

ANGELA FLORÃO

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE QUATRO ESPÉCIES DE *BACCHARIS*,
ASTERACEAE**

CURITIBA
2006

ANGELA FLORÃO

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE QUATRO ESPÉCIES DE *BACCHARIS*,
ASTERACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Almeriane M. Weffort-Santos.

CURITIBA
2006

NOTA BIOGRÁFICA

A autora graduou-se em Farmácia – Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná em 2004. Durante a graduação, de agosto de 2001 a julho de 2002, participou do Programa de Iniciação Científica, Departamento de Genética, sob orientação da Professora Maria Luiza Petzl Erler, com o projeto de pesquisa: “Genes do MHC e outros de função relacionada ao sistema imune: variabilidade em populações”. Ainda na graduação, de abril de 2003 a março de 2004, foi monitora na disciplina de Hematologia I, Departamento de Patologia Médica, sob orientação da Professora Almeriane Maria Weffort Santos. Em setembro de 2005, após concurso público, iniciou sua carreira como Professora Substituta do Curso de Farmácia – Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná, onde foi responsável pela disciplina de Bioquímica Clínica II, até dezembro de 2005. No ano de 2004, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Análises Clínicas, onde desenvolveu projeto sobre atividades biológicas de óleos essenciais de espécies de *Baccharis*, cujos resultados estão contidos nesta dissertação.

DEDICATÓRIA

Ao meu noivo, João, meus pais e irmão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sempre ter abençoado e iluminado meus caminhos.

Aos meus pais, Ilene Rossi e João Florão, e ao meu irmão Andre, pelo incansável apoio, estímulo e amor em todos os momentos.

Ao meu noivo João, pelo amor, compreensão e incentivo incondicional.

A Prof^a Almeriane Maria Weffort-Santos, pela dedicação, entusiasmo, bons conselhos, ensinamentos e, especialmente, pela amizade, sendo um exemplo de inteligência e perseverança.

Ao Prof. Cid Aimbiré de Moraes Santos, pelo auxílio em minha formação, sugestões e amizade.

A Prof^a Márcia do Rocio Duarte e Jane Manfron Budel, pela gentileza de fornecer os óleos essenciais, que possibilitaram a realização deste trabalho.

A Prof^a Cyntia M. T. Fadel-Picheth, pela atenção e disponibilidade para realização dos experimentos de atividade antibacteriana.

A Irene, pela amizade e valiosíssima ajuda.

A Celene, Geni, Graça e Regina, pela atenção e auxílio.

A todos os professores da UFPR, em especial aos professores Rogério Luiz Kopp, José Domingos Fontana e Maria Suely Soares Leonart, por suas colaborações que tornaram possível a realização desse trabalho.

Aos amigos Júlio, Jeanine, Christian, Ingrid, Maria Cecília, Patrícia, Sônia, Silvia, Caroline, Mauren, Lisângela, Wesley, Juliana, Ana Paula e colegas da Pós-Graduação, pelas contribuições e amizade.

A Fabiana e Larissa, pela inestimável ajuda em meus experimentos, por todos os bons momentos que compartilhamos e pela amizade.

A CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de mestrado.

E a todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Não importa onde você parou... em que momento da vida você cansou...
O que importa é que sempre é possível e necessário recomeçar.
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...
É renovar as esperanças na vida e, o mais importante...
Acreditar em você de novo. Se desejarmos fortemente o melhor e...
Principalmente, lutarmos pelo melhor...
O melhor vai se instalar em nossa vida.
Porque sou do tamanho daquilo que vejo. E não do tamanho da minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

SUMÁRIO

NOTA BIOGRÁFICA.....	ii
DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
EPIGRAFE.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS & FÓRMULAS QUÍMICAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 GÊNERO <i>Baccharis</i> — ASTERACEAE.....	1
1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	3
1.3 MECANISMOS DE DEFESA DO ORGANISMO HUMANO.....	6
1.4 INFLAMAÇÃO E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	7
1.5 QUIMIOTAXIA.....	9
1.6 O SISTEMA IMUNITÁRIO.....	10
1.7 REGIÕES NUCLEOLARES CORADAS PELA PRATA – AgNOR.....	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 SOLUÇÕES.....	23
3.2 ENSAIOS DE SOLUBILIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	25
3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	26
3.4 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS.....	26
3.4.1 <i>Separação das populações de leucócitos humanos.....</i>	<i>27</i>
3.5 VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE CELULARES.....	27
3.6 PREPARO DE CITOCENTRIFUGADOS.....	28
3.7 COLORAÇÃO DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA.....	28
3.8 QUIMIOTAXIA DE GRANULÓCITOS	28

3.9 ENSAIOS DE IMUNOMODULAÇÃO.....	29
3.9.1 Ativação/proliferação de linfócitos avaliada por citometria de fluxo.....	30
3.9.2 Ativação de linfócitos avaliada morfológicamente.....	31
3.10 IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DE REGIÕES NUCLEOLARES ORGANIZADAS – AgNOR.....	31
3.11 ATIVIDADE SOBRE O CRESCIMENTO BACTERIANO.....	32
3.11.1 Reativação da viabilidade e competência dos microorganismos.....	32
3.11.2 Teste de difusão em ágar.....	32
3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1 ENSAIOS DE SOLUBILIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	34
4.2 EFEITO DA TEMPERATURA E DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO SOBRE A VOLATILIDADE DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis</i>	35
4.3 CITOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES E GRANULÓCITOS.....	37
4.4 QUIMIOTAXIA DE GRANULÓCITOS INDUZIDA POR CASEÍNA.....	40
4.5 EFEITOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE <i>Baccharis</i> SOBRE A IMUNOMODULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	44
4.5.1 Efeitos do etanol e dimetilsufóxido sobre a imunomodulação de linfócitos humanos <i>in vitro</i>	44
4.5.2 Potencial imunomodulatório dos óleos essenciais.....	58
4.6 ATIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Baccharis</i> SOBRE O CRESCIMENTO BACTERIANO.....	64
5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto geral de <i>B. articulata</i> , <i>B. dracunculifolia</i> , <i>B. crispa</i> e <i>B. gaudichaudiana</i>	04
Figura 2. Efeito da temperatura e do período de incubação sobre os constituintes do óleo essencial de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	36
Figura 3. Citotoxicidade de óleos essenciais de espécies de <i>Baccharis</i> sobre leucócitos periféricos.....	39
Figura 4. Avaliação do potencial quimiotático de óleos essenciais de espécies de <i>Baccharis</i> sobre granulócitos humanos.....	41
Figura 5. Efeito do pré-tratamento com óleos essenciais de espécies de <i>Baccharis</i> sobre a quimiotaxia de granulócitos induzida por caseína.....	42
Figura 6. Representação gráfica em pontos para análise da atividade imunomodulatória de linfócitos por citometria de fluxo.....	45
Figura 7. Efeito <i>in vitro</i> de etanol e DMSO sobre a proliferação basal de linfócitos humanos.....	46
Figura 8. Efeito <i>in vitro</i> de etanol e DMSO sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina.....	47
Figura 9. Efeito <i>in vitro</i> de etanol (E) e DMSO (D) sobre a transformação blástica de linfócitos humanos.....	48
Figura 10. Efeito <i>in vitro</i> de etanol (E) e DMSO (D) sobre a transformação blástica de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina.....	48
Figura 11. Efeito do DMSO e etanol sobre a formação de AgNOR em linfócitos humanos.....	50
Figura 12. Efeito <i>in vitro</i> de etanol (E) e DMSO (D) sobre a formação de AgNOR em linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina.....	51
Figura 13. Aspecto morfológico de AgNOR em linfócitos humanos.....	52
Figura 14. Efeito <i>in vitro</i> de etanol (E) e DMSO (D) sobre a morfologia de AgNOR de linfócitos humanos.....	54
Figura 15. Efeito <i>in vitro</i> de óleos essenciais de espécies de <i>Baccharis</i> sobre a proliferação de linfócitos humanos.....	59
Figura 16. Efeito <i>in vitro</i> de óleos essenciais de espécies de <i>Baccharis</i> sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina.....	60
Figura 17. Efeito <i>in vitro</i> de óleos essenciais de espécies de <i>Baccharis</i> sobre a formação de AgNOR em linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina.....	63
Figura 18. Efeito <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina.....	63
Figura 19. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de <i>Baccharis</i>	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química e concentração relativa (%) dos óleos essenciais de <i>Baccharis articulata</i> (BA), <i>B. crispa</i> (BC), <i>B. dracunculifolia</i> (BD) e <i>B. gaudichaudiana</i> (BG) obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa.....	5
Tabela 2. Mitógenos: características e células alvo.....	17
Tabela 3. Influência da temperatura sobre os componentes do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	37
Tabela 4. Influência de DMSO e etanol na morfologia de linfócitos humanos cultivados na presença ou não de fitohemaglutinina, avaliada em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa.....	49
Tabela 5. Toxicidade do DMSO e etanol sobre células mononucleares humanas avaliada por citometria de fluxo.....	56
Tabela 6. Efeito dos óleos essenciais de espécies de <i>Baccharis</i> sobre a viabilidade de células mononucleares.....	59
Tabela 7. Efeito <i>in vitro</i> de óleos essenciais de espécies de <i>Baccharis</i> sobre a transformação blástica de linfócitos humanos estimulados ou não por fitohemaglutinina.....	61
Tabela 8. Influência de óleos essenciais de <i>Baccharis</i> sobre a morfologia de linfócitos, avaliada em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa.....	62
Tabela 9. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de <i>B. articulata</i> , <i>B. crispa</i> , <i>B. dracunculifolia</i> e <i>B. gaudichaudiana</i> sobre bactérias gram-positivas.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS & FÓRMULAS QUÍMICAS

AgNOR	Regiões nucleolares impregnadas pela prata
AMPc	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
AP-1	Fator de ativação Proteína 1 (<i>Activation Protein-1</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Atm	Atmosfera
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
<i>Ba</i>	<i>B. articulata</i>
<i>Bc</i>	<i>B. crispa</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
<i>Bd</i>	<i>B. dracunculifolia</i>
<i>Bg</i>	<i>B. gaudichaudiana</i>
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
CAA	Células apresentadoras de antígenos
C3a	Fração C3 do complemento ativada
C5a	Fração C5 do complemento ativada
CD	Grupos de diferenciação (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CF	Citometria de fluxo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
Con A	Concanavalina A
D	Dalton
DNA	Ácido desoxiribonucléico (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
DEXA	Dexametasona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EPM	Erro padrão da média
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
F1-73	Fibroblastos de células normais da pele 1-73
<i>f</i> MLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
FSC	<i>Forward light scatter</i>
<i>g</i>	Aceleração da gravidade
G ₀	Fase do ciclo celular em que as células não estão em processo de divisão
G ₁	Fase do ciclo celular em que as células estão se preparando para entrar em atividade de intensa síntese
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
GNC	Granulócitos
HCl	Ácido clorídrico
HL-60	Células humanas de leucemia pró-mielocítica 60
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
HepG2	Células derivadas de hepatocarcinoma 2
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IL	Interleucina
IL2-R	Receptor para Interleucina 2
IP	Índice de proliferação
K ⁺	Íon potássio

KCl	Cloreto de potássio
KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potássio
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
M	Mol, molar
MALT	Tecido linfóide associado a mucosas
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
Mg^{++}	Íon magnésio
MgCl_2	Cloreto de magnésio
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de magnésio hexaidratado
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio heptaidratado
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
min	Minutos
ml	Mililitros
mmol/l	Milimolar por litro
MNC	Células mononucleares
M-PHA	Meio com fitohemaglutinina
Na^+	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NFATc	Fator nuclear de células T ativadas (<i>Nuclear Factor of Activated T-Cells</i>)
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
Na_2HPO_4	Fosfato dissódico
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato dissódico monoidratado
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato monossódico diidratado
NaOH	Hidróxido de sódio
NH_4Cl	Cloreto de amônio
nm	Nanômetros
NOR	Regiões nucleolares organizadas
PAF	Fator de ativação plaquetária (<i>Platelet Activating Factor</i>)
PBS	Salina tamponada com fosfatos (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PBSs	Salina tamponada com fosfatos suplementada
PGE1	Prostaglandina E1
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Fitohemaglutinina (<i>Phytohemagglutinin</i>)
PKC	Proteína C quinase (<i>Protein Kinase C</i>)
PMN	Polimorfonucleares
p/v	Peso por volume
PWM	<i>Pokeweed mitogen</i>
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
SK-MEL-28	Células de melanoma humano 28
SSC	<i>Side light scatter</i>
T.A.	Temperatura ambiente
TB	Transformação blástica
TcR	Receptor de células T
Th1	Linfócitos T auxiliares subtipo 1 (<i>T helper</i>)
Th2	Linfócitos T auxiliares subtipo 2

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor - alpha</i>)
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
μ l	Microlitros

RESUMO

O gênero *Baccharis* (Asteraceae) possui mais de quinhentas espécies, especialmente distribuídas nas áreas tropicais da América do Sul, muitas das quais são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento e prevenção de várias patologias. Por sua vez, diferentes métodos *in vitro* têm sido empregados para a investigação de atividades biológicas de plantas usadas na medicina popular. Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial biológico dos óleos essenciais extraídos das partes aéreas de *Baccharis articulata*, *B. crispa*, *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana*, conhecidas popularmente como carquejas, enfatizando citotoxicidade, atividades imunomodulatórias, quimiotáticas e antibacterianas. Para tanto, a citotoxicidade dos óleos essenciais sobre leucócitos humanos foi estimada pela coloração com azul de tripano, enquanto os efeitos sobre a transformação blástica e a proliferação de linfócitos humanos, induzidas ou não pelo mitógeno fitohemaglutinina, foram avaliados por citometria de fluxo; a quimiotaxia de granulócitos humanos, pelo método de Boyden, através de um gradiente de caseína; o efeito sobre o desenvolvimento de colônias de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foi investigado pelo método de difusão em ágar. Os resultados apresentados demonstraram que concentrações dos óleos essenciais superiores a 10^{-2} $\mu\text{l/ml}$ apresentaram-se tóxicos para leucócitos humanos. Os ensaios de imunomodulação revelaram que o dimetilsulfóxido, mas não o etanol, solventes utilizados para incorporação dos óleos essenciais em meio aquoso, apresenta efeito inibitório significativo sobre a proliferação de linfócitos humanos espontânea e induzida por fitohemaglutinina, sendo inadequado para se estudar o perfil proliferativo de linfócitos humanos *in vitro*. Por outro lado, os óleos essenciais das espécies de *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana* diluídos em etanol inibiram significativamente a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina sem interferir com a proliferação espontânea dos mesmos. De particular interesse, *B. articulata* e *B. dracunculifolia*, inibiram significativamente a quimiotaxia induzida por caseína, efeito não observado para *B. crispa* e *B. gaudichaudiana*, provavelmente pela variação entre os constituintes e nas suas quantidades individuais. Os óleos essenciais também demonstraram moderada atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas, produzindo halos de inibição de maneira dose dependente, que variaram de acordo com a espécie ensaiada. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, os resultados contidos neste trabalho servem como base preliminar de dados que, com certeza, ajudarão a confirmar a utilidade dos óleos essenciais de espécies de *Baccharis* para o combate, controle ou mesmo prevenção de doenças.

Palavras-chaves: óleos essenciais, *Baccharis*, imunomodulação, quimiotaxia, atividade antibacteriana

ABSTRACT

The Baccharis genus (Asteraceae) has over 500 species distributed mainly in tropical areas of South America, which have been used in the folk medicine for the treatment and prevention of several diseases. Different in vitro methods have been used for investigating biological activities of medicinal plants. The aim of this work was to evaluate the biological potential of the essential oils extracted from the aerial parts of Baccharis articulata, B. crispa, B. dracunculifolia, and B. gaudichaudiana, popularly known as carquejas, focusing their toxicity, immunomodulatory, chemotactic, and antibacterial activities. To accomplish this, the effect of the essential oils upon human leukocyte viability was evaluated by the trypan blue exclusion test; the blastic transformation and proliferation of lymphocytes, stimulated or not by phytohemagglutinin, by flow cytometry; the human granulocyte chemotaxis induced by casein by the Boyden's method; and the Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa colony growth by the agar diffusion method. The results herein presented showed, in one hand, that concentrations over 10^{-2} ul/ml of the essential oils tested are toxic for human cells. The immunomodulation assays indicated that dimethyl sulfoxide, but not ethanol, is not appropriate for evaluating the proliferative potential of human leukocytes as a solvent when hydrophobic substances such as essential oils must be incorporated into aqueous medium, because it inhibits the lymphocyte proliferation independent of the presence of phytohemagglutinin. On the other hand, B. dracunculifolia and B. gaudichaudiana essential oils, diluted into ethanol, inhibited significantly the lymphocyte proliferation when phytohemagglutinin was present in the medium. Of particular interest, only B. articulata and B. dracunculifolia inhibited significantly the casein-induced human granulocyte chemotaxis, probably as a consequence of their constituents or their individual amount in the mixture. The essential oils also showed bactericidal activity, producing growth inhibition of gram-positive bacteria, which varied according to the assayed specie. Although further studies are needed, the results and suggestions presented in this work may be useful as a preliminary data to confirm the usefulness of Baccharis essential oils for combating, controlling, and preventing diseases.

Keywords: essential oils, Baccharis, immunomodulation, chemotaxis, bactericidal activity

1 INTRODUÇÃO

1.1 GÊNERO *Baccharis* — ASTERACEAE

A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e, raramente, árvores (Heywood, 1993). Cerca de 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, sendo encontrados em todos os tipos de *habitat*, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (Joly, 1967).

O gênero *Baccharis* está representado por mais de quinhentas espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas (Dupont, 1966; Malagarriga Heras, 1976). A alta concentração no Brasil e nos Andes indica que uma dessas áreas é o provável centro de origem desse gênero (Teodoro-Luis, 1955). Como recentemente revisado por Verdi e colaboradores (2005) no Brasil estão descritas pelo menos 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte delas localizada na região sudeste do país, estima-se em cem o número de espécies na Argentina, 28, no México e cerca de quarenta, na Colômbia, constituindo um dos mais importantes grupos de plantas neste país, das quais 38% são endêmicas.

As espécies do gênero *Baccharis* constituem-se de arbustos em sua maioria e sua altura varia, em média, de 0,5 a 4m. Apresentam elevado valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul, entre outras regiões do país, onde grande número delas é utilizado na medicina popular para controle ou tratamento de várias doenças. São consumidas, principalmente, na forma de chás, com as mais variadas indicações, desde males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes e doenças da próstata, sendo também descritas para o processo de desintoxicação do organismo, como poderá ser visto mais adiante neste capítulo.

O estudo de espécies do gênero *Baccharis* tem mostrado grandes avanços devido ao seu reputado uso na medicina caseira na América Latina. Cerca de 120 espécies do gênero *Baccharis* foram estudadas quimicamente e, dentre estas, cerca de trinta apresentam estudos de atividade biológica, dos quais destacam-se os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos e antiinflamatórios (Verdi *et al.*, 2005). Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e/ou

atividade biológica, encontram-se *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata*. Interessante notar que, para o extrato de *B. articulata*, descreveu-se recentemente atividade antioxidante, sendo a fração *n*-butanólica a mais ativa (De Oliveira *et al.*, 2003), enquanto que, para a *B. gaudichaudiana*, relatou-se atividade citotóxica de clerodanos, labdanos e flavonóides (Fullas *et al.*, 1994).

Muitas são as implicações econômicas dessas espécies, podendo-se citar aspectos negativos e positivos. Por exemplo, ajudam no combate à erosão e podem ser utilizadas como plantas ornamentais, mas também podem apresentar-se como pragas de difícil combate em pastagens, podendo envenenar o gado. Contudo, o destaque maior da sua utilização está na medicina caseira (Carneiro e Fernandes, 1996; Jarvis *et al.*, 1991).

Dentre as espécies de *Baccharis* mais comuns no Paraná, destacam-se *B. dracunculifolia*, *B. articulata*, *B. crispa* e *B. gaudichaudiana*. Entre as espécies denominadas coletivamente de carqueja, está a *B. dracunculifolia*, que é também popularmente conhecida como alecrim-de-vassoura, alecrim-do-campo, vassoureira, vassourinha, vassoura, erva-de-são-joão-maria, *chilca*, *cilca* e *suncho thola*. É utilizada na medicina tradicional para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica (Mors *et al.*, 2000; Silva Júnior, 1997). A partir de suas folhas é extraído, por arraste de vapor, óleo de vassoura, de alto valor para a indústria de fragrâncias (Molt e Trka, 1983). Além disso, *B. dracunculifolia* tem sido a fonte botânica mais importante para produção de própolis verde (Kumazawa *et al.*, 2003; Midorikawa *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002).

B. articulata, conhecida como carqueija, carquejinha, carqueja-doce, carqueja-do-morro, carqueja-miúda e vassoura (Alonso, 1998; Barroso, 1975-6; Corrêa, 1984; Mors *et al.*, 2000; Silva Júnior, 1997; Takeda e Farago, 2001), é empregada para uso interno na medicina popular como tônica, febrífuga, diurética, hepatoprotetora, antianêmica e colagoga e, para uso externo, como anti-séptica e secante de úlceras (Alonso, 1998; Corrêa, 1984; Silva Júnior, 1997). Na Argentina, acredita-se que *B. articulata* tenha atividade no tratamento da impotência sexual masculina e da esterilidade feminina. No Paraguai, é usada como anti-hipertensiva (Takeda e Farago, 2001). É uma planta amarga, digestiva e rica em saponinas (Corrêa, 1984).

