

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Insumos Farmacêuticos

**Estudo farmacognóstico de *Melampodium  
camphoratum* (L.f.) Baker – Asteraceae**

SUZANA MAYUMI SAITO

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientadora:  
Profa. Dra. Edna Tomiko Myiake Kato

São Paulo  
2003



DEDALUS - Acervo - CQ



30100005525

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Saito, Suzana Mayumi  
S158e Estudo farmacognóstico de *Melampodium camphoratum*  
(L.f.) Baker-Asteraceae / Suzana Mayumi Saito. -- São  
Paulo, 2003.  
115p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.  
Orientador: Kato, Edna Tomiko Myiake

1. Farmacognosia 2. Asteraceae : Farmacognosia I. T.  
II. Kato, Edna Tomiko Myiake, orientador.

615.321 CDD

Suzana Mayumi Saito

**Estudo farmacognóstico de *Melampodium*  
*camphoratum* (L.f.) Baker – Asteraceae**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

---

Orientador/ Presidente

---

1º. Examinador

---

2º. Examinador

São Paulo, de

de 2003

## AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Edna Tomiko Myiake Kato, orientadora e amiga em todos os momentos, pela orientação científica, confiança e apoio, que foram fundamentais para minha formação acadêmica e crescimento pessoal.

À Profª Drª Elfriede Marriane Bacchi, pelo auxílio no teste de toxicidade aguda e no teste de atividade antiúlcera gástrica.

Ao Prof Dr Fernando de Oliveira, que gentilmente nos auxiliou na identificação botânica da espécie –tema desta dissertação.

À Pós-Graduanda Vilma Mezzo, pelo apoio e valiosas sugestões na revisão do texto.

Aos colegas de Pós-graduação, pelo companheirismo e apoio constantes.

Às bibliotecárias Leila Aparecida Bonadio e Marina Yamashida, da Biblioteca do Instituto das Químicas da Universidade de São Paulo, pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas e elaboração da ficha técnica.

A todos que de alguma maneira, direta ou indireta, colaboraram para a realização deste trabalho.

---

## SUMÁRIO

	Página
Lista de tabelas	i
Resumo	ii
Abstract	iii
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Generalidades	01
1.2 Família Asteraceae	03
1.2.1 Aspectos botânicos	03
1.2.2 Aspectos químicos e usos	05
1.3 Gênero <i>Melampodium</i> .L	06
1.3.1 Aspectos botânicos	06
1.3.2 Aspectos químicos e usos	07
1.4 Aspectos biológicos	11
1.4.1 Atividade antimicrobiana	11
1.4.2 Atividade antioxidante	12
1.4.3 Atividade antiúlcera	15
2 OBJETIVO	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Material vegetal	18
3.2 Estudo farmacobotânico	18
3.3 Preparo da droga vegetal	20
3.4 Preparo do extrato bruto liofilizado (EBL)	20
3.5 Triagem das principais classes de substâncias na droga e no extrato bruto liofilizado (EBL)	21
3.5.1 Método de extração	21
3.5.2 Análise cromatográfica em camada delgada	25
3.6 Óleo volátil	26

3.6.1 Obtenção do óleo volátil	26
3.6.2 Identificação dos constituintes químicos do óleo volátil	27
3.6.3 Análise cromatográfica em camada delgada	27
3.7 Ensaio biológicos	28
3.7.1 Avaliação de toxicidade aguda do extrato bruto liofilizado (EBL)	28
3.7.2 Avaliação de atividade antimicrobiana do extrato bruto liofilizado (EBL) e do óleo volátil	29
3.7.3 Avaliação de atividade antioxidante do extrato bruto liofilizado (EBL)	37
3.7.4 Avaliação de atividade antiúlcera gástrica do extrato bruto liofilizado (EBL)	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Aspectos farmacobotânicos	40
4.1.1 Caracterização macroscópica da droga vegetal	40
4.1.2 Caracterização microscópica da droga vegetal	41
4.2 Rendimento do extrato bruto liofilizado (EBL)	57
4.3 Triagem das principais classes de substâncias na droga e no extrato bruto liofilizado (EBL)	57
4.4 Análise cromatográfica em camada delgada da droga vegetal e do extrato bruto liofilizado (EBL)	58
4.5 Óleo volátil	62
4.5.1 Rendimento	62
4.5.2 Identificação dos constituintes químicos	62
4.5.3 Análise cromatográfica em camada delgada	63
4.6 Ensaio biológicos	64
4.6.1 Avaliação de toxicidade aguda do extrato bruto liofilizado (EBL)	64
4.6.2 Avaliação de atividade antimicrobiana do extrato bruto liofilizado (EBL) e do óleo volátil	77

---

4.6.3 Avaliação de atividade antioxidante do extrato bruto liofilizado (EBL)	80
4.6.4 Avaliação de atividade antiúlcera do extrato bruto liofilizado (EBL)	82
5 DISCUSSÃO	84
5.1 Aspectos farmacobotânicos	84
5.2 Óleo volátil	86
5.3 Aspectos biológicos e fitoquímicos do extrato bruto liofilizado (EBL)	91
5.3.1 Avaliação de toxicidade aguda	91
5.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana	92
5.3.4 Avaliação da atividade antiúlcera e antioxidante	93
6 CONCLUSÃO	97
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

---

<b>Lista de tabelas</b>	<b>Página</b>
Tabela 1. Substâncias químicas encontradas no gênero <i>Melampodium</i> .	08
Tabela 2. Distribuição das possíveis classes de substâncias nos extratos preparados pelo método descrito por Marini-Bettòlo e cols. (1981).	23
Tabela 3. Reveladores utilizados na análise cromatográfica segundo os métodos de Marini-Bettòlo e cols. (1981) e de Wagner e Bladt (1996).	26
Tabela 4. Classes de substâncias encontradas nos extratos fracionados a partir da droga vegetal, segundo Marini-Bettòlo e cols. (1981) e Wagner e Bladt (1996), e no extrato EBL de <i>M. camphoratum</i> .	57
Tabela 5: Análise cromatográfica em camada delgada da droga vegetal (extratos A, B, C e D) e do extrato EBL.	59
Tabela 6: Análise cromatográfica em camada delgada da droga vegetal (extratos A, B, C e D) e do extrato EBL.	60
Tabela 7. Composição química do óleo volátil de <i>M. camphoratum</i> .	63
Tabela 8. Toxicidade aguda. Peso corpóreo médio dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. Cada valor representa a média aritmética $\pm$ epm de 5 animais. $p > 0,05$ .	65
Tabela 9. Toxicidade aguda. Peso corpóreo médio dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. Cada valor representa a média aritmética $\pm$ epm de 5 animais. $p > 0,05$ .	66



Tabela 10. Toxicidade aguda. Consumo de ração pelos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.	67
Tabela 11. Toxicidade aguda. Consumo de ração pelos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.	68
Tabela 12. Toxicidade aguda. Consumo de água pelos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.	69
Tabela 13. Toxicidade aguda. Consumo de água pelos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.	70
Tabela 14. Toxicidade aguda. Peso relativo de coração e pulmões dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5. $p>0,05$ .	71
Tabela 15. Toxicidade aguda. Peso relativo de coração e pulmões dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5. $p>0,05$ .	72
Tabela 16. Toxicidade aguda. Peso relativo de fígados dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5. $p>0,05$ .	73

Tabela 17. Toxicidade aguda. Peso relativo de fígados dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5. p>0,05.	74
Tabela 18. Toxicidade aguda. Peso relativo de rins dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5. p>0,05.	75
Tabela 19. Toxicidade aguda. Peso relativo de rins dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> , na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5. p>0,05.	76
Tabela 20. Atividade antimicrobiana do extrato bruto liofilizado (EBL) de <i>M. camphoratum</i> .	77
Tabela 21. Atividade antimicrobiana do óleo volátil de <i>M. camphoratum</i> em relação a bactérias e fungos pelo método de difusão em agar.	79
Tabela 22. Capacidade antioxidante (CAOx%) do extrato EBL de <i>M.camphoratum</i> na lipoperoxidação espontânea de homogenato de cérebro de ratos.	80
Tabela 23. Média do número de ulcerações induzidas por solução de ácido clorídrico 0,3M em etanol 60%, nos animais tratados por via oral com o extrato EBL de <i>M. camphoratum</i> (400 mg/kg), controle positivo (1 µg/kg) e controle negativo (4 mL/kg).	82

## RESUMO

*Melampodium camphoratum* (L.f.) Baker (Asteraceae), espécie vegetal conhecida como "erva-de-São-João" e "São-João-caá", é empregada na medicina tradicional brasileira no tratamento de problemas gastrintestinais e hepatite. A droga vegetal e o extrato hidroalcoólico (EBL), preparados com os órgãos aéreos da planta, foram caracterizados farmacognosticamente. O estudo morfoanatômico foi conduzido com o intuito de fornecer caracteres importantes na diagnose da droga vegetal, constituída principalmente por caules. Os caules jovens apresentaram-se hexagonais. As folhas evidenciaram venação delicada, com nervuras mais proeminentes na face abaxial e as superfícies pubescentes. Sob o aspecto anatômico, destacaram-se os itens seguintes: tipo de localização dos tricomas tectores e glandulares; organização das células epiteliais das cavidades secretoras e sua localização. A droga vegetal mostrou odor aromático, característico, canforáceo e, sabor amargo. A droga vegetal e o extrato (EBL) foram submetidos a análise cromatográfica em camada delgada. Flavonóides e terpenóides foram detectados. Fotografias acompanham a descrição farmacobotânica e a análise cromatográfica. O óleo volátil (0,28%) apresentou  $\alpha$ -felandreno (35,8%), cânfora (26,9%) e canfeno (12,2%) como substâncias majoritárias e apresentou atividade antimicrobiana. O extrato (EBL) evidenciou atividade antiúlcera em ratos, em modelo de indução aguda por HCl/etanol, baixa atividade antimicrobiana e promissora atividade antioxidante ( $Q_{1/2} = 4,42 \mu\text{g/mL}$ ). No ensaio de toxicidade aguda não foram observadas alterações relevantes no peso corpóreo dos animais, ingestão de água e ração ou no aspecto macroscópico de rins, coração, pulmões e fígado.

## ABSTRACT

*Melampodium camphoratum* (L.f.) Baker (Asteraceae), commonly known as "erva-de-São-João" and "São-João-caá", is a vegetal species, that have been used in Brazilian folk medicine for the treatment of gastrointestinal disorders and hepatitis. The crude drug and the hydroalcoholic extract obtained from its aerial parts were pharmacognostically characterized. The morphoanatomical study was conducted, aiming at disclosing characters for the diagnosis of the crude drug. The younger stems, usually form the bulk of the herb and show six conspicuous, longitudinal ridges. The leaves present veins fine, more evident on the lower surface and both surfaces pubescent. The leaf and stem reveal characters for the family. Despite that, some relevant observations include the kind and localization of glandular and nonglandular thricomes, the organization of the epithelial cells of secretory canals and its localization. The crude drug is aromatic, stronger when freshly crushed, characteristic and camphoraceous. The crude drug, volatile oil and extract (EBL) were analyzed by thin layer chromatography (TLC). Photographs of morfoanatomical and TLC are presented. Flavonoids and terpenoids were detected in crude drug and extract (EBL). The volatile oil was analyzed by GC-MS. The most abundant substances were  $\alpha$ -phellandrene (35,8%), camphor (26,9%) and camphene (12,2%). It exhibited antimicrobial activity. The extract (EBL) shown to protect rats from developing gastric ulcers induced by HCl/ethanol, low antimicrobial activity and promising antioxidant activity ( $Q_{1/2} = 4,42 \mu\text{g/ml}$ ). Acute toxicity test was carried out. There were no modifications in body weight, water or food intake or in the external aspect of kidneys, heart, lungs and liver.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Generalidades

A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento utilizam a medicina tradicional. Segundo Farnsworth (1994), as plantas medicinais, componentes importantes deste tipo de terapia, deveriam ser estudadas quanto aos aspectos de eficácia e segurança. A Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 17, editada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelece parâmetros de qualidade, segurança e eficácia terapêutica aos medicamentos fitoterápicos brasileiros (BRASIL, 2000). Este fato, o crescente interesse na obtenção de substâncias farmacologicamente ativas de fontes vegetais, aliado à preocupação no estudo de espécies pertencentes à biodiversidade brasileira, motivam este estudo.

A droga vegetal, definida como "planta ou partes submetidas a processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada" (BRASIL, 2000), no item qualidade tem sido uma das preocupações relatadas há décadas (OLIVEIRA e AKISUE, 1973). O problema da adulteração e falsificação ainda persiste em nosso país (OLIVEIRA e cols, 2000).

Pensando em contribuir na ampliação do conhecimento de uma planta medicinal nativa em minha cidade natal, muito pouco estudada sob o ponto de vista científico, escolheu-se *Melampodium camphoratum* (L.f.) Baker como tema desta dissertação.

*M. camphoratum*, espécie vegetal conhecida na medicina popular brasileira pelas denominações de São-João-Caá (PIMENTEL, 1994) e erva-de-São-João (CORREA, 1984), pertence à família Asteraceae. Esta planta apresenta-se como erva anual com odor canforáceo.

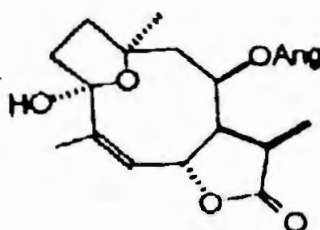
Esta espécie possui as seguintes sinonímias científicas: *Greenmania boladorensis* Hieron, *Pronacron ramosissimum* Cass., *Unxia camphorata* L. f.,

*Unxia digyna* Steetz e *Unxia hirsuta* Rich. (INDEX KEWENSIS, 1946; STUESSY, 1969).

*M. camphoratum* vegeta espontaneamente em campos arenosos do norte do Brasil e das Guianas, estendendo-se até o Panamá. Esta espécie adapta-se a diversas condições de clima e produz grande quantidade de sementes com bom poder germinativo (CORREA, 1984; PIMENTEL, 1994).

A planta é empregada na medicina popular em distúrbios digestivos, disfunções da vesícula e do fígado, inclusive em hepatite (Correa, 1984; Vieira, 1992; Pimentel, 1994). Os usos interno e externo do chá são mencionados no tratamento de corrimentos (VIEIRA, 1992). No comércio encontram-se principalmente os órgãos aéreos do vegetal.

Embora *M. camphoratum* seja freqüentemente empregada em preparações medicinais, poucos trabalhos são encontrados na literatura. Jacobs e colaboradores (1986) isolaram e identificaram os flavonóides acacetina e apigenina além da lactona sesquiterpênica nivelsina C nesta espécie (Fig. 1). Maia e colaboradores (1998) caracterizaram os constituintes dos óleos voláteis de dois espécimes. Na literatura não foram encontradas citações quanto a ensaios farmacológicos e caracterização farmacobotânica da espécie em questão.



Nivelsina C

Figura 1. Lactona sesquiterpênica identificada em *Melampodium camphoratum*.

## 1.2 Família Asteraceae

### 1.2.1 Aspectos botânicos

A família Asteraceae ou Compositae é uma das maiores famílias de angiospermas. Compreende cerca de 1.300 gêneros e aproximadamente 25.000 espécies arranjadas em 3 subfamílias e 17 tribos (HEYWOOD e cols, 1977; BREMER e ANDERBERG, 1994). No Brasil ocorrem mais de 180 gêneros (BARROSO, 1991).

A família Asteraceae é representada por espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, sendo particularmente abundantes no sudoeste dos Estados Unidos e México, no sul do Brasil, na Ásia central, sul da África e Austrália. A origem geográfica das Asteraceae é algumas vezes apontada como o norte da América do Sul (TURNER, 1977; BARROSO, 1991 BREMER e ANDERBERG,1994; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998).

Segundo alguns autores (CRONQUIST, 1981; BREMER e ANDERBERG, 1994) é pouco encontrada em ambientes aquáticos e florestas tropicais úmidas, não constando sua ocorrência na Antártida.

Na grande maioria, as Asteraceae estão representadas por espécies herbáceas, anuais ou perenes, subarbustivas ou arbustivas e, só raramente, por espécies arbóreas (Ex: *Vernonia* sp.). Plantas escandentes são encontradas, por exemplo, no gênero *Mikania* (BARROSO, 1991).

O sistema radicular pode estar constituído por uma raiz fusiforme, alongada, ou por um feixe de longas raízes fibrosas, fasciculadas (BARROSO, 1991).

As folhas, na grande maioria, são alternas ou radicais; folhas opostas apresentam-se em alguns gêneros e espécies, principalmente nas tribos Heliantheae e Eupatorieae. A lâmina foliar é simples, inteira ou dissecta. As

folhas são sésseis ou pecioladas, às vezes, expandidas na base em bainha ou aurícula (BARROSO, 1991).

As flores são encontradas reunidas em inflorescência característica, o capítulo (JOLY, 1993). As floretas encontram-se assentadas sobre um receptáculo comum cercado por brácteas involucrais dispostas em uma ou mais séries (BARROSO, 1991).

Em muitos membros da família Asteraceae, o capítulo é constituído por dois tipos de flores: as flores do disco, localizadas na porção central da inflorescência, chamadas tubulares e as flores do raio, localizadas na periferia, chamadas liguladas (RAVEN e cols., 1996).

As pétalas em número de cinco, são fundidas entre si e ao ovário, e as sépalas estão ausentes ou reduzidas a uma série de cerdas ou de escamas, conhecidas como pappus (RAVEN e cols., 1996). O pappus pode ser piloso ou, às vezes, espinhoso, auxiliando a dispersão do fruto (JOLY, 1993).

O fruto mostra-se seco, indeiscente, do tipo aquênio, disperso pelo vento ou excepcionalmente encerrado no capítulo, que então tem brácteas duras e espinhosas (JOLY, 1993).

O indumento é constituído de tricomas tectores simples, uni a plurisseriados, ramificados ou glandulares (BARROSO, 1991).

Diferentes tipos de estruturas secretoras podem ser encontrados nas folhas de Asteraceae, tais como: dutos, cavidades, idioblastos, laticíferos, hidatódios, tricomas e apêndices glandulares (METCALFE e colbs., 1950; ESAÚ, 1960; HEYWOOD, 1978; BREMER e ANDERBERG, 1994, CASTRO e cols., 1997).

As folhas apresentam mesofilo geralmente dorsiventral e estômatos anomocíticos e/ou anisocíticos (METCALFE e colbs, 1950; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998).

Cortes transversais de caules herbáceos, geralmente, exibem um anel de feixes vasculares colaterais acompanhados pelo periciclo ou fibras do floema (METCALFE e colbs, 1950; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998).



### 1.2.2 Aspectos químicos e usos

Grande número de espécies vegetais pertencentes a esta família é empregado na medicina popular há muito tempo (CORREA, 1968).

Esta família tem merecido a atenção de pesquisadores devido às inúmeras propriedades medicinais que lhes são atribuídas, destacando-se o uso como antiinflamatória, expectorante, antitussígena, antihipertensiva e no tratamento de problemas hepáticos (EVANS, 1996).

Durante muitos anos vários autores têm estudado sistematicamente a sua evolução. Quimicamente esta família é conhecida por apresentar principalmente poliacetilenos, terpenóides (sesquiterpenóides, diterpenóides e triterpenóides), flavonóides, cumarinas, benzofuranos e benzopiranos (EMERENCIANO e cols., 1998); alcalóides pirrolizidínicos também estão presentes, principalmente nas tribos Senecionae e Eupatoriae (MATTOCKS, 1986). Entretanto seus constituintes característicos são as lactonas sesquiterpênicas, às quais tem-se atribuído grande parte das atividades farmacológicas mencionadas.

As lactonas sesquiterpênicas são terpenóides com 15 átomos de carbono, distinguíveis quimicamente de outros sesquiterpenóides pela presença de um sistema  $\alpha$ -metileno  $\gamma$ -lactônico (SEAMAN, 1982; IVIE e WITZEL, 1983; HARBONE e TURNER, 1984). Primariamente são classificados de acordo com o tipo de esqueleto carbocíclico em: germacranólidos, pseudoguaianólidos, eudesmanólidos e guaianólidos (PICMAN, 1986).

A estes terpenóides atribuem-se várias atividades biológicas, tais como: antiinflamatória, citotóxica, antitumoral, bactericida, fungicida e antiúlcera (RODRIGUEZ, 1977; PICMAN, 1986; ROBLES e cols., 1995; HEINRICH e cols., 1998;).

*Arnica montana*, *Artemisia annua* e *Tanacetum parthenium* são exemplos de plantas medicinais, pertencentes à família Asteraceae, que apresentam estes terpenóides como substâncias biologicamente ativas. Suas ações têm

sido relacionadas, diversas vezes, à presença de anel  $\gamma$ -lactônico  $\alpha,\beta$ -insaturado (ROBLES e cols., 1995; HEINRICH e cols., 1998).

*Arnica montana*, é uma planta medicinal de origem indígena, utilizada externamente na forma de compressas para o tratamento de contusões, equimoses, torções e luxações, devido às suas propriedades antiinflamatórias e analgésicas. Um de seus constituintes ativos é um pseudoguaianólido denominado de helenalina. *Artemisia annua*, é uma espécie chinesa, tradicionalmente utilizada para o tratamento de febre e de malária. Um dos seus princípios ativos é o eudesmanólido denominado artemisina. *Tanacetum parthenium*, espécie medicinal utilizada tradicionalmente para o tratamento de cefaléias e cólicas menstruais, apresenta o germacranólido designado partenólido, como um dos seus princípios ativos. No Canadá, foi autorizada sua utilização para o tratamento de enxaquecas (BRUNETON, 1991).

### **1.3 Gênero *Melampodium* L.**

#### **1.3.1 Aspectos botânicos**

O gênero *Melampodium* compreende cerca de 37 espécies distribuídas no Sul dos Estados Unidos, México, América Central, Colômbia e Brasil (BREMER e ANDERBERG, 1994). É representado por espécies herbáceas, anuais ou perenes, ou subarborescentes, com folhas simples ou opostas (BREMER e ANDERBERG, 1994).

No capítulo, as brácteas involucrais apresentam-se dispostas em duas séries, dimórficas. O receptáculo é convexo ou colunar. As flores do raio, de coloração amarelada ou branco-amarelada, são muito pequenas. As flores do disco são funcionalmente masculinas, liguladas, de coloração amarelo-esverdeada ou amarelo-alaranjada. O pappus mostra-se ausente (BREMER e ANDERBERG, 1994).

---

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

### 1.3.2 Aspectos químicos e usos

Na literatura encontram-se descritas cerca de 40 espécies de *Melampodium* L., das quais três ocorrem no Brasil (INDEX KEWENSIS, 1946; TURNER, 1993).

Sob o aspecto químico, cerca de 15% das espécies de *Melampodium* foram estudadas, observando-se a predominância de lactonas sesquiterpênicas e diterpênicas. Cumarinas, flavonóides e alcalóides também têm sido identificados (Tabela 1).

No gênero, apenas a espécie tema da dissertação (Correa, 1984; Vieira, 1992; Pimentel, 1994) e *M. divaricatum* (GIRÓN e cols., 1991) constam como empregadas na medicina popular. Esta última, comum na Guatemala, tem suas folhas utilizadas popularmente como antimalárico e para o tratamento de males do estômago; a planta inteira é empregada contra resfriados (GIRÓN e cols., 1991). No México, a embolia é tratada com a administração oral de uma infusão da planta inteira. É usada também em ferimentos, como antidisentérico e anticonvulsivante (HÜTHER e cols., 1999). Na região nordeste do Brasil, o chá de suas folhas e inflorescências tem sido empregado popularmente como diurético, cicatrizante e diaforético (MOREIRA e cols., 2001). Na região nordeste do Brasil, o chá de suas folhas e inflorescências tem sido empregado popularmente como diurético, cicatrizante e diaforético (MOREIRA e cols., 2001).

Tabela 1. Substâncias químicas encontradas no gênero *Melampodium*.

Espécie vegetal	Substâncias químicas	Órgão vegetal	Local de coleta	Referência
<i>M. americanum</i> L.	Melampólidos, melampodinina A Quercetagenina	Órgãos aéreos	México	Malcon e cols., 1982
<i>M. aureum</i> Brandg.	Canferol, quercetina	Planta inteira	México	Bohm e Stuessy, 1991
<i>M. bibracteatum</i> S. Wats	Quercetagenina, hidroxicanferol	Planta inteira	México	Bohm e Stuessy, 1991
<i>M. camphoratum</i> (L.f.) Baker	Flavonóides, lactona sesquiterpênica Óleo volátil	Planta inteira	Guianas	Jacobs e cols., 1986
<i>M. cinereum</i> DC	Fitol, sitosterol, melampodinina C, germacranólido	Órgãos aéreos	Brasil México	Maia e cols., 1998 Castro e cols., 1989
<i>M. cinereum</i> DC var. <i>hirtellum</i> Stuessy	Fitol, sitosterol, melampólidos	Órgãos aéreos	México	Castro e cols., 1989
<i>M. diffusum</i> Cass.	Melampodinina, melfusina Lactonas diterpênicas	Folhas	México	Quijano e Fischer, 1981 Quijano e Fischer, 1984

Tabela 1. Continuação

Espécie vegetal	Substâncias químicas	Órgão vegetal	Local de coleta	Referência
<i>M. divaricatum</i> (Rich. In Pers.) DC	Cariofileno, espatulenol, guaianol, colavenol Cumarinas	Caulas e folhas Folhas	Panamá El Salvador	Hubert e Wiemer, 1985 Borges-del-Castillo e cols., 1984
	Estigmasterol Flavonóides glicosilados, Canferol, quercetina Derivados de hidroxítimol Alcalóides pirrolizidínicos	Folhas Planta inteira Órgãos aéreos Planta inteira	El Salvador México EUA EUA	Alonso-López e cols., 1985 Bohm e Stuessy, 1991 Hüther e cols., 1999 Schümgel e Passreiter, 2000
<i>M. heterophyllum</i> Lag.	Melampodina, didromelampodina	Órgãos aéreos	México	Dominguez e cols., 1981.
<i>M. leucanthum</i> Torrey and Gray	Melampólidos Lactona diterpénica, melampólidos, dilaconas sesquiterpénicas Melampólidos, guaianólidos (dilaconas)	Folhas Órgãos aéreos	EUA EUA	Fisher e cols., 1975 Quijano e cols., 1985
<i>M. linearilobum</i> DC.	Germacrólido, heliangólido	Folhas e caules	México	Seaman e Fisher, 1979

Tabela 1. Continuação

Espécie vegetal	Substâncias químicas	Órgão vegetal	Local de coleta	Referência
M. longicorne A. Gray	Longicornina A Longicorninas	Órgãos aéreos Folhas	EUA EUA	Fisher e cols., 1982 Malcolm e cols., 1983
M. longipilum Robins	Sesquiterpenos, melampolídeos, lactonas diterpênicas Canferol, quercetina	Folhas e caules	México	Quijano e Fisher, 1984
M. macvaughii (J.R. Weels.) H. Robinson	Cariofileno (óxido), curcumeno, endoperóxido de $\gamma$ -curcumeno, derivados caurano, melampolídidos	Planta inteira Órgãos aéreos	México México	Bohm e Stuessy, 1991 Castro e cols., 1989
M. pilosum Stuessy M. rosei Robins	Melampodina A, melfusina Melrosinas Melrosina A	Órgãos aéreos Órgãos aéreos Órgãos aéreos	México México México	Malcolm e cols., 1982 Olivier e cols., 1983 Fisher e cols., 1982

## 1.4 Aspectos biológicos

### 1.4.1 Atividade antimicrobiana

Uma triagem inicial na busca de compostos de origem natural com atividade bactericida e/ou fungicida pode ser realizada através de substâncias isoladas ou extratos brutos (COWAN, 1999).

Muitas espécies vegetais da família Asteraceae têm apresentado atividade antimicrobiana em relação a diversos microrganismos. O extrato hexânico dos órgãos aéreos de *Wedelia trilobata* inibiu o crescimento de várias bactérias, entre elas *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, entretanto foi inativa contra os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (TADDEI e ROMERO, 1999).

Salie e cols. (1996) estudaram 4 espécies utilizadas pelos indígenas, a saber: *Arctotis auriculata*, *Eriocephalus africanus*, *Felicia erigeroides* e *Helichrysum crispum*. O extrato clorofórmico das folhas de *Arctotis auriculata* foi ativo contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato clorofórmico das folhas de *Eriocephalus africanus* foi ativo somente contra *Candida albicans*. O extrato clorofórmico das folhas de *Felicia erigeroides* apresentou atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa* e o extrato metanólico das suas folhas também foi ativo contra esta bactéria e contra *Candida albicans*. Já os extratos clorofórmico e etanólico das folhas de *Helichrysum crispum* apresentaram atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Rios e cols. (1987) analisaram 81 espécies vegetais que ocorrem na Espanha e, entre elas, 14 espécies pertenciam à família Asteraceae. No ensaio para avaliação da atividade antimicrobiana, somente 16 entre as 81 analisadas mostraram atividade relevante, sendo que 5 espécies eram da família Asteraceae, a saber: *Helichrysum italicum*, *Helichrysum stoechas*, *Inula viscosa*, *Jasonia glutinosa* e *Tagetes minuta*. Os extratos clorofórmicos dos órgãos aéreos destas espécies foram ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Candida*

*albicans*, entretanto nenhum deles inibiu as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Diversos métodos são propostos para avaliar a atividade antimicrobiana de substâncias. Os métodos de difusão em ágar e diluição em meio líquido são alguns dos mais utilizados (HINDLER e cols., 1994; COWAN, 1999).

As vantagens do método de difusão em ágar são a utilização de pequena quantidade de amostra e a possibilidade de testarem-se várias substâncias contra um mesmo microrganismo em uma mesma placa de Petri (RIOS e cols., 1988; RECIO e cols., 1989).

A atividade antimicrobiana dos óleos voláteis pode ser avaliada pelo método de difusão em meio sólido, utilizando o óleo puro aplicado em poços no meio pré-inoculado com o microrganismo a ser testado (YOUSEF e TAWIL, 1980).

