg/mL, metanol).



EEtCs EFSCs1 EFSCs2 EFSCs3 CasgwF CasX CasB

Figura 4. Cromatoplaça resultante da análise das frações EFSBt1 a EFSBt8 (*B. trimera*), aplicadas em sequência após o extrato acetato de etila.



4.2. Ensaios de atividade antibacteriana

4.2.1. Avaliação da atividade antibacteriana – teste de diluição em microplaca para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os testes controle foram analisados e todos atingiram resultados satisfatórios, conforme item 3.10.6. Portanto, não ocorreram possíveis interferências nos resultados finais aqui apresentados.

Extratos, frações e substâncias de ambas as espécies vegetais foram avaliadas nos testes de diluição em microplaca.

Os resultados obtidos, referentes à atividade antibacteriana das amostras feitas em ensaios com o *S. aureus*, a *E. coli* e o *H. pylori* estão relacionados na Tabela 3:

Tabela 3. Determinação da CIM pelo método de diluição em microplaca

<i>Amostra vegetal</i> ($\mu\text{g/mL}$)	Bactérias		
	<i>Helicobacter</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>
	<i>Pylori</i>	<i>aureus</i>	<i>coli</i>
EAcCs	125	125	> 1000
EFSCs 2	> 1000	31,25	> 1000
Casearina X	> 500	> 500	> 500
Caseargrewiina F	> 500	> 500	> 500
EEtCs	500	>1000	> 1000
EAcBt	250	62,5	> 250
EFSBt 1	> 500	> 500	> 500
EFSBt 2	> 500	> 500	> 500
EFSBt 3	> 500	> 500	> 500
EFSBt 4	> 500	> 500	> 500
EFSBt 5	> 500	> 500	> 500
EFSBt 6	> 500	> 500	> 500
EFSBt 7	> 500	> 500	> 500
EFSBt 8	> 500	> 500	> 500
EEtBt	500	> 250	>250
EEt70Bt	500	> 250	>250
EHBt	—	> 1000	> 1000

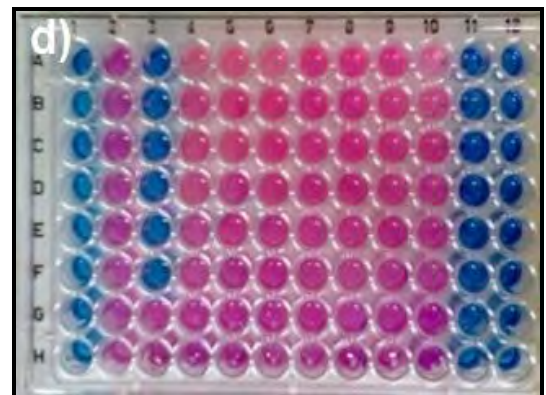
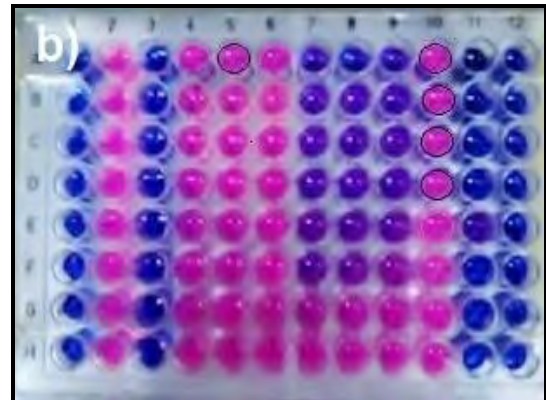
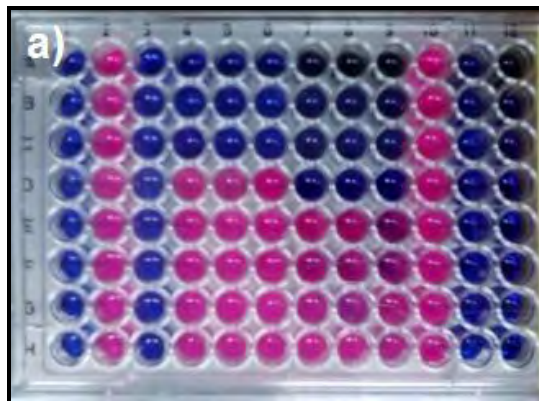
Os extratos acetato de etila, etanólico e etanol 70% de *B. trimera* apresentaram atividade anti-*H. pylori*, com valores de CIM de 250, 500 e 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os extratos de *C. sylvestris* também apresentaram ação anti-*H. pylori* com valores de CIM iguais a 125 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato acetato de etila e de 750 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato etanólico (Tabela 3). O extrato hexano de *B. trimera* não foi avaliado em testes com o *H. pylori* (problemas de solubilidade).

