



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JACQUELINE MIRANDA GONÇALVES

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Achyrocline satureoides*
(Lam) DC. E *Ageratum conyzoides* L. ENCONTRADAS NO
SEMIÁRIDO BAIANO.**

FEIRA DE SANTANA, BA

2015

JACQUELINE MIRANDA GONÇALVES

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Achyrocline satureoides*
(Lam) DC. E *Ageratum conyzoides* L. ENCONTRADAS NO
SEMIÁRIDO BAIANO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,
da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro.

Co-orientador (a): Profa. Dra. Angélica Maria Luchese

FEIRA DE SANTANA, BA

2015

BANCA EXAMINADORA

Dr. Lucas Miranda Marques
(Universidade Federal da Bahia)

Dr. Paulo José Lima Juíz
(Universidade Federal do Recôncavo da Bahia)

Dra. Raquel Guimarães Benevides
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

Dra. Regiane Yatsuda
(Universidade Federal da Bahia)

Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro
(Universidade Estadual de Santa Cruz)
Orientadora e Presidente da Banca

FEIRA DE SANTANA, BA
2015

Dedico este trabalho aos meus pais. Mota e Zildete, ao meu irmão Cleber, ao meu amor e companheiro Willian e meu querido sobrinho Davi.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por sempre guiar cada passo desta jornada e a Santo Antonio meu amigo fiel, que me deu força, coragem, ânimo, sabedoria, para superar as dificuldades e chegar até este dia tão importante em minha vida....minha defesa!

Aos meus pais, pelo exemplo de vida e amor e por abdicarem dos seus próprios sonhos e necessidades para me proporcionar sempre uma excelente educação e por me incentivar a buscar cada vez mais a qualificação profissional.

Ao meu irmão Cleber, meu amigo, como eu te admiro e respeito, obrigada por estar sempre comigo.

Ao meu amor Willian, por me acompanhar, me dar força, coragem, incentivo, segurar em minha mão e dizer: vamos....você vai conseguir, sempre me tranquilizando e acreditando na minha capacidade.

Meu sobrinho Davi, que enche minha vida de luz e alegria!

À professora Doutora Ana Paula Trovatti, a quem eu devo um agradecimento muito especial, pela orientação, por acreditar no meu trabalho, pelo respeito, a amizade em todos os momentos. Obrigada Ana!!!

À professora Doutora Angélica, pela grande ajuda nas dúvidas, dificuldades e pelo apoio em todas as etapas deste trabalho, sempre orientando o meu caminho, muito obrigada!!!.

Aos professores da UFBA, Professor Dr Vittor Silva e A Professora Doutora Soraya Trindade pela orientação da parte citotóxica e imunomoduladora, respectivamente.

À professora Edmayre Côelho pela grande ajuda na parte geográfica, ao professor Gabriel com os mapas das áreas de coleta, nunca li tanto sobre pluviosidade e vegetação! Ao professor Maurício Lordelo por toda a parte estatística, sempre muito solícito nas dificuldades destas probabilidades, obrigada.

Agradeço também a Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) por fornecer as estruturas físicas para a realização dos meus experimentos, o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) e o Laboratório de Produtos Naturais (LAPRON);

A todos os estagiários, professores e funcionários do Laboratório de pesquisa em Microbiologia (LAPEM), em especial, os Professores Doutores Aristóteles Góes e Helio Kamida, as funcionárias: Suzana, Clarissa e em especial, Goretti, pela sua dedicação e competência na esterilização dos instrumentos de trabalho utilizados no LAPEM e aos biólogos: Gisele, João Ronaldo (obrigada pelas fotos).

A todos os estagiários, professores e funcionários do Laboratório de pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON), em especial a bióloga Edna Peralta, sempre solícita a ajudar em todas as etapas desta pesquisa, as estagiárias Larissa e em especial Adriane que mesmo sem me conhecer se dispôs a me ajudar na hidrodestilação ficando até mais tarde, caso fosse necessário. Muito Obrigada!

À mestrande da UESC Ariely Cruz pelo apoio e ajuda durante os experimentos da Citotoxicidade e Elisa e pela convivência agradável e divertida.

A cada um dos meus alunos, por compreenderem e respeitarem as minhas ausências, e por terem orgulho do meu trabalho.

Ao Projeto Sempre Viva, localizado no município de Mucugê- BA por disponibilizar suas dependências para a realização das coletas de campo das espécies estudadas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC (UEFS) / FIOCRUZ- pela minha formação Acadêmica.

A todos aqueles que estiveram ao meu lado durante esse período, serei eternamente grata pelo apoio, compreensão, dedicação, companheirismo.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram de alguma forma a conquistar essa vitória!

Muito obrigada!

"Não faças do amanhã, o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo, que nunca mais. Teus passos ficaram. Olhes para trás...mas vá em frente pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te. "

Charles Chaplin

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE TABELAS | 10 |
| LISTA DE FIGURAS | 11 |
| LISTA DE EQUAÇÕES | 13 |
| RESUMO | 14 |
| ABSTRACT | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 OBJETIVOS | 18 |
| 1.1.1 OBJETIVO GERAL | 18 |
| 1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 18 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 19 |
| 2.1 PLANTAS MEDICINAIS: CONTEXTO HISTÓRICO..... | 19 |
| 2.2. ÓLEOS ESSENCIAIS: CONCEITO, OCORRÊNCIAS, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA..... | 24 |
| 2.2.2 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS..... | 27 |
| 2.2.2.1 FATORES INTRÍSECOS..... | 27 |
| 2.2.2.2 FATORES EXTRÍNSECOS..... | 28 |
| 2.2.3.COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS..... | 31 |
| 2.3.METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 32 |
| 2.4. A FAMÍLIA ASTERACEAE NA MEDICINA TRADICIONAL | 37 |
| 2.4.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM ASTERACEAE..... | 38 |
| 2.4.2.ASPECTOS BOTÂNICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS: <i>Achyrocline satureoides</i> e <i>Ageratum conyzoides</i> L. | 43 |
| 2.5.SISTEMA IMUNOLÓGICO..... | 52 |
| 2.5.1.IMUNIDADE INATA. | 53 |
| 2.5.2.NEUTRÓFILO:PRIMEIRA LINHA DE DEFESA CONTRA PATÓGENOS EXTRACELULARES..... | 54 |
| 2.5.3.MONÓCITOS/MACRÓFAGOS: FAGOCITOSE, RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS E PRODUÇÃO DE CITOCINAS. | 54 |
| 2.5.4. CÉLULAS NK (NATURAL KILLER): IMPORTANTES CONTRA INFECÇÕES VIRAIS E TUMORES. | 55 |

| | |
|---|------------|
| 2.5.5.IMUNIDADE ADAPTATIVA..... | 55 |
| 2.6 CITOCINAS..... | 56 |
| 2.6.1.INTERLEUCINA 8..... | 57 |
| 2.6.2.INTERLEUCINA 10..... | 57 |
| 2.6.1.INTERLEUCINA 12..... | 58 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 60 |
| 3.1 DESENHO DO ESTUDO..... | 60 |
| 3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO, MATERIAL BOTÂNICO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES..... | 62 |
| 3.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL..... | 66 |
| 3.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA..... | 69 |
| 3.4.1.CROMATOGRAFIA GASOSA..... | 69 |
| 3.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA..... | 70 |
| 3.5.1 CULTURA DE CÉLULAS E TRATAMENTO..... | 71 |
| 3.5.2 BIOENSAIO DO MTT (VIABILIDADE CELULAR)..... | 72 |
| 3.6 MICRO-ORGANISMOS TESTES..... | 73 |
| 3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 74 |
| 3.7.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA..... | 74 |
| 3.7.2 CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA..... | 76 |
| 3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS..... | 76 |
| 3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 77 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 78 |
| 4.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL..... | 78 |
| 4.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA..... | 79 |
| 4.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA..... | 84 |
| 4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA (CMM)..... | 87 |
| 4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS..... | 94 |
| 5.CONCLUSÕES..... | 98 |
| REFERÊNCIAS..... | 100 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1. Características de alguns grupos de princípios ativos em plantas medicinais..... | 34 |
| TABELA 2. Triagem fitoquímica de extratos aquosos e etanólicos das espécies <i>Gossypium hirsutum</i> (algodão); <i>Polygonum hydropiperoides</i> (erva de bicho); <i>Ageratum conyzoides</i> L. (mentrasto) e <i>Phyllanthus tenellus</i> (quebra pedra).. | 51 |
| TABELA 3. Composição química quantitativa dos óleos essenciais de <i>Achyrocline satureoides</i> (Flor). | 81 |
| TABELA 4. Composição química quantitativa dos óleos essenciais de <i>Ageratum conyzoides</i> (Folha). | 82 |
| TABELA 5. Resultados das concentrações inibitórias mínimas (mg.mL ⁻¹) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), em (mg.mL ⁻¹) dos Óleos essenciais de <i>A. conyzoides</i> e <i>A. satureoides</i> | 89 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em Plantas..... | 33 |
| Figura 2. Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos..... | 35 |
| Figura 3. Inflorescência da espécie <i>Achyrocline satureoides</i> | 43 |
| Figura 4. <i>Achyrocline satureoides</i> (Lam.) DC..... | 45 |
| Figura 5. Inflorescência da espécie <i>Ageratum conyzoides</i> | 48 |
| Figura 6. <i>Ageratum conyzoides</i> L..... | 49 |
| Figura 7. Principais funções das citocinas..... | 59 |
| Figura 8. Mapa da Área de Coleta..... | 62 |
| Figura 9. Mapa do tipo de vegetação da área de Coleta..... | 63 |
| Figura 10. Fotos das espécies coletadas: A- <i>Ageratum conyzoides</i> , B- <i>Achyrocline satureoides</i> | 65 |
| Figura 11. Técnicas de Herborização..... | 66 |
| Figura 12. Etapas para a obtenção dos óleos essenciais | 67 |
| Figura 13. Redução do sal tetrazólio (MTT) à formazana..... | 71 |
| Figura 14. Imagem microscópica das células HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) em alta densidade..... | 72 |

| | |
|---|----|
| Figura 15. Bioensaio do MTT (Viabilidade Celular)..... | 73 |
| Figura 16. Determinação da CIM utilizando-se uma pipeta automática multicanal .. | 74 |
| Figura 17. Esquema da placa de 96 poços para determinação da CIM..... | 75 |
| Figura 18. Viabilidade celular da linhagem HT 29 após tratamento com os óleos essenciais das Flores de <i>Achyrocline satureoides</i> e Folhas de <i>Ageratum conyzoides</i> nas concentrações de 2,5; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL..... | 85 |
| Figura 19. Mtt das Flores de <i>A. satureoides</i> (AS) e Folhas de <i>A. conyzoides</i> (AC) . | 86 |
| Figura 20. Avaliação da Atividade Antimicrobiana do óleo essencial de <i>A. satureoides</i> e <i>A.conyzoides</i> contra duas cepas de <i>S. aureus</i> (CCMB 262 e 263) e uma levedura <i>C. kruzei</i> (CCMB 287)..... | 91 |
| Figura 21. Produção de Interleucina IL 8 por células Adenocarcinoma de cólon humano (HT 29) estimuladas por 48 horas com os óleos essenciais das Flores de <i>Achyrocline satureoides</i> e Folhas de <i>Ageratum conyzoides</i> nas concentrações de 2,5; 25 e 100 µg/mL.. .. | 95 |
| Figura 22. Produção de Interleucina IL 12 por células Adenocarcinoma de cólon humano (HT 29) estimuladas por 48 horas com os óleos essenciais das Flores de <i>Achyrocline satureoides</i> e Folhas de <i>Ageratum conyzoides</i> nas concentrações de 2,5; 25 e 100 µg/mL.... | 96 |

LISTA DE EQUAÇÕES

| | |
|--|----|
| EQUAÇÃO 1. Cálculo do rendimento de óleos essenciais..... | 68 |
| EQUAÇÃO 2. Cálculo do Índice Aritmético..... | 69 |
| EQUAÇÃO 3. Cálculo do Índice de Kovats..... | 70 |

RESUMO

Os óleos essenciais são misturas complexas de metabólitos secundários isolados de diversas plantas. Devido ao aumento do uso destes compostos aromáticos, pesquisas vêm sendo desenvolvidas, além do desenvolvimento de novos produtos. O presente trabalho analisou as atividades antimicrobiana, citotóxica e imunomoduladora, além do perfil fitoquímico de óleos essenciais de *Achyrocline satureoides* e *Ageratum conyzoides*. Os micro-organismos mais sensíveis aos óleos foram *Staphylococcus aureus* CCMB 262 e *Candida kruzei* CCMB 287. O óleo essencial de *A. conyzoides* foi considerado atóxico nas condições testadas. Em relação à avaliação da resposta imune induzida pelos óleos, apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações testadas e o controle, pôde-se observar que os óleos essenciais inibiram a produção das citocinas IL-8 e IL-12, com exceção da espécie *A. satureoides* na concentração de 100 µg/mL. Este comportamento pode sugerir a capacidade de redução da resposta inflamatória. As análises cromatográficas dos óleos essenciais de *A. satureoides* demonstrou um perfil químico em concordância com a literatura onde os componentes majoritários foram α -Pinenos, E-Cariofileno, α -Copaeno, α -Humuleno, d-Cadineno. Já as análises dos óleos de *A. conyzoides* apresentou resultados divergentes da literatura o que nos sugere um novo quimiotipo, uma vez que não foi observada a presença de precocenos nas análises químicas

Palavras-chave: Óleos voláteis. Asteraceae. Atividades Biológicas.

ABSTRACT

Essential oils are complex mixtures of various isolates of plant secondary metabolites. Due to the increased use of these aromatic compounds, research has been developed, and the development of new products. This study analyzed the antimicrobial, cytotoxic and immunomodulatory activities in addition to the phytochemical profile of essential oils *Achyrocline satureoides* and *Ageratum conyzoides*. The micro-organisms most sensitive to oils were *Staphylococcus aureus* CCMB 262 and *Candida kruzei* CCMB 287. The essential oil of *A. conyzoides* was considered non-toxic in the tested conditions. In the assessment of the immune response induced by oils, although they were not statistically significant differences between the concentrations tested and control, it was observed that the essential oils inhibited the production of IL-8 and IL-12 cytokines with exception of the species *A. satureoides* at a concentration of 100 mg / mL. This behavior may suggest the capacity reduction of the inflammatory response. The chromatographic analysis of essential oils of *A. satureoides* demonstrated a chemical profile consistent with the literature where the major components were α -Pinene, E-caryophyllene, α -copaene, α -humulene, d-cadinene. Since the analysis of oils *A. conyzoides* showed conflicting results in the literature which suggests a new chemotype, since the presence of precocenos the chemical analysis was not observed.

Keywords: volatile oils. Asteraceae. Biological Activity.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são misturas complexas de metabólitos secundários isolados de diversas plantas. Caracterizam-se por possuir odor forte e serem líquidos voláteis, límpidos e raramente coloridos, podendo ser sintetizados por todos os órgãos das plantas. Nestas misturas encontram-se de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, geralmente havendo dois a três constituintes em maior concentração (principais), que em geral determinam as propriedades biológicas, e outros em concentrações traço (ESCOBAR et al., 2010). Os OEs são conhecidos por seu poder antisséptico, bactericida, virucida e fungicida, e são muito usados na preservação de alimentos. Óleos essenciais, ou seus constituintes, possuem largo espectro farmacológico, sendo utilizados como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, antiespasmódicos e remédios para anestesia local, funcionando também como antihelmínticos e antiprotozoários (BASSOLÉ e JULIANI., 2012; YORK et al., 2012).

Desde o início da sua existência, o Homem viu nas plantas o seu meio de sobrevivência, tanto na obtenção de alimento e vestuário quanto na sua defesa e cura de enfermidades. Ele utilizou vários recursos da natureza, preparando formulações que amenizassem os problemas relacionados com a saúde, numa busca incansável da cura. Por meio de tentativas, com erros e acertos, foi descobrindo a ação biológica das plantas e determinando assim quais seriam alimentos, venenos e remédios (WALKER, 2013).

O Brasil possui a mais rica flora do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas o que representa quase 19% da flora mundial. Entretanto, mesmo apresentando a maior diversidade vegetal do mundo, apenas 8% do total de espécies no país foi estudado para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 tiveram sua propriedade medicinal avaliada (OLIVEIRA et al., 2010).

Devido ao uso destes compostos aromáticos, pesquisas incentivando o desenvolvimento de novos produtos baseados em plantas aromáticas estão sendo cada vez mais difundidas no meio científico, comprovando suas propriedades como moléculas biologicamente ativas. A partir disso, nota-se um aumento na demanda por matérias-primas produtoras de óleos essenciais, a garantia de qualidade dos produtos obtidos, maior disponibilidade comercial dos óleos essenciais e, conseqüentemente, uma sistematização da produção em larga escala. Observa-se

que a maioria dos estudos de desenvolvimento de tecnologia relativo a esta área do conhecimento ainda são realizados em escala laboratorial (BARROSO, 2011).

Os óleos essenciais são encontrados nas várias estruturas secretoras especializadas das plantas, tais como: pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae) ou canais oliíferos (Apiaceae) e são especialmente encontrados nas famílias: Asteraceae, Laminaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rutaceae e Apiaceae. Sua função envolve sinais de comunicação química no reino vegetal e atuam como armas de defesa química contra o reino animal. Nem todos os vegetais produzem óleos essenciais, é raro encontrá-los em Gimnospermas (com exceção das coníferas) e Angiospermas monocotiledôneas (FRANCO, COSTA & NAKAJIMA, 2014). Para Vaz (2014), Asteraceae é uma das famílias com maior sucesso na produção de compostos de defesa e esse seria um dos motivos de sua distribuição cosmopolita. A presença de poliacetilenos e lactonas sesquiterpênicas tem proporcionado o estudo da família Asteraceae quanto à sua composição química e atividade biológica.

A Região do semiárido ainda é uma área pouco explorada quanto ao seu potencial biotecnológico e, por isso, se constitui em um ambiente de grande interesse na prospecção de novas moléculas com atividade biológica, em especial as plantas endêmicas. Devido à escassez de trabalhos sobre a atividade antimicrobiana de espécies da Família Asteraceae para esta região, esta pesquisa contribuiu para ampliar o conhecimento das propriedades antimicrobianas das espécies *Achyrocline satureoides* (Lam) DC e *Ageratum conyzoides* L., endêmicas e potencialmente exploráveis, que poderão contribuir na descoberta de novos medicamentos fitoterápicos, auxiliando para a melhoria da qualidade de vida da população em termos de saúde e contribuir para a descoberta das novas possibilidades que contribuem para o desenvolvimento de novos fármacos.

O presente estudo foi a continuação da pesquisa de mestrado das espécies que apresentaram o melhor desempenho de atividade antimicrobiana com os extratos testados. Entretanto, foi-se ampliado para atividades biológicas este estudo bem como mudada a forma de extração, agora óleo essencial e a identificação fitoquímicas das duas espécies estudadas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o potencial biotecnológico dos óleos essenciais das flores de *Achyrocline satureoides* (Lam) DC. e folhas de *Ageratum conyzoides* L. encontradas no semiárido baiano, prospectando atividades biológicas, tais como a: antimicrobiana, citotóxica e imunomoduladora, e sua composição química.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I – Determinar a composição química dos óleos essenciais das amostras das espécies vegetais selecionadas através da Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a um Detector de Ionização em Chama (CG/DIC) e Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM).

II – Analisar *in vitro* a citotoxicidade dos óleos essenciais extraídos das plantas estudadas frente a linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano (HT 29).

III – Verificar a atividade antimicrobiana de dos óleos essenciais de *A. satureoides* e *A. conyzoides* frente aos micro-organismos: *Escherichia coli* CCMB 261, *Escherichia coli* CCMB 284, *Salmonella sp.* CCMB 281; *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268; *Staphylococcus aureus* CCMB 262, *Staphylococcus aureus* CCMB 263; *Bacillus cereus* CCMB 282; *Candida albicans* CCMB 286; *Candida krusei* CCMB 287 e *Candida parapsilosis* CCMB 288, utilizando-se a microdiluição em placas para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM).

IV - Avaliar a expressão das citocinas (IL 10, IL 12 e IL 8) aos óleos essenciais das espécies em estudo sobre a linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PLANTAS MEDICINAIS: CONTEXTO HISTÓRICO

Planta medicinal pode ser definida como qualquer espécie vegetal cultivada ou não, utilizada para fins terapêuticos. Enquanto que o fitoterápico é todo o medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. Este é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2010). Segundo Lorenzi e Matos (2012), as plantas medicinais vêm sendo utilizadas desde os tempos mais remotos da humanidade até os dias atuais para a prevenção e recuperação da saúde sendo, todo o conhecimento propagado de geração em geração. As mais diversas doenças têm sido tratadas com chás, tinturas, cataplasmas e unguentos originados a partir das plantas.

O uso terapêutico da flora pelo homem é anterior à história escrita, sendo oralmente transmitido e acumulado na tradição dos povos antigos. O primeiro registro arqueológico do uso de plantas culturalmente importantes data de 60.000 anos, tendo sido encontrado em sepultamento humano localizado no Iraque. Descobertas arqueológicas apontam o uso de espécies psicoativas no Timor (Indonésia), datando em cerca de 11.000 anos A.C (ALLEN, 2012).

Parte do conhecimento médico dos egípcios antigos está registrada nos papiros denominados “Edwin Smith”, “Kahun” e “Ebers”. O papiro de Ebers (1550 A.C.), inicia-se com a afirmação “aqui começa o livro relativo à preparação dos remédios para todas as partes do corpo humano” (SAAD, 2013). Segundo Aboelsoud (2010), o documento é considerado como o primeiro tratado egípcio sobre o uso de plantas medicinais, descrevendo as aplicações médicas do ópio (*P. somniferum* L.), maconha (*Cannabis sativa* L.), mirra (*Commiphora myrrha* (T. Nees) Engl.), incenso (*Boswellia serrata* Roxb. ex Colebr.), sena (*Sena alexandrina* Mill.), hena (*Lawsonia inermis* L.) e babosa (*Aloe vera* (L.) Burm. f.).

A partir do Século VII a medicina Árabe inicialmente simples, passa a incorporar os conhecimentos médicos gregos e indianos tornando-se progressivamente mais complexa e passando a exercer grande influência nos séculos posteriores. A incorporação dos recursos terapêuticos gregos atingiu o seu auge no Século X, ponto no qual os principais textos de autoria de Galeno,

Hipócrates e Dioscórides dentre outros, já haviam sido traduzidos para o árabe. Em seu auge (Sec. VII e VIII), o Império Islâmico foi responsável pela transferência bem sucedida de vegetais entre o Sudeste da Ásia, Oriente Médio, Norte da África e Europa, enriquecendo a *Materia Medica* do mundo muçulmano com dezenas de espécies, incluindo o cominho negro, cedro, limão, berinjela, figo, alho, hena, cebola, arroz e melancia (SAAD, 2013).

No Brasil, a utilização de espécies vegetais bioativas é anterior ao Período Colonial, integrando as práticas tradicionais das diversas nações indígenas. Os relatos acerca da flora brasileira iniciaram-se logo após a descoberta. Na carta de Caminha, por exemplo, são citadas espécies vegetais e seus usos, dentre estas o urucum - *Bixa orellana* L.. Pedro Álvares Cabral observou entre os povos indígenas o uso de produtos de origem vegetal para alimentação, tratamento de doenças e finalidades cosméticas. Posteriormente, Gabriel Soares de Souza em seu “Tratado Descritivo do Brasil” de 1587, denomina os produtos empregados na medicina indígena como “árvores e ervas da virtude” (WALKER, 2013).

Um marco importante no registro das espécies medicinais brasileiras é a chegada dos jesuítas ao País. Por força do seu isolamento, as atividades da Companhia de Jesus não se limitavam apenas à catequese, atuando também no tratamento e cura de doenças. Os missionários dedicaram-se à elaboração de registros e tratados médicos e atuaram como boticários, médicos e enfermeiros. Desse modo, os jesuítas podem ser considerados como pioneiros na elaboração de uma Farmacopeia brasileira (POLLETO; WELTER, 2011).

A assimilação da medicina indígena pelos jesuítas não foi imediata. Diante de um sistema social que incluía práticas tidas como tabu na Europa, encararam os povos indígenas como bárbaros e, em uma visão demonológica, equipararam rituais e crenças Tupi à feitiçaria Europeia. Contudo, forçados pela escassez de médicos e medicamentos, foram gradualmente absorvendo o uso da flora nativa à medida que passaram a condenar não a terapêutica nela baseada, mas sim o seu emprego ritual. No Século XVII, tal assimilação cultural é expressa nos trabalhos do Irmão Pedro de Montenegro e do Padre Sigismundo Asperger, responsáveis pela catalogação das espécies vegetais e seus usos. A “*Materia Medica Misionera*”, de Pedro de Montenegro teve influência marcante sobre os Jesuítas, que não apenas produziram cópias do trabalho, mas também escreveram novos tratados e receituários sobre o mesmo tema (POLLETO; WELTER, 2011).

Ao longo do Sec. XVI, na medida em que a colonização adentrava sobre as regiões do Recôncavo Baiano, floresta Amazônica e zonas costeiras, informações acerca das espécies de plantas medicinais disponíveis, suas indicações e posologia eram sistematicamente observadas pelos missionários. Uma vez registrado, o conhecimento original era apropriado e adaptado pelos Padres jesuítas, de modo que pudessem elaborar suas próprias prescrições (WALKER, 2013).

O Brasil possui a mais rica flora do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas o que representa quase 19% da flora mundial. Entretanto, mesmo apresentando a maior diversidade vegetal do mundo, apenas 8% do total de espécies no país foi estudado para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 tiveram sua propriedade medicinal avaliada (OLIVEIRA et al., 2010). Dentro da biodiversidade brasileira, alguns exemplos importantes de plantas medicinais são: *Ilex paraguariensis* (mate), *Myroxylon balsamum* (bálsamo de Tolu), *Paullinia cupana* (guaraná), *Psidium guajava* (guava), *Spilanthes acmella* (jambu), *Tabebuia* sp. (lapacho), *Copaifera* sp. (copaíba), *Arnica montana* (arnica), *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão), *Peumus boldus* (boldo), *Curcuma longa* (açafrão, Zingiber zingiber (gengibre), (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

As plantas *Spiranthera odoratissima* (manacá), *Achyrocline satureioides* (marcela), *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão), apresentam compostos que lhes conferem atividade anti-inflamatória (BATISTA et al., 2012). As plantas *Baccharis trimera* (carqueja), *Bidens pilosa* (picão), *Matricaria recutita* (camomila) e *Calendula officinalis* (calêndula) são reconhecidas e amplamente utilizadas no tratamento de úlceras e feridas. O efeito cicatrizante já foi detectado nas espécies *Jatropha multifida* (flor-decoral), *Caryocar coriaceum* (pequi), *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Mauritia flexuosa* (buriti) (BATISTA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; BATISTA et al., 2012). Também, a atividade antimicrobiana já foi descrita nas espécies *Syzygium Cumini* (jambolão), *Eucalyptus citriodora* e *grandis* (eucalipto) e, *Cymbopogon citratus* (capim-cidreira).