O método de diluição em meio líquido apresenta sensibilidade e precisão (HINDLER e cols., 1994). No entanto, trata-se de uma técnica trabalhosa e envolve grande quantidade de material. Para obtenção de maior precisão nos resultados são necessárias réplicas de 3 a 5 tubos para cada concentração testada. Existem algumas substâncias que provocam turvação do meio devido sua própria natureza. Neste caso, o teste necessita de uma complementação que é a subcultura, acarretando em número adicional de tubos.

A autobiografia também pode ser utilizada na triagem de substâncias antimicrobianas, especialmente quando são de origem lipofílica como os óleos voláteis (COLE, 1994).

#### **1.4.2 Atividade antioxidante**

Quimicamente, radicais livres são definidos como moléculas que apresentam vida livre e número ímpar de elétrons na camada de valência, ou seja, são espécies químicas reativas que possuem elétrons não pareados nos orbitais mais externos (ABDALA, 1996).



Embora inúmeras moléculas possam ser incluídas nesta definição, considera-se que as espécies reativas tóxicas do oxigênio (ERTO) são as principais espécies químicas relacionadas com mecanismos patogênicos. As principais ERTO são cinco: radical superóxido ( $^{\cdot}\text{O}_2$ ); peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ); radicais alquila ( $\text{R}^{\cdot}$ ) e radicais peróxido ( $\text{ROO}^{\cdot}$ ), sendo os dois primeiros responsáveis pelo desencadeamento da produção dos outros três (ABDALA, 1996).

As ERTO podem ser formadas por reações enzimáticas e não-enzimáticas. As reações enzimáticas produtoras de radicais livres são aquelas envolvidas na cadeia respiratória, na fagocitose realizada pelos neutrófilos, monócitos e macrófagos (NADPH oxidase) e na síntese das prostaglandinas e leucotrienos (cascata do ácido aracdônico). As reações não-enzimáticas que geram radicais livres são as reações do oxigênio com compostos orgânicos e as iniciadas por radiação ionizante ou por fármacos (ABDALA, 1996).

As ERTO fazem parte do mecanismo intermediário das moléstias que envolvem isquemia, inflamação, trauma e moléstias degenerativas. Mesmo nas moléstias onde as ERTO não são a causa primária de lesão, elas são importantes, porque toda destruição celular libera ferro, o qual catalisa a geração de radicais hidroxila, que são os mais lesivos para as membranas e o sistema enzimático (ABDALA, 1996).

Quando, por algum motivo, os mecanismos naturais antioxidantes estão debilitados ou a produção de radicais livres é superior à capacidade antioxidante, é estabelecido o fenômeno chamado estresse oxidativo (ABDALA, 1996). Sies (1985) definiu o estresse oxidativo como um distúrbio no balanço pró-oxidante/antioxidante a favor do estado pró-oxidante.

Um pró-oxidante é uma substância tóxica que pode causar danos oxidativos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em várias enfermidades como artrite, aterosclerose, câncer e envelhecimento (PRIOR e CAO, 1999).

A proteção contra as patologias induzidas pelas espécies oxidantes é proporcionada por uma ampla classe de agentes protetores, chamados

antioxidantes. Uma substância antioxidante pode ser definida como aquela que inibe o processo de oxidação, ou qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE,1985). Do ponto de vista biológico, antioxidantes são compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ABDALA, 1996).

Todo organismo apresenta um sistema de defesa primário, formado por substâncias que impedem a geração de espécies reativas, ou que seqüestram-nas, de forma a impedir a sua interação com células-alvo, bloqueando assim a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Nesse item encontram-se as enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase); os quelantes e proteínas (EDTA, transferrina) que transportam ferro e cobre, impedindo que esses metais sejam liberados e catalisem a formação de espécies oxidantes; e as substâncias não enzimáticas (ascorbato, carotenóides) que seqüestram os radicais superóxido e hidroxila, ou que suprimem o oxigênio singlete (ABDALA , 1996).

O sistema de defesa secundário é formado por compostos (tocoferóis, flavonóides) que bloqueiam a etapa de propagação da cadeia radicalar, seqüestrando radicais intermediários (ABDALA , 1996).

Uma terceira linha de defesa antioxidante, é constituída por sistemas de reparo do DNA por proteases e fosfolipases, que atuariam removendo as lesões oxidativas do DNA, proteínas e lipídios (ABDALA , 1996).

Pesquisadores (HALLIWELL e GUTTERIDGE,1999) têm demonstrado que, nas situações em que há aumento do estresse oxidativo não compensado por adequada proteção antioxidante, existe aumento dos níveis sanguíneos de malonildialdeído (MDA). Esta condição pode ser facilmente medida em testes laboratoriais e representa um método presuntivo de triagem para avaliação do estresse oxidativo (BLAND, 1995).

O método de avaliação de atividade antioxidante *in vitro* descrito por Stocks e col. (1974) fundamenta-se na inibição de lipoperoxidação espontânea de homogenatos de cérebro pela produção de malonildialdeído (MDA), através da medida das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Trata-se de um teste colorimétrico baseado na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o MDA.

Um dos principais produtos formados no processo de lipoperoxidação é o malonildialdeído (MDA), um aldeído com 3 átomos de carbono. Neste ensaio uma molécula de MDA reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um complexo de cor vermelha, o qual absorve a 532-535 nm (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990). Outros produtos de oxidação dos lipídios também são formados: os 4-hidroxicenais, os 2,4-alcadienais e os 2-alcenais. Por esta razão adotou-se o termo "substâncias que reagem com o TBA" (TBARS) (SILVA e cols., 1999).

Uma das técnicas empregadas na avaliação da atividade antioxidante de espécies de Asteraceae tem sido a medida da inibição de lipoperoxidação espontânea.

Kim (2001) estudou o extrato em acetato de etila dos órgãos aéreos de *Lactula scariola*, Park e cols. (2000) analisaram o extrato butanólico de *Inula britannica* e Viturro e cols. (1999) pesquisaram o extrato aquoso de *Mutisia friesiana*. As três espécies vegetais apresentaram atividade antioxidante.

### 1.4.3 Atividade antiúlcera

A úlcera péptica, lesão escavada que se forma na mucosa gastrintestinal decorre de um desequilíbrio entre os fatores agressivos (secreção de ácido, pepsina, presença de *Helicobacter pylori*) e defensivos da mucosa (GLAVIN e SZABO, 1992). No Brasil, não há números oficiais, mas calcula-se que 5 a 10% da população desenvolva esta enfermidade. Atualmente, é consenso a importância de *Helicobacter pylori* na gênese da úlcera (DOOLEY, 1991;

BURKS, 1994; EISIG e LAUDANNA, 2001). Uma pesquisa realizada em 24 países em desenvolvimento, entre eles o Brasil, evidenciou que 50% das crianças e 90% da população adulta encontrava-se infectada (EISIG e LAUDANNA, 2001).

As úlceras pépticas ocorrem mais comumente nos primeiros centímetros do duodeno (úlceras duodenais) e ao longo da pequena curvatura do estômago (úlceras gástricas). Na grande maioria das vezes a lesão ulcerada é única e, mais raramente, dupla ou múltipla (BERKOW e FLETCHER, 1995).

No tratamento de úlceras tem-se empregado fármacos anti-secretores, representados pelos anti-histamínicos H<sub>2</sub> (cimetidina, famotidina, nizatidina e ranitidina) e pelos inibidores da bomba protônica (lanzoprazol, omeprazol). O misoprostol, derivado sintético da prostaglandina E<sub>1</sub>, é um agente antiúlcera e protetor da mucosa gástrica. Outros fármacos empregados são os sais de bismuto coloidal, o sucralfato e os antiácidos (BERKOW e FLETCHER, 1995; KOROLKOVAS e cols., 1995).

Muitas espécies vegetais da família Asteraceae apresentam atividade antiúlcera em modelos preventivos, entre elas podem-se citar: *Artemisia herba-alba*, *Baccharis trimera*, *Calendula officinalis*, *Mikania cordata* (BORRELLI e IZZO, 2000), *Neurolaena lobata* (GRACIOSO e cols., 2000), *Tanacetum vulgare* (TOURNIER e cols., 1999) e *Vernonia kotschyana* (GERMANO e cols., 1996). A ação destas espécies pode ser relacionada à presença de saponinas, flavonóides e lactonas sesquiterpênicas (GERMANO e cols., 1996; TOURNIER e cols., 1999; BORRELLI e IZZO, 2000; GRACIOSO e cols., 2000).

---

## 2 OBJETIVO

Considerando o seu potencial uso na terapêutica, o número reduzido de trabalhos científicos com esta planta medicinal e a importância de fornecer subsídios para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico preparado com *M. camphoratum*, este trabalho foi desenvolvido, realizando a:

- Caracterização morfológica e anatômica das folhas e dos caules;
- Extração e identificação dos componentes químicos do óleo volátil;
- Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo volátil;
- Caracterização dos principais grupos de substâncias químicas presentes na droga vegetal e no extrato bruto liofilizado (EBL);
- Avaliação da toxicidade aguda e das atividades antimicrobiana, antioxidante e antiúlcera gástrica do extrato bruto liofilizado (EBL).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

Os órgãos aéreos de *M. camphoratum* (L.f.) Baker foram coletados na cidade de Belém (PA), no período de agosto de 1998 a maio de 1999. Todo material coletado encontrava-se em floração e/ou frutificação. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Fernando de Oliveira, docente da Universidade São Francisco, por comparação com material depositado no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo sob as designações discriminadas a seguir:

- SP68412 - amostra coletada por J. Mattos 9950 et N. Mattos no Macapá, Amapá;
- SP37477 - amostra coletada por Francis Dronet s/n em 12/07/35 - Belém, Pará;
- SP793547 - amostra coletada por W. A. Engler e H. S. Irwin 45923 em 14/07/61;
- SP183217 - amostra coletada por A. Janssem 188 em 15/11/80 no km 2,5 da Transamazônica.

Exsicata referência do material empregado no estudo foi depositada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob a designação SMS01.

#### 3.2 Estudo farmacobotânico

No estudo da morfologia externa da droga constituída de folhas, foi utilizada amostra de sete unidades, de acordo com método descrito por Dibbern e cols. (1987). Os caracteres analisados foram: filotaxia; limbo (comprimento x largura); forma (geral, ápice, base, margem), nervação (padrão geral, superfície

---

das nervuras); tipo de indumento; pecíolo (comprimento x largura). A terminologia empregada na descrição de formas foliares, tipos de indumento e padrões de venação seguiu a sugerida por Oliveira e Akisue (2000). O estudo de morfologia externa da droga vegetal foi efetuado através de observação a vista desarmada e com lupa estereoscópica Willd®.

A morfologia interna foi observada com auxílio de microscópio de luz Olympus®. A caracterização anatômica dos órgãos aéreos foi realizada em cortes preparados com o material fresco e/ou fixado em FAA 50 (formol-ácido acético glacial-etanol 50%, 5:5:50) e conservado em etanol 70% (JOHANSEN, 1940; SASS, 1951) e com a droga vegetal.

Nos testes histoquímicos foram empregadas as soluções de floroglucinol clorídrico (SASS, 1951) para lignina; de Sudam III (SASS, 1951) para lipídios, cutina e suberina; de azul de astra (ROESER, 1962) e de hematoxilina de Delafield (JOHANSEN, 1940) para celulose; de cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para compostos fenólicos; e de lugol (BERLYN e MIKSCHE, 1976) para amido.

Na obtenção das preparações semipermanentes empregou-se amostra seccionada no sentido transversal e longitudinal tangencial, à mão livre na região do terço mediano inferior da lâmina foliar plenamente desenvolvida. Os cortes histológicos foram diafanizados com solução de hipoclorito de sódio a 20% e tratados, após lavagem, com água acética 0,5%. Os cortes foram corados com soluções de fucsina básica e azul de astra (ROESER, 1962) ou azul de astra e safranina (BUKATSCH, 1972) e montados em glicerina-água (1:1) (OLIVEIRA e AKISUE, 2000).

A dissociação dos tecidos foi obtida pelo método de Franklin (1945), que consiste de maceração em mistura de água oxigenada 20 V e ácido acético glacial na proporção de 1:1, em estufa a temperatura de 60 °C. As epidermes dissociadas, após lavagem, foram coradas e montadas como descrito para as preparações semipermanentes.

A documentação foi realizada empregando-se fotomicroscópio Nikon®, tipo Optiphot 104 UFX-IIA. A caracterização estrutural da folha foi complementada com a análise do material fixado em FAA 50%, desidratado em série etílica crescente e seco pelo ponto crítico. As amostras foram coladas em suporte e submetidas à metalização com ouro (SOUZA, 1989) em aparelho Balzers SCD. A análise ultra-estrutural de superfície foi efetuada em microscópio eletrônico de varredura Philips SEM. Elétron-micrografias destacando os aspectos de interesse são apresentados.

### **3.3 Preparo da droga vegetal**

A droga vegetal (BRASIL, 2000) foi obtida empregando-se estufa com circulação de ar, a cerca de 40 °C, durante 48 horas. O material vegetal convenientemente desidratado foi pulverizado em moinho de facas e martelos da marca Thomas®, obtendo-se pó semifino (FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil, 1959; FARMACOPÉIA Brasileira, 1988).

### **3.4 Preparo do extrato bruto liofilizado (EBL)**

O extrato dos órgãos aéreos de *Melampodium camphoratum* foi preparado segundo o processo A, descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959).

Quinhentos gramas da droga vegetal, previamente pulverizada, foram umedecidos com quantidade suficiente do líquido extrator (etanol 70%), permanecendo em repouso por aproximadamente 15 minutos. A droga vegetal umedecida foi acomodada em percolador, onde permaneceu em maceração por 24 horas. A extração foi desenvolvida com velocidade de 80 gotas/minuto. Cerca de 4 litros de líquido extrator foram empregados no processo.



A solução hidroalcoólica foi concentrada até eliminação do etanol, em rotavapor Bücchi, a pressão reduzida e temperatura limite de 50 °C. A seguir, procedeu-se à liofilização em equipamento de marca Edwards®. O extrato bruto liofilizado recebeu a denominação de EBL.

### **3.5 Triagem das principais classes de substâncias na droga e no extrato bruto liofilizado (EBL)**

#### **3.5.1 Método de extração**

A extração foi executada segundo os métodos descritos por Marini-Bettòlo e cols. (1981) e por Wagner e Bladt (1996).

##### **• Segundo Marini-Bettòlo e cols. (1981)**

O esquema de extração segundo estes autores está representado na Figura nº 2.

Três gramas da droga vegetal pulverizada foram submetidas à extração sob refluxo a 50 °C com éter de petróleo (10 mL) durante 5 minutos. Após resfriamento e filtração, a solução etérea foi descartada e o resíduo (material A) foi seco à temperatura ambiente na capela.

O material (A) foi tratado com 10 mL de clorofórmio-ácido acético (99:1) sob refluxo a 50 °C durante 5 minutos. O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro e reservado (extrato A).

O resíduo (material B) foi seco a temperatura ambiente na capela e em seguida extraído com 10 mL de clorofórmio-metanol-ácido acético (49,5:49,5:1) durante 5 minutos a 50 °C sob refluxo. O extrato foi filtrado e reservado (extrato B).

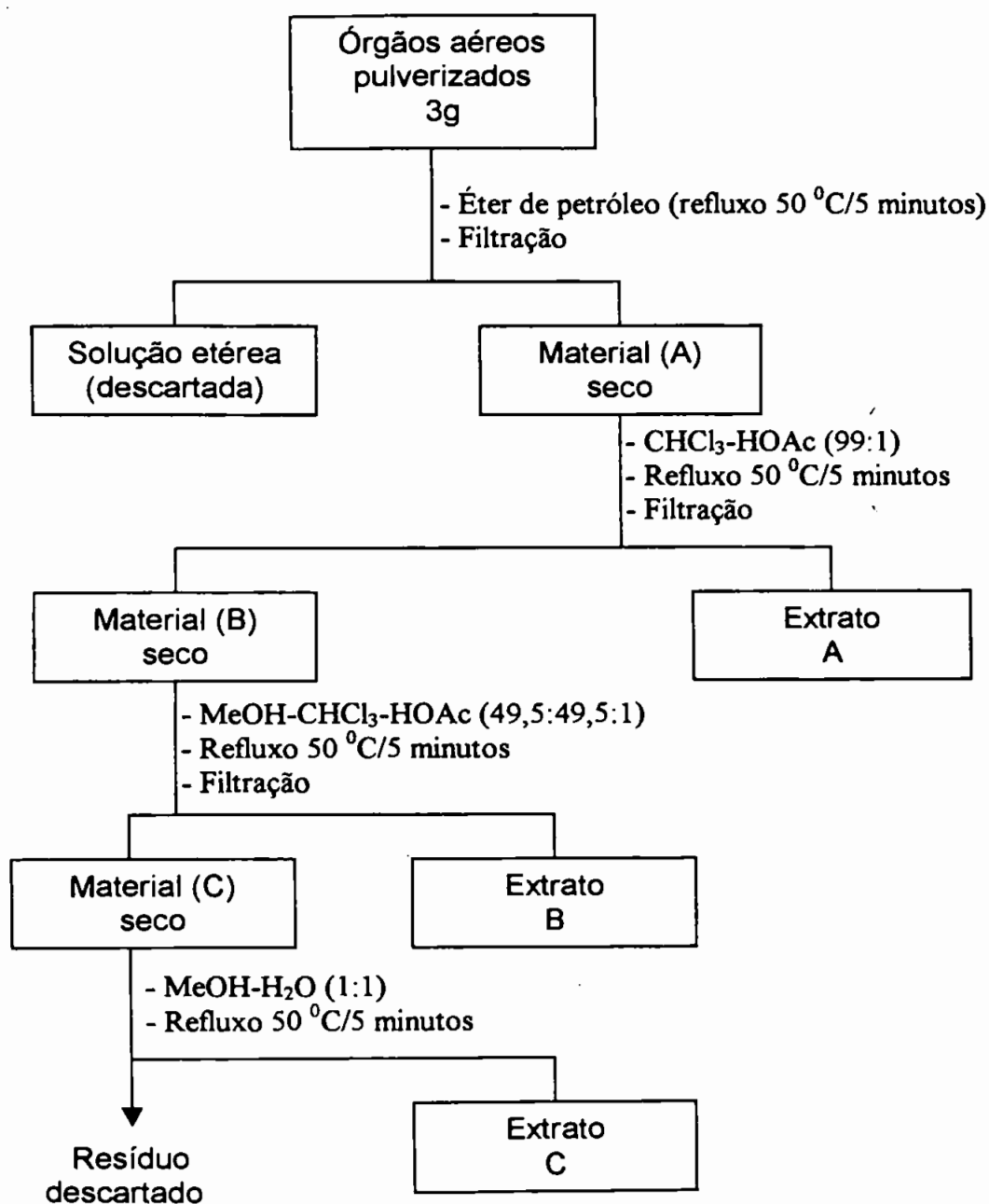


Figura 2. Esquema de obtenção dos extratos A, B e C empregados para caracterização das principais classes de substâncias presentes na droga vegetal (MARINI-BETTÒLO e cols., 1981).

O resíduo (material C) foi seco como descrito anteriormente e então extraído com 10 mL de metanol-água (1:1) durante 5 minutos sob refluxo a 50 °C. O extrato foi filtrado e reservado (extrato C). O resíduo foi descartado.

A Tabela nº 2 apresenta as várias classes de substâncias que podem ser encontradas nos extratos preparados pelo método descrito por Marini-Bettòlo e cols. (1981).

Tabela nº 2. Distribuição das possíveis classes de substâncias nos extratos preparados pelo método descrito por Marini-Bettòlo e cols. (1981).

Extrato	Classes de substâncias
A	Antraquinonas, flavonóides, cumarinas
B	Flavonóides glicosilados, glicosídeos cardiotônicos, antraquinonas glicosiladas, saponinas, taninos, cumarinas
C	Flavonóides glicosilados, antraquinonas glicosiladas, glicosídeos cardiotônicos, saponinas

• **Segundo Wagner e Bladt (1996)**

✓ **Antraquinonas glicosiladas e flavonóides**

Um grama da droga vegetal pulverizada foi extraído sob refluxo com 10 mL de metanol durante 10 minutos. O extrato obtido foi filtrado e reservado (extrato D).

**✓ Alcalóides**

Um grama da droga vegetal pulverizada foi umedecido com 1 mL de solução de hidróxido de amônio a 10%, em seguida foram adicionados 10 mL de metanol. A extração foi realizada sob refluxo durante 10 minutos. O extrato obtido foi filtrado e reservado (extrato E).

**✓ Saponinas**

Um grama da droga vegetal pulverizada foi extraído sob refluxo com 10 mL de metanol durante 10 minutos, em seguida o extrato obtido foi filtrado e evaporado até cerca de 1 mL, foi então adicionado 0,5 mL de água destilada e realizada a extração com 3 mL de *n*-butanol (saturado com água). A fase butanólica obtida foi reservada (extrato F)

**✓ Glicósidos cardiotônicos**

Um grama da droga vegetal pulverizada foi misturado com 5 mL de metanol e 10 mL de solução de acetato de chumbo a 10% e, em seguida, aquecido a 30 °C em banho-maria durante 10 minutos. A solução obtida foi filtrada e resfriada até temperatura ambiente e, em seguida, extraída com 10 mL de diclorometano (2 x). A fase diclorometanólica foi concentrada em evaporador rotatório até *secura* e o resíduo foi dissolvido com diclorometano-metanol (1:1) e reservado (extrato G).

**✓ Terpenóides e cumarinas**

Um grama da droga vegetal pulverizada foi extraído, sob refluxo, durante 15 minutos com 10 mL de diclorometano. O filtrado foi concentrado em

evaporador rotatório até secura. Este resíduo foi dissolvido com 0,5 mL de tolueno e reservado (extrato H).

### 3.5.2 Análise cromatográfica em camada delgada

O EBL de *M. camphoratum* e os extratos obtidos segundo os métodos de Marini-Bettòlo e cols. (1981) e de Wagner e Bladt (1996) foram analisados por cromatografia em camada delgada empregando-se os sistemas cromatográficos descritos a seguir. Os sistemas (A) e (B) diferem apenas na constituição da fase móvel (Wagner e Bladt, 1996) e nas substâncias de referência empregadas.

**Sistema (A)** - Fase móvel: acetato de etila-metanol-água (100:13,5:10).

Substâncias de referência a 5%: apigenina, quercetina e rutina.

**Sistema (B)** - Fase móvel: tolueno-acetato de etila (93:7).

Substância de referência a 10%: escina.

Itens comuns aos sistemas cromatográficos (A) e (B):

Fase estacionária: sílica gel G Merck

Ativação: a 105 °C, por cerca de 1 hora

Placa: 15 x 12 cm

Percurso: 10 cm

Desenvolvimento: Simples e ascendente

Visualização: luz natural ou luz UV 254/365 nm

Após a observação prévia com luz natural e/ou luz UV 254/366 nm, cada cromatograma foi nebulizado com o revelador adequado para cada classe de substâncias analisada (Tabela nº 3).

Tabela nº 3. Reveladores utilizados na análise cromatográfica segundo os métodos de Marini-Bettòlo e cols. (1981) \* e de Wagner e Bladt (1996) \*\*.

Classes de substâncias	Reveladores
Alcalóides	Dragendorff */ **
Antraquinonas	sol. metanólica de acetato de magnésio à 0,5% * sol. etanólica de hidróxido de potássio à 10% **
Cumarinas	sol. metanólica de hidróxido de potássio à 5% * sol. etanólica de hidróxido de potássio à 10% **
Flavonóides	sol. clorofórmica de cloreto de antimônio à 10% * NP/PEG (ácido difenilborico β-aminoetil éster/ polietilenoglicol 4000) **
Glicósidos cardiotônicos	Reativo de Kedde */ **
Saponinas	Liebermann-Burchard/ 100°C x 10 minutos * Anisaldeído sulfúrico/ 100°C x 5-10 minutos **
Taninos	Ferricianeto de potássio/cloreto férrico à 1% *
Terpenóides	Anisaldeído sulfúrico/ 100°C x 5-10 minutos **

### 3.6 Óleo volátil

#### 3.6.1 Obtenção do óleo volátil

Os órgãos aéreos frescos de *M. camphoratum* (1.300 g), divididos em fragmentos de cerca de 2 cm, foram submetidos a hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado (WASICKY e AKISUE, 1969). O sistema foi aquecido a ebulição durante 4 horas (FARMACOPÉIA Brasileira, 1988). O volume do óleo foi medido e a porcentagem em relação ao peso dos órgãos aéreos frescos foi calculada.

### 3.6.2 Identificação dos constituintes químicos do óleo volátil

O óleo volátil foi analisado visando à identificação dos seus constituintes químicos. A análise do óleo volátil foi realizada utilizando-se cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas. O equipamento empregado foi o modelo Finnigan 4021, com coluna de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) contendo um filme de 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de SE-54. Hélio foi usado como gás de arraste a uma velocidade de 10 mL/min. A temperatura programada foi de 50-250  $^{\circ}\text{C}$  com variação de 4  $^{\circ}\text{C}$  por minuto. O espectrômetro de massas empregado foi o de impacto eletrônico (70 eV) e temperatura da fonte de íons a 180  $^{\circ}\text{C}$ .

Os componentes individuais foram identificados com auxílio de computador provido de biblioteca com banco de dados de espectros de massas. Os índices de retenção das substâncias identificadas foram calculados usando-se uma série homóloga de alcanos. Após a análise cromatográfica em fase gasosa do óleo volátil dos órgãos aéreos procedeu-se à avaliação de sua atividade antimicrobiana.

### 3.6.3 Análise cromatográfica em camada delgada

O óleo volátil foi submetido a análises cromatográficas em camada delgada, empregando-se os sistemas descritos a seguir:

**Sistema (1)** - Fase móvel: hexano-acetato de etila (9:1). Substâncias de referência a 25% em clorofórmio: cânfora, borneol, cariofileno, timol e terpineol.

**Sistema (2)** - Fase móvel: tolueno-acetato de etila (95:5). Substâncias de referência a 25% em clorofórmio: cânfora e borneol.

Itens comuns aos sistemas cromatográficos (A) e (B):

Fase estacionária: sílica gel G Merck

Ativação: a 105  $^{\circ}\text{C}$ , por cerca de 1 hora

Placa: 15 x 12 cm

Percurso: 10 cm

Desenvolvimento: Simples e ascendente

A visualização e documentação foram efetuadas à luz natural após aplicação do reativo anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento a 100 °C por cerca de 10 minutos.

### **3.7 Ensaio biológicos**

#### **3.7.1 Avaliação de toxicidade aguda do extrato bruto liofilizado (EBL)**

O estudo de toxicidade aguda do EBL de *M. camphoratum* foi realizado segundo o método preconizado por Brito (1994).

Vinte camundongos Swiss (dez machos e dez fêmeas), com peso corpóreo variando de 28 a 41g, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, foram empregados neste ensaio. As fêmeas eram nulíparas e não-prenhas.

Os animais foram aclimatados às condições laboratoriais por cinco dias. Os ciclos de claro-escuro foram regulados em 12/12 horas, e a temperatura ambiente regulada para 21 °C. Os animais tiveram livre acesso à água e à ração purina. Os animais foram divididos por sexo em quatro grupos de cinco animais. Os conjuntos de machos e de fêmeas formaram os respectivos grupo controle e grupo tratado. Os camundongos permaneceram em jejum, aproximadamente, 6 horas antes do experimento.

O EBL foi dissolvido em solução a 15% de polissorbato (Tween 80) em água destilada e foi administrado ao grupo tratado na dose única de 5,0 g/kg de peso corporal. O grupo controle recebeu o veículo no qual o extrato foi solubilizado. A administração foi por via oral com auxílio de uma cânula gástrica metálica.

Após a administração, os animais foram privados de ração e água por um período de quatro horas. O comportamento dos animais foi observado e registrado após a administração e, em seguida após 30, 60, 120, 240 e 360 minutos e depois a cada 24 horas, durante 14 dias consecutivos. Itens como:



depressão, excitação, convulsão, piloereção, diarreia e constipação foram avaliados visualmente durante o experimento em intervalos de 24 horas. O peso corpóreo, o consumo de ração e o de água foram registrados a cada 48 horas.

Decorridos os 14 dias, os animais anestesiados com éter etílico foram sacrificados e necropsiados. Coração, rins, fígados e pulmões foram examinados macroscopicamente e pesados. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  dpm. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student (programa Instat II). Diferenças significativas foram consideradas para  $p < 0,05$ .

### **3.7.2 Avaliação de atividade antimicrobiana do extrato bruto liofilizado (EBL) e do óleo volátil**

#### **• Atividade antimicrobiana**

Nos ensaios foram utilizadas culturas de bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e de fungos (leveduras e bolores), procedentes do American Type Culture Collection (ATCC).

#### **• Critérios para avaliação da atividade antimicrobiana**

Os critérios para que o extrato bruto liofilizado (EBL) e o óleo volátil de *M. camphoratum* fossem considerados ativos foram: a inibição do crescimento de um ou mais microrganismos e a reprodutibilidade da atividade pelo menos em duas séries de ensaios realizados em dias diferentes.

---

→ **Atividade antimicrobiana do extrato bruto liofilizado (EBL) pelo método de diluição seriada em meio líquido**

- **Microrganismos**

- Bactéria Gram-positiva - *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538);
- Bactérias Gram-negativas - *Escherichia coli* (ATCC 10536);  
*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027);  
*Salmonella choleraesuis* (ATCC 10536);
- Levedura - *Candida albicans* (ATCC 10231);
- Bolor - *Aspergillus niger* (ATCC 16404).

- **Preparo dos meios de cultura**

Os meios de caseína-soja (caldo e ágar) para as bactérias e Sabouraud-dextrose (caldo e ágar) para os fungos, foram preparados conforme as instruções do fabricante (Difco®).

- **Preparo da solução fisiológica estéril**

A solução fisiológica foi preparada com cloreto de sódio p.a Merck®, na concentração de 0,9% em água destilada. Alíquotas de 9,0 mL foram distribuídas para tubos de ensaio e submetidas a esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

- **Preparo e padronização das suspensões de microrganismos**

A partir das culturas estoque, as bactérias foram semeadas em estrias, na superfície do meio inclinado de ágar caseína - soja. O bolor e a levedura foram semeados na superfície do meio inclinado de ágar Sabouraud dextrose.