Nos testes envolvendo avaliação da atividade bacteriana anti-*Staphylococcus aureus* das amostras dos extratos e de uma fração (EFSCs2) os extratos acetato de etila de ambas as espécies vegetais apresentaram atividade bacteriana anti-*S. aureus*, com valores de CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de *C. sylvestris* e de 62,5 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de *B. trimera*. A fração de diterpenos de *C. sylvestris* (EFSCs2) mostrou atividade bacteriana anti-*S. aureus*, com valor de CIM igual a 31,25 $\mu\text{g/mL}$. O extrato etanólico de *C. sylvestris* assim como os demais extratos de *B. trimera* (extrato etanólico, etanol 70% e hexano) não apresentaram atividade bacteriana anti-*S. aureus* nas concentrações avaliadas (Tabela 3).

Nenhuma das amostras demonstrou atividade bacteriana anti-*E. coli* nas concentrações testadas (Tabela 3).

Os resultados de atividade antibacteriana obtidos de algumas amostras para *S. aureus* e *E. coli* apresentados na Tabela 3 e discutidos acima estão representados na Figura 5 com os testes das microplacas reveladas utilizando resazurina.

Figura 5. Resultado de microplaca de alguns ensaios de atividade antibacteriana, reveladas utilizando-se resazurina: a) microplaca teste de atividade bacteriana anti-*S. aureus*, amostras extratos acetato de etila de *B. trimera* (CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$) e acetato de etila de *C. sylvestris* (CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$); b) microplaca teste de atividade bacteriana anti-*S. aureus*, amostras extrato hexânico de *B. trimera* e fração de diterpenos de *C. sylvestris* (CIM de 31,25 $\mu\text{g/mL}$); c) microplaca teste de atividade bacteriana anti-*E. coli*, amostras extratos acetato de etila de *B. trimera* e acetato de etila de *C. sylvestris*; d) microplaca teste de atividade bacteriana anti-*E. coli*, amostras extrato hexânico de *B. trimera* e fração de diterpenos de *C. sylvestris*.



Como nenhum extrato testado apresentou atividade bacteriana anti-*Escherichia coli* os testes de avaliação da atividade bacteriana anti-*E. coli* foram encerrados nesta etapa.

As frações obtidas do extrato acetato de etila de *B. trimera* (EFSBt de 1 a 8) e os diterpenos casearina X e caseargrewiina F isolados da fração EFSCs2 de *C. sylvestris* também foram avaliados nos testes de diluição em microplaca, não apresentando nas concentrações testadas ação bacteriana anti-*H. pylori* e anti-*S. aureus*.

5. DISCUSSÃO

Os resultados descritos no presente trabalho demonstram que extratos de ambas as plantas apresentam atividade bacteriana anti-*H. pylori* e anti-*S. aureus*.

Os extratos acetato de etila e etanólico de *C. sylvestris* apresentaram atividade anti-*H. pylori* nas concentrações de 125 e 750 µg/mL, respectivamente. Por esta razão, avaliamos a atividade da fração EFSCs2 do extrato etanólico de *C. sylvestris*, pois ela é constituída majoritariamente por diterpenos clerodânicos (SANTOS, 2008) e a maior atividade exibida pelo extrato acetato de etila sugeriu-nos que esta atividade poderia estar relacionada a presença destas substâncias em maior quantidade no extrato acetato de etila. Pela mesma razão avaliamos a atividade dos diterpenos casearina X e caseargrewiina F. No entanto, nem a fração EFSCs2 nem os diterpenos purificados apresentaram ação anti-*H. pylori*, sugerindo que outras substâncias presentes nos extratos devam ser responsáveis pela ação anti-*H. pylori*, como por exemplo sesquiterpenos ou flavonoides (SANTOS, 2008).

