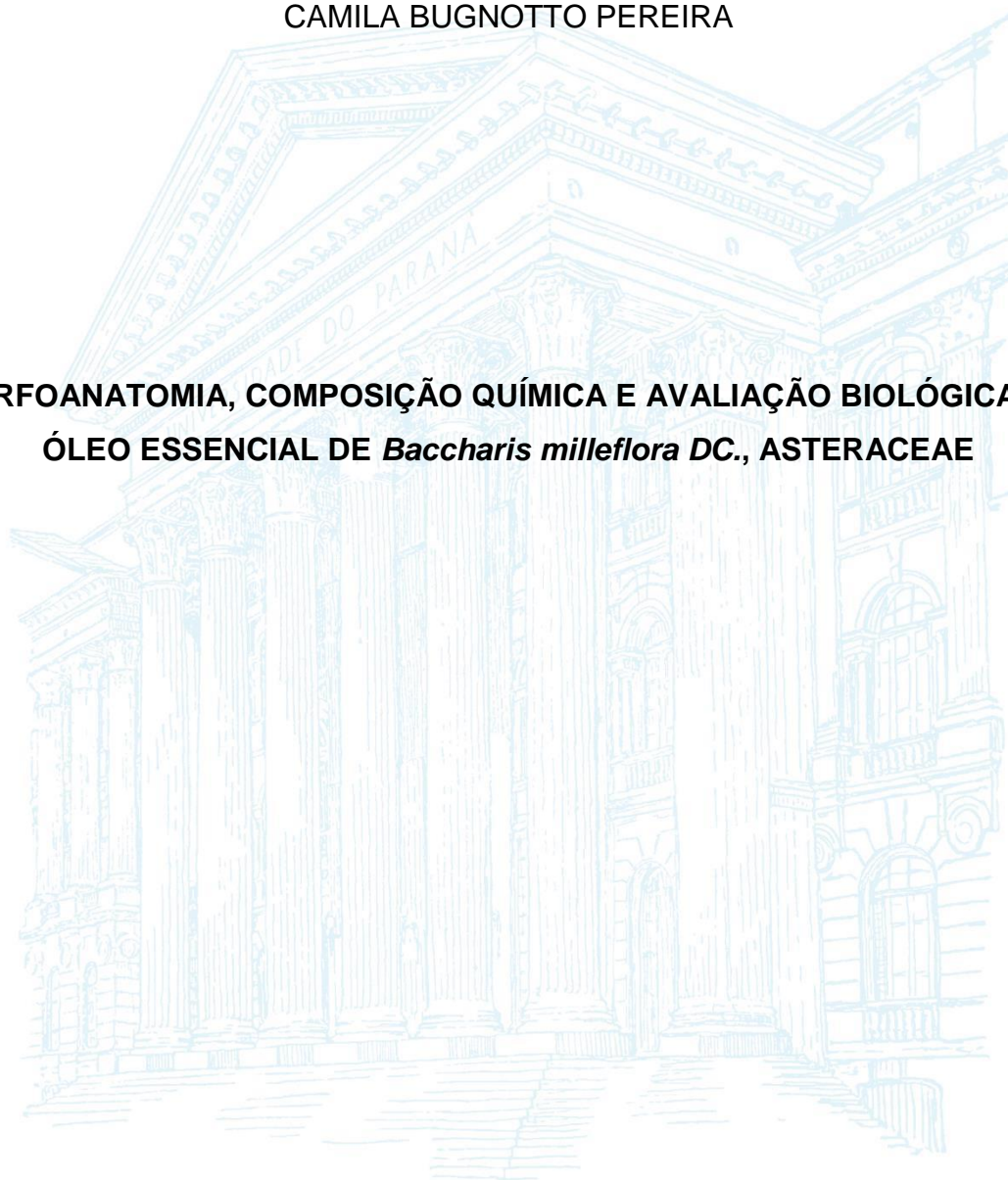


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILA BUGNOTTO PEREIRA

**MORFOANATOMIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* DC., ASTERACEAE**



CURITIBA

2017

CAMILA BUGNOTTO PEREIRA

**MORFOANATOMIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* DC., ASTERACEAE**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago


CURITIBA
2017




TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAMILA BUGNOTTO PEREIRA** intitulada: **MORFOANATOMIA, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* DC., ASTERACEAE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Curitiba, 14 de Junho de 2017.


OBDULIO GOMES MIGUEL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS
Avaliador Externo (UFPR)


BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA
Avaliador Externo (UFPR)


ELIANE CARNEIRO GOMES
Avaliador Interno (UFPR)


VINÍCIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (UNIANDRADE)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Léo Bugnotto (*in memoriam*) e Verani Cielo Bugnotto, meus maiores incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Á Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos.

Aos meus pais Léo (*in memorian*), meu grande amigo que fez o possível e o impossível para que eu tivesse uma educação de qualidade e que mesmo diante das dificuldades me deixava segura de que no final tudo daria certo e a minha mãe Verani pelo amor incondicional, pelo exemplo de mulher e profissional e por sempre me incentivar contribuindo grandemente na minha formação profissional.

Ao meu Amor Isaac, por respeitar minhas escolhas, pelo apoio, incentivo e compreensão em tantos momentos de ausência.

A meu anjinho Davi que chegou para tornar nossa vida mais completa e feliz.

Ao meu irmão Gustavo e a minha família por torcerem e acreditarem que esta etapa seria vencida sem grandes dificuldades.

Aos orientadores Prof^a. Dr^a Marilis Dallarmi Miguel e Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, por quem tenho muito respeito e admiração. Agradeço por terem aceitado me orientar, pela confiança, amizade e incentivo durante o desenvolvimento desse trabalho contribuindo para o meu aprendizado e amadurecimento profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, por ter me recebido com muita prestatividade, pelos ensinamentos, apoio e confiança, tornando possível o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores (as) Dr^a Jane Manfron Budel, Dr^a Beatriz Helena Noronha Sales Maia; Dr. Luís Antônio Esmerino; Dr^a Rosilda Aparecida Kovaliczn, Dr^a Rosi Zanoni da Silva pela colaboração no desenvolvimento desse trabalho.

A professora Dr^a Carla Cristine Kanunfre, por me acolher e dedicar o seu tempo na realização deste trabalho e também as colegas do laboratório de biologia celular, Lívia e Talissa pela amizade e parceria.

A colega e amiga Daniela Gaspardo Folquitto pelo companheirismo e amizade desde início deste trabalho e por sempre estar presente mesmo nos dias mais atarefados.

A colega e amiga Débora Maria Borsato pelo incentivo, amizade e por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho, tornando tudo mais fácil e possível.

Com vocês por perto tive a certeza de que a felicidade é feita de pequenos momentos, inclusive aqueles mais simples como tomar um cafezinho em um dia mais complicado. Sou muito grata por tê-las conhecido.

Aos funcionários e técnicos do laboratório da Universidade Estadual de Ponta Grossa pela ajuda, em especial a Luciane Mendes Monteiro e a Elizabete Munhoz que estavam sempre prontas para me auxiliar e ao seu João pelas inúmeras coletas realizadas.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo empréstimo de seus laboratórios e equipamentos.

À Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade de realização deste trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

Este trabalho só foi possível porque eu tive o apoio de cada um de vocês.

Muito obrigada.

“Feliz daquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina.

RESUMO

Baccharis milleflora (Less.) DC. popularmente conhecida como carqueja, carqueja do lajeado, possui poucos estudos registrados na literatura. É utilizada na medicina popular como diurética e estomáquica. O objetivo desse trabalho foi realizar a análise morfoanatômica, caracterizar o óleo essencial (OE) e avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana, pediculicida, citotóxica e imunomoduladora. Por meio de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura foram evidenciados estômatos anomocíticos e actinocíticos, tricomas glandulares capitados bisseriados, tectores flageliformes simples e dutos secretores de produtos lipofílicos. Os compostos majoritários identificados por CG/EM nas quatro estações do ano foram: trans-cariofileno, α -humuleno, germacreno D e o biciclogermacreno. A atividade antioxidante pelo método DPPH apresentou IC₅₀ entre 15,45 μ g/mL – 21,06 μ g/mL e pelo método ABTS IC₅₀ entre 3,85 μ g/mL – 4,60 μ g/mL. A atividade antioxidante pelo fosfomolibdênio foi de 77,9% a 79,81%. O índice antioxidante pelo TBARS variou de 12,60% a 29,06%. Foi verificada atividade frente a *S. aureus* nas quatro estações por microdiluição em caldo. A atividade pediculicida apresentou um IR de 80,65% e um KT₅₀ de 10,63 min. O OE apresentou citotoxicidade frente às linhagens Jurkat, Raji e HL-60 pelo ensaio de redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e inibiu a proliferação celular (30 e 100 μ g/mL) por afetar o conteúdo de DNA. A 10 μ g/mL diminuiu significativamente o conteúdo de DNA nas três linhagens tumorais mediante o ensaio com o iodeto de propídeo. O óleo essencial a 60 μ g/mL gerou parada em G0/G1 com uma diminuição no número de células nas fases S e G2/M. A coloração com EB/AO e Hoechst 33342 demonstrou que o OE provoca a morte celular por mecanismos de necrose e apoptose. O índice de seletividade de 3,97 obtido reforça a seletividade deste óleo frente às células malignas Raji. Frente às células J774 o óleo essencial (30 e 100 μ g/mL) apresentou moderado efeito citotóxico pelo ensaio do MTT e da sulforodamina com valores de IC₅₀ independentes do tempo de exposição. As células J774 incubadas com OE (8 μ g/mL) apresentaram uma redução estatisticamente significativa na produção de óxido nítrico. A 10 e 20 μ g/mL o OE não inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio nos tempos avaliados. A capacidade fagocítica do OE utilizando partículas não opsonizadas de zimozan foi de aproximadamente 40%, sugerindo atividade imunomoduladora.

Palavras-chave: Antioxidante. *Baccharis milleflora*. Cultura celular. Óleo essencial. Pediculicida.

ABSTRACT

Baccharis milleflora (Less.) DC. popularly known as carqueja, carqueja do lajeado, has few studies registered in the literature. It is used in folk medicine as diuretic and stomatal. The objective of this work was to perform the morphoanatomic analysis, to characterize the essential oil (EO) and to evaluate the antioxidant, antimicrobial, pediculida, cytotoxic and immunomodulatory activities. Scanning electron microscopy and optical microscopy revealed anomocytic and actinocytic stomata, biserial capillary glandular trichomes, simple flagelliform tectonics and secretory ducts of lipophilic products. The major compounds identified by GC/MS in the four seasons were: trans-caryophyllene, α -humulene, germacrene D and bicyclogermacrene. The antioxidant activity by the DPPH method presented IC_{50} between 15.45 μ g/mL - 21.06 μ g/mL and by ABTS method IC_{50} between 3.85 μ g/mL - 4.60 μ g/mL. The antioxidant activity by fosfomolibdenium was 77.9% to 79.81%. The antioxidant index by TBARS ranged from 12.60% to 29.06%. Activity against *S. aureus* was verified in the four seasons by broth microdilution. The repellent activity had a repellency index of 80.65% and a KT_{50} of 10.63 min. Essential oil showed cytotoxicity against the Jurkat, Raji and HL-60 cells by the MTT assay and inhibited cell proliferation (30 and 100 μ g/mL) for affecting the DNA content. At 10 μ g/mL significantly decreased the DNA content in the three tumor lines by the propidium iodide assay. The essential oil at 60 μ g/mL generated a G0/G1 arrest with a decrease in the number of cells in the S and G2/M phases. The staining with EB/AO and Hoechst 33342 demonstrated that EO causes cell death by mechanisms of necrosis and apoptosis. The selectivity index of 3.97 obtained reinforces the selectivity of this oil against the Raji malignant cells. The EO (30 and 100 μ g/mL) presented a moderate cytotoxic effect in J744 cells by the MTT and SRD assay with IC_{50} values independent of the exposure time. J774 cells incubated with EO (8 μ g/mL) showed a statistically significant reduction in nitric oxide production. At 10 and 20 μ g/mL EO did not inhibit oxigen-reactive species production at the times evaluated. The phagocytic capacity of EO using non-opsonized zimozan particles was approximately 40%, suggesting immunomodulatory activity.

Key-words: Antioxidant. *Baccharis milleflora*. Cell culture. Essential oil. Pediculicide.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ASPECTO GERAL DO HABITAT DE <i>Baccharis milleflora</i> (LESS.) DC. ASTERACEAE.....	27
FIGURA 2 -	ASPECTO DA INFLORESCÊNCIA DE <i>Baccharis milleflora</i> DC. ASTERACEAE.....	28
FIGURA 3 -	BIOSSÍNTESE DOS TERPENOS.....	31
FIGURA 4 -	CICLO CELULAR E PONTOS DE CHECAGEM.....	43
FIGURA 5 -	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUMEGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL <i>Baccharis milleflora</i>	60
FIGURA 6 -	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i>	62
FIGURA 7 -	MORFOLOGIA EXTERNA DE <i>Baccharis milleflora</i> DC.,.....	75
FIGURA 8 -	ANÁLISE ANATÔMICA DE <i>Baccharis milleflora</i> DC.,.....	77
FIGURA 9 -	<i>Baccharis milleflora</i> DC., ASTERACEAE. SECÇÃO TRANSVERSAL DA ALA DO CLADÓDIO.....	78
FIGURA 10 -	<i>Baccharis milleflora</i> DC., MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	80
FIGURA 11 -	<i>Baccharis milleflora</i> DC., SECÇÃO TRANSVERSAL DO EIXO CAULINAR.....	81
FIGURA 12 -	<i>Baccharis milleflora</i> DC., ASTERACEAE. DROGA FRAGMENTADA.....	82
FIGURA 13 -	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE OUTONO.....	87
FIGURA 14 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (20-30MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE OUTONO.	88
FIGURA 15 -	CROMATOGRAMA EXPANDIDO (30-40MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE OUTONO.....	89
FIGURA 16 -	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE INVERNO.....	91

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (20-30MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE INVERNO.....	92
FIGURA 18 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (30-40MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE INVERNO.....	93
FIGURA 19 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA.....	95
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (20-30MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA.....	96
FIGURA 21 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (30-40MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA.....	97
FIGURA 22 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE VERÃO.....	99
FIGURA 23 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (20-30MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE VERÃO.....	100
FIGURA 24 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (30-40MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFERENTE À COLETA DE VERÃO.....	101
FIGURA 25 - VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT APÓS A INCUBAÇÃO COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> POR 24, 48 E 72 HORAS, AVALIADA ATRAVÉS DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA POR EXCLUSÃO DE TRIPAN.....	109
FIGURA 26 - VIABILIDADE DAS CÉLULAS RAJI APÓS A INCUBAÇÃO COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> POR 24, 48 E 72 HORAS, AVALIADA ATRAVÉS DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA POR EXCLUSÃO DE TRIPAN.....	110
FIGURA 27 - VIABILIDADE DAS CÉLULAS HL-60 APÓS A INCUBAÇÃO COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> POR 24, 48 E 72 HORAS, AVALIADA ATRAVÉS DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA POR EXCLUSÃO DE TRIPAN.....	110

FIGURA 28 - DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR USANDO UMA SOLUÇÃO DE DIFENILAMINA (DPA) POR MEIO DA MEDIÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA EM CÉLULAS JURKAT (A), HL60 (B), RAJI (C) TRATADAS COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> (3, 10, 30 E 100 mg/mL) E CONTROLE POR 48 HORAS.....	113
FIGURA 29 - IMAGENS DAS CÉLULAS RAJI OBSERVADAS EM MICROSCÓPIO FLUORESCENTE APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO.....	118
FIGURA 30 - VIABILIDADE DOS LINFÓCITOS APÓS A INCUBAÇÃO COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>B. milleflora</i> POR 48 HORAS, AVALIADA ATRAVÉS DO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT.....	120
FIGURA 31 - EFEITO CITOTÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>B. milleflora</i> EM CÉLULAS J774.	122
FIGURA 32 - AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL SOBRE A PRODUÇÃO DE NO ESTIMULADA POR B-INTERFERON 1A (IFN) E POR LIPOPOLISSACARIDEOS (LPS).....	124
FIGURA 33 - EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>B. milleflora</i> NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) ESTIMULADAS POR ZIMOSAN (ZYM).....	126
FIGURA 34 - CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS USANDO PARTÍCULAS NÃO OPSONIZADAS DE ZIMOSAN.....	126

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFENTE À COLETA DE OUTONO.....	86
TABELA 2 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFENTE À COLETA DE INVERNO.....	90
TABELA 3 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFENTE À COLETA DE PRIMAVERA.....	94
TABELA 4 -	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> REFENTE À COLETA DE VERÃO.....	98
TABELA 5 -	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL (OE) DE <i>Baccharis milleflora</i> NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO.....	102
TABELA 6 -	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Baccharis milleflora</i> COLETADA NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO.....	106
TABELA 7 -	ATIVIDADE REPELENTE E FUMEGANTE DO POOL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Baccharis milleflora</i> CONTRA <i>Pediculus humanus capitis</i>	108
TABELA 8 -	CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> PELO ENSAIO DE MTT FRENTE A LINHAGENS CELULARES TUMORAIS APÓS 24, 48 E 72 HORAS.....	111
TABELA 9 -	DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR USANDO O IODETO DE PROPÍDEO (PI) POR MEIO DA MEDIÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA EM CÉLULAS JURKAT, HL-60 E RAJI TRATADAS COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> (3, 10, 30 E 100 mg/mL) E O CONTROLE POR 72Horas.....	114
TABELA 10 -	DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS RAJI NO CICLO CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> (15, 30, 60 µg/mL).....	116
TABELA 11 -	CONTAGEM DE CÉLULAS RAJI VIVAS, NECRÓTICAS APOPTÓTICAS APÓS A COLORAÇÃO CONVENCIONAL COM EB/AO.....	118
TABELA 12 -	IC ₅₀ DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> FRENTE AS CÉLULAS RAJI (CÉLULAS MALIGNAS) E LINFÓCITOS	

	HUMANOS (CÉLULAS NÃO MALIGNAS) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).....	121
TABELA 13 –	IC ₅₀ PARA O ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i> EM CÉLULAS J774A TRATADAS POR 48 E 72 HORAS.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAR	-	Atividade antioxidante relativa
ABAP	-	Cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano
ABS	-	Absorvância
ABTS	-	Ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico)
AO	-	Acredinorange
ATCC	-	American Type Culture Collection
BHT	-	Hidroxitolueno butilado
CBM	-	Concentração Bactericida Mínima
CIM	-	Concentração Inibitória Mínima
CG	-	Cromatografia gasosa
CG-EM	-	Cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massas
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMH	-	Caldo Müeller-Hinton
CMHG	-	Caldo Müeller-Hinton suplementado com 2% de glicose
CO ₂	-	Dióxido de carbono
DCFH-DA	-	Sonda 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína
DMEM	-	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DP	-	Desvio padrão
DPA	-	Solução de difenilamina
DPPH	-	Radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EtBr	-	Brometo de etídio
EM	-	Espectro de massas
EPM	-	Erro padrão da média
EROs	-	Espécies reativas de oxigênio
et al.	-	Expressão latina abreviada et alli, (=e outros)
FAA	-	Formalina, ácido acético e álcool etílico
FID	-	Detector de ionização por chama (flame ionization detector)
HL-60	-	Linhagem celular de leucemia promielocítica
H ₃ PO ₄	-	Ácido fosfórico
IA%	-	Índice de atividade antioxidante em porcentagem

IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IC ₅₀	- Concentração da amostra que inibiu 50% do crescimento celular
IFN	- Interferon
IL	- Interleucina
INCA	- Instituto Nacional de Câncer
IR	- Índice de retenção
IRP	- Índice de repelência
IS	- Índice de seletividade
ISO	- International Standard Organization
J774	- Linhagem celular macrófaga murina
KT ₅₀	- Tempo necessária para a inativação de 50% dos espécimes de <i>Pediculus humanus capitis</i>
LPS	- Lipopolissacarídeo
MDA	- Malondialdeído
MEV	- Microscopia eletrônica de varredura
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NaCl	- Cloreto de sódio
NO	- Óxido nítrico
ORAC	- capacidade de absorção dos radicais oxigenados
PBS	- Solução-tampão fosfato
PI	- Iodeto de propídeo
Raji	- Linhagem celular derivada do linfoma de Burkitt
RPMI	- Meio de cultivo
SBF	- Soro bovino fetal
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SRD	- Sulforodamina
TBA	- Ácido 2-tiobarbitúrico
TBARS	- Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
TCC	- 2, 3, 5 trifetil cloreto de tetrazólio
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
TR	- Tempo de retenção
UFC	- Unidade formadora de colônia
UR	- Umidade relativa
mg	- miligrama

mL	-	mililitro
mmol/L	-	milimol por litro
µg	-	micrograma
µL	-	microlitro
µM	-	micromolar
m/z	-	razão massa/carga
ppm	-	partes por milhão
nM	-	nanomolar
nmol/L	-	nanomol por litro
rpm	-	rotações por minuto
v/v	-	razão volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 FAMÍLIA ASTERACEAE.....	24
3.2 GÊNERO <i>Baccharis</i>	25
3.3 <i>Baccharis milleflora</i> (LESS.) DC.....	26
3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	28
3.5 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS	32
3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	34
3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	37
3.7.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	37
3.7.2 ATIVIDADE PEDICULIDA.....	38
3.7.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	40
3.7.4 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA.....	47
4 MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	52
4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	52
4.2.1 Lâminas semipermanentes.....	52
4.2.2 Testes histoquímicos.....	53
4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	53
4.3 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	53
4.3.1 Extração do óleo essencial dos cladódios de <i>B. milleflora</i>	53
4.3.2 Identificação e quantificação dos compostos voláteis do óleo essencial de <i>B. milleflora</i> por cromatografia gasosa acoplada a detector de massa.....	54
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	54
4.4.1 Atividade antioxidante.....	54
4.4.1.1 Método da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).....	55
4.4.1.2 Método da redução do complexo fosfomolibdênico.....	55
4.4.1.3 Método para a determinação das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	56

4.4.1.4 Método da descoloração do radical catiônico 2,2-azinobis (3 etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS•+)	57
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	57
4.5.1 Microrganismos e preparo do inóculo	57
4.5.1.1 Método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	58
4.6 ATIVIDADE PEDICULICIDA	59
4.6.1 Atividade biológica contra <i>Pediculus humanus capitis</i>	59
4.6.1.1 Coleta, armazenamento e transporte dos <i>Pediculus humanus capitis</i>	59
4.6.1.2 Avaliação da atividade fumegante	60
4.6.1.3 Avaliação da atividade repelente	61
4.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA	62
4.7.1 Ensaio com cultura de células	62
4.7.2 Células e culturas de células	63
4.7.3 Testes de citotoxicidade <i>in vitro</i>	63
4.7.3.1 Ensaio de viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul de Tripán	63
4.7.3.2 Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT)	64
4.7.4. Análise do conteúdo de DNA celular	64
4.7.4.1 Solução de difenilamina (DPA)	65
4.7.4.2 Iodeto de propídio (PI)	65
4.7.5 Ensaio do Ciclo Celular	66
4.7.6 Ensaio de condensação de cromatina	66
4.7.7 Avaliação do processo de morte celular	67
4.7.8 Índice de seletividade	68
4.7.9 Extração de linfócitos humanos	68
4.8 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA	69
4.8.1 Ensaio com cultura de células	69
4.8.2 Células e culturas de células	69
4.8.3 Testes de citotoxicidade <i>in vitro</i>	70
4.8.3.1 Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do MTT	70
4.8.3.2 Ensaio da sulforodamina (SRD)	70
4.8.4 Ensaio para a produção de óxido nítrico (NO)	71

4.8.5 Ensaio para a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	72
4.8.6 Ensaio de fagocitose.....	72
4.8.7 Análise estatística.....	72
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA EXTERNA.....	74
5.2 ANÁLISE ANATÔMICA.....	75
5.2.1 Ala do cladódio.....	75
5.2.2 Eixo caulinar.....	79
5.2.3. Droga.....	82
5.3 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis milleflora</i>	83
5.4 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	102
5.4.1 Atividade antioxidante.....	102
5.4.2 Atividade antimicrobiana.....	106
5.4.3 Atividade Pediculida.....	107
5.4.4 Atividade Citotóxica.....	108
5.4.4.1 Avaliação da integridade de membrana por exclusão de azul de Tripan.....	108
5.4.4.2 Ensaio de redução do MTT.....	111
5.4.4.3 Análise do conteúdo de DNA celular.....	113
5.4.4.3.1 Solução de difenilamina (DPA).....	113
5.4.4.3.2 Iodeto de propídeo (PI).....	114
5.4.4.4 Ensaio do ciclo celular.....	115
5.4.4.5 Coloração EB/AO e Hoechst 33342.....	116
5.4.4.6 Teste do índice de seletividade.....	119
5.4.5 Atividade imunomoduladora.....	121
5.4.5.1 Testes de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	121
5.4.5.2 Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do MTT e da sulforodamina.....	121
CONCLUSÃO.....	128
REFERÊNCIAS.....	130

APÊNDICE 1 - ARTIGO 1: A New Contribution to the Pharmacognostic Study of Carquejas: <i>Baccharis milleflora</i> DC., Asteraceae.....	155
APÊNDICE 2 - ARTIGO 2: Chemical Composition and Biological Activities of <i>Baccharis milleflora</i> Essential Oil.....	162
APÊNDICE 3 - ARTIGO 3: Cytotoxic mechanism of <i>Baccharis milleflora</i> (Less.) DC. essential oil.....	171
ANEXO 1 - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA.....	179
ANEXO 2 - ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO....	182
ANEXO 3 - DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE.....	183

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais utilizadas desde as antigas civilizações para tratar e curar enfermidades tem sido objeto de incessantes estudos de modo que suas ações farmacológicas são comprovadas através de testes científicos pré-clínicos e clínicos (CALIXTO et al., 1990; SAMUELSSON, 1992; CECHINEL, 1995). A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como plantas medicinais “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” e frequentemente são utilizadas *in natura* na forma de chás obtidos por infusão e maceração sendo muitas vezes o único recurso terapêutico de populações carentes. No início da década de 1990 a OMS divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE et al., 1993).

As espécies medicinais também são usadas como fonte de matérias-primas farmacêuticas, como modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos e como material de partida para a produção semi-sintética de moléculas de alta complexidade (BRUSCHI et al., 2000; GARLET, 2000; POSSAMAI, 2000). Desse modo é observado um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos o que pode ser comprovado pelo crescente aumento no número de trabalhos publicados. A pesquisa com plantas envolve diversos estudos como etnofarmacológicos; isolamentos, purificações e caracterização de compostos; investigações farmacológicas; transformações químicas de princípios ativos; relação estrutura/atividade; mecanismos de ação entre outros. Por meio desse conjunto de estudos é possível obter informações que venham a auxiliar na descoberta de novos medicamentos (MACIEL et al., 2002).

No Brasil, a família Asteraceae também conhecida como Compositae pertencente à classe das angiospermas e compreende cerca de 300 gêneros e 2.000 espécies (SOUZA et al., 2005). Segundo Cronquist (1981), são encontradas como ervas, arbustos e árvores estando bem distribuídas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas prevalecendo em formações campestres e montanhosas e menos frequente em formações florestais. Possui grande importância nos cerrados brasileiros devido a sua ampla comercialização (MENDONÇA et al., 1998). Algumas

espécies de Asteraceae são utilizadas na alimentação humana e animal, na produção de cosméticos e como medicinais.

O gênero *Baccharis*, amplamente distribuído nessa família, é conhecido por suas propriedades terapêuticas e aromáticas sendo empregado como diurético, antioxidante, anticarcinogênico, antimicrobiano, anti-inflamatório, entre outros (ALICE et al., 1985; KADA et al., 1985; AVANCI et al., 2000; CIFUENTE et al., 2001; JANUÁRIO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; ABAD et al., 2006; FERRONATTO et al., 2007). Aproximadamente 170 espécies de *Baccharis* são descritas no Brasil, sendo que 80 foram relatadas no estado do Paraná (HEIDEN et al., 2012) e cerca de 102 apresentaram estudos químicos ou farmacológicos de acordo com o levantamento realizado por Verdi et al. (2005). Os principais compostos encontrados nesse gênero foram flavonoides e terpenoides como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos (VERDI et al., 2005).

Entre as espécies pertencentes a esse gênero encontra-se *Baccharis milleflora*, conhecida popularmente como carqueja-do-lajeado. Essa espécie mede entre 0,75 a 2 m de altura e é descrita como um arbusto com caule e ramos eretos trialados, com alas medindo entre 03-05 cm, aplanadas e com folhas atrofiadas. Habita solos rasos, úmidos, banhados e lajeados com água parada. Ocorre nas regiões Sudeste (SP) e Sul (PR, SC e RS) do Brasil e frequentemente forma populações densas em formações abertas e ensolaradas. Os estudos envolvendo *B. milleflora* estão restritos a revisões taxonômicas e a composição química do óleo essencial (JUDD et al., 1999; AGOSTINI et al., 2005; HEIDEN et al., 2009; SCHNEIDER, 2009). Dessa forma, o presente trabalho visa contribuir com informações sobre a composição química, morfoanatômica e medicinal dessa espécie, particularmente do seu óleo essencial, por meio da investigação de diferentes atividades biológicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar a análise morfoanatômica dos cladódios e investigar a composição química, as atividades antioxidante e antimicrobiana sazonalmente e avaliar a ação pediculicida, citotóxica e imunomoduladora do *pool* do óleo essencial de *Baccharis milleflora* DC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Efetuar a coleta dos cladódios de *B. milleflora* em diferentes estações do ano;
- Realizar a análise morfoanatômica dos cladódios de *B. milleflora*;
- Extrair o óleo essencial de *B. milleflora* coletada em diferentes estações do ano, por hidrodestilação;
- Identificar e quantificar os compostos voláteis presentes no óleo essencial de *B. milleflora*, coletadas em diferentes estações do ano, por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa;
- Comparar a constituição dos óleos essenciais obtidos dos cladódios durante o outono, inverno, primavera e verão;
- Avaliar sazonalmente a atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *B. milleflora* (DPPH, complexo fosfomolibdênio, TBARS e ABTS);
- Avaliar sazonalmente a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *B. milleflora* por microdiluição em caldo;
- Determinar a atividade repelente e fumegante do *pool* do óleo essencial de *B. milleflora* contra o *Pediculus humanus capitis*;
- Investigar a ação citotóxica *in vitro* do *pool* do óleo essencial de *B. milleflora* sobre as linhagens tumorais Jurkat, Raji, HL-60;
- Investigar a ação imunomoduladora *in vitro* do *pool* do óleo essencial de *B. milleflora* sobre a linhagem celular J774.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae, também conhecida como Compositae, é a maior família das Magnoliophyta (Angiospermae), compreende 25.000 espécies pertencentes a 1.600 gêneros dispostos em 17 tribos e três subfamílias: Asteroideae, Cichorioideae e Barnadesioideae (BARROSO, 1991; JOLY, 1998; BREMER, 1994). No Brasil, essa família apresenta aproximadamente 300 gêneros e 2.000 espécies (SOUZA et al., 2005).

A inflorescência característica das Asteraceae é o capítulo, formado por flores sésses e estéreis, assentadas sobre um receptáculo comum (BARROSO, 1991; JOLY, 1998; JUDD et al., 1999; SOUZA et al., 2005). Os representantes da família Asteraceae apresentam folhas simples, alternas, opostas ou verticiladas, geralmente inteiras ou ligeiramente denteadas, porém nunca compostas, apresentando a forma de uma espátula (PENNA, 1921). Possuem tricomas glandulares que secretam óleos essenciais. Essas estruturas estão localizadas principalmente em depressões na epiderme e recebem diferentes designações como glândulas, pêlos glandulares e pêlos secretores (SOLEREDER, 1908). As sementes possuem pápus plumosos, apêndices e estruturas de aderência que contribuem para sua dispersão podendo ser encontrada nos mais diversos habitats, preferencialmente em ambientes campestres e em condições climáticas variadas, em regiões tropicais, subtropicais até temperadas, prevalecendo em formações campestres e montanhosas e, menos frequentemente, em formações florestais (CRONQUIST, 1981).

Cronquist (1988), atribuiu o sucesso evolucionário dessa família à produção e variabilidade de metabólitos secundários como derivados de ácido cafeico, flavonoides, alcaloides, associação de poliacetilenos e lactonas sesquiterpênicas e aos terpenoides, do que propriamente a sua morfologia floral especializada. Segundo Jones (1977) e Bremer (1994), esta família é abundante no Sudoeste dos Estados Unidos, México e extremo Sul do Brasil, estando presente também ao longo dos Andes, no Mediterrâneo, Sudoeste e Centro da Ásia, África do Sul e Austrália, sendo considerada cosmopolita (HEYWOOD, 1996). Representa cerca de 20% da flora de regiões Andinas e da Patagônia enquanto na região Amazônica seu número

é insignificante (BARROSO, 1991). As pesquisas envolvendo as Asteraceae iniciaram com o trabalho de Baker (1873), sendo observado um aumento nos estudos quanto à morfologia, anatomia, fitoquímica e também em relação à sua sistemática, o que permite um melhor conhecimento sobre o enquadramento taxonômico de espécies de Asteraceae (HOLMES, 1996; BREMER, 1994).

Muitas espécies são utilizadas na alimentação como o girassol (*Helianthus annuus* L.) e a salsa (*Tragopogon profolius* L.), na produção de cosméticos, inseticidas, corantes e como ornamentais (*Chrysanthemum coronarium* L.). Por outro lado, algumas espécies são indesejáveis pelo fato de invadirem os campos e deslocarem os pastos como é o caso do abrolho (*Xanthium cavanillesii* Schov.) (BURKART et al. 1974). Entre as aplicações terapêuticas das espécies da família Asteraceae, as mais frequentes são: antiflogística, hepatoprotetora, anti-helmíntica, antisséptica e anti-neoplásico, apresentando elevada importância econômica e farmacológica (JONES, 1977; JUDD et al., 1999, BREMER, 1994; SOUZA; LORENZI, 2005).

3.2 GÊNERO *Baccharis*

O gênero *Baccharis* L., compreende cerca de 500 espécies que se apresentam como arbustos medindo 0,5 a 4,0 m de altura, localizadas dos Estados Unidos até a Argentina (GIULIANO, 2001). Aproximadamente 120 espécies estão descritas no Brasil e são encontradas com mais frequência na região Sul (BUDEL et al., 2005). No Rio Grande do Sul quinze espécies do grupo Trimeria foram citadas (DIESEL, 1987), o qual apresenta expansões caulinares ou asas que constituem os cladódios. No Brasil e na Argentina essas espécies são popularmente chamadas de carqueja e apresentam dois ou três cladódios alados que são morfologicamente similares. De acordo com Barroso (1976), os cladódios são características marcantes nas carquejas e desempenham o papel de folhas, as quais estão totalmente ausentes ou reduzidas.

O nome carqueja é utilizado também para as espécies de ramos não alados como *B. tridentata* Vahl, conhecida como carqueja folhuda (CORRÊA, 1984). Entretanto, deve-se salientar que muitas espécies não aladas como *B. patens* Baker, *B. megapotamica* Sprengel e *B. coridifolia* DC., produzem metabólitos secundários

tóxicos como demonstrado no estudo realizado por Sebold e Bianchi (1997) em que houve a morte de até 100% dos camundongos utilizados no estudo.

Várias *Baccharis* tem demonstrado atividades biológicas como *B. crispa* e *B. notoserghila* utilizadas para tratar feridas e inflamações (BANDONI et al., 1978), *B. genistelloides* usada para combater desordens digestivas, malária, úlceras, diabetes, anemia, diarreia, inflamações urinárias, amigdalite, verminoses, entre outras (MELO et al., 2001), sendo essas atividades responsáveis pelo elevado valor sócio-econômico. Contudo, espécies pertencentes a esse gênero também podem apresentar aspectos negativos devido à presença de substâncias tóxicas como os tricotecenos presentes em *B. megapotamica* e *B. coridifolia* e que foram responsáveis pelo óbito de animais após sua ingestão (JARVIS et al., 1991).

No gênero *Baccharis* é comum a ocorrência de equívocos entre diferentes espécies chamadas pelo mesmo nome popular e utilizadas para a mesma finalidade. Pode-se atribuir a ocorrência desses equívocos ao pequeno número de estudos de controle de qualidade e morfoanatomia acarretando prejuízos ainda maiores à saúde. Mentz e Schenkel (1989) relataram diversas contradições nas indicações terapêuticas em bulas de produtos a base de carqueja e ressaltaram também que a semelhança morfológica entre algumas espécies favorece a adulteração.

3.3 *Baccharis milleflora* (Less.) DC.

Baccharis milleflora (Less.) DC., vulgarmente conhecida como carqueja, carqueja-do-lajeado, é usada na medicina popular como diurética e estomáquica (BUDEL et al., 2005). Está distribuída no Sudeste e Sul do Brasil e habita campos secos ou molhados, pântanos, margens de florestas, campos de altitude elevada e locais sombreados. Apresenta afinidade com *B. glaziovii* e *B. apicifoliosa*, pela semelhança na disposição e no tamanho dos capítulos, distinguindo-se pela ausência de limbo foliar e pela maior largura das alas (HEIDEN et al., 2009; SCHNEIDER, 2009) (FIGURA 1).

FIGURA 1 – ASPECTO GERAL DO HABITAT DE *Baccharis milleflora* (LESS.) DC. ASTERACEAE

FONTE: A autora (2013).

Pelo enquadramento taxonômico proposto por De Candolle (1836), *Baccharis milleflora* DC. pertence ao grupo das dicotiledôneas, a classe das Equisetopsidas, subclasse Magnoliidae, subordem Asteranae, ordem Asterales, Família Asteraceae, gênero *Baccharis*. De acordo com Heiden et al. (2009), seu nome significa mil flores, relativo as inúmeras flores e inflorescências. Floresce de setembro a fevereiro, na primavera e verão, frutificando logo após (HEIDEN et al., 2009; SCHNEIDER, 2009) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – ASPECTO DA INFLORESCÊNCIA DE *Baccharis milleflora* (LESS.) DC. ASTERACEAE

FONTE: Heiden (2014).

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

O Brasil está entre os maiores produtores de óleo essencial ao lado da Índia, China e Indonésia. Antigamente, o país exportava grandes quantidades de óleo essencial de pau-rosa, sassafrás e menta. De acordo com Coppen (1995), em 1995 o Brasil era o único fornecedor de óleo essencial de pau-rosa (*Aniba roseodora* var *amazonica* Ducke) e a sua posição de destaque na produção e exportação devia-se principalmente aos óleos essenciais cítricos provenientes da indústria de sucos.

A designação de “óleo” é devido ao fato de serem líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, tendo como principal característica a volatilidade, diferenciando-os dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente de sementes, como, por exemplo, soja, mamona e girassol. Possuem aroma agradável e intenso, em geral são pouco estáveis, principalmente na presença de ar, calor, luz, umidade e metais. São incolores ou claros, com sabor

ácido e picante, imiscíveis com a água e solúveis em solventes apolares como o éter (SIMÕES; SPITZER, 2003).

Os óleos essenciais são definidos como misturas complexas de baixo peso molecular que podem conter de 20 a 60 ou mais compostos diferentes, nas mais variadas concentrações, sendo alguns altamente voláteis e capazes de gerar sabores e/ou aromas. Geralmente possuem dois ou três compostos majoritários em concentração elevada quando comparados com os demais, presentes somente em traços, podendo esses compostos em quantidades ínfimas serem fundamentais para a ação farmacológica dos demais (BAKKALI et al., 2008; GALINDO et al., 2010).

Os óleos essenciais são encontrados isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Os produtos retificados são aqueles que foram submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; os que foram parcialmente desterpenados são chamados de concentrados e aqueles dos quais foram retirados quase a totalidade dos terpenos são ditos desterpenados (BRASIL, 2007). Os óleos essenciais atuam como uma barreira química produzindo compostos tóxicos ou repelentes, liberando exsudatos que formam camadas contínuas na superfície foliar, aumentando a refração de luz e diminuindo a temperatura, atuam ainda na atração de polinizadores (SIMÕES; SPITZER, 2003).

Podem ser extraídos de diferentes partes das plantas como frutos, flores, cascas, troncos, galhos, raízes, rizomas e sementes, entretanto, sua composição química pode variar assim como as características físico-químicas e os odores (ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2000). A composição química de um óleo essencial quando extraído de um mesmo órgão de uma mesma espécie pode variar significativamente, sendo influenciada por fatores como estágio de desenvolvimento, condições climáticas, solo e época de coleta (REIS et al., 2003; SIMÕES; SPITZER, 2003).

Há diversas maneiras de obter o óleo essencial como a “enfleurage”. Nesse processo as pétalas das flores são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante um período de tempo. Essas pétalas são esgotadas e substituídas por novas até a saturação total quando a gordura é tratada com álcool e assim obtido um óleo de elevado valor comercial (SIMÕES et al., 2007; BANDONI et al., 2008).

Para se extrair pequenas quantidades pode ser empregado o aparelho de Clevenger, sendo esse um procedimento clássico. Existe ainda a extração com solventes orgânicos, porém, ocorre simultaneamente a extração de outros compostos lipofílicos não agregando valor comercial. Para a extração de óleos essenciais de frutos cítricos é utilizada a prensagem. Por fim, existe ainda a extração por CO₂ supercrítico que permite recuperar os aromas naturais de vários tipos e não somente do óleo essencial, de um modo bastante eficiente, sendo muito utilizado pela indústria (SIMÕES et al., 2007; BANDONI et al., 2008).

A qualidade dos óleos essenciais é influenciada por vários fatores como condições ambientais, variabilidade de sua composição, adulteração através da adição de compostos sintéticos e até mesmo a falsificação completa do óleo essencial (SIMÕES, 2002). Algumas propriedades como o índice de refração e atividade óptica podem ser utilizadas para auxiliar no controle de qualidade (SIMÕES; SPITZER, 2007). O óleo obtido de uma planta pode ser utilizado como característica para aquela espécie. Embora muitos óleos diferentes apresentem compostos qualitativamente iguais, as diferenças quantitativas farão com que aquele óleo tenha propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais (TROMBETTA et. al, 2005; EDRIS, 2007).

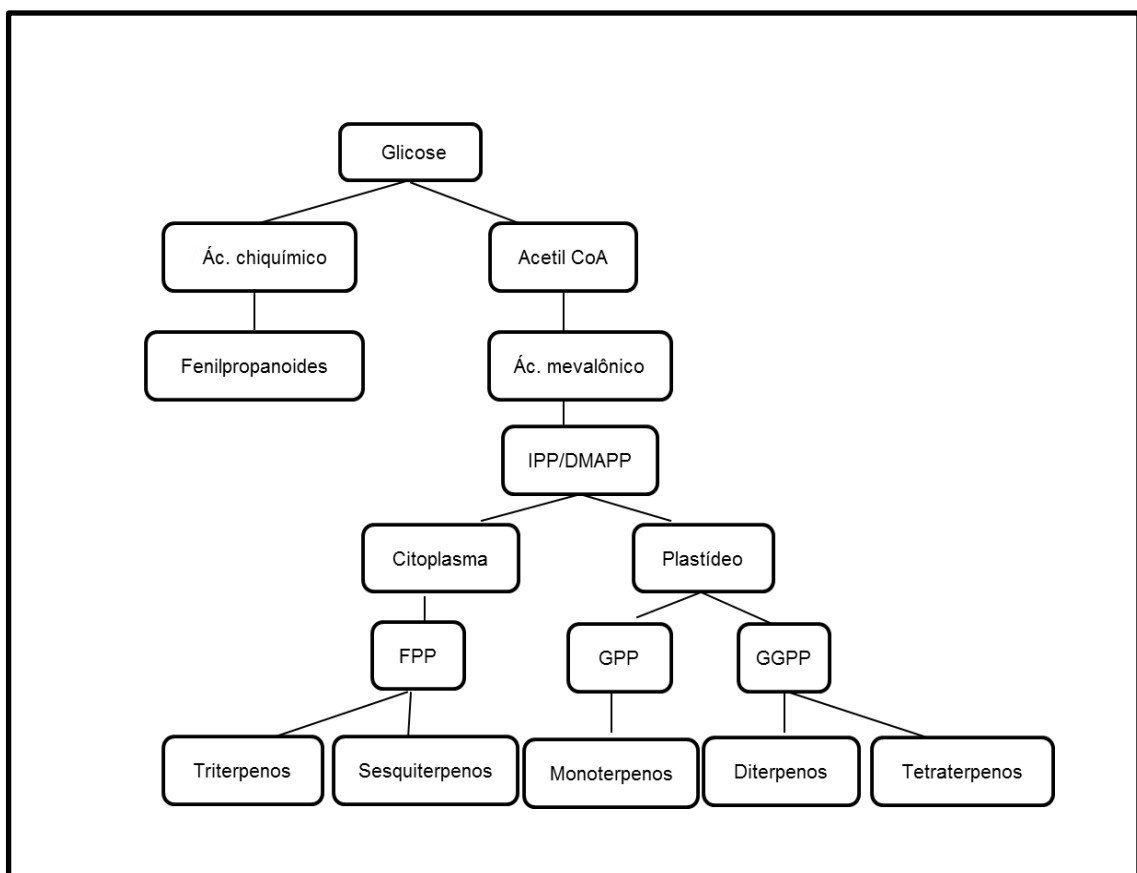
Conforme relata Bandoni (2008), as propriedades farmacológicas atribuídas aos óleos essenciais são diversas e de extrema valia principalmente quando comparadas aos medicamentos, como por exemplo, a sua volatilidade, que os torna ideais para uso em nebulizações, banhos de imersão ou simplesmente em inalações. Devido a sua volatilidade e ao baixo peso molecular de seus compostos eles podem ser rapidamente eliminados do organismo por meio das vias metabólicas. Outras atividades já foram comprovadas nos óleos essenciais como antiviral, antisséptica, nutricional, antifúngica, bacteriostática e/ou bactericida, sendo essa última atribuída principalmente aos compostos terpenoides (BURT, 2004).

Os compostos presentes nos óleos essenciais são formados via ácido mevalônico por derivação química de terpenoides ou a partir dos fenilpropanoides provindos do ácido chiquímico (SIMÕES et al., 2000). A via do mevalonato ocorre preferencialmente no citoplasma das células e sua origem biossintética pode ser resumida pelo metabolismo da glicose pela via do acetato e reduzido a mevalonato através de uma reação irreversível, na qual o mevalonato é convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP) ou isopreno e o seu isômero dimetilalil-pirofosfato

(DMAPP) (DESCHAMPS, 2005). A formação do IPP pode ocorrer por duas rotas biossintéticas: a primeira via do mevalonato conforme descrita acima e a via alternativa ou via do metileritritol fosfato (MEP), que origina os monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos, a qual ocorre preferencialmente nos plastídeos e tem como precursores piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (AHARONI et al., 2006).

A partir da formação do IPP e DMAPP ocorre a formação dos esqueletos carbonados dos terpenoides através da condensação de um número variável de unidades de isopreno. A condensação do tipo cabeça-cauda forma o geranyl-pirofosfato (GPP) que dará origem aos monoterpenos (C_{10}), farnesil-pirofosfato (FPP) que formará os sesquiterpenos (C_{15}) e triterpenos (C_{30}) e o geranylgeranyl-pirofosfato (GGPP) que dá origem aos os diterpenos (C_{20}) e tetraterpenos (C_{40}) (ROHDICH et al., 2003; DESCHAMPS, 2005). A via biossintética dos terpenos é ilustrada na figura 3.

FIGURA 3 - BISSÍNTESE DOS TERPENOS



FONTE: Adaptado de SIMÕES et al., 2004 e DESCHAMPS, 2005.

Diversos métodos são utilizados para a separação e identificação dos compostos presentes nos óleos essenciais, como a espectroscopia na região do ultravioleta (UV) e do infravermelho (IV), a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e de carbono (RMN¹³C), a espectrometria de massas e também as técnicas cromatográficas como a cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em coluna e a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (SILVERSTEIN, 2007).

A cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa é muito utilizada para a identificação devido ao baixo peso molecular dos compostos presentes no óleo essencial. Nesse método o óleo essencial é injetado no cromatógrafo sem nenhum tratamento anterior a fim de eliminar possíveis alterações na composição do óleo. Após a injeção, os componentes do óleo essencial se separam e penetram no espectrômetro de massas que registra o espectro de cada uma das substâncias separadas. Os constituintes do óleo essencial são identificados por comparação de seus espectros de massas com os do banco de dados das bibliotecas. Os espectros de massas de muitos componentes estão disponíveis em bases de dados como a biblioteca Adams (SERAFINI, 2002). Através da CG/MS é possível realizar em uma única operação a análise qualitativa junto com a indicação das proporções em que se encontram os componentes. A calibração do equipamento com uma substância padrão possibilita uma análise quantitativa exata da amostra (BANDONI, 2008).

3.5 ESTUDOS MORFOANATÔMICOS

Em decorrência do crescente aumento na utilização de plantas medicinais para tratar diversas enfermidades é imprescindível a realização de estudos de controle de qualidade a fim de assegurar a correta identificação das espécies. Entre esses estudos está a análise morfoanatômica que permite a correta identificação e diferenciação de uma espécie das demais, possibilitando a determinação da autenticidade do material e a verificação da presença de adulterantes na amostra. Segundo a Portaria nº 06, de 31 de janeiro de 1995 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, desde a década de 1990, ficou determinado a obrigatoriedade do controle botânico de qualidade de drogas vegetais comercializadas pela indústria

farmacêutica, visando diminuir o risco com o uso de espécies incorretas (BRASIL. Ministério da Saúde, 1995).

Beltrame et al. (2009), realizou um estudo com 12 amostras comerciais de carquejas indicadas como diuréticas e estomáquicas (*Baccharis trimera* L.). As amostras eram vendidas em estabelecimentos farmacêuticos no Estado do Paraná e utilizadas sob a forma de chás. Nesse estudo foram avaliados parâmetros de qualidade preconizados pela Farmacopéia Brasileira como as características dos rótulos e bulas, análise sensorial, autenticidade das amostras, presença de material estranho e doseamento de marcadores químicos. Os resultados demonstraram que todos os produtos avaliados apresentaram algum tipo de irregularidade segundo os códigos oficiais, comprometendo a segurança e a eficácia do tratamento.

Conforme consta na Farmacopeia Brasileira IV, *Baccharis trimera* pertence ao grupo Trimera e possui atividade anti-inflamatória, analgésica, bacteriostática, bactericida e antidiabética, entretanto, essa espécie é frequentemente confundida com *B. microcephala* e utilizada pela população para as mesmas finalidades terapêuticas. Através do trabalho realizado por Budel et al. (2009), foi possível analisar a morfologia externa e a anatomia dos cladódios dessas duas espécies auxiliando na identificação e na diferenciação das mesmas, contribuindo para o controle de qualidade e auxiliando na caracterização do grupo taxonômico.

É frequente a confusão entre diferentes espécies de uso medicinal, como é o caso das carquejas. Pertencentes ao gênero *Baccharis* e comumente utilizadas sem distinção de espécies, elas vem sendo alvo do extrativismo devido ao seu difundido uso popular (BONA et al., 2002). As diferentes espécies de carquejas muitas vezes são encontradas próximas umas das outras e são constantemente coletadas e misturadas. Elas apresentam dificuldades de identificação até mesmo por especialistas, sendo que muitas espécies apresentam expansões caulinares ou alas que constituem os cladódios. Essas estruturas desempenham o papel de folha, a qual está ausente ou totalmente reduzida sendo considerados caules modificados com função de fotossíntese (BARROSO, 1976; BUDEL et al., 2005).

Estudos morfoanatômicos com os órgãos vegetativos aéreos de *Baccharis*, utilizados com fins farmacognósticos, apontaram características comuns a muitas espécies como o tipo de estômato, tricoma, cristais de oxalato de cálcio, ductos secretores e amido (ARIZA; ESPINAR, 1973; BARROSO, 1976; OLIVEIRA; BASTOS 1998; BUDEL et al., 2003;). Essas características semelhantes podem

contribuir para a confusão entre as diferentes espécies, sendo necessário um estudo minucioso com o levantamento de informações botânicas, ensaios macroscópicos, microscópicos e a determinação de marcadores químicos específicos (FARIAS, 2003).

São utilizados também testes microquímicos que auxiliam na identificação da composição química da planta e na localização das substâncias de interesse, sendo testes simples e de baixo custo (LUSA, 2010). Os testes histoquímicos são métodos de análise qualitativa e quantitativa de componentes celulares como compostos lipofílicos, compostos fenólicos, lignina e amido. Esses testes são baseados em reações cromáticas utilizadas no reconhecimento da natureza química das membranas e no conteúdo celular (COSTA; CUNHA, 2000; GERSBACH, 2002). Todas essas análises em conjunto permitem distinguir uma espécie vegetal de outra (FIUZAI, 2010).

De acordo com Bosabalidis e Kofidis (2002), as características estruturais que auxiliam na identificação das espécies podem ser influenciadas pelos nutrientes, pelas condições do solo, da água, da luz, da temperatura, levando se necessário a adaptações na folha como diminuição do tamanho, enrolamento, aumento do número de tricomas, estômatos profundo, acúmulo de mucilagem e outros metabólitos a fim de garantir sua sobrevivência.

3.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Inúmeras pesquisas são desenvolvidas constantemente para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como o envelhecimento, aterosclerose, inflamação, câncer, entre outras (FERREIRA et al., 1997). Radical livre é um átomo ou molécula altamente reativo que contém um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica e esse desemparelhamento de elétrons da última camada confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (HALLIWELL et al., 1990; HALLIWELL, 1992; FERREIRA et al., 1997).

No organismo os radicais livres estão envolvidos na produção de energia, na fagocitose, na regulação do crescimento celular, na sinalização intercelular e na síntese de substâncias biológicas importantes. Dessa forma, a produção dos radicais livres se deve em parte ao nosso metabolismo ou devido a alguma disfunção biológica (BARREIROS et al., 2006). O excesso na sua produção causa

efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas e carboidratos (HUSAIN et al., 1987).

Uma grande variedade de compostos assume a função de intervenção no processo oxidativo sendo denominados agentes antioxidantes. Os óleos essenciais e seus compostos isolados são conhecidos como excelentes antioxidantes naturais podendo substituir os antioxidantes sintéticos (BOZIN et al., 2006). Essa atividade antioxidante está relacionada com o fato de sua composição química ser rica em compostos fenólicos (TOMAINO et al., 2005). Na indústria alimentícia são empregados na conservação dos alimentos pelo fato de seu uso não contrastar com seu aroma (RUBERTO; BARATA, 2000). Devido a essa propriedade também são utilizados pela indústria farmacêutica (HENRIQUES et al., 2009).

Diversos trabalhos tem sido realizados com os óleos essenciais obtidos de diferentes espécies como no estudo realizado por Schossler et al. (2006), com *Baccharis punctulata* e *Eupatorium laevigatum*, no qual ambos os óleos apresentaram atividade antioxidante pelo teste da carbonila em plasma humano. Bressan (2014), encontrou atividade antioxidante para *Baccharis burchellii* Baker através dos ensaios do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC). Por meio do método do tiocianato férrico também foi comprovada a atividade antioxidante no óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L, conhecida popularmente por alfavaca e utilizada na medicina e na culinária. A porcentagem de inibição da oxidação lipídica foi de 92,44% (PEREIRA et al., 2007).

De acordo com Alves et al. (2010), os diferentes tipos de radicais livres e as diferentes formas de atuação nos organismos vivos requerem variados métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais. Os mais utilizados são o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila); ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico); determinação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), redução do íon férrico (FRAP) e redução do complexo fosfomolibdênio (THAIPONG et al., 2006).

O DPPH é um radical livre e estável à temperatura ambiente que produz uma coloração violeta quando em contato com etanol. Esse radical é reduzido na presença de uma molécula de antioxidante doadora de hidrogênio, portanto, sua atividade baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (KUSKOSKI et al., 2005). Neste teste, a ação do radical DPPH é

acompanhada pelo monitoramento da diminuição da absorvância a 515 nm (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Utilizando o método de DPPH, foram analisadas as atividades antioxidantes dos óleos das folhas e inflorescências de *Eupatorium polystachyum* DC. O ensaio demonstrou que na diluição 1:10 em éter etílico (v/v) tanto o óleo volátil das folhas como das inflorescências foram capazes de capturar os radicais existentes, neutralizando-os, confirmando a atividade antioxidante (SOUZA et al., 2007). A ação antioxidante dos óleos essenciais de *Caryophyllus aromaticus* L., *Cymbopogon winterianus* Jowitt e *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats var. *motia* Burk. foi avaliada pelo mesmo método e revelou uma forte atividade antioxidante para o óleo *C. aromaticus*, entretanto, *C. winterianus* e *C. martinii* apresentaram moderada atividade antioxidante (SCHERER et al., 2009).

Ambos os métodos DPPH e ABTS são caracterizados pela excelente reprodutibilidade sob condições estabelecidas, entretanto, podem apresentar diferenças significativas em suas respostas antioxidantes. O radical ABTS pode ser gerado por meio de uma reação química, eletroquímica ou enzimática, permitindo avaliar a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

Através do método proposto por Kishida et al. (1993), é possível avaliar a capacidade de uma amostra em inibir a peroxidação lipídica, ou seja, inibir a formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) induzida por um agente oxidante (ABAP - cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano) em um substrato rico em lipídeos que pode ser a gema de ovo. Os ácidos graxos poli-insaturados presentes na gema do ovo podem sofrer auto-oxidação ou degradação enzimática formando o malondialdeído (MDA) que reage com o ácido tiobarbitúrico em altas temperaturas e baixo pH formando um complexo cor-de-rosa que representa a quantidade de lipídios oxidados e que pode ser medido espectrofotometricamente.

Outro método simples e de baixo custo frequentemente utilizado para verificar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos é por meio do ensaio do fosfomolibdênio (PRIETO et al., 1999). Esse ensaio é baseado na redução do molibdênio VI a molibdênio V pela amostra tornando-se verde à medida que se reduz e determinado espectrofotometricamente.

3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

3.7.1 Atividade antimicrobiana

O surgimento e a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais tem incentivado a comunidade científica na pesquisa de princípios ativos novos e com baixa toxicidade (MENDES et al., 2011). Diversos estudos relatam que bactérias sensíveis a determinadas drogas tornaram-se resistentes demonstrando habilidade genética em transmitir e adquirir resistência (SAKAGAMI et al., 2002; NASCIMENTO et al., 2000).

As plantas medicinais são muitas vezes usadas pela população associadas aos medicamentos convencionais, sendo que seus efeitos se devem principalmente a inibição ou intensificação do efeito terapêutico desses medicamentos (NASCIMENTO et al., 2000). Esse uso associativo pode comprometer o tratamento e dificultar o diagnóstico, visto que o paciente não informa ao serviço de saúde a associação por ele realizada (OLIVEIRA et al., 2005).