As bactérias foram incubadas a 30-35 °C por 24 horas, os fungos, a 25 °C, por 48 horas.

A massa celular, resultante do crescimento, foi recolhida em 9 mL de solução fisiológica estéril e a suspensão obtida foi submetida à contagem de microrganismos viáveis, pela técnica de semeadura em profundidade. Para isto foi transferida 1 gota da suspensão original para um tubo contendo 9,0 mL de solução fisiológica estéril. Diluições decimais seriadas foram efetuadas até  $10^{-6}$  em 9 mL de solução fisiológica estéril, a partir desta suspensão original. Alíquotas de 1 mL das diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  das bactérias e dos fungos, foram transferidas para placas de Petri, em duplicata e homogeneizadas com 15 mL de meio de cultura esterilizado, ágar caseína-soja para bactérias e ágar Sabouraud dextrose para fungos. Após incubação das placas, durante 24 horas a 30-35 °C para as bactérias e 48 horas a 25 °C para os fungos, efetuou-se a contagem de colônias com o contador Phoenix®.

O número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) da suspensão original foi determinado, sendo considerada a contagem das placas com cerca de 30 a 300 colônias.

A partir da suspensão original de cada microrganismo, de concentração conhecida, foram feitas diluições em solução fisiológica estéril até obtenção de suspensão com  $10^3$  UFC/mL.

#### • Preparo das soluções de antibióticos

Como controle negativo, foi utilizado padrão secundário de ampicilina anidra (Sigma®) de potência 970 µg/mg, na concentração de 100 µg/mL para *E. coli*; 10 µg/mL para *S. aureus*; 185 µg/mL para *P. aeruginosa* e o padrão secundário de nistatina (Bristol-Mayer®) de potência 5874 UI/mg na concentração de 350 UI/mL para *C. albicans* e para *A. niger* 600 UI/mL, em salina estéril.

- **Preparo da amostra**

Foi pesada quantidade suficiente do extrato EBL, para se obter as concentrações de 10 mg/mL, 5 mg/mL e 1 mg/mL diluída em água/etanol (1:1).

- **Avaliação da atividade antimicrobiana do EBL**

Alíquota de 0,1 mL da suspensão de cultura jovem com carga de  $10^3$  UFC/mL foi transferida para tubos com 9 mL do meio de cultura e 1 mL da solução da amostra, sendo as concentrações finais desta no meio de cultura de 1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL.

O ensaio foi monitorado com 3 tubos para o controle positivo (meio + microrganismo), 3 tubos para controle negativo (meio + microrganismo + antibiótico), 3 tubos para controle da amostra (meio + microrganismo + amostra) e 3 tubos para controle do solvente (meio + microrganismo + solvente).

A incubação dos tubos foi realizada por 24 horas ou até crescimento no tubo controle, à temperatura de cerca de 30-35 °C para as bactérias ou a 25 °C para os fungos. Foi efetuada a leitura dos tubos avaliando-se o crescimento ou a inibição dos microrganismos, pela visualização macroscópica da presença ou ausência de turvação do meio de cultura. Para os tubos que não apresentaram turvação, porém formaram precipitados, foi efetuada uma sub-cultura, para verificar o crescimento ou não dos microrganismos.

Os ensaios foram realizados em triplicata em 4 dias diferentes.

→ **Atividade antimicrobiana do óleo volátil pela técnica da autobiografia**

- **Microrganismos utilizados**

- Bactéria Gram-positiva - *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538);
- Bolor - *Aspergillus niger* (ATCC 16404).

- **Preparo dos meios de cultura**

Os meios de caseína-soja (ágar) e Sabouraud-dextrose (ágar) foram preparados conforme as instruções do fabricante (Difco).

- **Preparo das suspensões de microrganismos**

As culturas-estoque dos microrganismos foram semeadas em estrias na superfície do meio inclinado de ágar caseína-soja para a bactéria e de ágar Sabouraud-dextrose para o bolor. A bactéria foi incubada a 30-35 °C por 24 horas e o bolor a 20-25 °C, por uma semana ou até a sua esporulação.

Após o crescimento, os microrganismos foram suspensos em 9 mL de salina estéril, em vórtex. Alíquota de 0,3 mL desta suspensão foi adicionada a 10 mL de meio ágar fundido, sendo caseína-soja para a bactéria e Sabouraud-dextrose para o bolor, de modo a obter-se um crescimento homogêneo sobre as placas cromatográficas.

- **Preparo das soluções de antibiótico**

Os padrões secundários de cloranfenicol e de anfotericina B foram utilizados para a preparação das soluções estoque com 10 µg/mL e 2 mg/mL, respectivamente. A mistura de solventes empregada nos dois casos foi etanol/clorofórmio (1.2).

- **Preparo da amostra**

A amostra do óleo volátil de *M. camphoratum* foi utilizado sem diluição.

---

### • Sistema cromatográfico

Foram utilizadas placas cromatográficas de sílica gel GF<sub>254</sub> da marca Merck®, com espessura de 0,3 µm, 12 cm de comprimento e 5 cm de largura. O percurso foi de 10 cm, no sentido ascendente em cuba com saturação completa.

Dentre as diversas fases móveis ensaiadas, a mistura clorofórmio e acetona (9:0,1) mostrou-se a mais adequada para a separação dos componentes do óleo volátil sendo que em cada placa ensaiada foi aplicada a quantidade equivalente a 10 µL deste óleo.

Para o controle dos crescimentos, aplicou-se 0,1, 0,5 e 1,0 µg de cloranfenicol para ensaios com a bactéria e 10, 20 e 40 µg de anfotericina B, para ensaios com o bolor. Estas substâncias controle não sofreram deslocamento no sistema cromatográfico empregado.

### • Aplicação dos microrganismos nas cromatoplas e visualização do crescimento

Em condições assépticas, as placas cromatográficas desenvolvidas com as amostras, foram acondicionadas em placas de Petri, e receberam uma camada fina (aproximadamente 10 mL) de ágar caseína-soja inoculado com 10<sup>8</sup> UFC/mL de *Staphylococcus aureus* e de ágar Sabouraud-dextrose com 10<sup>7</sup> UFC/mL para *Aspergillus niger*. As placas cromatográficas foram incubadas em placas de Petri fechadas, para a manutenção das condições de assepsia e umidade.

A incubação foi realizada a 30-35 °C, por 24 horas, para a bactéria e a 20-25 °C para o bolor, até crescimento satisfatório.

As zonas de inibição de crescimento da bactéria foram visualizadas com auxílio do indicador de crescimento biológico, o cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 0,5% em dispersão de ágar a 1% fundido. Esta foi vertida sobre o sistema.

Em seguida, as placas foram novamente incubadas por mais uma hora a 30-35 °C. Para o bolor, as zonas de inibição foram reveladas pela presença de esporulações.

→ **Atividade antimicrobiana do óleo volátil pelo método de difusão em ágar**

• **Microrganismos utilizados**

- Bactéria Gram-positiva - *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538);
- Bactéria Gram-negativa - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027);
- Levedura - *Candida albicans* (ATCC 10231);
- Bolor - *Aspergillus niger* (ATCC 16404).

• **Preparo dos meios de cultura**

Os meios de caseína-soja (ágar), meios ATB1, ATB2 e Sabouraud-dextrose (ágar) foram preparados conforme as instruções do fabricante (Difco).

• **Preparo e padronização das suspensões de microrganismos**

A partir das culturas estoque, as bactérias foram repicadas em estrias na superfície do meio inclinado de ágar caseína-soja. A levedura e o fungo foram repicados na superfície do meio inclinado de ágar Sabouraud-dextrose. As bactérias foram incubadas a 30-35 °C por 24 horas. A levedura foi incubada a 20-25 °C e o bolor a temperatura ambiente por 7 dias.

Para as bactérias e para a levedura, a massa celular resultante dos crescimentos destes microrganismos foi recolhida com 10 mL de solução fisiológica estéril e a suspensão obtida foi submetida a homogeneização em agitador Vortex. Uma alíquota desta suspensão foi diluída com solução

fisiológica estéril, de modo a obter-se em espectrofotômetro, transmitância equivalente a 25% no comprimento de onda a 580 nm.

A massa celular resultante da incubação do bolor por 7 dias, à temperatura ambiente, foi recolhida com 10 mL de uma solução 1% de polissorbato (Tween 40) em solução fisiológica 0,9%. Desta suspensão, o volume utilizado para o inóculo foi de 0,075 mL/100 mL de meio.

#### • Preparo do padrão e da amostra

A amostra do óleo volátil de *M.camphoratum* e o padrão de eugenol, cedido pela empresa IFF foram utilizados sem diluição.

#### • Aplicação das amostras e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo volátil

Para cada placa foi distribuído 10mL de meio ATB2 e após solidificação, foi adicionado sobre o mesmo, 5mL de meio ATB1 inoculado com suspensão padronizada ( 0,025 a 0,25mL/100mL de meio).

Após solidificação do conjunto, foram feitos 2 orifícios em cada placa, empregando-se um furador metálico de 6 mm de diâmetro. Em cada orifício foi adicionada uma gota de meio ATB2 e a seguir 0,025mL de padrão de eugenol ou de óleo volátil de *M. camphoratum*.

Após o processo de aplicação da amostra e do padrão, as placas foram incubadas em estufa a 35-37 °C durante 18 a 24 horas para as bactérias e para a levedura e 7 dias para o bolor. Após o período apropriado de incubação, o halo de inibição de crescimento do microrganismo ao redor da amostra foi medida.

O ensaio foi realizado em triplicata. Os valores são apresentados em milímetros.



### **3.7.3 Avaliação de atividade antioxidante do extrato bruto liofilizado (EBL)**

A atividade antioxidante *in vitro* do EBL de *M. camphoratum* foi avaliada pela técnica da medida de malonildialdeído (MDA). O ensaio foi realizado de acordo com o método preconizado por Stocks e cols. (1974). Este método fundamenta-se na inibição de lipoperoxidação espontânea de homogenatos de cérebro pela produção de malonildialdeído (MDA), através da medida das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Trata-se de um teste colorimétrico baseado na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o MDA.

#### **• Preparo do homogenato de cérebro**

Foram utilizados ratos albinos Wistar, machos, adultos, com cerca de 350g, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP). Os animais, antes do teste, foram mantidos sob temperatura ambiente, alimentação tipo purina, com livre acesso à água.

Cada animal foi anestesiado com éter etílico, submetido a laparotomia e perfundido através da artéria pulmonar ou da artéria aorta do coração, com tampão fosfato de sódio 140 mM pH 7,4 (4 °C).

O cérebro foi retirado e homogeneizado no tampão acima mencionado na proporção 1:5, em um homogenizador Ultra Turax®. O homogenato foi centrifugado durante 15 minutos, a 3000 rpm e a 4 °C em equipamento refrigerado Himac CR 20B2-Hitachi®. O sobrenadante foi diluído em 3 vezes o seu volume com o tampão fosfato e mantido sob refrigeração.

#### **• Avaliação da lipoperoxidação através da medida de TBARS**

A 3,0 mL do sobrenadante diluído foram adicionados 50 µL do extrato EBL dissolvido em etanol 70%. Diversas concentrações foram preparadas,

sendo que nos controles foram utilizados 50  $\mu$ L de etanol 70%. Imediatamente antes da incubação retirou-se 1 mL de cada erlenmeyer para o seu respectivo tubo de plástico T<sub>0</sub> (tempo zero) contendo ácido tricloroacético a 5% (TCA 5%).

Os erlenmeyers contendo o restante das amostras foram mantidos sob agitação, em banho de Dubnoff (Gyrotory Water Bath Shaker - modelo G76 - New Brunswick Scientific®), durante 1 hora a 37 °C. Em seguida, transferiu-se 1 mL de cada erlenmeyer para o seu respectivo tubo de plástico contendo TCA a 5% (tubo T<sub>1</sub>).

Os tubos (T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>) foram centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos em equipamento da marca Clínica - Spin IV - Incibrás®. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi transferido a tubos de vidro (T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>) contendo 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%. Foi preparado um branco adicionando-se 1 mL de água destilada a 1 mL de TBA 0,67%. O conjunto foi mantido durante 20 minutos em banho de água fervente. Após este período, os tubos foram colocados em banho de gelo por 20 minutos e, em seguida, mantidos durante 20 minutos à temperatura ambiente.

A leitura foi efetuada a 535 nm, em espectrofotômetro Incibrás UV/VIS MF-200.

A capacidade antioxidante (CAOx) foi calculada em percentagem empregando-se a fórmula seguinte:

$$\text{CAOx \%} = 1 - \frac{\text{Leitura das amostras } T_1 - T_0}{\text{Leitura dos controles } T_1 - T_0} \times 100$$

A capacidade antioxidante (CAOx) foi calculada para as diferentes concentrações ensaiadas. Na elaboração da curva de regressão linear foi considerado  $x = 1/\text{Concentração de EBL } (\mu\text{g/mL})$  e  $y = 1/\text{CAOx}$ .

A concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a autoxidação do sistema (Q<sub>1/2</sub>) foi calculada de acordo com a equação da reta.

### 3.7.4 Avaliação de atividade antiúlcera do extrato bruto liofilizado (EBL)

O ensaio de atividade antiúlcera gástrica foi realizado segundo o modelo de indução aguda por etanol a 60% e ácido clorídrico 0,3 M, descrito por Mizui e Doteuchi (1983). Neste ensaio foram empregados ratos Wistar fêmeas, com peso entre 150-180g, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP). Todos os animais, antes dos testes, foram mantidos sob temperatura ambiente, alimentação tipo purina, com livre acesso à água. As fêmeas eram nulíparas e não prenhas.

O teste foi realizado com 30 animais, sendo empregados 10 animais como controle negativo, 10 animais como controle positivo e 10 animais como grupo tratado. Os animais permaneceram em jejum 24 horas antes do ensaio, com livre acesso à água.

Ao grupo controle negativo foi administrado, por via oral, solução de polissorbato a 7,5% (Tween 80) em água destilada, no volume de 4 mL/kg de animal. Os grupos controle positivo e tratado receberam, respectivamente misoprostol e o EBL de *M. camphoratum*, dissolvidos na mesma solução administrada ao grupo controle negativo. O misoprostol foi administrado na dose de 10 µg/mL e o EBL na dose de 400 mg/kg de animal, no volume de 4 mL/kg de animal. Trinta minutos após a administração, os 3 grupos de animais receberam por via oral, o agente indutor de úlcera na dose de 1 mL/100g de solução de HCl 0,3M em etanol 60% (v/v).

Após uma hora, os animais foram sacrificados com éter etílico. Seus estômagos foram retirados, abertos ao longo da grande curvatura, lavados com água corrente e fixados em suporte de isopor recoberto com gaze para exame macroscópico das ulcerações. As ulcerações foram classificadas em três níveis: nível 1 para petéquias (ulcerações pontuais), nível 2 para ulcerações finas e nível 3 para úlceras hemorrágicas severas. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  epm. Os dados foram submetidos à análise de variância, seguido de teste de Tukey (programa Instat II).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Aspectos farmacobotânicos**

#### **4.1.1 Caracterização macroscópica da droga vegetal**

A droga vegetal, preparada com os órgãos aéreos desta planta herbácea, anual, sublenhosa, bastante ramificada, medindo entre 12 a 50 cm de altura (Fig. nº 3), é constituída por fragmentos de cerca de 3 cm de comprimento. Os caules, com 0,7 a 2,6 mm de diâmetro, apresentam-se verdes, hexagonais, delgados, estriados longitudinalmente e pilosos nas regiões jovens. Por vezes, observam-se folhas opostas na região de ramificação do caule. As folhas, com 2 a 8 cm de comprimento e 0,4 a 2 cm de largura, são simples, geralmente subsésseis, oblongas ou agudo-lanceoladas, membranáceas, pilosas, inteiras ou denteadas, verdes nas duas faces. Os capítulos, quando presentes, são axilares, sésseis ou curto-pendunculados com flores diminutas e amarelas. O involúcro campanular, de cerca de 4 mm de diâmetro, evidencia brácteas involucrais foliáceas, pilosas obovado-obtusas. As flores radiais mostram 3 a 5 lígulas. As flores do disco, em número de 6 a 10, são tubulares e glabras, com limbo afunilado, glanduloso e pentadenteado no ápice. Os aquênios, de cerca de 2 mm de comprimento, são obovóides e apresentam uma bráctea aderente ao dorso. A droga apresenta odor canforáceo e sabor amargo.

#### 4.1.2 Caracterização microscópica da droga vegetal

##### • Folha

As folhas, em secções transversais, são dorsiventrais (Fig. 4 e 5). Parte do mesofilo é constituído por 1 a 2 fileiras de células alongadas, que podem assumir formas de H, U e Y (Fig. 4 e 5). Algumas vezes, a camada de células junto à epiderme é mais alongada que a seguinte (Fig. 5).

O parênquima lacunoso, com até quatro fileiras de células, é formado por células arredondadas ou ligeiramente lobadas, delimitando espaços intercelulares de dimensões variáveis (Fig. 4 e 5).

A epiderme das faces adaxial e abaxial, vista em secção transversal, é uniestratificada, de contorno aproximadamente retangular, alongada no sentido periclinal. As células da face abaxial mostram-se proporcionalmente menores (Fig. 4 e 5).

Tricomas tectores pluricelulares, unisseriados, curvos, de dimensões variáveis, encontrados em ligeiras elevações (Fig. 4, 6, 7, 10, 14, 15, 16 e 18), e tricomas tectores pluricelulares, unisseriados, mas com célula terminal afilada e bastante alongada (Fig. 37) são observados nas duas faces. Os primeiros ocorrem em maior número e predominam na face adaxial. Tricomas glandulares, encontrados principalmente na face abaxial, apresentam a porção secretora constituída por até oito células dispostas em duas séries (Fig. 4, 7, 8, 9 e 15).

As duas faces, em visão frontal, exibem células de paredes sinuosas. A cutícula evidencia-se estriada, principalmente na face adaxial e próximo a células subsidiárias e tricomas tectores (Fig. 11, 16 e 17). Os estômatos ocorrem em maior número na face abaxial. Observam-se de 3 a 4 células anexas, predominando os estômatos anomocíticos (Fig. 10, 12 e 13).

A nervura mediana, em secção transversal, é biconvexa, mais proeminente na face abaxial (Fig. 18). As células epidérmicas são

aproximadamente arredondadas (Fig. 19 e 20). Tricomas tectores pluricelulares, unisseriados, com até 5 células, localizam-se em ligeiras elevações (Fig. 18, 19 e 21). Estes tricomas mostram-se proporcionalmente maiores que as da lâmina (Fig. 18). Tricomas tectores cônicos e glandulares podem ser observados nesta região (Fig. 21).

O colênquima angular, constituído por até três camadas de células ocorre na região das costelas (Fig. 19 e 20).

O sistema vascular encontra-se disposto em arco aberto (Fig. 18 e 22) e relacionado com dutos secretores, sendo um voltado para a face adaxial e dois para a abaxial (Fig. 22 e 23). O feixe vascular colateral apresenta na região xilemática, elementos traqueais separados por células parenquimáticas (Fig. 22). O floema é constituído por tubos crivados e células companheiras, dispostos em pequenos grupos (Fig. 22).

O parênquima fundamental é formado por células aproximadamente isodiamétricas, providas de paredes delgadas, delimitando espaços do tipo meato (Fig. 18, 20, 22 e 23).

#### • Caule

O caule, em secção transversal, apresenta contorno hexagonal (Fig. 24). A epiderme é formada por um estrato de células aproximadamente quadrangulares (Fig. 24, 27 e 29), recoberta por cutícula fina e estriada. Tricomas tectores, semelhantes aos descritos para as folhas, são encontrados em grande número (Fig. 24, 27, 29 e 30).

O colênquima angular, constituído por 3 a 4 camadas celulares, é desenvolvido nas costelas (Fig. 27 e 29).

O parênquima cortical é formado por até 3 camadas de células aproximadamente isodiamétricas, delimitando espaços do tipo meato (Fig. 25 e 27). A endoderme apresenta estrias de Caspary perceptíveis (Fig. 28 e 34). Dutos secretores encontram-se relacionados aos feixes vasculares e

distribuídos na endoderme (Fig. 25, 26, 28, 36). O epitélio unisseriado, de conteúdo denso, que reage positivamente ao Sudam III, apresenta até oito células (Fig. 25, 26 e 28).

Os feixes vasculares, distribuídos em forma de anel ao redor da medula, apresentam-se em número médio de doze (Fig. 24). Cada feixe vascular colateral, relaciona-se com dois dutos secretores (Fig. 25, 26, 28, 35, 36, 37 e 38).

Os elementos traqueais, dispostos em fileiras radiais, encontram-se separados por células parenquimáticas (Fig. 26 e 29).

O floema, pouco desenvolvido, é constituído de tubos crivados, células companheiras e parenquimáticas (Fig. 34, 35 e 36).

A região medular mostra células parenquimáticas aproximadamente isodiamétricas, de paredes delgadas, delimitando meatos (Fig. 24, 25, 26, 27 e 31).

O crescimento secundário é evidenciado pela atividade do câmbio vascular. A epiderme permanece como sistema de revestimento nos estágios de crescimento representados nas figuras 27, 30, 31, 32 e 33.

Tricomas tectores, descritos anteriormente na estrutura primária, são encontrados em grande número. Estômatos podem ser observados em elevações (Fig. 30).

As figuras 39 e 40 representam os fragmentos caulinares de maior diâmetro, com sistema de revestimento suberificado.

Dutos secretores apresentam as características e a localização descritos no caule em estrutura primária (Fig. 28, 35 e 36).

A região pericíclica é representada por calotas fibrosas relacionadas diretamente com a região floemática (Fig. 27, 31, 32, 33, 34 e 35).

O início da estrutura secundária é desencadeado pelo funcionamento do câmbio fascicular localizado entre o floema e xilema primários (Fig. 26 e 29).

O câmbio forma no sentido centrífugo o floema, constituído de tubos crivados, células companheiras e parênquima do floema (Fig. 34, 35 e 36).

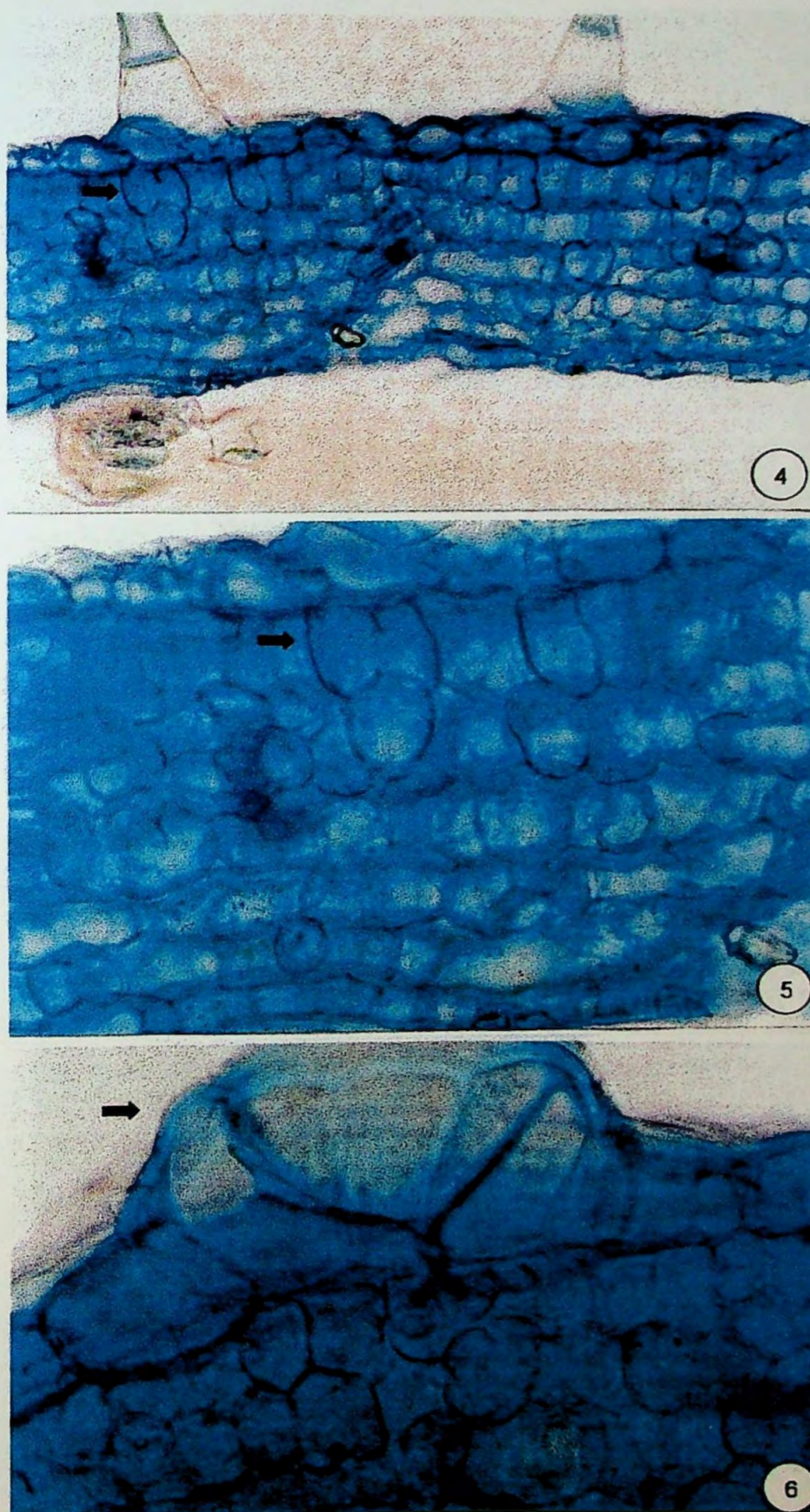
No sentido centrípeto, o câmbio forma xilema secundário, representado por vasos, isolados ou associados em pequenos grupos, fibras e parênquima do xilema. No estágio de desenvolvimento analisado observou-se predomínio de fibras (Fig. 39 e 40).

---

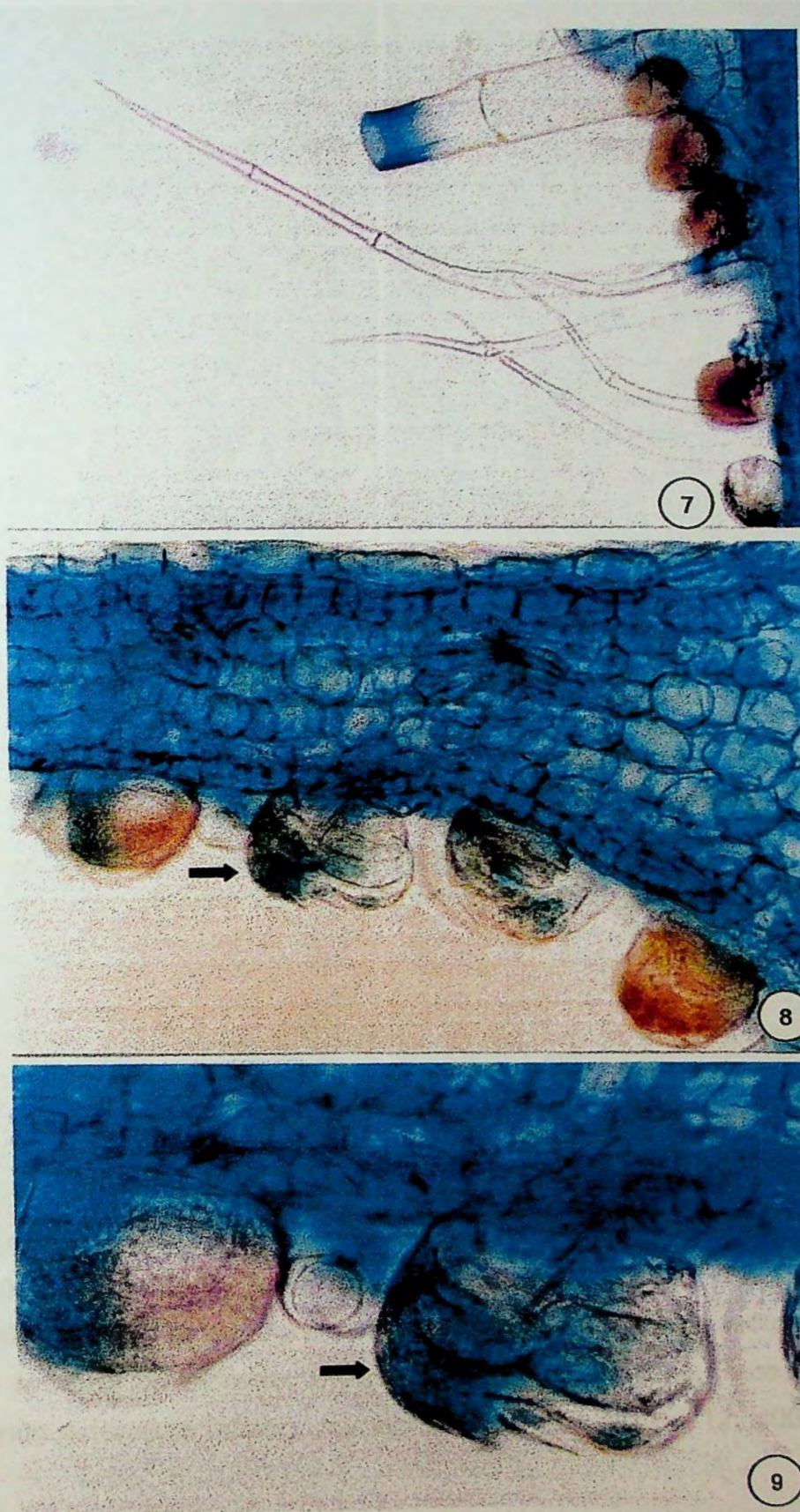




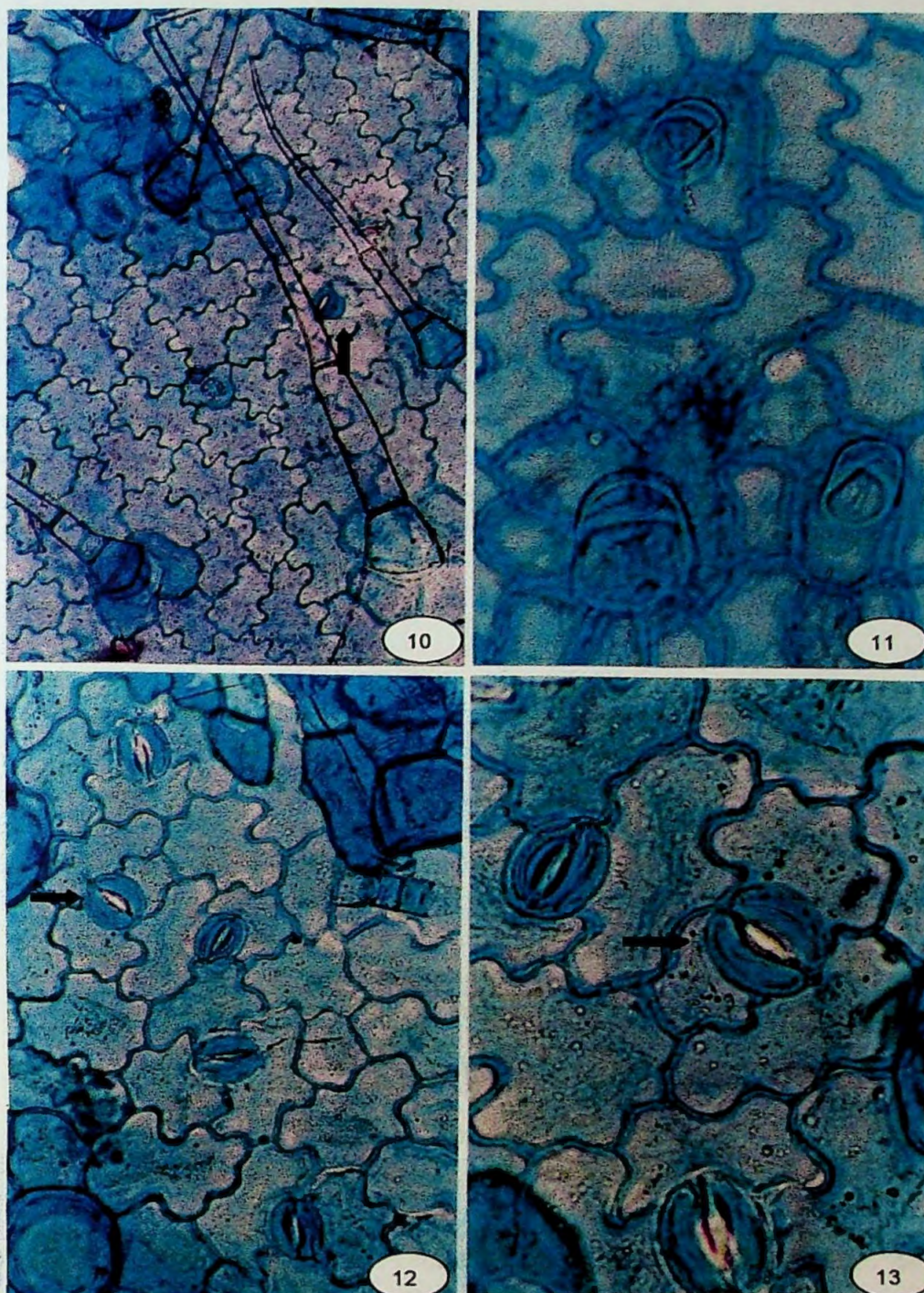
Figura 3. *M. camphoratum*. Ramo florido. Escala = 1 cm.



