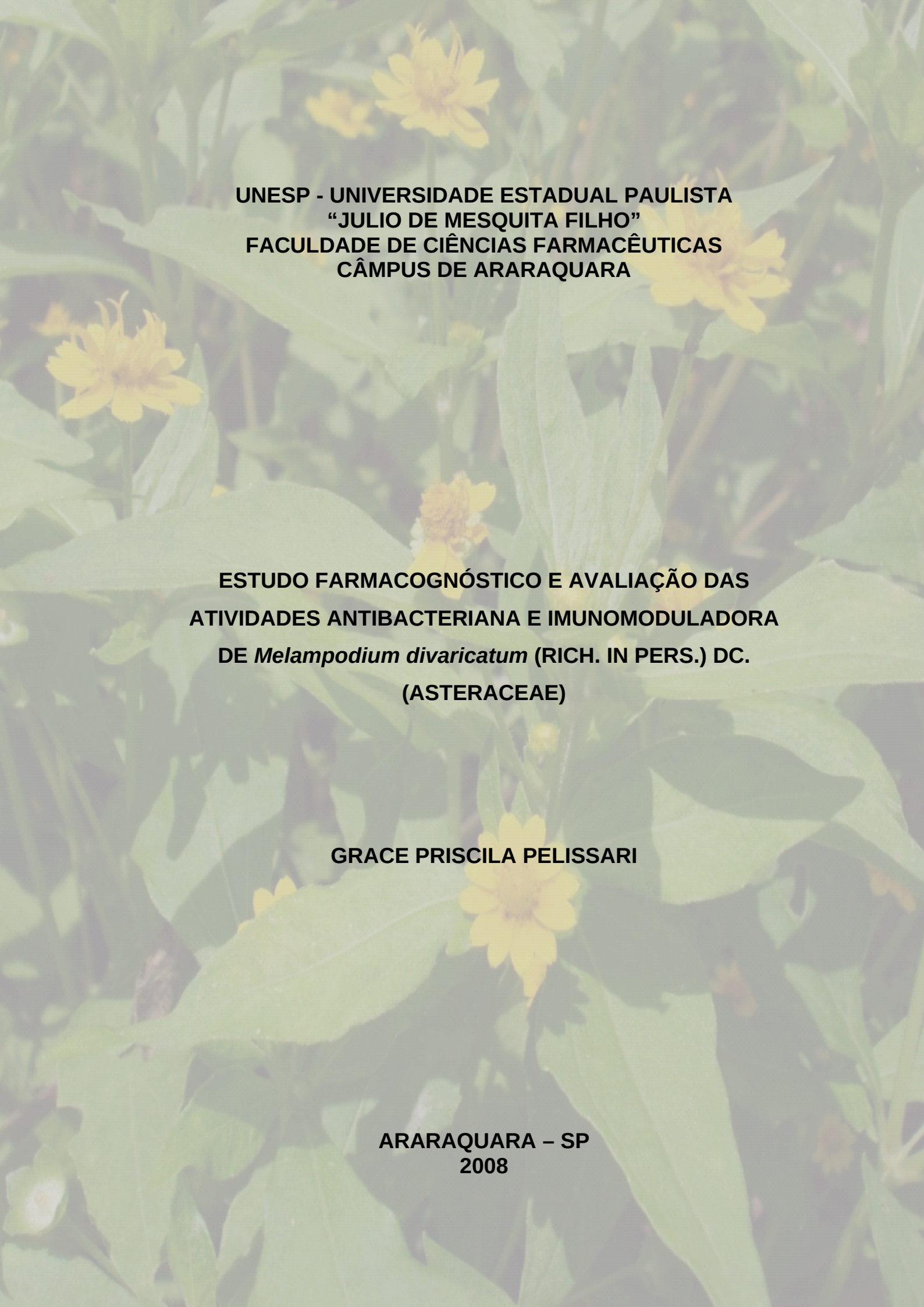




**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DAS
ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E IMUNOMODULADORA
DE *Melampodium divaricatum* (RICH. IN PERS.) DC.
(ASTERACEAE)**

GRACE PRISCILA PELISSARI

**ARARAQUARA – SP
2008**

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANTIBACTERIANA E IMUNOMODULADORA DE
Melampodium divaricatum (RICH. IN PERS.) DC. (ASTERACEAE)**

GRACE PRISCILA PELISSARI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Sandra Regina Ananias

**ARARAQUARA – SP
2008**

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P384e Pelissari, Grace Priscila
Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades antibacteriana e imunomoduladora de *Melanpodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC (Asteraceae). / Grace Priscila Pelissari. – Araraquara, 2008.
178 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Raquel Regina Duarte Moreira
Co-orientador: Sandra Regina Ananias

. 1.Melanpodium divaricatum. 2.Antibacteriana.
3.Imunomoduladora.Farmacognosia. 5.Falsa-Calendula. I.Moreira, Raquel Regina Duarte, orient. II.Ananias, Sandra Regina, co-orient. . III.Título.

CDD: 574.88

CAPES: 40300005

*Aos meus pais Celso e Marilise,
aos meus irmãos, Débora e Neto
e ao meu namorado Daniel
meus maiores tesouros...*

Agradecimentos

Acredito que um trabalho se torna grandioso em função do empenho, participação e compromisso de uma equipe multidisciplinar. Este estudo só se tornou possível pela colaboração de algumas pessoas e órgãos a quem gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos:

À Deus pela sublime presença de em minha vida, importante força diretora de minha consciência, que ensina o amor e a linguagem silenciosa da vida, a fim de espalhar a luz ao próximo, dando-nos sentido da verdadeira felicidade;

A toda minha família em especial aos meus avós Jefferson Joel de Carvalho, Romilda Lourdes da Silva Carvalho, Luiz Pelissari (in memorian) e Anézia Luiza Sousa Pelissari pelo exemplo de humildade e força requisitos muito importantes para o desenvolvimento de um trabalho de qualidade;

Aos meus pais Celso e Marilise mesmo que geograficamente distantes, fizeram-se presentes em cada momento desta importante jornada da minha vida, merecendo assim minha eterna gratidão pelo amor e carinho;

Aos meus irmãos Debora e Neto que me ajudaram a fortalecer meu ideal e que compartilharam comigo muitos momentos inesquecíveis;

Ao meu namorado Daniel, pelo companheirismo, dedicação e apoio que significou muito não por se tratar da finalização de um trabalho, mas por representar a concretização de um sonho;

À Professora Dr.^a Raquel Regina Duarte Moreira pela sua preciosa orientação, compreensão e principalmente pela amizade conquistada nestes dois anos;

À Dra. Sandra Regina Ananias não apenas pela co-orientação como também pela amizade e carinho que significaram muito na construção deste trabalho;

Ao Professor Cleyton Eduardo Mendes Toledo pelos ensinamentos oferecidos durante a disciplina de Farmacognosia durante a graduação em Palmas-TO e principalmente pelo apoio oferecido na concretização do sonho do mestrado;

Ao Luís Eduardo dos Santos técnico do Laboratório de Farmacognosia que tanto colaborou na execução dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade para realização do Mestrado;

Às secretárias da Pós-Graduação Cláudia, Sônia e Laura pela atenção e paciência dispensada;

Aos professores Dr. João Carlos Palazzo de Mello (UEM) e Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro (FCFAR/UNESP) pela participação na banca examinadora de qualificação e sugestões que tanto colaboraram neste trabalho;

Às Professoras Dra. Iracilda Zeppone Carlos, Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro e Dra. Hérica Regina Nunes Marona que disponibilizaram seus Laboratórios para realização dos ensaios imunológicos antibacteriano e de controle de qualidade e auxiliaram na análise dos resultados obtidos;

Aos professores Dra. Ana Doris de Castro e Dr. Luis Vitor da Silva Sacramento pelo auxílio na análise de alguns resultados e sugestões muito válidas;

Às técnicas de laboratório Marisa, Angélica e Maria de Fátima pela grande ajuda na execução das técnicas laboratoriais;

Aos queridos amigos da pós-graduação Juliane, Sabrina, Emerson, Priscileila, Ana Luisa, Kelli, Gustavo, Fabrício, Djamille, Tatiana, Silviane, Flávia, Cris, Michele e Nina, por terem compartilhado comigo os momentos de felicidade e principalmente pela força em todos os momentos que precisei

Às estagiárias Andréa, Alice, Patrícia, Elisângela, Taísa, Ana Carla pelo apoio oferecido durante os experimentos.

Aos amigos Cássia, André e Gustavo pelo constante incentivo, muito obrigada pelo carinho.

Aos professores, funcionários e colegas do programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela colaboração na realização do Mestrado;

Aos funcionários da biblioteca e secretária do departamento Ana, Irani, Maximiliano, Moacir e Tirene pelo carinho com que nos atendem;

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na realização de mais este sonho, o meu sincero agradecimento. Obrigada!!!

*“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele
lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”*

(Goethe)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	XVI
RESUMO.....	XVIII
ABSTRACT	XX
I INTRODUÇÃO.....	22
II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
2.1 Aspectos históricos do uso de plantas medicinais.....	26
2.2 Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.....	28
2.2.1 Sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento.....	29
2.2.2 Temperatura.....	29
2.2.3 Disponibilidade hídrica.....	30
2.2.4 Radiação ultravioleta.....	30
2.2.5 Nutrientes.....	31
2.2.6 Altitude.....	31
2.2.7 Indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos.....	32
2.3 Família Asteraceae	32
2.3.1 Aspectos botânicos.....	32
2.3.2 Aspectos químicos.....	34
2.3.3 Gênero <i>Melampodium</i>	35
2.3.3.1 <i>Melampodium divaricatum</i> Rich. In Pers.....	35
2.4 Óleos essenciais.....	38
2.4.1 Análise dos óleos essenciais.....	40
2.4.2 Atividades biológicas dos óleos essenciais.....	41
2.5 Flavonóides.....	42
2.5.1 Análise de flavonóides.....	44
2.5.2 Atividades biológicas dos flavonóides.....	45
2.6 Atividade antibacteriana.....	46
2.6.1 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana.....	47
2.7 Atividade imunológica.....	48
2.7.1 Atuação das plantas medicinais no sistema imunológico.....	54
III OBJETIVOS.....	56
3.1 Objetivo geral.....	57
3.2 Objetivos específicos.....	57
IV MATERIAL E MÉTODOS.....	58

4.1 Material.....	59
4.1.1 Equipamentos.....	59
4.1.2 Solventes, reagentes, soluções e meios de cultura.....	59
4.1.3 Microrganismos.....	61
4.1.4 Animais.....	61
4.1.5 Softwares.....	61
4.2 Métodos.....	61
4.2.1 Coleta e preparo do material vegetal.....	61
4.2.2 Estabelecimento de parâmetros para o controle de qualidade de <i>Melampodium divaricatum</i>	61
4.2.2.1 Determinação da perda por secagem.....	62
4.2.2.2 Moagem e análise granulométrica.....	62
4.2.2.3 Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho.....	62
4.2.2.4 Determinação do teor de cinzas totais.....	63
4.2.2.5 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido.....	63
4.2.2.6 Determinação do teor de resíduo seco.....	63
4.2.2.7 Determinação da densidade aparente e compactada da droga vegetal....	63
4.2.2.8 Determinação do pH da droga vegetal.....	64
4.2.2.9 Controle microbiológico da droga vegetal e dos extratos.....	64
4.2.2.9.1 Contagem total de microrganismos.....	64
4.2.2.9.2 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp e <i>Escherichia coli</i>	64
4.2.2.9.3 Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	65
4.2.3 Análises químicas.....	65
4.2.3.1 Análise fitoquímica preliminar.....	65
4.2.3.1.1 Pesquisa de alcalóides.....	65
4.2.3.1.2 Pesquisa de taninos.....	66
4.2.3.1.3 Pesquisa de antraquinonas.....	66
4.2.3.1.4 Pesquisa de saponinas.....	67
4.2.3.1.5 Pesquisa de glicosídeos cardiotônicos.....	67
4.2.3.1.6 Pesquisa de flavonóides.....	68
4.2.3.1.7 Pesquisa de cumarinas.....	69
4.2.4 Obtenção dos extratos vegetais.....	70
4.2.4.1 Extratos brutos	70
4.2.4.2 Óleo essencial bruto.....	70
4.2.5 Determinação do teor de flavonóides totais.....	70
4.2.5.1 Construção da curva analítica.....	71

4.2.5.2 Preparo da solução amostra a partir da droga vegetal.....	71
4.2.5.3 Preparo da solução amostra a partir dos extratos.....	71
4.2.6 Determinação do rendimento do óleo essencial.....	71
4.2.7 Determinação da densidade do óleo essencial.....	72
4.2.8 Análises cromatográficas.....	72
4.2.8.1 Cromatografia em camada delgada.....	72
4.2.8.1.1 Perfis cromatográficos do óleo essencial.....	72
4.2.8.1.2 Perfis cromatográficos dos extratos.....	73
4.2.8.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa.....	74
4.2.9 Avaliação das atividades biológicas.....	75
4.2.9.1 Atividade antibacteriana.....	75
4.2.9.1.1 Preparo das amostras e controles.....	75
4.2.9.1.2 Ajuste das suspensões bacterianas.....	75
4.2.9.1.3 Teste de difusão em ágar.....	76
4.2.9.2 Atividade imunológica.....	76
4.2.9.2.1 Preparo do material vegetal.....	76
4.2.9.2.2 Animais.....	76
4.2.9.2.3 Obtenção dos macrófagos peritoneais.....	77
4.2.9.2.4 Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial e dos extratos.....	78
4.2.9.2.5 Avaliação da estimulação das CEP	78
4.2.9.2.6 Determinação da atividade inibitória em CEP.....	79
4.2.9.2.7 Análise estatística.....	81
V RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
5.1 Estabelecimento de parâmetros para o controle de qualidade de <i>Melampodium divaricatum</i>	83
5.2 Análises químicas.....	90
5.3 Atividade antibacteriana.....	110
5.3.1 Atividade antibacteriana do óleo essencial.....	111
5.3.2 Atividade antibacteriana dos extratos brutos.....	114
5.4 Atividade imunomoduladora.....	116
5.4.1 Avaliação da estimulação de macrófagos.....	121
5.4.1.1 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)	121
5.4.1.2 Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	124
5.4.2 Determinação da atividade inibitória em cultura de CEP.....	127
5.4.2.1 Quanto à produção de NO.....	127
5.4.2.2 Quanto à liberação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	132
VI CONCLUSÕES.....	139

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
APÊNDICE	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.....	28
Figura 2. Aspecto macroscópico da flor de <i>Melampodium divaricatum</i>	35
Figura 3. Aspecto macroscópico da folha de <i>Melampodium divaricatum</i>	36
Figura 4. Aspecto macroscópico do caule de <i>Melampodium divaricatum</i>	36
Figura 5. Aspecto macroscópico das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i>	36
Figura 6. Estrutura geral dos flavonóides.....	43
Figura 7. Formação do complexo flavonóide-alumínio, em solução metanólica de cloreto de alumínio.....	44
Figura 8. Oxidação da L-arginina a L-citrulina catalisada pela NOS.....	51
Figura 9. Representação esquemática da ação do óxido nítrico no sistema imune.....	52
Figura 10. Esquema ilustrativo da avaliação da atividade imunológica dos extratos e do óleo essencial de <i>Melampodium divaricatum</i>	77
Figura 11. Comparação da perda por secagem de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> pelos diferentes processos de secagem.....	84
Figura 12. Aspecto do pó das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> pulverizado em moinho de facas.....	85
Figura 13. Distribuição do tamanho de partículas das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> pulverizadas em moinho de facas.....	86
Figura 14. Cromatograma dos extratos obtidos por maceração a partir das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> empregando-se diferentes líquidos extratores.....	92
Figura 15. Curva analítica de absorbância da solução padrão de quercetina dihidratada em diferentes concentrações.....	95

Figura 16. Variação sazonal do teor de flavonóides totais de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> nos diferentes períodos do ano.....	95
Figura 17. Cromatograma dos extratos obtidos por maceração a partir das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> empregando-se diferentes líquidos extratores.....	97
Figura 18. Cromatograma do óleo essencial obtido a partir de diferentes partes no estado seco de <i>Melampodium divaricatum</i>	98
Figura 19. Cromatograma do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> coletadas em diferentes períodos do ano.....	100
Figura 20. Variação no teor dos constituintes majoritários do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de <i>M. divaricatum</i> no estado fresco e seco.....	105
Figura 21. Cromatograma do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas secas <i>Melampodium divaricatum</i> empregado na avaliação das atividades biológicas.....	108
Figura 22. Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i>	109
Figura 23. Viabilidade das células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Melampodium divaricatum</i>	118
Figura 24. Viabilidade das células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i>	119
Figura 25. Viabilidade das células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato hidroetanólico 70% (v/v) de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i>	119
Figura 26. Viabilidade de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i>	120
Figura 27. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Melampodium divaricatum</i>	122
Figura 28. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de <i>Melampodium divaricatum</i> ...	122

Figura 29. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato hidroetanólico 70% (v/v) de <i>Melampodium divaricatum</i>	123
Figura 30. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>Melampodium divaricatum</i>	123
Figura 31. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações dos extratos de <i>Melampodium divaricatum</i>	124
Figura 32. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em cultura de células do exsudato peritoneal estimuladas com óleo essencial de <i>Melampodium divaricatum</i>	125
Figura 33. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas com extrato aquoso de <i>Melampodium divaricatum</i>	125
Figura 34. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas com extrato hidroetanólico 70% (v/v) de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i>	126
Figura 35. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas com extrato etanólico de <i>Melampodium divaricatum</i>	126
Figura 36. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas pelos diferentes extratos de <i>Melampodium divaricatum</i>	127
Figura 37. Efeito das diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Melampodium divaricatum</i> na produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal estimuladas por LPS.....	128
Figura 38. Efeito das diferentes concentrações extrato aquoso de <i>Melampodium divaricatum</i> na produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por LPS.....	129

Figura 39. Efeito das diferentes concentrações extrato hidroetanólico 70% (v/v) de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> na produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por LPS.....	129
Figura 40. Efeito das diferentes concentrações extrato etanólico de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> na produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por LPS.....	130
Figura 41. Efeito das diferentes concentrações dos extratos de <i>Melampodium divaricatum</i> na produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por LPS.....	131
Figura 42. Efeito das diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Melampodium divaricatum</i> na produção de H ₂ O ₂ em cultura de células do exsudato peritoneal estimuladas por PMA.....	133
Figura 43. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) por células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por PMA frente ao extrato aquoso de <i>Melampodium divaricatum</i>	134
Figura 44. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) por células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por PMA frente ao extrato hidroetanólico a 70% (v/v) de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i>	134
Figura 45. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) por células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por PMA frente ao extrato etanólico de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i>	135
Figura 46. Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) por células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por PMA frente aos extratos etanólicos e óleo essencial obtido de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i>	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos químicos identificados na espécie <i>Melampodium divaricatum</i>	37
Tabela 2. Deslocamento no comprimento de onda dos compostos flavonoídicos provocado pela complexação com cloreto de alumínio.....	44
Tabela 3. Condições cromatográficas empregadas para análises dos extratos brutos de <i>Melampodium divaricatum</i> por cromatografia em camada delgada.....	73
Tabela 4. Análise granulométrica por tamisação de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> moídas em moinho de facas.....	86
Tabela 5. Controle microbiológico das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> pulverizadas.....	89
Tabela 6. Análise física, físico-química, química e microbiológica das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i>	90
Tabela 7. Análise fitoquímica preliminar das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> ...	91
Tabela 8. Fatores de retenção e cor das bandas correspondentes ao cromatograma apresentado na figura 14.....	93
Tabela 9. Fator de retenção e fluorescências correspondentes ao cromatograma apresentado na figura 17.....	97
Tabela 10. Fator de retenção e cor das bandas correspondentes ao cromatograma apresentado na figura 18.....	99
Tabela 11. Fator de retenção e cor das bandas correspondentes ao cromatograma apresentado na figura 19.....	101
Tabela 12. Teor dos compostos presentes no óleo essencial bruto obtido a partir das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i>	103

Tabela 13. Atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>Melampodium divaricatum</i> pelo método de difusão em ágar.....	111
Tabela 14. Atividade antibacteriana dos extratos obtidos a partir das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> pelo método de difusão em ágar.....	114
Tabela 15. Valores de IC ₅₀ e IC ₂₅ dos macrófagos obtidos das células do exsudato peritoneal para os extratos de <i>Melampodium divaricatum</i>	120
Tabela 16. Efeito inibitório dos extratos e do óleo essencial obtido a partir de partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> na produção de NO em células do exsudato peritoneal estimuladas por LPS.....	130
Tabela 17. Efeito inibitório do óleo essencial e extratos obtidos a partir das partes aéreas de <i>Melampodium divaricatum</i> na produção de H ₂ O ₂ em células do exsudato peritoneal estimuladas por PMA.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC: *American Type Culture Collection*
BHI: *Brain Heart Infusion*
CBM: Concentração bactericida mínima
C+: Controle positivo
C-: Controle negativo
CC: Cepas de campo
CCD: cromatografia em camada delgada
CEP: Células do Exsudato Peritoneal
CIM: Concentração inibitória mínima
cNOS: óxido nítrico sintetase constitutiva
DMSO: dimetilsulfóxido
DP: Desvio-padrão
EMB: Eosina-Azul de Metileno
eNOS: óxido nítrico sintetase endotelial
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
IC₅₀: Índice de citotoxicidade mediano (50 % células viáveis)
IC₇₅: Índice de citotoxicidade (75 % células viáveis)
iNOS: óxido nítrico sintetase induzível
LPS: lipopolissacarídeo
MeOH: metanol
MS: espectrometria de massas
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
NF- κ B: Fator nuclear kappa beta
NHA: NG-hidroxi-L-arginina
nNOS: óxido nítrico sintetase neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintetase
NP/PEG: *Natural product/polyethylenoglicol*
PBS: solução salina tamponada com fosfato

PMA: Phorbol 1, 2 –myristate 13-acetate

p/p: peso por peso

p/V: peso por volume

R_f: Fator de Retenção

TNF- α : Fator de necrose tumoral – alfa

UFC: Unidade formadora de colônia

UV: ultra-violeta

V/V: volume por volume

Diante do amplo uso popular da espécie *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC (Asteraceae) conhecida no Brasil como falsa-calêndula, fica evidente o provável potencial farmacológico desta espécie justificando assim estudos que possam confirmar suas atividades biológicas bem como aspectos que garantam a qualidade e segurança de seu uso pela população. Neste trabalho foram estudados os extratos aquosos, etanólicos e o óleo essencial obtido a partir das partes aéreas desta espécie buscando avaliar possíveis atividades biológicas, bem como o estudo de parâmetros farmacognósticos relacionados à qualidade do material vegetal em estudo. Avaliou-se o efeito destes extrativos no sistema imunológico murino, utilizando cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss e também a atividade antimicrobiana pela metodologia de difusão em ágar frente às bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Serratia marcescens*. O estudo farmacognóstico foi realizado através de ensaios físico-químicos, qualitativos e quantitativos. Os resultados indicam que o material vegetal encontra-se dentro dos padrões de qualidade estabelecidos para materiais vegetais em geral. Os componentes majoritários presentes no óleo essencial, *trans*-cariofileno (48,6%); germacreno-D (13,2%); biciclogermacreno (10,6%); óxido de cariofileno (3,0%) e α -humuleno (2,2%) não apresentam variações estatisticamente significativas quando obtidos do material vegetal seco e fresco. Em triagem fitoquímica das partes aéreas foi caracterizada a presença de flavonóides e triterpenos e através de doseamento verificou-se que o extrato etanólico 99,5% apresentou um maior teor de flavonóides totais. Tanto os extratos hidroetanólicos e etanólico quanto o óleo essencial apresentou atividade imunomoduladora frente aos macrófagos murinos, inibindo potentemente a produção de NO e H₂O₂ de forma dose-dependente. Porém o extrato aquoso foi capaz de inibir a produção de NO e estimular a produção de H₂O₂. Quanto à atividade antimicrobiana os extratos apresentaram atividade antimicrobiana moderada tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas e não foram ativos contra *S. aureus* ao passo que o óleo essencial foi consideravelmente ativo apenas contra as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*) não apresentando atividade contra as Gram-negativas. Estudos químicos complementares são necessários para evidenciar quais as substâncias responsáveis por tais atividades evidenciadas neste estudo, bem como seus possíveis mecanismos de ação. Portanto os extratos e o óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *M. divaricatum* além de apresentarem atividade antimicrobiana contra diversas espécies potencialmente patogênicas, possuem efeitos imunomoduladores o que indica uma provável atividade antiinflamatória.

Palavras-chave: *Melampodium divaricatum*; falsa-calêndula; óleo essencial; extratos brutos; estudo farmacognóstico; atividade antimicrobiana; atividade imunomoduladora.

According the ample popular use of the *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC (Asteraceae) known in Brazil as false-calendula, it is evident the pharmacological potential of this species which justify studies that confirm its biological activities and aspects that guarantee the quality and safety of its use for the population. In this work the aqueous and ethanolic extracts as well as the essential oil from the aerial parts of this species had been studied in order to evaluate possible biological activities, as well as the study of related pharmacognostic parameters to the quality of the plant. It was evaluated the effect of these extractives in murine immune system, using peritoneal macrophages cultures from Swiss mice and also the antimicrobial activity for the methodology of agar diffusion to Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* and Gram-negatives: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Serratia marcescens*. The pharmacognostic study was carried through qualitative and quantitative assays physicochemical. The results indicate that the vegetal material was according to established standards of quality established for plant drugs in general. The majority components present in the essential oil *trans*-caryophyllene (48.6%); germacrene-D (13.2%); bicyclogermacrene (10.6%); caryophyllene oxide (3.0%), α -humulene (2.2%), do not present statistically significant variations when obtained from dry or fresh plant. In phytochemistry analysis of the aerial parts the presence of flavonoids and triterpenoids was characterized and through dosage was verified that the ethanolic extract presented higher level of total flavonoids. As extracts as essential oils presented immunomodulatory activity to the murine macrophages, inhibiting powerfully the production of NO and H₂O₂ in a form dose-dependent. However, the aqueous extract was able to inhibit the production of NO and stimulate the production of H₂O₂. Concerning the antimicrobial activity, the extracts showed moderate antimicrobial activity against Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria and did not have activity against *S. aureus*. The essential oil was considerably active only against Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *B. subtilis*) do not presenting activity against the Gram-negative ones. Complementary chemical studies are necessary to evidence what would these compounds be responsible for as well as its possible mechanism of action. Therefore the extracts and the essential oil gotten from the aerial parts of *M. divaricatum* besides presenting antimicrobial activity against diverse potentially pathogenic species possess effect immunomodulatory that indicates a probable antiinflammatory activity.

Key words: *Melampodium divaricatum*; false-calendula; essential oil; row extracts; pharmacognostic study; antimicrobial activity; immunomodulatory activity.

O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento tópico até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial (LORENZI & MATOS, 2002). Atualmente está ressurgindo o interesse pelo seu uso na terapêutica, por diversos motivos dentre eles as contra-indicações, efeitos colaterais e prejuízos causados pelo uso abusivo e/ou incorreto de medicamentos sintéticos, o fato de que amplas camadas da população mundial não têm acesso aos medicamentos e a crença popular de que o natural é inofensivo (RATES, 2001).

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas, adjuvantes, ou, ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais: os medicamentos fitoterápicos (SCHENKEL et al., 2001).

Ainda nesta perspectiva, o avanço tecnológico do domínio das patentes internacionais sobre nossas plantas, os grandes investimentos da indústria nacional de fitoterápicos na pesquisa fitoquímica, farmacológica e clínica têm representado fator determinante na busca de novos fármacos (CALIXTO, 2001).

Atualmente, pesquisas de compostos ativos contra câncer, doenças tropicais, infecções, inflamações, patologias relacionadas ao sistema imunológico e para usos psiquiátricos são bastante valorizadas (HAMBURGER & HOSTETTMAN, 1991; RATES, 2001). Muitos extratos e óleos essenciais vegetais têm demonstrado *in vitro* e *in vivo* atividades descritas pela medicina tradicional (SARTORATTO et al., 2004).

Porém o uso empírico e pouco cuidadoso das plantas, fora de seu contexto original e sem respaldo científico, se mostra inadequado para a implantação da fitoterapia, como um sólido recurso terapêutico no atendimento de algumas das necessidades básicas dos serviços de saúde, como tem sido recomendado por órgãos governamentais (SOUZA et al., 2003). A inexistência ou a falta de informação sobre a caracterização de espécies medicinais impossibilita o seu uso correto e com segurança.

Tendo em vista o estudo com base no uso popular torna-se interessante à realização de testes com extratos brutos, pois muitas pesquisas demonstram que quando uma planta possui determinada atividade, não necessariamente está relacionada a um único composto ativo (PHILLIPSON, 2003).

Um estudo demonstrou que o potencial antimalárico de *Artemisia annua* é maior quando é administrado na forma de extrato bruto, uma vez que o extrato além da artemisinina é constituído também por flavonóides que potencializam a sua atividade, o

mesmo acontece com a espécie *Panax ginseng*, que quando utilizada na forma de extrato bruto é mais ativa do que suas frações saponínicas isoladas (PUNTUREE et al., 2004).

No estudo de plantas, todas as etapas envolvidas na transformação de um vegetal em medicamento, estão relacionadas com diferentes áreas de conhecimento e é necessário longo tempo para se chegar a um medicamento padronizado, quanto aos aspectos de controle de qualidade, ação biológica e riscos toxicológicos.

O estudo de plantas medicinais requer, em primeiro plano, a garantia de qualidade de seus extratos e, posteriormente o exame de suas ações através de testes farmacológicos e toxicológicos em animais e, finalmente, a análise da eficácia e segurança no homem (MELLO & PETROVICK, 2000), portanto, o controle de qualidade de plantas medicinais se torna fundamental para que se tenha eficácia, segurança e qualidade.

Os ensaios de qualidade de matérias-primas vegetais objetivam a verificação da identidade botânica do material, da pureza e a caracterização dos constituintes químicos, especialmente daqueles envolvidos na atividade terapêutica, bem como o doseamento destes.

A espécie *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) pertencente a família Asteraceae, vem sendo amplamente utilizada em diversas partes do mundo incluindo o Brasil, onde o chá de suas folhas e inflorescências, bem como da planta inteira, tem sido empregado popularmente principalmente como diurético, antiinflamatório e no tratamento da leucorréia e malária (AGRA et al., 2007; BOTSARIS, 2007).

Estudos químicos caracterizaram a presença de diversos metabólitos secundários como cumarinas, flavonóides (canferol e quercetina), alcalóides pirrolizidínicos bem como substâncias comumente presentes em óleos essenciais como o cariofileno, espatulenol e guaiacol, substâncias de grande interesse farmacológico (ALONSO-LÓPES et al., 1985; BOHM & STUESSY, 1991; BORGES-DEL-CASTILLO et al., 1984; HUBERT & WIEMER, 1985; SCHÜNGEL & PASSREITER, 2000).

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O emprego dos recursos naturais como forma de tratamento e cura de doenças é tão antigo quanto à espécie humana (DI STASI, 1995). No processo histórico das plantas medicinais, muitas civilizações descreveram a utilização de ervas e outros vegetais como forma terapêutica, em seus registros e manuscritos. Os babilônios e sumerianos (2.600 a.C.) usavam em seus remédios, frutos, folhas, flores, cascas e raízes como a oliveira e o alho. A cultura chinesa (2.000~2.500 a.C.) descreve no 1º Pen T', 635 drogas citando plantas como ginseng, ruibarbo, podofilum e *Ephedra* (MIGUEL & MIGUEL, 1999).

Na verdade, a utilização de recursos naturais provavelmente antecede o *Homo sapiens* moderno. Evidências encontradas em escavações do Paleolítico mostram que o conhecimento das plantas medicinais existe há pelo menos 60.000 anos (SUMNER, 2000). Arqueólogos encontraram pólen e fragmentos de flores de diversas plantas medicinais no sítio arqueológico do homem de Neanderthal no Iraque. *Ephedra*, *Centaurea*, *Senecio*, *Athea* e *Achillea* estavam entre as espécies identificadas, comprovando o uso de várias plantas pelos antepassados (TYLER et al., 1988).

Theophrastus (371-287 a.C.), considerado o “pai da botânica”, foi estudante de Platão e escreveu extensivamente sobre plantas. Ele determinou as peculiaridades e qualidades médicas das ervas, observando cuidadosamente os aspectos farmacêuticos e farmacológicos da mirra, do incenso, da cássia, mentrasto, da beladona, do timo, etc. Seu trabalho *Historia Plantarum* englobava a coleta e o preparo de plantas medicinais, condimentos e perfumes e com isso foi utilizado como uma confiável fonte de referência durante 2000 anos (SUMNER, 2000).

O desenvolvimento dos fármacos a partir de plantas pode ser dividido em três períodos. O primeiro período entre 1800 e 1900 foi marcado pela descoberta de vários fármacos entre eles, morfina da *Papaver somniferum*, efedrina da *Ephedra sinica*, quinina da *Cinchona calisaya*, emetina e a cephaelina da *Cephalis ipeccacuanha*, e a salicina de *Salix alba* (que posteriormente originou o ácido acetilsalicílico). No segundo período, entre 1901 e 1970/80 aparecem somente os antibióticos obtidos dos fungos como produtos naturais de importância, sendo este período marcado pela síntese e consideração das plantas medicinais sem valor científico. No terceiro período, que compreende de 1970/80 até o presente, ocorre o retorno à busca de drogas vegetais com a descoberta de inúmeros fármacos, citando a artemisinina (presente na *Artemisia annua*) e o paclitaxel (taxol) isolado de *Taxus brevifolia* como exemplos (YUNES et al., 2001).

Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais. Apesar da grande evolução da medicina alopática a partir da segunda metade do século XX, existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à

obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA JR. et al., 2005).

Estudos revelam que atualmente cerca de 80% da população mundial utiliza plantas para fins medicinais. Contudo, a maioria das espécies não foi investigada profundamente tanto química quanto biologicamente, apesar de todas as inovadoras técnicas analíticas disponíveis. Mesmo as plantas já estudadas requerem estudos clínicos adicionais (PHILLIPSON, 2003).

Nos países em desenvolvimento, bem como nos mais desenvolvidos, os apelos da mídia para o consumo de produtos à base de fontes naturais aumentam a cada dia. Os ervanários prometem saúde e vida longa, com base no argumento de que plantas usadas há milênios são seguras para a população.

Muitas empresas conscientes das tendências de consumo buscam novos compostos para incorporar aos produtos já existentes ou o desenvolvimento de um produto novo tendo como constituintes produtos de origem natural, principalmente pelo fato de que um novo fármaco a partir de fontes naturais pode ser obtido com custos muito menores que os demais fármacos (YUNES et al., 2001).

Porém, no Brasil, as plantas medicinais da flora nativa ainda são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais diferentes daqueles utilizados pelos silvícolas. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos pode parecer trivial. Isto, entretanto, não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente (VEIGA JR. et al., 2005).

As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais.

Em vista disso, aumentaram também as preocupações com a qualidade de tais produtos, pois são bastante conhecidas as características desse segmento no sentido de apresentarem adulterações e falsificações freqüentes (ZAUPA et al., 2000). Análises físico-químicas farmacopéicas são importantes para o controle da qualidade da droga vegetal. Entretanto, nem todas as drogas vegetais possuem parâmetros estabelecidos que possam contribuir ao controle de qualidade, demonstrando assim a necessidade de estudos envolvendo as espécies utilizadas pela população e as já estudadas cientificamente.

2.2 FATORES DE INFLUÊNCIA NO CONTEÚDO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Desde o quarto século a.C. existem relatos de normas para a coleta de plantas medicinais. Os gregos, por exemplo, coletavam amostras de cicuta (*Conium maculatum*) pela manhã, quando os níveis de coniina são maiores (FAIRBAIRN & SUWAL, 1961; ROBINSON, 1974). Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas de metabólitos secundários em plantas, ocorrem em diferentes níveis (sazonais e diárias; intraplanta, inter e intraespecífica) e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (DARROW & BOWERS, 1997). De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é freqüentemente afetada por condições ambientais (KUTCHAN, 2001).

Deve ser ressaltado que, muitas vezes, as variações podem ser decorrentes do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos concomitante a uma constância no conteúdo total de metabólitos secundários. Além disso, alguns dos fatores discutidos apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto no metabolismo secundário, como, por exemplo, desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico e sazonalidade; temperatura e altitude, entre outros, como ilustrado na figura 1 (LOPES & GOBBO-NETO, 2007).

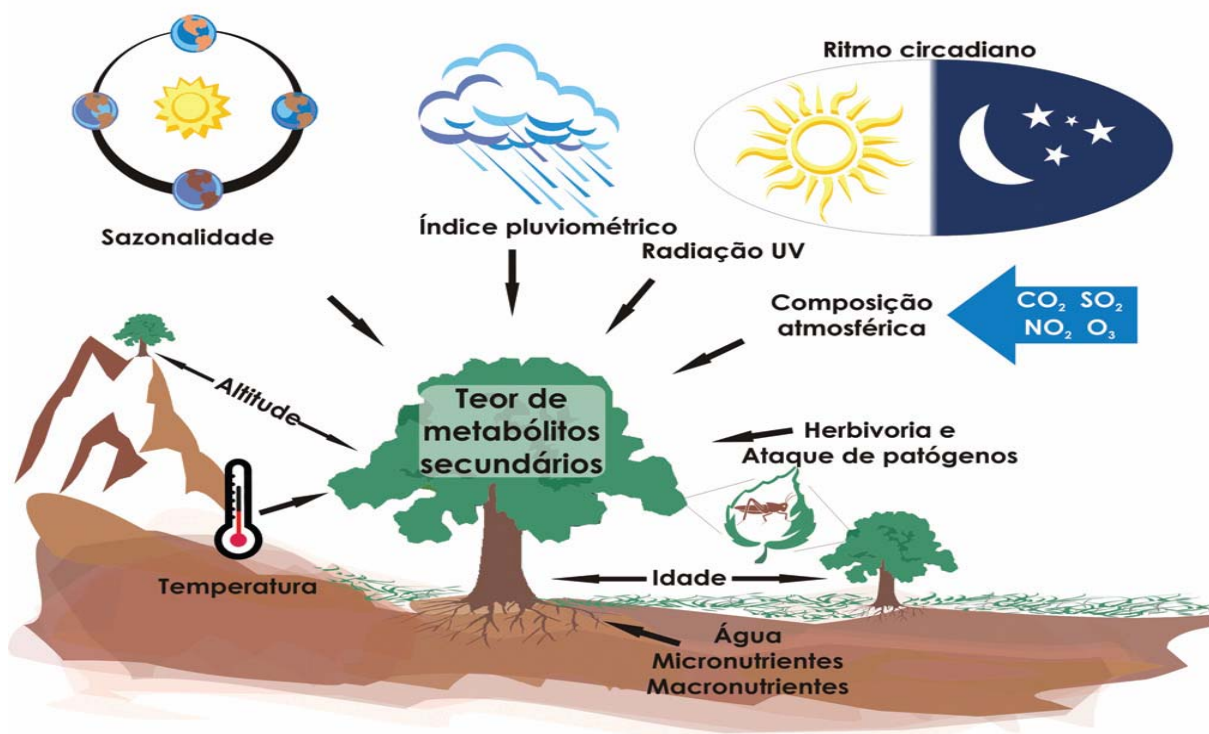


Figura 1. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas (LOPES & GOBBO-NETO, 2007).

2.2.1 Sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento

A época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e, às vezes, até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano (LOPES & GOBBO-NETO, 2007). Existem, também, cada vez mais estudos mostrando que a composição de metabólitos secundários de uma planta pode variar apreciavelmente durante o ciclo dia/noite, tendo sido descritas, por exemplo, variações circadianas nas concentrações de óleos voláteis (LOUGHRIN et al., 1993; LOPES et al., 1997; SILVA et al., 1999; ANGELOPOULOU et al., 2002), iridóides (HOGEDAL & MOLGAARD, 2000), alcalóides (FAIRBAIRN & SUWAL, 1961; ROBINSON, 1974; ITENOV et al., 1999), glucosinolatos (ROSA et al., 1994), glicosídeos cianogênicos e tiocianatos (OKOLIE & OBASI, 1993).

Foi notada, por exemplo, uma variação de mais de 80% na concentração de eugenol no óleo essencial da alfavaca (*Ocimum gratissimum*), o qual atinge um máximo em torno do meio-dia, horário em que é responsável por 98% do óleo essencial, em contraste com uma concentração de 11% em torno de 17 h (SILVA et al., 1999). Já o conteúdo total de taxanos em *Taxus media* mostra-se menor pela manhã, aumentando durante o dia e atingindo um máximo no final da noite (ELSOHLY et al., 1997). Também é interessante observar que mesmo havendo uma variação circadiana dos alcalóides majoritários de *Papaver somniferum*, causada por uma variação diária no conteúdo de água no látex da planta, o que leva à alteração na concentração, não resulta, portanto no conteúdo total, de morfina, codeína e noscapina (FAIRBAIRN & WASSEL, 1964; ITENOV et al., 1999).

A idade e o desenvolvimento da planta, bem como dos diferentes órgãos vegetais, também são de considerável importância e podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzidos, mas também as proporções relativas dos componentes da mistura (BOWERS & STAMP, 1993; EVANS, 1997; HENDRIKS et al., 1997). Sabe-se também que tecidos mais novos geralmente possuem maiores taxas biossintética de metabólitos (HARTMANN, 1996), tais como óleos essenciais (HALL & LANGENHEIM, 1986; GERSHENZON et al., 1989) lactonas sesquiterpênicas (SPRING & BIENERT, 1987), ácidos fenólicos (KOEPE et al., 1970), alcalóides (HÖFT et al., 1998) e flavonóides (SLIMESTAD, 1998).

2.2.2 Temperatura

Apesar de cada espécie ter se adaptado ao seu habitat, as plantas freqüentemente são capazes de existir em uma considerável faixa de temperatura. A faixa em que ocorrem as variações anuais, mensais e diárias na temperatura é um dos fatores que exerce maior influência em seu desenvolvimento, afetando, portanto, a produção de metabólitos secundários. A formação de óleos voláteis, em geral, parece aumentar em temperaturas

mais elevadas, apesar de dias muito quentes levarem a uma perda excessiva destes metabólitos (EVANS, 1997).

2.2.3 Disponibilidade hídrica

Fatores fisiológicos críticos, tais como fotossíntese, comportamento estomatal, mobilização de reservas, expansão foliar e crescimento, podem ser alterados por estresse hídrico e, conseqüentemente, levar a alterações no metabolismo secundário (HSIAO, 1973; SALISBURY & ROSS, 1991).

O estresse hídrico freqüentemente tem conseqüências significantes nas concentrações de metabólitos secundários em plantas, e há vários relatos de que estas condições geralmente levam a um aumento na produção de vários tipos de metabólitos secundários (GERSHENZON, 1984, WATERMAN & MOLE, 1989) como glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos (SALISBURY & ROSS, 1991), alguns terpenóides (LOKAR et al., 1987), antocianinas (JUNG, 2004) e alcalóides (BRISKE & CAMP, 1982; HÖFT et al., 1996). Com relação a metabólitos fenólicos, os estudos realizados apresentam resultados conflitantes e parece não ser possível estabelecer uma correlação clara entre sua concentração e estresse osmótico (COOPER-DRIVER et al., 1977; GERSHENZON, 1984).