Os efeitos terapêuticos provenientes do uso de plantas medicinais se devem aos compostos produzidos durante o metabolismo secundário como os óleos essenciais, os quais atuam protegendo a planta contra microrganismos, predadores e também atuam na atração de agentes polinizadores (CURIONI, 2006). Para Dorman et al. (2000), a atividade antimicrobiana exercida por compostos isolados como os terpenoides, presentes nos óleos essenciais, está relacionada com a estrutura química, com os grupos funcionais e com a estereoquímica dos compostos.

De acordo com Kalemba et al. (2003), a ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ocorrer por três mecanismos: através da interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular da bactéria, pelo aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares e ainda por alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, como os envolvidos na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais, ou destruição do material genético.

Pesquisadores têm avaliado o efeito dos compostos naturais em microrganismos causadores de doenças por vários métodos como difusão em ágar, difusão em disco de papel, bioautografia e microdiluição. O método da bioautografia é utilizado na determinação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Este

método reúne a cromatografia em camada delgada com a difusão em ágar e permite a determinação do potencial antimicrobiano de uma substância de forma qualitativa (VALGAS, 2002). Por meio da bioautografia foi comprovada a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogum citratus* DC. Stapf frente a *Staphylococcus aureus*; *Aspergillus niger*; *Candida albicans*; *Escherichia coli*; *Bacillus subtilis*; *Enterococcus faecalis* (PEREIRA, 2010).

O ensaio de microdiluição em caldo permite determinar a concentração mínima de um agente necessária para inibir o crescimento ou matar um microrganismo. Nesse ensaio os agentes antimicrobianos são testados em diluições consecutivas sendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM), a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo. Esse ensaio é considerado uma excelente ferramenta para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e, portanto, usado para julgar o desempenho de todos os outros métodos de susceptibilidade (ANDREWS, 2001).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Curcuma longa* L. e *Achillea millefolium* L., foi verificada frente a 20 cepas de microrganismos isolados de material humano. Por intermédio dos testes de microdiluição em caldo, os óleos de *A. millefolium* e de *C. longa* demonstraram ação antimicrobiana moderada ($0,625 \text{ mg mL}^{-1}$) em 63,2% e 68,4% das leveduras testadas, respectivamente (RIBEIRO et al., 2010). Pelo mesmo método foi investigada e comprovada a atividade antimicrobiana das folhas de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus* frente às cepas Gram-positivas testadas, porém, não foi evidenciada atividade frente às cepas Gram-negativas nas concentrações testadas, o que permite aferir atividade bacteriana de estreito espectro (MURARI et al., 2008). Dessa forma, evidencia-se que os óleos essenciais provenientes da família Asteraceae são metabólitos secundários de potencial interesse clínico.

3.7.2 Atividade pediculicida

A Pediculose é uma doença frequente tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos tornando-se um sério problema de saúde pública em todo o mundo. Essa patologia é causada pelo *Pediculus humanus* capitis conhecido popularmente como piolho de cabeça. O *P. humanus* capitis é um ectoparasita hematófago que mede aproximadamente 3 mm de comprimento e que desenvolve

todo seu ciclo de vida no ser humano (KO; ELSTON, 2004; NUNES et al., 2014). A infestação prevalece em ambientes escolares através do contato físico e corporal e é caracterizada por intenso prurido podendo ocasionar dermatite e infecções secundárias no couro cabeludo. Também podem ser encontradas escoriações nas costas dos pacientes logo abaixo da nuca (SHOLDT et al., 1979; GRATZ 1997; BORGES; MENDES, 2002; TOLOZA et al., 2006; JEONG-MIN et al., 2010).

O diagnóstico da pediculose é feito pela visualização dos piolhos na área acometida e pela presença dos ovos desses parasitas (lêndeas) aderidos aos cabelos e pelos. Através de medidas educacionais é possível prevenir e obter sucesso no tratamento, no entanto, a maioria das instituições escolares não possuem normas padronizadas para o manejo dessa ocorrência levando ao uso indiscriminado de produtos pediculicidas (TOLOZA et al., 2006).

Apesar dos efeitos prejudiciais causados pelos inseticidas sintéticos produzidos a partir de produtos organofosforados e piretróides, eles continuam sendo prescritos pelos médicos. Muitas crianças que realizam o tratamento mantem a infestação e isso ocorre devido à resistência dos insetos aos medicamentos disponíveis e também pela reinfestação no ambiente escolar, levando a desistência do tratamento (YANG et al., 2004; TOLOZA et al., 2006; VIDOTTO et al., 2013).

Diversos estudos tem relatado a pesquisa de substâncias vegetais capazes de controlar a pediculose como uma alternativa aos inseticidas sintéticos. De acordo com Toloza et al. (2006), os óleos essenciais não apresentam efeitos tóxicos permanecendo menos tempo no ambiente e com certa seletividade sobre os organismos. Yang et al. (2004), verificaram o efeito de monoterpenoides e terpenoides obtidos do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* frente ao *Pediculus humanus capitis* por meio do bioensaio de contato direto e da atividade fumegante. Através do bioensaio de contato foi possível verificar uma atividade pediculicida mais pronunciada com o óleo essencial em relação aos pediculicidas comumente utilizados (δ -fenotrina e o pyrethrum). Os monoterpenoides demonstraram-se eficazes nos ensaios de fumegância enquanto que os pediculicidas usuais não demonstraram atividade fumegante.

Outros estudos também exibiram a atividade pediculicida dos óleos essenciais de diferentes espécies, como é o caso do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae), que possui entre os compostos majoritários o (E)-nerolidol e (E)-anetol, o qual apresentou um considerável efeito no controle do *P. humanus*

capitis (LIMA et al., 2008). Esses achados incentivam a comunidade científica na pesquisa por substâncias capazes de controlar a Pediculose principalmente em crianças em idade escolar.

3.7.3 Atividade citotóxica

O século XX foi marcado por um expressivo aumento na busca por substâncias com atividades antitumorais. As pesquisas possibilitaram o desenvolvimento de drogas utilizadas até os dias atuais nas terapias antineoplásicas (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Segundo Harvey (2008), aproximadamente 60% dos fármacos utilizados no tratamento do câncer provém de produtos naturais.

As neoplasias malignas são responsáveis pelo óbito de milhões de pessoas anualmente e estão entre as principais preocupações de saúde pública. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) o câncer é como um conjunto de doenças causadas pelo crescimento desordenado (maligno) de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Essas células se dividem rapidamente e tendem a ser muito agressivas resultando na formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. De maneira geral, quanto mais rápido for o crescimento e mais indiferenciada for a célula tumoral maior a malignidade da neoplasia (BERRIDGE et al., 2010). Ao contrário do câncer, um tumor benigno é simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam lentamente e se assemelham ao seu tecido original. São auto-limitadas em seu crescimento, não invadem tecidos adjacentes e raramente constituem risco de vida (INCA, 2004).

O processo de carcinogênese geralmente se desenvolve lentamente e é dividido em três etapas. O início do processo ou a primeira etapa pode ocorrer por uma mutação, devido a fatores ambientais ou herdado da linhagem germinativa. Uma única célula que sofreu lesão genética pode, por meio da expansão clonal, resultar em uma massa tumoral. Na segunda etapa, os agentes oncopromotores agem sobre a célula geneticamente alterada. A lesão celular causada pode: ativar os proto-oncogenes promotores do crescimento; ativar os genes supressores de tumor; ativar os genes que regulam a morte celular programada (apoptose) e ainda ativar os genes de reparo ao DNA. Os proto-oncogenes são genes inativos em células normais, mas que uma vez ativados transformam-se em oncogenes responsáveis

pela malignização de células normais. Estas células malignas passam a se comportar de maneira desordenada, multiplicando-se descontroladamente. Assim, a última etapa é caracterizada pelo crescimento excessivo da massa tumoral com início de sintomas clínicos, invasão local e capacidade de migrar para outros tecidos originando as metástases (COTRAN et al., 2010).

Diferentes tipos de câncer já foram identificados e correspondem aos diferentes tipos de células e órgãos. Os mais frequentes são os de pele, pulmão, mama, fígado, estômago, rim, ovário, cérebro e próstata. Nos tecidos epiteliais como as mucosas o câncer é denominado de carcinoma, já nos tecidos conjuntivos como ossos, músculos ou cartilagens é chamado de sarcoma (SOUZA et al., 2004).

O diagnóstico é realizado através da biópsia do material investigado aliado a radiografia, exames de sangue, tomografia, endoscopia, entre outros. Por meio deles é possível identificar o tipo de célula que está em proliferação, sua graduação histológica e outras características que irão auxiliar na escolha do tratamento correto. Muitos tipos de câncer podem ser tratados com sucesso. As terapias antitumorais geralmente envolvem uma combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia (INCA, 2004).

Os antineoplásicos atuam sobre o ciclo celular inibindo a hiperproliferação das células tumorais e dessa forma estimulam a indução da apoptose, que é o resultado buscado na quimioterapia. As drogas podem agir por diferentes mecanismos de ação como interferência na síntese de DNA; indução de dano ao DNA e inibição da função do fuso mitótico, entre outros (SCHIMIDT et al., 2007). O tratamento pode ser realizado através da administração de fármacos isolados (monoquimioterapia) ou pela combinação desses (poliquimioterapia). A poliquimioterapia proporciona uma melhor resposta a cada aplicação, pois atinge as células em diferentes fases do ciclo e diminui o risco de resistência farmacológica (CARVALHO et al., 2003).

A compreensão do ciclo celular e seus mecanismos são fundamentais para entendermos o desenvolvimento das neoplasias. O ciclo celular é dividido em duas fases principais, a interfase e a mitose. A interfase é o período presente entre as divisões celulares, nesse período a célula não se encontra em divisão, porém, em seu interior ocorrem muitos eventos, os quais foram divididos em subfases conhecidas por fase G1 (*gap 1*), fase S (síntese) e fase G2 (*gap 2*), tendo também uma fase anexa, a G0 (quiescente). Na fase G1 inicia-se a preparação para a

divisão celular. As células aumentam de tamanho, ocorre a condensação dos cromossomos e síntese de proteínas. A fase S é a mais importante, pois ocorre a replicação do DNA de forma que a célula duplique precisamente seus cromossomos. Após a replicação, inicia-se a fase G2, que compreende o intervalo entre a síntese de DNA (Fase S) e a mitose, a célula continua a crescer em tamanho e a produzir proteínas, ocorre a síntese de componentes necessários para a mitose como, por exemplo, o fuso mitótico. Ao final dessa fase a célula completa seu crescimento e está preparada para a mitose (ALBERTS et al., 2011; VERMEULEN et al., 2003; DE ALMEIDA et al., 2005).

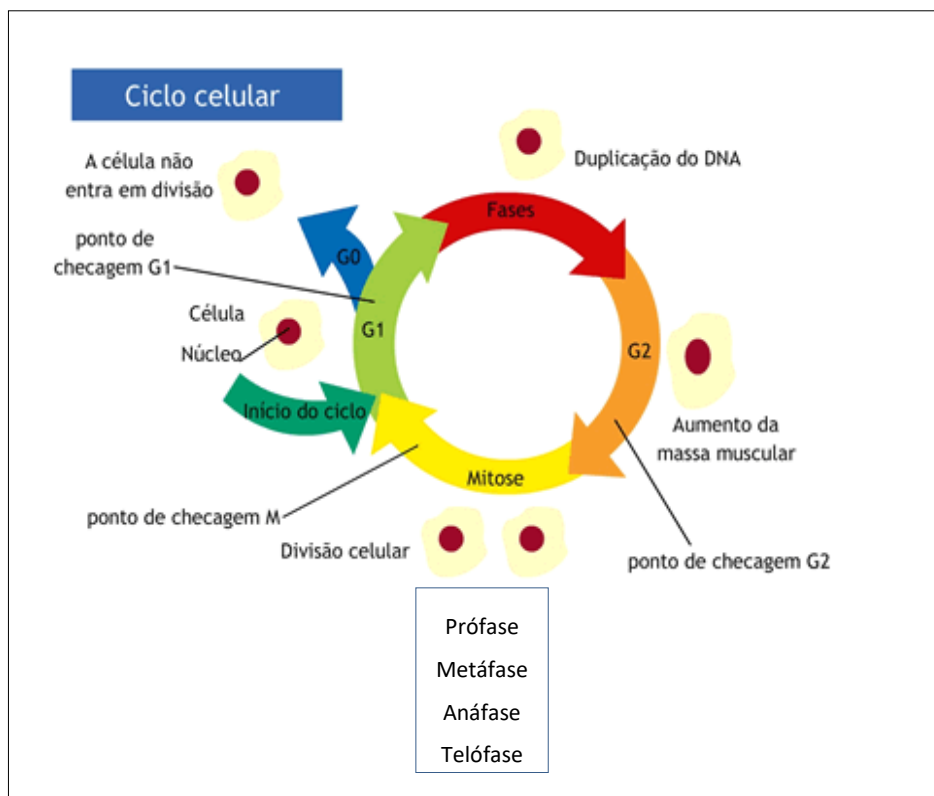
A célula que não está se replicando encontra-se na fase G0 ou quiescência. A fase G0 representa uma “pausa” no ciclo celular, apesar de as células estarem metabolicamente ativas, o DNA encontra-se altamente enovelado e a atividade nuclear é baixa. As células que já atingiram um estágio final de desenvolvimento e não precisam mais se dividir mantêm-se na fase G0 permanentemente ou até que um sinal externo as estimule para que voltem a se dividir. A célula tumoral não finaliza o ciclo de replicação celular de forma normal, ou seja, não retorna à fase G0 e passa diretamente da mitose para uma nova fase G1 (ALBERTS et al., 2011; VERMEULEN et al., 2003; DE ALMEIDA et al., 2005).

De acordo com Abbas et al. (2009), as células possuem múltiplos mecanismos de checagem durante o ciclo celular com o objetivo de monitorar e responder aos distúrbios celulares, detendo a progressão das células alteradas até que os erros sejam reparados ou até a promoção da apoptose. Esses mecanismos de checagem são chamados de *checkpoints* ou pontos de checagem e referem-se aos mecanismos pelos quais as células bloqueiam de forma ativa o ciclo celular até que um processo como a replicação do DNA ou a mitose ocorra de forma completa e assertiva.

O ponto de restrição é o mais importante ponto de checagem (ponto de checagem G1), ocorre no final do período G1, antes de iniciar o período S. Nesse momento, a célula verifica se seu tamanho está adequado, se o meio extracelular se encontra ideal à proliferação e se o DNA está íntegro. Caso as condições não estejam adequadas, o ciclo celular não prossegue e a célula assume um estado pausado ou quiescente denominado G0 em vez de seguir para o período S, podendo permanecer nesse estado por longo tempo sem se dividir. Estando as condições ideais, a célula entra na fase S e, em seguida, no período G2. Nesse

período, um pouco antes de a célula iniciar a divisão, ocorre outro ponto de checagem (ponto de checagem G2), no qual ocorre nova verificação quanto ao crescimento da célula e à correta replicação do DNA. Com o crescimento adequado e a correta duplicação do DNA, tem início a divisão celular. Se, por outro lado, as condições não são satisfatórias, a prófase não é iniciada, e a divisão não se processa. Um terceiro ponto de checagem, denominado ponto de checagem da mitose, ocorre durante a divisão celular, entre o término da metáfase e o início da anáfase. Ele tem por finalidade detectar defeitos na formação do fuso mitótico (fuso de divisão ou acromático) e na adesão dos cinetócoros aos microtúbulos. Dessa forma, as células só entram em anáfase, via de regra, quando todos os cinetócoros se encontrarem perfeitamente ligados aos microtúbulos do referido fuso (ROBERTIS, 2003). Esse ciclo está demonstrado na figura 4.

FIGURA 4 - CICLO CELULAR E PONTOS DE CHECAGEM



FONTE: Adaptado de DE ROBERTIS (2003).

Alterações nesses pontos de checagem comprometem a integridade do genoma podendo levar ao desenvolvimento de neoplasias e prejudicando significativamente a eficácia de terapias antitumorais (KASTAN; BARTEK, 2004). Diversas enzimas como as cinases também auxiliam no controle do ciclo celular, principalmente nas transições de fases do ciclo (WARD, 2002).

As células comprometidas, infectadas ou que sofreram algum dano serão naturalmente eliminadas por um processo conhecido por morte celular programada, também chamado de apoptose, visando prevenir doenças como o câncer (BAETU et al., 2002; WICKMAN et al. 2012).

O controle das vias de ativação da apoptose envolve proteínas antiapoptóticas, pró-apoptóticas e as caspases. Esse fenômeno biológico além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais está associado ao câncer. A morte celular programada ocorre por duas vias: a via extrínseca por meio da ativação de receptores de morte do fator de necrose tumoral e pela via intrínseca por meio da privação de fatores de crescimento, hipóxia ou danos no DNA. Estes fatores convergem para a mitocôndria, causando alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c para o citosol, levando a formação do complexo apoptossomo (ORRENIUS, 2011).

De acordo com Ricci e Zong (2006), características morfológicas e bioquímicas são utilizadas na classificação dos diferentes processos de morte celular como a autofagia, mitose catastrófica, senescência, apoptose e necrose. No processo apoptótico a célula sofre alterações morfológicas características como retração celular e perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas mantem a morfologia, porém em alguns casos as mitocôndrias podem apresentar ruptura na membrana externa. A cromatina sofre condensação, juntandose a carioteca. Na membrana plasmática ocorre a formação de prolongamentos (*blebs*), os quais aumentam de tamanho e se rompem, originando os corpos apoptóticos que são fagocitados pelos macrófagos e removidos sem causar inflamação. Nesse processo ocorre a desintegração do núcleo em fragmentos envoltos pela membrana celular, chamados de fragmentação internucleossômica do DNA (ZIEGLER et al., 2004; MATTIOLI et al., 2006).

Diferentemente, no processo de morte por necrose ocorre um aumento do volume celular e ruptura da membrana plasmática com extravasamento de conteúdo intracelular para o meio intercelular e indução de reação inflamatória local (RICCI et

al., 2006; PUYAL et al., 2009). Segundo Campagnaro (2012), a necrose é um processo agressivo de morte celular causada por estímulos patológicos que resultam em rápido desequilíbrio da homeostase e que afetam várias células ao mesmo tempo, visto que os agentes causadores atingem grandes áreas do tecido.

As alterações morfológicas, nucleares e citoplasmáticas que ocorrem permitem realizar a diferenciação entre células viáveis, células apoptóticas e células necróticas (McGAHON et al., 1995). Essa diferenciação das células é realizada com o auxílio da microscopia de fluorescência e de alguns corantes como o brometo de etídio e laranja de acedina, os quais apresentam diferenças de permeabilidade na membrana plasmática das células.

O laranja de acedina é permeável à membrana intacta das células e se liga ao DNA, conferindo uma aparência verde ao núcleo das células. O brometo de etídio é permeável somente à membrana danificada (células não viáveis), conferindo coloração laranja ao núcleo das células ao se intercalar ao DNA. Dessa forma, as células viáveis apresentam fluorescência verde com núcleo uniforme. As células em apoptose inicial ainda apresentam membranas intactas e possuem manchas verdes brilhantes no núcleo e não são marcadas por brometo de etídio. As células em apoptose tardia apresentam fluorescência laranja devido à perda da integridade da membrana plasmática, cromatina condensada ou fragmentada e presença de corpos apoptóticos. As células necróticas apresentam coloração uniforme laranja-avermelhada e não há formação de corpos apoptóticos (TAKAHASHI et al., 2004; KOSMIDER et al., 2004).

A ocorrência do processo de morte celular também pode ser verificada com o auxílio do corante fluorescente Hoescht 33342, o qual penetra em todas as células e cora os núcleos de azul fluorescente, porém permanece apenas nas células apoptóticas. As células vivas possuem a capacidade de bombear o corante para fora. Dessa maneira as células em apoptose apresentam uma maior intensidade de fluorescência, com núcleos menores, cromatina condensada e possivelmente fragmentada dando origem aos corpos apoptóticos. Esse ensaio baseia-se na análise da alteração morfológica nuclear permitindo detectar diferenças na condensação da cromatina (BONFOCO et al., 1997). Estudos envolvendo o ciclo celular e os diferentes processos de morte possibilitaram um progresso significativo no desenvolvimento de medicamentos que agem em anomalias moleculares presentes em certos tumores, minimizando o dano às células normais. Entretanto,

apesar dos grandes avanços, o tratamento mais utilizado continua sendo a terapia sistêmica com fármacos citotóxicos (KADOWAKI et al., 2011).

A quimioterapia apresenta diversas limitações como a alta toxicidade dos fármacos podendo inclusive levar o paciente ao óbito (ALTMAN et al., 2011). No tratamento convencional os agentes antineoplásicos são empregados na máxima dosagem tolerada pelo paciente a fim de eliminar o maior número de células tumorais (MIHICH, 2000). Essa dosagem pode causar redução na produção de células sanguíneas fundamentais (hemácias, leucócitos e plaquetas) pela medula óssea (efeitos mielossupressores), acarretando neutropenia e leucopenia, reduzindo a atividade e o número de células efectoras do sistema imunológico (HALF et al., 2009; LEWIS et al., 2013). A leucopenia geralmente ocorre entre o nono e o décimo quarto dia após a primeira quimioterapia e os linfócitos são as principais populações de células depletadas (SHURIN et al., 2012). Devido à facilidade de obtenção por meio de punção venosa e a abundância na corrente sanguínea, os linfócitos em cultura vem sendo amplamente utilizados em estudos de genotoxicidade e citotoxicidade. O fato de serem obtidos praticamente livres de contaminantes e serem mantidos em culturas por longos períodos também contribuem para o seu uso (WNUK et al., 2009).

Alta toxicidade dos antineoplásicos e as constantes recidivas incentivam a comunidade científica na busca por novas substâncias com ações antitumorais. Essas substâncias precisam ser testadas primeiramente em ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Entre esses ensaios está o método do corante vital MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), amplamente utilizado para determinação da viabilidade de células isoladas e que avalia a função celular a nível mitocondrial. Através do corante vital MTT é possível analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula baseado na redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-brometo de tetrazólico (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas desidrogenases presentes somente em células ativas. Dessa maneira a quantidade de formazan, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMMANN, 1983). Esse ensaio tem sido usado frequentemente para avaliar a atividade de extratos vegetais e óleos essenciais. Momesso et al. (2009), por meio do ensaio do corante vital MTT, comprovou a capacidade do extrato de *Ageratum conyzoides* L., (Asteraceae), (50 mg/kg de peso) em inibir o crescimento de células tumorais.

Outros ensaios também são utilizados para verificar a citotoxicidade dos compostos como o método de exclusão de azul de tripan. Esse ensaio avalia a permeabilidade da membrana plasmática ao corante azul de tripan. As células são contadas em câmara de Neubauer sendo consideradas células mortas (inviáveis) as células que incorporam e viáveis as que excluem o corante (BARILE, 1994). De acordo com Valadares et al. (2007), os ensaios de citotoxicidade podem apresentar algumas particularidades, pois embora a membrana celular esteja lisada por um agente citotóxico e incorpore o corante, as organelas citoplasmáticas podem, ainda, manter sua atividade fisiológica.

Diversos quimioterápicos empregados no tratamento do câncer foram obtidos a partir de plantas como é o caso da vincristina extraída da *Vinca rosa*. A vincristina é um quimioterápico antimitótico que age inibindo as proteínas tubulares específicas que compõem os centríolos. Os centríolos participam da formação de uma estrutura celular conhecida por fuso mitótico pelo qual migram os cromossomos durante o processo de mitose, dando início à divisão celular. Dessa maneira a vincristina inibe a mitose e conseqüentemente a divisão das células tumorais (OLIVEIRA; ALVES, 2002). As drogas antitumorais podem agir bloqueando os sinalizadores celulares que atuam no citoplasma e no núcleo das células. Esses sinalizadores estimulam o DNA das células tumorais a multiplicarem constantemente, formando o tumor.

O ensaio da proliferação celular também é muito empregado para verificar a ação de compostos naturais candidatos a drogas antitumorais (ALBERTS et al., 2004). Nesse ensaio podem ser utilizadas diferentes linhagens tumorais objetivando verificar se um determinado composto ou substância é capaz de inibir a proliferação dessas células tumorais. O ensaio pode ser realizado através da determinação do conteúdo de DNA utilizando uma solução de difenilamina (DPA) e também através do iodeto de propídeo (PI).

3.7.4 Atividade imunomoduladora

O sistema imune possui diversas funções, entre elas o rápido reconhecimento e eliminação dos microrganismos patogênicos por meio de diferentes processos como a fagocitose e a indução da inflamação (SKELDON; SALEH, 2011). A inflamação pode ser dividida didaticamente em duas fases: a fase

aguda e a fase crônica. A primeira apresenta resposta imediata e de curta duração se estendendo por minutos ou dias e caracterizada por febre, dor, emigração e acúmulo de leucócitos no foco da lesão, formando o edema. A fase crônica tem duração mais longa persistindo por dias e até anos, associada à presença de linfócitos, macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e necrose tecidual (GORDON; TAYLOR, 2005; SERHAN, 2007). No momento em que cessa a ação do agente inflamatório ocorre uma diminuição na liberação dos mediadores da inflamação e a microcirculação recupera o estado hemodinâmico; o líquido e as células exsudadas voltam à circulação sanguínea (BOGLIOLO, 2011). Embora a reação inflamatória seja um mecanismo de proteção do organismo contra agentes lesionantes, algumas vezes essa resposta defensiva pode ser potencialmente danosa, uma vez que em sua manifestação pode lesar o próprio organismo.

O sistema imunológico é um sistema de defesa complexo e sofisticado constituído por células e moléculas. A ação coletiva e coordenada destes componentes frente às substâncias invasoras constitui a chamada resposta imune (GOLDSBY et al., 2000; ABBAS, 2000). O organismo se protege da invasão de microrganismos por dois mecanismos básicos: a imunidade natural (inata) e a imunidade específica (adquirida). A imunidade natural ou inata é a primeira linha de defesa do organismo e sua ação depende da participação de um componente celular, geralmente fagócitos como macrófagos e também um componente não celular formado por moléculas circulantes como o sistema complemento. A imunidade específica ou adquirida é formada principalmente por linfócitos e seus produtos de secreção, como os anticorpos (ABBAS, 2000).

Os macrófagos são as principais células fagocitárias envolvidas na defesa que tem a capacidade de internalizar partículas mais rápida e eficientemente que outras células (WU et al., 2004). Essas células possuem importante função na resposta imune inata e também um grande papel na imunidade adquirida. Na resposta inata desempenham a fagocitose de partículas, como microrganismos, macromoléculas e também de tecidos mortos ou danificados. Uma vez fagocitadas, estas partículas são degradadas nos lisossomos devido à ação de diversas enzimas lisossomais. Os macrófagos desempenham a função de citotoxicidade, por meio da liberação de enzimas, espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio e outros mediadores, como as prostaglandinas, os quais atuam na eliminação de microrganismos invasores e controle da infecção, podendo até mesmo

danificar tecidos normais do organismo. Na imunidade inata essas células podem também produzir e secretar citocinas, as quais recrutam outras células inflamatórias, amplificando a resposta frente ao componente invasor. Os macrófagos induzem ainda o reparo de tecidos danificados (como o endotélio e fibroblastos) através da produção e liberação de fatores de crescimento (ABBAS, 2000; GOLDSBY et al., 2000).

Essas células são classificadas em M1 e M2, onde os primeiros são ativados pelos sinais considerados clássicos, como interferon (IFN) e lipopolissacarídeo (LPS), levando à produção de mediadores envolvidos na resposta proinflamatória. Os macrófagos M2 podem ser ativados pelas interleucinas (IL-4, IL-13), complexos imunes, entre outros, sendo sua principal característica a produção de altos níveis de interleucina (IL-10) que atua inibindo a inflamação e promovendo a reparação e remodelação tecidual (BENOIT et al., 2008; MANTOVANI et al., 2011). Uma vez ativados, os macrófagos possuem a capacidade de produzir óxido nítrico (NO) a partir do aminoácido arginina e oxigênio molecular a partir de uma enzima denominada óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Os macrófagos respondem a estímulos endógenos e exógenos, como os provocados pelo LPS (ZWILLING; EISENSTEIN, 1994).

O NO é um gás solúvel, altamente instável, difusível pelas membranas celulares com comportamento de radical livre e que pode ser benéfico ou potencialmente tóxico para as células, conforme a concentração ou depuração tecidual (DUSSE et al., 2003; PARSLOW, 2004; COULTER et al., 2008). O óxido nítrico possui diversas funções como regulação do tônus vascular, sinalização entre o sistema nervoso central e periférico e também ativação de macrófagos e neutrófilos (BARTBERGER et al., 2002; XU et al., 2002). Em pesquisas recentes o NO tem sido relacionado com a regulação da função mitocondrial e também com a atividade citotóxica em macrófagos, sendo considerado um marcador para esse tipo de ação (BROWN; BORUTAITE, 2004). Muitas plantas e seus princípios ativos possuem efeitos na via do óxido nítrico (NO). A via de sinalização do NO tem se mostrado um alvo para o desenvolvimento de novos medicamentos (ACHIKE; KWAN, 2003). Esse mediador inflamatório, sintetizado e liberado por vários tipos celulares, é normalmente encontrado no ar atmosférico em pequenas quantidades, sendo altamente tóxico devido à presença de radicais livres (SNYDER; BREDDT, 1992). A produção de NO em quantidades elevadas por células inflamatórias pode

estar envolvida na patogênese da inflamação, por isso, muitos estudos avaliam o efeito de óleos essenciais e dos extratos vegetais sobre o NO.

Segundo Lopes (2004), a produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados por LPS foi reduzida na presença dos extratos e frações de *Alchornea triplinervia* Spreng. Mull. Arg. e *Alchornea glandulosa* Poepp. Em um estudo realizado com o óleo essencial de folhas adultas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage foi possível verificar seus efeitos sobre a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS. De acordo com os resultados obtidos, o óleo essencial reduziu significativamente a produção de NO em relação ao controle, ou seja, os constituintes voláteis do óleo essencial podem atuar como agentes imunomoduladores (BOSCARDIN, 2009).

Os agentes imunomoduladores tem a capacidade modificar a resposta imune potencializando ou suprimindo elementos do sistema imunológico (MAKARE et al., 2001; DUTTA, 2002). Esses agentes são capazes de simultaneamente estimular algumas células do sistema imune e suprimir outras, podendo aumentar os mecanismos de defesa do hospedeiro (imunoestimulantes) ou diminuí-los (imunossupressores) (MASIHI, 2000). Os imunoestimulantes estimulam os mecanismos que envolvem tanto a imunidade inata quanto a imunidade adquirida, através da ativação de células e mediadores, enquanto os imunossupressores agem seletivamente sobre os mecanismos envolvidos na imunidade adquirida (STITES; TERR, 1995). Sendo assim, diversas pesquisas são realizadas na busca por substâncias capazes de auxiliar o sistema imune no combate a microrganismos patogênicos, ou a doenças com outras etiologias, tais como câncer e doenças autoimunes (LABRO, 2000).

Para avaliação da atividade antineoplásica, outro teste de citotoxicidade frequentemente empregado além do MTT é o ensaio da sulfarrodamina B (SRB). Esse método consiste em um ensaio de quantificação colorimétrica da proteína celular em culturas de células coradas com SRB. A Sulfarrodamina B é um corante brilhante de cor purpúrea e solúvel em água. Em condições ácidas o corante liga-se aos resíduos de aminoácidos da proteína básica em células viáveis previamente fixadas com ácido tricloroacético. O corante empregado é uma aminoxantina usada como um indicador quantitativo do conteúdo proteico da cultura celular, sendo este conteúdo proporcionalmente linear à densidade de células. Um aumento ou diminuição no número de células resulta numa alteração proporcional da quantidade

do corante incorporado nas células em cultura, o que indica o grau de citotoxicidade causada pelo composto em estudo (SKEHAN et al., 1990).

O método da sulfarrodamina é amplamente empregado por ser rápido, reprodutível e sensível. A leitura das placas pode ser realizada posteriormente ao ensaio e não necessariamente em seguida como no ensaio do MTT (HOUGHTON et al., 2007). Segundo Keepers et al. (1991), o método da SRB é superior ao MTT pois cora células lisadas recentemente, diferentemente do MTT. Esse método permite que um maior número de substâncias sejam testadas em poucos dias, além de não requerer reagentes de alto custo (VICHAI et al., 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Os cladódios de *Baccharis milleflora* foram coletados na região de Uvaranas, na cidade de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (latitude: 25° 5' 23" S e longitude: 50° 6' 23"W). As coletas foram realizadas pela manhã nas quatro estações do ano de 2013. As exsicatas foram identificadas pelos taxonomistas Dr. Nelson Ivo Matzenbacher e Osmar dos Santos Ribas, sob os números 192141 e 388373 e depositadas no Herbário do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Museu Botânico Municipal de Curitiba no Paraná, respectivamente. O presente estudo tem autorização do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) para atividades de acesso ao patrimônio genético (Processo 02001.001165/2013-47).

4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

As pesquisas referentes aos caracteres morfoanatômicos foram efetuadas com os cladódios de *B. milleflora* obtidos a partir de 5 cm do ápice da planta. O material vegetal foi fixado em FAA 70 (JOHANSEN, 1940) e estocado em etanol a 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976). As análises foram realizadas no laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

4.2.1 Lâminas semipermanentes

Lâminas semipermanentes foram preparadas com o material seccionado no sentido longitudinal e transversal, à mão livre, submetido à coloração de azul de astra e fucsina básica (ROESER, 1972). As lâminas foram montadas com glicerina diluída a 50% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e para a lutagem foi utilizado esmalte incolor.

4.2.2 Testes Histoquímicos

Os testes histoquímicos foram realizados com o material seccionado à mão livre e estocado em etanol a 70% (v/v). Para a verificação de lignina foi empregado uma solução de floroglucina clorídrica (FOSTER, 1949), Sudam III para compostos lipofílicos (SASS, 1951), cloreto férrico para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940) e lugol para amido (BERLYN; MIKSCHE, 1976). A droga vegetal também foi analisada micro e macroscopicamente. Os resultados foram ilustrados por meio de um microscópio fotônico Olympus CX-31 RTSF.

4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

A análise ultraestrutural de superfície foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em alto vácuo (SOUZA, 1998). As amostras fixadas em FAA 70 foram desidratadas em série etanólica crescente e pelo ponto crítico CO₂ no equipamento Balzers CPD-030. A seguir foram transferidas para um suporte e submetidas à metalização em ouro no aparelho Balzers Sputtering SCD-030. As eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6360LV, no Centro de Microscopia Eletrônica, da Universidade Federal do Paraná.

4.3 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora*

4.3.1 Extração do óleo essencial dos cladódios de *B. milleflora*

A extração do óleo essencial dos cladódios secos à temperatura ambiente e a sombra foi realizada por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger (USP XXV, 2002), com duração de 6 horas. O óleo essencial obtido foi estocado em tubos de vidro âmbar, selados e mantidos em temperatura de $(4 \pm 0,5)$ °C. As atividades antioxidante e antimicrobiana foram avaliadas sazonalmente. As atividades pediculicida, citotóxica e imunomoduladora foram realizadas com os dos óleos essenciais obtidos nas quatro estações do ano. As diluições do óleo essencial empregadas para os experimentos foram obtidas a partir de cálculos baseados na densidade.

4.3.2 Identificação e quantificação dos compostos voláteis do óleo essencial de *B. milleflora* por cromatografia gasosa acoplada a detector de massa

A identificação dos constituintes voláteis foi realizada por meio do cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890 equipado com o detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5975 e coluna de capilaridade HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). A cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massa foi realizada usando injetor split, com injetor na temperatura de 220°C, sendo da coluna 60°C, com rampa de aquecimento de 3°C/min, temperatura final 240°C e temperatura do detector 250°C. O hélio foi usado como gás de arraste a 1 mL min⁻¹. O sistema de ionização de elétrons CG-MS foi 70 eV. As análises quantitativas foram realizadas usando um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890 equipado com detector de ionização de chama sob as mesmas condições descritas anteriormente. As amostras dos óleos foram dissolvidas em acetato de etila (20 mg/mL) para as análises. Os índices de retenção foram determinados pela injeção de padrões de hidrocarbonetos e das amostras dos óleos essenciais sob as mesmas condições. Os componentes dos óleos essenciais foram identificados por comparação com os dados da literatura (ADAMS, 2007), e perfis da biblioteca de espectro de massas (NIST -11). A quantificação cromatográfica gasosa com detector de ionização de chama foi obtida usando cromatógrafo GC-FID e expressa como média a partir de três amostras do óleo essencial.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos óleos essenciais de *B. milleflora* obtidos nas quatro estações do ano foi determinada por meio de quatro métodos: redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), redução do complexo fosfomolibdênio, determinação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela descoloração do radical catiônico 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}).

4.4.1.1 Método da redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Yamaguchi et al. (1998). Foram preparadas diferentes concentrações (35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1 e 0,5 mg/mL) dos óleos essenciais em metanol. Esse solvente também foi empregado na obtenção das diluições seriadas dos controles positivos: ácido ascórbico e ácido gálico (1000 a 0,387 µg/mL) e na obtenção da solução de DPPH (0,1mM).

Em microplacas de 96 poços foram transferidos 20 µL das soluções de óleo essencial de *B. milleflora* bem como dos controles positivos e do branco (metanol) e 100 µL da solução de DPPH. As placas foram homogeneizadas durante 1 minuto e a leitura foi realizada após 30 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente em leitor de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 517 nm.

A atividade antioxidante (AA) foi determinada sob a forma de porcentagem e calculada pela taxa de declínio da absorvância da solução de DPPH com o óleo ou padrões, após 30 minutos de reação, em relação à solução de referência (DPPH em metanol), de acordo com a equação 1:

$$\%AA = 100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}} / A_{\text{controle}}) \times 100] \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, A é o valor de cada absorvância. A partir da porcentagem da atividade antioxidante obtida para cada concentração de óleo essencial foi construído um gráfico. A equação da reta obtida foi utilizada para o cálculo do IC₅₀, substituindo o valor de Y por 50%. O valor de IC₅₀ encontrado representa a concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% da concentração de DPPH adotada.

4.4.1.2 Método da redução do complexo fosfomolibdênico

A determinação da capacidade antioxidante total foi realizada pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico. Esse ensaio é baseado na redução do molibdênio VI a V pela amostra em análise (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Em um tubo de ensaio foi adicionado 300 µL do óleo essencial em solução etanólica a 200 µg/mL, juntamente com 3 mL do reativo (molibdato de amônio a 4 mmol/L,

fosfato de sódio 28 mmol/L, ácido sulfúrico 0,6 mol/L). O tubo foi fechado hermeticamente e levado ao banho-maria a 95°C por 90 min. O ensaio foi realizado em triplicata.

Após o resfriamento do tubo foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1601 a 695 nm contra um branco (300 µL de etanol, acrescidos de 3 mL do reativo). Os padrões utilizados foram o ácido ascórbico, ácido gálico e a rutina a 200 µg/mL. Para efeitos de cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante, conforme a equação 2.

$$\%AA = (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}} / A_{\text{ácido ascórbico}} - A_{\text{branco}}) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde, A é o valor de cada absorvância.

4.4.1.3 Método para a determinação das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a determinação das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico foi utilizada, como meio rico em lipídeos, uma solução de gema de ovo homogeneizada (KISHIDA et al., 1993). O procedimento foi realizado em quintuplicata. Em cinco tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL da solução de gema de ovo (10% m/v) e 0,1 mL de solução de óleo essencial ou padrão a 1000 ppm (m/v) em metanol, completando-se o volume para 1 mL com água destilada. A seguir, foi adicionado a cada tubo 0,05 mL de cloreto de 2,2'-azo-bis-2-amidinopropano (ABAP) (0,07 mol/L) para induzir a peroxidação dos lipídeos. Adicionaram-se 1,5 mL de solução 20% de ácido acético (pH 3,5) e 1,5 mL de solução de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (0,8% m/v) em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) (1,1% m/v). O controle foi preparado, para a completa peroxidação dos lipídeos, com a adição de todos os reagentes, com exceção da amostra testada.

Os tubos de ensaio foram levados ao banho-maria à 95°C, sob agitação, por 1 h. Após resfriamento, foram adicionados 5 mL de 1-butanol a cada tubo e centrifugados a 3000 rpm, durante 10 min. A absorvância da camada orgânica superior foi medida em um espectrofotômetro Spekol no comprimento de onda de 532 nm. O Índice antioxidante da amostra foi expresso em porcentagem (IA%) usando a equação 3:

$$IA\% = (1 - A/C) \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde, C é a absorvância do controle totalmente oxidado e A, a média aritmética das absorvâncias da amostra testada. Utilizou-se como padrão positivo o antioxidante BHT a 1000 ppm (m/v).

4.4.1.4 Método da descoloração do radical catiônico 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+})

O método da descoloração do radical catiônico (ABTS^{•+}) foi realizado de acordo com RE et al., 1999. Para a obtenção do radical catiônico ABTS^{•+} foram misturadas soluções aquosas de ABTS (7 mmol/L) e persulfato de potássio (2,45 mmol/L) em uma proporção volumétrica de 1:1 e incubadas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente por 12 horas. A seguir, a solução de ABTS^{•+} foi diluída em etanol para a obtenção de um valor de absorvância de $\pm 0,7$ a 734 nm. A complexação entre o ABTS^{•+} e o óleo essencial diluído (0,1; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 mg/mL) foi medida pelo decréscimo da absorvância a 734 nm, após 30 minutos, em leitor de microplacas (Molecular Devices, SpectraMax 190, Sunnyvale, Estados Unidos). Todas as leituras foram realizadas em triplicata. Uma solução de rutina (0,078; 0,156; 0,312; 0,500; 0,625 mg/mL) foi utilizada como padrão. A atividade antioxidante foi calculada pela equação 4.

$$\% \text{ Inibição} = [(A_b - A_a) / A_b] \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde, A_b é a absorvância do controle positivo e A_a é a absorvância da amostra. Os resultados foram expressos como concentração necessária do antioxidante para suprimir 50% do agente oxidante (IC_{50}).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.5.1 Microrganismos e preparo dos inóculos

As cepas utilizadas no ensaio microbiológico foram obtidas da American Type of Culture Collection (ATCC) de *Escherichia coli* (ATCC 10530),

Staphylococcus aureus (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). O inóculo foi preparado a partir de uma suspensão de colônias em solução salina. A concentração de microrganismos foi ajustada em comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL) e diluída 1:10 para se obter uma diluição de 1×10^7 UFC/mL. Um volume de 0,010 mL dessa suspensão foi inoculado no caldo. A concentração final de microrganismos no teste foi de aproximadamente 1×10^5 UFC/mL poço. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5.1.1 Método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os óleos essenciais de *Baccharis milleflora* foram solubilizados em Tween[®] 80 a uma concentração final de 1% e diluídos a 10 mg/mL no caldo Müller-Hinton (CMH) para os testes com *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e no caldo Müller-Hinton com 2% de glicose (CMHG) para os ensaios com *C. albicans*. Todas as soluções resultantes foram filtradas por membrana 0,22 µm.

O teste de microdiluição foi realizado em placas de 96 poços de acordo com o protocolo adaptado M7-A6 (NCCLS, 2004). A um volume de 200 µL de cada solução de óleo essencial, previamente adicionado em cada poço da microplaca, nas diluições seriadas de 10 a 0,078 mg/mL, foi adicionado 10 µL de cada inóculo microbiano.

No controle negativo foi adicionado o meio com o microrganismo e o Perio Gard[®] (0,12% de clorexidina). No controle positivo foi adicionado apenas a cepa bacteriana com o meio (preparada da mesma forma que as amostras). As microplacas foram tampadas e incubadas a 35°C por 24 h em estufa. Para a confirmação da presença de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias, foi utilizado 50 µL do corante TCC (2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio) a 1% e incubado por 30 minutos em estufa a 35°C. Isto torna possível distinguir as amostras vivas, coloridas de vermelho, daquelas mortas que mantêm a sua cor, possibilitando determinar a concentração inibitória mínima (CIM) (DESWAL; CHAND, 1997).

As concentrações que se mantiveram incolores foram semeadas em placas contendo o meio Agar Mueller-Hinton solidificado a fim de verificar a Concentração

Bactericida Mínima (CBM). As concentrações na qual se observou nulidade de crescimento ou crescimento de até 3 UFC foram consideradas bactericidas (CBM) (POZZATTI et al., 2009).

4.6 ATIVIDADE PEDICULICIDA

4.6.1 Atividade biológica frente ao *Pediculus humanus capitis*

Este ensaio foi aprovado pelo de Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa parecer n° 369.973 (08/05/2014).

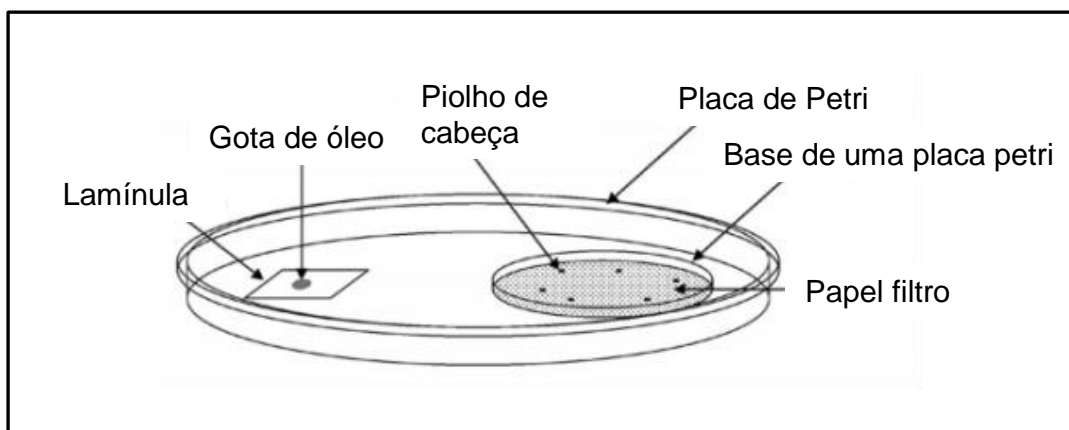
4.6.1.1 Coleta, armazenamento e transporte do *Pediculus humanus capitis*

A coleta dos exemplares de *Pediculus humanus capitis* foi realizada pelo método de catação manual em uma escola de Ponta Grossa, mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos responsáveis. Foram realizados esclarecimentos sobre a finalidade do trabalho e sobre o procedimento a ser adotado. Os piolhos coletados foram, imediatamente, transferidos para um recipiente de plástico cristal, rígido, com capacidade para 100 mL e acomodados juntos a alguns fios de cabelos que serviram como suporte para os insetos. O frasco foi tamponado com gaze de algodão, identificado e acondicionado em caixa de isopor tampada, contendo termo-higrômetro de bulbo seco e bulbo úmido e transportado ao laboratório de Parasitologia Humana da UEPG. A temperatura da caixa fechada foi mantida entre (25 e 30)°C e a umidade relativa (UR) entre (70 e 75)%. O transporte ocorreu em um prazo máximo de 2 h. Após a constatação da mobilidade dos espécimes de *Pediculus humanus capitis*, esses insetos em diferentes fases evolutivas (ninfas e adultos) foram separados em grupos de seis e transferidos, com auxílio de uma pinça entomológica, para placas de Petri de vidro com 5 cm de diâmetro.

4.6.1.2 Avaliação da atividade fumegante

A atividade fumegante do *pool* do óleo essencial de *B. milleflora* foi realizada utilizando o método sugerido por Toloza et al. (2006). Esse experimento foi conduzido em um sistema de câmara fechada que permitiu a formação de vapores, utilizando uma placa de Petri e sua respectiva tampa (FIGURA 5). Uma gota (60 µL) do óleo essencial em estudo foi depositada sobre a lamínula de vidro. Três grupos de seis piolhos adultos foram expostos ao teste com o óleo essencial e monitorados a cada 5 min durante 1 h. Os resultados foram expressos como tempo médio de *knockdown* (KT_{50}), em min. O *knockdown* consiste na incapacidade dos insetos se moverem em um papel filtro. O KT_{50} representa o tempo médio em que 50% dos piolhos foram imobilizados. Durante todo o procedimento, foram mantidos valores de temperatura de $(28 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e UR $(60 \pm 5)\%$. O óleo essencial de *Melaleuca* (Via Farma) foi utilizado como controle positivo. O controle negativo foi estabelecido da mesma forma, porém, sem a aplicação de nenhuma substância sobre a lamínula de vidro. O ensaio foi realizado em triplicata.

FIGURA 5 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUMEGANTE DO ÓLEO ESSENCIAL *Baccharis milleflora* DC.



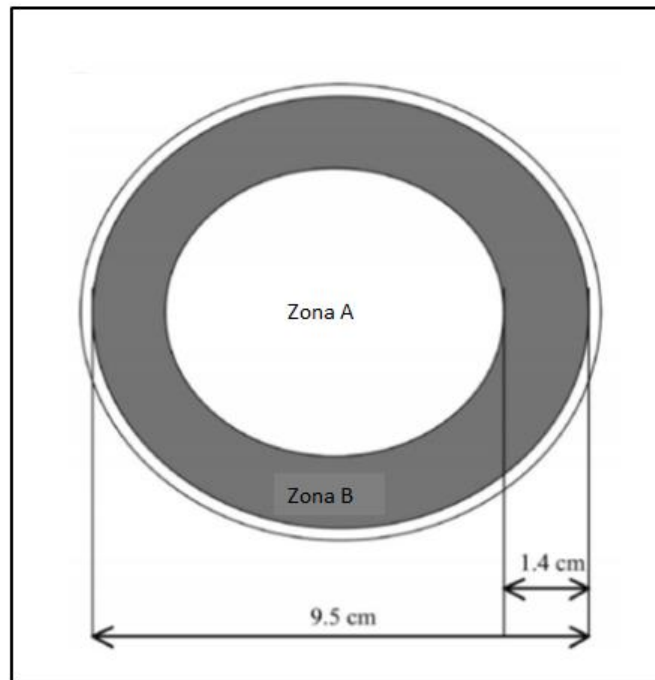
FONTE: Adaptado de TOLOZA et al. (2006).

4.6.1.3 Avaliação da atividade repelente

Para o teste de repelência foi utilizado um papel filtro dividido em duas zonas circulares: uma interna (zona a) e outra externa (zona b) (TOLOZA et al., 2006), (FIGURA 6). A zona (a) foi impregnada somente com acetona, enquanto a zona (b) foi impregnada com 500 µL do *pool* do óleo essencial de *B. milleflora* em solução de acetona (50 mg/mL). Um teste preliminar foi efetuado, no qual ambas as zonas foram tratadas somente com acetona, sendo mensurada a mobilidade dos insetos em direção à zona externa (controle negativo). Grupos de seis piolhos adultos foram colocados na zona interna e a repelência foi expressa pela porcentagem de insetos que evitou a zona externa (zona impregnada com o óleo essencial em estudo). Para verificar o número de piolhos encontrados em cada zona, o experimento foi monitorado durante 1 h e a cada 5 min. Como controle positivo foi utilizado o óleo essencial de citronela (DEG). Os testes foram efetuados em triplicata. O índice de repelência (IR) foi calculado como a porcentagem de insetos repelidos da zona tratada com o óleo essencial, a partir da Equação 5, na qual N_c é a média do número de piolhos encontrados na zona b do ensaio realizado somente com acetona (controle negativo) e N_t é o número de piolhos encontrados na zona b para o teste ou para o controle positivo.

$$IRP = [(N_c - N_t / N_c)] \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE REPELENTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* DC.



FONTE: Adaptado de TOLOZA et al. (2006).

4.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA

4.7.1 Ensaios com cultura de células

Os óleos essenciais obtidos sazonalmente dos cladódios de *B. milleflora* foram utilizados nos ensaios com culturas de células. Uma solução estoque (100 mg/mL) do *pool* do óleo essencial foi preparada em propilenoglicol e álcool etílico (1:4) como procedimento de solubilização (VIRADOR et al., 1998). A solução estoque do óleo essencial de *B. milleflora* foi diluída em meio de cultivo RPMI 1640 com 10% de dodecil sulfato de sódio (SFB) (3, 10, 30, 100, e 300 µg/mL) no momento antecedente ao início dos experimentos (SYLVESTRE et al., 2006; CARDILE et al., 2009).

4.7.2 Células e culturas de células

As linhagens celulares Jurkat (leucemia de células T), HL-60 (células de leucemia promielocítica humana) e Raji (células linfoblastóides derivadas do linfoma de Burkitt) foram obtidas a partir do banco de células da Escola de Patologia Dunn (Universidade de Oxford, Reino Unido); American Type Culture Collection (ATCC) e do Banco de Células do Rio de Janeiro (Ilha do Fundão), respectivamente. Todas as culturas foram mantidas em meio RPMI-1640 (Sigma). Este meio foi suplementado com soro bovino fetal 10% (SBF, Life Technologies), contendo 0,1% de uma mistura de antibióticos: 10.000 unidades de penicilina e 10 mg de estreptomicina por mL (Sigma). Foram adicionados bicarbonato de sódio 2 mg/mL e glutamina 2 mmolar. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Estas células foram sub cultivadas a cada 3-4 dias. A viabilidade das células excedeu 95%, como determinado pelo azul de tripan (0,5% de solução de azul, Sigma tripano).

4.7.3 Testes de citotoxicidade *in vitro*

4.7.3.1 Ensaio de viabilidade celular pela técnica de exclusão do azul de Tripan

Este método avalia a integridade da membrana celular (MERCHANT; KAHN; MURPHY, 1964). As linhagens Jurkat, HL-60 e Raji, em meio RPMI 1640 contendo 10% de SBF, foram semeadas em placas de 24 poços (1x10⁵ células/poço) e mantidas sob condições de cultivo (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂) por 24 h. Posteriormente, foram adicionados os tratamentos com o *pool* do óleo essencial (3, 10, 30 e 100 µg/mL). As células foram incubadas por 24, 48 e 72 h consecutivas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após o período de incubação uma alíquota de 100 µL da suspensão de células devidamente homogeneizada foi retirada e diluída em azul de Tripan (0,4% em PBS) (1:1). As células foram observadas e contadas em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. O azul de Tripan penetra no interior de células que perderam a integridade da membrana. As células consideradas viáveis apresentaram-se íntegras, redondas e incolores e as células não viáveis apresentaram-se coradas em azul. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem.

4.7.3.2 Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do MTT

A citotoxicidade foi realizada pelo ensaio da redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] (Sigma) para investigar a atividade das desidrogenases mitocondriais, por conseguinte, atividade metabólica celular (MOSMANN,1983). As linhagens Jurkat, HL-60 e Raji em meio de cultivo RPMI 1640 contendo 10% de SBF, foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^5 células/mL) e mantidas sob condições de cultivo (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂) por 24h. Diferentes concentrações do óleo essencial foram adicionadas (3, 10, 30, 100, e 300 µg/mL). As células foram incubadas por 24, 48 e 72 h consecutivas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi centrifugado a 220g por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e foi adicionada uma solução de MTT (0,5 mg/mL). Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C durante 30 min ao abrigo da luz. Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi centrifugado a 600g por 5 minutos e desprezado o sobrenadante. Para a solubilização dos cristais de formazan, produto da redução do MTT, foi adicionado o dimetilssulfóxido (DMSO). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de placas (Biotek, µQuant), em comprimento de onda de 550 nm. O meio RPMI 1640 foi empregado como controle negativo. A viabilidade celular foi determinada pela comparação dos valores das absorbâncias obtidas para células tratadas e não tratadas com o *pool* dos óleos essenciais. A citotoxicidade foi expressa como a concentração da amostra que inibiu 50% do crescimento celular (IC₅₀) e foi calculada por regressão de Probit através da análise de Finney.

4.7.4. Análise do conteúdo de DNA celular

O efeito do *pool* do óleo essencial sobre a proliferação celular foi avaliada por meio da análise do conteúdo de DNA utilizando as soluções de difenilamina (DPA) e iodeto de propídio (PI).

4.7.4.1 Solução de difenilamina (DPA)

As células Jurkat, HL-60 e Raji em meio de cultivo RPMI 1640 contendo 10% de SBF foram semeadas em placas de 24 poços ($1,5 \times 10^5$ células/mL) e mantidas sob condições de cultura por 24 h (SELLITTI et al., 2001). A seguir, os tratamentos com o óleo essencial foram adicionados (3, 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$) e as placas mantidas sob condições de cultivo (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2) por 48 h. Após esse período, as suspensões de células referentes a cada tratamento foram coletadas e centrifugadas a 600g por 10 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e sobre o precipitado celular foi adicionado 500 μL de uma solução de difenilamina por um período de 24 h ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A solução DPA foi preparada com 8 mL de água deionizada, 0,1 mL de acetaldeído 1% e 20 mL de uma solução estoque de DPA (1 g difenilamina, 90 mL de ácido acético glacial e 2 mL de ácido sulfúrico). O meio RPMI 1640 com 10% de SBF foi empregado como controle negativo. Determinou-se a absorbância em espectrofotômetro a 575 nm (SELLITTI et al., 2001). Os resultados foram expressos em porcentagem de conteúdo de DNA celular.

4.7.4.2 Iodeto de propídio (PI)

O ensaio do iodeto de propídio (PI) foi realizado utilizando o protocolo modificado de Dengler et al. (1995). As células Jurkat, HL-60 e Raji em meio de cultivo RPMI 1640 contendo 10% de SBF foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^5 células/mL) e mantidas sob condições de cultura por 24 h. A seguir, foram adicionados os tratamentos com o óleo essencial (3, 10, 30, 100 $\mu\text{g/mL}$) por 72 horas. Alíquotas de 50 μL , correspondente a 4×10^4 células/mL, foram transferidas para um placa preta de 96 poços e sobre essa foi adicionado 150 μL de solução de iodeto de propídio a 100 $\mu\text{g/mL}$ contendo Triton X-100 0,2% (v/v) e citrato de sódio 0,2% (v/v). Após 24 horas de incubação à temperatura ambiente, a fluorescência foi medida utilizando o leitor de microplacas (CytofluorH 4000) (excitação = 525 nm e emissão = 617 nm) para quantificar a quantidade de células viáveis. Os resultados foram expressos em porcentagem de conteúdo de DNA celular.