Figuras 4-6. *M. camphoratum*. Folha. Secções transversais. 4 e 5. Mesofilo dorsiventral, evidenciando células em forma de H na região paliçádica. 6. Destaque da região de inserção do tricoma tector. Aumento: 200x para 4, 400x para 5 e 6.



Figuras 7-9. *M. camphoratum*. Folha. Secção transversal. 7. Tricomas tectores e glandulares na face abaxial. 8 e 9. Destaque aos tricomas glandulares na face abaxial (setas). Aumentos: 100x para 7; 200x para 8 e 400x para 9.



Figuras 10-13. *M. camphoratum*. Epiderme em visão frontal. 10 e 11. Face adaxial. 10. Epiderme evidenciando estômato (setas) e tricomas tectores. 11. Destaque a bases de tricomas e cutícula estriada. 12 e 13. Face abaxial evidenciando estômatos (setas). Aumentos: 200 x para 10 e 12; 400x para 11 e 13.

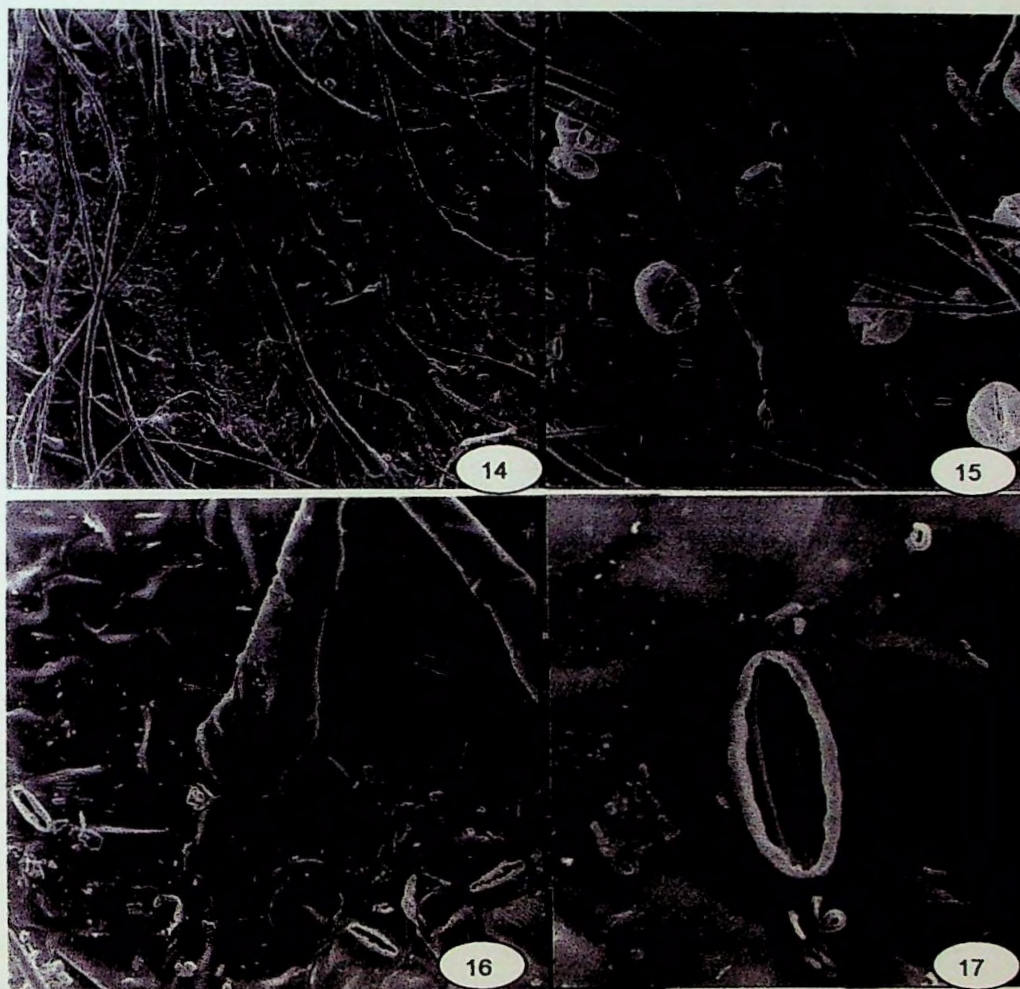
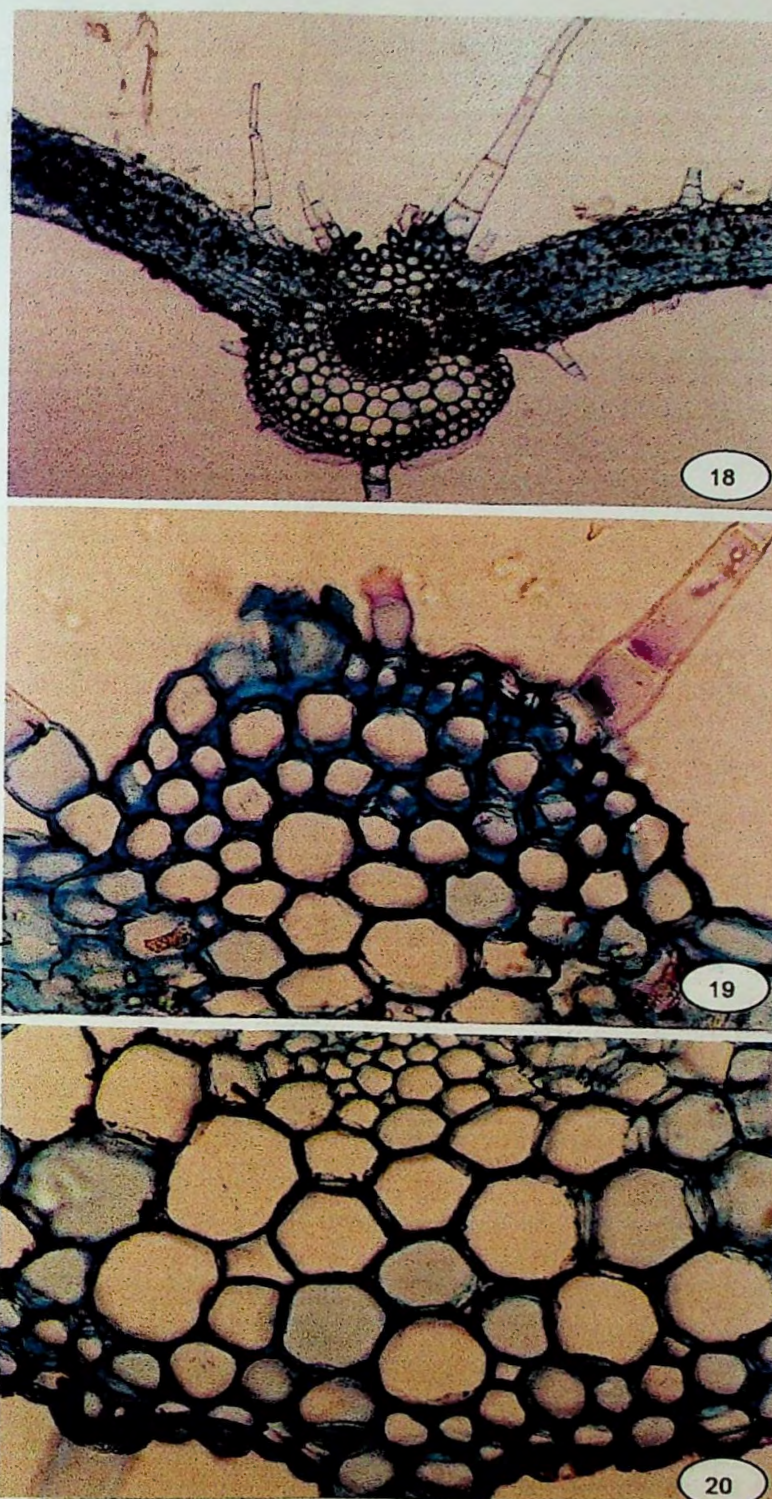
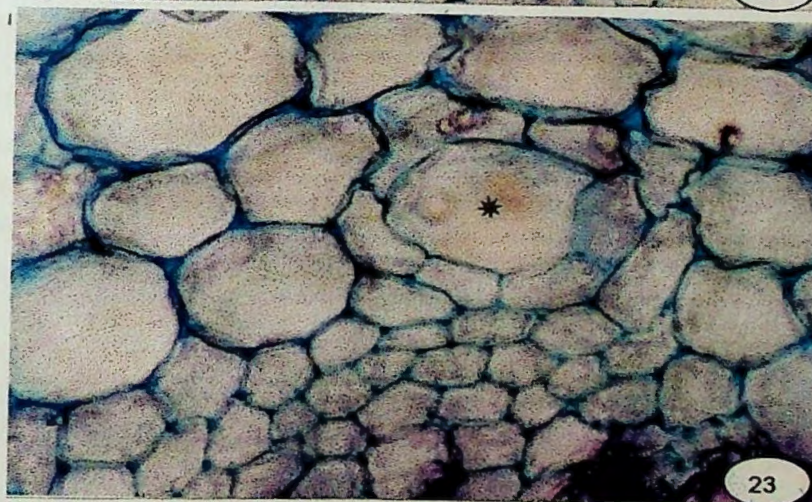


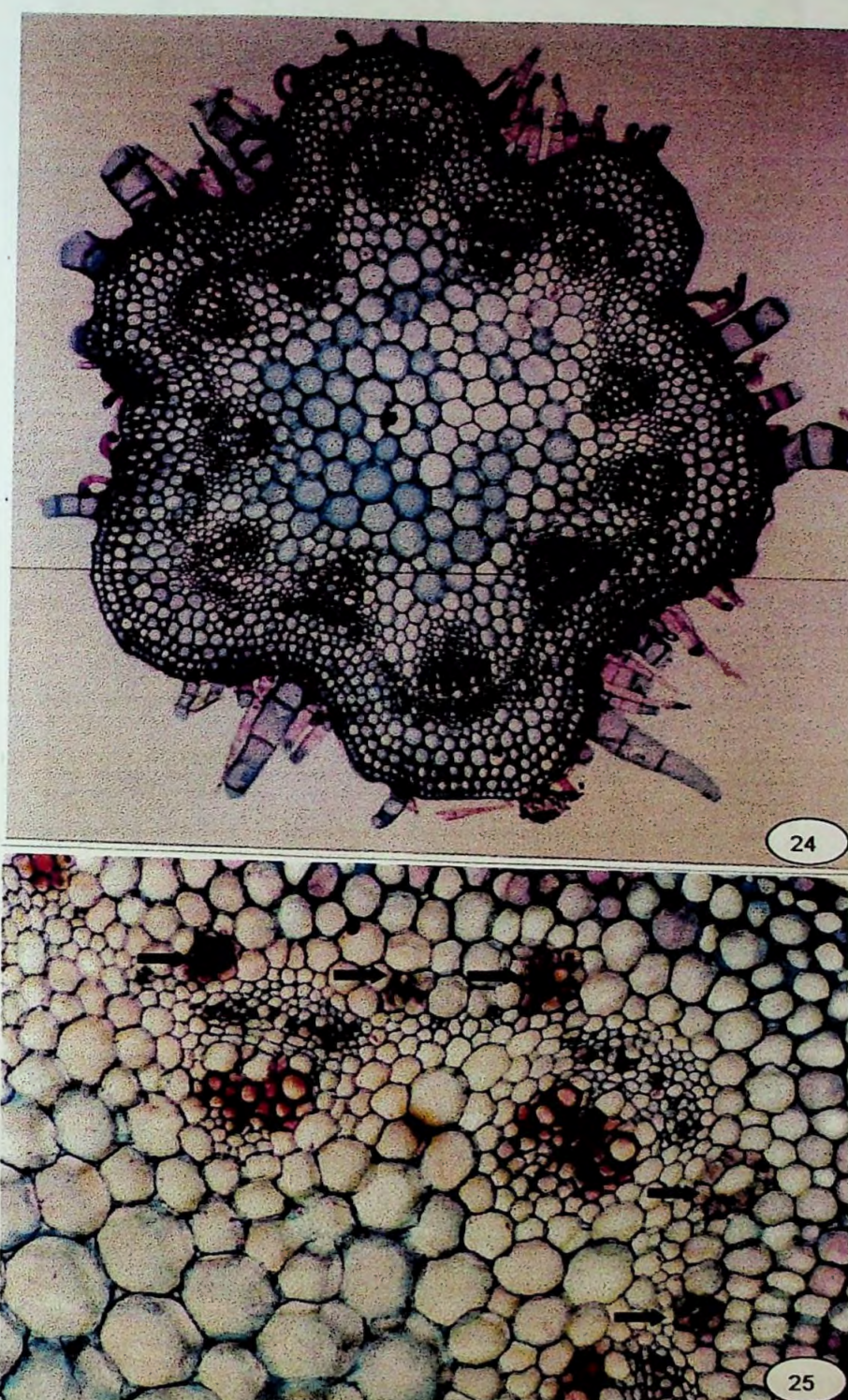
Figura 14-17. *M.camphoratum*. Folha. Imagens ao microscópio eletrônico de varredura. 14. Face adaxial evidenciando grande número de tricomas tectores. 15-17. Face abaxial. 15. Epiderme com tricomas tectores e glandulares. 16 e 17. Destaque à cutícula estriada principalmente junto aos estômatos.



Figuras 18-20. *M. camphoratum*. Nervura mediana. Secções transversais. 18. Aspecto geral destacando tricomas tectores. 19. Região da costela da face adaxial. 20. Região da costela da face abaxial. Aumentos: 40x para 18; 200x para 19 e 20.

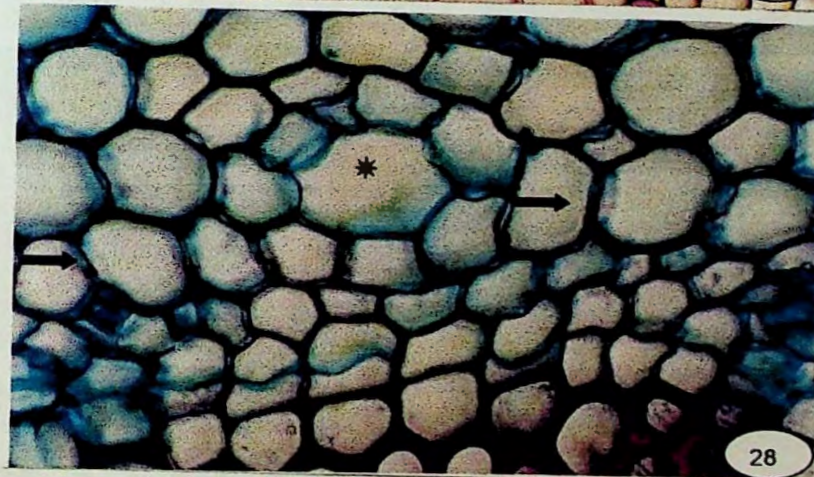
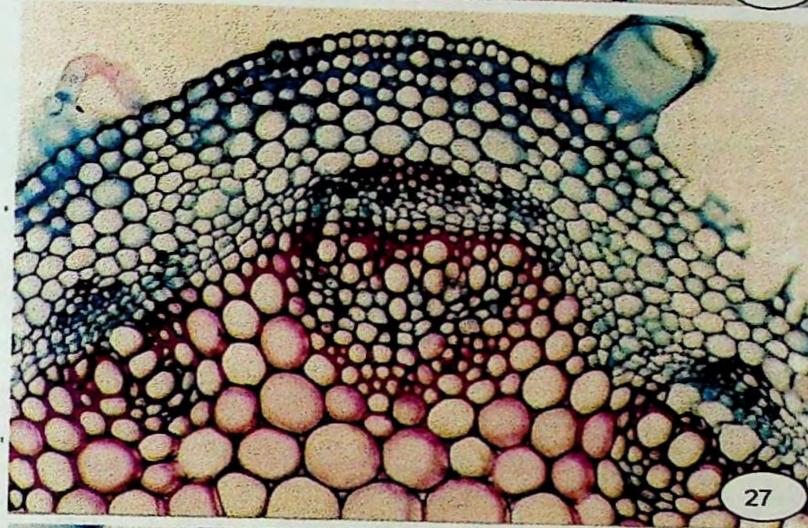
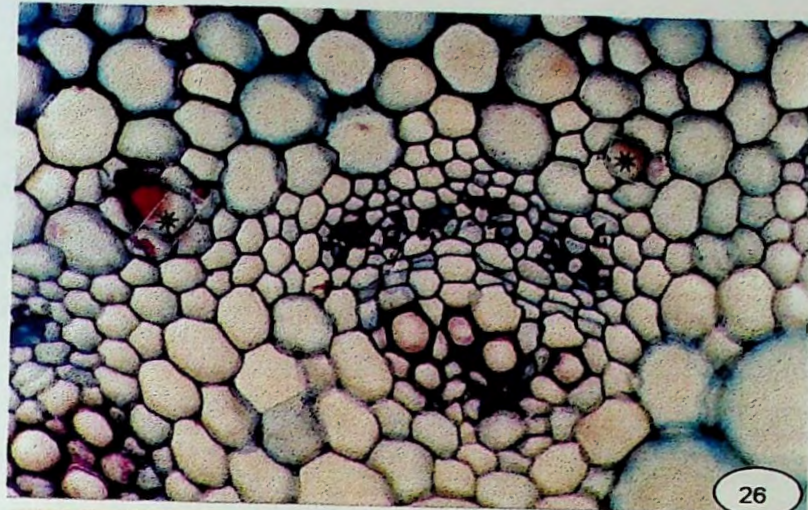


Figuras 21-23. *M.camphoratum*. Secções transversais. Nervura mediana. 21. Tricomas tectores de diversos tamanhos próximo a tricoma glandular (seta). 22. Detalhe do sistema vascular mediano acompanhado de dutos secretores (\*). 23. Destaque ao duto secretor (\*). Aumentos: 100x para 21; 200x para 22 e 400x para 23.

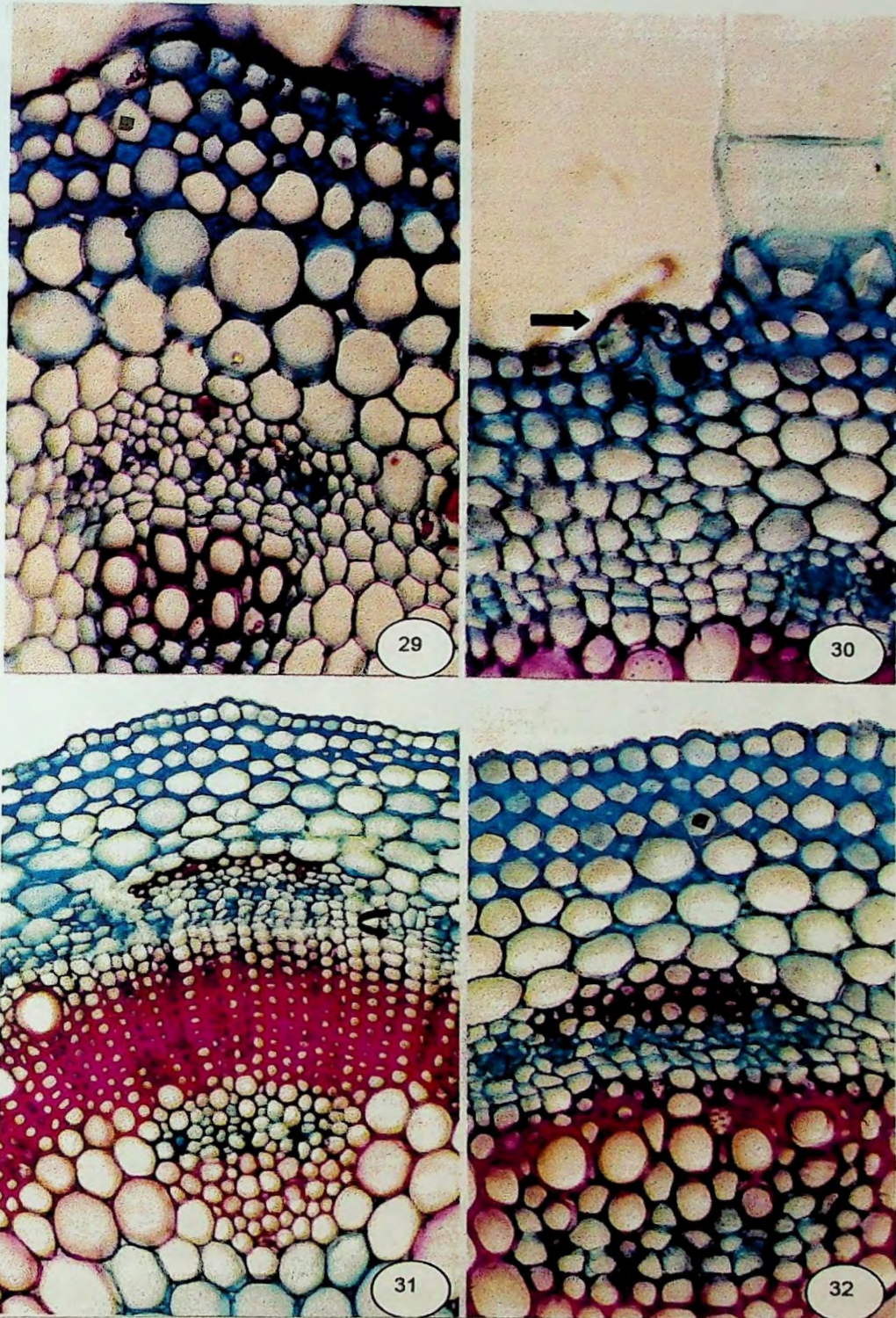


Figuras 24-25. *M. camphoratum*. Secções transversais. Caule. 24. Aspecto geral do caule. 25. Detalhe destacando os dutos secretores (setas) evidenciados com Sudam III. Aumentos: 40x para 24 e 100x para 25.

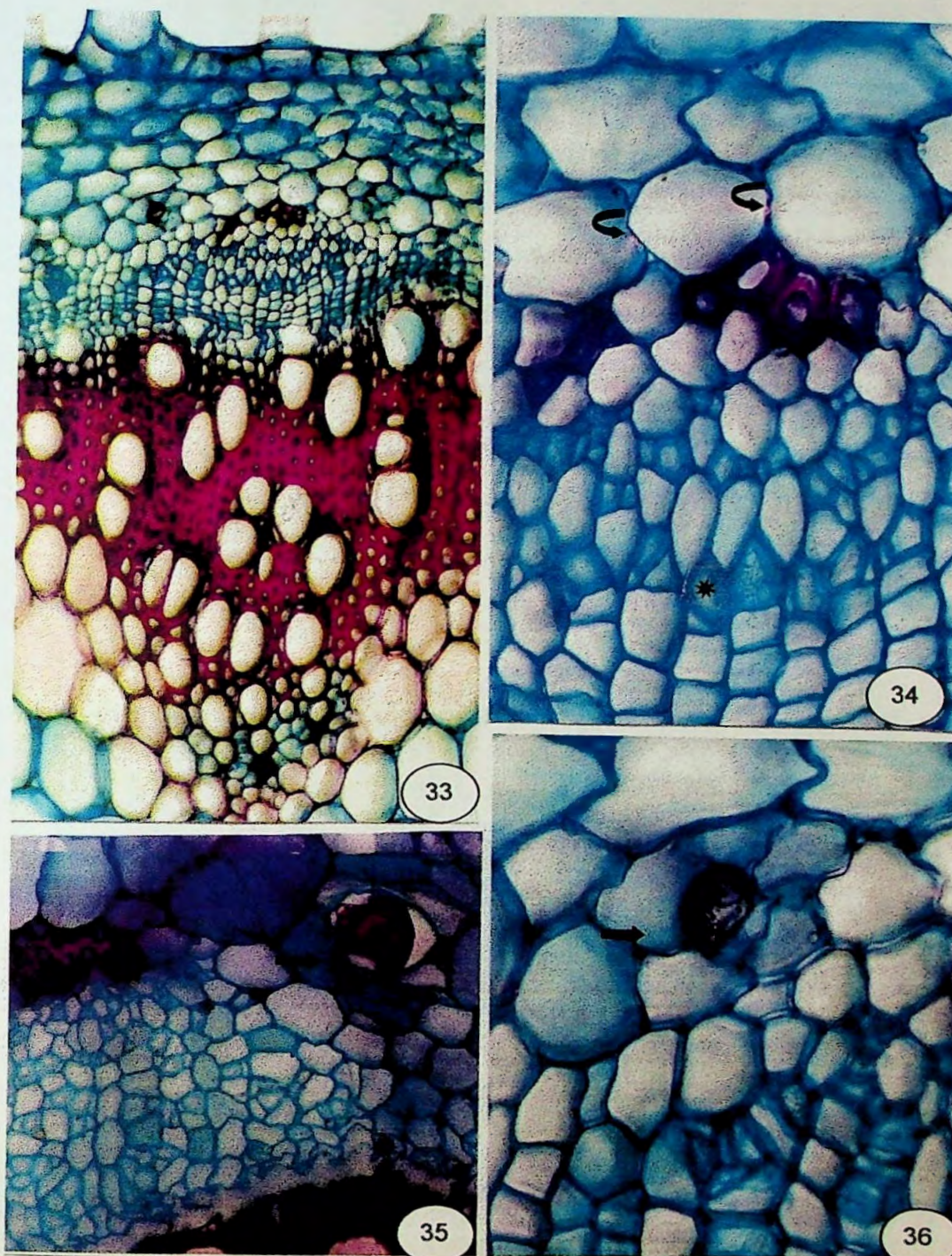




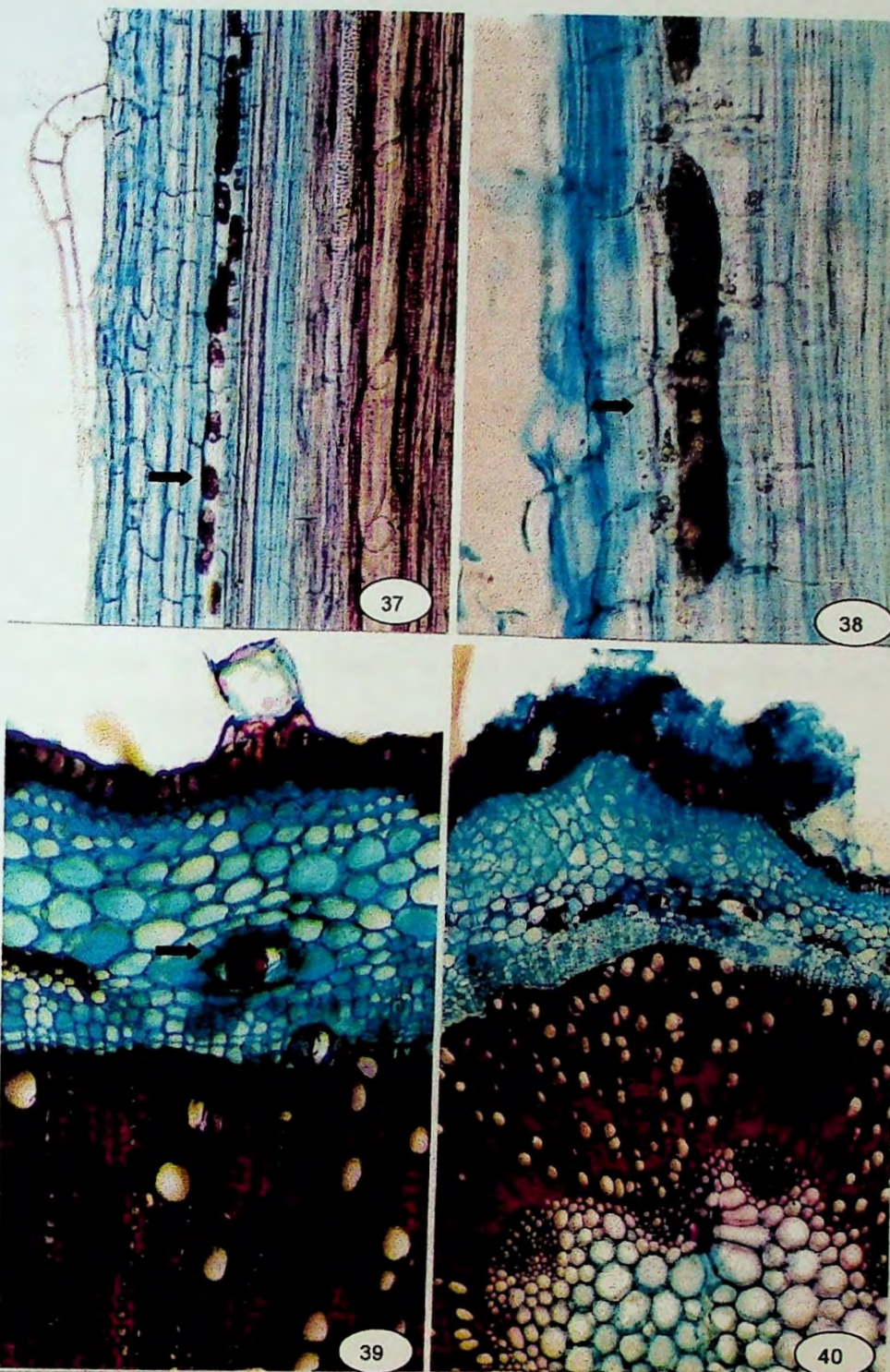
Figuras 26-28. *M. camphoratum*. Seções transversais. Caule. 26. Detalhe do feixe vascular colateral com dutos secretores (\*) na endoderme. 27. Destaque ao colênquima desenvolvido na região das costelas e formação de estrutura secundária. 28. Endoderme com estrias de Caspary (setas). Aumentos: 200x para 26; 100x para 27 e 400x para 28.