Exemplos da influência do índice pluviométrico na produção de metabólitos secundários são a correlação positiva de alguns dos componentes do óleo essencial de *Santolina rosmarinifolia* (PALÁ-PAÚL et al., 2001) e a correlação negativa entre a produção de saponinas, como a lemmatoxina em *Phytolacca dodecandra* (LOBSTEIN et al., 1991).

O efeito da seca na concentração de metabólitos é, às vezes, dependente do grau de estresse e do período em que ocorre, sendo que efeitos curto prazo parecem levar a uma produção aumentada, enquanto a longo prazo é observado um efeito oposto (MATTSON & HAACK, 1987; WATERMAN & MOLE, 1989; HORNER, 1990). Outro fator é que a chuva contínua pode resultar na perda de substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes por lixiviação; sabe-se que isto se aplica a algumas plantas produtoras de alcalóides, glicosídeos e até mesmo óleos voláteis (WATERMAN & MOLE, 1994; EVANS, 1996).

2.2.4 Radiação ultravioleta

As diferentes espécies de plantas estão adaptadas a uma enorme variação na intensidade e quantidade de incidência luminosa (WATERMAN & MOLE, 1989, SALISBURY & ROSS, 1991; EVANS, 1996). Além disso, existe uma crescente preocupação com os efeitos do aumento de radiação ultravioleta (UV-B, 280–320 nm), decorrente da depleção da camada de ozônio (LOPES & GOBBO-NETO, 2007).

A radiação solar está intimamente relacionada com a produção de diversos metabólitos secundários, como flavonóides, taninos, terpenóides, glicosídeos cianogênicos e

alcalóides (YAMAURA et al., 1989; WATERMAN & MOLE, 1994; HÖFT et al., 1996; BURNS et al., 2002).

Foi demonstrado, por exemplo, que no manjeriço (*Ocimum basilicum*) e no tomilho (*Thymus vulgaris*), duas plantas utilizadas na medicina popular e como condimentos, o completo desenvolvimento de tricomas glandulares, onde os óleos essenciais são armazenados, é luz-dependente (YAMAURA et al., 1989, IOANNIDIS et al., 2002). Por outro lado, as folhas de hortelã (*Mentha piperita*) mantidas sob condições de dia longo contêm somente traços de mentofurano e se desenvolvidas sob condições de dia curto apresentam o mentofurano como constituinte majoritário do óleo essencial (VOIRIN et al., 1990).

2.2.5 Nutrientes

A disponibilidade de nutrientes afeta não somente o metabolismo primário, mas também influencia a produção de diferentes metabólitos secundários, e o impacto de mudanças em sua disponibilidade na produção de metabólitos secundários de certo modo, não são totalmente previsíveis; tendências podem ser reconhecidas, mas não é possível estabelecer regras sólidas e estáveis (WATERMAN & MOLE, 1989).

A grande maioria dos estudos visa estabelecer uma relação entre as disponibilidades de nitrogênio, carbono e luz (FAJER et al., 1992; KORICHEVA et al., 1998). Nestes estudos, de modo geral, a produção de metabólitos secundários (exceto os nitrogenados) mostra uma correlação positiva com a proporção carbono/nutrientes (C/N), isto é, em solos pobres em nutrientes, paralelamente à menor taxa de crescimento, geralmente se verifica maior produção de metabólitos secundários, particularmente derivados fenólicos (BRYANT et al., 1983; COLEY et al., 1985). Contudo, a produção global de metabólitos nitrogenados por uma planta (alcalóides, glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos) geralmente é aumentada com a maior disponibilidade de nitrogênio no solo (WATERMAN & MOLE, 1989; HÖFT et al., 1996).

2.2.6 Altitude

A altitude também exerce efeitos sobre o desenvolvimento e a produção de metabólitos secundários em plantas, apesar de existirem relativamente poucos estudos neste sentido. A correlação positiva geralmente existente entre o conteúdo total de flavonóides e a altitude, por exemplo, é de particular interesse farmacêutico, uma vez que estes são constituintes ativos de um grande número de plantas medicinais (POLLE et al., 1992; BACHEREAU & MARIGO, 1998). Esta correlação pode ser explicada pela maior susceptibilidade à radiação UV em altitudes maiores, uma vez que, conforme comentado anteriormente, os flavonóides são reconhecidos por propiciarem proteção à radiação e seus efeitos.

Metabólitos não fenólicos também podem ser influenciados pela altitude. O aumento de altitude leva a um decréscimo no conteúdo dos alcalóides diterpênicos de *Aconitum napellus* e piperidínicos de *Lobelia inflata* e no de óleos voláteis de tomilho e hortelã pimenta (EVANS, 1996).

2.2.7 Indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos

Fatores mecânicos aos quais as plantas estão susceptíveis, tais como ferimentos, ou mesmo meros estímulos, causados por chuva, granizo, vento, areia, invasão por patógenos e pastagem de herbívoros, também podem influenciar a expressão do metabolismo secundário (BOWERS & STAMP, 1993; ZHENG & WU, 2004).

Danos causados a plantas por ferimentos ou ataque de herbívoros ou patógenos freqüentemente levam a uma resposta bioquímica, que reduz a aceitabilidade do órgão ou de todo o organismo a ataques futuros (WATERMAN & MOLE, 1989). Sabe-se também que o nível de indução pode variar de acordo com o agente causador. De fato, algumas observações têm revelado que injúria causada por alimentação de insetos pode resultar em uma resposta fisiológica diferenciada, na qual a expressão gênica e/ou formação de metabólitos secundários é induzida especificamente ou mais rapidamente, devido a eliciadores presentes na saliva do inseto (NEUVONEN et al., 1987; KORTH & DIXON, 1997).

2.3 FAMÍLIA ASTERACEAE

Estudos sugerem que as Asteraceae tiveram origem na América do Sul, no Eoceno Superior com posterior migração para a América do Norte (DEVORE & STUESSY, 1995).

Grande número de espécies vegetais pertencentes a esta família é empregado na medicina popular há muito tempo (CUATRECASAS, 1969) e com isso desperta a atenção de pesquisadores devido a suas inúmeras propriedades medicinais que lhes são atribuídas, principalmente antiinflamatória, expectorante, antitussígena, anti-hipertensiva e no tratamento de problemas hepáticos (EVANS, 1996).

2.3.1 Aspectos botânicos

Considerada uma das maiores famílias, representando cerca de 1/10 de todas as Angiospermas, Asteraceae possui aproximadamente 23.000 espécies distribuídas em 1.535 gêneros (BREMER & ANDERBERG, 1994).

Estudos sugerem que as Asteraceae tiveram origem na América do Sul, no Eoceno Superior com posterior migração para a América do Norte (DEVORE & STUESSY, 1995).

Possui distribuição cosmopolita sendo encontrada em todos os continentes, com exceção do Antártico, e seus representantes normalmente apresentam adaptações às várias condições ambientais e ecológicas (BARROSO, 1991; JUDD et al., 1999).

A América Latina é considerada um centro de diversidade de Asteraceae, sendo que na América do Sul, em algumas regiões semi-áridas e na Patagônia, os representantes de Asteraceae correspondem a 20% da flora (CABRERA, 1978). Para o Brasil são estimados aproximadamente 180 gêneros e 3.000 espécies com distribuição desde as regiões mais frias e úmidas, como as serras do Sudeste e Sul, até as áreas secas na região do semi-árido nordestino, sendo menos frequentes em formações florestais (HIND, 1993).

São plantas com hábito variável abrangendo desde ervas até arbustos, mais raramente árvores; podem ser monóicas, dióicas ou poligamo-dióicas. As folhas são alternas ou opostas, raramente verticiladas, pecioladas ou sésseis, simples, inteiras, lobadas ou dissectas, distribuídas ao longo dos ramos, em rosetas basais ou ausentes; estípulas geralmente ausentes. O indumento é variável, constituído de tricomas multicelulares unisseriados ou multisseriados, composto de células uniformes ou células basais e terminais modificadas (BREMER & ANDERBERG, 1994).

Geralmente apresentam tricomas tectores que podem ser simples, estrelados, malpighiáceos ou escamiformes, também são comuns tricomas glandulares depressos na face abaxial das folhas, e neste caso, aparecem como pontos pretos, translúcidos ou estrias alongadas. Sua secreção é responsável pela aparência envernizada das folhas de alguns gêneros, em especial de *Baccharis* L., *Eupatorium* L. *sensu lato*, *Gochnatia* Kunth e *Symphypappus* Turcz. (Metcalf & Chalk, 1950). Tricomas unicelulares são raros, sendo exclusivos da subfamília Barnadesoideae (BREMER & ANDERBERG, 1994).

Quanto à anatomia, a principal característica é a ocorrência de canais laticíferos e resiníferos, sendo que sua distribuição nos membros da família tem valor taxonômico, uma vez que canais ou cavidades de látex são característicos de Cichorioideae, especialmente na tribo Lactuceae, enquanto que canais ou cavidades de resinas são comuns nos representantes de Asteroideae (BREMER & ANDERBERG, 1994).

Asteraceae é facilmente reconhecida pelas flores reunidas em capítulos, formando um pseudanto, que podem ser isolados ou agrupados nas mais diversificadas inflorescências, formando capitulescências corimbiformes, paniculiformes, tirsóideo-paniculadas, racemiformes, espiciformes, fasciculadas, glomeruliformes ou até mesmo formando capítulos envoltos por involúcro secundário (CRONQUIST, 1981).

Provavelmente a maior contribuição das Asteraceae para o homem é a ecológica, uma vez que são responsáveis pela grande diversidade de espécies e, portanto, favorecem a estabilidade e sustentabilidade produtiva das vegetações em áreas secas do mundo, tais como os cerrados, capoeiras, campos e semi-áridos, especialmente nas regiões tropicais e

subtropicais. Economicamente são pouco utilizadas na alimentação; tem potencial medicinal, toxicológico e alergogênico, destacando-se sem dúvida como planta ornamental ou daninha (HEYWOOD, 1979).

Os caracteres ecológicos que distinguem as Asteraceae das demais famílias são os pseudantos, o mecanismo especializado de apresentação do pólen e a diversidade de armas químicas presentes em todos os membros da família (CRONQUIST, 1981). Por isso, segundo alguns autores como Cronquist (1981) e Bremer & Anderberg (1994) o grande sucesso de Asteraceae se deve à associação dos compostos químicos com a morfologia especializada, pois apenas a morfologia especializada, como as flores reunidas em capítulos e o mecanismo secundário de apresentação do pólen também são encontrados em outras famílias, porém estas não apresentam a grande diversidade de Asteraceae.

Mesmo sendo um táxon com numerosas espécies, Asteraceae sempre foi considerada como um grupo natural bem sustentado por caracteres sinapomórficos, tais como: lactonas sesquiterpênicas, cálice altamente modificado em pápus, anteras conatas com deiscência introrsa formando um tubo ao redor do estilete; mecanismo secundário de apresentação de pólen com estilete modificado funcionando como uma escova; ovário bicarpelar com apenas um óvulo de placentação basal e fruto com endosperma constituído de apenas uma camada inconspícua (BREMER & ANDERBERG, 1994).

2.3.2 Aspectos químicos

Uma das principais características das Asteraceae é a diversidade de seus metabólitos secundários, dentre eles os poliacetilenos, terpenóides (sesquiterpenóides, diterpenóides e triterpenóides), alcalóides (CRONQUIST, 1981), óleos essenciais (AGOSTINI et al., 2005), antocianinas (HEYWOOD et al., 1977), flavonóides (MARKHAM, 1982), cumarinas, benzofuranos e benzopiranos (EMERENCIANO et al., 1998). Entretanto seus constituintes característicos são as lactonas sesquiterpênicas, às quais se têm atribuído grande parte de suas atividades farmacológicas, dentre elas citotóxica, antitumoral, antiinflamatória, bactericida, fungicida e antiúlcera (RODRIGUEZ, 1977; PICMAN, 1986, ROBLES et al., 1995; HEINRICH et al., 1998).

Flavonóides pertencentes à família Asteraceae têm se apresentado como marcadores taxonômicos, permitindo que algumas espécies sejam classificadas sistematicamente pelos flavonóides que estas produzem (EMERENCIANO et al., 2001; SHARP et al., 2001).

2.3.3 Gênero *Melampodium*

O gênero *Melampodium* é representado por cerca de 40 espécies distribuídas no Sul dos Estados Unidos, México, América Central, Colômbia e três delas no Brasil (TURNER, 1993; BREMER & ANDERBERG, 1994).

As espécies deste gênero são herbáceas, anuais ou perenes, com folhas simples ou opostas. No capítulo, as brácteas involucrais apresentam-se dispostas em duas séries, dimórficas. O receptáculo é convexo ou colunar. As flores do raio, de coloração amarelada ou branco-amarelada, são muito pequenas. As flores do disco são funcionalmente masculinas, liguladas, de coloração amarelo-esverdeada ou amarelo-alaranjada (BREMER & ANDERBERG, 1994).

A maioria das espécies do gênero *Melampodium* floresce durante os meses de agosto e setembro, entretanto algumas apresentam um tempo de floração muito mais amplo, podendo florir do início ao fim do ano (SUNDBERG & STUESSY, 1990).

Apenas duas espécies constam como empregadas na medicina popular a *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC e *Melampodium camphoratum* (L.f.) Backer. Sob o aspecto químico, cerca de 15% das espécies do gênero foram estudadas, observando a predominância de lactonas sesquiterpênicas e diterpênicas e também a presença de cumarinas, flavonóides e alcalóides (SAITO, 2003).

2.3.3.1 *Melampodium divaricatum* Rich. In Pers.

Melampodium divaricatum é uma planta anual, ereta, herbácea, ramificada, de 80 – 160 cm de altura, nativa da América do Sul e propaga-se apenas por sementes. É uma planta daninha medianamente freqüente em quase todo o país, onde infesta principalmente lavouras anuais, pomares, cafezais e beira de estradas. Apresenta preferência por solos argilosos e com boa fertilidade. É bastante variável no tamanho e forma de suas folhas (LORENZI, 2000). As características macroscópicas de seus órgãos estão apresentadas nas figuras 2-4.



Pedro Tenorio Lezama

Figura 2. Aspecto macroscópico da flor de *Melampodium divaricatum*.



Figura 3. Aspecto macroscópico da folha de *Melampodium divaricatum*.



Figura 4. Aspecto macroscópico do caule de *Melampodium divaricatum*.



Figura 5. Aspecto macroscópico das partes aéreas de *Melampodium divaricatum*.

Conhecida popularmente como falsa-calêndula (VARANDA et al., 2006), flor-amarela, estrelinha, flor-de-ouro (LORENZI, 2000); picão-da-praia (AGRA et al., 2007); fel da terra e salsa da praia (BOTSARIS, 2007) *Melampodium divaricatum* é uma espécie comumente empregada na medicina popular (GIRÓN et al., 1991), principalmente na América Latina.

Na Guatemala, tem suas folhas utilizadas como antimalárica e no tratamento de problemas estomacais; a planta inteira é empregada contra resfriados (GIRÓN et al., 1991). No México, a embolia é tratada com a administração oral de uma infusão da planta inteira, sendo usada também como antidisentérico e anticonvulsivante (HÜTHER et al., 1999). No Brasil é empregada popularmente no tratamento da malária como também em casos de inflamações, febre, flatulências, dores estomacais, cólicas, icterícia, dores comuns, dores musculares, palpitações, vertigens, reumatismo, anúria e também como diurética e carminativa (BOTSARIS, 2007) e no Nordeste o chá de suas folhas e inflorescências bem como da planta inteira tem sido utilizado como diurético e no tratamento da leucorréia (AGRA et al., 2007).

Estudos químicos realizados nos Estados Unidos da América, no México e em El Salvador caracterizaram a presença de diversos metabólitos secundários como cumarinas, flavonóides (canferol e quercetina), alcalóides pirrolizidínicos bem como compostos comumente presentes em óleos essenciais como o cariofileno, espatulenol e guaiacol como apresentado na tabela 1.

Tabela 1. Compostos químicos identificados na espécie *Melampodium divaricatum*

Compostos Químicos	Órgão Vegetal	Local da Coleta	Referências
Cumarinas	Folhas	Panamá	BORGES-DEL-CASTILLO et al., 1984
Cariofileno e Espatulenol Guaianol e Colavenol	Caules e Folhas	EI Salvador	HUBERT & WIEMER, 1985
Estigmasterol Flavonóides glicosilados	Folhas	EI Salvador	ALONSO-LÓPEZ et al., 1985 BOHM & STUESSY, 1991
Canferol Quercetina	Planta inteira	México	HÜTHER et al., 1999
Derivados de hidroxitimol Alcalóides pirrolizidínicos	Partes Aéreas Planta Inteira	Estados Unidos	SCHÜNGEL & PASSREITER, 2000

São conhecidas algumas sinonímias científicas da espécie, a saber: *Alcina minor* Cass., *Dysodium divaricatum* Rich. ex Pers., *Eleutheranthera divaricata* (Rich. ex Pers.) Millsp., *Melampodium berterianum* Spreng., *Melampodium copiosum* Klatt, *Melampodium divaricatum* var. *macranthum* Schltl., *Melampodium flaccidum* (Benth.) Benth., *Melampodium paludosum* Kunth, *Melampodium panamense* Klatt, *Melampodium pumilum* Benth., *Melampodium tenellum* var. *flaccidum* Benth., *Melampodium brachyglossum* Donn. Sm (LORENZI, 2000).

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são os princípios odoríferos encontrados em várias partes da planta às quais são atribuídas diversas funções biológicas. Considerados por muito tempo como desperdício fisiológico ou produtos de desintoxicação, atualmente sabe-se que desempenham fundamental papel para a adaptação do vegetal ao meio. Graças à sua volatilidade, atuam biologicamente na defesa contra o ataque de predadores, na atração de polinizadores, proteção contra perda de água e aumento de temperatura bem como inibidores de germinação dentre outras funções (FABROWSKI, 2002; SIMÕES et al., 2004).

As denominações atribuídas devem-se às suas características físico-químicas. Como evaporam quando expostos ao ar em temperatura ambiente, sua principal característica, são denominados óleos voláteis; por apresentarem aroma intenso e agradável constituindo verdadeiras “essências”, óleos essenciais; e por serem solúveis em solventes orgânicos apolares, como o éter, por exemplo, podem ser chamados de óleos etéreos (ROBBERS et al., 1997; VITTI & BRITO, 2003; SIMÕES et al., 2004).

As características físicas dos óleos voláteis são comuns, apesar de apresentarem constituições químicas diferentes. São geralmente insolúveis, ou muito pouco solúveis em água, solubilizando-se em álcool, éter e em muitos solventes orgânicos. Apresentam odores característicos, alto índice de refração e são opticamente ativos (TYLER et al., 1988; ROBBERS et al., 1997).

De acordo com a família a que pertencem às espécies, os elementos voláteis podem estar concentrados em órgãos anatômicos específicos. Os óleos essenciais localizam-se em estruturas especiais de secreção, como cavidades, canais (bolsas) esquizógenos ou lisígenos, canais oleíferos, pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas. Podem ser estocados nas flores, folhas, casca do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos e sementes, podendo variar na sua composição de acordo com a localização em uma mesma espécie (SIANI et al., 2000; FABROWSKI, 2002; SIMÕES et al., 2004).

Além da variação de acordo com o órgão de localização, outros fatores podem interferir na composição do óleo essencial de uma mesma espécie vegetal, tais como: a época de coleta; condições climáticas e de solo, localização geográfica; ciclo vegetativo da espécie e o processo de obtenção (MOREIRA et al.1980, ROBBERS et al., 1997; MEJDOUB & KATSIOTIS, 1998; WIRTHENSOHN & SEDGLEY, 1998; SIANI et al., 2000; SIMÕES et al., 2004).

Os processos de obtenção de óleos essenciais variam conforme a localização do óleo na planta. Os métodos mais comuns são: enfloração; arraste direta por vapor d'água; extração com solventes orgânicos; prensagem e extração com CO₂ supercrítico (GUENTHER, 1977; ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2004).

A maior parte dos óleos essenciais consiste na mistura de hidrocarbonetos (terpenos, sesquiterpenos, entre outros) e de compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, éteres fenólicos, entre outros). Quimicamente, estes compostos derivam de terpenóides, originados a partir do ácido mevalônico, ou de fenilpropanóides, provindos do ácido chiquímico (GUENTHER, 1977; SIMÕES et al., 2004).

Os compostos terpênicos, cuja origem biossintética deriva de unidades de isopreno são os mais freqüentes e os monoterpenos correspondem a aproximadamente 90 % da composição. Os diterpenos são encontrados apenas em óleos vegetais extraídos com solventes orgânicos.

Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos (alfa-terpineol e terpinoleno) e bicíclicos (alfa-pineno, tujona, cânfora, fenchona). Em cada um desses subgrupos, classificam-se ainda: hidrocarbonetos insaturados (limoneno), álcoois (mentol), aldeídos ou cetonas (mentona, carvona), lactonas (monoterpenos lactônicos, ex. nepelactona) e tropolonas (gama-tujaplicina). As variações estruturais dos sesquiterpenos podem ser: acíclicos (farnesol, nerolidol), monocíclicos (ácido abscísico) ou bicíclicos (gama-bisaboleno, beta-selineno, cariofileno) ou lactonas sesquiterpênicas. Em cada um desses subgrupos, classificam-se inúmeras substâncias. O número de compostos terpênicos conhecidos ultrapassa a 8000 e estima-se um número superior a 150 monoterpenos e 1000 sesquiterpenos (SIMÕES et al., 2004).

Os óleos essenciais são empregados para diversas finalidades: como medicinais, devido a algumas propriedades terapêuticas, na indústria de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas), perfumes e cosméticos, bem como na fabricação de produtos de limpeza. Apesar de apresentar várias características benéficas, não podem ser descartados os efeitos tóxicos acarretados por estas substâncias, que podem acarretar

desde uma simples reação cutânea a efeitos convulsivantes e psicotrópicos (ROBBERS et al., 1997; FABROWSKI, 2002; SIMÕES et al., 2004).

2.4.1 Análise dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são as misturas naturais muito complexas que podem conter aproximadamente de 20 a 60 componentes em concentrações completamente diferentes. Porém são caracterizados por dois ou três componentes principais que geralmente apresentam concentrações razoavelmente elevadas (20-70%) comparadas a outras os componentes atuais em quantidades de traço. Por exemplo, o carvacrol (30%) e o timol (27%) são os componentes majoritários do óleo essencial de *Origanum compactum*, o linalol (68%) do óleo essencial de *Coriandrum sativum*, o mentol (59%) e a mentona (19%) do óleo essencial de *Mentha piperita*. Geralmente, estes componentes principais determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

De forma geral os componentes estão divididos em dois grupos distintos de acordo com sua origem biossintética. O principal grupo é composto pelos terpenos e terpenóides e o outro de constituintes aromáticos e alifáticos, caracterizado pelo baixo peso molecular (PICHESKY et al., 2006).

A separação e a identificação dos componentes que normalmente formam os óleos essenciais oferecem algumas dificuldades, por causa da existência de diversos compostos isoméricos e da instabilidade apresentada por certos terpenos (RUDLOFF & KELLER, 1974). De acordo com Collins (1997), a separação e identificação do óleo essencial requerem técnicas e instrumentos apropriados.

A cromatografia em fase gasosa (CG) é o método de escolha que separa e quantifica componentes dos óleos essenciais. Como os óleos são suficientemente voláteis, a amostra é somente solubilizada em solventes, antes de ser injetada no cromatógrafo. Com o objetivo de segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico, é recomendável analisar qualquer óleo volátil também por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (WATERMAN, 1993). Este método permite a separação dos componentes e fornece, ainda, o espectro de massas de cada composto. O espectro de massas geralmente indica a massa molecular e o padrão de fragmentação. A massa molecular informa sobre a classe da substância. O padrão de fragmentação pode ser comparado com aqueles constantes do banco de dados de espectros de massas, que, normalmente, é instalado no computador (SIMÕES & SPITZER, 2004).

A identificação dos compostos pode ser realizada por meio da comparação do tempo de retenção relativo à amostra com padrões. Para que essa identificação fosse

independente de variações do tempo de retenção, sob condições diferentes de medida, foi introduzido o índice de Kovat's, que relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos (SIMÕES & SPITZER, 2004).

2.4.2 Atividades biológicas dos óleos essenciais

Desde a idade média os óleos essenciais vêm sendo empregados pelos árabes principalmente, pelas propriedades anti-sépticas desde então já conhecidas. Portanto, eram bastante utilizados em processos de embasamento, preservação de alimentos e como antimicrobiano, analgésico, sedativo, antiinflamatório, espasmolítico e como anestésicos locais. Estas propriedades relatadas há tanto tempo estão sendo confirmadas através de estudos e muitos mecanismos de ação se encontram bem esclarecidos, principalmente para a atividade antimicrobiana (BAKKALI et al., 2008).

Atualmente, são conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais, destes aproximadamente 300 são comercialmente importantes em especial para as indústrias farmacêuticas, agronômicas, alimentícias, sanitárias, cosméticas e de perfumes e muitos constituintes podem ser empregados para diversas finalidades. Limoneno, geranil acetato e δ -carvona são empregados em perfumes, como aditivos de sabor em alimentos, fragrâncias em produtos de limpeza e como solventes industriais. Além disso, os óleos essenciais parecem exibir as propriedades medicinais específicas atuando em disfunções locais e até mesmo sistêmicas (SILVA et al., 2003; HAJHASHEMI et al., 2003; PERRY et al., 2003).

Efeitos citotóxicos são observados *in vitro* contra bactérias patogênicas tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas (BURT, 2004; ROTA et al., 2004; SI et al., 2006), no DNA e RNA viral (JASSIM & NAJI, 2003; REICHLING et al., 2005), em fungos (PITAROKILI et al., 2003; KOSALEC et al., 2005), incluindo leveduras (DUARTE et al., 2005; PAULI, 2006).

Devido o grande número de constituintes, os óleos essenciais parecem não ter nenhum alvo celular específico (CARSON et al., 2002). Como lipídios típicos atravessam a membrana citoplasmática, desorganizam a estrutura dos polissacarídeos da camada, dos ácidos graxos e dos fosfolipídios, atravessando-os. A propriedade citotóxica parece incluir tais danos na membrana. Nas bactérias a permeabilização das membranas está associada com a perda dos íons e a redução do potencial da membrana, gerando colapso da bomba de prótons e posteriormente a deficiência de energia (DI PASQUA et al., 2006; TURINA et al., 2006). Os danos na membrana celular podem conduzir ao extravasamento de macromoléculas acarretando a morte celular (OUSSALAH et al., 2006).

Esse efeito parece estar relacionado com o estado de desenvolvimento celular. Em estado de divisão, as células são mais sensíveis provavelmente pelo fato dos óleos essenciais atingirem com maior facilidade os sítios-alvo e em geral a atividade citotóxica é

maior na presença de fenóis, aldeídos e álcoois (BRUNI et al., 2003; SACCHETTI et al., 2005).

Em células eucariontes, os óleos essenciais podem provocar a despolarização da membrana mitocondrial por reduzir o potencial de membrana, afetando o transporte iônico de cálcio reduzindo o gradiente iônico em outros canais, afetando o pH e assim como nas bactérias a bomba de prótons fica comprometida e conseqüentemente a taxa de ATP. Mudam a fluidez da membrana, que se tornam anormalmente permeáveis permitindo o extravasamento dos radicais do citocromo C, dos íons de cálcio e das proteínas assim como no estresse oxidativo e falha energética. O atravessamento de outras membranas internas como a da mitocôndria gera a morte celular por apoptose e necrose (YOON et al., 2000; ARMSTRONG, 2006).

Recentemente estudos estão demonstrando o potencial antimutagênico dos óleos essenciais o que pode estar relacionado à inibição da penetração de agentes mutagênicos nas células (SHANKEL et al., 1993), inativação direta atuando como antioxidantes, capturando radicais livres ou ativação enzimática de células antioxidantes (IPEK et al., 2005), inibição do metabolismo de conversão de substâncias pró-mutagênicas em mutagênicas pelo citocromo P450 (GOMES-CARNEIRO et al., 2005) dentre outros.

Tanto os óleos essenciais como seus constituintes isolados têm apresentado atividade supressora frente a diversos tipos de câncer, dentre eles câncer de cólon, gástrico, mamário, tumores pulmonares, leucemia (DE ANGELIS, 2001).

Atuam na prevenção da arteriosclerose e trombose (BALLABENIA et al., 2004; BARTER, 2005), como antioxidantes (KULISIC et al., 2004), antidiabético (TALPUR et al. 2005), antiinflamatório (CALIXTO et al., 2004; VEIGA JUNIOR et al., 2007) promotores de absorção de fármacos (WILLIAMS & BARRY, 2004) e todas estas propriedades variam conforme a constituição química dos óleos essenciais (EDRIS, 2007).

Diante o grande interesse por produtos naturais, principalmente para os óleos essenciais, torna-se de fundamental importância a compreensão de seu mecanismo de ação em sistemas biológicos para que se consigam novas aplicações tanto na área farmacêutica, alimentícia e na agricultura. Alguns destes óleos podem atuar como alternativa ou complementar as substâncias sintéticas, sem apresentar muitas vezes os mesmos efeitos adversos (CARSON & RILEY, 2003).

2.5 FLAVONÓIDES

Os flavonóides são substâncias polifenólicas amplamente encontradas na natureza, em frutas, folhas, flores, raízes, madeiras, cascas, pólen, néctar, sementes e grãos (HARBONE, 1996). Estruturalmente, os flavonóides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos C6-C3-C6,

onde os dois anéis C6 são necessariamente aromáticos (anéis A e B) e conectados por uma ponte de três carbonos que geralmente contém um átomo de oxigênio (anel C) (LOPES et al., 2000). Com exceção das chalconas, todos os flavonóides possuem um anel pirânico (com heteroátomo de oxigênio). De acordo com as características químicas e biossintéticas, os flavonóides são classificados em: flavonas, flavonóis, diidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (HAVSTEEN, 1983).

As estruturas químicas dos flavonóides podem variar de acordo com o processo de substituição dos grupos funcionais existentes nos anéis, os quais incluem a hidrogenação, hidroxilação, metilação, sulfatação e glicosilação (COOK & SAMMAN, 1996; DI CARLO et al., 1999; HARBONE & WILLIAMS, 2000; ZUANAZZI, 2004). A figura 6 apresenta a estrutura geral dos flavonóides.

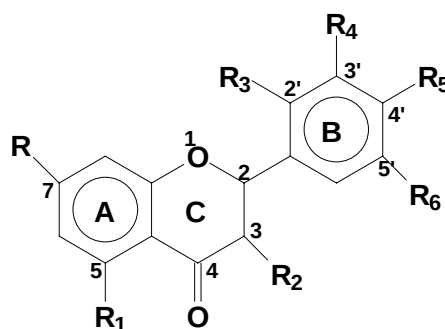


Figura 6. Estrutura geral dos flavonóides (HARBONE, 1996).

Muitos flavonóides são encontrados na natureza na forma glicosilada (agenina ou glicona) e na forma de aglicona (sem associação a um açúcar). Quando se apresentam na forma glicosilada, esses açúcares podem ser D-glucose, L-raminose, arabinose, glucoramnose, galactose, entre outros.

Os flavonóides, por serem pigmentos presentes em todas as células fotossintetizadoras, são encontrados em ervas, legumes, frutas, mel dentre outros produtos de consumo cotidiano (HAVSTEEN, 1983; LOPES et al., 2000; HAVSTEEN, 2002).

Apesar do termo flavonóide derivar do latim *flavus*, que significa amarelo, observa-se que o grupo flavanona (ex. pinocembrina) é incolor e que a classe das antocianinas possuem substâncias que variam no seu espectro de coloração do verde ao azul (LOPES et al., 2000).

2.5.1 Análise de flavonóides

Os flavonóides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (banda II) e outro entre 300-400 nm (banda I). Em geral, a banda II pode ser considerada como devido à existência do anel A e a banda I devido ao anel B e as diferentes classes dos flavonóides possuem bandas de absorção características.

A concentração de flavonóides totais pode ser determinada pela complexação dos flavonóides com o cátion alumínio, formando complexos estáveis entre o cátion alumínio com os flavonóides em meio metanólico (figura 7). A formação do complexo entre o alumínio e flavonóide em metanol promove um desvio para maiores comprimentos de onda (efeito batocrômico) e uma intensificação da absorção na análise espectrofotométrica como descrito na tabela 2.

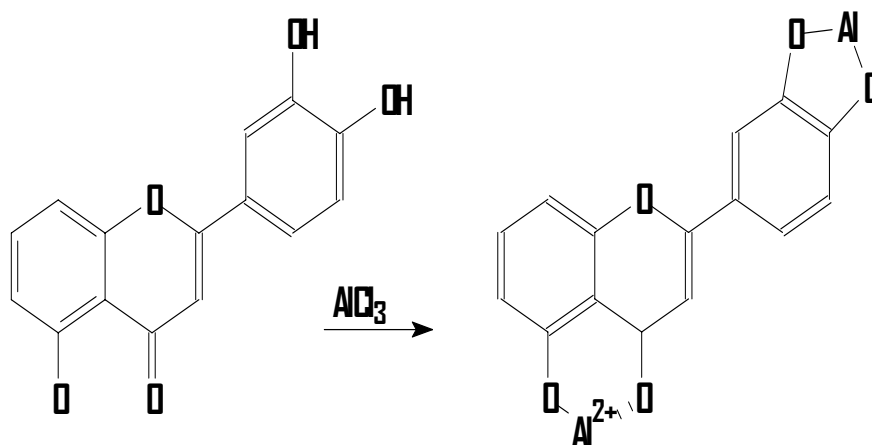


Figura 7. Formação do complexo flavonóide-alumínio, em solução metanólica de cloreto de alumínio (MARCUCCI et al., 2001).

Tabela 2. Deslocamento no comprimento de onda dos compostos flavonoídicos provocado pela complexação com cloreto de alumínio (MARCUCCI et al., 2001)

Classe de flavonóide	Banda (nm)	I Banda (nm)	II Banda (nm)	Deslocamento provocado por complexação com $AlCl_3$ (nm)**
Flavonas	310-350		250-280	+ 35 – 55 *
Flavonóis (3-OH substituído)	330-360		250-280	+ 50 - 60 *
Flavonóis (sem 3-OH)	350-385		250-280	+ 35 - 55 *
Isoflavonas	310-330 ombro		245-275	+ 10 – 14
Isoflavonas (5-desoxi-6,7-dioxigenadas)	320 pico		275-295	+ 11 – 30
Flavanonas	300-330 ombro		230-270	+ 20 – 26 *
diidroflavonóis				
Chalconas	340-390		230-270	+ 48 - 64 *
Auronas	465-560		270-280	+ 40 *
				+ 60 - 70 *

Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. A leitura é feita em espectrofotômetro a 415 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2 % em metanol. Em 425 nm, os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas não absorvem em presença de AlCl_3 , por isso não há interferência destas substâncias no doseamento de flavonóides (MARCUCCI et al., 2001).

2.5.2 Atividades biológicas dos flavonóides

Estudos demonstraram que, independente de estarem vinculados ou não a açúcares, os flavonóides têm se mostrado ativos em diversos processos patológicos como referido para rutina e quercetina (COOK & SAMMAN, 1996; DI CARLO et al., 1999). O tipo de atividade farmacológica apresentada pelos flavonóides vai ser definido por sua estrutura química e pelos grupos funcionais ligados à sua estrutura principal.

Os flavonóides são responsáveis por funções biológicas que garantem o equilíbrio ecológico, como proteção contra a radiação ultravioleta, regulação do crescimento e desenvolvimento normal das plantas, defesa contra fungos, bactérias e vírus, além de serem responsáveis pela coloração das pétalas das flores, quelarem metais tóxicos e reduzirem os agentes oxidativos lesivos à própria planta. Estão ainda envolvidos no processo de transferência de energia, morfogênese, determinação do sexo das plantas, respiração e fotossíntese da maioria das plantas (COOK & SAMMAN, 1996; DI CARLO et al., 1999; HARBONE; WILLIAM, 2000; ZUANAZZI, 2004).

Nos últimos anos, os flavonóides têm tido um crescente interesse por parte da indústria química, farmacêutica e alimentícia. São capazes de modular a atividade das enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares, sugerindo que esses compostos possuem atividades hepatoprotetora, antialérgica, antiinflamatória, antiosteoporótica, antitumoral, analgésica, antianginosa, antiaterogênica, antidiabética, antidiarréica e protetora vascular. Uma vez absorvidos, influenciam muitas funções biológicas incluindo síntese de proteínas, proliferação, diferenciação celular e angiogênese, trazendo benefícios em muitas patologias (HALLIWELL et al., 1995; MILLER, 1996; DI CARLO et al., 1999).

Alguns estudos mostram que os flavonóides são absorvidos pelo trato gastrointestinal após administração oral. No entanto, existem relatos que afirmam que estes compostos são pouco absorvidos, podendo alcançar ou não, em pequenas concentrações, a circulação sistêmica (COOK & SAMMAN, 1996; HARBONE & WILLIAM, 2000).

Acredita-se que os efeitos benéficos dos flavonóides estejam, em parte, associados à sua atividade antioxidante. O processo antioxidante inclui: seqüestro de radicais livres

para prevenir a sua propagação, hidrólise enzimática da ligação éster para remover ácidos graxos peroxidados de lipídeos, seqüestro de íons metálicos de transição e redução de enzimas catalisadoras de peróxidos (ANDREOLI, 2000). Os antioxidantes inibem a peroxidação lipídica e outros processos mediados por radicais livres e, dessa forma, protegem o organismo de doenças atribuídas à formação destes radicais.

Várias substâncias têm sido sugeridas como antioxidantes a exemplo dos flavonóides (catequina e rutina), taninos, cumarinas, xantinas e, mais recentemente, procianidina por apresentarem propriedade seqüestradora de radicais livres de uma maneira dose-dependente, tornando-se viáveis como agentes terapêuticos promissores nas patologias envolvidas com os radicais livres (CZINNER et al., 2001) como asma, câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, diabetes, doenças inflamatórias gastrintestinais e doenças no fígado (MILLER, 1996).

2.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A história do desenvolvimento e uso de substâncias antimicrobianas na prática médica antecedeu a descoberta de espécies microbianas, uma vez que Hipócrates (460-337 a.C.) recomendava a lavagem de ferimentos com vinho para impedir o processo infeccioso. Documentos datados de 2.500 a 3.000 anos atrás, mostram que alguns povos como os chineses e indianos, ainda primitivos, utilizavam mofo, papa de soja e produtos correlatos para o tratamento de lesões infectadas e processos inflamatórios (SANCHES, 2004).

Atualmente os fármacos usados no tratamento de doenças infecciosas são denominados agentes antimicrobianos. Este termo teve início com a descoberta da penicilina por Fleming em 1929, primeiro antibiótico a ser produzido em escala industrial.

O termo antibiótico pode ser definido amplamente como substância biossintetizada por um ser vivo com capacidade de inibir microrganismos e/ou bloquear o crescimento e replicação celulares, em concentrações relativamente pequenas. Do mesmo modo, a denominação quimioterápico caracteriza o tratamento de doenças por meio de substâncias químicas obtidas sinteticamente. Portanto, o que diferencia os dois termos acima citados, utilizados muitas vezes como sinônimos, é a origem dos mesmos (SILVA, 1998).

Segundo Lima (2001) as substâncias antimicrobianas ou antibióticas representam talvez o maior avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas ou mais, com progressos sem limites dentro da terapêutica medicamentosa. O referido grupo de medicamentos apresenta, de forma acentuada efeitos sobre espécies microbianas patogênicas e oportunistas, responsáveis pelas mais variadas patologias que provocam a incapacidade prolongada ou óbito de seres humanos. Os antimicrobianos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. Devem ser substâncias que, em pequenas concentrações, apresentem

atividade letal ou inibitória contra as espécies microbianas, prevenindo o desenvolvimento de microrganismos resistentes, com mínimos efeitos indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química, dentre outros.

Os mecanismos de ação dos agentes antimicrobianos incluem os principais pontos: inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana; lesão da membrana citoplasmática, interferindo nas funções desta; interferência na síntese de ácido nucléico e proteínas quer seja na interferência da síntese e replicação de DNA, ou na inibição da RNA-polimerase dependente de DNA; e inibição competitiva da síntese de metabólitos essenciais (PELCZAR et al., 1996; KONEMAN et al., 1997; SILVA, 1998; TORTORA et al., 2001).

Desde o princípio das civilizações, os vegetais têm sido utilizados não só como fonte alimentícia, como também medicamentosa. As diversas enfermidades têm sido tratadas com chás, garrafadas, sucos, tinturas, banhos, cataplasmas e ungüentos, preparados a partir de partes de plantas. A referida conduta terapêutica remonta, principalmente, aos antigos povos da China, Egito, Ásia e Roma, onde eruditos, com base em seus conhecimentos classificaram numerosas espécies vegetais, com a respectiva indicação do uso medicinal. Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato recente, a busca das mesmas teve grande impulso após a descoberta da penicilina (LIMA, 2001).

As espécies vegetais desenvolveram ao longo de sua evolução, mecanismos de defesa interagindo com o meio ambiente. As substâncias químicas produzidas são empregadas em consequência da ativação de rotas específicas do metabolismo secundário e constituem a maioria dos princípios ativos, por exemplo, óleos essenciais, alcalóides, taninos e flavonóides, entre outras (COWAN, 1999).

Diante da múltipla resistência urge a descoberta de novos compostos capazes de contornar os mecanismos de resistência desenvolvidos, ou mesmo atuar através de mecanismos de ação distintos aos fármacos disponíveis. Portanto a atividade antimicrobiana é um item relevante na caracterização de extratos vegetais.

2.6.1 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios para verificação da atividade antimicrobiana *in vitro* seguem diferentes técnicas e métodos.

Métodos de difusão em ágar: a substância pesquisada é colocada em um reservatório, podendo este ser disco de papel, cavidade no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície, em contato com meio de cultura sólido previamente inoculado com o microrganismo teste. A leitura é realizada após o período de incubação, medindo-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento microbiano formado (ISENBERG, 1992; KONEMAN et al., 1997).

Métodos de diluição: uma quantidade de amostra é dissolvida homogeneamente em um meio sólido ou líquido. São feitas diluições da amostra original, inoculando-se o microrganismo teste. A leitura é realizada após o período de incubação considerando a primeira diluição em que não se observa turvação. Através deste método pode-se determinar a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano (COWAN, 1999; ELLOF, 1998).

Métodos de bioautografia: a amostra complexa é eluída em cromatografia em camada delgada e posteriormente imersa em um meio de cultura sólido fundido previamente inoculado com o microrganismo teste. Após o período de incubação verifica-se a formação do halo de inibição no composto com atividade antimicrobiana presente na amostra (SOUZA et al., 2003).

Os microrganismos testados são preferencialmente cepas padronizadas, podendo ser utilizados microrganismos isolados de materiais biológicos. Geralmente são selecionados gêneros e espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e fungos (JANSSEN, 1989; SOUZA et al., 2003).

2.7 ATIVIDADE IMUNOLÓGICA

O sistema imunológico evoluiu nos vertebrados com o objetivo de protegê-los de microrganismos invasores e do câncer. A resposta imune é mediada por uma variedade de células e moléculas solúveis que estas células secretam capazes de reconhecer especificamente e eliminar uma variedade aparentemente ilimitada de agentes invasores (GOLDSBY et al., 2000). Os principais componentes do sistema imunológico são os leucócitos que podem ser classificados em dois grupos funcionais: os fagócitos (mastócitos, monócitos/ macrófagos, neutrófilos e basófilos) e os linfócitos (células T e B). Outro componente celular fundamental para o sistema imunológico é a célula “natural killer” (NK) (STITES et al., 1997).