4.7.5 Ensaio do Ciclo Celular

Para analisar se houve alteração no ciclo celular foi executado o protocolo descrito por Crissman e Steinkamp (1973) e por Krishan (1975), adaptado. As células Raji em meio RPMI 1640 contendo 10% de SBF foram semeadas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) e mantidas sob condições de cultivo (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2) por 24 horas. Posteriormente, foi adicionado o tratamento com o óleo essencial (15, 30 and 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e o antitumoral clorambucil (20 μM) (Sigma). Após 24 horas de cultura, as células em suspensão foram centrifugadas a 300 g por 7 minutos e desprezado sobrenadante. O *pellet* celular foi lavado com 1 mL de tampão PBS, centrifugado novamente a 300 g por 7 minutos e ressuspensão em 150 μL de PBS. As células foram fixadas por gotejamento com etanol 70%, homogeneizadas e mantidas a 4°C . A seguir, as células foram novamente centrifugadas a 300 g por 7 minutos, o sedimento foi ressuspensão em 1 mL de tampão PBS, centrifugado e ressuspensão em 200 μL de tampão de PSSI (1,4 μL de Triton X-100 a 1%, 20 μL de RNase (20 mg/mL), 60 μL de iodeto de propídio (2 mg/ mL) e 8,520 mL de PBS). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 37°C e analisadas em citômetro de fluxo (FACscalibur da Becton & Dickinson, San Jose, CA, EUA) utilizando-se o canal FL2-H. Os resultados obtidos foram processados utilizando o programa CellQuest (Becton & Dickinson) avaliando 10.000 eventos por amostra e expressos em porcentagem de células em diferentes fases do ciclo celular.

4.7.6 Ensaio da condensação de cromatina

As células Raji em meio RPMI 1640 contendo 10% de SBF foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^5 células/poço) e mantidas sob condições de cultivo (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2) por 24 horas. A seguir, as células foram tratadas com óleo essencial (30 e 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), vincristina 40 nmol/L (Tecnocris®) e cloranbucil 20 μM (Sigma) por 48 horas. Após o tratamento, 1 mL da suspensão de células foi centrifugada a 220 g por 5 minutos. O sedimento foi lavado com 0,5 mL de tampão PBS gelado e centrifugado a 220g por 5 minutos. O sedimento foi corado com 20 μL de uma solução de NaCl 0,9% contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Hoechst 33342 (Sigma). Este corante fluorescente liga-se ao DNA revelando se a

cromatina nuclear está frouxa ou condensada (sinais de apoptose). As células foram incubadas no escuro por 10 min. As mudanças nos núcleos foram observadas por microscopia óptica de fluorescência com aumento de 400x, sob feixe de luz UV, utilizando filtro tipo de DAPI (BX41, Olympus). As amostras foram fotografadas em quatro campos diferentes sob a luz UV (365/380 nm).

4.7.7 Avaliação do processo de morte celular

Para elucidar o tipo de morte celular induzida pelo óleo essencial de *B. milleflora* foi utilizado a mistura dos corantes acridinorange e brometo de etídio, conforme descrito por Ribble et al. (2005). As células Raji em meio RPMI 1640 contendo 10% de SBF foram semeadas em placas de 24 poços (1×10^5 células/poço) e mantidas sob condições de cultivo (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂) por 24 horas. As células foram tratadas com óleo essencial (30 e 60 µg/mL), vincristina 40 nmol/L (Tecnocris®) e cloranbucil 20 µM (Sigma) por 48 horas. Após o tratamento, 1 mL da suspensão de células foi centrifugada a 220 g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi lavado com 0,5 mL de PBS gelado e centrifugado novamente a 220 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 2 µL da solução de acridinorange (AO) e brometo de etídio (EB). A mistura de corantes para a coloração EB/AO foi de 200 µg/mL acridinorange e 200 µg/mL de brometo de etídio em PBS. A suspensão de células coradas (10 µL) foi colocada sobre uma lâmina e coberta com uma lamínula. A coloração foi visualizada em microscópio óptico de fluorescência (400x), com excitação 480/30 nm e emissão a 535/40 nm (BX41, Olympus). A detecção das células apoptóticas e necróticas foi avaliada pelo formato morfológico do núcleo e pela coloração das células e cromatina, conforme descrito por Ribble et al. (2005). O corante acridinorange penetra nas células vivas e mortas emitindo fluorescência. As células viáveis apresentam núcleo normal e coloração verde. As células em fase inicial de apoptose apresentam núcleo verde brilhante, porém, com perda parcial da integridade de membrana, observando-se áreas laranja no núcleo. As células necróticas apresentam núcleo laranja uniforme, pois há perda total da integridade da membrana. Pelo menos quatro campos diferentes foram fotografados. Os testes foram realizados em triplicata, contando um mínimo de 100 células por amostra.

4.7.8 Índice de seletividade:

O índice de seletividade (IS) é utilizado para indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem tumoral (Raji) e uma linhagem saudável (Linfócitos), indicando o potencial dos compostos em testes clínicos, determinados pela equação 6.

$$\text{Índice de seletividade} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ dos linfócitos humanos}}{\text{IC}_{50} \text{ das células tumorais}} \quad (\text{Equação 6})$$

Para o cálculo do IS foi utilizado o IC_{50} obtido no ensaio de redução do MTT pelo período de 48 horas, tanto para células tumorais (Raji) quanto para células saudáveis (linfócitos) tratadas com óleo essencial, onde IC_{50} é a concentração necessária para matar 50% da população de células, calculados por regressão Probit, Finney métodos (BADISA et al., 2009).

4.7.9 Extração de linfócitos humanos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná (Protocolo nº 1.026.524/2015). Amostras do sangue periférico humano, utilizadas nos ensaios *in vitro*, foram coletadas de voluntários saudáveis, não fumantes, que permaneceram em jejum por 12 horas, com idade entre 18-30 anos, mediante o seu consentimento informado. O sangue foi coletado em tubos vacutainer contendo o anticoagulante EDTA e diluído com o mesmo volume de tampão PBS. A seguir foi utilizado o reagente Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), o qual possibilita a separação de células mononucleares (linfócitos e monócitos). A suspensão de células foi centrifugada a 400 g por 30 min a 4°C. A camada de células mononucleares foi recolhida com o auxílio de uma pipeta de pasteur e diluída em 10 mL de PBS e novamente centrifugada a 220 g por 10 minutos a 4°C. O *pellet* obtido foi lavado com 10 mL de PBS, centrifugado e ressuspenso em 20 mL meio de cultura de RPMI-1640 (pH 7.4) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), bicarbonato de sódio (2 mg/mL), glutamina (2 mM) e antibióticos (10000 U/mL de penicilina e estreptomicina 10 mg/mL). Os monócitos das células mononucleares quando colocados em cultura aderem à superfície e os linfócitos permanecem no

sobrenadante, por isso, a suspensão de células obtidas anteriormente foi adicionada a uma garrafa de cultura (75 cm²) e mantida sob condições de cultura (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂) por 2h. A seguir, a suspensão de células foi centrifugada a 220 g por 5 minutos. Os linfócitos foram separados dos monócitos e utilizados no experimento. Os linfócitos foram ressuspensos em 5 mL de meio de cultura RPMI-1640 tamponado com bicarbonato de sódio 24 mM, 10% de SBF e antibióticos (10000 U/mL de penicilina e 10 mg/mL estreptomicina). A suspensão de linfócitos foi semeada em placa de 24 poços (2x10⁵ células/mL) e mantida sob condições de cultura por 24 horas. As células foram tratadas com óleo essencial de *B. milleflora* (3, 10, 30, 100 e 200 µg/mL), e mantidas sob condições de cultura (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂) por 48 h. A viabilidade celular foi determinada pela contagem das células em câmara Neubauer com azul de tripan e pelo método de redução do MTT, conforme descrito no item 4.7.3.2.

4.8 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

4.8.1 Ensaio com culturas de células

Os óleos essenciais obtidos a partir dos cladódios de *B. milleflora* foram utilizados nos ensaios com culturas de células. Uma solução estoque (100 mg/mL) do *pool* do óleo essencial foi obtida com propilenoglicol e álcool etílico (1:4) como procedimento de solubilização (VIRADOR et al., 1999). A solução estoque foi diluída a concentrações finais de 1,5, 3, 10, 30 e 100 µg/mL utilizando meio de cultura. (CARDILE et al., 2009).

4.8.2 Células e culturas de células

A célula J774A.1 foi cultivada em frasco de cultura de plástico em meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 24 mM de NaHCO₃, 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) em estufa a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após 2-4 dias, as células foram removidas do frasco de cultura e centrifugadas por 5 minutos a 125g. O meio foi removido e as células foram ressuspensas em meio e plaqueadas em placas apropriadas

(Multiwells 24 poços). Os experimentos foram realizados quando as células atingiram cerca de 70% de confluência.

4.8.3 Testes de citotoxicidade *in vitro*

4.8.3.1 Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do MTT

A citotoxicidade foi realizada pelo ensaio da redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] (Sigma) para investigar a atividade das desidrogenases mitocondriais, por conseguinte, atividade metabólica celular (MOSMANN,1983). As células J774 ($2,5 \times 10^4$ células / mL) em meio de cultivo RPMI 1640 contendo 10% de SBF foram semeadas em placas de 24 poços e mantidas sob condições de cultivo (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂) por 24h para adesão. Diferentes concentrações do óleo essencial foram adicionadas (1.5, 3, 10, 30 e 100 µg/mL). As células foram incubadas por 48 e 72 h consecutivas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após incubação, o sobrenadante foi removido e foi adicionado uma solução de MTT (0,5 mg/mL) em cada poço 20 minutos antes do final dos experimentos. O DMSO foi utilizado para solubilizar os cristais de formazano azul escuro formados nas células viáveis. A absorvância foi medida a 550 nm usando um leitor de microplacas (Biotek µQuant). A sobrevivência celular foi determinada por comparação dos valores das absorvâncias obtidos para as células tratadas e não tratadas. A citotoxicidade foi expressa como a concentração da amostra que inibiu 50% do crescimento celular (IC₅₀) e foi calculada pelo método dos mínimos quadrados pela análise probit.

4.8.3.2 Ensaio da sulfarodamina (SRD)

As células J774 em meio RPMI 1640 contendo 10% de SBF foram semeadas ($2,5 \times 10^4$ células/mL) em placas de 96 poços e mantidas sob condições de cultivo (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂) por 24h para aderência. O óleo essencial em diferentes concentrações (1,5, 3, 10, 30, e 100 µg/mL) foi adicionado. As células foram incubadas por 48 e 72 h consecutivas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. O sobrenadante foi removido e uma solução de ácido tricloroacético a 10% foi adicionada a cada poço e a placa foi

aconditionada na geladeira durante 30 minutos. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com água miliQ e ficou secando em temperatura ambiente por 24 horas. Após este período foi adicionado 50 µL de sulfarodamina a 0,4% (SRD) por 20 minutos. A SRB foi descartada e a placa foi lavada cinco vezes com 200 µL ácido acético a 1%. Após a secagem da placa em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos foi adicionado 200 µL de tris-base 10 mM e a absorvância foi medida a 492 nm usando um leitor de microplacas (Biotek µQuant) (PAPAZISIS et al., 1997).

4.8.4 Ensaio para a produção de óxido nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico (NO) foi determinada através da medida de nitritos no sobrenadante de culturas J774A.1 usando o ensaio descrito por Ding et al. (1988) e Shand et al. (2011), com adaptações. As células J774 (1×10^5 células/mL) em meio de cultivo RPMI 1640 contendo 10% de SBF foram semeadas em placa de 24 poços e mantida sob condições de cultivo (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂) por 24h para aderência, obtendo 95% de confluência. O sobrenadante foi descartado e adicionado 300 µL de meio RPMI 1640, seguido de incubação em estufa por duas horas. O tratamento foi realizado com a adição de 100 µL da solução de óleo essencial de *B. milleflora* a 8 µg/mL nas células tratadas e 100 µL de uma solução de meio com veículo nas células do controle. Após leve homogeneização, as células foram mantidas sob condições de cultivo (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂) por 4 horas. Em seguida, as células foram estimuladas ou não com lipopolissacarídeos (LPS) a 10 mg/mL obtido a partir de *Escherichia coli* 055:B55 (Sigma) e 11 µg/mL de β-interferon 1A (Merck) e mantidas sob condições de cultura, por 24 horas. Após, 100 µL do sobrenadante foram removidos e incubados com um volume igual de reagente de Griess (1% de sulfanilamida; 0,1% de dihidrocloreto de naftileno diamina; 2,5% de H₃PO₄) à temperatura ambiente por 10 min. A absorvância foi determinada a 550 nm com um leitor de microplacas (Biotek Instruments Inc). O nitrito foi determinado por comparação usando uma curva de nitrito de sódio como padrão.

4.8.5 Ensaio para a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi avaliada com o auxílio da sonda 2',7'- diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (LANDREMAN et al., 2008). Para determinar a produção de ROS intracelular, as células J774A.1 ($0,5 \times 10^5$ células/mL) foram semeadas em placas pretas de 96 poços. As células foram incubadas com o óleo essencial de *B. milleflora* (10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h, a seguir o sobrenadante foi descartado. As células foram incubadas com 200 μL de sonda DCFH-DA (25 μM) com Zimozan ($12,50 \times 10^6$ partículas por mL) em meio RPMI 1640 incolor suplementado com SBF a 1% durante 60 min a 37°C no escuro. A intensidade de fluorescência foi medida a cada 10 min, a um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 535 nm, usando um leitor de microplacas de fluorescência (Biotek Instruments.Inc).

4.8.6 Ensaio de fagocitose

As células J774A.1 (2×10^5 células/poço) foram semeadas sobre lamínulas de vidro, em placas de 24 poços, e mantidas sob condições de cultivo (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2) por 24h para aderência. Após as células foram lavadas com meio DMEM e tratados ou não com o óleo essencial de *B. milleflora* (10 $\mu\text{g/mL}$) e zimozan ($12,50 \times 10^6$ partículas por mL). As células foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2 por 60 minutos e descartado o sobrenadante. As lamínulas foram lavadas com meio DMEM e fixadas com corante Rosenfeld. A capacidade fagocítica foi avaliada por microscopia óptica através da contagem de 100 células por tratamento como descrito por Sampaio et al. (2003). A porcentagem de células foi determinada pelo número de macrófagos que fagocitaram uma ou mais partículas Zimozan.

4.8.7 Análise estatística

A análise estatística dos compostos majoritários presentes nos óleos essenciais foi determinada por meio da análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post hoc* de Tukey, utilizando o software Graph Pad Prism 5.01. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Nos ensaios biológicos e nos testes de citotoxicidade com as células Jurkat, Raji e HL-60 foram empregadas as análises estatísticas usando software Graph Pad Prism 5.01. Comparações de múltiplos grupos foram feitas usando análise de variância Anova e quando necessário foi empregado o teste post hoc de Tukey para comparação entre grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (EPM).

A análise estatística empregada nos ensaios autoimunes com as células J774 foi determinada utilizando o software Graph Pad Prism 5.01. Comparações entre dois grupos foram realizadas utilizando o teste de Mann Whitney. Comparações de múltiplos grupos foram realizadas utilizando o teste Kruskal-Wallis seguido de uma comparação intergrupos post-hoc pelo teste de comparação Dunn's Multiple. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A citotoxicidade foi expressa como a concentração da amostra que inibiu 50% do crescimento celular (IC_{50}) e foi calculada por regressão Probit.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA EXTERNA

As carquejas apresentam como característica morfológica a presença de cladódios, conhecidos como caules alados (BUDEL et al., 2005). Há, entretanto, carquejas que além dos cladódios apresentam folhas como, por exemplo: *B. apicifoliosa*, *B. flexuosiramosa* (SCHNEIDER; BOLDRINI, 2008), *B. opuntioides* Mart. ex. Baker (SCHNEIDER; BOLDRINI, 2008), *B. trimera* (Less.) DC. (RODRIGUES et al., 2010), *B. pseudovillosa* I.L. Teodoro & J.E. Vidal, *B. sagittalis* (Less.) DC., *B. usterii* Heering e *B. stenocephala* Baker (BARROSO; BUENO, 2002).

A identificação destas espécies apresenta certas dificuldades devido ao fato de serem muito parecidas. Nesse sentido, *B. trimera* é muito confundida com *B. crispa* Spreng., *B. microcephala* Baker, *B. opuntioides*, *B. stenocephala* e *B. usterii* (BARROSO; BUENO, 2002; RODRIGUEZ; GATTUSO; GATTUSO, 2008; SCHNEIDER; BOLDRINI, 2008). Adicionalmente, *B. apicifoliosa* e *B. flexuosiramosa* são similares a *B. milleflora* e *B. organensis* Baker, respectivamente (SCHNEIDER; BOLDRINI, 2008). Além disso, *Baccharis sphagnophila* A.A. Schneid. & G. Heidenis é similar a *B. pseudovillosa* e *B. ramboi* G. Heiden & Macias.

Neste estudo, *Baccharis milleflora* (FIGURA 7A) apresentou o eixo central do caule lenhoso medindo 1-1,5 m de altura e três caules alados (FIGURA 8A). As alas mostraram-se planas e interrompidas na extensão, medindo de 0,3-0,5cm de largura (FIGURA 7B). Não foram encontradas folhas nessa espécie.

FIGURA 7 – MORFOLOGIA EXTERNA DE *Baccharis milleflora* DC., ASTERACEAE.



A) Aspecto geral; B) Ramos vegetativos.
 FONTE: A autora (2014).

5.2 ANÁLISE ANATÔMICA

5.2.1 Ala do cladódio

As células epidérmicas, em vista frontal, apresentaram parede anticlinal delgada e com formato poligonal (FIGURA 8B), sendo possível visualizar a presença de campos de pontuação primária. Essas características são encontradas em várias espécies de carqueja (CORTADI et al., 1999; ORTINS; AKISUE, 2000; ALQUINI; TAKEMORI, 2000; BUDEL; DUARTE; SANTOS, 2003). Nesse aspecto, a F. Bras. IV (2003), descreveu a parede anticlinal das células epidérmicas de *B. trimera* com contorno sinuoso.

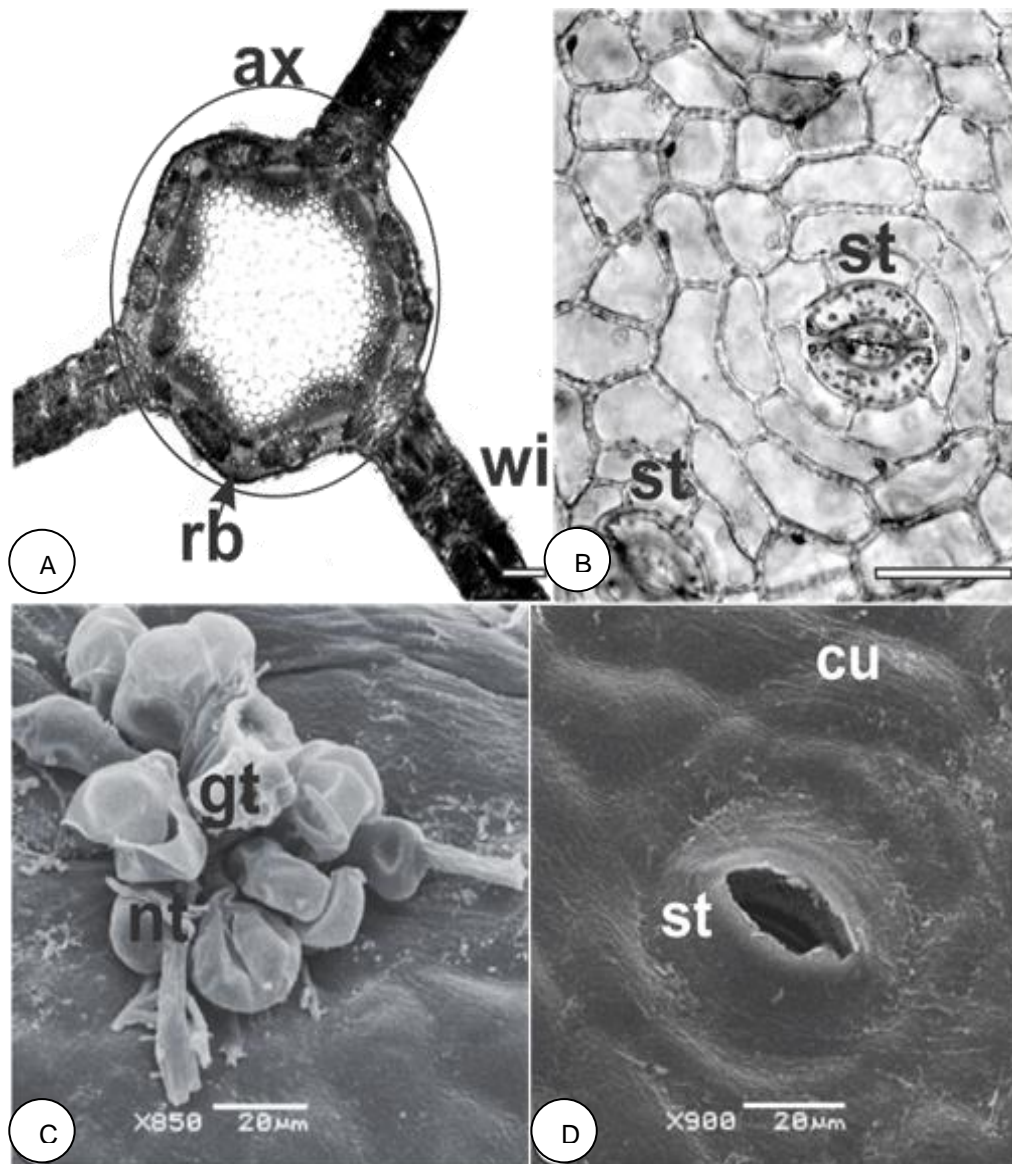
Em vista frontal, a epiderme mostra-se uniestratificada e revestida por cutícula levemente estriada (FIGURA 8D), característica semelhante foi encontrada

em *B. articulata* (Lam.) Pers. (CORTADI et al., 1999) e *B. myriocephala* DC. (SÁ; NEVES, 1996), diferindo de *B. gaudichaudiana* DC. (BUDEL et al., 2003) e *B. trimera* (CORTADI et al., 1999) que possuem cutícula estriada. No estudo realizado por Petenatti et al. (2007), com *B. sagittalis* (Less.) DC. e *B. triangularis* Hauman foi verificado a presença de uma cutícula espessa e estriada.

Estômatos anomocíticos e anisocíticos são comuns em carquejas (CORTADI et al., 1999; BUDEL et al., 2003; BUDEL et al., 2004; PETENATTI et al., 2007; BUDEL et al., 2009). No presente estudo, *B. milleflora* apresentou estômatos anomocíticos e actinocíticos (FIGURA 8B) com 5 a 7 células subsidiárias localizadas radialmente. Estas características foram descritas por Freire, Urtubey e Giuliano (2007), para as espécies não aladas: *B. boliviensis* (Wedd.) Cabrera, *B. conferta* Kunth, *B. linearis* (Ruiz & Pav.) Pers., *B. nitida* (Ruiz & Pav.) Pers., *B. odorata* Kunth, *B. pilularis* DC., *B. salicifolia* (Ruiz & Pav.) Pers., *B. sarothroides* A. Gray, *B. teindalensis* Kunth, *B. tola* Phil. e *B. tricuneata* (L. F.) Pers. Tricomas glandulares capitados bisseriados são característicos de carquejas e podem ser encontrados isolados, em tufos ou juntamente com tricomas tectores e frequentemente em depressão na epiderme (CORTADI et al., 1999; F. BRAS. IV, 1988-2003; FREIRE; URTUBEY; GIULIANO, 2007; PETENATTI et al., 2007; RODRIGUEZ; GATTUSO; GATTUSO, 2008; BUDEL; DUARTE, 2009; RODRIGUES et al., 2010).

De acordo com o padrão encontrado nas carquejas, *B. milleflora* apresentou tricomas glandulares capitados bisseriados formados por 8 células (FIGURA 8C, 9A, 9C). Outros tipos de tricomas glandulares também foram descritos para as carquejas, como o tricoma glandular capitado unisseriado em *B. sagittalis* e *B. triangularis* (PETENATTI et al., 2007) e tricoma glandular não capitado em *B. usterii* (HEIDEN et al., 2009).

FIGURA 8 – ANÁLISE ANATÔMICA DE *Baccharis milleflora* DC., ASTERACEAE.

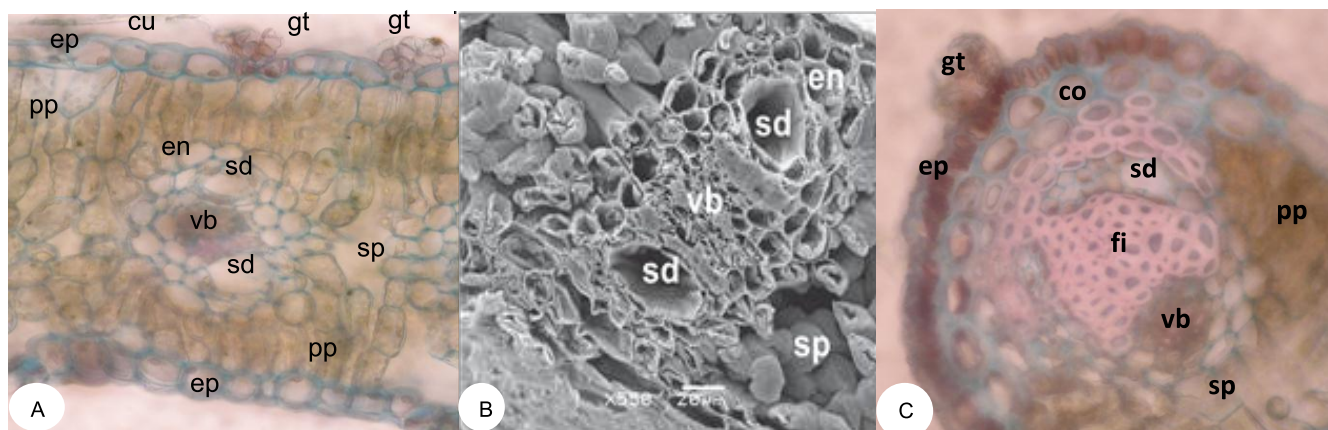


A) Secção transversal do eixo caulinar mostrando eixo central (AX) e três alas (WI); B) Vista frontal das células epidérmicas mostrando paredes anticlinais e estômatos (ST); C) Vista frontal da epiderme da ala dos cladódios evidenciando tufo de tricomas formados por tricomas glandulares capitados bisseriados (GT) e tectores flageliformes (NT) em MEV; D) Vista frontal da epiderme da ala dos cladódios mostrando estômato (ST) e cutícula levemente estriada (CU). Barra = A (15CM), (100µM), D (50µM). FONTE: A autora (2014).

Pagni e Masini (1999), acreditam que o óleo essencial presente nos tricomas glandulares e dutos secretores de espécies de Asteraceae pode ser o responsável pelo seu uso terapêutico. Nesse sentido, várias espécies de *Baccharis* são importantes fontes produtoras de óleos essenciais (MORALES et al., 2009; VANINI et al., 2012; FLORÃO et al., 2012). No estudo em questão, os tricomas glandulares

presentes em *B. milleflora* reagiram positivamente à pesquisa de compostos lipofílicos.

FIGURA 9 - *Baccharis milleflora* DC., ASTERACEAE. SECÇÃO TRANSVERSAL DA ALA DO CLADÓDIO.



A) Ala do cladódio, evidenciando endoderme (EN), Epiderme (EP), Cutícula (CU), Parênquima esponjoso (SP), Parênquima paliçádico (PP), Tricoma glandular capitado bisseriado (GT), Feixe vascular (VB) e Duto secretor (SD); B) Detalhe da figura anterior em MEV; C) Bordo da ala do cladódio, mostrando epiderme (EP), Cutícula (CU), Parênquima esponjoso (SP), Parênquima paliçádico (PP), Tricoma glandular capitado bisseriado (GT), Fibras (FI), Feixe vascular (VB) e Duto secretor (SD). BARRA = A, C (50µM). FONTE: A autora (2014).

Tricomas não glandulares anatomicamente descritos como flageliformes simples unisseriados têm sido amplamente relatados nas carquejas a exemplo de *B. microcephala* (BUDEL; DUARTE, 2009), *B. articulata*, *B. gaudichaudiana* (RODRIGUES et al., 2010), *B. crispera* (syn. *B. cylindrica*) (BUDEL et al., 2004; RODRIGUES et al., 2008), *B. sagittalis* (Less.) DC. e *B. triangularis* Hauman.

Em *B. milleflora* também foram encontrados tricomas não glandulares (FIGURA 8C), com cerca de 3 células na base sendo que estas se alargam em direção ao ápice. Descrição similar foi encontrada para as espécies não aladas: *B. coridifolia* (FREIRE; URTUBEY e GIULIANO, 2007), *B. anômala* DC. (BUDEL et al., 2008), *B. singularis* (Vell.) G.M. Barroso (SOUZA et al., 2011), *B. spicata* (Lam.) Baill. (OLIVEIRA et al., 2011) e *B. cognata* DC. (BUDEL; FARAGO; DUARTE, 2013). Adicionalmente, tricomas não glandulares, flageliformes, simples e unisseriados com células isodiamétricas na base foram descritos para a espécie não alada *B. uncinella* DC. (BUDEL; DUARTE, 2008).

As carquejas apresentam expansões caulinares que desempenham papel de folha (BUDEL et al., 2005). Nesse sentido, as alas possuem estrutura foliar interna

formada por parênquimas fotossintetizantes. Neste estudo, *B. milleflora* evidenciou parênquimas com disposição isobilateral formados por 2-3 camadas de parênquima paliádico em ambas as faces e 3 camadas de parênquima esponjoso na região central. Esta característica também foi relatada para as alas de *B. articulata* (Lam.) Pers. (ARIZA; ESPINAR, 1973; SÁ; NEVES, 1996; ORTINS; AKISUE, 2000) *B. gaudichaudiana* DC., *B. myriocephala* (BUDEL; DUARTE; SANTOS, 2003; BUDEL et al., 2003), *B. crispa* (syn *B. cylindrica*) (BUDEL et al., 2004; RODRIGUEZ, GATTUSO; GATTUSO, 2008), *B. trimera* (RODRIGUEZ; GATTUSO; GATTUSO, 2008; BUDEL; DUARTE, 2009) e *B. sagittalis* (PETENATTI et al., 2007).

A cutícula que reveste a epiderme, na borda das alas de *B. milleflora*, é estriada. Subjacente à epiderme, localiza-se 1-2 camadas de colênquima angular e diferentes graus de lignificação. Foi observado também um feixe vascular colateral com uma calota de fibras perivasculares aposta ao floema e ductos secretores (FIGURA 9C). Esses elementos foram encontrados na borda da ala algumas carquejas como: *B. microcephala* (BUDEL; DUARTE, 2009), *B. trimera* (RODRIGUES et al., 2008; BUDEL; DUARTE, 2009;) e *B. Usterii* (BUDEL; DUARTE, 2010).

Em *B. milleflora*, os feixes vasculares colaterais estavam envoltos por uma bainha parenquimática e distribuídos no parênquima esponjoso (FIGURA 9B) e na borda da ala (FIGURA 9C). Essas estruturas estavam presentes tanto na direção do floema quanto do xilema e eram acompanhados pelos ductos secretores. Os ductos secretores apresentaram epitélio unisseriado formado por cerca de 6-10 células, com citoplasma denso (FIGURA 9A, 9B, 9C). Esses ductos apresentaram reação positiva ao Sudam III, devido à natureza lipofílica de seus produtos.

Essas características foram relatadas em diversas carquejas (BUDEL et al., 2003; CORTADI et al., 1999; ORTINS; AKISUE, 2000; SÁ; NEVES 1996; BUDEL; DUARTE, 2009; BUDEL; DUARTE, 2010; RODRIGUES et al., 2010). Entretanto, *B. crispa* apresentou ductos secretores somente nas bordas das alas, os quais não acompanhavam os feixes vasculares (CORTADI et al., 1999).

5.2.2 Eixo caulinar

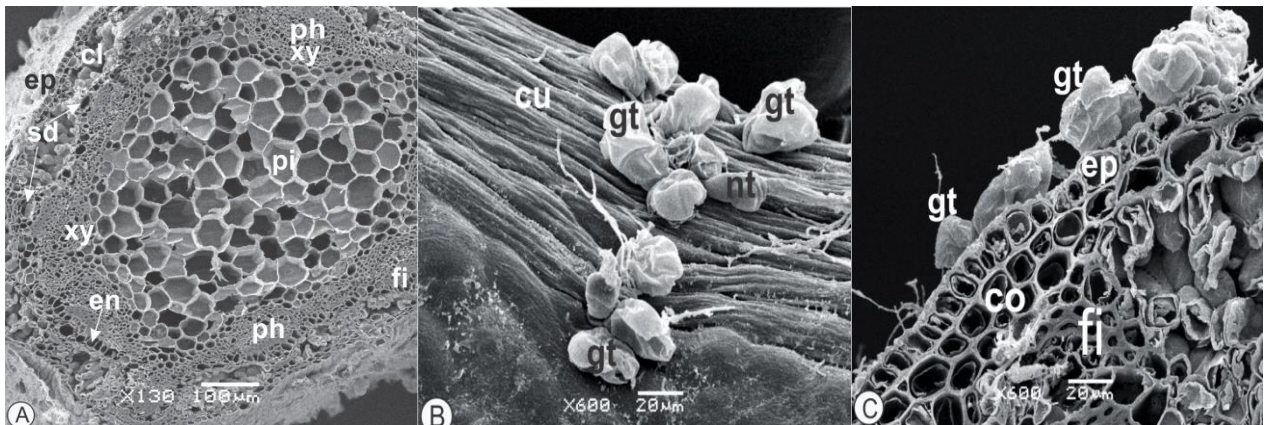
Os cladódios de *B. milleflora*, em seção transversal, exibiram eixo central circular e com nervuras entre as alas (FIGURA 8A), as quais foram observadas em

B. crisper (CORTADI et al., 1999), *B. usterii* (BUDEL; DUARTE, 2010). Contudo, não foram observadas em *B. microcephala* (BUDEL; DUARTE, 2009), *B. Sagittalis* (PETENATTI et al., 2007) e *B. trimera* (CORTADI et al., 1999; BUDEL; DUARTE, 2009, RODRIGUES et al., 2010).

No presente estudo, a epiderme apresentou-se em camada única revestida por cutícula espessa e estriada (FIGURA 10A, 10B, 10C), características também encontradas em *B. sagittalis* e *B. triangularis* (PETENATTI et al., 2007). Nas carquejas, os estômatos estão localizados no mesmo nível ou ligeiramente acima das demais células epidérmicas (BUDEL et al., 2003; BUDEL; DUARTE; SANTOS, 2004; CORTADI et al., 1999; BUDEL; DUARTE, 2009; BUDEL; DUARTE, 2010).

Divergindo da constatação geral em *B. milleflora* os estômatos foram encontrados em nível superior às demais células epidérmicas (FIGURA 11A). Os tricomas mencionados para a ala do cladódio também foram encontrados no eixo caulinar (FIGURA 10B, 10C).

FIGURA 10 - *BACCHARIS MILLEFLORA* DC., ASTERACEAE. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.



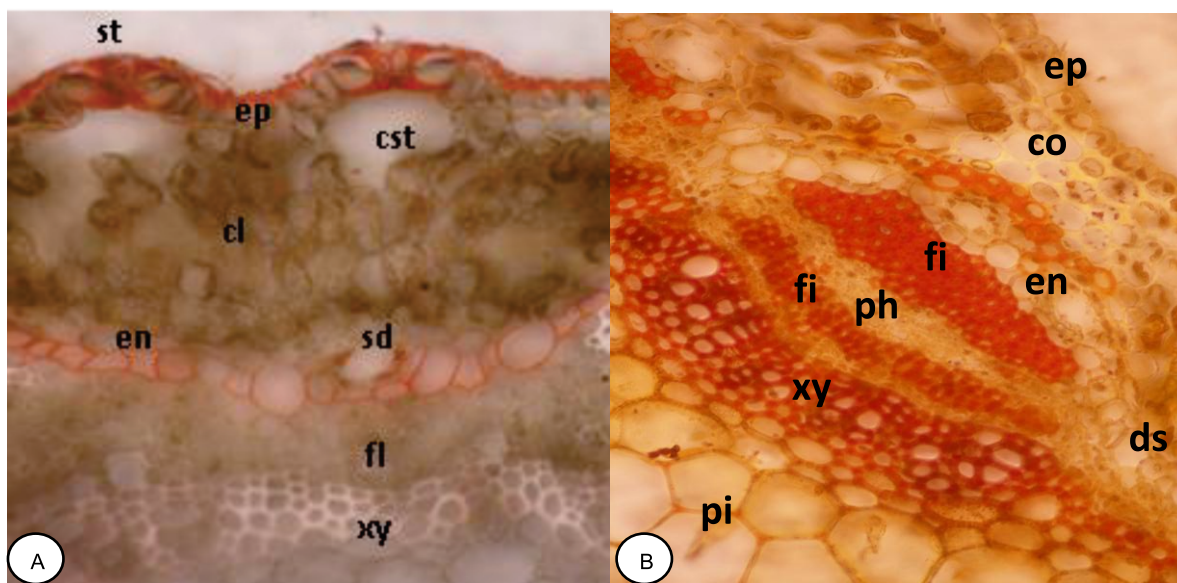
A) Secção transversal do caule, indicando epiderme (EP), Endoderme (EN), Fibras (FI), Floema (PH), Xilema (XY), Medula (PI), Clorênquima (CL) e Dutos secretores (SD); B) Vista frontal da epiderme do eixo caulinar, mostrando cutícula estriada (CU) e tricomas glandulares capitados bisseriados (GT), Tricomas tectores flageliformes (NT) organizados em tufos; C) Secção transversal do eixo caulinar, evidenciando epiderme (EP) com tricomas glandulares capitados bisseriados (GT), Colênquima (CO) e fibras (FI). FONTE: A autora (2014).

Subjacente ao sistema de revestimento de *B. milleflora* encontraram-se grupos alternados de clorênquima (FIGURA 11A) e colênquima do tipo angular (FIGURA 11B). O colênquima, localizado próximo aos feixes vasculares, apresentou cerca de 3 camadas (FIGURA 11B). Calotas de fibras perivasculares bem

desenvolvidas foram encontradas com o floema. Ductos secretores semelhantes aqueles das alas estavam dispostos perto da endoderme, que delimita internamente a região cortical (FIGURA 11B), e cujas paredes de células estavam impregnadas com compostos lipofílicos.

Essas características estão de acordo com o relatado para outras carquejas, a exemplo de *B. myriocephala* (SÁ; NEVES, 1996), *B. articulata*, *B. crispa* (CORTADI et al., 1999; BUDEL; DUARTE; SANTOS, 2004), *B. trimera* (CORTADI et al., 1999, BUDEL; DUARTE, 2009), *B. sagittalis*, *B. triangularis* (PETENATTI et al., 2007), *B. microcephala* (BUDEL; DUARTE, 2009) e *B. usterii* (BUDEL; DUARTE, 2010).

FIGURA 11 - *Baccharis milleflora* DC., ASTERACEAE. SECÇÃO TRANSVERSAL DO EIXO CAULINAR.



A) Região do clorênquima (CL) do eixo caular, mostrando epiderme (EP) com estômatos localizados acima das demais células epidérmicas (ST), Cutícula (CU), Câmara subestomática (CST), Endoderme (EN), Duto secretor (SD), Fibras (FI), Floema (PH) e xilema (XY). B) Região do colênquima (CO) do eixo caular, evidenciando epiderme (EP), Endoderme (EN), Dutos secretores (SD), Fibras (FI), Floema (PH), Xilema (XY) e medula (PI). Barra = A, B (50 µM).

FONTE: A autora (2014).

O sistema vascular das carquejas é constituído por um cilindro de floema, formado em direção centrífuga, e um cilindro de xilema, formado centripetamente, estabelecendo uma região medular formada por células relativamente grandes e de paredes delgadas não lignificadas (BUDEL et al., 2003; BUDEL; DUARTE; SANTOS, 2004; CORTADI et al., 1999; BUDEL; DUARTE, 2009; BUDEL; DUARTE,

2010). Essas mesmas características foram encontradas em *B. milleflora* (FIGURA 11A, 11B).

Nakata (2003), afirmou que o crescimento da planta e a baixa concentração de cálcio podem influenciar na quantidade de cristais presentes. Jorge et al. (1991), afirmou que cristais de oxalato de cálcio estão ausentes no gênero *Baccharis*. No presente trabalho, *B. milleflora* não evidenciou cristais, entretanto, estes foram encontrados nas espécies aladas, *B. articulata* (CORTADI et al., 1999; ORTINS; AKISUE, 2000), *B. crispa* (CORTADI et al., 1999; BUDEL et al., 2004), *B. myriocephala* (SÁ; NEVES, 1996), *B. microcephala* (BUDEL; DUARTE, 2009), *B. sagittalis*, *B. triangularis* (PETENATTI et al., 2007) e *B. trimera* (CORTADI et al., 1999; F. BRAS. IV, 1988-2003; BUDEL; DUARTE, 2009).

De maneira geral, a descrição dos estômatos anomocíticos e actinocíticos acima das demais células, a presença tricomas glandulares capitados bisseriados, tectores flagelifomres simples, ductos secretores de produtos lipofílicos e a ausência de cristais auxiliaram na identificação e diferenciação de *B. milleflora* das demais espécies.

5.2.3. Droga

A droga vegetal consistiu de caules alados, secos e fragmentados (FIGURA 12). O pó atendeu a todas as exigências estabelecidas para a espécie. De maneira geral, foram encontrados fragmentos de epiderme com estômatos anomocíticos e actinocíticos, tricomas glandulares e tectores (não glandulares), porções de parênquima paliçádico, esponjoso e medular; porções de fibras acompanhadas de ductos secretores.

FIGURA 12 - *Baccharis milleflora* DC., ASTERACEAE. DROGA FRAGMENTADA.



FONTE: A autora (2014).

5.3 EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora*

Os cladódios de *B. milleflora* foram coletados pela manhã, entre 9:00 e 10:00 horas, nas quatro estações do ano de 2013. A extração, realizada por meio do aparato clevenger, revelou que o óleo essencial da presente espécie possui menor densidade que a água. Foi observada também a formação de uma espuma intensa e persistente após a extração indicando a presença de saponinas na droga vegetal. O óleo apresentou uma coloração amarelo claro e um odor característico. O rendimento dos óleos foi de 0,6%, 0,5%, 0,6% e 0,6% em relação ao peso de material fresco no outono, inverno, primavera e verão. Agostini et al. (2005), utilizando o mesmo método de extração, encontrou um rendimento de 0,1% para o óleo essencial de *B. milleflora*. Demais espécies pertencentes ao gênero *Baccharis*, como *B. articulata* e *B. oxyodonta* apresentaram rendimentos de 0,5% e 0,3%, respectivamente (AGOSTINI et al., 2005).

A composição química das diferentes espécies medicinais sofre alterações devido à ação dos fatores ambientais, como a temperatura, pluviosidade, nutrição e horário de coleta. No caso dos óleos essenciais há um aumento em seu teor quando as plantas produtoras se encontram em ambientes com temperaturas elevadas, porém, em dias muito quentes pode-se observar uma perda excessiva dos mesmos (MORAIS, 2009).

Ao avaliarmos a composição química dos óleos essenciais de *B. milleflora* provenientes das diferentes estações do ano, identificamos aproximadamente 25 compostos, os quais estão compilados nas tabelas 1 a 4 e seus cromatogramas apresentados nas figuras 13 a 24. De modo geral, os óleos essenciais de *B. milleflora* foram compostos principalmente por sesquiterpenos hidrocarbonados e por uma mistura de monoterpenos hidrocarbonados e sesquiterpenos oxigenados e apresentaram como majoritários os sesquiterpenos hidrocarbonados: trans-cariofileno (7,65-13,41%), germacreno-D (6,83-11,18%), biciclogermacreno (9,99-12,89%) e 9-10-dehidro isolongifoleno (8,74-10,06%).

Os compostos majoritários foram os mesmos nas quatro estações do ano, com exceção do 9-10-dehidro isolongifoleno que apresentou menores teores para os óleos obtidos na primavera e no verão. Por meio da análise estatística empregada, os quatro compostos majoritários apresentaram diferenças significativas em relação

a estação do ano. O transcariofileno apresentou o maior teor no verão (13,41%), assim como o germacreno-D, o biciclogermacreno e o 9-10-dehidro isolongifoleno apresentaram os maiores teores na primavera (11,18%), no inverno (12,89%) e no outono (10,06%), respectivamente. Informações sobre o efeito de condições ambientais no metabolismo secundário de plantas provêm principalmente de esforços da pesquisa para maximizar a produção de constituintes ativos de espécies medicinais e aromáticas. Como aplicação prática, avanços no sentido de compreender a influência dos fatores ambientais na regulação de biossíntese de metabólitos secundários podem contribuir para um aumento na produção de compostos de interesse nestas espécies (MORAIS, 2009). Alguns compostos foram apresentados nas tabelas pelos valores de suas massas molares, os quais exibiram teores elevados como o composto com massa molar 204 que apresentou 13,77% e 15,31% para as amostras dos óleos essenciais obtidos no outono e o no verão, porém, teores mais baixos para o inverno (7,15%) e (2,34%).

Os majoritários relatados em nosso estudo também foram encontrados em *B. trimeria* com teores variando de 12 a 21% para (E)-cariofileno; 6,3 a 28% para germacreno-D e 12 a 23% para biciclogermacreno (SILVA et al., 2007). Entretanto, Agostini et al. (2005), ao analisar três amostras do óleo essencial de *B. milleflora* verificou a presença de majoritários distintos entre eles o espatulenol com teor de 16,2% e 25,3% em duas amostras e o β -pineno com teor de 34,2% na terceira amostra. Essas amostras apresentaram altas porcentagens de sesquiterpenos oxigenados (25,3% e 28,2%) e monoterpenos hidrocarbonados (38,4%), respectivamente. Entretanto, baixas concentrações desses compostos foram observadas em nosso trabalho. Muitos compostos voláteis não relatados em estudos anteriores (SIMÕES-PIRES et al., 2005; AGOSTINI et al., 2005) foram identificados no óleo essencial de *B. milleflora* como valenceno; 9,10-dehidro-isolongifolene, 4-alfa-metil-3,4,4a,9,10a-hexahidro-1(2H)-fenantrenona; ar-turmerona; (E)- β -farnesene; 1-acetyl-4,6,8 trimetilazuleno e β -bisaboleno.

Zapata et al. (2010), encontrou limoneno (9,4%) e timol (24,04%) como compostos majoritários no óleo essencial de *B. latifolia* e *B. alata*. Já Sosa et al. (2012), encontrou os majoritários (Z)- β -ocimene (11,03%) e α -felandreno (9,66%), no óleo essencial de *B. salicifolia*. Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *B. dracunculifolia* D.C. e *B. uncinella* D.C., apresentaram teores entre 18,76-27,45% para α -pinene e 12,96-14,02% para ϵ -nerolidol (FABIANE et al.,

2007). Porém, Boix et al. (2010), ao analisar o óleo de *B. dracunculifolia* encontrou como majoritários verbenona (10.1%), mirceno (10.2%), 1,8-cineol (10,4%) e a cânfora (25,2%). Lago et al. (2008), relatou a prevalência de compostos sesquiterpênicos no óleo essencial de espécimes femininas e masculinas de *B. trimera* com predominância de 48,5 e 68,6%, respectivamente. *B. unincella* revelou a prevalência de monoterpenos (55,9%) no óleo essencial (AGOSTINI et al., 2005). De acordo com Gobbo e Lopes (2007), essas variações podem ser atribuídas a diversos fatores como a sazonalidade, condições ambientais, condições de stress, entre outros. Nosso estudo demonstrou uma composição química distinta de *B. milleflora* em comparação com a literatura, o que pode ser explicado pela presença de diferentes quimiotipos (AGOSTINI et al., 2005). Estas diferenças na composição reforçam a importância da caracterização das amostras por GC/MS a fim de encontrar correlações entre a composição química e os efeitos biológicos.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFENTE À COLETA DE OUTONO.

COMPOSTOS	TR (MIN)	IR	ÁREA DO PICO (%)
α -copaeno	22,40	1375	0,22
α -gurjuneno	23,80	1409	0,39
trans-cariofileno	24,22	1419	7,65
aromadendreno	24,97	1438	1,18
α -humuleno	25,58	1453	3,34
trans- β -farneseno	25,76	1457	1,68
allo-aromadendreno	25,85	1460	0,75
M = 204	26,40	1473	0,54
γ -muuroleno	26,52	1477	0,55
germacreno-D	26,68	1480	6,83
β -selineno	26,78	1483	1,46
valenceno	27,11	1491	0,46
biciclogermacreno	27,34	1497	11,57
α -muuroleno	27,45	1500	0,59
β -bisaboleno	27,81	1509	3,49
cis- γ -bisaboleno	28,05	1515	0,58
delta-cadineno	28,38	1524	4,27
M = 218	29,87	1562	1,23
M = 204	30,02	1566	0,88
9-10-dehidro isolongifoleno	30,50	1578	10,06
M = 204	30,69	1583	5,19
M = 204	31,04	1592	13,77
M = 204	31,39	1602	1,14
M = 220	31,64	1608	0,52
M = 204	32,14	1622	0,50
M = 220	32,36	1628	1,28
cis-cadin-4-en-7-ol	32,55	1633	1,67
M = 204	32,87	1642	1,03
M = 204	33,27	1653	1,02
ar-turmerona	33,81	1667	2,31
M = 214	35,71	1720	0,63
1-acetil-4,6,8-trimetilazuleno	36,17	1733	2,60
4-alfa-metil-3,4,4a,9,10a-hexahidro-1(2H)-fenantrenona	36,28	1736	0,56
M = 214	36,71	1749	4,55
M = 214	37,51	1772	2,03
Compostos identificados			
Sesquiterpenos hidrocarbonados			55,07
Sesquiterpenos oxigenados			6,58

TR: tempo de retenção em minutos

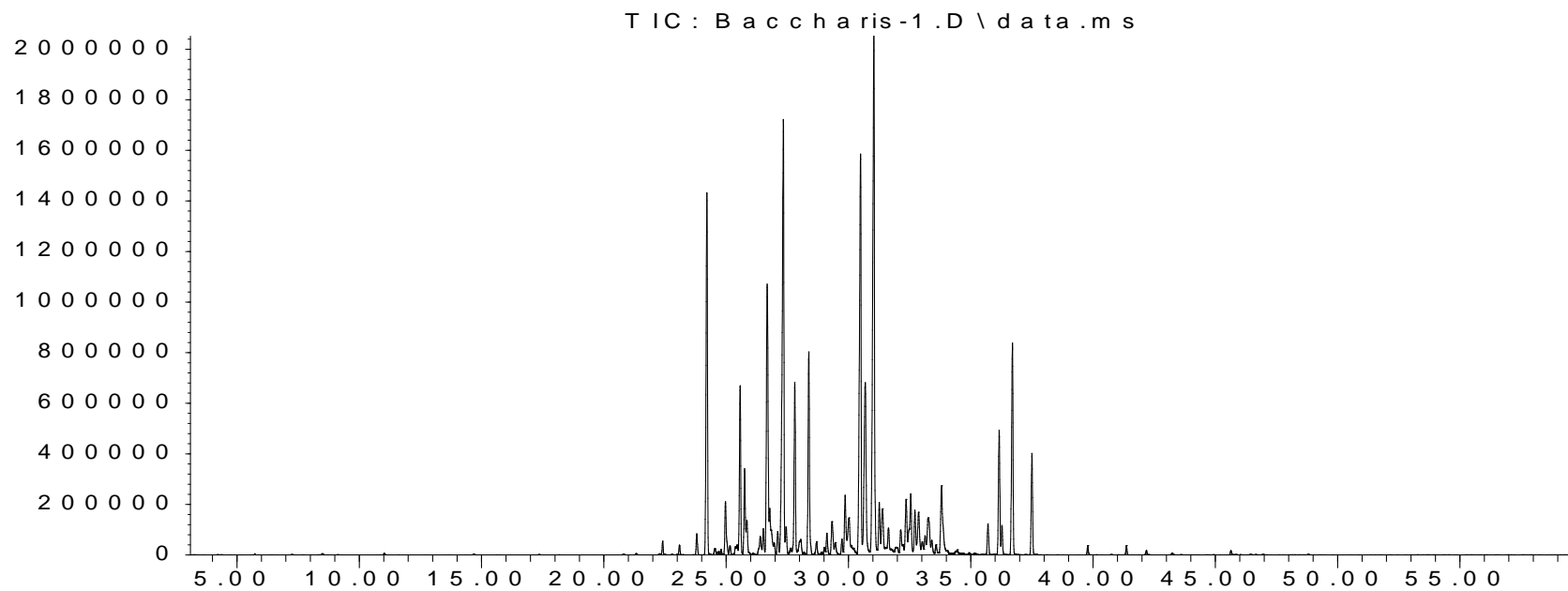
IR: índice de retenção

M: massa molar

FONTE: A autora (2015).

FIGURA 13 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE OUTONO.

Abundance



Time -->

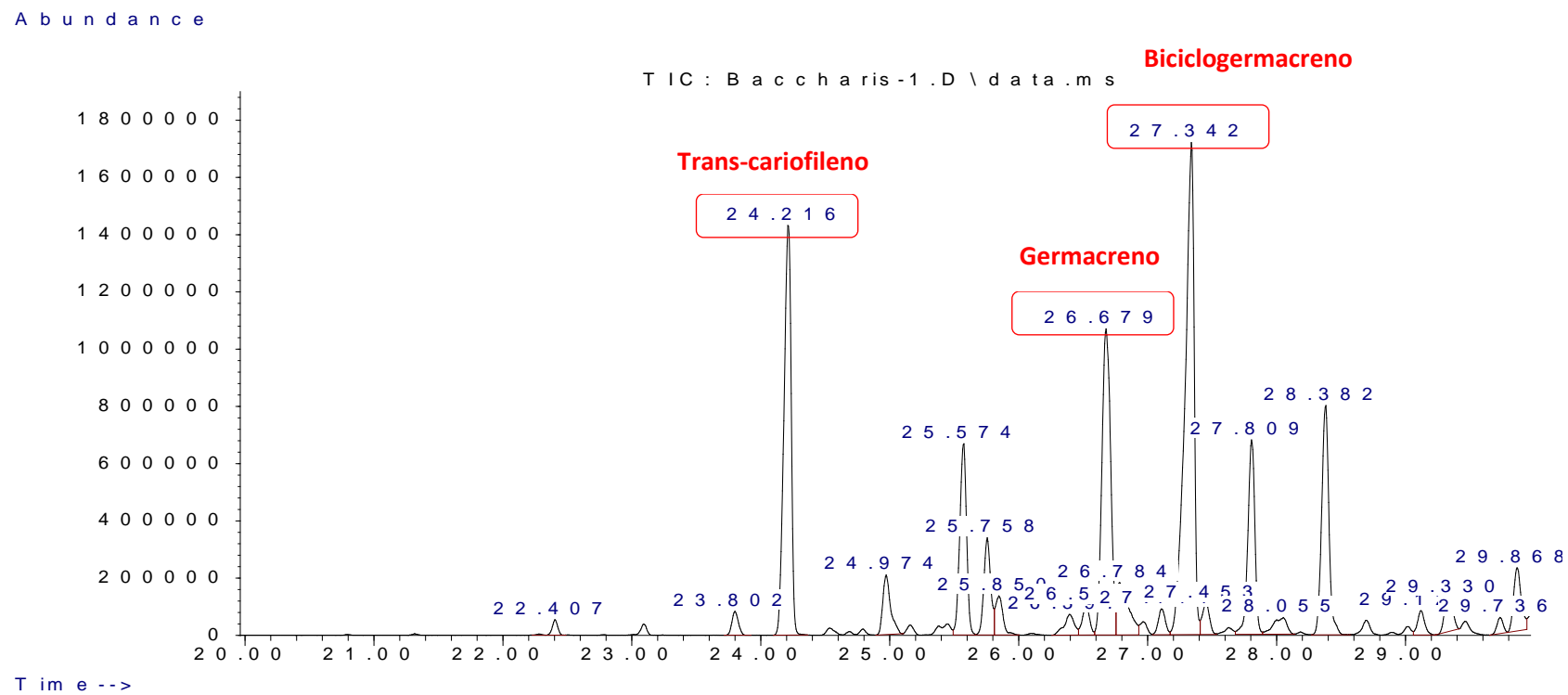
FIGURA 14 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (20-30 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE OUTONO.

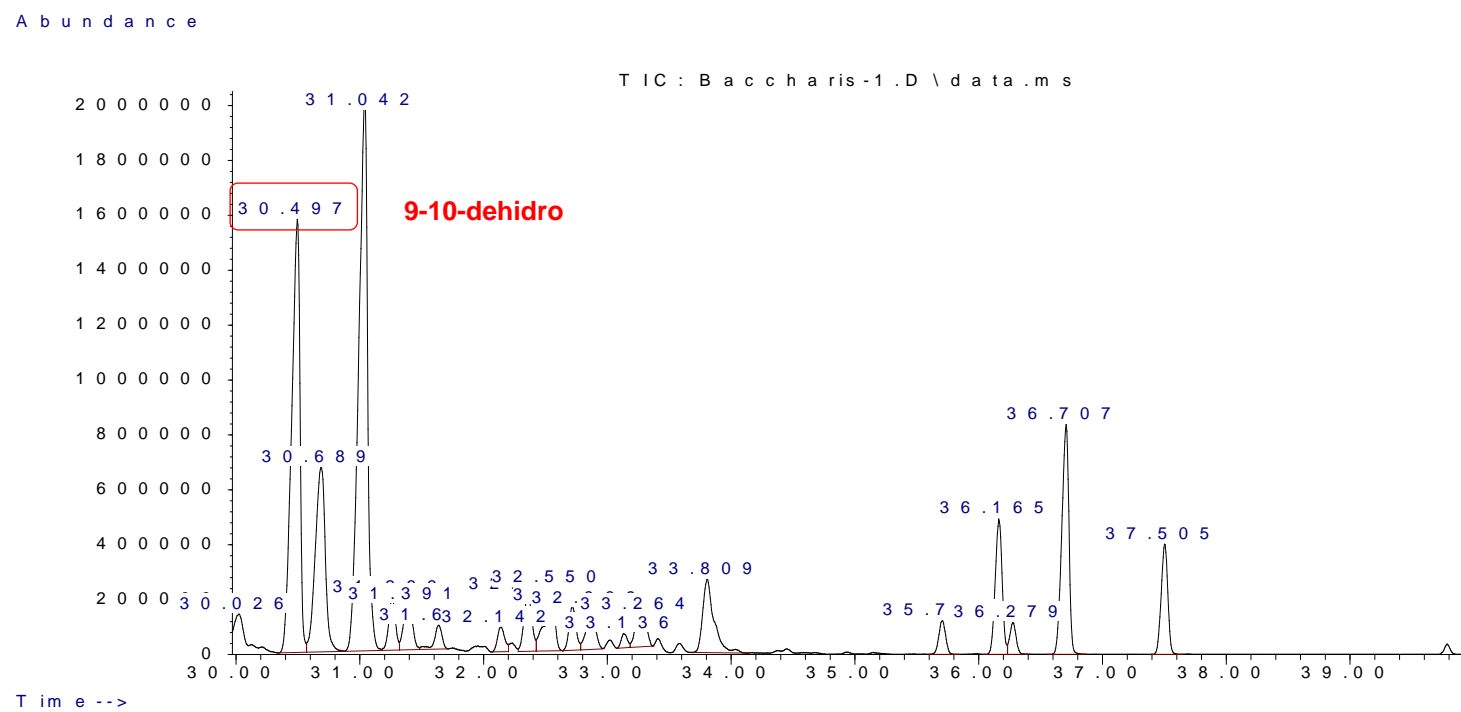
FIGURA 15 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (30-40 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE OUTONO.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFENTE À COLETA DE INVERNO.