Entretanto, mesmo diante de inúmeras pesquisas, as plantas medicinais brasileiras são consumidas por usuários e comerciantes, em sua maioria, com a existência de pouca ou nenhuma evidência científica sobre suas propriedades farmacológicas. Além disso, a toxicidade destas plantas é considerada um problema de saúde pública. Os efeitos colaterais dos fitoterápicos, possíveis adulterações e ação sinérgica são comuns. Outro fator a ser ressaltado é o de que as pesquisas

realizadas para avaliar o uso seguro de plantas e fitoterápicos são principiantes, bem como o controle de órgãos oficiais em relação à comercialização nas feiras, mercado e lojas de produtos naturais. Ainda assim, dados do Instituto Brasileiro de Plantas Mediciniais (IBPM) indicam que, no Brasil, o mercado de fitoterápicos movimenta cerca de 500 milhões de dólares anualmente. Cerca de apenas 37% dos alopáticos disponíveis são consumidos pela população brasileira uma vez que a maioria depende quase que somente de fitoterápicos (BANDEIRA et al., 2011).

O surgimento da “era verde” e a valorização pelo natural, fizeram com que aumentasse o uso das plantas medicinais nas últimas décadas. A utilização de produtos de origem vegetal tem se tornado uma nova opção terapêutica no combate a diversas doenças por apresentar maior segurança, eficácia e serem ambientalmente corretos, em comparação com produtos químicos sintéticos (LEE et al., 2011).

As plantas medicinais são consideradas importantes recursos terapêuticos para o tratamento da saúde humana, apresentando como vantagem o seu baixo custo, quando comparado ao desenvolvimento de novos fármacos sintéticos ou durante o uso tradicional, pois, essas muitas vezes são utilizadas como a única forma tratamento pela população carente. Neste sentido, o Ministério da Saúde Brasileiro, nos últimos anos, tem buscado estimular a inserção das práticas complementares de cuidado no sistema oficial de saúde. A implementação da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2013a) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (BRASIL, 2013b). Essas publicações têm como objetivo estimular o acesso às terapias complementares utilizando plantas medicinais, para o cuidado em saúde, de forma eficaz e segura. Outras publicações importantes são a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), do ano de 2010, contendo 71 plantas medicinais que devem ser objeto de pesquisa e implementação dos setores e serviços de saúde públicos brasileiros (BRASIL, 2011). Já a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 10, do ano de 2010, lista 66 plantas medicinais com comprovadas ações na saúde humana, que podem ser utilizadas e distribuídas pelos serviços de saúde, elucidando aspectos como dose, preparação e contraindicações. Desta forma, pode-se verificar o importante papel da fitoterapia na assistência à saúde da população, o que torna cada vez mais necessário, estudos que possam avaliar suas ações terapêuticas (PINTO et al., 2012).

O uso de plantas medicinais tem sido significativo nos últimos tempos. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que 80% da população mundial faz uso da medicina popular para a amenização ou cura de doenças. Assim, tem-se verificado um grande avanço científico no entendimento do mecanismo de ação de compostos químicos presentes nas plantas com ações medicinais, bem como seus potenciais tóxicos, como por exemplo, os flavonóides, alcaloides, terpenos, taninos e esteróis, sendo isto claramente observado pelo número de trabalhos científicos publicados nesta área em congressos e em periódicos nacionais e internacionais (LOPES et al. 2010).

Outra característica importante é o potencial terapêutico de seus representantes, onde, diferentemente de outras famílias de plantas, a Família Asteraceae possui espécies, que além da utilização na medicina popular, possuem grupos químicos com ação terapêutica e tóxica já comprovadas por estudos laboratoriais (SILVA et al. 2010).

Atualmente há uma variedade de medicamentos fitoterápicos com diversas finalidades, podendo não ser considerada terapêutica, devido ao uso irregular. As pesquisas com plantas medicinais estão sendo realizadas com maior intensidade, devido ao desenvolvimento da tecnologia e o interesse em confirmar o uso empírico desses medicamentos fitoterápicos (MARTINS et al., 2009).

O estudo de plantas medicinais raras ou pouco conhecidas está sendo novamente considerado de alta relevância, devido à redescoberta de que o elo existente entre plantas e saúde humana tem sido responsável pelo lançamento de uma nova geração de produtos terapêuticos baseados no uso de insumos vegetais, o que inclui medicamentos fitoterápicos, drogas botânicas baseadas em sistemas multicomponentes, suplementos dietéticos e alimentos funcionais (BRASIL, 2013).

A produção de drogas vegetais preconiza a observação de uma série de cuidados durante o processamento e entre eles incluem-se a secagem, o tipo de fragmentação mecânica e as condições de armazenamento. Na maioria dos casos, a secagem deve ser realizada imediatamente após a colheita, minimizando com isso as perdas de substâncias farmacológicas ativas que ocorrem devido à degradação enzimática associada à presença de água. Além disso, teores de água elevados favorecem o desenvolvimento de micro-organismos, comprometendo a qualidade do produto. A secagem permite também o armazenamento do produto por períodos

prolongados e facilita seu transporte, contribuindo para regular a oferta e comercialização de plantas (DE OLIVEIRA et al., 2011)

Para De Carvalho (2012), o crescente interesse ao uso de plantas medicinais está relacionado a vários fatores, entre eles o alto custo dos medicamentos industrializados, a crise econômica, a falta de acesso da população à assistência médica e farmacêutica e uma tendência dos consumidores em utilizar produtos de origem natural.

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS: CONCEITO, OCORRÊNCIAS, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.

Óleos essenciais (OEs) são misturas complexas de metabólitos secundários isolados de diversas plantas. Caracterizam-se por possuir odor forte e serem líquidos voláteis, límpidos e raramente coloridos, podendo ser sintetizados por todos os órgãos das plantas (ESCOBAR et al., 2010). Designam-se aromáticas as plantas que apresentam aroma ou perfume, geralmente agradável, que é proporcionado pelos óleos essenciais biosintetizados pela planta e armazenados em estruturas específicas (CUNHA et al., 2012). Nestas misturas encontram-se de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, geralmente havendo dois a três constituintes em maior concentração (principais), que em geral determinam as propriedades biológicas dos óleos essenciais, e outros em concentrações traço. Os constituintes são distribuídos em dois grandes grupos de origem biológica distintas: (a) terpenos e terpenóides, e (b) constituintes aromáticos e alifáticos, ambos caracterizados por baixo peso molecular. As vias biossintéticas relativas a terpenos e compostos aromáticos geralmente são separadas nas plantas, mas podem coexistir em algumas, com uma delas sendo a principal (BALDWIN, 2010).

Segundo Alviano e colaboradores (2012) o registro mais antigo que se conhece sobre a utilização de plantas aromáticas foi encontrado num túmulo do Neolítico (entre 5000 e 2500 anos A.C.) no qual se encontraram vestígios de um homem envolvido em plantas aromáticas, identificadas por restos de grãos de pólen. O autor cita que há cerca de quatro mil anos, os aborígenes do continente Australiano perceberam a utilidade das plantas aromáticas ricas em cineol, tais como os eucaliptos e as melaleucas, em particular a *Melaleuca alternifolia*, utilizada até hoje na terapêutica moderna.

No Paquistão foi descoberto um alambique em terra cozida em que possivelmente se destilavam plantas aromáticas, datado de 5.000 anos. O nome “Perfume”, que está associado às plantas aromáticas, deriva da palavra latina “per fumum” ou “*pro fumum*”, que significa “pelo fumo”, o que vem demonstrar o modo mais antigo de aplicação das plantas aromáticas, feito pela combustão desses materiais que criavam um ambiente apropriado para uma dada cerimônia. Com este objetivo eram utilizadas, entre outras plantas, o sândalo (*Santalum álbum* L.), a casca de canela (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl), as raízes de cálamus (*Acorus calamus* L.), o cedro do Líbano (*Cedrus libani* A. Rich), bem como substâncias resinosas como a mirra (*Commiphora myrra* (Nees) Engl.), o olíbano (*Boswellia carteri* Birdw.) e o benjoim (*Styrax benjoin* Dryand). Com o passar dos anos as plantas aromáticas passaram a fazer parte de técnicas de prevenção e de tratamento das doenças, principalmente de feridas e contusões, como mostram documentos chineses e indianos com mais de 5.000 anos (SANTANA, 2013).

Os OEs são conhecidos por seu poder antisséptico, bactericida, virucida e fungicida, e são muito usados na preservação de alimentos. Óleos essenciais, ou seus constituintes, possuem largo espectro farmacológico, sendo utilizados como antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, antiespasmódicos e remédios para anestesia local, funcionando também como antihelmínticos e antiprotozoários (BASSOLÉ e JULIANI., 2012; YORK et al., 2012).

A atividade dos OEs está associada à característica lipofílica das moléculas que os constituem. Estas moléculas atravessam a membrana celular e rompem a estrutura da camada de fosfolipídios que constituem as membranas, podendo levar a um extravasamento de moléculas e à lise celular (YORK et al., 2012). A habilidade de difusão através de membranas dá a estas moléculas vantagens em agir sobre componentes celulares, estabelecendo uma opção valiosa na procura por componentes bioativos (ALVIANO et al., 2012).

Devido ao uso destes compostos aromáticos, pesquisas incentivando o desenvolvimento de novos produtos baseados em plantas aromáticas estão sendo cada vez mais difundidas no meio científico, comprovando suas propriedades como moléculas biologicamente ativas. A partir disso, nota-se um aumento na demanda por matérias-primas produtoras de óleos essenciais, a garantia de qualidade dos produtos obtidos, maior disponibilidade comercial dos óleos essenciais e, conseqüentemente, uma sistematização da produção em larga escala. Observa-se

que a maioria dos estudos de desenvolvimento de tecnologia relativo a esta área do conhecimento ainda são realizados em escala laboratorial (BARROSO, 2011).

O óleo essencial tem dois grandes mercados. O primeiro é definido pelas suas características organolépticas, utilizado primordialmente pela indústria de sabores e fragrâncias. O segundo é o que se nutre de seus distintos componentes, isolados ou não. Na indústria cosmética, principalmente para elaboração de perfumes, a importância comercial do óleo essencial é singularmente relevante, pois muitos cosméticos têm um posicionamento no mercado devido quase exclusivamente à fragrância que contêm. E de forma especial merece destaque o mercado de fragrâncias: perfumes, águas-de-colônia, colônias e extratos. Outros produtos importantes são os dentífricos, por seu grande consumo de derivados de menta. Já na indústria alimentícia, serve para elaboração de sabores, aditivos e bebidas (ALVIANO et al., 2012).

A indústria de óleos essenciais no Brasil, apesar da forte participação no mercado mundial, ainda está em processo de desenvolvimento. Várias tentativas de uma melhor organização das destilarias de óleos essenciais, através da criação de cooperativas e redes de cooperação entre universidades e produtores, estão sendo implementadas. Estes projetos têm como objetivo fornecer maior visibilidade à cadeia produtora de óleos essenciais e tornar o processo de produção mais eficiente, o controle de qualidade mais efetivo e a comercialização mais rápida (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Os óleos essenciais são extraídos geralmente por processos físicos de destilação e apresentam uma composição complexa de metabolitos secundários lipófilos que se caracterizam pela sua elevada volatilidade, sendo muitas vezes designados de óleos voláteis. Estes compostos são insolúveis em água, mas solúveis em óleos e solventes orgânicos (ABDELKADER E LOCKWOOD, 2011).

Como já referido, atualmente sabe-se que os óleos essenciais, tal como os outros metabolitos secundários, não são apenas necessários, mas sim imprescindíveis para a defesa e manutenção/propagação das populações de plantas aromáticas. Os seus aromas têm função ativa, principalmente em dois aspetos que beneficiam a planta. Atraem agentes polinizadores, como abelhas, borboletas, pássaros, traças entre outros. Muitas vezes, a emissão destes compostos voláteis é máxima quando o pólen está maduro, pronto para ser dispersado. Por outro lado,

afastam animais herbívoros, fazendo com que estes percam o apetite pela planta (CUNHA e ROQUE, 2013).

2.2.1 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A) FATORES INTRÍNSECOS

▪ VARIABILIDADE GENÉTICA

A variedade genética e a transmissão hereditária são determinantes no tipo de genes expressos pela planta e conseqüentemente no tipo de metabolitos secundários produzidos. A dinâmica exibida no conteúdo e composição dos óleos essenciais está associada à expressão de diferentes genes em diferentes fases da vida da planta aromática. Devido a essa variação intra-espécie introduziu-se o conceito de quimiótipo que se define como populações com fenótipos idênticos, mas genótipos distintos (CUNHA et al., 2012).

▪ ÓRGÃO DA PLANTA

Óleos essenciais extraídos de diferentes partes da planta podem apresentar composições muito distintas consoantes o órgão de onde se está a extrair. Tais variações decorrem da existência de diversas estruturas secretoras que estão distribuídas pela planta de forma heterogênea. No caso de espécies entomófilas, os óleos essenciais da flor são ricos em compostos que atraem os animais polinizadores sendo, normalmente, muito distintos dos óleos essenciais presentes nos outros órgãos (VERMA et al., 2013).

▪ FASE ONTOGÉNICA

O ciclo de vida da planta é constituído por diferentes estádios e em cada um deles a planta pode produzir diferentes óleos essenciais conforme as necessidades dessa fase, por exemplo, a floração e frutificação são fases de elevada atividade metabólica onde a composição dos óleos essenciais pode variar significativamente, comparativamente com as outras fases (YAPI et al., 2014).

- **IDADE DA PLANTA AROMÁTICA**

A idade representa outro fator preponderante que afeta a composição qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais produzidos. Um exemplo óleos essenciais como agentes terapêuticos oito de situações em que isso se verifica é no óleo essencial da hortelã-pimenta que à medida que a planta vai envelhecendo o seu teor de pulegona vai sendo substituído por mentona e mentol (CUNHA et al., 2012). Schmidt (2010) na sua investigação acerca do *Origanum vulgare* ssp. Hirtum, detectaram conteúdos em γ -terpineno maiores em plantas jovens quando comparado com plantas mais antigas.

B) FATORES EXTRÍNSECOS

- **LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA E TIPO DE SOLO**

Os óleos essenciais obtidos da mesma espécie de planta aromática provenientes de diferentes zonas geográficas e diferentes tipos de solo, em geral, apresentam frequentemente a mesma composição qualitativa, no entanto, os seus componentes encontram-se em concentrações muito variáveis (SCHMIDT, 2010). Yapi et al. (2014), na análise dos óleos essenciais de folhas de *Xylopia quintasii* de três zonas da Costa do Marfim (Agboville e Azaguié com solo argiloso e Adippodoumé com solo arenoso), pôde comprovar que nas zonas de solo argiloso, os óleos essenciais apresentavam composições tanto qualitativas quanto quantitativas mais próximas, com predomínio de (E)- β -cariofileno e isómeros β -pineno e α -pineno, enquanto que, os óleos da zona de Adippodoumé apresentavam (Z)- β -ocimeno e furanoguaia-1,4-dieno como componentes majoritários, sendo este último exclusivo desta zona.

- **MESES DE COLHEITA E ALTURA DO DIA**

Cada planta tem ciclos de vida específicos da sua espécie, enquanto umas florescem no verão, outras florescem no outono ou inverno. Assim, também os óleos essenciais produzidos variam em quantidade durante o ano e em certas plantas a composição dos óleos essenciais variam, também durante o dia, onde, por exemplo, o seu teor é maior nas primeiras horas da manhã (CUNHA et al., 2012). No seu artigo acerca de *Aegle marmelos*, Verma et al. (2013) verificou que ao longo do ano as quantidades de óleo essencial variavam entre 0,37 e 0,82%, que correspondem,

aos meses de maio e setembro, respectivamente. Além disso, também as concentrações dos seus constituintes não eram constantes ao longo do ano. Este estudo permitiu relacionar a temporada de colheita com a quantidade e qualidade do óleo essencial produzido.

Estudos como estes são de elevada importância, uma vez que permitem saber qual a melhor altura de colheita para obter maior quantidade do componente de interesse resultando numa extração mais rentável. Também a hora do dia tem um papel relevante na composição dos óleos essenciais. Salgueiro e colaboradores (2010) investigaram a interferência do horário da colheita na quantidade de óleo essencial de *Andropogon* sp. e no seu teor de citral, componente majoritário deste óleo. Assim, pôde concluir que o maior rendimento deste óleo foi obtido às 7h (5,06 mL/Kg de matéria seca) e que a maior quantidade de citral foi obtida às 13h (91,7%).

- **PRECIPITAÇÃO E QUANTIDADE DE ÁGUA DISPONIBILIZADA À PLANTA**

É bem conhecido que tanto a deficiente quantidade de água quanto o seu excesso podem resultar em danos para a planta e em última instância até a sua própria morte. Para as plantas aromáticas de uma maneira geral, o déficit de água disponibilizada é um dos fatores abióticos que mais influencia positivamente a produção de óleos voláteis, no entanto, é desfavorável ao rendimento de massa vegetal total. Assim, é de suma importância procurar um local de cultivo com a precipitação tolerada pela planta que se pretende cultivar (SCHMIDT, 2010).

- **INTERAÇÕES BIÓTICAS**

Neste grupo encontram-se fatores como a competitividade entre plantas e alelopatia, que se manifestam em situações em que uma planta tem o potencial de inibir o crescimento da outra, tanto por uso dos mesmos nutrientes quanto por processos bioquímicos. Também é necessário observar a atuação de parasitas das plantas aromáticas que podem desencadear a produção de determinados compostos químicos que não são apresentados em plantas saudáveis (CUNHA et al., 2012).

▪ IRRADIAÇÃO LUMINOSA

A radiação solar tem uma grande influência no crescimento e metabolismo das plantas aromáticas e conseqüentemente a produção de óleos essenciais. Geralmente, as plantas aromáticas requerem grandes quantidades de luz solar, no entanto, não se pode relacionar proporcionalmente com um maior rendimento em óleos essenciais (SALGUEIRO et al., 2010). Msaada e colaboradores (2012) estudaram a interferência da luz solar na produção de óleos essenciais de salva e tomilho. Colocando-as sob influência de diferentes percentagens de luz solar (15, 27, 45, 100%) verificaram que, no caso da salva, a percentagem ideal para o maior rendimento em óleo essencial foi a de 45% de radiação solar, enquanto, no tomilho (*Thymus vulgaris*) a maior concentração ocorreu nas plantas sujeitas a total radiação solar.

▪ TEMPERATURA

A temperatura tem também um profundo papel na composição quantitativa e qualitativa dos óleos essenciais. Um exemplo do grande impacto deste fator ocorreu em Provença, região de França (conhecida pela capital da lavanda), em 2009. Aquele começou muito frio e foi seguido de um período extremamente quente e seco, Óleos essenciais como agentes terapêuticos 10 que resultou numa perda de rendimento do óleo essencial de lavanda aí produzido que rendeu 1/3 do habitual. Também, longos períodos com temperaturas abaixo dos 0°C resultam, normalmente, em danos graves nas plantas e conseqüente baixos rendimentos em óleos essenciais (PÉRINO-ISSARTIER et al., 2013).

• TRATAMENTO PÓS-COLHEITA

Após a colheita do material vegetal existem vários parâmetros a serem levados em conta, nomeadamente o tipo de transporte, local de armazenamento, tipo de secagem e limpeza, para que qualquer tipo de degradação ou perda seja evitada. Todas as superfícies onde as matérias-primas contactam têm que se apresentar limpas e isentas de microrganismos e deve evitar-se o contacto com o solo (WHO, 2013). O transporte é crucial para alguns óleos essenciais. Por exemplo, o poder terapêutico da valeriana é resultante do seu conteúdo em ácido valerênico. Se o transporte dos seus rizomas for violento pode haver danos nas células

secretoras e de armazenamento e este composto pode ficar exposto a oxidação diminuindo assim o rendimento do óleo essencial extraído (SALGUEIRO et al., 2010). As matérias vegetais só devem ser expostas a luz solar direta em situações específicas de secagem e quando a fotossensibilidade não é um problema. (CUNHA et al., 2012).

- **TÉCNICA DE EXTRAÇÃO UTILIZADA**

A técnica escolhida para o isolamento/extração do óleo essencial do material vegetal tem, também, grande influência na quantidade e qualidade do produto final (MARTINS et al., 2011).

2.2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A composição química é talvez a mais complexa variável nos trabalhos com os óleos essenciais. Embora a pequena quantidade comumente obtida nas extrações de plantas (os rendimentos médios descritos na literatura estão em torno de 0,2 a 0,7%), quando comparados à massa inicial úmida, os óleos apresentam diversidade muito grande de constituintes. São comuns óleos nos quais são identificados mais de 60 compostos distintos (DEL MENEZZI e RESCK, 2010). As classes mais encontradas são os fenilpropanoides, terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) e seus derivados oxigenados (ISMAN et al., 2011). Uma característica comum entre essas moléculas é o baixo peso molecular e a pouca variedade de átomos (basicamente hidrogênio, carbono e oxigênio). Também são conhecidos alguns compostos contendo átomos de nitrogênio ou enxofre que conferem aos óleos odores característicos e geralmente desagradáveis ao homem (CARSON e HAMMER, 2011).

Os terpenoides, entendidos como os terpenos e seus análogos oxigenados, representam uma classe bastante variada e extensa de compostos. Eles são formados por várias unidades de isoprenos (C₅H₈) unidas, isso implica que os terpenoides seguem a razão de cinco átomos de carbono para oito, de hidrogênio quando não há insaturações (duplas ligações ou anéis). Esses compostos são subdivididos em algumas classes de acordo com o número de unidades de isopreno existentes. Os monoterpenos, espécie mais comum nos óleos essenciais, são

isômeros compostos por duas unidades de isopreno, isto é, possuem 10 átomos de carbono. Os sesquiterpenos, por sua vez, são formados por três unidades, ou seja, 15 carbonos, enquanto, os diterpenos, os triterpenos e os tetraterpenos (carotenoides) são formados, respectivamente, por quatro, seis e oito unidades (CARSON e HAMMER, 2011). Existem ainda os norterpenos que são oriundos de uma clivagem específica de carotenos, resultando em compostos de 13 carbonos, mas que não são muito comuns nos óleos (ISMAN et al., 2011).

Tanto os triterpenos como os carotenoides são compostos muito pesados (elevado peso molecular) e, por essa razão, não são encontrados em óleos essenciais. Apesar de não fazerem parte do escopo dos óleos essenciais, os triterpenos têm função relevante no metabolismo das plantas, pois fazem parte dessa classe os esteroides (CARSON e HAMMER, 2011).

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E A ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Historicamente, os compostos produzidos pelas plantas têm sido separados em metabólitos ou produtos primários e secundários. Os metabólitos primários, por definição, são moléculas que se encontram em todas as células vegetais e são necessários para a vida da planta. São os açúcares, aminoácidos, proteínas e os ácidos nucléicos. Os metabólitos secundários, ao contrário, são restritos em sua distribuição, tanto dentro da planta quanto entre diferentes espécies de plantas. São importantes para a sobrevivência e a propagação das plantas que os produzem, são eles: compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais e alcalóides entre outros. São esses compostos os responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas, e eles apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra estresse ambiental (RAVEN et al., 2012). Esses compostos possuem importantes funções nos vegetais, já que são constituídos de substâncias que agem na preservação da integridade das plantas. Por outro lado, esses compostos, ao serem incorporados ao organismo animal, produzem variados efeitos e, quando benéficos, caracterizam as plantas que os possuem. Muitos desses compostos ou grupos deles podem provocar reações nos organismos, esses são os princípios ativos. Algumas dessas substâncias podem ou não ser tóxicas, isto depende muito da dosagem em que venham a ser utilizadas. Assim, planta medicinal é aquela que contém um ou mais

de um princípio ativo que lhe confere atividade terapêutica (LORENZI E MATOS, 2011).

Metabólitos secundários são produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, algas, insetos, animais marinhos, e outros seres. Nas plantas o conjunto de compostos secundários é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante o crescimento da planta, sendo que esse equilíbrio é influenciado por fatores genéticos (que são fixos) e ambientais como luz, temperatura, tipo de solo, água, além de outros, que são variáveis. Entre as explicações sobre a origem de metabólitos secundários produzidos pelos organismos, está a pressão seletiva natural que inclui resposta a interações de competição, parasitismo, e modificações ambientais que alterem a disponibilidade de recursos (FIGURA 1). Como exemplos destes metabólitos, podemos citar as micotoxinas, toxinas produzidas por fungos, cuja ação pode impedir os insetos predadores, a ação dos antibióticos na defesa territorial e o odor usado para atrair insetos para dispersão de esporos (RAVEN et al., 2012).

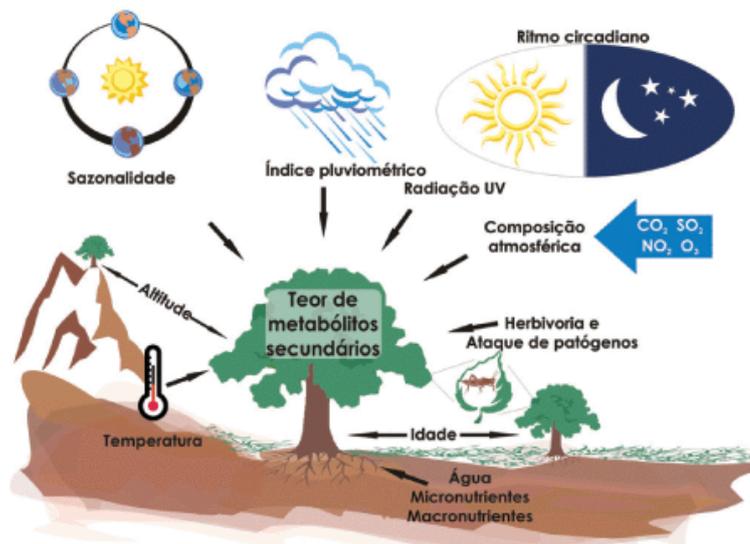


FIGURA 1 - Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas. **Fonte:** GOBBO-NETO, 2007.

Nem sempre os princípios ativos de uma planta são conhecidos, mas mesmo assim ela pode apresentar atividade medicinal satisfatória e ser usada desde que não apresente efeito tóxico. Existem vários grupos de princípios ativos, alguns de maior importância são abordados na Tabela 1.

TABELA 1. Características de alguns grupos de princípios ativos em plantas medicinais.

| PRINCIPIO ATIVO | PROPRIEDADES MEDICINAIS OU TÓXICAS |
|-------------------------|--|
| Alcalóides | Atuam no sistema nervoso central (calmante, sedativo, estimulante, anestésico, analgésico). Alguns podem ser cancerígenos e outros antitumorais. |
| Mucilagens | Cicatrizante, anti-inflamatório, laxativo, expectorante e antiespasmódico. |
| Flavonóides | Anti-inflamatório, fortalece os vasos capilares, antiesclerótico, antidematoso, dilatador de coronárias, espasmolítico, antihepatotóxico, colerético e antimicrobiano. |
| Taninos | Adstringentes e antimicrobianos (antidiarréico). Precipitam proteínas. |
| Óleos essenciais | Bactericida, antivirótico, cicatrizante, analgésico, relaxante, expectorante e antiespasmódico. |

Fonte: Adaptada de Lorenzi E Matos (2012).

Embora uma planta possa conter centenas de metabólitos secundários, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos. Por isto a necessidade de um trabalho em colaboração mais ampla entre químicos e farmacólogos para a análise de extratos, onde se obtém extratos semi-puros, frações e finalmente, os compostos puros (FALCAO, 2012).