Entre essas células, destacam-se os macrófagos, células que participam de diferentes processos no organismo, como remodelagem tecidual durante a embriogênese, reparação de ferimentos, remoção de células velhas e danificadas, hematopoiese e homeostase. Os macrófagos se originam na medula óssea, atingem a circulação como monócitos e finalmente se tornam macrófagos maduros, virtualmente espalhados por todos os tecidos e coletivamente inseridos no “sistema fagocítico mononuclear”. Funcionam como células apresentadoras de antígenos (APC), além de controlarem a proliferação e diferenciação de linfócitos através da síntese de mediadores químicos (KLIMP et al., 2002).

Portanto pode ser considerado um dos principais componentes do sistema imunológico por serem as primeiras células a serem ativadas para participar de uma

resposta imunológica propriamente dita quando o organismo é exposto a fatores exógenos, em uma inflamação aguda ou crônica como traumas teciduais, infecções, desordens autoimunes e câncer através da secreção de quimiocinas e citocinas (ERWIG et al., 1998; EBERHARDET, 2001).

Os macrófagos podem desempenhar um papel indireto nas atividades antimicrobianas e antitumorais mediante secreção de citocinas ou pelo processamento e apresentação de antígenos e assim ajustar o sistema imunológico ou ainda acompanhar este processo de maneira direta, através da liberação de produtos tais como radicais de oxigênio e nitrogênio e fator de necrose tumoral, que são prejudiciais aos microrganismos e células tumorais, dependendo da concentração liberada (EBERHARDET, 2001; JANEWAY, 2006).

Diante de determinados estímulos, os macrófagos sofrem um processo de ativação, caracterizado por um aumento do seu metabolismo, motilidade e atividade fagocítica, secretando mais de cem produtos, dentre enzimas, componentes do complemento, fatores de coagulação, espécies reativas de oxigênio e citocinas (PARSLOW & BANTON, 2000).

Os macrófagos respondem a um grande espectro de estímulos endógenos e exógenos, sendo em particular o LPS (lipopolissacarídeo). O lipopolissacarídeo (LPS), um produto das bactérias Gram-negativas é capaz de influenciar muitos aspectos da fisiologia dos macrófagos induzindo um aumento do consumo de glicose e oxigênio promovendo a morte de microrganismos e células tumorais. Os macrófagos são capazes de reconhecer LPS no ambiente e em muitos casos apenas um pg/mL é capaz de produzir uma resposta mensurável, portanto é um dos mais potentes estimuladores de macrófagos (ZWILLING & EISENSTEIN, 1994).

Dentre os efeitos provocados pelo LPS, têm-se o aumento na produção de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF), interferon- γ (IFN- γ), interleucina-1 (IL-1), expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), secreção de óxido nítrico (NO), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além de regularem a expressão de moléculas de adesão na superfície dos macrófagos (KLIMP et al., 2002; DAVID et al., 2006).

As espécies reativas de oxigênio (EROs), como o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o íon hidroxila ($OH^{\bullet}$), são importantes na destruição de microrganismos invasores e células cancerígenas. Durante a fagocitose, há um aumento no consumo de oxigênio pelos neutrófilos. Neste fenômeno, conhecido como explosão respiratória, o $O_2^{\bullet-}$ é produzido pela redução de um elétron do O_2 , promovida pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), o doador específico de elétrons. Uma porção significativa do $O_2^{\bullet-}$ produzido é liberada para o meio extracelular, onde ocorre uma dismutação espontânea que resulta na formação do H_2O_2 (HALLIWELL, 1987; DAVID et al., 2006).

A geração fisiológica de espécies reativas de oxigênio (ERO) está relacionada com diversas respostas fisiológicas, como processos imunológicos antimicrobianos, antitumorais e antivirais. Dentre as espécies reativas de oxigênio destacam-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO). Existe, porém, um tênue limite de concentração tissular entre a não toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para a ação contra agentes invasores (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

A geração de H_2O_2 é um processo natural, resultante de várias reações específicas essenciais à atividade celular. Entretanto, a liberação de quantidades significativas de H_2O_2 pode induzir diversos efeitos citotóxicos como a quebra da fita de DNA e/ou perturbação no citoesqueleto da membrana graças a sua facilidade em atravessar membranas celulares independentemente de canais aniônicos (HALLIWELL et al., 2000; FORMAN & TORRES, 2002).

Devido ao fato da célula possuir metais de transição, ocorre geração do radical $\text{HO}^\bullet$ em seu interior (HUSAIN et al., 1987), conforme ilustrado na equação abaixo:



Em nosso organismo, os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são Cu^{1+} e Fe^{2+} . O radical hidroxila causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. No DNA ele ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose. O ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um dos átomos de hidrogênio e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA (HALLIWELL, 2000).

Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas, o que pode ter como consequência perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular (BERGER et al., 1999). Podem produzir danos nas células por ataque aos lipídios de membrana (DAVID et al., 2006).

O óxido nítrico (NO) em seu estado puro, sob condições normais de temperatura e pressão é um gás. Sua solubilidade é moderada em água, sendo muito mais solúvel em solventes apolares, desta forma, quando presente em sistemas biológicos, o NO tende a se concentrar em ambientes lipofílicos, como membranas e domínios hidrofóbicos de proteínas (KERWIN et al., 1995).

Por ser uma molécula neutra com 11 elétrons na camada de valência, possui um elétron não-emparelhado e esse seu caráter radicalar lhe confere uma alta reatividade (meia-vida de 5 a 10 s in vitro. Formado pela oxidação do átomo de nitrogênio do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) dando origem ao nitrito (NO_2). Esta reação provavelmente ocorre em duas etapas, ambos os passos requerem oxigênio molecular (O_2) e fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) como co-

substrato, além de tetraidrobiopterina (BH₄), flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e ferroprotoporfirina IX (heme) como cofatores (MARLETTA & PUFAHL, 1993), como ilustrado na figura 8.

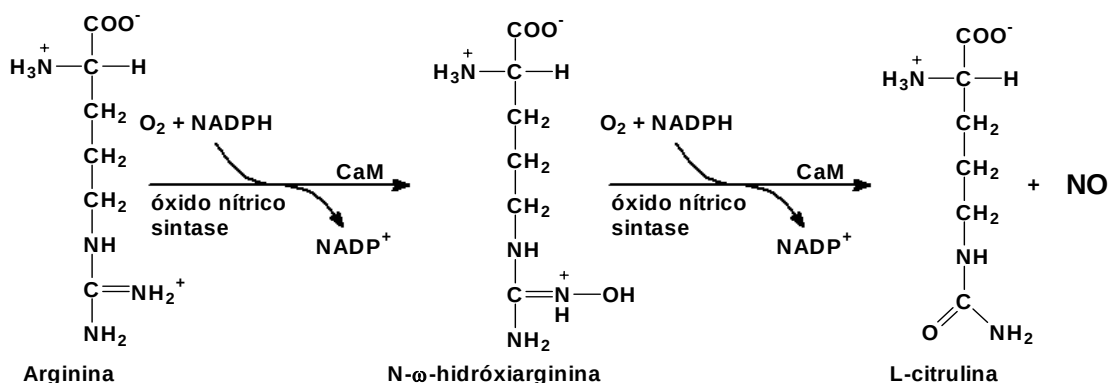


Figura 8. Oxidação da L-arginina a L-citrulina catalisada pela NOS (MARLETTA & PUFAHL, 1993).

Em termos estruturais e funcionais, a família da NOS compreende três isoenzimas distintas, as isoformas endotelial (eNOS ou NOS-III) e neuronal (nNOS ou NOS-I, e uma isoforma induzível (iNOS ou NOS-II), que foram descritas baseadas nos três diferentes genes que as originam, na localização e na sensibilidade à estimulação pelo cálcio (KIECHLE & MALINSKI, 1993).

A cNOS é capaz de produzir pequenas quantidades de NO, nano ou picomols, e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que é controlada pelos níveis de Ca²⁺ (MONCADA, 1991; KUO & SCHROEDER, 1995). Em macrófagos, a iNOS é independente de Ca²⁺ e sua atividade é induzida por citocinas, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), a interleucina – 1 (IL-1) e o interferon-gama (INF-γ), além de estímulos microbianos, como o LPS (KUO & SCHROEDER, 1995; SCHINDLER & BOGDAN, 2001). A iNOS requer algumas horas para ser expressa, mas uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que a constitutiva (cNOS) e a produção deste mediador continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou até a morte celular (DUSTING & MACDONALD, 1995).

Existem fortes evidências de que existem diferenças significativas entre as isoformas da NOS, o que sugere, pelo menos em princípio, que é possível a inibição seletiva de uma determinada isoforma em detrimento das outras (STUEHR & GRIFFITH, 1992). Do ponto de vista terapêutico, a inibição seletiva de uma das isoformas da NOS é extremamente desejável.

A importância fisiológica do NO deve-se ao fato de poder atuar como um importante segundo-mensageiro, ativando ou inibindo diversas moléculas-alvo envolvidas em processos tão diversos quanto regulação do tônus vascular, controle imunológico da relação patógeno-hospedeiro e neurotransmissão. Diferentemente de outros mensageiros químicos, o NO não depende de sua “topologia” estrutural para se ligar a um receptor ou enzima, mas sim de sua reatividade redox. Ademais, o NO não é armazenado *in vivo* como outros neurotransmissores, mas sintetizado sobre demanda, difundindo-se rapidamente até seu sítio de ação (CORREIA et al., 2005).

Na área cardiovascular, por exemplo, o NO liberado pelas células endoteliais é responsável pelo relaxamento do músculo liso adjacente, assim como pela inibição da adesão e agregação plaquetária, através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) (CORREIA et al., 2005).

No sistema nervoso central (SNC) e periférico, a função do óxido nítrico ainda não está muito bem elucidada. Além do NO atuar como neurotransmissor, ele media a “plasticidade” sináptica (SHIBUKI, 1993) (capacidade de modulação e adaptação das sinapses para transmissão do impulso nervoso) e facilita a liberação de outros neurotransmissores e hormônios (DAWSON, 1994).

Por outro lado, no sistema imunológico, o óxido nítrico é produzido em quantidades significativas durante a resposta inflamatória por macrófagos e outras células do sistema imune, que expressam a isoforma induzível (ou tipo II) da NO sintase (NOS). O NO gerado nestas circunstâncias ocasiona “danos oxidativos” letais às células-alvo, tais como células cancerosas ou bactérias. O NO “ataca” as metalo-proteínas contendo cobre e ferro, liberando seus íons metálicos e ocasionando a formação de radicais hidroxila e oxigênio molecular, que possuem elevado potencial oxidante (CORREIA et al., 2005), como ilustrado na figura 9.

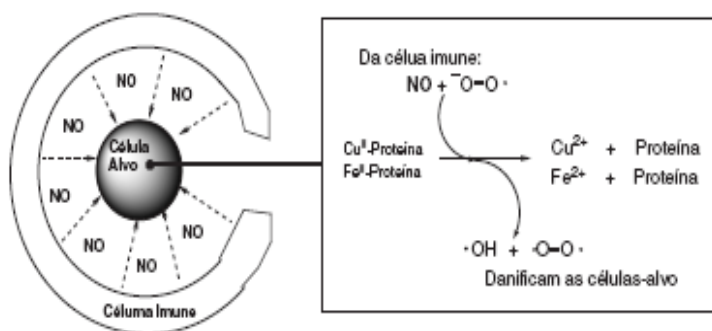


Figura 9. Representação esquemática da ação do óxido nítrico no sistema imune (CORREIA et al., 2005).

O óxido nítrico NO• não é suficientemente reativo para atacar o DNA diretamente, mas pode reagir com o radical ânion superóxido O₂^{•-}, produzido pelos fagócitos, gerando peroxinitrito. Esse último, por sua vez, pode sofrer reações secundárias formando agentes capazes de nitrar aminoácidos aromáticos, a exemplo da tirosina gerando nitrotirosina e as bases do DNA, em particular a guanina (ACHIKE & KWAN, 2003).

As espécies reativas de oxigênio podem lesar o tecido do hospedeiro especialmente na vizinhança do sítio inflamatório. Tem-se relatado seu envolvimento em danos a tecidos associados com doenças inflamatórias incluindo a artrite reumatóide, aterosclerose, catarata, diabetes mellitus, câncer, dentre outras (BERGENDI et al., 1999; KARPUZOGLU & AHMED, 2006).

O crescimento tumoral associado com a inflamação é dependente da ativação endotelial e da infiltração de leucócitos induzidos pelas citocinas geradas pelo endotélio ativado. Constatou-se que a inflamação influencia no desenvolvimento do câncer, visto que a enzima óxido nítrico sintase (NOS) é induzida por citocinas inflamatórias a produzir o óxido nítrico, mediador essencial na resposta imune (HUSSAIN et al., 2004).

Citocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular que são sintetizadas e secretadas especialmente por fagócitos mononucleares e linfócitos T ativados após diversos estímulos tais como células tumorais, agentes infecciosos, etc. Elas agem em diferentes células-alvo adjacentes (pleiotropismo) geralmente de maneira aditiva, sinérgica ou antagônica (HEINRICH et al., 1998).

Dentre as citocinas envolvidas na resposta imunológica, a interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) são as primeiras a serem secretadas, determinando a adesão ao endotélio e a migração trans-endotelial dos leucócitos (NATH et al., 2006). O TNF-α estimula um amplo espectro de respostas celulares, incluindo a ativação e migração de linfócitos e leucócitos, febre, resposta de fase aguda, proliferação celular, diferenciação e apoptose (PALLADINO et al., 2003).

O Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF-α) é uma citocina multifuncional, que possui funções centrais na inflamação aguda ou crônica, na resposta antitumoral (induzindo à morte apoptótica) e nas infecções (PALLADINO et al., 2003). A apoptose é promovida pela ativação da cascata da cascata apoptótica via caspases (CHANG & YANG, 2000) e as respostas inflamatórias agudas e crônicas pela ativação de dois importantes fatores de transcrição, AP-1 e NF-κB que por sua vez induzem genes responsáveis pela inflamação (PARHAM, 2001; GIBSON, 2004; METHE et al., 2004).

Além disso, o TNF age sobre a musculatura lisa vascular, promovendo o relaxamento do tônus celular, além de também estar envolvido na produção de substâncias vasodilatadoras endógenas, como o próprio NO, por indução da enzima óxido nítrico sintetase (MARQUES, 2002).

Atualmente, ensaios de liberação de citocinas bem como de NO e H₂O₂ em cultura de macrófagos fornecem importantes dados sobre a modulação imunológica ou capacidade citotóxica, dependendo de sua concentração (PUNTUREE et al., 2004).

Diante do grande número de produtos naturais usados na medicina tradicional e popular, no tratamento de inflamações bem como antitumorais, torna-se importante a caracterização da atuação desses compostos bioativos sobre o sistema imune, e no que se refere aos macrófagos, a avaliação da liberação de NO, H₂O₂ e TNF- α pode indicar um possível mecanismo de ação destas substâncias (CHOI & HUANG, 2005).

2.7.1 Atuação das plantas medicinais no sistema imunológico

Os sistemas biológicos, incluindo o sistema imunológico, necessitam ser regulados e uma vez que a resposta imune é iniciada, mecanismos devem existir para controlar a extensão dos seus efeitos modulando-a. O termo imunomodulação pode ser definido como uma modificação da resposta imunológica ou da função do sistema imune, através da ação de agentes estimulantes ou supressores (PUNTUREE et al., 2004).

Agentes terapêuticos capazes de alterar as respostas imunológicas são denominados “modificadores da resposta biológica” e apesar do mecanismo de ação dos imunomoduladores serem supostamente muito complexos, parte de sua atividade pode ser por efeito direto sobre as células imunológicas. Portanto uma forma de avaliação do potencial imunomodulador de compostos é através da quantificação dos mediadores celular *in vitro*. Os diferentes métodos de análise devem ser adequados para verificar a supressão ou estimulação dos sistemas celulares testados (LAWSON & BAUER, 1998). Testes *in vitro* têm sido muito úteis na avaliação da imunomodulação (LAWSON & BAUER, 1998; AUTORE et al., 2001; LU et al., 2004).

Com o objetivo de se adaptarem ao meio as plantas produzem inúmeros compostos com potencial imunomodulador dentre eles: isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcalóides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais que atuam como antioxidantes e coenzimas, além de outros mecanismos (WILLIAMS, 2001).

Várias plantas utilizadas na medicina popular demonstraram capacidade em modular a resposta imunológica (AGARWAL & SINGH, 1999), tendo sido os princípios ativos dessas plantas isolados e caracterizados (YAMAGUCHI, 1992; GRAHAM et al., 2000). Portanto, suas propriedades imunomoduladoras e antiproliferativas estão bem determinadas (AGARWAL & SINGH, 1999; OPOKU et al., 2000).

Muitas plantas medicinais e seus derivados demonstraram atuar na via do óxido nítrico e com isso a via de sinalização do NO tem se tornado, nesses últimos anos, alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos. Acredita-se que o alto teor de flavonóides, taninos e outros constituintes fenólicos contribuam para os efeitos benéficos à saúde.

Alguns desses compostos induzem a formação de NO nas células endoteliais, melhorando a circulação, enquanto outros suprimem a indução da iNOS nas inflamações e infecções. Apesar de uma intervenção farmacológica na formação do NO ser um alvo terapêutico em certos estados patológicos, uma dieta apropriada favorecendo uma homeostase positiva de NO pode servir como medida preventiva promovendo assim a saúde (ACHIKE & KWAN, 2003).

Triterpenos isolados da espécie *Rubia yunnanensis*, conhecida como Xiao Hong Sheng na medicina chinesa, apresentaram efeito inibidor na produção de NO por macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS (MORIKAWA et al., 2003).

Polissacarídeo isolado de *Panax ginseng* demonstrou atividade citotóxica contra células de melanoma B16 e esta atividade está relacionada ao aumento dos níveis de TNF- α , IL-1 β ; IL-6, IFN- γ , óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Os autores sugerem que este efeito estimulante em macrófagos pode indicar um potencial anticancerígeno (SHIN et al., 2004). Outro efeito estimulante *in vitro* de interleucinas 1, 6 e 10 (IL-1; IL-6; IL-10) e TNF- α por macrófagos foi verificado por polissacarídeos da espécie *Echinacea purpurea* (GOEL et al., 2002).

Mehrotra e colaboradores (2003) demonstraram potencial antiproliferativo e imunossupressor *in vitro* do extrato etanólico do rizoma de *Acorus calamus* através da inibição da produção de NO, interleucina – 2 (IL-2) e TNF- α , porém o IFN- γ não sofreu alteração.

No Brasil alguns estudos demonstram a atividade imunomoduladora de diversas espécies, como a atividade imunossupressora do extrato aquoso de *Achyrocline satureioides* (SANTOS et al., 1999) e metanólico de *Alchornea* ssp. (LOPES, 2004), bem como atividade estimuladora do óleo essencial de *Achillea millefolium* (CARLOS et al., 2005) e da fração acetato de etila do extrato metanólico *Byrsonima crassa* (CARDOSO, 2006).

3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antibacteriana e imunomoduladora do óleo essencial e extratos de *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) e estabelecer alguns parâmetros de qualidade farmacopeicos através de seu estudo farmacognóstico.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar os testes de controle de qualidade do material vegetal;
- Executar a triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários;
- Identificar a composição do óleo essencial bruto através de Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG/EM).
- Verificar a variação no teor dos compostos majoritários do óleo essencial obtido do material vegetal seco e fresco;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e dos extratos etanólicos e aquosos;
- Determinar o efeito imunomodulador do óleo essencial e extratos sobre células murinas através da quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral (TNF- α).

4.1 MATERIAL

4.1.1 Equipamentos

- Autoclave vertical - PHOENIX®
- Balança analítica – BEL MARK®
- Balança com infravermelho -METTLER® LP 11
- Contador de colônias -PHOENIX®
- Compactador *Tapped Volumeter* (Erweka SVM 12)
- Espectrofotômetro - UV/VIS Cary 1E Varian®
- Estufa de ar circulante - FABBE®
- Estufa para esterilização 400/ 5D NOVA ÉTICA®
- Evaporador rotatório MA 120 – MARCONI®
- Fluxo laminar -VECO®
- Leitor de Elisa (espectrofotômetro UV/Visível – Multiskan Ascent, Labsystems)
- Liofilizador – CHRISTH ALPHA®
- Moinho de facas -TECNAL®
- Mufla -FORLABO®
- Tamisador vibratório -PRODUTEST®

4.1.2 Solventes, reagentes, soluções e meios de cultura

- Acetato de chumbo – Reagen
- Acetato de etila – Labsynth
- Acetona – Labsynth
- Ácido bórico – Labsynth
- Ácido clorídrico – Labsynth
- Ácido oxálico – Labsynth
- Ácido sulfúrico – Labsynth
- Ágar desidratado – Acumedia
- Ágar bismuto sulfito – Acumedia
- Ágar brain heart infusion (BHI) – Biobrás
- Ágar eosina-azul de metileno (EMB) – Difco
- Ágar MacConkey – Acumedia
- Ágar Mueller Hinton – Acumedia
- Ágar Sabouraud- Acumedia
- Ágar tioglicolato –Difco

- Ágar tríplice açúcar - ferro (TSI) –Difco
- Ágar verde brilhante – Difco
- Ágar Vogel Johnson –Oxoid
- Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) - Difco
- Água MILI-Q
- Ampicilina – Medley
- Caldo brain heart infusion (BHI) – Acumedia
- Caldo caseína-soja – Difco
- Caldo lactosado- Difco
- Caldo Mueller Hinton – Acumedia
- β - cariofileno – Vetec
- Cloreto de alumínio – Reagen
- Clorofórmio – Labsynth
- Dimetilsulfóxido – Labsynth
- Etanol – Labsynth
- Éter etílico – Labsynth
- Fosfato dibásico de sódio – Labsynth
- Fosfato monobásico de sódio – Labsynth
- Gelatina – Kraft Foods
- Hidróxido de sódio – Labsynth
- Magnésio metálico – Reagen
- MTT tetrazólio 3-(4,5-dimethylthiazol-2 yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide – Sigma
- Polissorbato 80 – Labsynth
- Quercetina dihidratada – Merck
- Reativo de Bertrand
- Reativo de Bouchardat
- Reativo de Dragendorff
- Reativo de Mayer
- Reativo Liebermann-Burchard
- Rutina – Merck
- Soro fetal bovino - Cultilab
- Sulfato de sódio anidro – Reagen
- Tolueno - Labsynth

4.1.3 Microrganismos

Os microrganismos selecionados para a avaliação da atividade antibacteriana obtidos do American Type Culture Collection (ATCC) foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), e as cepas de campo *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Serratia marcescens*.

4.1.4 Animais

Foram empregados camundongos Swiss machos de 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 18 e 25 g, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Câmpus de Araraquara. O seu uso foi estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA tendo protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” apresentado em apêndice.

4.1.5 Softwares

- Excel MICROSOFT®
- Origin Pro 7.0
- Instat 3

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Coleta e preparo do material vegetal

As partes aéreas (mistura de folhas, flores e escapos) de *Melampodium divaricatum* L. (Asteraceae) foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP- Araraquara- SP entre as coordenadas 21° 48' 51,4"S e 48° 12' 5,1"W, com altitude de 661 metros, nos diferentes períodos do ano (primavera, verão, outono e inverno) de 2006 e 2007. A exsicata da planta está depositada no Herbário do Instituto de Biociências da Unesp de Rio Claro- SP sob o número de registro HRCB 35294.

4.2.2 Estabelecimento de parâmetros para o controle de qualidade de *Melampodium divaricatum*

Os métodos de avaliação da droga vegetal foram desenvolvidos segundo normas farmacopéicas: Farmacopéia Brasileira (1988; 1996; 2000), USP 26 (2003), e outras técnicas não farmacopéicas (HARBORNE, 1998; PINTO *et al.*, 2003).

Alguns critérios, tais como a presença de elementos estranhos à droga, teor de umidade, contaminação microbiológica e parasitária, resíduos de pesticidas e de metais pesados são de extrema importância no processo de verificação da pureza da amostra (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.2.1 Determinação da perda por secagem

Amostras de 100 g das partes aéreas frescas foram expostas ao processo de secagem em temperatura ambiente (protegidos da incidência dos raios solares), em estufa a 40 °C e em estufa com circulação de ar circulante a 40 °C. As amostras foram pesadas diariamente até peso constante. Os resultados obtidos pela média de 5 determinações foram expressos em porcentagem (% p/p) e indicam a perda de água e de substâncias voláteis durante o processo de secagem (MELLO & PETROVICK, 2001). Para a comparação dos métodos empregou-se o teste *t* de Student com um nível de significância 0,05%, precedido da análise de variância (ANOVA).

4.2.2.2 Moagem e análise granulométrica

As partes aéreas secas foram pulverizadas em moinho de facas e amostras de 100,00 g das partes aéreas secas e pulverizadas foram submetidas à análise granulométrica empregando-se um jogo de tamises de abertura nominal da malha de 0,840; 0,590; 0,420; 0,297; 0,250; 0,210; 0,177; 0,149; 0,125 e 0,074 mm com tampa e recipiente coletor. As amostras foram tamisadas durante 30 min a 100 vibrações/min, utilizando-se um tamisador vibratório Produtest®. Posteriormente, foram pesados os pós remanescentes em cada tamis e os recolhidos no coletor. O tamanho médio das partículas da droga vegetal foi determinado pela fórmula a seguir e o resultado foi obtido pela média de 5 determinações (VOIGT, 1993).

$$d_{av} = \sum \frac{(\% \text{ retida }) \cdot (\text{abertura média})}{100}$$

4.2.2.3 Determinação da perda por dessecação em balança com infravermelho

Amostras de 4,000 g das partes aéreas previamente secas em estufa com circulação de ar a 40 °C e moídas foram submetidas ao aquecimento (105 °C) através de raios infravermelhos pelo período de aproximadamente 1 h. Após 1 h foi feita a primeira leitura e o procedimento foi repetido de hora em hora até que a massa não variasse mais do que 0,005 g (COSTA, 1994).

Os valores foram expressos em porcentagem (% p/p), através da média de 5 determinações.

4.2.2.4 Determinação do teor de cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais foi realizada segundo a Farmacopéia Brasileira (1988) com amostras das diferentes épocas do ano (primavera, verão, outono e inverno).

O cadinho de porcelana foi previamente calcinado em mufla a 450 °C por 30 min. O mesmo foi resfriado em dessecador (15 min) e seu peso (tara) determinado em balança analítica. Posteriormente, adicionou-se exatamente 3,00 g de cada amostra que foram incineradas e submetidas à calcinação em mufla à temperatura de 450 °C por 2 h. Após arrefecimento em dessecador, foram pesados até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de peso de cinzas na droga (% p/p) e equivalem à média de três determinações para cada amostra e o resultado total é dado pela média das 5 determinações (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.2.5 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

As cinzas previamente obtidas no ensaio de cinzas totais foram aquecidas à ebulição por 5 min com 25 mL de solução de ácido clorídrico 10% (p/v) e posteriormente completou-se o volume de 100 mL com água destilada. A solução obtida foi filtrada em papel de filtro isento de cinzas, lavando com água quente até o filtrado se mostrar límpido. Transferiu-se o papel de filtro com as cinzas retidas para um cadinho e incinerou em mufla a 800 °C até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de peso de cinzas insolúveis em ácido (% p/p) e equivalem à média de 5 determinações (COSTA, 1994).

4.2.2.6 Determinação do teor de resíduo seco

Amostras de 20,0 g das soluções extrativas obtidas por maceração (etanol a 70% e etanol absoluto) e decocção ambos a 10% (m/v) foram pesadas em pesa-filtro previamente tarado e evaporadas até secar em banho de água. Os resíduos obtidos foram dessecados em balança analítica com sistema de secagem por infravermelho à temperatura de 110 °C até peso constante (MELLO & PETROVICK, 2000). Os resultados foram obtidos em massa percentual pela média de 5 determinações.

4.2.2.7 Determinação da densidade aparente e compactada da droga vegetal

A densidade aparente não compactada e compactada foi determinada pela razão entre a massa da droga vegetal seca e pulverizada e o volume fixo de 250mL verificado em

proveta graduada. A densidade aparente foi verificada sem nenhum tipo de compactação, já a compactada foi obtida pela compactação em compactador *Tapped Volumeter* (Erweka SVM 12) com séries de 1250 compactações até volume constante, o resultado representa a média de 5 determinações (BOLHUIS et al., 2001).

4.2.2.8 Determinação do pH da droga vegetal

Em erlenmeyer, 99,00 g de água foram colocados em chapa-elétrica até ebulição por 5 min, posteriormente procedeu-se o método extrativo de infusão por 15 min com 1 g da droga vegetal. O extrato foi filtrado com algodão e após esfriamento verificou-se o pH em peagômetro (calibrado anteriormente em pH 4 e pH 9) (FARMACOPÉIA, 1988). Para uma melhor reprodutibilidade deste teste o pH da água também foi verificado como parâmetro para posteriores análises. O resultado representa a média de 5 determinações.

4.2.2.9 Controle microbiológico da droga vegetal e dos extratos

O controle microbiológico da droga vegetal e dos extratos consiste na determinação do número total de microrganismos e pesquisa de *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, conforme preconizados na Farmacopéia Brasileira (1988), British Pharmacopeia (2001) e USP (UNITED, 2003), para análise microbiológica de produtos não-estéreis, como se segue.

4.2.2.9.1 *Contagem total de microrganismos*

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g da droga vegetal para 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2 e 1 g dos extratos aquoso, hidroetanólico e etanólico para 9,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2, para a contagem dos microrganismos totais. Amostras nas proporções (1:10; 1:100; 1:1000 e 1:10.000) foram submetida à agitação durante 10 min. Após a homogeneização, foi pipetado 1,0 mL de cada amostra e adicionados 20,0 mL ágar tioglicolato para bactérias e ágar Sabouraud para leveduras, a 47 °C em placa de Petri, que foram colocadas em estufa a 35 °C por 24 h e 25 °C por 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de contador de colônias, calculando o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

4.2.2.9.2 *Pesquisa de Salmonella sp e Escherichia coli*

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g da droga vegetal para 90,0 mL de caldo lactosado e 1,0 g dos extratos para 9,0 mL de caldo lactosado, para pesquisa de *Salmonella* e *E. coli*, incubados a 35 °C durante 24 a 48 h. Após este período, 1,0 mL do caldo

lactosado foi transferido para 2 tubos contendo caldo tetrationato e caldo selenito cistina, que foram incubados a 35 °C por 24 h. Após este período, a amostra foi semeada do caldo tetrationato para 1 tubo contendo ágar verde brilhante e duas placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) e ágar bismuto sulfito. Foi realizado da mesma forma com a amostra inoculada no caldo selenito cistina, transferindo para os três meios, os quais foram incubados a 35 °C por 24 h. O crescimento e as características das colônias foram observados.

As colônias suspeitas foram semeadas com alça reta em tubo contendo ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) e incubado a 35 °C por 24 h. A confirmação da *Salmonella* foi feita pelo método de Gram. Na pesquisa de *E. coli*, 1,0 mL do caldo lactosado foi transferido para placa contendo ágar Mac Conkey e incubado a 35 °C por 24 h. As colônias suspeitas foram semeadas em ágar eosina azul de metileno (EMB) e incubadas a 35 °C por 24 h. A confirmação da *E. coli* foi realizada através de método de Gram.

4.2.2.9.3 Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g da droga vegetal para 90,0 mL de caldo soja caseína e 1,0 g dos extratos para 9,0 mL, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e incubados a 35 °C por 24 a 48 h. Após este período, foi semeado em ágar Vogel Johnson, para a pesquisa de *S. aureus* e ágar cetrimida, para a pesquisa de *P. aeruginosa* a 35 °C por 24 h. As características das colônias foram observadas e a confirmação foi realizada através de método de coloração de Gram.

4.2.3 Análises químicas

As análises químicas tiveram como objetivo identificar os principais grupos químicos de metabólitos secundários presentes nas partes aéreas da espécie em estudo para direcionar a obtenção dos extratos e avaliação das atividades biológicas.

4.2.3.1 Análise fitoquímica preliminar

A triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabólitos secundários das partes aéreas de *Melampodium divaricatum* foi realizada segundo metodologias propostas por Costa (1994) e Matos (1997). As partes aéreas estudadas foram coletadas nos diferentes períodos do ano de 2006 (primavera, verão, outono e inverno).

4.2.3.1.1 Pesquisa de alcalóides

Foram colocados 5,00 g de partes aéreas de *M. divaricatum* pulverizadas alcalinizando-as com carbonato de sódio a 10% e posteriormente adicionou-se 25 mL de

clorofórmio. A mistura obtida foi filtrada em funil de separação através de papel previamente embebido com clorofórmio e particionada com 7 mL de ácido clorídrico 2%. A camada ácida foi separada e utilizada nas reações de caracterização. Uma gota da solução foi aplicada em lâmina de microscópio ao lado de uma gota dos reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer ou Bertrand unindo-as posteriormente. O resultado positivo é observado pela precipitação da mistura sobre fundo escuro.

4.2.3.1.2 Pesquisa de taninos

Inicialmente preparou-se decoctos com 5,00 g do material vegetal em 100 mL de água destilada.

Reação da gelatina

Foram adicionados 2 gotas de ácido clorídrico (HCl) em 2 mL da solução extrativa e posteriormente solução de gelatina 2,5% gota a gota. A formação de precipitado indica a presença de taninos.

Reação com sais de ferro

Foram adicionados 10 mL de água destilada em 2 mL da solução extrativa e 4 gotas de solução de cloreto férrico (FeCl_3) a 1% em metanol. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto a coloração verde indica a presença de taninos condensados.

Reação com acetato de chumbo

À 5 mL da solução extrativa foram adicionados 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo 10%. A formação de precipitado esbranquiçado indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

4.2.3.1.3 Pesquisa de antraquinonas

Antraquinonas livres

Agitou-se 1,00 g do material vegetal com 10 mL de éter etílico, filtrando posteriormente. À solução etérea foi adicionado 1 mL de amônia diluída, agitando em seguida. A camada aquosa deve tornar-se rósea indicando resultado positivo.

Glicosídeos antraquinônicos (reação de Bornträger)

Adicionou-se 20 mL de água destilada ao material vegetal fervendo posteriormente por 5 min. Ao filtrado obtido desta extração foram adicionados 10 mL de ácido clorídrico e 3 mL de água oxigenada 30%. A solução foi submetida à ebulição por 5 min e após resfriamento e filtragem efetuou-se duas extrações com 5 mL de éter etílico. As duas fases etéreas obtidas foram reunidas agitando-as com 3 mL de amônia diluída. O desenvolvimento de coloração rósea na camada aquosa indica a presença de glicosídeos antraquinônicos.

4.2.3.1.4 Pesquisa de saponinas

A solução extrativa para pesquisa de saponinas foi obtida pela adição de 10 mL de água destilada em 2 g do material vegetal e posterior aquecimento à ebulição por 3 min, filtrando através de algodão para um tubo de ensaio. Em seguida agitou-se verticalmente e vigorosamente o tubo de ensaio contendo a solução extrativa durante 20 s. O resultado positivo é indicado pela presença de espuma persistente por 20 min e resistente à adição de 1 mL de HCl 2N.

4.2.3.1.5 Pesquisa de glicosídeos cardiotônicos

A solução extrativa foi obtida pela adição de 50 mL de etanol 70% (v/v) em 5,00 g do material vegetal e posterior aquecimento por 10 min, completando o volume para 30 mL após resfriamento.

Adicionou-se à solução extrativa 30 mL de água e 15 mL de acetato de chumbo a 10% e após agitação e repouso a mistura foi filtrada e adicionou-se 10 mL de fosfato ácido de sódio a 10%. Posteriormente a solução foi transferida para um funil de separação onde foram realizadas duas extrações com 15 mL de clorofórmio cada. Reunidas as fases orgânicas eliminaram-se possíveis resíduos de água com sulfato de sódio anidro.

Reação de LEGAL

Evaporaram-se 2 mL da solução etérea em um tubo de ensaio e o resíduo obtido foi diluído em 1 mL de piridina e posteriormente adicionou-se 0,5 mL de NaOH a 10% e 0,5 mL de nitroprussiato de sódio 10%. O surgimento de coloração vermelha intensa indica a presença de anel lactônico insaturado.

Reação de Keller-Killiani

Evaporaram-se 2 mL da solução etérea em tubo de ensaio e o resíduo foi tratado com 1 mL de ácido acético adicionando 2 gotas de FeCl₃ a 2%. O conteúdo deste tubo de ensaio foi transferido para outro tubo contendo 2 mL de H₂SO₄ concentrado. A presença de

desoxi-açúcares é caracterizada pela presença de um anel castanho avermelhado na zona de contato dos líquidos e coloração verde-azulada na camada acética.

Reação de Liebermann-Burchard

Evaporaram-se 2 mL da solução etérea em tubo de ensaio e ao resíduo adicionou-se 1 mL de anidrido acético e 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A presença do núcleo esteroidal é caracterizada pelo surgimento de coloração castanha.

4.2.3.1.6 Pesquisa de flavonóides

A extração foi realizada com 3,00 g do material vegetal e 20 mL de éter de petróleo sob aquecimento em banho-maria filtrando logo em seguida. O resíduo obtido após filtração foi transferido para um béquer e após secagem adicionou-se 20 mL de metanol, aquecendo por 10 min em banho-maria. Filtrou-se ainda a quente e o filtrado foi evaporado até seca e o resíduo foi tratado com 10 mL de etanol, obtendo assim o extrato final.

Reação de Shinoda

Do extrato final transferiu-se uma alíquota de 1 mL para tubo de ensaio e posteriormente adicionou-se um fragmento de magnésio metálico e ácido clorídrico concentrado gota a gota. O resultado positivo é observado pelo aparecimento de coloração rósea ou vermelha após o desprendimento de hidrogênio nascente.

Reação de Taubock

Evaporaram-se até seca em banho aquecimento, 3 mL do extrato, esfriando e umedecendo o resíduo com algumas gotas de acetona. Posteriormente foram adicionados alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico evaporando posteriormente em banho aquecimento até seca evitando aquecimento prolongado. O resíduo obtido foi dissolvido em 5 mL de éter etílico e a mistura obtida observada sob luz ultravioleta (254 nm). O aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada indica a presença de flavonóides.

Reação de Pew

Em banho aquecimento foram evaporados até seca 3 mL do extrato final em tubo de ensaio e ao resíduo foram adicionados 3 mL de metanol e uma pequena porção de zinco metálico e algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. O resultado positivo é confirmado pelo surgimento de coloração vermelha.

Reação do cloreto férrico

Adicionou-se algumas gotas de cloreto férrico a 2% a 1 mL do extrato final. Dependendo do flavonóide presente a coloração varia entre verde, amarelo ou ainda violáceo.

Reação do cloreto de alumínio

Foram umedecidas diferentes áreas de papel de filtro com o extrato colocando sobre cada uma das manchas uma gota de cloreto de alumínio a 5% em etanol. O aparecimento de fluorescência verde-amarelada sob luz ultravioleta indica resultado positivo.

4.2.3.1.7 Pesquisa de cumarinas

Para a pesquisa de cumarinas, 0,75 g do extrato bruto hidroetanólico 70% obtido a partir das partes aéreas de *M. divaricatum* foram ressuspensos em 12,5 mL de EtOH/H₂O 7:3, filtrados em papel de filtro e diluídos para 25 mL de EtOH/H₂O 7:3. Essa solução foi hidrolisada através da adição de excesso de HCl e aquecimento sob refluxo por 6 h. Após resfriamento, a mistura foi extraída com três porções sucessivas de 40, 30 e 20 mL de éter, sendo que a primeira extração se procedeu após uma noite de contato.

A solução etérea obtida foi tratada com Na₂SO₄ para eliminar o excesso de água e submetida à separação dos ácidos fracos e fenóis, através da extração com três porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL de solução de NaOH a 2% seguida de acidificação com HCl concentrado até pH 3-4 e extração dos ácidos fracos e fenóis com três porções sucessivas de 15, 10 e 5 mL de éter. Desprezada a fase aquosa ácida, a fase orgânica (onde possivelmente estão contidos os ácidos fracos e fenóis) foi tratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e seca em banho-maria. O resíduo obtido foi redissolvido em 15 mL de etanol, filtrado e submetido ao teste.

Com um tubo capilar de vidro foram feitas duas manchas, de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, em um pedaço de papel de filtro não-fluorescente. Sobre as manchas aplicou-se uma gota de solução alcoólica de KOH 1*N*. As manchas foram cobertas pela metade com um cartão opaco não-fluorescente e esse conjunto exposto a ação da luz UV por cerca de 3 min. A parte coberta foi descoberta ainda sob luz UV, e observada se houve modificação na fluorescência da mancha alcalinizada.

O desenvolvimento de fluorescência azulada, forte, bem visível na metade não encoberta da mancha alcalinizada indica a presença de cumarina.

4.2.4 Obtenção dos extrativos vegetais

As partes aéreas de *M. divaricatum* foram selecionadas e secas em estufa com circulação de ar a 40 °C por 72 h e armazenadas em local seco e ao abrigo da luz até o momento do uso.

4.2.4.1 Extratos brutos

Os extratos hidroetanólico 70 % (EH) e etanólico (EE) foram obtidos por maceração durante 7 dias ao abrigo da luz, com agitação ocasional e o extrato aquoso (EA) por decocção durante 15 min. A proporção empregada entre a droga vegetal pulverizada e o líquido extrator foi 10% (p/v). A solução extrativa obtida após filtragem em algodão foi concentrada em evaporador rotatório com temperatura máxima de 40 °C para os macerados e liofilização para o decocto, obtendo-se assim os extratos brutos.

4.2.4.2 Óleo essencial (OE)

O óleo essencial foi extraído tanto para os testes de controle de qualidade como para a avaliação das atividades biológicas. Para a avaliação do controle de qualidade o óleo essencial foi obtido de diferentes partes (folhas, flores e partes aéreas) de *M. divaricatum* coletadas nos diferentes períodos do ano de 2006 (primavera, verão, outono e inverno) e a partir do material fresco ou seco.

Para a obtenção do óleo essencial empregado nos testes biológicos o óleo essencial foi extraído das partes aéreas coletado em diferentes períodos do ano de 2006, secas em estufa com circulação de ar e aquecimento a 40 °C. O óleo essencial obtido foi adequadamente armazenado sob baixas temperaturas até o momento do uso.

Para a extração dos óleos essenciais foi utilizado o processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado (WASICKY, 1963) com o material vegetal previamente selecionado e rasurado em pedaços de aproximadamente 2,5 cm. Cerca de 60 g do material vegetal foram extraídos em balão com capacidade de 5000 mL com volume de água correspondente a cerca de 2/3 do volume do balão.

4.2.5 Determinação do teor de flavonóides totais

O método de quantificação do teor de flavonóides totais foi baseado na complexação com o cloreto de alumínio e detecção por espectrofotometria no visível ($\lambda = 425 \text{ nm}$) segundo metodologia descrita por Jurd & Geissman (1956).