Figuras 29-32. *M.camphoratum*. Caule. Secções transversais. 29, 31, 32. Destaque ao colênquima (◆) e desenvolvimento do sistema vascular. A seta recurvada indica a região cambial. 30. Destaque do estômato em elevação (seta). Aumentos: 100x para 31; 200x para 29, 30 e 32.



Figuras 33-36. *M.camphoratum*. Caule. Secções transversais. 33. Aspecto geral. 34. Detalhe evidenciando elementos crivados (\*) e estrias de Caspary (seta curva). 35 e 36. Detalhes destacando dutos secretores (setas) com conteúdo corado com Sudam III. Aumentos: 100x para 33; 200x para 35; 400x para 34 e 36.



Figuras 37-40. *M. camphoratum*. Caule. 37 e 38. Secções longitudinais radiais. Destaque aos dutos secretores (setas). 39 e 40. Secções transversais. Notar o tecido de revestimento e dutos secretores (setas). Aumentos: 100x para 37 e 40; 200x para 39 e 400x para 38.

## 4.2 Rendimento do extrato bruto liofilizado

O extrato bruto liofilizado (EBL) apresentou-se como pó verde-acastanhado, higroscópico e com odor canforáceo. O rendimento foi de 13% (m/m).

## 4.3 Triagem das principais classes de substâncias na droga vegetal e no extrato bruto liofilizado (EBL)

As classes de substâncias encontradas nos extratos preparados a partir da droga vegetal, segundo método preconizado por Marini-Bettòlo e cols. (1981) e Wagner e Bladt (1996), e no EBL de *M. camphoratum* são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Classes de substâncias encontradas nos extratos fracionados a partir da droga vegetal, segundo Marini-Bettòlo e cols. (1981) e Wagner e Bladt (1996), e no extrato EBL de *M. camphoratum*.

Classes de Substâncias	Droga vegetal/ Extrato EBL	Droga vegetal/ Extrato EBL
	Marini-Bettòlo e cols.	Wagner e Bladt
Alcalóides	(-)	Negativo
Antraquinonas	Negativo	Negativo
Cumarinas	Negativo	Negativo
Flavonóides	Positivo	Positivo
Glicósidos	Negativo	Negativo
cardiotônicos		
Saponinas	Negativo	Negativo
Taninos	Negativo	(-)
Terpenóides	(-)	Positivo

(-) = Não realizado.

#### **4.4 Análise cromatográfica em camada delgada da droga vegetal e do extrato EBL**

Os extratos A, B e C preparados a partir da droga vegetal segundo Marini-Bettòlo e cols. (1981) e extrato D conforme Wagner e Bladt (1996), e o extrato EBL de *M. camphoratum* apresentaram os perfis cromatográficos em camada delgada ilustrados nas figuras nº 41 (tabela nº 5) e 42 (tabela nº 6).

Tabela nº 5: Análise cromatográfica em camada delgada da droga vegetal (extratos A, B, C e D) e do extrato EBL. Fase móvel: acetato de etila-metanol-água (100:13,5:10), adsorvente: sílicagel 60G, revelador: NP/PEG/366nm]. Padrões: quercetina, apigenina, rutina.

Amostras	hRf	Cor da mancha	Intensidade
Extrato A	00	Amarela	+
	75	Amarela	+++
	80	Amarela	+
Extrato B	00	Amarela	+
	05	Amarela	+
	12	Azul	+
	22	Amarela	+
	32	Amarela	+
	75	Amarela	+++
	80	Amarela	++
Extrato C	00	Amarela	++
	13	Amarela	++
	22	Amarela	++
	32	Amarela	++
Extrato D	00	Amarela	+
	12	Azul	++
	22	Amarela	+
	32	Amarela	+
	75	Amarela	++
	80	Amarela	+
EBL	00	Amarela	+
	12	Amarela	+
	22	Azul	+
	32	Amarela	++
	47	Amarela	++
	75	Amarela	+++
	83	Azul	++
<b>PADRÕES:</b>			
Quercetina	61	Amarela	+
Apigenina	75	Amarela	+++
Rutina	21	Amarela	+

hRf = Distância de migração da substância/ distância percorrida pela fase móvel (x100); EBL = Extrato bruto liofilizado de *M. camphoratum*. Intensidades: (+) = Fraca; (++) = Média; (+++) = Forte.

Tabela nº 6: Análise cromatográfica em camada delgada da droga vegetal (extratos A, B, C e D) e do extrato EBL. Fase móvel: tolueno-acetato de etila-metanol (95:5), fase estacionária: sílicagel 60G, revelador anisaldeído sulfúrico/110 °C]. Padrões: quercetina, apigenina, rutina.

Amostras	HRf	Cor da mancha	Intensidade
Extrato A	00	Roxo	++
	16	Roxo	+
	32	Roxo	+
	40	Roxo	+++
	48	Roxo	+
	61	Roxo	+
	71	Roxo	+
	85	Roxo	+++
Extrato B	00	Roxo	+
	32	Roxo	+
	40	Roxo	+
	48	Roxo	Traço
	61	Roxo	Traço
	85	Roxo	+
Extrato C	00	Roxo	+
Extrato D	00	Roxo	+
	32	Roxo	+
	40	Roxo	+++
	48	Roxo	+
	61	Roxo	+
	85	Roxo	+++
EBL	00	Roxo	++
	35	Roxo	++
	40	Roxo	+++
	54	Roxo	+
	71	Roxo	+
<b>PADRÃO</b>			
Escina	12	Roxo	++

hRf = Distância de migração da substância/ distância percorrida pela fase móvel (x100); EBL = Extrato bruto liofilizado de *M. camphoratum*. Intensidades: (+) = Fraca; (++) = Média; (+++) = Forte.



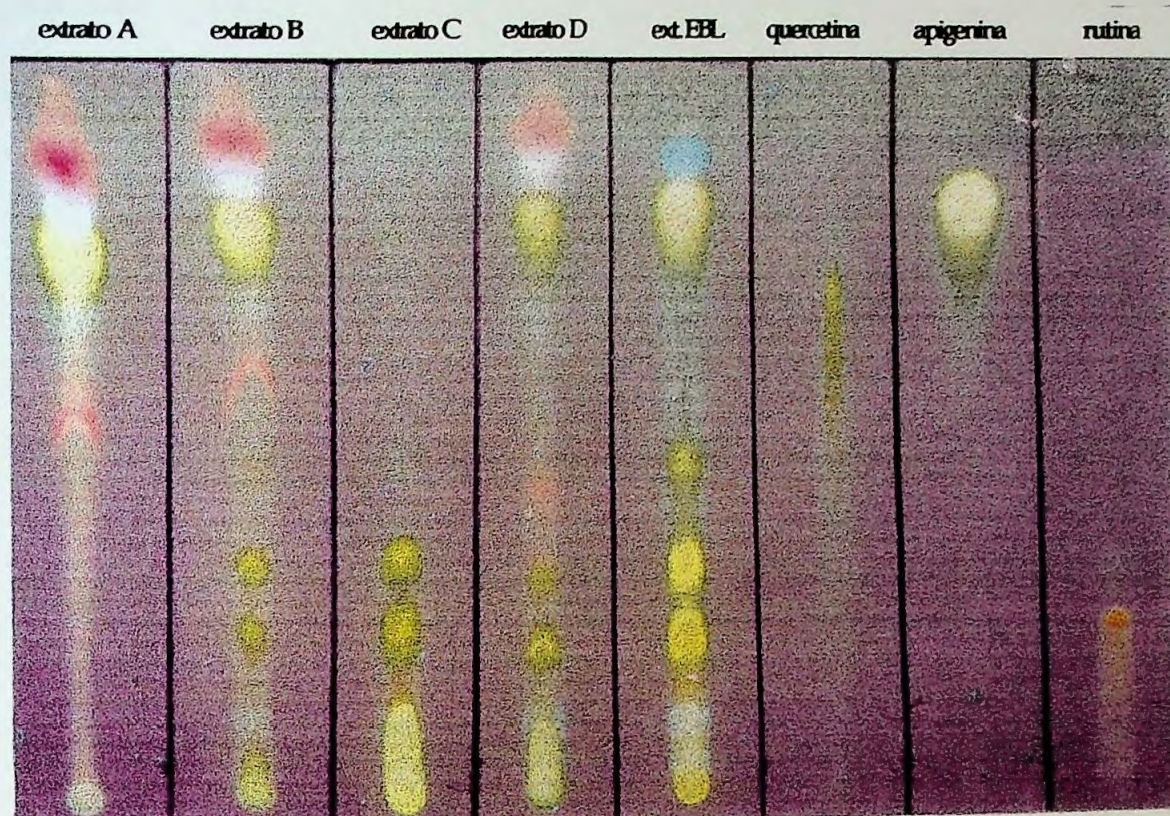


Figura 41. Cromatograma em camada delgada de *M.camphoratum* (Martini-Bettòlo e cols, 1981; Wagner e Bladt, 1996). Fase móvel: acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10), fase estacionária: sílicagel G, revelador: NP/PEG. Ext. EBL = extrato hidroetanólico, liofilizado

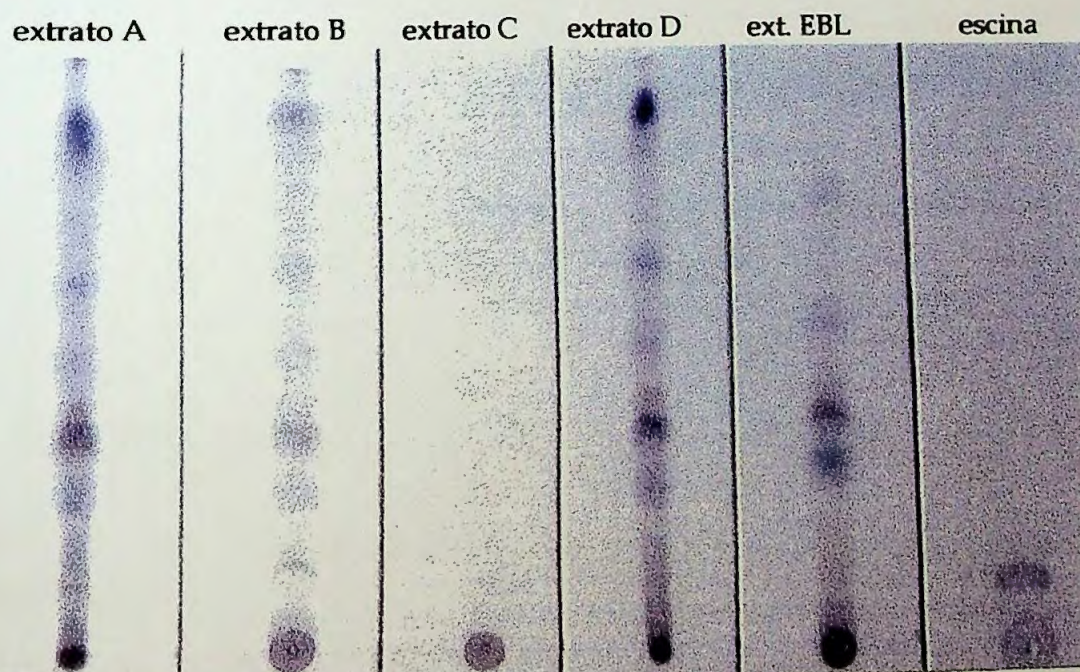


Figura 42. Cromatograma em camada delgada de *M.camphoratum* (Martini-Bettòlo e cols, 1981; Wagner e Bladt, 1996). Fase móvel: tolueno:acetato de etila (93:7), fase estacionária: sílicagel G, revelador: anisaldeído sulfúrico. Ext. EBL = extrato hidroetanólico, liofilizado.

## 4.5 Óleo volátil

### 4.5.1 Rendimento

O rendimento do óleo volátil foi de 0,28% (v/p) em relação à planta fresca. O óleo volátil, menos denso que a água, apresentou coloração amarela clara e odor canforáceo.

### 4.5.2 Identificação dos componentes químicos

No óleo volátil de *M. camphoratum*, analisado por CG/EM foram identificados 15 constituintes (99%) apresentados na figura nº 43 e tabela nº 7.

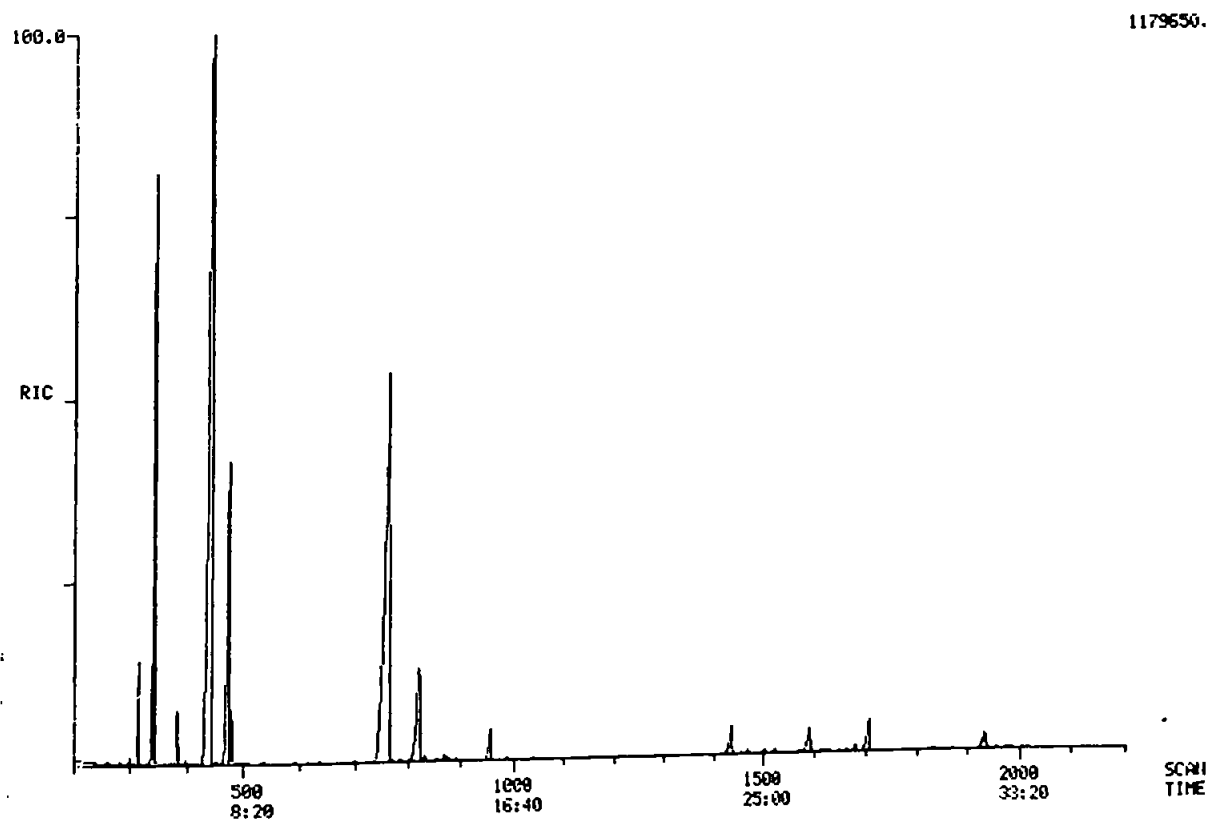


Figura nº 43. Cromatograma em fase gasosa do óleo volátil de *M. camphoratum*.

Tabela nº 7. Composição química do óleo volátil de *M. camphoratum*

<b>Componentes químicos</b>	<b>Índice de Kovats</b>	<b>Porcentagem</b>
$\alpha$ -pineno	937	1,5
canfeno	951	12,2
$\beta$ -pineno	978	1,0
$\alpha$ -felandreno	1006	35,8
p-cimeno	1025	9,5
Limoneno	1029	1,0
Cânfora	1147	26,9
Borneol	1170	5,3
$\alpha$ -terpineol	1192	0,3
timol (metil éter)	1234	1,0
(E)-cariofileno	1417	1,4
germacreno D	1478	1,2
Cadineno (delta)	1529	0,2
(E)- $\gamma$ -Bisaboleno	1535	1,5
Não identificado	—	0,9
$\alpha$ -cadinol	1654	0,2

### 4.5.3 Análise cromatográfica em camada delgada

O óleo volátil apresentou os perfis cromatográficos em camada delgada ilustrados nas figuras nº 44 A e 44 B.

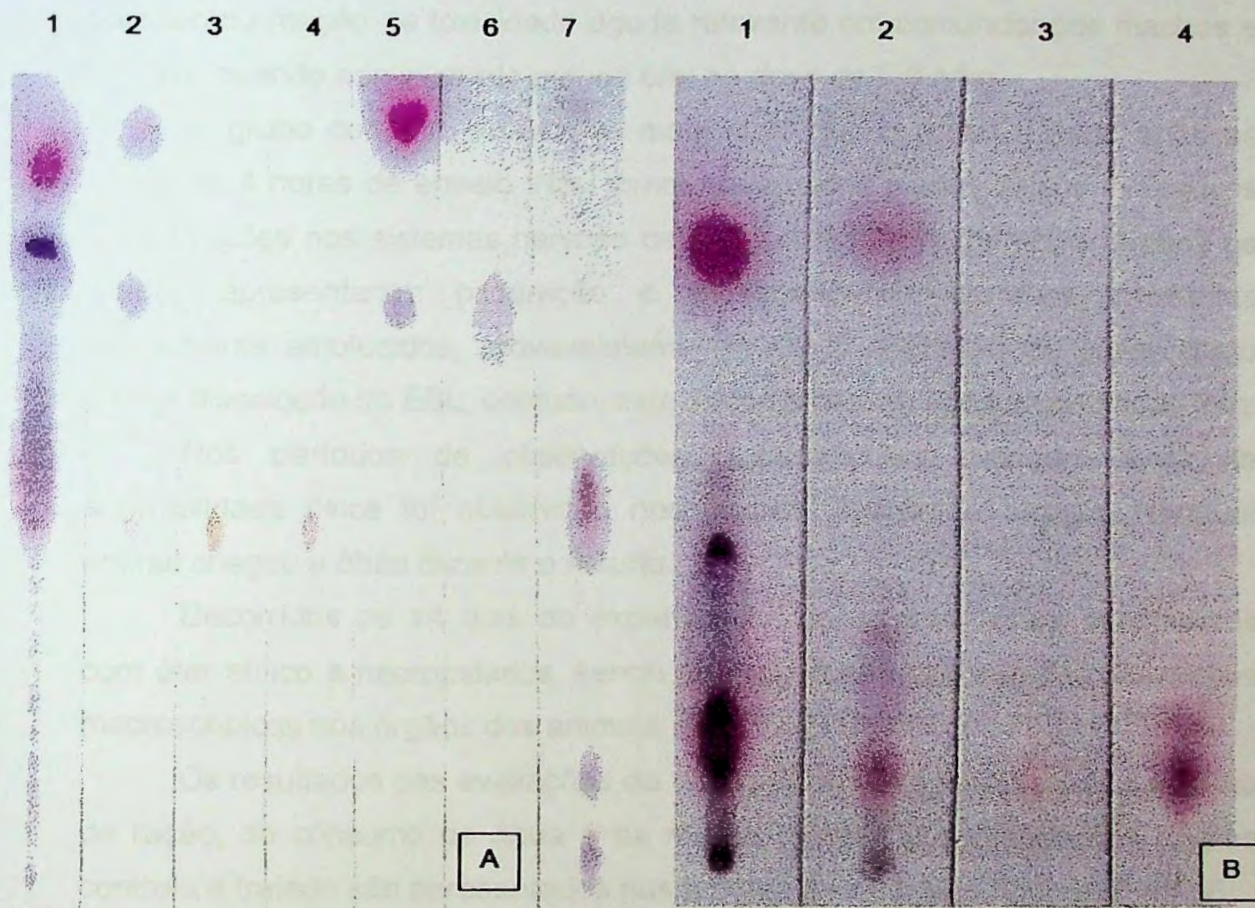


Figura 44. A e B. Cromatogramas em camada delgada do óleo essencial de *M.camphoratum*. A. Fase móvel: hexano-acetato de etila (9:1), fase estacionária: sílicagel G, revelador: anisaldeído sulfúrico. (1) óleo essencial sem diluição; (2) óleo essencial 10%; (3) cânfora; (4) borneol; (5) cariofileno; (6) timol; (7) terpineol. B. Fase móvel: tolueno:acetato de etila (95:5), fase estacionária: sílicagel G, revelador: anisaldeído sulfúrico. (1) óleo essencial sem diluição; (2) óleo essencial 10%; (3) cânfora; (4) borneol. A amostra e padrões (25%) foram diluídos com clorofórmio.

## 4.6 Ensaio biológicos

### 4.6.1 Avaliação de toxicidade aguda do extrato bruto liofilizado (EBL)

O ensaio realizado com o extrato EBL de *M. camphoratum*, não apresentou reação de toxicidade aguda relevante em camundongos machos e fêmeas, quando administrado por via oral na dose de 5,0 g/kg.

O grupo controle mostrou-se mais ativo que o grupo tratado após as primeiras 4 horas de ensaio. Não foram observados efeitos físicos indicativos de alterações nos sistemas nervoso central, urinário e respiratório. Ambos os grupos apresentaram piloereção e eliminação de resíduos intestinais ligeiramente amolecidos, provavelmente devido à utilização de polissorbato para a dissolução do EBL; contudo, este sintoma cessou após as primeiras 24h.

Nos períodos de observações subseqüentes, nenhum sinal de anormalidade física foi observado nos grupos controle e tratado. Nenhum animal chegou a óbito durante o estudo.

Decorridos os 14 dias do experimento, os animais foram sacrificados com éter etílico e necropsiados, sendo que não foram encontradas alterações macroscópicas nos órgãos dos animais.

Os resultados das avaliações da variação do peso corporal, do consumo de ração, do consumo de água e da massa relativa dos órgãos dos grupos controle e tratado são apresentados nas tabelas de nº 8-19 e figuras nº 45-56.

Tabela 8. Toxicidade aguda. Peso corpóreo médio dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. Cada valor representa a média aritmética  $\pm$  epm de 5 animais.  $p > 0,05$ .

Dias	Peso corpóreo (g)	
	Controle*	Tratado*
1	33,97 $\pm$ 2,48	33,24 $\pm$ 3,09
2	36,69 $\pm$ 2,60	36,56 $\pm$ 0,68
4	37,82 $\pm$ 3,32	37,22 $\pm$ 1,57
6	38,22 $\pm$ 3,26	39,11 $\pm$ 2,12
8	38,79 $\pm$ 3,11	39,62 $\pm$ 2,02
10	39,29 $\pm$ 3,13	40,03 $\pm$ 1,80
12	40,12 $\pm$ 2,87	40,69 $\pm$ 2,03
14	40,03 $\pm$ 3,02	40,29 $\pm$ 1,89

Controle\*: solução de polissorbato a 15%; Tratado\*: EBL de *M. camphoratum* (5 g/kg).

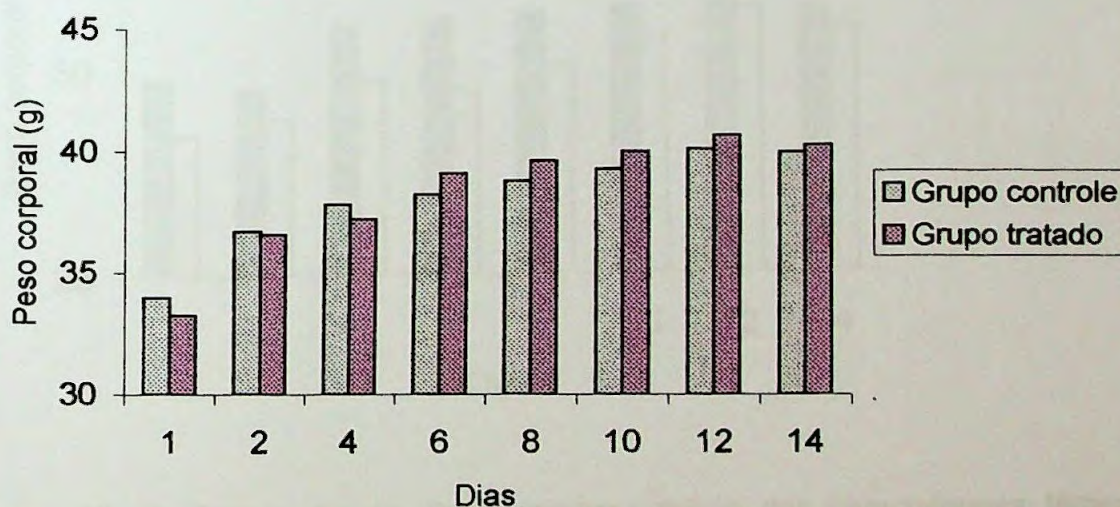


Figura 45 Toxicidade aguda. Peso corpóreo médio dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. Cada ponto representa a média aritmética de 5 animais.

Tabela 9. Toxicidade aguda. Peso corpóreo médio dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de

peso de animal. Cada valor representa a média aritmética  $\pm$  epm de 5 animais.  $p > 0,05$ .

Dias	Peso corpóreo (g)	
	Controle*	Tratado*
1	29,79 $\pm$ 0,54	28,38 $\pm$ 1,46
2	29,51 $\pm$ 0,79	28,79 $\pm$ 2,14
4	30,99 $\pm$ 0,49	29,73 $\pm$ 1,61
6	31,22 $\pm$ 0,79	29,43 $\pm$ 2,85
8	31,34 $\pm$ 1,12	30,07 $\pm$ 2,62
10	31,47 $\pm$ 1,08	30,75 $\pm$ 2,16
12	32,01 $\pm$ 1,18	31,44 $\pm$ 2,27
14	31,38 $\pm$ 0,93	31,01 $\pm$ 1,83

Controle\*: solução de polissorbato a 15%; Tratado\*: EBL de *M. camphoratum*.

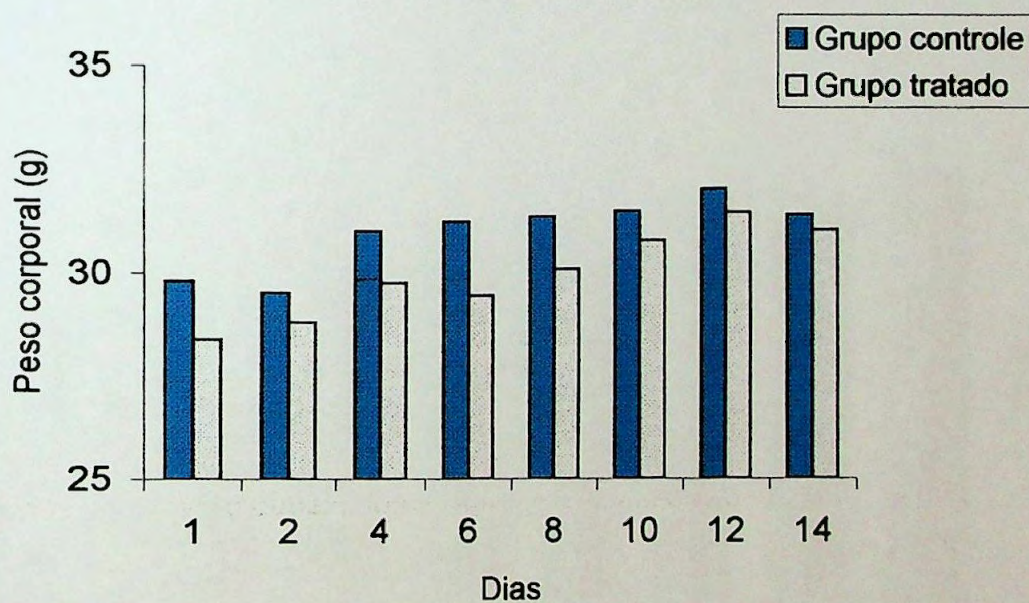


Figura 46. Toxicidade aguda. Peso corpóreo médio dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. Cada ponto representa a média aritmética de 5 animais.