Já o extrato aquoso das partes aéreas de *B. crispa* demonstrou efeito antioxidante no ensaio com DPPH (Simoies-Pires *et al.*, 2005), enquanto a *B. gaudichaudiana* é usada popularmente no Paraguai como tônica, antidiabética e para distúrbios gastrintestinais, onde é conhecida como *chilca melosa* (Fullas *et al.*,

1994). Flavonóides extraídos de *B. gaudichaudiana* também demonstraram moderada atividade antioxidante pelo ensaio com DPPH (Akaike *et al.*, 2003).

1.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos que se evaporam quando expostos ao ar. São obtidos de várias partes vegetais, principalmente, por hidrodestilação ou expressão. Quimicamente, constituem-se misturas de substâncias divididas em dois grupos principais: derivados terpenóides e/ou derivados fenilpropanóides (Robbers *et al.*, 1997). Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, especialmente nas famílias Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Rutaceae e Apiaceae (Alonso, 1998; Lavabre, 1997). Sua função envolve sinais de comunicação química no reino vegetal e atuam como armas de defesa química contra o reino animal.

O cultivo de espécies aromáticas tem aumentado e a obtenção de óleos essenciais constitui importante atividade econômica, sendo amplamente utilizados como fragrância em cosméticos, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica, como, por exemplo, detergentes, sabões, repelentes de insetos e aromatizantes de ambiente, além de seu emprego como intermediários sintéticos de perfumes (Woolf, 1999). O uso de óleos essenciais na aromaterapia tem se expandido por todo o mundo e inclui terapia contra várias doenças inflamatórias, alergias, reumatismo e artrite. Estas atividades são reconhecidas através de experimentação clínica, especialmente por aplicações na pele via massagens e ungüentos, mas existem poucos estudos científicos sobre suas ações biológicas (Maruyama *et al.*, 2005).

Além disso, plantas que os possuem são utilizadas *in natura* para a preparação de infusões com finalidades terapêuticas ou ainda para aromatização de formas farmacêuticas destinadas a uso oral, além da aromaterapia (Lavabre, 1997; Simões e Spitzer, 2000). Os óleos essenciais têm sido empregados no setor farmacêutico devido às suas propriedades antimicrobianas (Burt, 2004). Neste contexto, relatos sobre a ação dos óleos essenciais na degradação da parede bacteriana, alteração na membrana plasmática e nas proteínas de membrana, no fluxo de elétrons e na coagulação do citoplasma (Gustafson *et al.*, 1998; Juven *et al.*, 1994; Ultee *et al.*, 2002) vêm se acumulando. Essas ações parecem estar relacionadas à hidrofobicidade desses compostos e à sua capacidade de ligação com íons (Gustafson *et al.*, 1998; Sikkema *et al.*, 1994b).

O gênero *Baccharis* é uma fonte rica de óleos essenciais utilizados na indústria de perfumaria (Silva *et al.*, 1978; Silva Júnior, 1997). Vários constituintes dos óleos essenciais de *B. articulata*, *B. crispa*, *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana* (Figura 1) foram recentemente descritos (Manfron, 2005, comunicação pessoal) e estão relacionados na Tabela 1.

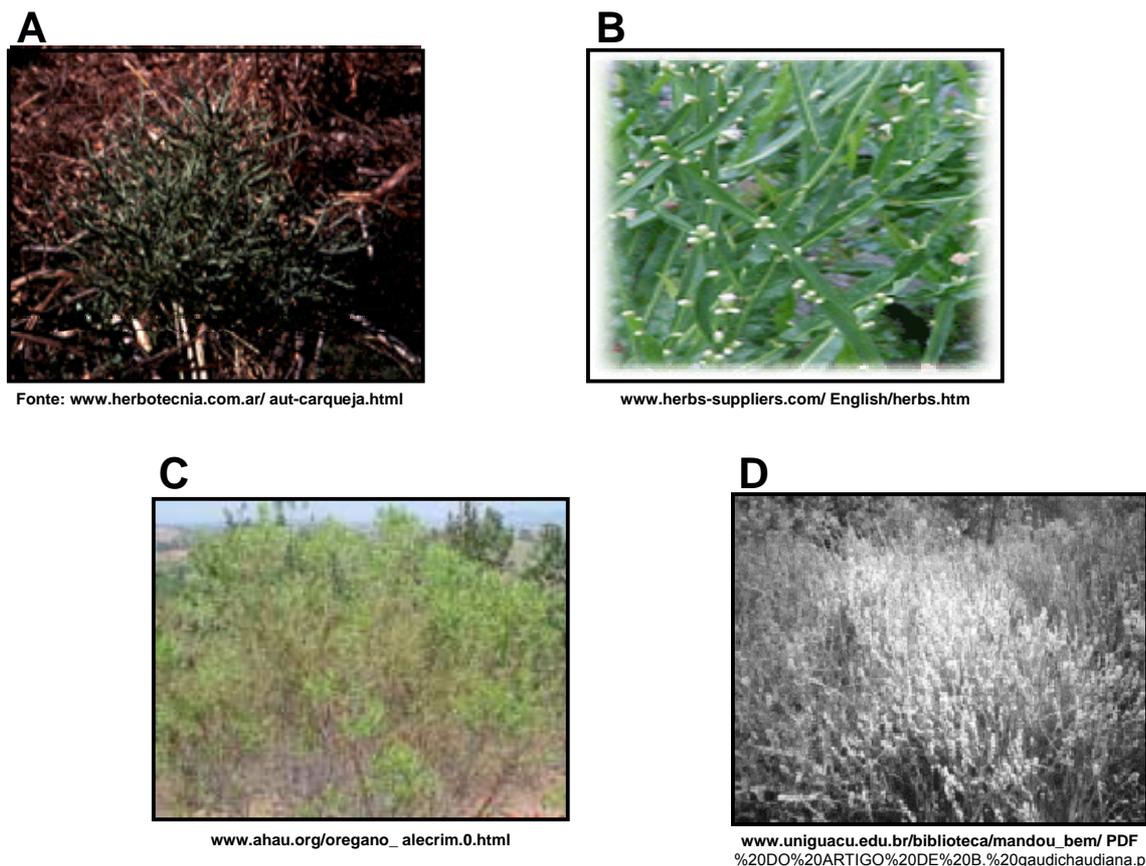


Figura 1. Aspecto geral de *B. articulata* (A), *B. dracunculifolia* (B), *B. crispa* (C) e *B. gaudichaudiana* (D).

Entretanto, o gênero *Baccharis*, por sua ampla distribuição geográfica e grande variedade de espécies, associado ao notável destaque na medicina popular no Brasil e em outros países da América do Sul, apresenta estudos de atividade biológica um tanto tímidos (Verdi *et al.*, 2005). Dessa forma, estas plantas tornaram-se alvo de nosso interesse, amparados não só no fato de serem muito usadas na medicina caseira, mas e principalmente, porque suas indicações de uso, assim como sua composição química, podem estar relacionadas a aspectos envolvidos com os mecanismos das respostas inflamatória e imunológica.

Tabela 1. Composição química e concentração relativa (%) dos óleos essenciais de *Baccharis articulata* (BA), *B. crispa* (BC), *B. dracunculifolia* (BD) e *B. gaudichaudiana* (BG) obtidos por cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia de massa.

Pico	Tempo de retenção (min)	Componente	BA	BC	BD	BG
1	7.12	?	0,31	0,31	0,31	0,31
2	8.36	α -pineno	0,55	-	1,38	-
3	9.82	β -pineno	5,63	0,22	6,64	-
4	10.41	β -mirceno	0,16	-	0,62	2,64
5	11.56	<i>p</i> -cimeno	0,11	-	0,07	-
6	11.70	limoneno	3,30	0,18	6,72	2,01
7	12.17	?	0,24	0,24	0,24	0,24
8	12.47	β -ocimeno (E)	0,23	0,10	0,12	-
9	12.81	γ -terpineno	-	-	0,05	-
10	13.08	acetofenona	-	-	0,11	-
11	13.88	terpinoleno	0,09	-	0,05	-
12	14.37	linalool	0,97	0,12	0,22	7,63
13	14.93	?	-	-	0,11	-
14	15.04	?	-	0,07	-	-
15	15.71	?	0,13	-	-	-
16	16.03	?	-	0,08	-	-
17	16.43	?	-	1,84	-	-
18	17.09	terpin-4-ol	0,13	-	0,12	-
19	17.38	?	-	0,10	-	-
20	17.59	α -terpineol	0,60	0,06	0,34	0,74
21	17.75	mirtenal	0,14	-	-	-
22	18.28	?	-	0,06	-	-
23	18.55	?	-	0,12	-	-
24	19.89	?	-	0,19	-	-
25	21.41	?	-	20,05	-	-
26	21.67	?	-	0,03	-	-
27	22.97	α -cubebeno	0,36	0,11	0,25	-
28	23.63	ovl α -copaeno/longiciclono	0,28	0,13	0,10	-
29	23.81	α -copaeno	2,86	0,30	-	2,85
30	24.10	β -bourboneno	0,19	-	-	1,97
31	24.11	?	-	0,10	-	-
32	24.35	β -elemeno	0,36	1,47	0,25	4,18
33	24.78	metileugenol	0,10	0,06	0,07	-
34	24.90	longifoleno	0,33	0,96	0,32	-
35	25.00	?	-	0,19	-	-
36	25.20	β -cariofileno	13,54	1,47	6,29	3,85
37	25.31	?	-	-	0,31	-
38	25.50	β -gurjuneno	1,11	-	-	0,12
39	25.66	ovl aromadrendeno	0,09	0,05	0,12	-
40	25.80	aromadrendeno	1,29	0,40	1,53	-
41	25.95	?	0,09	0,12	0,23	-
42	26.11	<i>cis</i> -muurolo-4(14)5-dieno	0,50	0,31	0,52	-
43	26.25	<i>epi</i> β -santaleno	0,88	0,53	1,40	1,81
44	26.47	γ -gurjuneno	1,38	1,73	2,38	0,81
45	26.68	?	-	0,15	-	-
46	26.90	ovl γ -muurolo	0,76	-	-	-
47	26.99	γ -muurolo	3,55	1,72	1,69	1,23
48	27.00	?	-	0,76	-	0,66
49	27.13	?	-	-	5,43	-
50	27.13	ovl germacreno D	13,54	-	-	-
51	27.27	β -selineno	0,72	-	0,57	1,97
52	27.14	germacreno D	-	12,10	-	-
53	27.72	?	-	-	0,09	-
54	27.18	ar-curcumeno	-	-	-	2,09
55	27.44	<i>cis</i> - β -guaieno	0,50	-	0,31	-
56	27.57	biciclogermacreno	7,87	1,18	8,68	5,59
57	27.70	α -muuruleno	3,26	0,90	0,60	1,13
58	27.91	γ -cadineno	1,36	3,03	1,05	3,14
59	28.39	δ -cadineno	7,18	3,49	2,95	5,63
60	28.65	cadina-1,4-dieno	0,38	0,05	0,10	-
61	28.80	α -cadineno	0,33	0,04	0,87	-
62	28.96	α -calacoreno	0,14	0,19	0,14	0,87
63	29.63	ledol	0,26	14,99	11,66	10,95
64	30.00	espatulenol	4,81	1,94	14,17	21,27
65	30.13	cariofileno oxide	-	-	-	17,51
66	30.16	globulol	2,80	0,63	3,87	-
67	30.40	?	1,58	4,20	1,43	2,36
68	31.28	β -eudesmol	-	0,09	0,22	-
69	31.42	?	0,32	-	-	-
70	31.81	α -cadinol	-	0,53	1,26	-

(?): desconhecido; (—): ausente.

Fonte: Manfron, 2005.

1.3 MECANISMOS DE DEFESA DO ORGANISMO HUMANO

Todos os seres vivos estão sujeitos a ações nocivas de substâncias de natureza diversificada que podem comprometer seu estado de saúde. Quando o agente agressor supera as linhas de defesa ou barreiras naturais exemplificadas pela pele, mucosa dos tratos gastrintestinal, respiratório e geniturinário, conjuntiva ocular, invadindo o hospedeiro, nele instala-se e, quando possível, multiplica-se, causando quadros infecciosos e/ou inflamatórios. O agente agressor pode ser de natureza física, química ou biológica, destacando-se, nesta última categoria, microorganismos como bactérias, fungos, protozoários, vírus e parasitas multicelulares.

Numa infecção localizada, na maioria dos casos, a invasão é limitada por fatores inerentes ao microorganismo e a agressão ocorre nas células não só do tecido lesado, como também naquelas pertencentes aos tecidos adjacentes ao foco de invasão. Quando generalizada, os microorganismos alcançam diversos tecidos, distantes do foco primário de instalação. Há, também, microorganismos que liberam toxinas que exercem efeitos nocivos quando carregadas pelo sangue ou linfa para outros tecidos ou órgãos, além do infectado (Margni, 1990).

Diante de uma lesão celular, independentemente do agente agressor, uma série de modificações no tecido conjuntivo vascularizado ocorre, com acúmulo de líquidos e recrutamento de elementos celulares com funções específicas, particularmente granulócitos neutrófilos ou polimorfonucleares (PMN), e macrófagos, ambos fagócitos por excelência, que objetivam a eliminação rápida do agente agressor e a reparação do tecido lesado, caracterizando a resposta inflamatória aguda (Cotran *et al.*, 1994).

Sob certas circunstâncias, quando o processo reacional agudo não é suficiente para eliminar o agente causal e/ou reparar os danos locais causados, a reação inflamatória pode prolongar-se por dias ou mesmo por semanas ou meses, instalando-se então, um processo reacional crônico, com a infiltração de linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos, além dos macrófagos e PMN já presentes (Cotran *et al.*, 1994).

1.4 INFLAMAÇÃO E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A reação orgânica aguda que se verifica em uma inflamação é, fundamentalmente, uma resposta de defesa e proteção do organismo lesado contra o agente agressor e as conseqüências que ele pode vir a causar. É um fenômeno estereotipado, cujos sinais clássicos rubor, tumor, calor e dor foram primeiramente descritos por Celsius 178 a.C, sendo que a estes, Galeno adicionou a perda de função (Cotran *et al.*, 1994). Atualmente, sabe-se que estes sinais são conseqüências da liberação de substâncias químicas encontradas no local da lesão, particularmente as citocinas (Sedgwick e Willoughby, 1985; Silva, 1978).

As citocinas inflamatórias são substâncias químicas circulantes no plasma e importantes mediadores das respostas vascular e celular desencadeadas pelo estímulo inflamatório agudo. Dentre elas, destacam-se as interleucinas 1 (IL-1), IL-6 e IL-8, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Cassatela, 1995; Springer, 1994; Springer, 1995).

No decorrer de um processo infeccioso ou inflamatório agudo, os leucócitos circulantes no sangue periférico aproximam-se da parede vascular devido à sua ativação por mediadores da inflamação, liberados por células presentes na área de lesão, tais como bactérias, células lesadas ou frações do complemento, passando a ocupar uma posição mais periférica. Em seguida, aderem-se firmemente, mas de forma transitória, ao endotélio e atravessam a parede do vaso (Smith *et al.*, 1979). Após a diapedese, continuam a migrar em direção ao foco inflamatório pelo processo de quimiotaxia (Dekker e Segal, 2000).

Dessa forma, pelo menos três etapas estão distintamente envolvidas no desenvolvimento de um processo inflamatório agudo: (1) adesão dos leucócitos ao endotélio, (2) sua passagem através do mesmo e (3) sua migração em direção ao estímulo quimiotático (Dekker e Segal, 2000; Mackai e Rosen, 2000).

Uma função crítica da inflamação é a migração de células especializadas provenientes do sangue periférico para o tecido conjuntivo no qual se situa o foco inflamatório. Estudos recentes têm demonstrado que os mecanismos moleculares que recrutam os diferentes tipos de leucócitos para as áreas inflamadas são similares (Mackai e Rosen, 2000). Esses experimentos também mostram que a adesão, a transmigração e a locomoção de leucócitos envolvem a ativação, por ligantes específicos, de diferentes famílias de receptores presentes na superfície dessas células e na matriz extracelular (Bokoch, 1995; Dekker e Segal, 2000).

Das células com grande capacidade de responder a estímulos inflamatórios destacam-se os granulócitos (GNC) circulantes no sangue periférico. Dentre esses, há os neutrófilos, que constituem a população celular primária na defesa aguda contra vários tipos de microorganismos presentes no meio ambiente, acumulando-se rapidamente no sítio invasivo ou de lesão. Sua participação no processo inflamatório é multifuncional e envolve (1) o reconhecimento seletivo do agente agressor, (2) resposta apropriada por meio de locomoção, (3) fagocitose do microorganismo e (4) sua subsequente destruição. Para tanto, possuem a habilidade de secretar substâncias não só capazes de retardar a disseminação da infecção, mas, quando necessário, também recrutar outros tipos de leucócitos para o foco infeccioso/inflamatório (Cassatela, 1995).

O neutrófilo é uma célula que participa da defesa inata e, nos tecidos, está presente em todas as portas de entrada do organismo humano que fazem contato com o meio externo. Com um tempo de vida média na circulação de aproximadamente sete horas (Quesenberry e Colvin, 2001), passam a maior parte desse tempo circulando no sangue periférico, num processo passivo.

Para o mesmo número de neutrófilos que está circulando no leito central do vaso, tem-se igual quantidade na porção mais periférica, próxima ao endotélio, representando o compartimento marginal, ou *pool* marginal. Ainda, para que o organismo possa atender a uma demanda tecidual extra de PMN como, por exemplo, no combate a patógenos invasores ou em uma inflamação aguda, a medula óssea dispõe do *pool* de reserva, composto por neutrófilos segmentados e seus precursores imediatos, os neutrófilos bastonetes e os metamielócitos. Assim, quando necessário, um maior número de neutrófilos pode ser lançado na corrente circulatória, colaborando com a leucocitose, geralmente acompanhada do aumento do número de neutrófilos (neutrofilia) e de bastonetes (Lee *et al.*, 1999a).

Em contraste com a reação aguda, a inflamação crônica caracteriza-se por uma maior infiltração de células mononucleares (MNC), incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, como reflexo de lesão tecidual persistente (Cotran *et al.*, 1994). Dentre essas células, os macrófagos ocupam posição de destaque comparável ao papel principal desempenhado pelos PMN na reação aguda.

Os macrófagos são células que se originam dos monócitos circulantes que, por sua vez e à semelhança dos GNC, são descendentes de progenitores hematopoiéticos presentes na medula óssea (Lee *et al.*, 1999a). Após diapedese, os monócitos se distribuem nos mais diferentes tecidos do organismo dos mamíferos (Reeves e Todd, 2000). Em contraste com um tempo de vida de cerca de 24 horas

para os monócitos circulantes, os macrófagos sobrevivem por vários meses, durante os quais, ao responderem a vários estímulos, especialmente de citocinas, tornam-se ativados e capazes de exercer inúmeras funções, como proliferação, síntese, armazenamento e secreção de moléculas biologicamente ativas (enzimas proteolíticas, componentes do sistema complemento, fibronectina, α_2 -macroglobulina, fatores de coagulação, prostaglandinas, fatores de crescimento, citocinas *etc*), atuam como células apresentadoras de antígenos para linfócitos, produzem reagentes metabólitos do oxigênio e outras moléculas importantes para a eliminação de microorganismos (Cotran *et al.*, 1994; Reeves e Todd, 2000).

1.5 QUIMIOTAXIA

O fluxo de leucócitos ao local de injúria, cuja locomoção é direcional e determinada por substâncias químicas, é denominado quimiotaxia. Necessário se faz distinguir um fenômeno em que apenas a velocidade ou a frequência da locomoção celular é afetada por substâncias químicas, porém o movimento não é direcional e denomina-se quimiocinese ou, atualmente, ortoquinese (Wilkinson, 1998).

Quimiotaxia, ou o movimento celular direcional a favor ou contra um gradiente químico, é comum a várias células eucarióticas e implica numa série sucessiva de eventos que se iniciam com a polarização celular, seguida de extensão da bainha frontal (*pseudopodium* ou *lamelipodium*), fixação ao substrato e retração do corpo celular. Todos estes eventos dependem da dinâmica do citoesqueleto de actina que se reorganiza em resposta ao sinal recebido (Wilkinson, 1996).

Os atraentes químicos são, em geral, moléculas pequenas e solúveis que reconhecem e se ligam a receptores transmembrana específicos, via proteína G, localizados na superfície dos leucócitos. O sinal quimiotático liberado dessa interação é o AMPc (adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico), mensageiro intermediário que ativa vias de sinalização que estimulam a polimerização de actina, produzindo filamentos ramificados (F-actina) na linha de frente, próxima ao sinal. Esta polimerização localizada empurra a membrana celular para frente, acompanhada de contração do pólo posterior, a qual é medeiada pela proteína motora miosina II (Chung *et al.*, 2001). Na sua forma globular monomérica, a actina é solúvel, mas quando polimerizada produz filamentos insolúveis de considerável força mecânica. As miosinas interagem com filamentos de actina e convertem a energia química do ATP (adenosina trifosfato) em trabalho mecânico, resultando no movimento celular.

Portanto, como resultado da ativação de receptores quimioatraentes, os neutrófilos são estimulados a mover-se, aderir-se, rearranjar seu citoesqueleto e, por fim, fagocitar microorganismos. Além disso, freqüentemente ocorre degranulação e ativação da NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) oxidase, gerando metabólitos tóxicos do oxigênio (Bokoch, 1995).