COMPOSTOS	TR	IR	ÁREA DO PICO (%)
α -pineno	5,73	933	0,18
β -felandreno	8,49	1028	0,60
α -copaeno	22,40	1375	0,72
β -elemeno	23,09	1392	0,39
α -gurjuneno	23,80	1409	0,81
trans-cariofileno	24,22	1419	9,99
aromadendreno	24,97	1438	1,42
α -humuleno	25,57	1453	1,43
trans- β -farneseno	25,76	1458	2,23
allo-aromadendreno	25,85	1460	0,94
gama-muuroleno	26,53	1477	0,81
germacreno-D	26,69	1481	9,03
β -selineno	26,79	1483	1,65
valenceno	27,11	1491	0,56
biciclogermacreno	27,35	1497	12,89
α -muuroleno	27,46	1500	0,70
β -bisaboleno	27,81	1509	3,87
cis-gama-bisaboleno	28,05	1515	0,81
delta-cadineno	28,38	1524	5,03
trans-cadina-1,4-dieno	28,70	1532	0,34
M = 218	29,33	1548	1,44
n.i.	29,73	1559	0,25
M = 218	29,87	1562	1,42
9-10-dehidro isolongifoleno	30,49	1578	8,74
M = 204	30,68	1583	5,10
M = 204	31,01	1592	7,15
M = 220	32,34	1628	0,89
M = 204	32,87	1642	1,18
M = 204	33,29	1653	0,96
ar-turmerona	33,81	1667	1,81
M = 214	35,71	1720	0,86
1-acetil-4,6,8-trimetilazuleno	36,16	1733	1,97
4-alfa-metil-3,4,4a,9,10a-hexahidro-1(2H)-fenantrenona	36,28	1736	0,69
M = 214	36,71	1749	5,85
M = 214	37,51	1772	2,53
Compostos identificados			
Monoterpenos hidrocarbonados			0,78
Sesquiterpenos hidrocarbonados			62,36
Sesquiterpenos oxigenados			4,55

TR: tempo de retenção em minutos

IR: índice de retenção

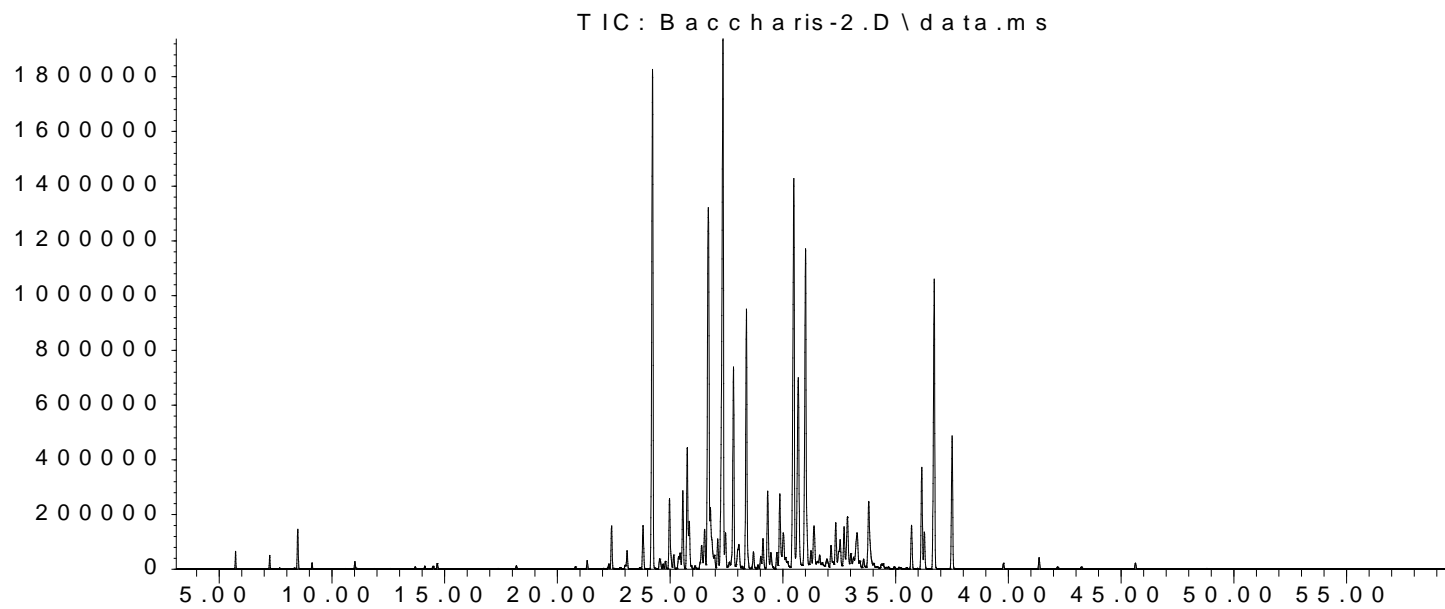
M: massa molar

n.i: não identificado

FONTE: A autora (2015).

FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE INVERNO.

Abundance



Time -->

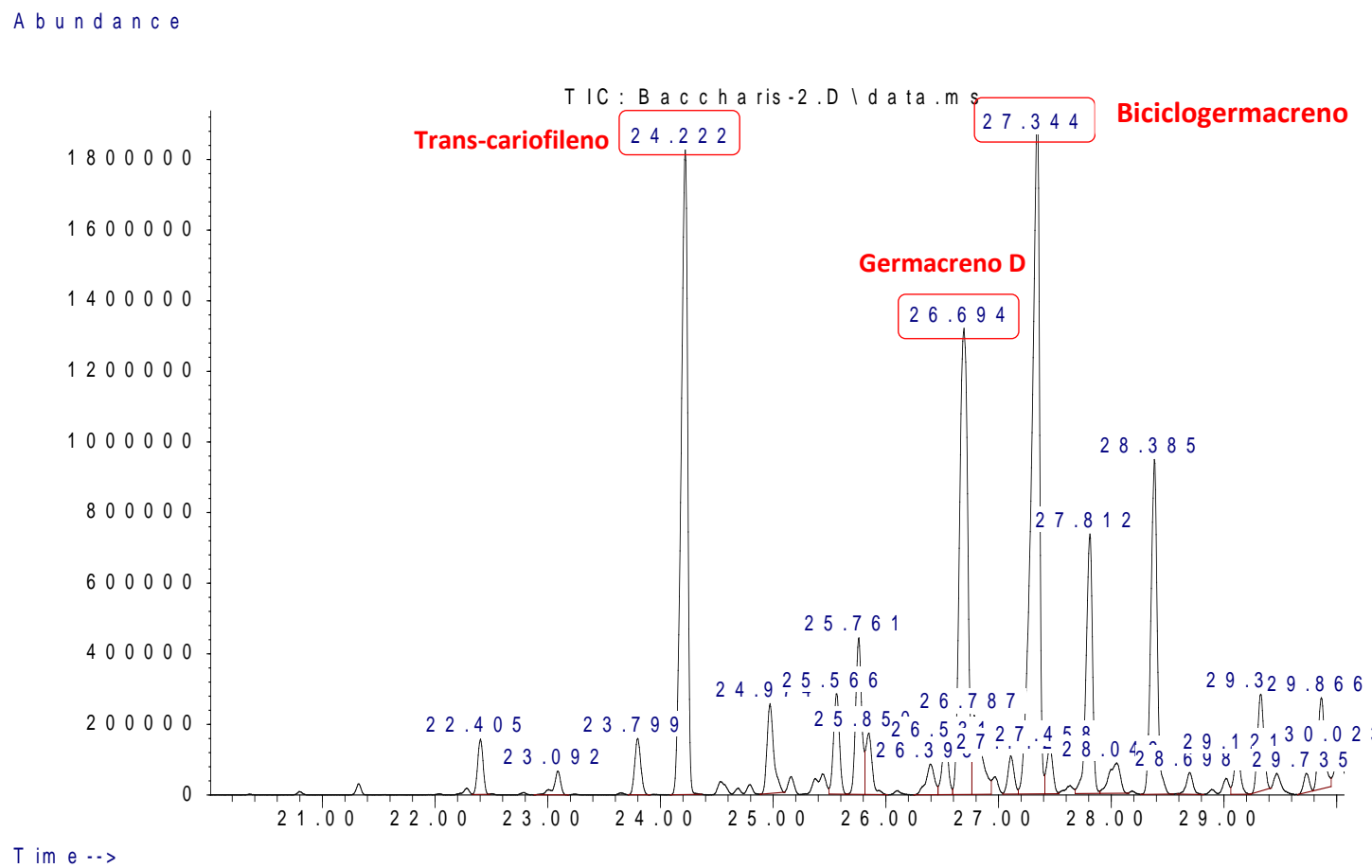
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (20-30 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE INVERNO.

FIGURA 18 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (30-40 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE INVERNO.

A b u n d a n c e

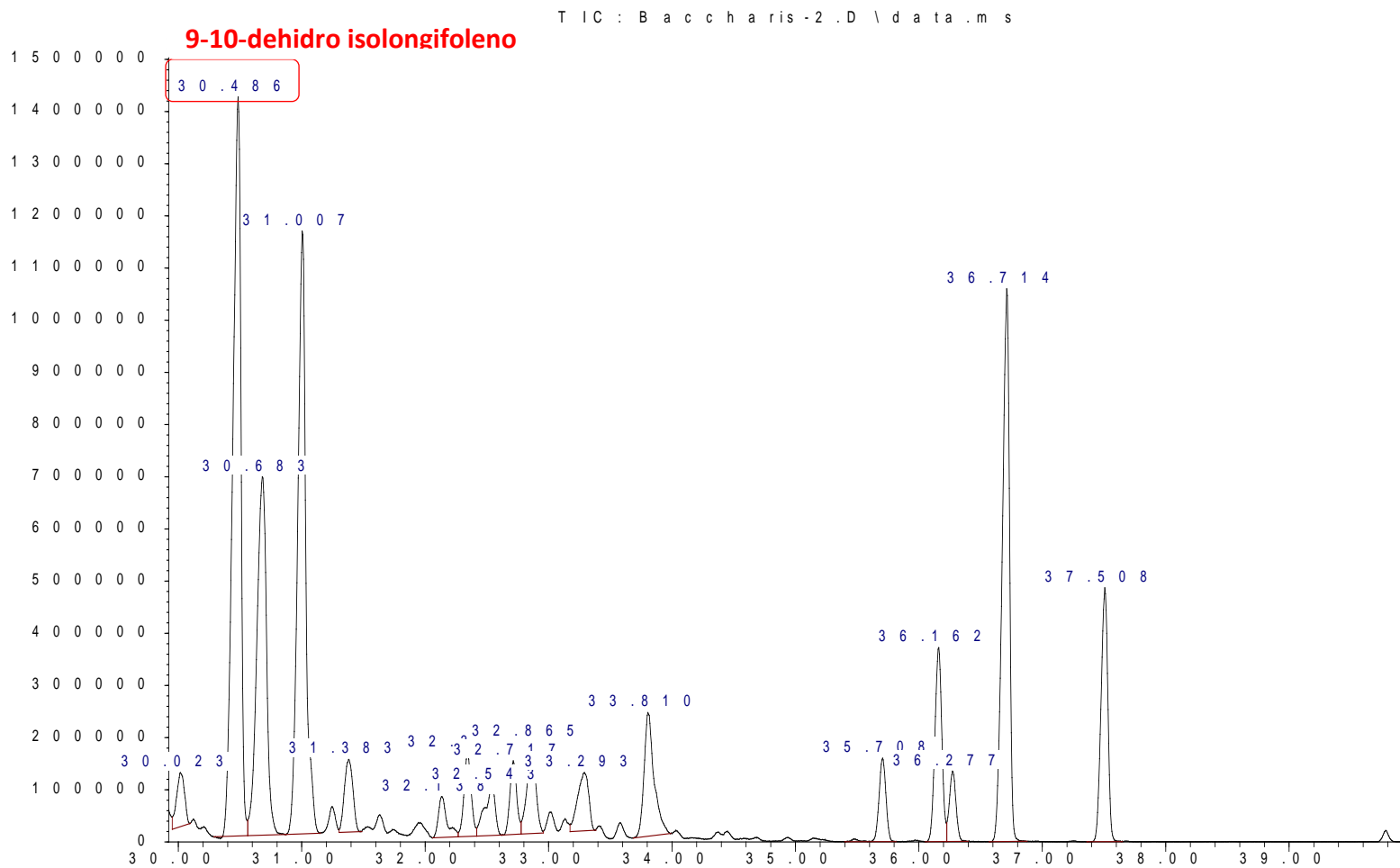


TABELA 3 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFENTE À COLETA DE PRIMAVERA.

COMPOSTOS	TR (MIN)	IR	ÁREA DO PICO (%)
β-felandreno	8,49	1028	0,64
trans-ocimeno	9,12	1046	0,17
α-copaeno	22,40	1375	0,33
β-elemeno	23,09	1392	0,35
α-gurjuneno	23,80	1409	0,63
trans-cariofileno	24,23	1419	9,28
aromadendreno	24,98	1438	1,51
α-humuleno	25,60	1453	8,05
trans-β-farneseno	25,77	1458	2,62
allo-aromadendreno	25,85	1460	0,53
M = 204	26,41	1474	0,46
γ-muuroleno	26,54	1477	1,24
germacreno-D	26,72	1481	11,18
β-selineno	26,80	1483	1,68
valenceno	27,11	1491	0,43
biciclogermacreno	27,35	1497	12,16
α-muuroleno	27,46	1500	0,80
β-bisaboleno	27,81	1509	4,09
γ-cadineno	28,00	1514	0,57
cis-γ-bisaboleno	28,05	1515	0,44
delta-cadineno	28,38	1524	4,31
9-10-dehidro isolongifoleno	30,44	1577	1,21
M = 204	30,68	1583	2,34
M = 204	30,99	1591	4,34
M = 220	31,25	1598	1,39
cis-cadin-4-en-7-ol	32,54	1633	1,54
M = 204	32,86	1641	0,77
M = 204	33,25	1652	0,95
ar-turmerona	33,81	1667	1,91
M = 214	35,71	1720	1,00
1-acetil-4,6,8-trimetilazuleno	36,17	1733	3,22
4-alfa-metil-3,4,4a,9,10a-hexahidro-1(2H)-fenantrenona	36,28	1737	1,39
M = 214	36,73	1749	7,11
M = 214	37,53	1772	4,79
M = 262	45,66	2020	1,51
Compostos identificados			
Monoterpenos hidrocarbonados			0,81
Sesquiterpenos hidrocarbonados			61,41
Sesquiterpenos oxigenados			6,67

TR: tempo de retenção em minutos

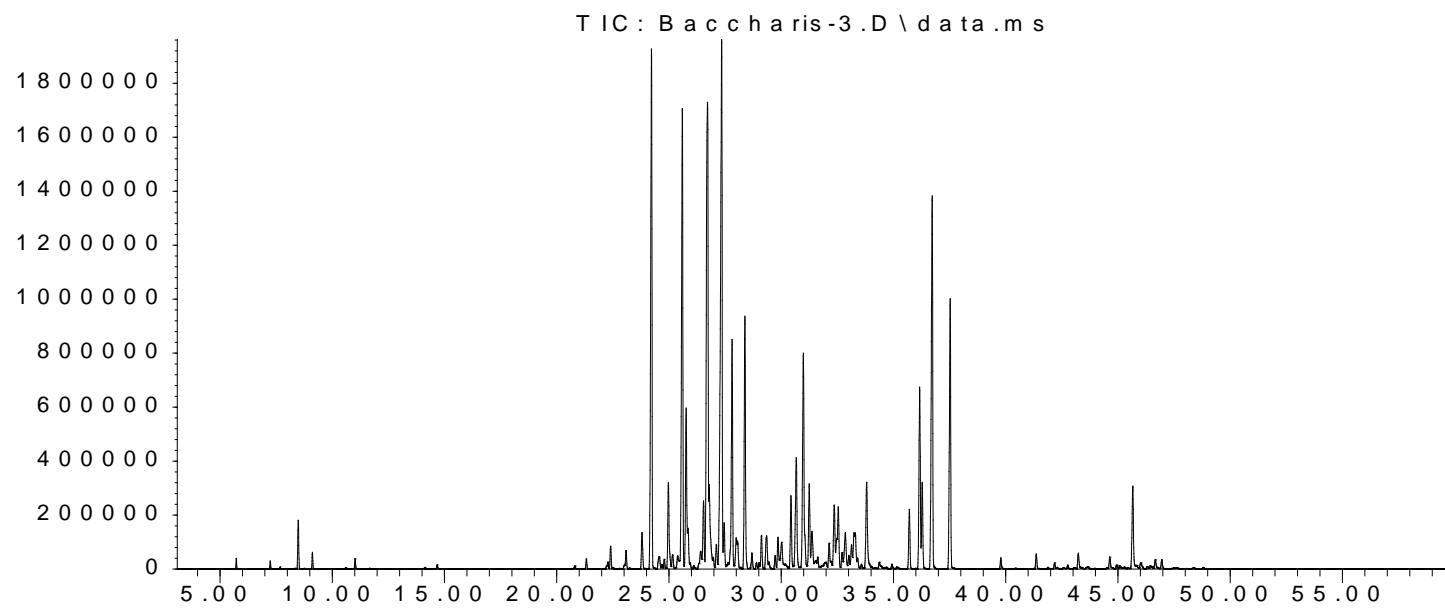
IR: índice de retenção

M: massa molar

FONTE: A autora (2015).

FIGURA 19 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA.

Abundance



Time -->

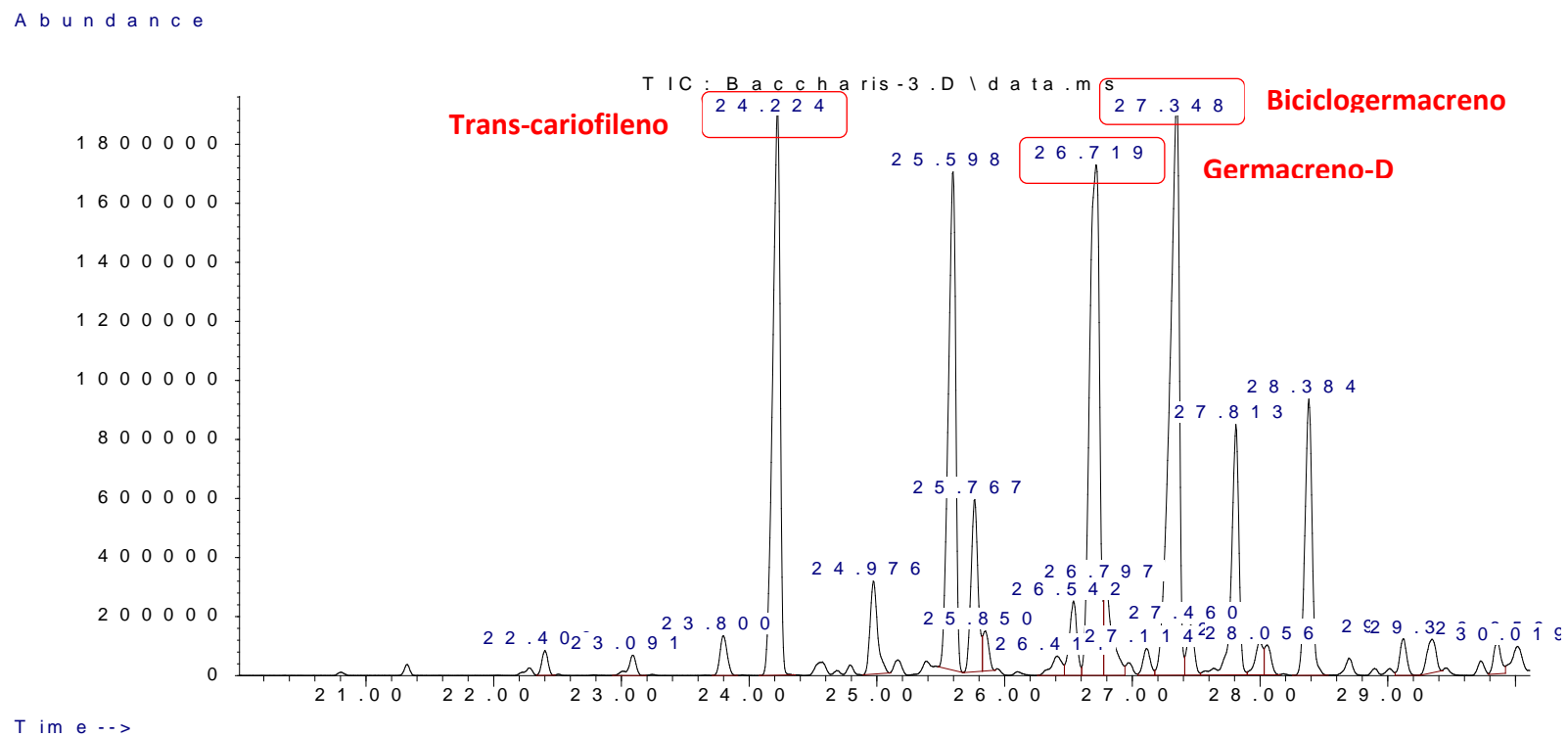
FIGURA 20 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (20-30 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA.

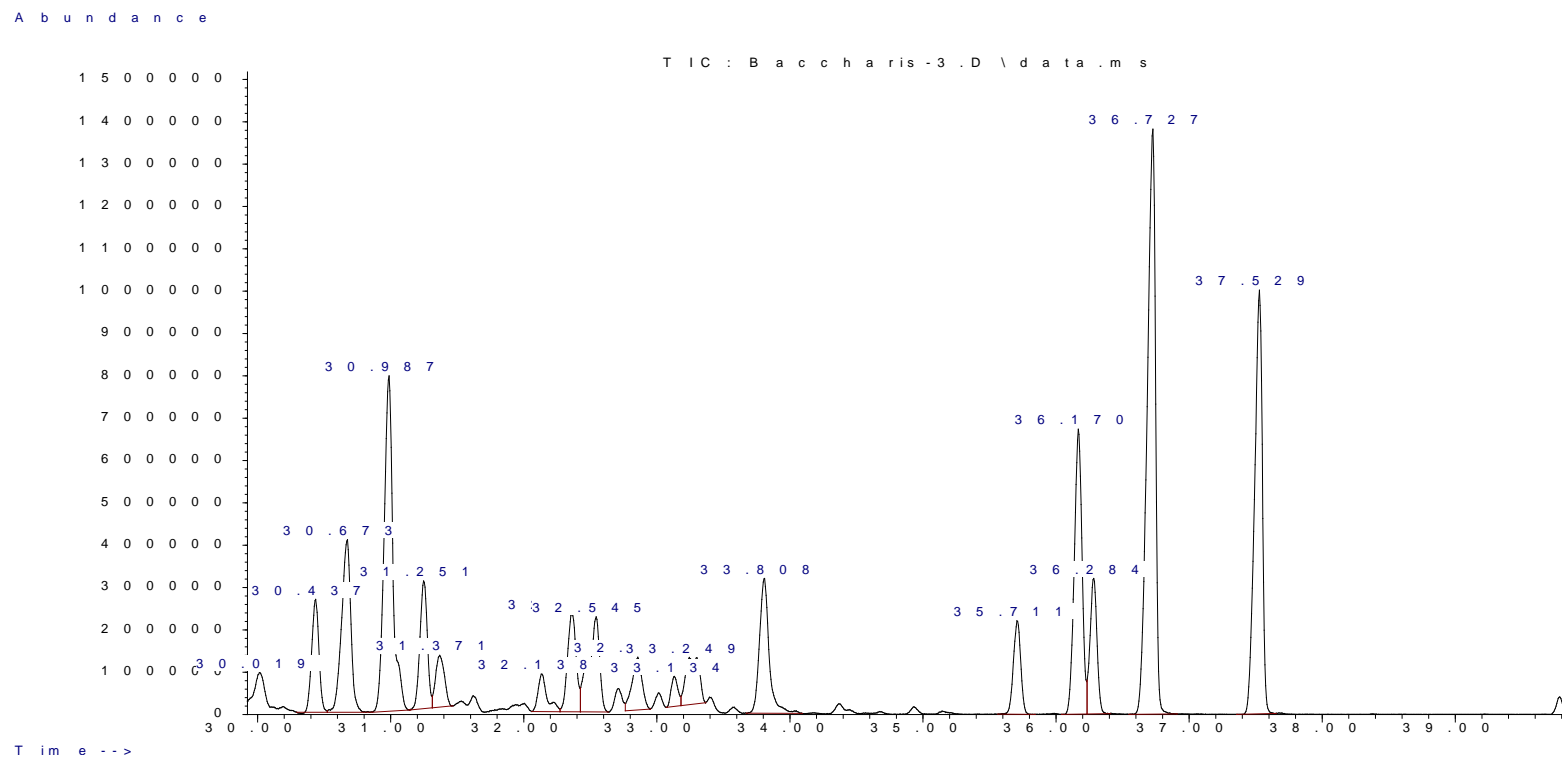
FIGURA 21 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (30-40 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE PRIMAVERA.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFENTE À COLETA DE VERÃO.

COMPOSTOS	TR (MIN)	IR	ÁREA DO PICO (%)
α -pineno	5,73	933	1,10
β -mirceno	7,24	990	0,42
β -felandreno	8,49	1028	1,50
α -copaeno	22,40	1375	0,49
β -elemeno	23,09	1392	0,67
α -gurjuneno	23,80	1409	0,93
trans-cariofileno	24,22	1419	13,41
β -gurjuneno	24,54	1427	0,44
aromadendreno	24,97	1438	2,80
M = 204	25,16	1443	0,40
α -humuleno	25,57	1453	5,67
trans- β -farneseno	25,76	1458	2,22
allo-aromadendreno	25,85	1460	0,96
gama-muuroleno	26,53	1477	1,51
germacreno-D	26,69	1481	7,13
β -selineno	26,79	1483	0,90
valenceno	27,11	1491	0,35
biciclogermacreno	27,35	1497	9,99
α -muuroleno	27,46	1500	0,85
β -bisaboleno	27,81	1509	3,11
cis- γ -bisaboleno	28,05	1515	0,78
delta-cadineno	28,38	1524	3,68
M = 204	30,02	1566	1,01
9-10-dehidro isolongifoleno	30,49	1578	5,27
M = 204	30,68	1583	5,30
M = 204	31,01	1592	15,31
M = 220	31,26	1598	0,90
M = 220	32,34	1628	0,97
cis-cadin-4-en-7-ol	32,55	1633	1,74
M = 220	32,72	1638	0,79
M = 204	32,87	1642	0,84
M = 204	33,14	1649	0,52
M = 204	33,29	1653	1,02
ar-turmerona	33,81	1667	1,13
1-acetil-4,6,8-trimetilazuleno	36,16	1733	2,00
Compostos identificados			
Monoterpenos hidrocarbonados			3,02
Sesquiterpenos hidrocarbonados			61,16
Sesquiterpenos oxigenados			4,87

TR: tempo de retenção em minutos

M: massa molar

IR: índice de retenção

FONTE: A autora (2015).

FIGURA 22 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE VERÃO.

A b u n d a n c e

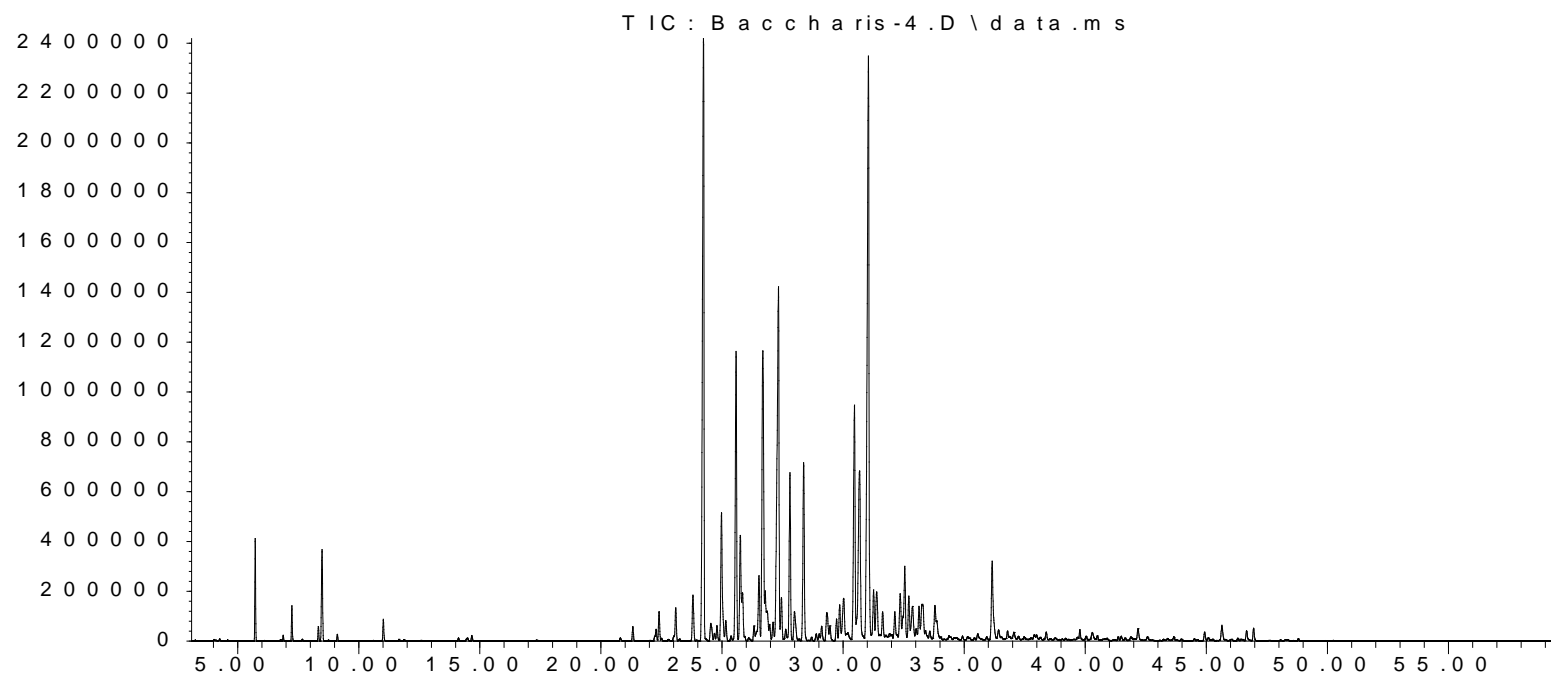


FIGURA 23 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (20-30 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE VERÃO.

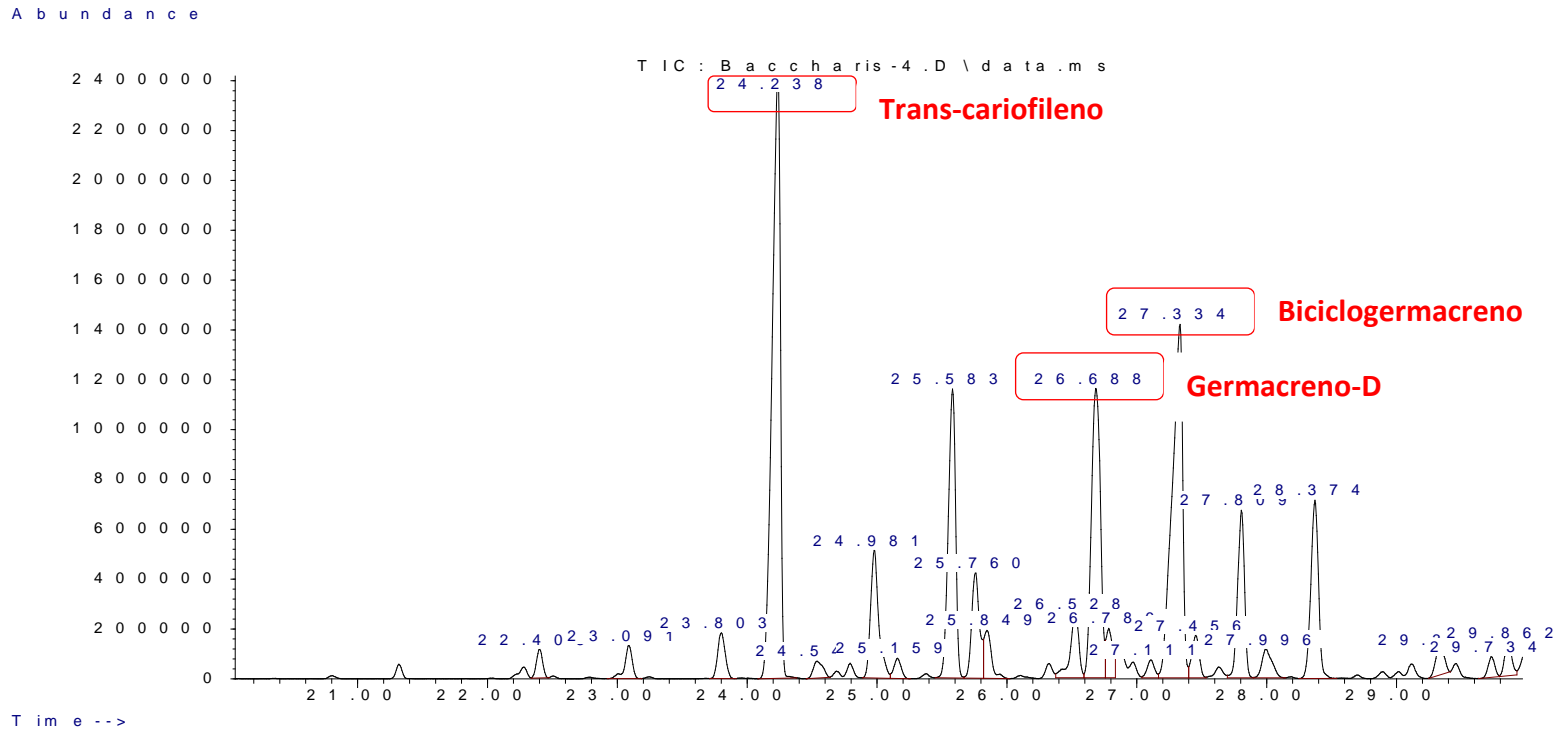
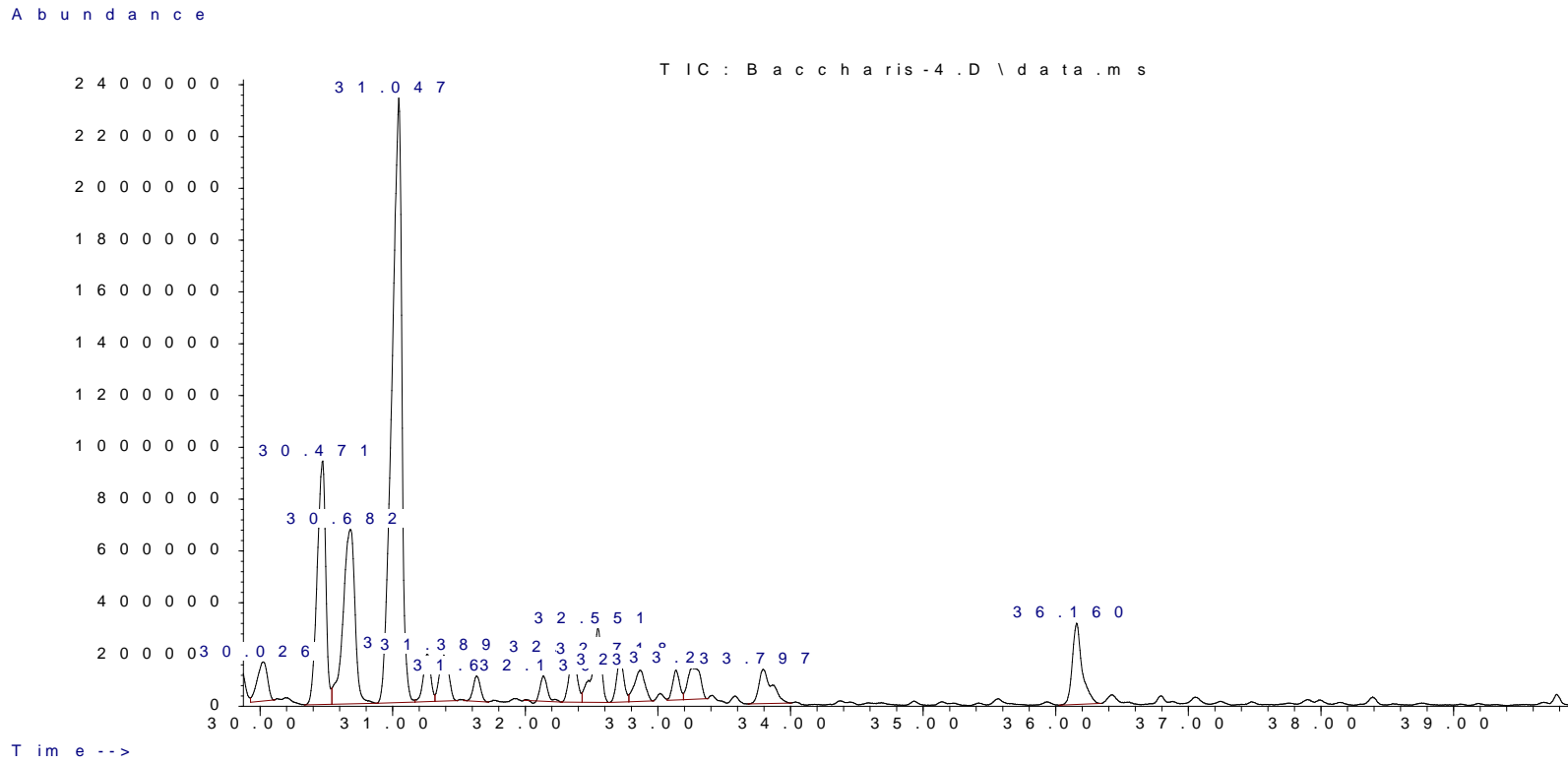


FIGURA 24 - CROMATOGRAMA EXPANDIDO (30-40 MIN) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis milleflora* REFERENTE À COLETA DE VERÃO.



5.4 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.4.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos óleos essenciais dos cladódios de *B. milleflora*, obtidos nas quatro estações do ano, foi avaliada por meio da redução do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), redução do complexo fosfomolibdênio, determinação da taxa de peroxidação lipídica através da reação com espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e pela descoloração do radical catiônico 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}). Os resultados estão expressos na tabela 5. Comparações de múltiplos grupos foram realizadas usando Anova, seguido pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados aos padrões e estão representados pelo símbolo****. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (EPM).

TABELA 5 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS (OE) DE *Baccharis milleflora* NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO.

AMOSTRA	DPPH IC ₅₀ [*] (mg/mL ± EPM)	FOSFOMOLIBDÊNIO AAR ^{**} (% ± EPM)	TBARS IA ^{***} (% ± EPM)	ABTS IC ₅₀ [*] (µg/mL ± EPM)
OE. Outono	16,21±0,19****	79,81±2,30****	25,91±2,33	4,60±0,07****
OE. Inverno	15,48±0,52****	79,10±0,57****	29,06±1,47	4,56±0,09****
OE. Primavera	16,72±0,46****	78,12±2,66****	12,60±0,78****	3,85±0,10****
OE. Verão	20,97±0,16****	77,90±0,90****	14,49±0,23****	4,37±0,05****
BHT	-	-	26,42±2,09	-
Ác. ascórbico	6,36±0,03	100±0,00	-	-
Ác. gálico	6,37±0,03	48,60±1,60	-	-
Rutina	7,95±0,05	24,50±1,22	-	0,34±0,00

* IC₅₀: Concentração inibitória

** AAR: Atividade antioxidante relativa

*** IA: Índice da atividade antioxidante

Muitos ensaios são empregados para determinar a atividade antioxidante de substâncias com potencial para a prevenção de diversas doenças. Dentre estes, destaca-se o método de sequestro de radicais livres em que o antioxidante age reduzindo o DPPH levando ao emparelhamento de elétrons (BRAND; CUVÉLIER; BERSET, 1995). Por meio desse método, o óleo essencial de *B. milleflora*, obtido nas quatro estações do ano, apresentou valores de IC₅₀ variando de 15,48 a 20,97 mg/mL. De modo geral, os quatro óleos essenciais apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos padrões utilizados e também entre si, porém, o óleo essencial oriundo do outono não apresentou diferença estatística em relação ao inverno e a primavera. O óleo essencial obtido no inverno também não apresentou diferença estatística em relação ao óleo obtido na primavera. Os padrões ácido ascórbico e ácido gálico não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Paraoul et al. (2016), ao analisar a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Baccharis trimera* Pers e *Baccharis dracunculifolia* DC., pelo ensaio do DPPH, encontrou relevante atividade antioxidante com valores de IC₅₀ de 6,193 e 3,521 mg/mL, respectivamente. Esses dados reforçam a atividade antioxidante existente no gênero *Baccharis*.

Demais estudos utilizando o óleo essencial de espécies pertencentes à família Asteraceae demonstraram uma significativa atividade antioxidante como observado com *Artemisia herba-alba* (Asteraceae), que apresentou IC₅₀ de 8,55; 17,96; 8,24; 18,04 µg/mL para os compostos isolados β-thujone; α-thujone; thujones (α e β) e 1,8-cineol, respectivamente (BRAND et al., 1995). O óleo essencial de *Scutia buxifolia* Reissek, também pertencente à família Asteraceae, apresentou IC₅₀ de 13,62 µg/mL pelo mesmo método (BOLIGON et al., 2012). Extratos obtidos de diferentes espécies de *Baccharis* como *B. dracunculifolia* e *B. trimera* apresentaram atividade antioxidante pelo DPPH com IC₅₀ de 5 µg/mL e 39 µg/mL, respectivamente (FABRI et al., 2011). Pelo ensaio da oxidação acoplada do β-caroteno e do ácido linoleico foi possível confirmar o potencial antioxidante do óleo essencial de *B. unincella* e *B. dracunculifolia* com 65,66% e 52,18% de atividade antioxidante, respectivamente (FERRONATO et al., 2007).

O método do fosfomolibdênio permite medir a capacidade antioxidante total, baseado na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) em presença de determinadas substâncias com capacidades antioxidantes, acarretando a

formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V) (PRIETTO et al., 1999). Através desse ensaio, o óleo essencial de *B. milleflora* apresentou uma significativa atividade antioxidante com os melhores resultados no outono (79.81%) e no inverno (79.1%). Nesse estudo utilizamos o ácido ascórbico como padrão atribuindo a ele 100% de atividade antioxidante. Os padrões rutina e ácido gálico apresentaram uma atividade antioxidante de 24.5% e 48.60%, os quais foram inferiores aos verificados com os óleos essenciais provenientes das quatro estações. O óleo essencial obtido no outono não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos óleos provenientes das demais estações. Também não foi verificada diferença estatística entre os óleos obtidos na primavera quando comparado ao verão e ao inverno e também entre o inverno e o verão. Os demais grupos apresentaram diferenças estatísticas quando comparados entre si e aos padrões. Paula et al. (2014), pesquisou a capacidade antioxidante dos extratos e frações de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera em relação ao padrão rutina. *D. tomentosum*, pertence à família Asteraceae, apresentou uma relevante atividade antioxidante com valores de 88.99% e 76.12% para fração clorofórmio e para o extrato bruto, respectivamente. Esses dados reforçam a atividade antioxidante de compostos pertencentes a família Asteraceae.

A atividade antioxidante pode ser avaliada também pela capacidade do composto teste em inibir a peroxidação lipídica através da quantificação do malondialdeído formado, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico e gera um derivado que pode ser medido espectrofotometricamente. Nesse ensaio foi verificado que o óleo essencial proveniente do inverno, na concentração de 1000 ppm, apresentou uma atividade antioxidante de 29,06%. Essa atividade foi superior à obtida com antioxidante padrão BHT (26,42%). O óleo essencial proveniente do outono apresentou um índice de atividade antioxidante próximo ao BHT (25,91%). Os óleos provenientes da primavera e do verão apresentaram valores inferiores ao padrão. O BHT não apresentou diferença estatística quando comparado ao óleo obtido no outono e ao óleo obtido no inverno. Também não foram verificadas diferenças entre o óleo obtido no outono quando comparado ao óleo obtido no inverno e entre o óleo obtido na primavera quando comparado ao óleo obtido no verão. Os demais apresentaram diferenças estatísticas quando comparados entre si e com o padrão BHT.

Singh et al. (2009), ao analisar o óleo essencial de *Artemisia scoparia* (Asteraceae) na concentração de 200 µg/mL, pelo método de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico, encontrou uma atividade antioxidante de 62,7%. No trabalho realizado por Morais et al. (2006), com o óleo essencial de *Croton zehntneri* Pax et Hoffm. e *Croton nepetaefolius* (Euforbiaceae) a 1000 ppm, pelo mesmo método, o índice de atividade antioxidante foi de 52,33 e 25,92%. O padrão utilizado nesse ensaio foi o BHT com índice de atividade antioxidante de 27,93% semelhante ao encontrado em nosso estudo (26,42%).

Assim como os métodos descritos acima, o ensaio da descoloração do radical catiônico 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) está entre os mais empregados. Conhecido por sua excelente reprodutibilidade sob condições estabelecidas é usado tanto para avaliar a atividade antioxidante de compostos lipofílicos como hidrofílicos (KUSKOSKI et al., 2005). Em nosso estudo, o óleo essencial de *B. milleflora* reduziu a formação do radical ABTS com valores de IC₅₀ variando de 3,85 µg/mL a 4,60 µg/mL. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre o óleo obtido no verão quando comparado ao óleo obtido no outono e ao óleo obtido no inverno e também entre o óleo essencial obtido no outono quando comparado ao óleo obtido no inverno. Os demais grupos apresentaram diferenças estatísticas quando comparados entre si e ao padrão rutina.

De modo geral foi observado com os ensaios empregados, os quais se baseiam em diferentes mecanismos de reação, que o óleo essencial de *B. milleflora* apresentou atividade antioxidante nas quatro estações do ano. Os óleos essenciais são misturas complexas e a atividade antioxidante pode ser devido à presença de compostos antioxidantes ou ao efeito sinérgico entre estes compostos. O efeito benéfico dos compostos antioxidantes esta relacionado à sua capacidade de prevenção a danos oxidativos e consequentemente a progressão de diversas doenças. Os resultados aqui apresentados contribuem para o conhecimento do potencial antioxidante dos óleos essenciais de *B. milleflora*, os quais apresentaram uma porcentagem de atividade antioxidante relativa superior aos padrões ácido gálico e rutina pelo método do fosfomolibdênio.

5.4.2 Atividade antimicrobiana

Os valores da concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima do óleo essencial de *B. milleflora* frente às cepas utilizadas estão apresentados na tabela 6. Os óleos essenciais do inverno e da primavera demonstraram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* com CIM de 2,5 mg/mL e CBM de 5 mg/mL. No outono e no verão também foi constatada atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, com CIM de 5,0 mg/mL e CBM de 10,0 mg/mL. Entretanto, não foi observada atividade antimicrobiana com os demais microrganismos utilizados no estudo. De acordo com Gören et al. (1990) e Claeson et al. (1992), a atividade antibacteriana frente a *S. aureus* pode ser atribuída aos sesquiterpenos, os quais predominaram nos óleos essenciais de *B. milleflora*. Em nosso estudo, *S. aureus* apresentou maior sensibilidade ao óleo essencial que os demais microrganismos testados.

TABELA 6 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Baccharis milleflora* COLETADA NAS QUATRO ESTAÇÕES DO ANO.

MICRORGANISMOS	*CIM (mg/mL)				*CBM (mg/mL)			
	OUT.	INV.	PRI.	VER.	OUT.	INV.	PRI.	VER.
<i>E. coli</i>	> 10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
<i>S. aureus</i>	5,0	2,5	2,5	5,0	10,0	5,0	5,0	10,0
<i>E. faecalis</i>	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
<i>P. aeruginosa</i>	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
<i>C. albicans</i>	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0	>10,0
Clorexidine	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

*CIM (mg/mL): Concentração Inibitória Mínima

*CBM (mg/mL): Concentração Bactericida Mínima

No estudo realizado por Parreira et al. (2010), foi verificado que o óleo essencial de *B. dracunculifolia* não apresentou atividade sobre leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. Zapata et al. (2010), pesquisou a atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo do óleo essencial de *B. latifolia* frente a *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida krusei* (ATCC 6258) *Aspergillus*

flavus (ATCC 204304), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305) e encontrou moderada atividade somente frente a *A. fumigatus* com CIM de 157,4 µg/mL. Esse foi o primeiro estudo sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *B. milleflora*.

Por meio do teste de disco difusão em ágar foi comprovada a atividade antimicrobiana de *B. trinervis* frente à *Candida albicans* com CIM de 2,8 µg/mL (ALBUQUERQUE et al., 2004). Ferronato et al. (2007), encontrou atividade antimicrobiana para o óleo essencial de *B. dracunculifolia* e *B. uncinella* por difusão em disco de papel frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) com halos de inibição de 7,32-13,05; 14,63-14,68 e 7,32-8,32 mm, respectivamente. Esses valores foram muito próximos aos encontrados com os padrões cloranbucil e amoxicilina. Os dados sugerem que técnicas como disco difusão em ágar e disco difusão em papel apresentam melhores resultados para atividade antimicrobiana, entretanto, as diferenças obtidas entre as espécies pertencentes ao mesmo gênero podem ser explicadas por diversos fatores como a época, local, horário da coleta, técnica utilizada e principalmente devido à diversidade dos constituintes químicos encontrados nas diferentes espécies.

5.4.3 Atividade Pediculicida

Os resultados da atividade repelente e fumegante estão apresentados na tabela 7. Em nosso estudo utilizamos os óleos essenciais de *C. nardus* e *M. alternifolia* como padrões pelo fato de serem repelentes naturais amplamente conhecidos. O óleo essencial de *B. milleflora* apresentou resultado estatisticamente significativo em comparação ao padrão *C. nardus* frente ao *Pediculus humanus capitis*, com índice de repelência (IRP) de $(80,65 \pm 6,69)\%$. Esse valor foi duas vezes superior ao IRP de $(36,39 \pm 21,00)\%$, obtido com o óleo de *C. nardus*. Tolozza et al. (2006), ao analisar as propriedades fumegantes e repelentes dos óleos essenciais de espécies pertencentes a diferentes famílias, frente ao *P. humanus capitis*, encontrou valores de IRP de $(75,50 \pm 11,60)\%$ para o óleo essencial de *Mentha pulegium* L. e IRP de $(72,26 \pm 11,16)\%$ para o piperonal, utilizado como controle positivo. Sosa et al. (2012), comprovou a atividade repelente de *B. salicifolia* após a ingestão do óleo essencial por insetos

conhecidos como pulgão-do-pessegueiro (*Myzus persicae*). O óleo essencial de *B. milleflora* apresentou elevada atividade fumegante com um valor de KT_{50} (10,63 min) menor que o óleo essencial de *M. alternifolia* (22,10 min), utilizado como padrão. O óleo essencial de *B. milleflora* apresentou diferença estatística em relação ao padrão *M. alternifolia*.

Diversos produtos estão disponíveis no mercado para o controle do *P. humanus capitis*, entretanto, muitos são produzidos a partir de inseticidas sintéticos tornando-se tóxicos principalmente para as crianças. Deve-se levar em consideração também o elevado custo com a aquisição desses produtos e o desenvolvimento de resistência, sendo muitas vezes necessário aumentar a dosagem para obter o efeito desejado (CESTARI et al., 2004). Nosso estudo relatou pela primeira vez a atividade repelente e fumegante de *B. milleflora*, incentivando o desenvolvimento de pesquisas com produtos contendo o OE de *B. milleflora* para o tratamento da pediculose.

TABELA 7 – ATIVIDADE REPELENTE E FUMEGANTE DO POOL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *B. milleflora* CONTRA *Pediculus humanus capitis*.

AMOSTRA	REPELÊNCIA IRP \pm DP (%)	FUMEGÂNCIA $KT_{50} \pm$ DP (min)
Óleo essencial de <i>B. milleflora</i>	80,65 \pm 6,69*	10,63 \pm 2,68*
Óleo essencial de <i>C. nardus</i>	36,39 \pm 21,00*	NT
Óleo essencial de <i>M. alternifolia</i>	NT	22,10 \pm 3,40*

KT_{50} : tempo necessário para a inativação de 50% dos espécimes de *P. humanus capitis*.

* teste *t*: resultados estatisticamente diferentes ($P < 0,05$)

DP: desvio padrão

NT: não testado

IRP: índice de repelência

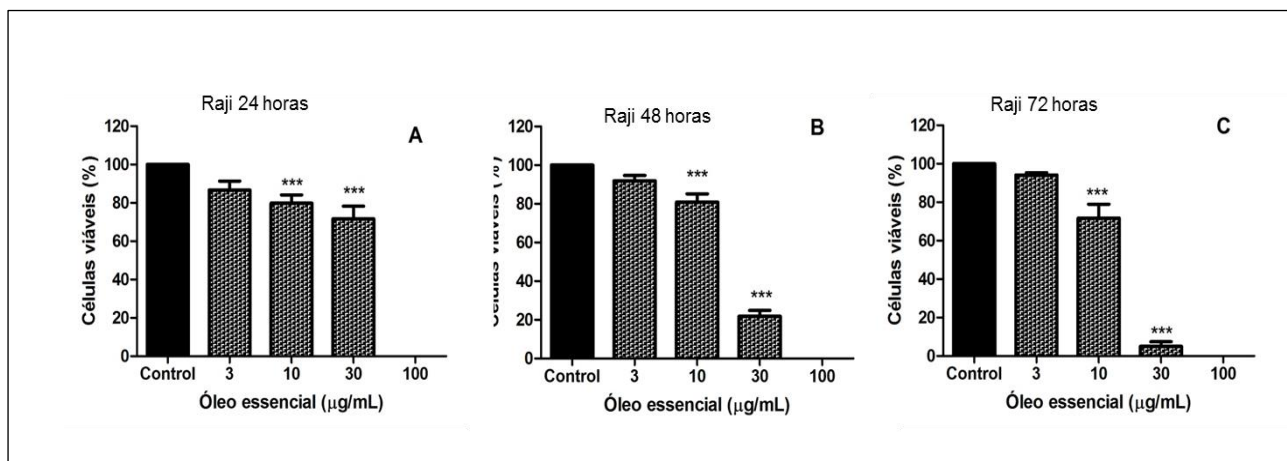
5.4.4 Atividade Citotóxica

5.4.4.1 Avaliação da integridade de membrana por exclusão de azul de Tripan

De acordo com Vargas-Cortes et al. (1983), a técnica de exclusão de azul de Tripan permite diferenciar células viáveis de células não viáveis através do ensaio de coloração, sendo considerado um ensaio de citotoxicidade. Por meio

desse teste as células Raji incubadas com o óleo essencial de *B. milleflora* apresentaram uma significativa redução na viabilidade celular a partir da concentração de 30 µg/mL em comparação ao controle, com valores percentuais de viabilidade na ordem de 71,69; 21,80 e 5,09% para 24, 48 e 72 horas, respectivamente. O óleo essencial na concentração de 10 µg/mL também exibiu uma queda significativa na viabilidade em comparação ao controle, porém, nas demais concentrações e tempos analisados não foi observado uma redução significativa na viabilidade (FIGURA 25).

FIGURA 25 –VIABILIDADE DAS CÉLULAS RAJI APÓS A INCUBAÇÃO COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* POR 24, 48 E 72 HORAS.



A análise estatística foi realizada usando anova, seguido pelo teste de tukey. ***valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao controle.

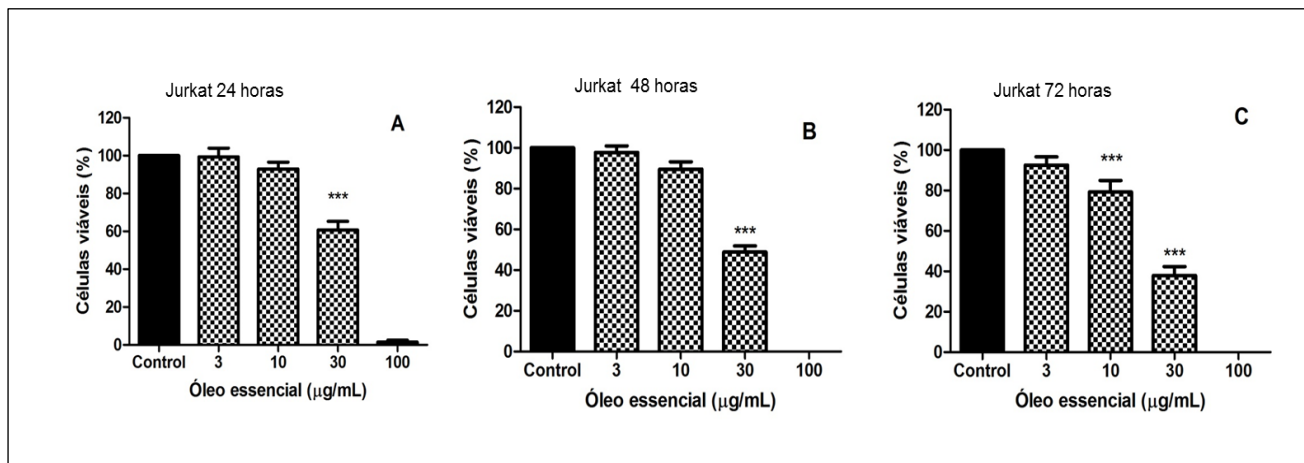
FONTE: A autora (2016).

As células Jurkat também exibiram uma queda significativa na viabilidade celular a partir de 30 µg/mL em comparação ao controle. Em 72 horas de tratamento, o óleo essencial a 10 µg/mL apresentou uma diminuição estatisticamente significativa na viabilidade. Houve uma acentuada redução na viabilidade com o aumento do tempo de exposição ao óleo essencial e em 100 µg/mL não foram verificadas células viáveis em 48 e 72 horas de tratamento (FIGURA 26).

As células HL-60 foram as mais sensíveis ao óleo essencial com uma significativa redução na viabilidade celular a partir da menor concentração testada (3 µg/mL). Em 48 horas a redução se tornou ainda mais pronunciada com um

percentual de viabilidade de 4% para 30 $\mu\text{g/mL}$ e em 72 horas não foram encontradas células HL-60 viáveis para 30 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ (FIGURA 27).