A análise do teor de flavonóides totais foi realizada tanto em amostras da droga vegetal coletada nas diferentes épocas do ano (primavera, verão, outono e inverno), quanto nos extratos aquoso, hidroetanólico a 70% e absoluto.

4.2.5.1 Construção da curva analítica

Inicialmente uma solução estoque de quercetina diidratada em metanol na concentração de 50 µL/mL foi preparada. Alíquotas de 2 a 6 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, contendo 1mL de solução aquosa de cloreto de alumínio a 2%. O volume final de cada balão foi ajustado com metanol. Decorridos 1 h, foi tomada a leitura de cada solução a 425 nm, em espectrofotômetro, em triplicata (FUNARI & FERRO, 2006).

4.2.5.2 Preparo da solução amostra a partir da droga vegetal

Amostras de 200,0 mg da droga vegetal de cada época do ano em triplicata foram inicialmente extraídas com 20 mL de metanol 80% por 2 h em temperatura ambiente, os filtrados obtidos após a extração foram transferidos para balões volumétricos de 100 mL e o volume completado com metanol. Alíquotas de 1 mL foram complexadas com 1 mL de solução de cloreto de alumínio $AlCl_3$ a 2% por 1 h em temperatura ambiente e a absorbância foi mensurada em 425 nm. O teor de flavonóides totais foi calculado com base na curva analítica e os resultados expressos em µg/mL de quercetina (WOISKY & SALATINO, 1998).

4.2.5.3 Preparo da solução amostra a partir dos extratos

Para a quantificação de flavonóides nos extratos preparou-se uma solução na concentração de 2 mg/mL a partir do extrato liofilizado em seus respectivos solventes extratores (água ou etanol). Desta solução retirou-se uma alíquota de 2 mL transferindo assim para um balão de 25 mL contendo 1 h da solução de $AlCl_3$ a 2% e o volume foi completado com metanol. Após 30 min em temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada em 425 nm. O teor de flavonóides totais foi calculado com base na curva analítica. Os valores representam à média de três determinações e foram expressos em equivalentes de quercetina di-hidratada sobre o extrato bruto (mg de quercetina/100 mg de extrato seco) tendo como referência a curva analítica previamente obtida (FUNARI & FERRO, 2006).

4.2.6 Determinação do rendimento do óleo essencial

A determinação do rendimento do óleo essencial em % (p/p) corresponde à relação entre a massa (g) de óleo essencial obtido por massa (g) de material vegetal (FARMACOPEIA, 1988; FABROWSKI, 2002). O rendimento do óleo foi calculado para a planta fresca e seca em estufa com circulação de ar. Considerou-se a umidade presente na planta fresca para o cálculo da massa real da droga vegetal da qual o óleo essencial foi

extraído. O resultado representa a média de cinco determinações e os resultados comparados estatisticamente através do teste *t* de Student ($p < 0,05$).

4.2.7 Determinação da densidade do óleo essencial

A densidade do óleo essencial foi determinada pela relação entre o volume ocupado (mL) por determinada massa (g) do óleo essencial. O resultado corresponde à média de cinco determinações.

4.2.8 Análises cromatográficas

4.2.8.1 Cromatografia em camada delgada

Os perfis cromatográficos dos extratos brutos (EA, EH e EE) bem como dos óleos essenciais foram obtidos através de cromatografia em camada delgada (CCD), frente a diversas fases móveis com o objetivo de avaliar as diferenças no perfil fitoquímico das amostras analisadas quanto ao farmacógeno, variações sazonais e líquidos extratores. A fase estacionária empregada em todas as análises foi placa de alumínio (20 x 20 cm) de sílica gel GF254 (MERCK®).

A comparação entre o perfil cromatográfico das amostras foi realizada tendo como parâmetros a coloração das bandas, bem como o valor de R_f (Fator de Retenção) calculados, comparando-os entre as amostras e os padrões empregados.

O valor do R_f foi calculado de acordo com a equação

$$R_f = \frac{db}{dfm}$$

Onde:

R_f : Fator de Retenção;

db : distância entre o ponto de aplicação da amostra até a banda correspondente;

dfm : distância percorrida pela fase móvel a partir do ponto de aplicação da amostra;

4.2.8.1.1 *Perfis cromatográficos do óleo essencial*

Os perfis cromatográficos dos óleos essenciais de *M. divaricatum* obtidos em diferentes condições foram avaliados através de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) para detectar possíveis alterações no perfil fitoquímico dos mesmos ocasionados por variações sazonais bem como variações de acordo com o farmacógeno empregado para sua extração (folhas, flores, escapos e partes aéreas).

A metodologia empregada foi a proposta por Wagner e colaboradores (1984) tendo como fase móvel a mistura tolueno:acetato de etila na proporção (93:7) (v/v) e o revelador empregado foi vanilina sulfúrica ácida seguido de aquecimento a 110 °C por 5-10 min. As amostras foram diluídas em tolueno na proporção (1:10) e o padrão na proporção (1:30) e desta diluição aplicou-se 10 µL. Como substância de referência foi utilizado cariofileno Vetec®.

4.2.8.1.2 Perfis cromatográficos dos extratos

Os extratos brutos (EA, EH e EE) obtidos por maceração foram avaliados frente a diferentes fases móveis específicas para as principais classes de metabólitos presentes em espécies vegetais, levando-se em conta constituintes já identificados na espécie em estudo (flavonóides, cumarinas, alcalóides e terpenos). Os extratos foram ressuspensos em seus respectivos solventes (água, etanol 70% e etanol) na proporção de 50 mg/mL. A metodologia empregada foi proposta por Wagner e colaboradores (1984) e as condições cromatográficas encontram-se descritas na tabela a seguir.

Tabela 3. Condições cromatográficas empregadas para análises dos extratos brutos de *Melampodium divaricatum* por cromatografia em camada delgada* (Wagner et al., 1984).

Classe de Metabólitos	Fase Móvel ^a	Revelador	Visualização
Flavonóides	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (5:6:1:4)	NP/NEP	UV-365 nm
Cumarinas	Tolueno :éter (1:1) saturada com ácido acético a 10 %	Solução etanólica de KOH 5%	UV-254nm e UV-365 nm
Alcalóides	Tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10)	Reagente Dragendorff	visível
Terpenóides	metanol: n-propanol: água (5:6:1:4) ^c	Anisaldeído Sulfúrico	visível

* fase estacionária: sílica gel GF₂₅₄ (Merck®); ^a proporção (v/v); ^b Revelação seguida de aquecimento entre 100-105 °C por 5 min ^c: fase orgânica obtida pelo contato de 24 h entre os solventes.

4.2.8.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massas (CG/EM)

Amostras de óleo essencial obtido das partes aéreas secas e frescas de *M. divaricatum* coletadas em 02 de setembro de 2007 foram analisadas por CG/EM, com co-injeção de padrões de hidrocarbonetos (C₀₉ a C₂₂), nas seguintes condições:

Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrofotômetro de massa: **Shimadzu** modelo **QP2010**;

Coluna: **DB-5MS (30 m x 0.25µm x 0,25 mm)**;

Gás de arraste: **Hélio**;

Fluxo: **1,33 mL/min**;

Temperatura do injetor: **240 °C**;

Temperatura inicial: **60 °C**;

Rampa de Aquecimento: **3 °C/min**;

Temperatura final: **240 °C**;

Temperatura do auxiliar: **250 °C**;

Tempo total de análise: **75 min**

Os constituintes presentes no óleo essencial foram identificados através de comparação dos índices de retenção com a literatura e também por comparação dos espectros de massas correspondentes a cada pico com os da biblioteca WILEY 7, NIST 12 e NIST 62.

Os índices de retenção dos compostos foram obtidos através da coinjeção das amostras com a mistura de *n*-alcanos padrão e foram calculados de acordo com a equação de van den Dool e Kratz. Os valores calculados foram comparados com dados da literatura (ADAMS 1995).

$$IR = 100 \times \left\{ z + \frac{(Tr(x) - Tr(z))}{(Tr(y) - Tr(z))} \right\}$$

Onde:

z : número de átomos de carbonos do *n*-alcano que elui antes da substância analisada (*x*);

Tr(x) : tempo de retenção da substância analisada;

Tr(z) : tempo de retenção do *n*-alcano que elui antes da substância analisada;

Tr(y) : tempo de retenção do *n*-alcano que elui depois da substância analisada;

4.2.9 Avaliação das atividades biológicas

4.2.9.1 Atividade antibacteriana

O método utilizado para avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial e extratos brutos (EA, EH e EE) foi baseado na norma M2-A8 do *National Commitee for Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCLSI), com algumas modificações (NCCLS, 2003).

O princípio deste método baseia-se na inoculação em superfície de um ágar de solução padronizada de microrganismo específico. Sobre a fase sólida são colocados discos de papéis impregnados previamente com soluções das amostras que se deseja investigar a atividade antibacteriana.

As substâncias impregnadas nos discos de papel difundem-se no meio de cultura e, se a amostra em questão apresentar atividade inibitória sobre o microrganismo testado, forma-se um halo de não crescimento ao redor do disco impregnado. Após o período de incubação, respeitadas as condições específicas para o microrganismo, as zonas de inibição são medidas ao redor de cada disco (ISENBERG, 1992; KONEMAN et al., 1997).

4.2.9.1.1 Preparo das amostras e controles

Foi utilizado para avaliação da atividade antibacteriana o óleo essencial extraído das partes aéreas secas e os extratos brutos. O óleo essencial foi testado puro e com a adição do emulsificador Polissorbato 80 na concentração 0,5% com o objetivo de facilitar sua dispersão no meio de cultura (LAHLOU, 2004; BRUNI et al., 2004). Os extratos etanólicos foram ressuspensos em água estéril na concentração de 50 mg/mL com o auxílio de dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção (1:1).

O antibiótico ampicilina foi utilizado como controle positivo e a solução empregada foi obtida pela diluição do antibiótico em água destilada e estéril de forma a obter a concentração 50 µg/mL.

Como controles negativos foram utilizados o emulsificador polissorbato 80 em água destilada estéril na concentração de 0,5% e DMSO em água na proporção (1:1).

4.2.9.1.2 Ajuste das suspensões bacterianas

As cepas bacterianas foram repicadas do estoque para tubos contendo caldo de infusão de cérebro coração (BHI) e incubadas a 37 °C durante 24 h. A partir deste inóculo, as culturas microbianas foram ajustadas em solução salina 0,9% por comparação com a escala 0,5 de MacFarland que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL.

4.2.9.1.3 Teste de difusão em ágar

A difusão foi realizada em disco e em “template” para o óleo essencial bruto e na presença do emulsificador polissorbato 80 na concentração 0,5%. Para os extratos, o teste foi realizado empregando-se o “template”.

Cerca de 100 µL de cada suspensão bacteriana previamente ajustada foram semeada em placas contendo ágar Mueller-Hinton com o auxílio de alça de Drigalsky.

A difusão em disco foi realizada impregnando 10 µL do óleo essencial, os controles positivo e negativo em discos de papel (6 mm de diâmetro), aplicando sobre a superfície da placa contendo o inóculo bacteriano. Para a difusão empregando-se “template” foram aplicados 20 µL do óleo essencial puro e emulsificado, bem como 100 µL dos extratos brutos. O volume do controle negativo foi correspondente ao empregado nas amostras e o antibiótico (controle positivo) foi aplicado 50 µL no teste com “template” e 10 µL nos discos de papel.

Antes da incubação a 35 ± 1 °C por 24 h as placas permaneceram em repouso por cerca de 30 min em temperatura ambiente para permitir a difusão das amostras. Após a incubação, verificou-se o diâmetro do halo de inibição em mm considerando o diâmetro dos discos e dos orifícios do “template”. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados estão apresentados como a média $\pm$ desvio-padrão (DP).

Os resultados foram comparados estatisticamente empregando-se análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste *t* de Student considerando um nível de significância de 5%.

4.2.9.2 Atividade imunológica

A avaliação da atividade imunológica foi realizada a partir de células do exsudato peritoneal murino (CEP) e desenvolvida de acordo com o esquema apresentado na figura 10.

4.2.9.2.1 Preparo do material vegetal

Os extratos e o óleo essencial obtidos segundo descrito nos itens 4.2.4, foram inicialmente solubilizados em RPMI-1640 na concentração de 1 µL/mL para o óleo essencial, 50 mg/mL para o extrato aquoso e 3 mg/mL para os extratos etanólicos com a adição de 0,5% de DMSO e posterior sonificação durante 10 min.

4.2.9.2.2 Animais

Em cada experimento foram utilizados 5 camundongos Swiss machos de 6 a 8 semanas de idade, pesando entre 18 e 25 g, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Câmpus de Araraquara. Os animais foram mantidos em

gaiolas de policarbonato, com água e ração *ad libitum* em local climatizado ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ e $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar), com controle de claro e escuro a cada 12 h.

4.2.9.2.3 Obtenção dos das células do exsudato peritoneal (CEP)

Na cavidade peritoneal de cada animal foram inoculados 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3%, três dias antes da coleta de células. O sacrifício dos animais foi realizado 72 h após em câmara de CO_2 . Os animais foram colocados em suporte onde ficaram imobilizados pelas patas com o abdome voltado para cima. Dentro da câmara de fluxo laminar, após a anti-sepsia do abdome com álcool iodado a 0,3%, o peritônio dos camundongos foi exposto com o auxílio de duas pinças. A seguir foi injetada intraperitonealmente, 5,0 mL da solução salina tamponada de fosfatos (PBS), pH 7,4 estéril. Os abdomes foram suavemente massageados e a suspensão celular foi coletada com o auxílio de seringa e agulha descartáveis. O material obtido foi colocado em tubos plásticos e centrifugados a $225 \times g$ durante 10 min e ressuspensos na mesma solução, sempre mantida a 4°C .

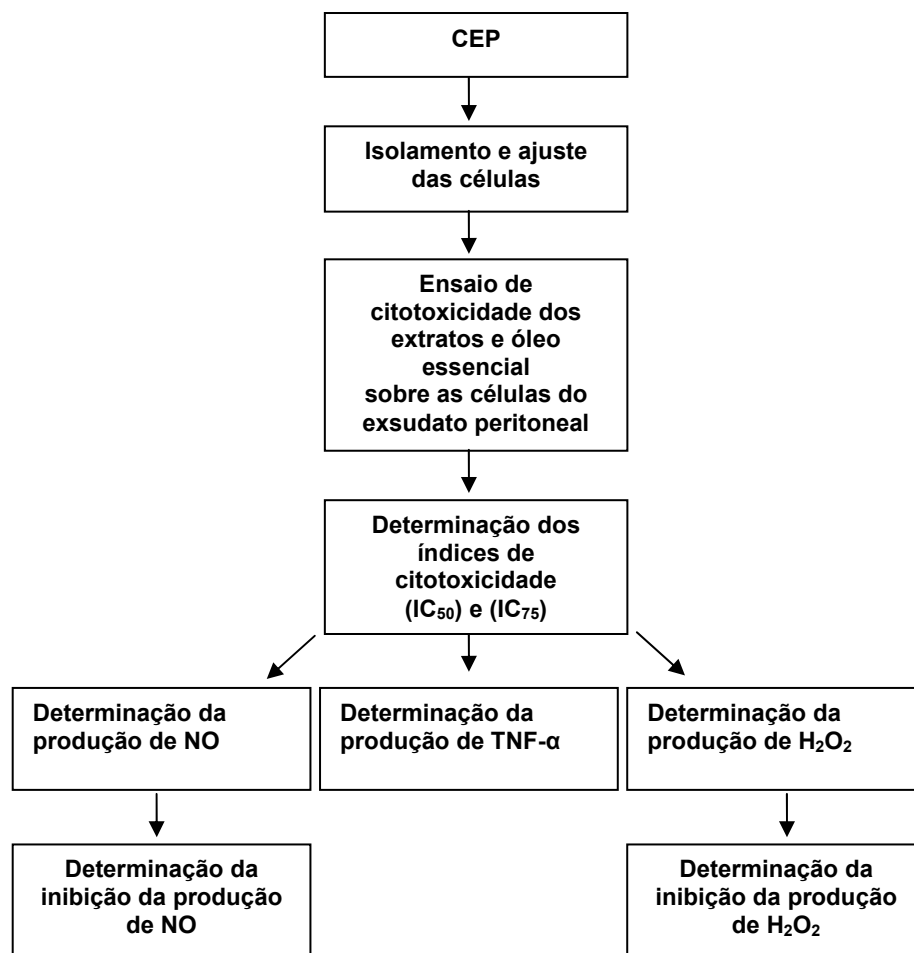


Figura 10. Esquema ilustrativo da avaliação da atividade imunológica dos extratos e do óleo essencial de *Melampodium divaricatum*.

4.2.9.2.4 Avaliação da citotoxicidade do óleo essencial e dos extratos

A partir de diluições seriadas em RPMI – 1640 da solução-estoque (1 µL/mL) do óleo essencial, 50 mg/mL e 3 mg/mL (decocto e macerações etanólicas) respectivamente 7 diferentes concentrações que foram testadas quanto a citotoxicidade frente as CEP.

Os experimentos foram realizados utilizando a técnica de MTT (MOSMANN, 1983). As CEP foram ressuspensas em RPMI contendo 5% de soro fetal, 100 IU/mL penicillina, 100 µg/mL de estreptomicina e 50 mM de 2-mercaptoetanol. A suspensão celular (100 µL) e as amostras (100 µL) foram adicionadas em cada poço da microplaca de 96 cavidades incubando-as por 24 h a 37 °C em estufa contendo tensão constante de 7,5% de CO₂. Após o tempo de incubação, o conteúdo da placa foi vertido e 100 µL de solução de MTT a 1 mg/mL foi adicionado a cada orifício. A placa foi incubada por mais 3 h nas mesmas condições anteriores. Após esse período, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100 µL de álcool isopropílico foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais de formazana formados. Células no meio de cultura (RPMI-1640) foram utilizadas como controle e correspondem a 100% de CEP viáveis. A leitura da absorvância foi realizada em leitor de ELISA com comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm.

4.2.9.2.5 Avaliação da estimulação das CEP

Determinação de óxido nítrico (NO)

O óxido nítrico quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura foi medido espectrofotometricamente usando reação de Griess com nitrato de sódio (NaNO₂) como padrão (GREEN et al., 1982). Em cada orifício de uma placa de 96 cavidades foram adicionados 100 µL de uma suspensão celular ajustada na concentração de 5x10⁶ células/mL. Após a aderência das células, a placa foi incubada com 100 µL das preparações obtidas a partir do óleo essencial e dos extratos nas concentrações correspondentes a presença de 50 e 75% de células viáveis, anteriormente calculadas através do teste de citotoxicidade. Como controle negativo foi utilizado 100 µL do meio de cultura RPMI-1640 e como controle positivo 100 µL de uma solução de LPS a 1 µg/mL. Após a incubação, alíquotas de 50 µL do sobrenadante da cultura foram misturadas com 50 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 0,1%; N-naftil-etilenodiamino 0,1% e ácido fosfórico a 3%). Após 10 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorvância foi lida a 540 nm em leitor de ELISA. Os resultados foram expressos como µmols de nitrito/5x10⁶ células peritoneais/orifício a partir de uma curva analítica previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio em RPMI-1640.

Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A produção de H_2O_2 foi determinada segundo método descrito por Pick e Keisari (1980) e adaptado por Pick e Mizel (1981). Foram preparadas suspensões de células peritoneais ajustadas na concentração de 2×10^6 células/mL. Após a aderência, as células foram incubadas em solução de vermelho de fenol, contendo: 140 mM de NaCl, 10 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho de fenol e peroxidase de raiz forte tipo II (0,01 mg/mL), juntamente com 50 μ L das soluções de óleo essencial e extratos, por 1h a 37 °C em estufa com tensão constante de 7,5% de CO_2 . Como controle negativo foi utilizado somente células em solução completa de vermelho de fenol e como controle negativo foi empregado 50 μ L de uma solução de PMA a 0,2 μ M.

Decorrido o prazo de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de NaOH 5N, e a seguir foram feitas as leituras em espectrofotômetros UV/Visível de microplacas a 620 nm. As amostras foram ensaiadas em triplicata e os resultados expressos em nanomols de H_2O_2 /2x10⁵ células peritoneais, a partir de curva analítica previamente estabelecida, constituída de concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho de fenol.

Determinação da produção de TNF- α por bioensaio

O ensaio baseia-se na capacidade do TNF- α em lisar células tumorais (CARSWELL et al., 1975; CARLOS et al., 1994). As células utilizadas foram da linhagem L929, cultivadas em meio Eagle, com 7,5% de soro fetal bovino inativado.

As células L929 foram contadas em câmara de Neubauer e ajustadas a uma densidade de 4×10^5 cels/mL de meio RPMI –1640C e acondicionadas em uma placa (100 μ L/cavidade) e incubadas 18 h a 37 °C, em tensão constante de CO_2 5%. Após incubação, 100 μ L dos sobrenadantes das culturas de macrófagos incubados com os extratos, obtidos anteriormente, foram adicionados em cada cavidade e novamente incubados por 24 h, nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes foram desprezados e as células coradas com cristal violeta (0,2% em metanol 20%), por 30 min em temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado lauril-sulfato de sódio para solubilizar as células coradas e a absorvância de cada orifício foi obtida a 495 nm em leitor de ELISA.

4.2.9.2.6 Determinação da atividade inibitória em CEP

Quanto à produção de óxido nítrico (NO)

Células do exsudato peritoneal, na concentração de 5×10^6 células/mL, foram utilizadas. As células aderentes foram incubadas na presença de 100 μ L de solução de LPS

(1µg/mL) e 100 µL das preparações obtidas a partir do óleo essencial e extratos nas concentrações correspondentes a 50 e 75% de células viáveis. A incubação foi feita por 24 h em estufa a 37 °C com tensão constante de 7,5% de CO₂. A produção de NO foi medida espectrofotometricamente através do acúmulo de nitrito no meio de cultura com a utilização do reagente de Griess seguindo a mesma metodologia para determinação de NO descrita no item 4.2.9.2.5.

Quanto à produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Células do exsudato peritoneal, na concentração de 2 x 10⁶ células/mL, foram utilizadas. As células aderentes foram incubados na presença de 50 µL PMA (0,2 µM) e 50 µL das preparações obtidas a partir do óleo essencial e dos extratos nas concentrações equivalentes a presença de 50 e 75% de células viáveis. A incubação foi feita durante 1 h em estufa a 37 °C com tensão constante de 7,5% de CO₂. A produção de H₂O₂ foi medida espectrofotometricamente através do método de Pick & Keisari (1980) assim como na determinação da liberação de H₂O₂ descrita no item 4.2.9.2.5.

Cálculo da porcentagem de inibição

Foram calculadas as porcentagens de inibição, através de comparação com os controles tanto para produção de NO quanto para a produção de H₂O₂ na presença do óleo essencial. Utilizou-se a seguinte equação para o cálculo:

$$Inibição(\%) = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

Onde: A, B e C correspondem:

Nos testes de NO

A: LPS na presença do óleo essencial

B: LPS na ausência do óleo essencial

C: CEP na ausência do LPS e do óleo essencial

Nos testes de H₂O₂

A: PMA na ausência do óleo essencial

B: PMA na presença do óleo essencial

C: CEP na ausência do PMA e do extrato

4.2.9.2.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através de análise de variância (ANOVA) e posteriormente o teste-t de Student com um nível de significância de 1% ou seja, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,01$.

Diante do amplo uso popular da espécie *M. divaricatum* (Rich. In Pers.) DC (Asteraceae) fica evidente o provável potencial farmacológico desta espécie justificando assim estudos que possam confirmar sua eficácia terapêutica, bem como aspectos que garantam a qualidade e segurança de seu uso pela população.

Conhecer a atividade farmacológica de constituintes químicos presentes em espécies vegetais selecionadas para estudo sempre foi objetivo de todo trabalho envolvendo plantas. Uma análise fitoquímica preliminar pode identificar grupos de metabólitos secundários relevantes que possam estar relacionados ou não às atividades biológicas encontradas, juntamente com estudos relacionados ao controle de qualidade do material em estudo pode direcionar a pesquisas para obtenção de um fitoterápico eficaz e seguro.

O controle de qualidade e a padronização de um fitoterápico envolvem várias etapas, entretanto, a fonte e a qualidade das matérias-primas têm um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis (CALIXTO, 2000).

Tendo em vista as exigências atuais por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004) e a ausência de estudos farmacognósticos e biológicos para a espécie *M. divaricatum*, buscou-se através deste trabalho colaborar com o estudo desta espécie.

Para isso foram realizados vários ensaios com o objetivo de estabelecer parâmetros de qualidade do material botânico e testes com o objetivo de avaliar atividades biológicas de interesse farmacêutico. As análises físico-químicas envolveram a perda por secagem (utilizando-se do material fresco), a determinação da perda por dessecação, determinação do pH, determinação do teor de cinzas e determinação do teor de extrativos.

5.1 ESTABELECIMENTO DE PARÂMETROS PARA O CONTROLE DE QUALIDADE DE *Melampodium divaricatum*

Após a coleta e seleção, o material botânico foi submetido à secagem por período definido através da perda por secagem tanto em estufa com e sem circulação de ar a 40 °C bem como em temperatura ambiente, com o objetivo de avaliar qual o melhor processo de secagem a ser empregado, quanto ao tempo de secagem para evitar possíveis degradações decorrentes da alta temperatura ou mesmo de contaminação microbiológica fruto da alta umidade.

A massa do material vegetal estabilizou após 72 h de secagem em estufa com e sem circulação de ar. Em temperatura ambiente o tempo de secagem foi maior (96 h), o que pode acarretar uma contaminação microbiológica e/ou ação enzimática por exposição do

material ao ambiente por um tempo maior sem estar armazenado, além do fato da secagem ao ar ambiente estar sujeito a condições não controláveis como: umidade e temperatura.

Os resultados obtidos para perda por secagem foram $85,29 \pm 0,40\%$ em temperatura ambiente, $85,58 \pm 0,32\%$ em estufa com circulação de ar e aquecimento em torno de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $86,37\% \pm 0,18$ e em estufa com aquecimento em torno de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e representam a média de cinco determinações como apresentado na figura 11.

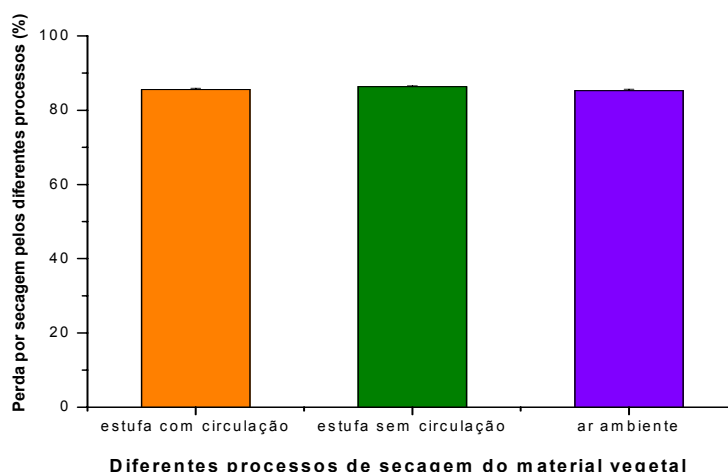


Figura 11. Comparação da perda por secagem de partes aéreas de *Melampodium divaricatum* pelos diferentes processos de secagem.

Os resultados obtidos nos permitem afirmar que os diferentes processos de secagem da espécie em estudo não apresentaram diferença significativa quanto à umidade perdida, segundo teste *t* de Student com um nível de significância de 5%.

Os constituintes químicos, presentes nas plantas medicinais, principalmente os voláteis são sensíveis ao processo de secagem com temperatura e circulação de ar. O efeito da secagem sobre a composição de substâncias voláteis tem sido pesquisado, no sentido de demonstrar que as variações nas concentrações de seus constituintes, durante a secagem, dependem de vários fatores como o método de secagem, temperatura do ar empregada, características fisiológicas, além de conteúdo e tipo de componentes químicos presentes nas plantas submetidas à secagem (VENSKUTONIS, 1997).

A secagem pode aumentar o número de modificações físicas e químicas negativas, alterando a qualidade da matéria-prima para a sua comercialização como, por exemplo, mudanças em aparência (coloração), cheiro e possíveis perdas de constituintes voláteis. Esses fatores requerem trabalhos de pesquisa, cujo objetivo é estudar os possíveis efeitos da secagem e do armazenamento de plantas medicinais, sob condições pré-estabelecidas (BARITAUX et al., 1992).

A secagem é importante, pois diminui a velocidade de deterioração do material, por meio da redução no teor de água, atuando regressivamente na ação das enzimas possibilitando a conservação das plantas por maior tempo. Com a redução da quantidade de água, aumenta-se, também, a quantidade de princípios ativos em relação à massa seca (SILVA & CASALI, 2000).

Diante dos resultados obtidos optou-se pelo processo de secagem do material vegetal seco em estufa com circulação de ar e aquecimento a 40 °C.

Após secagem, o material vegetal, agora denominado droga vegetal, foi pulverizado em moinho de facas, já que esse tipo de moagem é o indicado para partes não friáveis como folhas e flores (SIMÕES et al., 2004). O aspecto do pó obtido após a moagem das partes aéreas está ilustrado na figura 12.



Figura 12. Aspecto do pó das partes aéreas de *Melampodium divaricatum* pulverizado em moinho de facas.

Estando o grau de divisão da droga intimamente relacionado com a eficiência do processo extrativo, torna-se importante a análise granulométrica do material vegetal empregado na extração, também com o objetivo de caracterização deste material, tendo em vista que nenhum estudo envolvendo estes aspectos da espécie *M. divaricatum* foi realizado.

A distribuição granulométrica do pó obtido a partir das partes aéreas pulverizadas em moinho de facas nos permite afirmar que a maior parte das partículas encontra-se entre as classes granulométricas de 0,840 a 0,420 mm como apresentado na tabela 4 e figura 13, o tamanho médio das partículas calculado foi 0,476 mm $\pm$ 0,063.

Segundo classificação dos pós vegetais proposta pela Farmacopéia Brasileira IV (1988), o pó de *M. divaricatum* pulverizado em moinho de facas pode ser classificado como grosso, visto que 100% do pó foi menor que 2000 μ m ou 2 mm.

Tabela 4. Análise granulométrica por tamisação de partes aéreas de *Melampodium divaricatum* pulverizadas em moinho de facas.

Abertura da malha (mm)	Classe granulométrica (mm)	Abertura média (mm)	Fração Resíduo (%)	Fração Retida Acumulada (%)
0,840	0,084 — 2,000	1,042	4,91 ± 2,05	4,91
0,590	0,590 — 0,840	0,715	22,22 ± 6,05	27,13
0,420	0,420 — 0,590	0,505	29,80 ± 3,92	56,93
0,297	0,297 — 0,420	0,359	11,72 ± 1,15	67,75
0,250	0,250 — 0,297	0,274	6,04 ± 0,92	73,79
0,210	0,210 — 0,250	0,230	6,77 ± 1,65	80,56
0,177	0,177 — 0,210	0,194	4,69 ± 1,49	85,25
0,149	0,149 — 0,177	0,163	2,73 ± 0,98	87,98
0,125	0,125 — 0,149	0,137	1,37 ± 0,59	89,35
0,074	0,074 — 0,125	0,100	5,35 ± 2,74	94,70
coletor	0,000 — 0,074	0,037	4,39 ± 2,10	100,00

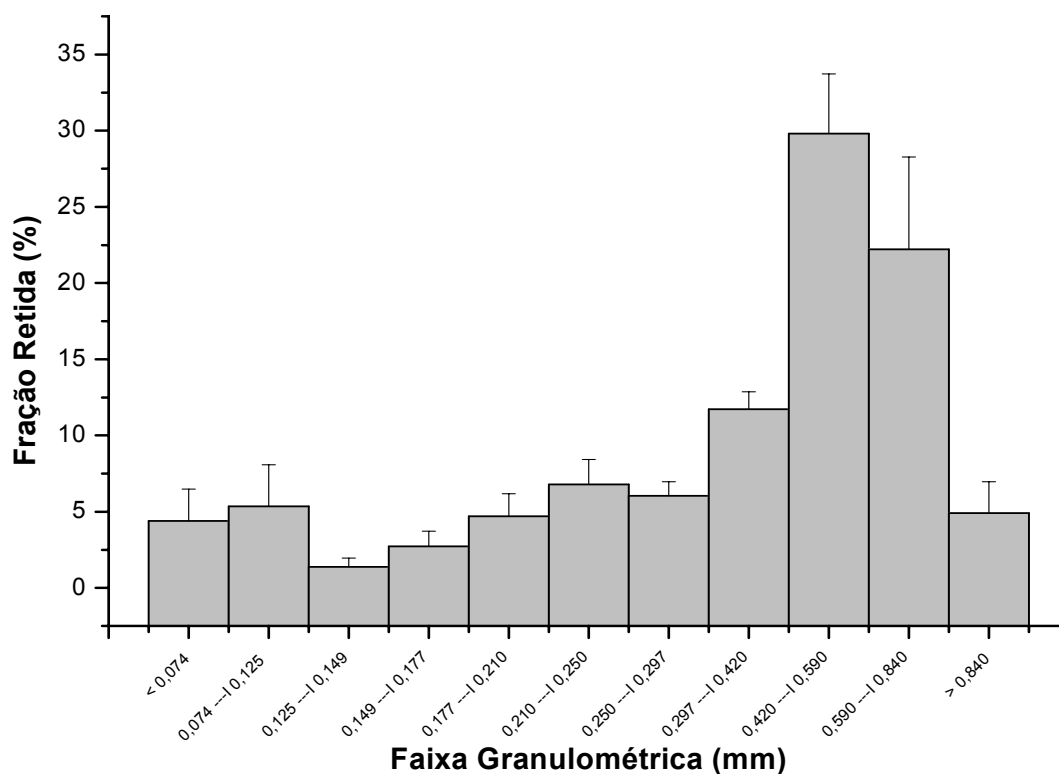


Figura 13. Distribuição do tamanho de partículas das partes aéreas de *Melampodium divaricatum* pulverizadas em moinho de facas.

A granulometria é expressa com referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado (FARMACOPÉIA, 1988). Segundo List & Schmidt, 2000, a droga vegetal que apresente partículas de tamanho superior a classificação de fino é mais adequada para os processos de extração, principalmente por percolação, pois a presença de um pó muito fino pode promover o entupimento do percolador.

O estado de fragmentação do material vegetal também tem sua importância para a otimização extrativa, portanto para obtenção dos extratos vegetais as partes aéreas secas foram moídas, aumentando assim a superfície de contato da droga vegetal com o líquido extrator, porém um tamanho muito reduzido pode ocasionar a perda de compostos de interesse.

Como os óleos essenciais localizam-se em estruturas internas e/ou externas diversas, a fragmentação do material vegetal pode influenciar diretamente no rendimento extrativo. Silva e colaboradores (2004), estudando os teores de óleos essenciais de folhas de cidrão (*Aloysia triphylla*), frescas e secas em diferentes tamanhos de fragmentos verificaram que folhas inteiras secas, frescas inteiras e frescas processadas em liquidificador não apresentaram diferenças no teor de óleo essencial. Porém, as folhas secas trituradas em moinho apresentaram o menor rendimento no ensaio. Portanto, o material vegetal empregado na extração do óleo essencial em estudo não foi moído e sim rasurado manualmente com o auxílio de tesoura em tamanhos com cerca de 2,0 cm.

Estando determinado o tamanho das partículas da droga vegetal pulverizada, partiu-se para a determinação do teor de cinzas totais e insolúveis em ácido que permite verificar a presença de impurezas inorgânicas não-voláteis no material vegetal (SIMÕES et al., 2004; VIGO et al., 2004).

Os teores de cinzas totais e insolúveis em ácido foram determinados para as partes aéreas de *M. divaricatum* coletadas nas diferentes épocas do ano. Os resultados obtidos para cinzas totais e insolúveis em ácido foram, respectivamente, $15,81 \pm 0,59\%$ e $1,55 \pm 0,19\%$ representando a média de todas as determinações (tabela 6).

O teor de resíduo seco é um parâmetro farmacognóstico que indica o rendimento da extração em massa através da relação droga vegetal x resíduo seco (m/m) (SANCHES, 2004).

O teor de resíduos secos foi calculado como descrito no item 4.2.2.6 e os resultados obtidos foram $2,767 \pm 0,105\%$ (p/p) em água, $0,744 \pm 0,008\%$ (p/p) em etanol 70% e $0,739 \pm 0,008\%$ (p/p) em etanol absoluto. Indicando, assim que o maior rendimento de extrato em massa se deu pela extração em água, tendo como processo extrativo a decocção.

O excesso de água em matérias-primas vegetais possibilita a ação de enzimas, além de propiciar o desenvolvimento de fungos e bactérias (FARIAS, 2003).

Entre os métodos analíticos oficiais para determinação de água em matérias-primas vegetais, o método gravimétrico em estufa é o mais comum, seguido do método de destilação azeotrópica, preconizado para a determinação de água em drogas vegetais ricas em óleos voláteis (BORGES et al., 2005).

Os métodos gravimétricos determinam não somente a perda de água, como também dos demais constituintes volatilizados juntamente com a água (ISENGARD & FÄRBER, 1999; FARIAS, 2003), incluindo os óleos essenciais, portanto não são indicados para espécies ricas em óleos essenciais. Como a espécie em estudo apesar de conter óleos essenciais o seu teor não é elevado o que pode não afetar significativamente nos resultados.

Em estudo realizado por Borges e colaboradores (2005) para as folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek conhecido popularmente como espinheira-santa e partes aéreas de *Passiflora alata* Curtis conhecida como maracujá, onde o teor de umidade obtido pelos métodos gravimétricos e azeotrópico não diferiram significativamente. Porém no mesmo estudo foi observada diferença significativa entre as metodologias para espécies com alto teor de óleo essencial como a *Calendula officinalis* L. e *Foeniculum vulgare* Miller.

A determinação da perda por dessecação das partes aéreas moídas de *M. divaricatum* foi realizada em balança de infravermelho à temperatura de 110 °C por cerca de oito horas apresentado uma perda de $12,1 \pm 0,25\%$ quando ocorreu estabilização do processo. Este resultado representa a média de cinco resultados e encontra-se dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (1988) na qual a especificação de umidade para drogas vegetais encontra-se entre 8 e 14% evitando assim que o material sofra algum tipo de degradação tanto enzimático quanto pela contaminação excessiva por microrganismos. Mesmo sendo o método gravimétrico não indicado para materiais que apresentem constituintes voláteis além da água, possivelmente o material avaliado apresenta uma umidade inferior ao resultado obtido e desde que não esteja inferior a 8% continua dentro dos limites estabelecidos para garantia da qualidade.

Outro parâmetro importante para a caracterização de um material vegetal é o pH; os valores obtidos pela média de 12 determinações foi $6,57 \pm 0,10$ mostrando-se praticamente neutro. O pH da água destilada empregada no preparo do extrato analisado foi de $5,32 \pm 0,03$.

Considerando os diversos aspectos que garantem a qualidade do material vegetal, que incluem não somente os aspectos físico-químicos, mas também microbiológico, e diante dos procedimentos de coleta e manuseio torna-se comum a detecção de contaminantes microbiológicos, porém essa carga microbiana não deve ser elevada a ponto de prejudicar a qualidade deste material tanto por degradação de princípios ativos pelos microrganismos

quanto à contaminação de qualquer extrato ou extrativo obtido a partir desta planta altamente contaminada.

O controle microbiológico tem como objetivo determinar o número total de microrganismos presentes em preparações não estéreis, cosméticos e drogas vegetais, além da identificação de microrganismos patogênicos, tais como *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que não devem estar presentes assegurando assim o utilização de produtos de boa qualidade, seja ele de qualquer origem.

Existem padrões pré-estabelecidos pela Organização da Saúde que tornam aceitáveis a contaminação por bactérias e fungos, desde que em um nível não muito alto e a ausência ou presença reduzida dos microrganismos com potencial patogênico.

O material vegetal coletado no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – SP foi avaliado microbiologicamente e os resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Controle microbiológico das partes aéreas de *Melampodium divaricatum* pulverizadas.

Microrganismos	Recomendação ^a	Resultado ^b
Aeróbios viáveis	$\leq 10^5$ UFC/g	$2,48. 10^4 \pm 22$ UFC/g
Fungos	$\leq 10^4$ UFC/g	$1,82.10^2 \pm 12$ UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	ausência	ausência
<i>Salmonella</i> sp.	ausência	ausência
<i>Staphylococcus aureus</i>	ausência	ausência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ausência	ausência

^a Recomendação segundo CARTURAN (1999); PINTO et al., (2003) ; USP 26 (2003); SIMÕES et al., (2004); ^b resultados expressos pela média $\pm$ desvio-padrão de três determinações.

Os resultados obtidos indicam que mesmo os níveis de aeróbios totais e fungos detectados não são baixos, porém estão dentro dos limites aceitáveis. O material analisado trata-se de um arbusto coletado e selecionado manualmente o que pode aumentar os riscos de contaminação, no entanto houve crescimento dos microrganismos não aceitáveis (*Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*), o que indica que o material apresenta-se de qualidade e não contaminado por microrganismos patogênicos.

A contaminação por aeróbios totais e fungos encontrada foi minimizada pelo processo de extração, uma vez que nos processos extrativos empregados empregou-se

temperatura (decoção) e solventes (etanol) que reduziram a carga microbiana detectada nos testes de controle microbiológico.

Os extratos de *M. divaricatum*, portanto apresentaram-se ausentes de contaminantes microbiológicos, tanto na contagem total como nos testes específicos para microrganismos patogênicos.

Outros fatores também podem afetar o conteúdo final dos metabólitos secundários em plantas medicinais, tais como condições de coleta, estabilização, estocagem e muitos outros. O presente estudo buscou caracterizar farmacognosticamente a espécie *M. divaricatum* tendo em vista a ausência de estudos e parâmetros pré-estabelecidos para o controle de qualidade desta espécie. Os resultados obtidos nas análises física, físico-química e microbiológica estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Análise física, físico-química, química e microbiológica das partes aéreas de *Melampodium divaricatum*.

Parâmetros	Resultados
Diâmetro médio das partículas	0,476 mm $\pm$ 0,063 ^a
Densidade aparente não-compactada	0,22 g/mL $\pm$ 0,10 ^a
Densidade compactada	0,26 $\pm$ 0,10 g/mL ^a
Perda por secagem em estufa com circulação de ar a 40 °C	86,37 $\pm$ 0,18% ^a
Perda por dessecação	12,1 $\pm$ 0,25% ^a
pH da droga vegetal	6,57 $\pm$ 0,10 ^a
Teor de cinzas totais	15,81 $\pm$ 0,59% ^a
Teor de cinzas insolúveis em ácido	1,55 $\pm$ 0,19% ^a
Triagem fitoquímica preliminar	Presença de traços de flavonóides
Teor de flavonóides totais	0,71 $\pm$ 0,30%
Análise microbiológica	Ausência de microrganismos patogênicos e presença inferior ao aceite para fungos

^a Média $\pm$ desvio padrão obtido a partir de 5 determinações.

5.2 ANÁLISES QUÍMICAS

Inicialmente foi realizada uma triagem dos principais metabólitos secundários com a finalidade de se conhecer quais as principais classes de princípios ativos presentes na espécie *M. divaricatum*. A tabela 7 apresenta os resultados obtidos na triagem fitoquímica.

Tabela 7. Análise fitoquímica preliminar das partes aéreas de *Melampodium divaricatum*.