As substâncias capazes de induzir quimiotaxia, denominadas quimioatraentes, não constituem uma classe específica de compostos e podem ter natureza exógena ou endógena. Dentre as substâncias exógenas que provocam alterações no comportamento locomotor dos leucócitos encontram-se alguns produtos de bactérias, como os peptídios *N*-formilados (*f*-MLP) (Johansson *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 1995; Rabgaoui *et al.*, 1994); certas citotaxinas como a caseína (Lewis e Van Epps, 1983; Rabgaoui *et al.*, 1994; Siddiqui *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Wilkinson, 1974; Wilkinson e Haston, 1988), os derivados de bactérias como os lipopolissacarídeos (LPS) (Qu *et al.*, 1995), proteínas desnaturadas (Wilkinson e Haston, 1988). Dentre as substâncias endógenas, as mais conhecidas são as citocinas, já citadas anteriormente e que, de modo geral, são capazes de estimular todos os tipos de leucócitos do sangue. Dessas, destacam-se a IL-8, o interferon gama, o TNF- α , além de componentes do sistema complemento, como as frações C3a e C5a, os produtos relacionados a lipoxigenação do ácido araquidônico (leucotrienos), particularmente o LTB₄, e o fator de ativação plaquetária (PAF) (Bokoch, 1995; Cotran *et al.*, 1994; Johansson *et al.*, 2002; Lewis e Van Epps, 1983; Siddiqui *et al.*, 1999; Wilkinson e Haston, 1988).

1.6 O SISTEMA IMUNITÁRIO

Após a instalação de um agente patogênico, o organismo reage para a eliminação do mesmo numa ação integrada entre fagócitos, protagonistas da reação inflamatória, e as células do sistema imunitário.

O local da infecção e o tipo de patógeno são fatores determinantes do tipo de resposta imunológica que será desencadeada. A resposta imunológica adaptativa desenvolve-se após o contato entre as células do sistema e o patógeno como, por exemplo, vírus, bactérias ou protozoários, o que lhe confere caráter de especificidade (Roitt *et al.*, 2003). Estas células são capazes de identificar e reagir somente com as moléculas que são estranhas ao organismo.

Outro fator que colabora para a ativação do sistema imunitário adaptativo é o fato da agressão pelo agente ser recorrente, pois uma característica específica

deste sistema é a produção de uma memória imunológica a partir da primeira infecção (Parham, 2001).

Células do sistema imunitário adaptativo

Devido a suas importantes características de memória, especificidade e reconhecimento do não próprio, o sistema imunitário adaptativo é muito eficaz na defesa do organismo. Os tipos celulares que medeiam esta reação são os linfócitos, em particular os B e T, e as células apresentadoras de antígenos (CAA), representadas por uma coleção de macrófagos e células dendríticas (Roitt *et al.*, 2003).

Linfócitos

Principais células responsáveis pela resposta imunológica adaptativa, no ser humano, as células da linhagem linfóide originam-se a partir das mesmas células-tronco hematopoiéticas que dão origem aos granulócitos, eritrócitos e plaquetas presentes, subsequentemente durante a ontogenia, no saco vitelínico, fígado e medula óssea (Lee *et al.*, 1999a). Nos indivíduos adultos, são continuamente produzidos às custas da proliferação controlada das células linfóides primitivas presentes na medula óssea, as quais dão origem à populações distintas de linfócitos.

Antes de se tornarem células maduras e capazes de exercer funções específicas, os linfócitos passam por processos sucessivos para aquisição de imunocompetência no timo ou na própria medula óssea, denominados órgãos linfóides primários. Os que requerem um período de diferenciação no timo são denominados linfócitos T. Outros que continuam a se diferenciar no próprio sítio produtor emergem como linfócitos B.

Mais de 70% dos linfócitos circulantes são representados pela linhagem T, os quais participam ativamente na defesa do organismo contra infecções causadas por agentes intracelulares. Enquanto estão no timo, os linfócitos T em desenvolvimento (ou timócitos) apresentam o marcador CD3 e diferenciam-se em duas linhagens, expressando receptores de membrana distintos relacionadas com as suas funções efetoras, destacando-se as glicoproteínas CD4 e CD8 (Parham, 2001).

A fase de desenvolvimento dos timócitos envolve um exame crítico de receptores produzidos. A seleção positiva envolve células T que podem reconhecer peptídeos apresentados por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) próprias, enquanto que a negativa elimina as células

potencialmente auto-reativas, que poderiam ser ativadas por peptídeos normalmente apresentados por moléculas MHC na superfície das células saudáveis. É durante a seleção positiva que as células T CD3, primeiramente duplo-positivas para CD4 e CD8, irão se tornar células T CD3 de positividade única para CD4 ou CD8, sendo que as CD4 interagem somente com moléculas MHC de classe II, enquanto as CD8 interagem somente com moléculas MHC de classe I (Parham, 2001).

Como é no tecido linfóide periférico que ocorrem as maiores chances dos linfócitos T encontrarem antígenos, após a fase de amadurecimento no timo, essas células, agora imunocompetentes, ficam circulando entre a corrente sangüínea e o tecido linfóide periférico até encontrarem o seu antígeno específico, quando, então, são induzidas a proliferar e se diferenciar em células T efetoras (Janeway, 2002). Fazem parte do tecido linfóide periférico, também chamado secundário, os linfonodos, a polpa branca do baço, o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e o tecido linfóide associado a mucosas (MALT), representado pelas tonsilas, placas de Peyer, apêndice, tecidos brônquico e mamário.

O encontro com um antígeno específico provoca a fase final do desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos T, onde as células CD8 tornam-se células T citotóxicas para as células que expressam esses antígenos protéicos, enquanto as células CD4, sob influência de citocinas, tornam-se células T auxiliares subtipos 1 ou 2 (Th1 e Th2, respectivamente), sendo que o tipo celular que predominará dependerá do patógeno e do tipo de resposta imunológica requerida (Parham, 2001).

Em contraste com o processo de amadurecimento dos linfócitos T, os precursores dos linfócitos B são induzidos a diferenciar dentro da própria medula óssea, influenciados por várias citocinas produzidas pelas células estromais. No sangue periférico, representam de 5 a 15% da população de linfócitos circulantes. Enquanto sua ativação por antígenos protéicos requer a presença de linfócitos T, a qual é facilitada pela expressão de moléculas classe II do sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen*), antígenos de natureza lipídica, glicolipídica ou constituídos de proteínas polimerizadas ou carboidratos estimulam diretamente as células B.

Macrófagos

Macrófagos fazem parte do sistema fagocitário mononuclear que se constitui de células de origem medular, incluindo os monócitos que trafegam no sangue periférico e os macrófagos tissulares. Dependendo do tecido ou órgão onde se encontram, recebem diferentes nomes, como as células de Kuppfer do fígado, os histiócitos dos linfonodos, os macrófagos alveolares e os esplênicos, quando nos

pulmões e no baço, respectivamente. Da circulação, os monócitos migram para os tecidos, onde se transformam em macrófagos, células com elevada capacidade fagocitária, responsáveis pela remoção de restos celulares e materiais estranhos particulados (Reeves e Todd, 2000).

Os macrófagos podem ser ativados, processo este que culmina com aumento do seu tamanho, elevação dos níveis de enzimas lisossomais, metabolismo ativo e grande habilidade de fagocitar e matar microorganismos. Sua ativação pode ser efetivada por meio de toxinas bacterianas, moléculas de adesão, citocinas secretadas por linfócitos T ativados e outros mediadores químicos presentes nas reações inflamatórias (Lee *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2003).

Após ativação dos macrófagos, elementos celulares centrais da inflamação crônica como já citado, estes passam a sintetizar e secretar várias moléculas biologicamente ativas, coletivamente chamadas citocinas, que são importantes mediadores das respostas inflamatórias e imunológicas (Homolka *et al.*, 2003). Particularmente importantes são as citocinas produzidas que têm a habilidade de ativar linfócitos, os quais passam também a secretar mediadores, fechando e amplificando um círculo de respostas biológicas responsáveis não só pela eliminação de agentes invasores, mas também envolvidas nos processos para garantir o restabelecimento do organismo e desenvolver resistência.

Como células apresentadoras de antígenos, os macrófagos têm a capacidade de reconhecer e, subseqüentemente, internalizar antígenos, processá-los e, posteriormente, expor fragmentos destes para os linfócitos T por meio de moléculas de superfície específicas do MHC (Roitt *et al.*, 2003).

Dessa forma, os macrófagos desempenham funções centrais na resposta imunológica, assim como o fazem na resposta inflamatória. Primeiro eles são necessários para processar e apresentar antígenos aos linfócitos T imunocompetentes, pois, ao contrário das células B, as células T não são ativadas por antígenos solúveis. Segundo, eles produzem numerosas citocinas, dentre elas a IL-1 e o TNF- α , capazes de amplificar as respostas inflamatória e imunitária. Também, são elementos capazes de lisar células tumorais pela produção de metabólitos tóxicos e enzimas proteolíticas, sendo importantes na vigilância imunológica (Cotran *et al.*, 1994).

Funções dos elementos celulares envolvidos na resposta imunológica

O modo pelo qual um antígeno é reconhecido pelos linfócitos T e B é específico e isso reflete as diferentes funções dessas células após sua ativação pelo antígeno.

Um linfócito B ativado pode transformar-se num plasmócito produtor de imunoglobulinas com a mesma especificidade para o receptor do linfócito que lhe deu origem. A função desses anticorpos é ligar-se diretamente ao antígeno que lhe deu origem, com a finalidade de neutralizar sua atividade ou de desencadear mecanismos de defesa que culminem na sua eliminação. Na prática, isso significa que células B podem interagir com o antígeno na sua forma nativa, sem modificações (Brostoff e Male, 1994; Reeves e Todd, 2000).

Já os linfócitos T regulam a atividade das outras células do sistema imunitário ou eliminam as células infectadas. Portanto, interações com outros tipos celulares são necessárias para que as células T possam desempenhar sua função. Esta é uma das razões que explicam porque, em contraste com os linfócitos B, os T podem reconhecer e ser ativados por antígenos ligados a glicoproteínas específicas do HLA presentes na superfície das CAA, codificadas pelos genes do MHC, processo que é denominado duplo reconhecimento, pois receptores de células T não se ligam ao antígeno ou às moléculas do HLA independentemente, mas à combinação de ambos.

Uma das funções básicas das CAA é ativar linfócitos T e eliminar, por endocitose, células alvo que foram mortas por estes, ou eliminar antígenos que foram neutralizados por anticorpos. Muitos antígenos em seu estado natural não conseguem se associar eficientemente às moléculas do HLA e o fazem somente após terem sido processados pelas CAA. Este processamento envolve sua parcial degradação enzimática, liberando unidades peptídicas de tamanho e seqüência apropriada para se ligarem às moléculas do HLA e, então, servirem como epítopos para ligação de linfócitos T. Relevante é o fato de que esses determinantes antigênicos podem ser originados de qualquer parte do antígeno original e um corolário disto é que linfócitos T e B podem interagir com epítopos totalmente diferentes e, ainda assim, demonstrar especificidade para o mesmo antígeno (Brostoff e Male, 1994; Reeves e Todd, 2000).

É importante ressaltar que todos os tipos celulares acima citados também têm, como função, a liberação de citocinas, que estimulam e amplificam a resposta ou a suprimem quando o agente for totalmente erradicado.

Dessa forma, a ativação e o desempenho de funções pelos linfócitos T e B requerem interação recíproca, assim como com outros tipos celulares. Como já visto, as oportunidades para que esses contatos ocorram são maximizadas pela recirculação dos linfócitos através de todo o organismo e pela sua manutenção nos órgãos linfóides secundários, levando ao desenvolvimento do vasto repertório imunológico observado em indivíduos normais (Reeves e Todd, 2000).

Interação de linfócitos e antígenos

Os eventos celulares que decorrem da ativação de um linfócito são denominados coletivamente de transformação blástica e as células resultantes deste processo são referidas como células efectoras da resposta imunológica. Morfológicamente, são caracterizados como linfoblastos e possuem elevada capacidade proliferativa. Como resultado, observa-se um aumento do número de células, da produção e secreção de citocinas, assim como de expressão de receptores específicos.

As células efectoras originadas da ativação de linfócitos T CD4 proliferam, dando origem a células auxiliares, responsáveis pela propagação da resposta imunológica por meio da produção e secreção de interleucinas. Os linfócitos T CD8, após contato com o antígeno, ativam-se e proliferam, originando também células capazes de produzir grandes quantidades de citocinas, que são secretadas para a eliminação do agente agressor.

No caso de linfócitos B, após transformação, muitos proliferam, dando origem aos plasmócitos, células especializadas na síntese de imunoglobulinas que são, então, secretadas como anticorpos livres, como já citado anteriormente.

Outros linfoblastos formam uma população de memória específica para o antígeno que induziu a resposta primária, adquirindo o aspecto morfológico do linfócito inicial. São essas células que, quando re-expostas ao mesmo antígeno ou a outro cuja estrutura antigênica seja muito semelhante, produzem uma rápida e vigorosa resposta imunológica, chamada secundária (Reeves e Todd, 2000).

Ativação e proliferação de linfócitos

Ativação de linfócitos decorre da interação entre um antígeno e o receptor presente na superfície celular com o qual ele pode interagir. Em células CD4, por exemplo, este evento culmina com a proliferação, diferenciação e produção de citocinas que medeiam as funções específicas de células T efectoras, como já citado.

Eventos subseqüentes, que ocorrem em segundos ou minutos após a interação ligante-receptor, incluem mudanças no fluxo de cátions monovalentes (Na^+ e K^+) e a ativação de metiltransferases. Ao mesmo tempo, síntese e utilização de fosfolipídeos aumentam, envolvendo fosfatidil inositol, um constituinte dos fosfolipídeos de membrana. Influxo de Ca^{++} é central na ativação de linfócitos e ocorre em menos de cinco minutos após interação do mitógeno fitohemaglutinina, por exemplo, com receptores presentes na superfície de linfócitos humanos. Após algumas horas dessa interação ligante-receptor, a síntese de proteínas aumenta, alcançando um pico entre 48 e 72 horas. Neste período, ocorre aumento da síntese de RNA, assim como há síntese de várias proteínas (Cooper, 1972). O conteúdo de RNA em linfócitos dobra em 48 horas e reflete-se em alterações morfológicas distintas da célula. Finalmente, aumento da síntese de DNA, a marca registrada da proliferação celular, inicia-se após cerca de 36 horas, atingindo níveis máximos entre 48 e 72 horas (Greaves e Janossy, 1972).

Para que a proliferação celular ocorra, fatores de transcrição, que são ativados simultaneamente à interação ligante-receptor, representam intermediários essenciais, os quais traduzem e direcionam sinais extracelulares em respostas transcricionais específicas. A regulação combinada da transcrição envolve complexos multiprotéicos que se ligam de forma cooperativa a regiões específicas do DNA alvo. Esta interação permite a convergência de diferentes sinais para uma região definida do DNA, a qual, por sua vez, exerce controle regulatório rigoroso sobre a expressão dos genes alvos em resposta aos sinais recebidos.

Neste contexto, complexos formados por fatores de transcrição da família NFATc, por exemplo, junto com proteínas AP-1 e ras, integram vias de sinalização dependentes de Ca^{++} , as quais regulam a expressão de genes que codificam proteínas imunomodulatórias como IL-2, IL-4, IL-3/GM-CSF, TNF- α , CD40 e Faz (Feske *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 1997; Trama *et al.*, 2000).

A replicação de linfócitos T é muito particular e é determinada pela interação de IL-2 com seus receptores (IL-2-R) em níveis significativos para desencadear esta ação. Entretanto, células T não expressam IL-2-R a menos que sejam estimulados por antígenos, anticorpos monoclonais específicos para células T, lectinas mitogênicas ou forbol éster, por exemplo. Além disso, uma vez exposta a esses agentes, cada célula T expressa IL-2-R de forma individual, entrando em fases proliferativas do ciclo celular de forma assincrônica. Se níveis de IL-2 não se mantiverem contínuos, a expressão de IL-2-R se mantém, mas a síntese de DNA

não ocorre, uma vez que é a interação com IL-2-R o fenômeno crucial para que ocorra a replicação do DNA (Cantrell e Smith, 1984).

Um outro ponto de relevância é que a expressão de IL-2-R é dependente da presença de antígeno e a retirada do estímulo do meio leva à queda progressiva de seus níveis. Em paralelo, há o declínio, também progressivo, da proliferação celular e todas as células, eventualmente, passam a se apresentar na fase G_0 do ciclo celular, mesmo na presença de concentrações saturantes de IL-2 (Smith e Cantrell, 1985).

Resposta de linfócitos a mitógenos

Certas substâncias possuem a habilidade de ativar e, subseqüentemente, induzir a proliferação de linfócitos T, B ou de ambos *in vitro*, sendo genericamente denominados mitógenos (Gery *et al.*, 1972; Gery e Waksman, 1972; Janossy e Greaves, 1972; Oppenheim e Rosenstreich, 1976). A Tabela 2 mostra uma seleção dessas substâncias e sua especificidade com referência à população estimulada.

Tabela 2. Mitógenos: características e células alvo.

Mitógeno	Fonte	Tamanho molecular (D)	Células Alvo	Espécie(s)
Concanavalina A (Con A)	<i>Canavalia ensiformis</i>	55.000	Linfócitos T	humana, camundongo
Fitohemaglutinina (PHA)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	140.000	Linfócitos T	humana, camundongo
Lipopolissacarídeo (LPS)	Bactérias gram negativas	1-24x10 ⁶	Linfócitos B	Roedores
Pokeweed mitogen (PWM)	<i>Phytolacca americana</i>	32.000	Linfócitos T e B	Humana e camundongo
Dextran sulfato	-	500.000	Linfócitos B	-

Adaptado de Myers, 1995.

Enquanto a resposta dos linfócitos a antígenos *in vivo* é específica, gerando amplificação clonal, sua resposta a mitógenos *in vitro* é inespecífica e influencia, simultaneamente, um grande número de células, levando-as a sofrer transformação blástica e, posteriormente, proliferar.

Diferente do que acontece *in vivo*, esse estímulo à proliferação não depende de células apresentadoras de antígenos, embora os mesmos mecanismos bioquímicos estejam aparentemente envolvidos (Burgermeister *et al.*, 2003). Esta propriedade favorece estudos experimentais e Fitohemaglutinina (PHA) e Concanavalina A (ConA), lectinas extraídas e purificadas de plantas que estimulam sub-populações de células T, têm sido usadas como mitógenos para estudos de proliferação dessas populações *in vitro* e a resposta resultante pode ser utilizada para qualificar e quantificar a imunocompetência dessas células (Myers, 1995). Como já visto, o primeiro passo para a ativação de um linfócito reside na interação de receptores de superfície com um agente estimulante. A interação de um mitógeno com o receptor das células T (TcR), por exemplo, também inicia, na célula, eventos que envolvem o recrutamento de íons cálcio e a ativação simultânea das enzimas tirosina quinases citossólicas fosfolipases C γ e A $_2$, proteína C quinase (PKC), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e calcineurina. Estas, por via de cascatas metabólicas específicas, produzem sinais direcionados ao núcleo, promovendo a transcrição de fatores pró-mitóticos. Estes, por sua vez, conduzem os eventos da proliferação e de síntese de IL-2, a qual é o principal mediador químico da amplificação da resposta imunológica (Cooper, 1972; Feske *et al.*, 2000; Rao e Chakrabarti, 2005; Smith e Cantrell, 1985; Trama *et al.*, 2000).

São várias as metodologias *in vitro* utilizadas para quantificar a ativação e proliferação celulares. Entre estas estão os ensaios que incluem a incorporação de nucleotídeos radioativos (Brunner *et al.*, 1968; Gillis *et al.*, 1978), a redução de sais tetrazólio (Mosmann, 1983), a incorporação de agentes fluorescentes (Lyons, 2000), a incorporação de análogos de pirimidina (Kubbies *et al.*, 1985) e a análise por citometria de fluxo, tecnologia que inclui métodos para a avaliação de efeitos sobre a população analisada, como, por exemplo, ativação e proliferação celulares, para a identificação de eventuais modificações que ocorrem dentro e fora das células e na análise das substâncias produzidas e secretadas pelas células em estudo (Shapiro, 1985).

Esta versatilidade deriva da múltipla e independente quantidade de análises das características físicas e químicas das células, as quais são individualmente conduzidas por um canal de corrente fluída, que intersepta um ou mais feixes de luz provenientes de um raio *laser*. Ao passarem pelos raios, as células causam dispersão da luz em várias direções, a qual depende do tamanho e da estrutura interna de cada célula (Macey, 1994). Também, moléculas fluorescentes, quando

ligadas às células, podem ser excitadas e, subseqüentemente, emitir luz de acordo com a natureza da molécula fluorescente (Assenmacher *et al.*, 1995).

A luz dispersa e/ou a fluorescência emitida são, então, coletadas por diferentes sensores, os quais, por sua vez, convertem-nas em sinais elétricos que são amplificados e transferidos a processadores matemáticos. O feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionado com o tamanho celular (*forward light scatter* - FSC), enquanto aquele que capta o desvio ortogonal aos eixos do fluido celular e do raio laser (*side light scatter* - SSC), relaciona-se com a complexidade interna da célula, em particular sua granularidade (Macey, 1994; Robinson, 1993; Shapiro, 1985).