FIGURA 26 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS JURKAT APÓS A INCUBAÇÃO COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* POR 24, 48 E 72 HORAS.

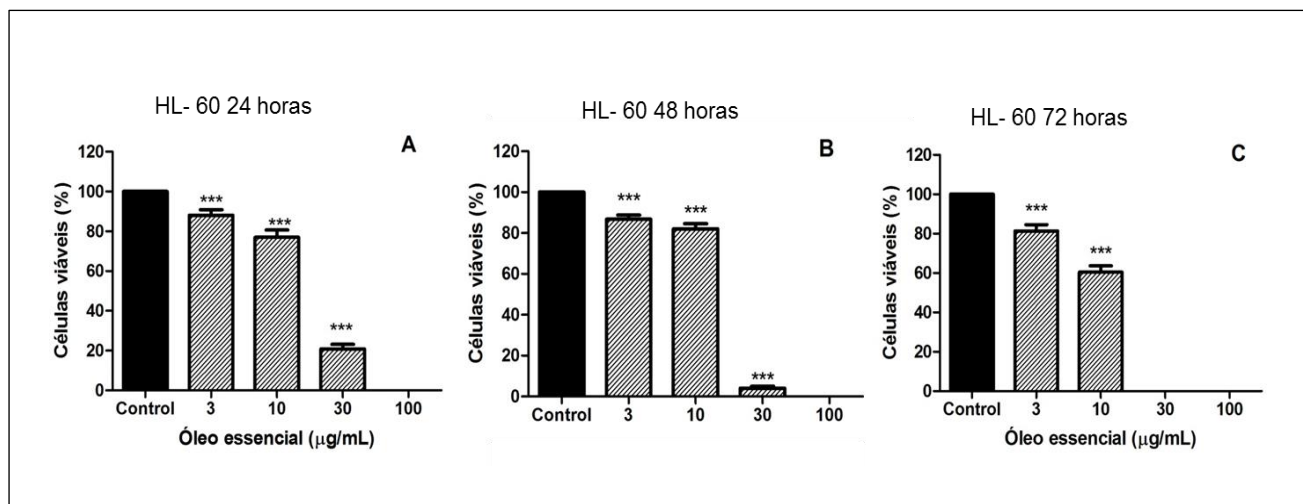


A análise estatística foi realizada usando Anova, seguido pelo teste de Tukey. ***Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao controle.

FONTE:

A autora (2016).

FIGURA 27 – VIABILIDADE DAS CÉLULAS HL-60 APÓS A INCUBAÇÃO COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* POR 24, 48 E 72 HORAS.



A análise estatística foi realizada usando Anova, seguido pelo teste de Tukey. ***Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao controle.

FONTE: A autora (2016).

5.4.4.2 Ensaio de redução do MTT

A viabilidade celular foi realizada a fim de verificar se o óleo essencial de *B. milleflora* possui efeito sobre as células tumorais Jurkat, HL-60 e Raji. Os resultados, expressos como IC₅₀, estão apresentados Tabela 8. De modo geral, por meio do ensaio de redução do MTT foram obtidos valores de IC₅₀ menores que 50 µg/mL para as três células estudadas após 24, 48, 72h por ensaio MTT.

TABELA 8 - CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* PELO ENSAIO DE MTT FRENTE A LINHAGENS CELULARES TUMORAIS APÓS 24, 48 E 72 HORAS.

LINHAGEM CELULAR	IC ₅₀ (µg/mL)		
	24 h	48 h	72 h
Jurkat	42,91 ± 16,02	35,05 ± 6,81	36,34 ± 15,71
HL-60	23,06 ± 6,98	23,22 ± 12,69	22,13 ± 11,95
Raji	39,15 ± 12,71	26,22 ± 11,45	20,07 ± 10,46

IC₅₀: Concentração que reduz a atividade mitocondrial em 50%. Os resultados foram expressos como média ± EPM para três experimentos independentes (n=8 por experimento).

O ensaio de redução do MTT é normalmente realizado para verificar a atividade da desidrogenase mitocondrial/ não mitocondrial como um teste citotóxico para uma variedade de compostos químicos. Assim, o óleo essencial de *B. milleflora* é potencialmente eficiente em alterar a atividade enzimática das mitocôndrias e iniciar uma lesão preliminar que leve à morte celular. Além disso, também foi relatado que os óleos essenciais podem causar danos à membrana mitocondrial, uma vez que provoquem a despolarização das membranas mitocondriais, diminuindo o potencial de membrana (DOLL-BOSCARDIN et al., 2012) e também alterando a fluidez das membranas que ficam anormalmente permeáveis. Estes mecanismos adicionais relatados aos óleos essenciais podem ter contribuído para o efeito citotóxico do óleo essencial *B. milleflora*.

Sylvestre et al. (2006), investigou os efeitos citotóxicos de óleos essenciais e declarou que valores de IC₅₀ entre 10-50 µg/mL representam uma forte atividade citotóxica. Valores de IC₅₀ entre 50-100, 100-200, e 200-300 µg/mL representam moderada, fraca e muito fraca atividade citotóxica, respectivamente. Além disso, valores de IC₅₀ superiores a 300 µg/mL não apresentam

citotoxicidade. Levando-se isso em consideração, os resultados deste estudo demonstraram que óleo essencial de *B. milleflora* possui forte citotoxicidade frente as células Jurkat, HL-60 e Raji, porém, o aumento no tempo de exposição ao óleo essencial demonstrou uma maior influência na diminuição da viabilidade das células Raji.

Além disso, Suffness e Pezzuto (1990), declararam que valores de IC₅₀ inferiores a 30 µg/mL em testes com células tumorais são considerados promissores para o desenvolvimento de fármacos antitumorais. Nesse sentido, o óleo essencial de *B. milleflora* demonstrou este notável efeito com as células HL-60 e Raji, após 24 e 48 horas, respectivamente. O efeito citotóxico foi particularmente importante frente as células HL-60 que mantiveram valores de IC₅₀ baixos durante todo o período de tempo investigado. O óleo essencial de *B. milleflora* também demonstrou forte citotoxicidade no intervalo de tempo inicial de 24 horas. Nesse sentido, óleo essencial de *B. milleflora* exerceu citotoxicidade aguda frente a Jurkat, HL-60 e Raji, induzindo a morte celular com tempos de exposição ainda mais curtos.

Outros estudos envolvendo sesquiterpenos de Asteraceae (*Athanasia brownii* Hochr.) apresentaram forte efeito citotóxico frente a células humanas cancerígenas pelo método de MTT, tal como: A375 (melanoma maligno) e HCT116 (carcinoma do cólon) com valores de IC₅₀ de 19,85 e 29,53 µg/mL, respectivamente (RASOANAIVO et al., 2013). Ferraz et al. (2013), estudou o efeito do óleo essencial de *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae), composto principalmente por monoterpenos, sobre a proliferação celular usando metil-[3H]- timidina durante 72 horas frente a três linhagens celulares: HepG2 (carcinoma hepatocelular), K562 (leucemia mielocítica crônica) e B16-F10 (melanoma). O óleo essencial de *L. gracilis* apresentou atividade citotóxica com valores de IC₅₀ de 4,93-22,92 mg/mL. Além disso, os autores também testaram alguns compostos isolados como o timol, p-cimeno, γ-terpineno e mirceno e observaram que estes compostos possuíram baixa atividade citotóxica em comparação ao óleo essencial. A atividade citotóxica pode ser atribuída a um efeito sinérgico entre os monoterpenos e sesquiterpenos fornecidos pelos óleos voláteis. Nesse sentido, para fins biológicos, o efeito sinérgico dos compostos parece ser mais significativo do que os seus compostos isolados devido, talvez, a atividade dos compostos

principais ser modulada por compostos em menores quantidades (BAKKALI et al., 2008).

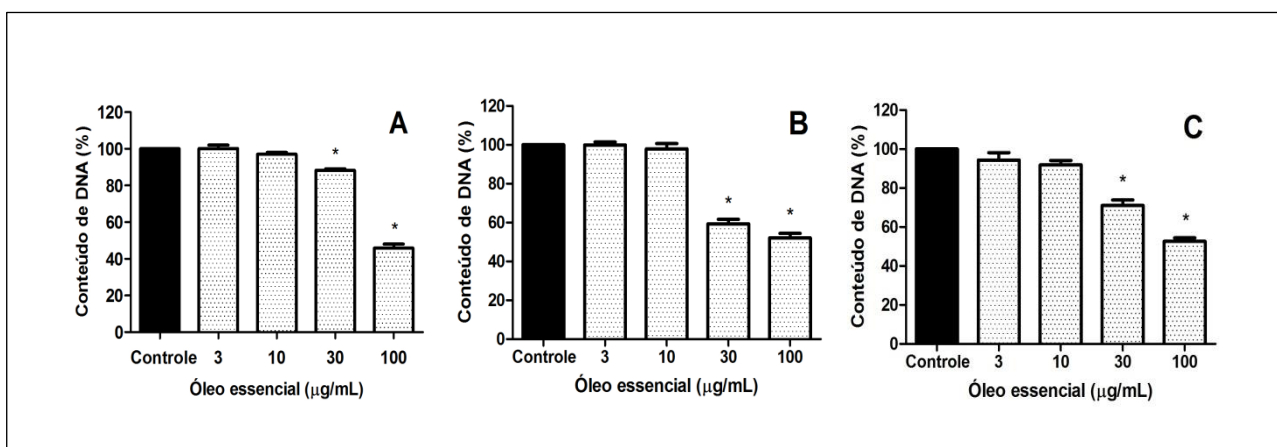
O ensaio da integridade de membrana por exclusão de azul de tripan juntamente com o o ensaio de redução do MTT foram utilizados em nosso estudo para verificar a citotoxicidade do óleo essencial de *B. milleflora*. Através dos resultados obtidos por esses ensaios podemos verificar que os testes foram coerentes entre si.

5.4.4.3 Análise do conteúdo de DNA celular

5.4.4.3.1 Solução de difenilamina (DPA)

O efeito do óleo essencial de *B. milleflora* no conteúdo de DNA em células Jurkat, HL-60 e Raji usando uma solução DPA esta apresentado na FIGURA 28. O óleo essencial a 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$ não apresentou diferença significativa em relação ao controle. No entanto o óleo essencial de *B. milleflora* a 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentou uma diminuição significativa no conteúdo de DNA ($p < 0,05$) em comparação ao controle nas células Jurkat, HL-60 e Raji. De acordo com esses resultados, o óleo essencial de *B. milleflora* inibiu a proliferação das três células cancerígenas por afetar o conteúdo de DNA.

FIGURA 28 - DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR USANDO UMA SOLUÇÃO DE DIFENILAMINA (DPA) POR MEIO DA MEDIÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA EM CÉLULAS JURKAT (A), HL60 (B), RAJI (C) TRATADAS COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* (3, 10, 30 E 100 $\mu\text{g/mL}$) E CONTROLE POR 48 HORAS.



Os resultados estão expressos como média \pm EPM para três experimentos independentes ($n=3$ por experimento). O símbolo * representa um valor de $p < 0,05$ que foi considerado significativo quando comparado ao controle. FONTE: A autora (2016).

5.4.4.3.2 Iodeto de propídeo (PI)

Considerando o resultado do conteúdo de DNA encontrado anteriormente, foi realizado um teste mais sensível usando o iodeto de propídeo a fim de confirmar se as concentrações mais baixas do óleo essencial podem acarretar dano ao DNA levando a citotoxicidade celular. Nesse ensaio, foi verificado o efeito do óleo essencial na proliferação celular por meio da medição do conteúdo de DNA nas células Jurkat, HL-60 e Raji. Os resultados estão apresentados na tabela 9. Uma significativa redução no conteúdo de DNA foi observada na menor concentração (3 µg/mL) para as células Jurkat e Raji, quando comparadas com o controle. O óleo essencial de *B. milleflora* a partir de 10 µg/mL diminuiu significativamente o conteúdo de DNA nas três linhagens tumorais mediante o ensaio com o PI.

TABELA 9 - DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR USANDO O IODETO DE PROPÍDEO (PI) POR MEIO DA MEDIÇÃO DO CONTEÚDO DE DNA EM CÉLULAS JURKAT, HL60 E RAJI TRATADAS COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* (3, 10, 30 E 100 µg/mL) E O CONTROLE POR 72H.

LINHAGEM CELULAR	CONTROLE	ÓLEO ESSENCIAL <i>B. milleflora</i> (µg/mL)			
		3	10	30	100
Jurkat	100,00	93,35 ± 1,98*	75,67 ± 1,27*	31,89 ± 0,85*	15,31 ± 0,22*
HL-60	100,00	95,57 ± 2,28	74,48 ± 2,15*	24,33 ± 1,65*	26,65 ± 1,91*
Raji	100,00	90,59 ± 2,20*	68,35 ± 1,50*	19,89 ± 0,95*	14,60 ± 0,55*

Os resultados estão expressos como média ± EPM para três experimentos independentes. O símbolo * representa um valor de $p < 0.05$ que foi considerado altamente significativo em comparação ao controle (100%).

O óleo essencial de *B. milleflora* promoveu uma diminuição no conteúdo de DNA em todas as linhagens tumorais testadas, isto pode sugerir que eventos intracelulares relacionados a apoptose tenham ocorrido (KANUNFRE et al., 2004). Doll-Boscardin et al. (2012), estudou o efeito dos óleos essenciais de folhas jovens e adultas de *E. benthamii* L. (Myrtaceae) e demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa no conteúdo de DNA, em comparação com a

vincristina (controle positivo). A análise do conteúdo de DNA celular revelou que o óleo volátil de *E. benthamii* apresentou citotoxicidade, principalmente frente as células Jurkat e HeLa, em comparação com terpenos isolados: α -pineno e γ -terpineno. Da mesma forma, o efeito citotóxico do óleo essencial de *B. milleflora* pode ser atribuído ao efeito sinérgico entre os diferentes compostos, os quais foram capazes de inibir a proliferação de células tumorais e que estão sendo relatados pela primeira vez.

5.4.4.4 Ensaio do ciclo celular

Após analisar as mudanças no conteúdo de DNA celular, foi investigado a capacidade do óleo essencial em causar uma parada no ciclo celular. Isso explicaria a particular redução da proliferação de células Raji por apoptose. As células Raji apresentaram a maior inibição da proliferação celular utilizando o ensaio com o PI e foram, a seguir, utilizadas na investigação da parada do ciclo celular por citometria de fluxo. A parada no ciclo celular é frequentemente causada por um produto químico que promova a inibição do crescimento celular. A análise da distribuição celular por citometria de fluxo foi incluída neste estudo a fim de determinar se a atividade citotóxica do óleo essencial de *B. milleflora* envolveria mudanças na progressão do ciclo celular. A citometria de fluxo permite detectar a distribuição das células nas três fases principais do ciclo (G1,S, G2/M), fazendo com que seja possível detectar células apoptóticas. A tabela 10 mostra o efeito do óleo essencial de *B. milleflora* (15, 30 e 60 $\mu\text{g/mL}$) sobre a progressão do ciclo celular das células Raji. ANOVA seguido pelo teste post hoc Tukey foram aplicados em relação ao controle.

O símbolo * representa um valor de $p < 0.05$ que foi considerado significativo quando comparado ao controle. #Sub G0 representa a porcentagem de células com DNA fragmentado em relação ao total de eventos analisados (20,000 eventos).

O óleo essencial a 60 $\mu\text{g/mL}$ apresentou resultados estatisticamente significativos após 24 horas de tratamento. Nessa concentração a parada na fase G0/G1 foi induzida com uma diminuição concomitante no número de células nas fases S e G2/M. Estes efeitos não foram observados a 15 e 30 $\mu\text{g/mL}$.

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS RAJI NO CICLO CELULAR APÓS O TRATAMENTO COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* (15, 30, 60 µg/mL).

Tratamento	µg/mL	Distribuição no ciclo celular (%)			
		Sub G0 [#]	G0/G1	S	G2/M
Controle	–	14,83 ± 0,65	48,02 ± 0,63	18,20 ± 0,53	33,78 ± 0,63
Óleo essencial	15	12,22 ± 0,50	48,87 ± 0,38	16,52 ± 0,90	34,61 ± 0,84
	30	11,64 ± 0,59	47,53 ± 0,95	17,15 ± 0,36	35,32 ± 0,26
	60	26,48 ± 0,60*	64,14 ± 0,26*	15,45 ± 0,43*	20,41 ± 0,29*

Meio RPMI foi usado como controle negativo. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n=6). A porcentagem de células distribuídas no ciclo celular não incluem a fase sub G0 e correspondem a 100%.

Até o momento não houveram estudos direcionados a investigar os efeitos dos óleos essenciais de espécies de *Baccharis* na parada do ciclo celular. Contudo, nossos resultados foram semelhantes aos encontrados por Singh et al. (2003), e Agarwal et al. (2004), que relataram o acúmulo de células de câncer de próstata humana na fase G0/G1 acompanhada por uma diminuição celular nas fases S e G2/M. Estes resultados representaram que o óleo essencial de *B. milleflora* a 60 µg/mL gerou uma parada no ciclo e inibiu o crescimento de células Raji como demonstrado na fracção hexânica de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (LUZ et al., 2016). Além disso, o óleo essencial *B. milleflora* a 60 µg/mL induziu a fragmentação celular, representada por um aumento na população sub G0 e que corresponde à análise total de eventos e é um indicativo de morte celular induzida por apoptose (LIMA et al., 2015). A apoptose é geralmente representada por uma série de eventos intracelulares que conduzem, finalmente, a fragmentação do DNA e a degradação internucleossomal de DNA genômico, devido à ativação de endonucleases endógenas (KROEMER et al., 1998).

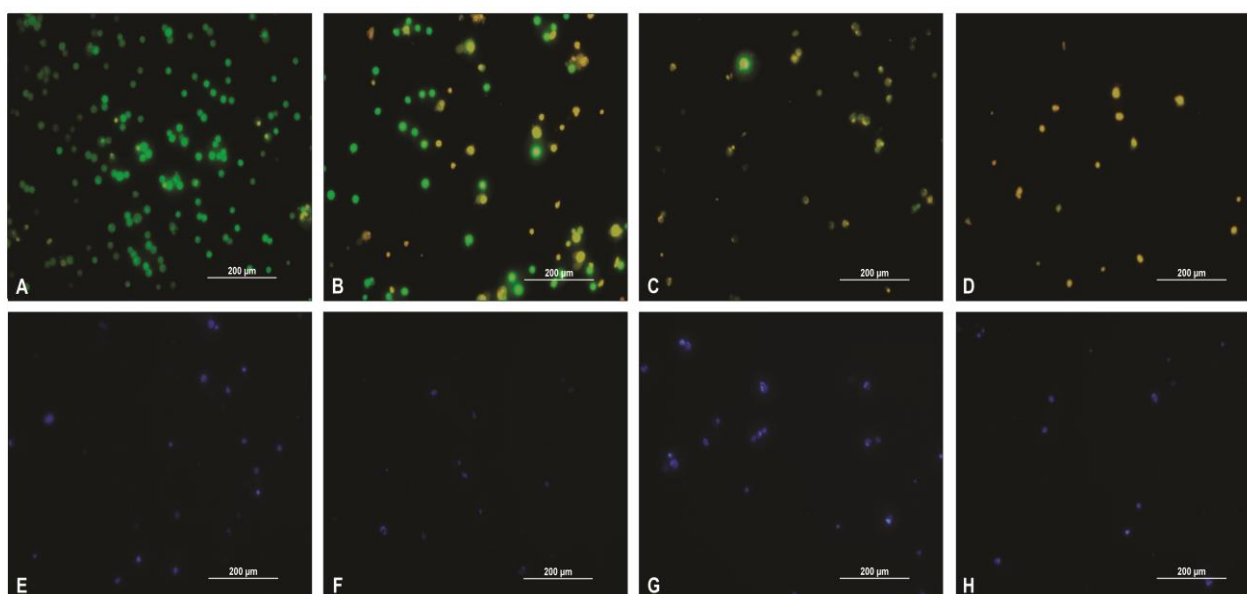
5.4.4.5 Coloração EB/AO e Hoechst 33342

A fim de proporcionar uma compreensão profunda sobre a morte das células Raji foi realizada a coloração convencional EB / AO (FIGURA 29A-29D) e Hoechst 33342 (FIGURA 29E-29H). Esse ensaio permite investigar o efeito do

óleo essencial de *B. milleflora* a 60 µg/mL na promoção da apoptose e/ou necrose em linhagens de células tumorais em comparação com os controles negativo e positivo (vincristina e clorambucil). No controle negativo foram observadas células viáveis com a coloração do núcleo normal, representado por cromatina verde (FIGURA 29A). As células Raji tratadas com óleo essencial de *B. milleflora* a 60 µg/mL (FIGURA 29B) apresentaram uma diminuição do número de células viáveis e um aumento de células apoptóticas e necróticas em comparação com o controle. Na presença de vincristina (FIGURA 29C), relacionada anteriormente a inibição da formação de microtúbulos no fuso mitótico levando a morte celular por apoptose (MUKHTAR et al., 2014), foram registradas poucas células viáveis e um elevado número de células em apoptose com cromatina condensada ou fragmentada e coloração verde ou laranja. O clorambucil, conhecido como um agente alquilante que interfere na replicação do DNA e na função mitocondrial e induz a apoptose e necrose celular (MOURTADA et al., 2013), apresentou um maior número de células necróticas, com núcleo normal com a cromatina corada de laranja (FIGURA 29D). Em relação aos resultados das contagens de células em triplicata (Tabela 11), foram observadas diferenças em células vivas entre os tratamentos com o óleo essencial de *B. milleflora*, vincristina e clorambucil quando comparados ao controle negativo ($p < 0,001$). Estes dados demonstraram o efeito citotóxico do óleo essencial de *B. milleflora* em comparação ao grupo controle. No entanto, a vincristina e clorambucil apresentaram uma citotoxicidade significativamente maior ($p < 0,001$) que o óleo essencial. Conforme o esperado e considerando cada tratamento, a vincristina apresentou um número significativo de células apoptóticas ($p < 0,001$). No tratamento com o clorambucil houve uma predominância estatisticamente significativa ($p < 0,001$) de células necróticas. O óleo essencial de *B. milleflora* conduziu a um aumento significativo de células apoptóticas e necróticas ($p < 0,001$) em comparação ao controle, com uma elevada contagem de células necróticas. Os resultados obtidos com o ensaio de coloração com Hoescht 33342 mostraram células em apoptose com alterações morfológicas no núcleo e condensação da cromatina (FIGURA 29E-29H), com elevada fluorescência em comparação as células do controle (FIGURA 29E). Assim, estes dados reforçam que o óleo essencial de *B. milleflora* age por meio dos mecanismos de necrose e apoptose.

A coloração convencional com EB/AO e Hoechst 33342 demonstrou que o óleo essencial de *B. milleflora* provoca a morte celular por mecanismos de necrose e apoptose. Este efeito observado no óleo essencial de *B. milleflora* também foi observado na literatura.

FIGURA 29 - IMAGENS DAS CÉLULAS RAJI OBSERVADAS EM MICROSCÓPIO FLUORESCENTE APÓS 24 HORAS DE TRATAMENTO.



Coloração EB/AO (A-D); Coloração Hoescht 33342 (E-H) A; E: Controle negativo (RPMI caldo); B; F: *B. milleflora* essential oil (60 µg/mL); C; G: vincristina (40 nmol/L) e D; H: cloranbucil (20 µmol/L). FONTE: A autora (2016).

TABELA 11 – CONTAGEM DE CÉLULAS RAJI VIVAS, NECRÓTICAS E APOPTÓTICAS APÓS A COLORAÇÃO CONVENCIONAL COM EB/AO.

TIPO CELULAR	CONTROLE (Meio RPMI)	OE. <i>B. milleflora</i> (60 µg/mL)	VINCRISTINA (40 nmol/L)	CLORANBUCIL (20 µmol/L)
Vivas	92 ± 4,2 ^{a,A}	44 ± 5,1 ^{b,A}	3 ± 3,2 ^{c,A}	0 ± 1,3 ^{c,A}
Apoptóticas	4 ± 2,5 ^{a,B}	19 ± 3,2 ^{b,B}	89 ± 3,5 ^{c,B}	40 ± 4,4 ^{d,B}
Necróticas	4 ± 4,2 ^{a,B}	37 ± 2,7 ^{b,A}	8 ± 2,8 ^{a,A}	60 ± 4,1 ^{c,C}

Os testes foram realizados em triplicata, contando um mínimo de 100 células cada. Os valores representam a média ± DP. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos entre os agentes antitumorais e o grupo controle. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a morfologia das células com o mesmo agente antitumoral ou o grupo controle. OE: óleo essencial.

Greay et al. (2010), estudou o efeito citotóxico do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel e do terpinen-4-ol em células de mesotelioma (AE17) e células de melanoma (B16). Estes autores descobriram que o óleo essencial de *M. alternifolia* e o terpinen-4-ol induziram uma parada no ciclo celular mostrando células necróticas e baixo número de células apoptóticas em ambas linhagens tumorais. Em outras palavras, é possível verificar que a necrose e a apoptose podem ocorrer simultaneamente dependendo de fatores tais como a intensidade e a duração do estímulo e a extensão da depleção de ATP entre outros.

A necrose é um processo descontrolado e passivo que normalmente afeta grandes áreas de células enquanto que a apoptose é controlada e dependente de energia e pode afetar células individuais ou grupos de células. A lesão celular por necrose é mediada por dois mecanismos principais: dano direto às membranas celulares e interferência no fornecimento de energia a célula (ELMORE, 2007). Além disso, as células Raji têm expressão da glicoproteína-P e sobre-expressão da proteína mutante p53 (FOROUTAN et al., 2007). Estas proteínas são capazes de proporcionar resistência à apoptose e levar à morte celular por necrose em vez da apoptose como relatado no presente estudo. O efeito do mecanismo de resistência da glicoproteína-P das células Raji na redução da morte celular por apoptose causada pelo óleo essencial de *B. milleflora* deve ser confirmado por trabalhos futuros.

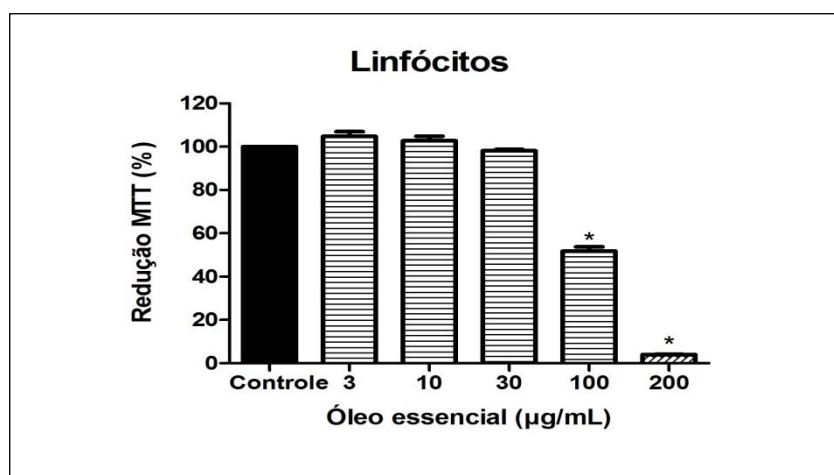
De modo geral, o óleo essencial de *B. milleflora*, por meio dos ensaios realizados, foi capaz de reduzir a viabilidade das células tumorais, diminuir a proliferação celular, causar a fragmentação no DNA e levar a morte celular pelos mecanismos de necrose e apoptose. Esses resultados são importantes indícios da atividade antitumoral de *B. milleflora*, sendo assim, é importante verificar a seletividade do óleo essencial de *B. milleflora* frente as células cancerígenas.

5.4.4.6 Teste do índice de seletividade

As drogas antitumorais ideais devem produzir um efeito citotóxico sobre as células cancerosas, em baixas concentrações e, ao mesmo tempo, não devem afetar ou causar dano as células normais. Neste sentido, um outro experimento foi realizado utilizando linfócitos humanos, a fim de avaliar a ausência da

citotoxicidade do óleo essencial de *B. milleflora* em diferentes concentrações (3-200 µg/mL) frente as células normais. Os resultados obtidos mostraram que os óleos essenciais de *B. milleflora* nas concentrações de 3, 10 e 30 µg/mL não possuem efeito citotóxico sobre células saudáveis. Os linfócitos humanos apresentaram uma viabilidade intermediária (51.39 ± 6.12)% quando tratados com o óleo essencial de *B. milleflora* a 100 µg/mL. Por outro lado, quando tratados com o óleo essencial a 200 µg/mL apresentaram uma viabilidade muito baixa ($3,96 \pm 2,05$ %) (FIGURA 30).

FIGURA 30 –VIABILIDADE DOS LINFÓCITOS APÓS A INCUBAÇÃO COM O ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* POR 48 HORAS, AVALIADA ATRAVÉS DO ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT.



A análise estatística foi realizada usando Anova, seguido pelo teste de Tukey. ***Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao controle. FONTE: A autora (2016).

O índice de seletividade (IS), calculado para o óleo essencial de *B. milleflora* (SI) foi de 3,97 e esta representado na tabela 12. O IS de 3,97 obtido para o óleo essencial de *B. milleflora* reforça a seletividade deste óleo volátil frente às células malignas Raji. Valores de IS maiores ou iguais a 2,0 são considerados significativos e indicam que a substância avaliada possui chances de se tornar um novo produto antitumoral (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990), devido a sua reduzida citotoxicidade frente às células humanas não malignas.

TABELA 12 - IC₅₀ DO ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* FRENTE AS CÉLULAS RAJI (CÉLULAS MALIGNAS) E LINFÓCITOS HUMANOS (CÉLULAS NÃO MALIGNAS) E ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS).

LINHAGEM CELULAR	IC ₅₀ (µg/mL)	IS
Células Raji	26,22 ± 7,45	3,97
Linfócitos humanos	104,03 ± 9,39	

Valores representam a média ± EPM de triplicatas.

5.4.5 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

5.4.5.1 Testes de Citotoxicidade *in vitro*

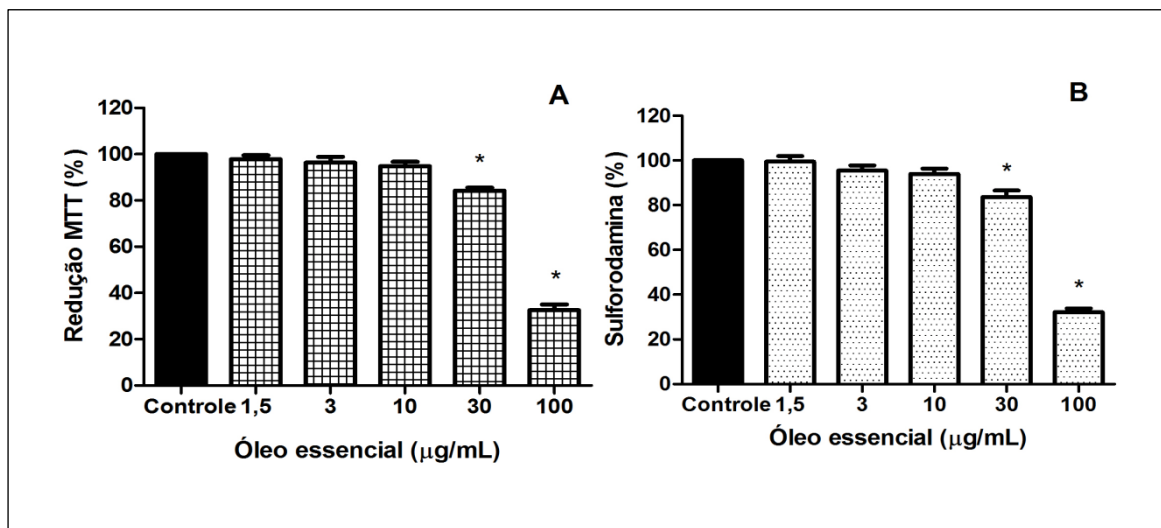
5.4.5.2 Ensaio da viabilidade celular pelo método de redução do MTT e da sulforodamina

Diversos métodos podem ser utilizados para avaliar a citotoxicidade dos compostos naturais, entre eles o ensaio de redução do MTT e o ensaio da sulforodamina (SRD). O método de redução do corante MTT é amplamente utilizado para verificar a função celular a nível mitocondrial e o estado metabólico da célula a partir de enzimas desidrogenases presentes em células ativas (MOSMANN, 1983). O método da SRD consiste na quantificação colorimétrica da proteína corada. O corante SRD liga-se aos resíduos de aminoácidos da proteína básica em células viáveis, sendo usado como um indicador quantitativo do conteúdo proteico da cultura celular. Um aumento ou diminuição no número de células resulta numa alteração proporcional da quantidade do corante incorporado indicando o grau de citotoxicidade causada pelo composto em estudo (SKEHAN et al., 1990). Esse método permite que um maior número de substâncias sejam testadas em poucos dias, além de ser rápido, reprodutível e sensível (VICHAI et al., 2006; HOUGHTON et al., 2007).

Os dados obtidos utilizando os ensaios acima descritos demonstraram que o óleo essencial de *B. milleflora* nas concentrações 1,5; 3 e 10 µg/mL não apresentaram efeito citotóxico nas células J774 (macrófago) (FIGURA 31). Entretanto, os óleos essenciais nas concentrações de 30 e 100 µg/mL apresentaram efeito citotóxico, com diferenças significativas quando comparados

ao controle. O efeito citotóxico *in vitro* do óleo essencial de *B. trimera* (250 µg/mL) foi comprovado por meio do ensaio da SRD usando uma linhagem de queratinócitos humanos (HaCat) (OLIVEIRA et al., 2012).

FIGURA 31 – EFEITO CITOTÓXICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* EM CÉLULAS J774.



A) ensaio de redução do MTT; B) ensaio da sulforodamina (SRD) em células J774 tratadas com o óleo essencial de *B. milleflora* (1,5, 3, 10, 30 e 100 µg/mL) e controle por 48 horas. O símbolo* representa um valor de $p < 0.05$ que foi considerado significativo quando comparado ao controle.

FONTE: A autora (2016).

De acordo com o Suffness e Pezzuto (1990), valores de $IC_{50} < 30$ µg/mL indicam forte atividade citotóxica, entretanto, para Sylvestre et al. (2006), os óleos essenciais com valores de IC_{50} entre 10-50 µg/mL possuem forte atividade citotóxica, IC_{50} entre 50-100, 100-200 e 200-300 µg/mL possuem moderada, fraca e muito fraca atividade, respectivamente. Porém, valores de IC_{50} maiores que 300 µg/mL não apresentam ação citotóxica. Segundo os critérios acima, o óleo essencial de *B. milleflora* frente a linhagem celular em estudo e aos ensaios realizados apresentou moderada atividade citotóxica com valores de IC_{50} independentes do tempo de exposição (tabela 13). O IC_{50} de *B. milleflora* foi calculado por regressão de Probit com base em um gráfico de viabilidade celular obtido utilizando o ensaio de redução de MTT ou o ensaio de SRD versus a concentração dos compostos.

Parreira et al. (2010), não encontrou ação citotóxica no óleo essencial de *B. dracunculifolia* (47,6 µg/mL), usando o método do vermelho neutro em células de mamíferos. Compostos isolados de *B. uncinella* apresentaram moderada

citotoxicidade em células J774 pelo ensaio do MTT (PASSERO et al., 2011). Búfalo et al. (2010), comparou a ação citotóxica do óleo essencial de *B. dracunculifolia* e dois compostos isolados (ácido cafeico e ácido cinâmico) utilizando células de carcinoma epidermoide de laringe (HEp-2) *in vitro* e verificou que o óleo essencial possui ação citotóxica pelo ensaio do cristal violeta.

TABELA 13 - IC₅₀ PARA O ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* EM CÉLULAS J774 TRATADAS POR 48 E 72 HORAS.

TEMPO DE CULTURA	MTT IC ₅₀ (µg/mL)	SRD IC ₅₀ (µg/mL)
48 horas	79,52 ± 4,37	78,38 ± 3,56
72 horas	66,36 ± 2,75	76,37 ± 3,64

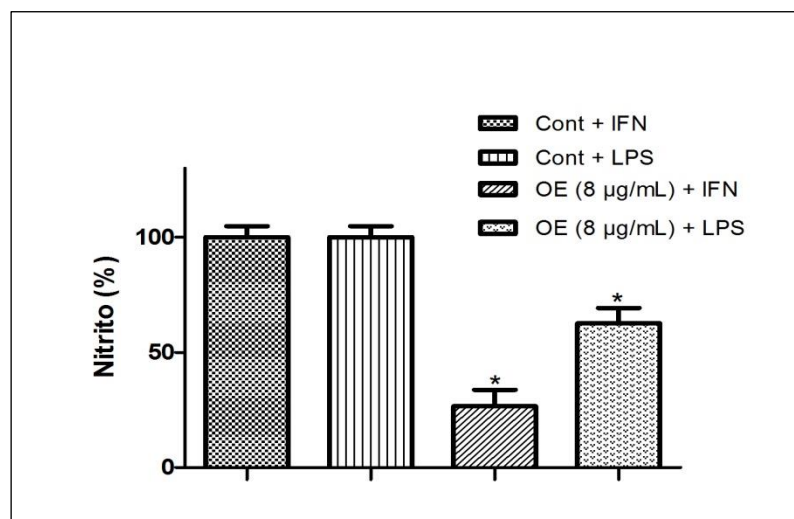
Legenda: O IC₅₀ corresponde à concentração de compostos que inibiram 50% do crescimento celular. Os resultados foram expressos como média ± EPM e são representativos de um experimento com n = 8 repetições e foram reprodutíveis em um experimento adicional.

Outros estudos envolvendo sesquiterpenos (*Lindera strychnifolia* - Lauraceae) relataram forte citotoxicidade em células humanas A549 (carcinoma de pulmão humano), HeLa (carcinoma cervical humano), Hep G2 (carcinoma de fígado humano) e HUVEC (endotélio da veia umbilical humana) após 24 horas de tratamento. A citotoxicidade envolvendo sesquiterpenos de *L. strychnifolia* foi pesquisada por meio do ensaio de MTT e os valores de IC₅₀ encontrados foram de 22 a 163 µg/mL (YAN et al., 2009). Rasoanaivo et al. (2013), estudou o efeito do óleo essencial de *Athanasia brownie* Hochr. (Asteraceae), composto principalmente pelos sesquiterpenos selin-11-en-4α-ol, cariofileno, humuleno e (E)-nerolidol em células A375 (melanoma maligno) e HTC 116 (carcinoma do cólon) e encontrou efeitos citotóxicos significativos com valores de IC₅₀ de 19,85 e 29,53 µg/mL respectivamente. O óleo essencial de *Tagetes minuta*, também pertencente a família Asteraceae, foi avaliado quanto a atividade citotóxica em células de carcinoma de laringe (KB) e carcinoma de fígado (HepG2) usando o ensaio modificado do MTT. O óleo essencial apresentou atividade citotóxica com valores de IC₅₀ de 75 ± 5 µg/mL para KB e 70 ± 4 µg/mL para HepG2 (SHIRAZI et al., 2014).

Silva et al. (2007), demonstrou a possível citotoxicidade do óleo essencial de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e de alguns terpenos isolados (β -cariofileno, α -humuleno, α -pineno, mirceno e linalol) frente as células HeLa (carcinoma cervical humano), A-549 (carcinoma de pulmão humano), HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano), células Vero (não tumorais, obtidas de rim de macaco) e macrófagos de camundongos por meio do ensaio de redução do MTT. Os resultados obtidos permitiram verificar que o óleo essencial é citotóxico apenas para as células tumorais, porém, os compostos β -cariofileno e α -humuleno apresentaram uma citotoxicidade elevada para as células A-549, HeLa and HT-29, quando comparados ao óleo essencial de *Z. rhoifolium*.

No ensaio da atividade imunomoduladora as células J774 estimuladas por β -interferon 1A (IFN) e por lipopolissacarídeos (LPS) foram incubadas com o óleo essencial de *B. milleflora* (8 μ g/mL) e apresentaram uma redução estatisticamente significativa na produção de óxido nítrico quando comparadas ao controle, ou seja, os constituintes voláteis do óleo essencial podem atuar como agentes imunomoduladores (FIGURA 32).

FIGURA 32 – AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL SOBRE A PRODUÇÃO DE NO ESTIMULADA POR B-INTERFERON 1A (IFN) E POR LIPOPOLISSACARÍDEOS (LPS).



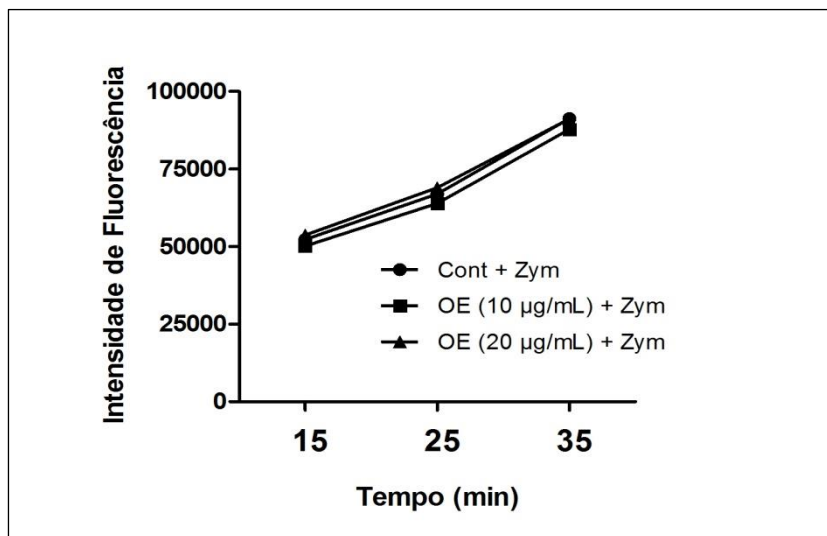
O símbolo* representa $p < 0,05$ e foi considerado significativo em comparação ao controle.
 FONTE: A autora (2016).

Esses agentes são de extrema importância no combate a microrganismos patogênicos e a doenças de etiologias variadas como câncer e doenças autoimunes, uma vez que possuem a capacidade de modificar a resposta imune potencializando ou suprimindo elementos do sistema imunológico (LABRO, 2000; MAKARE et al., 2001; DUTTA, 2002).

Kim et al. (2008), investigou a composição química e a ação anti-inflamatória do óleo essencial das flores *Farfugium japonicum* (Asteraceae) e encontrou entre os compostos majoritários o β -cariofileno e o germacreno-D. O óleo essencial de *F. japonicum* (100 $\mu\text{g/mL}$) inibiu em 25% a produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 estimuladas com LPS, quando comparado ao controle. Os sesquiterpenos β -cariofileno, δ -cadineno, allo-aromadendreno, β -bisaboleno e α -cadineno também foram identificados entre os compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Copaifera officinalis* (Fabaceae-Caesalpinioideae). Nesse estudo, o óleo essencial de *C. officinalis* (100 $\mu\text{g/mL}$) inibiu a produção de óxido nítrico em esplenócitos obtidos por meio da indução de encefalomielite autoimune em ratos (DIAS et al., 2014). Rodrigues et al. (2015), investigou a ação antileishmania do óleo essencial de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) e de seu constituinte majoritário o α -pineno através da atividade imunomoduladora *in vitro* por meio da quantificação das concentrações de nitrito. Foi verificado um aumento na produção de NO nas concentrações de 50 a 400 $\mu\text{g/mL}$ tanto em macrófagos tratados com o óleo essencial quanto em macrófagos tratados com o α -pineno, sugerindo que o óleo essencial possui atividade anti-leishmania mediada pela imunomodulação. Boscardin et al. (2012), também relatou a ação imunomoduladora do óleo essencial das folhas adultas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cabbage sobre a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS.

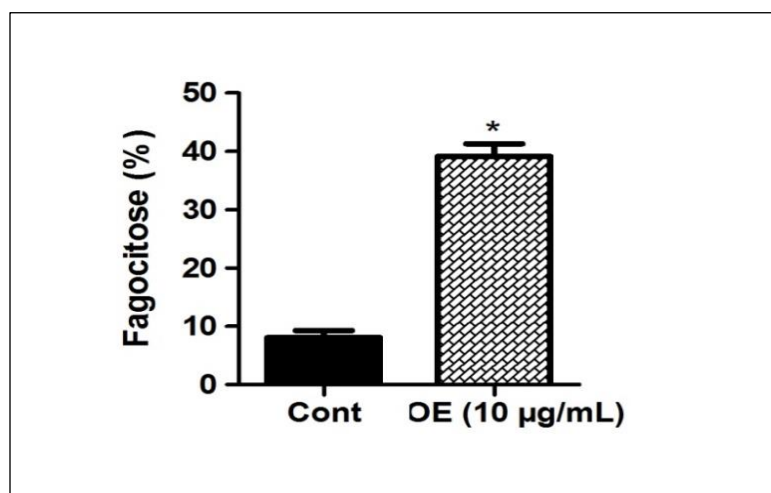
A super produção de espécies reativas de nitrogênio (RNS) e oxigênio (ROS) por macrófagos é um clássico indicador de eventos inflamatórios (KARIMIAN et al., 2014). O efeito do óleo essencial de *B. milleflora* na produção de espécies reativas de oxigênio está apresentado na figura 33. Nesse ensaio as células J774 foram estimuladas com zimozan a produzir ROS. Os resultados obtidos sugeriram que o óleo essencial nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma intensidade de fluorescência semelhante ao controle, ou seja, o óleo essencial não inibiu a produção de ROS nos tempos avaliados.

FIGURA 33 - EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *B. milleflora* NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) ESTIMULADAS POR ZIMOSAN (ZYM);



FONTE: A autora (2016).

FIGURA 34 - CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS USANDO PARTÍCULAS NÃO OPSONIZADAS DE ZIMOSAN.



O símbolo* representa $p < 0,05$ e foi considerado significativo em comparação ao controle.
FONTE: A autora (2016).

O ensaio da fagocitose vem sendo frequentemente empregado para avaliar a atividade imunomoduladora de produtos naturais. Os macrófagos são as principais células utilizadas nesses estudos e que possuem a capacidade de internalizar partículas mais eficientemente que outras células, desempenhando importante função nas respostas imune inata e adquirida (ABBAS, 2000;

GOLDSBY et al., 2000; WU et al., 2004). A capacidade fagocítica do óleo essencial de *B. milleflora*, utilizando partículas não opsonizadas de zimozan, foi de aproximadamente 40% quando comparada ao controle, sugerindo uma possível atividade imunomoduladora (FIGURA 34).

Óleo essencial de *Helichrysum odoratissimum* (L.) Less., também pertencente a família Asteraceae, demonstrou possuir uma potente atividade anti-inflamatória pela sua capacidade em inibir a via 5-lipoxigenase. O Autor atribuiu a atividade relatada aos compostos majoritários β -cariofileno e limoneno encontrados no óleo essencial. Ainda nesse estudo, o óleo essencial de *Heteropyxis natalensis* Harv. (Heteropyxidaceae) apresentou uma menor atividade inibitória sobre a 5-lipoxigenase, a qual foi atribuída a diversos fatores entre eles a ausência do composto β -cariofileno (FRUM et al., 2006). O β -cariofileno é um dos compostos majoritários presentes no OE de *B. milleflora*. Segundo Baylac et al. (2003), a via 5-lipoxigenase também pode ser inibida pelo monoterpeneo α -pineno, presente em menores quantidades em *B. milleflora*. As análises realizadas com o óleo essencial de *B. milleflora* revelaram uma mistura de diferentes compostos, os quais podem exercer efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos, resultando no efeito imunomodulador encontrado nesse trabalho.

CONCLUSÃO

Os objetivos propostos para o estudo da espécie *Baccharis milleflora* foram atingidos e as conclusões estabelecidas estão listadas a seguir:

- Os caracteres morfoanatômicos de *B. milleflora*, com ênfase no caule triado, demonstraram estômatos actinocíticos, tricomas glandulares capitados bisseriados, tectores flageliformes simples e dutos secretores. Essas descrições contribuem para a identificação e diferenciação das demais carquejas;
- A partir das análises por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas foram identificados os compostos majoritários trans-cariofileno (7,65-13,41%), germacreno-D (6,83-11,18%), biciclogermacreno (9,99-12,89%) e 9-10-dehidro isolongifoleno (1,21-10,06%);
- A atividade antioxidante foi demonstrada nas quatro estações do ano. Por meio do ensaio de redução do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), o óleo essencial oriundo da coleta realizada no inverno apresentou o melhor resultado com um valor de IC₅₀ de 15,45 mg/mL. Os óleos essenciais provenientes das coletas realizadas no outono e no inverno, pelo ensaio do fosfomolibdênio, demonstraram significativas atividades antioxidantes com valores superiores aos padrões rutina e ácido gálico. Novamente o óleo essencial proveniente do inverno, através do ensaio de TBARS, apresentou o melhor resultado com uma atividade antioxidante de 29,06%. Essa atividade foi superior à obtida com antioxidante padrão BHT (26,42%);
- O potencial antimicrobiano por microdiluição em caldo foi demonstrado somente frente à cepa de *Staphylococcus aureus*;
- A atividade inseticida realizada pelos ensaios de repelência e fumegância demonstrou que o óleo essencial possui forte atividade frente ao *Pediculus humanus capitis* podendo ser uma alternativa mais segura, eficaz e acessível;
- No ensaio de citotoxicidade, o óleo essencial apresentou valores de IC₅₀ inferiores a 50 µg/mL para as células Jurkat, Raji e HL-60 em 24, 48 e 72 horas de tratamento e demonstrou uma diminuição do conteúdo de DNA celular para as três linhagens tumorais. Em particular, as células Raji apresentaram uma maior inibição na proliferação celular e por consequência foram utilizadas na investigação dos mecanismos de morte celular. O óleo essencial de *B. milleflora*

promoveu parada em G0/G1 e também induziu fragmentação celular, a qual foi representada pelo aumento da população sub G0 indicando morte celular induzida por apoptose. A morte celular por necrose associada ao baixo nível de morte celular por apoptose foi observada nos ensaios de coloração com EB/AO e Hoechst 33342, demonstrando que o óleo essencial age por ambos os mecanismos apoptóticos e necróticos. O índice de seletividade obtido foi de 3,97 o que representa uma reduzida citotoxicidade em células humanas saudáveis;

- A ação imunomoduladora do óleo essencial foi investigada frente as células J774. O óleo essencial apresentou citotoxicidade nas concentrações de 30 e 100 µg/mL, reduziu significativamente a produção de NO e ROS, emitiu uma intensidade de fluorescência semelhante ao controle e exibiu uma capacidade fagocítica de aproximadamente 40%.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BESSA, A. L.; BALLARIN, B.; ARAGÓN, O.; GONZALES, E., BERMEJO, P. Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, n.3, p. 338-344, 2006.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: REVINTER, 2000.
- ABBAS, T. & DUTTA, A. In cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**. v. 9, n. 6, p. 400-414, 2009.
- ACHIKE, F. I. & KWAN, C. Y. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signaling pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 30, p. 605-615, 2003.
- ADAMS R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**, fourth ed. Allured, Carol Stream, Illinois. 2007.
- AGARWAL, C.; DHANALAKSHMI, S.; SINGH, R.P.; AGARWAL, R. Inositol Hexaphosphate Inhibits Growth and Induces G1 Arrest and Apoptotic Death of Androgen-Dependent Human Prostate Carcinoma LNCaP Cells. **Neoplasia** v. 6, p. 646–659, 2004.
- AGOSTINI, F.; SANTOS, A.C.A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M.R.; ZATTERA, F.; WASUM, R.; SERAFINI, L.A., Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, p. 215–220, 2005.
- AHARONI, A.; JONGSMA, M.A.; KIM, T.Y.; RI, M.B.; GIRI, A.P.; VERSTAPPEN, F.W.A.; SCHWAB, W; BOUWMEESTER, W.A. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**. v. 5, p. 49-58, 2006.
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for assessment of herbal medicines. **Herbal Gram** v. 28, p. 13-19, 1993.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; HOPKIN, K.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. O Ciclo da Divisão Celular. In: ALBERTS, Bruce et.al. (Ed). **Fundamentos da Biologia Celular**. Porto Alegre: Artmed, p. 609-620, 2011.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 235-33, 2004.
- ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SOUZA, E. B.; LINS, M.U.; NOGUEIRA, N. A. P.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* (Lam.) **Pers. Arkovic**. n. 6, p. 59-65, 2004.

ALICE, C. B.; SILVA, G. A. A. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A. Levantamento fitoquímico de alguns vegetais utilizados na medicina popular do Rio Grande do Sul (Parte I). **Caderno de Farmácia**, v.1, p. 83-94, 1985.

ALQUINI, Y. & N.K. TAKEMORI "Organização estrutural de espécies vegetais de interesse farmacológico". Curitiba: **Herbarium**, p. 79, 2000.

ALTMAN, J. K.; SASSANO, A.; PLATANIAS, L. Targeting mTOR for the treatment of AML agents and new directions. **Oncotarget**. v. 12 n. 6., p. 510-517, 2011.

ALVES, C. Q.; DAVIDI, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, 2010.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 48, p. 5-16, 2001.

ARIZA & ESPINAR, L. A. Las especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central. **Boletín de la Academia Nacional de Ciencias**, v. 50, p. 175-305. 1973.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Bacteriostatic and bactericidal activity of the *Baccharis trimera* (Less.) DC. - Compositae, decocto, as desinfectant or antiseptic. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 52, p. 230-234, 2000.

BADISA, R. B.; DARLING-REED, S. F.; JOSEPH, P.; COOPERWOOD, J. S.; LATINWO, L. M.; GOODMAN, C. B. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Research**, v. 29, p. 2993–2996, 2009.

BAETU, T. M.; HISCOTT, J. On the TRAIL to apoptosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v.13, n.3, p.199-207, 2002.

BAKER, J. G. *Compositae I Vernoniaceae*. In: Martius, C. F. P. von & Eichler, A. W. (eds.). **Flora brasiliensis**, v.6; n. 2, p. 1-179, 1873.

BAKKALI, F.; AVERBECK. S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-75, 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: EDUFES, p. 623, 2008.

BANDONI, A. L.; MEDINA, J. E.; RONDINA, R. V. D.; COUSSIO, J. D. Genus *Baccharis* L. I: phytochemical analysis of a non polar fraction from *B. crispa* Sprengel. *Planta Medica*, v. 34, n. 6, p. 328-331, 1978.

BARILE, F.A. **In vitro cytotoxicology**. New York: CRC Press, p. 96, 1994.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROSO, G. M. Compositae – Subtribo Baccharidinae Hoffmann – Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguésia**, v.28, n.40, p.1-273, 1976.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. 3ed. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 1991.

BARROSO, G. M. & BUENO O. L. “Compostas, 5. Subtribo: Baccharidinae Flora, 2002.

BARTBERGER, M. D.; LIU, W.; FORD, E.; MIRANDA, K. M.; SWITZER, C.; FUKUTO, J. M.; FARMER, P. J.; WINK, D. A.; HOUK, K. N. The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 17, p. 10958-10963, 2002.

BAYLAC S. & RACINE P. Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts International Journal of Aromatherapy. v. 13, n. 2, p.138–142, 2003.

BELTRAME, F. L.; FERRONI, D. C.; ALVES, B. R. V.; PEREIRA, A. V.; ESMERINO, E. L. A. Avaliação da qualidade das amostras comerciais de *Baccharis trimera* L. (Carqueja) vendidas no Estado do Paraná (Carqueja). **Acta Scientiarum**, v. 31, n. 1, p. 37-43, 2009.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.L. Macrophage polarization in bacterial infections. The Journal of Immunology, v. 181, n.6, p.3733-9, 2008.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, p. 326, 1976.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer. **Mitochondrion**, v. 10, n. 6, p. 584-588, 2010.

BOGLIOLO, L. Inflamações, **Bogliolo Patologia** cap. 7, p. 187. Ed. Guanabara Koogan. 2011.

BOIX, Y. F., VICTÓRIO, C. P., LAGE, C. L. S., KUSTER, R. M. Volatile compounds from *rosmarinus officinalis* L. and *baccharis dracunculifolia* DC. growing in southeast coast of Brazil. **Química Nova**, 33, n. 2, p. 255-257, 2010.

BOLIGON, A. A, DE BRUM, T. F, FROLHICH, J. K; FROEDER, A. L. F, ATHAYDE, M. L. HPLC/DAD Profile and determination of total phenolics, flavonoids, tannins and alkaloids contents of *Scutia buxifolia* Reissek Stem Bark. **Research Journal of Phytochemistry** v. 6, n. 3, p. 84-91, 2012.

BONA, C. M.; BIASI, L. A.; NAKASHIMA, T.; ZANETTE, F.; CORRÊA JÚNIOR, C. **Carqueja: Cultive esta idéia**. Curitiba: SEAB-PR, 2002.

BONFOCO, E. A. M.; KRAINIC, D.; NICOTERA, P.; LIPTON, S. Techniques for distinguishing apoptosis from necrosis in cerebrocortical and cerebellar neurons: pp. 237–253. Poirier J. (ed) .In **Neuromethods: Apoptosis Techniques and Protocols**, Humana Press, New Jersey. 1997.

BORGES, R. & MENDES, J. Epidemiological aspects of head lice in children attending day care centers, urban and rural schools in Uberlândia, Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 189-192, 2002.

BOSBALIDIS, A. M. & KOFIDIS, G. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. **Plant Science**, v. 163, n. 2, p. 375-379, 2002.

BOSCARDIN, P. M. D. **Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de *Eucalyptus benthamii* maiden et cunha – Myrtaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2009.

BOZIN, B. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Resolução n.2, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o regulamento técnico sobre Aditivos Aromatizantes, que consta como anexo da presente Resolução. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 17 de janeiro de 2007.

BREMER, K. **Asteraceae: cladistics and classification**. Timber Press, Portland. v.10, p. 295-304,1994.

BRESSAN, J. **Constituintes químicos, atividade antioxidante e citotóxica das partes aéreas de *Baccharis burchellii* Baker (ASTERACEAE)**. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2014.

BROWN, G.C. & BORUTAITE, V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1658, p. 44- 49, 2004.

BRUSCHI, M. L. ; FRANCO, S. L.; NOVELLO, C. R. . Projeto de manipulação e desenvolvimento de medicamentos e correlatos a base de plantas medicinais na disciplina de farmacotécnica. In: XVI **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Recife, v. 1, 2000.

BUDEL J. M & DUARTE M. R. Macro and microscopic characters of the aerial vegetative organs of Carqueja: *Baccharis usterii* Heering. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 53, n. 1, p. 123-31. 2010.

BUDEL, J. M.; FARAGO, P. V.; DUARTE, M. R. Pharmacobotanical study of *Baccharis cognata* DC. (Asteraceae: Astereae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**. v.32, p.550 - 554, 2013.

BUDEL, J. M.; DUARTE M. R.; SANTOS, C. A. M. Stem morpho-anatomy of *Baccharis cylindrica* (Less) DC.. Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 40, n. 1, p. 93-99, 2004.