Classes	Reações (Costa, 1994; Matos, 1997)	Resultado			
		P	V	O	I
Alcalóides	Bertrand	-	-	-	-
	Bouchardat	-	-	-	-
	Dragendorff	-	-	-	-
	Mayer	-	-	-	-
Antraquinonas	Livres	-	-	-	-
	Glicosiladas	-	-	-	-
Glicosídeos Cardiotônicos	LEGAL	-	-	-	-
	Keller-Killiani	-	-	-	-
	Liebermann-Burchard	-	-	-	-
Flavonóides	Shinoda	-	-	-	-
	Taubock	+	+	-	-
	Pew	-	-	-	-
	Cloreto férrico	+	+	-	-
	Cloreto de alumínio	+	+	-	-
Antraquinonas	Livres	-	-	-	-
	Glicosiladas	-	-	-	-
Saponinas	Formação e permanência de espuma	-	-	-	-
Taninos	Gelatina	-	-	-	-
	Sais de ferro	-	-	-	-
	Acetato de chumbo	-	-	-	-
Cumarinas	Teste para cumarinas	-	-	-	-

- : presença do grupo químico não caracterizada; + : presença do grupo químico caracterizada.

P: primavera; V: verão; O: outono e I: inverno.

Um método clássico empregado para a identificação segura de drogas vegetais é a análise cromatográfica, portanto buscou-se caracterizar a presença dos constituintes majoritários presentes em *M. divaricatum* tanto no material vegetal bem como nos extratos (EA, EH e EE), por cromatografia em camada delgada empregando sistemas eluentes clássicos para as principais classes de metabólitos, buscando detectar a presença de metabólitos mesmo que em quantidades pequenas, mas que pudessem estar relacionados às atividades biológicas avaliadas. Todas as análises cromatográficas em camada delgada empregadas basearam-se nos métodos propostos por Wagner e colaboradores (1984).

Através do perfil cromatográfico dos extratos foi possível detectar a presença de flavonóides e de terpenos, resultados estes condizentes com os obtidos para espécie *M. divaricatum* por Hubert & Wiemer (1985), Alonso-López e colaboradores (1985), Bohm & Stuessy (1991) e Hüther e colaboradores (1999), que identificaram a presença de sesquiterpenos e flavonóides em extratos de média polaridade a partir de várias partes da planta, como apresentado na tabela 1.

O perfil cromatográfico para terpenóides dos extratos brutos está apresentado na figura 14 e tabela 8.

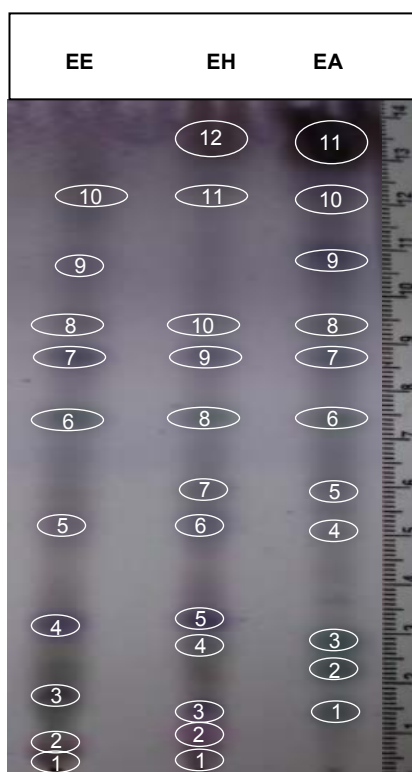


Figura 14. Cromatograma dos extratos obtidos por maceração a partir das partes aéreas de *Melampodium divaricatum* empregando-se diferentes líquidos extratores. Onde: EE (Extrato Etanólico 98,5%); EH (Extrato Hidroetanólico 70%); EA (Extrato Aquoso). Sistema cromatográfico: fase móvel: metanol: *n*-propanol: água (5:6:1:4) (v/v); fase estacionária: sílica gel GF₂₅₄ (Merck®); revelação: anisaldeído sulfúrico a quente.

Tabela 8. Fatores de retenção e cor das bandas correspondentes ao cromatograma apresentado na figura 14.

Amostras*	Coloração das bandas (Wagner et al., 1984)	Rf (Fator de Retenção)
EE*	1: marrom avermelhada	0,02
	2: violeta avermelhada	0,05
	3: marrom -avermelhada	0,12
	4: violeta	0,22
	5: violeta	0,35
	6: azul esverdeada	0,50
	7: violeta	0,59
	8: violeta	0,63
	9: violeta	0,72
	10: marrom amarelada	0,81
EH*	1: marrom avermelhada	0,02
	2: violeta avermelhada	0,06
	3: violeta	0,10
	4: azul esverdeada	0,19
	5: violeta	0,23
	6: violeta	0,36
	7: azul erverdeada	0,40
	8: azul erverdeada	0,50
	9: violeta	0,59
	10: violeta	0,63
	11: violeta	0,81
	12: violeta	0,92
EA*	1: azul esverdeada	0,10
	2: violeta	0,15
	3: azul esverdeado	0,19
	4: violeta	0,35
	5: violeta	0,39
	6: azul erverdeada	0,50
	7: azul erverdeada	0,58
	8: violeta	0,63
	9: violeta	0,72
	10: violeta	0,81
	11: violeta	0,91

* EE (Extrato Etanólico 98,5%); EH (Extrato Hidroetanólico 70%); EA (Extrato Aquoso).

De forma geral houve algumas diferenças no número e intensidade de constituintes identificados nos extratos, o que pode indicar diferenças na constituição química e teor dos constituintes dos extratos, visto que foram empregados líquidos extratores diferentes, justificando assim possíveis diferenças nas atividades biológicas testadas.

Através da triagem fitoquímica foi possível detectar também a presença de flavonóides a partir das reações com cloreto de alumínio, cloreto férrico e Taubock nas amostras coletadas na primavera e verão, portanto foi possível verificar uma variação sazonal quanto à presença de flavonóides nas partes aéreas de *M. divaricatum*.

O metabolismo secundário de plantas pode variar consideravelmente dependendo de vários fatores, sendo que a constância de concentrações de metabólitos secundários é praticamente uma exceção. São relatadas variações sazonais no conteúdo de praticamente

todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais (PALÁ-PAÚL et al., 2001; SCHWOB et al., 2004), lactonas sesquiterpênicas (SCHMIDT et al., 1998; ZIDORN & STUPPNER, 2001), ácidos fenólicos (GRACE et al., 1998; ZIDORN & STUPPNER, 2001), flavonóides (BROOKS & FEENY, 2004), cumarinas (WILT & MILLER, 1992), alcalóides (ROCA-PÉREZ et al., 2004) dentre outros.

A maneira mais precisa e exata de se identificar e quantificar flavonóides em produtos naturais é a análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Entretanto, quando se pensa em controle de qualidade, é conveniente a introdução de alternativas analíticas mais simples e baratas, pois nesses casos se requer procedimentos que permitam a análise rápida de amostras numerosas e em laboratórios geralmente modestos no que se refere ao instrumental instalado e utilizado por analistas na maioria das vezes sem formação superior. Uma das técnicas que se enquadram bem nesse contexto é a determinação de flavonóides totais por espectrofotometria no UV/Vis através do uso de cloreto de alumínio (WOISKY & SALATINO, 1998).

Esse é um método preciso, isto é, reproduzível, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides totais realmente presente na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis (ex. quercetina) na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas (ex. crisina). Isso se deve ao fato de que o comprimento de onda selecionado (425 nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-alumínio. A utilização da quercetina como padrão se justifica, pois este flavonol é certamente o mais comum dos flavonóides encontrado nas plantas. Os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo de 425 nm, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas (WOISKY & SALATINO, 1998).

No entanto, essa limitação não reduz a validade do método para propósitos de controle de qualidade. Nesse contexto, é mais importante precisão do que exatidão, pois no controle de qualidade o que normalmente se faz é estabelecer limites inferiores e superiores, dentro dos quais os valores encontrados devem se situar nas condições prescritas pelo método. A determinação do conteúdo real de flavonóides nas amostras analisadas é menos importante, embora a exatidão seja uma característica desejável nos procedimentos para o controle de qualidade (MARCUCCI et al., 2001).

O doseamento foi realizado a partir de curva analítica obtida a partir do padrão de quercetina diidratada apresentada na figura 15.

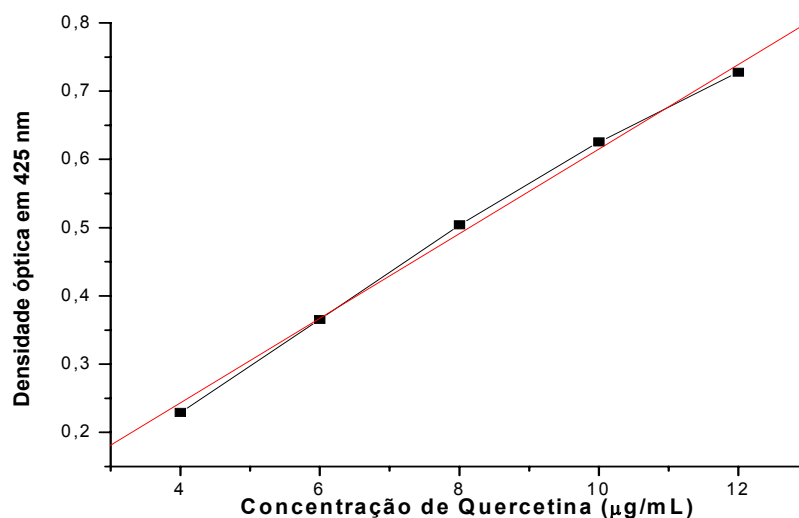


Figura 15. Curva analítica de absorvância da solução padrão de quercetina diidratada em diferentes concentrações.

Os resultados obtidos para o teor de flavonóides das partes aéreas de *M. divaricatum* coletadas nos diferentes períodos do ano expressos em µg/mL de quercetina foram: $0,85 \pm 0,05$ (primavera), $1,03 \pm 0,13$ (verão), $0,34 \pm 0,01$ (outono) e $0,63 \pm 0,01$ (inverno) que diferem estatisticamente entre si segundo teste *t* de Student com nível de significância de 5% como apresentado na figura 16.

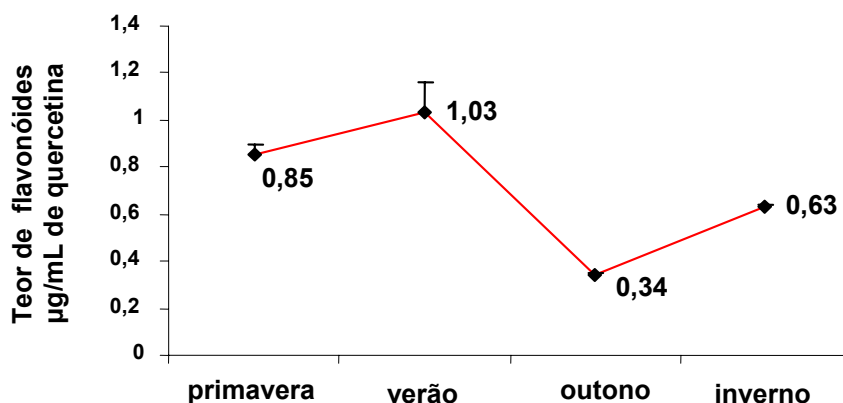


Figura 16. Variação sazonal do teor de flavonóides totais de partes aéreas de *Melampodium divaricatum* nos diferentes períodos do ano.

Esta diferença se dá pelo fato da produção dos metabólitos secundários estar relacionada a diversas condições, bem como disponibilidade de água, nutrientes no solo dentre outros fatores que podem variar ao longo do ano (VIGO et al., 2004; FREIRE et al., 2006).

Resultados semelhantes foram observados nas concentrações de hipericina e pseudo-hipericina obtidas a partir da erva de São João (*Hypericum perforatum*), utilizada no tratamento de depressões leves a moderadas que aumentam de cerca de 100 ppm no inverno para mais de 3000 ppm no verão (44). As folhas de *Digitalis obscura* apresentam as menores concentrações de cardenolídeos, como o lanatosídeo A, na primavera e uma fase de rápido acúmulo no verão, seguida por uma fase de decréscimo no outono (ROCA-PÉREZ et al., 2004); nas raízes de *Panax ginseng* foi detectado um grande aumento na concentração de damarano-saponinas bioativas, tais como o ginsenosídeo no verão (KIM et al., 1981).

As diferenças sazonais observadas no teor de flavonóides de *M. divaricatum* podem ser explicadas pelo fato de existir uma correlação positiva bem estabelecida entre intensidade de radiação solar e produção de compostos fenólicos (WATERMAN & MOLE, 1994), tais como flavonóides (MARKHAM et al., 1989; TATTINI et al., 2004), taninos (DUDT & SHURE, 1994) e antocianinas (JEONG et al., 2004). Isso pode ser explicado, principalmente no caso de flavonóides e fenilpropanóides correlatos, pela proteção contra a foto-destruição proporcionada por estes metabólitos ao absorver e/ou dissipar a energia solar, dificultando assim a danificação dos tecidos mais internos pela radiação UV-B (GRACE et al., 2000). O aumento na produção de tais metabólitos “protetores solares” é controlado por enzimas da rota biossintética dos fenilpropanóides, as quais podem ter sua expressão gênica induzida pela luz (CHAPPELL & HAHLBROCK, 1984).

Portanto, a qualidade das matérias-primas tem um papel central na obtenção de produtos com constância de composição e propriedades terapêuticas reprodutíveis (CALIXTO, 2000).

Na análise cromatográfica em camada delgada das soluções extrativas obtidas por maceração com diferentes líquidos extratores empregando o sistema proposto por Wagner e colaboradores (1984), para a identificação de compostos flavonoídicos, não foram observadas diferenças no perfil cromatográfico, quanto ao número de bandas correspondentes aos constituintes presentes nos extratos, porém a intensidade das bandas apresentou algumas diferenças o que pode indicar diferenças nos teores de acordo com a polaridade do líquido extrator empregado, como apresentado na figura 17 e tabela 9.

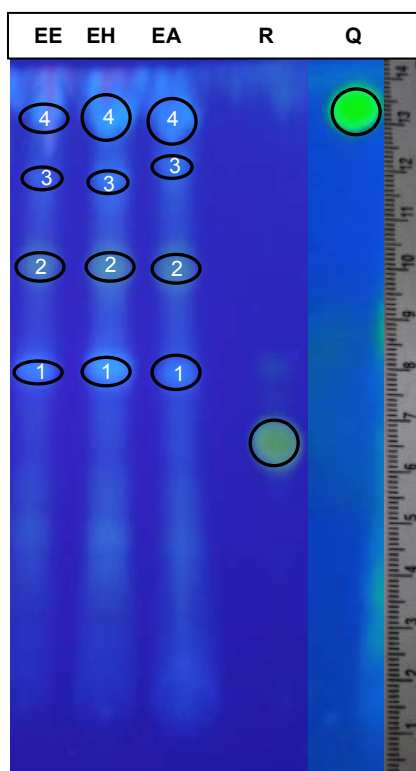


Figura 17. Cromatograma dos extratos obtidos por maceração a partir das partes aéreas de *Melampodium divaricatum* empregando-se diferentes líquidos extratores. Onde: EE (Extrato Etanólico 98,5%); EH (Extrato Hidroetanólico 70%); EA (Extrato Aquoso); Padrões: R (rutina) e Q (quercetina). Sistema cromatográfico: fase móvel: acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (5:6:1:4) (v/v), fase estacionária: sílica gel GF₂₅₄ (Merck®); revelação: NP/PEG e visualização UV-365 nm (WAGNER et al., 1984).

Tabela 9. Fator de retenção e fluorescências correspondentes ao cromatograma apresentado na figura 17.

Amostra	Fluorescência (Wagner et al., 1984)	Rf Fator de Retenção)
EE*	1: azul	0,53
	2: alaranjada	0,67
	3: azul	0,80
	4: azul	0,88
EH*	1: azul	0,54
	2: alaranjada	0,68
	3: azul	0,80
	4: azul	0,89
EA*	1: azul	0,54
	2: alaranjada	0,68
	3: azul	0,82
	4: azul	0,89
R*	alaranjada	0,43
Q*	amarela	0,88

*EE (Extrato Etanólico 98,5%); EH (Extrato Hidroetanólico 70%); EA (Extrato Aquoso); R (Rutina); Q (Quercetina).

Através do doseamento é possível afirmar que existe uma diferença no teor de flavonóides totais nos diferentes extratos obtidos a partir das partes aéreas de *M. divaricatum*. Os resultados obtidos expressos em mg de quercetina/ 100 mg de extrato seco foram 7,46 no extrato etanólico 98,5%, 4,23 no extrato hidroalcolico 70% e 1,44 no extrato aquoso. Portanto torna-se evidente uma relação entre polaridade do líquido extrator e quantidade de flavonóides extraídos para a espécie em estudo.

Os perfis fitoquímicos do óleo essencial de *M. divaricatum* foi obtido empregando-se a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) segundo descrito no item 4.2.8.1.1, onde foi possível avaliar possíveis diferenças no perfil fitoquímico dos óleos essenciais obtidos de diferentes partes da planta bem como se coletadas em diferentes períodos do ano (primavera, verão, outono e inverno).

A figura 18 e tabela 10 apresentam os resultados do perfil fitoquímico do óleo essencial obtido das diferentes partes de *M. divaricatum*.

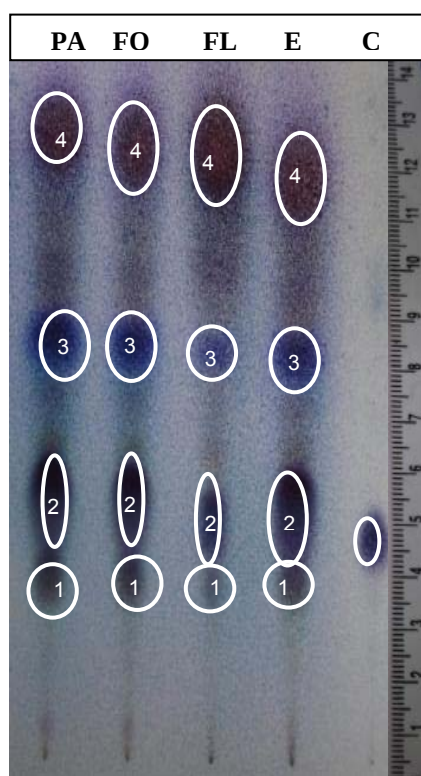


Figura 18. Cromatograma do óleo essencial obtido a partir de diferentes partes no estado seco de *Melampodium divaricatum*. Onde: PA – Partes Aéreas; FO – Folhas; FL - Flores; E – Escapos; C – padrão (β - cariofileno). Sistema cromatográfico: fase móvel: tolueno: acetato de etila (93:7) (v/v); fase estacionária: sílica gel GF₂₅₄ (Merck®); revelação: vanilina sulfúrica a quente.

Tabela 10. Fator de retenção e cor das bandas correspondentes ao cromatograma apresentado na figura 18

Amostra*	Coloração da banda (Wagner et al., 1984)	Rf Fator de Retenção)
PA	1: violeta	0,25
	2: violeta	0,33
	3: violeta-azulada	0,56
	4: violeta-avermelhada	0,85
FO	1: violeta	0,25
	2: violeta	0,33
	3: violeta-azulada	0,56
	4: violeta-avermelhada	0,83
FL	1: violeta	0,25
	2: violeta	0,32
	3: violeta-azulada	0,55
	4: violeta-avermelhada	0,83
E	1: violeta	0,25
	2: violeta	0,35
	3: violeta-azulada	0,55
	4: violeta-avermelhada	0,80
C	violeta	0,31

* PA: partes aéreas; FO: folhas; FL: flores; E: escapos. C: β -cariofileno.

O perfil cromatográfico dos óleos essenciais obtidos das diferentes partes de *M. divaricatum* não apresentou diferenças quanto ao número de constituintes majoritários. Em todas as amostras foi possível identificar 4 constituintes cujos fatores de retenção não apresentaram diferença maiores do que 0,05, o que indica que as bandas são correspondentes, portanto são compostos equivalentes.

Como no caso da espécie em estudo a avaliação ter sido feita apenas qualitativamente, não foi possível concluir em qual dos órgãos os compostos majoritários apresentam um maior teor, apenas foi possível verificar que o perfil fitoquímico foi diferente para o óleo essencial obtido a partir dos escapos (galhos). Com isso, optou-se por trabalhar com as partes aéreas por representar a mistura dos três órgãos vegetais o que pode resultar em um teor maior dos compostos presentes no óleo essencial.

Resultados semelhantes foram obtidos para as espécies *Ocotea puberula* e *Unxia camphta*. Segundo Araújo e colaboradores (2001) o óleo essencial obtido a partir dos galhos e folhas de *O. puberula* não apresentaram diferenças significativas e para a espécie *U. camphta* não houve diferenças nos teores dos compostos majoritários presentes nas flores, folhas, caule, raízes e partes aéreas (BUSMAN et al., 2005).

Como não existem diferenças qualitativas quanto aos compostos majoritários no óleo essencial de *M. divaricatum* obtido das diferentes partes da planta, optou-se por trabalhar com o óleo essencial das partes aéreas, por ser a mistura de flores, folhas e escapos, correspondentes aos 15 cm superiores como ilustrado na figura 5.

Outro parâmetro a ser avaliado e que pode representar grande variabilidade na composição química de um metabólito secundário é a variação sazonal. A figura 19 e a tabela 11 apresentam os resultados do cromatograma do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *M. divaricatum* coletadas nos diferentes períodos do ano.

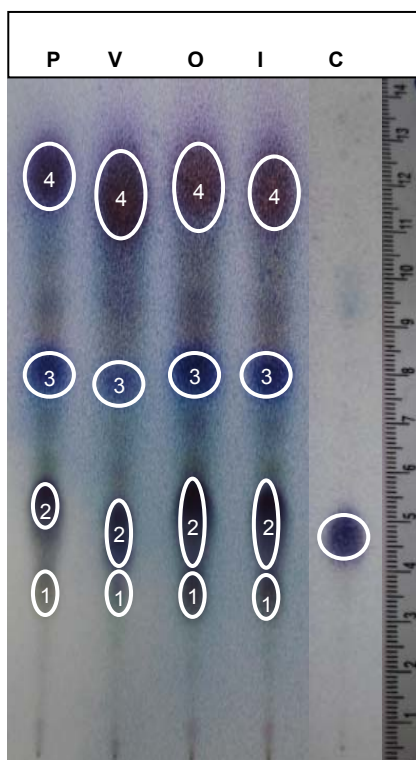


Figura 19. Cromatograma do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *Melampodium divaricatum* coletadas em diferentes períodos do ano. Onde: P (primavera); V (verão); O (outono); I (inverno) e C (β -cariofileno). Sistema cromatográfico: fase móvel: tolueno: acetato de etila (93:7) (v/v); fase estacionária: sílica gel GF₂₅₄ (Merck®); revelação: vanilina sulfúrica a quente.

Tabela 11. Fator de retenção e cor das bandas correspondentes ao cromatograma apresentado na figura 19.

Amostra*	Coloração das bandas (Wagner et al., 1984)	Rf Fator de Retenção)
P	1: violeta	0,23
	2: violeta	0,36
	3: violeta-azulada	0,55
	4: violeta-avermelhada	0,85
V	1: violeta	0,23
	2: violeta	0,32
	3: violeta-azulada	0,53
	4: violeta-avermelhada	0,80
O	1: violeta	0,23
	2: violeta	0,33
	3: violeta-azulada	0,55
	4: violeta-avermelhada	0,81
I	1: violeta	0,23
	2: violeta	0,33
	3: violeta-azulada	0,55
	4: violeta-avermelhada	0,80
C	violeta	0,31

P: primavera; V: verão; O: outono; I: inverno; C: β -cariofileno.

Preliminarmente é possível concluir que não há uma variação quanto à presença dos constituintes majoritários no óleo essencial de *M. divaricatum* quando obtido a partir de amostras coletadas na primavera, verão, outono e inverno. Os fatores de retenção não apresentaram diferenças maiores do que 0,05. Análises complementares são necessárias para avaliar se existem diferenças significativas nos teores destes constituintes majoritários, bem como nos demais constituintes do óleo essencial.

Estudos realizados por Chericoni e colaboradores (2004), Palá-Paúl e colaboradores (2001) e Gauvin & Smadja (2005) com as espécies *Artemisia verlotiorum*, *Santolina rosmarinifolia* e quatro espécies do gênero *Psiadia*, respectivamente, demonstraram que os óleos essenciais não apresentaram diferenças sazonais significativas e todas as espécies são da mesma família que a espécie em estudo (Asteraceae).

Outro fator importante que deve ser avaliado é o processo de secagem empregado. Na verdade quando se trata de processo de secagem de plantas medicinais, diversos fatores devem ser levados em conta e a cada dia novos estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de identificar qual a melhor metodologia a ser empregada para determinada espécie medicinal, já que características fisiológicas, além de conteúdo e tipo de componentes químicos presentes nas plantas submetidas à secagem são variáveis que devem ser consideradas.

Resultados conflitantes são obtidos em estudos de avaliação de processo de secagem de espécies aromáticas. Segundo Müller & Mühlbauer (1990), o acréscimo na temperatura do ar de secagem de 30 para 50 °C na secagem de camomila (*Chamomilla recutita*) reduziu o tempo de secagem de 52 para 3,5 h, não causando redução significativa no teor de óleo essencial, sendo que este manteve-se na faixa de 15 a 25%, independentemente da temperatura do ar de secagem utilizada.

Baritoux e colaboradores (1992) compararam a composição química do óleo essencial de manjerição (*Ocimum basilicum* L.), submetido à secagem com ar aquecido a 45 °C, com aquela obtida com a planta fresca (testemunha). A composição do óleo essencial de manjerição seco apresentou um padrão cromatográfico diferente do obtido na testemunha. Os teores de metilchavicol e eugenol decresceram durante a secagem, entretanto, os teores de *trans*-bergamoteno, linalol e 1,8-cineol aumentaram significativamente.

Diante destes estudos fica evidente a necessidade de um estudo da influência do processo de secagem frente aos metabólitos presentes em cada espécie. Tendo em vista a necessidade de uma avaliação quantitativa principalmente dos constituintes majoritários que podem estar relacionados com as atividades biológicas, buscou-se verificar se o processo de secagem em estufa com circulação de ar e aquecimento a 40 °C afetou o teor dos constituintes do óleo essencial empregando-se CG/EM segundo descrito no item 4.2.8.2. O cromatograma obtido para o óleo essencial encontra-se apresentado na figura 21.

Os resultados obtidos nas análises por CG/EM para avaliação da variação na composição química do óleo essencial extraído a partir da planta fresca (recém-coletada) ou seca e seus respectivos índices de retenção estão apresentados na tabela 12 em ordem crescente de tempo de retenção, sendo que todos os compostos foram identificados não apenas por comparação do índice de Kovats calculado com o da literatura, mas também através dos espectros de massas comparados com o banco de dados das bibliotecas WILEY, NIST 12 e NIST 62, considerando os compostos com índice de similaridade maior ou igual a 85%.

Tabela 12. Teor dos compostos presentes no óleo essencial obtido a partir das partes de *Melampodium divaricatum*

Nº	TR ^a	IK ^b	IK ^c	IS ^d	Composto	Fresca ^e	Seca ^e	AB ^e
1	8,0	1031	1033	90	1,8 cineol	0,01	-	
2	14,9	1206	1204	90	<i>n</i> -decanal	0,01	-	-
3	21,0	1350	1356	92	eugenol	0,05	-	-
4	22,0	1372	1376	90	α -copaeno	0,02	-	-
5	22,3	1379	1384	97	β -bourboneno	0,65	0,59	0,42
6	22,6	1386	1391	97	β -elemeno	1,02	0,96	0,71
7	23,9	1418	1418	96	β -cariofileno	48,59	39,94	51,06
8	24,1	1420	1418	90	β -cedreno	0,07	-	-
9	24,4	1429	1436	95	<i>trans-alfa</i> -bergamoteno	0,44	0,25	0,26
10	24,6	1433	1439	87	aromadendreno	0,04	-	-
11	24,9	1440	1432	83	β -gurjuneno	0,11	-	-
12	25,3	1450	1454	97	α -humuleno	2,17	1,82	1,76
13	25,4	1454	1461	90	alloaromadendreno	0,01	-	0,03
14	26,1	1471	1478	92	α -amorfenos	0,07	0,06	0,08
15	26,4	1477	1480	95	germacreno D	13,18	12,13	10,04
16	26,6	1484	1485	88	β -selineno	0,02	-	0,04

17	26,7	1486	1495	92	ledeno	0,03	-	0,07
18	26,9	1491	1494	95	biciclogermacreno	10,60	8,73	3,13
19	27,1	1494	1499	89	α -muuroleno	0,04	-	0,07
20	27,4	1502	1503	95	germacreno A	0,84	0,62	0,46
21	27,6	1508	1513	86	γ -cadineno	0,04	-	-
22	27,8	1514	1524	93	δ -cadineno	0,11	0,18	0,17
24	29,4	1553	1556	92	germacreno B	0,33	0,32	0,30
	29,6	1559	1565	92	nerolidol	0,31	0,24	0,15
26	30,1	1572	1576	96	espatulenol	0,87	1,62	1,43
27	30,3	1576	1581	96	óxido de cariofileno	3,00	2,28	5,23
28	30,8	1588	1590	86	viridiflorol	0,08	0,10	0,10
29	33,1	1651	1653	85	α -cadinol	1,35	0,28	0,69
30	39,6	1838	1843	93	E,E - farnesil acetato	0,14	0,10	0,12
31	39,9	1840	1845	94	hexahidrofarnesil acetona	0,20	0,13	0,42
32	45,4	2008	2009	91	hexadecil acetato	0,08	0,33	0,18
33	48,6	2109	2116	96	<i>trans</i> -phytol	1,20	0,34	0,66
					Σ identificados Σ não-identificados Σ total	85,79 14,21 100,00	71,11 28,89 100,00	80,68 19,32 100,0

^a tempo de retenção em coluna DB-5; ^b índice de Kovats calculado. ^c índice de Kovats da literatura (ADAMS, 1995); ^d índice de similaridade compara com a biblioteca de dados WILEY 7 NIST 12 e NIST 62; ^e teor (%) dos compostos presentes no óleo essencial obtido pela área dos picos no cromatograma; **Fresca**: partes aéreas recém coletadas; **Secas**: partes aéreas secas em estufa com circulação de ar e aquecimento a 40 °C; **AB**: óleo essencial empregado nas atividades biológicas.

Foi possível verificar que os cinco constituintes majoritários presentes no óleo essencial correspondentes a 82,5% da composição do óleo essencial obtido a partir do material fresco não apresentaram diferença significativa, quanto ao teor no óleo obtido a partir da planta seca em estufa ou fresca, como se observa na figura 20, considerando que o material vegetal foi coletado nas mesmas condições e na mesma data, evitando assim possíveis variações provenientes da época ou horário da coleta.

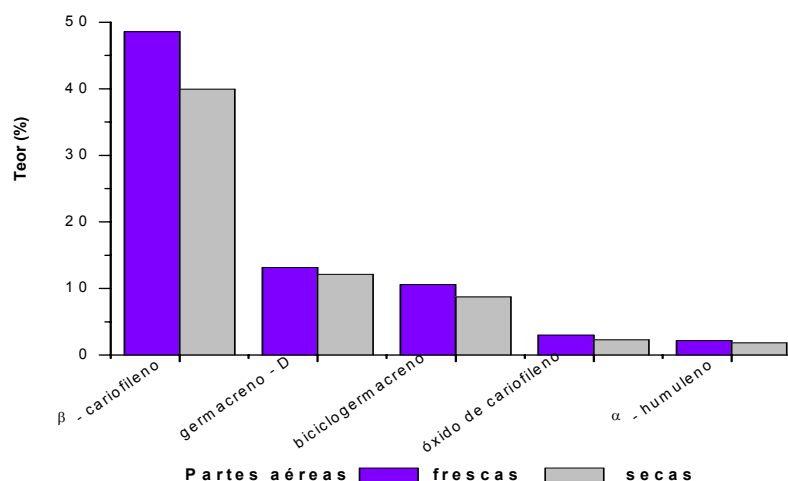


Figura 20. Variação no teor dos constituintes majoritários do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *M. divaricatum* no estado fresco e seco.

Resultado semelhante foi observado por Venskutonis (1997) em estudo com temperatura do ar de secagem de 60 °C, mesmo verificando reduções de 3,4; 3 e 2 vezes nas quantidades de mirceno, limoneno e β -pineno, respectivamente, em comparação com os resultados obtidos com a planta fresca observou que o teor de óxido de cariofileno não apresentou diferença significativa. Com isso concluiu que a redução dos compostos voláteis durante a secagem depende da volatilidade estrutura química dos constituintes da planta.

Outro parâmetro avaliado foi se o rendimento do óleo essencial difere se obtido a partir do material fresco ou seco como descrito no item 4.2.6. Os rendimentos obtidos representam a média de 5 determinações foram $0,17 \pm 0,04\%$ (m/m) para a planta fresca e $0,10 \pm 0,02\%$ para a planta seca. Esta diferença mostrou-se significativa segundo teste-*t* de Student, tendo como nível de significância 0,05%. Portanto, o rendimento do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas frescas é maior que quando obtido a partir da planta seca, mesmo não sendo significativa a diferença dos teores dos 5 principais constituintes presentes no óleo essencial.

Resultados semelhantes foram observados por Deans & Svoboda (1992) que empregaram temperaturas do ar de secagem entre 40 e 100 °C, durante 24 h, para a secagem de manjerona (*Origanum majorana* L.), manjeriço (*Ocimum basilicum*), artemísia (*Artemisia dracunculus*), sálvia (*Salvia officinalis*), satureja (*Satureja hortensis*), tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*), a fim de avaliar a quantidade e a qualidade do óleo essencial.

Concluíram que a quantidade extrativa de óleo essencial foi inversamente proporcional ao aumento da temperatura do ar de secagem. A composição do óleo essencial de manjerona e manjeriço apresentou mudanças significativas, quando a temperatura de secagem atingiu 80 °C, sendo que, em artemísia, sálvia e satureja, essa alteração foi observada apenas quando a temperatura atingiu 50 e 60 °C, enquanto em tomilho e alecrim não foram observadas mudanças significativas no cromatograma do óleo essencial.

Outro estudo realizado com a espécie *Cymbopogon citratus*, popularmente conhecida como capim limão, com o objetivo de avaliar a quantidade e qualidade do óleo essencial obtido a partir do material vegetal quando aquecido a 30, 50, 70 e 90 °C. Os melhores resultados para o rendimento de óleo essencial foram obtidos com a secagem a 50 °C, sendo de 1,43% m/v, apesar de o tratamento a 30 °C ter alcançado 1,34% m/v, não demonstrando diferença significativa, em relação ao anterior.

Entretanto, os autores afirmaram que a secagem em temperatura de 30 °C não é indicada, pois, possibilita o desenvolvimento de fungos. Para os tratamentos de secagem às temperaturas de 70 e 90 °C foram obtidos rendimentos de 1,19 e 1,06% m/v, respectivamente, demonstrando redução significativa no teor de óleo essencial, em relação aos outros tratamentos. Apesar das variações no conteúdo de citral (composto majoritário) não terem sido avaliadas estatisticamente, as variações observadas foram pequenas, sendo de 95,2; 90,6; 91,8 e de 94,6% para os tratamentos de secagem a 30, 50, 70 e 90 °C, respectivamente (BUGGLE et al., 1999).

Diante destes resultados fica evidente que cada espécie deve ser avaliada criteriosamente quanto ao melhor processo de secagem, principalmente se o constituinte de interesse farmacológico for o óleo essencial, por ser extremamente termossensível.

Outro estudo interessante envolvendo a espécie *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf avaliou a velocidade do ar de secagem de 0,5 e 1,0 m s⁻¹, para as temperaturas de 40, 50 e 60 °C, e observaram que o emprego de ar circulante não afetou no teor de óleo essencial extraído e nem a quantidade do seu componente majoritário (citral) (MARTINS, 2000).

Mesmo o óleo essencial obtido a partir do material fresco apresentando um maior rendimento em massa, não foi possível extraí-lo nestas condições pela dificuldade de

obtenção deste material durante o ano todo, pois mesmo sendo uma espécie anual as coletas tinham que ser realizadas em períodos específicos para que não se perdesse, portanto a coleta com posterior secagem possibilitava um armazenamento deste material e extrações contínuas.

A extração do óleo essencial de *M. divaricatum* apresentou um baixo rendimento, o que é comumente verificado em se tratando de óleos essenciais. Rendimentos de óleos essenciais apresentados por Wagner e colaboradores (1984) nos permite concluir que mesmo algumas espécies apresentarem alto rendimento como *Foeniculi fructus* e *Carvi fructus*, cujo rendimento corresponde a 4 mL para cada 100 g do material vegetal, a maioria das espécies apresentam baixo rendimento, variando entre 1 – 0,05 mL para cada 100 g da planta.

A densidade do óleo essencial obtido pela relação massa/volume foi $0,865 \pm 0,035$ g/mL e representa a média de cinco determinações.

O óleo essencial empregado na avaliação das atividades antimicrobiana e imunomoduladora foi obtido das partes aéreas secas de *M. divaricatum* proveniente de diferentes coletas em diferentes períodos do ano de 2006 e armazenados a 4 °C até o momento da utilização. Sendo os compostos presentes nos óleos essenciais extremamente voláteis e passíveis a degradações ocasionadas pelo amplo período de armazenamento, uma alíquota do óleo empregado nos testes foi analisado e sua composição química evidenciada, para que as possíveis atividades biológicas pudessem ser correlacionadas com a composição do óleo essencial empregado. Os compostos e seus respectivos teores encontram-se descritos na tabela 12.

Os constituintes majoritários do óleo essencial obtido das partes aéreas de *M. divaricatum* empregado na avaliação das atividades biológicas são β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, óxido de cariofileno, α -humuleno e espatulenol correspondendo a 74,9% dos constituintes totais do óleo (figura 21). Suas respectivas estruturas ilustradas na figura 22.

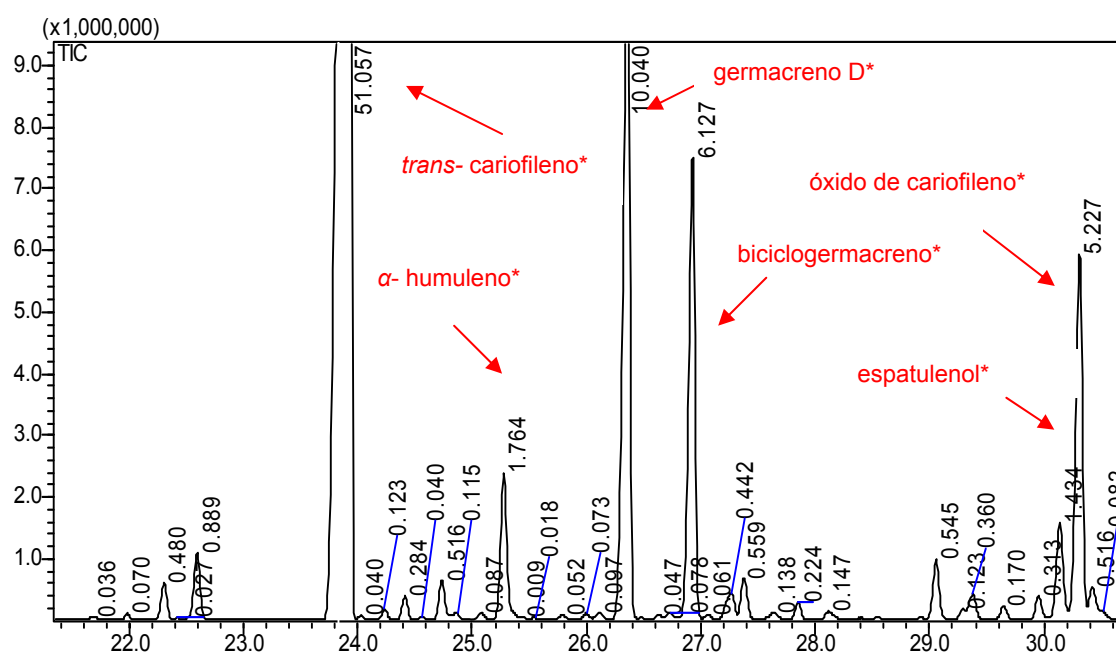


Figura 21. Cromatograma do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas secas *Melampodium divaricatum* empregado na avaliação das atividades biológicas. Condições cromatográficas: cromatógrafo a gás acoplado ao espectrofotômetro de massas: Shimadzu modelo QP2010; coluna: DB-5MS; gás de arraste: hélio; fluxo: 1,33 mL/min.; temperatura do injetor: 240 °C; tempo total de análise: 75 min.

* constituintes majoritários do óleo essencial empregado nas atividades biológicas.

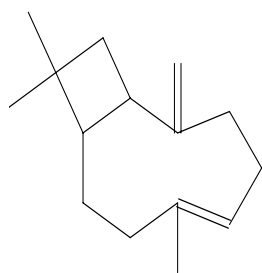
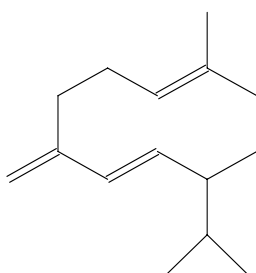
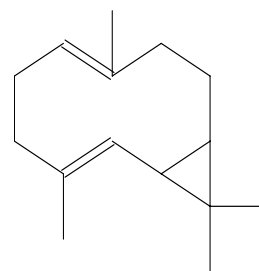
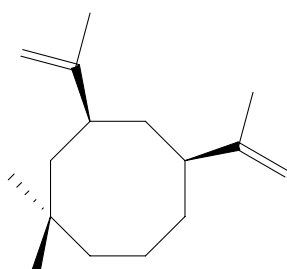
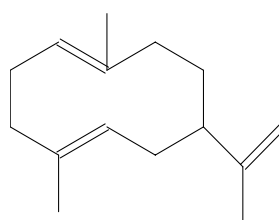
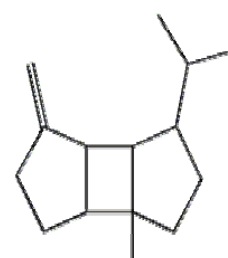
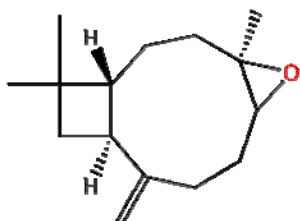
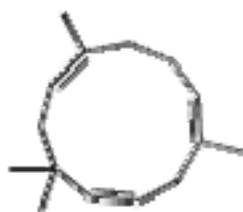
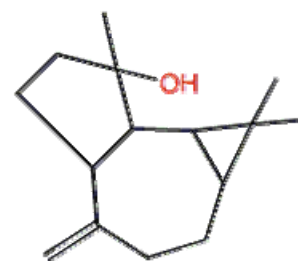
 **β -cariofileno****germacreno-D****bicliclogermacreno** **β -elemeno****germacreno-A** **β -bourboneno****óxido de cariofileno** **α -humuleno****espatulenol**

Figura 22. Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial das partes aéreas de *Melampodium divaricatum*.