1.7 REGIÕES NUCLEOLARES CORADAS PELA PRATA – AgNOR

Regiões nucleolares organizadas (NOR) são alças de DNA localizadas nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos humanos 13, 14, 15, 21 e 22, as quais codificam RNA ribossomal (Crocker, 1990, 92; Derenzini e Ploton, 1991; Mamaev e Mamaeva, 1990). Durante a intérfase, um NOR origina um nucléolo (Junera *et al.*, 1995), cujo tamanho e forma variam entre diferentes tipos celulares e mesmo entre células iguais, em função do estado de proliferação celular (Goodpasture e Bloom, 1975).

A técnica de impregnação pela prata (Goodpasture e Bloom, 1975; Howell e Black, 1980; Ploton *et al.*, 1986) para demonstração de NOR (AgNOR) é empírica e, aparentemente, forma complexos entre proteínas nucleolares diferentes das histonas, mas envolvidas na regulação da transcrição ou processamento do transcrito primário, localizadas dentro dos nucléolos, e a prata (Crocker, 1990, 92; Derenzini e Ploton, 1991; Mamaev e Mamaeva, 1990). As duas proteínas envolvidas na biogênese ribossomal, nucleolina e B23 (Tuteja e Tuteja, 1998), parecem ser o principal substrato para a reação de coloração em células interfásicas (Roussel e Hernandez-Verdun, 1994).

A impregnação pela prata foi originalmente utilizada para demonstrar NOR de cromossomos, para avaliar sua função e para a identificação de cromossomos em preparações citogenéticas (Goodpasture e Bloom, 1975). A técnica foi simplificada e aplicada a secções histológicas por Ploton e colaboradores (1986) e, subseqüentemente, popularizada especialmente por Crocker (1990). Os AgNOR podem ser visualizados ao microscópio óptico como pontos castanhos ou negros,

bem definidos, que, nas células interfásicas, estão localizados exclusivamente nos nucléolos (Derenzini *et al.*, 1990; Derenzini e Ploton, 1991).

O número de NOR expressos pelos tecidos parece estar relacionado à taxa de proliferação e diferenciação celulares, assim como à transformações neoplásicas (Crocker, 1990, 92; Derenzini e Ploton, 1991; Dervan *et al.*, 1989; Hall *et al.*, 1988; Hall e Levison, 1990; Leek *et al.*, 1991; Mamaev e Mamaeva, 1990; Raymond e Leong, 1989; Trere *et al.*, 1991; Trere *et al.*, 1989), ou seja, parece estar relacionado à atividade mitótica (Ivanyi *et al.*, 1992). Neste contexto, Crocker e outros pesquisadores têm demonstrado sua utilidade no diagnóstico de patologias pela demonstração do potencial neoplásico e para avaliação do prognóstico e agressividade de neoplasmas malignos (Cardillo, 1992; Crocker, 1990, 92; Derenzini e Ploton, 1991; Derenzini *et al.*, 1988; Mamaev e Mamaeva, 1990; Raymond e Leong, 1989; Trere *et al.*, 1991). Por exemplo, foi demonstrado que células cancerosas de próstata são caracterizadas por número elevado de AgNOR, comparados às células benignas ou hiperplásicas correspondentes (Ploton *et al.*, 1986).

Estabeleceu-se, também *in vitro*, a correlação inversa entre o tamanho dos AgNOR e o tempo de duplicação celular (Derenzini *et al.*, 1990; Ofner *et al.*, 1992; Trere *et al.*, 1989). Estas observações foram confirmadas em modelos animais, onde a diminuição de AgNOR contrasta com o aumento do tempo de duplicação de massa tumoral em ratos atímicos (Trere *et al.*, 1997). Mais recentemente, modulação experimental da duração do ciclo celular pela temperatura demonstrou que o tamanho dos AgNOR diminui quando o ciclo celular é estendido (Canet *et al.*, 2001), sugerindo que seu tamanho pode ser um marcador da velocidade do ciclo celular.

Três métodos têm sido usados para a avaliação quantitativa de AgNOR: método manual de contagem, método morfométrico e análise por citometria de fluxo. O método manual de contagem consiste na enumeração dos precipitados argênticos diretamente observados ao microscópio de luz em aumento de 1000x (Trere, 2000); neste contexto, Crocker e colaboradores recomendam considerar como um único AgNOR todos os precipitados que não podem ser resolvidos como NOR individuais (Crocker *et al.*, 1989). Já o método morfométrico consiste de medida automática ou semi-automática da área ocupada pelas estruturas impregnadas pela prata através de análise de imagem computadorizada (Trere *et al.*, 1995). Mais recentemente, Jacquet e colaboradores usaram a citometria de fluxo para caracterizar a presença e o tamanho de AgNOR (Jacquet *et al.*, 2001), uma vez que essa metodologia tem a capacidade de definir com maior precisão do que as outras, populações de acordo

com o seu tamanho (FSC), além da sua complexidade interna (SSC), como anteriormente descrito.

De especial interesse, os produtos extraídos de plantas medicinais continuam a representar uma diversidade química única, a qual continuará a ser uma fonte importante de compostos-modelo para programas de investigação clínica, iniciados a partir da observação das espécies de plantas regionais popularmente utilizadas. Devido à importância do gênero *Baccharis* destacada nesta introdução e aos poucos relatos sobre atividades biológicas de seus óleos essenciais, as espécies *B. articulata*, *B. crispa*, *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana* tornaram-se alvo de nosso interesse no sentido de explorar o potencial medicinal desses óleos em ensaios *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar atividades biológicas *in vitro* de óleos essenciais de *Baccharis articulata*, *B. crispa*, *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana*, Asteraceae, espécies de carquejas de uso medicinal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a toxicidade dos óleos essenciais sobre leucócitos humanos

- ✓ Verificar os efeitos dos óleos essenciais de espécies *Baccharis* sobre a quimiotaxia espontânea de granulócitos e naquela induzida por caseína

- ✓ Avaliar o potencial imunomodulatório dos óleos essenciais de espécies *Baccharis* sobre a transformação blástica e proliferação de linfócitos humanos, basal e estimulada por fitohemaglutinina

- ✓ Investigar atividades antibacterianas dos óleos essenciais de espécies de *Baccharis* contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, usando o método de difusão em ágar.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho são de procedência Merck, Sigma ou Reagen, salvo indicação contrária. Para o preparo das soluções, utilizou-se água obtida pelo sistema Puritech / Permuton.

As soluções foram preparadas e em seguida esterilizadas (1) por calor úmido (autoclavação a 121°C, trinta min, 1atm) ou (2) por filtração (0,22µm – Acrodisc) e, posteriormente, armazenadas em temperaturas apropriadas para sua conservação (temperatura ambiente – T.A., 4 - 8°C ou a -20°C), ao abrigo de luz, conforme indicado.

3.1 SOLUÇÕES

Solução salina fisiológica

Cloreto de sódio 150mmol/l em água.

Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) (Dacie e Lewis, 1995)

A solução tampão foi preparada dissolvendo-se $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (150mmol/l), Na_2HPO_4 (150mmol/l) e NaCl (154mmol/l) em água. Após ajuste do pH para 7,2 – 7,4 com solução de NaOH 1N, procedeu-se à esterilização por autoclavação e armazenamento a 4 – 8°C.

Solução de azul de tripano a 0,4% (p/v)

Azul de tripano em solução salina tamponada com fosfatos.

PBS suplementado (PBSs)

PBS foi suplementado, em condições assépticas, na hora do uso, com soro albumina bovina (BSA) 0,25% (p/v), glucose 0,1% (p/v), CaCl_2 (0,9mmol/l) e MgCl_2 (0,5mmol/l).

Solução hemolisante de Gey

Solução A: NH_4Cl (654,20mmol/l), KCl (24,83mmol/l), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (6,53mmol/l), KH_2PO_4 (0,88mmol/l), glucose (27,77mmol/l), vermelho de fenol (0,05g/l).

Solução B: $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2,06mmol/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,56mmol/l), CaCl_2 (3,42mmol/l).

Solução C: NaHCO₃ (26,78mmol/l).

O pH de cada solução foi ajustado para 7,2 – 7,4 com solução de NaOH 1N e os reagentes foram conservados a 4°C. No momento do uso, a solução hemolisante foi preparada na proporção de 4:1:1:14 para as soluções A, B, C e água, respectivamente.

Solução de caseína a 5 % (p/v) (Siddiqui *et al.*, 1999)

Caseína em pó foi dissolvida em PBS (50mg/ml) e aquecida a 56°C por dez min. A solução foi resfriada rapidamente a 4°C, centrifugada a 1300g por cinco min para remoção de partículas insolúveis, fracionada em alíquotas e armazenada à temperatura de -20°C, sendo descongelada apenas na hora do uso.

Meio RPMI 1640

RPMI 1640 (Gibco) em pó foi dissolvido em água conforme instruções do fabricante e suplementado com 3g/l de bicarbonato de sódio. O meio foi, então, esterilizado por filtração, usando-se o sistema a vácuo Sterifil, Millipore, com filtro de 0,22 µm de diâmetro.

Meio RPMI suplementado com 10% (v/v) de soro humano

No momento do uso, soro humano obtido de uma mistura de soros provenientes de sangue de, pelo menos, vinte doadores, foi acrescentado ao meio RPMI 1640, na proporção de 1:10, em condições de esterilidade.

Meio com fitohemaglutinina (M-PHA)

Meio para cariótipo comercial (Cultilab, Campinas/SP), contendo PHA em RPMI 1640, HEPES e soro fetal bovino; conservado a temperatura de -20°C e ao abrigo de luz, conforme instruções do fabricante.

Solução de H₂SO₄ 1% (v/v)

Ácido sulfúrico P.A., na proporção de 1:100 em água.

Fixador de *Carnoy*

Etanol absoluto, clorofórmio e ácido acético foram misturados na proporção de 6:3:1, respectivamente e, mantidos em temperatura ambiente.

Solução de Gelatina

Gelatina 2% (Sigma) (p/v) foi dissolvida em solução de ácido fórmico 1% (v/v) e, após vinte minutos a temperatura ambiente, a solução foi filtrada em papel de filtro Inlab tipo 30, no mesmo dia do uso.

Solução de Nitrato de prata

Nitrato de prata 50% (p/v) foi dissolvido em água destilada, imediatamente antes do uso.

Solução de Trabalho

Solução foi preparada no momento do uso através da mistura de uma parte da solução de gelatina 2% com duas partes da solução de nitrato de prata 50%.

Solução de Hipossulfito de Sódio

Hipossulfito de sódio 5% (p/v) foi dissolvido em água destilada e a solução foi mantida a temperatura ambiente.

Solução de Verde de Malaquita

Verde de Malaquita 3% (p/v) foi dissolvido em água destilada e a solução foi mantida a temperatura ambiente.

3.2 ENSAIOS DE SOLUBILIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais foram extraídos das partes aéreas floridas de *B. dracunculifolia* D.C., coletada na região de Vila Velha, Ponta Grossa em fevereiro de 2002; *B. articulata* (Lam.) Pers., em Campo Magro, em setembro de 2001; *B. crispera* Sprengel., em Campo Largo, em fevereiro de 2002; e *B. gaudichaudiana* D.C., na localidade de Inácio Martins, em outubro de 2001, todos no estado do Paraná. Os exemplares foram submetidos à confecção de exsiccatas, identificadas por especialistas e os representantes equivalentes estão registrados no Herbário do Instituto de Ciências Naturais da UFRGS sob os seguintes números: *B. dracunculifolia* – ICN n.º 122946, *B. articulata* – ICN n.º 122945, *B. crispera* – ICN n.º 122944 e *B. gaudichaudiana* – ICN n.º 122943. O material coletado foi devidamente processado para a realização do estudo morfo-anatômico e dos métodos de análise de fármacos vegetais. Cem gramas das partes aéreas secas em estufa a 40°C e fragmentadas foram submetidas à destilação por arraste a vapor pelo aparelho de

Clevenger para essências menos densas que a água por aproximadamente 5 horas. Os óleos essenciais obtidos foram, então, tratados com sulfato de sódio anidro para retirada de umidade residual e armazenados em frascos âmbar a 4°C.

Testes para avaliar a solubilidade dos óleos essenciais das espécies de *Baccharis* incluídas neste trabalho foram realizados com PBS acidificado com HCl (pH=6,8), acetona, etanol e dimetilsulfóxido (DMSO).

Diluições seriadas foram realizadas nos solventes, em PBS, PBSs e RPMI 1640 suplementado. Na escolha dos solventes, levou-se em consideração que ensaios posteriores seriam realizados em meio aquoso e com a utilização de células sanguíneas humanas. As diluições dos óleos essenciais para a realização das análises subsequentes sempre foram preparadas imediatamente antes do uso.

3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para avaliação do efeito da temperatura sobre a volatilidade dos compostos químicos presentes no óleo essencial de *B. dracunculifolia*, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para tanto, o óleo essencial foi diluído em etanol (5µl/ml) e incubado a 37°C durante cinco dias em placa estéril de 96 cavidades. As análises foram realizadas antes (1º dia) e após três e cinco dias de incubação a 37°C, utilizando-se o equipamento Varian, bomba Prostar 210 (série 02038), detector UV-VIS Prostar 320 (série 01453), módulo organizador, válvula rheodyne, Programa Workstation Star 6.0. A coluna utilizada foi Microsorb-MV 100 C-18 de 250 mm, tamanho de partícula de 5µm e diâmetro interno de 4,6mm. O *loop* utilizado foi de 20 µl. Foram utilizados reagentes grau HPLC, sendo a fase móvel constituída de água:acetonitrila (11:9) (Sharma e Sharma, 2001), a qual foi sonicada durante trinta minutos antes do procedimento experimental. As amostras foram analisadas em 209, 217 e 237nm, com fluxo de 1ml/min, durante 120 minutos, após varredura entre 200 e 400 nm. As análises sem incubação (controle) e após cinco dias de incubação a 37°C foram realizadas no mesmo dia, portanto, nas mesmas condições experimentais.

3.4 OBTENÇÃO DE LEUCÓCITOS HUMANOS

O protocolo para obtenção de leucócitos humanos foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob registro CEP/SD: 039.SI.003/04-01 e aprovado em abril de 2004.

Amostras de sangue periférico de indivíduos voluntários sadios (10ml), após consentimento informado, colhidas em seringas estéreis e anticoaguladas com heparina, foram utilizadas para obtenção das diferentes populações de leucócitos humanos.

3.4.1 Separação das populações de leucócitos humanos

Células mononucleares (MNC: linfócitos e monócitos) foram separadas dos granulócitos (GNC: polimorfonucleares, eosinófilos e basófilos) por meio de centrifugação, usando-se *Ficoll-Paque*TM*PLUS* 1,077g/cm³ (Amersham, Biosciences). Após centrifugação a 200g por dez minutos a T.A., o plasma rico em plaquetas foi retirado e o volume original reconstituído com PBS. Nova centrifugação a 800g por 25 minutos permitiu a separação do creme leucocitário, que foi submetido ao gradiente de densidade. Com centrifugação de 200g por trinta minutos a T.A., os MNC recuperados da interface do gradiente foram lavados duas vezes com PBS (800g/cinco minutos), ressuspensos em RPMI suplementado e a concentração ajustada para 10⁶ células/ml, após contagem em hemocítmetro de Neubauer. Os granulócitos recuperados do sedimento após lise dos eritrócitos com solução hemolisante de Gey, foram lavados duas vezes com PBS (800g/cinco minutos), ressuspensos em PBSs, enumerados com o auxílio de um hemocítmetro e sua concentração igualmente ajustada para 10⁶ células/ml.

3.5 VIABILIDADE E CITOTOXICIDADE CELULARES

A viabilidade dos leucócitos foi avaliada após o processo de isolamento e durante todas as etapas dos procedimentos metodológicos. Para tanto, usou-se o teste com azul de tripano (Merchant *et al.*, 1964). Populações de leucócitos isoladas como descrito anteriormente foram diluídas apropriadamente em solução a 0,4% (p/v) de azul de tripano em PBS e sua viabilidade observada ao microscópio de luz (Olympus CH30). As células discriminadas como viáveis apresentavam-se íntegras, brilhantes, incolores e redondas, enquanto que as não viáveis mostraram-se coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno.

A toxicidade dos óleos essenciais de *Baccharis* sobre leucócitos humanos foi avaliada usando-se concentrações crescentes das amostras (10 a 10⁻⁴ µl/ml) diluídas em solventes apropriados. Para MNC (10⁶ células/ml), as amostras foram incorporadas em etanol e incubadas por cinco dias, a 37°C, em atmosfera de 5-10% CO₂. Para GNC (10⁶ células/ml), as amostras foram incorporadas em DMSO e

incubadas a 37°C por somente cinco horas. Após o período de incubação, o efeito tóxico foi avaliado com solução de azul de tripano (1:2), como descrito para a viabilidade.

Quanto aos ensaios que envolviam citometria de fluxo, após o período de incubação, a viabilidade dos MNC foi observada de acordo com a variação dos seus parâmetros físicos detectados no citômetro, considerando que células mortas e restos celulares possuem pequeno tamanho (baixo FSC; ≤ 180) e complexidade interna média (SSC) quando comparados a células vivas e íntegras (FSC > 200). A comparação foi realizada entre células MNC do controle em RPMI suplementado e a mesma população incubada na presença de diferentes concentrações dos óleos essenciais, localizadas na região R3 dos gráficos de citometria (ver seção de Resultados).

3.6 PREPARO DE CITOCENTRIFUGADOS

Para observação da composição das frações celulares ensaiadas, citocentrifugados contendo 8×10^4 células foram preparados através de centrifugação da suspensão de leucócitos a 1500 rpm por cinco minutos em T.A., sob baixa aceleração, em citocentrífuga Cytopro™ (Wescor). Em seguida, as lâminas secas ao ar foram coradas com May-Grünwald-Giemsa (Dacie e Lewis, 1995) e as células diferenciadas e enumeradas com auxílio de um microscópio óptico. Fotografias foram obtidas usando-se o *software* IMAGE PRO PLUS acoplado ao microscópio.

3.7 COLORAÇÃO DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA

Lâminas contendo citocentrifugados secos ao ar foram recobertas completamente com corante de May-Grünwald por três minutos; posteriormente, o corante foi diluído com gotas de água destilada tamponada (pH 6,8) por um minuto. Em seguida, as lâminas foram recobertas com corante de Giemsa diluído em água tamponada (1:20) por quinze minutos e, finalmente, lavadas em água corrente e secas ao ar.

3.8 QUIMIOTAXIA DE GRANULÓCITOS

A quimiotaxia dos granulócitos foi observada em câmaras de Boyden (Lee *et al.*, 1999a; Wilkinson, 1988), sendo este ensaio realizado em duas etapas.

Na primeira série de experimentos, granulócitos humanos (2×10^5) separados por gradiente de densidade foram adicionados ao compartimento superior de câmaras de Boyden e expostos a concentrações crescentes dos óleos essenciais (10^{-2} a 10^{-4} $\mu\text{l/ml}$) incorporados em DMSO (Synth) e adicionados a PBS suplementado, localizados no compartimento inferior. Filtros de policarbonato isentos de polivinilpirrolidona (Nuclepore, Neuroprobe), com poros de $5\mu\text{m}$ de diâmetro, foram usados para separar os compartimentos. As câmaras foram, então, incubadas a 37°C por noventa minutos e o número de leucócitos que migraram ativamente para o compartimento inferior foram enumerados com o auxílio de um hemocítômetro.

Na segunda série de experimentos, os granulócitos foram pré-tratados com concentrações crescentes de óleo essencial (10^{-2} a 10^{-4} $\mu\text{l/ml}$) por trinta minutos, a 37°C . Em seguida, foram lavados (800g/cinco minutos), ressuspensos em PBSs, adicionados ao compartimento superior de câmaras de Boyden e estimulados a migrar contra um gradiente de 0,5% de caseína, presente no compartimento inferior do sistema. As câmaras foram, então, incubadas a 37°C por noventa minutos e o número de leucócitos que migraram para o compartimento inferior contados. Dexametasona (10^{-3}M) foi utilizada como controle de inibição do procedimento experimental.

O monitoramento do movimento espontâneo dos leucócitos (controle) e a influência do solvente sobre a migração de GNC foram realizados com adição de PBSs e DMSO, respectivamente, no compartimento inferior da câmara.

Os resultados estão expressos como porcentagem média de células recuperadas do compartimento inferior das câmaras em relação aos resultados obtidos para o PBSs (Controle) ou aquele induzido por caseína, na ausência de óleo essencial.

3.9 ENSAIOS DE IMUNOMODULAÇÃO

Para avaliar o efeito dos óleos essenciais das espécies de *Baccharis* sobre linfócitos, MNC (10^6 células/ml) foram incubados em RPMI 1640 (Gibco) contendo 10% (v/v) de soro humano e na presença de concentrações crescentes (10^{-2} a 10^{-4} $\mu\text{l/ml}$) dos óleos essenciais, em placas estéreis de 96 cavidades (TPP), a 37°C por cinco dias, em atmosfera de 5-10% de CO_2 (Bier, 1977). Em alguns experimentos, avaliou-se o efeito dos óleos essenciais sobre MNC na presença de mitógeno, adicionando-se 10% (v/v) do meio de cultura comercial denominado Meio para

Cariótipo enriquecido com fitohemaglutinina (Cultilab-Campinas/SP) à mistura (M-PHA). Cada ensaio foi realizado em triplicata e, como resultado de cada experimento, utilizou-se a média da triplicata.