Neste sentido, torna-se indispensável a análise da potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração. Esta avaliação permite prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado. Desta forma, para se obter substâncias puras dotadas de efeitos biológicos, são requeridos, além da dedicação e da determinação dos pesquisadores, uma ampla colaboração multidisciplinar. A figura 2 ilustra algumas etapas básicas que podem ser seguidas quando se procura obter princípios ativos de plantas. O fundamento básico deste procedimento consiste no fato de que toda substância, independente de sua proporção na planta, e de ser conhecida ou não, pode ser um princípio ativo (FALCAO, 2012).

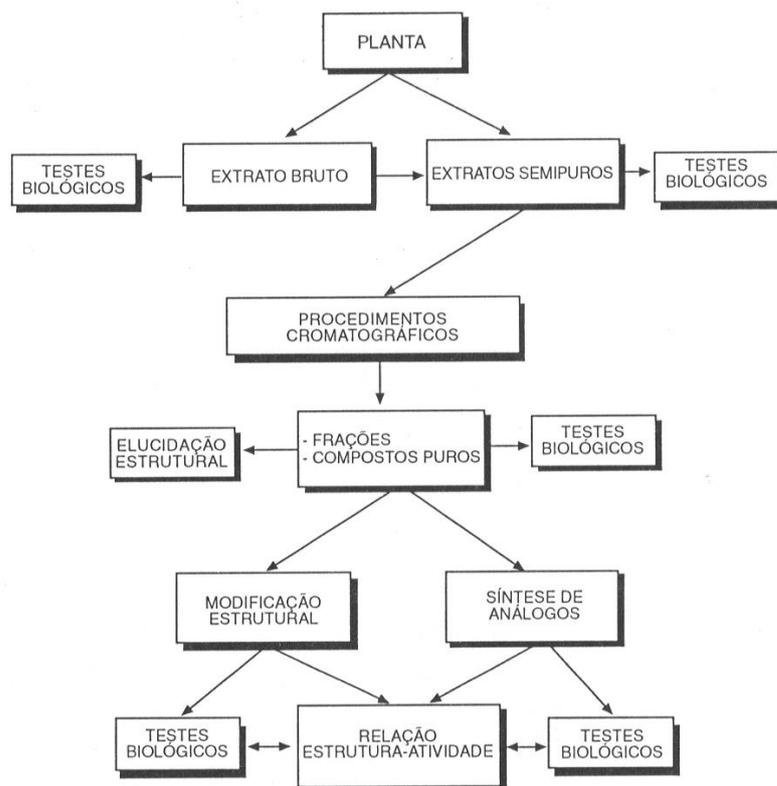


FIGURA 2 - Procedimentos gerais para a obtenção de compostos biologicamente ativos. Fonte: Adaptado de FALCAO (2012)

As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a diversos compostos como alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos terpenos, poliacetilenos, que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (SALLES, 2010). Com o avanço das pesquisas, foram atribuídas às referidas substâncias importâncias relevantes no mecanismo de defesa das plantas contra seus predadores, sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores (SANTOS, 2010). Além disso, em determinadas circunstâncias, algumas plantas superiores podem formar substâncias de natureza antimicrobiana, denominadas fitoalexinas. Estas são produzidas como resposta imediata a agressões por fungos, bactérias, vírus ou nematóides ou em função de determinados estímulos, como radiações, agentes químicos e outras injúrias (PUEYOA et al., 2011).

As plantas que contêm compostos aromáticos são usadas tradicionalmente na medicina popular, na indústria farmacêutica, na indústria de alimentos

aumentando a vida útil dos alimentos, mostrando inibição de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, na medicina alternativa e na de terapias naturais. O uso de vegetais e fitoquímicos com finalidade medicinal é uma das mais antigas formas de aplicação medicinal na humanidade. A OMS estima que mais de 65% da população dos países desenvolvidos utilizem plantas medicinais para cuidados básicos com a saúde. Graças à atividade metabólica secundária dos vegetais superiores, estes produzem substâncias antibióticas como mecanismo de defesa contra predação por micro-organismos, insetos e herbívoros (TANG et al., 2011).

Os óleos essenciais e os extratos de diversas espécies de plantas podem controlar o crescimento dos micro-organismos relacionados à pele, à cárie dental, incluindo as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (ADWAN et al., 2010). Imatomi e colaboradores (2013) demonstraram a atividade antimicrobiana de extratos de 29 espécies, comercializadas ou coletadas em diferentes locais da Finlândia, ricos em flavonóides, frente a nove micro-organismos, sendo esses efetivos contra Gram-positivos, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*; e Gram-negativos como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*; e também fungos filamentosos, como *Aspergillus niger*, e leveduras tais como *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Existe um número significativo de famílias e espécies de plantas que foram estudadas recentemente. Entretanto, se levarmos em conta a existência das cerca de 300.000 espécies de plantas conhecidas. Para a maioria das plantas, somente uma das partes, como folha, raiz ou caule, ou somente um tipo de preparação como óleo essencial ou extrato foram estudados. A atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenos terpenóides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e muroleno, que também na forma pura exibem atividade antibacteriana ou antifúngica. Apesar dos mecanismos de ação estarem incipientemente caracterizados, estes parecem estar associados ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo em membranas e perda de energia pelas células. As diferenças com respeito às técnicas empregadas para investigação da ação de compostos de plantas e uma grande variação encontrada na composição química de algumas preparações vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas. Não existe também um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões (DUARTE et al., 2011).

Muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica têm sido utilizadas como fármacos naturais pelas populações locais no tratamento de várias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária e infecções fúngicas e bacterianas. Além disso, muitas plantas exóticas foram introduzidas no Brasil desde a colonização e incorporadas na medicina popular (MORAIS-BRAGA et al., 2013).

No Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana também aumentou significativamente nos últimos anos. Entretanto, apesar da rica biodiversidade, somente estão disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas. Em virtude da biodiversidade presente nos diferentes biomas brasileiros, existe uma crescente demanda para produtos naturais por indústrias farmacêuticas nacionais e internacionais, que impulsiona as investigações científicas e a busca por drogas naturais. Esta sequência de eventos resultou em uma legislação “sui generis” a respeito da biodiversidade e conhecimento tradicionais associados, agora colocados em prática (RODRIGUES et al., 2011).

2.4 A FAMÍLIA ASTERACEAE NA MEDICINA TRADICIONAL

Asteraceae é considerada a maior família dentre as Angiospermas, com mais de 1.600 gêneros distribuídos em todo o mundo, exceto para a Antártida, e aproximadamente 24.000 espécies com estimativa de um número total 30.000 espécies (FUNK et al., 2009). Estas estão distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas montanhosas, sendo mais abundantes nas regiões abertas e áridas do que nas florestas tropicais úmidas (QUARESMA, 2013).

Estudos moleculares e morfológicos reconhecem para a família 12 subfamílias e 43 tribos. Asteroideae é a maior subfamília e compreende aproximadamente 15.500 espécies (mais de 60% das espécies da família), 1229 gêneros (mais de 70%) e 20 tribos (aproximadamente 60%) (FUNK et al., 2009). No Brasil as Asteraceae são representadas por 14 tribos, 275 gêneros e 2034 espécies. Destas, 1302 espécies são endêmicas e distribuídas em todos os domínios fitogeográficos do país. É representada, predominantemente, por espécies herbáceas, arbustivas e subarbustivas, embora o hábito arbóreo e trepador também estejam presentes, exibindo uma variação contínua da condição de herbácea a

lenhosa e às vezes plantas latexcentes e resiníferas. As folhas são alternas e espiraladas, opostas ou verticiladas, simples, mas às vezes profundamente lobadas ou partidas, inteiras a diversamente denteadas, com venação penínervia ou palmada e estípulas ausentes (NAKAJIMA et al., 2014).

Uma característica típica de todos os seus membros é a inflorescência em capítulo. Este se encontra rodeado por um involúcro de uma ou mais séries de brácteas livres ou fundidas e flores que podem ser actinomórficas ou zigomórficas, monóicas ou dióicas, sendo o ovário ínfero e bicarpelar. Além destas características, a família possui uma apresentação secundária de pólen, ou seja, os grãos de pólen são depositados sobre os ramos do estilete, nas flores durante a pré-antese e o fruto característico é a cipsela, que juntamente com o pappus, caracteriza a unidade de dispersão. A grande plasticidade evidenciada pela ocupação de diferentes habitats, leva ao surgimento de padrões anatômicos muito variados no que concerne à anatomia dos órgãos vegetativos (MARTINELLI E MORAES, 2013).

As espécies de Asteraceae podem ser encontradas em diferentes condições climáticas e nos mais variados habitats, desde regiões tropicais, subtropicais até temperadas, com exceção do ambiente aquático, pois poucas espécies são verdadeiramente aquáticas. A ampla distribuição dessa família ocorre em função ao seu extraordinário potencial de adaptação e de algumas características como a facilidade de dispersão das sementes pelo vento, 20 além de estruturas de aderência do pappus modificados em espinhos com bárbulas retorcidas e ganchos (FUNK et al., 2005; JUDD et al., 2009). Algumas características anatômicas são constantes para a família, como feixes colaterais acompanhados por fibras, folhas anfiestomáticas, endoderme com grãos de amido e estrias de Caspary, além de estruturas secretoras que secretam compostos provindos do metabolismo secundário que conferem proteção contra herbivoria e condições ambientais adversas (TELES e STEHMANN, 2011).

2.4.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM ASTERACEAE

Em Asteraceae, os principais produtos do metabolismo secundário são poliacetilenos, sesquiterpenóides, diterpenóides, triterpenóides, flavonóides, cumarinas, benzofuranos e benzopiranos (SOUZA et al.; 2013). Os óleos essenciais ou óleos voláteis são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas,

geralmente odoríferas e líquidas. A composição química destes óleos essenciais pode variar amplamente desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com nitrogênio e enxofre (HEIDEN; SCHINNEIDER, 2014). Toda essa diversidade funcional, no entanto, pode ser agrupada em duas séries principais: a série aromática e a série terpênic. Na série aromática são classificados como derivados do ácido cinâmico, oriundos do metabolismo do ácido chiquimico. Os derivados mais comuns em óleos essenciais são as cumarinas e alguns aldeídos aromáticos (PEREIRA et al., 2014). Na série terpênic, quantitativamente a mais numerosa e qualitativamente a mais variada encontram-se os terpenos. Os terpenos são sintetizados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto).

As classes de moléculas mais investigadas nessa família são os terpenóides e os compostos fenólicos que, além da diversidade estrutural, apresentam potencial farmacológico. Dentre os terpenóides, os diterpenos e as lactonas sesquiterpênicas são os mais estudados e, dentre os fenóis, destacam-se os flavonoides e, mais recentemente, os ácidos clorogênicos. As espécies da Asteraceae possuem aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Possuem como características gerais as inflorescências tipicamente em capítulos, flores cercadas por brácteas dispostas em uma ou mais séries. As flores são individuais, 9 andrógenas ou unissexuais, ovário ínfero bicarpelar, unilocular e uniovulado e os frutos são do tipo aquênio (GOTT et al., 2010).

A grande maioria das lactonas sesquiterpênicas ocorre em Asteraceae (exceto a tribo Tagetae), sendo componentes característicos da família. Diferenças estruturais das lactonas sesquiterpênicas têm sido utilizadas em estudos quimiotaxonômicos em diferentes gêneros e espécies desta família (SOUZA et al; 2013). A relação de lactonas sesquiterpênicas com tricomas glandulares foi evidenciada por Bobek (2015), ao qual verificou-se a presença de vinte e quatro tipos de lactonas sesquiterpênicas e quatro benzofuranos isoladas a partir de tricomas glandulares da superfície foliar e partes da inflorescência de três espécies de *Pappobolus* sp. Em *Helianthus annuus* L. também foi verificada a presença tricomas glandulares contendo seis tipos de lactonas sesquiterpênicas (SOUZA et al; 2013).

Os compostos secundários de Asteraceae variam em suas atividades biológicas e farmacológicas conferindo a esta família um estatus importante no que se refere à procura de compostos bioativos. Os efeitos terapêuticos obtidos com os óleos essenciais são dependentes dos compostos predominantes, como a ação anti-séptica em bactérias, fungos e leveduras, sedativa, digestiva e expectorante (NAKAJIMA et al 2013). O estudo das lactonas sesquiterpênicas presentes em óleos essenciais tem recebido mais atenção nos últimos tempos devido ao seu potencial biológico com fins terapêuticos como propriedade antibacteriana, antifúngica, antiplasmódica e citotóxica. Em *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *B. uncinella* D.C. os óleos essenciais produzidos apresentam atividade antimicrobiana sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Melampodium divaricatum* Rich D.C. sobre as espécies Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, e por fim quatro espécies de *Tagetes* L. possuem propriedade inseticidas sobre *Ceratitis capitata* e *Triatoma infestans*. Uma característica química importante de Eupatorieae é a presença de benzofuranos em seus óleos essenciais, estes são responsáveis por muitas das espécies desta tribo serem venenosas (SOUZA et al; 2013). Além disto, várias espécies destacam-se por serem importantes economicamente como: *Ageratum fastigiatum* (Gardner) R.M.King & H.Rob utilizadas como cicatrizante, analgésico e anti-inflamatório, *Eupatorium cannabinum* L. usada no tratamento de úlceras; espécies de *Mikania* usadas no tratamento de mordidas de serpentes; óleos essenciais de *Trilisa odoratissima* (J.F.Gmel.) Cass como agente fixador em perfumes e o uso das folhas secas para adicionar sabor ao tabaco; *Koanophyllon tinctorium* Arruda e *K. albicaule* (Sch. Bip. ex Klatt) R. M. King & H. Rob. como corantes e *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni como adoçante. No que concerne o perfil fitoquímico de Trichogonia, Bohlmann et al. (1981), encontraram em cinco espécies: (*Trichogonia grazielae* R.M.King & H.Rob, *T. pracci* G. M. Barroso, *T. salviaefolia* Gardner, *T. scottmorii* R.M.King & H.Rob e *T. villosa* (Spreng.) Sch.Bip. ex Baker) sesquiterpenos lactonas, derivados da acetofenoma, esteróides e triterpenos (LOPÉZ et al., 2011)..

Muitas plantas da família possuem importância econômica e biológica, sendo empregadas na terapêutica (fitoterápicos), na medicina popular e na alimentação. Como exemplos de espécies da família economicamente importantes pode-se citar a arnica (*Arnica montana*), a alface (*Lactuca sativa*), a chicórea (*Cichorium intybus*), a camomila (*Matricaria chamomilla*), o guaco (*Mikania glomerata*) e o falso boldo

(*Vernonia condansata*). A tribo Heliantheae é a segunda maior da família Asteraceae, com mais de 2.500 espécies. Dentre as espécies mais importantes, pode-se citar o girassol (*Helianthus annuus*), que possui terpenóides com atividades biológicas e é empregado na produção de óleo comestível; o margaridão (*Tithonia diversifolia*) que é uma planta infestante cujas substâncias possuem atividade anti-inflamatória e alelopática; a equinácea (*Echinacea augustifolia*), cujo fitoterápico é um dos mais vendidos imunostimulantes do mundo. O gênero *Xanthium* faz parte desta tribo (BUDEL et al., 2003b).

Diversos trabalhos científicos têm demonstrado a importância de espécies da família Asteraceae para a medicina, no tratamento e prevenção de várias doenças. A *Calea divaricata* Benth., por exemplo, é utilizada na Venezuela como remédio para febre. Espécies de *Acmella*, da América do Sul, e *Salmea scandens* (L.) DC., da América Central, são utilizadas para aliviar dores de dentes. Na medicina popular e no comércio de fitoterápicos, vários remédios são extraídos de espécies de *Arnica montana* L., *Calendula officinalis* L. e *Echinacea purpurea*. O Guaco (*Mikania glomerata* Spreng.), por exemplo, é um fitoterápico brasileiro utilizado para problemas respiratórios e outras espécies de *Mikania* são utilizadas também como remédios para picada de cobra. Com relação à indústria alimentícia, importantes alimentos são derivados das Asteraceae. Dentre eles estão a alface (*Lactuca sativa* L.), o girassol (*Helianthus annuus* L.), a chicória (*Cichorium intybus* L.) e a alcachofra (*Cynara scolymus* L.), entre outras (BUDEL et al., 2012).

Entre as espécies de Asteraceae mais conhecidas do Cerrado brasileiro podemos citar: *Achyrocline satureoides* (Lam) DC., usada na medicina popular e no artesanato regional, e como enchimento de travesseiros e estofados de móveis com os capítulos; *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica), usada na medicina popular principalmente como anti-inflamatório; *Piptocarpha rotundifolia* (Less.) Baker, que fornece madeira, além do uso no artesanato e medicinal e *Vernonia ferruginea* Less [= *Vernonanthura ferruginea* (Less.) H. Rob.], planta melífera cujas folhas são tidas como diuréticas e cujas flores podem ser usadas em perfumarias (GOTT et al., 2010).

Inúmeras plantas desta família são produtoras de óleo essencial de importância comercial sendo usados, em sua maioria, nas indústrias de perfumes e licores. Destaque é dado à candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish], uma espécie produtora de óleo essencial com grande importância para o mercado

brasileiro. Existem cinco indústrias de óleo essencial bruto de candeia natural no Brasil, com uma produção anual estimada em cerca de 170 mil quilos de óleo essencial, sendo grande parte exportada, principalmente para países europeus. O alfabisabolol, composto químico isolado do óleo essencial bruto da candeia, é produzido por apenas três indústrias brasileiras, que o vendem para distribuidores e indústrias de cosméticos e de fármacos, como componente em formulações para cosméticos, 10 protetores solares, cremes dentais, loções pós-barba, cremes para barbear e produtos para depilação, entre outros (OLIVEIRA et al., 2011).

As espécies da família Asteraceae são ricas em estruturas secretoras e apresentam uma grande variedade de atividades biológicas e farmacológicas que lhes conferem um estatuto importante no que se refere à procura de compostos bioativos (GOTT et al., 2010). As estruturas secretoras são formadas por células glandulares, células especializadas que ocorrem isoladas num tecido ou agrupadas constituindo um tecido glandular. Assim as estruturas secretoras variam quanto à morfologia, função, posição e tipo de compostos que biossintetizam e acumulam. Os produtos de secreção produzidos por espécies da família Asteraceae são acumulados, de um modo geral, em idioblastos e tricomas glandulares, podendo ainda em alguns gêneros estarem também depositados em canais secretores e laticíferos (NAKAJIMA et al, 2013). Os tricomas glandulares característicos das Asteraceae são pluricelulares e bisseriados, em que o secretado acumulado no espaço subcuticular é eliminado para o exterior por ruptura da cutícula. Os canais resiníferos são em geral nas Asteraceae de origem esquizogénica, contendo oleoresinas ricas em poliacetilenos e lactonas sesquiterpénicas e os laticíferos maioritariamente do tipo articulado anastomosado, contêm latices ricos em açúcares e lactonas sesquiterpénicas (KARAM et al., 2013).

Nas Asteraceae a morfologia e distribuição das estruturas secretoras têm sido utilizadas para delimitar alguns gêneros. A presença de estruturas secretoras responsáveis pela síntese de uma grande variedade de compostos que estão envolvidos na defesa química das plantas justifica o sucesso adaptativo das Asteraceae, refletido no elevado número de espécies e ampla distribuição geográfica (BOBEK, 2015).

2.4.2 ASPECTOS BOTÂNICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS: *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC e *Ageratum conyzoides* L

A) *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC.

É conhecida popularmente como marcela do campo (FIGURA 3), marcela-amarela e é utilizada na medicina popular em infusões como um agente digestivo, antiespasmódico, antiinflamatório e hipoglicêmico, para tratar distúrbios gastrintestinais e reduzir os níveis de colesterol sanguíneo. Estudos experimentais têm demonstrado atividades anti-HIV, anti-proliferativa, além de ações antioxidantes, anti-herpéticas, analgésicas, constipativa e sedativa, imunomodulatória, antiviral, colerética e hepatoprotetora, anti-inflamatória e antimicrobiana (DUARTE et al., 2011). Esta planta também demonstrou *in vitro* atividade mutagênica contra *Salmonella* e *Escherichia coli* e mutagênico e genotóxico, *in vitro* sobre *Salmonella* o que pode explicar seu uso popular na disenteria, diarreia e infecções intestinais (NOOL, 2011). Foi verificada atividade anti-hiperglicêmica em ratos (MARTINELLI; MORAES, 2013), antioxidativa, *in vitro*, citotóxica contra carcinoma hepático humano *in vitro*, hepatoprotetor em ratos, antispasmódico, anti-inflamatório (BARROSO, 2011).



Figura 3 – Fotos da inflorescência da espécie *Achyrocline satureoides*. Fonte: a autora (2013)

A importância desta planta levou sua inclusão na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (BRANDÃO et al., 2006).

As flores da *A. satureoides* são amarelo pálidas e se apresentam em capítulos agrupados em glomérulos paniculados, sendo protegidas por oito a nove brácteas de forma navicular, promovidas de ápice acuminado e base truncada. As

externas são mais curtas, medindo cerca de 3 mm de comprimento por 1 mm de largura. Já as brácteas mais internas medem 3,5 mm de comprimento por 1 mm de largura. Suas flores mais externas do capítulo são femininas e de aspecto filiforme, sendo menos frequentes e alcançam 3 mm de comprimento. Já as flores centrais, geralmente em número de um a três, são tubulosas, hermafroditas e alcançam até 3 mm de comprimento (SEELIG E GRAZZIOTIN, 2014) (FIGURA 4).

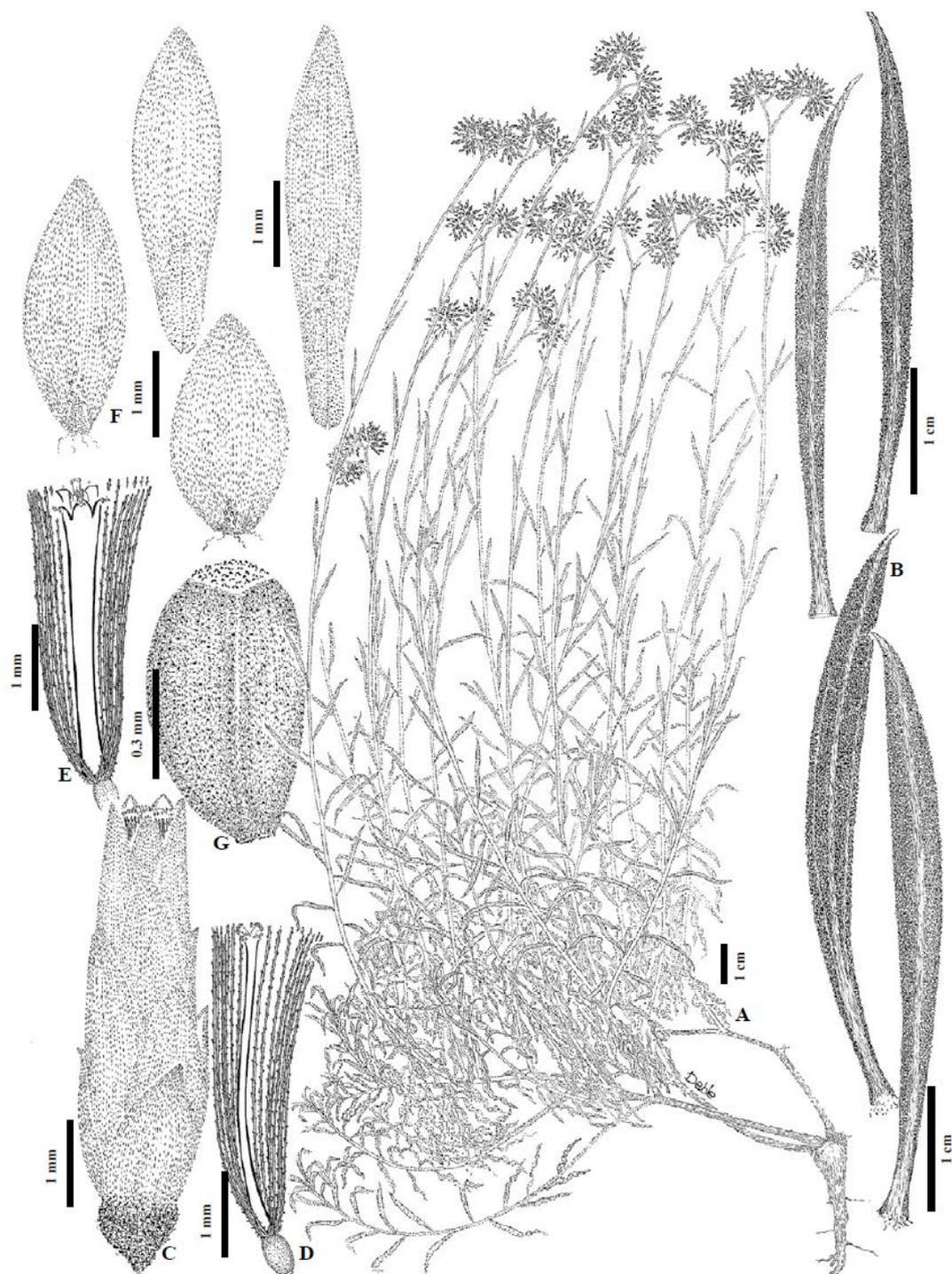


FIGURA 4 - *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. A: Planta; B:Folha; C: Capítulo; D: Flor Marginal; E: Flor do Disco; F: Brácteas Involucrais, G: Aquenio. Fonte: Adaptado de DEBLLE (2007)

A. satureioides é a espécie mais estudada do ponto de vista químico. Foram encontrados flavonóides (GUGLIUCCI et al., 2002; KADARIAN et al., 2002), terpenóides, carotenóides, cumarinas e esteróides (GUGLIUCCI et al., 2002), sesquiterpenos e monoterpenos, dibenzofurano (CARNEY et al., 2002), componentes derivados de fenilpirona, componentes derivados de tiofeno. e ácido cafeico, clorogênico e isoclorogênico (MEIRELES et al. , 2009).

A marcela é uma herbácea perene, ereta ou de ramos decumbentes, muito ramificadas, de 60-120 cm de altura, nativa de campos e áreas abertas do sul do Brasil. Suas folhas são simples com revestimento alvo-tomentoso na face inferior. As flores de marcela possuem cheiro particular e sabor amargo e aromático (BARROSO, 2011). É uma erva anual, possui ramificações de até 1,5 m de altura coberta de pilosidades brancas. As folhas são alternadas, sésseis, as flores são amarelo-dourado, fruto é do tipo aquênio, glabro e pardo. É nativa da América do Sul, sendo muito comum no Peru, Bolívia, Brasil, Uruguai e Argentina, tanto em vegetação de campos de altitude quanto em restinga (PEREIRA et al., 2006). Esta planta é comum no Brasil, ocorrendo de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. *Achyrocline* apresenta em torno de 32 espécies distribuídas na África, Madagascar e América do Sul (DE SOUZA et al., 2002).