Diante dos dados aqui apresentados, torna-se evidente que, além da importância dos estudos de adulterações e contaminações, existe a necessidade de uma análise química detalhada de plantas destinadas ao uso terapêutico. Sabendo-se dos inúmeros fatores que podem acarretar variações no conteúdo de metabólitos secundários, fica clara a necessidade de estudos visando detectar as condições e épocas para cultivo e/ou coleta que conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis de princípios

ativos. Também se faz necessário um rigoroso controle de qualidade realizado por meio de técnicas analíticas modernas, para garantir constância na composição de metabólitos secundários pensando no desenvolvimento de um fitoterápico. Além disso, o reconhecimento e a compreensão dessas variações poderão, no futuro, auxiliar na ampliação dos conhecimentos sobre interações ecológicas do vegetal com seu ambiente.

Paralelamente ao controle de qualidade do material vegetal, foram desenvolvidos testes biológicos, visto que esta espécie é amplamente empregada na medicina popular e segundo a triagem fitoquímica e perfis cromatográficos a espécie *M. divaricatum* possui metabólitos com possíveis atividades antimicrobiana e imunomoduladora, justificando assim os testes realizados.

5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

As doenças infecciosas representam um grave e crescente problema de saúde mundial. Mudanças contínuas de hábitos sociais, avanços tecnológicos e alterações relacionadas aos próprios microrganismos têm contribuído, simultaneamente, para o surgimento de novas doenças e para o reaparecimento de doenças antes controladas. Muitos dos microrganismos que causam danos à saúde humana possuem resistência à drogas pelo uso inadequado dos antibióticos, logo há a necessidade de se encontrar novas substâncias que possam combatê-los (SARTORATTO et al., 2004).

Assim, estudou-se a influência dos óleos essenciais e extratos brutos (EA, EH e EE) de *M. divaricatum* sobre o crescimento bacteriano de cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*, bactérias potencialmente patogênicas ao homem e tidas como agentes responsáveis por quadros infecciosos comuns.

Os resultados estão apresentados como a média $\pm$ desvio-padrão (DP) e de acordo com os diâmetros dos halos observados, a atividade antimicrobiana foi classificada para facilitar a discussão como: ausente, para halos com diâmetros inferiores a 8 mm ou semelhante ao observado para os respectivos controles negativos, leve para halos com diâmetros superiores à 8 mm, mas bem inferiores ao observado para o controle positivo (ampicilina), considerando diferenças maiores que 2 e menores que 4 mm, moderada quando o diâmetro de inibição foi inferior ao do antibiótico, porém com diferenças inferiores ou iguais a 2 mm. A atividade antimicrobiana foi considerada boa quando o halo de inibição observado foi igual ou superior ao observado para a ampicilina.

5.3.1 Atividade antibacteriana do óleo essencial

Diante das características apolares do óleo essencial o que dificulta sua difusão pelo agar, dois métodos de difusão foram testados com o objetivo de avaliar qual a metodologia adequada para o óleo essencial em questão, com maior reprodutibilidade de resultados para as cepas analisadas.

Seguindo a classificação proposta, o óleo essencial inibiu fortemente o crescimento das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e de forma moderada as bactérias *Serratia marcescens* e *Shigella sonnei*, mostrando sua maior atividade contra bactérias Gram-positivas conforme apresentado na tabela 13.

Tabela 13. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* pelo método de difusão em ágar.

MICRORGANISMOS TESTADOS	DISCO				TEMPLATE			
	A	OP	OT	CT	A	OP	OT	CT
<i>Staphylococcus aureus</i>	27 ± 3	18 ± 4	25 ± 3	-	27 ± 3	11 ± 2	11,0 ± 0	-
<i>Bacillus subtilis</i>	12 ± 2	17 ± 3	20 ± 2	-	12 ± 3	12 ± 2	11 ± 1	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11 ± 1	-	-	-	14 ± 2	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	10 ± 1	-	-	-	15 ± 2	-	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	10 ± 1	-	-	-	11 ± 2	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	10 ± 1	-	-	-	12 ± 1	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	10 ± 1	-	-	-	12 ± 2	-	-	-

Os halos representam a média ± desvio padrão de 3 determinações em mm. **A:** Ampicilina; **OP:** Óleo essencial puro; **OT:** Óleo essencial com adição de Polissorbato 80 (0,5%); **CT:** controle - água e polissorbato 80 (0,5%); - : ausência de atividade (halos ≤ 7mm).

Das metodologias testadas para difusão do óleo essencial, a difusão empregando-se discos mostrou-se mais efetiva e o uso do emulsificador polissorbato 80 facilitou a difusão do óleo essencial, os halos obtidos apresentaram-se maiores, como apresentado na tabela 8.

Através da metodologia de difusão em disco o óleo essencial na presença do agente emulsificador mostrou-se tão ativo quanto à ampicilina contra *S. aureus* e contra *B. subtilis*; tanto o óleo essencial puro quanto na presença de Polissorbato apresentou maior atividade do que a ampicilina, o que demonstra que o óleo essencial pode ter uma boa aplicabilidade farmacológica visto a necessidade de novos compostos ativos contra esse tipo de bactéria.

Resultados semelhantes foram observados em estudo realizado por Cimanga e colaboradores (2002), onde se avaliou a atividade antimicrobiana de algumas espécies aromáticas da República do Congo buscando correlacionar a composição química destes óleos com a atividade antimicrobiana evidenciada. Os resultados indicaram que a atividade antimicrobiana varia bastante de acordo com a espécie em estudo e de forma geral o óleo essencial foi ativo apenas contra os microrganismos Gram-positivos e a atividade mostrou-se bem específica contra *S. aureus* e *B. subtilis*. Os demais microrganismos mostraram-se resistentes.

O estudo realizado com o óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *Cordia verbenacea*, popularmente conhecida como erva-baleeira, cujos compostos majoritários são α -pineno, β -cariofileno e aloaromadendreno apresentou um espectro de ação semelhante ao observado para o óleo essencial de *M. divaricatum*, onde as bactérias mais sensíveis foram as Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*) e as Gram-negativas mostraram-se resistentes ao óleo essencial. Essa similaridade nos resultados possivelmente está relacionada à composição química do óleo essencial. O β -cariofileno presente em grande concentração no óleo da *C. verbenaceae* é a substância majoritária do óleo essencial de *M. divaricatum* e os outros dois compostos encontram-se também presentes entre os majoritários (SHIMIZU et al., 2004).

Em estudos realizados com o óleo essencial de *Baccharis notoserigila* também da família Asteraceae e cujos principais componentes incluem α -pineno, limoneno, β -cariofileno e espatulenol foi detectada atividade antibacteriana discreta tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (COBOS et al., 2001). Sendo o β -cariofileno o composto majoritário do óleo essencial estudado e a presença de α -pineno e espatulenol dentre outros no óleo essencial em estudo possivelmente a presença desses compostos tenha contribuído para os efeitos antimicrobianos observados.

De forma geral os terpenos são ativos contra bactérias (TAYLOR ET AL., 1996; BARRE ET AL., 1997; MENDOZA ET AL., 1997; AMARAL ET AL., 1998). Em 1977 um

estudo realizado por Chaurasia & Vyas testou um amplo número de espécies aromáticas contra diversas bactérias e fungos e demonstrou que 60% dos óleos essenciais foram ativos contra fungos e 30% contra bactérias.

Os resultados obtidos frente às diferentes espécies bacterianas variam bastante na maioria das vezes (OHNO et al., 2003) graças à infinidade de compostos que estão presentes e sua variabilidade entre as espécies vegetais.

Portanto, possivelmente a atividade antimicrobiana evidenciada em nosso estudo está relacionada à presença destes três constituintes químicos, bem como aos outros também com potencial antimicrobiano relatado.

Embora com discrepâncias nos espectros de atividade e potência, efeitos antimicrobianos de óleos essenciais têm sido relatados. Por exemplo, SHIMIZU e colaboradores (2004) demonstraram que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à sua ação inibitória sobre o crescimento, em contraste com Deans & Ritchie (1987), os quais não encontraram diferenças de ação sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Vários fatores podem contribuir para estas diferenças, como a volatilidade e a pobre solubilidade da maioria dos óleos essenciais, principalmente quando se utiliza métodos de difusão ou diluição dessas misturas em meio microbiológico geralmente de natureza aquosa. Diferenças na composição dos óleos como já citado, assim como no processamento das amostras, também podem influenciar as propriedades antimicrobianas, uma vez que se relacionam com o perfil e concentração de ativos (DELAQUIS et al., 2002), e pouco se sabe sobre os efeitos de interações entre constituintes individuais, considerando que estas podem acarretar efeitos aditivos, sinérgicos ou mesmo antagonistas (DAVIDSON & PARISH, 1989).

A ação antimicrobiana de óleos essenciais é ocasionada por efeitos tóxicos à estrutura e função da membrana do microrganismo (ANDREWS et al., 1980; URIBE et al., 1985; KNOBLOCH et al., 1988). Em muitos casos, tem-se indicado que sua atividade é devido à presença de monoterpenos (BEYLIER, 1979; KNOBLOCH et al., 1988; MORRIS et al., 1979), que parecem exercer danos à membrana (SIKKEMA et al., 1995); seu caráter lipofílico causa partição de suas estruturas, resultando em expansão, aumento de fluidez e inibição de enzimas (SIKKEMA et al., 1994).

Análises estruturais por microscopia eletrônica demonstram que bactérias quando em contato com constituintes comuns aos óleos essenciais reduz fortemente a insaturação e aumenta a saturação dos ácidos graxos, alterando completamente a estrutura celular bacteriana (DI PASQUA et al., 2006).

Em estudo realizado por Florão (2006) foi observada inibição similar do óleo essencial de *Baccharis* frente à bactéria *S. aureus*, cuja composição química inclui

limoneno, linalool, α -terpineol, β -elemeno, β -cariofileno, epi β -santaleno, γ -gurjuneno, γ -muuroleno, biciclogermacreno, α -muuruleno, γ -cadineno, δ -cadineno, α -calacoreno, ledol e espatulenol composição esta semelhante ao óleo essencial em estudo e provavelmente responsável pela atividade antibacteriana observada.

5.3.2 Atividade antibacteriana dos extratos brutos

Avaliou-se também a atividade antibacteriana dos extratos aquosos e etanólicos. Os halos de inibição observados estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Atividade antibacteriana dos extratos obtidos a partir das partes aéreas de *Melampodium divaricatum* pelo método de difusão em ágar.

MICROORGANISMOS TESTADOS	TEMPLATE				
	C+	EA	EH	EE	C-
<i>Staphylococcus aureus</i>	27 $\pm$ 3	11 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	-
<i>Bacillus subtilis</i>	12 $\pm$ 3	12 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	-	10 $\pm$ 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14 $\pm$ 2	9 $\pm$ 0	10 $\pm$ 1	10 $\pm$ 0	9 $\pm$ 1
<i>Escherichia coli</i>	15 $\pm$ 2	-	-	-	10 $\pm$ 1
<i>Serratia marcescens</i>	11 $\pm$ 2	12 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	-
<i>Shigella sonnei</i>	12 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1	-	11 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1
<i>Proteus mirabilis</i>	12 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2	11 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1

Os halos representam a média $\pm$ desvio padrão de 3 determinações em mm.

C+: Ampicilina; **EA:** extrato aquoso; **EH:** extrato hidroetanólico 70% (v/v); **EE:** extrato etanólico 98,5%; **C-:** solução aquosa de DMSO na proporção (1:1); (-): sem atividade.

O controle negativo foi obtido a partir da aplicação de uma solução de aquosa de DMSO na mesma proporção utilizada na solubilização dos extratos etanólicos, como o extrato aquoso foi ressuspensionado apenas em água não foi empregado controle.

De forma geral a atividade antibacteriana foi classificada em leve, moderada e boa como descrito no item 4.2.9.1.3 e para os extratos etanólicos, cuja solubilização foi realizada em solução de DMSO (1:1) os halos obtidos para o controle negativo foram considerados na interpretação dos resultados obtidos. Nos casos em que o halo observado pelo extrato foi inferior a 8 mm ou idêntico ao observado para o controle considerou-se como ausência de inibição.

Para o extrato aquoso obtido por decocção não foi considerado o valor do controle, pois foi diluído em água, portanto o extrato mostrou-se ativo contra todas as bactérias testadas tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas. Sua atividade foi leve contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, moderada contra *S. sonnei* e *P. mirabilis* e boa contra *B. subtilis* e *S. marcescens*.

O extrato hidroetanólico 70% (v/v) não apresentou nenhuma inibição classificada como boa, apresentando atividades moderadas para o *B. subtilis*, *S. marcescens* e *P. mirabilis*, leve contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* e ausência de atividade contra *E. coli* e *S. sonnei*.

Quanto ao extrato etanólico 98,5% também não houve nenhuma atividade considerada boa, mas moderada contra *S. marcescens*, *S. sonnei* e *P. mirabilis* e leve contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Contra *E. coli* e *B. subtilis* não apresentou atividade antimicrobiana.

Como na triagem fitoquímica foi detectada apenas a presença de flavonóides nas partes aéreas de *M. divaricatum*, classe esta identificada na espécie em estudo realizado por Bohm & Stuessy (1991) possivelmente a atividade antibacteriana evidenciada em nosso estudo estar relacionadas à presença desta classe de metabólito nos extratos.

Desde que ficou conhecido que os flavonóides são sintetizados pelas plantas em resposta a infecções por microrganismos não poderia deixar de ser confirmado *in vitro* por diversos estudos seu potencial antimicrobiano frente a uma ampla variedade de microrganismos (DIXON et al., 1983). Diversos são os mecanismos de ação propostos e já identificados dos flavonóides na célula bacteriana. Um deles se dá pela habilidade de complexação com proteínas extracelulares e solúveis bem como com a parede celular que os flavonóides apresentam assim como as quinonas. Os flavonóides lipofílicos podem também destruir a membrana da bactéria (TSUCHIYA et al., 1996). Um outro mecanismo também já caracterizado é a inativação de enzimas essenciais aos microrganismos (TANIGUCHI & KUBO, 1993).

Um estudo avaliou a atividade de 38 flavonóides contra bactérias resistente a antibióticos e verificou que os flavonóis (classe de flavonóides) apresentaram-se mais ativos contra as bactérias testadas e os mais ativos foram a miricetina, canferol e quercetina (XU & LEE, 2001). Diante da potente atividade da miricetina, este estudo buscou evidenciar o mecanismo de ação deste favonol e verificou que este composto atua na síntese protéica das bactérias, possivelmente os demais flavonóis mesmo não apresentando-se tão eficazes atuem pelo mesmo mecanismo.

O mesmo estudo buscou correlacionar a estrutura química destes flavonóides com sua maior ou menor atividade antimicrobiana e verificou que determinadas características moleculares estão relacionadas à atividade. Os flavonóides mais ativos foram os poliidroxilados (miricetina, datiscetina, quercetina, luteolina e canferol) que apresentavam em comum hidroxilas ligadas aos carbonos 3, 4, 5 e 7 (C-3; C-4; C-5 e C-7) e pelo menos uma hidroxila ligada ao anel B. Os flavonóides que não apresentam nenhuma hidroxila no anel B (pinocembrina galangina) ou então um substituinte como um grupo metil (canferida e tamarixetina) não apresentaram nenhuma atividade, o que enfatiza a importância desta hidroxila no anel B para que se tenha atividade antimicrobiana. Esses resultados indicam que quanto maior a hidrossolubilidade dos flavonóides mais ativos são contra os microrganismos (XU & LEE, 2001).

No presente estudo os extratos apresentaram uma leve atividade antibacteriana contra a maioria das bactérias testadas e o extrato aquoso foi o que demonstrou uma maior atividade, apresentando halo de inibição até mesmo contra *E. coli* e *P. aeruginosa*. As bactérias mais sensíveis aos extratos foram *B. subtilis*, *S. marcescens*, uma Gram-positiva e outra Gram-negativa. Isso nos permite afirmar que os extratos apresentaram uma atividade mais ampla do que o óleo essencial que não apresentou atividade contra nenhuma bactéria Gram-negativa. Por outro lado os extratos não se mostraram ativos contra *S. aureus*, enquanto que o óleo essencial apresentou uma boa atividade contra esta bactéria.

5.4 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

O sistema imunológico é um sistema complexo de defesa do organismo. A pesquisa básica dos compostos naturais com propriedades imunomoduladoras pode ser feita através de ensaios de estimulação da imunidade inespecífica, como, por exemplo, a eficiência dos granulócitos, macrófagos, sistema complemento, células *natural killer* (NK) e seus efeitos sobre a fagocitose, proliferação linfocitária, migração de linfócitos T, ativação de macrófagos dentre outros. Outras pesquisas incluem a produção de citocinas pelos macrófagos, como, por exemplo, o TNF- α (WILLIAMS, 2001).

Tem sido muito bem reportado que muitas substâncias derivadas de plantas apresentam efeito antiinflamatório significativo. Portanto, são moléculas potenciais para o desenvolvimento de novos medicamentos, especialmente designados para o tratamento e/ou controle de inflamações crônicas como reumatismo, asma, arteriosclerose dentre outras. Diversas classes de metabólitos são descritas como os responsáveis pela atividade antiinflamatória de extratos vegetais, dentre eles os compostos fenólicos, principalmente os flavonóides; lignanas, terpenos e alcalóides (CALIXTO et al., 2004).

As propriedades imunomodulatórias de muitos extratos de plantas têm sido amplamente descritas, especialmente quanto às atividades inibitórias da produção de óxido nítrico e citocinas, como o TNF- α , por macrófagos (RIMBACH et al., 2000; RYU, 2003a; FERREIRA et al., 2003; RYU et al., 2003b). Visto que assim como acontece com qualquer molécula mensageira, qualquer alteração nos níveis de concentração endógena tanto deficiência quanto excesso, pode ser a causa de vários processos fisiopatológicos. Nesse sentido, emergem duas abordagens terapêuticas distintas para o tratamento destas doenças. No caso da superprodução, a utilização de inibidores que podem diminuir a biodisponibilidade, enquanto que, na falta, o uso de doadores ou estimulantes da produção para então elevá-la (CORREIA et al., 2005).

Nesse trabalho, portanto um dos objetivos foi avaliar o potencial imunomodulador do óleo essencial, extrato aquoso, hidroetanólico e 70% de *M. divaricatum*, ou seja, a possível ação dos compostos químicos presentes nos extratos dessa espécie nos macrófagos presentes nas células do exsudato peritoneal através da liberação de NO, H₂O₂ e TNF- α .

Uma importante etapa desse trabalho, que antecedeu os ensaios imunológicos, foram os ensaios de citotoxicidade dos extratos de frente os macrófagos presentes nas CEP murino. A técnica escolhida foi o teste colorimétrico MTT, proposto por Mosmann (1983) que vem sendo amplamente empregado nas avaliações de citotoxicidade de produtos naturais.

A escolha das concentrações testadas baseou-se em outros trabalhos em que não se observou citotoxicidade representativa, tendo-se 50 e 75% de células viáveis (MEHROTRA et al., 2003). Com base nos resultados dos ensaios de citotoxicidade fornecidos, foram determinadas as concentrações a serem utilizadas, para cada extrato testado, as quais estão apresentadas na tabela 15.

Uma vez que as células são retiradas de seu ambiente natural *in vivo* e entram em contato com os compostos a serem testados a questão da viabilidade é fundamental principalmente frente às substâncias teste, assegurando dessa forma que as células conseguiram responder aos vários estímulos, quaisquer que sejam eles (FRESHENEY, 1994).

Como os extratos e o óleo essencial apresentaram dificuldades de solubilização no meio de cultura empregado nos testes, fez-se necessário à solubilização em DMSO. A escolha da concentração empregada na solubilização foi feita tendo como referência um estudo realizado por (LOPES, 2004) que avaliou a viabilidade celular de células aderentes na presença de DMSO. Foi verificado que o DMSO na concentração de 10% é altamente citotóxico, onde apenas 21,92% das células aderentes permaneceram viáveis. Porém, em baixas concentrações (2%) 99,89% das células permaneceram viáveis.

Mesmo diante da possibilidade do uso de 2% de DMSO sem afetar na viabilidade, pela facilidade de solubilização dos compostos o extrato aquoso foi ressuspensão apenas no meio de cultura RPMI, os extratos hidroetanólico 70% e etanólico 98,5% foram empregados dissolvidos no meio com a adição de 0,5% de DMSO e o óleo essencial com 0,25%.

Os valores de citotoxicidade obtidos para os extratos e óleo essencial demonstram que o potencial citotóxico em cultura de CEP é dependente da concentração, ou seja, a viabilidade celular diminuiu com o aumento da concentração.

Através das equações de reta obtidas com um índice de correlação sempre superiores a 0,95, foi possível estimar em quais concentrações dos compostos tem-se 50 e 75% de células viáveis e a partir destas concentrações foram realizados os demais testes.

A viabilidade das células na presença do óleo essencial nas concentrações de 0,0156 $\mu\text{L/mL}$ a 0,125 $\mu\text{L/mL}$ variou entre 14,99 % $\pm$ 0,07% e 92,69 $\pm$ 1,01% como apresentado na figura 23.

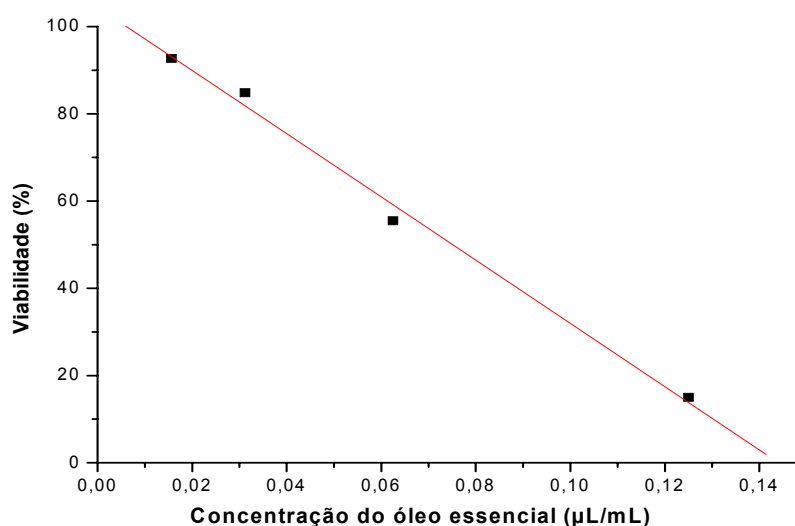


Figura 23. Viabilidade das células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do óleo essencial de *Melampodium divaricatum*.

As concentrações correspondentes a presença de 50% de células viáveis (IC_{50}) e 75% de células viáveis (IC_{25}) para o óleo essencial foram respectivamente: 0,075 $\mu\text{L/mL}$ e 0,040 $\mu\text{L/mL}$.

Para o extrato aquoso a viabilidade das CEP na presença do extrato nas concentrações entre 0,78 mg/mL a 12,50 mg/mL variou entre $17,13 \pm 0,58\%$ e $69,24 \pm 3,87\%$ como apresentado na figura 24.

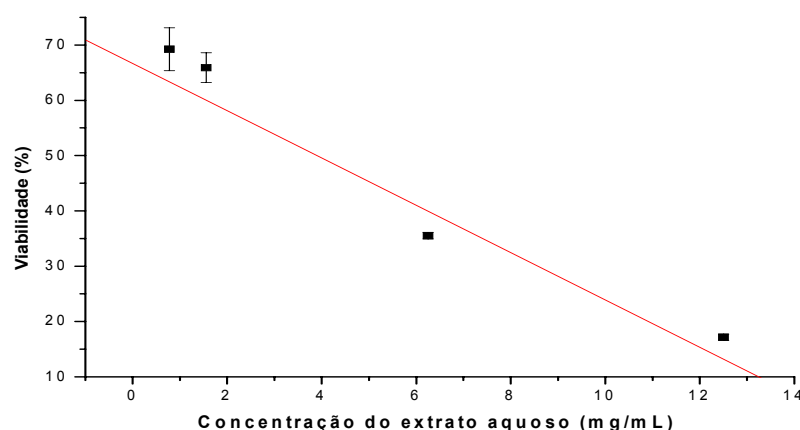


Figura 24. Viabilidade das células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de partes aéreas de *Melampodium divaricatum*.

As concentrações correspondentes ao IC_{50} e ao IC_{25} para o extrato aquoso obtido a partir da equação de reta foram respectivamente: 3,90 mg/mL e 1,95 mg/mL.

As figuras 25 apresenta a viabilidade das CEP quando na presença do extrato hidroetanólico 70% (v/v), nas concentrações de 0,05 mg/mL a 1,50 mg/mL. A viabilidade variou de $9,95 \pm 0,56\%$ a $87,05 \pm 3,22\%$.

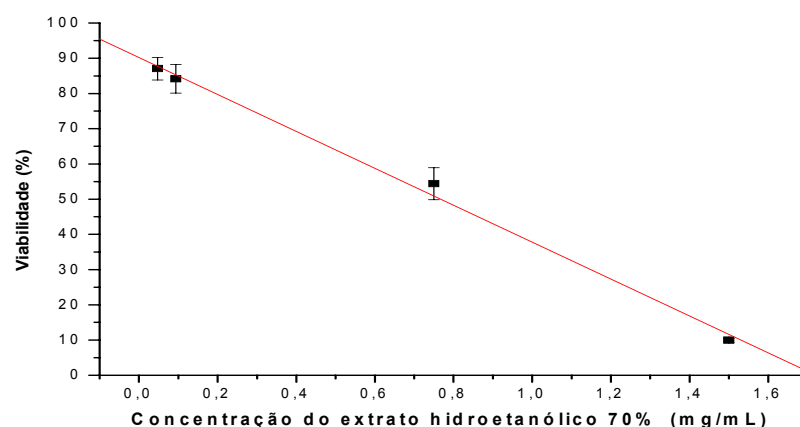


Figura 25. Viabilidade das células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato hidroetanólico 70% (v/v) de partes aéreas de *Melampodium divaricatum*.

Para o extrato etanólico 98,5% a viabilidade celular variou de $7,32 \pm 0,04\%$ a $86,59 \pm 1,37\%$ nas concentrações entre 0,01 e 3,00 mg/mL.

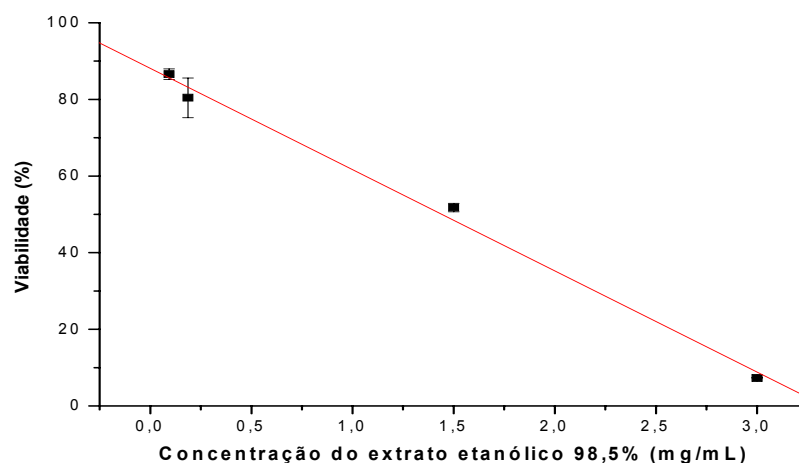


Figura 26. Viabilidade de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico de partes aéreas de *Melampodium divaricatum*.

Segundo as equações de reta as concentrações correspondentes ao IC₅₀ e ao IC₂₅ respectivamente para o extrato hidroetanólico 70% foram 0,77 mg/mL e 0,30 mg/mL. Já para o extrato etanólico 98,5% as concentrações foram 1,44 mg/mL e 0,50 mg/mL para IC₅₀ e IC₂₅ respectivamente.

A liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, como H₂O₂ e NO foi avaliada através da exposição de CEP de camundongos, dentre elas os macrófagos aos compostos (extratos e óleo essencial) nas concentrações previamente determinadas pelo teste de citotoxicidade. As concentrações testadas encontram-se apresentadas na tabela 15.

Tabela 15. Valores de IC₅₀ e IC₂₅ dos macrófagos obtidos das células do exsudato peritoneal para os extratos de *Melampodium divaricatum*

Extratos	IC ₅₀ ^a	IC ₂₅ ^a
Óleo essencial ^a	0,075	0,040
Extrato aquoso ^b	3,90	1,95
Extrato hidroetanólico 70% ^b	0,77	0,30
Extrato etanólico 98,5% ^b	1,44	0,50

* Valores correspondentes a 50% (IC₅₀) e 75% (IC₂₅) de células viáveis, determinados por uma curva dose-resposta e expressos em: ^a µL/mL; ^b mg/mL.

Diante dos resultados de viabilidade celular é possível afirmar que o óleo essencial apresentou uma toxicidade elevada frente às células do exsudato peritoneal, possivelmente

pela presença de óxido de cariofileno, substância conhecida pelo potencial citotóxico (VEIGA JR. et al., 2007).

5.4.1 Avaliação da estimulação de CEP

5.4.1.1 Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

Em poucos anos o óxido nítrico passou a ser conhecido não apenas como um gás tóxico e poluente, mas também como uma molécula de vital importância, envolvida na fisiologia e fisiopatologia de microrganismos, plantas e organismos superiores. A cada dia, são descobertos novos papéis fisiológicos para o NO e já existem indícios de sua participação em distúrbios de ansiedade, tais como a depressão e o pânico (ZORZETTO, 2003).

O método de escolha para a determinação da produção de NO pelas CEP foi o de Griess, por consistir em uma técnica relativamente simples, eficiente e bem documentada (MARQUES, 2002). O princípio do método envolve a degradação oxidativa do NO em solução aquosa, formando nitrito (NO_2^-) que é determinado pelo reagente de Griess, que reage primeiramente com a sulfanilamida (reação de diazotização) em meio ácido, formando um composto intermediário que reage com o naftiletilenodiamino formando um derivado azo colorido prontamente monitorado em espectroscopia de UV/visível com absorbância máxima de 548 nm em pH 2,0. O meio ácido favorece a reação de diazotização, melhorando a leitura espectrofotométrica (MARQUES, 2002).

Tanto o óleo essencial quanto os extratos aquoso e etanólicos de *M. divaricatum*, nas concentrações testadas não induziu a produção de NO conforme apresentado nas figuras 27-30.

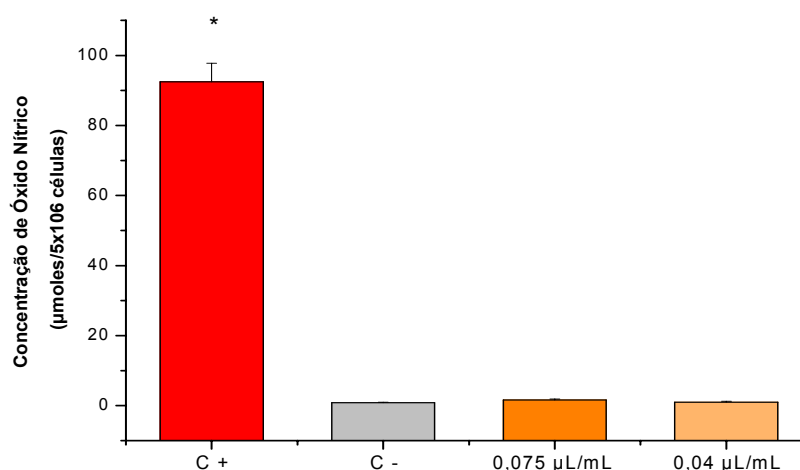


Figura 27. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do óleo essencial de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + lipopolissacarídeo de *E. coli*); C- (controle negativo, células em RPMI-1640); Os resultados foram expressos em micromols de NO/ 5x10⁶ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (p<0,01).

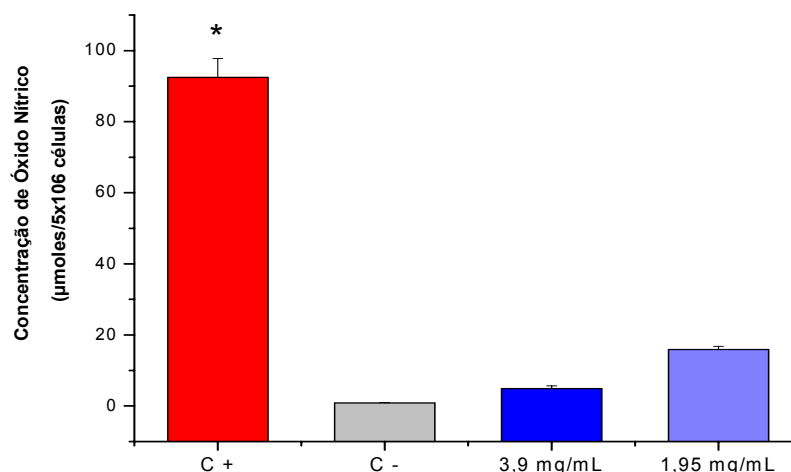


Figura 28. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato aquoso de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + lipopolissacarídeo de *E. coli*); C- (controle negativo, células em RPMI-1640); Os resultados foram expressos em micromols de NO/ 5x10⁶ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (p<0,01).

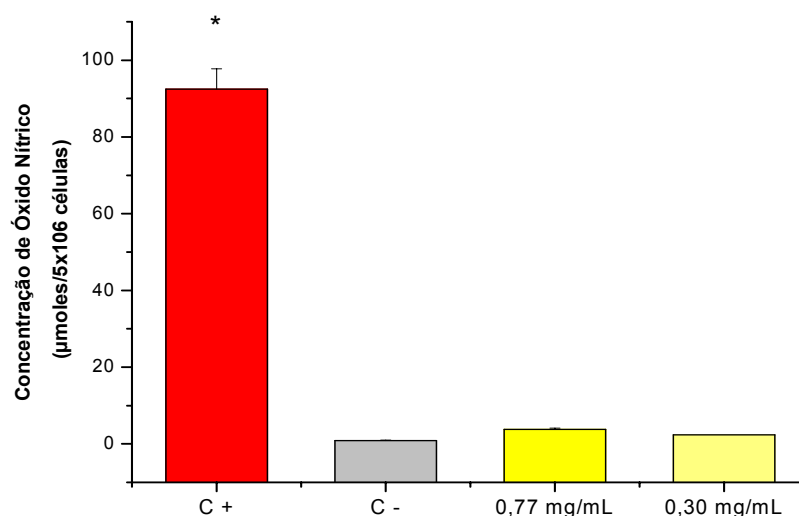


Figura 29. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato hidroetanólico 70% (v/v) de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + lipopolissacarídeo de *E. coli*); C- (controle negativo, células em RPMI-1640); Os resultados foram expressos em micromols de NO/5x10⁶ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (p<0,01).

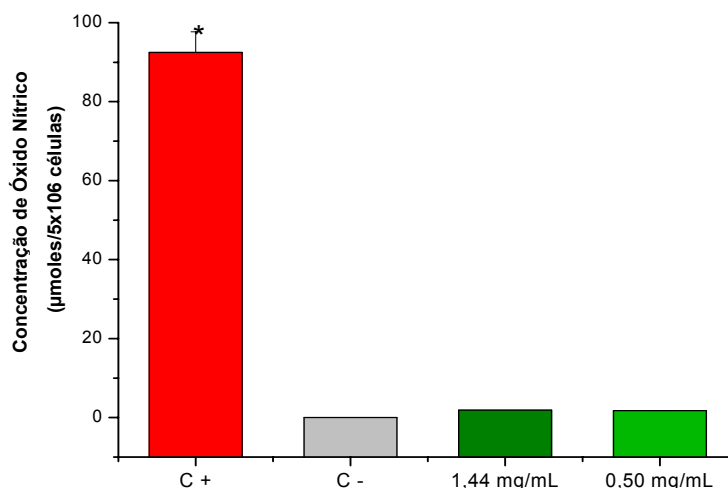


Figura 30. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico 98,5% de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + lipopolissacarídeo de *E. coli*); C- (controle negativo, células em RPMI-1640); Os resultados foram expressos em micromols de NO/5x10⁶ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (p<0,01).

Solução de lipopolissacarídeo de *E. coli* foi utilizada como controle positivo e apenas células em meio de cultura (RPMI – 1640) como controle negativo, visto que os macrófagos podem ser estimulados por citocinas e por componentes microbianos como o LPS (ADAMS & HAMILTON, 1984).

Os resultados, tanto do óleo essencial como dos extratos, permite concluir que nas concentrações testadas os compostos não estimularam significativamente a produção de NO pelas CEP (figura 31).

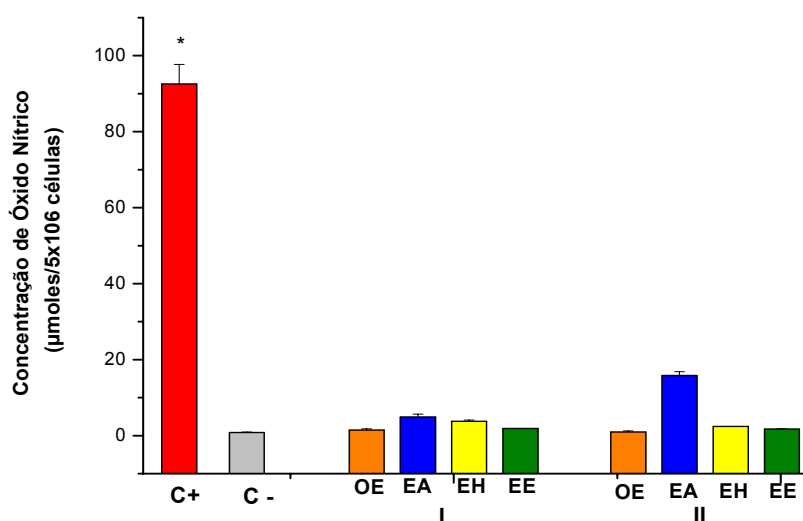


Figura 31. Produção de óxido nítrico (NO) em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de diferentes concentrações dos extratos de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + lipopolissacarídeo de *E. coli*); C- (controle negativo, células em RPMI-1640); OE: óleo essencial; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroetanólico 70%; EE: extrato etanólico 98,5%. I: (concentração correspondente ao IC₅₀) e II (concentração correspondente ao IC₂₅). Os resultados foram expressos em micromols de NO/5x10⁶ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (p<0,01).

5.4.1.2 Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Os extratos etanólicos e o óleo essencial de *M. divaricatum*, nas concentrações testadas não induziram a liberação de H₂O₂, conforme apresentado nas figuras 32, 34 e 35, porém o extrato aquoso induziu significativamente a liberação de peróxido de hidrogênio como apresentado na figura 33.

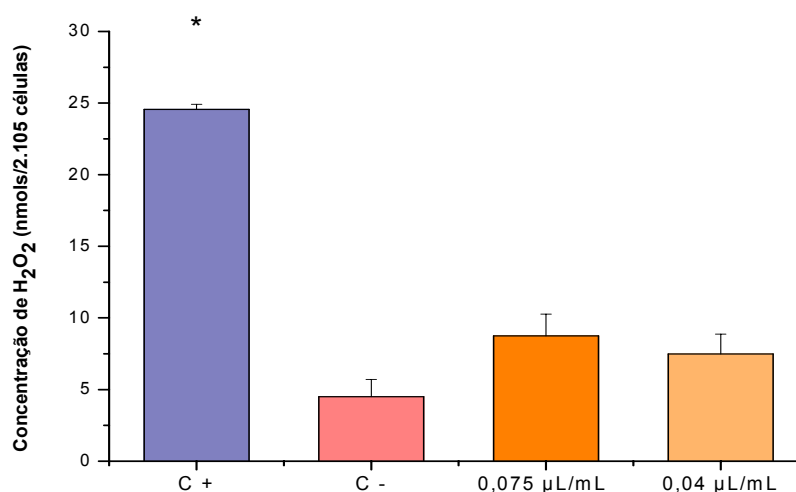


Figura 32. Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em cultura de células do exsudato peritoneal estimuladas com óleo essencial de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + PMA); C- (controle negativo, células em RPMI-1640). Os resultados foram expressos em nanomols de $H_2O_2/2 \times 10^5$ células, como a média $\pm$ desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo ($p < 0,01$).

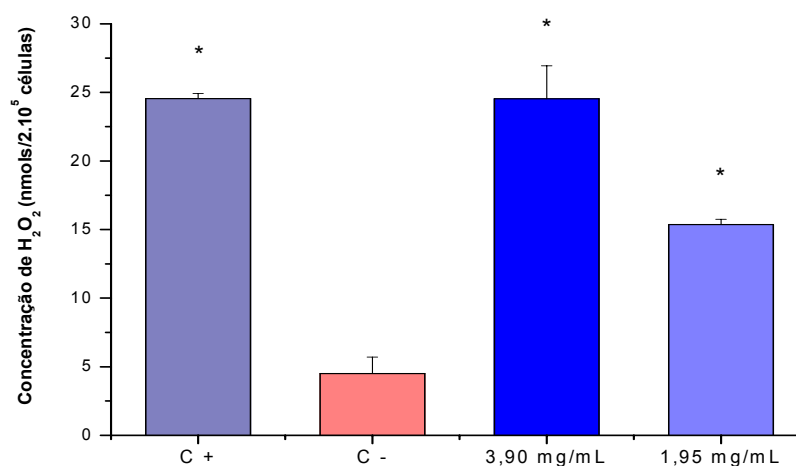


Figura 33. Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas com extrato aquoso de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + PMA); C- (controle negativo, células em RPMI-1640). Os resultados foram expressos em nanomols de $H_2O_2/2 \times 10^5$ células, como a média $\pm$ desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo ($p < 0,01$).

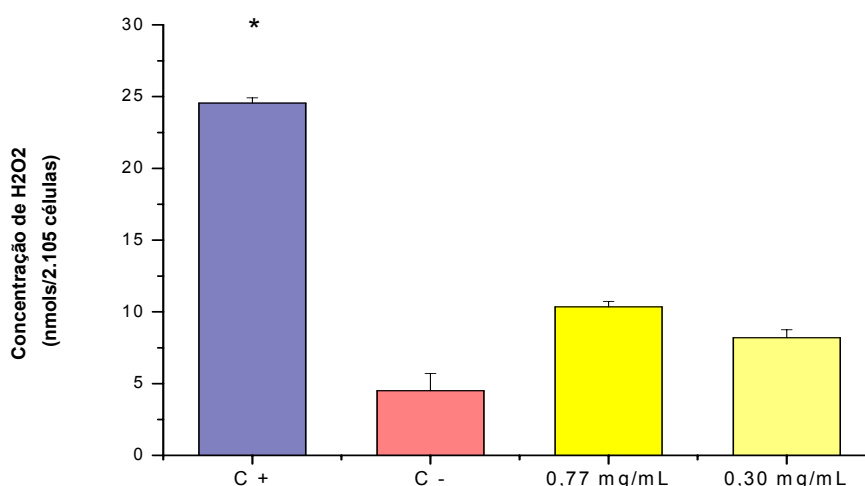


Figura 34. Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas com extrato hidroetanólico 70% (v/v) de partes aéreas de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + PMA); C- (controle negativo, células em RPMI-1640). Os resultados foram expressos em nanomols de H₂O₂/2x10⁵ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (p<0,01).