Em alguns experimentos, concentrações específicas dos compostos testados foram adicionadas somente após 72 horas de incubação das suspensões de MNC com M-PHA e reincubadas por mais dois dias. Em outros, 10% de M-PHA foi adicionado às culturas de MNC previamente incubados com concentrações específicas dos compostos e reincubadas por mais quatro dias (ou 96 horas).

3.9.1 Ativação/proliferação de linfócitos avaliada por citometria de fluxo

Após incubação, as células MNC foram transferidas para tubos de ensaio apropriados e analisadas com um citômetro de fluxo modelo FACSCalibur, equipado com laser de Argônio (488nm) e detectores de dispersão para tamanho e complexidade interna, Becton & Dickinson. Para cada análise, eventos foram adquiridos por 45 segundos na velocidade média em escala linear e gráficos, baseados no tamanho (FSC - *forward light scatter*) e na complexidade interna (SSC - *side light scatter*) das células, foram construídos. Delineou-se janelas discriminatórias para as populações de linfócitos (R1), blastos (R2) e células mortas/debris celulares (R3). Os dados foram analisados usando-se o *software* WinMDI 2.8.

O efeito proliferativo foi avaliado através do índice de proliferação (IP) (Gaines *et al.*, 1996), onde a média aritmética das triplicatas (X) dos valores obtidos por ensaio foram aplicadas como a seguir:

$$IP = \frac{X \text{ (células detectadas em R2)}_{\text{teste}}}{X \text{ (células detectadas em R2)}_{\text{controle}}}$$

A porcentagem de transformação blástica foi avaliada usando-se a média aritmética das triplicatas (X) dos valores obtidos, como a seguir:

$$TB (\%) = \frac{100 \text{ (células presentes em R2 - células presentes em R1)}}{\text{células presentes em R2}}$$

3.9.2 Ativação de linfócitos avaliada morfológicamente

A morfologia das células de citocentrifugados corados dos diferentes grupos foi observada sob imersão em microscópio de luz. Linfócitos foram reconhecidos por seu aspecto morfológico característico, apresentando-se como células arredondadas, pequenas, mantendo elevada relação núcleo-citoplasmática, citoplasma geralmente escasso, de coloração azul, ausência de granulação específica, núcleo arredondado e denso, com cromatina densa com agregados irregulares e eventual presença de estruturas semelhantes a nucléolos, porém mal definidos. Linfócitos transformados pela ação da fitohemaglutinina foram considerados como blastos ou linfoblastos e identificados como células maiores do que linfócitos não-ativados, citoplasma azul intenso, geralmente vacuolizado, com Complexo de Golgi desenvolvido, definido como a área não corada ao redor do núcleo; cromatina delicada, presença de dois ou mais nucléolos visíveis, proeminentes e delineados, com volume aumentado (Lee *et al.*, 1999a).

3.10 IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DE REGIÕES NUCLEOLARES ORGANIZADAS – AgNOR

Para a realização do ensaio de AgNOR, todo o material foi previamente desmineralizado, sendo a vidraria utilizada imersa em ácido nítrico 30% durante 24 horas e, posteriormente, lavada exaustivamente com água. Citocentrifugados preparados a partir da suspensão celular de MNC foram fixados em solução de Carnoy por trinta minutos. Em seguida, as lâminas foram recobertas com a Solução de Trabalho e mantidas a 37°C por 25 minutos. Após lavagem em água, foram imersas em solução de hipossulfito de sódio por 2,5 minutos; após nova lavagem, as mesmas foram mergulhadas em etanol absoluto por três minutos. Finalmente, o material foi contracorado com Solução de Verde de Malaquita por dez minutos. Após desprezar o corante e lavar as lâminas com água, as mesmas foram mantidas no escuro até sua leitura. A contagem de AgNOR foi realizada sob microscopia de imersão de acordo com os critérios sugeridos por Shome e Khurana (1999), ou seja:

AgNOR Tipo I: precipitados pequenos, arredondados e bem delimitados;

AgNOR Tipo II: precipitados maiores, disformes;

Complexa: presença das estruturas do Tipo I e Tipo II na mesma célula.

3.11 ATIVIDADE SOBRE O CRESCIMENTO BACTERIANO

A atividade dos óleos essenciais de *Baccharis* foi investigada frente às cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

3.11.1 Reativação da viabilidade e competência dos microorganismos

Cepas de bactérias mantidas a -20°C em glicerol:TSB (1:2) foram inoculadas em ágar Cled (Becton Dickinson) e incubadas a 36°C por 24 horas. Colônias isoladas foram, então, individualmente inoculadas em TSA inclinado (Becton Dickinson), incubadas a 36°C por 24 horas e mantidas em geladeira por até quatro semanas. A partir do TSA, foram feitos subcultivos em ágar Mueller Hinton (Oxoid) e, após 24 horas de incubação a 36°C , três a cinco colônias isoladas de cada bactéria foram transferidas para frasco contendo salina estéril e a concentração bacteriana ajustada de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

3.11.2 Teste de difusão em ágar

O teste de difusão em ágar foi realizado segundo metodologia descrita por Hindler (1998), com algumas modificações. A suspensão bacteriana, na concentração equivalente ao tubo 0,5 de McFarland, foi inoculada com auxílio de zaragatoa, homogeneamente, em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton. Os óleos essenciais diluídos em etanol (Carlo Erba Reagents), nas concentrações de 1,25 μl , 2,5 μl , 5 μl e 10 μl , foram colocados em discos de papel de filtro e distribuídos na superfície do meio. As placas foram refrigeradas a 4°C por trinta minutos, para facilitar a difusão dos óleos essenciais, e posteriormente incubadas a 36°C por 24 horas. Após o período de incubação, os halos de inibição que se desenvolveram foram medidos em milímetros, sendo incluído o diâmetro do disco (6mm). Os ensaios foram realizados em duplicata e os controles incluíram discos de antibióticos, para cada cepa de bactéria, recomendados pelo NCCLS (2005), além de um disco embebido em 10 μl de etanol, o qual foi utilizado como solvente para os óleos essenciais nestes ensaios.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como a média \pm 1 erro padrão da média (EPM) quando $n \geq 3$, e como a média \pm 1 desvio padrão (DP), quando $n = 2$. Para análise estatística dos resultados, usou-se a Análise de Variância (ANOVA - *one way*); o teste *post hoc* empregado foi o teste de Tukey quando apropriado. Os cálculos foram realizados utilizando-se o *software* InStatSoft e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variabilidade de climas e regiões geográficas no Brasil favorece o desenvolvimento de uma flora variadíssima, sendo que um grande número dessas plantas são usadas na medicina popular com finalidade terapêutica específica e, dentre elas, somente cerca de 5% têm estudos farmacológicos descritos (Buss e Waigh, 1995).

No Brasil, como em todo o mundo, tem sido crescente o uso de plantas medicinais como terapia alternativa e/ou como suporte às terapias convencionais, principalmente pela maior circulação de informações na mídia, além de oferecerem menor custo e poucos, quando existentes, efeitos colaterais. Sabe-se que cerca de 80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento faz uso de produtos naturais para o tratamento de problemas primários de saúde (Mans *et al.*, 2000). Mesmo em países industrializados, uma grande porcentagem dos produtos farmacêuticos comercializados provém de produtos naturais (Eldin e Dunford, 2001). Assim, os produtos extraídos de plantas medicinais continuam a representar uma diversidade química única, a qual continuará a ser uma fonte importante de compostos-modelo para programas de investigação clínica, iniciados a partir da observação das espécies de plantas regionais popularmente utilizadas.

Pelo potencial biológico dos óleos essenciais de *B. articulata*, *B. crispa*, *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana*, como descrito na introdução deste trabalho, investigaram-se suas propriedades antiinflamatórias, imunomoduladoras e antimicrobianas.

4.1 ENSAIOS DE SOLUBILIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Como as metodologias experimentais escolhidas para avaliar as atividades biológicas dos óleos essenciais envolviam sistemas aquosos incompatíveis com a sua natureza, diluições em solventes orgânicos foram realizadas com a finalidade de maximizar a incorporação desses em meio aquoso. Para tanto, avaliaram-se os seguintes solventes: PBS, PBSs, PBS acidificado com HCl (pH=6,8), RPMI 1640 suplementado, acetona, etanol e DMSO, em diluições seriadas (1:2 a 1:20.000).

Enquanto não houve solubilização em PBS, PBSs, PBS acidificado com HCl ou RPMI 1640 suplementado, onde a solução tornou-se visivelmente prejudicada, com separação das fases óleo/água, os óleos essenciais foram pouco solúveis em acetona, deixando a solução final com aspecto opalescente. Entretanto, houve sua

total solubilização em etanol e DMSO. Dessa forma, as diluições seriadas que se fizeram necessárias foram sempre realizadas em DMSO ou em etanol.

4.2 EFEITO DA TEMPERATURA E DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO SOBRE A VOLATILIDADE DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis*

Óleos essenciais contêm uma variedade de compostos químicos, principalmente monoterpenos e sesquiterpenos não oxigenados e oxigenados, que diferem em volatilidade segundo sua estrutura e função química. Como nos ensaios biológicos propostos utilizar-se-ia leucócitos de sangue periférico que seriam mantidos na presença dos óleos essenciais por até cinco dias, a temperatura de aproximadamente 37°C, avaliou-se o perfil cromatográfico dos componentes do óleo essencial de *B. dracunculifolia*, espécie mais conhecida entre as estudadas neste trabalho, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A varredura espectral entre 200 e 400nm demonstrou a presença de compostos com absorção em 209, 217 e 237nm com o mesmo tempo de retenção. Entretanto, a melhor resolução foi obtida em 217nm. Dessa forma, este foi o comprimento de onda utilizado para se obter o perfil cromatográfico do óleo essencial de *B. dracunculifolia* após três e cinco dias de incubação a 37°C, e compará-lo com aquele obtido antes do ensaio.

Como ilustrado nos cromatogramas da Figura 2, a maioria dos picos presentes na amostra inicial (Figura 2-A) foi observada após três (Figura 2-B) e cinco dias (Figura 2-C), sendo que os principais estão listados na Tabela 3, de acordo com o tempo de retenção. Entretanto, a área total dos picos aumentou cerca de 2,1 vezes entre o primeiro e o quinto dias experimentais, indicando concentração desses constituintes ou por volatilização do solvente ou por volatilização de outros componentes que, indiretamente, contribuíram para a concentração daqueles detectados nesse comprimento de onda. De fato, análise individual desses picos demonstra que, dos dezoito listados, doze tiveram aumento da área relativa (picos 1-3, 5, 7-9, 13-17), enquanto somente seis diminuíram este parâmetro (picos 4, 6, 10-12, 18), elevando a área total desses cromatogramas de 83,9 para 91,5%.

Embora não se possa excluir o fato de que foram visualizados somente componentes detectados na região do ultravioleta, esses resultados sugerem, que nem a temperatura nem o período de incubação parecem interferir com a composição deste óleo essencial, ou seja, não implicam diferenças na constituição do óleo para análise e/ou ensaios.

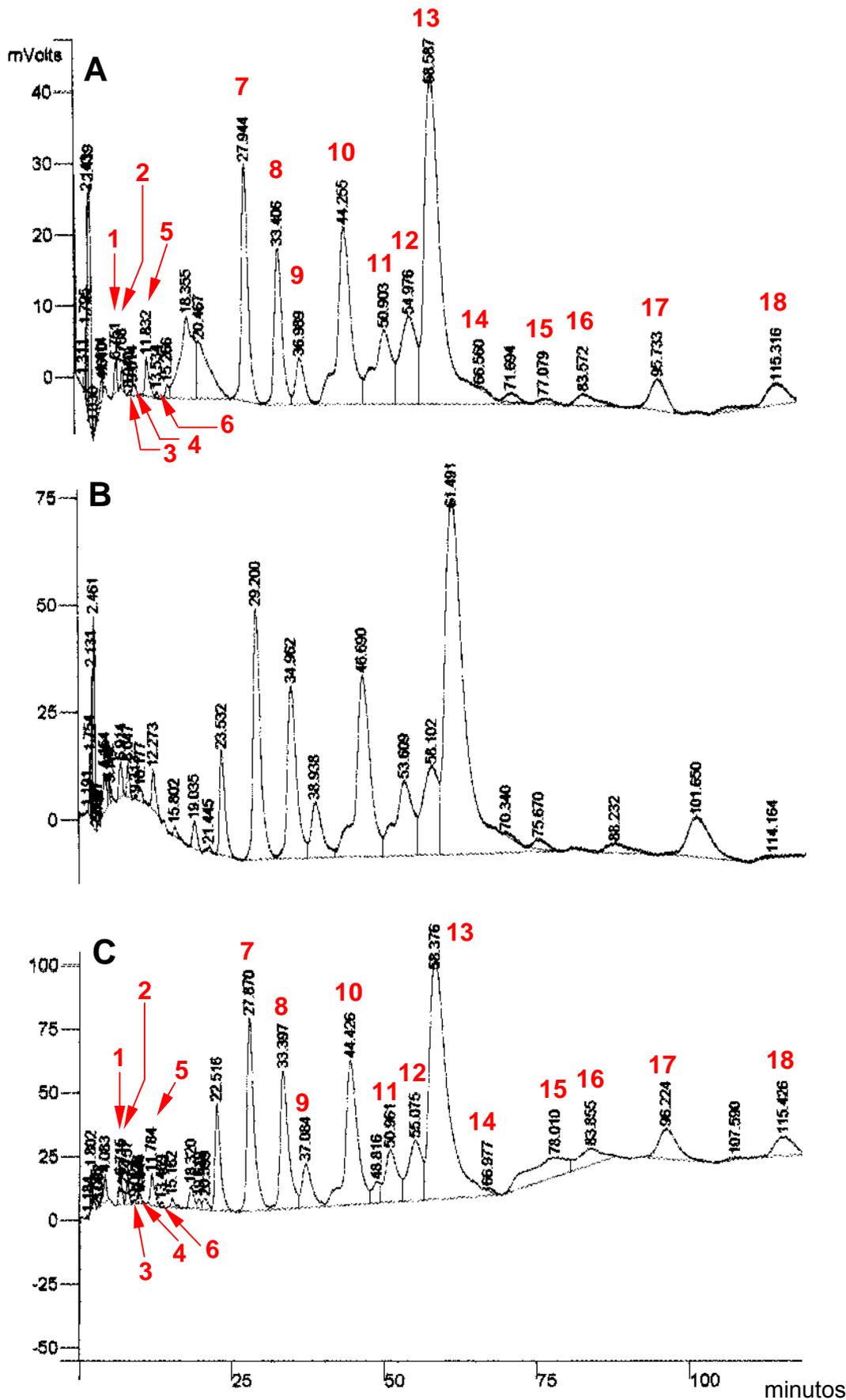


Figura 2. Efeito da temperatura e do período de incubação sobre os constituintes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*. Óleo essencial de *B. dracunculifolia*, na concentração de 5µl/ml em etanol, foi incubado por um período de 5 dias, a 37°C. Os cromatogramas representam o perfil obtido por CLAE, antes da incubação (A) e após 3 (B) e 5 (C) dias, em 217nm, com fase móvel água:acetoneitrila (11:9), coluna C18 e fluxo de 1ml/min, durante 120 min. Os picos numerados em vermelho correspondem aos descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Influência da temperatura sobre os componentes do óleo essencial de *B. dracunculifolia*.

Picos	Tempo de retenção (minutos)		Área (%)	
	1º dia	5º dia	1º dia	5º dia
1	6,751	6,715	0,4541	0,6052
2	7,768	7,757	0,2246	0,4960
3	8,940	9,021	0,0493	0,0731
4	9,614	9,526	0,2438	0,1146
5	11,832	11,784	0,8504	0,8946
6	13,534	13,469	0,0803	0,0778
7	27,944	27,870	8,3086	9,4952
8	33,406	33,397	6,4807	8,1083
9	36,989	37,084	2,1445	3,0401
10	44,255	44,426	12,9511	12,5956
11	50,903	50,961	7,0913	4,4910
12	54,976	55,075	7,4519	5,7170
13	58,587	58,376	30,3327	30,7068
14	66,560	66,977	0,1192	0,1258
15	77,079	78,010	0,3622	5,8209
16	83,572	83,855	1,3415	2,7277
17	95,733	96,224	2,6028	3,9214
18	115,316	115,426	2,8293	2,4979
	Área Parcial (%)		83,9183	91,5090

4.3 CITOTOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES E GRANULÓCITOS

A realização de ensaios biológicos de imunomodulação e quimiotaxia com leucócitos humanos exige, além de um solvente que permita a incorporação dos óleos essenciais em meio aquoso, testes preliminares para avaliação da citotoxicidade destes compostos. Neste contexto, o ensaio que utiliza o corante azul de tripano é muito útil, pois permite observar este efeito sobre as células em estudo, as quais possuindo membrana citoplasmática íntegra, com preservação da sua permeabilidade seletiva, excluem o corante (Merchant *et al.*, 1964). Assim, células viáveis, após alguns minutos de contato com o corante, apresentam-se incolores, esféricas e refringentes.

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade, quimiotaxia e imunomodulação, os leucócitos obtidos de sangue periférico de voluntários sadios foram divididos em duas populações, mononucleares (MNC) e granulócitos (GNC),

ambas obtidas após centrifugação com um gradiente de densidade. Como esperado, citocentrifugados corados dessas duas populações demonstraram que linfócitos e monócitos predominaram entre os MNC (>90%), enquanto neutrófilos e eosinófilos constituíram mais de 95% da fração dos GNC (n=11). Além disso, somente amostras contendo $\geq 90\%$ de células viáveis, após o processo de isolamento, foram utilizadas nos experimentos.

Dessa forma, leucócitos GNC e MNC foram expostos a concentrações crescentes de óleos essenciais (10 a 10^{-4} $\mu\text{l/ml}$) das espécies de *Baccharis* incluídas neste estudo e seus efeitos citotóxicos investigados sob microscopia de luz, após duas e cinco horas de incubação a 37°C para os GNC, tempo em que o ensaio de quimiotaxia é realizado e, para a população de MNC, após quatro e cinco dias de cultivo a 37°C sob atmosfera de 5-10% de CO_2 , tempo necessário para se avaliar a atividade imunomodulatória.

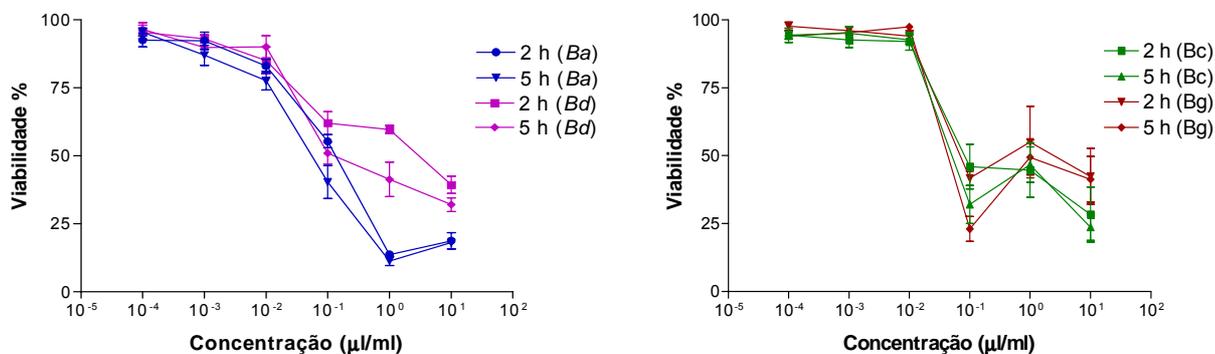
Como ilustrado na Figura 3A, todos os óleos essenciais demonstraram comportamento semelhante e, na concentração de $10\mu\text{l/ml}$ apresentaram citotoxicidade elevada para GNC, sendo a viabilidade de apenas $18,0\pm 1,2\%$ para *B. articulata*, $32,0\pm 2,5\%$ para *B. dracunculifolia*, $23,7\pm 4,9\%$ para *B. crispa* e, $41,3\pm 8,4\%$, para *B. gaudichaudiana*, após cinco horas de incubação (n=3). À $10^{-2}\mu\text{l/ml}$, o óleo essencial de *B. articulata* foi o que demonstrou maior toxicidade para GNC, com somente $77,6\pm 3,4\%$ de sua população mantendo-se viável. Já para *B. dracunculifolia* ($90,0\pm 4,2\%$), *B. crispa* ($92,7\pm 1,8\%$) e *B. gaudichaudiana* ($97,3\pm 0,9\%$), a viabilidade manteve-se superior a 90%. Concentrações de 10^{-3} e $10^{-4}\mu\text{l/ml}$ de óleo essencial demonstraram não influenciar a viabilidade dos GNC, os quais mantiveram-se com viabilidade semelhante à observada para o controle ($93,8\pm 2,2\%$), neste caso, na presença de 2% de DMSO, concentração final de solvente presente em todos os ensaios.

Quanto ao potencial tóxico apresentado pelos óleos essenciais em relação aos MNC, este foi mais evidente após cinco dias de incubação, onde uma viabilidade celular média de somente $5,3\pm 3,2\%$ foi registrada na presença de $10\mu\text{l/ml}$ de óleo essencial de *B. articulata*, enquanto a viabilidade, nesta concentração, foi de $1,5\pm 1,5\%$ para o de *B. dracunculifolia*, $0,7\pm 0,7\%$ para *B. gaudichaudiana*, e ausência de células viáveis na presença de óleo essencial de *B. crispa* (Figura 3B).