BUDEL, J. M.; DUARTE M. R.; SANTOS, C. A. M. Caracteres morfoanatômicos de *Baccharis gaudichaudiana* DC., Asteraceae. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 22, n. 4, p. 313-320, 2003.

BUDEL, J. M. & DUARTE, M. R. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera* (Less.) DC., Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, 2009.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, P. V.; MATZENBACHER, N. I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 3, p. 268-271, 2005.

BUDEL, J. M & DUARTE, M. R. Pharmacobotanical study of aerial vegetative parts of *Baccharis anomala* DC., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 761-8, 2008.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; CUNHA, L. M. Macro and microscopical identification of four species of *Baccharis* from Trimeria group. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.13, p.42-3, 2003.

BUDEL, J. M., MATZENBACHER, N. I; DUARTE, M. R. "Genus *Baccharis* (Asteraceae): a review of chemical and pharmacological studies", in "**Recent Progress in Medicinal Plants - Phytopharmacology and Therapeutic Values**" (Houston: Studium Press LLC, ed.), p. 1-18, 2008

BÚFALO, M. C; CANDEIAS, J. M; SOUSA, J. P; BASTOS, J. K; SFORCIN, J. M. *In vitro* cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. **Natural Product Research**, v. 24, n.18, p.1710-8, 2010.

BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines**. A worldwide review, Geneva, 1998.

BURKAT, A. Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina). Coleccin Cientfica del I.N.T.A.. Tomo IV. Buenos Aires. p. 328-330, 1974.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology** v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R.A.; RAE, G. A.; MEDEIROS, Y.S. In **Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research**; R.M. Burch, Marcel Dekker Inc. New York, p. 88, 1990.

CAMPAGNARO, B.P. Utilização da citometria de fluxo para análise do efeito da hipertensão renovascular 2r1c sobre células sanguíneas, endoteliais e da medula óssea de camundongos. Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Espírito Santo. 2012.

CARDILE V., A; RUSSO, C.; FORMISANO et al., "Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from lebanon: chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells," **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 2, p. 265–272, 2009.

CARVALHO, P.; TIRNAUER, J. S.; PELLMAN, D. Surfing on microtubule ends. **Trends in Cell Biology**. v.13, n. 5, p. 229-37, 2003.

CECHINEL FILHO, V. **Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais. Correlação estrutura química - atividade biológica**. Tese de Doutorado em Química. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, SC, 1995.

CESTARI, I.M.; SARTI, S.J.; WAIB, C.M.; BRANCO J. R. Avaliação da atividade potencial inseticida de óleo essencial de *Tagetes minuta* (Asteraceae) contra *Pediculus humanus capitis* De Geer (Phthiraptera: Pediculidae). **Neotropical Entomology**. v. 33, n. 6, p. 805-7, 2004.

CIFUENTE, D. A.; SIMIRGIOTIS, M. J.; FAVIER, S.; ROTELLI, A.E.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sopherifolia* in mice. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 529-531, 2001.

CLAESON, P.; RADSTROM, P.; SKOLD, O.; NILSSON, A.; HOGLUND, S. **Phytotherapy Research**. v. 6, n. 2, p. 94-8, 1992.

COPPEN, J. J. W. Flavours and Fragrances of Plant Origin: non-wood forest products 1. Rome: **Food and agriculture organization of the united nations**, 1995.

CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: IBDF. v.2, 1984.

CORTADI, A. O.D.; SAPIO, J.M.C.; CARGO, A.; SCANDIZZI, S.; GATTUSO, M. Anatomical Studies of *Baccharis Artriculata*, *Baccharis Crispa* and *Baccharis Trimeria*, "Carquejas" Used in Folk Medicine. **Pharmaceutical Biology** v. 37, p. 357-65, 1999.

COSTA, A. F.; CUNHA, A. P. Farmacognosia. 3. Ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, v.3, 2000.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n.1, p.47-58, 2010.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: patologia estrutural e funcional. 8ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2010.

COULTER, J. A.; MCCARTHY, H. O.; XIANG, J.; ROEDL, W.; WAGNER, E.; ROBSON, T.; HIRST, D. G. Nitric oxide – A novel therapeutic for cancer. **Nitric Oxide**, v. 19, p. 192-198, 2008.

CRISMAN, H. A. & STEINKAMP, J. A. Rapid, simultaneous measurement of dna, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. **The Journal of Cell Biology**. v. 59, p. 766–771, 1973.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press. p. 1262, 1981.

CRONQUIST, A. **The Evolution and Classification of Flowering Plants**. Second Edition. Bronx, NY: The New York Botanical Garden. 1988.

CURIONI, A.; ARIZIO, O. **Plantas aromáticas y medicinales**: labiadas. Buenos Aires: Hemisferio Sul, p. 194, 2006.

DE ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. D. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

DE CANDOLLE, A. P. Compositae: *Baccharis*. *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*. v.5. Paris: Treuttel & Würtz. p. 398-429. 1836.

DE ROBERTIS, E. M. F; HIB, J.; PONZIO R. **Biología Celular e Molecular** 14ª Ed. São Paulo, Editora Guanabara Koogan, 2003.

DENGLER, W. A.; SCHULTE, J.; BERGER, D. P.; MERTELSMANN, R.; FIEBIG, H. H. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. **Anticancer Drugs**. v. 6, p. 522–532, 1995.

DESCHAMPS, C. Biossíntese de óleos essenciais. In: Simpósio Brasileiro de óleos essenciais, 3., 2005, Campinas, Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/sboe2005/palestras.htm>

DESWAL, D. P. & CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi e Ohashi) seeds. **Science and Technology**, v. 25, p.409-417, 1997.

DIAS D. S.; FONTES L. B. A.; CROTTI A. E. M.; AARESTRUP B. J. V.; AARESTRUP F. M.; FILHO A. A. S.; CORRÊA J. O. A. Copaiba Oil Suppresses Inflammatory Cytokines in Splenocytes of C57Bl/6 Mice Induced with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). **Molecules** v. 19, p. 12814-12826, 2014.

DIESEL, S. Contribuição ao estudo taxonômico do gênero *Baccharis* L. (grupo Trimeris) no Rio Grande do Sul. **Pesquisas** v. 38, p.91-126, 1987.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **Journal of Immunology**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.

DÖLL-BOSCARDIN, P. M; SARTORATTO, A.; MAIA B., PAULA JP, NAKASHIMA, T.; FARAGO, P. V.; KANUNFRE, C. C. In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.1, p.8, 2012.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39. n. 4. p. 343-350, 2003.

DUTTA, R. C. Peptide immunomodulators versus infection: an analysis. **Immunology Letters**, p. 1-9, 2002.

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

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology** v. 35, p. 495–516, 2007.

ESPINAR, A. L. As Especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central Bol. **Academia Nacional de Ciências**. v. 50, p. 175-305, 1973.

FABIANE, K. C.; FERRONATTO, R.; SANTOS, A. C.; ONOFRE, S. B. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**., v.18, n.2, p.197-203, 2008.

FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; DUTRA, L. B.; BOUZADA, M. L. M.; SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, p.183-189, 2011.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu p. 1320, 1988-2003.

FERRAZ, R.P.; BOMFIM, D.S.; CARVALHO, N.C.; SOARES, M.B.; SILVA, T.B.; MACHADO, W.J.; PRATA, A.P.; COSTA, E.V.; MORAES, V. R.; NOGUEIRA, P. C.; BEZERRA, D. P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine** v. 15, p. 615–621, 2013.

FERREIRA, A. L. A. & MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, 1997.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 224-230, 2007.

FIUZAI, T. S.; REZENDEII, M. H.; SABÓIA-MORAISI, S.M.T.; TRESVENZOLIII, L. M. F.; FERREIRA, H. D.; PAULA, J. R. Estudos das folhas e caule de *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) Harley, Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p.192-200, 2010.

FLORÃO A.; BUDEL J. M.; DUARTE M. R.; MARCONDES A.; RODRIGUES R. A. F.; RODRIGUES, M. V. N.; SANTOS, C. A. M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Essential oils from *Baccharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. **Journal of Essential Oil Research**. v. 24, p. 561-70, 2012.

FOROUTAN, B.; RUF, A.A.; COSTALL, B.; ANDERSON, D. An in vitro model to study chemoresistance in non-Hodgkin's lymphoma patients over-expressing mutant p53. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. v. 55, p. 151–158, 2007.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**, ed. Princeton: D. Van Nostrand, p. 218. 1949.

FREIRE, S. E.; URTUBEY E.; GIULIANO, D. A. Epidermal characters of *Baccharis* (Asteraceae) species used in traditional medicine. **Caldasia** v. 29, p. 23-38, 2007.

FRUM, Y. & VILJOEN, A. M. In Vitro 5-Lipoxygenase Activity of Three Indigenous South African Aromatic Plants Used in Traditional Healing and the Stereospecific Activity of Limonene in the 5-Lipoxygenase Assay. **Journal of Essential Oil Research**. v.18, p. 85-88, 2006.

GALINDO, L. A; PULTRINI, A. M; COSTA, M. Biological effects of *Ocimum gratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 4, p. 436-41, 2010.

GARLET, T. M. B. **Levantamento das plantas medicinais utilizadas no município de Cruz Alta, RS, Brasil.** Porto Alegre. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p. 220, 2000.

GERSBACH, P. V. The essential oil secretory structures of *Prostanthera ovalifolia* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, v.89, n.3, p. 255-260, 2002.

GIULIANO, D. A., Clasificación infragenérica de las especies Argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). **Darwiniana**. v. 39, p. 131–154, 2001.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

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

GORDON, S.; TAYLOR, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v.5, n.12, p. 953-64, 2005.

GOREN, N.; JAKUPOVIC, J.; TOPAL, S. Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum argyrophyllum* Var. *Argyrophyllum*. **Phytochemistry**. v. 29, p. 1467-9, 1990.

GRATZ, N.G. Human lice: Their prevalence, control and resistance to insecticides. A Review 1985-1997. Document W.H.O./ CTD/ WHOPES/ 97.8, **World Health Organization**, Geneva. 1997.

GREAY, S. J.; IRELAND, D.J.; KISSICK, H.T.; LEVY, A., BEILHARZ, M.W.; RILEY, GRIGUTYTĚ, R.; NIMPTSCH, J., MANUSADŽIANAS, L., PFLUGMACHER, S. Response of oxidative stress enzymes in charophyte *Nitellopsis obtusa* exposed to allochthonous leaf extracts from beech *Fagus sylvatica*. **Biologia**. v. 55, p. 142–9. 2009.

HALF, E. & ALBER, N.. Colon cancer: preventive agents and the present status of chemoprevention. **Expert Opin Pharmacother**. v. 10, n. 2, p. 211-9, 2009.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, n.1, p. 609-23, 1992.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Method in Enzymology**, v. 186, n.2, p. 1-85, 1990.

HARVEY, A. L.; Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, n. 13, p. 894-901, 2008.

HEIDEN, G.; BAUMGRATZ, J. F. A.; ESTEVES, R. L. *Baccharis* subgen. *Molina* (Asteraceae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 3, 2012.

HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; MACIAS, L. *Baccharis* sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae) no Rio Grande do Sul, Brasil **Rodriguésia**. v. 60, n. 4, p. 943-83, 2009.

HENRIQUES, SIMÕES-PIRES, APEL. Óleos essenciais: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R.A.; CECHIMEL FILHO, V. (orgs.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2.ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, p. 219-256, 2009.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. B.T. Batsford, London. 1996.

HOLMES, W. C. A proposed sectional classification for *Mikania* (*Eupatorieae*). In: Hind, D. J. N. & Beentje, H. J. (eds.). *Compositae: Systematics*. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994. Vol. 1. **Royal Botanic Gardens, Kew**. p. 621-626, 1996.

HOUGHTON, P., FANG, R., TECHATANAWAT, I., STEVENTON, G., HYLANDS, P. J., LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**. v. 42, n. 4, p. 377-87, 2007.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids **Phytochemistry**, v. 26, p. 2489, 1987.

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

JARVIS, B. B.; MOKHTARI-REJALI, N.; SCHENKEL, E. P.; BARROS C. S. L; MATZENBACHER, N. I. Trichothecene mycotoxins from Brazilian species. **Phytochemistry**, v. 30, p. 789-797, 1991.

JEONG-MIN, O.; LEE, I. Y.; SEO, M.; PARK, S.; LEE, S. H.; SEO, J. H.; YOUNG, T.; PARK, S.; SHIN, M. H.; PAI, K.; YU, J.; SIM, S. Prevalence of *Pediculosis capitis* among Korean children. **Journal of Parasitology Research**, v. 107, n. 6, p. 1415-1419, 2010.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York, McGraw-Hill Book, p. 523, 1940.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Nacional, p.777, 1998.

JONES, S. B. Vernonieae - systematic review. In: *The Biology and Chemistry of the Compositae* (HEYWOOD, V.H., HARBORNE, J.B. AND TURNER, B.L., eds.). v. 1. Academic Press, London. p. 503-521, 1977.

JORGE, L. I. F., PEREIRA U.; SILVA, A. M. Identificação histológica das principais compostas brasileiras de emprego medicinal / Histological identification of main Brazilian compositional of medicinal use. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 51, p. 47-51, 1991.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG E. A.; STEVENS P. F. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer Associates. Sunderland. p. 439, 1999.

KADA, T.; KANEKO, K.; MATSUZAKI, S.; MATSUSAKI, T.; HARA, Y. Detection and chemical identification of natural bioantimutagens. **Mutation Research**, v. 150, p. 127-132, 1985.

KADOWAKI, N.; KITAWAKI, T.; Recent advance in antigen-specific immunotherapy for acute myeloid leukemia. **Clinical Developmental Immunology**, p. 1-7. 2011.

KALEMBA, D.; KUNICKA A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 813-829, 2003.

KANUNFRE, C. C., FREITAS, J. J. S., POMPEIA, C., ALMEIDA, D. C. G., CURY-BOAVENTURA, M. F., VERLENGIA, R., CURI, R. Ciglitizone and 15d PGJ2 induce apoptosis in Jurkat and Raji cells. *Int. Immunopharmacol.* v. 4, p. 1171–1185, 2004.

KARIMIAN, P.; KAVOOSI, G., AMIRGHOFRAN, Z. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 4, n. 3, p. 219-227, 2014.

KASTAN, M. B. & BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v.18, n. 432, p. 316– 323, 2004.

KEEPERS, Y. P, PIZAO, E. P, PETERS, G. J, VAN ARK-OTTE, J., WINOGRAD, B., PINEDO, H. M. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**. v. 27, n. 7, p. 897-900, 1991.

KIM, J. Y, OH, T.H, KIM, B. J, KIM, S. S, LEE, N. H, HYUN, C.G. Chemical composition and anti-inflammatory effects of essential oil from *Farugium japonicum* flower. **Journal of Oleo Science**. v. 57, n. 11, p. 623-8, 2008.

KISHIDA, E.; KAMURA, A.; TOKUMARU, S.; ORIBE, M.; IGUSHI, H.; KOJO, S. Re-evaluation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances as indexes of autoxidation based on oxygen consumption. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 41, n.1, p. 1-4, 1993.

KO, C. J.; ELSTON, D. M. Pediculosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**., Schaumburg, v. 50, n. 1, p.1-12, jan. 2004.

KOSMIDER, B.; ZYNER, E.; OSIECKA, R.; OCHOCKI, J. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt (II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. **Mutation Research**, v. 563, p. 61-70; 2004.

KRISHAN, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. **The Journal of Cell Biology**. v. 66, p.188–193, 1975.

KROEMER, G., DALLAPORTA, B., RESCHE-RIGON, M., The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. **Annual Review of Physiology**. v. 60, p. 619–642, 1998.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R.; Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciencia Y Tecnologia Alimentaria**, v. 25, p. 726-732, 2005.

LABRO, R. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immuno-fairy tales”? **Clinical Microbiology Reviews**. v.13, n.4, p.615-650, 2000.

LAGO, J. H. G.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; SOARES, M. G.; BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G. & SOUZA, F. O. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de "Campos de Altitude" da mata atlântica paulista. **Química Nova**. v. 31, p.727-30, 2008.

LANDREMAN, A. P., SHAFER, M. M., HEMMING, J. C., HANNIGAN, M. P., SCHAUER, J. J. A Macrophage-Based Method for the Assessment of the Reactive Oxygen Species (ROS) Activity of Atmospheric Particulate Matter (PM) and Application to Routine (Daily-24 h) Aerosol Monitoring Studies. **Aerosol Science and Technology**. V. 42, n.11, p. 946-957, 2008.

LEWIS, S. L., DIRKSEN, S. R., HEITKEMPER, M. M.; BUCHER, L.; CAMERA I. M. **Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica. Avaliação e Assistência dos Problemas Clínicos**. v.1, 8 ed. 2013.

LIMA, E. M., KANUNFRE, C. C., ANDRADE, L. F., GRANATO, D., ROSSO, N. D. Cytotoxic effect of inositol hexaphosphate and its Ni(II) complex on human acute leukemia Jurkat T cells. **Toxicology in Vitro**. v. 29, p. 2081–2088, 2015.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. D.; MORAES, J. C.; VIEIRA, S. S.; MELO, B. A.; FILGUEIRAS, C. C. Composição dos Óleos Essenciais de Anis-estrelado *Illicium verum* L. e de Capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: Avaliação do Efeito Repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, v. 3, n. 8, 2008.

LOPES, F. C. M. **Avaliação da atividade imunológica *in vitro* de *Alchornea* spp quanto a produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de necrose tumoral- α por macrófagos murinos**. Dissertação (Mestrado em análises clínicas). Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2004.

LUSA, M. G. **Caracterização morfoanatômica e histoquímica de *Cuphea cartaginenses* (Jacq.) J.F. MACBR. (Lythraceae) e avaliação em ambientes hidrofítico e mesofítico.** Dissertação (Mestrado em Botânica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

LUZ, L. E. C., KANUNFRE, C. C., PALUDO, K. S., JUSTO, A. S., PETRY, V. K., LEMES, B. M., BARISON, A., NEPEL, A., WANG, M., AVULA, B., KHAN, I. A., BELTRAME, F. L. Cytotoxic biomonitored study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 183, n. 29–37, 2016.

MACIEL, MARIA A. M.; PINTO, ÂNGELO C.; VEIGA JR, VALDIR VEIGA; GRYNBERG, NOEMA F; ECHVARRIA, Áurea. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 133-137, 2001.

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n.8, p. 519-31, 2011.

MASIHI, K. N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 14, p. 181-191, 2000.

MATTIOLI, F.; MARTELLI, A.; GOSMAR, M.; GARBERO, C.; MANFREDI, V.; VARALDO, E.; TORRE, G. C.; BRAMBILLA G. DNA fragmentation and DNA repair synthesis induced in rat and human thyroid cells by chemicals carcinogenic to the rat thyroid. **Mutation Research**. v. 609, p. 146–153, 2006.

MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. J.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.; MOGIL, R. J.; NISHIOKA, W. K.; GREEN, D. P. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods in Cell Biology**. v. 46, p. 153–181, 1995.

MELO, S. F.; SOARES, S. F.; COSTA, R. F.; SILVA, C. R.; OLIVEIRA, M. B. N.; BEZERRA, R. J. A. C.; ARAÚJO, A. C.; BERNARDO, F. B. Effect of *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research**, v. 496, p. 33-38, 2001.

MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; VIEIRA, A. B. R.; MENDONÇA, L. C. V.; SILVA, R. M. F.; ROLIM, N. P. J. BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n.1, p.121-125, 2011.

MENDONÇA, R. C. F.; WALTER, J. M.; SILVA JUNIOR, B. M. T.; M.I.C., REZENDE, M. C.; FILGUEIRAS, A. V.; NOGUEIRA T. S. Flora vascular do cerrado. In SANO, S.M. & ALMEIDA, S.P. (eds.). Cerrado: ambiente e flora. EMBRAPA. Planaltina, p.289-556, 1998.

MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Plantas Medicinais: A coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre, RS, v. 5, p. 93-119, 1989.

MERCHANT, D.; KAHN, R.; MURPHY, W. **Handbook of cell and organ culture**. Broken Arrow: Burgess Publishing, 1964.

MIHICH E. *New leads in cancer therapeutics: a keynote address*. Medicine (B Aires) 60 Suppl 2, 2000a, 4-8. Mihich E. *On the immunomodulating effects of anti-cancer drugs and their therapeutic exploitation*. **Japanese Journal of Clinical Oncology** v. 30, p. 469-471, 2000.

MOLARES, S.; GONZÁLEZ, S. B; LADIO A.; CASTRO, M. A. Etnobotánica, anatomía y caracterización físico-química del aceite esencial de *Baccharis obovata* Hook. et Arn. (Asteraceae: Astereae). **Acta Botanica Brasilica**. V. 23, p. 578-89, 2009.

MOMESSO, L. S.; MOURA, R. M. X.; CONSTANTINO, D. H. J. Atividade antitumoral do *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n. 3, p. 660-663, 2009.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. v. 27, n. 2, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURTADA, R., FONSECA, S. B., WISNOVSKY, S. P., PEREIRA, M. P., WANG, X., HURREN, R., PARFITT, J., LARSEN, L., SMITH, R. A. J., MURPHY, M. P. SCHIMMER, A. D., KELLEY, S. O. Re-Directing an Alkylating Agent to Mitochondria Alters Drug Target and Cell Death Mechanism. **PLoS ONE** v. 8, e60253, 2013.

MUKHTAR, E., ADHAMI, V. M., MUKHTAR, H., Targeting Microtubules by Natural Agents for Cancer Therapy. **Molecular Cancer Therapeutics**. V. 13, p. 275–284, 2014.

MURARI, A. L; CARVALHO, F. H.; HEINZMANN, B. M.; MICHELOT, T. M.; HÖRNER, R.; MALLMANN, C. A. Composição e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus*. **Química Nova**. v. 31, n. 5, 2008.

NAKATA, P.A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. **Plant Science**. v. 164, n. 6, p. 901–909, 2003.

NASCIMENTO, G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, p. 48-53, 2000.

NCCLS/CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard, document M7-A6, 2004.

NUNES, S. C. B.; BORGES, R.; MENDES, J.; JUSTINIANO, S. C. B.; MORONI, F. T. Biologia e Epidemiologia da Pediculose da cabeça. **Revista Scientia Amazonia**, v. 3, p: 85-92, 2014.

OLIVEIRA C. B.; COMUNELLO L. N., LUNARDELLI A., AMARAL R. H., PIRES M. G. S., SILVA G. L., MANFREDINI V., VARGAS C. R., GNOATTO S. C. B., OLIVEIRA J. R., GOSMANN G. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. **Molecules**. v.17, p. 1113-1123, 2012.

OLIVEIRA, A. C. P.; ENDRINGER, D. C.; AMORIM, L. A.S.; BRANDÃO, M. G. M.; COELHO, M. M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 465-469, 2005.

OLIVEIRA, A. M. A., SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; FARAGO, P. V.; DUARTE, M. R.; BUDEL, J. M. Comparative morpho-anatomical study of *Baccharis curitybensis* Heering ex Malme and *Baccharis spicata* (Lam.) Baill. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 30, n. 8, p. 1560-6, 2011.

OLIVEIRA, R. B.; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química nova**. v.25, n.6, p.976-984, 2002.

OLIVEIRA, V. C.; BASTOS, E. M. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis Dracunculifolia* DC. (Asteraceae) visando a identificação da origem botânica da própolis. **Acta Botanica Brasilica**, v. 12, n. 3, p. 431-439, 1998.

ORRENIUS, S.; NICOTERA, P.; ZHIVOTOVSKY, B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology. **Toxicological Sciences**. v.119, n.1, p.3-19, 2011.

ORTINS, G. M. M. & AKISUE, G.. Estudo morfo-histológico, screening fitoquímico, constantes físicas e análise cromatográfica da droga e extrato fluido visando controle de qualidade da espécie *Baccharis articulata* Pers / Morpho-anatomic study, phytochemistry screeing, physical constant, chromatography of crude drug and fluids extracts for quality control of *Baccharis articulata* Pers. **Lecta-USF**. v. 18, n. 2, p. 9- 32, 2000.

PAGNI, A. M & MASINI, A. Histochemistry of secretory structures in vegetative organs of *santolina leucantha bertol.* (Asteraceae). **Israel Journal of Plant Sciences.** v. 47, p. 257-63, 1999.

PAPAZISIS, K. T.; GEROMICHALOS, G. D.; DIMITRIADIS, K. A.; KORTSARIS, H. A. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods.** n. 208, p. 151-158, 1997.

PAROUL, N.; ROSA, R. L. D.; PIAZZA, S. P.; BERTELLA, T.; PUTON, B. M. S.; FALCÃO L.; BACKES. G. T.; CANSIAN, R. L. Composição química e atividade antioxidante de *Baccharis trimera* Pers e *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). **Perspectiva**, v. 40, n.151, p. 55-64, 2016.

PARREIRA, N. A, MAGALHÃES, L. G, MORAIS, D. ,R, CAIXETA, S.C, DE SOUSA, J.P, BASTOS, J. K, CUNHA, W. R, SILVA, M.L, NANAYAKKARA, N.P, RODRIGUES, V., DA SILVA FILHO, A.A. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry Biodiversity** v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.

PARSLOW, T. G. **Imunologia médica.** 10ª Edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.

PASSERO, L. F. D., BONFIM-MELO, A., CORBETT, C. E. P., LAURENTI, M. D., TOYAMA, M. H., TOYAMA, D. O., ROMOFF, P., FÁVERO, O. A., GRECCO, S. S., ZALEWSKY, C. A.; LAGO, J. H. G. Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae). **Parasitology Research** v. 108, n. 3, p 529–536, 2011.

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C. D.; VERDAM, M. C. S.; KALEGARI, M.; CAMPOS, R.; HIROTA, B. C. K.; MIGUEL, O. G. M.; MIGUEL, M. D. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.)Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** v.16, n.2, 2014.

PENNA, M. *Calendula officinalis*. In: **Notas sobre plantas brasileiras.** Rio de Janeiro: Araújo Penna Filhos, p. 67-9, 1921.

PEREIRA, C. A. M.; MAIA, J. F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciencia Y Tecnologia Alimentaria**, Campinas, v. 27, n.3, p. 624-632, 2007.

PEREIRA, M. A. L. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica.** Dissertação (Mestre em engenharia e tecnologia de materiais). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2010.

PETENATTI, E. M.; CIFUENTE, D. A.; GIANELLO, J. C.; GIORDANO, O. S.; TONN, C.E.; DEL VITTO, L. A. Medicamentos Herbarios en el Centro-Oeste Argentino. VI. Caracterización y Control de Calidad de dos Especies de "Carquejas": *Baccharis sagittalis* y *B. triangularis* (Asteraceae) **Latin American Journal of Pharmacy**. v. n. 26, p. 201-8, 2007.

POSSAMAI, R. M. **Levantamento etnobotânico das plantas de uso medicinal em Mariana Pimentel, RS**. Porto Alegre, 108p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2000.

POZZATTI, P.; LORETO, E. S.; LOPES, P. G. M.; ATHAYDE, M. L.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**. v. 53, n.1, p.12-5, 2009.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

PUYAL, J.; VASLIN, A.; MOTTIER, V.; CLARKE, P. G. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. **Annals of Neurology**. v. 66, p. 378-389, 2009.

RASOANAIVO, P., RANDRIANA, R. F., MAGGI, F., NICOLETTI, M., QUASSINTI, L., BRAMUCCI, M., LUPIDI, G., PETRELLI, D., VITALI, L. A., PAPA, F., VITTORI, S. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oil of *Athanasia brownii* Hochr. (Asteraceae) Endemic to Madagascar. **Chemistry Biodiversity**. V. 10, p. 1876–1886, 2013.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, p. 43-74, 2003.

RIBBLE, D., GOLDSTEIN, N. B., NORRIS, D. A., SHELLMAN, Y.G., A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. **BMC Biotechnology**. v. 5, n. 12, 2005.

RIBEIRO, D. I.; ALVES, M. S.; FARIA, M. G. I.; SVIDZINSKI, T. I. E.; NASCIMENTO, I. A.; FERREIRA, F. B. P.; FERREIRA, G. A.; GAZIM, Z. C. Determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) e de *Achillea millefolium* (Asteraceae) cultivadas no Noroeste do Paraná. **Arquivos da Ciências da Saúde**. UNIPAR, v. 14, n. 2, p. 103-109, 2010.

RICCI, M. S.; ZONG, W. X. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **The Oncologist**, v. 11, n.4, p. 342-57, 2006.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, p. 327, 1997.

RODRIGUES K. A. F., AMORIM L. V., DIAS C. L., MORAES D. F. C., CARNEIRO S. M. P., CARVALHO F. A. A. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 160, p. 32–40, 2015.

RODRIGUEZ, M. V., MARTÍNEZ, M. L., CORTADI, A.A., BANDONI, A., GIULIANO, D. A., GATTUSO, S. J. **Plant Systematics and Evolution**.v. 286, n. 3, p. 175-90, 2010.

RODRIGUEZ, M. V.; GATTUSO S.; GATTUSO; M. *Baccharis crispa y Baccharis trimera* (Asteraceae): Revisión y Nuevos Aportes para su Normalización Micrográfica **Latim American Journal of Pharmacy**. v. 27, p. 387-97, 2008.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, v. 61, p. 33-36, 1972.

ROHDICH, F.; HECHT, S.; BACHER, A., EISENREICH, W. The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Discovery and function of the ispDEFGH genes and their cognate enzymes. **Pure and Applied Chemistry**, v. 75, n. 2-3, p. 393-405, 2003.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v.69, n.2, p. 167-174, 2000.

SÁ, M. F. A. & NEVES, L. J. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 77, p. 88-96, 1996.

SAKAGAMI, Y.; KAJAMURA, K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin – resistant Enterococci. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 2, p.140-144, 2002.

SAMPAIO, S. C., BRIGATTEA, P., SOUSA-E-SILVA, M. C. C., DOS-SANTOS, E. C., RANGEL-SANTOS, A. C., CURIC, R., CURYA, Y. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon**. V. 41, p. 899–907, 2003.

SAMUELSSON, G.; Sesquiterpenoids and diterpenoids with pharmacological and biological activities. **Acta Pharmaceutica Fennica** . 1992.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College, p. 97, 1951.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, 2009.

SCHIMIDT, M. & BASTIANS, H. Mitotic drug targets and the development of noveol anti-mitotic anticâncer drugs. **Drug Resistance Updates**. v.10, n.4/5, p.162-181, 2007.

SCHNEIDER, A. A. “*Estudo taxonômico de Baccharis L. sect. Caulopterae DC. (Asteraceae: Astereae) no Brasil*”. Tese (Doutor em Ciências: Botânica) Instituto de Biociências, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 198, 2009.

SCHNEIDER, A. A. & I.I. BOLDRINI. Two new species of *Baccharis* sect. caulopterae (asteraceae: astereae) from southern brazil. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**. v. 2, n. 1, p. 45-51, 2008.

SCHNEIDER, A. A. “**Estudo taxonômico de *Baccharis* L. sect. Caulopterae DC. (Asteraceae: Astereae) no Brasil**”, Instituto de Biociências, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 198, 2009.

SCHOSSLER, P.; WUNCH, D.; SCHNEIDER, GL.; NUNES, J. E. S.; MARTINS, V. D.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.; CARAMÃO, E. B.; ZINI, C. A. Caracterização dos Óleos Essenciais de *Baccharis punctulata* e *Eupatorium laevigatum* e de suas Atividades Antioxidantes. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindoia. São Paulo. 2006.

SEBOLD, D. F. & BIANCHI, N. R. Contribuição ao estudo do gênero *Baccharis* L. (Asteraceae): ensaio de toxicidade excessiva e abordagem fitoquímica de dez espécies. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 78, n. 2, p. 33-34, 1997.

SELLITTI, D. F.; SUZUKI, K.; DOI, S. Q.; LAGRANHA, C.; MACHADO, M.; MATOS, T.; KOHN, L. D. Thyroglobulin increases cell proliferation and suppresses Pax-8 in mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 3, p. 795-799, 2001.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002.

SERHAN C. N., Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annual Reviews Immunology**. v.25, p.101-37, 2007.

SHAND F. H. W., LANGENBACH, S. Y., KEENAN, C. R., MA, S. P., WHEATON, B. J., SCHULIGA, M. J., ZIOGAS, J., STEWART, A. G. In Vitro and In Vivo Evidence for Anti-Inflammatory Properties of 2-Methoxyestradiol. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**. v. 336, n. 3, p. 962–972, 2011.

SHIRAZI M. T., GHOLAMI H., KAVOOSI G., ROWSHAN, V., TAFSIRY A. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food Science and Nutrition*. V. 2, n. 2, p. 146–155, 2014.

SHOLDT, L. L.; HOLLOWAY, M. L.; FRONK, W. D. The epidemiology of human pediculosis in Ethiopia. Jacksonville, Navy Disease Vector Ecology and Control Center, 1979.

SHURIN, M. R, NAIDITCH, H, GUTKIN, D. W, et al. Chemoimmunomodulation: immune regulation by the antineoplastic chemotherapeutic agents. **Current Medicinal Chemistry**. v. 19, p. 1792–803, 2012.

SILVA, F. G.; OLIVEIRA, C. B. A; PINTO, J. E. B. P.; NASCIMENTO, V. E.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C. et al. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 18, p. 990-7, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER F. X.; KIEMLE D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos S.A., p. 490, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. UFRGS / Ed. da UFSC, 2002.

SIMÕES, C. M. O. & SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC, p. 467-495, 2003.

SIMÕES, C. M. O & SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007, p. 467-495.

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora UFRGS/ Editora UFSC, 2000.

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

SINGH, H.P, MITTAL, S., KAUR, S., BATISH, D.R., KOHLI, R.K. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*. **Food Chemistry**. v.114, p. 642–5, 2009.

SINGH, R. P., AGARWAL, C., AGARWAL, R. Inositol hexaphosphate inhibits growth, and induces G1 arrest and apoptotic death of prostate carcinoma DU145 cells: modulation of CDKI–CDK–cyclin and pRb-related protein–E2F complexes. **Carcinogenesis** v. 24, p. 555–563, 2003.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, n.13, p. 1107-1110, 1990.

SKELDON, A.; SALEH, M. The Inflammasomes: Molecular Effectors of Host Resistance Against Bacterial, Viral, Parasitic, and Fungal Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 15, 2011.

SNYDER, S. H.; BREDT, D. S. Biological role of nitric oxide. **Scientific American**. v. 266, n. 5, p. 68-71, 1992.

SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons**. A handbook for laboratories of pure and applied botany. v. 2, Oxford: Clarendon Press, p. 1182, 1908.

SOUZA M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312, 2004.

SOUZA, C. A., FARAGO, P. V., DUARTE, M. R.; BUDEI, J. M. Pharmacobotanical study of *Baccharis singularis* (Vell.) G.M. Barroso, Asteraceae. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v. 30, p. 311-7, 2011.

SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; IVO, N. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 3, p. 368-372, 2007.

SOUZA, V.C. & LORENZI. H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Instituto Plantarum**, Nova Odessa. 2005.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, p. 1-44, 1998.

STITES, D. P. & TERR, A. I. Basic and Clinical Immunology, Appleton & Lange, 7nd. Edition, New York, p. 870, 1995.

SUFFNESS, M. & PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K., (Ed.), **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. Academic Press, London, pp. 71-133. 1990.

SYLVESTRE M., PICHETTE, A.; LONGTIN, A.; NAGAU, F.; LEGAULT, J. "Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe," **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 99–102, 2006.

TAKAHASHI, A.; MATSUMOTO, H.; YUKI, K.; YASUMOTO, J.; KAJIWARA, A.; AOKI, M.; FURUSAWA, Y.; OHNISHI, K.; OHNISHI, T. High-LET radiation enhanced apoptosis but not necrosis regardless of status. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 60, n. 2, p. 591-597, 2004.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from *guava* fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 19, p. 669-675, 2006.

TOLOZA, A. C.; ZYGADLO, J.; CUETO, G. M.; BIURRUN, F.; ZERBA, E.; PICOLLO, M. I. Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 5, p. 889-895, 2006.

TOMAINO, F.; CIMINO, V.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, PASQUALE, A., SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 549-554, 2005.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

USP (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA). 25th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention. 2002.

VALADARES, M. C; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.43 n.4, 2007.

VALGAS, C. **Avaliação de método de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais**. Florianópolis. Dissertação de mestrado em Farmácia. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina. p. 103, 2002.

VANNINI, A. B., SANTOS, T. G.; FLEMING, A. C., PURNHAGEN, L. R. P., LOURENÇO, L. A., BUTZKE, L. A. et al. Chemical characterization and antimicrobial evaluation of the essential oils from *Baccharis uncinella* D.C. and *Baccharis semiserrata* D.C. (Asteraceae). **Journal of Essential Oil Research**. v. 24, p. 547-54, 2012.

VARGAS-CORTES, M., HELLSTRÖM, U., PERLMANN, P. Surface markers of human natural killer cells as analyzed in a modified single cell cytotoxicity assay on poly-L-lysine coated cover slips. **Journal of Immunological Methods**. v.62, n.1, p.87-99. 1983.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. The *Baccharis* genus (Asteraceae): Chemical, economical and biological aspects. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in câncer. **Cell Proliferation**. v. 36, n.3, p. 131-149, 2003.

VICHAJ V.; KIRTIKARA K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols** v. 1, p. 1112–1116, 2006.

VIDOTTO, C.; SILVA, D. B.; PATUSSI, R.; BRANDÃO, L. F. G.; TIBÚRCIO, J. D.; ALVES, S. N.; SIQUEIRA, J. M. Teste de toxicidade frente artemia como modelo preliminar de busca de substâncias pediculicidas a partir de fontes naturais. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 1, p. 255-263, 2013.

VIRADOR, V. M., KOBAYASHI, N., MATSUNAGA, J., HEARING, V. J. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. *Anal. Biochem.* 270, 207–219. W. **Zoologia Geral**, 6. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e metabolismo**, v. 46, p. 351-360, 2002.

WICKMAN, G.; JULIAN, L.; OLSON, M. F. How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 5, p. 735-742, 2012.

WNUK, M., LEWINSKA, A., OKLEJEWICZ, B., BUGNO, M., SLOTA, E., BARTOSZ, G. Evaluation of the Cyto- and Genotoxic Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in Human Lymphocytes *In Vitro*. **Mutation Research**. v. 679, p. 18-23, 2009.

WU, R.; VAN DER HOEK, K. H.; RYAN, N. K. et al. Macrophage contributions to ovarian finction. **Human Reproduction Update**, v.10, n. 2, p. 119-133, 2004.

XU, W.; LIU, L. Z.; LOIZIDOU, M.; AHMED, M.; CHARLES, I. G. The role of nitric oxide in cancer. **Cell Research**, v. 12, p. 311-320, 2002.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAQ, J. HPLC method for evaluationof the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 62, p. 1201–1204, 1998.

YAN, R., YANG Y., ZENG, Y., ZOU, G. Cytotoxicity and antibacterial activity of *Lindera strychnifolia* essential oils and extracts. **Journal of Ethnopharmacology** v. 121, p. 451–455, 2009.

YANG, Y.; CHOI, H.; CHOI, W.; CLARK, J. M.; AHN, Y. Ovicidal and Adulticidal Activity of *Eucalyptus globulus* Leaf Oil Terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52 n. 9, p. 2507–2511, 2004.

ZAPATA, B., DURÁN, C., STASHENKO, E., BETANCUR-GALVIS, L., MESA-ARANGO, A. C. Actividad Antimicótica y Citotóxica de Aceites Esenciales de Plantas de la Familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología*. v. 27, n.2, p.101-3. 2010.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**. v. 19, p.124-128, 2004.

ZWILLING, B. S.; EISENSTEIN, T. K. **Macrophage-pathogen interactions**. New York: Marcel Dekker, p. 634, 1994.

APÊNDICE 1 - ARTIGO 1



Latin American Journal of Pharmacy
(formerly *Acta Farmacéutica Bonaerense*)
Lat. Am. J. Pharm. **33** (5): 841-7 (2014)

Regular article
Received: November 2, 2013
Revised version: April 2, 2014
Accepted: April 5, 2014

A New Contribution to the Pharmacognostic Study of Carquejas: *Baccharis milleflora* DC., Asteraceae

Camila B. PEREIRA ^{1*}, Paulo V. FARAGO ², Jane M. BUDEL ², Josiane P. DE PAULA ²,
Daniela G. FOLQUITTO ¹, Obdulio G. MIGUEL ¹ & Marilis D. MIGUEL ¹

¹ Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná;
Av. Prof. Lothário Meissner, 632; Jardim Botânico; 80210-170; Curitiba, Paraná, Brasil

² Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa;
Av. Gen. Carlos Cavalcanti, Uvaranas, 84030-900; Ponta Grossa, Paraná, Brasil

SUMMARY. *Baccharis* is an important genus of Asteraceae and comprises about 120 species in Brazil. Several *Baccharis* have demonstrated biological activities. *Baccharis milleflora* (Less.) DC., commonly known as carqueja, carqueja-do-lajeado, is used in popular medicine as a diuretic and stomachic, similarly to other carquejas. The botanical material was investigated according to standard methods of light and scanning electron microscopy. In brief, *B. milleflora* showed a three-winged stem with ribs between the wings, actinocytic and anomocytic stomata located above the other epidermal cells in the axis, simple uniseriate flagelliform non-glandular trichomes with cells that extend from the base, biseriate glandular trichomes and secretory ducts. These data contribute to the identification of this medicinal plant and supply additional knowledge for the *Trimeria* group.

RESUMEN. *Baccharis* es un género importante de Asteraceae y cuenta con cerca de 120 especies en Brasil. Varias especies de *Baccharis* han demostrado actividades biológicas. *Baccharis milleflora* (Less.) DC., comúnmente conocida como carqueja o carqueja-do-Lajeado, se utiliza en medicina popular como diurético y estomacal, de manera similar a otras carquejas. El material botánico se investigó de acuerdo con los métodos estándar de microscopía óptica y electrónica de barrido. *B. milleflora* posee un tallo de tres alas con costillas entre las alas, estomas actino- y anomocíticos situados por encima de las otras células de la epidermis en el eje, tricomas no glandulares flageliformes uniseriados con células que se extienden desde la base, tricomas glandulares biseriados y conductos secretores. Estos datos contribuyen a la identificación de esta planta medicinal y suministra conocimientos adicionales sobre el grupo *Trimeria*.

INTRODUCTION

Baccharis L., an important genus of Asteraceae, comprises about 500 species distributed from the United States to Argentina ¹. Approximately 120 species are described in Brazil, mainly in Southern ². Several *Baccharis* have shown biological activities as *B. coridifolia* DC. ³, *B. sagittalis* (Less.) DC. ⁴, *B. unbelliformis* DC. ⁵, *B. trinervis* Pers. ⁶, *B. dracunculifolia* DC., and *B. uncinella* DC. ⁷.

Baccharis L. (sect. *Caulopterae* DC.) is represented by about 30 species and restricted to South America ¹. Brazil presents the main diversity of species for this section, which increases with altitude ⁸. In Rio Grande do Sul, 15 species of the *Trimeria* group were reported ⁹.

Trimeria group comprises many species that show caulinar expansions or wings which con-

stitute cladodes. These species are popularly known as carqueja in Brazil and Argentina, and exhibit two or three winged cladodes, which are similar in morphology. Some works have dealt with anatomical characters of aerial vegetative organs for pharmacognostic purposes ^{2,10}.

Baccharis milleflora (Less.) DC., commonly named as carqueja and carqueja-do-lajeado, is used in popular medicine as a diuretic and stomachic, similarly to other carquejas ². It takes place in the Southeast and South of Brazil and occurs in dry or wet fields, swamps, margins of forests, fields of high altitude and shaded sites ^{11,12}. Studies involving its essential oil from different samples of *B. milleflora* showed distinct major compounds, including spathulenol (25.3%) and β -pinene (34.2%) ¹³.

KEY WORDS: Asteraceae, *Baccharis milleflora*, morpho-anatomy, pharmacognosy, quality control.

* Author to whom correspondence should be addressed: E-mail: camilabugno@hotmail.com

Morphological and anatomical studies have been performed due to confusion between different medicinal representatives known as carqueja that are popularly used for the same purposes¹⁴⁻¹⁶. However, no previous paper was devoted to investigate the morpho-anatomy of *B. milleflora*.

Thus, this study aimed to analyze macro and microscopic characters of *B. milleflora* contributing to its pharmacognostic study in order to provide further information to support the quality control of this medicinal plant.

MATERIAL AND METHODS

Baccharis milleflora (Less.) DC. was collected in Uvaranas, Ponta Grossa, state of Paraná, Brazil (coordinates 25° 5' 23"S and 50° 6' 23"W) in May 2013. The voucher was identified and registered as ICN 192141 in the Herbarium at the Instituto de Ciências Naturais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Cladode fragments obtained 5 cm from the apex were fixed in FAA 70¹⁷, which was replaced by 70 % ethanol¹⁸. Transversal and longitudinal freehand sections were stained with astra blue and basic fuchsin¹⁹. The histochemical analyzes were performed using solution of hydrochloric phloroglucin for investigating

lignin²⁰, Sudan III for lipophilic compounds²¹, ferric chloride for phenolic compound¹⁷ and Lugol for starch¹⁸. The powdered plant drug was also micro-/macroscopically examined. Photos were taken with the light microscope Olympus CX-31 RTSF in order to illustrate the results.

The ultrastructural analysis (scanning electron analysis-SEM) was performed in high vacuum. The samples were dehydrated in a graded ethanolic series and by CO₂ critical point apparatus (Balzers CPD-030) and coated with gold (Balzers Sputtering SCD-030). Electron micrographs were taken with the scanning microscope Jeol JSM-6360LV²².

RESULTS AND DISCUSSION

External morphological analysis

Carquejas showed the presence of cladodes as a morphological feature, i.e. winged stems (Budel *et al.*)². However there are carquejas that have leaves besides cladodes, e.g. *B. apicifolia* A.A. Schneid. & Boldrini, *B. flexuosiramosa* A.A. Schneid. & Boldrini²³, *B. opuntioides* Mart. ex Baker²⁴, *B. trimera* (Less.) DC.²⁵, *B. pseudovillosa* I.L. Teodoro & J.E. Vidal, *B. sagittalis* (Less.) DC. and *B. usterii* Heering, and *B. stenocephala* Baker (rudimentary form)²⁶.

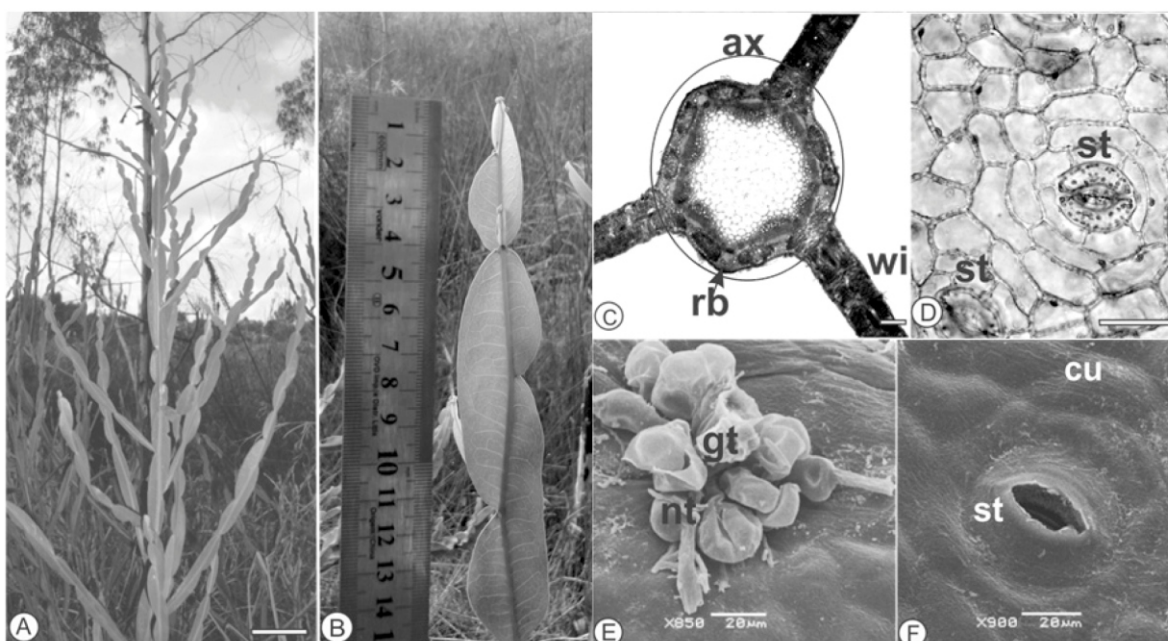


Figure 1. *Baccharis milleflora* DC., Asteraceae. **A.** General aspect; **B.** Vegetative branches; **C.** Cross section of the stem axis exhibiting central axis (ax), ribs (rb) and three wings (wi); **D.** Front view of epidermal cells exhibiting anticlinal walls and stomata (st); **E.** Front view of the cladodes wind epidermal exhibiting trichomes in clusters formed by glandular trichomes (gt) and non-glandular (nt) in SEM (scanning electron analysis); **F.** Front view of the cladodes wings epidermal exhibiting stomata (st) and slightly striate cuticle (cu). Bar = A (15 cm), C (100 μ m), D (50 μ m).

The identification of these species offers difficulty because they are very similar. In this regard, *B. trimera* is confused with *B. crispa* Spreng., *B. microcephala* Baker, *B. opuntioides*, *B. stenocephala* and *B. usterii*^{23,26-28}. In addition, *B. apicifolia* and *B. flexuosiramosa* are similar to *B. milleflora* and *B. organensis* Baker, respectively²³. Moreover, *Baccharis sphagnophila* A.A. Schneid. & G. Heiden is similar to *B. pseudovillosa* and *B. ramboi* G. Heiden & L. Macias.

In this study, *B. milleflora* (Fig. 1A) presents a ligneous central axis stem measuring 1 to 1.5 m in height and shows a three-winged stem (Fig. 1C). The wings are flat and have an interruption in length measuring from 0.3-0.5 cm wide (Fig. 1B). Leaves are not observed in this taxon.

Anatomical Analysis

Wing of cladodes

In the frontal view, the anticlinal wall of epidermal cells presents itself in a slim and polygonal shape (Fig. 1D), in which it is possible to verify the presence of primary pit fields. These features are found in several species of carqueja^{16,29-34}. Concerning this aspect, F. Bras. IV³⁵ has described a sinuous outline in the anticlinal wall of epidermal cells of *B. trimera*.

In cross section, the epidermis is uniseriate and is coated with a slightly thin cuticle (Fig. 1F). Similar data were described for *B. articulata* (Lam.) Pers.²⁹ and *B. myriocephala* DC.³⁶. However *B. gaudichaudiana* DC.³³ and *B. trimera*²⁹ presented striated cuticle. Nevertheless, thick and striate cuticle was observed in *B. sagittalis* (Less.) DC. and *B. triangularis* Hauman as reported by Petenatti *et al.*³.

Anomocytic and anisocytic stomata are common in carquejas^{14,16,29,32-34,37,38}. In the present study, *B. milleflora* exhibits anomocytic and actinocytic stomata (Fig. 1D) with five to seven subsidiary cells radially placed. These characteristics were described by Freire, Urtubey and Giuliano³⁹ for the following non-winged species: *B. boliviensis* (Wedd.) Cabrera, *B. conferta* Kunth, *B. linearis* (Ruiz & Pav.) Pers., *B. nitida* (Ruiz & Pav.) Pers., *B. odorata* Kunth, *B. pilularis* DC., *B. salicifolia* (Ruiz & Pav.) Pers., *B. sarothroides* A. Gray, *B. teindalensis* Kunth, *B. tola* Phil. and *B. tricuneata* (L. f.) Pers.

Biseriate capitate glandular trichomes seem to be characteristic of carquejas. These trichomes can be verified isolated, in clusters or with non-glandular trichomes and are often in epidermal depressions^{16,25,28-29,35,37,39}. In accor-

dance to this standard, biseriate capitate glandular trichomes formed by 8 cells were observed in *B. milleflora* (Figs. 1E, 2A, 2C). Other types of glandular trichomes were also related to carquejas, such as uniseriate capitate glandular trichomes in *B. sagittalis* and *B. triangularis*³⁷ and non-capitate glandular trichomes in *B. usterii*¹¹.

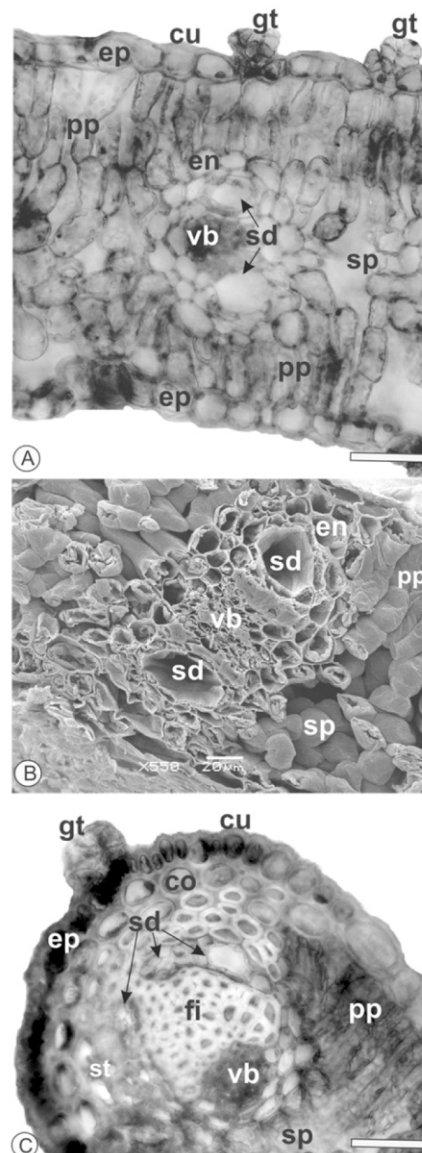


Figure 2. *Baccharis milleflora* DC., Asteraceae. Cross section - **A.** Wing of the cladodes, exhibiting endoderm (en), epidermis (ep), cuticle (cu), spongy parenchyma (sp), palisade parenchyma (pp), glandular trichomes (gt), vascular bundle (vb) and secretory ducts (sd); **B.** Detail of the previous figure by SEM; **C.** Wing border of the cladodes, exhibiting epidermis (ep), cuticle (cu), spongy parenchyma (sp), palisade parenchyma (pp), glandular trichomes (gt), fibers (fi), vascular bundle (vb) and secretory ducts (sd). Bar = A, C (50 μ m).

The essential oil present in the glandular trichomes and secretory ducts of Asteraceae species can have therapeutic applications⁴¹. In that sense, several members of *Baccharis* are used as relevant essential oil producers⁴²⁻⁴⁵. In this study, the glandular trichomes present in *B. milleflora* reacted positively to the presence of lipophilic compounds.

Non-glandular trichomes anatomically described as uniseriate, simple, and flagelliform have been widely reported in carquejas, as seen in *B. microcephala*⁴⁰, *B. articulata*, *B. gaudichaudiana*²⁵, *B. crispa* (syn. *B. cylindrica*)^{28,34}, *B. sagittalis* and *B. triangularis*³⁷.

These non-glandular trichomes are also observed in *B. milleflora* (Fig. 1E). They have about 3 cells at the base which are enlarged toward the apex. Similar description was reported for non-winged species as in *B. coridifolia*^{14,39}, *B. anomala* DC.¹⁵, *B. singularis* (Vell.) G.M. Barroso⁴⁶, *B. spicata* (Lam.) Baill.⁴⁷ and *B. cognata* DC.⁴⁸. Additionally, uniseriate simple flagelliform non-glandular trichomes with isodiametric cells at the base were described for the non-winged species *B. uncinella* DC.¹⁵.

Carquejas have expansion shoots that serve as leaves². Likewise the wings show the same internal structure of a leaf by presenting a photosynthetic parenchyma. In this study, *B. milleflora* has an isobilateral mesophyll comprising a parenchyma composed by 2-3 layers of palisade parenchyma on both sides and 3 layers of spongy parenchyma in the central region (Fig. 2A). This arrangement is in accordance to what is described for the wings of *B. articulata* (Lam.) Pers.^{30,36,49}, *B. gaudichaudiana* DC., *B. myriocephala*^{32,33}, *B. crispa* (syn. *B. cylindrica*)^{28,34}, *B. trimera*^{28,40} and *B. sagittalis*³⁷.

At the wing borders of *B. milleflora*, the cuticle that coats the epidermis presents itself striated. Underlying the epidermis, an angular collenchyma of 1-2 layers is observed. A collateral bundle with a perivascular fiber caps adjoining the phloem and secretory ducts (Fig. 2C). These elements were also reported at the wing borders of *B. microcephala*⁴⁰, *B. trimera*^{28,40} and *B. ussterii*¹⁶.

In *B. milleflora*, the collateral vascular bundles are surrounded by a sheath parenchyma and are distributed in the spongy parenchyma (Fig. 2B) and in the edge of the wing (Fig. 2C). These structures are present in the direction of both xylem and phloem and are accompanied by secretory ducts. The secretory ducts epithelium is uniseriate and consists of about 6-10 cells

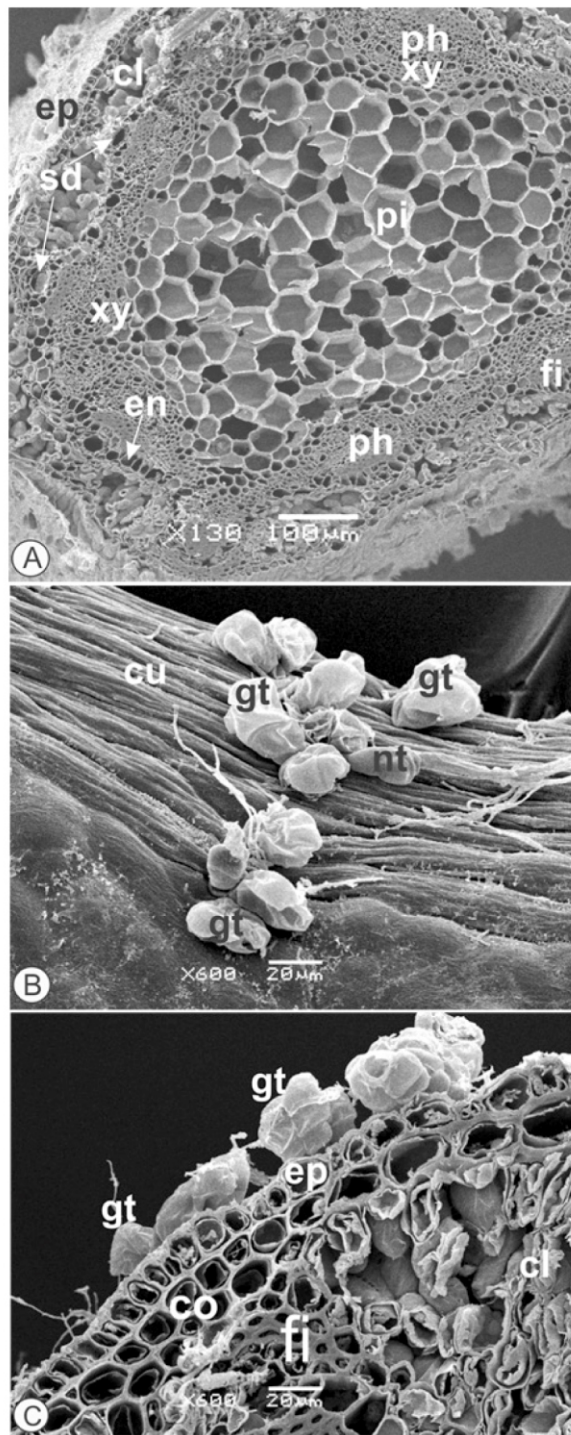


Figure 3. *Baccharis milleflora* DC., Asteraceae. Scanning electron analysis. **A.** Cross section of stem, exhibiting the epidermis (ep), endoderm (en), fibers (fi), phloem (ph), xylem (xy), pith (pi), collenchyma (co), chlorenchyma (cl) and secretory ducts (sd); **B.** Front view of the stem axis epidermis, showing striated cuticle (cu) and glandular trichomes (gt), non-glandular trichomes (nt) arranged in clusters; **C.** Cross section of the stem axis, showing the epidermis (ep) with glandular trichomes (gt), collenchyma (co) and fibers (fi).

with dense cytoplasm (Figs. 2A, 2B, and 2C). These ducts demonstrate positive reaction to Sudan III due to the lipophilic nature of their products.