Tabela 10. Toxicidade aguda. Consumo de ração pelos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.

Dias	Consumo de ração (g)	
	Controle	Tratado
2	48,03	41,70
4	83,33	72,14
6	82,13	70,18
8	83,56	71,09
10	87,37	86,89
12	88,95	84,85
14	99,40	92,97

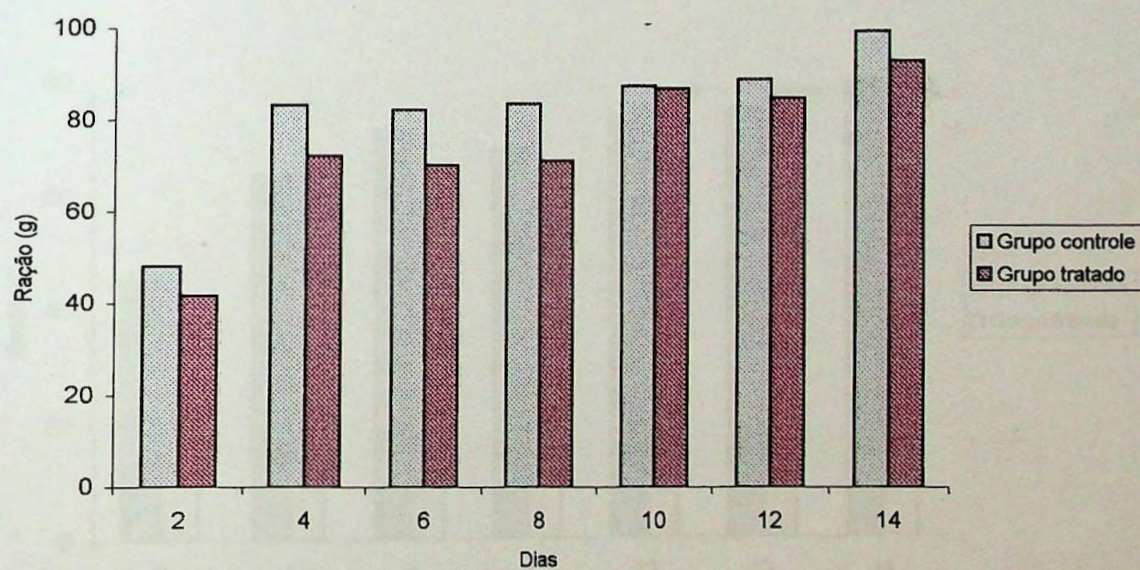


Figura 47. Toxicidade aguda. Consumo de ração pelos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.



Tabela 11. Toxicidade aguda. Consumo de ração pelos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.

Dias	Consumo de ração (g)	
	Controle	Tratado
2	45,73	37,56
4	63,72	46,98
6	71,50	58,94
8	67,99	57,56
10	73,75	65,67
12	74,55	66,88
14	79,56	66,60

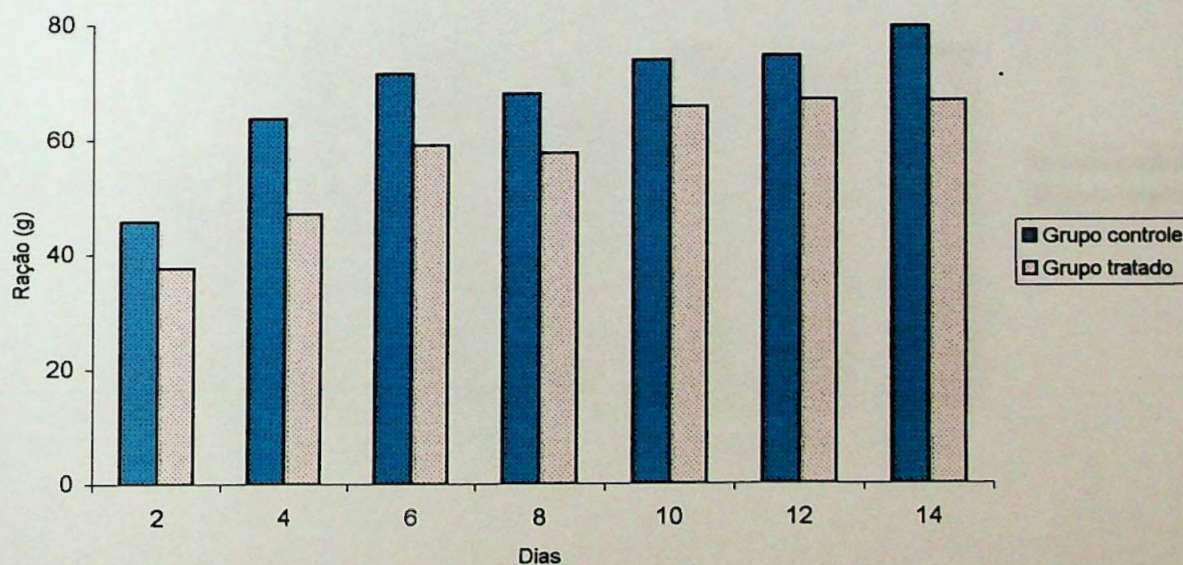


Figura 48. Toxicidade aguda. Consumo de ração pelos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.

Tabela 12. Toxicidade aguda. Consumo de água pelos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.

Dias	Consumo de água (mL)	
	Controle	Tratado
2	65	60
4	100	100
6	100	95
8	90	80
10	90	95
12	80	90
14	80	95

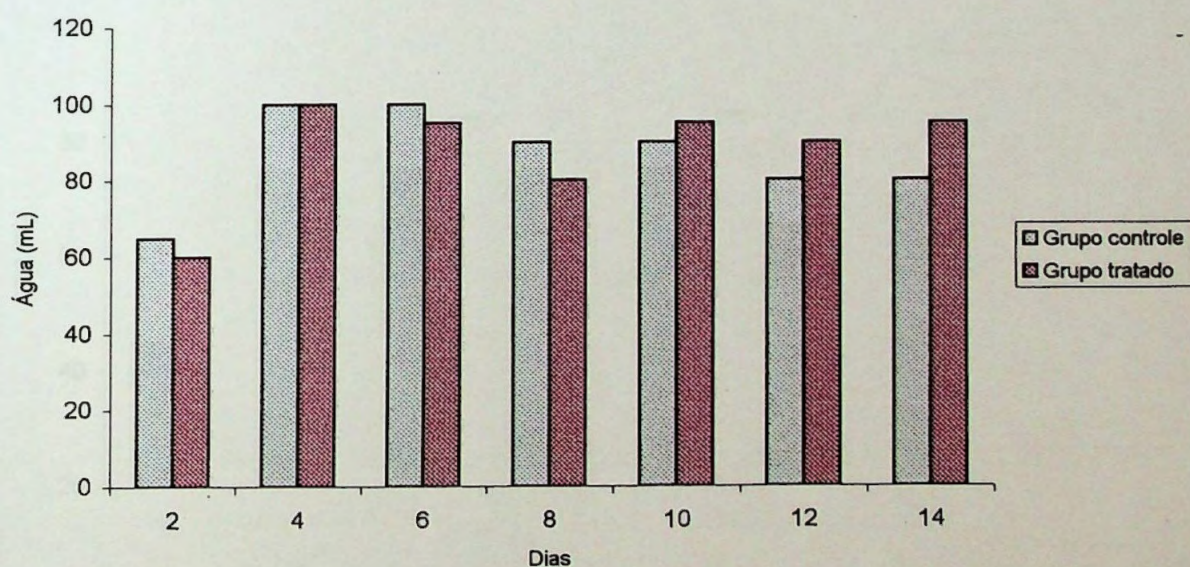


Figura 49. Toxicidade aguda. Consumo de água pelos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.

Figura 49. Toxicidade aguda. Consumo de água pelos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.

Tabela 13. Toxicidade aguda. Consumo de água pelos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.

Dias	Consumo de água (mL)	
	Controle	Tratado
2	45	40
4	75	85
6	75	65
8	75	55
10	75	65
12	65	65
14	70	75

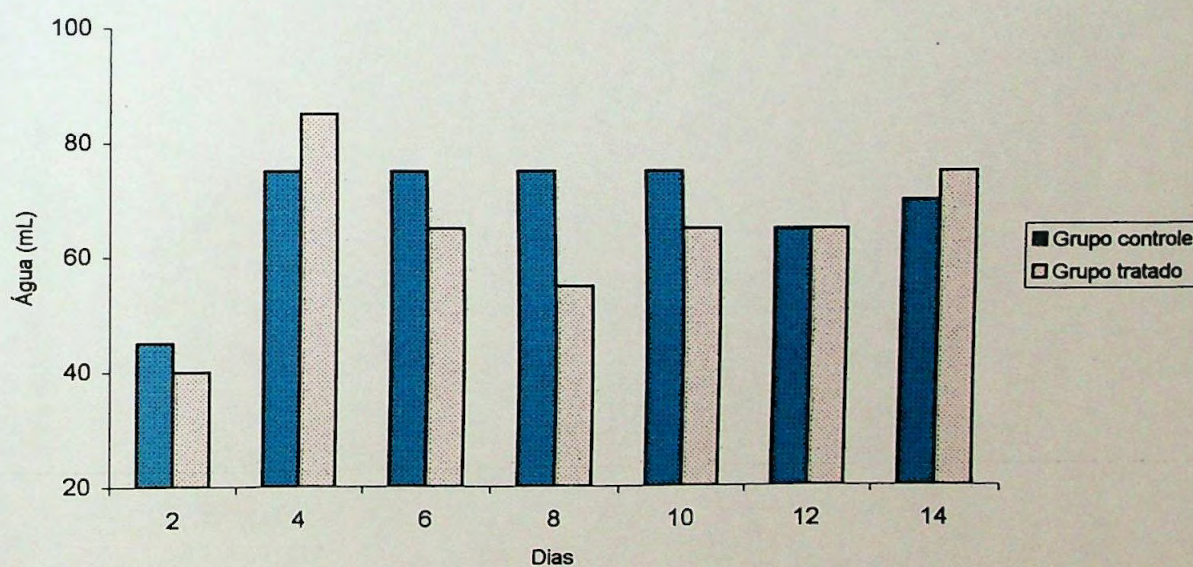


Figura 50. Toxicidade aguda. Consumo de água pelos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.

Tabela 14. Toxicidade aguda. Peso relativo de coração e pulmões dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .

Animal	Peso relativo de coração e pulmões $\times 10^{-2}$	
	Controle*	Tratado*
1	1,091	1,158
2	1,069	1,104
3	1,139	1,152
4	1,133	1,260
5	1,117	1,191

Controle\*: solução de polissorbato a 15%;  
 Tratado\*: EBL de *M. camphoratum*.

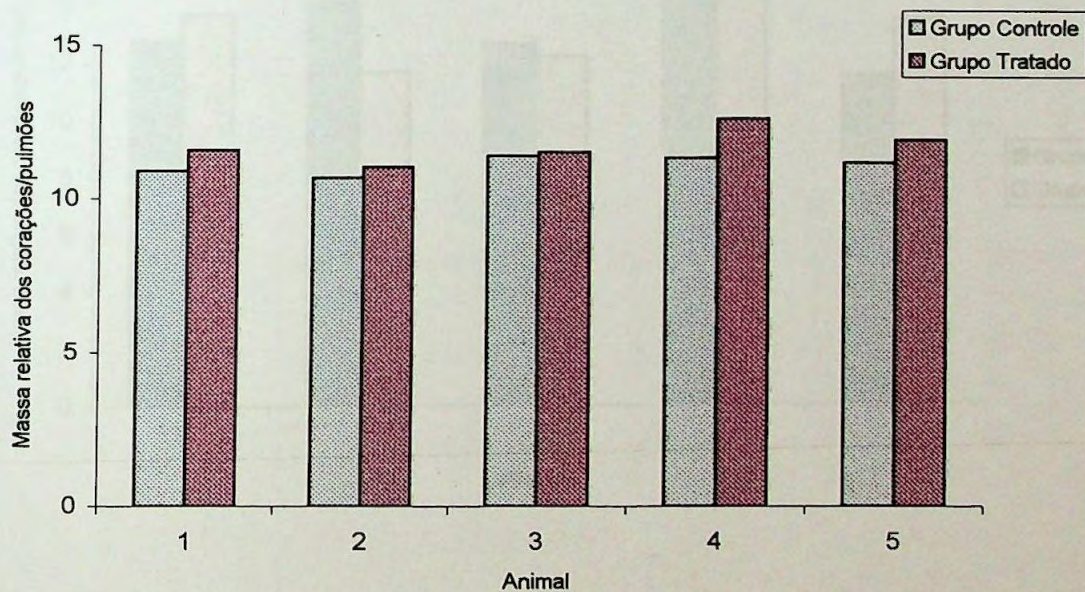


Figura 51. Toxicidade aguda. Peso relativo de coração e pulmões dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .

Tabela 15. Toxicidade aguda. Peso relativo de coração e pulmões dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .

Animal	Peso relativo de coração e pulmões $\times 10^{-2}$	
	Controle*	Tratado*
1	1,273	1,366
2	1,414	1,164
3	1,261	1,216
4	1,502	1,438
5	1,148	1,341

Controle\*: solução de polissorbato a 15%;  
Tratado\*: EBL de *M. camphoratum*.

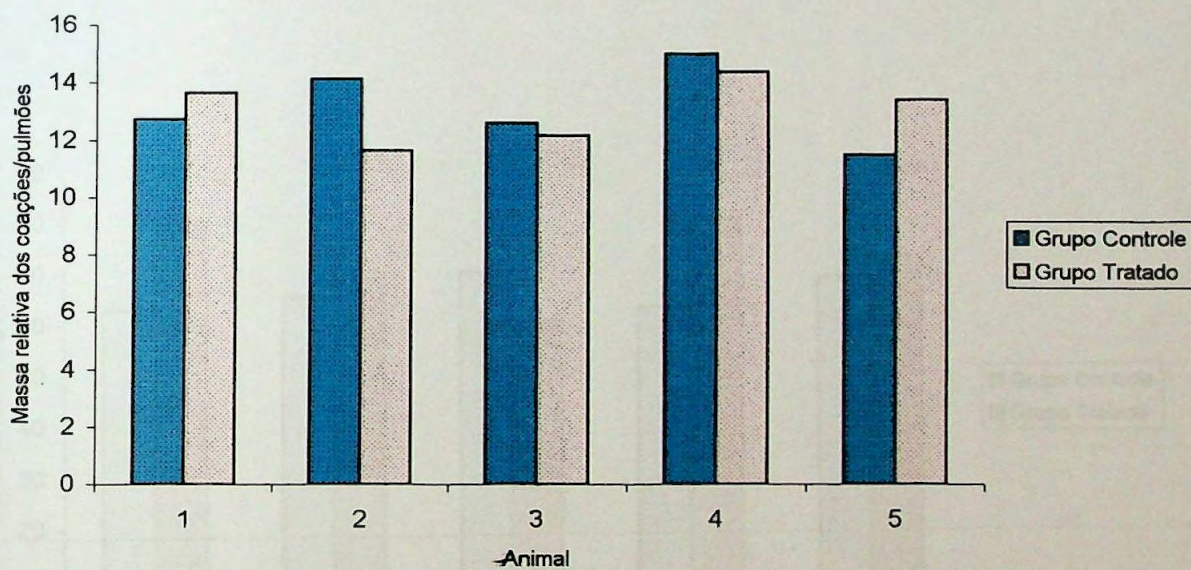


Figura 52. Toxicidade aguda. Peso relativo de coração e pulmões dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .

Tabela 16. Toxicidade aguda. Peso relativo de fígados dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .

Animal	Peso relativo de fígados $\times 10^{-2}$	
	Controle*	Tratado*
1	6,298	8,054
2	6,573	7,044
3	7,013	6,081
4	6,305	8,036
5	6,881	7,297

Controle\*: solução de polissorbato a 15%;  
Tratado\*: EBL de *M. camphoratum*.

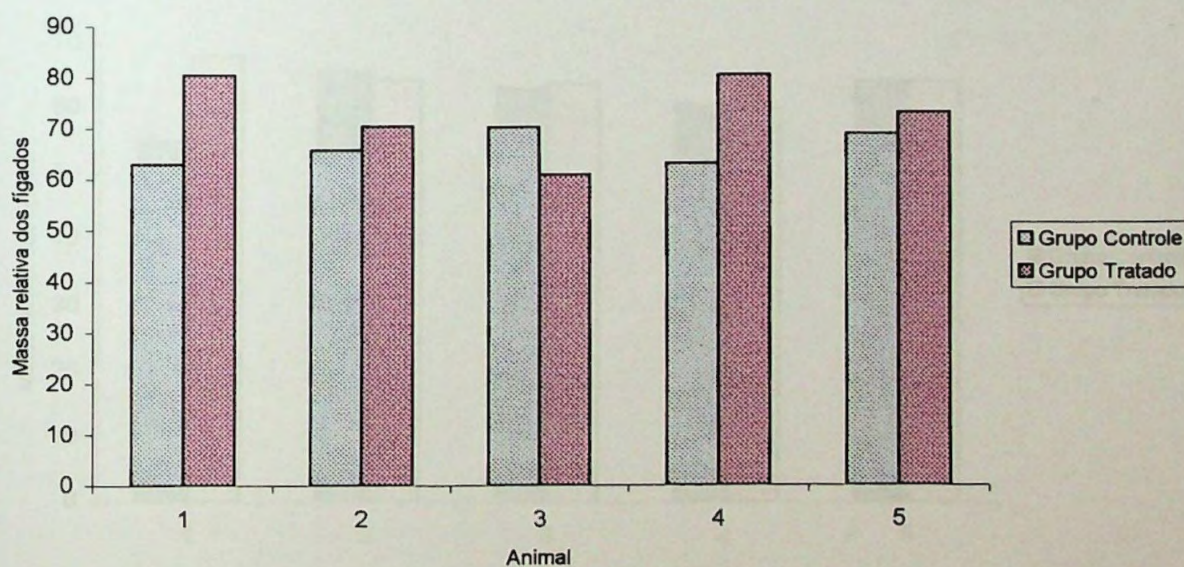


Figura 53. Toxicidade aguda. Peso relativo de fígados dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .

Tabela 17. Toxicidade aguda. Peso relativo de fígados dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .

Animal	Peso relativo de fígados x 10 <sup>-2</sup>	
	Controle*	Tratado*
1	5,496	6,799
2	6,568	6,432
3	6,303	6,383
4	6,072	5,998
5	6,421	6,423

Controle\*: solução de polissorbato a 15%;  
 Tratado\*: EBL de *M. camphoratum*.

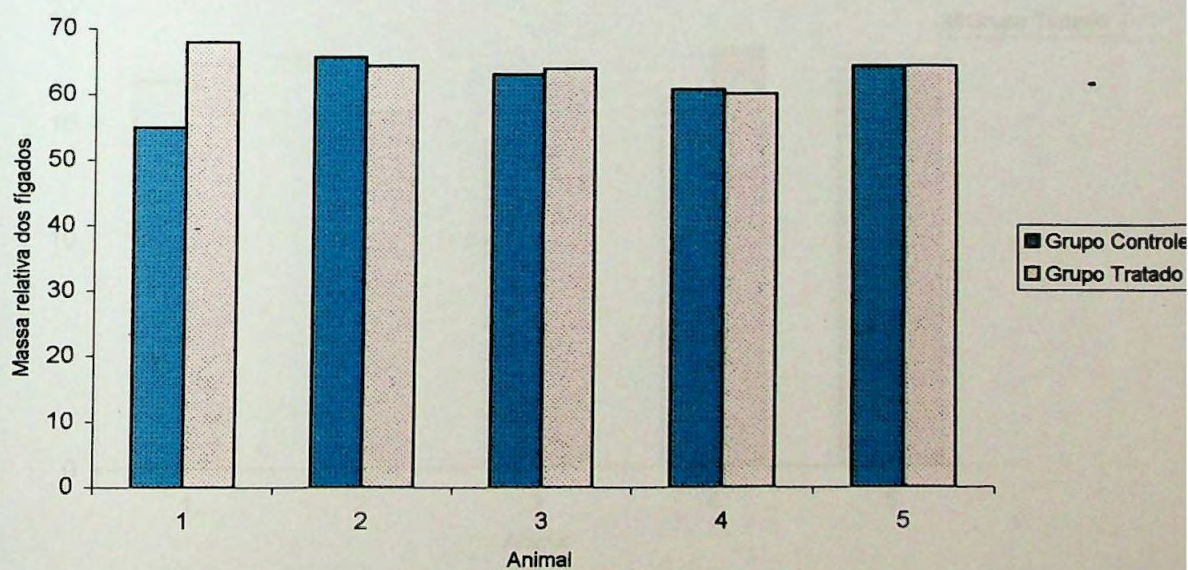


Figura 54. Toxicidade aguda. Peso relativo de fígados dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .

Tabela 18. Toxicidade aguda. Peso relativo de rins dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .

Animal	Peso relativo de rins $\times 10^{-2}$	
	Controle*	Tratado*
1	1,69	1,762
2	1,569	1,549
3	1,423	1,667
4	1,606	1,812
5	1,714	1,688

Controle\*: solução de polissorbato a 15%;  
Tratado\*: EBL de *M. camphoratum*.

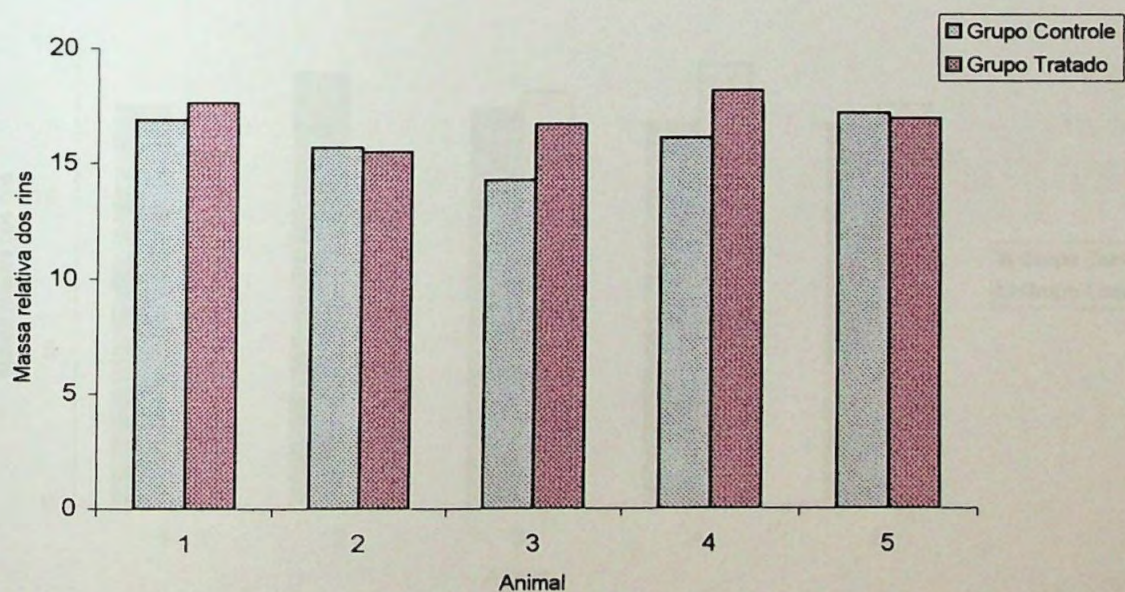


Figura 55. Toxicidade aguda. Peso relativo de rins dos camundongos machos controle e tratados por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .



Tabela 19. Toxicidade aguda. Peso relativo de rins dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .

Animal	Peso relativo de rins $\times 10^{-2}$	
	Controle*	Tratado*
1	1,307	1,149
2	1,414	1,133
3	1,292	1,351
4	1,246	1,438
5	1,241	1,309

Controle\*: solução de polissorbato a 15%;  
 Tratado\*: EBL de *M. camphoratum*.

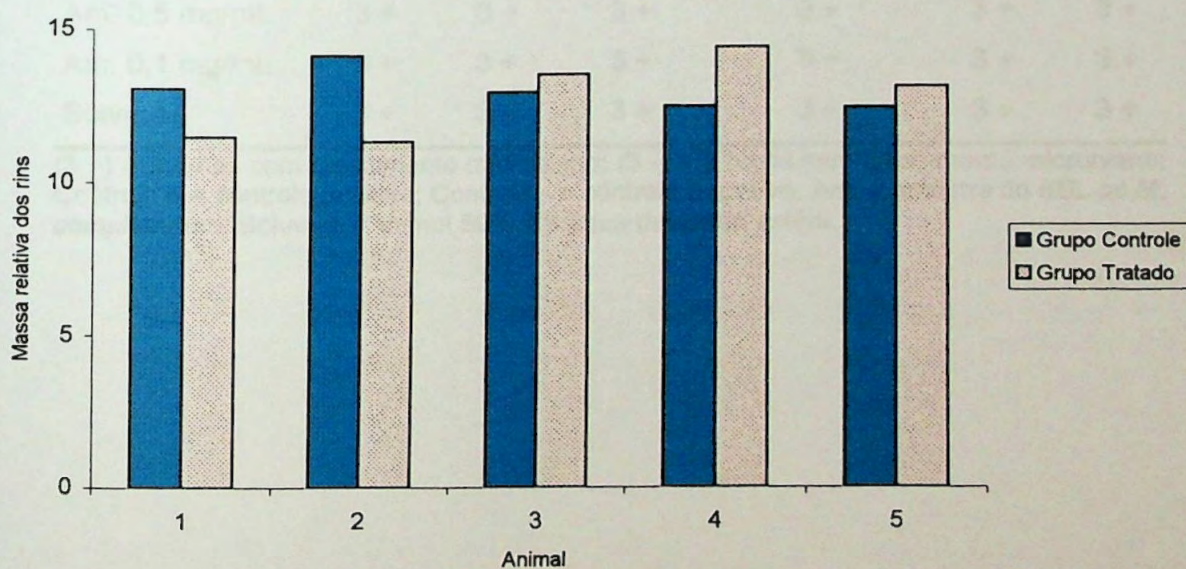


Figura 56. Toxicidade aguda. Peso relativo de rins dos camundongos fêmeas controle e tratadas por via oral com o extrato EBL de *M.camphoratum*, na dose de 5g/kg de peso de animal. N = 5.  $p > 0,05$ .

#### 4.6.2 Avaliação de atividade antimicrobiana do extrato bruto liofilizado (EBL) e do óleo volátil

- **Atividade antimicrobiana do extrato bruto liofilizado (EBL)**

A atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato EBL encontra-se na Tabela 20.

Tabela 20. Atividade antimicrobiana do extrato bruto liofilizado (EBL) de *M. camphoratum*.

	S. aureus	E. coli	P. aeruginosa	S. choleraesuis	C. albicans	A. niger
Controle +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +
Controle -	3 -	3 -	3 -	3 -	3 -	3 -
Am. 1mg/mL	3 -	3 +	3 -	3 +	3 +	3 -
Am. 0,5 mg/mL	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +
Am. 0,1 mg/mL	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +
Solvente	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +	3 +

(3 +) = 3 tubos com crescimento microbiano; (3 -) = 3 tubos sem crescimento microbiano; Controle + = controle positivo; Controle - = controle negativo; Am. = amostra do EBL de *M. camphoratum*; Solvente = etanol 50% em água destilada estéril.

- **Atividade antimicrobiana do óleo volátil pela técnica da autobiografia**

A atividade antimicrobiana apresentada pelo óleo volátil empregando-se a técnica da autobiografia encontra-se nas Figuras 57 e 58.



Figura nº 57. Autobiografia do óleo volátil de *M. camphoratum* em relação a *S. aureus*.



Figura nº 58. Autobiografia do óleo volátil de *M. camphoratum* em relação a *A. niger*.

• **Atividade antimicrobiana do óleo volátil pelo método de difusão em ágar**

A atividade antimicrobiana apresentada pelo óleo volátil empregando-se o método de difusão em ágar encontra-se na Tabela 21.

Tabela 21. Atividade antimicrobiana do óleo volátil de *M. camphoratum* em relação a bactérias e fungos pelo método de difusão em ágar.

Microrganismos	Halos de inibição (mm)	
	Óleo volátil	Eugenol (referência)
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	19
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)	(-)
<i>Candida albicans</i>	10	19
<i>Aspergillus niger</i>	8	26

(-) = crescimento microbiano. Os valores correspondem à média aritmética de 3 determinações.

#### 4.6.3 Avaliação da atividade antioxidante do extrato bruto liofilizado (EBL)

A capacidade antioxidante do extrato EBL é apresentada na Tabela 22. Os valores representam a média de 3 determinações.

Tabela 22. Capacidade antioxidante (CAOx%) do extrato EBL de *M. camphoratum* na lipoperoxidação espontânea de homogenato de cérebro de ratos.

Amostra (mg/mL)	CAOx (%) $\pm$ epm	1/Amostra	1/CAOx
1,0	97,24 $\pm$ 1,39	1	0,0103
0,5	75,65 $\pm$ 0,75	2	0,0132
0,25	56,21 $\pm$ 2,02	4	0,0178
0,125	32,70 $\pm$ 1,90	8	0,0306
0,0625	9,72 $\pm$ 0,26	16	0,1028

Amostra = Concentração do EBL de *M. camphoratum*;  
CAOx = capacidade antioxidante.

A partir destes resultados foi elaborado o gráfico do inverso da concentração versus o inverso de CAOx representado na Figura 59.