Em contraste, na presença de $10^{-2}\mu\text{l/ml}$ dos óleos essenciais de *B. articulata*, *B. dracunculifolia*, *B. crispa* e *B. gaudichaudiana*, a viabilidade média observada foi

de $79,0 \pm 5,1\%$; $83,5 \pm 5,8\%$; $90,0 \pm 2,3\%$ e $88,3 \pm 3,2\%$, respectivamente, enquanto o controle apresentou-se com $86,0 \pm 4,2\%$ de células íntegras.

A



B

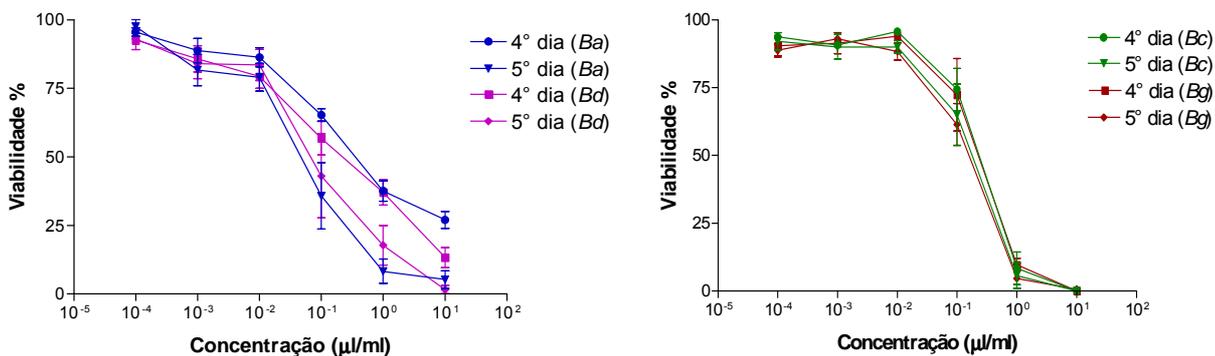


Figura 3. Citotoxicidade de óleos essenciais de espécies de *Baccharis* sobre leucócitos periféricos. Leucócitos obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis, após isolamento em gradiente de densidade, foram tratados com óleos essenciais de *B. articulata* (*Ba*), *B. dracunculifolia* (*Bd*), *B. crispa* (*Bc*) e *B. gaudichaudiana* (*Bg*) como indicado. Granulócitos (**A**) foram incubados por duas e cinco horas, enquanto que mononucleares (**B**) foram incubados por 4-cinco dias em atmosfera de 5-10% de CO_2 , ambos a 37°C . Os pontos representam a média \pm EPM, em porcentagem, de células viáveis verificada pelo teste com azul de tripano, de pelo menos três experimentos independentes. Viabilidade de $93,8 \pm 2,2\%$ para o controle de granulócitos, e de $86,0 \pm 4,2\%$ para o controle de células mononucleares.

Os resultados experimentais obtidos demonstraram que concentrações superiores a $10^{-2} \mu\text{l/ml}$ dos óleos essenciais de *Baccharis* são, de fato, tóxicas tanto para GNC como para MNC humanos.

A literatura relata estudos de citotoxicidade com óleos essenciais, principalmente sobre linhagens de células de carcinoma. Por exemplo, óleo essencial de *Backhousia citriodora* e citral, seu principal constituinte, mostraram-se tóxicos para células HepG2, derivada de hepatocarcinoma, e para F1-73, fibroblastos provenientes de células normais da pele (Hayes e Markovic, 2002). Em contraste, o óleo essencial de *Heteropyxis dehniae*, cujos principais constituintes são linalool, 4-terpineol, α -terpineol e cariofileno, não apresentou citotoxicidade para células SK-MEL-28 de melanoma humano ou células 5637 de carcinoma humano (Sibanda *et al.*, 2004).

Embora os dados apresentados favoreçam o uso dos óleos essenciais para estudos biológicos com células humanas, é preciso ressaltar que resultados de experimentação *in vitro* não devem ser comparados com a dinâmica de um organismo vivo, pois neles têm-se um acúmulo de metabólitos no meio de cultura, os quais, devido à ausência das vias de biotransformação e excreção como normalmente ocorre *in vivo*, não podem ser eliminados do sistema, causando efeito nocivo que pode superestimar a toxicidade de substâncias (Hayes e Markovic, 2002).

4.4 QUIMIOTAXIA DE GRANULÓCITOS INDUZIDA POR CASEÍNA

Como revisto na introdução, a resposta inflamatória envolve várias etapas, com o objetivo maior de recrutar populações celulares distintas, capazes de eliminar o agente causal, com concomitante reparo do tecido lesado. Quando este processo torna-se exacerbado, ultrapassando os seus efeitos salutares, há a necessidade de se usar agentes que interfiram em uma ou mais dessas etapas.

Os neutrófilos formam a primeira linha de defesa do hospedeiro, sendo as primeiras células a chegar nas áreas de lesão. Aí, desempenham inúmeras funções com a finalidade de eliminar o agente agressor. A locomoção por si só envolve uma série de fases, incluindo alterações das propriedades de adesividade, de forma e de orientação da célula em estudo.

Neste trabalho em particular, investigou-se o potencial dos óleos essenciais de *Baccharis* em interferir no recrutamento de fagócitos, etapa fundamental da resposta inflamatória.

Como ilustrado na Figura 4, os óleos essenciais, independente da concentração, parecem não ser dotados da habilidade de atrair granulócitos humanos, tendo comportamento semelhante à população exposta ao PBSs, em

contraste com a caseína (n=19), onde significativamente um número $2,4 \pm 0,15$ [$F(14,59)=19,30$; $p < 0,001$] vezes maior de células migraram para o compartimento inferior das câmaras em comparação a PBSs.

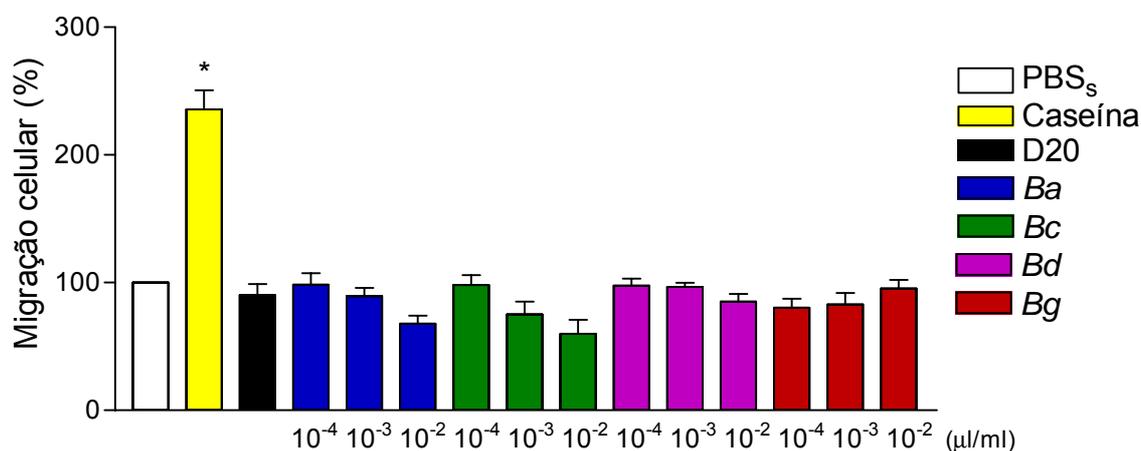


Figura 4. Avaliação do potencial quimiotático de óleos essenciais de espécies de *Baccharis* sobre granulócitos humanos. Granulócitos (GNC) obtidos de sangue periférico de doadores saudáveis foram expostos a gradiente de concentração de caseína (0,5%, p/v), DMSO 20μl/ml (D20), ou às concentrações indicadas de óleo essencial extraído de *B. articulata* (Ba), *B. crispa* (Bc), *B. dracunculifolia* (Bd) e *B. gaudichaudiana* (Bg), adicionadas ao compartimento inferior de câmaras de Boyden, por noventa minutos, a 37°C. As colunas representam a porcentagem média \pm EPM de GNC recuperados em relação à população não-estimulada (PBSs), normalizada em 100% (n = 3 a 19), * $p \leq 0,05$ em relação aos dados do PBS_s – ANOVA, seguida do teste de Tukey.

Entretanto, pré-tratamento de GNC humanos com concentrações crescentes dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e de *B. articulata* resultou em inibição significativa da quimiotaxia induzida por caseína, na concentração de 10^{-2} μl/ml, para ambas espécies (Figura 5), onde apenas $41,7 \pm 10,2\%$ [n=5; $F(14,47)=6,56$; $p < 0,01$] das células tratadas migraram para o compartimento inferior da câmara, enquanto $53,9 \pm 12,5\%$ [n=5; $F(14,47)=6,56$; $p < 0,05$] foram recuperados para *B. articulata*, sendo estatisticamente significativos quando comparados às populações tratadas com DMSO ($95,2 \pm 3,0\%$; n=5), solvente usado neste modelo experimental para incorporação dos óleos essenciais ao meio experimental. Este efeito inibitório foi, embora não significativo, inclusive, superior àquele demonstrado para a DEXA, droga usada frequentemente como padrão de inibição em estudos semelhantes

(Lomas *et al.*, 1991; Zentay *et al.*, 1999), onde $59,0 \pm 7,2\%$ [$n=8$; $F(14,47)=6,56$; $p < 0,01$] das células foram recuperadas.

Em contraste, os óleos essenciais de *B. crispa* e *B. gaudichaudiana* não demonstraram interferir na quimiotaxia de granulócitos induzida por caseína. Para o óleo essencial de *B. crispa*, $102 \pm 4,51\%$, $94,96 \pm 10,44\%$ e $88,26 \pm 9,66\%$ das células migraram para o compartimento inferior das câmaras de Boyden, enquanto que, para *B. gaudichaudiana*, observou-se os valores de $89,19 \pm 7,39\%$, $97,84 \pm 7,92\%$ e $101,29 \pm 15,89\%$, respectivamente, para as concentrações de 10^{-4} a 10^{-2} $\mu\text{l/ml}$.

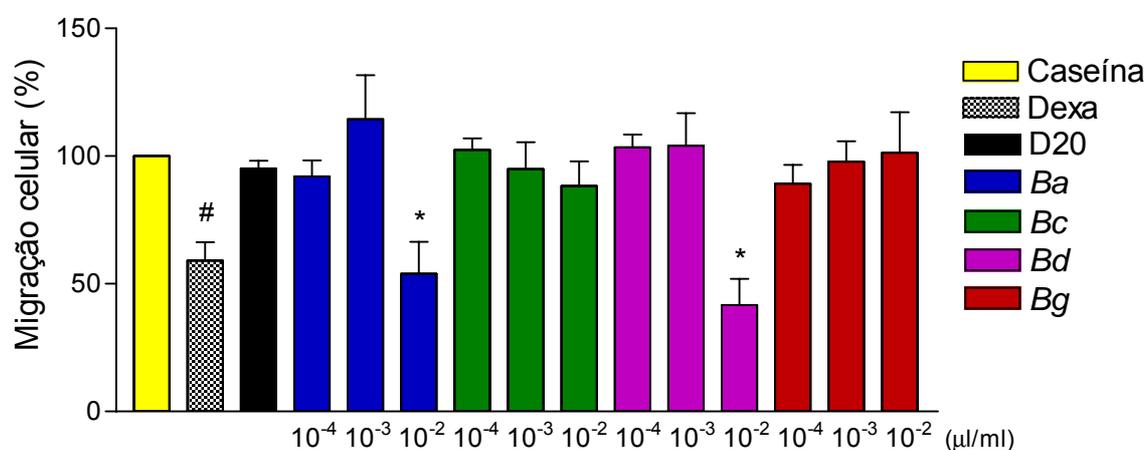


Figura 5. Efeito do pré-tratamento com óleos essenciais de espécies de *Baccharis* sobre a quimiotaxia de granulócitos induzida por caseína. Granulócitos obtidos de doadores saudáveis foram tratados, a 37°C , por trinta minutos, com as concentrações indicadas de óleo essencial de *B. articulata* (Ba), *B. crispa* (Bc), *B. dracunculifolia* (Bd) e *B. gaudichaudiana* (Bg) e induzidos a migrar, em câmara de Boyden, por noventa minutos, contra um gradiente de 0,5% (p/v) de caseína. Dexametasona (DEXA) foi utilizada como controle de inibição. Cada coluna representa a porcentagem média \pm EPM de células migradas em relação ao controle (sem tratamento), normalizada em 100% ($n=3-8$); $*p \leq 0,05$ em comparação às células migradas após tratamento com DMSO 20 $\mu\text{l/ml}$ (D20). # $p \leq 0,05$ em relação ao controle não-tratado – ANOVA, seguida do teste de Tukey.

Muitas plantas têm sido utilizadas na medicina tradicional pela sua eficiência em atenuar ou mesmo eliminar os efeitos indesejáveis da resposta inflamatória aguda, como tumor, calor e dor. Estudos de efeito antiinflamatório com óleos essenciais normalmente usam modelos *in vivo*. Por exemplo, óleos essenciais de três espécies de *Eucalyptus* demonstraram efeito antiinflamatório, inibindo a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida por carragenina

(Silva *et al.*, 2003). Recentemente, óleos essenciais de gerânio, limão e hortelã-pimenta suprimiram o recrutamento de leucócitos induzido pela injeção intraperitoneal de caseína em ratos (Abe *et al.*, 2004). Atividade antiinflamatória similar do óleo essencial de *Bupleurum fruticosens*, em modelo de indução de edema em pata de ratos por carragenina ou PGE1, foi atribuída ao α -pineno e ao β -cariofileno, componentes majoritários dessa fração (Martin *et al.*, 1993), enquanto a ação do óleo de *Bupleurum fruticosum* foi atribuída aos componentes α e β -pineno (Lorente *et al.*, 1989).

Aplicação cutânea em ratos de óleo essencial de gerânio, lavanda, eucalipto e melaleuca suprimiram a inflamação local, inibindo a acumulação de neutrófilos, da mesma forma como observado para geraniol e terpinen-4-ol, principais constituintes do óleo essencial de gerânio e melaleuca, respectivamente (Maruyama *et al.*, 2005).

Os resultados aqui apresentados mostraram que, das espécies estudadas, somente os óleos essenciais de *B. articulata* e *B. dracunculifolia* possuem a habilidade de interferir significativamente na quimiotaxia induzida por caseína. Dos componentes listados na Tabela 1, somente α -pineno, *p*-cimeno, terpinoleno, terpinen-4-ol e *cis*- β -guaieno foram detectados por CG nos óleos essenciais dessas duas espécies. Além disso, somente nessas espécies é que se observou concentração representativa de β -pineno e β -cariofileno. Assim, é possível que essas substâncias, isoladas ou em combinação, sejam as responsáveis pelos efeitos observados, embora a contribuição de outras substâncias nessa atividade não possa ser descartada.

A habilidade dos óleos essenciais de interferir na migração de granulócitos estimulada por caseína foi investigada em um sistema *in vitro*, específico para avaliar esta função. É possível que os resultados daí derivados possam apontar os compostos dos óleos essenciais como fontes importantes de substâncias antiinflamatórias a serem incorporadas em formas farmacêuticas adequadas para o tratamento de estados inflamatórios. Acrescente-se, ainda, o fato de que a caseína mobiliza GNC humanos interagindo com eles via receptores opióides, que se expressam abundantemente na membrana dessas células (Makman *et al.*, 1995; Pasotti *et al.*, 1992). Interessante seria investigar este efeito com outros agentes mobilizadores de granulócitos, que atuam em outros receptores, e observar se o mecanismo de inibição da quimiotaxia aqui observado se repete. Portanto, apesar dos óleos essenciais terem apresentado resultados sugestivos de sua participação na quimiotaxia, estudos mais aprofundados devem ser realizados por meio de

ensaios experimentais específicos que investiguem os mecanismos desses efeitos em nível molecular.

4.5 EFEITOS DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE *Baccharis* SOBRE A IMUNOMODULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

A estratégia utilizada para avaliar a proliferação de MNC por citometria de fluxo (CF), ilustrada com detalhes na Figura 6, baseou-se em conceitos clássicos que distinguem cada população particular de células presente na medula óssea ou no sangue periférico de acordo com seu tamanho (FSC – *forward side scatter*) e complexidade interna (SSC – *side light scatter*) (Civin e Loken, 1987) e no trabalho de Kristensen e colaboradores (1982), com algumas modificações.

A janela R1 foi, então, delineada de forma subjetiva para especificar a população de linfócitos (Figura 6A), caracterizados por baixos FSC e SSC, correspondente a células de pequeno tamanho e complexidade citoplasmática simples (Civin e Loken, 1987), conforme morfologia ilustrada na Figura 6C; a janela R2 foi traçada, também de forma subjetiva, para caracterizar células ativadas (Figura 6B), ou seja, aquelas que sofreram alteração morfológica, ou transformação blástica, conforme morfologia ilustrada na Figura 6D, e se deslocaram para uma região de maior complexidade e tamanho (linfoblastos), porém incluindo a janela R1. A janela R3 delimita uma região ampla, na qual dispõem-se granulócitos, por apresentarem elevada complexidade interna e variável tamanho, células não viáveis, além de debris celulares.

4.5.1 Efeitos do etanol e dimetilsulfóxido sobre a imunomodulação de linfócitos humanos *in vitro*

Dimetilsulfóxido e etanol são solventes amplamente utilizados para diluir ou incorporar componentes ou misturas de natureza não aquosa em meios de cultura para ensaios biológicos. Como anteriormente citado, foram os solventes que viabilizaram a incorporação dos óleos essenciais incluídos neste trabalho nos meios que seriam utilizados para o estudo de suas atividades biológicas. Dessa forma, para eliminar a hipótese de qualquer interferência desses solventes sobre os estudos que seriam realizados, seus efeitos sobre MNC humanos foram avaliados com relação à viabilidade e à multiplicação celular por citometria de fluxo, em

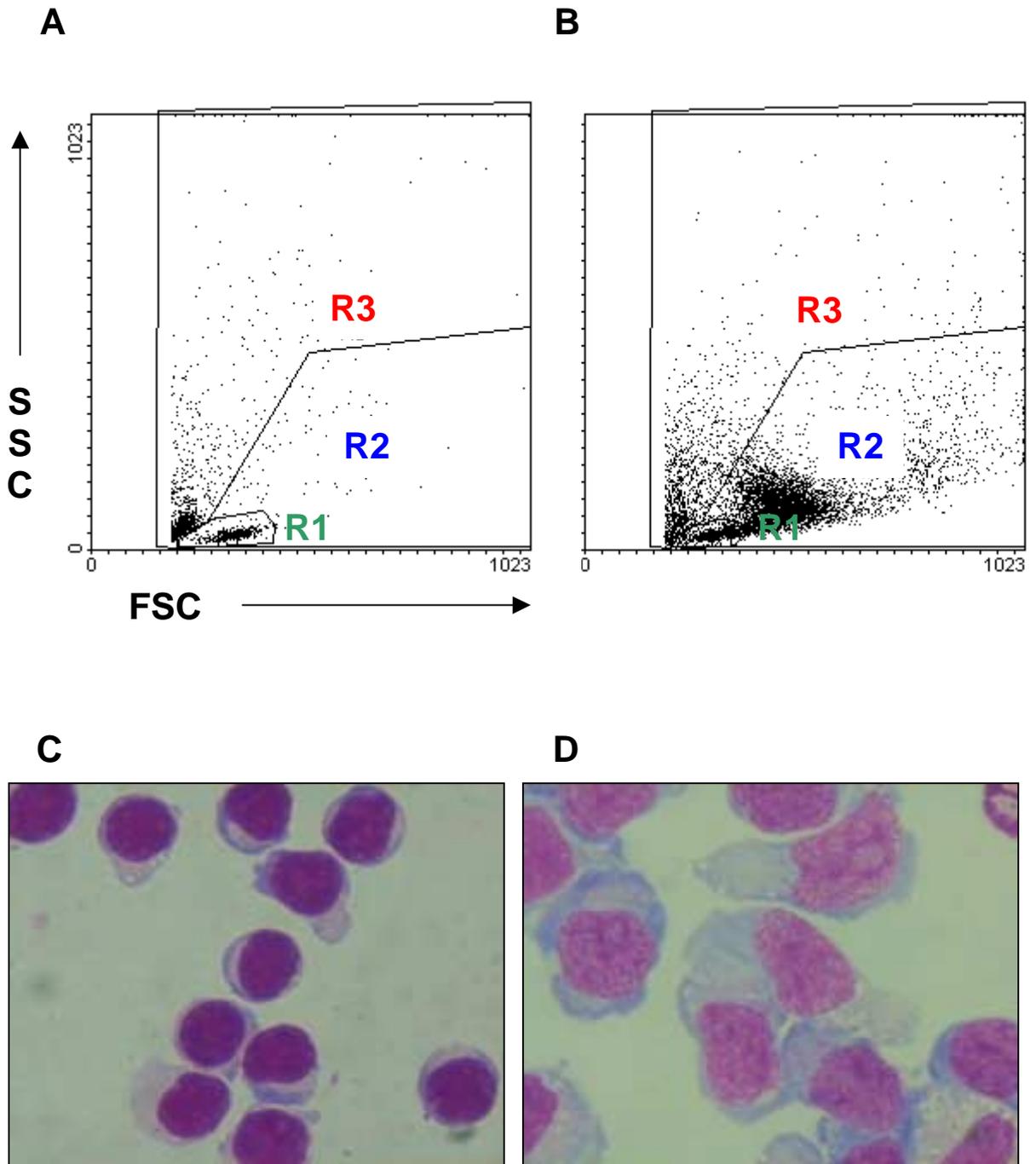


Figura 6. Representação gráfica em pontos para análise da atividade imunomodulatória de linfócitos por citometria de fluxo. Os gráficos representam populações de mononucleares, onde as características de tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) foram utilizadas para distinguir cada população e definir as regiões para avaliação da proliferação de linfócitos do grupo controle (**A**) e do grupo tratado, neste caso com fitohemaglutinina (**B**). **R1** denota a região delimitada para linfócitos não ativados, **R2** delinea a região para linfócitos ativados, que se transformam em linfoblastos, e **R3** delimita a área para granulócitos e debris celulares. Cada ponto representa uma célula detectada pelo sistema. Citocentrifugados preparados dessas populações e corados com May-Grunwald-Giemsa demonstraram populações predominantes de linfócitos (**C**) e blastos (**D**). (magnificação: 1000x)

relação à morfologia em citocentrifugados corados e em relação à quantificação de AgNOR. Para tanto, células mononucleares de sangue periférico humano foram expostos às concentrações de 10 (D10 ou E10) e 20 μ l/ml (D20 ou E20) de DMSO ou etanol, respectivamente, por serem os volumes finais desses solventes presentes no meio de cultivo experimental. Seus efeitos foram, também, avaliados sobre a proliferação de linfócitos estimulados por fitohemaglutinina (PHA).