These features have been reported for several carquejas^{16,25,29-30,32,36,40}. However, *B. crispa* showed secretory ducts only on the edges of the wings which do not accompany the vascular bundles²⁹.

Caulinar axis

The cladode of *B. milleflora* tends to have a circular shape and exhibits ribs between the wings (Fig. 1C). Ribs between the wings have also been observed in *B. crispa*²⁹ and *B. usterii*¹⁶. However these structures were not found in *B. microcephala*⁴⁰, *B. sagittalis*³⁷ and *B. trimera*^{25,29,40}.

In the present study, the epidermis presents itself in a single layer coated for thickened and striated cuticle (Figs. 3B, 3C) which was also described in *B. sagittalis* and *B. triangularis*³⁷. In carquejas, the stomata are located at or slightly above the epidermal cells^{16,29,32,34,40}. Diverting from the general finding, *B. milleflora* has stomata in the upper level of the other epidermal cells (Fig. 4A). The same trichomes that were mentioned for the wing of the cladodes are verified in the stem axis (Figs. 3B, 3C).

Underlying to the coating system of *B. milleflora*, alternating groups of cells of chlorenchyma (Fig. 4A) and angular collenchyma (Fig. 4B) are observed. The collenchyma located near to the vascular bundles has about 3 layers (Fig. 4B). Well-developed perivascular fiber caps are found with the phloem. Secretory ducts similar to those of the wings are verified near the endoderm which delimits internally the cortical region (Fig. 4B). The cell walls of secretory ducts are impregnated with lipophilic compounds.

These characteristics are in accordance with those reported from other carquejas, such as *B. myriocephala*³⁶, *B. articulata*, *B. crispa*^{29,34}, *B. trimera*^{29,40}, *B. sagittalis*, *B. triangularis*³⁷, *B. microcephala*⁴⁰ and *B. usterii*¹⁶.

The vascular system of carquejas consists of cylinders of centrifugally-formed phloem and centripetally-formed xylem. The vascular system establishes a medullar region that has relatively large cells which are thin-walled and not lignified^{16,29,32,34,40}. These same characteristics are observed in *B. milleflora* (Figs. 4A, 4B).

Nakata⁵⁰ reported that plant growth and low calcium concentration can influence the amount of crystals present in it. Jorge *et al.*⁵¹ reported that calcium oxalate crystals are absent in *Bac-*

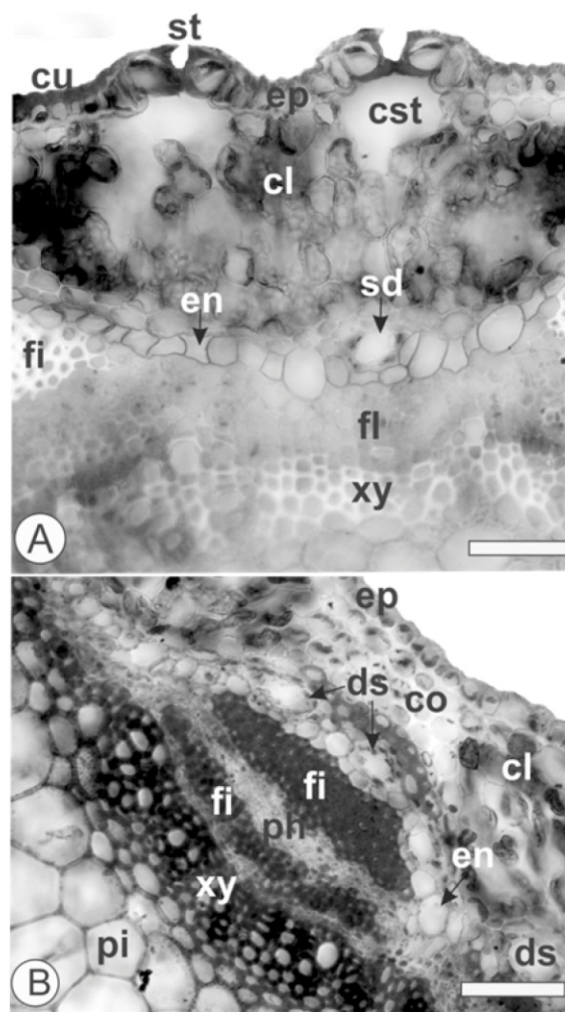


Figure 4. *Baccharis milleflora* DC., Asteraceae. Cross-section of the stem axis - **A.** Chlorenchyma (cl), epidermis (ep) and stomata located above the epidermal cells (st), cuticle (cu), substomatal cavity (cst), endoderm (en), secretory duct (sd), fibers (fi), phloem (ph) and, xylem (xy). **B.** Collenchyma (co), epidermis (ep), endoderm (en), secretory ducts (sd), fibers (fi), phloem (ph), xylem (xy) and, pith (pi). Bar = A, B (50 μ m).

charis. In the present work, *B. milleflora* displayed no crystals. On the other side, these elements were described in the winged species: *B. articulata*²⁹⁻³⁰, *B. crispa*^{29,34}, *B. myriocephala*³⁶, *B. microcephala*⁴⁰, *B. sagittalis*, *B. triangularis*³⁷ and *B. trimera*^{29,35,40}.

Fragmented drug

The plant drug material consists of dried and fragmented winged stems (Fig. 5). The powder meets all the requirements for this species. In brief, the typical characteristics are: fragments of epidermis with anomocytic and actinocytic stomata besides the presence of glandular and



Figure 5. *Baccharis milleflora* DC., Asteraceae. Fragmented drug. Bar = 1 cm.

non-glandular trichomes, portions of palisade, spongy and medullar parenchyma and portions of fibers accompanied by secretory ducts. Depending on the degree of fragmentation, portions of winged branches with and without capitula can occur.

CONCLUSION

In summary, *B. milleflora* presents a three-winged stem with ribs between the wings, actinocytic and anomocytic stomata located above the other epidermal cells in the axis, simple uniseriate flagelliform non-glandular trichomes with cells that extend from the base, biseriate glandular trichomes and secretory ducts. When taken together, these main features contribute to the identification of this medicinal plant and can supply additional knowledge for the *Trimera* group.

Acknowledgement. The authors thank the taxonomist Dr. Nelson Ivo Matzenbacher for species identification and the Electron Microscopy Center of Federal University of Paraná by electron micrographs.

REFERENCES

- Giuliano, D.A (2001) *Darwiniana* **39**: 131-54.
- Budel, J.M., M.R. Duarte, C.A.M. Santos, P.V. Farago & N.I. Matzenbacher (2005) *Braz. J. Pharmacogn.* **15**: 268-71.
- Monks, N.R.; A. Ferraz, S. Bordignon, K.R. Machado, M.F.S. Lima, A.B. Rocha & G. Schwartzmann (2002) *Pharm. Biol.* **40**: 494-500.
- Cifuentes, D.A., E.J. Borkowski, M.E. Sosa, J.C. Gianello, O.S. Giordano & C.E. Tonn (2002) *Phytochemistry* **61**: 899-905.
- Céspedes, C.L., A. Uchoa, J.R. Salazar, F. Perich & F. Pardo (2002) *J. Agric. Food Chem.* **50**: 2283-92.
- Sanchez, P.S., M.J. Abad & L.M. Bedoya (2002) *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 1147-50.
- Ferronato, R., E.D. Marchesan, E. Pezenti, F. Bednarski & S.B. Onofre (2007) *Rev. Bras. Farmacogn.* **17**: 224-30.
- Barroso, G.M (1976) *Rodriguésia* **28**: 1-273.
- Diesel, S. (1987) *Botânica* **38**: 91-126.
- Budel, J.M., N.I. Matzenbacher & M.R. Duarte (2008) "Genus *Baccharis* (Asteraceae): a review of chemical and pharmacological studies", in "Recent Progress in Medicinal Plants - Phytopharmacology and Therapeutic Values" (Houston: Studium Press LLC, ed.), pp. 1-18.
- Heiden, G., J.R.V. Iganci & L. Macias (2009) *Rodriguésia* **60**: 943-83.
- Schneider, A.A. (2009) "Estudo taxonômico de *Baccharis* L. sect. *Caulopterae* DC. (Asteraceae: Astereae) no Brasil", Instituto de Biociências, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 198.
- Agostini, F., A.C.A. Santos, M. Rossato, M.R. Pansera, F. Zattera, R. Wasum & L.A. Serafini (2005) *Rev. Bras. Farmacogn.* **15**: 215-20.
- Budel, J.M. & M.R. Duarte (2007) *Lat. Am. J. Pharm.* **26**: 723-31.
- Budel, J.M. & M.R. Duarte (2008) *Rev. Bras. Farmacogn.* **18**: 761-8
- Budel, J.M. & M.R. Duarte (2010) *Braz. Arch. Biol. Technol.* **53**: 123-31.
- Johansen, D.A (1940) *Plant microtechnique*. New York, McGraw-Hill Book, p. 523.
- Berlyn, G.P. & J.P. Miksche (1976) "Botanical microtechnique and cytochemistry", Ames: Iowa State University, pp. 121- 276.
- Roeser, K.R (1972) *Mikrokosmos* **61**: 33-6.
- Sass, J.E. (1951) *Botanical microtechnique*. 2. ed. Ames: Iowa State College, p. 97.
- Foster, A.S (1949) "Practical plant anatomy", ed. Princeton: D. Van Nostrand, pp. 218.
- Souza, W. (1998) "Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas". Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, p. 1-44.
- Schneider, A.A. & I.I. Boldrini (2008) *J. Bot. Res. Inst. Texas* **2**: 45-51.
- Schneider, A.A & I.I. Boldrini (2008) *Brazilian J. Biosciences*, **6**: 137-9.
- Rodriguez, M.V., M. L. Martínez, A.A. Cortadi, A. Bandoni, D.A. Giuliano, S.J. Gattuso *et al.* (2010) *Plant Syst. Evol.* **286**: 175-90.
- Barroso, G.M. & O.L. Bueno (2002) "Compostas, 5. Subtribo: *Baccharidinae* Flora *Ilustrada Catarinense*" in "Herbário Barbosa Rodrigues" (R. Reitz, ed.) Itajaí, pp. 765-1065.
- Alonso, J. & C. Desmarchelier (2006) "Plantas medicinales autóctonas de la Argentina – bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud". Buenos Aires: Fitociencia, pp. 663.

28. Rodriguez, M.V., S. Gattuso & M. Gattuso (2008) *Lat. Am. J. Pharm.* **27**: 387-97
29. Cortadi, A., O.D. Sapio, J.M.C. Cargo, A. Scandizzi, S. Gattuso & M. Gattuso (1999) *Pharm. Biol.* **37**: 357-65.
30. Ortins, G.M.M. & G. Akisue (2000) *Lecta* **18**: 9-32.
31. Alquini, Y. & N.K. Takemori (2000) "Organização estrutural de espécies vegetais de interesse farmacológico". Curitiba: Herbarium, p. 79.
32. Budel, J.M., M.R. Duarte, C.A.M. Santos & L.M. Cunha (2003b) *Rev. Bras. Farmacogn.* **13**: 42-3.
33. Budel, J.M., M.R. Duarte & C.A.M. Santos (2003a) *Acta Farm. Bonaerense* **22**: 313-20.
34. Budel, J.M., M.R. Duarte & C.A.M. Santos (2004a) *Braz. J. Pharm. Sci.* **40**: 93-9.
35. Farmacopéia Brasileira. 4 ed. (1988-2003) São Paulo: Atheneu p. 1320.
36. Sá, M.F.A. & L.J. Neves (1996) *Rev. Bras. Farm.* **77**: 88-96.
37. Petenatti, E.M., D.A. Cifuentes, J.C. Gianello, O.S. Giordano, C.E. Tonn & L.A. Del Vitto (2007) *Lat. Am. J. Pharm.* **26**: 201-8.
38. Budel, J.M., M.R. Duarte, I. Kosciuv, T.B. Moraes & L.P. Ferrari (2009) *Rev. Bras. Farmacogn.* **19**: 545-52.
39. Freire, S.E., E. Urtubey & D.A. Giuliano (2007) *Caldasia* **29**: 23-38.
40. Budel, J.M. & M.R. Duarte (2009) *Braz. J. Pharm. Sci.* **45**: 75-5.
41. Pagni, A.M & A. Masini (1999) *Isr. J. Plant. Sci.* **49**: 257-63.
42. Molares, S., S.B González, A. Ladio & M.A. Castro (2009) *Acta Bot. Bras.* **23**: 578-89.
43. Budel, J.M., M.R. Duarte, P.M. Döll-Boscardin, P.V. Farago, N.I. Matzenbacher, A. Sartoratto & B.H.L.N.S. Maia (2012) *J. Essent. Oil Res.* **24**: 19-24.
44. Vannini, A.B., T.G. Santos & A.C. Fleming, L.R.P. Purnhagen, L.A. Lourenço, L.A. Butzke et al. (2012) *J. Essent. Oil Res.* **24**: 547-54.
45. Florão, J., J.M. Budel, M.R. Duarte, A. Marcondes, R.A.F. Rodrigues, M.V.N. Rodrigues et al. (2012) *J. Essent. Oil Res.* **24**: 561-70.
46. Souza, C.A., P.V. Farago, M.R. Duarte & J.M. Budel (2011) *Acta Farm. Bonaerense* **30**: 311-7.
47. Oliveira, A.M.A., V.L.P. Santos, C.R.C. Franco, P.V. Farago, M.R. Duarte & J.M. Budel (2011) *Lat. Am. J. Pharm.* **30**: 1560-6.
48. Budel, J.M., P.V. Farago & M.R. Duarte (2013) *Lat. Am. J. Pharm.* **32**: 540-4.
49. Espinar, A.L. (1973) *Bol. Acad. Nac. Ci.* **50**: 175-305.
50. Nakata, P.A (2003) *Plant Sci.* **146**: 901-9.
51. Jorge, L.I.F., U. Pereira & A.M. Silva (1991) *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **51**: 47-51.

APÊNDICE 2 - ARTIGO 2



Latin American Journal of Pharmacy
(formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)
Lat. Am. J. Pharm. 35 (10): 2225-33 (2016)

Regular article
Received: July 1, 2016
Revised version: August 3, 2016
Accepted: August 5, 2016

Chemical Composition and Biological Activities of *Baccharis milleflora* Essential Oil

Camila B. PEREIRA^{1*}, Paulo V. FARAGO², Débora M. BORSATO²,
Daniela G. FOLQUITTO¹, Beatriz H. L. N. S. MAIA³, Luís A. ESMERINO⁴,
Rosilda A. KOVALICZN⁵, Marilis D. MIGUEL¹, & Obdulio G. MIGUEL¹

¹ Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraná,
632 Prefeito Lothário Meissner Avenida, 80210-170 Curitiba, PR, Brazil

² Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, ⁴ Department of Clinical and Toxicological Analysis,
and ⁵ Department of Biological and Health Sciences, State University of Ponta Grossa,
4748 Carlos Cavalcanti Avenida, 84030-900 Ponta Grossa, PR, Brazil

³ Department of Chemistry, Federal University of Paraná, Polytechnic Center,
P.O. Box 19081, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

SUMMARY. *Baccharis milleflora* essential oil was obtained by hydrodistillation in four seasons of the year and analyzed by GC/MS. The major constituents identified were trans-caryophyllene (7.65-13.41%), germacrene-D (6.83-11.18%), bicyclogermacrene (9.99-12.89%). The essential oils showed antioxidant activity by DPPH methods with IC₅₀ between 15.45 ± 0.52 and 21.06 ± 0.15 µg/mL, fosfomolibdenium with AAR 77.9 ± 0.90% - 79.81 ± 2.30%, TBARS with IA 12.60 ± 0.78% - 29.06 ± 1.47%, and ABTS with IC₅₀ between 3.85 ± 0.10 and 4.60 ± 0.07 µg/mL. Through the microdilution broth method it was observed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* for the four seasons. The repellency test showed an IR 80.65 ± 6.69% well above the IR 36.39 ± 21.00 found for the essential oil of *Cymbopogon nardus*, used as a standard. The fumigant activity showed a KT₅₀ (min) of 10.63 ± 2.68 and 22.70 ± 3.40 for the *B. milleflora* and *Melaleuca alternifolia* essential oil, respectively.

RESUMEN. El aceite esencial *Baccharis milleflora* se obtuvo por hidrodestilación en las cuatro estaciones del año y se analizó mediante GC/MS. Los principales constituyentes identificados fueron trans-cariofileno (7,65-13,41%), germacreno-D (6,83-11,18%) y bicyclogermacreno (9,99-12,89%). Los aceites esenciales mostraron actividad antioxidante mediante los siguientes métodos: DPPH con IC₅₀ entre 15,45 ± 0,52 a 21,06 ± 0,15 µg/mL, fosfomolibdenio con AAR 77,9 ± 0,90% a 79,81 ± 2,30%, TBARS con IA 12,60 ± 0,78% a 29,06 ± 1,47% y ABTS con IC₅₀ entre 3,85 ± 0,10 y 4,60 ± 0,07 µg/mL. A través del método de microdilución en caldo se observó actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* para las cuatro estaciones. El ensayo de repelencia mostró un IR de 80,65 ± 6,69%, muy por encima del IR 36,39 ± 21,00% encontrado para el aceite esencial de *Cymbopogon nardus*, usado como estándar. La actividad fumigante mostró una KT₅₀ (min) de 10,63 ± 2,68 y 22,70 ± 3,40 para los aceites esenciales de *B. milleflora* y de *Melaleuca alternifolia*, respectivamente.

INTRODUCTION

Baccharis milleflora belongs to the genus *Baccharis*, composed by more than 500 species distributed mainly in Brazil, Argentina, Colombia, Chile and Mexico¹. Found in the form of dense populations in sunny locations and shallow, wet soils or wetlands they are popularly known as the broom flagged². The morphological and anatomical analysis of *B. milleflora* revealed triangular stem, epidermal cells with anomocytic and actinocytic stomata, non glandular trichomes, glandular biseriate and essential oil secretory ducts³. Previous studies have revealed several major compounds in the essen-

tial oil of *B. milleflora* including the terpenoids gamma-gurjunene, alpha-selinene, β-pinene, and spathulene^{4,5}.

The pharmacological activities of *Baccharis* have been demonstrated through numerous studies, thus increasing the interest of the scientific community in species belonging to this genus. Avancini *et al.*⁶, while studying the *Baccharis trimera* essential oil, found antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* by serial dilution technique with multiple tube system. This activity was also found in the *Baccharis latifolia* essential oil by broth microdilution⁷ and *Baccharis trinervis*

KEY WORDS: antimicrobial, antioxidant, *Baccharis milleflora*, essential oil, insecticide.

* Author to whom correspondence should be addressed: E-mail: camilabugno@hotmail.com

through disk agar diffusion test ⁸. The discovery of substances which can serve as an alternative to the use of conventional antibiotics is extremely important, taking into consideration that many microorganisms are resistant to conventional antibiotics ⁹.

The terpenoids have been widely investigated due to their ability to inhibit the enzyme xanthine oxidase which generates reactive oxygen species ¹⁰. Many drugs are able to prevent these oxidation processes, however, have several undesirable side effects so it is extremely important to search for new alternatives with enhanced therapeutic effects and fewer side-effects. Studies with *Baccharis* often report antioxidant activities such as *B. coridifolia* by determining tiobarbituric acid reactive species ¹¹. *Baccharis trimera* reduced the release of reactive oxygen species through experimental models *in vitro* and *in vivo* using neutrophils of rats ¹². In the study conducted by Guimarães *et al.* ¹³, *B. dracunculifolia* exhibited potent antioxidant activity against the oxidative stress in mitochondria isolated from rat livers.

Other activities were also found in this genus as *Baccharis salicifolia* which showed repellent activity against a important agricultural pest that attacks cornfields, the *Tribolium castaneum* larvae ¹⁴ and against the mosquito carrier dengue *Aedes aegypti* larvae ¹⁵. *Baccharis darwinii* essential oil presented insecticide activity against a pest known as *Ceratitis capitata* or fly of the Mediterranean, capable of causing damage in large varieties of fruit ¹⁶. These studies demonstrate the growing search for natural insecticides that are more selective and less aggressive than chemical insecticides and offer less risk to human health and to the environment ¹⁷. Whereas the *Baccharis* genus has been widely researched and that there are no studies on the biological activity of the *B. milleflora* essential oil, the objective was seasonally evaluate the chemical composition and investigate the antioxidant, antimicrobial and insecticide activity.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material

Baccharis milleflora (Less.) DC. was collected in the region of Uvaranas, in the city of Ponta Grossa, state of Paraná, Brazil (coordinates 25° 5' 23"S and 50° 6' 23"W), in the four seasons during 2013. The species was identified by the vouchers 192141 and 388373 and stored at the Herbariums at the Institute of Natural Sciences,

Federal University of Rio Grande do Sul and Municipal Botanical Museum of Curitiba in Paraná, respectively.

Extraction of essential oil and GC-MS analysis

The leaves of *B. milleflora* were air dried and then distilled using a Clevenger type apparatus for 6 h. The essential oils were stored in glass vial with Teflon-sealed caps at 4 ± 0.5 °C in the absence of light until used. The identification of volatile constituents was performed using a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph, equipped with a Hewlett-Packard 5975 mass selective detector and capillary column HP-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). GC-MS was carried out using split/splitless injection, with injector set at 220 °C, column set at 60 °C, with heating ramp of 3 °C/min and final temperature at 240 °C, and the detector was set at 250 °C. Helium was used as carrier gas at 1 mL/min. The GC-MS electron ionization system was set at 70 eV. Quantitative analysis was carried out using a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector under the same conditions previously described. A sample of each essential oil was dissolved in ethyl acetate (20 mg/mL) for the analyses. Retention indices (RI) were determined by injection of hydrocarbons standards and essential oil samples in the same conditions. The oils components were identified by comparison with data from literature ¹⁸ and the profiles from the mass spectra libraries (Wiley 139, 275, and 7 and Nist 127). The GC-FID quantification was obtained using GC-FID chromatogram and was expressed as a mean from three samples of each extracted essential oil.

Antioxidant Activity

Free radical scavenging activity: DPPH test

The antioxidant activity of essential oils was determined by the reduction of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ¹⁹. Essential oils in methanol at different concentrations were tested (35.0, 30.0, 25.0, 20.0, 15.0, 10.0, 5.0, 1.0, and 0.5 mg/mL). Methanol was employed to obtain the serial dilutions of the positive controls: ascorbic acid and gallic acid at concentrations from 1000 to 0.387 mg/mL and also for obtaining the DPPH solution (0.1 mM). A total of 20 µL of the essential oil solutions *B. milleflora* well as the positive control and blank (methanol) and 100 µL of the DPPH solution

were transferred to 96 well microplates. The plates were homogenized for 1 min and the reading was performed in a microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) at 517 nm, immediately after mixing and at the end of a 30 min incubation in the dark at room temper-

ature. The antioxidant activity (AA) was determined as a percentage and calculated by the decay rate of the DPPH solution absorbance with oil or standards after 30 mins of reaction, with respect to the reference solution (DPPH in methanol) according to Eq. [1]:

$$\%AA = 100 - [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad [1]$$

Antioxidant activity of the essential oil was expressed as IC_{50} , defined as the concentration of the test material required to cause a 50% decrease initial DPPH concentration. All measurements were performed in triplicate.

Reducing phosphomolybdenum complex

The phosphomolybdenum complex reduction method was used to determine the total antioxidant capacity ²⁰. An aliquot of 300 μ L of essential oil in an ethanol solution at 200 μ g/mL was added to a test tube, along with 3 mL of the

reagent (4 mmol/L ammonium molybdate, 28 mmol/L sodium phosphate, and 0.6 mol/L sulfuric acid). The tube was sealed and transferred to a water bath at 95 °C for 90 min. The tube was cooled and the reading was performed using a spectrophotometer model UV/Vis Shimadzu-1601-695 nm at 695 nm against a blank (to 300 μ L of ethanol was added 3 mL of reagent) in triplicate. For calculation purposes, ascorbic acid was regarded as 100% antioxidant activity, according to Eq. [2]:

$$\%AA = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{ascorbic acid}} - A_{\text{blank}}) \times 100 \quad [2]$$

Method for the determination of thiobarbituric acid reactive species (TBARS)

The determination of thiobarbituric acid reactive species was performed using a medium rich in lipids, in this case, a gem homogenized egg solution ²¹. The procedure was performed in five replications. In five test tubes was added 0.5 mL of egg yolk solution (10% w/v) and 0.1 mL essential oil solution of 1000 ppm (w/v) dissolved in methanol, supplementing its volume to 1mL with distilled water. Then it was added to each tube ABAP 0.05 mL (0.07 mol/L) to induce lipid peroxidation. It was then added a solution of 1.5 mL of 20% acetic acid (pH 3.5), 1.5 mL TBA solution (0.8% w/v), and SDS solution (1.1% w/v). The test tubes were brought to a water bath at 95 °C under stirring for 1 h. After cooling, it was added 5 mL of 1-butanol to each tube and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. The absorbance of the upper organic layer was measured in a Spekol spectrophotometer at 532 nm. Finally, it was obtained the antioxidant index of the sample in percentage (IA %), according to Eq. [3]:

$$IA\% = (1 - A/C) \times 100 \quad [3]$$

where C is the absorbance of the fully oxidized control and A is the arithmetic mean of ab-

sorbance of the essential oil. The 3,5-di-terbutyl-4-hydroxytoluene (BHT) antioxidant to 1000 ppm (w/v) was used as a positive standard.

ABTS radical-scavenging activity

The radical cation $ABTS^{\bullet+}$ was mixed to aqueous solutions of ABTS (7 mmol/L) and potassium persulfate (2.45 mmol/L) in a volumetric ratio of 1:1 and incubated under light at room temperature for 12 h. Next, the solution $ABTS^{\bullet+}$ was diluted in ethanol to obtain an absorbance value at ± 0.7 to 734 nm. The complexation between $ABTS^{\bullet+}$ and the essential oil (0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8 mg/mL) was measured by decreasing absorbance at 734 nm after 30 min by a microplate reader (Molecular Devices, SpectraMax 190, Sunnyvale, USA). All readings were performed in triplicate. A rutin solution (0.078125, 0.15625, 0.3125, 0.5, and 0.625 mg/mL) was used as a standard ²². The antioxidant activity was calculated by Eq. [4].

$$\% \text{ Inhibition} = [(Ab - A_a) / A_b] \times 100 \quad [4]$$

where Ab is the absorbance of the positive control and A_a is the absorbance of the sample. The results were expressed as concentration of antioxidant needed to suppress 50% of the oxidizing agent (IC_{50}).

Antimicrobial activity

Broth microdilution method

All assays were performed in triplicate using strains from the American Type of Culture Collection (ATCC) *Escherichia coli* (ATCC 10530), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). A suspension of microorganisms (0.010 mL) was inoculated in the broth and the final concentration of test microorganisms was approximately 1×10^5 CFU/mL well. Essential oils of *B. milleflora* were solubilized in Tween 80 at a final concentration of 1% and diluted to 10 mg/mL in Mueller Hinton broth (MHB) test for *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* and Mueller-Hinton broth with 2% glucose for assays *C. albicans*. All the resulting solutions were filtered through 0.22 μ m membrane. The microdilution test was conducted in 96 well microplates according to the adapted M7-A6 protocol of the NCCLS²³. Essential oils (200 μ L) in serial dilutions from 10 to 0.078 mg/mL were added in each well and then it was added 10 μ L of each microbial inoculum. The microplates were capped and incubated at 35 °C for 24h. The negative control was performed with Perio GARD® (0.12% chlorhexidine) and the positive control received only the bacterial strain. To confirm the presence of viable microorganisms in non-inhibitory concentrations, 50 μ L of TCC dye (2, 3, 5 triphenyl tetrazolium chloride) was used at 1% and incubated for 30 min in an oven at 35 °C. The minimum bactericidal concentration (MBC) was obtained by seeding the contents of the wells of microdilution plates in Mueller-Hinton Agar aliquots of dilutions corresponding to the immediately preceding and two MIC. After sowing, the petri dishes were incubated at 37 °C for 24 h. The CBM was considered the lowest concentration that prevented visible growth of bacteria or allowed the formation of up to three colony forming units (CFU). The results of the antimicrobial testing were expressed as minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC).

Insecticide activity

Biological activity against *Pediculus humanus capitis*

This trial was approved by the Ethics Committee in Research involving human beings of the State University of Ponta Grossa, protocol n° 369.973 (05/08/2014).

Collection, storage and transportation of *Pediculus humanus capitis*

The collection of *Pediculus humanus capitis* specimens was performed by the manual scavenging method after signing the Informed Consent and Informed (IC) for voluntary individual. The lice collected were immediately transferred to a hard crystal plastic container with a capacity of 100 mL, accommodated together some hairs of the volunteers themselves, who served as support for the insects. For transport to the Human Parasitology laboratory, UEPG, the flask was buffered with cotton gauze, identified and packaged in a capped styrofoam box containing thermo-hygrometer dry bulb and wet bulb. The temperature of the sealed box was maintained between 25 and 30 °C and relative humidity (RH) between 70 and 75%. The transport took place in a period of 2 h. After verifying the mobility of *Pediculus humanus capitis* specimens, these insects at different developmental stages (adults and nymphs) were separated into groups of six and transferred with the aid of a entomological clamp to glass petri dishes 5cm in diameter.

Biossay for fumigant activity

This experiment was conducted in an enclosed camera system, using a Petri dish and its respective cap, which allowed the formation of vapors. A drop (60 μ L) of the essential oil in this study was deposited on the glass coverslip. Three groups of six lice were exposed to the test with the essential oil, and monitored every 5 min for 1 h. The results were expressed as mean knockdown time (KT₅₀) at min. The knock-down is the inability of the insects to move in a filter paper. The KT₅₀ is the average time in which 50% of the lice were immobilized. This test was performed in triplicate. Throughout the procedure, temperature values were kept at 28 ± 1 °C and $60 \pm 5\%$ RH. The negative control was set up the same way, but without the application of any substance over the glass cover slip. As a positive control the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Via Pharmaceuticals) was used²⁴.

Biossay for repellents

The repellency test was carried out on a filter paper which was divided into two circular zones: internal and external. The external zone was impregnated with 500 μ L of the essential oil of *B. milleflora* in acetone solution (50 mg/mL), whereas the inner zone was impregnated only with acetone. A preliminary test was performed in which both zones were treated only with ace-

tone, at which the insects mobility towards the outer zone was measured (negative control). Groups of six lice were placed in the inner zone and the repellency was expressed by the percentage of insects that avoided the outer zone (zone impregnated with essential oil under study). The experiment was monitored for 1 h and every 5 min the number of lice found in each zone was checked. As a positive control we used the essential oil of citronella (DEG). The tests were performed in triplicate. The repellency index (*RI*) was calculated as the percentage of insects repelled from the area treated with the essential oil, from Eq. [5], where *N_c* is the average number of lice found in the external zone of the assay performed only with acetone (negative control) and *N_t* is the number of lice found in the area b to the test or positive control.

$$RI = [(N_c - N_t)/N_c] \times 100 \quad [5]$$

Statistical analyses

Statistics were determined using GraphPad Prism software (GraphPad Software Incorporated). Multiple-group comparisons were made using a one-way analysis of variance followed by post hoc intergroup comparison by the Tukey test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

The relative yield weight of fresh material was 0.6, 0.5, 0.6, and 0.6 % (v/w) to *B. milleflora* essential oil in fall, winter, spring and summer, respectively. Agostini *et al.* ⁵, using the same method of extraction return a yield of 0.1% for *B. milleflora* essential oil. Other species of the genus *Baccharis*, as *B. articulata* and *B. oxydonta* presented, respectively, yield 0.5 and 0.3% ⁵.

In general, the major compounds identified in the *B. milleflora* essential oil in four seasons were trans-caryophyllene (7.65 to 13.41%), germacrene-D (6.83 to 11.18%), bicyclgermacrene (9.99 to 12.89%) and 9-10-dehydro isolongifolene (1.21 to 10.06%). In the study conducted by Besten *et al.* ²⁵, the essential oil from cladodes and inflorescences from male and female specimens of *B. milleflora* presented high variations in the chemical components, especially in viridiflorol contents that varied from 2.11 to 41.48 %, which was not found in this study. Besten *et al.* ²⁵ also found high variations in a unidentified

component labeled 212 (M^+) (0.62 to 11.87 %) ⁵. *Baccharis trimera* also presented as major compound (E)-caryophyllene with a content ranging from 12 to 21%, germacrene-D (6.3 to 28%) and bicyclgermacrene (12 to 23%) ²⁶. However, Agostini *et al.* ⁵ analyzed three essential oil samples from *B. milleflora* and verified the presence of distinct major compounds including spathulenol (25.3%) and β -pinene (34.2%). The author attributed the result of the oil analysis to the presence of chemotypes in *B. milleflora*, since the samples were collected in the same place and time. Zapata *et al.* ⁷ found limonene (9.4%) and thymol (24.04%) as major compounds in the essential oil of *B. latifolia* and *B. alata*. Sosa *et al.* ²⁷ analysed the *B. salicifolia* essential oil and found (Z)- β -ocimene (11.03%) and α -phellandrene (9.66%) as the majority. The major compounds found in the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC and *Baccharis uncinella* DC, showed levels between 18.76 to 27.45% for α -pinene and 12.96 to 14.02% for (E)-nerolidol ²⁸. However, Boix *et al.* ²⁹ when analyzing the oil *Baccharis dracunculifolia* found as majority verbenone (10.1%), myrcene (10.2%), 1,8-cineole (10.4%) and camphor (25.2%).

Many studies have reported the prevalence of monoterpene and sesquiterpene compounds in the chemical composition of *Baccharis* essential oils. In our study we found a prevalence of sesquiterpene compounds, this result is in agreement with findings in the study by Lago *et al.* ³⁰, with the essential oil of female and male specimens of *B. trimera*, with a predominance of 48.5 and 68.6%, respectively. But it was different from that observed in the analysis of essential oil of *B. unincella* where it was found the prevalence of monoterpene (55.9%) ⁵. According to Gobbo & Lopes ³¹ these variations may be attributed to several factors such as seasonal, environmental conditions, stress conditions and others.

The antioxidant activity (AA) was determined by assays with DPPH, fosfomolybdenium, TBARS, ABTS and are shown in Table 1. The DPPH is a stable chromophore radical and as the antioxidant reduces the DPPH electron pairing occurs and the absorptivity disappears ³². The values of antioxidant activity for the four seasons studied were similar to each other. Winter showed the best result with an IC_{50} of 15.45 mg/mL.

Other studies with the essential oil of species

Sample	DPPH IC ₅₀ * (µg/mL ± SEM)	Fosfomolybdenum AAR** (% ± SEM)	TBARS IA*** (% ± SEM)	ABTS IC ₅₀ * (µg/mL ± SEM)
Essential oil Fall	16.19 ± 0.19	79.81 ± 2.30	25.91 ± 2.33	4.60 ± 0.07
Essential oil Winter	15.45 ± 0.52	79.1 ± 0.57	29.06 ± 1.47	4.56 ± 0.09
Essential oil Spring	16.70 ± 0.46	78.12 ± 2.66	12.60 ± 0.78	3.85 ± 0.10
Essential oil Summer	21.06 ± 0.15	77.9 ± 0.90	14.49 ± 0.23	4.37 ± 0.05
BHT	-	-	26.42 ± 2.09	-
Ascorbic acid	6.36 ± 0.03	100 ± 0.00	-	-
Gallic acid	6.37 ± 0.05	48.60 ± 1.6	-	-
Rutin	7.95 ± 0.05	24.5 ± 1.22	-	0.34 ± 0.00

Table 1. Antioxidant activity of the *Baccharis milleflora* essential oil in four seasons.* IC₅₀: Inhibiting Concentration, **AAR: Antioxidant activity relative, ***IA: Antioxidant activity index in percentage ± standard error of the mean.

belonging to Asteraceae family also showed significant antioxidant activity by the DPPH method as seen with *Artemisia herba-alba* with IC₅₀ values for the isolated compounds β-thujone (8.55 µg/mL), α-thujone (17.96 µg/mL), thujones (8.24 µg/mL), 1,8-cineole (4.18 µg/mL) ³². In the study by Hedi *et al.* ³³, the values obtained for the standards rutin and ascorbic acid (7.73 and 6.93 µg/mL) were close to those found in our study (7.95 and 6.36 µg/mL). The *Scutia buxifolia* Reissek essential oil also belonging to the Asteraceae family presented IC50 value of 13.62 µg/mL by the method of DPPH ³⁴. Extracts obtained from different species as *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis trimera* had antioxidant activity by DPPH assay, with IC₅₀ values of 5 and 39 µg/mL, respectively ³⁵. Through of the test of coupled oxidation of β-carotene and linoleic acid the antioxidant potential of *Baccharis unincella* and *B. dracunculifolia* essential oil was confirmed with 65.66 and 52.18% of antioxidant activity ³⁶.

The phosphomolybdenum method measures total antioxidant capacity and is based on the reduction of molybdenum (VI) to molybdenum (V) in the presence of substances with antioxidant capacity ²⁰. For this test it was verified a significant antioxidant activity with better results in the fall (79.81%) and winter (79.1%). In this study we used ascorbic acid as standard giving it 100% antioxidant activity. The rutin and gallic acid standards presented an antioxidant activity of 24.5% and 48.60%, lower values than the activity observed with the essential oils from the four seasons. Paula *et al.* ³⁷ investigated the antioxidant activity of extracts and fractions of *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera

(Asteraceae) compared to standard rutin and found 88.99% and 76.12% of antioxidant activity for chloroform fraction and to the crude extract, showing statistically activity similar rutin with 100% AA.

The antioxidant activity can also be evaluated for the test compound ability to inhibit lipid peroxidation by quantifying the formed malondialdehyde which reacts with thiobarbituric acid and generates a derivative which can be measured spectrophotometrically. In this assay it was found that the essential oil from the winter at 1000 ppm showed antioxidant activity of 29.06% which is higher than that obtained with a standard antioxidant BHT (26.42%). The essential oil from the fall showed an index of antioxidant activity (25.91%) similar to BHT. The oils from the spring and summer had standard to lower values. Singh *et al.* ³⁸ analyzed the *Artemisia scoparia* essential oil (Asteraceae) at 200 µg/mL by the thiobarbituric acid reactive species method and found an antioxidant activity of 62.7%. The work done by Morais *et al.* ³⁹ with the *Croton zebntneri* and *Croton nepetaefolius* essential oil to 1000 ppm by the modified thiobarbituric acid reactive species method found an antioxidant activity index of 52.33 and 25.92%. The standard used in this study was also the BHT with antioxidant activity index of 27.93% similar to that found by us.

Among the methods most commonly used to evaluate the antioxidant activity is the ABTS radical known for the excellent reproducibility under stated conditions and used both to evaluate the antioxidant activity of lipophilic compounds as hydrophilic ⁴⁰. The ABTS radical scavenging activity of the essential oil was also investigated

Microorganism	*CIM (mg/mL)				*CBM (mg/mL)			
	Fall	Winter	Spring	Summer	Fall	Winter	Spring	Summer
<i>E. coli</i> ATCC 10530	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	5.0	2,5	2,5	5.0	10.0	5.0	5.0	10.0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0	> 10.0
Chlorhexidine	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

Table 2. Antimicrobial activity of essential oils of *Baccharis milleflora* in four seasons. *CIM (mg/mL): minimum inhibitory concentration. *CBM (mg/mL): minimum bactericidal concentration.

and are shown in Table 1. The essential oil also reduced the ABTS radical formation with values de IC₅₀ of 3.85 ± 0.10 to 4.60 ± 0,07 for spring and fall, respectively.

In general it was observed with the assays employed that the *B. milleflora* essential oil has antioxidant activity in the four seasons. Essential oils are complex mixtures and antioxidant activity eventually found could be due to the presence of antioxidants or the synergistic effect between these compounds. The beneficial effect of antioxidant compounds is related to their ability to prevent oxidative damage and thereby the progression of various diseases. The results presented here can contribute to the knowledge of the *B. milleflora* essential oil antioxidant potential and provide information for future studies.

The values of minimum inhibitory concentration of the *B. milleflora* essential oil front of the strains used in the study are presented in Table 2.

The essential oil showed strong antimicrobial activity against *S. aureus* with MIC of 2.5 mg/mL and CBM of 5 mg/mL in winter and spring. In the fall and summer it was also observed antimicrobial activity against *S. aureus* with MIC of 5.0 mg/mL and CBM of 10.0 mg/mL. However, there was no antimicrobial activity with other microorganisms used in the study. According Gören *et al.*⁴¹ and Claeson *et al.*⁴² the antibacterial activity against *S. aureus* can be attributed to the presence of hydrocarbon sesquiterpenes, since *S. aureus* is more sensitive to essential oil than *E. coli* and *C. albicans*. Parreira *et al.*⁴³ analyzed the antimicrobial activity of *B. dracunculifolia* essential oil and also found no activity on yeast belonging to the candida genus. Zapata *et al.*⁷ studied the antimicrobial activity of *Baccharis latifolia* essential oil against *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* by broth microdilution

Essential oil of	Repellency IR (%) ± SD	Fumigant activity oil of KT50 ± SD (min)
<i>Baccharis milleflora</i>	80.65* ± 6.69	10.63 ± 2.68
<i>Cymbopogon nardus</i>	36.39 ± 21.00	-
<i>Melaleuca alternifolia</i>	-	22.10 ± 3.40

Table 3. Fumigant and repellent activities of the pool of essential oils from *Baccharis milleflora* and controls.* teste *t*: resultados estatisticamente diferentes (*p* < 0.0001).

and found moderate activity against *A. fumigatus* with MIC 157,4 µg/mL but found no activity with the other strains tested. Through the agar disk diffusion test it was proven antimicrobial activity of *Baccharis trinervis* against *Candida albicans* with CIM of 2.8 µg/mL⁸. Ferronato *et al.*³⁶ found antimicrobial activity in the *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* essential oil by paper diffusion disc. These essential oil showed halos of inhibition against *Escherichia coli* (7.32 to 13.05 mm), *Staphylococcus aureus* (14.63 to 14.68 mm) and *Pseudomonas aeruginosa* (7.32 to 8.32 mm).

The results of fumigant and repellent activity are presented in Table 3. *B. milleflora* essential oil presented relevant repellent activity front to *Pediculus humanus* capitis, with RI 80.65 ± 6.69%. This value was two times higher than the IR 36.39 ± 21.00 % obtained with citronella essential oil used as positive control. Toloza *et al.*²⁴, when analyzing the fumigant and repellent properties of essential oil of species belonging to different families against *Pediculus humanus* capitis, found an RI of 75.50 ± 11.60% for the *Mentha pulegium* L. essential oil and an IR of 72.26 ± 11.16% for piperonal used as positive control. Sosa *et al.*²⁷ demonstrated repellent ac-

tivity after intake *Baccharis salicifolia* essential oil for insect popularly known as aphid of the peach (*Myzus persicae*). As demonstrated in Table 3, the essential oil of *B. milleflora* showed high fumigant activity against head lice with KT 50 values less than *Melaleuca alternifolia* essential oil used as standard.

Several products are used for control of *Pediculus humanus capitis*, however, many are obtained from synthetic insecticides causing toxic effects primarily in children. Additionally they can induce resistance and it becomes necessary to increase the dosage to achieve the desired effect⁴⁴. Through this study it was observed for the first time fumigant and repellent activity of the *B. milleflora* essential oil suggesting the development of formulations containing the *B. milleflora* essential oil in topical products for treatment of pediculosis.

CONCLUSION

This is the first study reporting biological activities of the *Baccharis milleflora* essential oil. The major constituents identified in the four seasons of the year were the same: trans-caryophyllene (7.65-13.41%), germacrene-D (6.83-11.18%), bicyclogermacrene (9.99-12.89%), with small variations in the contents. The essential oils obtained from the different seasons showed antioxidant activity by the four methods utilized. The antimicrobial activity was observed only against *S. aureus*. The essential oil showed strong insecticidal activity becoming a safe, efficient and accessible alternative to the population for the treatment of *Pediculus humanus capitis*.

Acknowledgements. The authors thank to CAPES/Brazil (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and Fundação Araucária/Brazil for financial support.

REFERENCES

- Verdi, L.G., I.M.C. Brighente & M.G. Pizzolatt (2005) *Quím. Nova* **28**: 85-94.
- Heiden, G., J.R.V. Iganci & L. Macias (2009) *Rodriguésia* **60**: 943-83.
- Pereira, C.B., P.V. Farago, J.M. Budel, J.P. Paula, D.G. Folquitto, O.G. Miguel *et al.* (2014) *Lat. Am. J. Pharm.* **33**: 841-7.
- Simões-Pires, C., S. Debenedetti, E. Spagazzini, L.A. Mentz, N.I. Matzenbacher, R.P. Limberger, *et al.* (2005) *Pl. Syst. Evol.* **253**: 23-32.
- Agostini, F., A.C.A. Santos, M. Rossato, M.R. Pansera, F. Zattera, R. Wasum, *et al.* (2005) *Rev. Bras. Farmacogn.* **15**: 215-20.
- Avancini, C.A.M., J.M. Wiest & E. Mundstock (2000) *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **52**: 230-4.
- Zapata, B., C. Duran, E. Stashenko, L. Betancur-Galvis & A.C. Mesa-Arango (2010) *Rev Iberoam. Micol.* **27**: 101-3.
- Albuquerque, M.R.J.R., E.B. Souza, M.U. Lins, N.A.P. Nogueira, T.L.G. Lemos, E.R. Silveira, *et al.* (2004) *Pers. Arkovic.* **6**: 59-65.
- Acosta, M., M. González, M. Araque, E. Velasco, N. Khourl, L. Rojas, *et al.* (2003) *Rev Facultad Farmacia.* **45**: 19-24.
- Maitraie, D., C.F. Hung, H.Y. Tu, Y.T. Liou, B.L. Wei, S.C. Yang, *et al.* (2009) *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 2785-92.
- Mongelli, E.C., J. Desmarchelier, R. Talou, J. Coussio & G. Ciccía (1997) *J. Ethnopharmacol.* **58**: 157-63.
- Padua, B.C., L.D. Silva, J.V.R. Júnior, J.L. Humberto, M.M. Chaves, M.E. Silva, *et al.* (2010) *J. Ethnopharmacol.* **129**: 381-6.
- Guimarães, N.S.S, J.C. Mello, J.S. Paiva, P.C.P. Bueno, A.A. Berretta, R.J. Torquato, *et al.* (2012) *Food Chem. Toxicol.* **50**: 1091-7.
- García, M., O.J. Donadel, C.E. Ardanaz, C.E. Tonn & M.E. Sosa (2005) *Pest Manag Sci.* **61**: 612-8.
- Gleiser, R.M., M.A. Bonino & J.A. Zygodlo (2011) *Parasitol. Res.* **108**: 69-78.
- Kurdelas, R.R., S. López, B. Lima, G.E. Feresin, J. Zygodlo, S. Zacchino *et al.* (2012) *Ind. Crops Produc.* **40**: 261-7.
- Menezes, E.L.A. (2005) *Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola*. Seropédica, Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, pp. 58.
- Adams, R.P. (2007) *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Fourth Edition, Allured, Carol Stream, USA.
- Yamaguchi, T., H. Takamura, T. Matoba & J. Terao (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1201-4.
- Prieto, P., M. Pineda & M. Aguilar (1999) *Anal Biochem.* **269**: 337-41.
- Kishida, E., A. Kamura, S. Tokumaru, M. Oribe, H. Igushi & S. Kojo (1993) *J. Agric. Food Chem.* **41**: 2707.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Prolegente, A. Pannala, M. Yang & C. Rice-evans (1999) *Free Radical Bio. Med.* **26**: 1231-7.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004) NCCLS/CLSI - *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, document M7-A6*.

24. Toloza, A.C., J. Zygadlo, G.M. Cueto, F. Biurrun, E. Zerba & M.I. Picollo (2006) *J. Med. Entomol.* **43**: 889-95.
25. Besten, A.M., D.S. Nunes, D. Granato, S.L. Sens, A. Wisniewski, E.L. Simionatto, *et al.* (2014) *J. Essent. Oil-Bear. Plants* **17**: 899-905.
26. Silva, F.G., C.B.A. Oliveira, J.E.B.P. Pinto, V.E. Nascimento, S.C. Santos, C. Seraphin, *et al.* (2007) *J. Braz. Chem. Soc.* **18**: 990-7.
27. Sosa, M.E., H.G. Lancelle, C. Tonn, M.F. Andres & A. Gonzalez-Coloma (2012) *Biochem. Syst. Ecol.* **43**: 132-8.
28. Fabiane, K.C., R. Ferronato, A.C. Santos & S.B. Onofre (2008) *Rev. Bras. Farmacogn.* **18**: 197-203.
29. Boix, Y.F., C.P. Victório, C.L.S. Lage & R.M. Kuster (2010) *Quím. Nova* **33**: 255-7.
30. Lago, J.H.G., P. Romoff, O.A. Fávero, M.G. Soares, P.T. Baraldi, A.G. Corrêa, *et al.* (2008) *Quím. Nova.* **31**: 727-30.
31. Gobbo, N.L. & N.P. Lopes (2007) *Quím. Nova.* **30**: 374-81.
32. Brand W., M.E. Cuvelier & C. Berset (1995) *Food. Sci. Technol.* **28**: 25-30.
33. Hedi, M., H. Hafedh, A. Ahmed, N. Hanen & N. Mohamed (2010) *Compt. Rend. Chim.* **13**: 380-6.
34. Boligon, A.A., T.G. Schwanz, T.F. Brum, J.K. Frohlich, L. Nunes, D.N. Mario, *et al.* (2012) *Pharmaceut. Anal. Acta.* **3**: 10.
35. Fabri, R.L., M.S. Nogueira, L.B. Dutra, M.L.M. Bouzada & E. Scio (2011) *Rev. Bras. Pl. Med.* **13**: 183-9.
36. Ferronato, R., E.D. Marchesan, E. Pezenti, F. Bednarski & S.B. Onofre (2007) *Rev. Bras. Farmacogn.* **17**: 224-30.
37. Paula, C.S., V.C.D. Canteli, M.C.S. Verdam, M. Kalegari, R. Campos, B.C.K. Hirota, *et al.* (2014) *Rev. Bras. Pl. Med.* **16**: 189-95.
38. Singh, H.P., S. Mittal, S. Kaur, D.R. Batish & R.K. Kohli (2009) *Food Chem.* **114**: 642-5.
39. Morais, S.M., F.E.A.C. Júnior, A.R.A. Silva & J.S.M. Neto (2006) *Quim. Nova.* **29**: 907-10.
40. Kuskoski, E.M., A.G. Asuero, A.M. Troncoso, J. Mancini-filho & R. Fett (2005) *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **25**: 726-32.
41. Gören, N., J. Jakupovic & S. Topal (1990) *Phytochemistry* **29**: 1467-9.
42. Claeson, P., P. Radström, O. Sköld, A. Nilsson & S. Höglund (1992) *Phytother. Res.* **6**: 94-8.
43. Parreira, N.A., L.G. Magalhães, D.R. Morais, S.C. Caixeta, J.P.B. Sousa, J.K. Bastos, *et al.* (2010) *Chem. Biodivers.* **7**: 993-1001.
44. Cestari I.M., S.J. Sarti, C.M. Waib & J.A. Branco (2004) *Neotrop. Entomol.* **33**: 805-7.

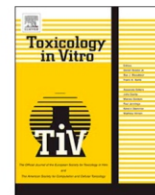
APÊNDICE 3 - ARTIGO 3

Toxicology in Vitro 42 (2017) 214–221



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxinvitCytotoxic mechanism of *Baccharis milleflora* (Less.) DC. essential oil

Camila Bugnotto Pereira^a, Carla Cristine Kanunfre^b, Paulo Vitor Farago^{c,*}, Débora Maria Borsato^c, Jane Manfron Budel^c, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia^d, Eliane Aparecida Campesatto^e, Adilson Sartoratto^f, Marilis Dallarmi Miguel^a, Obdulio Gomes Miguel^a

^a Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraná, 632 Prefeito Lothário Meissner Avenue, Zip Code 80210-170 Curitiba, PR, Brazil

^b Postgraduate Program in Biomedical Sciences, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Avenue, Zip Code 84030-900 Ponta Grossa, PR, Brazil

^c Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Ponta Grossa, 4748 Carlos Cavalcanti Avenue, Zip Code 84030-900 Ponta Grossa, PR, Brazil

^d Postgraduate Program in Chemistry, Federal University of Paraná, Polytechnic Center, P.O. Box 19081, Zip Code 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^e Laboratory of Pharmacology and Immunity, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Alagoas, Lourival Melo Mota Avenue, Zip Code 57072-900 Maceió, AL, Brazil

^f Organic Chemistry and Pharmaceutical Division, Research Center for Chemistry, Biology and Agriculture, University of Campinas, P.O. Box 6171, Zip Code 13083-970 Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Baccharis milleflora
GC-MS
Antitumoral agent
Cytotoxic activity

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the cytotoxic activity of the essential oil from cladodes of *Baccharis milleflora* in relation to Jurkat, Raji and HL-60 cells, as well as exploring the cell mechanisms in order to elucidate how the cytotoxic process occurs. The presence of the following volatile compounds was detected by GC-MS: bicyclogermacrene (12.16%), germacrene D (11.18%), (*E*)-caryophyllene (9.28%), and α -humulene (8.05%). In general, IC₅₀ values lower than 50 μ g/mL were obtained for all the tumor cells at 24, 48 and 72 h by MTT assay. The decrease in cell DNA content was demonstrated due to the inhibition of the proliferation of Jurkat, Raji and HL-60 cells by *B. milleflora* essential oil. In particular, Raji cells presented the greatest inhibition of cell proliferation and they were subsequently used to investigate cell death mechanisms. *B. milleflora* essential oil promoted G₀/G₁ arrest and also induced cell fragmentation, which was represented by an increase in the sub-G₀ population, indicating cell death induced by apoptosis. The selectivity index was 3.97. Necrotic cell death, coupled with low levels of apoptotic cell death, was observed by conventional EB/AO and Hoechst 33342 staining assays, demonstrating that this essential oil acts via both necrotic and apoptotic mechanisms.

1. Introduction

Baccharis L. (Asteraceae) comprises about 500 species, which are widely distributed from the United States to Argentina (Giuliano, 2001). *Baccharis milleflora* (Less.) DC. is a perennial shrub that is found in southeast and southern Brazil, where it is popularly known as “carqueja” and “carqueja-do-lajeado” (Heiden et al., 2009). It presents a ligneous central axis stem measuring 1 to 1.5 m in height and has a three-winged stem. The wings are flat and have an interruption in length measuring from 0.3–0.5 cm wide. In the morphological study, the wing of cladodes of *B. milleflora* showed actinocytic and anomocytic stomata located above the other epidermal cells, simple uniseriate flagelliform non-glandular trichomes, biseriate glandular trichomes and secretory ducts containing essential oil (Pereira et al., 2014). The cladodes are typically used in folk medicine for diuretic and anti-

inflammatory purposes and also for treating gastrointestinal disorders (Heiden et al., 2009). Two previous studies of the essential oil of *B. milleflora* found differences in the major components, including β -pinene and spathulenol (Agostini et al., 2005) and γ -gurjunene, α -selinene and β -caryophyllene (Simões-Pires et al., 2005) as the main volatile compounds.

The literature contains some studies that have investigated the cytotoxic properties of *Baccharis* for several isolated components. Squalene of *Baccharis* spp. showed antitumoral activity (Lavie and Glotter, 1971). Baccharin, a trichothecene from *B. megapotamica*, was effective against leukemic cells implanted in rats. Macrocyclic trichothecenes of *B. coridifolia* demonstrated activity regarding KB cells of human nasopharyngeal carcinoma (Kupchan et al., 1976, 1977). Gaudichaudols, gaudichaudone, articulin acetate, apigenin, hispidulin, spathulenol, and ursolic acid from *B. gaudichaudiana* presented cyto-

* Corresponding author.

E-mail address: pvfarago@uepg.br (P.V. Farago).

toxic activity on cells of lymphocytic leukemia P-388, as well as in other human cell lines (Fullas et al., 1994). Banskota et al. (1998) showed that pure compounds isolated from different species of *Baccharis* exerted strong cytotoxic activity on HT-1080 cells of human fibrosarcoma and 26-L5 cells of colon carcinoma of mice.

Monoterpene phenols and sesquiterpene alcohols isolated from the leaves of *B. dracunculifolia* potently inhibited the growth of leukemia cells (L 1210) (Fukuda et al., 2006). Ursolic acid isolated from *B. dracunculifolia* was cytotoxic for the human cancer cell lines UACC-62 (melanoma), MCF-7 (breast) and TK-10 (renal) (Johann et al., 2012). Oliveira et al. (2014) demonstrated the antiproliferative activity of the major compounds artemillin C and baccharin from *B. dracunculifolia* in different tumor cell lines. These studies increased interest in exploring the cytotoxic effects in relation to tumor cells from other species of *Baccharis*, with the purpose of improving therapeutic opportunities regarding cancer. However, to the best of our knowledge, no previous paper has investigated the cytotoxicity of *B. milleflora*.