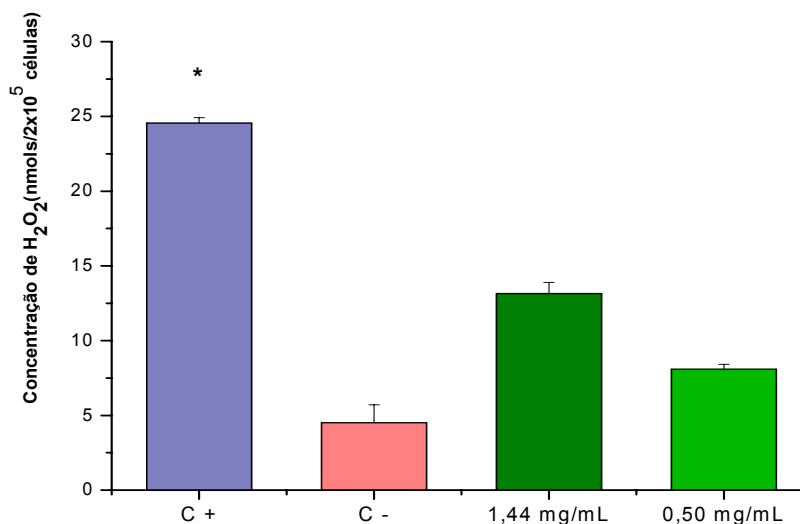


Figura 35. Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas com extrato etanólico 98,5% de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + PMA); C- (controle negativo, células em RPMI-1640). Os resultados foram expressos em nanomols de H₂O₂/2x10⁵ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo (p<0,01).

Solução de PMA (PMA - Forbol Miristato Acetato) foi utilizada como controle positivo células em meio de cultura (RPMI – 1640) como controle negativo.

Os resultados obtidos evidenciam que nas concentrações testadas os extratos etanólicos e o óleo essencial não estimulam a liberação de H_2O_2 . Porém, o extrato aquoso promoveu a liberação significativa ($p<0,01$) de H_2O_2 . Possivelmente esta atividade foi promovida por algum constituinte químico ausente nos extratos etanólicos e no óleo essencial, ou até mesmo pela interação de compostos presentes apenas no extrato aquoso (figura 36).

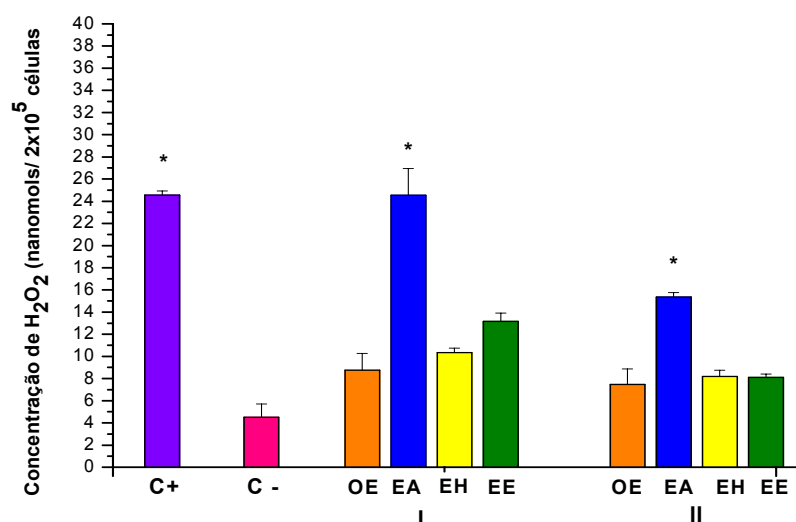


Figura 36. Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas pelos diferentes extratos de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + PMA); C- (controle negativo, células em RPMI-1640); OE: óleo essencial; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroetanólico; EE: extrato etanólico 98,5%. I: (concentração correspondente ao IC₅₀) e II (concentração correspondente ao IC₂₅). Os resultados foram expressos em nanomols de $H_2O_2/2 \times 10^5$ células, como a média $\pm$ desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle negativo ($p<0,01$).

5.4.2 Determinação da atividade inibitória em cultura de CEP

5.4.2.1 Quanto à produção de NO

Para o estudo da atividade inibitória da produção de NO pelas CEP empregou-se o LPS, que apresenta potencial atividade estimulante de macrófagos. A estrutura do LPS é anfipática, composta de uma porção lipopolissacarídica covalentemente ligada à região hidrofóbica do lipídeo A. As respostas celulares dos macrófagos ao LPS são numerosas,

praticamente cada aspecto da fisiologia dessas células é de algum modo influenciada pelo LPS.

O LPS induz a um aumento no consumo de glicose e oxigênio e então as células adquirem alta capacidade funcional, como a capacidade de matar microrganismos e células tumorais. Desse modo, os macrófagos desenvolveram um eficiente mecanismo para o reconhecimento do LPS no ambiente e, como consequência, esse componente das bactérias Gram-negativas está entre os mais potentes estimuladores de macrófagos. Em muitos casos uma quantidade pequena como 1 pg/mL induz resposta mensurável (ZWILLING & EISENSTEIN, 1994).

A avaliação da atividade inibitória foi realizada com o objetivo de avaliar se os extratos que não apresentaram atividade estimuladora da produção de NO não apresentam alguma atividade inibitória deste mediador. As CEP na presença de LPS empregados como controle positivo produziram altos níveis de óxido nítrico e as figuras 37–40 apresentam a produção de NO pelas mesmas estimuladas pelo LPS na presença dos extratos brutos e do óleo essencial.

Na presença do óleo essencial nas duas concentrações testadas (0,075 $\mu\text{L/mL}$ e 0,040 $\mu\text{L/mL}$) a produção de NO foi reduzida e esta inibição demonstrou-se dependente da concentração, como apresentado na figura 37.

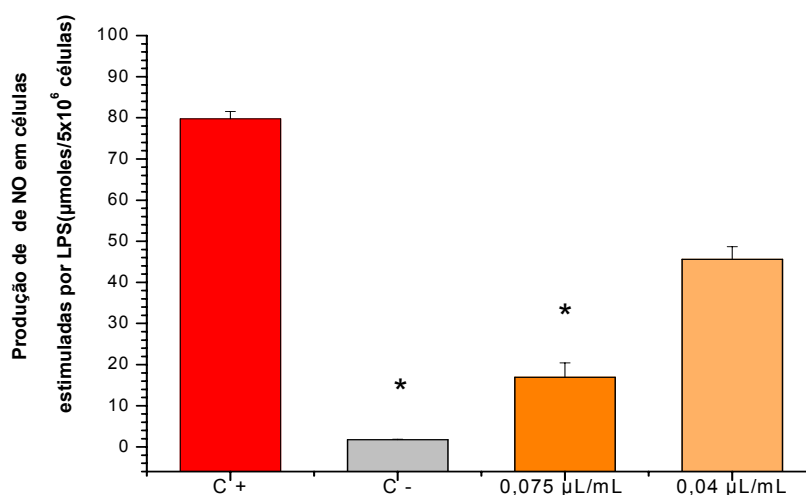


Figura 37. Efeito das diferentes concentrações do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* na produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal estimuladas por LPS. C+ (controle positivo, células + lipopolissacarídeo de *E. coli*); C- (controle negativo, células em RPMI-1640); Os resultados foram expressos em micromols de NO/ 5×10^6 células, como a média $\pm$ desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle positivo ($p < 0,01$).

Os extratos aquosos e etanólicos também promoveram uma inibição da produção de NO pelas CEP nas concentrações testadas como se observa nas figuras 38-40.

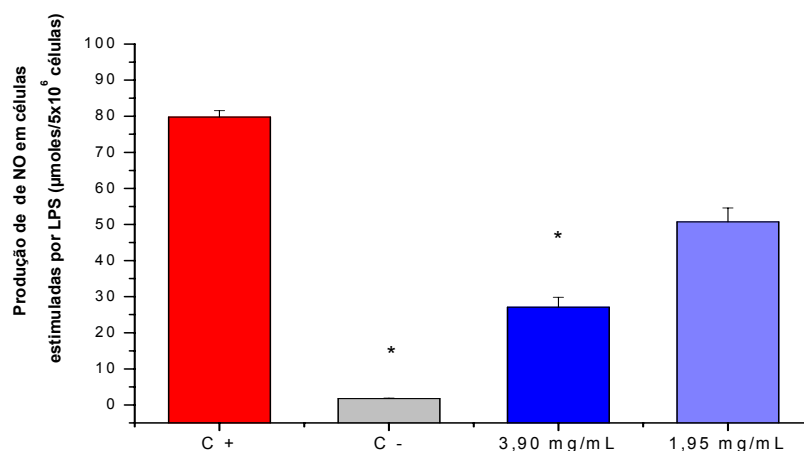


Figura 38. Efeito das diferentes concentrações extrato aquoso de *Melampodium divaricatum* na produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por LPS. C+ (controle positivo, células + lipopolissacarídeo de *E. coli*); C- (controle negativo, células em RPMI-1640). Os resultados foram expressos em micromols de NO/ 5x10⁶ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle positivo (p<0,01).

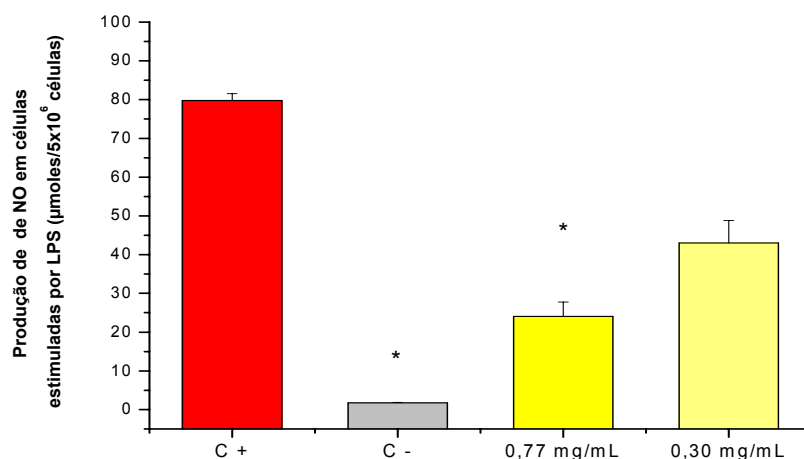


Figura 39. Efeito das diferentes concentrações extrato hidroetanólico 70% (v/v) de partes aéreas de *Melampodium divaricatum* na produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por LPS. C+ (controle positivo, células + lipopolissacarídeo de *E. coli*); C- (controle negativo, células em RPMI-1640). Os resultados foram expressos em micromols de NO/ 5x10⁶ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle positivo (p<0,01).

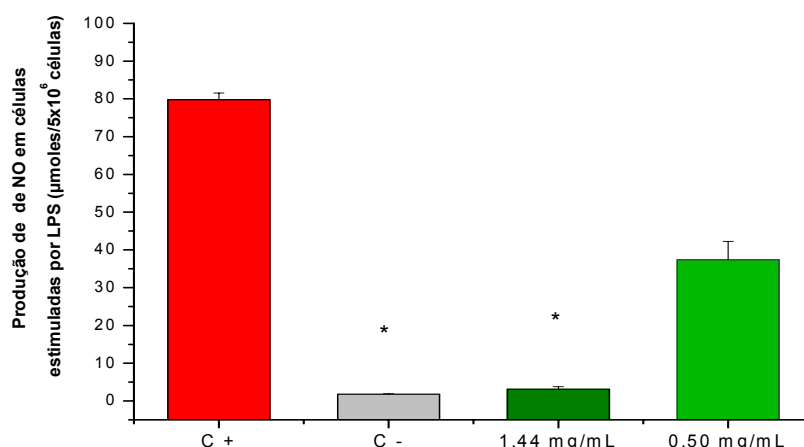


Figura 40. Efeito das diferentes concentrações extrato etanólico 98,5% de partes aéreas de *Melampodium divaricatum* na produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por LPS. C+ (controle positivo, células + lipopolissacarídeo de *E. coli*); C- (controle negativo, células em RPMI-1640). Os resultados foram expressos em micromols de NO/5x10⁶ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle positivo ($p < 0,01$).

Os percentuais de inibição estão apresentados na tabela 16. As inibições da produção de NO foram significativas considerando ($p < 0,01$) nas concentrações correspondentes ao IC₅₀ para todos os extratos de *M. divaricatum*.

Tabela 16. Efeito inibitório dos extratos e do óleo essencial obtido a partir de partes aéreas de *Melampodium divaricatum* na produção de NO em células do exsudato peritoneal estimuladas por LPS

EXTRATIVOS	INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (%)	
	IC ₅₀ *	IC ₂₅ *
Extrato aquoso	66,03 ± 3,44	36,39 ± 4,81
Extrato hidroetanólico 70%	60,45 ± 6,07	29,33 ± 9,51
Extrato etanólico 98,5%	94,87 ± 1,11	36,80 ± 8,10
Óleo essencial	80,33 ± 4,76	40,58 ± 6,16

*Cada valor representa a média ± desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

O NO é uma molécula mensageira envolvida na regulação de diversos processos fisiológicas incluindo a contração da musculatura lisa, a reatividade plaquetária, a neurotransmissão central e periférica e as ações citotóxicas. Essa molécula é crucial para

muitas funções fisiológicas e a sua liberação inapropriada está ligada a numerosas patologias (HOBBS et al., 1999). Nesta pesquisa realizada com a espécie de *M. divaricatum*, foi possível observar que a superprodução de NO, ocasionada pela estimulação das CEP (dentre elas os macrófagos) por LPS, foi significativamente inibida pelos extratos e pelo óleo essencial nas maiores concentrações testadas. Na menor concentração foi possível verificar uma inibição um pouco menor e não significativa quando comparada com o controle, como apresentado na figura 41.

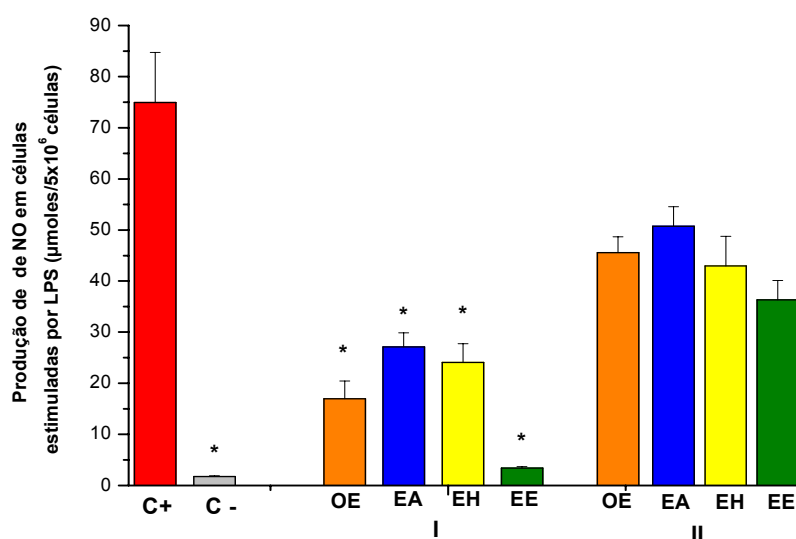


Figura 41. Efeito das diferentes concentrações dos extratos de *Melampodium divaricatum* na produção de NO em cultura de células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por LPS. C+ (controle positivo, células + lipopolissacarídeo de *E. coli*); C- (controle negativo, células em RPMI-1640); OE: óleo essencial; EA: extrato aquoso; EH: extrato hidroetanólico; EE: extrato etanólico 98,5%. I: (concentração correspondente ao IC₅₀) e II (concentração correspondente ao IC₂₅). Os resultados foram expressos em micromols de NO/5x10⁶ células, como a média ± desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

A célula produtora de NO e sua vizinhança são estão a salvo da toxicidade dessa molécula, podendo ser destruídas. Várias evidências estão surgindo para confirmar que o NO contribui para algumas condições patológicas como a asma, artrite reumatóide, tuberculose, esclerose múltipla, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (HAMID et al., 1993; SAKURAI et al., 1995; MANNICK, 1996; NICHOLSON et al., 1996; VODOVOTZ et al., 1996; HOOPER et al., 1997; CALABRESE et al., 2004). Além destas doenças, a falência cardíaca crônica está

relacionada com a produção excessiva de NO pela iNOS e o excesso de NO é também um dos principais sinais de rejeição aos transplantes (DUSTING & MacDONALD, 1995).

Portanto, agentes que modulem a atividade do NO podem ter considerável valor terapêutico, principalmente aqueles capazes de reduzir a produção excessiva de NO, podendo ser benéficos em estados fisiopatológicos onde a produção excessiva desse mediador é um fator contribuinte, como no caso das doenças inflamatórias (HOBBS et al., 1999). Tanto os extratos como o óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *M. divaricatum* apresentaram atividade inibitória da produção de NO pelas CEP murino o que pode indicar um potencial farmacológico interessante.

Portanto, seria de grande valor o desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos da iNOS (WANG et al., 2002) e inibidores da NOS utilizados no tratamento de processos inflamatórios requerem alta especificidade para iNOS para que possam funcionar como moduladores relativamente seguros do NO em várias condições patológicas (SHIN et al., 2004).

Alguns estudos já estão sendo realizados com o objetivo de descobrir esses agentes específicos, um deles foi realizado por Matsuda e colaboradores (1999), onde testaram-se vários sesquiterpenos e triterpenos isolados do extrato metanólico do rizoma de *Alisma orientale* que é utilizado na medicina chinesa. Os resultados obtidos evidenciaram a atividade inibitória na produção de NO em CEP ativados por LPS e os constituintes ativos do extrato (alismol e alisol F) foram capazes de inibir a indução da iNOS.

Ganju e colaboradores (2003) em um estudo na tentativa de determinar os efeitos imunomodulatórios de *Emblica officinalis* (Euphorbiaceae) e *Evolvulus alsinoides* (Convolvulaceae) na artrite induzida em ratos (modelo que se assemelha à artrite reumatóide humana), uma atividade antiinflamatória significativa foi encontrada. A produção de NO dos animais tratados com as plantas foi significativamente menor quando comparada ao controle, sugerindo que um possível mecanismo para conter a progressão da artrite nesses animais pode graças à diminuição da produção de NO, através da inibição da atividade da NOS. Os autores sugerem que possivelmente a atividade antiinflamatória destas espécies deva-se à capacidade de neutralizar o dano oxidativo induzido pelo NO, o que eventualmente auxilia na remodelagem das células.

5.4.2.2 Quanto à liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para avaliação da atividade inibitória da liberação de H₂O₂ empregou-se o PMA, que é um estimulante químico hidrofóbico que pode atravessar a membrana citoplasmática do fagócito independentemente de receptor e é capaz de se ligar e também ativar a proteína

quinase C (PKC), causando uma grande variedade de efeitos nas células (BENDER et al., 1983; BLUMBERG, 1980). Trata-se de uma substância extensivamente estudada, sendo que o estresse oxidativo induzido pelo PMA é um dos mecanismos de promoção tumoral (LU et al., 2004).

Os macrófagos são células que produzem e liberam espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta à fagocitose ou à estimulação por vários agentes. A enzima responsável pela produção de superóxido e peróxido de hidrogênio é a NADPH oxidase (FORMAN & TORRES, 2002). Neste trabalho, o PMA foi utilizado como um indutor do *burst* oxidativo.

A produção de H_2O_2 pelas CEP estimuladas por PMA foi fortemente inibida na presença do óleo essencial e extratos etanólicos de *M. divaricatum*, como se observa na figuras 42, 44 e 45, já o extrato aquoso não apresentou atividade inibitória significativa (figura 43).

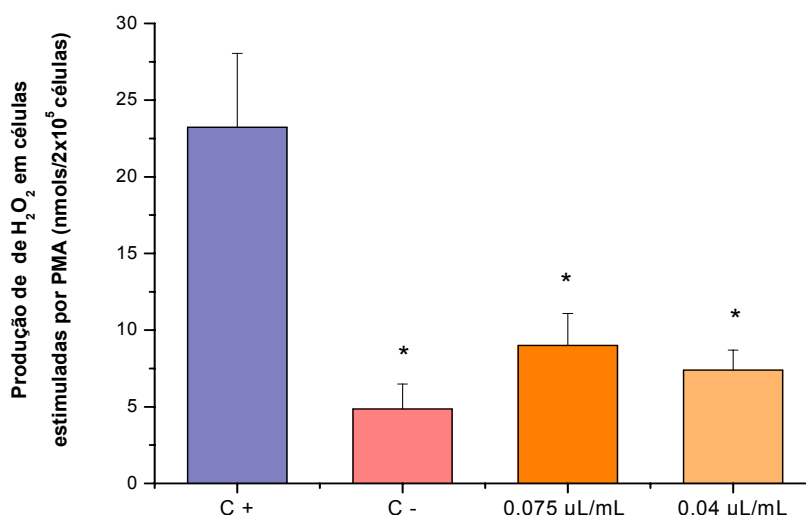


Figura 42. Efeito das diferentes concentrações do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* na produção de H_2O_2 em cultura de células do exsudato peritoneal estimuladas por PMA. C+ (controle positivo, células + PMA); C- (controle negativo, células em RPMI-1640). Os resultados foram expressos em nanomols de H_2O_2 /2x10⁵ células, como a média $\pm$ desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle positivo ($p < 0,01$).

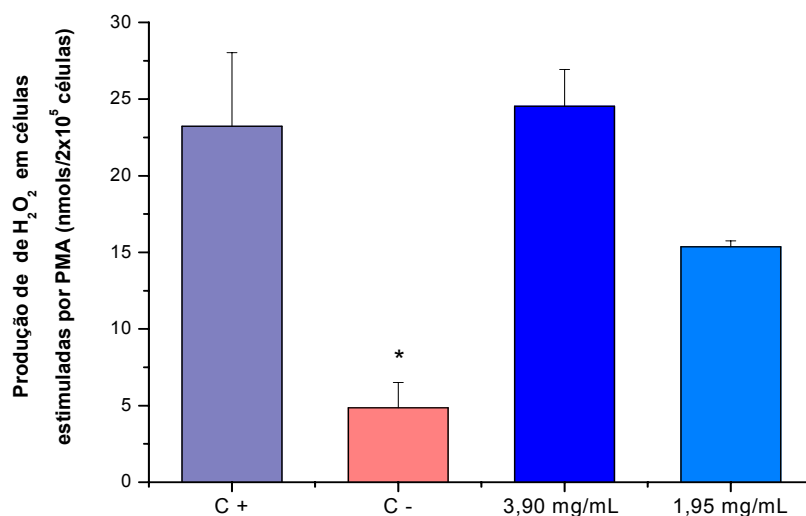


Figura 43. Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por PMA frente ao extrato aquoso de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + PMA); C- (controle negativo, células em RPMI-1640). Os resultados foram expressos em nanomols de $H_2O_2/2 \times 10^5$ células, como a média $\pm$ desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle positivo ($p < 0,01$).

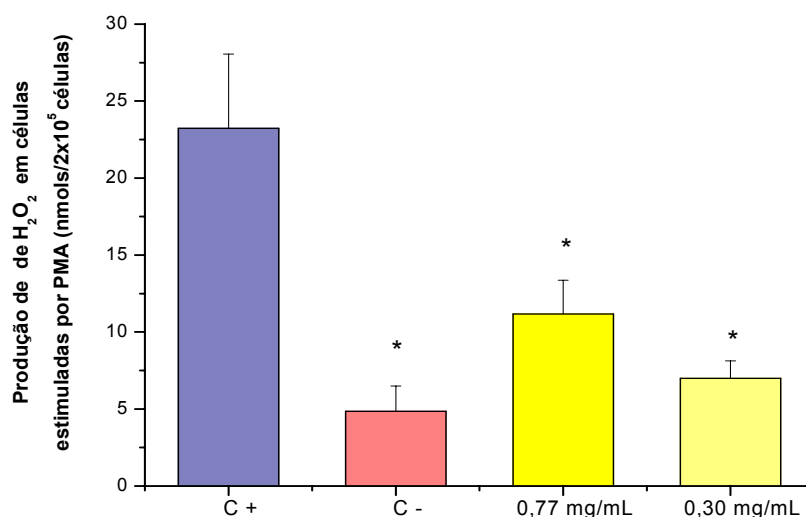


Figura 44. Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por PMA frente ao extrato hidroetanólico a 70% (v/v) de partes aéreas de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + PMA); C- (controle negativo, células em RPMI-1640). Os resultados foram expressos em nanomols de $H_2O_2/2 \times 10^5$ células, como a média $\pm$ desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle positivo ($p < 0,01$).

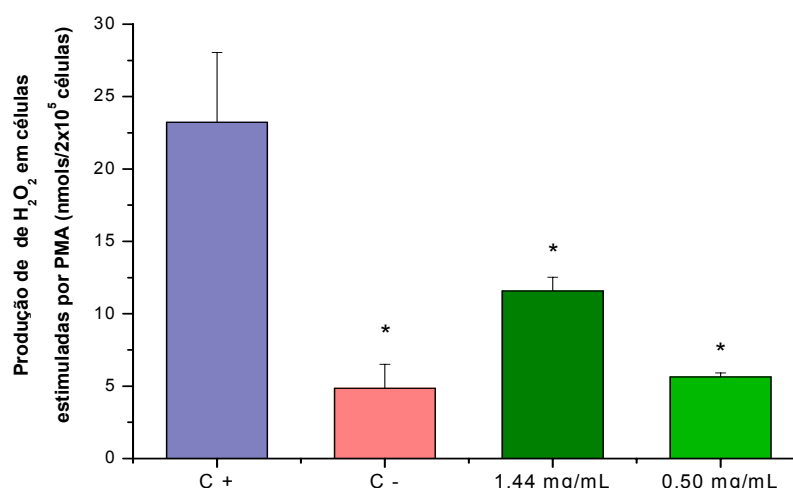


Figura 45. Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por PMA frente ao extrato etanólico 98,5% de partes aéreas de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + PMA); C- (controle negativo, células em RPMI-1640). Os resultados foram expressos em nanomols de $H_2O_2/2 \times 10^5$ células, como a média $\pm$ desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

* Valor estatisticamente significativo quando comparado ao controle positivo ($p < 0,01$).

O percentual de inibição da produção de H_2O_2 calculado conforme descrito no item 4.2.9.2.6, encontra-se apresentado na tabela 17 e o extrato que apresentou maior efeito inibitório foi o extrato etanólico 98,5%, e este efeito não se mostrou dose-dependente, pois quanto menor a concentração dos extratos e do óleo essencial maior o efeito inibitório observado.

Tabela 17. Efeito inibitório do óleo essencial e extratos obtidos a partir das partes aéreas de *Melampodium divaricatum* na produção de H_2O_2 em células do exsudato peritoneal estimuladas por PMA.

EXTRATIVOS	INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO H_2O_2 (%) *	
	IC ₅₀	IC ₂₅
Extrato aquoso	-----	-----
Extrato hidroetanólico 70%	51,89 $\pm$ 9,43	69,89 $\pm$ 4,87
Extrato etanólico 98,5%	50,16 $\pm$ 4,09	75,72 $\pm$ 1,22
Óleo essencial	76,22 $\pm$ 8,87	70,59 $\pm$ 1,19

*Cada valor representa a média $\pm$ desvio-padrão de 5 experimentos realizados em triplicata.

A figura 46 apresenta o potencial inibitório do óleo essencial e dos extratos brutos frente à produção de H_2O_2 por células do exsudato peritoneal.

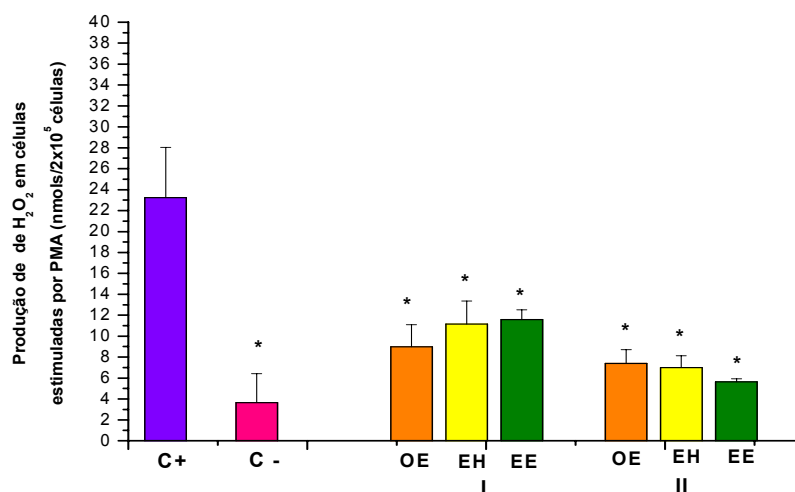


Figura 46. Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por células do exsudato peritoneal de camundongos estimuladas por PMA frente aos extratos etanólicos e óleo essencial obtido de partes aéreas de *Melampodium divaricatum*. C+ (controle positivo, células + PMA); C- (controle negativo, células em RPMI-1640); OE: óleo essencial; EH: extrato hidroetanólico; EE: extrato etanólico 98,5%. Os resultados foram expressos em nanomols de $H_2O_2/2 \times 10^5$ células, como a média $\pm$ desvio-padrão de triplicatas de 5 animais.

Os resultados obtidos na avaliação da produção de *TNF- α* por bioensaio indicam que nenhum das substâncias testadas (extratos e óleo essencial) estimularam a liberação da citocina pelos macrófagos peritoneais, nas concentrações testadas, correspondentes a 50 e 75% de células viáveis.

Apesar das substâncias testadas terem promovido o aumento ou a inibição da produção de NO e H_2O_2 , verificamos que as mesmas não foram capazes de aumentar a produção de *TNF- α* , resultados estes já esperados, visto que a produção de *TNF- α* está diretamente relacionada com a produção de NO, portanto se o composto inibe a produção de NO possivelmente inibirá a produção de *TNF- α* (RIMBACH et al., 2000; PASSOS et al., 2007; FERNANDES et al., 2007). Os ensaios de inibição de *TNF- α* não foram realizados neste trabalho, porém o direcionamento dos experimentos nesse sentido representa uma interessante proposta para estudos biológicos futuros. Além disso, a determinação de outras citocinas relacionadas ao processo inflamatório, como o interferon γ (IFN- γ), pode auxiliar na elucidação dos resultados obtidos nesse trabalho.

Os resultados inibitórios tanto para os extratos como para o óleo essencial de *M. divaricatum* podem ser justificados pela presença de compostos cujas atividades imunomoduladora encontram-se evidenciadas como os flavonóides e terpenos, cujas presenças foram detectadas no material em estudo. Vários são os estudos que elucidam a atividade imunomoduladora destes compostos.

Por exemplo, o resveratrol, presente no vinho tinto, mostrou forte efeito inibitório na expressão de iNOS e geração de NO por macrófagos ativados (TSAI et al., 1999); a quercetina mostrou atividade inibitória na superprodução de NO e TNF- α em macrófagos (MANJEET et al., 1999); muitos outros flavonóides presentes na dieta já foram estudados, como a morina, apigenina, ácido elágico, ácido cafeico e curcumina, e todas essas substâncias apresentaram efeitos supressores dose-dependente sobre a produção de NO (SOLIMAN & MAZZIO, 1998; FANG et al., 2003).

Resultados inibitórios semelhantes aos obtidos com os extratos etanólicos e o óleo essencial de *M. divaricatum* foram observados por Benencia e colaboradores (1999), que observaram uma diminuição da capacidade fagocítica e do burst oxidativo de macrófagos murinos tratados com o extrato aquoso das folhas da *Trichilia glabra*, rico em terpenos. O burst oxidativo permite a geração de espécies reativas de oxigênio e o extrato inibiu significativamente esse processo nos macrófagos estimulado por PMA.

O extrato de *Taraxacum officinale*, rico em terpenos, é capaz de inibir marcadamente a expressão de proteínas responsáveis pela indução de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL 17 e TNF- α) (KIM et al., 1981). O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, cujo constituinte majoritário é o terpineol, inibe a formação de TNF- α , IL 1 β , IL-8, IL 10 em monócitos peritoneais humanos ativados por LPS (HART et al., 2000).

De forma geral o mecanismo de atuação proposto para diversos terpenos tem sido a inibição da produção destas citocinas pelo bloqueio da ativação do fator nuclear NF- κ B (GHOSH et al., 1998; GERONDAKIS et al., 1998).

As espécies reativas de oxigênio demonstram induzir a ativação do NF- κ B, fator importante nas respostas inflamatórias, mas os mecanismos não são claramente compreendidos (FORMAN & TORRES, 2002). Portanto, torna-se de grande interesse a descoberta de compostos capazes de atuar de forma seletiva e eficaz imunomodulando estas espécies reativas de oxigênio, o que terapeuticamente significaria um grande avanço.

De forma geral as substâncias testadas inibiram a produção de NO e H₂O₂ e apenas o extrato aquoso foi capaz de inibir a produção de NO e estimular a produção de H₂O₂ em células do exsudato peritoneal de camundongos. Este resultado é interessante, uma vez que altas concentrações desses mediadores são prejudiciais ao organismo e ocasionam os mais diversos estados patológicos.

Resultados imunomoduladores semelhantes aos obtidos para o óleo essencial de *M. divaricatum* foram observados por Veiga Jr. e colaboradores (2007) que avaliaram a atividade antiinflamatória do óleo essencial de três espécies de copaíba (*Copaifera cearensis*, *C. reticulata* e *C. multijuga*). Nas concentrações testadas a espécie *C. reticulata* (500 µg/mL) foi capaz de inibir 85% da produção de NO, ao passo que a *C. multijuga* inibiu 30% em uma concentração dez vezes menor (50 µg/mL), concentração relativa a presença de cerca de 100 % de células viáveis.

A similaridade no potencial inibitório pode estar relacionado à presença dos constituintes majoritários β -cariofileno e α -humuleno presentes em concentrações superiores a 50% tanto no óleo essencial das espécies de copaíba (VEIGA JR. et al., 2007) como na espécie *M. divaricatum*. A atividade antiinflamatória destas substâncias já estão bem estabelecidas através de estudos com edema de pata induzido por carragenina, no qual tanto o β -cariofileno quanto o α -humuleno reduziram significativamente o edema de pata após 4 h da administração por via oral, comparado a redução do edema promovido por dexametasona após 1 h da administração via subcutânea (FERNANDES et al., 2007).

Esse efeito antiinflamatório promovido pelo β -cariofileno e α -humuleno estão associados à inibição da expressão das enzimas iNOS e COX-2, provavelmente por inibir fatores transcricionais assim como o fator nuclear (NF- κ B).

Várias substâncias já foram desenvolvidas e aprovadas para tratamento de diversas doenças relacionadas ao descontrole dos níveis de NO, sendo a grande maioria delas inibidoras seletivas da enzima NO sintase ou doadoras de NO (CORREIA et al., 2005). Contudo, a descoberta de novos fármacos, mais potentes e seletivos que possam atuar na produção de outros intermediários do processo inflamatório é um aspecto altamente desejável.

Ainda são necessários estudos futuros para elucidar o exato mecanismo de ação destas substâncias, mas já é evidente através dos resultados obtidos que tanto os extratos quanto o óleo essencial apresentam potencial antiinflamatório principalmente pela presença de terpenos e flavonóides, metabólitos potencialmente ativos contra a inflamação.

ACHIKE, F. I.; KWAN, C. Y. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signaling pathway. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 30, p. 605-615, 2003.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 283-318, 1984.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing, 1995.

AGARWAL, S. S.; SINGH, V. K. Immunomodulators: a review of studies on Indian medicinal plants and synthetic peptides: part I. medicinal plants. **Proc. Indian Natl. Sci. Acad.**, v. 65, p. 179-204, 1999.

AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSEIRA, M. R.; ZATTERA F.; WASUM, R.; SERAFI L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 215-220, 2005.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, vol. 17, n. 1, p. 114–121, 2007.

ALONSO-LÓPES, M.; ARRIAGA-GINER, F. J.; BORGES-DEL-CASTILLO, J.; VÁZQUEZ-BUENO, P. N-alkanes and triterpenoids from some *Salvadorian compositae*. **Fitoterapia**, v.56, n.2, p. 123-125, 1985.

AMARAL, J. A. A.; EKINS, S. R.; RICHARDS, R. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 520– 525, 1998.

ANDREOLI, T. E. Free radicals and oxidative stress. **Am. J. Med. Sci.**, v. 108, p. 650-651, 2000.

ANDREAZZA, R. C. S. **Análise botânica, química e microbiológica de *Salvia aliciae* E. P. Santos, *S. lachnostachys* Benth., *S. microphylla* Kunth, *S. officinalis* L (Lamiaceae)**. Curitiba, 125 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2000.

ANDREWS, R. E.; PARKS, L. W.; SPENCE, K. D. Some effects of Douglas terpenes on certain microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 40, p. 301-304, 1980.

ANGELOPOULOU, D.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLU, D. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliens* L. leaves. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 30, p. 198-202, 2002.

ARAÚJO, A. J.; LORDELLO, A. L. L.; MAIA, B. H. L. N. S. Análise comparativa dos óleos essenciais de folhas e galhos de *Ocotea puberula* (Lauraceae). **Rev. Visão Acad.**, v. 2, n. 2, p. 81-84, 2001.

ARMSTRONG, J. S. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. **BioEssays**, v. 28, p. 253–260, 2006.

AUTORE, G.; RASTRELLI, L.; LAURO, M. R.; MARZOCCO, S.; SORRENTINO, R.; SORRENTINO, U.; PINTO, A. AQUINO, R. Inhibition of oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. **Life Sci.**, v. 70, p. 523-534, 2001.

BACHEREAU, F.; MARIGO, G. Effect of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in *Sedum album*. **Asta J. Physiol. Plant.**, v. 104, p. 203-210, 1998.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BALLABENIA, V.; TOGNOLINIA, M.; CHIAVARINIA, M. Novel antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from *Lavandula hybrida* Reverchon 'grosso'. **Phytomedicine**, v. 11, p. 596–601, 2004.

BARITAUX, O.; RICHARD, H.; TOUCHE, J.; DERBESY, M. Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. part I. Basil, *Ocimum basilicum* L. **Flavour Fragr. J.**, v.7, p.267-271, 1992.

BARRE, J. T.; BOWDEN, B.F.; COLL, J. C.; JESUS, J.; FUENTE, V. E.; JANAIRO, G. C.; RAGASA, C. Y. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 321–324, 1997.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: UFV Imprensa Universitária, 1991.

BARTER, P. The inflammation: Lipoprotein cycle. **Atherosclerosis Suppl.**, v.6, p. 15–20, 2005.

BENDER, J. G.; MCPHAIL, L. C.; VAN EPPS, D. E. Exposure of human neutrophils to chemotactic factors potenciales activation of the respiratory burst enzyme. **J. Immunol.**, v. 130, n.5, p. 2316-2323, 1983.

BENENCIA, F.; COURREGES, M. C.; COULOMBIE, F. C. *Trichilia glabra*: effect on the phagocytic activity and respiratory burst response of peritoneal macrophages. **Immunopharmacology**, v. 41, p. 45-53, 1999.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci.**, v.65, p.1865-1874, 1999.

BERGER, P.; LEITNER, N. K. V.; DORÉ, M.; LEGUBE, B. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. **Water Res.**, v. 33, n. 2, p. 433- 441, 1999.

BEYLIER, N. Bacteriostatic activity of some Australian essential oils. **Perfum. Flavor.**, v. 4, p. 23-25, 1979.

BLUMBERG, P. M. In vitro studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters: part 1. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 8, n. 2, p. 153-197, 1980.

BOHM, B. A.; STUESSY, T. F. Flavonoid variation in *Melampodium*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 19, n. 8, p. 677-679, 1991.

BOLHUIS, G. K.; EISSENS, A. C.; ZOESTBERGEN, E. D. C. Calcium lactate, a new filler-binder for direct compaction of tablets. **Int. J. Pharm.**, v. 221, n. 1/2, p. 77-86, 2001.

BORGES, D. B.; FARIAS, M. R.; SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E.P. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para *Calendula officinalis* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.15, n. 3, p. 229-236, 2005.

BORGES-DEL-CASTILLO, J.; MARTINEZ-MARTIR, A. I.; RODRIGUEZ-LUIS, F.; RODRIGUEZ-UBIS, J. C.; VAZQUEZ-BUENO, P. Isolation and syntesis of two coumarins from *Melampodium divaricatum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 4, p. 859-861, 1984.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v.3, n.18, p.1-8, 2007.

BOWERS, M. D.; STAMP, N. E. Effects of plant age, genotype, and herbivory on *Plantago*. performance and chemistry. **Ecology** , v. 74, p. 1778-1791, 1993.

BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da (República Federativa do Brasil), Brasília, março. 2004.

BRISKE, D. D.; CAMP, B. J. Water stress increases alkaloid concentrations in threadleaf groundsel (*Senecio longilobus*). **Weed Sci.**, v. 30, p. 106-108, 1982.

BREMER, K.; ANDERBERG, A. A. **Asteraceae**: cladistics & classification. Porland: Timber Press, 1994.

BRITISH Pharmacopea. London: Her Majesty's Stationery Office, 2001.

BROOKS, J. S.; FEENY, P. Seasonal variation in *Daucus carota*. leaf-surface and leaf-tissue chemical proWles. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, p. 769-782, 2004.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI, G. Chemical composition and biological activities of *Ishpingo* essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) *Kosterm* (Lauraceae) flower calices. **Food Chem.**, v. 85, p. 415-421, 2004.

BRYANT, J. P.; CHAPIN III, F. S.; KLEIN, D. R. Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. **Oikos**, v. 40, p. 357-368, 1983.

BUGGLE, V.; MING, L. C.; FURTADO, E. L.; ROCHA, S. F. R.; MARQUES, M. O. M. Influence of different drying temperatures on the amount of essential oils and citral content in *Cymbopogon citrates* (DC) Stapf. Poaceae. **Acta Hort.**, n. 500, p. 71-74, 1999.

BURNS, A. E.; GLEADOW, R. M.; WOODROW, I. E. Light alters the allocation of nitrogen to cyanogenic glycosides in *Eucalyptus. cladocalyx*. **Oecologia**, v. 133, p. 288-294, 2002.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 94, p. 223–253, 2004.

BUSMAN, D. V.; ZOGHBI, M. G. B.; POTIGUARA, R. C. V.; ANDRADE, E. H. A. Volatiles from different organs of *Unxia camphorate* growing wild in the Amazon. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 33, p. 1269-1273, 2005.

CABRERA, A. L. Compositae. flora de la provincia de jujuy. **Col. Cient. INTA**, v. 13, n. 10, p. 1-726, 1978.

CALABRESE, V.; BOYD-KIMBALL, D.; SCAPAGNINI, G.; BUTTERFIELD, D. A. Nitric oxide and cellular stress response in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. **In Vivo**, Athens, v. 18, n. 3, p. 245-267, 2004.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicine (phytoterapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.297-315.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med.**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CARDOSO, C. R. P. **Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae).** Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara UNESP, 2006.

CARLOS, I. Z.; ZINNI, M. M. C.; SGARBI, D. B. G.; ANGLUSTER, J.; ALVIANO, C. S.; SILVA, C. L. Disturbances in the production of interleukin-1- necrosis and tumor factor in dissiminated murine sporothricosis. **Mycophatology**, v. 127, p. 189-194, 1994.

CARLOS, I. Z.; LOPEZ, F. C. M.; BENZATTI, F. P.; JORDÃO JR. M. C. MOREIRA, R. R. D. Effect of the essential oil of *Achillea millefolium* L. in the production of hydrogen peroxide and tumor necrosis factor- α in murine macrophages. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 41, n. 3, p.402-405, 2005.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 1914–1920, 2002.

CARSON, C. F.; RILEY, T. Toxicity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* or tea tree oil. **J. Toxicol. Clin Toxicol.**, v. 33, p. 193–195, 2003.