A fitohemaglutinina, como esperado (Figura 8), foi capaz de promover significativamente a proliferação de linfócitos, com um índice de proliferação (IP) $5,49 \pm 0,7$ vezes maior em relação ao IP obtido para o controle não estimulado [n=8; $F(13,41)=7,79$; $p < 0,001$].

Para o DMSO, observou-se inibição dose-dependente sobre a proliferação basal de linfócitos (Figura 7), com um IP médio de $0,69 \pm 0,1$ e de $0,54 \pm 0,02$ [n=3; $F(4,10)=13,81$; $p < 0,01$], para 10 (D10) e 20 μ l/ml (D20) de DMSO, respectivamente, perfil que se reproduziu, porém com maior intensidade, na avaliação da proliferação de linfócitos estimulados por PHA (Figura 8), onde $2,05 \pm 0,8$ [n=3; $F(13,41)=7,79$; $p < 0,05$] e $0,84 \pm 0,1$ [n=3; $F(13,41)=7,79$; $p < 0,001$] de IP foram obtidos para as concentrações de 10 (D10+PHA) e 20 μ l/ml (D20+PHA), respectivamente. Para o etanol, os IP médios observados foram de $5,41 \pm 1,1$ (E10+PHA) e $4,37 \pm 0,9$ (E20+PHA), $1,1 \pm 0,06$ (E10) e $1,09 \pm 0,08$ (E20), respectivamente, para 10 e 20 μ l/ml, na presença ou não de PHA (n=3-4).

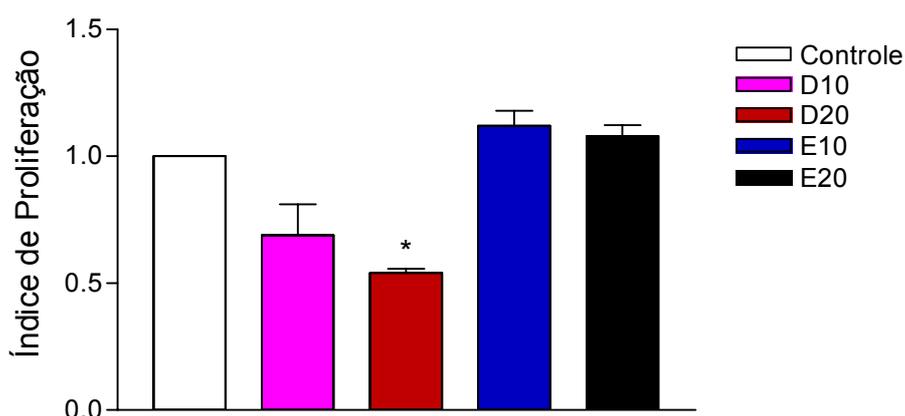


Figura 7. Efeito *in vitro* de etanol e DMSO sobre a proliferação basal de linfócitos humanos. Mononucleares obtidos de sangue periférico de voluntários sadios foram tratados com 10 ou 20 μ l/ml de DMSO (D) ou etanol (E) e incubados a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Cada coluna representa a média \pm EPM do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo DMSO ou etanol e o número obtido no Controle (MNC não-tratados) de células incubadas em RPMI suplementado de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$ em relação ao controle (ANOVA+Tukey).

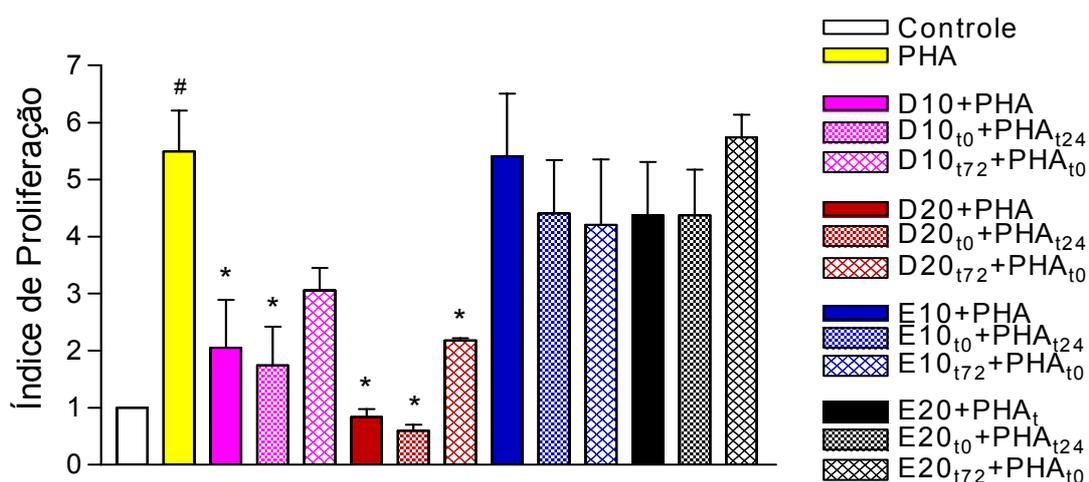


Figura 8. Efeito *in vitro* de etanol e DMSO sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina. Mononucleares (MNC) obtidos de sangue periférico, foram tratados com meio contendo fitohemaglutinina (PHA) e com 10 ou 20 μ l/ml de DMSO (D) ou etanol (E), e incubados a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos incubou-se suspensão de MNC com as concentrações indicadas dos solventes por 24 horas (t₂₄) e, após adicionou-se meio contendo PHA; em outros, incubaram-se as células com PHA por 72 horas e, em seguida, adicionou-se o solvente na concentração indicada (t₇₂). Cada coluna representa a média \pm EPM do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo DMSO ou etanol e o número obtido no Controle de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$ em relação a PHA. # $p \leq 0,05$ em relação ao controle (ANOVA + Tukey).

Simultaneamente, avaliou-se a transformação blástica por citometria de fluxo, através da porcentagem de células deslocadas da região R1 para a R2. Para as concentrações de 10 e 20 μ l/ml, os valores obtidos foram, respectivamente, 14,3 \pm 2,03% e 14,3 \pm 2,02% para o DMSO, e 11,1 \pm 2,78% e 14,1 \pm 3,04% para o etanol, enquanto para o controle, os resultados foram 18,8 \pm 4,46% (Figura 9). Ou seja, nas culturas realizadas para avaliação da proliferação linfocitária basal, a maioria das células, como esperado, manteve-se na região R1, independente da presença de solventes.

Já nas culturas onde o mitógeno foi acrescentado (Figura 10), observou-se que 83,4 \pm 2,0% das células deslocaram-se para a região R2 [$F(13,46)=44,90$; $p < 0,001$ em relação ao controle sem PHA]. O acréscimo de DMSO diminuiu a presença de células nessa região, com 75,4 \pm 0,9% delas, para a concentração de 10 μ l/ml, e 50,0 \pm 2,5% [$F(13,46)=44,90$; $p < 0,001$] para 20 μ l/ml. Para o etanol, nas concentrações de 10 e 20 μ l/ml, 86,9 \pm 3,4% e 83,5 \pm 4,2%, respectivamente, das células sofreram transformação blástica, migrando para R2.

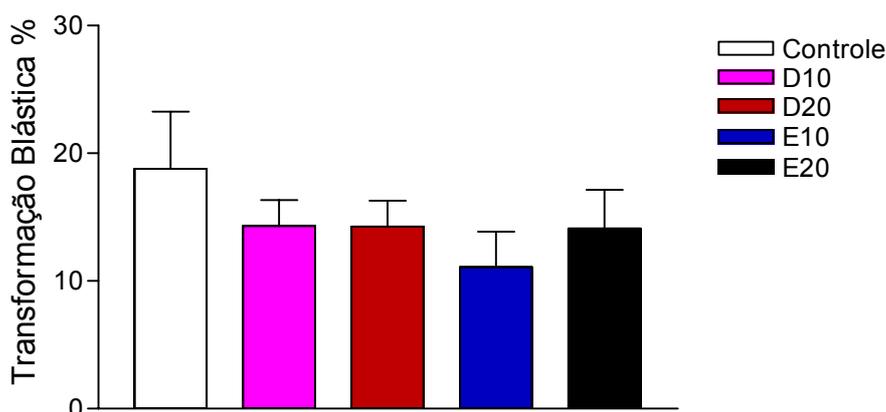


Figura 9. Efeito *in vitro* de etanol (E) e DMSO (D) sobre a transformação blástica de linfócitos humanos. Mononucleares obtidos de sangue periférico de voluntários saudáveis foram tratados com 10 e 20 μ l/ml dos solventes e incubados a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Cada coluna representa a porcentagem média \pm EPM dos valores resultantes da relação entre R1 e R2, descrita na sessão de Material e Métodos, obtidos por citometria de fluxo (n=3-6).

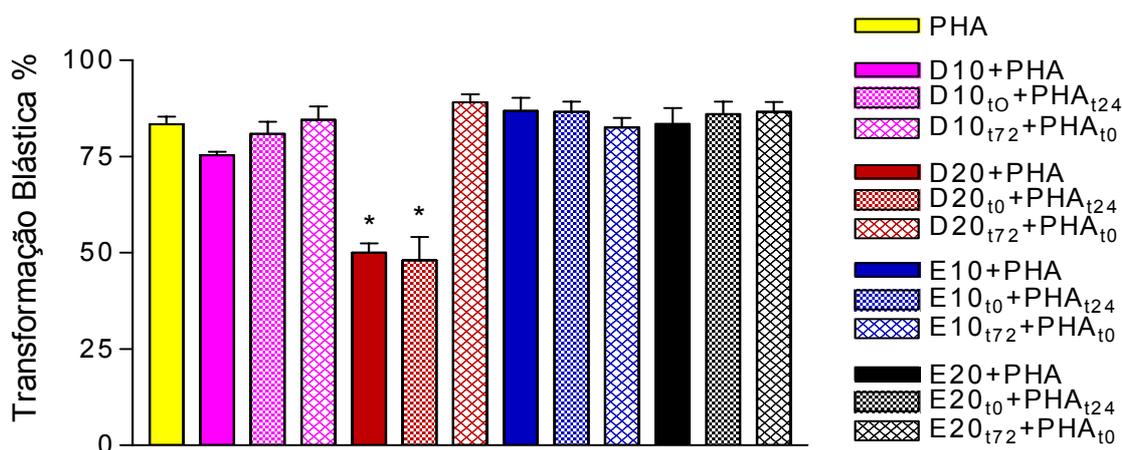


Figura 10. Efeito *in vitro* de etanol (E) e DMSO (D) sobre a transformação blástica de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina. Mononucleares (MNC) obtidos de sangue periférico foram tratados com fitohemaglutinina (PHA) e com 10 e 20 μ l/ml dos solventes, incubados a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos, incubou-se suspensão de MNC com as concentrações indicadas dos solventes por 24 horas (t₂₄) e, após adicionou-se meio contendo PHA; em outros, incubou-se as células com PHA por 72 horas e, em seguida, adicionou-se o solvente (t₇₂). Cada coluna representa a porcentagem média \pm EPM dos valores resultantes da relação entre R1 e R2, descrita na sessão de Material e Métodos, obtidos por citometria de fluxo (n=3-6). * $p \leq 0,05$ em relação a PHA.

Esses resultados foram confirmados pela análise morfológica das populações celulares em citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa e resumidos na Tabela 4, onde se observa predominância absoluta de linfócitos nas culturas sem mitógeno, principalmente naquelas onde somente DMSO foi adicionado.

Sendo a contagem de AgNOR paralela à atividade mitótica e estando correlacionada com a taxa de renovação celular (Ivanyi *et al.*, 1992), explorou-se este comportamento dos linfócitos na presença ou não de PHA, DMSO e etanol.

Uma nítida e significativa [$n=2$; $F(5,6)=122,00$; $p<0,001$] diferença no número médio de AgNOR por célula foi encontrada em linfócitos estimulados por mitógeno em relação aos não estimulados. Como ilustra a Figura 11, a grande maioria das células cultivadas na ausência de mitógeno apresentou somente um AgNOR ($1,05\pm 0,02$), fato que se reproduziu para linfócitos cultivados somente na presença de DMSO ou de etanol, independente da concentração. Entretanto, quando cultivados na presença de PHA, observou-se uma média de $2,9\pm 0,2$ AgNOR por célula (Figura 12).

Tabela 4. Influência de DMSO e etanol na morfologia de linfócitos humanos cultivados na presença ou não de fitohemaglutinina, avaliada em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa.

	Linfócitos (%)	Linfoblastos (%)	Linfócitos (%)	Linfoblastos (%)
MNC	89	11	-	-
PHA	16	84	-	-
	10µl/ml		20µl/ml	
DMSO	99	01	98	02
Etanol	92	08	89	11
DMSO + PHA	42	58	82	18
DMSO_{t0} + PHA_{t24}	36	64	88	12
DMSO_{t72} + PHA_{t0}	25	75	25	75
Etanol + PHA	10	90	15	85
Etanol_{t0} + PHA_{t24}	15	85	11	89
Etanol_{t72} + PHA_{t0}	20	80	11	89

Células mononucleares (MNC) obtidas de sangue periférico foram tratadas com as concentrações indicadas dos solventes, incubadas a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos, os MNC foram simultaneamente expostos a fitohemaglutinina (PHA); em outros, incubou-se MNC com as concentrações indicadas dos solventes por 24 horas e, em seguida, adicionou-se PHA; ainda, em outros, incubou-se as células com PHA por 72 horas e, em seguida, adicionou-se o solvente. A morfologia foi avaliada em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa, sob imersão em microscópio comum. Cada valor representa a porcentagem média de células obtidas de dois experimentos, onde um mínimo de 100 células por experimento foi observado.

Nossos resultados estão de acordo com vários estudos que relacionam a contagem e a morfologia de AgNOR, especialmente entre células normais e cancerosas. Neste contexto, Lee e colegas (1999b) relataram que linfócitos de sangue periférico apresentam cerca de um AgNOR por célula, sendo aproximadamente todos do mesmo tamanho e com morfologia arredondada. De fato, este tipo de morfologia foi observada para nossas culturas sem adição de mitógeno, ou seja, aquelas em que os linfócitos, por não sofrerem estimulação, apresentaram-se em absoluta maioria ($98,0\pm 2,8\%$) com morfologia tipo I (Figura 14A). Já, maior porcentagem de células com morfologia complexa [$20,5\pm 6,4\%$, $F(5,6)=208,15$; $p<0,05$] e do tipo II ($9,0\pm 0,0\%$), em detrimento da morfologia do tipo I [$70,5\pm 6,4\%$; $F(5,6)=208,15$; $p<0,001$], foi observada somente quando linfócitos foram cultivados na presença de PHA (Figura 14, B e C).

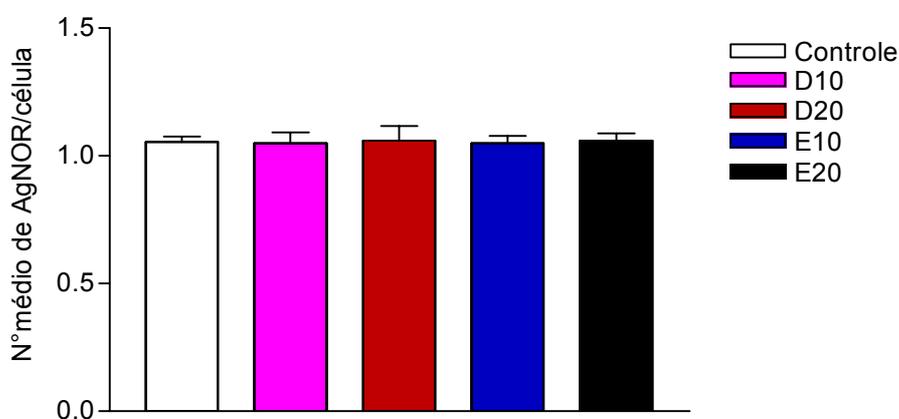


Figura 11. Efeito do DMSO e etanol sobre a formação de AgNOR em linfócitos humanos. Células mononucleares humanas foram incubadas por cinco dias a 37°C , na presença de 10 ou $20\mu\text{l/ml}$ de DMSO (D) ou etanol (E). Citocentrifugados foram corados para revelação de AgNOR, como descrito na sessão de Material e Métodos. As colunas representam o nº médio de AgNOR \pm DP por célula ($n=2$, experimentos independentes).

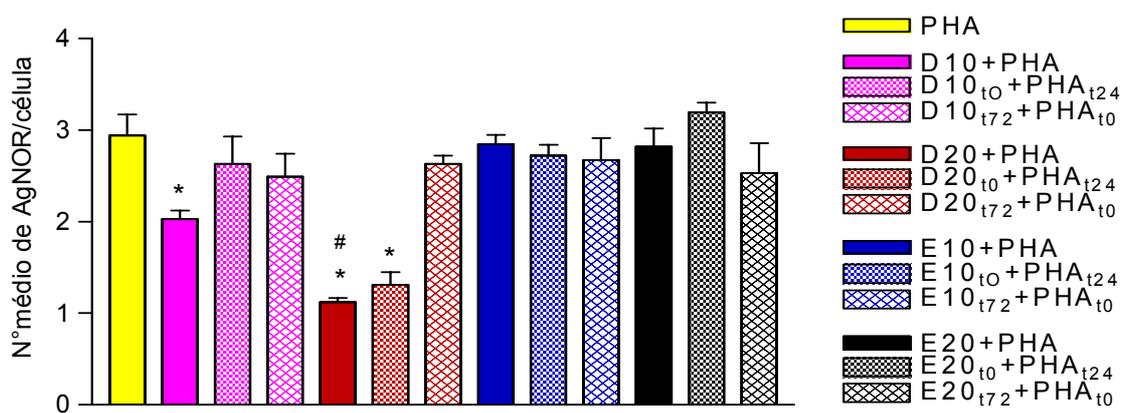


Figura 12. Efeito *in vitro* de etanol (E) e DMSO (D) sobre a formação de AgNOR em linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina. Mononucleares humanos foram incubados por cinco dias na presença de fitohemaglutinina (PHA), DMSO (D) ou etanol (E), 10 ou 20 μ l/ml. Citocentrifugados foram corados para revelação de AgNOR, como descrito na sessão de Material e Métodos. As colunas representam o n $^{\circ}$ médio de AgNOR \pm DP/célula (n=2, experimentos independentes). * $p \leq 0,05$ em relação a PHA. # $p \leq 0,05$ em relação a DMSO 10 μ l/ml acrescido de PHA (ANOVA + Tukey).

Com a finalidade de se esclarecer às diferenças de comportamento induzidas pelo DMSO, duas séries de experimentos foram realizadas onde, além da incubação simultânea na presença do mitógeno, concentrações específicas dos solventes foram adicionadas após 72 horas de incubação dos MNC com PHA. Em outros, PHA foi adicionada às culturas de MNC previamente incubadas por 24 horas com os solventes.

O IP obtido para MNC (Figura 8) incubados previamente com o DMSO e 24 horas depois acrescidos de PHA foi de $1,74 \pm 0,68$ [$F(13,41)=7,79$; $p < 0,05$] e $0,60 \pm 0,10$ [$F(13,41)=7,79$; $p < 0,001$], para 10 (D10_{t0}+PHA_{t24}) e 20 μ l/ml (D20_{t0}+PHA_{t24}), sendo ambos estatisticamente significativos em relação ao grupo tratado apenas com PHA, mas sem diferença em relação ao IP obtido na incubação concomitante do DMSO e PHA (D10 ou D20+PHA), cujos valores de IP foram de $2,05 \pm 0,8$ e $0,84 \pm 0,1$ para 10 e 20 μ l/ml, respectivamente. A transformação blástica também foi inibida: somente $48,1 \pm 6,1\%$ [$F(13,46)=44,90$; $p < 0,001$] de células ocuparam a região R2 quando 20 μ l/ml de DMSO foi incubado por 24 horas antes do acréscimo de PHA (Figura 10 – D20_{t0}+PHA_{t24}), com valor similar ao encontrado quando houve incubação simultânea (Figura 10 – D20+PHA). Estes resultados estão em concordância com os valores de IP obtidos, indicando, a princípio, uma provável atuação do DMSO nos mecanismos de ativação celular ou transformação blástica, de forma dose-dependente.