There are very few existing studies regarding the cytotoxic potential of *Baccharis* essential oils. There has been a recent increase in interest regarding the use of *Baccharis* essential oil due to its high yield, its practical extraction by hydrodistillation, the rapid identification of volatiles by GC/MS, and its remarkable pharmacological potential. Búfalo et al. (2010) compared the cytotoxic action of *B. dracunculifolia*, propolis and two isolated compounds (caffeic and cinnamic acids) on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells in vitro. Lower concentrations of *B. dracunculifolia* (extract and essential oil), propolis, as well as caffeic and cinnamic acids, showed no cytotoxic activity regarding HEp-2 cells. On the other hand, higher concentrations (50 and 100 µg per 100 µL) provided a suitable cytotoxic effect.

In an effort to expand knowledge about *B. milleflora* and its potential use, our research group performed an initial morpho-anatomical study using its cladodes, in which the presence of essential oil in glandular trichomes and secretory ducts was observed (Pereira et al., 2014). Therefore, taking into account a previous study that demonstrated the cytotoxic effect of a *Baccharis* essential oil (Búfalo et al., 2010) and another study that detected the presence of essential oil in cladodes of *B. milleflora* (Pereira et al., 2014), this study investigated the cytotoxic activity of essential oil from cladodes of *B. milleflora* in relation to Jurkat, Raji and HL-60 cells. Furthermore, a comprehensive investigation was performed by exploring several cell mechanisms in order to elucidate how the cytotoxic process can occur.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Baccharis milleflora (Less.) DC. was collected in the city of Ponta Grossa, Paraná, Brazil (coordinates 25° 5' 23"S and 50° 6' 23"W) in 2013. The species was identified by the voucher Nos. 192141 and 388373 and stored at the Herbaria of the Institute of Natural Sciences (Federal University of Rio Grande do Sul) and Municipal Botanical Museum of Curitiba, respectively.

2.2. Extraction of essential oil and GC–MS analysis

The cladodes of *B. milleflora* were air-dried and then distilled using a Clevenger type apparatus for 6 h. The essential oil was stored in glass vials with Teflon-sealed caps at 4 ± 0.5 °C in the absence of light until used. The identification of the volatile constituents was performed using a Hewlett-Packard 6890 gas chromatograph, equipped with a Hewlett-Packard 5975 mass selective detector and HP-5 capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). GC–MS was carried out using split/splitless injection, with the injector set at 220 °C, the column set at 60 °C, with heating ramp of 3 °C/min (final temperature: 240 °C), and the detector set at 250 °C. Helium was used as the carrier gas at 1 mL/min. The GC–MS electron ionization system was set at 70 eV.

Quantitative analysis was carried out using a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector under the same conditions as previously described. A sample of each essential oil was dissolved in ethyl acetate (20 mg/mL) for the analysis. The retention indices (RI) were determined by the injection of hydrocarbon standards and essential oil samples in the same conditions. The components of the oils were identified by comparison with data from the literature (Adams, 2007) and the profiles from the mass spectra libraries (NIST-11). The GC-FID quantification was performed using a GC-FID chromatograph and was expressed as the mean from three samples of extracted essential oil.

2.3. Samples for cell culture tests

The previously obtained essential oil from cladodes of *B. milleflora* was used for the cell culture protocols. A stock solution (300 mg/mL) was prepared with propylene glycol and ethyl alcohol (1:4) as solubilizing procedure (Virador et al., 1999). Prior to the cell experiments, this sample was diluted to final concentrations of 3, 10, 15, 30, 60, 100, 200, and 300 µg/mL (Sylvestre et al., 2006; Cardile et al., 2009) using culture medium.

2.4. Cells and cell cultures

Jurkat (T leukemia cells), HL-60 (promyelocytic leukemia cells) and Raji (lymphoblastoid cells derived from a Burkitt lymphoma) cells were obtained from the Cell Bank of Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil), American Type Culture Collection, and the Cell Bank of Dunn School of Pathology (Oxford, UK), respectively. All the cultures were maintained in RPMI-1640 medium. This medium was supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) containing 10,000 units penicillin, and 10 mg streptomycin per mL. 2 mg/mL sodium bicarbonate and 2 mM glutamine. The cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. These cells were subcultured every 3–4 days. The viability of the cells exceeded 95%, as determined by the trypan blue (0.5% trypan blue solution) dye exclusion method.

2.5. In vitro cytotoxicity tests

2.5.1. MTT assay

The cytotoxicity was assessed using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay for investigating changes in mitochondrial/non-mitochondrial dehydrogenase activity (Mosmann, 1983). In brief, cell lines (Jurkat, HL-60 or Raji, 1×10^5 cells/mL) were seeded on 24-well plates and cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. The essential oil, in different concentrations (3, 10, 30, 100, and 300 µg/mL), was then added. Exposure periods of 24, 48 and 72 h were chosen to determine the in vitro cytotoxicity. After incubation, the supernatant was removed and 0.5 mg/mL of MTT solution was added to each well 30 min prior to the end of the experiment. Water-insoluble dark blue formazan crystals formed in viable cells were solubilized in DMSO and the absorbance was measured at 550 nm using a Biotek µQuant microplate reader. Cell survival was determined by comparing the absorbance values obtained for the treated and untreated cells. The cytotoxicity was expressed as the concentration of sample that inhibited 50% of cell growth (IC₅₀) and was calculated by Finney's probit analysis method.

2.5.2. Analysis of cell DNA content

2.5.2.1. Diphenylamine solution (DPA). The effect of the essential oil on cell proliferation activity was determined by measuring the DNA content. Jurkat, HL-60 and Raji cells were seeded (1.5×10^5 cells/mL) on 24-well plates (Sellitti et al., 2001). After 24 h, different concentrations of essential oil (3, 10, 30 and 100 µg/mL) were added, and the plates were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂

incubator for 48 h. After 48 h of culture, the cell suspension was placed in 2 mL tubes and centrifuged at 550g for 10 min at room temperature. The supernatant was removed and 0.5 mL of DPA was added to the precipitate. This was incubated for 24 h and the absorbance was recorded at 575 nm. The DPA solution consisted of deionized water (8 mL), 1% acetaldehyde (0.1 mL) and 20 mL of stock solution (1 g diphenylamine, 90 mL glacial acetic acid and 2 mL sulfuric acid). The cytotoxicity was expressed as percentage of DNA content.

2.5.2.2. Propidium iodide (PI). The content analysis of DNA was performed using a modified propidium iodide (PI) assay (Dengler et al., 1995). Jurkat, HL-60 and Raji cells were seeded (1×10^5 cells/mL) on 24-well plates. After 24 h, different concentrations of essential oil (3, 10, 30 and 100 $\mu\text{g/mL}$) were added. After 72 h, aliquots of 50 μL , corresponding to a cell concentration of 4×10^4 cells/mL, were transferred to a black 96-well plate. Then, 150 μL of a solution containing 100 $\mu\text{g/mL}$ PI, 0.2% (v/v) Triton X-100 and 0.2% (v/v) sodium citrate was added. After an incubation period of 24 h at room temperature, the fluorescence (FU) was measured using a CytofluorH 4000 microplate reader (excitation at 525 nm and emission at 617 nm) to quantify the amount of attached viable cells.

2.5.3. Cell cycle assay

The protocol was based on Crissman and Steinkamp (1973) and Krishan (1975). Suspensions of Raji cells (5×10^5 cells/mL) were seeded on 24-well plates and cultured in RPMI 1640 containing 10% FBS at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. The cells were treated with 15, 30 and 60 $\mu\text{g/mL}$ of *B. milleflora* essential oil for 24 h. The cell suspensions were centrifuged at 300g for 7 min. The pellets were washed with PBS buffer (1 mL), centrifuged, resuspended in PBS buffer (150 μL) and homogenized. The cells were then fixed in 70% ethanol in PBS (final volume of 1350 μL) for 30 min at 4 °C and centrifuged at 300g for 7 min. The pellets were resuspended in PBS buffer (1 mL), centrifuged and resuspended again in 200 μL of PSSI buffer (1.4 μL of 1% Triton X-100; 20 μL of 20 mg/mL RNase; 60 μL of 2 mg/mL propidium iodide and 8.520 μL of PBS). Each sample was incubated for 15 min at 37 °C and analyzed by flow cytometer using FL2-H channel. The results were processed using CellQuest software at 10,000 events per sample, which provided the percentage of cells in the different cell cycle phases.

2.5.4. Conventional ethidium bromide (EB)/acridine orange (AO) staining

Raji cells were seeded (1×10^5 cells/mL) on 24-well plates. After 24 h, the cells were treated with *B. milleflora* essential oil at 60 $\mu\text{g/mL}$, 40 nM vincristine and 20 μM chlorambucil for 24 h. After treatment, the cell suspensions (1 mL) were centrifuged at 220 g for 5 min. The pellets were resuspended with PBS buffer (25 μL) and EB/AO dye mix (2 μL) was added. The dye mix for EB/AO staining was 200 $\mu\text{g/mL}$ ethidium bromide and 200 $\mu\text{g/mL}$ acridine orange in PBS. The stained cell suspensions (10 μL) were placed on a clean microscope slide and covered with a coverslip. The staining was visualized using a fluorescence optical microscope with excitation at 480/30 nm and emission at 535/40 nm. The apoptotic and necrotic cell detection were evaluated by morphological examination of core shape, color of cells and chromatin, as described by Ribble et al. (2005). The orange dye (acridine) penetrates living and dead cells and emits fluorescence. Viable cells show a normal nucleus and green color; apoptotic cells in early stages present both bright green and orange areas in the nucleus, which are related to the partial loss of membrane integrity; and necrotic cells reveal a uniform orange nucleus due to a total loss of membrane integrity. The cells were viewed and counted at 200 \times magnification with an excitation filter of 480/30 nm.

2.5.5. Hoechst 33342

In order to detect chromatin condensation, the Raji cells were seeded (1×10^5 cells/mL) on 24-well plates. After 24 h, the cells were treated with 60 $\mu\text{g/mL}$ *B. milleflora* essential oil, 40 nM vincristine and

20 μM chlorambucil for 24 h. After treatment, the cell suspensions (1 mL) were centrifuged at 220g for 5 min. The pellets were washed with cold PBS buffer (0.5 mL) and centrifuged again at 220g for 5 min. The pellet was then stained in 20 μL of 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 solution. The cells were incubated in the dark for 10 min. Changes in the nuclei were observed with a fluorescence optical microscope at 200 \times magnification using a DAPI filter at 460–490 nm. Hoechst 33342 stain was used to distinguish the compact chromatin of the apoptotic nuclei, which exhibited a high level of fluorescence compared to the control cells.

2.5.6. Selectivity index test

The selectivity of *B. milleflora* essential oil was calculated by comparing its IC₅₀ values with a normal cell line (human lymphocytes) and a Raji cell line, where IC₅₀ is the concentration required to kill 50% of the cell population that was obtained by Finney's probit analysis (Badisa et al., 2009).

2.5.6.1. Extraction and viability of human lymphocytes. This protocol was previously approved by the Ethics Committee of the State University of Ponta Grossa (Protocol number 1.026.524/2015). Peripheral blood samples were collected from healthy, non-smoking male volunteers who had fasted for 12 h. Mononuclear cells (lymphocytes and monocytes) were separated with Histopaque[®] reagent 1077 in accordance with the manufacturer's instructions. The layer of mononuclear cells was removed and washed twice with PBS. The cells were resuspended in RPMI 1640 (pH 7.4) culture supplemented with 10% FBS, 10,000 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 2 mg/mL sodium bicarbonate and 2 mM glutamine, seeded in culture bottles and then incubated at 37 °C. After 2 h of culture, the lymphocytes present in the supernatant were separated from the monocytes and resuspended in RPMI 1640 culture medium (5 mL) buffered with 24 mM sodium bicarbonate, 10% FBS and antibiotics (10,000 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin). These lymphocytes were seeded (2×10^5 cells/mL) on 24-well plates. After 24 h, the cells were treated with 3, 10, 30, 100, and 200 $\mu\text{g/mL}$ of *B. milleflora* essential oil, 40 μM vincristine, 20 μM chlorambucil and incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator for 48 h. The cell viability was determined by cell counting in a Neubauer chamber using trypan blue and by the MTT assay, as described in Section 2.5.1.

2.6. Statistical analysis

The statistical analysis was performed by ANOVA and Tukey's post-hoc test. The results were expressed as mean \pm standard error of mean (SEM) from three independent biological replicates. A value of $p < 0.05$ was considered indicative of significance. All the tests were carried out using Graph Pad Prism 5.01 software.

3. Results

3.1. *B. milleflora* essential oil yield and GC–MS analysis

The chemical composition of *B. milleflora* essential oil is summarized in Table 1. This sample provided a mean yield of 0.6%, a higher value than found in a previous study which obtained 0.1% for the same species (Agostini et al., 2005). *B. milleflora* essential oil is mainly composed of sesquiterpene hydrocarbons and a mixture of monoterpene hydrocarbons and oxygenated sesquiterpenes. The major compounds are bicyclogermacrene (12.16%), germacrene D (11.18%), (*E*)-caryophyllene (9.28%), and α -humulene (α -caryophyllene) (8.05%).

3.2. In vitro cytotoxicity tests

3.2.1. MTT assay

In order to explore whether the *B. milleflora* essential oil had an

Table 1
Chemical composition of *B. milleflora* essential oil.

Volatile compound	RI lit.	RI calc.	Peak area (%)	Identification
β -Phellandrene	1025	1028	0.64	RI, MS
(E)-ocimene	1044	1046	0.17	RI, MS
α -Copaene	1374	1375	0.33	RI, MS
β -Elemene	1389	1392	0.35	RI, MS
α -Gurjunene	1409	1409	0.63	RI, MS
(E)-caryophyllene	1417	1419	9.28	RI, MS
Aromadendrene	1439	1438	1.51	RI, MS
α -Humulene (α -caryophyllene)	1452	1453	8.05	RI, MS
(E)- β -farnesene	1454	1458	2.62	RI, MS
allo-aromadendrene	1458	1460	0.53	RI, MS
γ -Muuroleone	1478	1477	1.24	RI, MS
Germacrene D	1484	1481	11.18	RI, MS
β -selinene	1489	1483	1.68	RI, MS
Valencene	1496	1491	0.43	RI, MS
Bicyclogermacrene	1500	1497	12.16	RI, MS
α -Muuroleone	1500	1500	0.80	RI, MS
β -Bisabolene	1505	1509	4.09	RI, MS
γ -Cadinene	1513	1514	0.57	RI, MS
(Z)- γ -bisabolene	1514	1515	0.44	RI, MS
δ -Cadinene	1522	1524	4.31	RI, MS
9,10-Dehydro-isolongifolene ^a	–	1577	1.21	RI, MS
(Z)-Cadin-4-em-7-ol	1635	1633	1.54	RI, MS
ar-Turmerone	1668	1667	1.91	RI, MS
1-Acetyl-4, 6, 8-trimethylazulene ^a	–	1733	3.22	RI, MS
4-Alpha-methyl-3,4,4a,9,10a-hexahydro-1(2H)-j-2-one ^a	–	1737	1.39	RI, MS
Compounds identified			70.28	
Monoterpene hydrocarbons			0,81	
Oxygenated monoterpenes			–	
Sesquiterpene hydrocarbons			61.41	
Oxygenated sesquiterpenes			8.06	

RI lit.: literature retention index (Adams, 2007); RI calc.: calculated retention index; MS: mass spectroscopy.

^a Identified by the mass spectrum with the Nist-11library and no Adams' retention index is available.

Table 2
Cytotoxicity of *B. milleflora* essential oil by MTT assay in relation to tumor cell lines after 24, 48 and 72 h.

Cell line	IC ₅₀ (μ g/mL)		
	24 h	48 h	72 h
Jurkat	42.91 \pm 16.02	35.05 \pm 6.81	36.34 \pm 15.71
HL-60	23.06 \pm 6.98	23.22 \pm 12.69	22.13 \pm 11.95
Raji	39.15 \pm 12.71	26.22 \pm 11.45	20.07 \pm 10.46

IC₅₀: concentration that reduces mitochondrial activity by 50%. The results are shown as mean \pm SEM from three independent biological replicates ($n = 8$ per experiment).

effect on the tumor cell lines, cell viability experiments were performed in relation to Jurkat, HL-60 and Raji cells and the results, expressed as IC₅₀, are shown in Table 2. In general, IC₅₀ values lower than 50 μ g/mL were obtained for all the tumor cells at 24, 48, 72 h by MTT assay.

3.2.2. Analysis of cell DNA content

3.2.2.1. Diphenylamine solution (DPA). The effect of *B. milleflora* essential oil on DNA content in relation to Jurkat, HL-60 and Raji cells using DPA solution is shown in Fig. 1. This volatile oil at 3 and 10 μ g/mL showed no significant difference compared to the control. However, a significant decrease was achieved ($p < 0.05$) when *B. milleflora* essential oil was compared to the control at 30 and 100 μ g/mL on the DNA content in relation to Jurkat, HL-60 and Raji cells. This result demonstrates that *B. milleflora* essential oil was able to inhibit the proliferation of cancer cells by affecting the DNA content.

3.2.2.2. Propidium iodide (PI). Considering this previous result, a more

sensitive test for studying DNA content was also performed using PI in order to confirm if lower concentrations of volatile oil could damage the DNA, leading to cell cytotoxicity. In this experiment, *B. milleflora* essential oil was investigated in terms of the proliferation of Jurkat, HL-60 and Raji tumor cells, and these results are shown in Table 3. A significant reduction in DNA content was observed even at the lowest concentration of 3 μ g/mL for Jurkat and Raji cells when compared to the control. At 10 μ g/mL and higher concentrations, *B. milleflora* essential oil produced a significant decrease in DNA content for all the tumor cell lines tested using PI.

3.2.3. Cell cycle assay

Table 4 shows the effect of *B. milleflora* essential oil at 15, 30, and 60 μ g/mL on the cell cycle progression of Raji cells. At 60 μ g/mL, statistically significant results were observed for *B. milleflora* essential oil after 24 h. At this concentration, G0/G1 arrest was induced with a concomitant decrease in the number of cells in the S and G2/M phases. In particular, these effects were not observed at 15 and 30 μ g/mL. *B. milleflora* essential oil at 60 μ g/mL also induced cell fragmentation, which was represented by an increase in the sub-G0 population.

3.2.4. Conventional EB/AO and Hoechst 33342 staining

In order to provide better information regarding Raji cell death, conventional EB/AO (Fig. 2A–2D) and Hoechst 33342 (Fig. 2E–2H) staining were performed to investigate the effect of *B. milleflora* essential oil at 60 μ g/mL on promoting apoptosis and/or necrosis of the tumor cell line in comparison to the negative and positive controls (vincristine and chlorambucil). For the negative control, viable cells with normal nucleus staining, represented by green chromatin, were observed (Fig. 2A). Raji cells treated with 60 μ g/mL of *B. milleflora* essential oil (Fig. 2B) showed a decrease in the viable cell number and an increase in apoptotic and necrotic cells compared to the control. In the presence of vincristine (Fig. 2C), which has been previously linked to the inhibition of microtubule formation in mitotic spindle, leading to cell death by apoptosis (Mukhtar et al., 2014), few viable cells and a high number of apoptotic cells, which showed as condensed or fragmented chromatin with green or orange staining, were recorded. Chlorambucil, an alkylating agent that interferes with DNA replication and mitochondrial function and induces cellular apoptosis and necrosis (Mourtada et al., 2013), presented a higher number of necrotic cells, which exhibited normal nucleus staining with orange chromatin (Fig. 2D). Regarding the cell count results in triplicate (Table 5), differences in live cells were observed between treatments with *B. milleflora* essential oil, vincristine and chlorambucil compared with the negative control ($p < 0.001$). These data demonstrate the cytotoxic effect of *B. milleflora* essential oil compared with the control group. However, vincristine and chlorambucil showed a significantly higher level of cytotoxicity ($p < 0.001$) than this essential oil. Considering each treatment, a significant number of apoptotic cells ($p < 0.001$) was detected for vincristine, which was expected. Chlorambucil showed a statistically significant predominance ($p < 0.001$) of necrotic cells. *B. milleflora* essential oil led to a significant increase in apoptotic and necrotic cells ($p < 0.001$) compared with the control, with a higher count of necrotic cells. The results obtained from the Hoechst 33342 staining assay showed cells in apoptosis, with morphological changes in the nucleus and chromatin condensation (Fig. 2E–2H), which exhibited high fluorescence compared to control cells (Fig. 2E). Thus, these data reinforce the fact that *B. milleflora* essential oil acts via both necrotic and apoptotic mechanisms.

3.2.5. Selectivity index test

A suitable anti-cancer drug must produce a cytotoxic effect on cancer cells at a low concentration and at the same time it must not affect, or be harmful to, normal cells. Consequently, a further experiment was carried out using human lymphocytes in order to evaluate the lack of cytotoxicity of *B. milleflora* essential oil at different concentra-

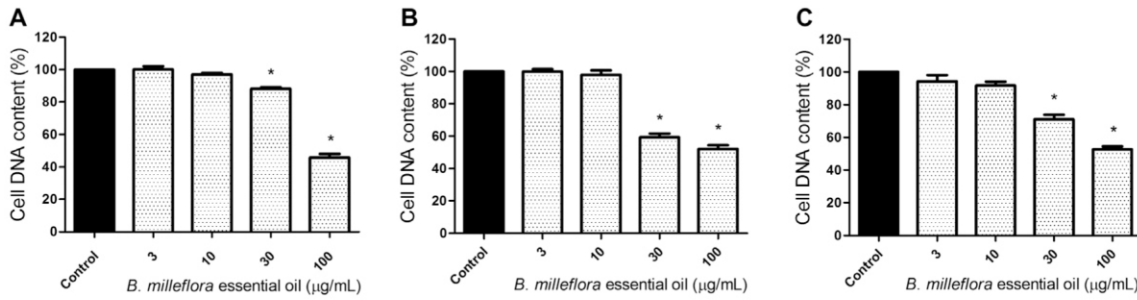


Fig. 1. Determination of cell proliferation using diphenylamine solution (DPA) by measuring the DNA content of Jurkat (A), HL60 (B) and Raji (C) cells treated with *B. milleflora* essential oil (3, 10, 30 and 100 µg/mL) and control for 48 h. The results are shown as mean ± SEM from three independent biological replicates (n = 4 per experiment). The symbol * represents a value of p < 0.05, which was considered significant when compared to the control.

Table 3

Determination of cell proliferation using propidium iodide (PI) by measuring the DNA content of Jurkat, HL-60 and Raji cells treated with *B. milleflora* essential oil (3, 10, 30 and 100 µg/mL) and control for 72 h.

Cell line	Control	<i>B. milleflora</i> essential oil (µg/mL)			
		3	10	30	100
Jurkat	100.00	93.35 ± 1.98*	75.67 ± 1.27*	31.89 ± 0.85*	15.31 ± 0.22*
HL-60	100.00	95.57 ± 2.28	74.48 ± 2.15*	24.33 ± 1.65*	26.65 ± 1.91*
Raji	100.00	90.59 ± 2.20*	68.35 ± 1.50*	19.89 ± 0.95*	14.60 ± 0.55*

The results are shown as mean ± SEM from three independent biological replicates (n = 12 per experiment). The symbol * represent a value of p < 0.05, which was considered to be highly significant compared to the control (100%).

Table 4

Distribution of Raji cells in cell cycle after treatment with *B. milleflora* essential oil (15, 30, 60 µg/mL).

Treatment	µg/mL	Cell cycle distribution (%)			
		Sub G0 ^a	G0/G1	S	G2/M
Control	–	14.83 ± 0.65	48.02 ± 0.63	18.20 ± 0.53	33.78 ± 0.63
Essential oil	15	12.22 ± 0.50	48.87 ± 0.38	16.52 ± 0.90	34.61 ± 0.84
	30	11.64 ± 0.59	47.53 ± 0.95	17.15 ± 0.36	35.32 ± 0.26
	60	26.48 ± 0.60 ^a	64.14 ± 0.26 ^a	15.45 ± 0.43 ^a	20.41 ± 0.29 ^a

RPMI medium was used as negative control. The results are expressed as mean ± SEM from six independent biological replicates (n = 10,000 events per sample). The percentage of cells distributed in the cell cycle do not include the sub-G0 phase and correspond to 100%.

^a Statistical differences (p < 0.05) when one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was applied in relation to the control during 24 h of the treatment.

^a Sub-G0 represents the percentage of cells with fragmented DNA in relation to the total events analyzed (20,000 events).

tions (3–200 µg/mL) in relation to normal cells. The results showed no cytotoxicity of *B. milleflora* essential oil at 3, 10 and 30 µg/mL. An intermediate viability of human lymphocytes (51.39 ± 6.12%) was

achieved when *B. milleflora* essential oil at 100 µg/mL was assayed. On the other hand, *B. milleflora* essential oil at 200 µg/mL led to a very low viability (3.96 ± 2.05%) of human lymphocytes. Regarding these

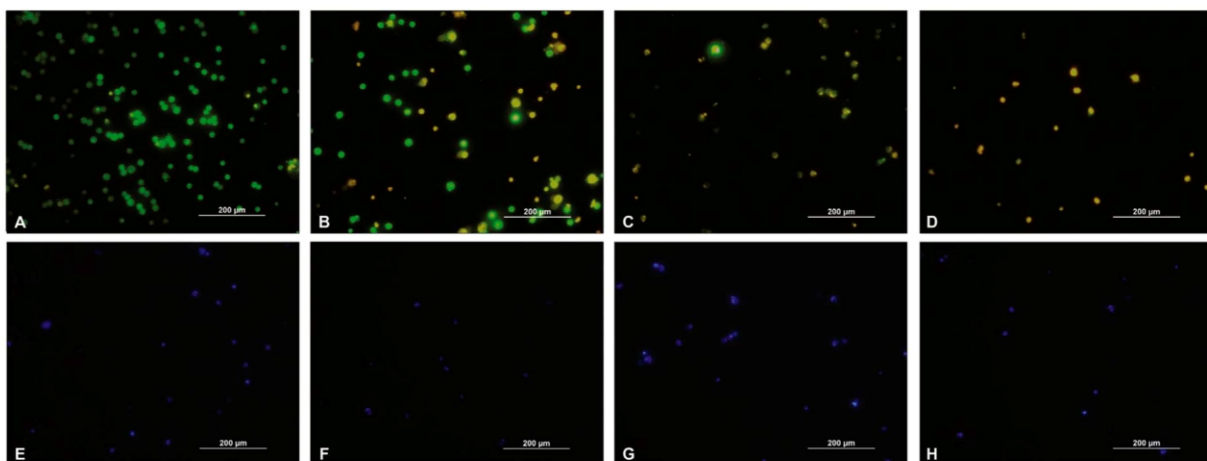


Fig. 2. Images of Raji cells observed by fluorescence microscopy after 24 h treatment. Conventional EB/AO staining (A–D); Hoechst 33342 staining (E–H). A; E: negative control (RPMI broth); B; F: *B. milleflora* essential oil (60 µg/mL); C; G: vincristine (40 nmol/L) and D; H: chlorambucil (20 µmol/L). Images are representative of results obtained from three independent biological replicates (n = 6 blades per sample).

Table 5

Scores of live, necrotic, and apoptosis Raji cells for negative control and treatments after conventional EB/AO staining.

Cell type	Control (RPMI broth)	<i>B. milleflora</i> essential oil (60 µg/mL)	Vincristine (40 nmol/L)	Chlorambucil (20 µmol/L)
Live	92 ± 4.2 ^{a,A}	44 ± 5.1 ^{b,A}	3 ± 3.2 ^{c,A}	0 ± 1.3 ^{c,A}
Apoptotic	4 ± 2.5 ^{a,B}	19 ± 3.2 ^{b,B}	89 ± 3.5 ^{c,B}	40 ± 4.4 ^{d,B}
Necrotic	4 ± 4.2 ^{a,B}	37 ± 2.7 ^{b,A}	8 ± 2.8 ^{a,A}	60 ± 4.1 ^{c,C}

The values represent the mean ± SD from three independent biological replicates ($n = 100$ cells per sample). Different lowercase letters indicate significant statistical difference ($p < 0.05$) between different treatments between the antitumor agents and the control group. Different uppercase letters represent significant statistical difference ($p < 0.05$) between cell morphology with the same antitumor agent or the control group.

Table 6

IC₅₀ of *B. milleflora* essential oil in relation to Raji cells (malignant cell) and human lymphocytes (non-malignant cell) and selectivity index (SI).

Cell line	IC ₅₀ (µg/mL)	SI
Raji cells	26.22 ± 7.45	3.97
Human lymphocytes	104.03 ± 9.39	

Values represent mean ± SEM from three independent biological replicates ($n = 8$ per experiment).

data, a selectivity index (SI) of 3.97 was calculated for *B. milleflora* essential oil (Table 6).

4. Discussion

Two studies have previously reported on the chemical composition of *B. milleflora* essential oil. Simões-Pires et al. (2005) assessed a sample collected in southern Brazil and found mainly sesquiterpenes such as γ -gurjunene, α -selinene, and β -caryophyllene. Agostini et al. (2005) evaluated three samples collected in the same region; spathulenol was the major compound in two of them (16.2% and 25.3%) and β -pinene was the main component in the third sample (34.2%). These samples contained high percentages of oxygenated sesquiterpenes (25.3% and 28.2%) and monoterpene hydrocarbons (38.4%), respectively. However, low concentrations of monoterpene hydrocarbons (0.81%) and oxygenated sesquiterpenes (8.06%) were observed in this study, even though collection occurred in the same region and during the same season. In addition, various volatile compounds that had not been reported in previous studies (Simões-Pires et al., 2005; Agostini et al., 2005) were identified, such as valencene (0.43%), 9,10-dehydroisolongifolene (1.21%), 4- α -methyl-3,4,4a,9,10a-hexahydro-1(2H)-phenanthren]-2-one (1.39%), ar-turmerone (1.91%), (*E*)- β -farnesene (2.62%), 1-acetyl-4, 6, 8-trimethylazulene (3.22%), and β -bisabolene (4.09%). Moreover, the distinct chemical composition found in the present study, compared to other studies in the literature, can be explained by the presence of different chemotypes in *B. milleflora* (Agostini et al., 2005). These differences in composition reinforce the importance of sample characterization by GC/MS in order to find correlations between chemical composition and cytotoxic effect.

MTT reduction is usually performed to study mitochondrial/non-mitochondrial dehydrogenase activity as a cytotoxic test for a variety of chemical compounds. *B. milleflora* essential oil is potentially effective in changing the enzymatic activity of mitochondria and initiating preliminary injury that leads to cell death. Furthermore, it has also been reported that essential oils can cause damage in the mitochondrial membrane since they provoke the depolarization of mitochondrial membranes by decreasing membrane potential (Döll-Boscardin et al., 2012) and they also alter the fluidity of membranes, which become abnormally permeable. These additional mechanisms reported in rela-

tion to essential oils may have also contributed to the cytotoxic effect of *B. milleflora* essential oil.

As described in a previous paper (Sylvestre et al., 2006) which investigated the cytotoxic effects of essential oils, IC₅₀ values between 10 and 50 µg/mL represent a strong cytotoxic activity. Moreover, IC₅₀ values between 50–100, 100–200, and 200–300 µg/mL indicate moderate, weak, and very weak cytotoxic properties, respectively. Furthermore IC₅₀ values higher than 300 µg/mL represent no cytotoxicity. Taking this into account, the results of the present study showed that *B. milleflora* essential oil demonstrated strong cytotoxicity in relation to Jurkat, HL-60 and Raji cells.

In addition, Suffness and Pezzuto (1990) proposed that IC₅₀ values lower than 30 µg/mL in testing regarding tumor cell lines are considered promising in relation to the development of antitumoral drugs. *B. milleflora* essential oil demonstrated this remarkable effect in relation to HL-60 and Raji cells after 24 and 48 h, respectively. This cytotoxic effect was particularly important regarding HL-60 cells, which maintained low IC₅₀ values throughout the investigated time period.

B. milleflora essential oil also provided strong cytotoxicity at the initial time interval of 24 h. In that sense, *B. milleflora* essential oil demonstrated acute cytotoxicity in relation to Jurkat, HL-60 and Raji cells by inducing cell death with even shorter exposure times.

Other studies involving sesquiterpenes from Asteraceae (*Athanasia brownii* Hochr.) showed a strong cytotoxic effect against human cancer cells by the MTT method, such as A375 (malignant melanoma) and HCT116 (colon carcinoma), with IC₅₀ values of 19.85 and 29.53 µg/mL, respectively (Rasoanaivo et al., 2013). Ferraz et al. (2013) studied the effect of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) essential oil, which is mainly composed of monoterpenes, on cell proliferation using methyl-[3H]-thymidine for 72 h in relation to three cell lines: Hep G2 (hepatocellular carcinoma), K562 (chronic myelocytic leukemia) and B16-F10 (melanoma). This essential oil showed cytotoxic activity with IC₅₀ values from 4.93 to 22.92 mg/mL. In addition, the authors also tested some isolated compounds, such as thymol, *p*-cymene, γ -terpinene, and myrcene, and observed that these volatile components had low cytotoxic activity in comparison to the whole essential oil. These results can be attributed to a synergic effect among monoterpenes and sesquiterpenes provided by volatile oils. For biological purposes, synergism appears to be more meaningful than isolated compounds, due to the activity of main components being able to be modulated by other minor molecules, which can lead to better cellular distribution in an essential oil (Bakkali et al., 2008).

Döll-Boscardin et al. (2012) evaluated the cytotoxicity of *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage essential oil by the MTT assay in relation to Jurkat cells and found an IC₅₀ value of 108.33 µg/mL after 24 h of treatment. In comparison, the oil evaluated in the present study exhibited superior cytotoxicity (IC₅₀ 42.91 µg/mL) for this cell line in the same treatment time. Kumara et al. (2008), evaluated the cytotoxicity of *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) Will. Watson essential oil using the MTT assay in relation to HL-60 cells and found an IC₅₀ value of approximately 30 µg/mL after 48 h of treatment; however, *B. milleflora* essential oil had an IC₅₀ of 23.06 µg/mL after a shorter treatment time (24 h).

B. milleflora essential oil provided a decrease in DNA content for all the tested tumor cell lines, which suggests that intracellular events related to apoptosis occurred (Kanunfre et al., 2004). Döll-Boscardin et al. (2012) studied the effect of essential oils from young and adult leaves of *E. benthamii* L. (Myrtaceae) and demonstrated a statistically significant decrease in DNA content compared to vincristine (positive control). The analysis of cell DNA content revealed that the volatile oil of *E. benthamii* presented cytotoxicity, mainly in relation to the Jurkat and HeLa cell lines compared to isolated terpenes, particularly α -pinene and γ -terpinene. In the same way, the cytotoxic effect of *B. milleflora* essential oil can be attributed to the synergic effect between different compounds, which were able to inhibit the proliferation of tumor cells. This represents the first time that such activity has been reported.

After investigating the changes in cell DNA content, our focus was to analyze whether essential oils could induce cell cycle arrest, which would explain the particular reduction of the proliferation of Raji cells by apoptosis. This tumor cell showed the greatest inhibition of cell proliferation using PI and it was then used for the investigation of cell cycle arrest by flow cytometry.

Cell cycle arrest is often caused by a chemical that provides the inhibition of cell growth. Analysis of cell distribution by flow cytometry was included in this study in order to determine whether the cytotoxic activity of *B. milleflora* essential oil involved changes in cell cycle progression. Flow cytometry can detect the distribution of cells in three major phases of the cycle (G1 vs S vs G2/M) and makes it possible to detect apoptotic cells.

To date, no other previous study has investigated the effect of essential oils from the *Baccharis* species on cell cycle arrest. However, the results of the present study were similar to those reported by Singh et al. (2003) and Agarwal et al. (2004), who observed that the accumulation in the G0/G1 phase in human prostate cancer cells was accompanied by a decrease in cell population in both the S and G2/M phases. The results of the present study showed that *B. milleflora* essential oil at 60 µg/mL led to cycle arrest and the inhibition of Raji cell growth, as demonstrated for the hexane fraction of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Luz et al., 2016). In addition, the sub-G0 population was increased by *B. milleflora* essential oil at 60 µg/mL. The sub-G0 population represents the DNA fragmentation corresponding to the total events analysis and is indicative of cell death induced by apoptosis (Lima et al., 2015). Apoptosis is typically represented by a series of intracellular events, which ultimately lead to DNA fragmentation and the internucleosomal degradation of genomic DNA due to the activation of endogenous endonucleases (Kroemer et al., 1998).

The conventional EB/AO and Hoechst 33342 staining demonstrated that *B. milleflora* essential oil caused cell death by necrotic and apoptotic mechanisms. This effect, which was observed in relation to *B. milleflora* essential oil, has also been observed in the literature. Greay et al. (2010) studied the cytotoxic effect of *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel essential oil and terpinen-4-ol on mesothelioma cells (AE17) and melanoma cells (B16). These authors found that *M. alternifolia* essential oil and terpinen-4-ol induced cell cycle arrest, producing necrotic cells and a low number of apoptotic cells for both tumor cell lines. In other words, it is possible to verify that necrosis and apoptosis can occur simultaneously, depending on factors such as the intensity and duration of the stimulus, the extent of ATP depletion, and the availability of caspases. Necrosis is an uncontrolled and passive process that usually affects large fields of cells, whereas apoptosis is controlled and energy-dependent and can affect individual cells or clusters of cells. Necrotic cell injury is mediated by two main mechanisms: interference with the energy supply of the cell and direct damage to cell membranes (Elmore, 2007). In addition, Raji cells have P-glycoprotein expression and over-expression of the p53 mutant protein (Foroutan et al., 2007). These proteins may provide resistance to apoptosis and lead to necrotic cell death, instead of apoptosis, as shown in the present study. The effect of the resistance mechanism of P-glycoprotein in relation to the Raji cell line and the reduction in apoptotic cell death caused by *B. milleflora* essential oil needs to be confirmed in a further study.

A SI of 3.97 was calculated for *B. milleflora* essential oil, which reinforces the selectivity of this volatile oil regarding malignant Raji cells. SI values greater than or equal to 2.0 are considered significant and indicate that the evaluated substance has the potential to become a new anti-cancer product (Suffness and Pezzuto, 1990) due to a reduced cytotoxicity in relation to non-malignant human cells.

5. Conclusions

In conclusion, the investigated essential oil from cladodes of *B. milleflora* showed bicyclogermacrene, germacrene D, (*E*)-caryophyllene,

and α -humulene as the main volatile components. In general, this essential oil presented IC₅₀ values lower than 50 µg/mL for Jurkat, Raji and HL-60 cells at 24, 48 and 72 h and also demonstrated a decrease in cell DNA content for all the analyzed tumor cell lines. In particular, Raji cells demonstrated had the greatest inhibition of cell proliferation and they were then used for the investigation of cell death mechanisms. *B. milleflora* essential oil promoted G0/G1 arrest and also induced cell fragmentation, which was represented by an increase in the sub-G0 population, indicating cell death induced by apoptosis. Necrotic cell death, coupled with low levels of apoptotic cell death, was observed by conventional EB/AO and Hoechst 33342 staining assays, demonstrating that this essential oil acts via both necrotic and apoptotic mechanisms. A selectivity index of 3.97 was achieved, which represents a reduced cytotoxicity in relation to normal human cells.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.031> associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

The authors would like to thank CAPES/Brazil (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) (#694741/2013), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (310257/2013-1) and Fundação Araucária/Brazil (40829.426.36640.30072013/2013) for financial support.

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, fourth ed. Allured, Carol Stream, Illinois.
- Agarwal, C., Dhanalakshmi, S., Singh, R.P., Agarwal, R., 2004. Inositol hexaphosphate inhibits growth and induces G1 arrest and apoptotic death of androgen-dependent human prostate carcinoma LNCaP cells. *Neoplasia* 6, 646–659.
- Agostini, F., Santos, A.C.A., Rossato, M., Pansera, M.R., Zattera, F., Wasum, R., Serafini, L.A., 2005. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. *Rev. Bras. Farm.* 15, 215–220.
- Badisa, R.B., Darling-Reed, S.F., Joseph, P., Cooperwood, J.S., Latinwo, L.M., Goodman, C.B., 2009. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Res.* 29, 2993–2996.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils — a review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Prasain, J.K., Matsushige, K., Saiki, I., Kadota, S., 1998. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *J. Nat. Prod.* 61, 896–900.
- Búfalo, M.C., Candeias, J.M., Sousa, J.P., Bastos, J.K., Sforcin, J.M., 2010. In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. *Nat. Prod. Res.* 24, 1710–1718.
- Cardile, V., Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Arnold, N.A., Piozzi, F., 2009. Essential oils of *Salvia bracteata* and *Salvia rubifolia* from Lebanon: chemical composition, antimicrobial activity and inhibitory effect on human melanoma cells. *J. Ethnopharmacol.* 126, 265–272.
- Crissman, H.A., Steinkamp, J.A., 1973. Rapid, simultaneous measurement of dna, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J. Cell Biol.* 59, 766–771.
- Dengler, W.A., Schulte, J., Berger, D.P., Mertelmann, R., Fiebig, H.H., 1995. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anti-Cancer Drugs* 6, 522–532.
- Döll-Boscardin, P.M., Sartoratto, A., Maia, B.H.L.N.S., Paula, J.P., Nakashima, T., Farago, P.V., Kanunfre, C.C., 2012. In vitro cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012, 1–8.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35, 495–516.
- Ferraz, R.P., Bomfim, D.S., Carvalho, N.C., Soares, M.B., Silva, T.B., Machado, W.J., Prata, A.P., Costa, E.V., Moraes, V.R., Nogueira, P.C., Bezerra, D.P., 2013. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). *Phytomedicine* 15, 615–621.
- Foroutan, B., Ruf, A.A., Costall, B., Anderson, D., 2007. An in vitro model to study chemoresistance in non-Hodgkin's lymphoma patients over-expressing mutant p53. *J.*

- Pharmacol. Toxicol. 55, 151–158.
- Fukuda, M., Ohkoshi, E., Makino, M., Fujimoto, Y., 2006. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.* 54, 1465–1468.
- Fullas, F., Hussain, R.A., Chai, H.B., Pezzuto, J.M., Soejarto, D.D., Kinghorn, A.D., 1994. Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. *J. Nat. Prod.* 57, 801–807.
- Giuliano, D.A., 2001. Clasificación infragenérica de las especies Argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwin* 39, 131–154.
- Greay, S.J., Ireland, D.J., Kissick, H.T., Levy, A., Beilharz, M.W., Riley, T.V., Carson, C.F., 2010. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 877–888.
- Heiden, G., Iganci, J.R.V., Macias, L., 2009. *Baccharis* sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae) no Rio Grande do Sul, Brazil. *Rodriguésia*. 60, 943–983.
- Johann, S., Oliveira, F.B., Siqueira, E.P., Cisalpino, P.S., Rosa, C.A., Alves, T.M.A., Zani, C.L., Cota, B.B., 2012. Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.* 50, 843–851.
- Kanunfre, C.C., Freitas, J.J.S., Pompéia, C., Almeida, D.C.G., Cury-Boaventura, M.F., Verlengia, R., Curi, R., 2004. Ciglitzone and 15d PGJ2 induce apoptosis in Jurkat and Raji cells. *Int. Immunopharmacol.* 4, 1171–1185.
- Krishnan, A., 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol.* 66, 188–193.
- Kroemer, G., Dallaporta, B., Resche-Rigon, M., 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 619–642.
- Kumara, A., Malik, F., Bhushan, S., Sethi, V.K., Shahi, A.K., kaur, J., Taneja, S.C., Qazi, G.N., Singh, J., 2008. An essential oil and its major constituent isointermedeol induce apoptosis by increased expression of mitochondrial cytochrome c and apical death receptors in human leukaemia HL-60 cells. *Chem. Biol. Interact.* 171, 332–347.
- Kupchan, S.M., Jarvis, B.B., Dailey, R.G., Bright, W., Bryan, R.F., Shizuri, Y., 1976. Baccharin, a novel potent antileukemic trichothecene triepoxide from *Baccharis megapotamica*. *J. Am. Chem. Soc.* 98, 7092–7093.
- Kupchan, S.M., Streelman, D.R., Jarvis, B.B., Dailey, R.G., Sneden, A.T., 1977. Isolation of potent new antileukemic trichothecenes from *Baccharis megapotamica*. *J. Org. Chem.* 42, 4221–4225.
- Lavie, D., Glotter, E., 1971. The cucurbitanes, a group of tetracyclic triterpenes. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 29, 307–362.
- Lima, E.M., Kanunfre, C.C., Andrade, L.F., Granato, D., Rosso, N.D., 2015. Cytotoxic effect of inositol hexaphosphate and its Ni(II) complex on human acute leukemia Jurkat T cells. *Toxicol. in Vitro* 29, 2081–2088.
- Luz, L.E.C., Kanunfre, C.C., Paludo, K.S., Justo, A.S., Petry, V.K., Lemes, B.M., Barison, A., Nepel, A., Wang, M., Avula, B., Khan, I.A., Beltrame, F.L., 2016. Cytotoxic biomonitored study of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns. *J. Ethnopharmacol.* 183, 29–37.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mourtada, R., Fonseca, S.B., Wisnovsky, S.P., Pereira, M.P., Wang, X., Hurren, R., Parfitt, J., Larsen, L., Smith, R.A.J., Murphy, M.P., Schimmer, A.D., Kelley, S.O., 2013. Redirecting an alkylating agent to mitochondria alters drug target and cell death mechanism. *PLoS One* 8, e60253.
- Mukhtar, E., Adhami, V.M., Mukhtar, H., 2014. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.* 13, 275–284.
- Oliveira, P.F., Lima, Ildercílio, M.S., Munari, C.C., Bastos, J.K., Silva Filho, A.A., Tavares, D.C., 2014. Comparative evaluation of antiproliferative effects of Brazilian green propolis, its main source, and their major constituents artemillin C and baccharin. *Planta Med.* 80, 490–492.
- Pereira, C.B., Farago, P.V., Budel, J.M., Paula, J.P., Folquitto, D.G., Miguel, O.G., Miguel, M.D., 2014. A new contribution to the pharmacognostic study of Carquejas: *Baccharis milleflora* DC., Asteraceae. *Lat. Am. J. Pharm.* 33, 841–847.
- Rasoanaivo, P., Randriana, R.F., Maggi, F., Nicoletti, M., Quassinti, L., Bramucci, M., Lupidi, G., Petrelli, D., Vitali, L.A., Papa, F., Vittori, S., 2013. Chemical composition and biological activities of the essential oil of *Athanasia brownii* Hochr. (Asteraceae) endemic to Madagascar. *Chem. Biodivers.* 10, 1876–1886.
- Ribble, D., Goldstein, N.B., Norris, D.A., Shellman, Y.G., 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol.* 5, 12.
- Sellitti, D.F., Suzuki, K., Doi, S.Q., LaGranha, C., Machado, M., Matos, T., Kohn, L.D., 2001. Thyroglobulin increases cell proliferation and suppresses Pax-8 in mesangial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 795–799.
- Simões-Pires, C.A., Debenedetti, S., Spigazzini, E., Mentz, L.A., Matzenbacher, N.I., Limberger, R.P., Henriques, A.T., 2005. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Syst. Evol.* 253, 23–32.
- Singh, R.P., Agarwal, C., Agarwal, R., 2003. Inositol hexaphosphate inhibits growth, and induces G1 arrest and apoptotic death of prostate carcinoma DU145 cells: modulation of CDKI-CDK-cyclin and pRb-related protein-E2F complexes. *Carcinogenesis* 24, 555–563.
- Suffness, M., Pezzuto, J.M., 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Academic Press, London, pp. 71–133.
- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Nagau, F., Legault, J., 2006. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. *J. Ethnopharmacol.* 103, 99–102.
- Virador, V.M., Kobayashi, N., Matsunaga, J., Hearing, V.J., 1999. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. *Anal. Biochem.* 270, 207–219.

ANEXO 1 - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade inseticida in vitro do óleo essencial de Baccharis milleflora DC. (Asteraceae) contra o Pediculus humanus Capitis De Geer

Pesquisador: Paulo Vitor Farago

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30538114.5.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Programa de Apoio a Planos de Reest e Exp. das Universidades Federais - REUNI

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 639.973

Data da Relatoria: 06/05/2014

Apresentação do Projeto:

A aplicação repetida de inseticidas sintéticos convencionais, como os piretroides, usados para combater o *Pediculus humanus capitis* conduzem ao surgimento de resistência. Os óleos voláteis e/ou seus compostos isolados tem sido sugeridos como uma opção aos pediculicidas sintéticos frequentemente adotados no tratamento da pediculose. Plantas pertencentes à família Asteraceae são frequentemente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas. O óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* L. têm demonstrado atividade inseticida. Entretanto, a literatura é restrita na investigação das atividades biológicas da espécie *Baccharis milleflora* DC. O objetivo desse estudo é investigar o potencial pediculicida do óleo essencial dos cladódios de *Baccharis milleflora*. Para a realização do estudo pediculicida, o óleo essencial será obtido a partir da espécie *B. milleflora*. A coleta dos insetos será realizada pelo método de catação manual, juntamente com a ação educativopreventiva. Os insetos em diferentes fases evolutivas serão separados em grupos, os quais serão empregados nos ensaios de atividade fumegante e de atividade repelente. Para a determinação da ação repelente será avaliado o índice de repelência, calculado como a porcentagem de insetos repelidos

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12

Bairro:

CEP: 84.030-900

UF: PR

Município: PONTA GROSSA

Telefone: (42-)3220-3108

Fax: (42-)3220-3102

E-mail: seccoep@uepg.br

Continuação do Parecer: 639.973

da zona tratada com o óleo essencial. Os resultados do ensaio de fumegância serão expressos como tempo médio de knock-down (KT50).

Objetivo da Pesquisa:

Visando a possível obtenção de uma alternativa mais segura ao tratamento da pediculose e baseado na evidência do potencial terapêutico do gênero *Baccharis*, estão sendo realizadas investigações fitoquímicas e de atividades biológicas com a espécie *Baccharis milleflora*, considerando que o uso contínuo dos medicamentos atualmente disponibilizados pela indústria farmacêutica tem desenvolvido a resistência dos piolhos, esse projeto pretende investigar o potencial pediculicida do óleo essencial obtido a partir dos cladódios desse táxon.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco não há, apenas constrangimento dos voluntários em doarem o material da pesquisa (piolhos) devido ao preconceito pré-existente sobre o tema pediculose.

Benefícios é a identificação de portadores de pediculose, com retirada das formas vivas infestantes, contribuindo assim a redução da população de piolhos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é importante para as crianças que estão sujeitas a infestação e evitar a resistência dos piolhos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos estão em anexo. Faltando autorização dos pais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Recomendações:

Incluir autorização dos pais ou responsáveis.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foi incluído no TCLE a autorização dos pais ou responsáveis.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12
Bairro: CEP: 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42-)3220-3108 **Fax:** (42-)3220-3102 **E-mail:** seccoep@uepg.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



Continuação do Parecer: 639.973

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PONTA GROSSA, 08 de Maio de 2014

Assinador por:
ULISSES COELHO
(Coordenador)

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12
Bairro: CEP: 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (42-)3220-3108 **Fax:** (42-)3220-3102 **E-mail:** seccoep@uepg.br

ANEXO 2 – ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
 Diretoria de Uso Sustentável da Biodiversidade e Florestas
 Coordenação Geral de Autorização de Uso da Flora e Floresta
 SCEN Trecho 2 Ed. Sede do Ibama - Cx. Postal nº 09566 Brasília - DF
 CEP: 70818-900 e Telefone: 61) 3316-1474
 www.ibama.gov.br

OF 02001.002470/2014-37 CGAUF/IBAMA

Brasília, 18 de março de 2014.

A Sua Magnificência o Senhor
 ZAKI AKEL SOBRINHO
 Reitor da UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
 RUA XV DE NOVENBRO, 1299
 CURITIBA - PARANA
 CEP.: 83.327-700

Assunto: Encaminhamento de Autorização de Atividades de Acesso ao Patrimônio Genético realizada de acordo com a Resolução CGEN nº 35, de 27/04/2011-(Processo nº 02001.001165/2013-47).

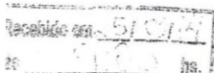
Magnífico Reitor,

1. Encaminhamos, para os devidos fins, a Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético realizada de acordo com a Resolução CGEN nº 35, de 27/04/2011 nº 03/2014, referente ao projeto de pesquisa intitulado "Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais", sob a coordenação do Dr. Obdulio Gomes Miguel.
2. Na oportunidade informamos, que em razão da continuidade do projeto de pesquisa por mais cinco, ou seja, até 2019, faz-se o envio de relatório anual sobre a execução das atividades, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013, e que o acesso para pesquisa científica de outras espécies não constantes do presente projeto de regularização, deverá ser formalmente solicitado.

Atenciosamente,

PAULO BALTAZAR DINIZ

Coordenador-Geral Substituto da CGAUF/IBAMA



Recebido em 18/03/14
 Nº 112/14
 Assunto: Encaminhamento de Autorização de Acesso ao Patrimônio Genético

*Boa tarde, Sr. Paulo Baltazar Diniz,
 De acordo com o relatório
 encaminhado, segue
 a autorização solicitada.*
 27/03/14
 Marinês de Paulil Thomaz
 Diretora da Divisão de Expediente
 do Gabinete de Reitor

ANEXO 3 – DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE

 INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTOCOLO GERAL 16/12/2014 015140002475 15:55 DEPR  EIR 10 2014 031501 2	< Uso exclusivo do INPI >	
Espaço reservado para o protocolo	Espaço reservado para a etiqueta	Espaço reservado para o código QR
 INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Sistema de Gestão da Qualidade Diretoria de Patentes		
DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001 Versão: 2 Procedimento: DIRPA-PQ006

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal do Paraná
 1.2 Qualificação: Autarquia Federal
 1.3 CNPJ/CPF: 75095679/0001-49
 1.4 Endereço Completo: Rua João Negrão, 280 2º andar Curitiba/PR
 1.5 CEP: 80010-200
 1.6 Telefone: 41-33607441 1.7 Fax: 41-33607416
 1.8 E-mail: inovacao@ufpr.br

continua em folha anexa

- 2. Natureza:** Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

MÉTODO DE EXTRAÇÃO E ATIVIDADES ANTITUMORAL E ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E PRODUTOS ORIGINÁRIOS DAS PARTES AÉREAS E RAIZ DA ESPÉCIE *Lobelia exaltata* POHL, CAMPANULACEAE

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão: do pedido Nº** **Data de Depósito:**

- 5. Prioridade:** Interna (66) Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

continua em folha anexa

Jap.



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	2/3
	Título do Documento:		Código:	Versão:	
Depósito de Pedido de Patente			FQ001	2	
			Procedimento:		

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: Obdulio Gomes Miguel

6.2 Qualificação: Doutor em Química

6.3 CPF:

6.4 Endereço Completo: Rua Eduardo Sprada, 4373, Campo Comprido, Curitiba, PR

6.5 CEP: 81270-010

6.6 Telefone: (41) 3360-4070

6.7 FAX:

6.8 E-mail: obdulio@ufpr.br

continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

10. Listagem de seqüências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	3/3
	Título do Documento:			Código:	Versão:
Depósito de Pedido de Patente			FQ001	2	
			Procedimento:		DIRPA-PQ006

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	2
<input type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	18
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	2
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	2
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	1
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) DOU, Anexo de Inventores, Procuração, Documento de Nomeação	7

12. Total de folhas anexadas: 32 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Curitiba, 11 de dezembro de 2014

Local e Data

Assinatura e Carimbo

Prof. Dr. ZAKI AKEL SOBRINHO
Reitor

ANEXO DE CONTINUAÇÃO – FORMULÁRIO FQ001

1. Depositante (71):

Nome: Universidade Estadual de Ponta Grossa
Qualificação: Instituição de Ensino Estadual
CNPJ: 80.257.355/0001-08.
Endereço: Av. Carlos Cavalcanti, nº4748 Ponta Grossa – PR
CEP: 84.030-900
Telefone: (41) (42) 3220.3263
E-mail: agipi@uepg.br

1. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: MARILIS DALLARMI MIGUEL
Qualificação: DOUTORA EM AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL)
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA.
Endereço: Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico– Curitiba – PR
CEP: 80210-170
Telefone: (41) 3360-4070
E-mail: dallarmi@ufpr.br

2. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: DANIELA GASPARDO FOLQUITTO
Qualificação: DOUTORANDA EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. DEPARTAMENTO
DE FARMÁCIA.
Endereço: Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico – Curitiba – PR
CEP: 80210-170
Telefone: (42) 91577474
E-mail: danielafolquitto@gmail.com

3. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: CAMILA BUGNOTTO PEREIRA
Qualificação: DOUTORANDA EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
Endereço: Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico – Curitiba – PR
CEP: 80210-170
Telefone: (42) 99555925
E-mail: camilabugno@hotmail.com

4. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s) (art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: JULIANE NADAL DIAS SWIECH
Qualificação: DOUTORANDA EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA.
Endereço: Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico – Curitiba – PR
CEP: 80210-170
Telefone: (42) 99810061
E-mail: juliswiech@yahoo.com.br

5. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s) (art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: SANDRA MARIA WARUMBI ZANIN
Qualificação: DOUTORA EM QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA.
Endereço: Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico – Curitiba – PR
CEP: 80210-170
Telefone: (41) 3360-4070
E-mail: sandrazanin@ufpr.br

6. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s) (art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS
Qualificação: DOUTORA EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA.

Endereço: Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico – Curitiba – PR
CEP: 80210-170
Telefone: (41) 3360-4070
E-mail: jodias@pop.com.br

7. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: PAULO VITOR FARAGO
Qualificação: DOUTOR EM QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS.
Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas – Ponta Grossa – PR
CEP: 84030-900
Telefone: (42) 3220-3115
E-mail: pvfarago@gmail.com

8. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: LUÍS ANTÔNIO ESMERINO
Qualificação: DOUTOR EM ODONTOLOGIA, DEPARTAMENTO DE ANÁLISES
CLÍNICAS.
Endereço: Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 – Uvaranas – Ponta Grossa – PR
CEP: 84030-900
Telefone: (42) 3220-3113
E-mail: lesmerino@yahoo.com

9. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: ROSI ZANONI SILVA
Qualificação: DOUTORA EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DEPARTAMENTO DE
FARMÁCIA.
Endereço: Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico – Curitiba – PR
CEP: 80210-170
Telefone: (42) 3220-3124
E-mail: rosizanoni@bol.com.br

10. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: DÉBORA MARIA BORSATO

Qualificação: DOUTORA EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA.

Endereço: Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico – Curitiba – PR

CEP: 80210-170

Telefone: (42) 3220-3115

E-mail: dmborsato@yahoo.com.br

11. Inventor (72):

- Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

Nome: JANE MANFRON BUDEL

Qualificação: DOUTORA EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA.

Endereço: Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - Jardim Botânico – Curitiba – PR

CEP: 80210-170

Telefone: (42) 3220-3124

E-mail: janemanfron@hotmail.com