A. satureioides do ponto de vista farmacológico, apresenta atividades anti-inflamatória e analgésica e efeito sedativo, prestando-se também ao tratamento de disfunções gastrintestinais, devido a suas atividades hepatoprotetora e antiespasmódica (Kadarian et al., 2002). Lorenzi e Matos (2002), relatam que suas inflorescências secas são utilizadas em muitas regiões para o preenchimento de travesseiros e acolchoados. No entanto, na medicina caseira, seu uso é maior, tanto no Brasil como em outros países da América do Sul. O chá é utilizado na proporção de 5 gramas por litro de água fervente, sendo utilizado suas flores, folhas e ramos secos. No Brasil é usada no tratamento de problemas gástricos, epilepsia e cólicas de origem nervosa, intestinais e menstruais (NOOL, 2011). Também empregado como anti-inflamatório, antiespasmódico e analgésico, para diarreia e disenteria, como sedativa e emenagoga (LORENZI E MATOS, 2002). Mencionada também contra angústia, azia, para baixar o colesterol, em congestões, crises de fígado, desânimo, como diuréticas e nas dores de barriga (VENDRUSCOLO; SIMÕES; MENTZ, 2005). É empregada sob a forma de cataplasmas ou banhos de imersão como anti-inflamatório contra reumatismos, nevralgias (NOOL, 2011).

A. satureioides é uma espécie de planta nativa no Rio Grande do Sul, distribuída em todo o Estado, usada tradicionalmente como medicinal, sua colheita ocorre entre março e abril, época em que os capítulos estão maduros (PEREIRA et al., 2006). No Rio Grande do Sul há a tradição de colheita da macela na sexta-feira Santa, antes do nascer do sol, pois há a crendice que a colheita, nesse dia, traga mais eficiência ao chá das flores. Comprovada a importância que *A. satureioides* (“macela”) tem no costume popular, através da Lei 11.858, de 05 de dezembro de 2002, ela foi “instituída como Planta Medicinal Símbolo do Estado do Rio Grande do Sul”, sendo considerada a planta mais utilizada na medicina popular do estado (CONY, 2005). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) droga vegetal é a planta ou suas partes, que após processo de coleta, secagem, estabilização e conservação, justificam seu emprego na preparação de medicamento (BRASIL, 2013). Fica instituída a notificação de drogas no âmbito da ANVISA, assim consideradas as plantas medicinais ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta ou colheita, estabilização e secagem, íntegras, rasuradas, trituradas ou pulverizadas (BRASIL, 2010).

A droga vegetal consiste das sumidades floridas secas de *A. satureioides*. É permitida a presença de pedúnculos e pedicelos das inflorescências, em um comprimento de até 3 cm e correspondendo a um valor não maior que 1% do peso do conjunto. Deve ser constituída pelos ramos com inflorescências, acompanhada de alguns ramos superiores não alados, para comprovar a identidade da espécie (LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL, 2013).

B) *Ageratum conyzoides* L.

Conhecida popularmente como mentrasto, maria-preta, picão-branco, picão-roxo, erva de São João, erva de São José, erva de Santa Lúcia (LORENZI & MATOS, 2012) é utilizada na medicina popular como laxante, antipirético, tratamento de úlceras e curativo, além de cicatrização de feridas cutânea. Suas folhas também foram relatadas em tratamentos de infecção por parasitas, reumatismo, cefaléia e cólicas. As propriedades antipiréticas e antientéricas também foram relatadas em uma resenha sobre “Plantas medicinais do Senegal”. A planta teve seu consumo

aumentado desde a inclusão na lista da Central de Medicamentos, com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (KAUR et al., 2012) (FIGURA 5).



Figura 5 – Fotos da inflorescência da espécie *Ageratum conyzoides*. Fonte: A autora.

No Brasil, o chá é utilizado como anti-inflamatório, analgésico e anti-diarréico. Outras soluções são utilizadas contra coceiras, doença do sono, elixires para dor de dente, tosse, vermífugo, tônica e para matar piolhos (flores). As folhas são utilizadas para aplicação em cortes, feridas (LORENZI E MATOS, 2012); hemostático; como um inseticida; nas dores de cabeça; em furúnculos doenças de pele, micose, em febre tifóide, como antídoto ao veneno; febre amarela; para problemas uterinos, prolapso anal, infecção de garganta; na cicatrização de feridas e leucorréia (PRAJAPATI et al, 2014).

É uma erva ereta, folhas opostas, flores brancas a liláses, espécie nativa das Américas Central e do Sul, atualmente com distribuição pantropical, ocorrendo desde o nível do mar até 2.500 m de altitude (CHAUHAN E TRIVEDI, 2013). No Brasil é encontrada em praticamente todos os estados, principalmente em áreas antropizadas e em lavouras, já que é considerada invasora de culturas e de áreas não cultivadas. O gênero *Ageratum* é composto por cerca de 30 espécies, mas apenas algumas espécies têm sido investigadas fitoquimicamente (JOSHI et al, 2014).

É uma planta herbácea anual, ereta, pilosa e aromática com até 1 m de altura. O caule (talos) e folhas são cobertos com pêlos brancos, sendo que as folhas são opostas, longo-pecioladas, ovóides e ásperas, com até 7,5 cm de comprimento. Possuem inflorescência tipo capítulo com cerca de 30-50 flores de cor lilás a branca. Fruto aquênio, muito pequeno, preto e anemocórico, sendo facilmente espalhados;

as sementes são fotoblásticas e perdem sua viabilidade para germinação dentro de 12 meses (PERES, 2012). (FIGURA 6).

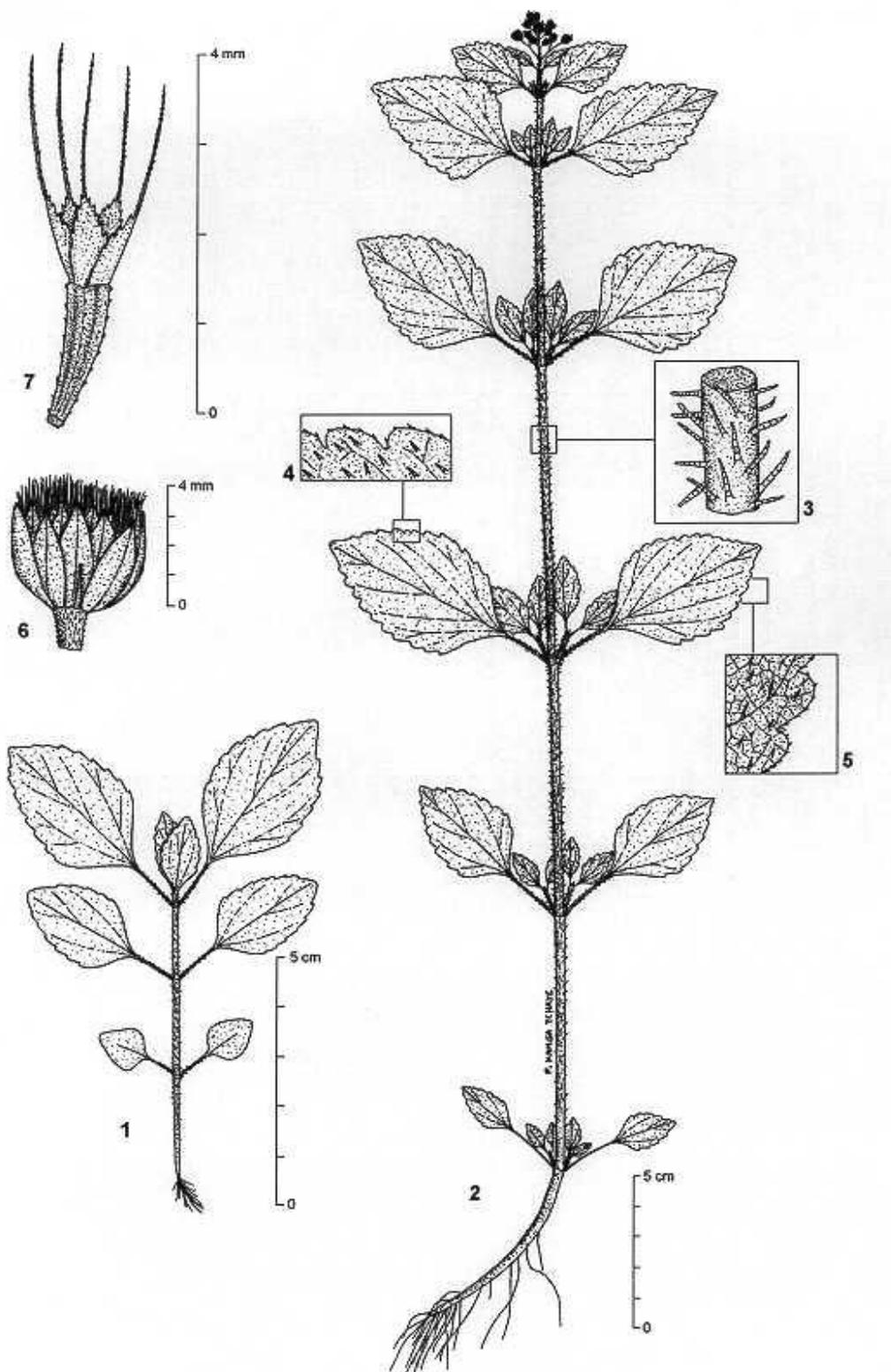


FIGURA 6 – *Ageratum conyzoides*. Fonte: Adaptado de Flora Brasiliensis (2012)

Ageratum conyzoides tem importância pelo uso medicinal difundido pela população no Brasil e em outros países e tem tido seu consumo aumentado, a partir de sua inclusão na lista da Central de Medicamentos e subsequente verificação de sua eficácia como analgésico e anti-inflamatório (ESPER, 2011).

Ageratum conyzoides tem sido utilizada em várias partes da África, Ásia e América do Sul, por ter efeitos terapêuticos diversos. Githen, em sua revisão, listou o uso desta planta como remédio popular de ação purgativa, antitérmica, para tratamento de oftalmia, cólicas, úlceras e feridas. As propriedades antialérgica e antipirética da planta também foram indicadas em uma revisão: "Plantas Medicinais O Senegal". Em alguns países da África, a planta tem sido indicada para o tratamento de doenças mentais e infecciosas, como também cefaléia e dispnéia (BAYALA et al, 2014).

Em Camarões, o extrato aquoso obtido pela maceração das folhas é utilizado como emético, e também é aplicado intravaginalmente para cólicas menstruais. São usadas no tratamento de pneumonia, esfregando-se a planta no peito do paciente. Além do seu uso popular no tratamento de doenças de pele e feridas na Nigéria, a decocção da planta é usada internamente para o tratamento de diarreia em crianças. Na África Central *A. conyzoides* é usada particularmente em feridas causadas por queimaduras, enquanto que no Quênia (África Oriental), é usada na medicina tradicional como antiasmática, antiespasmódica e hemostática. Na Índia, é utilizada no tratamento da hanseníase, e a loção do seu óleo para oftalmia purulenta. Na medicina popular brasileira, chás são usados como anti-inflamatório, analgésico e anti-diarreico, e no Vietnã a planta é particularmente usada para o tratamento de doenças ginecológicas. Esta espécie também é utilizada para prurido, distúrbios do sono, higiene bucal, dor de dente, como antireumática, antitussígena, vermífuga e tônica. Atividade nematocida também tem sido reportada (DESTA et al, 2014).

O óleo essencial de *A. conyzoides* tem sido testado como anti-inflamatório, analgésico e antipirético em camundongos e ratos. Nas doses de 3 e 4mL/kg o óleo mostrou ter significativa atividade anti-inflamatória. Na dose de 3mL/kg efeito antipirético foi comparável com um composto de referência (acetil salicilato 50 mg/kg), considerando que atividade analgésica foi mostrada nas doses de 2, 3 e 4ml/kg. A administração diária por 7 dias não mostrou toxicidade gástrica (OSTROSKY, 2008). A atividade antimicrobiana do óleo foi sujeita a investigação. As propriedades antibacteriana e antifúngica contra 22 bactérias e 12 fungos,

mostraram que o óleo inibiu bactérias e 4 fungos (*Candida albicans* SP-14, *Cryptococcus neoformas* SP-16, *Sclerolium rolfsii* SP-5 e *Trichophyton mentagrophytes* SP-12) (HILLEN et al., 2012).

Atividades farmacológicas dos mais importantes metabólitos, além do óleo essencial do mentrasto, responsáveis por propriedades medicinais têm sido identificadas. Existe, entretanto, um amplo espectro de atividades farmacológicas a partir das classes dos compostos obtidos desta planta. Por exemplo, simples cromenos e cromanos, especialmente os derivados 6-amino e 6-acetamido foram avaliados como tendo propriedade antidepressiva, analgésica e antipirética. Alguns deles têm atividade contra cestódeos da ordem dos trematódeos. Outros cromenos simples, como os derivados 6-(1-hidroxietil)-7,8-dimetoxi- 2,2dimetilcromeno e 6-hidroxi-7,8-dimetoxi-2,2 dimetilcromeno, têm mostrado atividades antimicrobianas BOSI et al, 2013) (Tabela 2).

TABELA 2- Triagem fitoquímica de extratos aquosos e etanólicos das espécies *Gossypium hirsutum* (algodão); *Polygonum hydropiperoides* (erva de bicho); *Ageratum conyzoides* L. (mentrasto) e *Phyllanthus tenellus* (quebra pedra).

| Classe de compostos | Amostras | | | | | | | |
|---------------------------|----------|---------|---------------|---------|-----------|---------|--------------|---------|
| | Algodão | | Erva de Bicho | | Mentrasto | | Quebra Pedra | |
| | Ext.aq. | Ext.et. | Ext.aq. | Ext.et. | Ext.aq. | Ext.et. | Ext.aq. | Ext.et. |
| Açucares redutores | ++* | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Compostos Fenólicos | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Alcaloides | ++ | ++ | — | — | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Cumarinas | ++ | ++ | ++ | ++ | — | ++ | — | — |
| Compostos Antracênicos | —* | — | — | — | — | — | — | — |
| Flavonoides | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Heterosídeo Cardiotônicos | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Naftoquinonas | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Saponinas | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | — | — |
| Taninos | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| Triterpenos e Esteroides | — | ++ | — | ++ | — | ++ | — | ++ |

Ext.aq. - extrato aquoso; Ext.et. - Extrato etanólico; (+) - Resultado positivo; (-) - Resultado negativo; * - Resultados em duplicata

Fonte: Adaptação MIRANDA et al. (2013).

Os esteróis, especialmente o stigmasterol, mostraram atividade anti-inflamatória. Os flavonóides possuem uma gama extensiva de atividades biológicas. A lista inclui efeitos no sistema vascular central, propriedades diuréticas, espasmolítica, antiviral e anti-inflamatória. Embora as atividades biológicas dos flavonóides de *A. conyzoides* não foram bem investigadas, é importante destacar

quatro polimetoxiflavonas isoladas de sucos cítricos que têm se mostrado importantes candidatos para prevenção de câncer. Duas dessas polimetoxiflavonas são as mesmas isoladas de *A. conyzoides* (PERES, 2012).

Os compostos predominantes do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* são os cromenos, principalmente precoceno I e precoceno II, que causam metamorfose prematura em diversas espécies de insetos, levando à formação de adultos estéreis. Estudos realizados com o óleo essencial em ratos mostraram que ele possui significativa atividade analgésica, anti-inflamatória e antipirética, não sendo observada toxicidade gástrica. O mentrasto é planta nativa da América com adaptação a diversas condições ambientais, estabelecendo-se em várias regiões de clima tropical e subtropical do mundo. Planta considerada invasora em cerca de 50 países, tem valor ornamental e, na Malásia, é usada como forrageira para cabras, bovinos e muares. *Ageratum conyzoides* apresenta uso medicinal difundido pela população no Brasil e em outros países. A droga vegetal denominada mentrasto (*Ageratum conyzoides*) tem tido seu consumo aumentado, a partir de sua inclusão na lista da Central de Medicamentos e subsequente verificação de sua eficácia como analgésico e anti-inflamatório. Embora comprovada sua atividade, o vegetal não se acha ainda em fase de cultivo racional. A droga que abastece o mercado de São Paulo e Rio de Janeiro e, por extensão, todo o Brasil é proveniente do extrativismo (MIRANDA et al. 2013).

2.5 SISTEMA IMUNOLÓGICO

Todo organismo vivo encontra-se em íntima interação com os mais distintos componentes do ambiente. Tal é o caso do *H. sapiens sapiens*, o qual possui sistema imune “equipado” com uma rede de mecanismos que protegem de infecções por micro-organismos e metazoários, os quais poderiam de alguma maneira, estabelecer-se no organismo, no intuito de garantir a sobrevivência (KINOSHITA, 2014).

O Sistema imune (SI) é, então, o principal mecanismo de resposta biológica, especialmente nos vertebrados (RYMKIEWICZ, et al., 2012). É um sistema muito complexo, formado por diversos conjuntos de substâncias, células, tecidos e órgãos que compõem o chamado sistema linfóide, com alto paralelismo, distribuição, organização e adaptação. Sua principal atribuição é responder aos micro-

organismos e aos metazoários infecciosos, bem como de substâncias estranhas, as quais possam causar algum dano ao corpo (SOLANA, et al., 2012).

Para cumprir esta tarefa, o SI conta com dois tipos de respostas imunológicas, ou seja, duas abordagens para manter homeostase: a resposta imunológica inata ou não específica, mediada pelo SI inato, sendo mais rápida e efetiva; e a resposta imunológica adaptativa, mediada pelo SI adaptativo, sendo mais lenta, mas mais duradoura (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2008). Isso ocorre, pois, as células do SI inato estão disponíveis o tempo todo no organismo, desde o nascimento do indivíduo (WOOLDRIDGE, 1999). Trata-se de um sistema constituído por vários fatores que são relativamente não-específicos, capazes de responder a uma ampla variedade de agentes, sem exigir prévia exposição aos mesmos. Já a resposta imune adaptativa é capaz de desenvolver uma memória imunológica, reconhecendo o mesmo estímulo antigênico em um momento posterior, evitando o restabelecimento da infecção, tornando-a mais branda em sua expressão clínica e patológica. Deste modo, a resposta imune adaptativa se aperfeiçoa a cada encontro com um antígeno (WOOLDRIDGE, 1999). Neste domínio se destaca também o *sistema complemento*, o qual representa um efetor das imunidades inata e adquirida. Ele atua em uma grande variedade de reações do organismo hospedeiro, inflamatórias, homeostáticas e imunes (SUNSHINE et al., 2000).

2.5.1 IMUNIDADE INATA

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do sistema imunológico contra a maioria dos agentes infecciosos. Nessa fase, ocorre o reconhecimento de patógenos (agentes infecciosos) por células imunológicas resultando em fagocitose, citotoxicidade e produção de mediadores inflamatórios, com o intuito de eliminar a infecção. Apesar da maior notoriedade das alterações da imunidade adaptativa na imunossenescência, a imunidade inata também é afetada pelo processo de envelhecimento (KINOSHITA, 2014).

A)NEUTRÓFILOS – A PRIMEIRA LINHA DE DEFESA CONTRA PATÓGENOS EXTRACELULARES

Os neutrófilos são o primeiro tipo celular a chegar a tecidos infectados ou lesionados, à partir da circulação. O recrutamento dessas células (do sangue para o tecido) ocorre através da liberação de mediadores inflamatórios (como Fator de Necrose Tumoral- α e Interleucina-1) por macrófagos teciduais, culminando no processo de adesão à parede vascular, quimiotaxia (movimento direcionado ao tecido lesionado) e diapedese (passagem dos vasos para o tecido) dos neutrófilos. No local de agressão, os neutrófilos são capazes de fagocitar patógenos e eliminá-los, intracelularmente, através da produção de radicais livres e enzimas proteolíticas dentro de vesículas. Neutrófilos são células com meia vida muito curta (8 a 12 horas), mas no local da inflamação, em resposta a mediadores inflamatórios e a produtos bacterianos, apresentam uma sobrevivência maior, aumentando as chances de debelar o agente infeccioso. Após a destruição dos patógenos, os neutrófilos sofrem apoptose, um processo de morte celular programada (RYMKIEWICZ, et al., 2012).

B)Monócitos/macrófagos – fagocitose, recrutamento de neutrófilos e produção de citocinas

Monócitos são encontrados na circulação, e entram nos tecidos, para se diferenciar em macrófagos, onde adquirem funções especializadas. Macrófagos teciduais são as células responsáveis pelo reconhecimento de agentes infecciosos (através dos receptores de reconhecimento padrão, que incluem uma vasta família de receptores) e pelo recrutamento de neutrófilos da circulação para o tecido infectado. Assim como os neutrófilos, macrófagos participam da fagocitose de patógenos e antígenos, destruindo-os através da ação de enzimas lisossômicas ou pela secreção de espécies reativas de oxigênio, dentro de vesículas. Além disso, macrófagos são importantes produtores de citocinas e interleucinas responsáveis por diversas sinalizações com outras células imunológicas, como o já relatado recrutamento de neutrófilos e também a indução da proliferação de linfócitos T. Também realizam a ligação entre a imunidade inata e adaptativa, servindo como células apresentadoras de antígenos (APCs) (SOLANA, et al., 2012).

C) Células NK (“natural killer”) – importantes contra infecções virais e tumores

As células NK (do inglês “natural killer”) são uma linhagem de linfócitos, que participam da resposta imune inata, importantes na destruição de células tumorais e de células infectadas por vírus. Elas circulam no sangue e possuem grandes grânulos citoplasmáticos (SHAW, et al., 2010).

2.5.2 IMUNIDADE ADAPTATIVA

A resposta imune inata pode ser suficiente para debelar certos tipos de agentes infecciosos (aqueles que são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão). Entretanto, para alguns tipos de bactérias e para os vírus, macrófagos e neutrófilos podem não ser capazes de fagocitar e eliminar o patógeno. Nesse cenário, as células dendríticas presentes nos tecidos são altamente importantes. Elas são capazes, como visto anteriormente, de englobar agentes infecciosos e apresentar antígenos desses agentes a linfócitos (DORRINGTON; BOWDISH, 2014).

O organismo possui uma variedade muito grande de linfócitos capazes de reconhecer uma variedade de antígenos, através de receptores na membrana celular. Um linfócito é capaz de reconhecer apenas um tipo de antígeno. Mas como existe grande diversidade de linfócitos, existe também uma infinidade de antígenos que podem ser reconhecidos pelo organismo. Essa grande diversidade, intrínseca à imunidade adaptativa, é extremamente importante para que o organismo seja capaz de combater a imensidade de infecções às quais pode ser submetido (BRUNNER, et al., 2011).

A célula apresentadora de antígeno é capaz de ativar o linfócito específico para aquele antígeno, induzindo a formação de clones desse linfócito e sua ativação. Antes dessa ativação, o linfócito é dito naive (do inglês, “ingênuo”). Dependendo do tipo de linfócito ativado, pode ocorrer a produção de anticorpos (por linfócitos B), ou (em se tratando de ativação de linfócitos T) a destruição de células infectadas, ou a ativação de outras células imunológicas. Essas respostas dotadas de especificidade ao agente infeccioso fazem parte da imunidade adaptativa (RYMKIEWICZ, et al., 2012).

Após a destruição do agente infeccioso, a maior parte das células efectoras (os clones do linfócito ativado) é destruída por apoptose. Mas algumas, as células de memória, permanecem, e fornecerão uma resposta mais rápida, caso o organismo entre em contato com o mesmo agente infeccioso. É nesse princípio que se baseiam as imunizações através de vacinas. São utilizados antígenos que sabidamente não causarão a doença no indivíduo, mas que serão capazes de induzir uma resposta, e memória, ao agente infeccioso (SOMMER; WHITE, 2010).

2.5.3 CITOCINAS

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, variando entre 8 e 30 kDA. São produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por aquelas do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinases por mitógenos. Elas atuam especialmente por mecanismos parácrino (em células vizinhas) e autócrino (nas próprias células produtoras). Algumas citocinas podem ter ações pró- (Th1) ou anti-inflamatórias (Th2), de acordo com o microambiente no qual são produzidas (SOMMER; WHITE, 2010). Estudos recentes em equinos indicam que a expressão de mRNA de citocinas em potros é muitas vezes quantitativamente menor que a de cavalos adultos, sugerindo que as células T dos potros ainda não estão totalmente maduras para esta função (WAGNER et al., 2010). Em bovinos, os neonatos são deficientes na resposta Th1, porém após a ingestão do colostro adquirem um perfil imunológico Th1 que se mantém até completarem 15 dias de vida, quando as citocinas não são mais detectáveis (MADUREIRA, 2011). Os antígenos-ativados naturais das células T CD4+ podem se diferenciar em várias linhagens de células T efectoras, incluindo as células T helper 1 (Th1), T helper 2 (Th2), T helper folicular (Tfh), T helper 9 (Th9), T helper 17 (Th17), assim como várias subpopulações de células T regulatórias incluindo células T regulatórias naturais FOXP3+CD4+CD25+ (nTreg), células T regulatórias induzidas FOXP3+ ou FOXP3- (iTreg), incluindo as células T regulatórias tipo 1 (Tr1) e células T helper tipo 3 (Th3) (CHEN et al., 2010). Como não é possível classificar as citocinas quanto à célula de origem ou quanto a sua função biológica, elas foram agrupadas em interleucinas (IL, numeradas sequencialmente de IL-1 a IL-35), fator de necrose tumoral (TNF), quimiocinas

(citocinas quimiotáticas), interferons (IFN) e fatores de crescimento mesenquimal (SOMMER; WHITE, 2010) (FIGURA 7).

A)INTERLEUCINA 8

A interleucina-8 (IL-8), também conhecida como CXCL-8, foi originalmente purificada a partir de lipopolissacarídeo (LPS) estimulados por cultura de monócitos humanos e, subsequentemente, mostrou que induzia a quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos-T, ativava os neutrófilos, e aumentava a expressão e adesão de dos mesmos (ASFAHA et.al.,2012).

A interleucina-8 (IL-8) tem propriedades mitogênicas e angiogênicas. Monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos dérmicos, queratinócitos, células endoteliais vasculares, os melanócitos, hepatócitos e várias linhas de células tumorais são produtoras de IL-8 (Enzo Lifescience Catalog # ADI-900-156). Em tecidos inflamados, a fonte primária de secreção de IL-8 parece ser de células mielóides, onde o gene é transcricionalmente-regulado por proteína ativadora-1 e o fator nuclear κ B. Essa interleucina é normalmente indetectável em tecidos saudáveis, mas sua expressão é fortemente regulada por citocinas pró-inflamatórias ou fatores associados a patógenos, através dos receptores do tipo Toll em tecidos feridos e / ou infectados. (LARA.,2013).

B)INTERLEUCINA 10

A IL-10 é um polipeptídeo não glicosilado com cerca de 18 kDa, sintetizado em células imunológicas e tecidos neuroendócrino e neural. Seu receptor (IL-10R) pertence à família de receptores de citocina de classe II, semelhante aos receptores para interferons. A produção de IL-10 é prejudicada por muitas citocinas, como IL-4, IL-13 e IFN γ , e também pela sua própria autorregulação (SOMMER E WHITE, 2010).

Inibe as citocinas pró-inflamatórias, principalmente FNT, IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias. Além disso, aumenta a proliferação de mastócitos e impede a produção de IFN γ pelas células matadoras naturais. Seus efeitos

supressivos sobre as células Th1 podem ser clinicamente úteis em prevenir a rejeição de transplantes e tratar doenças autoimunes mediadas por células-T, como Esclerose múltipla e *diabetes mellitus* tipo I. Efeito benéfico também pode ser observado em sepse, artrite reumatoide e psoríase. Por outro lado, antagonismo de IL-10 pode ter efeito satisfatório durante a ativação de células-B policlonal e hiperglobulinemia em pacientes com SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida) (OLIVEIRA et al, 2011).