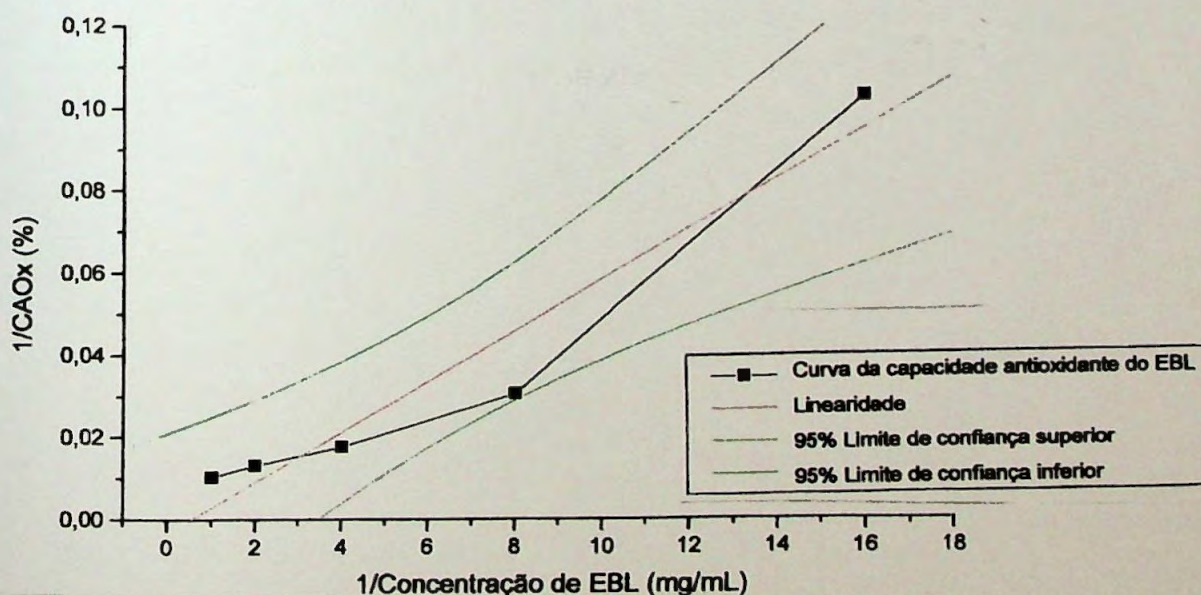


Figura 59. Atividade antioxidante do EBL de *M. camphoratum*

A partir do gráfico da Figura 59, foi determinada a equação da reta que possibilitou o cálculo do  $Q_{1/2}$  (concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a autooxidação do sistema), sendo levado em consideração a diluição do meio de reação (50  $\mu$ L da amostra em 3 mL de homogenato de cérebro).

Equação da reta:  $y = a + bx$ ,

onde  $y = 1/CAO_x$  (%)

$x = 1/\text{amostra}$  (mg/mL)

$$y = -0,00316 + 0,00614x$$

$$x = 3,7719$$

$$1/x = 0,2651 \text{ mg/mL}$$

$$Q_{1/2} = 4,42 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

#### 4.6.4 Avaliação da atividade antiúlcera do extrato bruto liofilizado (EBL)

Os resultados do ensaio da atividade antiúlcera gástrica - modelo agudo, obtidos após a administração, por via oral, de extrato EBL de *M. camphoratum* (400 mg/kg), controle positivo (1 µg/kg) e controle negativo (4 mL/kg), estão expressos na Tabela 23 e Figuras 60 a 61. O extrato EBL apresentou resultado significativo nos níveis de ulceração II e III.

Tabela 23. Média do número de ulcerações induzidas por solução de ácido clorídrico 0,3M em etanol 60%, nos animais tratados por via oral com o extrato EBL de *M. camphoratum* (400 mg/kg), controle positivo (1 µg/kg) e controle negativo (4 mL/kg).

Nível de Ulceração	Controle negativo ± epm	Controle Positivo ± epm	Tratado ± epm
I	4,9 ± 2,767	13,1 ± 2,702*	8,9 ± 7,824*
II	11,8 ± 2,331	4,4 ± 0,718**	6,4 ± 3,293**
III	51,6 ± 7,598	4,5 ± 1,565***	1,5 ± 1,269***

Controle negativo = solução aquosa de polissorbato 7,5%; Controle positivo = misoprostol; Tratado = extrato EBL de *M. camphoratum*; \*p > 0,05; \*\*p < 0,05; \*\*\* p < 0,001.



Figura 60. Atividade antiúlcera. Indução por ácido clorídrico 0,3M em etanol 60%. Tratado: extrato hidroetanólico, liofilizado de *M.camphoratum* (400mg/kg). Controle positivo: misoprostol (10 µg/mL). Controle negativo: solução aquosa de polissorbato 7,5%.

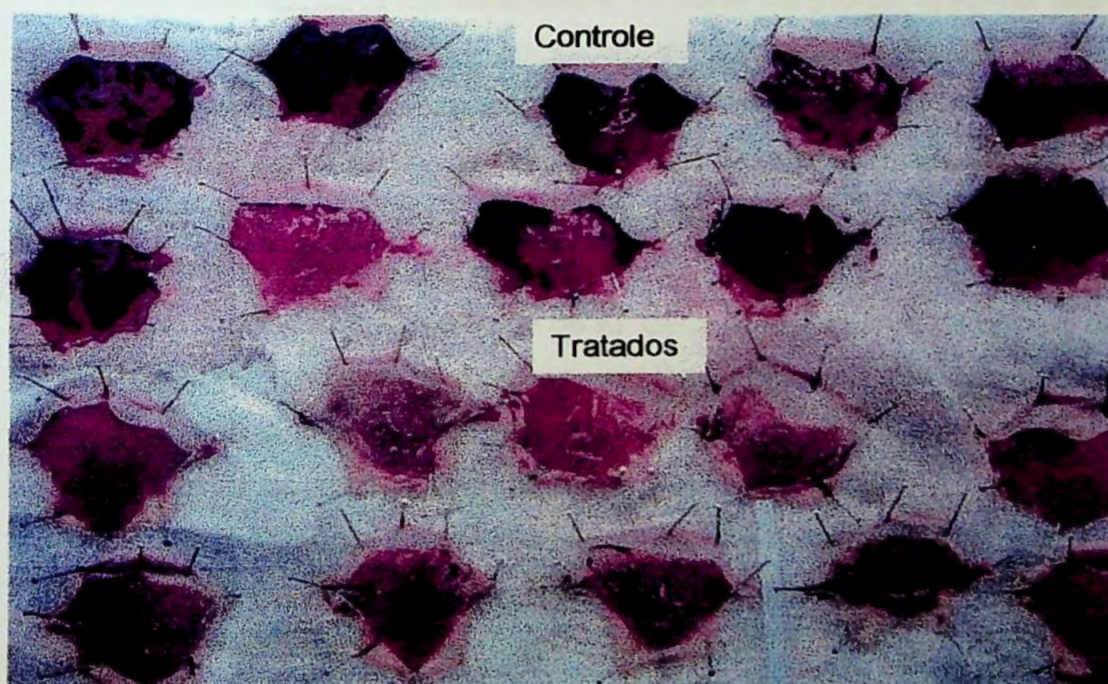


Figura 61. Atividade antiúlcera. Indução por ácido clorídrico 0,3M em etanol 60%. Fotografias de estômagos de ratos Wistar. Tratado: extrato hidroetanólico, liofilizado de *M.camphoratum* (400mg/kg). Controle: solução aquosa de polissorbato 7,5%.



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Aspectos farmacobotânicos

*M. camphoratum*, espécie tema desta dissertação, chamou nossa atenção pelo uso popular em problemas gastrintestinais e em hepatite na região norte do país, especialmente em Belém (PA), cidade natal da autora.

O nome popular das plantas empregadas na medicina popular há muito causam problemas. Hoje persistem as fraudes e adulterações de drogas vegetais. *M. camphoratum*, recebe o nome vulgar de "erva-de-São-João". Esta denominação é comumente utilizada para designar outras espécies. Algumas das mais conhecidas são *Ageratum conizoides* (Asteraceae) e *Hypericum perforatum* (Guttiferae). Do ponto de vista macroscópico, a diferenciação entre estas 3 espécies é relativamente simples. As plantas da família Asteraceae apresentam capítulos característicos. O porte da planta, a forma das folhas, a disposição dos capítulos, a coloração e o número de floretas diferenciam *M. camphoratum* e *Ageratum conizoides* (BARROSO, 1991; PIMENTEL, 1994). *Hypericum perforatum* (Guttiferae) caracteriza-se pelas flores amarelas, monóclinas, de cerca de 2 cm de diâmetro, providas de numerosos estames e fruto classificado como cápsula.

Embora os órgãos aéreos de *M. camphoratum* apresentem os caracteres morfológicos externos e internos, estabelecidos para a família Asteraceae (METCALFE e cols., 1950; BARROSO, 1991), diversos itens destacam-se na identificação da espécie transformada em droga vegetal. O odor aromático é associado à presença de óleo essencial (0,28%) nos órgãos aéreos. Este grupo de substâncias pode ser evidenciado nos tricomas glandulares e dutos secretores empregando-se Sudam III (Fig. 4, 7, 8, 9, 25, 35). A sensação canforácea descrita (PIMENTEL, 1994) deve-se à presença de cânfora (26,9%), identificada na análise cromatográfica em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (Tab 7; fig. 44). O sabor amargo pode ser

relacionado à lactona sesquiterpênica identificada anteriormente (RODRIGUEZ, 1977; JACOBS e cols., 1986).

O aspecto morfológico das folhas e dos caules mostra reduzidas variações nas amostras analisadas. A ramificação do caule e a pilosidade são evidentes. O comprimento da lâmina foliar corresponde aproximadamente ao quádruplo da largura. Os capítulos evidenciam-se na região axilar das folhas opostas (Fig.2).

O mesofilo dorsiventral (Fig. 4 e 5) encontra-se em conformidade com o descrito para os representantes desta família (METCALFE e cols., 1950). Células de parênquima com formas em Y e H (Fig. 4 e 5) são descritos para outras espécies de Asteraceae medicinais (RODRIGUES e cols., 1998).

As folhas são anfiestomáticas, predominando os estômatos anomocíticos na face abaxial (Fig. 10, 12, 13). Nas lâminas dorsiventrais, de mesófitas, geralmente se observa uma distribuição diferencial dos estômatos (ESAÚ, 1960). Os estômatos anomocíticos e anisocíticos encontrados são freqüentes em Asteraceae (METCALFE e cols., 1950).

A superfície cuticular mostrou-se estriada principalmente nas áreas em torno dos estômatos e dos tricomas (Fig. 11, 13, 16,17).

Os tricomas tectores pluricelulares, unisseriados (Fig. 7, 10, 14, 15, 16, 18, 21) e os glandulares pluricelulares, bisseriados (Fig. 4, 7, 8, 9) são semelhantes àqueles encontrados em outras espécies da família (OLIVEIRA, 1971; KATO e cols., 1994). Na espécie, os tricomas tectores ocorrem preferencialmente na superfície adaxial (Fig. 4, 10, 14); alguns de forma cônica destacam-se nesta face (Fig. 21). Estes tricomas apresentam comprimentos variáveis; os mais alongados observam-se na nervura mediana (Fig. 18). Os tricomas glandulares ocorrem normalmente na face abaxial (Fig. 4, 7, 8, 9, 15).

Dutos secretores esquizógenos são comuns em Asteraceae (METCALFE e cols., 1950). Em *M. camphoratum* não foi realizado estudo de ontogênese. Na nervura mediana encontram-se 3 dutos secretores relacionados ao feixe vascular arqueado; um deles voltado para a face adaxial (Fig. 22, 23) e 2 para a abaxial (Fig. 22). Nos caules, relacionados a cada feixe vascular colateral (Fig.

25, 26), observam-se 2 dutos secretores localizados na região da endoderme (Fig. 25, 26, 28, 30, 35, 36, 37, 38). Estrias de Caspary são perceptíveis nesta região (Fig. 28, 34). Este detalhe foi observado em outras Asteraceae medicinais, tais como, *Calea pinnatifida* (R. Brown) Banks ex Steudel (KATO e cols., 1994) e *Mikania malacolepsis* Robinson (RODRIGUES e cols, 1998). A distribuição dos dutos é importante caráter de diagnose. *M. malacolepsis* (RODRIGUES e cols, 1998) diferencia-se de outras espécies de *Mikania*, por apresentar dutos na região medular. Em *M. camphoratum* os dutos ocorrem na região cortical (Fig. 25, 26, 28).

Como a maioria das espécies de Asteraceae, *M. camphoratum* apresenta estrutura eustélica (METCALFE e cols., 1950). Com o início da formação de estrutura secundária, observa-se o desenvolvimento de grupos de fibras na região pericíclica (Fig. 27, 31, 32, 33, 34, 39, 40). Fibras pericíclicas no caule de representantes de Asteraceae são descritas por diversos autores (METCALFE e cols., 1950; RODRIGUES e cols., 1998). No floema pouco desenvolvido (Fig. 33, 35) observam-se placas crivadas conspícuas (Fig. 34, 36). A região xilemática, comparativamente ao floema, é bem desenvolvida. Elementos traqueais isolados e fibras predominam nesta região (Fig. 39, 40).

Outra característica relevante na diagnose da droga é a ausência de inclusões celulares inorgânicas.

## 5.2 Óleo volátil

O estudo químico do óleo volátil de *M. camphoratum* e sua relação com a atividade antimicrobiana foram motivados pela falta deste tipo de ensaio com a espécie.

De forma geral, este grupo de compostos é representado por misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (BRUNETON, 1991; TISSERAND e BALACS, 1995; SIMÕES e SPITZER, 1999). Os terpenos e seus derivados oxigenados são seus principais

componentes (GERSHENZON e MABRY, 1983). Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (TISSERAND e BALACS, 1995; SIMÕES e SPITZER, 1999).

Os órgãos aéreos de *M.camphoratum* forneceram 0,28% (m/p) de óleo volátil. Sua análise permitiu a identificação de 15 substâncias, representadas por monoterpenos hidrocarbonados [ $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -felandreno, *p*-cimeno e limoneno] e sesquiterpenos [(E)-cariofileno, germacreno D, cadineno ( $\delta$ ), (E)- $\gamma$ -bisaboleno,  $\alpha$ -cadinol]. Os monoterpenos oxigenados são encontrados em menor número [cânfora, borneol,  $\alpha$ -terpineol, timol (metil éter)]. As substâncias em maior proporção foram:  $\alpha$ -felandreno (35,8%), cânfora (26,9%) e canfeno (12,2%) (Tab. 7).

Maia e cols. (1998), analisaram os óleos voláteis de órgãos aéreos de 2 espécimes de *M.camphoratum*, coletados em 2 localidades da região amazônica. A composição do óleo foi marcadamente diferente. A amostra de Manaus (AM), com rendimento de 0,2%, caracterizou-se pelo elevado conteúdo de terpineol (30,3%), limoneno (13,8%) e  $\delta$ -3-careno (13,2%). A amostra coletada em Vigia (PA), com rendimento de 0,7%, apresentou como componentes majoritários a cânfora (15%), o  $\alpha$ -felandreno (20,5%) e o  $\beta$ -cariofileno (8,9%).

A variação da composição dos óleos voláteis dos 3 espécimes estudados, um coletado na cidade de Belém (Tab. 7) e dos 2 analisados por Maia e cols. (1998), pode ser atribuída a fatos bem estabelecidos para este grupo de substâncias. Embora comparativamente seja diversificada, de modo geral, estes óleos apresentaram monoterpenóides como substâncias predominantes. As amostras procedentes do Estado do Pará mostraram coincidências na composição e na proporção de dois dos componentes de maior teor. Nossa amostra apresentou 35,8% de felandreno e 26,9% de cânfora (Tab. 7); na amostra de Vigia (MAIA e cols., 1998) foram identificados os

mesmos compostos, mas na proporção de 20,5% e de 15%, respectivamente. Reconhece-se que o rendimento, a composição e a qualidade dos óleos voláteis dependem de uma série de fatores, entre os quais destacam-se as condições topográficas e climáticas. Em geral, o clima seco e ensolarado propicia a maior produção de óleos voláteis pelos vegetais. A proporção dos diferentes constituintes pode variar ao longo do ciclo vegetativo, conforme a fenologia, o órgão, a idade da planta, horário de coleta e métodos extrativos (BRUNETON, 1991; ROBBERS e cols., 1996). De modo geral, uma mesma espécie, desenvolvida em localidades distintas, apresenta os mesmos constituintes no seu óleo volátil, mas em proporções variadas (ROGERS, 1981; MOOKHERJEE, 1996). Fatores climáticos, natureza do solo, práticas de cultivo, entre outros, podem dar origem a quimiotipos ou raças, ou seja, uma mesma espécie quando exposta a diferentes condições pode apresentar alterações na sua composição (ROGERS, 1981; VANHAELEN e cols., 1991; TISSERAND e BALACS, 1995; GUIGNARD, 1996; SIMÕES e SPITZER, 1999).

Alguns dos componentes identificados (Tab. 7) foram anteriormente avaliados isoladamente quanto à atividade antimicrobiana. A cânfora apresentou fraca inibição em relação a *Pseudomonas aeruginosa* e praticamente ausência de inibição em relação a *Staphylococcus aureus* (SIVROPOULOU e cols., 1997). O canfeno demonstrou atividade em relação a *S.aureus*, ao passo que foi inativo frente a *P.aeruginosa* (HINOUE e cols., 1989). Ensaio de atividade antimicrobiana empregando-se o  $\alpha$ -felandreno não foram encontrados em literatura.

A avaliação da atividade antimicrobiana do óleo volátil de *M. camphoratum* foi efetuada empregando-se o método de difusão em meio sólido e a técnica da autobiografia.

Pelo método de difusão em meio sólido, o óleo volátil apresentou-se ativo em relação *S. aureus*, *Candida albicans* e *A. niger*, mas inativo contra *P. aeruginosa* (Tab. 21).

O eugenol, substância de referência, mostrou resultado semelhante, com referência aos microrganismos empregados (Tab. 21). Os óleos voláteis, ricos em compostos fenólicos, tais como carvacrol, eugenol e timol são conhecidos por apresentarem elevados níveis de atividade antimicrobiana (PANIZZI e cols., 1993; DORMAN e DEANS, 2000). Por esta razão, o eugenol foi utilizado como referência contra os microrganismos testados. A atividade de um óleo volátil e de seus constituintes é atribuída à sua propriedade lipofílica, que possibilita atravessar a membrana citoplasmática de algumas bactérias e, pela interação de seus grupos funcionais com as proteínas enzimáticas (KNOBLOCH e cols., 1986; COWAN, 1999).

Em geral, os óleos voláteis são mais ativos contra as bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas (YOUSEF e TAWIL, 1980; HINOUE e cols., 1989). Este fato coincidiu com os resultados obtidos (Tab. 21). A resistência das bactérias Gram-negativas em relação às Gram-positivas frente a óleos voláteis diversos foi estudada por Nikaido e Vaara (1985). Segundo estes autores, a membrana fosfolipídica de bactérias Gram-negativas atua como uma barreira a substâncias lipofílicas.

O óleo volátil de *M.camphoratum*, assim como a substância de referência, apresentou ação antifúngica (Tab. 21). A atividade antifúngica de um óleo volátil pode variar conforme o período de desenvolvimento do teste. Geralmente, este período é longo e leva à decomposição dos componentes do óleo analisado (JANSSEN e cols., 1987). Yousef e Tawil (1980) demonstraram que os diâmetros dos halos de inibição determinados após 2 e 15 dias diferenciavam-se significativamente para alguns óleos voláteis estudados. Estes autores atribuíram este fato à decomposição ou evaporação de componentes dos óleos, durante o ensaio.

A atividade antimicrobiana de um óleo volátil pode ser relacionada à sua composição; as substâncias em maior proporção não são obrigatoriamente os responsáveis por esta atividade (CHALCHAT e cols., 1997). A configuração estrutural destes compostos, seus grupos funcionais e possíveis efeitos sinérgicos devem ser analisados (DORMAN e DEANS, 2000).

Chalchat e cols. (1997) após analisarem os óleos voláteis de 13 plantas concluíram que a atividade antimicrobiana está relacionada com a composição química de cada óleo. Aqueles com maior porcentagem de monoterpenos hidrocarbonados e sesquiterpenos apresentaram baixo poder de inibição dos microrganismos. Outros com elevada porcentagem de monoterpenos oxigenados demonstraram alto poder de inibição.

Os monoterpenos oxigenados devido à presença do oxigênio apresentam ligeira solubilidade em água e considerável solubilidade em álcool (TISSERAND e BALACS, 1995). Este fato pode estar relacionado à maior atividade dos monoterpenos oxigenados em relação aos monoterpenos hidrocarbonados e sesquiterpenos.

Kurita e cols. (1981) após avaliarem a atividade antifúngica de 7 monoterpenos hidrocarbonados verificaram que nenhum deles inibiu o crescimento dos fungos.

Akimov e cols. (1977) reportaram que uma elevada proporção de sesquiterpenos em relação aos constituintes monoterpênicos, geralmente diminuía a atividade antibacteriana do óleo volátil de *Juniperus sabina* L.

Pela técnica da autobiografia, o óleo volátil apresentou atividade antimicrobiana em relação a *S. aureus* e atividade fungistática frente a *A. niger* (Fig. 57 e 58). Resultado coincidente com o encontrado empregando-se o método de difusão em ágar (Tab. 21). As manchas indicativas de atividade antimicrobiana coincidem com o deslocamento da cânfora e do terpineol no cromatograma em camada delgada do óleo volátil (Fig. 44). Os resultados obtidos (Fig. 57 e 58), comparados aos dados da literatura (HINOUE e cols., 1989; SIVROPOULOU e cols., 1997) não permitem afirmar qual componente do óleo apresenta atividade em relação a *S.aureus* e *A. niger*. O emprego de diversos sistemas cromatográficos evidenciou deslocamentos praticamente coincidentes para a cânfora e o terpineol. No óleo empregado, o teor deste último foi de 0,3% (Fig. 7, fig. 44). Embora os dados de alguns autores (HINOUE e cols., 1989; SIVROPOULOU e cols.; 1997) mostrem atividade conflitante da cânfora e do canfeno frente a *S.aureus*, a atividade positiva do óleo analisado

(Fig.57, tab. 21) pode ser atribuída ao sinergismo de alguns componentes que seriam ativos em baixas concentrações.

### **5.3 Aspectos biológicos e fitoquímicos do extrato bruto liofilizado (EBL)**

#### **5.3.1 Avaliação de toxicidade aguda**

O ensaio de toxicidade aguda representa uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de um fitoterápico, fornecendo informações acerca dos riscos sobre a saúde, resultantes de uma exposição de curta duração, pela via selecionada. Um estudo da toxicidade aguda - dose simples serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas sobre a toxicidade aguda - doses repetidas, subcrônica e crônica, além de fornecer informações iniciais sobre o modo de ação tóxica do fitoterápico (BRITO, 1995).

Este ensaio permite a observação dos efeitos tardios do tratamento e, quando for o caso, a recuperação da ação tóxica durante esse período de observação dos animais sobreviventes. Esse teste agudo é obrigatório para todos os tipos de materiais em análise, pois evidencia o risco de intoxicações agudas, inadvertidas ou não, e a forma de preveni-las (LAPA e cols., 1999).

O ensaio realizado com o extrato EBL, não apresentou reação de toxicidade aguda relevante, em camundongos machos e fêmeas, quando administrado por via oral, na dose de 5,0 g/kg. Piloereção e eliminação de resíduos intestinais ligeiramente amolecidos foram observadas nas primeiras horas após a administração do extrato.

O consumo de ração e de água do grupo tratado permaneceu dentro dos parâmetros de normalidade. Nos primeiros dias do experimento, estes animais equipararam-se com os do grupo controle (Tab. 10-13 e fig. 47-50).

Ao final do ensaio, os órgãos dos animais tratados não evidenciaram alterações macroscópicas relevantes quando comparados aos dos controles.



Tanto o grupo controle quanto o tratado não apresentaram diferenças significativas quando comparados estatisticamente em relação à variação do peso corporal e do peso relativo dos órgãos dos animais empregados (Tab. 8,9, 14-19 e fig. 45, 46, 51-56).

### 5.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

As bactérias e os fungos são os causadores de diversas doenças nos seres humanos, especialmente nas regiões tropicais. Os pacientes imunodeficientes são os mais vulneráveis a estes microrganismos oportunistas. Apesar da existência de antibióticos e agentes antifúngicos potentes, o aparecimento contínuo de cepas resistentes leva a uma pesquisa permanente e ao desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos (SILVER e BOSTIAN, 1993).

Muitas espécies vegetais da família Asteraceae têm apresentado atividade antimicrobiana em relação a diversos microrganismos (RIOS e cols. 1988; SALIE e cols., 1996; TADDEI e Romero, 1999).

*S.aureus*, bactéria que rapidamente desenvolve resistência a muitos agentes antimicrobianos, representando um difícil problema terapêutico, foi inibido pelo extrato EBL (Tab. 20).

Alguns microrganismos entéricos, como *E. coli*, fazem parte da flora normal e acidentalmente causam doenças, enquanto outros, como *Salmonella choleraesuis*, são regularmente patogênicos para os seres humanos. Ambos apresentaram resistência frente ao extrato EBL (Tab. 20).

*P.aeruginosa*, freqüentemente encontrada em pequeno número na flora intestinal normal e na pele dos seres humanos, é um microrganismo resistente a muitos agentes antimicrobianos. Esta bactéria torna-se dominante, quando os microrganismos mais suscetíveis da flora normal são suprimidos, produzindo infecções em pacientes cujas defesas estejam alteradas. É considerado um

importante patógeno nosocomial. Esta bactéria foi inibida pelo extrato EBL (Tab. 21).

Entre as complicações infecciosas mais comuns em indivíduos imunodeficientes estão a candidíase e a aspergilose, ambas ocasionadas por fungos considerados invasores oportunistas. O extrato EBL foi inativo contra *C. albicans*; entretanto, inibiu *A. niger* (Tab. 20).

Pelo método de diluição seriada em meio líquido, o extrato EBL foi ativo na concentração de 1 mg/mL contra as bactérias e o fungo anteriormente mencionados (Tab. 20).

Rios e cols. (1988) consideram que uma diluição máxima de 1 mg/mL é suficiente para a avaliação da presença de substâncias potencialmente ativas em extratos vegetais. Os mesmos autores sugerem que a atividade antimicrobiana de 5 espécies de Asteraceae estaria relacionada à presença de flavonóides e lactonas sesquiterpênicas. Na espécie em estudo foram identificados anteriormente a lactona sesquiterpênica niveucina C bem como os flavonóides apigenina e acacetina (Jacobs e cols., 1986). A triagem fitoquímica do extrato EBL evidenciou a presença de flavonóides e terpenóides (Tab. 4, 5, fig. 41, 42), compostos aos quais poderia ser atribuída a atividade antimicrobiana observada (Tab. 20).

#### **5.3.4 Avaliação da atividade antiúlcera e antioxidante**

A participação de espécies reativas tóxicas do oxigênio (ERTO) na etiologia e na fisiopatologia de problemas gastrintestinais, tais como úlceras gástricas, tem sido avaliada. As ERTTO formadas no metabolismo do ácido araquidônico, macrófagos e células da musculatura lisa podem contribuir na formação de lesões na mucosa (MIZUI e DOTEUCHI, 1983; KANNER e LAPIDOT, 2001). Antioxidantes de origem vegetal, tais como flavonóides, taninos, procianidinas tem apresentado-se como fármacos promissores no

tratamento de patologias relacionadas à presença de radicais livres (LARSON, 1988; REPETTO e LLESUY, 2002).

Pesquisas clínicas tem confirmado a eficácia de plantas no tratamento de úlceras, mas os mecanismos não estão estabelecidos (GURBUZ e cols., 2000, KANNER e LAPIDOT, 2001).

A atividade antioxidante do extrato EBL foi avaliada pela técnica da medida de substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Barros e cols. (1996), empregando o mesmo método determinaram a concentração da amostra necessária para reduzir em 50% a autoxidação do sistema ( $Q_{1/2}$ ) para o  $\alpha$ -tocoferol ( $Q_{1/2} = 12,10 \mu\text{g/mL}$ ) e para o extrato etanólico das raízes de *Pothomorphe umbellata* ( $Q_{1/2} = 4,4 \mu\text{g/mL}$ ).

O valor de  $Q_{1/2}$  obtido para o extrato EBL foi de  $4,42 \mu\text{g/mL}$  (Tab. 22 e fig. 59). Este valor é quase 3 vezes inferior ao obtido para o  $\alpha$ -tocoferol e muito próximo ao de *Pothomorphe umbellata*; todavia, muito superior aos valores que tem sido encontrados para espécies da família Myrtaceae. Markman (2002) ensaiando extrato de folhas de *Campomanesia xanthocarpa* determinou  $Q_{1/2}$  de  $0,29 \mu\text{g/mL}$ . Silva (2001) estudando o extrato hidroalcoólico das folhas de *Myrciaria glomerata* obteve valor de  $Q_{1/2}$  igual a  $0,51 \mu\text{g/mL}$ .

O extrato bruto de uma espécie vegetal é uma mistura complexa de substâncias. Algumas delas podem atuar de modo sinérgico redundando em uma atividade biológica benéfica como a antioxidante; entretanto, podem ocorrer outras que reduziram esta atividade, como as substâncias prooxidantes.

A existência de mecanismos bioquímicos pelos quais os radicais livres são gerados nas células e nos tecidos, possibilita a pesquisa nos seguintes campos: o uso de antioxidantes na proteção contra as patologias induzidas pelas espécies oxidantes e o uso de prooxidantes no desenvolvimento de compostos para o tratamento do câncer (BEM-YOSEPH e ROSS, 1994).

Os prooxidantes são produzidos em grande quantidade por determinadas espécies vegetais como mecanismo de defesa contra seus predadores, tais

como insetos, herbívoros e microrganismos fitopatógenos. Atividade prooxidante tem sido atribuída a cumarinas, poliacetilenos e alcalóides (BERENBAUM, 1995), bem como às lactonas sesquiterpênicas (JODYNIS-LIEBERT, 1999, 2000).