Nos ensaios com *S. aureus*, o extrato acetato de etila de *C. sylvestris* apresentou ação antibacteriana, mas o extrato etanólico não demonstrou tal atividade. Neste caso, a fração EFSCs2 também mostrou atividade antibacteriana com valor de CIM= 31,25 µg/mL, mas novamente os diterpenos não apresentaram tal ação. Além dos diterpenos, a fração EFSCs2 contém outras substâncias, dentre as quais sesquiterpenos, que poderiam ser responsáveis por tal ação (SANTOS, 2008).

Os extratos acetato de etila, etanol 70% e etanólico de *B. trimera* exibiram atividade bacteriana anti-*H. pylori* nas concentrações de 250, 500 e 500 µg/mL,

respectivamente. Por apresentar menor valor de CIM, o extrato acetato de etila foi fracionado, mas nenhuma das frações resultantes demonstrou ação antibacteriana.

Com relação aos ensaios com *S. aureus*, apenas o extrato acetato de etila de *B. trimeria* mostrou ação antibacteriana (CIM= 62,5 µg/mL). No entanto, como nos ensaios com *H. pylori*, as frações deste extrato também não apresentaram ação antibacteriana.

Com base nestes resultados sugerimos uma possível ação sinérgica aditiva de substâncias presentes nos extratos de *B. trimeria*, já que com o fracionamento houve perda de atividade. Além disso, os resultados podem ser explicados pela perda de componentes por possível degradação durante estudo realizado.

Nos ensaios de ação antibacteriana nenhum dos extratos de ambas as espécies demonstraram atividade bacteriana anti-*E. coli*, nas concentrações testadas.

Os resultados obtidos podem ser comparados com dados encontrados na literatura. O extrato etanólico de *B. trimeria* mostrou atividade bacteriana anti-*S. aureus* (CBM= 25 mg/mL) (OLIVEIRA et al., 2005). No presente trabalho, o extrato etanólico de *B. trimeria* não apresentou tal atividade. A divergência dos resultados pode ser explicada pelas diferentes concentrações de extrato utilizadas, sendo que neste trabalho a concentração do extrato foi 100 vezes menor. Além disso, os métodos utilizados foram diferentes e há fatores ambientais e genéticos que produzem variabilidade química nos vegetais, que se reflete nas ações biológicas de extratos.

Com relação a *C. sylvestris*, o óleo essencial de suas folhas e dois ésteres do ácido gálico isolados das folhas apresentaram atividade antibacteriana em ensaios com diversas bactérias, incluindo *S. aureus* e *E. coli*, revelando-se mais eficazes contra bactérias gram-positivas (SCHNEIDER et al., 2006; SILVA, 2008)

Em outro estudo envolvendo testes para avaliar a ação antimicrobiana de extrato de *C. sylvestris* verificou-se que o extrato apresentou no antibiograma ação inibitória em *S. aureus* e resistência para *E. coli* na concentração de 0,74 mg/mL. No teste de diluição em tubo, observaram-se valores de CIM para *E. coli* e *S. aureus* de 3,7 mg/mL; a CBM foi de 5,55 mg/mL para *E. coli* e de 3,7mg/mL para *S. aureus* (NARDI et al., 2004).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos apontam para a potencial aplicação de extratos destas espécies vegetais ou de substâncias presentes nos mesmos no tratamento de infecções causadas por *H. pylori* e *S. aureus*.

O extrato acetato de etila de *C. sylvestris* exibiu atividade bacteriana anti-*H. pylori* e anti-*S. aureus* com valores de CIM de 125 µg/mL para ambas as bactérias.

O extrato etanólico de *C. sylvestris* apresentou atividade anti-*H. pylori* com valor de CIM igual a 750 µg/mL.

O extrato acetato de etila de *B. trimera* mostrou atividade antibacteriana em ensaios envolvendo ambas as bactérias com valores de CIM iguais a 250 e 62,5 µg/mL para *H. pylori* e *S. aureus*, respectivamente.