C) INTERLEUCINA 12

A IL-12 é uma citocina heterodimérica de 70 kDa, formada a partir de duas cadeias ligadas covalentemente (p35 e p40), codificadas por dois genes separados. A IL-12 promove a diferenciação de linfócitos T auxiliares CD4+ em células TH1, prepara essas células para aumentar a produção de IFN- γ e aumenta a capacidade citolítica de células NK ativadas e linfócitos T citotóxicos (CTLs) CD8+. A IL-12 é produzida principalmente pelos monócitos e macrófagos, células dendríticas e, em menor grau, por neutrófilos. A produção da IL-12 é regulada negativamente pela IL-10 e pelo TGF- β , e sua síntese é potencializada pelo IFN- γ (VIGNALI e KUCHROO, 2012).

Dentre as citocinas produzidas durante a resposta imune inata destaca-se a interleucina-12 (IL12), que é uma citocina heterodimérica pró-inflamatória que induz a produção de interferon-gama (IFN- γ), o qual induzirá a produção de fator de necrose tumoral (TNF), favorecendo a diferenciação dos linfócitos para o perfil T auxiliar do tipo 1 (Th1), formando um elo entre a imunidade inata e a imunidade adquirida. As principais fontes de produção de IL-12 são as células dendríticas e os macrófagos em resposta a patógenos durante a infecção. O IFN- γ é outra citocina fundamental para a geração do perfil Th1. Esta citocina pode ser produzida em uma fase inicial pelas células NK da imunidade inata (GOMES, 2012). De uma maneira geral, a indução de uma resposta imune que favoreça o perfil Th1 irá controlar os patógenos intra-celulares através da ativação de macrófagos e a não geração desta resposta imune promove a replicação do patógeno (CASTRO, 2013) .

| Nome | Fonte | Alvo | Funções biológicas |
|--|---|--|---|
| IL-1 (α e β) | Macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e outros tipos celulares | Linfócitos B e Th, outros tecidos | Ativação celular |
| IL-2 | Th ₁ | Linfócitos Tc e Th, células NK | Proliferação e indução da atividade de linfócitos B e NK |
| IL-3 | Linfócitos Th ₁ e Th ₂ , mastócitos, células NK | Mastócitos e células hematopoéticas | Proliferação de células progenitoras e diferenciação |
| IL-4 | Linfócito Th ₂ , mastócitos, célula NK | Linfócitos T e B, mastócitos e macrófagos | Proliferação celular, Indução da expressão de MHC de classe II |
| IL-5 | Linfócitos Th ₂ , mastócitos | Eosinófilos | Proliferação e diferenciação celular |
| IL-6 | Macrófagos, Linfócitos Th ₂ | Células plasmáticas, linfócitos B e outros tipos celulares | Diferenciação e secreção de anticorpos |
| IL-8 | Medula óssea, Timo | Neutrófilos | Quimioatraente |
| IL-9 | Linfócitos Th ₂ | Linfócitos Th, mastócitos e eosinófilos | Induz a resposta inflamatória |
| IL-10 | Macrófagos, linfócitos Th ₂ , Mastócitos | Macrófagos, APC | Citocina anti-inflamatória |
| IL-11 | Medula óssea | Progenitores de linfócitos B e outras células | Diferenciação |
| IL-12 | Macrófagos e Linfócitos B | Linfócitos Th ₀ , Tc e NK | Proliferação e diferenciação (sinergia com a IL-2) |
| IL-13 | Linfócitos Th | Macrófagos e linfócitos B | Inibição de citocinas inflamatórias, regulação da inflamação e infecções parasitárias |
| IL-16 | Linfócitos Tc | Linfócitos Th | Quimiotaxia |
| IL-18 | Células de linhagem hematopoética e outras | Linfócitos T, e células NK | Citocina pro-inflamatória e fator de indução de INF- γ |
| INF-α | Leucócitos | - | Inibidor da replicação viral |
| INF-β | Fibroblastos | - | Inibidor da replicação viral |
| IFN-γ | Linfócitos Th ₁ e Tc e células NK | Várias células, incluindo os macrófagos | Inibidor da replicação viral e da proliferação celular. |
| TNF-α | Macrófagos | | Citotoxicidade, indução de secreção de citocinas |
| TNF-β | Linfócitos B | Células tumorais, neutrófilos e macrófago | Citotoxicidade e fagocitose |

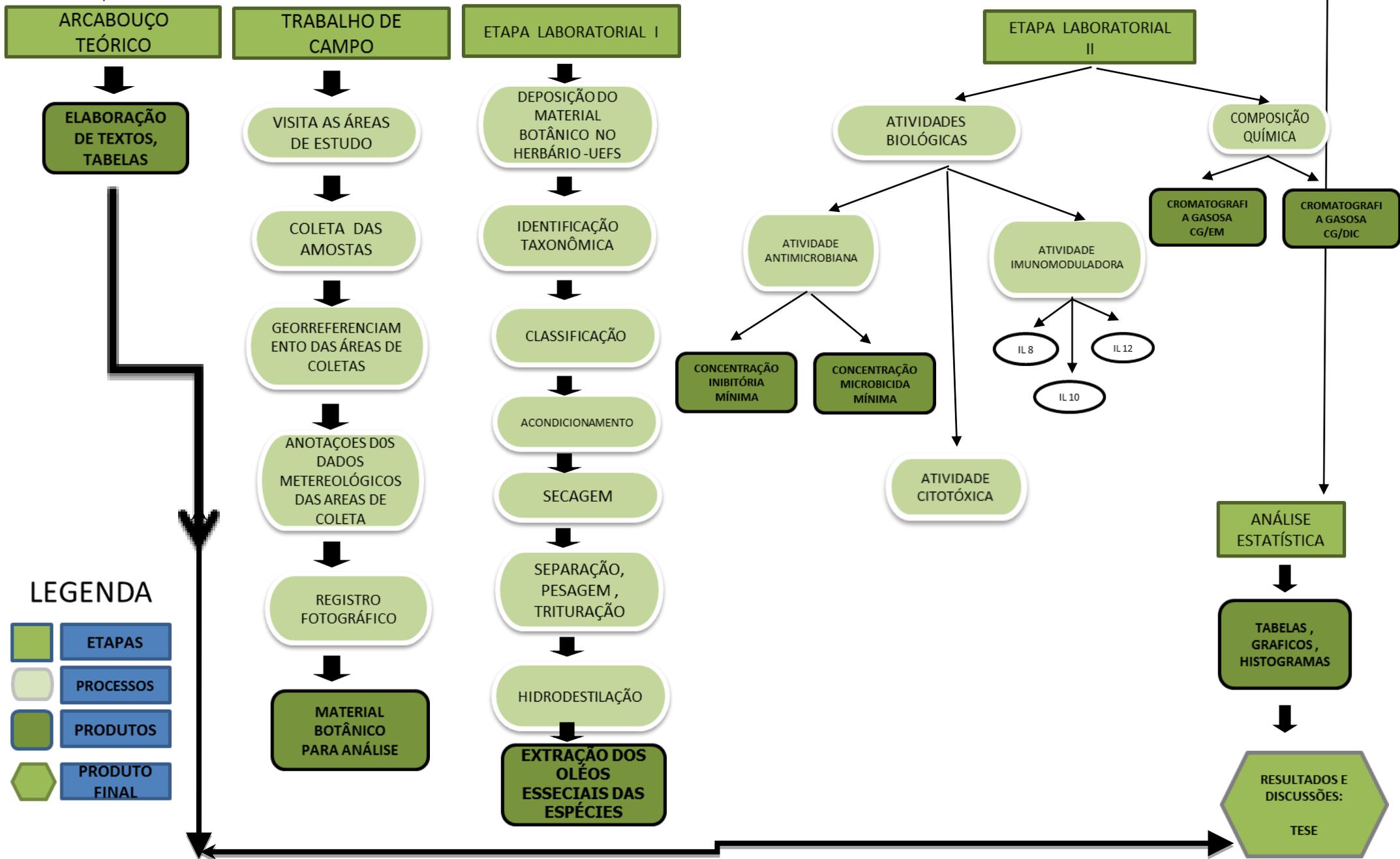
Figura 7 - Principais funções das citocinas.Fonte: Adaptado de SEYFRIED (2014).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Esta pesquisa foi desenvolvida em caráter interinstitucional com a colaboração do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM), onde foram feitos os testes da Determinação da Concentração inibitória mínima e microbicida mínima e o Laboratório de Produtos Naturais (LAPRON) da Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS , onde foram extraídos os óleos essenciais, Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS, o Laboratório de Química da Universidade Federal do Ceará, onde foram realizados a Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa e o Laboratório de Biotecnologia e Genética (LBG) e o Laboratório de Microbiologia Agroindustrial (LMA) onde foram realizados os testes de Citotoxicidade e dosagem de citocinas (ELISA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Para a sua execução, foi observado o seguinte delineamento de estudo:

FLUXOGRAMA METODOLÓGICO



3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO, MATERIAL BOTÂNICO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES

Foram realizadas quatro excursões a campo para a coleta das espécies *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. e *Ageratum conyzoides* L., nos meses de julho, agosto, outubro e novembro de 2012, abrangendo duas diferentes localidades do semiárido da Bahia: Serrinha (11° 36'3,1" S de latitude Sul e 38° 57'18,7" W de longitude oeste) e Mucugê (13° 8'10,3" S de latitude Sul e 41° 29'50,9" W de longitude Oeste) (FIGURA 8 e 9). Vale ressaltar que a região de Mucugê, na Chapada Diamantina, neste período de outubro e novembro passava por processos de queimadas naturais na região.

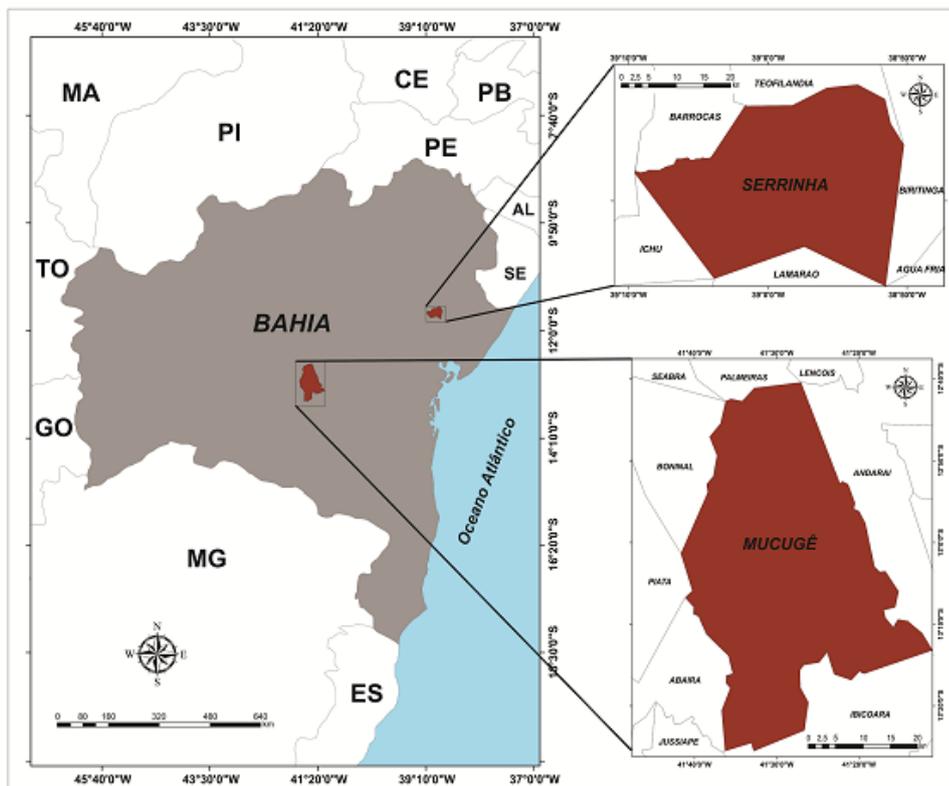


FIGURA 8 – MAPA DA ÁREA DE COLETA.

Fonte: IBGE (2014)

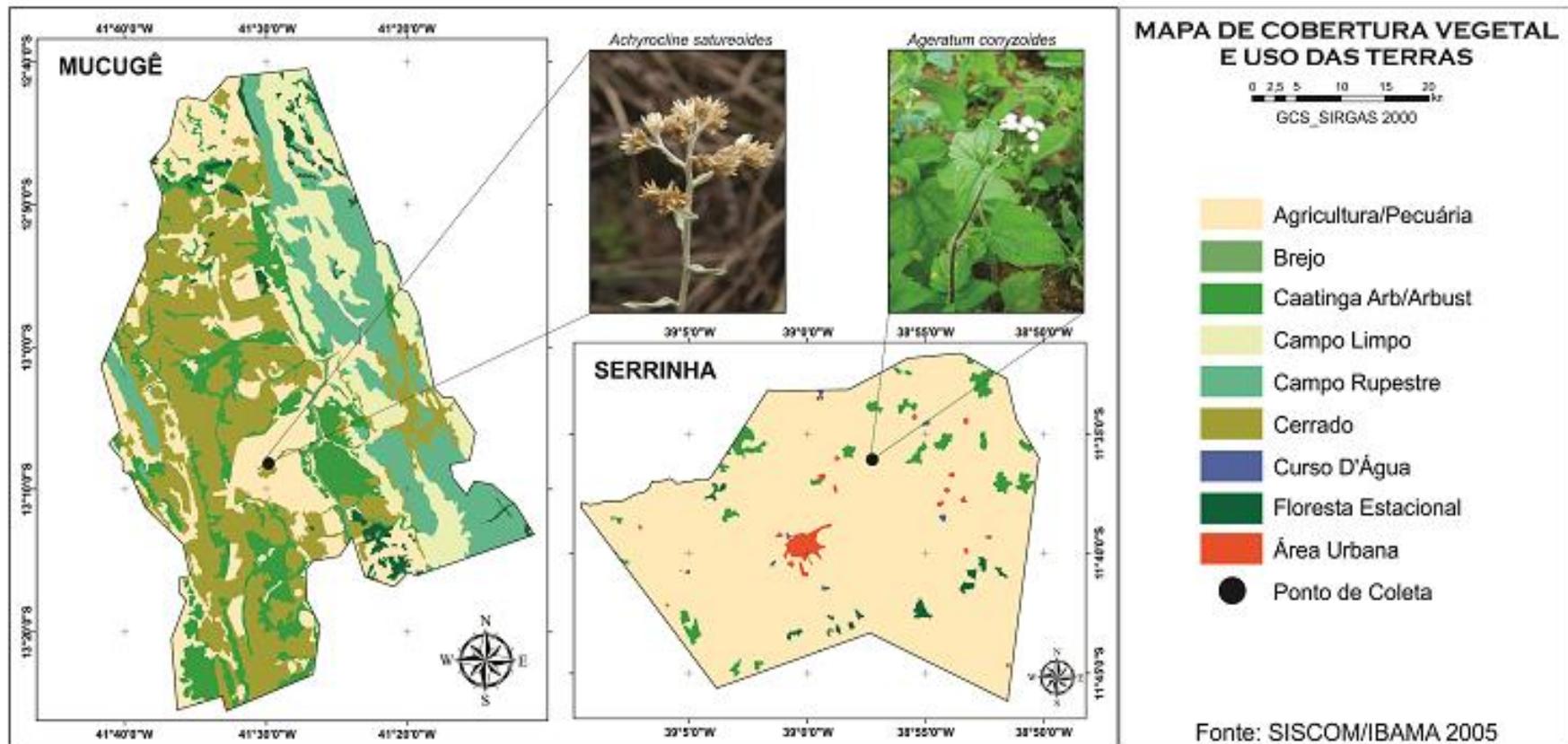


FIGURA 9 – Mapa do tipo de vegetação da área de Coleta.

Esta pesquisa, conforme já descrito anteriormente, foi uma continuação do trabalho de Mestrado, em que as espécies, em estudo, foram as que obtiveram os melhores resultados da atividade antimicrobiana com os extratos metanólicos obtidos das suas diferentes partes vegetais, neste caso folhas e flores. Para o doutorado, foi ampliada a proposta, agora para óleos essenciais bem como o estudo das atividades biológicas.

Inicialmente, foram coletadas, no período da manhã, as folhas de *Ageratum conyzoides* e as Flores de *Achyrocline satureoides* e anotadas: a data, altitude, coordenadas geográficas, dados meteorológicos, temperatura, pluviosidade e vegetação da área de coleta das espécies (FIGURA 10). O material botânico coletado foi depositado no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS: 146861, 140095, respectivamente), a identificação taxonômica foi realizada com a colaboração da Profa. Nádia Roque, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Bahia, especialista da Família Asteraceae. Foi adotada a classificação de Bremer (1994) para o tratamento das espécies da família. Todo o tratamento convencional de herborização seguiu o descrito por MORI et al. (1989) (FIGURA 11).

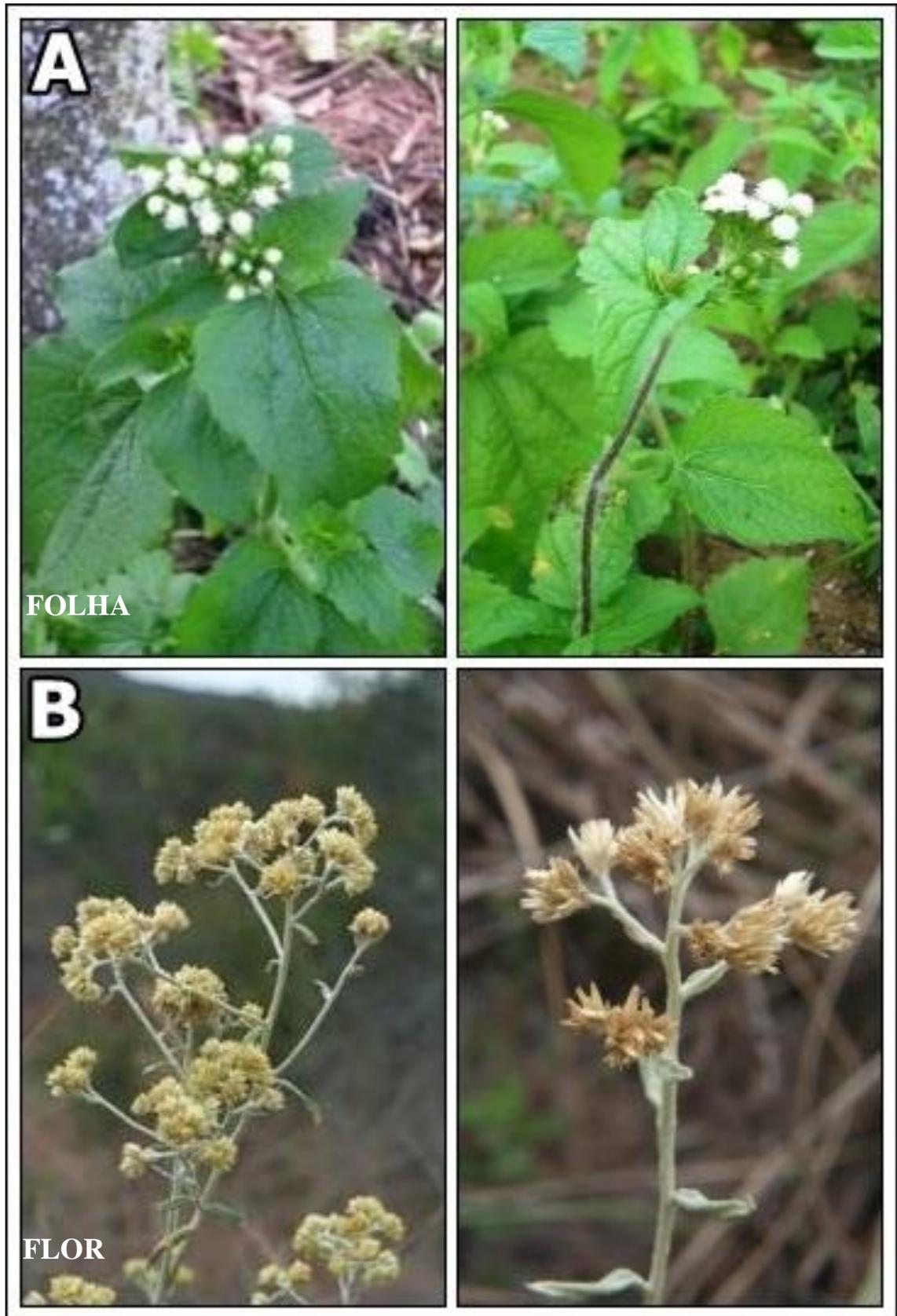


FIGURA 10 - Fotos das espécies coletadas: A- *Ageratum conyzoides*, B- *Achyrocline satureioides*.

Foto: GONÇALVES, (2012).



FIGURA 11 - Técnicas de Herborização (MORI, 1989). **Foto:** GONÇALVES (2012).

3.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

As flores de *A. saturooides* e as folhas de *A. conyzoides* foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos durante a coleta e posteriormente levadas ao Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON-UEFS). Em seguida, suas respectivas partes, flores e folhas, foram separadas (processo de catação) e secas, a temperatura ambiente, aproximadamente 25°C, em estantes forradas com papel metro. Somente após a secagem, que demorou em média 30 dias, em virtude do período chuvoso e grande umidade, o óleo foi obtido por hidrodestilação.

As folhas e flores das espécies selecionadas foram pesadas e em seguida, trituradas em um liquidificador industrial com a adição de água destilada para facilitar o processo, por cerca de 3 min. Após trituração, a biomassa vegetal foi transferida para um balão de destilação, com capacidade de 5 L, sendo submetido à hidrodestilação, em um aparelho de Clevenger, por um período de três horas contadas a partir do início do refluxo da água condensada do tubo separador para o balão de destilação. Após este intervalo de tempo, esperou-se o sistema estabilizar para que fosse realizada a leitura do volume de óleo extraído.

Os óleos obtidos foram retirados do tubo separador com o auxílio de uma micropipeta do tipo Pasteur, sendo a posteriori desidratados (remoção de água residual) pela adição de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrados, evitando perdas e conservados em frascos de vidro revestidos com papel alumínio. Os quais foram adequadamente vedados e armazenados sob a temperatura de - 86°C

(Ultrafreezer), até a realização da análise química e dos testes de atividades biológicas: antimicrobiana (MIC), citotóxica (MTT) e imunomoduladora (ELISA). Cada amostra de óleo essencial foi identificada com o nome da respectiva espécie (FIGURA 12).

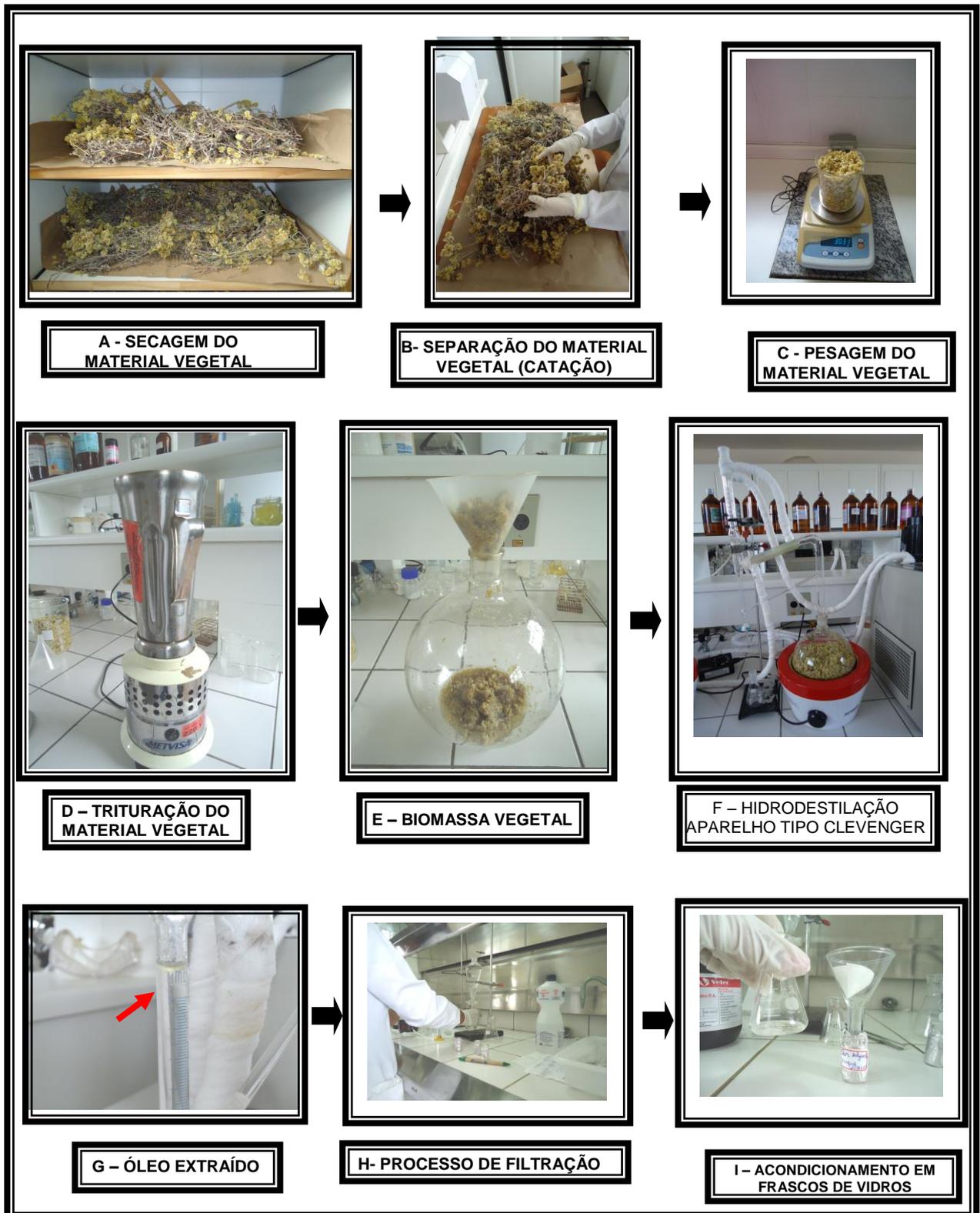


FIGURA 12 – Etapas para a obtenção dos óleos essenciais.

Ao hidrolato (mistura de óleo essencial e água) remanescente no tubo separador, foram adicionadas 5 mL do solvente heptano, visando separar pequenas porções de óleo dispersas na água condensada. A mistura hidrolato-heptano foi transferida para um funil de separação. Após a separação das duas fases: apolar (heptano e óleo) e polar (água), a solução heptânica foi removida do recipiente, desidratada com a adição de Na₂SO₄, filtrada e acondicionada em frascos de vidro. Sendo os mesmos mantidos sob condições semelhantes às das amostras de óleo essencial. Soluções de óleo em heptano são utilizadas, eventualmente, na análise da composição química de óleos voláteis, quando o rendimento destes é demasiadamente ínfimo, a ponto de impossibilitar a sua remoção do equipamento de hidrodestilação.