CARSWELL, E. A.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 72, p. 3666-3670, 1975.

CARTURAN, G. F. **Guia ABC de microbiologia:** controle microbiológico na indústria de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. 2.ed. São Paulo: ABC, 1999. p. 39–58.

CHANG, H. Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.64, p.821–846, 2000.

CHAPPELL, J.; HAHLBROCK, K. Transcription of plant defence genes in responses to UV light or fungal elicitor. **Nature**, v. 311, n. 76-78, 1984.

CHAURASIA, S. C.; VYAS, K. K. In vitro effect of some volatile oil against *Phytophthora parasitica* var. *piperina*. **J. Res. Indian Med. Yoga Homeopathic.**, p. 24–26, 1977.

CHERICONI, S.; FLAMINI, G.; CAMPEOL, E.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. GC-MS analyses of the essential oil from the aerial parts of *Artemisia verlotiorum*: variability during the year. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, p. 423-429, 2004.

CHOI, E.; HUANG, J. K. Screening of Indonesian medicinal plants for inhibitor activity on nitric oxide production of RAW264.7 cells and antioxidant activity. **Fitoterapia**, v. 76, p. 194-203, 2005.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **J. Ethnopharmacol.**, v.79 , p. 213–220, 2002.

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

COLEY, P. D.; BRYANT, J. P.; CHAPIN III, F. S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, v. 230, p. 895-899, 1985.

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

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Review article: Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **J. Nutr. Biochem.**, v. 7, p. 66-76, 1996.

COOPER-DRIVER, G. A.; FINCH, S.; SWAIN, T.; BERNAYS, E. Seasonal variation in secondary plant compounds in relation to the palatability of *Pteridium aquilinum*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 5, p. 211-218, 1977.

CORREIA, C. R. D.; BARRETO, R. L.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Quim. Nova**, v. 28, p. 1046-1054, 2005.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CUATRECASAS, J. Prima Flora Colombiana. 3. Compositae – Asteraceae. **Webbia**, v. 24, n. 1, p. 1-335, 1969.

CZINNER, E.; HAGYMAS, I. K.; BLAZOVICS, A.; KERY, A.; SZOKE, E.; LEMBERKOVICS, E. The in vitro effect of *Helichys flos* on microsomal lipid peroxidation. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 31-35, 2001.

DARROW, K.; BOWERS, M. D. Phenological and population variation in iridoid glycsoides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 25, p. 1-11, 1997.

DAVID, J. M.; BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, p.113-123, 2006.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of antimicrobials. **Food Technology**, v. 52, p. 148-154 1989.

DAWSON, D. A. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcomes. **Cerebrovasc. Brain. Metab. Rev.**, v. 6, p. 299- 324, 1994.

DE ANGELIS L. Brain tumors. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 114-123, 2001.

DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 5, p. 165-180, 1987.

DEANS, S. G; SVOBODA, K.P. Effects of drying regime on volatile oil and microflora of aromatic plants. **Acta Horticulturae**, n. 306, p. 450-452, 1992.

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 74, p. 101-109, 2002.

DEVIENCE, K. F. **Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides***. Araraquara: 2000. 126f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.

DEVORE, M. L.; STUESSY, T. F. The place and time of origem of the Asteraceae, with additional comments on the calyceraceae and goodeniaceae. In: HIND, D. D. N.; JEFFREY, C.; POPE, G. V. **Advences in Compositae Systematics**. Kew: The Royal Botanical Gardens. 1995. p. 23-40.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Review article: Flavonoids old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 2745–2749, 2006.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp, 1995. 230p.

DIXON, R. A.; DEY, P. M.; LAMB, C. J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Adv. Enzymol.**, v. 55, p. 1–69, 1983.

DUARTE, M. C.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** v. 97, p. 305–311, 2005.

DUDT, J. F.; SHURE, D. J. The influence of light and nutrients on foliar phenolics and insect herbivory. **Ecology**, v. 75, p. 86-98, 1994.

DUSTING, G. J.; MACDONALD, P. S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Ann. Med.**, v. 27, n. 3, p. 395-406, 1995.

EBERHARDET, M. K. **Reactive oxygen metabolites**: chemistry and medical consequences. Boca Raton: CRC Press, 2001. 590 p.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytother. Res.**, v. 21, p. 308-323, 2007.

ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. **Planta Med.**, v.64, p. 711-713, 1998.

ELSOHLY, H. N.; CROOM, E. M.; KOPYCKI, W. J.; JOSHI, A. S.; MCCHESENEY, J. D. Diurnal and seasonal effects on the taxane content of the clippings of certain taxus cultivars. **Phytochem. Anal.**, v. 8, n. 9, p. 124-129, 1997.

EMERENCIANO, V. P.; RODRIGUES, G. V.; ALVARENGA, S. A. V.; MACARI, P. A. T. Um novo método para agrupar parâmetros quimiotaxonômicos. **Quim. Nova**, v. 21, p. 125-129, 1998.

ERWIG, L. P.; KLUTH, D. C.; WALSH, G. M.; REES, A. J. Initial cytokines exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. **J. Immunol.** v. 161, p. 1983-1988, 1998.

EVANS, M. **Manual completo de medicinas naturais**. Lisboa: Stampa, 1997.

EVANS, W. C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14th ed. WB Saunders Company: London, 1996.

FABROWSKI, F. J. **Eucaliptus smithii R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. Curitiba, 2002. 225 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

FAIRBAIRN, J. W.; SUWAL, P. N. The alkaloids of hemlock (*Conium maculatum* L.) - II. **Phytochemistry**, v. 1, p. 38-46, 1961.

FAIRBAIRN, J. W.; WASSEL, G. The alkaloids of *Papaver somniferum* L., evidence for a rapid turnover of the major alkaloids. **Phytochemistry**, v. 3, p. 253-258, 1964.

FAJER, E. D.; BOWERS, M. D.; BAZZAZ, F. A. The effect of nutrients and enriched carbon/nutrient balance hypothesis. **Am. Nat.**, v. 140, p. 707-723, 1992.

FANG, S. H.; HOU, Y. C.; CHANG, W. C.; HSIU, S. L.; CHAO, P. D. L.; CHIANG, B. L. Morin sulfates/glucuronides exert anti-inflammatory activity on activated macrophages and decreased the incidence of septic shock. **Life Sci.**, v. 74, p. 743-756, 2003.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M.O. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

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

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; PIANOWSKI, L. F. CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 569, p. 228-236, 2007.

FERREIRA, A. P.; SOARES, G. L.; SALGADO, C. A.; GONÇALVES, L. S.; TEIXEIRA, H. C.; TEIXEIRA, F. M.; KAPLAN, M. A. Immunomodulatory activity of *Mollugo verticillata* L. **Phytomed.**, v. 10, p. 154-158, 2003.

FLEMING, I.; BUSSE, R. NO: the primary EDRF. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 31, p. 5-14, 1999.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assist. Med. Bras.**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FLORÃO, A. **Avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *Baccharis* Asteraceae**. 2006. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 166, p. S4-S8, 2002.

FRANCO, J. **Determinação *in vitro* da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.v.M. Myrtaceae**. Curitiba, 2003, 13 f. Monografia (Especialização em Microbiologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

FREIRE, C. M. M.; ORTIZ, M.; MARQUES, M.; COSTA, M. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essencial oil. **J. Ethnopharmacol.**, v.105, p. 161-166, 2006.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3rd. ed. New York: Willy Liss, 1994.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GANJU, L.; KARAN, D.; CHANDA, S.; SRIVASTAVAS, K. K.; SAWHNEY, R. C.; SELVAMURTHY, W. Immunomodulatory effects of agents of plant origin. **Biomed. & Pharmacother.**, v. 57, p. 296-300, 2003.

GAUVIN A.; SMADJA, J. Essential oil composition of four *Psiadia* species from Reunion Island: A chemotaxonomic study. **Biochem. Syst. Ecol.** v. 33, p. 705-714, 2005.

GERONDAKIS, S.; GRUMONT, R.; ROURKE, I.; GROSSMANN, M. The regulation and roles of Rel/NF- κ B transcription factors during lymphocyte activation. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 10, p.353–359, 1998.

GERSHENZON, J. Changes in the levels of plant secondary metabolites under water and nutrient stress. **Rec. Adv. Phytochem.**, v. 18, p. 273-320, 1984.

GERSHENZON, J.; MAFFEI, M.; CROTEAU, R. Biochemical and histochemical localization of dular trichomes of spearmint. **Plant Physiol.**, v. 89, 1351-1357, 1989.

GHOSH, S.; MAY, M. J.; KOPP, E. B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 225–260, 1998.

GIBSON, P. R. Increased gut permeability in Crohn's disease: is TNF the link? **Gut**, v. 53, n. 12, p. 1724-1725, 2004.

GIRÓN, L. M.; FREIRE, V.; ALONZO, A.; CÁCERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **J. Ethnopharmacol.**, v. 34, p. 173-187, 1991.

GOEL, V.; CHANG, C.; SLAMA, J. V.; BARTON, R.; BAUER, R.; GAHLER, R.; BASU, T. Alkylamines of *Echinacea purpurea* stimulate alveolar macrophage function in normal rats. **Int. Immunopharmacol.**, v. 2, p. 381-387, 2002.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. W. H. **Kuby immunology**. 4th. ed New York: W. H. Freeman, 2000.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; FELZENSZWALB, I.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Mutagenicity testing of ($\pm$)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, menthol and terpineol with the *Salmonella*/microsome assay. **Mutat. Res.**, v. 416, p. 129–136, 1998.

GRACE, S. C.; LOGAN, B. A.; ADAMS III, W. W. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. **Plant Cell Environ.**, v. 21, p. 513-521, 1998.

GRACE, S. C.; LOGAN, B. A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 355, p. 1499-1510, 2000.

GRAHAN, J. G.; QUINN, M. L.; FABRICANT, D. S.; FRANSWORTH, N.R. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 347-377, 2000.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNERBAUN, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GUENTHER, E. History, Origin in Plants, Production and Analysis. In: **The Essential oils**. 4th.ed. New York: Van Nostrand, 1977.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia* Mill. **J. Ethnopharmacol.**, v. 89, p. 67-71, 2003.

HALL, G. D.; LANGENHEIM, J. H. Temporal changes in the leaf monoterpenes of *Sequoia sempervirens*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 14, p. 61-69, 1986.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **Faseb J.**, v.1, n. 5, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Chem. Toxic.**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs Lett.**, v.486, p. 10-13, 2000.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HAMID, Q.; SPRINGALL, D. R.; RIVEROS-MORENO, V.; CHANEZ, P.; HOWARTH, P.; REDINGTON, A.; BOUSQUET, J.; GODARD, P.; HOLGATE, S.; POLAK, J. M. Induction of nitric oxide synthase in asthma. **Lancet**, London, v. 342, n. 8886-8887, p. 1510-1513, 1993.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids advances in research since**. London: Chapman and Hall, 1996.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Review: Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 2nd. ed. London: Chapman and Hill, 1998. 288 p.

HART, P. H.; BRAND, C.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; PRAGER, R. H.; FINLAY-JONES, J. J. Teroin-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppress inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Res.**, v. 49, p. 619-626, 2000.

HARTMANN, T. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. **Ent. Exp. Appl.**, v. 80, p. 177-188, 1996.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 1141-1148, 1983.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. & Therapeutic**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HEINRICH, M.; ROBLES, M.; WEST, J. E.; MONTELLANO, B. R. O.; RODRIGUEZ, E. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 38, p. 539-565, 1998.

HENDRIKS, H.; ANDERSON-WILDEBOER, Y.; ENGELS, G.; BOS, R.; WOERDENBAG, H. J. The content of parthenolide and its yield per plant during the growth of *Tanacetum parthenium*. **Planta Med.**, v. 63, p. 356-359, 1997.

HEYWOOD, V. H. **Compositae. in flowering plants of the world** (Heywood, V.H., ed.). Oxford, London, Melbourne: Oxford University Press., 1979, p. 263-268.

HEYWOOD, V. H.; HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L. An overture to the Compositae. In: HEYWOOD, V. H., HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L., Eds. **The Biology and Chemistry of the Compositae**. London: Academic Press., 1977. p.1-20.

HIND, D. J. N. Notes on the Compositae of Bahia, Brazil. **Kew Bull.**, v. 48, p. 245-277, 1993.

HINDLER, J. **Antimicrobial susceptibility testing. Essential procedures for clinical microbiology**. Washington, DC: Asm Press, 1998.

HOBBS, A. J.; HIGGS, A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharm. Toxicol.**, v. 39, p. 191-220, 1999.

HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. **Oecologia**, v. 107, p. 160-169, 1996.

HÖFT, M.; VERPOORTE, R.; BECK, E. Leaf alkaloid contents of *Tabernaemontana pachysiphon* as influenced by endogenous and environmental factors in the natural habitat. **Planta Med.**, v. 64, p. 148-152, 1998.

HOGEDAL, B. D.; MOLGAARD, P. HPLC analysis of the seasonal and diurnal variation of iridoids in cultivars of *Antirrhinum majus*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 28, p. 949-962, 2000.

HOOPER, D. C.; BAGASRA, O.; MARINI, J. C.; ZBOREK, A.; AHNISHI, S. T.; KEAN, R.; CHAMPION, J. M.; SARKER, A. B.; BOBROSKI, L.; FARBER, J. L.; AKAIKEW, T.; MAEDA, H.; KOPROWSKI, H. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: Implications for the treatment of multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 2528-2533, 1997.

HORNER, J. D. Nonlinear effects of water deficits on foliar tannin concentration. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 18, p. 211-213, 1990.

HSIAO, T. C. Plant responses to water stress. **Annu. Rev. Plant Phys.**, v. 24, p. 519-570, 1973.

HUBERT, T. D.; WIEMER, D. F. Anti-repellent terpenoids from *Melampodium divaricatum*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 1197-1198, 1985.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochem.**, v. 26, p. 2489-2491, 1987.

HUSSAIN, S. P.; TRIVERS, G. E.; HOFSETH, L. J.; HE, P.; SHAIKH, I.; MECHANIC, L. E.; DOJA, S.; JIANG, W.; SUBLESKI, J.; SHORTS, L.; HAINES, D.; LAUBACH, V. E.; WILTROUT, R. H.; DJURICKOVIC, D.; HARRIS, C. C. Nitric Oxide, a Mediator of Inflammation, Suppresses Tumorigenesis. **Cancer Res.**, v.64, p.6849-6853, 2004.

- HÜTHER, J.; PASSREITER, C. M.; WRAY, V.; WILLUHN, G. Acylated 2- hydroxythymol 3-O-diglycosides from *Melampodium divaricatum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 979–986, 1999.
- IOANNIDIS, D.; BONNER, L.; JOHNSON, C. B. UV-B is required for normal development of oil glands in *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil). **Ann. Bot.**, v. 90, p. 453-460, 2002.
- IPEK, E.; ZEYTINOGLU, H., OKAY, S., TUYLU, B. A., KURKCUOGLU, M., HUSNU CAN BASER, K. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test. **Food Chem.**, v. 93, p. 551–556, 2005.
- ISENBERG, H. D. **Clinical Microbiology Procedures Handbook**. Washington, D.C: American Society for Microbiology, 1992.
- ISENGARD, H. D.; FÄRBER, J. M. Hidden parameters of infrared drying for determining low water contents in instant powders, **Talanta**, v. 50, p. 239-246, 1999.
- ITENOV, K.; MOLGAARD, P.; NYMAN, U. Diurnal fluctuations of the alkaloid concentration in latex of poppy *Papaver somniferum* is due to day–night fluctuations of the latex water content. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1229-1234, 1999.
- JANEWAY, C. J. **Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença**. 6.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2006. 824p.
- JANSSEN, A. M. **Antimicrobial Activities of Essential Oils: a pharmacognostical study**. 1989, 181 f. Tese (Doctoraan de Rijksuniversiteit te Leiden). Faculteit der Wiskunde en Natuutwetenschappen, 1989.
- JASSIM, S. A.; NAJI, M .A. A Review. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, p. 412–427, 2003.
- JEONG, S. T.; GOTO-YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, S.; ESAKA, M. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. **Plant Sci.**, v. 167, p. 247-252, 2004.
- JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVES, P. F. **Plants systematics: a phylogenetic approach**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 1999.

JUNG, S. Variation in antioxidant metabolism of young and mature leaves of *Arabidopsis thaliana* subjected to drought. **Plant Sci.**, v. 166, p. 459-466, 2004.

JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **J. Organ. Chem.**, v. 21, p. 1395-1401, 1956.

KARPUZOGLU, E.; AHMED, S. A. Estrogen regulation of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in immune cells: Implications for immunity, autoimmune diseases, and apoptosis. **Nitric Oxide**, v.15, p.177–186, 2006.

KERWIN, J. F.; LANCASTER, J. R.; FELDMAN, P. L. Nitric oxide: A new paradigm for second messengers. **J. Med. Chem.**, v. 38, n. 1, p. 4343–4362, 1995.

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Clin. Chem.**, v. 100, n. 5, p. 567-573, 1993.

KILBOUM, R. G.; GRIFFITH, O. W. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 84, n. 11, p. 827-831, 1992.

KIM, H. K.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; HANG, S. S.; KIM, H. P. Amentoflavone, a plant biflavone: A new potential anti-inflammatory agent. **Arch. Pharm. Res.**, v. 21, n. 4, p. 406-410, 1998.

KIM, S. K.; SAKAMOTO, I.; MORIMOTO, K.; SAKATA, M.; YAMASAKI, K.; TANAKA, O. Seasonal variation of saponins, sucrose and monosaccharides in cultivated Ginseng roots. **Planta Med.**, v. 42, p. 181- 186, 1981.

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; WEIS, N.; WEIGAND, H. Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. **J. Essent. Oil Res.**, v.1, p.119-128, 1988.

KOEPPE, D. E.; ROHRBAUGH, L. M.; RICE, E. L.; WENDER, S. H. Tissue age and caffeoylquinic acid concentration in sunflower. **Physiol. Plant.**, v. 23, p. 258-261, 1970.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. N.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr, W. C. Antimicrobial susceptibility testing. In:-----, **Color atlas and text book of diagnostic microbiology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997.

KORICHEVA, J.; LARSSON, S.; HAUKIOJA, E.; KEINÄNEN, M. Regulation of woody plant secondary metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of meta-analysis. **Oikos**, v. 83, p. 212-226, 1998.

KORTH, K. L.; DIXON, R. A. Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. **Plant Physiol.**, v. 115, p. 1299-1305, 1997.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; KUSTRAK, D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). **Acta Pharm.**, v. 55, p. 377–385, 2005.

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Analytical, nutritional and clinical methods use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chem.**, v. 85, p. 633–640, 2004.

KUO, P. C.; SCHROEDER, R. A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. **Ann. Surg.**, v. 221, n. 3, p. 220-235, 1995.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher. The paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiol.**, v. 125, p. 58-60, 2001.

LAHLOU, M. Methods to Study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytother. Res.**, Casablanca, v. 18, p. 435-448, 2004.

LAWSON, L. D.; BAUER, R. **Phytomedicines of Europe**: chemistry and biological activity. Washington, DC: American Chemical Society, 1998.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). **Plantas medicinais**: sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: ARGOS, 2001. p. 483-501.

- LIST, P. H.; SCHMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical Technology**, Florida: CRC Press. 2000.
- LOBSTEIN, A.; JAKO, L. R.; BERRURIER, M. H.; ANTON, R. Seasonal variations of the flavonoid content from *Ginkgo biloba* leaves. **Planta Med.**, v. 57, p. 430-433, 1991.
- LOKAR, L. C.; MAURICH, V.; MELLERIO, G.; MONEGHINI, M.; POLDINI, L. Variation in terpene composition of *Artemisia alba* in relation to environmental conditions. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 15, p. 327-333, 1987.
- LOPES, F. C. M. **Avaliação da atividade imunológica *in vitro* de *Alchornea* spp quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α por macrófagos murinos**. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, 2004.
- LOPES, N. P.; KATO, M. J.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S.; YOSHIDA, M. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Viola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**, v. 46, 689-693, 1997.
- LOPES, N. P.; GOPPO-NETO, L. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- LOPES, R. M., OLIVEIRA, T. T. DE, NAGEM, T. J. E PINTO, A. DE S. Flavonóides. **Biotechnol. Ciênc. Desenvolvimento**, v. 17, p. 18-22, 2000.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- LOUGHRIN, J. H.; KEMP, T. R. H.; BURTON, H. R.; ANDERSEN, R. A. Effect of diurnal sampling on the headspace composition of detached *Nicotiana suaveolens* flowers. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1417-1419, 1993.

LU, Y.; ZHAO, W. Z.; CHANG, Z.; CHEN, W. X.; LI, L. Procyanidins from grape seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxicity damage. **Acta Pharmacol. Sinica**, v. 25, n. 8, p. 1083-1089, 2004.

MANJEET, K. R.; GHOSH, B. Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 21, p. 435-443, 1999.

MANNICK, E. E.; BRAVO, L. E.; ZARAMA, G.; REALPE, J. L.; ZHANG, X. J.; RUIZ, B.; FONTHAM, E. T.; MERA, R.; MILLER, M. J.; CORREA, P. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effects of antioxidants. **Cancer Res.**, v. 56, n. 14, p. 3238-3243, 1996.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J. Ethnoph.**, v. 74, p. 105-112, 2001.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982.

MARLETTA, M. A.; PUFAHL, R. A. Oxidation of N^G-Hydroxy-L-arginine by nitric oxide synthase: evidence for the involvement of the heme in catalysis. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, v.193, p. 963-970, 1993.

MARQUES, M. F. **Molécula de óxido nítrico e a sua inter-relação com o fator de necrose tumoral- α na resposta imunológica induzida por *Styrax camporum* Pohl**. 2002. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, 2002.

MARTINS, P. M. **Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e na composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)**. Viçosa: 2000. 77p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa, 2000.

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed EUFC, Fortaleza, 1997.

MATTSON, W. J.; HAACK, R. A. The role of drought in outbreaks of plant-eating. **Bioscience**, v. 37, p. 110-118, 1987.

MATSUDA, H.; KAGEURA, T.; TOGUCHIDA, I.; MURAKAMI, T.; KISHI, A.; YOSHIKAWA, M. Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rhizome of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: absolute stereostructures of alismaketones-b 23-acetate and – c 23- acetate. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 9, p. 3081-3086, 1999.

MEHROTRA, S.; MISHRA, K. P.; MAURYA, R.; SRIMAL, R. C.; YADAV, V. S.; PANDEY, R.; SINGH, V. K. Anticellular and immunosuppressive properties of ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome. **Int. Immunopharmacol.**, v. 3, p. 53-61, 2003.

MEJDOUB, R.; KATSIOTIS, S. Factors influencing the yield nad the quality of the obtaining essential oil from the leaves of *Eucalyptus citriodora* Hook growing in Crete. **Scient. Pharm.**, v.66, p. 93-105, 1998.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

MENDOZA, L.; WILKENS, M.; URZUA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 58, p. 85–88, 1997.

METHE, H.; ZIMMER, E.; GRIMM, C.; NABAUER, M.; KOGLIN, J. Evidence for a role of toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. **Transplantation**, v. 78, n. 9, p. 1324-1331, 2004.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe, 1999.

MILLER, A. L. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. **Alternative Med.**, v.1, p. 103-111, 1996.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n.2, p. 109-142, 1991.

MOREIRA, E. A.; CECY, C.; NAKASHIMA, T.; FRANKE, T. A.; MIGUEL, O. G. O óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F.V.M. aclimatado no estado do Paraná-Brasil. **Tribuna Farm.**, Curitiba, v.48, n.1-2, p.44-54, 1980.

MORIKAWA, T.; TAO, J.; ANDO, S.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Absolute stereostructures of new arborinane-type triterpenoids and inhibitors of nitric oxide production from *Rubia yunnanensis*. **J. Natl. Prod.**, v. 66, p. 638-645, 2003.

MORRIS, J. A.; KHETTRY, A.; SEITZ, E. W. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.56, p. 595-603, 1979.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Method**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MÜLLER, J.; MÜHLBAUER, W. Effects of drying on the essential oil of Chamomile recutita. In: INTERNATIONAL JOINT SYMPOSIUM OF BIOLOGY AND CHEMISTRY OF ACTIVE NATURAL SUBSTANCES. 1990, Bonn. **Anais...** Bonn, 1990. p.155.

NATH, A.; CHATTOPADHYA, S.; CHATTOPADHYAY, U.; SHARMA, N. K. Macrophage inflammatory protein (MIP)1a and MIP1b differentially regulate release of inflammatory cytokines and generation of tumoricidal monocytes in malignancy. **Câncer Immunol. Immunother.** v. 55, p.1534–1541, 2006.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão: Norma Aprovada. 8.ed. Waive, Pennsylvania, 2003. (NCCLS documento M2-A8)

NEUVONEN, S.; HAUKIOJA, E.; MOLARIUS, A. Delayed inducible resistance against a leaf-chewing insect in four deciduous tree species. **Oecologia**, v. 74, p. 363-369, 1987.

NICHOLSON, S.; BONECINI-ALMEIDA, M. G.; LAPA E SILVA, J.R.; NATHAN, C.; XIE, Q. W.; MUMFORD, R.; WEIDNER, J. R.; CALAYCAI, J.; GENG, J.; BOECHAT, N.; LINHARES, C.; ROM, W.; HO, J. L. Inducible nitric oxide synthase pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 5, p. 2293-2302, 1996.

OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, S. M.; KODAMA, T.; KASHIMA, K.; IMANISHI, J. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. **Helicobacter**, v.8, p.207-215, 2003.

OKOLIE, P. N.; OBASI, B. N. Diurnal variation of cyanogenic glucosides, thiocyanate and rhodanese in cassava. **Phytochemistry**, v. 33, p. 775-778, 1993.

OPOKU, A. R.; GEHEEB-KELLER, M.; LIN, J.; TERBLAND, S. E.; HUTCHINGS, A. Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for antineoplastic activities versus the HepG2 cell line. **Phytother. Res.**, v. 14, p. 534-537, 2000.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 69, p. 1046–1055, 2006.

PALLADINO, M. A.; BAHJAT, F. R.; THEODORAKIS, E.; MOLDAWER, L. L. Anti TNF- α therapies: the next generation. **Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 736-746, 2003.

PALÁ-PAÚL, J.; PÉREZ-ALONSO, M. J.; VELASCO-NEGUERUELA, A.; PALÁ-PAÚL, R.; SANZ, J.; CONEJERO, F. C. O. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *Rosmarinifolia*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 29, p. 663-672, 2001.

PARHAM, P. **O sistema imune**. São Paulo, Artemed, 2001. p. 372.

PARSLOW, T. G.; BAINTON, D. F. Imunidade Inata. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Imunologia médica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **J. Ethnopharmacol.**, v.110, p. 323–333, 2007.

PAULI, A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. **Med. Res. Rev.**, v. 26, p. 223–268, 2006.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. p. 111-140.

PERRY, N. S.; BOLLEN, C.; PERRY, E. K.; BALLARD, C. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 75, p. 651–659, 2003.

PHILLIPSON, J. D. 50 years of medicinal plant research – every progress in methodology is a progress in science. **Planta Med.**, Stuttgart, v. 69, p. 491-495, 2003.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**, v. 311, p. 808–811, 2006.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Method**, v. 38, p. 161-170, 1980.

PICK, E.; MIZEL, D. J. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Method**, v. 46, p. 211-226, 1981.

PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 14, n. 3, p. 255-281, 1986.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

PITAROKILI, D.; TZAKOU, O.; LOUKIS, A.; HARVALA, C. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 3294–3301, 2003.

POLLE, A.; MÖSSNANG, M.; SCHÖNBORN, A.; SLADKOVIC, R.; RENNENBERG, H. Field studies on Norway spruce trees at high altitudes. I. Mineral, pigment and soluble protein contents of needles as affected by climate and pollution. **New Phytol.**, v. 121, p. 89-99, 1992.

PUNTUREE, K.; WILD, C. P.; VINITKETKUMNEUN, U. Thai medicinal plants modulate nitric oxide and tumor necrosis factor- α in J774.2 mouse macrophages. **J. Ethnopharmacol.**, v. 95, p. 183-189, 2004.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REICHLING, J.; KOCH, C.; STAHL-BISKUP, E.; SOJKA, C.; SCHNITZLER, P. Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. **Planta Med.**, v. 71, p. 1123–1127, 2005.

RIMBACH, G.; PARK, Y.C.; GUO, Q.; MOINI, H.; QURESHI, N.; SALIOU, C.; TAKAYAMA, K.; VIRGILI, F.; PACKER, L.; Nitric oxide synthesis and TNF- α secretion in Raw 264.7 macrophages: mode of action of a fermented papaya preparation. **Life Sci.**, v. 67, p. 679-694, 2000.

ROCA-PÉREZ, L.; BOLUDA, R.; GAVIDIA, I.; PÉREZ-BERMÚDEZ, P. Seasonal cardenolide production and Dop5 β r gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1869-1878, 2004.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 327p.

ROBINSON, T. Metabolism and function of alkaloids in plants. **Science**, v. 184, p. 430- 435, 1974.

ROBLES, M.; AREGULLIN, M.; WEST, J.; RODRIGUEZ, E. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. **Planta Med.**, v. 61, p. 199-203, 1995.

RODRIGUEZ, E. Sesquiterpene lactones: chemotaxonomy, biological activity and isolation. **Rev. Latinoamer. Quim.**, v. 8, p. 56-62, 1977.

ROSA, E. A. S.; HEANEY, R. K.; REGO, F. C.; FENWICK, G. R. The variation of glucosinolate concentration during a single day in young plants of *Brassica oleracea* var *acephala* and capitata. **J. Sci. Food Agric.**, v. 66, p. 457-463, 1994.

ROTA, C.; CARRAMINANA, J. J.; BURILLO, J.; HERRERA, A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. **J. Food Prot.**, v. 67, p. 1252–1256, 2004.

RUDLOFF, E. V.; KELLER, R. A. Gas-liquid: advances in chromatography of terpenes. In: GIDDINGS, J.C. **Chromatography**, v. 10, p.173-229, 1974.

RYU, J. H.; AHN, H.; KIM, J. Y.; Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. **Phytoth. Res.**, v. 17, p. 485-489, 2003a.

RYU, J. H.; AHN, H.; JIM LEE, H.; Inhibition of nitric oxide production on LPS-activated macrophages by kazinol B from *Broussonetia kazinoki*. **Fitoter.**, v.74, p. 350-354, 2003b.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. **Food Chem.**, v. 91, p. 621–632, 2005.

SAITO, S. M. **Estudo farmacognóstico de *Melampodium camphoratum* (L.f.) Backer – Asteraceae**. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SAKURAI, H.; KOHSAKA, H.; LIU, M. F.; HIDASHIYAMA, H.; HIRATA, Y.; KANNO, K.; SAITO, I.; MYASAKA, N. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthrides. **J. Clinical Investigation**, v. 96, p. 2357-2363, 1995.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4th ed. Wadsworth Publishing Co.: Belmont, 1991.

SANCHES, A. C. C. **Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos**. Araraquara, 2004. 214f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2004.

SANTOS, A. L.; RIPOLL, D.; NARDI, N.; BASSANI, V. L. Immunomodulatory effect of *Achyrocline satureioides* (LAM.) D.C. aqueous extracts. **Phytother. Res.**, v. 13, p. 65-66, 1999.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, M. G.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/ Editora da UFSC, 2001.

SCHINDLER, H.; BOGDAN, C. NO as a signaling molecule: effects on kinases. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1, p. 1443-1455, 2001.

SCHMIDT, T. J.; BOMME, U.; ALFERMANN, A. W. Sesquiterpene lactone content in leaves of in vitro and field cultivated *Arnica Montana*. **Planta Med.**, v. 64, p. 268-270, 1998.

SCHÜNGEL, J.; PASSREITER, C. M. New diacylated 2-hydroxythymol derivatives from *Melampodium divaricatum*. Zeitschrift Fur Naturforschung C—A. **J. Biosci.**, v. 57, p.966–968, 2000.

SCHWOB, I.; BESSIERE, J. M.; MASOTTI, V.; VIANO, J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, p. 735-745, 2004.

SERTIÉ, J. A. A.; BASILLE, A. C.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. P.; PENNA, E. C. Pharmacological assay of *Cordia verbenaceae* III: Oral and optical anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. **J. Ethnopharmacol.**, v.31, p. 239-247, 1991.

SHANKEL, D. M.; KUO, S.; HAINES, C.; MITSCHER, L. A. Extracellular interception of mutagens. **Basic Life Sci.**, v. 61, p. 65–74, 1993.

SHARP, H.; BARTHOLOMEW, B.; BRIGHT, C.; LATIF, Z.; SARKER, S. D.; NASH, R. J. 6-Oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v.29, p.105-107, 2001.

SHIBUKI, K. Nitric oxide: a multi-functional messenger substance in cerebellar synaptic plasticity. **Seminars in Neuroscience**, v. 5, p. 217-223, 1993.

SHIMIZU, M. T.; MARQUES, M. O. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; RODRIGUES, R. F. O.; CARVALHO JR, P. M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenaceae* D.C. **J. Ethnopharmacol.**, v.95, p. 297-301, 2004.

SHIN, K. M.; KIM, Y. H.; PARK, W. S.; KANG, I.; HA, J.; CHOI, J. W.; PARK, H. J.; LEE, K. T. Inhibition of methanol extract from the fruits of *Kochia scoparia* on lipopolysaccharide-induced nitric-oxide, prostaglandin e2, and tumor necrosis factor- α production from murine macrophage raw 264.7 cells. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 27, n. 4, p. 538-543, 2004.

SI, W.; GONG, J.; TSAO, R.; ZHOU, T.; YU, H.; POPPE, C.; JOHNSON, R.; DU, Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **J. Appl. Microbiol.**, v. 100, p. 296–305, 2006.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUZA, M. C.; HENRIQUES, M. G.M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biotechnol. Ciênc. Desenvolvimento**, v.16, p.38-43, 2000.

SIKKEMA, J.; DEBONT, J. A.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **J. Biol. Chem.**, v.269, p. 8022-8028, 1994.

SIKKEMA, J.; DEBONT, J. A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Review**, v. 59, p. 201-222, 1995.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUZA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **J. Ethnopharmacol.**, v.89, p. 277-283, 2003.

SILVA, M. G. V.; CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; ALENCAR, J. W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, p. 32-34, 1999.

SILVA, P. Princípios farmacológicos da antibioticoterapia. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p.931-948.

SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais**. Viçosa: Arte e Livros, 2000. 135p.

SILVA, R.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DINIZ, K. A. Teores de óleos essenciais de folhas frescas e secas em diferentes estados de divisão de cidrão (*Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton)). In: CONGRESSO DOS PÓS-GRADUANDOS DA UFLA, 8. 2004, Lavras. **Anais...** Lavras, 2004. p.43.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004. 821p.

SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A, PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.6. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2004. 821p.

SLIMESTAD, R. Amount of flavonols and stilbenes during needle development of *Picea abies*; variations between provenances. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 26, p. 225-238, 1998.

SOLIMAN, K. F.; MAZZIO, E. A. *In vitro* attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 218, p. 390-397, 1998.

SOUZA, M. M.; CRUZ, A. B.; SCHUMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: Bresolin, T. M. B. CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003.

SPRING, O.; BIENERT, U. J. Sesquiterpene lactones in glandular trichomes of sunflower leaves. **Plant Physiol.**, v. 130, p. 441-444, 1987.

STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLow, T. G. **Medical Immunology**. Stamford: Appleton & Lange, 1997. 320p.

STUEHR, D. J.; GRIFFITH, O. W. Mammalian nitric oxide syntheses. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.**, v. 65, p. 287-346, 1992.

SUMNER, J. **The natural history of medicinal plants**. Portland: Timber Press, 2000. 235p.

SUNDBERG, S. D.; STUESSY, T. F. Isolating mechanisms and implications for modes of speciation in *Heliantheae* (Compositae). In: MABRY, T. J.; WAGENITZ, G. Research advances in the Compositae. **Pl. Syts. Evol., Wien**, suppl. 4, p. 77-97, 1990.

TALPUR, N.; ECHARD, B.; INGRAM, C.; BAGCHI, D.; PREUSS, H. Effects of a novel formulation of essential oils on glucose-insulin metabolism in diabetic and hypertensive rats: a pilot study. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 7, p. 193–199, 2005.

TANIGUCHI, M.; KUBO, I. Ethnobotanical drug discovery based on medicine men's trials in the *African savanna*: screening of east African plants for antimicrobial activity II. **J. Natl. Prod.**, v. 56, p.1539–1546, 1993.

TATTINI, M.; GALARDI, C.; PINELLI, P.; MASSAI, R.; REMORINI, D.; AGATI, G. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare*. **New Phytol.**, v. 163, 547-561, 2004.

TAYLOR, R. S. L., F. EDEL, N. P. MANANDHAR; G. H. N. TOWERS. Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 50, p. 97–102, 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. **Microbiology**: an introduction. 17th. ed. New York: Addison Wesley Longman, 2001. p.549-575.

TSAI, S. H.; LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, J. K. Suppression of nitric oxide synthase and the downregulation of the activation of NFkappa B in macrophages by resveratrol. **Braz. I. J. Pharmacol.**, v. 126, n. 3, p. 673-680, 1999.

TSUCHIYA, H. M.; SATO, T.; MIYAZAKI, S.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, M.; OHYAMA, T.; TANAKA, T.; IINUMA, I. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 50, p. 27–34, 1996.

TURNER, B. L. A new species of *Melampodium* from Jalisco, México. **Phytologia**, v. 75, p. 136, 1993.

TURNER, B. L.; POWELL, A. M. Helenieae: systematic review. In: HEYWOOD, V. H.; HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L. Eds. **The biology and chemistry of the Compositae**. London: Academic Press, 1977. v.2, p. 699-737.

TYLER, V. E.; BRADY, L. R.; ROBBERS, J. E. **Pharmacognosy**. 9th. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1988.

UNITED States Pharmacopea. 26th. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003.

URIBE, S.; RAMIREZ, J.; PENA, A. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. **J. Bacteriol.**, v. 161, p. 1195-1200, 1985.

VARANDA, E. A.; NOGUEIRA, M. E. I.; PASSONI, M. H.; BISO, F. I.; LONGO, M. C.; CARDOSO, C. R. P.; SANTOS, L. C. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicol. Vitro**, v. 20, p. 361–366, 2006.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; ROSAS, E. C.; CARVALHO, M. V.; HENRIQUES, M. G. M. O.; PINTO, A. C. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne: A comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, p. 248-254, 2007.

VENSKUTONIS, P. R. Effect of drying on the volatile constituents of thyme (*Thymus vulgaris* L.) and sage (*Salvia officinalis* L.). **Food Chem.**, v.59, n.2, p.219-227, 1997.

VIGO, C. L. S.; NATIRA, E.; MARQUES, L. C. Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n. 2, p. 137-144, 2004.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **Óleo essencial de eucalipto**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, 2003. 26f. (Documentos,17).

VODOVOTZ, Y.; LUCIA, M. S.; FLANDERS, K. C.; CHESLER, L.; XIE, Q. W.; SMITH, T. W.; WEIDNER, J.; MUMFORD, R.; WEBBER, R.; NATHAN, C.; ROBERTS, A.B.; LIPPA, C. F.; SPORN, M.B. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients Alzheimer’s disease. **J. Exp. Med.**, New York, v. 184, n. 4, p. 1425-1433, 1996.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 7. ed. Berlin: Ullstein Mosby, 1993

VOIRIN, B.; BRUN, N.; BAYET, C. Effects of daylength on the monoterpene composition of leaves of *Mentha x piperita*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 749-755, 1990.

WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984. 303p.

WANG, C. C.; HUANG, Y. J.; CHEN, L. G.; LEE, L. T.; YANG, L. L. Inducible nitric oxide syntase inhibitors of chinese herbs III. *Rheum palmatum*. **Planta Méd.**, v. 68, p. 869-874, 2002.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Rev. Fac. Farm. Bioquím.**, São Paulo, v. 1, p. 7-81, 1963.

WATERMAN, P. G. The chemistry of volatile oils. In: HAY, R. K. M.; WATERMAN, P. G. Eds. **Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production**. Harlow: Longman Scientific, Technical, 1993.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Em Insect-plant interactions**; Bernays, E. A., ed. 1st ed., CRS Press: Boca Raton, vol. 1, 1989.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1994.

WILLIAMS, A.; BARRY, B. Penetration enhancers. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 56, p. 603–618, 2004.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. **Alternat. Med. Rev.**, v.6, n.6, p. 567-579, 2001.

WILT, F. M.; MILLER, G. C. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentrations in persistent leaves of wyoming big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *wyomingensis*: Asteraceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 20, p. 53-67, 1992.

WIRTHENSOHN, M. G.; SEDGLEY, M. Effect of pruning on regrowth or cut foliage stems of seventeen *Eucalyptus* species. **Aust. J. Exp. Agric.**, v.38, p.631-636, 1998.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apic. Res.**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regional office for the western pacific research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines**. Manila, 1998.

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

YAMAGUCHI, H. Immunomodulation by medicinal plants. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 319, p. 287-297, 1992.

YAMAURA, T.; TANAKA, S.; TABATA, M. Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in thyme seedlings. **Phytochemistry**, v. 28, p. 741-744, 1989.

YOON, H. S., MOON, S. C., KIM, N. D., PARK, B. S., JEONG, M. H., YOO, Y. H. Genistein induces apoptosis of RPE-J cells by opening mitochondrial PTP. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 276, p.151–156, 2000.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova**, v.24, n.1, p. 147-152, 2001.

ZAUPA, C.; CARRASCHI, L.; SILVA, E. A.; CHANCKE, A. L. S.; USHIROBIRA, T. M. A.; MARQUES, L. C. Controle de qualidade farmacobotânico e legal de fitoterápicos comercializados nas farmácias de Maringá (PR). **Rev. Racine**, v.58, p. 32–37, 2000.

ZHENG, Z.; WU, M. Cadmium treatment enhances the production of alkaloid secondary metabolites in *Catharanthus roseus*. **Plant Sci.**, v. 166, p. 507-514, 2004.

ZIDORN, C.; STUPPNER, H. Evaluation of chemosystematic characters in the *Genus leontodon* (Asteraceae). **Taxon**, v. 50, p. 115-133, 2001.

ZORZETTO, R. Ataque contra o Pânico. **Pesquisa FAPESP**, v. 84, p. 30-35, 2003.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A, PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.6. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2004. 821p.

ZWILLING, B. S.; EISENSTEIN, T. K. **Macrophage-pathogen interactions**. New York: Marcel Dekker, 1994.

Apêndice



Protocolo CEP/FCF/CAR. nº 18/2007 – Animais em Pesquisa

Interessado: GRACE PRISCILA PELISSARI

Orientador: Profa. Dra. RAQUEL REGINA DUARTE MOREIRA

Projeto: Estudos farmacognósticos e atividade antimicrobiana e imunológica de *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC ("falsa-calêndula") (Asteraceae)

Parecer nº 41/2007 – Comitê de Ética em Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, considera o protocolo para uso de animais na pesquisa: Estudos farmacognósticos e atividade antimicrobiana e imunológica de *Melampodium divaricatum* (Rich. In Pers.) DC ("falsa-calêndula") (Asteraceae), estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa, com no máximo três folhas (espaço 1,5 e letra 12) deverá ser entregue em março de 2008.

Araraquara, 21 de dezembro de 2007.

Profa. Dra. MARIA VIRGINIA C. SCARPA
Coordenadora do CEP