Os extratos etanólico e etanol 70% de *B. trimera* demonstraram atividade bacteriana anti-*H. pylori* com valores de CIM de 500 µg/mL para ambos os extratos.

Por outro lado, nenhum extrato obtido de ambas as plantas possui atividade bacteriana anti-*E. coli*, nas concentrações utilizadas. Dessa maneira, os testes de avaliação da atividade antibacteriana continuaram somente com *H. pylori* e *S. aureus*, sendo que a melhor atividade antibacteriana encontrada em ensaios utilizando ambas as bactérias foi exibida pelos extratos acetato de etila de ambas as espécies vegetais. A partir disso, foi possível prosseguir o fracionamento biomonitorado no sentido de se obter as frações que compõem ambos os extratos.

A fração de diterpenos de *C. sylvestris* possui atividade bacteriana anti-*S. aureus* com valor de CIM igual a 31, 25 µg/mL, entretanto, não mostrou tal atividade anti-*H. pylori*. Além disso, os diterpenos purificados (casearina X e caseargrewiina F)

também não exibiram atividade bacteriana em ensaios com ambas as bactérias utilizadas.

Os mesmos resultados foram obtidos nos testes com as frações do extrato acetato de etila de *B. trimera*, pois não demonstraram atividade bacteriana anti-*H. pylori* e anti-*S. aureus*, nas concentrações testadas.

Diante dos resultados apresentados podemos apontar a possibilidade de uma ação de sinergismo, ação aditiva ou possível degradação e perda de componentes no processo de fracionamento das substâncias que compõem os extratos das espécies vegetais aqui estudadas.

De maneira geral os dados obtidos nesse estudo são coerentes com os já descritos na literatura para a atividade antibacteriana de *C. Sylvestris*, pois sugerem uma atividade bacteriana anti-*S. aureus*. Com relação a *E. coli*, apesar de haver relatos na literatura sobre a atividade em ensaios usando esta bactéria, pode-se afirmar que nestes casos utilizou-se concentrações maiores em relação ao atual estudo.

Portanto, os resultados obtidos apontam para a potencial aplicação de extratos de *B. trimera* e *C. sylvestris* ou de substâncias presentes nos mesmos no tratamento de infecções causadas por *H. pylori* e *S. aureus*

7. REFERÊNCIAS

ATHERTON, J. C.; BLASER, M. J. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 9, p. 2475-2487, 2009.

BORELLA, J. C.; DUARTE, D. P.; NOVARETTI, A. A. G.; MENEZES JUNIOR, A.; FRANÇA, S. C.; RUFATO, C. B.; SANTOS, P. A. S.; VENEZIANI, R. C. S.; LOPES, N. P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 557-561, 2006.

COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 1004 – 1009, 1997.

COVER, T. L.; BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* in Health and Disease. **Gastroenterology**, v. 136, p. 1863-1873, 2009.

DAILY, A.; WAGNER, H.; SELIGMANN, O. Hispidulin and stigmasta-7,22-dien-3-ol from *Baccharis genistelloides*. **Fitoterapia**, v.55, p.236, 1984.

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

DOS SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J.; VICHNEWSKI, W.; BULHÕES, M. S.; LEITÃO FILHO, H. F. Molluscicidal activity on *Biomphalaria glabrata* of a diterpene lactone and a flavone isolated from *Baccharis trimera* (Less.). **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto**, v. 17, n. 1, p. 43-47, 1980.

ELOFF, J. N. A. A. Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711 - 713, 1998.

FLAUSINO JR, O.; ABISSI, B. M.; VIEIRA, JR, G. M.; SANTOS, A. G.; SILVA, D. H.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Protease inhibition activity of extracts from Salicaceae species from brazilian Cerrado and Atlantic Rain Forest and of an enriched fraction of clerodane diterpenes (casearins). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.3, p.755-758, 2009.

GENÉ, R. M.; CARTAÑA, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*. Identification of its active constituents. **Planta Medica**, v.62, n. 3, p.232-235, 1996.