O teor de óleo essencial de cada amostra foi determinado pela relação entre o volume de óleo obtido e a biomassa vegetal livre de umidade, conforme a Equação 1. Para a obtenção do teor de umidade presente nas folhas, aproximadamente 1 g do material vegetal fresco foi pesado e submetido a um Determinador de Umidade Série ID Versão 1.8 Marte®, todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Este equipamento possui como fonte de calor o infravermelho. De acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, no modo automático, o determinador provoca a desidratação de um grama da amostra, num intervalo de tempo de dez minutos e sob a temperatura de até 100 °C. O percentual de umidade perdido pela amostra durante o aquecimento é detectado e fornecido, assim como a massa vegetal remanescente.

EQUAÇÃO 1. Cálculo do rendimento de óleos essenciais.

$$TO = \frac{VO}{BM \left[- \frac{BM \times U}{100} \right]} \times 100$$

Onde:

TO = Teor de óleo essencial (%)

Vo = Volume de óleo extraído (mL), lido diretamente na escala do tubo separador.

Bm = Biomassa vegetal (g)

U = Teor de umidade presente na biomassa vegetal (%);

3.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

3.4.1 CROMATOGRAFIA GASOSA

A análise por Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a um Detector de Ionização em Chama (CG/DIC) foi realizada em equipamento Shimadzu, modelo 17A, equipado com detector de ionização de chama de hidrogênio e coluna capilar SBP – 5 (30 cm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C, sendo programada para ter acréscimos de 3 °C a cada min, até atingir a temperatura máxima de 240°C. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 220 e 240°C, respectivamente. Uma quantidade de 10 mg das amostras foi diluída em 1 mL de acetato de etila, sendo injetado 1 µL da mistura pentano + óleo essencial. Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas.

A análise por Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM) foi realizada em equipamento Shimadzu, modelo CG 17A, com detector seletivo de massa, modelo QP 5000 (Shimadzu). A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária DB – 5, de 30 mm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás carreador. As temperaturas foram de 220 °C no injetor e 300 °C no detector. A temperatura do forno foi programada de 60 a 240 °C, com acréscimo de 3°C a cada min.

A identificação dos constituintes foi realizada através do cálculo do índice de Kovats (EQUAÇÃO 01) e do índice Aritmético (EQUAÇÃO 02) de cada um dos picos. Os índices foram calculados com a utilização de cromatogramas obtidos pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de n-alcanos (C8 a C24).

EQUAÇÃO 2. Cálculo do Índice Aritmético.

$$IA = 100N + \left[\frac{100 [TR(A) - TR_N]}{TR_{(N+1)} - TR_N} \right]$$

Onde:

AI = Índice Aritmético

N = Número de átomos de carbono do padrão do alcano (C8 a C24)

TR(A) = tempo de retenção do pico calculado

TR(N) = tempo de retenção do alcano correspondente ao pico calculado

$TR(N + 1)$ = tempo de retenção do alcano que elui posteriormente ao pico calculado

Cada pico do cromatograma foi também identificado pelo seu espectro de massas, pela comparação com a biblioteca do equipamento, pela consulta da literatura especializada (ADAMS, 2007; JOULAIN; KONIG, 1998) e pela injeção de padrões. Já a quantificação do percentual relativo dos constituintes identificados foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes pelo método da normalização (EQUAÇÃO 03).

Equação 3: Cálculo do Índice de Kovats (IK)

$$IK_A = 100N + 100 \frac{\log RT_{(A)} - \log RT_N}{\log RT_{(N+1)} - \log RT_N}$$

Onde:

IK_A : Índice de retenção do pico a ser calculado "A" (amostra)

N: Número de átomos de carbono do padrão com eluição anterior a "A"

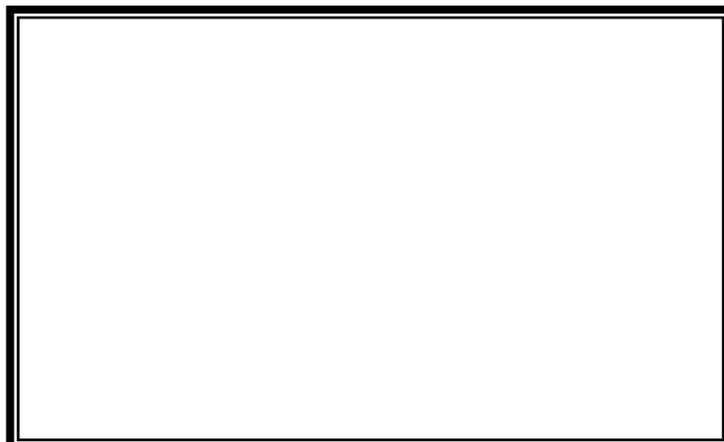
$RT_{(A)}$: Tempo de retenção do pico a ser calculado "A" (amostra)

RT_N : Tempo de retenção do pico do alcano com eluição anterior ao pico "A"

$RT_{(N+1)}$: Tempo de retenção do pico do alcano com eluição posterior ao pico "A"

3.5 ATIVIDADE CITOTÓXICA

A atividade citotóxica foi obtida através do método do MTT que consiste em uma dosagem colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo tetrazólio (MTT) de cor amarela a formazan insolúvel, de cor púrpura, que precipita devido à ação da enzima succinil-desidrogenase presente somente nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas (LIMA, 2013) (FIGURA 13).



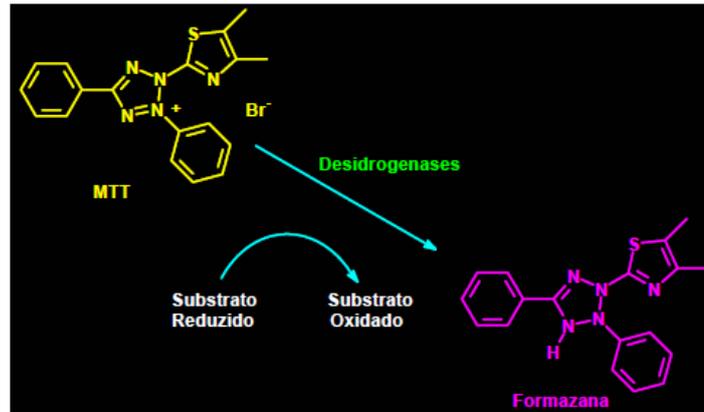


Figura 13 - Redução do sal tetrazólio (MTT) à formazana

3.5.1 CULTURA DE CÉLULAS E TRATAMENTO

A linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29), foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Brasil) (FIGURA 14). As células foram acondicionadas em frascos próprios para cultura, em 90% de meio DMEN, suplementados com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina), mantidas em estufa a 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As células quando em confluência de 100%, sofriam processo de tripsinização, e eram replaqueadas, cerca de duas vezes por semana. Para cada experimento, as células foram tripsinizadas, plaqueadas em placas de 96 poços, numa concentração de 1 x 10⁵cel/mL.



Figura 14 – Imagem microscópica das células HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) em alta densidade (Adaptado de American Type Culture Collection - ATCC).

3.5.2 BIOENSAIO MTT (VIABILIDADE CELULAR)

As amostras dos óleos essenciais foram diluídas em 870 μL de etanol e 30 μL de metanol (etanol/metanol 30%) e testadas na concentração de 2,5 até 100 mg/mL . Após 24 horas de adesão, cerca de 30% de confluência, as células foram tratadas com 5 diferentes concentrações (2,5, 12,5, 25, 50 e 100 mg/mL) do óleo essencial por 24 horas. Foi utilizado como controle negativo as células não tratadas e o controle positivo as células tratadas com triton a 1% (dissolvido no meio de cultura). No fim do experimento os sobrenadantes foram retirados e uma solução de Mtt a 1 mg/mL foi adicionada aos poços, sendo que para cada poço foi adicionado 50 μL . As células foram incubadas em atmosfera de CO_2 por 4 horas, em placas de 96 poços, revestidas com papel alumínio. Os cristais de formazan foram diluídos em DMSO puro (FIGURA 15).

Posteriormente, as placas foram agitadas durante 5 min e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida no leitor de ELISA (Enzyme Linked

Immunosorbent Assay) a 540 nm. A absorbância obtida das células controle, não tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular (MOSMANN, 1983). Todo o experimento foi realizado em triplicata.



Figura 15 – Bioensaio do MTT (Viabilidade Celular).

3.6 MICRO-ORGANISMOS TESTES

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram obtidos da Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS, BA), são eles: *Escherichia coli* CCMB 261, sensível à trimetoprima e resistente à sulfonamida; *Escherichia coli* CCMB 284 *Salmonella sp.* CCMB 281; *Pseudomonas aeruginosa* CCMB 268; *Staphylococcus aureus* CCMB 262, resistente à estreptomicina e diidroestreptomicina; *Staphylococcus aureus* CCMB 263; *Bacillus cereus* CCMB 282; *Candida albicans* CCMB 286; *Candida krusei* CCMB 287 e *Candida parapsilosis* CCMB 288, resistente a anfotericina-B. Os micro-organismos foram cultivados em Ágar Müller-Hinton (AMH), sendo que as bactérias foram incubadas a 37°C por 24 horas, e as leveduras a 28°C por 48 horas.

3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As amostras dos óleos essenciais das diferentes espécies foram individualmente testadas contra micro-organismos através do método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima e a concentração microbicida mínima.

3.7.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Foi utilizado o ensaio de susceptibilidade por microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* CLSI (2012a) para bactérias e CLSI (2012) para leveduras. A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada utilizando placas de microtitulação, de poliestireno, estéreis, com 96 poços, próprias para microdiluição (FIGURA 16).



FIGURA 16. Determinação da CIM utilizando-se uma pipeta automática multicanal. Foto: Vasconcellos- Neto (2009).

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) os óleos essenciais foram solubilizados em uma solução de Tween80 a 10% de modo a obter uma concentração inicial de 200 mg.mL^{-1} . Os compostos foram esterilizados em filtro Millipore de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Foi utilizado o ensaio de suscetibilidade por microdiluição em

caldo recomendado pelo CLSI (2012a), com modificações, sendo que todos os testes foram realizados em caldo Müller Hinton autoclavado, em triplicata.

Foram preparadas diluições geométricas na placa, conforme demonstrado na Figura 14, em que foram colocados 90 μL dos óleos essenciais diluídos em Tween80 a 10% nos poços das linhas A1 até A9 da placa de microtitulação, contendo previamente 90 μL de caldo Müller-Hinton duas vezes concentrado. Com isso, os primeiros poços (A1 até A9) continham óleos essenciais diluídos na concentração de 10,00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ até a de 0,078 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (H1 até H9) (FIGURA 17).

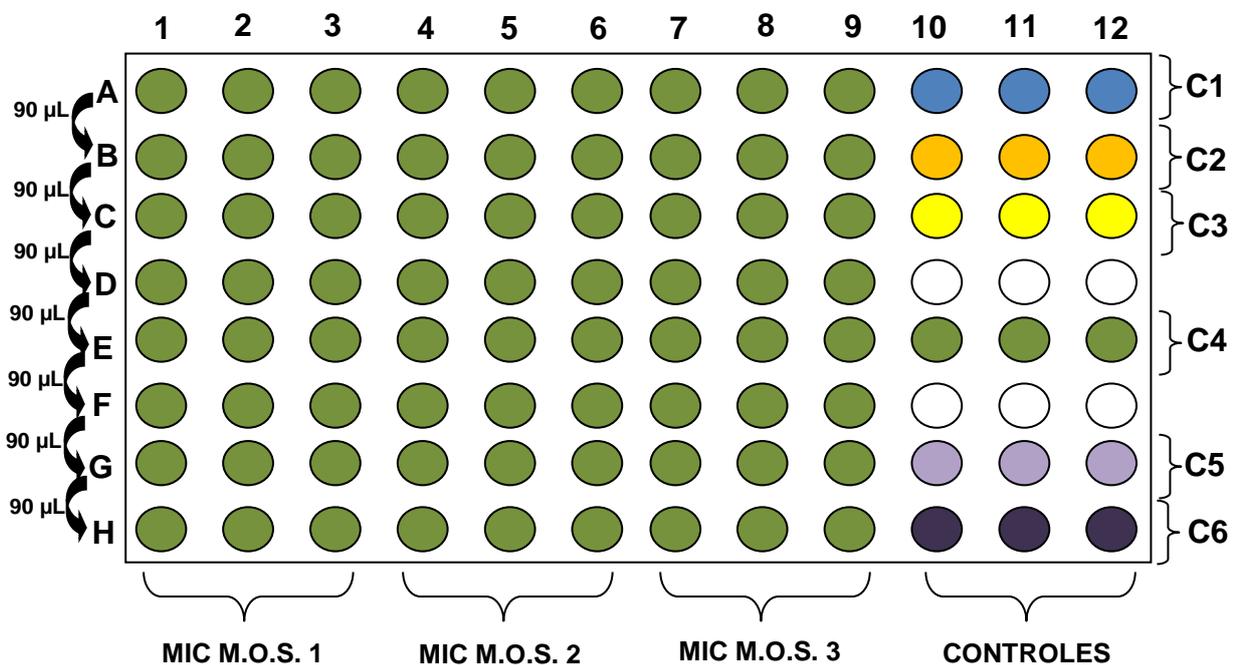


Figura 17 - Esquema da placa de 96 poços para determinação da CIM. C1; C2 e C3: Controle dos micro-organismos; C4: Controle do óleo; C5 e C6: Controle do meio de cultura 1x e 2x concentrado, respectivamente M.O.S: Micro-organismos.

As suspensões de micro-organismos foram obtidas pela adição do inóculo microbiano a 6,0 mL de solução salina a 0,45% esterilizada. A suspensão do micro-organismo teste foi ajustada, 0,1 mL de $1,5 \times 10^8$ células mL^{-1} para bactérias e 0,1 mL de $1,5 \times 10^5$ células $\cdot\text{mL}^{-1}$ para leveduras, utilizando o turbidímetro do equipamento VITEK da Biomérieux, seguindo as instruções do fabricante. Depois de realizadas as diluições em todos os poços, cada poço recebeu 10 μL da suspensão de micro-organismo teste, totalizando um volume de 100 μL em cada poço (90 μL do CMH + óleo essencial e 10 μL de micro-organismo). As placas foram incubadas à 28°C por 48 horas para as leveduras e à 37°C por 24 horas para as bactérias. Após

o período de incubação, foram adicionados 50 µL de cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio na concentração final de 1,25 mg.poço⁻¹ (leveduras) e 30 µL de Rezasurina na concentração final de 0,01% (bactérias), para análise quantitativa do crescimento microbiano nos poços de ensaio e determinação da atividade antimicrobiana relativa de cada diluição das amostras. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.7.2 CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA (CMM)

Após a determinação da CIM, realizou-se a concentração microbicida mínima (CMM). Para isso, utilizaram-se placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (AMH). Das amostras que apresentaram resultado positivo no CIM foram retiradas alíquotas de 5 µL dos poços e plaqueadas sobre AMH. As placas de AMH contendo as leveduras foram incubadas a 28°C por 48h e bactérias a 37°C por 24h. O crescimento microbicida mínimo no meio de cultura contido na placa de Petri caracterizou o composto como tendo atividade bacteriostática e a ausência de crescimento, atividade bactericida.

3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS

A determinação das Interleucinas (IL 8, IL 10 e IL 12) foram realizadas através do ensaio ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay) seguindo as especificações do fabricante (R & D System Corporations, Minneapolis, MN) e utilizando sobrenadantes de culturas de células HT29 estimuladas por 24 horas após o teste de citotoxicidade.

Resumidamente, o ensaio foi dividido em dois dias, sendo o primeiro dia de sensibilização da placa e o segundo de coloração da amostra. No primeiro dia, os anticorpos primários foram diluídos no tampão de ligação, adicionados 100 µL por poço de anticorpo na placa de 96 poços e espalhados uniformemente. A placa foi revestida com papel alumínio e incubada a 4°C *Overnight*. No segundo dia, as placas foram bloqueadas com PBS/soro Albumina bovina 4% (SAB, Sigma) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente. Em seguida, após um ciclo de três lavagens de solução tampão PBS 0,05% Tween 20, foram adicionadas 100 µL do sobrenadante e as diluições seriadas da curva padrão. As placas foram incubadas por duas horas a temperatura ambiente e após o término deste período, os

respectivos anticorpos anti-quimiocinas/citocinas conjugados a biotina foram adicionadas as placas e incubados por uma hora a temperatura ambiente. A seguir, após um ciclo de três lavagens, foi adicionada estreptoavidina peroxidase do kit por 30 min à temperatura ambiente. Após novas lavagens, substrato 3, 3',5',5' tetrametilbenzidina (TMB, Zymed, São Francisco, CA, EUA) foi adicionado as placas e a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1 M. A leitura foi realizada em leitor de microplacas de ELISA (Molecular Devices, CA, EUA) a 450 nm.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram interpretados por meio de análise das medidas descritivas médias e mediana utilizando-se um nível de significância de 5% de probabilidade. A análise estatística foi feita pelo método não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre as diferentes concentrações uma vez que a normalidade não foi verificada, considerando significantes as diferenças com valor $p < 0,05$. Para comparação entre os níveis de citocinas das duas espécies foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney. Foi utilizada o software livre R versão 3.10.

4.RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Na extração dos óleos essenciais foram utilizados, em média, 150 g das flores de *A. saturooides* e 120 g das folhas de *A. conyzoides*. A massa total de flores de *A. saturooides* (150 g) e folhas de *A. conyzoides* (120 g) secas das espécies estudadas apresentaram o rendimento de $0,60\pm 0,50\%$ e $0,47\pm 0,40\%$, respectivamente. Os resultados encontrados estão em conformidade com os obtidos na literatura, pois os rendimentos dos óleos essenciais da Família Asteraceae são, em geral, inferiores a 1% segundo Verma et al. (2011).

Lima et al. (2014) em estudos com óleos essenciais de *A. conyzoides* obtiveram o rendimento do óleo essencial inferior a 0,46%. Entretanto, em estudos anteriores, Castro et al. (2004), o rendimento do óleo essencial dos cinco acessos de mentrasto apresentou variação de rendimento entre 0,49 a 0,70% (p/p). Já o rendimento do óleo essencial de *A. saturooides* apresentou o teor de 0,60%. Barroso (2011) em estudos de obtenção de extratos e óleos essenciais desta espécie obteve a variação de rendimento entre 0,43 a 0,87%, confirmando os dados apresentados. Em outros trabalhos como Bezerra et al. (2008) o indicativo da época ideal de colheita de espécies medicinais produtoras de flores é bastante variável, coletando-se desde botões florais, ainda fechados, como em *Arnica montana* Hook. semi-abertos, em malva (*Malva sylvestris* L.), e até flores completamente abertas, como em *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert. Portanto, deve-se levar em conta os teores de princípios ativos presentes nas estruturas reprodutivas.

A produção de óleos essenciais é muitas vezes influenciada por fatores internos e externos à planta que vão condicionar não só o tipo de compostos voláteis a serem produzidos, mas também as quantidades em que estes se encontram, resultando uma grande variabilidade química dentro da mesma espécie (Cunha et al., 2012).

Além disso, outros trabalhos afirmaram que a constituição genética das plantas influencia a produção de determinados metabólitos, e que variedades diferentes de espécies de plantas medicinais podem conter diferentes teores de óleo essencial. Cada planta tem ciclos de vida específicos da sua espécie, enquanto umas florescem no verão, outras florescem no outono ou inverno. Assim, também os

óleos essenciais produzidos variam em quantidade durante o ano e em certas plantas a composição dos óleos essenciais variam, também durante o dia, onde por exemplo o seu teor é maior nas primeiras horas da manhã (Cunha et al., 2012). Nesta pesquisa, o período de coleta foi preferencialmente pela manhã e as estações do ano foram inverno e primavera.

Verma et al. (2013) verificaram que ao longo do ano as quantidades de óleo essencial variavam entre 0,37 e 0,82%, que correspondem, aos meses de maio e setembro, respectivamente. Além disso, também as concentrações dos seus constituintes não eram constantes ao longo do ano. Este estudo permitiu relacionar a temporada de colheita com a quantidade e qualidade do óleo essencial produzido. Estudos como estes são de elevada importância, uma vez que permitem saber qual a melhor altura de colheita para obter maior quantidade do componente de interesse resultando numa extração mais rentável.

A época de coleta é um dos fatores que mais influenciam na atividade farmacológica de drogas vegetais, visto que, a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. Atualmente, são relatadas, por exemplo, variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, tendo como destaque os óleos essenciais (GIACOMELLI et al, 2014).

Para Bruneton (2001) as condições climáticas e a natureza do solo influenciam diretamente no teor como nos constituintes químicos de um óleo essencial. É relatado também que o horário do dia interfere na produção de óleos essenciais, sendo recomendado que as plantas usadas para a produção de óleos essenciais ou compostos secundários devam ser colhidas pela manhã, após a secagem do orvalho, quando as concentrações de óleos essenciais são maiores em relação aos compostos primários (PINTO et al., 2001; SIMÕES e SPITZER, 2004).

4.2 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A análise dos constituintes químicos identificados nos óleos essenciais de *A. saturoides* (Lam.) DC. e *A. conyzoides* L. revelou a predominância de sesquiterpenos nas espécies estudadas, conforme dados ilustrados nas Tabelas 03 e 04.

Existe uma significativa semelhança entre os resultados obtidos na presente pesquisa, com a maior parte dos trabalhos descritos na literatura tanto para a família

Asteraceae em geral, como especificamente, para a espécie *A. saturoides*. Ekundayo et al., (1988) analisaram o óleo essencial das flores de *A. saturoides* por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, encontrando 51 componentes, dentre eles: 13 hidrocarbonetos monoterpenoides (5.0%), 7 monoterpenoides oxigenados (1.4%), 16 hidrocarbonetos sesquiterpenoides (4.3%), 4 sesquiterpenoides oxigenados (0.8%), 3 fenilpropanoides e benzenoides (2.33%), 6 cromenos (85.2%), e 2 cromanas (0.9%). Entre os monoterpenos encontram-se o sabineno, β -pineno, β -feladreno, 1,8 cineol, terpineno-4-ol e o α -terpineol; nos sesquiterpenos são encontrados β -cariofileno, sesquifeladreno, e o epóxi-cariofileno (LIMA & CARVALHO, 2004). As análises cromatográficas dos óleos essenciais de *A. saturoides* demonstraram que o perfil obtido está em concordância com o publicado na literatura (LORENZO et al., 2000), onde se observa que os componentes majoritários são α -Pineno, E-Cariofileno, α -Copaeno, α -Humuleno, d-Cadineno.

TABELA 03 – Composição química quantitativa dos óleos essenciais de *Achyrocline satureoides* (Flor).

| COMPOSTO | IK _{CALC} | IK _{LIT} | MÉDIA | DESVIO PADRÃO |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|-------|---------------|
| α -pineno | 940 | 939 | 5,71 | 3,09 |
| canfeno | 954 | 954 | - | - |
| β -pineno | 981 | 979 | - | - |
| p-cimeno | 1028 | 1024 | - | - |
| limoneno | 1032 | 1029 | - | - |
| 1,8-cineol | 1035 | 1031 | - | - |
| linalol | 1099 | 1096 | - | - |
| endo-fenchol | 1116 | 1116 | - | - |
| trans-verbenol | 1143 | 1144 | - | - |
| borneol | 1170 | 1169 | - | - |
| α -terpineol | 1193 | 1188 | - | - |
| α -copaeno | 1376 | 1376 | 7,50 | 1,95 |
| <i>E</i> -cariofileno | 1421 | 1419 | 50,23 | 3,17 |
| α -humuleno | 1456 | 1454 | 2,09 | 0,13 |
| g-muuroleno | 1479 | 1479 | 2,98 | 0,34 |
| α -amorfeno | 1482 | 1484 | - | - |
| β -selineno | 1489 | 1490 | - | - |
| g-amorfeno | 1497 | 1496 | 1,08 | 0,10 |
| α -muuroleno | 1503 | 1500 | 1,95 | 0,22 |
| g-cadineno | 1518 | 1513 | 2,78 | 0,36 |
| d-cadineno | 1528 | 1523 | 6,32 | 0,78 |
| cariofilenil álcool | 1577 | 1572 | - | - |
| óxido de cariofileno | 1591 | 1583 | 3,55 | 1,42 |
| cariofila-4(12),8(13)-dien-5-ol | 1646 | 1640 | 2,01 | 1,02 |
| b-eudemol | 1653 | 1650 | - | - |
| 7-epi-a-eudesmol | 1661 | 1663 | 2,25 | 1,01 |
| % de identificados | | | 89,53 | 1,61 |

TABELA 04 – Composição química quantitativa dos óleos essenciais de *Ageratum conyzoides* (Folha).

| COMPOSTO | IK _{CALC} | IK _{LIT} | MÉDIA | DESVIO PADRÃO |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|-------|---------------|
| α -pineno | 940 | 939 | 25,49 | 9,82 |
| canfeno | 954 | 954 | - | - |
| β -pineno | 981 | 979 | - | - |
| p-cimeno | 1028 | 1024 | - | - |
| limoneno | 1032 | 1029 | 0,58 | 0,13 |
| 1,8-cineol | 1035 | 1031 | 0,97 | 0,24 |
| linalol | 1099 | 1096 | - | - |
| endo-fenchol | 1116 | 1116 | - | - |
| trans-verbenol | 1143 | 1144 | - | - |
| borneol | 1170 | 1169 | - | - |
| α -terpineol | 1193 | 1188 | - | - |
| α -copaeno | 1376 | 1376 | 3,53 | 0,33 |
| <i>E</i> -cariofileno | 1421 | 1419 | 37,19 | 15,75 |
| α -humuleno | 1456 | 1454 | 1,37 | 0,42 |
| g-muuroleno | 1479 | 1479 | 1,32 | 0,27 |
| α -amorfenol | 1482 | 1484 | - | - |
| β -selineno | 1489 | 1490 | - | - |
| g-amorfenol | 1497 | 1496 | 0,69 | 0,24 |
| α -muuroleno | 1503 | 1500 | 0,65 | 0,21 |
| g-cadineno | 1518 | 1513 | 1,14 | 0,17 |
| d-cadineno | 1528 | 1523 | 1,61 | 0,82 |
| cariofilenil álcool | 1577 | 1572 | 1,24 | 0,33 |
| óxido de cariofileno | 1591 | 1583 | 10,93 | 11,46 |
| cariofila-4(12),8(13)-dien-5-ol | 1646 | 1640 | 2,35 | 1,03 |
| b-eudemol | 1653 | 1650 | - | - |
| 7-epi-a-eudesmol | 1661 | 1663 | 0,92 | 0,24 |
| % de identificados | | | 90,15 | 6,00 |

Já para a espécie *Ageratum conyzoides* dentre os compostos secundários caracterizados e presentes em seu óleo essencial, destacam-se os cromenos, precocenos (I e II) e o sesquiterpeno trans-cariofileno (Castro *et al.*, 2004). Em estudos fitoquímicos a partir de folhas e flores de *Ageratum conyzoides*, Sundufu *et al.* (2003) isolaram como componentes dos óleos essenciais ageratocromeno (precoceno II, 25,89%), o sesquiterpeno cariofileno (23,79%); demetoxiageratocromeno (precoceno I, 14,76%) e alguns hidrocarbonetos monoterpenos, com percentuais de 2-5,5%. Em estudos de Zoghbi *et al.* (2007) dos componentes voláteis da espécie *A. conyzoides* coletados no município de Santarém Novo e Belém, estado do Pará, verificaram a ocorrência de pelo menos dois tipos químicos no Pará: o tipo rico em precoceno I, similar aos óleos de Cameroon, Ghana e Burkina Faso, e do Sudeste do Brasil, e o tipo rico em apineno/germacreno D. Lima *et al.* (2010) identificaram e quantificaram o óleo essencial da planta e encontraram 87% de precoceno em seu óleo essencial como composto majoritário, com atividade inseticida para a lagarta-do-cartucho *S. frugiperda*. Assim, o perfil químico das folhas de *A. conyzoides* do presente estudo apresentou resultados divergentes da literatura o que sugere a presença de um novo quimiotipo, visto que para a referida espécie há relatos da presença marcante de precocenos o que não foi observado nestas análises químicas.