*M. camphoratum* contém lactona sesquiterpênic e flavonóides (JACOBS e cols, 1986). A triagem fitoquímica do extrato EBL evidenciou a presença de flavonóides e terpenóides (Tab. 4, 5, fig. 41, 42). As mirtáceas, de modo geral, apresentam elevado teor de fenólicos (MARKMAN, 2002; SILVA, 2001). Este fato pode estar relacionado às diferenças nos valores de  $Q_{1/2}$  observadas em relação às espécies de Myrtaceae.

Os resultados (Fig. 60 e 61) mostram que o extrato EBL é capaz de atuar como agente antiúlcera contra substâncias gástricas irritantes.

O ensaio da atividade antiúlcera gástrica foi realizado segundo o modelo descrito por Mizui e Doteuchi (1983), onde soluções etanólicas provocam a formação de úlceras. Com a adição de ácido clorídrico, a formação das úlceras é acelerada. Segundo o protocolo, a amostra a ser testada deve ser administrada anteriormente ao agente indutor. Neste modelo, o resultado positivo indica ação preventiva na formação de úlceras gástricas. Ele permite avaliar propriedades citoprotetoras de substâncias capazes de elevarem a produção de muco e bicarbonato pelas células parietais da mucosa estomacal, além de, por mecanismos desconhecidos, aumentarem a resistência da mucosa contra as lesões provocadas pelas altas concentrações de ácido clorídrico. As prostaglandinas, como as do tipo E, sintetizadas predominantemente pela mucosa gástrica, tem mostrado importante participação neste efeito. Estes compostos apresentam atividade citoprotetora através do estímulo da regeneração celular e da produção de muco e bicarbonato (ROBERT e cols., 1979; MILLER, 1983).

Neste ensaio foi utilizado o misoprostol (prostaglandina  $E_1$ ) como fármaco-padrão. Esta substância é o agente citoprotetor mais indicado para o modelo de indução por etanol acidificado (ROBERT e cols., 1979; BAUER e cols., 1986; CHO e OGLE, 1992).

O extrato EBL, administrado por via oral, apresentou resultado significativo nos níveis de ulceração II e III, na dose de 400 mg/kg (Tab.22, fig. 60 e 61). Esta atividade antiúlcera pode estar associada à redução de espécies reativas tóxicas do oxigênio ou de radicais livres pela fração flavonoídica. A presença de lactonas sesquiterpênicas no extrato poderia contribuir com esta ação. Diversos pesquisadores (GERMANO e cols., 1996; TOURNIER e cols., 1999; GRACIOSO, 2000) relatam que as lactonas sesquiterpênicas de algumas espécies de Asteraceae mostram-se responsáveis pelo efeito antiúlcera.

A artemisinina e derivados isolados de *Artemisia annua* (FOGLIO e cols., 2002), o partenólido de *Tanacetum vulgare* (TOURNIER e cols., 1999) e a diidroleucodina de *Artemisia douglasiana* (MARIA e cols., 1998) são exemplos de lactonas sesquiterpênicas isoladas de Asteraceae que apresentam atividade antiúlcera. Foglio e cols. (2002) sugerem que esta ação seja decorrente da elevação da síntese de prostaglandinas.

---

## 6 CONCLUSÃO

O estudo permite enumerar as seguintes conclusões:

1. As características farmacobotânicas importantes na identificação da droga vegetal comercializada como "erva-de-São-João" ou "São-João-caá" preparada com os órgãos aéreos de *Melampodium camphoratum* (L.f.) Baker são apresentadas a seguir:

1.1. Características macroscópicas. O caule jovem hexagonal, de coloração verde-acastanhado apresenta-se fragmentado, piloso e provido de estrias longitudinais. As folhas são geralmente sésseis, oblongas ou agudolanceoladas, membráceas, pilosas, inteiras ou finamente denteadas. O odor é canforáceo e o sabor amargo.

1.2. Características microscópicas. Caule eustélico mostra-se provido de dutos secretores na região endodérmica. Cada feixe vascular é ladeado por dois dutos secretores. Tricomas tectores pluricelulares, unisseriados, alguns com forma cônica são encontrados em grande número. Tricomas glandulares bisseriados com até 8 células ocorrem em menor número. Na estrutura secundária observam-se fibras na região pericíclica. O floema é pouco desenvolvido, mas deixa perceber placas crivadas. A região xilemática é constituída principalmente por vasos isolados e fibras. As folhas evidenciam mesofilo dorsiventral. Estômatos anomocíticos ocorrem predominantemente na face abaxial. Cutícula estriada é observada próxima a estômatos e base de tricomas. Tricomas tectores e glandulares semelhantes aos descritos para o caule são encontrados neste órgão. Estes últimos predominam na face abaxial. A droga vegetal não contém inclusões celulares inorgânicas.

2. A triagem fitoquímica da droga vegetal e do extrato EBL permitiu detectar a presença de flavonóides e terpenóides.

---

3. O óleo volátil (0,28%, v/p), analisado por CG-MS, apresentou 15 componentes.  $\alpha$ -felandreno (35,8%), cânfora (26,9%) e canfeno (12,2%) foram as substâncias majoritárias.

4. O óleo volátil inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, mas manteve-se inativo frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

5. No ensaio de atividade antioxidante, o extrato EBL apresentou  $Q\ \frac{1}{2} = 4,42\ \mu\text{g/mL}$ .

6. No ensaio de toxicidade aguda, os animais tratados com o extrato EBL, na dose de 5g/kg, não mostraram alterações relevantes em relação ao consumo de água, ração e condições físicas. Peso corpóreo, aspecto macroscópico dos órgãos e peso dos mesmos não apresentaram diferenças significativas.

6. O extrato EBL apresentou atividade antiúlcera, no modelo induzido por solução etanólica acidificada.

7. O extrato EBL inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus niger*, mas manteve-se inativo frente a *Escherichia coli*, *Salmonella cholerasuis* e *Cândida albicans*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALA, D.S.P. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S.; CHASIN, A.A.M.; MACHADO-SANTELLI, G.M. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. p.37-58.
- AKIMOV, Y.A.; KHARCHENKO, G.I.; KRYLOVA, A.P.; BELOVA, N.N. Microbial activity of terpenes from *Juniperus sabina* L. *Prkl. Biokhim. Mikrobiol.*, Moscow, v.13, p.185-188, 1977.
- ALONSO-LÓPEZ, M.; ARRIAGA-GINER, F.J.; BORGES-DEL-CASTILLO, J.; VÁZQUEZ-BUENO, P. N-alkanes and triterpenoids from some *Salvadorian compositae*. *Fitoterapia*, Amsterdam, v.56, n.2, p.123-125, 1985.
- BARROS, S.B.M.; TEIXEIRA, D.S.; AZNAR, A.E.; MOREIRA Jr., J.A.; ISHII, I.; FREITAS, P.C.D. Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* L. Miq. (Pariparoba). *Cienc. Cult.*, São Paulo, v.48, p.114-116, 1996.
- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Viçosa: Imprensa Universitária/UFV, 1991. v.3, 326p.
- BAUER, R.F.; BIANCHI, R.G.; CASLER, J.; GOLDSTIN, B. Comparative mucosal protective properties of misoprostol, cimetidine and sucralfate. *Dig. Dis. Sci.*, Dordrecht, v.31, suppl.2, p.81-85, 1986.
- BEM-YOSEPH, O.; ROSS, B. Oxidation therapy: the use of a reactive oxygen species-generating enzyme system for tumor treatment. *Br. J. Cancer*, Sidcup, n.70, p.1131-1135, 1994.



- BERENBAUM, M.R. Metabolic detoxification of plant prooxidants. In: ARMAD, S., ed. *Oxidative stress and antioxidant defenses in biology*. New York: Chapman & Hall, 1995. p.181-209.
- BERG, M.E.; SILVA, M.H.L. Ethnobotany of a traditional ablution in Pará, Brazil. *Bol. Mus. Para. Emilio Goeldi, Bot.*, Belém, v.2, n.2, p.213-218, 1986.
- BERKOW, R.; FLETCHER, A.J., eds. *Manual Merk de medicina: diagnóstico e tratamento*. 16.ed. São Paulo: Roca, 1995. 2782p.
- BERLYN, G.P.; MIKSCH, J.P. *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames: Iowa State University Press, 1976. 326p.
- BHATTACHARYYA, B.; JOHRI, B.M. *Flowering plants: taxonomy and phylogeny*. New Delhi: Narosa Publishing House, 1998. 753p.
- BLAND, J.S. Oxidants and antioxidants in clinical medicine: past, present and future potencial. *J. Nutr. Environ. Med.*, Basingstoke, v.5, p.255-280, 1995.
- BOHM, B.A.; STUESSY, T.F. Flavonoid variation in *Melampodium*. *Biochem. Syst. Ecol.*, Oxford, v.19, n.8, p.677-679, 1991.
- BORRELI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother. Res.*, London, v. 14, p. 581-591, 2000.
- BORGES-DEL-CASTILLO, J.; MARTINEZ-MARTIR, A.I.; RODRIGUEZ-LUIS, F.; RODRIGUEZ-UBIS, J.C.; VAZQUEZ-BUENO, P. Isolation and synthesis of two coumarins from *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry*, Oxford, v.23, n.4, p.859-861, 1984.

- BRASIL. Ministério da Saúde. *Secretaria da Vigilância Sanitária*. Resolução RDC 17 de 24/02/2002. Disponível em < [http\www.saúde.gov.br](http://www.saúde.gov.br)
- BREMER, K.; ANDERBERG, A.A. *Asteraceae: cladistics & classification*. Portland: Timber Press, 1994. 752p.
- BRITO, A.R.M.S. *Manual de ensaios toxicológicos in vivo*. Campinas: UNICAMP, 1994. p.15-22. (Ciências médicas).
- BRITO, A.R.M.S. Toxicologia pré-clínica de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C., org. *Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP, 1995. p.99-107.
- BRUNETON, J. *Elementos de fitoquímica y de farmacognosia*. Zaragoza: Acribia, 1991. 594p.
- BUKATSCH, F. Bemerkungen zur Doppelfärbung Astrablau-safranin. *Mikrokosmos*, Stuttgart, v. 61, n.8, p.255, 1972.
- BURKS, T.F. Gastrointestinal drugs. In: BRODY, T.M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K.P.; NEU, H.C. *Human pharmacology: molecular to clinical*. 2.ed. Saint Louis: Mosby, 1994. p.801-812.
- CASTRO, M.M.C.; LEITÃO-FILHO, H.F.; MONTEIRO, W.R. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de *Asteraceae* de uma vegetação de cerrado. *Rev. Bras. Bot.*, São Paulo, v.20, n.2, p.163-174, 1997.
-

- CASTRO, V.; JAKUPOVIC, J.; DOMINGUEZ, X.A. Melampolides from *Melampodium* and *Smallanthus* species. *Phytochemistry*, Oxford, v.28, n.10, p.2727-2729, 1989.
- CHALCHAT, J.; GARRY, R.; MENUT, C.; LAMATY, G.; MALHURET, R.; CHOPINEAU, J. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, Carol Stream, v.9, p.67-75, 1997.
- CHO, C.H.; OGLE, C.W. The pharmacological differences and similarities between stress- and ethanol- induced gastric mucosal damage. *Life Sci.*, New York, v.51, p.1833-1842, 1992.
- COLE, M.D. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays: a critical review. *Biochem. Syst. Ecol.*, Oxford, v.22, n.8, p.837-856, 1994.
- CORREA, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v.4, p.117.
- CORREA, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1968.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v.12, n.4, p.564-582, 1999.
- CRONQUIST, A. *An Integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

- DIBBERN, M., KELMANSKY, D., ROMERO, E. Minimal sample for foliar morphology: empirical method and its application in Myrtaceae. *Phytomorphol*, v. 37, p. 87-93, 1987.
- DOMINGUEZ, X.A.; VILLARREAL, R.; FRANCO, R.; BOHLMANN, F. A melampolide from *Melampodium heterophyllum*. *Phytochemistry*, Oxford, v.20, n.6, p.1431-1432, 1981.
- DOOLEY, C.P. *Helicobacter pylori*: review of research findings. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, Oxford, v.5, suppl.1, p.129-143, 1991.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, Oxford, v.88, p.308-316, 2000.
- EMERENCIANO, V.P.; RODRIGUES, G.V.; ALVARENGA, S.A.V.; MACARI, P.A.T. Um novo método para agrupar parâmetros quimiotaxonômicos. *Quim. Nova*, São Paulo, v.21, p.125-129, 1998.
- ESAÚ, K. *Anatomy of seed plants*. New York, London: John Wiley, 1960.
- ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.*, San Diego, v.186, p.407-431, 1990.
- EVANS, W.C.; TREASE, G.E. *Trease and Evans' pharmacognosy*. 14.ed. London: WB Saunders, 1996. 612p.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

- FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. (Código farmacêutico brasileiro, v.1).
- FINNEY, D.J. *Probit analysis*. 3.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1971. 333p.
- FISCHER, N.H.; MALCOLM, A.J.; OLIVIER, E.J.; FRONCZEK, F.R.; DELORD, T.J.; WATKINS, S.F. The isolation and first x-ray crystal structures of two new germacra-*cis*-1(10),*cis*-4-dien-*trans*-6 $\alpha$ ,12-olides from *Melampodium*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, London, p.1243-1244, 1982.
- FISCHER, N.H.; WILEY, R.A.; LIN, H.J.; KARIMIAN, K.; POLITZ, S. New melampolide sesquiterpene lactones from *Melampodium leucanthum*. *Phytochemistry*, Oxford, v.14, p.2241-2245, 1975.
- FOGLIO, M.A., DIAS, P. C.; ANTONIO, M.A.; POSSENTI, A.; RODRIGUES, R.A.F. Antiulcerogenic activity of some sesquiterpene lactones isolated from *Artemisia annua*. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 68, n. 6, p. 515-518, 2002.
- FRANKLIN, G.L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature*, London, v.155, n.51, p.3924, 1945.
- GERMANO, M.P.; PASQUALE, R.; IAUK, L.; GALATI, E.M.; KEITA, A.; SANOGO, R. Antiulcer activity of *Vernonia kotschyana* sch. bip. *Phytomedicine*, Jena, v.2, n.3, p.229-233, 1996.
- GIRÓN, L.M.; FREIRE, V.; ALONZO, A.; CÁCERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *J. Ethnopharmacol.*, Shannon, v.34, p.173-187, 1991.

- GLAVIN, G.B.; SZABRO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *FASEB J.*, Bethesda, v.6, p.825-831, 1992.
- GRACIOSO, J.S.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO, A.R.M.S. Antiulcerogenic effect of a hydroalcoholic extract and its organic fractions of *Neurolaena lobata* (L.) R. Br. *Phytomedicine*, Jena, v.7, n.4, p.283-289, 2000.
- GURBUZ, I.; AKYUZ, C.; YESILADA, E.; SENER, B. Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* fruits on various ulcer models in rats. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v.71, p.77-82, 2000.
- HALLIWELL, B.; GUTTERGUIDE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 2.ed. Oxford: Pergamon Press, 1985, v.1, p.12.
- HUBERT, T.; WIEMER, D. Ant-repellent terpenoids from *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry*, Oxford, v.24, n.6, p.1197-1198, 1985.
- HÜTHER, J., PASSREITER, C.M., WRAY, V., WILLUHN, G. Acylated 2-hydroxythymol 3-O-diglycosides from *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry*, Oxford, v.51, n.8, p.979-986, 1999.
- HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L. *Plant chemosystematics*. London, Orlando: Academic Press, 1984. 562p.
- HEINRICH, M.; ROBLES, M.; WEST, J.E.; MONTELLANO, B.R.O.; RODRIGUEZ, E. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, Palo Alto, v.38, p.539-565, 1998.

- HEYWOOD, V.H.; MOORE, D.M.; RICHARDSON, I.B.K.; STEARN, W.T., eds. *Flowering plants of the world*. London: Oxford University Press, 1978. 335p.
- HEYWOOD, V.H.; HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L. *The biology and chemistry of the Compositae*. London: Academic Press, 1977.
- HINDLER, J.A.; HOWARD, B.J.; KEISER, J.F. Antimicrobial agentes and antimicrobial susceptibility testing. In: HOWARD, B.J., ed. *Clinical and pathogenic microbiology*. 2.ed. St Louis: Mosby, 1994. 942p.
- HINO, J.B.; HARVALA, C.E.; HINO, E.B. Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. *Pharmazie*, Eschborn, v.44, p.302-303, 1989.
- HÜTHER, J., PASSREITER, C.M., WRAY, V., WILLUHN, G. Acylated 2-hidroxythymol 3-O-diglycosides from *Melampodium divaricatum*. *Phytochemistry*, Oxford, v.51, n.8, p.979-986, 1999.
- INDEX KEWENSIS, v.2, Oxford: University Press, 1946.
- IVIE, G.W.; WITZEL, D.A. Sesquiterpene lactones: structure, biological action, and toxicological significance. In: KEELER, R.F.; TU, A.T.; KEELER, R.F.; HARDEGREE, M.C.; MOSS, J., eds. *Handbook of natural toxins: plant and fungal toxins*. New York: Dekker, 1983. v.1.
- JACOBS, H.; BUNBURY, M.; HYLANDS, P.J.; McLEAN, S. Flavonoids and a heliangolide, niveusin-C from *Melampodim camphoratum*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.49, n.6, p.1163-1164, 1986.

- JANSSEN, A.M.; SCHEFFER, J.J.; SVENDSEN, A.B. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review: aspects of the test methods. *Planta Med.*, Stuttgart, v.53, p.395-398, 1987.
- JODYNIS-LIEBERT, J., MURIAS, M.; BLOSZYK, E. Effect of sesquiterpene lactones on antioxidant enzymes and some drug-metabolizing enzymes in rat liver and kidney. *Planta Med.*, Stuttgart, v.66, p.199-205, 2000.
- JODYNIS-LIEBERT, J., MURIAS, M.; BLOSZYK, E. Effect of several sesquiterpene lactones on lipid peroxidation and glutathione level. *Planta Med.*, Stuttgart, v.65, p.320-324, 1999.
- JOHANSEN, D.A *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill Book Co. Inc., 1940. 523 p.
- JOLY, A.B. *Botânica: introdução a taxonomia vegetal*. 11.ed. São Paulo: Nacional, 1993. 778p. (Biblioteca universitaria. Serie 3. Ciencias puras, v.4).
- KANNER, J., LAPIDOT, T. The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and effects of plant-derived antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*, v.31, p.1388-1395, 2001.
- KATO, E.T.M.; AKISUE, M.K.; OLIVEIRA, F. Caracterização farmacognóstica de aruca - *Calea pinnatifida* (R. Brown) Banks ex Strudel. *Lecta*, Bragança Paulista, v.12, n.1, p.111-127, 1994.
- KIM, D.K. Antioxidative components from the aerial parts of *Latuca scariola* L. *Arch. Pharmacal Res.*, Seoul, v.24, n.5, p.427-430, 2001.



- KNOBLOCH, K.; WEIS N.; WEIGAND, H. Mechanism of antimicrobial activity of essential oils. *Planta Med.*, Stuttgart, v.52, p.556, 1986.
- KOROLKOVAS, A., CUNHA, B.C.A., FRANÇA, F.F.A. C., FERREIRA, E.I. Dicionário terapêutico Guanabara.3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, p.10.2- 10.8.
- KURITA, N.; MIYAJI, M.; KURANE, R.; TAKAHARA, Y. Antifungal activity of components of essential oils. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v.45, n.4, p.945-952, 1981.
- LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C.M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 1999. p.181-196.
- LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, Oxford, v.27, n.4, p.969-978, 1988.
- MAIA, J.G.S.; ZOGHBI, M.G.B.; SILVA, H.L.; LUZ, A.I.R. Essential oil variation in *Melampodium camphoratum* Baker. *J. Essent. Oil Res.*, Carol Stream, v.10, p.109-110, 1998.
- MALCOLM, A.J.; CARPENTER, J.F.; FRONCZEK, F.R.; FISCHER, N.H. Longicornins A to D, four *cis*-1(10),*cis*-4-germacradienolides from *Melampodium longicorne*. *Phytochemistry*, Oxford, v.22, n.12, p.2759-2766, 1983.

- MALCON, A.; DIFEO, D.; FISHER, N.H. Germacranolides from *Melampodium americanum* and *Melampodium pilosum*. *Phytochemistry*, Oxford, v.21, n.1, p.151-155, 1982.
- MARIA, A.O.M.; FRANCHI, A.M.; WENDEL, G.H.; GIMENO, M.; GUZMAN, J.A.; GIORDANO, O.S.; GUERREIRO, E. Gastric cytoprotective activity of dehydroleucodine in rats: role of prostaglandins. *Biol. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.21, n.4, p.335-338, 1998.
- MARINI-BETTÒLO, G.B.; NICOLETTI, M.; PATAMIA, M.; GALEFFI, C.; MESSANA, I. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.213, p.113-127, 1981.
- MARKMAN, B.E.O. Caracterização farmacognóstica de *Campomanesia xanthocarpa* – Myrtaceae. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. USP. São Paulo
- MATTOCKS, A. R. *Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids*. London: Academic Press, 1986.
- METCALFE, C.R.; CHALK, L.; CHATTAWAY, M.M., eds. *Anatomy of the dicotyledons: leaves, stem, and wood in relation to taxonomy, with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press, 1950. 2v.
- MILLER, T.A. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v.245, p.601-623, 1983.
- MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesions in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, Kyoto, v.33, p.939-945, 1983.

- MOREIRA, R.R.D.; TIOSSI, L.C.L.; FURUKAWA, C.R.; MAIA, D.C.G.; SANTOS, L.E.; PLACERES, M.C.P.; CARLOS, I.Z. Release of nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  by peritoneal macrophages in the presence of *M. divaricatum* (Asteraceae). *Rev. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v.22, n.2, p.251-261, 2001.
- MOOKHERJEE, B.D. Essential oils. In: KIRK, R.E.; OTHMER, D.F.; KROSCWITZ, J.I.; HOWE-GRANT, M., eds. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. 4.ed. New York: Wiley-Interscience, 1996, v.17, 1112p.
- NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.49, p.1-32, 1985.
- OLIVEIRA, F. Contribuição para o estudo botânico de *Mikania hirsutissima* D.C. var. *hirsutissima*. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo*, São Paulo, v.9, n.1, p.79-100, 1971.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. O problema da adulteração de drogas. *Rev. Bras. Farm.*, v. 54, p. 71-83, 1973.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. *Fundamentos de farmacobotânica*. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 178p.
- OLIVIER, E.J.; MALCOLM, A.J.; ALLIN, D.V.; FISCHER, N.H. Melrosins A, B and C, three *cis*-1(10)-*cis*-4-germacradienolides from *Melampodium rosei*. *Phytochemistry*, Oxford, v.22, n.6, p.1453-1456, 1983.

- PANIZZI, L.; FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; MORELLI, I. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *J. Ethnopharmacol.*, Shannon, v.39, p.167-170, 1993.
- PARK, E.J.; KIM, Y.; KIM, J. Acylated flavonol glycosides from the flower of *Inula britannica*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.63, n.1, p.34-36, 2000.
- PICMAN, A.K. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.*, Oxford, v.14, n.3, p.255-281, 1986.
- PIMENTEL, A.A.M.P. *Cultivo de plantas medicinais na Amazônia*. Belém: FCAP, 1994. p.87.
- PRIOR, R.L.; CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biol. Med.*, New York, v.27, n.11/12, p.1173-1181, 1999.
- QUIJANO, L.; FISCHER, N.H. Sesquiterpene and diterpene lactones from *Melampodium longipilum*. *Phytochemistry*, Oxford, v.23, n.4, p.829-831, 1984.
- QUIJANO, L.; FISCHER, N.H. Two oxepane-type diterpene lactones from *Melampodium diffusum*. *Phytochemistry*, Oxford, v.23, n.4, p.833-836, 1984.
- QUIJANO, L.; FISCHER, N.H. Melfusin, a new germacrolide from *Melampodium diffusum*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.44, n.3, p.266-273, 1981.
- QUIJANO, L.; NUÑEZ, I.S.; FRONCZEK, F.R.; FISCHER, N.H. A guaianolide and four melampolides from *Melampodium leucanthum*. *Phytochemistry*, Oxford, v.45, n.4, p.769-775, 1987.

- QUIJANO, L.; FRONCZEK, F.R.; FISCHER, N.H. Sesquiterpene and diterpene lactones from *Melampodium leucanthum* and the molecular structure of 4(5)-dihydromelampodin B. *Phytochemistry*, Oxford, v.24, n.8, p.1747-1753, 1985.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 728p.
- RECIO, M.C.; RÍOS, J.L.; VILLAR, A. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytother. Res.*, Bognor Regis, v.3, n.4, p.117-125, 1989.
- REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v.35, n.5, p.523-34, 2002.
- RÍOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.*, Shannon, v.23, n.2/3, p.127-149, 1988.
- RÍOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. *J. Ethnopharmacol.*, Shannon, v.21, n.2, p.139-152, 1987.
- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. *Pharmacognosy and pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. 337p.
- ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C, HANCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. *Gastroenterology*, New York, v.77, p.433-443, 1979.
-

- ROBLES, M.; AREGULLIN, M.; WEST, J.; RODRIGUEZ, E. Recent studies on the zoopharmacognosy, pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. *Planta Medica*, Stuttgart, v.61, p.199-203, 1995.
- RODRIGUEZ, E. Sesquiterpene lactones: chemotaxonomy, biological activity and isolation. *Rev. Latinoam. Quim.*, Monterrey, v.8, p.56-62, 1977.
- ROESER, K.R. Die nadel der schwarzkiefer - massenprodukt und kunstwerk der natur. *Mikrokosmos*, Stuttgart, v.61, p.33-36, 1962.
- ROGERS, J.A. Essential oils. In: KIRK, R.E.; OTHMER, D.F. *Encyclopedia of chemical technology*. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 1981. v.16.
- SALIE, F.; EAGLES, P.F.K.; LENG, H.M.J. Preliminary antimicrobial screening of four South African *Asteraceae* species. *J. Ethnopharmacol.*, Shannon, v.52, n.1, p.27-33, 1996.
- SASS, J.E. *Botanical microtechnique*. 2ed. Ames: The Iowa State College Press, 1951. 391 p.
- SCHÜNGEL, J., PASSREITER, C.M. 2-pyrrolidineacetic acid and pyrrolizidine alkaloids from *Melampodium divaricatum*. *Biochem. Syst. Ecol.*, Oxford, v.28, n.7, p.705-706, 2000.
- SEAMAN. F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic character in the *Asteraceae*. *Bot. Rev.*, New York, v.48, p.123-551, 1982.

- SEAMAN, F.C., FISHER, N.H. New germacrolide and heliangolide-type sesquiterpene lactones from *Melampodium linearilobum*. *Phytochemistry*, Oxford, v.19, p.849-856, 1979.
- SIES, H., ed. *Oxidative stress*. London, Orlando: Academic Press, 1985. p.1-8.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quim. Nova*, São Paulo, v.1, n.22, p.94-103, 1999.
- SILVA, M.G. *Estudo farmacognóstico de Myrciaria glomerata Berg*. São Paulo, 2001. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- SILVER, L.L.; BOSTIAN, K.A. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, n.37, p.377-383, 1993.
- SIMÕES, C.M.O.S.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 1999. p.181-196.
- SIVROPOULOU, A.; NIKOLAOU, C.; PAPANIKOLAOU, E.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v.45, p.3197-3201, 1997.
- STOCKS, J.; GUTTERGUIDE, J.M.C.; SHARP, R.J.; DORMANDY, T.L. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin. Sci. Mol. Med.*, Oxford, v.47, p.212-222, 1974.

- STUESSY, T.F. Re-establishment of the genus *Unxia* (*Compositae* - *Heliantheae*). *Brittonia*, New York, v.21, p.314-321, 1969.
- SUNDBERG, S.D.; STUESSY, T.F. Isolating mechanisms and implications for modes of speciation in *Heliantheae* (*Compositae*). In: MABRY, T.J.; WAGENITZ, G. Research advances in the *Compositae*. Pl. Syst. Evol., Wien, suppl.4, p.77-97, 1990.
- TADDEI, A.; ROMERO, A.J.R. Antimicrobial activity of *Wedelia trilobata* crude extracts. *Phytomedicine*, Jena, v.6, n.2, p.133-134, 1999.
- TISSERAND, R.; BALACS, T. *Essential oil safety*: a guide for health care professionals. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995. 279p.
- TOURNIER, H.; SCHINELLA, G.; Balsa, E.M.; BUSCHIAZZO, H.; MAÑEZ, S.; BUSCHIAZZO, P.M. Effect of the chloroform extract of *Tanacetum vulgare* and one of its active principles, parthenolide, on experimental gastric ulcer in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.51, p.215-219, 1999.
- TURNER, B.L. A new species of *Melampodium* from Jalisco, México. *Phytologia*, v.75, p.136, 1993.
- TURNER, B.L.; POWELL, A.M. *Helenieae*: systematic review. In: HEYWOOD, V.H.; HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L.. eds. *The biology and chemistry of the Compositae*. London, New York: Academic Press, 1977. v.2, p.699-737.
- VIEIRA, L.S. *Fitoterapia da Amazônia*: manual das plantas medicinais: a farmácia de Deus. 2.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992. p.203-204.



VITURRO, C.; MOLINA A.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers from *Mutisia friesiana* (Asteraceae) and *Sanicula graveolens* (Apiaceae). *Phytother. Res.*, Bognor Regis, v.13, n.5, p.422-424, 1999.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2.ed. Berlin: Springer, 1996. 384p.

WASICKY, R.; AKISUE, G. Um aparelho aperfeiçoado para extração de óleos essenciais. *Rev. Fac. Farm. Bioquím. S. Paulo*, v.7, n.2, p.399-405, 1969.

YOUSEF, R.T.; TAWIL, G.G. Antimicrobial activity of volatile oils. *Pharmazie*, Eschborn, v.35, p.698-701, 1980.

Data:	11/09/03
Lilacs:	11
Dedalus:	1340617
MFN:	26138
Terminal:	OK

LIV.	Dirigido do autor
N. E.	-
DATA	11/09/03
PREÇO	-
TOMBAMENTO	22/09/03

L. 17657

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacéuticas  
Universidade de São Paulo