GIANELLO, J. C.; CEÑAL, J. P.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E.; PETENATTI, M. E.; PETENATTI, E. M.; DEL VITTO, L. A. Medicamentos herbários em el centro-este argentino. II. "Carquejas": control de calidad de las drogas oficiales y sustituyentes. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 2, p. 99-103, 2000.

HATAKEYAMA, M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. **Journal of Gastroenterology**, v. 44, p. 239–248, 2009.

HERZ, W.; PILOTTI, A-M; SÖDERHOLM, A-C; SHUHAMA, I. K.; VICHNEWSKI, W. New *ent*- clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 3913-3917, 1977.

HIRATA, J.; CHUNG, L. P.; ARIESE, F.; IRTH, H.; GOOIJER, C. Coupling of size-exclusion chromatography to a continuous assay for subtilisin using a fluorescence resonance energy transfer peptide substrate: testing of two standard inhibitors. **Journal of Chromatography A**, v. 1081, p. 140-144, 2005.

JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. L. R.; SATO, D. N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, p. 243-251, 2004.

KUROYANAGI, M.; FUJITA, K.; KAZAOKA, M.; MATSUMOTO, S.; UENO, A.; FUKUSHIMA, S.; KATSUOKA, M. Studies in the constituents of *Baccharis genistelloides*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 11, p. 5.075-5.078, 1985.

LAGO, J. H. G.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; SOARES, M. G.; BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G.; SOUZA, F. O. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de “campos de altitude” da mata atlântica paulista. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p.727-730, 2008a.

LAGO J. H. G. A.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; SOUZA, F. O.; SOARES, M. G.; BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 737–740, 2008b.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 142-143 e 220-221.

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin by *p*- benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, n. 64, p. 117- 124, 2005.

NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal Plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.46, p.2560-2564, 1998.

PALÁCIO, C. P. A. M.; BIASI, L. A.; NAKASHIMA, T.; SERRAT, B. M. Biomassa e óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* (Less) DC.) sob influência de fontes e doses de nitrogênio. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 3, p. 58-63, 2007.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720 – 2722, 2002.

SANCHES, A. C. C. **Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth, atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos**. Araraquara, 2004. 241f. Dissertação (Mestrato em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estado Paulista, 2004.

SANTOS, A. G. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos das folhas de *Casearia sylvestris*: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico**. 2008. 361 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SERTIÉ, J. A. A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 2, p. 112-119, 2000.

SILVA, F. G.; JANUÁRIO, A. H.; PINTO, J. E. B. P.; NASCIMENTO, V. E.; BARIZAN, W. S.; SALES, J. F.; FRANÇA, S. C. Teor de flavonóides em populações silvestre e cultivada de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] coletadas nas estações seca e úmida. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 2, p. 19-25, 2006a.

SILVA, F. G.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; NASCIMENTO, E. A.; NELSON, D. L.; SALES, J. F.; MOL, D. J. S. Influence of radiation level on plant growth, yield and quality of essential oil in carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 52-57, 2006b.

SILVA, F. G.; OLIVEIRA, C. B. A.; PINTO, J. E. B. P.; NASCIMENTO, V. E.; SANTOS, S. C.; SERAPHIND, J. C.; FERRI, P. H. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 990-997, 2007.

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

SIMÕES-PIRES, C. A.; QUEIROZ, E. F.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line identification of anti-oxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS-MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 307-314, 2005b.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v.53, n.1, p.37-39, 1987.

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

SUTTISRI, R.; KINGHORN, A. D.; WRIGHT, A. D.; STICHER, O. Neo-clerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. **Phytochemistry**, v. 35, p.443, 1994.

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

VARGAS, R. M. F.; CASSEL, E.; GOMES, G. M. F.; LONGHI, L. G. S.; ATTI-SERAFINI, L.; ATTI-SANTOS, A. C. Supercritical extraction of *carqueja* essential oil: experiments and modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 3, p. 375-382, 2006.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 7. a ed. Berlin: Ullstein Mosby, 1993.
ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; SOLOMON, J. C.; KING, R. M.; ROBINSON, H. *Ent-clerodanes and other constituents from bolivian Baccharis species*. **Phytochemistry**, v. 28, n.2, p.531-542, 1989.