A variação quantitativa e qualitativa nos constituintes químicos dos óleos essenciais das duas espécies estudadas em comparação com a literatura pode estar relacionada também a alterações no clima e no solo; as interações com herbívoros, dispersores de sementes e polinizadores; as interações planta-planta; bem como, a idade do vegetal, seu estágio de desenvolvimento e a fenologia (períodos de floração e frutificação), que provocam modificações metabólicas refletindo tanto no rendimento das essências como na sua composição química (GOBBO-NETO, 2007).

Os terpenos são chamados de inseticidas naturais e esta classe integra os limonóides, limoneno e o mirceno, os quais desempenham um papel de proteção às plantas contra os insetos. Os terpenos são formados por unidades básicas de pirofosfato de isopentenila ou isopreno ativo, originando os triterpenos e os sesquiterpenos já citados na literatura como substâncias dotadas de ação bactericida (ARANTES *et al.*, 2005). Segundo Sartori (2005) tem sido demonstrado que os terpenos são ativos contra diversos microrganismos. Seu mecanismo de ação provável envolve a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos. O β -

cariofileno, por exemplo, é um sesquiterpeno descrito em diversos óleos essenciais responsável pelo aroma forte e por diversas atividades biológicas, tais como: anti-inflamatória (FERNANDES et al., 2007; PASSOS et al., 2007), antialérgica (GHELARDINI et al., 2001), anestésica local (COSTA et al., 2000), antifúngica (ZHENG et al., 1992) e anticarcinogênica (CHINOUE et al., 1996). Neste presente estudo foi observada a presença majoritária destes compostos.

4.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os resultados da avaliação da atividade citotóxica dos óleos essenciais das folhas de *A. conyzoides* e das flores de *A. saturoides* demonstraram que estes não apresentaram alto grau de citotoxicidade sobre as células HT29, quando comparados com os controles, como ilustrado na figura 18. O óleo essencial de *A. conyzoides* foi considerado atóxico pelo ensaio do MTT nas cinco concentrações testadas (2,5; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). E apenas as duas primeiras e menores concentrações testadas (2,5 e 12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) do óleo essencial de *A. saturoides* não foram considerados tóxicas.

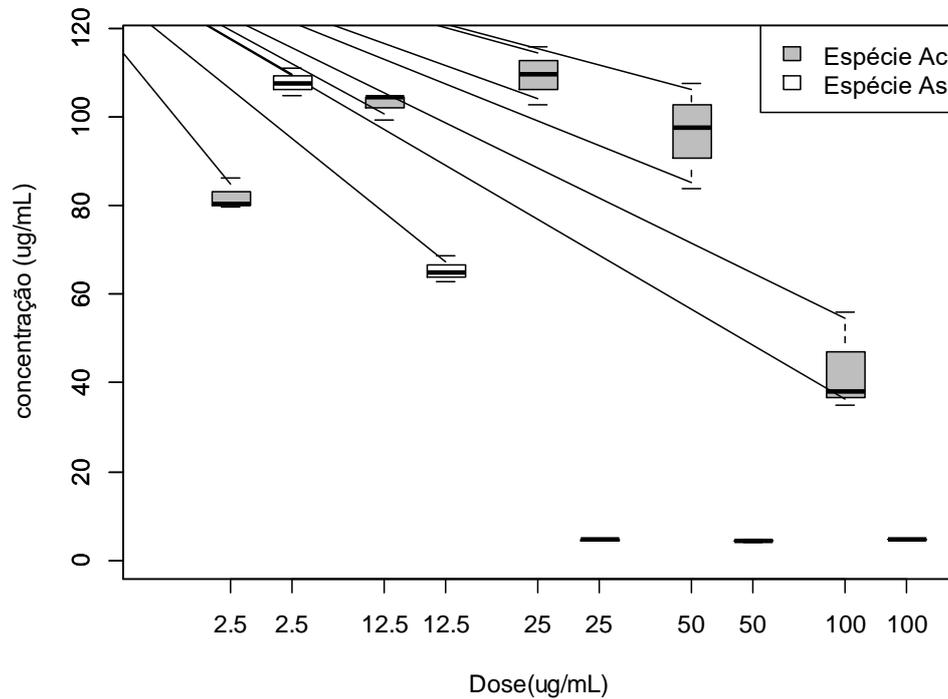


FIGURA 18 Viabilidade celular da linhagem HT 29 após tratamento com os óleos essenciais das Flores de *Achyrocline saturooides* (As) e Folhas de *Ageratum conyzoides* (Ac) nas concentrações de 2,5; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Os ensaios de citotoxicidade têm sido os métodos *in vitro* mais estudados. Sabe-se que linhagens celulares quando mantidas em cultura dividem-se e multiplicam-se continuamente. A base dos ensaios de citotoxicidade está exatamente na avaliação da interferência induzida por agentes químicos (e.g. tensoativos) nos processos metabólicos celulares e na investigação a respeito da maneira em que esses processos podem vir a intervir no crescimento/multiplicação celular, ou até mesmo culminar na morte celular, reduzindo assim, o número de células viáveis se comparado com o de culturas controles não-tratadas. Estes ensaios tendem a simplificar os eventos quantificados, contudo, por serem métodos simples, de baixo custo e reprodutíveis são extensamente empregados em processos de triagem (GOMES, 2014).

Apesar destes ensaios apresentarem vantagens como precisão e serem sujeitos a automação, eles são extremamente dependentes de possíveis alterações fisiológicas celulares, como alterações nas atividades lisossomal (NRU) e mitocondrial (MTT). Estes parâmetros são dependentes das condições da cultura

celular, que podem ser modificados por aspectos como densidade celular e secreção celular. Conseqüentemente, somente células crescendo em condições similares podem ser comparadas por estes métodos (TARIKU et al, 2011).

Desta forma, neste trabalho, a atividade celular foi quantificada através da redução do MTT à formazan correspondente (Figura 19), ocasionada indiretamente pela ação das enzimas desidrogenases presentes nas células viáveis. Os produtos formados pela atividade enzimática, (NADH - NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEÓTIDO HIDRETO) e (NADPH - NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEÓTIDO FOSFATO), são responsáveis em reduzir o sal tetrazólio à formazan na medida em que não há perda da viabilidade celular.

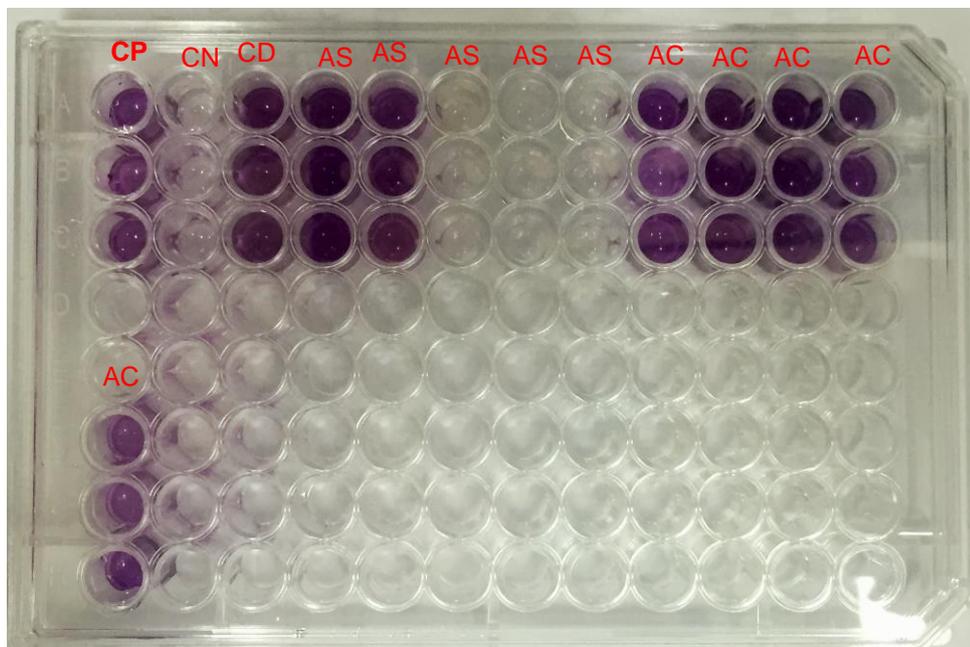


FIGURA 19 – Mtt das Flores de *A. saturooides* (AS) e Folhas de *A. conyzoides* (AC).

CP: controle positivo; CN: Controle negativo; CD: Controle do diluente.

Pelo fato dos óleos essenciais serem produtos advindos dos vegetais, não se exclui a possibilidade deles apresentarem toxicidade. Nesse sentido, a avaliação citotóxica dessas substâncias é de suma importância para assegurar a qualidade e segurança desses produtos quando se tratam de compostos promissores a aplicações fármacos, alimentos ou cosméticos.

O teste de citotoxicidade *in vitro* é classificado na ISSO 10993-1 (Orgão Internacional de Padronização) como o primeiro ensaio para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material. Este teste promove resultados preliminares

relacionados a interação do material e o corpo biológico, de forma rápida e eficiente, minimizando a necessidade de testes em animais. Para Jomaa et al. (2012) esses ensaios consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição de formação de colônias celulares.

O produto, para ser viável no ensaio de citotoxicidade *in vitro*, não deve ocasionar a morte das células, nem afetar suas funções celulares. Esses testes podem detectar a ocorrência de lise de células, a inibição de formação de colônias celulares, deslocamento de tecido, entre outros efeitos que possam ser desencadeados nelas. Segundo Ferreira (2011) essas alterações são detectadas na maioria das vezes por meio de mecanismos de coloração, que são aplicados a culturas de células após um tempo de exposição ao material em teste.

A determinação da citotoxicidade *in vitro* tem se tornado cada vez mais constante em trabalhos para a determinação da toxicidade de óleos essenciais. Bayala e colaboradores (2014), realizaram pesquisas com os óleos essenciais de *Ocimum americanum*, *Hyptis spicigera*, *Lippia multiflora*, *Ageratum conyzoides*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Zingiber officinale* onde foram testados para avaliação da possível atividade antiproliferativa em células cancerígenas, nomeadamente, células epiteliais derivadas de carcinoma humano da próstata (células sensíveis ao androgênio com baixo poder metastático derivadas de um nódulo linfático metastático (LNCaP) e células insensíveis ao androgênio com elevado potencial metastático derivadas de metástase em osso (PC-3). No final do estudo, os óleos essenciais de *Ocimum americanum*, *Hyptis spicigera* e *Eucalyptus camadulensis* não apresentaram efeitos sob o crescimento das células. Já os óleos essenciais de *L. multiflora*, *A. conyzoides* e *Z.officinale* demonstraram atividade antiproliferativa, anti-inflamatória e antioxidante, (CELIA et al. 2013).

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO MICROBICIDA MÍNIMA (CMM).

Considerando que a ação antimicrobiana dos óleos depende da sua composição química, comparamos os compostos majoritários presentes nas

amostras de óleos essenciais testadas segundo análises CG-EM com outros estudos, bem como a resistência intrínseca dos microrganismos testados (CIM 90%) para a discussão dos resultados obtidos.

Os óleos essenciais vêm sendo amplamente estudados, com atenção especial para o uso no controle de processos infecciosos, em virtude disso foram realizados ensaios para verificação da capacidade inibidora dos óleos essenciais das espécies: *A. saturooides* (flores) e *A. conyzoides* (folhas) contra dez microrganismos dentre eles: bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras.

A Tabela 5 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *A. saturooides* e *A. conyzoides* frente às cepas bacterianas Gram-positivas: *S. aureus* CCMB 262, *S. aureus* CCMB 263, *B. cereus* CCMB 282; Gram-negativas: *E. coli* CCMB 261, *E. coli* CCMB 284, *P. aeruginosa* CCMB 268, *Salmonella* sp. CCMB 281 e às leveduras: *C. albicans* CCMB 286, *C. krusei* CCMB 287 e *C. parapsilosis* CCMB 288.

A técnica de diluição para determinação de concentrações inibitórias mínimas (CIM) junto com outros sistemas de diluição de antibióticos é considerada, frequentemente, como a melhor metodologia para a avaliação de suscetibilidade ou de resistência das bactérias aos antimicrobianos (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988; REIS, 2006). A determinação da CIM e Concentração Microbicida Mínima (CMM) foram realizadas com os óleos essenciais das duas espécies de plantas.

TABELA 05 - Resultados das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), em (ambas em mg.mL⁻¹) dos óleos essenciais de *A. conyzoides* e *A. saturooides*.

| Cepas testadas | C.T.L 1 | C.T.L. 2 | <i>A. conyzoides</i> (FOLHA) | | <i>A. saturooides</i> (FLOR) | |
|-----------------------------|------------|-------------|---------------------------------|------|---------------------------------|-------|
| | | | CIM | CMM | CIM | CMM |
| <i>S. aureus</i> 262 | 0,31 | N/A | 2,5 | 5,0 | 0,15 | 0,31 |
| <i>S. aureus</i> 263* | 0,62 | N/A | 5,0 | 10 | 0,15 | 0,31 |
| <i>B. cereus</i> 282* | 0,15 | N/A | 5,0 | 10 | 0,15 | 0,31 |
| <i>E. coli</i> 261* | 0,15 | N/A | 5,0 | 10 | 5,0 | 10 |
| <i>E. coli</i> 284* | 0,15 | N/A | 5,0 | 10 | 5,0 | 10 |
| <i>P. aeruginosa</i> 268* | 10 | N/A | 2,5 | 5,0 | 5,0 | 10 |
| <i>Salmonella</i> sp. 281* | 0,31 | N/A | 5,0 | 10 | 5,0 | 10 |
| <i>C. albicans</i> 286* | 10 | 10 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 5,0 |
| <i>C. kruzei</i> 287* | N/A | 0,078 | 0,15 | 0,31 | 0,078 | 0,078 |
| <i>C. parapsilosis</i> 288* | N/A | 10 | 5,0 | 10 | 5,0 | 10 |

* número de identificação dos micro-organismos pela Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB); *B.c.*- *Bacillus cereus*, *C.a.* – *Candida albicans*, *C.k.* – *Candida kruzei*, *C.p.* – *Candida parapsilosis*, *E.c.* – *Escherichia coli*, *P.a.* – *Pseudomonas aeruginosa*, *S.a.* – *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp.- *Salmonella* sp. C.T.L 1: Cloranfenicol; C.T.L 2: Nistatina. N/A- Não se aplica.

Muitas das substâncias constituintes de óleo essencial possuem habilidade de romper ou penetrar na estrutura lipídica presente na estrutura bacteriana levando ao processo de morte (KOYAMA et al., 1997). Para se conhecer o modo de ação dos constituintes presentes nos óleos essenciais será necessário examinar isoladamente cada constituinte, e a sincronização entre eles, para averiguar as atividades bacterianas (COSTA et al., 2011). Já a tolerância relativa aos óleos essenciais encontrada nas bactérias Gram negativa tem sido atribuída à presença de uma camada hidrofílica externa que pode bloquear a penetração de componentes hidrofóbicos através da membrana da célula-alvo (MANN et al., 2000).

Avancini et al. (2006) comprovaram, em estudo *in vitro* realizado com decocto da planta *A. saturooides*, que esta apresenta atividade biológica bacteriostática e bactericida contra amostras bacterianas gram-positivas padronizadas. Calvo et al. (2006) confrontando extratos desta espécie a diferentes cepas de *S. aureus* relata atividade antibacteriana dos extratos frente ao *S. aureus*. Nool (2011) e Oliveira (2012) verificaram que o decocto de *A. saturooides*, na mesma concentração

utilizada neste experimento (5 g/100 mL) apresentou capacidade antibacteriana sobre a bactéria *S. aureus* o que corrobora com a atividade antibacteriana frente ao *S. aureus* realizada neste estudo. Mota (2008) relata que os decoctos da *A. satyroides* mostraram-se completamente ineficazes frente a algumas bactérias gramnegativas, a exemplo da *E. coli*, corroborando com este estudo, o qual mostrou que as formas de extração por infusão e decoção foram completamente ineficazes às bactérias gram-negativas testadas neste estudo. Mota, Carvalho e Wiest (2011) também mostraram que os decoctos foram completamente ineficazes frente a algumas bactérias gram-negativas, enquanto que as gram-positivas *S. aureus* e *E. faecalis* foram sensíveis ao decocto. Segundo Fonsêca (2005) existem fatores que podem interferir no processo de extração, como o tempo empregado. Na decoção, o vegetal permanece mais tempo em contato com o solvente extrator, assim como a temperatura que pode influenciar de maneira positiva, aumentando a solubilidade de determinado princípio ativo.

Quanto aos métodos utilizados, segundo Ostrosky (2008) a determinação da CIM, o método de microdiluição, vem sendo bastante utilizado, principalmente devido à sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados. Segundo Fennell et al. (2004) as variações referentes à determinação da CIM dos óleos essenciais de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podem-se citar a metodologia aplicada, o micro-organismo avaliado, a origem da planta, a época da coleta, se os óleos essenciais foram preparados a partir de plantas secas e a quantidade de extrato testada.

A bactéria Gram-positiva *S. aureus* CCMB 262 foi a mais sensível aos óleos essenciais testados. Porém, em relação às bactérias gram-negativas, pelo CIM apenas de *A. conyzoides* verificou-se atividade antimicrobiana contra para *P. aeruginosa*. Segundo alguns autores (TORTORA et al., 2000; BLACK 2002; LOGUERCIO et al., 2005) a diferença de atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas parecem derivar da constituição da parede celular bacteriana, composta por peptidoglicano, polímero complexo, além desta estrutura, as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa que confere a este grupo de micro-organismos uma efetiva barreira de permeabilidade, restringindo a penetração de alguns compostos. O conhecimento das diferenças entre as paredes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é da mais alta relevância para o

estudo do mecanismo de ação dos quimioterápicos, de patogenicidade e de outros tantos assuntos relacionados diretamente à composição química e estrutura da parede bacteriana (SCHAECHTER et al., 2002) (FIGURA 20).

O óleo essencial da flor de *A. saturooides* apresentou a menor CIM para a *S. aureus* CCMB 262, CCMB 263, *B. cereus* (0,15 mg.mL⁻¹) e também inibição para a levedura *C. kruzei* CCMB 287 (0,078 mg.mL⁻¹). Fernandez et al. (2003) em seu estudo de atividade antimicrobiana para a espécie *A. saturooides* observou o resultado positivo para inibição principalmente da cepa *S. aureus*. Como também Schneider e Cezaroto (2009) em estudos sobre os óleos essenciais de *A. saturooides* observou a inibição de *S. aureus*, *B. cereus*. Assim, os resultados deste presente trabalho confirmam os dados da literatura.

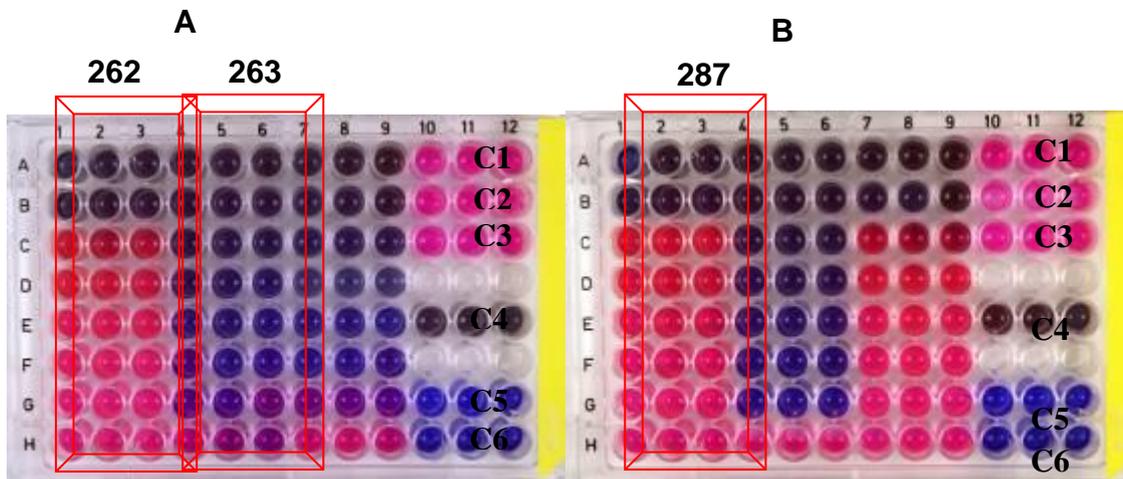


FIGURA 20 - Avaliação da Atividade Antimicrobiana do óleo essencial de *A. saturooides* (A) e *A. conyzoides* (B) contra duas cepas de *S. aureus* (CCMB 262 e 263) e uma levedura *C. kruzei* (CCMB 287)

Pela técnica de determinação da CIM, as duas amostras de óleos essenciais inibiu, em extensões variadas, o crescimento de micro-organismos que não se demonstraram inicialmente sensíveis pela metodologia. Esta variação pode ser justificada pela presença de diferentes substâncias nas amostras, pois moléculas mais polares ou de maior massa molecular podem ser mais solúveis e de mais fácil dispersão em meio líquido (VALGAS et al., 2007). Há descrição de vários métodos para demonstrar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de produtos naturais, sendo que os diferentes métodos não são igualmente sensíveis. Os resultados obtidos no presente estudo corroboram outros trabalhos (VANDEN

BERGHE; VLIETINCK, 1991, VALGAS et al., 2007), no sentido de que as metodologias utilizadas para a o estudo de atividade antimicrobiana são influenciadas pelos micro-organismos usados para realizar o teste, pelo método selecionado e pelas características de solubilidade de cada substância (RIBEIRO et al., 2001; HERSCHLER, 1970).

Ainda não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004 ; OSTROSKY et al., 2008). A técnica de diluição para determinação de concentrações inibitórias mínimas (CIM) junto com outros sistemas de diluição de antibióticos é considerada, frequentemente, como a melhor metodologia para a avaliação de suscetibilidade ou de resistência das bactérias aos antimicrobianos (ALVES et al., 2008).

Como para outros testes de atividade antimicrobiana, as variações referentes à determinação da CIM dos óleos essenciais de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, à origem da planta, a época da coleta, se os óleos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de óleo testada.

Considerando-se a atividade das diferentes partes estudadas das plantas *A. saturoides* e *A. conyzoides* (folha e flor, respectivamente), foi possível notar que, no geral, os melhores resultados de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foram contra a bactéria *S. aureus* e as leveduras *C. albicans* e *C. krusei*. *A. saturoides* foi a que apresentou melhores resultados de atividade antimicrobiana, confirmando trabalhos na literatura descritos a seguir. Segundo Wiest et al. (2009) esta espécie apresentou os melhores resultados de atividade anti-estafilocócica que ele classificou como máxima, dentre as 39 plantas que deram resultados positivos, como também Mota (2008) estudando a atividade antibacteriana *in vitro* da inflorescência desta espécie, observou a inibição do extrato contra *S. aureus* confirmando assim seus melhores resultados para *S. aureus* no presente trabalho. Sua atividade antimicrobiana contra *Salmonella* sp. também foi confirmada por Bettega et al. (2004) que observaram atividade antibacteriana do extrato vegetal (decocto) frente a micro-organismos de interesse em medicina veterinária. Para as leveduras, *A. saturoides* demonstrou os melhores resultados do CIM.: 2,5 mg.mL⁻¹ para *C. albicans* e 0,078 mg.mL⁻¹ (menor) a 0,625 mg.mL⁻¹. (maior) para *C. krusei*. Em relação a *C. parapsilosis* somente apresentou atividade com CIM de 1,25 mg.mL⁻¹. Comparando com dados da literatura, segundo Sartoratto (2006) a espécie

A. saturooides apresentou atividade antimicrobiana contra *C. albicans* com CIM >2,0 mg.mL⁻¹.

Duarte et al. (2005), trabalhando com extratos e óleos essenciais de Asteraceae, propôs uma classificação da atividade antimicrobiana como: forte atividade (MIC ≤ 0,5 mg/mL⁻¹), moderada atividade (MIC 0,51- 1,0 mg/mL⁻¹) e fraca atividade (MIC ≥ 1,0 mg/mL⁻¹). Aplicando esta classificação nos resultados do presente trabalho, pode-se verificar que as duas espécies estudadas obtiveram atividade forte frente a levedura *Candida kruzei*, com MIC entre 0,078 mg.mL⁻¹ (menor) a 0,31 mg.mL⁻¹ (maior). Segundo Picoli et al. (2007) são poucos estudos que relatam a atividade e a CIM dos extratos e óleos essenciais de *A. saturooides* e *A. conyzoides* frente a leveduras. No presente trabalho, além da *C. kruzei* as duas espécies estudadas inibiram a levedura *C. albicans*, porém apresentaram atividade fraca segundo Duarte et al. (2005), exibindo CIM de 2,5 mg.mL⁻¹.

Os resultados do CIM para a espécie *A. conyzoides* confirmaram os dados da literatura. Segundo Kambij et al. (2008) e Batish et al. (2009), avaliando o óleo essencial (CIM variando entre 25 mg/mL⁻¹ (menor) a 100 mg/mL⁻¹ (maior)) da planta inteira de *A. conyzoides*, o mentrasto, observaram que o mesmo apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. No presente estudo, atividade foi confirmada para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, ambos inibidos com CIM de 2,5 mg/mL⁻¹ pelos óleos essenciais da folha e flor para *S. aureus* e folha para *P. aeruginosa*.

O estudo de agentes antimicrobianos tem grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Outro ponto a ser ressaltado é a utilização desse estudo como primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, sendo de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma imensa biodiversidade. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (MENG et al., 2000; HO et al., 2001; MICHELIN et al., 2005; LEITÃO et al., 2006; LIMA et al., 2006b; BARBOSA-FILHO et al., 2007; SAÚDE-GUIMARÃES E FARIA, 2007).

Os micro-organismos utilizados (*S. aureus* e *E. coli*) para a avaliação antibacteriana foram selecionados por serem recomendados como padrões para

testes de suscetibilidade antimicrobiana, sendo responsáveis por várias formas de infecções em humanos e adquirirem, com maior frequência, resistência aos antimicrobianos (OPLUSTIL et al., 2000).

As variações referentes à determinação da CIM de extratos e óleos essenciais de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, o micro-organismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade testada. Assim, dificulta a comparação entre os resultados de diferentes trabalhos publicados para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004; OSTROSKY et al., 2008).

4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS

Em relação à avaliação da resposta imune induzida pelos óleos, apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações e o controle (meio de cultura com o diluente do óleo), pode-se observar que ambos inibiram a produção das citocinas IL-8 e IL-12 (Figuras 21 e 22), com exceção da espécie *A. saturooides* na concentração de 100 µg/mL. Este comportamento pode sugerir uma capacidade de redução da resposta inflamatória, já que a IL-8 é uma citocina quimiotática, que atua no recrutamento de neutrófilos e macrófagos (SEYFRIED, 2014) e a IL-12 é uma citocina da imunidade inata capaz de induzir a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o perfil Th1 (STRANFORD, 2013). Entretanto, os óleos estudados não foram capazes de induzir a produção de IL-10, uma citocina imunorreguladora, indicando que esta molécula pode não ter uma participação na atividade anti-inflamatória dos óleos.

As comparações entre as concentrações foram avaliadas por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis; seriam consideradas estatisticamente significantes aquelas diferenças com valor de $p < 0,05$.

Vale ressaltar, que comparando com os dados de citotoxicidade, a melhor concentração quanto a viabilidade celular para a espécie *A. saturooides* foi a concentração de 2,5µg/mL. Já para a espécie *A. conyzoides* o comportamento da viabilidade e produção celular perpassa as três diferentes concentrações. O controle

do diluente, utilizado como referência em todos os testes, não apresentou interferência na viabilidade e produção celular.

A comparação entre os níveis de IL-8 (figura 21) e IL-12 (FIGURA 22) entre as duas espécies, foi analisada com o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as espécies *A. saturooides* e *A. conyzoides* em todas as concentrações testadas (2,5; 25 e 100 ug/mL).

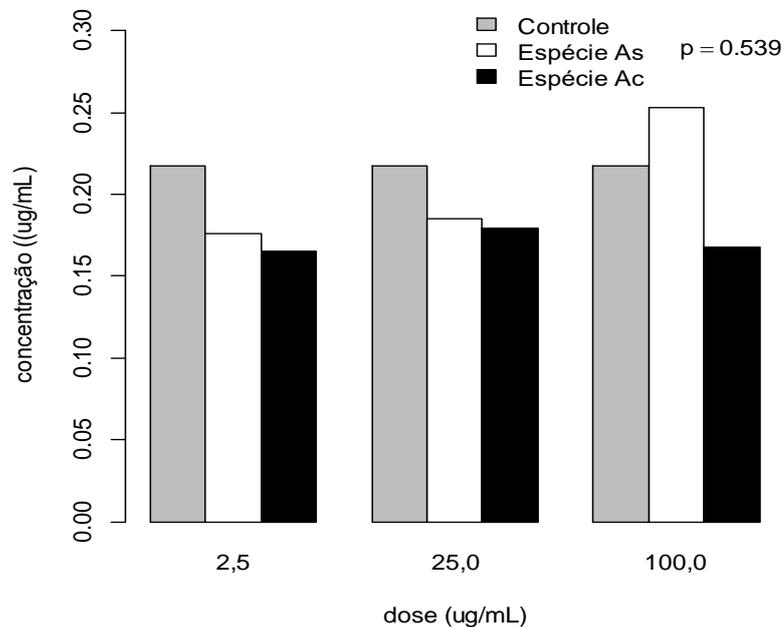


FIGURA 21 Produção de Interleucina IL 8 por células Adenocarcinoma de cólon humano (HT 29) estimuladas por 48 horas, com os óleos essenciais das Flores de *Achyrocline saturooides* e Folhas de *Ageratum conyzoides* nas concentrações de 2,5; 25 e 100 ug/mL.

A IL 8 é produzida por uma ampla variedade de células, incluindo neutrófilos, monócitos e macrófagos, fibroblastos e queratinócitos, em resposta a micro-organismos, mitógenos e mediadores endógenos tais como IL- 1 e TNF. A IL 8 tem sido implicada como principal participante de muitas doenças; umas das maiores funções da IL 8 é sua capacidade de induzir a migração direcional de células incluindo neutrófilos, monócitos e células T, tendo um papel chave no acúmulo de leucócitos no local da inflamação (GREGHI, 2011, TRINDADE et al, 2011).

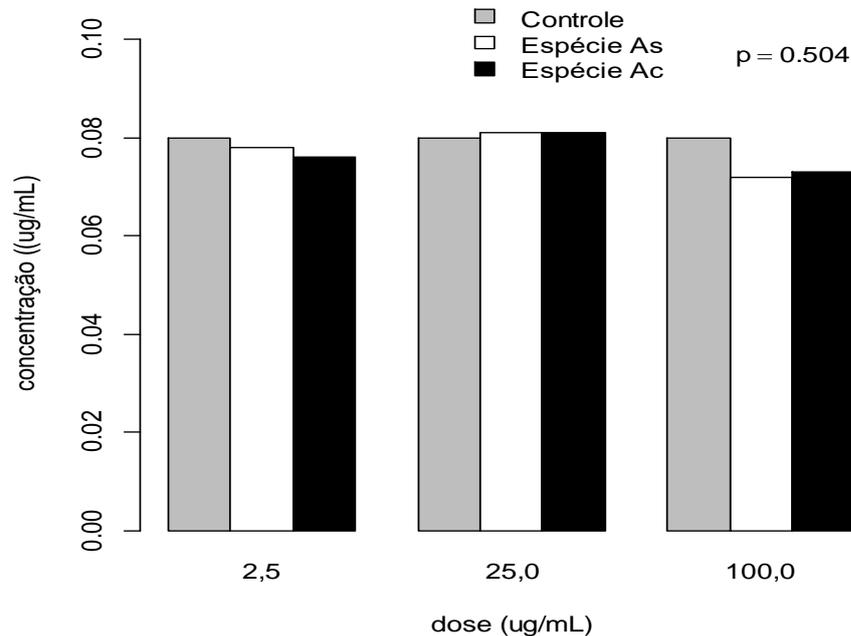


FIGURA 22 Produção de Interleucina IL 12 por células Adenocarcinoma de cólon humano (HT 29) estimuladas por 48 horas, com os óleos essenciais das Flores de *Achyrocline saturoides* e Folhas de *Ageratum conyzoides* nas concentrações de 2,5; 25 e 100 ug/mL.

A IL-12 é uma citocina indutora da produção de IFN- γ , produzida por células dendríticas e macrófagos (MURPHY et al., 2010). Esta citocina atua no controle do parasitismo do tecido cardíaco, inflamação e resistência do hospedeiro à infecção aguda, é essencial na resposta inata do parasitismo por *T.cruzi*, resposta essa considerada importante para a ativação da resposta imune adaptativa e para a resistência inicial do organismo às infecções (CHAMBELA, 2012).

Quanto a produção de IL-10, não foram produzidos níveis detectáveis da citocina nas condições de cultivo empregadas, mesmo tendo sido realizados quatro ensaios independentes em triplicata. Como a IL-10 atua na resposta imune como uma citocina imunorreguladora que atua no *feedback* negativo (ARCHANA et al., 2013), isto é, uma resposta mais tardia, é possível que não tenha havido tempo hábil para a sua indução.

A IL-10 é uma citocina produzida por resposta Th2, que tem ação inibitória sobre a resposta Th1, o que reforça sua participação na regulação da resposta imune. Além de regular negativamente a secreção de citocinas por células Th1, inibe também as ações ativadoras de TNF- α e IFN- γ desativando a transcrição e tradução de genes de macrófagos. A IL-10 controla a resposta imune geral, a resposta

inflamatória e o dano tecidual (ABRAHAMSOHN, 2011; TRINDADE et al, 2011). É possível que outros mecanismos de inibição da resposta inflamatória que não envolvam a IL-10 estejam participando na resposta das células de adenocarcinoma aos óleos estudados.

5.CONCLUSÕES

Os óleos essenciais das flores e frutos das espécies *A. saturooides* e *A. conyzoides* apresentaram resultados promissores em relação ao seu potencial biotecnológico pois foram observadas as atividades biológicas: antimicrobiana, citotóxica e imunomoduladora, além disso foram identificadas sua composição química.

- ✓ Considerando as atividades antimicrobianas, através da metodologia da CIM os microrganismos testados apresentaram maior sensibilidade, com maior efeito sobre as duas linhagens de *Staphylococcus aureus* e da de *Bacillus cereus* para a espécie *A. saturooides* e *C. kruzei* para a espécie *A. conyzoides*. Os resultados obtidos neste trabalho apontam a CIM como uma técnica eficiente para avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Achyrocline saturooides* e *Ageratum conyzoides* como também se destacaram pela presença de potente atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos testados e em concentrações inibitórias mínimas muito baixas.
- ✓ Em relação as atividades citotóxicas as espécies se comportaram como atóxicas, o que contribui para a segurança e qualidade destes óleos para futuros testes de fitoterápicos
- ✓ Em relação à avaliação da resposta imune induzida pelos óleos, apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações e o controle, pode-se observar que ambos inibiram a produção das citocinas IL-8 e IL-12. Este comportamento pode sugerir uma capacidade de redução da resposta inflamatória, já que a IL-8 é uma citocina quimiotática, que atua no recrutamento de neutrófilos e macrófagos.
- ✓ A análise química para a espécie *A. conyzoides* sugere um novo quimiotipo por não apresentar em sua constituição precocenos como compostos majoritários e sim outros compostos o que confirma a questão da influencia

de outros fatores ambientais na constituição química, novos testes poderão ser feitos futuramente para elucidar a constituição química desta espécie.

- ✓ Este é o primeiro trabalho na literatura sobre atividades biológicas *in vitro* para a Família Asteraceae na região do semiárido baiano e contribui para ampliação do conhecimento científico sobre as plantas medicinais brasileiras, além de agregar valor a produtos da região do semiárido.

REFERÊNCIAS

- ❖ ALLEN, G.M. et al. 50 Common native important plants in Florida's ethnobotanical history. University of Florida. **Circular 1439**, p. 1-21, 2012.

- ❖ ALEIXO, A. A.; HERRERA, K. M. S.; RIBEIRO, R. I. M de A.; LIMA, L. A. R dos S.; FERREIRA, J. M. S. Antibacterial activity of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) against bacteria of medical interest. **Revista Ceres**, v. 60, n. 5, p. 731-734, 2013.

- ❖ ALVES, L. L.; OLIVEIRA, P. V. A.; FRANÇA, S. C.; ALVES, P. L. C.; PEREIRA, P. S. Atividade alelopática de extratos aquosos de plantas medicinais na germinação de *Lactuca sativa* L. e *Bidens pilosa* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 328-336, 2011.

- ❖ AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA, **Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal**. PAMVET. RELATÓRIO 2006/2007 - Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo, Ministério da Saúde, 2014.

- ❖ BALDWIN, IT. Plant Volatiles. **Curr Biol**, v. 20, p. R392-R397, 2010.

- ❖ Bayala, B., et al. (2014). **Chemical Composition, Antioxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Proliferative Activities of Essential Oils of Plants from Burkina Faso**. PLOS ONE, 9, pp.1-11. [Em linha]. Disponível em <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0092122>> [Consultado em 08-09-2014].

- ❖ BARROSO, M. S. T.; Villanueva, G.; Lucas, A. M.; Perez, G. P.; Vargas, R. M. F.; Brun, G. W; Cassel, E. Supercritical fluid extraction of volatile and non-volatile compounds from *Schinus molle* L. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 02, p. 305 - 312, 2011.

- ❖ BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e**

Sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

❖ BIZZO, H.; Hovell, A. M. C.; Rezende, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, 2009.

❖ BOBEK, V. B. **ANÁLISE FARMACOBOTÂNICA COMPARATIVA DE ESPÉCIES DE Baccharis L. (ASTERACEAE) DA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS.**

Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. PR. 2015.

❖ BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC no 10. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 mar. 2010.

❖ BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RDC Nº 10 de 09 de março de 2010. **Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais.** Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

❖ BRASIL. Lei 12.651, de 25 de maio de 2012. Dispõe sobre a proteção da vegetação nativa; altera as Leis nos 6.938, de 31 de agosto de 1981, 9.393, de 19 de dezembro de 1996, e 11.428, de 22 de dezembro de 2006; revoga as Leis nos 4.771, de 15 de setembro de 1965, e 7.754, de 14 de abril de 1989, e a Medida Provisória no 2.166-67, de 24 de agosto de 2001; e dá outras providências. Disponível em < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12651.htm>. Acesso em: 20 de novembro de 2013.

❖ BREMER, K. *et. al.* **Branch support and tree stability.** *Cladistics*, v.10, n.3, p.295-304, 1994.

❖ BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; DOLL-BOSCARDIN, P. M.; FARAGO, P. V.; MATZENBACHER, N.I.; SARTORATTO, A.; MAIA, B. H. L. N. S. Composition of

essential oils and secretory structures of *Baccharis anomala*, *B. megapotamica* and *B. ochracea*. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 24, p.19-24, 2012.

❖ BUDEL, J. M.; FARAGO, P. V.; DUARTE, M. R. Pharmacobotanical study of *Baccharis cognata* DC. (Asteraceae: Astereae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, p. 550-554, 2013.

❖ CARNEY, J.R.; KRENISKY, J.M.; WILLIAMSON, R.T. & LUO, J. Achyrofuran, a new antihyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant *Achyrocline satureioides*. **Journal of Natural Products** 65: 203–205. 2002.

❖ CELIA, C., et al. (2013). Anticancer activity of liposomal bergamot essential oil (BEO) on human neuroblastoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, pp.548-553. [Em linha]. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776513005857>> [Consultado em 17-09-2014].

❖ CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved standard M02 and M07. CLSI, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

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

❖ CUNHA, A. S.; BORTOLOTTI, I. M. Etnobotânica de plantas medicinais no assentamento Monjolinho, município de Anastácio, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 3, p. 685-698, 2013.

❖ DORRINGTON, M. G.; BOWDISH, D. M. **Immunosenescence and novel vaccination strategies for the elderly**. *Frontiers in Immunology*, v. 4, n. 171, p. 1-10, -2014.

- ❖ DUARTE, A. R. et al. Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia Dysenterica*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 8, p. 1459-1467, 2010.

- ❖ DUARTE, M. C. et al. Avaliação do potencial alelopático, atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos orgânicos das folhas de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.4, p.447-455, 2011.

- ❖ DUARTE, A. R. et al. Influence of spatial, edaphic and genetic factors on phenols and essential oils of *Myrciaria cauliflora* fruits. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 4, p. 737- 746, 2012.

- ❖ ESPER, R. H. **Óleos essenciais de mentrasto e orégano no controle de *Aspergillus flavus* em milho e soja**. Tese. São Paulo, 2011.

- ❖ Franco, I.M., Costa, F.N. & Nakajima, J.N. Richterago (Asteraceae, Gochnatieae) na porção central da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia** 65(1): 159-173. 2014

- ❖ FLORA digital. Disponível em:
<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php>. Acesso em 23 de outubro 2014.

- ❖ GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

- ❖ GOMES, M. DE SOUZA. Atividades Biológicas dos óleos essenciais de três espécies do gênero *Citrus* de seus componentes majoritários. Universidade Federal de Lavras. **Tese**. Lavras, Minas Gerais. 2014.

- ❖ GUIMARÃES, R.; SOUSA, M.J.; FERREIRA, I.C.F.R. Contribution of essential oils and phenolics to the antioxidant properties of aromatic plants. **Industrial Crops and Products**. v.32, p. 152-156, 2010.

- ❖ HEIDEN, G.; SCHNEIDER, A. 2014. **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB5241>>. Acesso em: julho/2013.
- HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; CHATHA, S. A. S.; JABBAR, A.; MAHBOOB, S.; NIGAM, P. S. Rosmarinus officinalis óleo essencial: antiproliferativo atividades antioxidantes e antibacterianas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1070-1078. 2010.
- ❖ INMET/INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Embrapa Informática Agropecuária. **Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura**. Disponível em: <<http://www.agritempo.gov.br/agroclima/sumario?uf=BA>>. Acesso em: 03 de Fevereiro 2015.
- ❖ INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (Brasil). **Flora das Restingas do Litoral Norte da Bahia - Costa dos Coqueiros e Salvador**. Projeto Flora-Fauna. UE/BA-HERBÁRIO RADAMBRASIL. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/levantamento/inventario.shtm>>. Acesso em: 23 de Fevereiro 2015
- ❖ IBGE. **Mapa de biomas do Brasil**. Escala 1:5.000.000. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Disponível em: <<http://mapas.ibge.gov.br/biomas2/viewer.htm>> Acesso em: Agosto de 2015.
- ❖ ISMAN, M. B.; MIRESMALLI, S.; MACHIAL, C. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. **Phytochem. Rev.**, v. 10, p. 197-204, 2011.
- ❖ KADARIAN, C.; BROUSSALIS, A.M.; MINO, J.; LOPEZ, P.; GORZALCZANY, S.; FERRARO, G. & ACEVEDO, C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Pharmacological Research** 45: 57–61. 2002.
- ❖ KISHIMOTO, T. IL-6: from its discovery to clinical applications. **International Immunology**, v. 22, n. 5, p. 347-352, 2010.

- ❖ LEE, C. J.; CHEN, L. G; CHANG, T. L.; KE, W. M.; LO, Y. F.; WANG, C. C. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. **Food Chemistry**, v. 124, p. 833-841, 2011.

- ❖ LOPEZ, M. D. et al. Development of formulations to improve the controlled-release of linalool to be applied as an insecticide. **J. Agric. Food Chem.**, v. 60, p. 1187-1192, 2010.

- ❖ LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2012.

- ❖ LORENZI, H.; MATOS, F. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 188 p.

- ❖ MARTINELLI, M. A. U.; MORAES, M. A. (Orgs). Livro vermelho da Flora do Brasil. 10 ed. – Rio de Janeiro. Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013.

- ❖ MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2009.

- ❖ MSAADA, K., et al. (2012). **Comparison of Different Extraction Methods for the Determination of Essential Oils and Related Compounds from Coriander (*Coriandrum sativum* L.)**. Acta Chimica, 59, pp.803-813. [Em linha]. Disponível em <<http://europepmc.org/abstract/MED/24061362>> [Consultado em 21-01-2014].

- ❖ MOTA, F. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (“macela”, “marcela”) sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 3, p. 298-304, 2011.

- ❖ MORI, S.A. et al. **Manual de Manejo do Herbário Fanerogâmico**. Ilhéus: CEPEC/CEPLAC. 1989.

- ❖ MOHAMMADI, A., et al. (2014). **Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants**. *Journal de Mycologie Médicale* 468, pp.1-8. [Em linha]. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523314001243>> [Consultado em 01-05-2014].
- ❖ NAKAJIMA, J.N.; JUNQUEIRA, T.V.; FREITAS, F.S. & TELES, A.M. 2012. Comparative analysis of red lists of the Brazilian flora: Asteraceae. *Rodriguésia* 63: 39-54.
- ❖ NOGUEIRA, J. H. C. et al. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology*, v.137, n.1, p. 55-60, 2010.
- ❖ NOGUEIRA, M. N. M., et al. (2014). Terpinen-4-ol and alpha-terpineol (tea tree oil components) inhibit the production of IL-1b, IL-6 and IL-10 on human macrophages. *Inflammation Research*, 63, pp.769-778. [Em linha]. Disponível em <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00011-014-0749-x>> [Consultado em 01-09-2014].
- ❖ NOOL, N. C. **Teste piloto para avaliar a atividade antimicrobiana quantitativa do decocto de *Achyrocline satureioides* Lam (D.C) frente a cepa padronizada de *Staphylococcus aureus***. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- ❖ OLIVEIRA, E. A. **Atividade antimicrobiana “in vitro” do decocto de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. (Asteraceae) frente à cepa de referência de interesse em medicina veterinária – *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- ❖ OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K., ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 61, p. 255-265, 2011.

- ❖ OLIVEIRA, M. T. R.; BERBERT, P. A.; MATOS, C. R. R.; MATHIAS, L. & MOREIRA, R. O. Efeito da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Pectis brevipedunculata*. **Química. Nova**, v. 34, n. 7, p. 1200-1204, 2011

- ❖ ONUCHIC AC, CHAMMAS R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med (São Paulo)**, v.89, n.1, p. 21-31, 2010.

- ❖ PORTALATINO, E. V.; MEDINA, E. L. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungia paniculata* del Parque Nacional Huascarán (Perú) frente a cepas bacterianas de interés clínico. **Revista Rebiolest**, v. 1, n. 2, p. 43-49, 2013.

- ❖ PEREIRA, M. C. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

- ❖ PROBST, I. DA SILVA. Atividade antibacteriana de óleos essenciais e Avaliação de potencial sinérgico. **Dissertação**. Universidade Estadual Paulista. Botucatu – SP 2012.

- ❖ RAVEN, P. H., EVERT, R. F., CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 906 p. 2012.

- ❖ RAJKOWSKA, K., et al. (2014). The effect of thyme and tea tree on morphology and metabolism of *Candida albicans*. *Acta Biochimica Polonica*, 61, pp.305-310. [Em linha]. Disponível em <http://www.actabp.pl/pdf/2_2014/305.pdf> [Consultado em 03-09-2014].

- ❖ RYMKIEWICZ, P. et al. **The Immune System in the Aging Human**. *Immunologic Research*, v. 73, n. 1-3, p. 235-250, 2012.

- ❖ SÁ, I. M.; ELISABETSKY, A. N. E. Medical knowledge exchanges between Brazil and Portugal: An ethnopharmacological perspective. **Journal of Ethnopharmacology**. n. 142, p. 762–768, 2012.
- ❖ SAAD, N. Y.; MULLER, C. D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour Frag. J.**, v. 28, p. 269-279, 2013.
- ❖ SALGUEIRO, L., ET AL. (2010). Raw materials: the importance of quality and safety. A review. *Flavour and Fragrance Journal* 25, pp.253-271. [Em linha]. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.1973/pdf>> [Consultado em 05-07-2014].
- ❖ SANTOS, R. C.; KUSHIMA, H.; RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA, M.; ROCHA, L. R. M.; BAUAB, T. M.; TAMASHIRO, J.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 203-212, 2012a.
- ❖ SANTOS, A. P. et al. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel; Fabaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 6, p. 891-896, 2010.
- ❖ SALGADO, P. C.; COSTA, M. F.; MASSOCATTO, A. M.; LAVERDE JR, A.; FREI, F.; KOLB, R. M.; SANTOS, C. Avaliação do potencial citotóxico, moluscicida e alelopático dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, p. 197-202, 2013.
- ❖ SCHMIDT, E. Production of essential oils. In: BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology and applications**. Boca Raton: CRC Press, Cap. 4, p. 83-120. 2010.

- ❖ SHAW, A. C., et al. **Aging of the Innate Immune System**. *Current Opinion in Immunology*, v. 22, n. 4, p. 507-513, 2010.
- ❖ SILVA, E. R.; OVERBECK, G. E.; SOARES, G. L. G. Phytotoxicity of volatiles from fresh and dry leaves of two Asteraceae shrubs: Evaluation of seasonal effects. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 14-18, 2014.
- ❖ SILVA, D. A.; ALVES, V. G.; FRANCO, D. M. M.; RIBEIRO, L. C.; SOUZA, M. C.; KATO, L.; CARVALHO, J. E.; KOHN, L. K.; DE OLIVEIRA, C. M.; DA SILVA, C. C. Antiproliferative activity of *Luehea candicans* Mart. et Zucc. (Tiliaceae). **Natural Product Research**, v. 26, p. 364-369, 2012.
- ❖ SILVA, R. F. et al. **Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from *Pseudobrickellia brasiliensis* (Asteraceae)**. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS, 44, 2013g, Budapest. Budapest: ISEO, 2013g, p. 34.
- ❖ SILVA, P. S. et al. Chemical composition of the essential oil and hexanic fraction of *Lippia* and *Lantana* species. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 6, p. 843-849, Dez. 2010.
- ❖ SILVA, V. S. Potencial alelopático do óleo essencial de espécies de *Heterothalamus* Less. (Asteraceae) nativas do Rio Grande do Sul. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.
- ❖ SILVESTRE, D. M.; KOLB, R. M.; FREI, F.; SANTOS, C. Phytotoxicity of organic extracts of *Turnera ulmifolia* L. and *Turnera diffusa* Willd.ex Schult. in cucumber seeds. **Acta Botanica Brasílica**, v. 27, n. 3, p. 476-482, 2013.
- ❖ SILVEIRA, F.P.; NICOLUZZI, J.E.; SAUCEDO JÚNIOR, N.S.; SILVEIRA, F.; NICOLLELLI, G.M.; MARANHÃO, B.S.A. Avaliação das concentrações séricas de interleucina-6 e interleucina-10 nos pacientes submetidos à colecistectomia laparoscópica *versus* convencional. **Revista Brasileira de Cirurgia**, v.39, 2012.

- ❖ SOARES, C. S. A.; COSTA, M. B.; SOARES, A. H. V.; BEZERRA, C. E. S. & CARVALHO, L. M. Avaliação da atividade inseticida do óleo essencial de Mentrasto (*Ageratum conyzoides* L.). **Revista Verde**, v.6, n.5, p. 21 – 24, 2011.

- ❖ SOLANA, R. et al. **Innate immunosenescence: Effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans**. *Seminars in Immunology*, v. 24, n. 5, p. 331-241, 2012.

- ❖ SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p.435-440, 2010.

- ❖ SOUZA, S. P. de; PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, A. A.; SOUZA, R. V. de; SANTOS, C. D. dos. Estudo da atividade antiobesidade do extrato metanólico de *Baccharis trimera* (Less.) DC. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.1, n. 93, p. 27-32, 2012.

- ❖ SOUZA, J. P.; FRANCO, C. R. C.; SANTOS, V. L. P.; BORTOLOZO, E. A. F. Q.; FARAGO, P. V.; MATZENBACHER, N. I. ; BUDEL, J. M. *Baccharis rufescens* Spreng. var. *tenuifolia*(DC.) Baker: contribuição ao estudo farmacognóstico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 566-574, 2013.

- ❖ VERMA, P. K. Hepatoprotective mechanisms of *Ageratum conyzoides* L. on oxidative damage induced by acetaminophen in wistar rats. *Free Radicals and antioxidants*, v. 3, n.2, p. 73-76, out. 2013

- ❖ WALKER, T. D. The medicines trade in the Portuguese Atlantic World: acquisition and dissemination of healing knowledge from Brazil (c. 1580-1800). In: **Social History of Medicine Advanced Access**. Oxford: Oxford University Press, 2013.

- ❖ WOLFFENBUTTEL, A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia**: abordagem técnica e científica. São Paulo: Roca, 2010.

- ❖ YAMASSAKI, F.T. **Moléculas bioativas das folhas de *Persea americana***. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- ❖ YANG, JH. LEE, EO. KIM, SE. SUY, YH. CHONG, YH. Norepinephrine differentially modulates the innate inflammatory response provoked by amyloid- β peptide via action at β -adrenoceptors and activation of cAMP/PKA pathway in human THP-1 macrophages. **Exp Neuro**. 15 may, 2012.
- ❖ YAPI, T. A., et al. (2014). **Chemical Variability of *Xylopia quintasii* ENGL. & DIELS** Leaf Oil from Côte d'Ivoire. *Chemistry & Biodiversity* 11, pp.332-339. [Em linha]. Disponível em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.201300297/pdf> [Consultado em 30-03-2014].
- ❖ YOUSSEF, J.; FARAGO, P. V.; DOLL-BOSCARDIN, P. M.; DUARTE, M. R.; BUDEL, J. M. *Gochnatia polymorpha*: macro-and microscopic identification of leaf and stem for pharmacognostic quality control. **Revista Brasileira de Farmacognosia** (Impresso), v. 23, p. 585-591, 2013.
- ❖ ZAPATA, B.; DURÁ'N, C.; STASHENKO, E.; BETANCUR-GALVIS, L.; MESA-ARANGO, A.C. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.27, n.2, p.101–103, 2010.