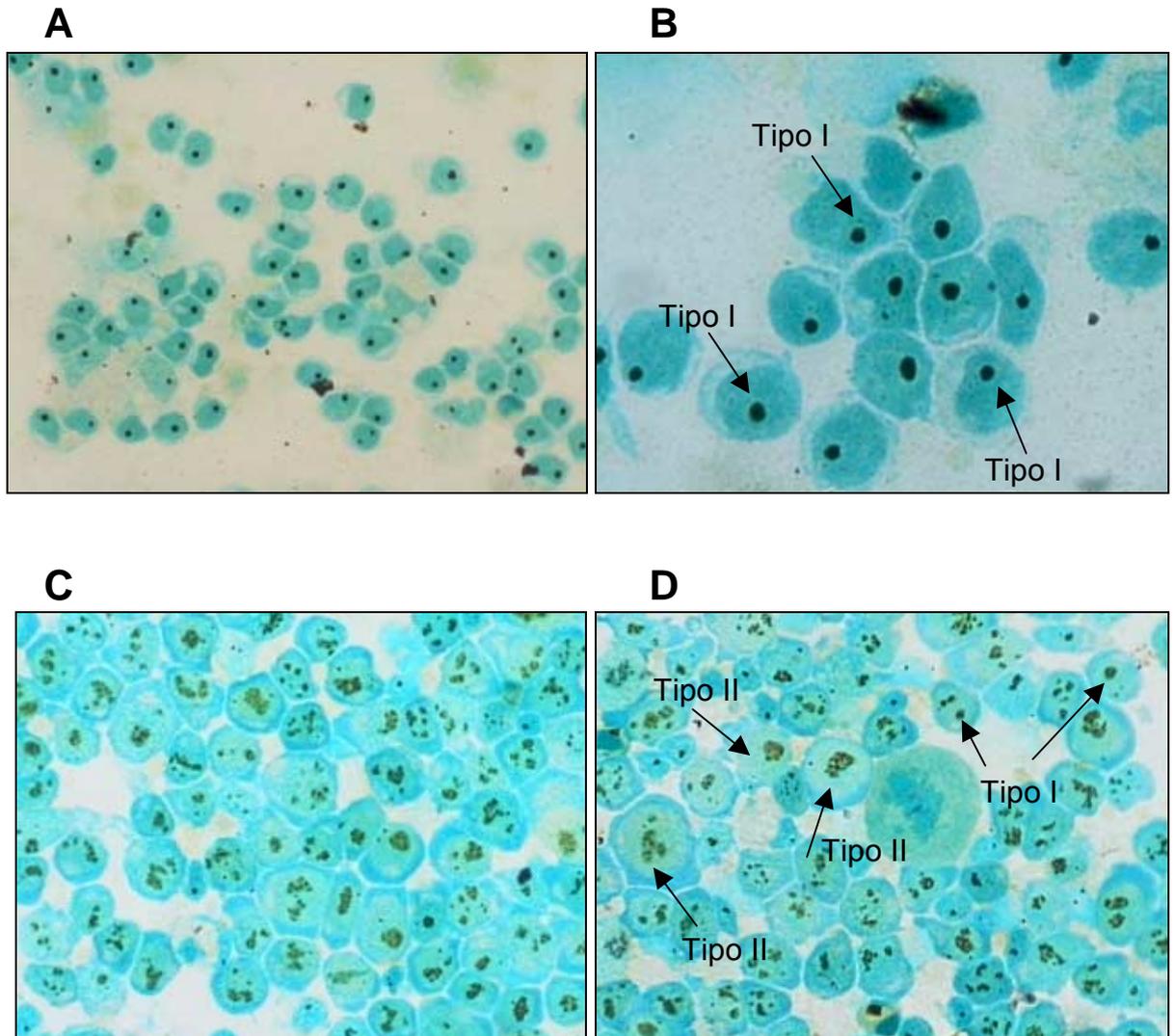


Figura 13. Aspecto morfológico de AgNOR em linfócitos humanos. Citocentrifugados de mononucleares humanos obtidos de sangue periférico cultivados por cinco dias em RPMI 1640 suplementado com soro humano (10%), a 37°C e tensão de CO₂, na presença (C e D) ou não (A e B) de fitohemaglutinina, foram fixados em solução de Carnoy e submetidos à impregnação argêntica para definição das regiões nucleolares impregnadas pela prata (setas) e contracoradas com solução de Verde de Malaquita. AgNOR Tipo I: precipitados pequenos, arredondados e bem delimitados; AgNOR Tipo II: precipitados maiores, disformes; AgNOR Complexos: Tipo I e Tipo II na mesma célula. (magnificação: A/C 400x, B/D 1000x).

Para a população previamente incubada por 72 horas com o mitógeno e posteriormente acrescida de DMSO (Figura 8), o IP foi significativo para a concentração de 20 μ l/ml (D20_{t72}+PHA_{t0}) em relação ao grupo tratado com PHA, sendo de 2,18 \pm 0,04 [n=3; $F(13,41)=7,79$; $p<0,05$], enquanto para a concentração de 10 μ l/ml (D10_{t72}+PHA_{t0}) o IP foi de 3,06 \pm 0,4 (n=3).

Na avaliação morfológica, praticamente todas as células mantiveram-se como linfócitos (Tabela 4), reforçando o efeito inibitório observado para o IP. Na presença de PHA, foi notável a diferença entre as doses de 10 e 20 μ l/ml, com cerca de 82% das células com morfologia de linfócitos na maior concentração, valor que ainda se acentuou quando os MNC foram incubados previamente com DMSO, onde 88% das células demonstraram características morfológicas de linfócitos, sendo praticamente o mesmo percentual encontrado na incubação dos MNC em RPMI suplementado (controle), com 89% de linfócitos.

Com relação ao número médio de AgNOR/célula, na população tratada simultaneamente com DMSO e PHA observou-se diminuição significativa, com 2,0 \pm 0,09 [10 μ l/ml; $F(12,13)=21,24$; $p<0,05$] e 1,1 \pm 0,05 [20 μ l/ml; $F(12,13)=21,24$; $p<0,001$]. Este valor manteve-se em 1,3 \pm 0,1 [$F(12,13)=21,24$; $p<0,001$] quando 20 μ l/ml de DMSO foram adicionados 24 horas antes da PHA, enquanto que, para 10 μ l/ml de DMSO, o valor encontrado foi de 2,6 \pm 0,3. No tratamento com DMSO adicionado 72 horas após a incubação com PHA, 2,5 \pm 0,3 e 2,6 \pm 0,09 foram os números médios de AgNOR/célula obtidos para 10 e 20 μ l/ml, respectivamente (Figura 12).

Em paralelo, a morfologia do tipo I foi a mais freqüente quando MNC foram submetidos a 20 μ l/ml de DMSO, com uma média de 95,5 \pm 0,7% [$F(20,21)=172,08$; $p<0,001$] no tratamento simultâneo de DMSO e PHA, e de 93,0 \pm 1,4% [$F(20,21)=172,08$; $p<0,001$] quando DMSO foi adicionado 24 horas antes da PHA (Figura 14-C). Conseqüentemente, a morfologia complexa apareceu em somente 1,0 \pm 0,0% [$F(20,21)=172,08$; $p<0,01$] das células quando da adição concomitante de mitógeno e solvente, e em 3,0 \pm 2,8% [$F(20,21)=172,08$; $p<0,05$] das células na adição prévia de DMSO no meio de cultura, deixando 3,5 \pm 0,7% e 4,0 \pm 1,4%, respectivamente, para a morfologia do tipo II.

Para o etanol, quando se incubou os MNC por 24 horas e, após, adicionou-se PHA seguindo-se incubação por mais quatro dias, os valores de IP foram de 4,41 \pm 0,9 (n=3, E10_{t0}+PHA_{t24}) e 4,37 \pm 0,8 (n=3, E20_{t0}+PHA_{t24}), respectivamente, para as concentrações de 10 e 20 μ l/ml.

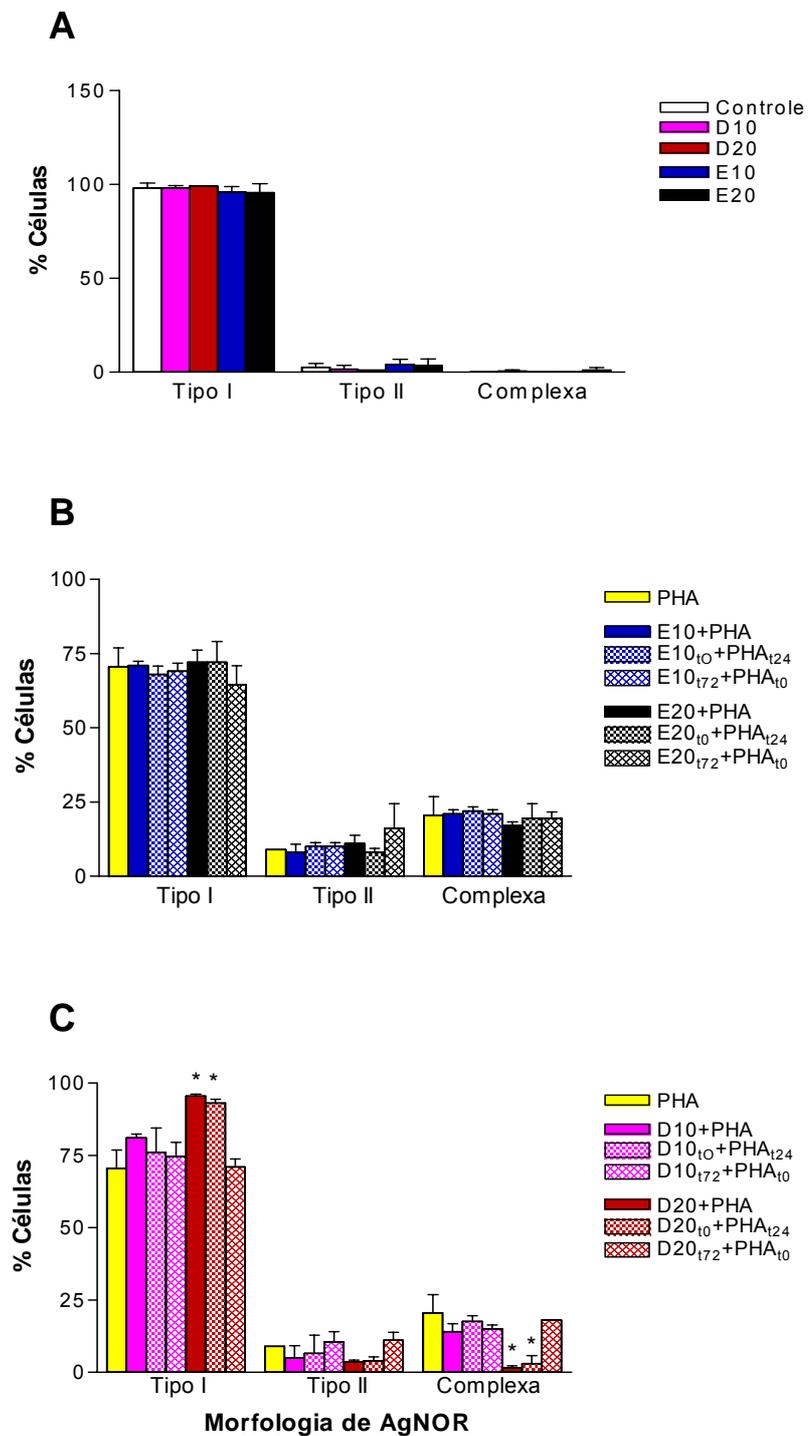


Figura 14. Efeito *in vitro* de etanol (E) e DMSO (D) sobre a morfologia de AgNOR de linfócitos humanos. Células mononucleares humanas foram tratadas com etanol ou DMSO, 10 ou 20 μ l/ml (A) e incubadas a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Mononucleares foram tratados com etanol (B) e DMSO (C), respectivamente, além da adição de PHA como descrito na sessão de Material e Métodos. Após este período citocentrifugados foram preparados e corados para revelação de AgNOR. As colunas representam a porcentagem média de células \pm DP contendo AgNOR do tipo I, II ou complexa (n=2, experimentos independentes). * $p \leq 0,05$ em relação a PHA (ANOVA + Tukey).

Na incubação concomitante de etanol com PHA, deve-se ressaltar que, quanto à morfologia, $86,6 \pm 2,7\%$ e $82,6 \pm 2,4\%$ de blastos, respectivamente, para 10 e 20 $\mu\text{l/ml}$, foram observados. De igual modo, o etanol não interferiu com o número médio de AgNOR por célula, assim como não alterou a morfologia destes. O número médio de AgNOR/célula foi de $2,8 \pm 0,1$ e $2,8 \pm 0,2$, respectivamente, para os tratamentos com 10 e 20 $\mu\text{l/ml}$ de etanol em presença de PHA. Ao adicionar PHA 24 horas após a incubação de MNC com etanol, $2,7 \pm 0,1$ e $3,2 \pm 0,1$ foram as médias de AgNOR por célula para 10 e 20 $\mu\text{l/ml}$, com morfologia complexa em $22,0 \pm 1,4\%$ (10 $\mu\text{l/ml}$) e $19,5 \pm 4,9\%$ (20 $\mu\text{l/ml}$) das células. Nesta última situação, os achados para AgNOR não foram diferentes dos controles ($2,9 \pm 0,2$ AgNOR por célula, com $20,5 \pm 6,4\%$ das células apresentando morfologia complexa).

Para a população previamente incubada por 72 horas com o mitógeno e posteriormente acrescida de etanol, o IP foi de $4,21 \pm 1,1$ e $5,74 \pm 0,4$ para as concentrações de 10 ($E_{10t_{72}} + PHA_{t_0}$) e 20 $\mu\text{l/ml}$ ($E_{20t_{72}} + PHA_{t_0}$), respectivamente, com números médios de AgNOR de $2,7 \pm 0,2$ (10 $\mu\text{l/ml}$) e $2,5 \pm 0,3$ (20 $\mu\text{l/ml}$).

Os resultados dessas duas séries de experimentos sugerem que o DMSO, mas não o etanol, interfere, de forma dose-dependente, na imunomodulação de linfócitos humanos, quando submetidos às condições experimentais propostas. Análise mais minuciosa dos dados indica que esta interferência é mais acentuada na etapa de ativação celular, ou seja, nos mecanismos que antecedem sua proliferação. Esta afirmação encontra suporte no fato de que os MNC pré-tratados com DMSO mantiveram morfologia predominante de linfócitos após exposição ao mitógeno e com baixos números de AgNOR, cuja morfologia simples (Tipo I) implica características de células com reduzida atividade mitótica, como já sugerido por outros (Ivanyi *et al.*, 1992).

Estes resultados contrastam com aqueles observados para o etanol, os quais foram bastante próximos aos obtidos nas culturas controle contendo mitógeno e que demonstraram presença intensa de blastos, com alta prevalência de células com morfologia de AgNOR complexos.

Deve-se ressaltar que a possibilidade de um efeito tóxico do DMSO sobre as células MNC foi avaliada por citometria de fluxo durante todos os procedimentos experimentais e está demonstrada na Tabela 5. Interessante notar que, somente nas culturas em que ele foi adicionado 72 horas após a ação do mitógeno, elevada porcentagem de células foram registradas na região R3, indicando toxicidade. Entretanto, essas mesmas culturas registraram a presença majoritária de células

blásticas, independente da concentração de DMSO, com quantidade de AgNOR próximo aos valores obtidos para os controles. Sendo assim, é possível inferir uma toxicidade elevada do DMSO frente às células blásticas, que sofreram ativação e transformação celular.

Tabela 5. Toxicidade do DMSO e etanol sobre células mononucleares humanas avaliada por citometria de fluxo.

Solvente	Viabilidade (%)	
	10µl/ml	20µl/ml
DMSO	86,5±6,8	96,99±3,01
DMSO + PHA	96,4±3,6	>99
DMSO_{t0} + PHA_{t24}	91,8±8,2	>99
DMSO_{t72} + PHA_{t0}	49,7±12,0	32,6±2,0
Etanol	>99	>99
Etanol + PHA	>99	92,2±7,8
Etanol_{t0} + PHA_{t24}	90,3±9,7	>99
Etanol_{t72} + PHA_{t0}	87,5±5,9	91,5±4,2

Células mononucleares (MNC) obtidas de sangue periférico foram tratadas com as concentrações indicadas dos solventes, incubados a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos, os MNC foram simultaneamente expostos a PHA; em outros, incubou-se suspensão de MNC com as concentrações indicadas dos solventes por 24 horas e, após, adicionou-se meio contendo PHA. Em outros, incubou-se as células com PHA por 72 horas e, em seguida, adicionou-se o solvente. Cada valor representa a porcentagem média de viabilidade ± EPM obtida entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo dos experimentos contendo etanol ou DMSO e o número obtido no controle de células não tratadas ou expostas a PHA (n=3).

A interferência do DMSO no metabolismo celular não é desconhecida. Por exemplo, há relatos de que o DMSO é capaz de induzir diferenciação celular em várias linhagens mielóides, enquanto que, para células de linhagem linfóide, a concentração de 1,5% de DMSO é capaz de bloquear, de forma reversível, o ciclo celular em G₁ (Sawai *et al.*, 1990).

Neste contexto, vários estudos relacionam a interferência do DMSO com o influxo de Ca⁺⁺. Zhang e Eyzaguirre (1999) relataram que o aumento na concentração de cálcio intracelular induzido por hipóxia em células “glomous” de ratos é bloqueado pela presença de DMSO, enquanto estudos com células humanas HL-60, de leucemia pró-mielocítica, indicam que o aumento na concentração de Ca⁺⁺ intracelular induzido por neurotensina desapareceu após tratamento com

DMSO (Choi *et al.*, 1999). Michel (1998) mostrou redução significativa nas elevações de Ca^{++} causada por adrenalina e pelo neuropeptídeo Y em células humanas de eritroleucemia. Reynaud e colaboradores (1999) relataram similar interferência do DMSO sobre o efeito da heparina A_3 em neutrófilos humanos.

Além disso, McConnel e colegas (1999), usando membranas isoladas de eritrócitos humanos, mostraram que o DMSO inibe a estimulação da calmodulina ATPase Ca^{++} - Mg^{++} dependente e Na^+ - K^+ dependente, sem nenhum efeito significativo sobre a calmodulina ATPase independente de Ca^{++} - Mg^{++} ou sobre a atividade da ATPase dependente de Mg^{++} . A coerência entre esses resultados obtidos com diferentes sistemas biológicos e moduladores de Ca^{++} intracelular sugerem uma ação inespecífica do DMSO, como sugerido por outros (Santos *et al.*, 2003).

Como o influxo de Ca^{++} é central na ativação de linfócitos e ocorre em menos de cinco minutos após a interação do mitógeno PHA com receptores na superfície de linfócitos humanos (Cooper, 1972), um bloqueio nesta etapa pelo DMSO ratifica os efeitos encontrados em nossos estudos relacionados à inibição da proliferação de linfócitos, provavelmente por atuação deste nas etapas que envolvem a ativação celular. Em adição, como o conteúdo de RNA em linfócitos estimulados dobra em 48 horas (Greaves e Janossy, 1972), justifica-se as alterações na morfologia e no número médio de AgNOR por célula, quando DMSO e PHA encontram-se simultaneamente no meio de cultura ou quando da adição primária do DMSO, fato não observado quando o solvente foi acrescentado somente 72 horas após a incubação com o mitógeno. Neste último caso, as células já teriam sofrido estimulação pela PHA e aumentado seu conteúdo em RNA quando da adição do solvente, não alterando dessa forma o perfil morfológico dos AgNOR.

O conjunto de resultados obtidos indica que o DMSO é uma substância inadequada para ser utilizada como solvente quando se deseja a incorporação de compostos insolúveis em meios aquosos com a finalidade de se estudar o perfil proliferativo de linfócitos humanos *in vitro*.

Nossos resultados são de particular relevância, considerando que o DMSO, um composto anfipático, com um domínio altamente polar e dois grupos apolares e que, torna-se solúvel em meios aquoso e orgânico (Santos *et al.*, 1997), é freqüentemente usado como solvente em estudos biológicos e como veículo de drogas terapêuticas (Santos *et al.*, 2003). Portanto, a ausência de compreensão dos efeitos do DMSO pode ocasionar artefatos experimentais e levar à interpretação equivocada dos resultados.

4.5.2 Potencial imunomodulatório dos óleos essenciais

Tendo se estabelecido que o etanol não interfere nas atividades imunomodulatórias de linfócitos humanos nas condições experimentais propostas, ele foi o solvente utilizado para se estudar o efeito imunomodulatório dos óleos essenciais de *Baccharis*. Assim, concentrações crescentes dos mesmos diluídas em etanol foram adicionadas às suspensões de MNC humanos e sua ação avaliada na ausência e presença de mitógeno.

Simultaneamente e primariamente ao efeito imunomodulatório, avaliou-se a citotoxicidade dos óleos essenciais de *Baccharis* por citometria de fluxo, através do número de células localizadas na região R3, comparando-se aos respectivos controles (com e sem PHA), todos normalizados em 100%. Na maioria das análises, a viabilidade dos MNC mostrou-se superior a 90% e, de forma geral, sempre superior a 83%, como demonstrado na Tabela 6, indicando que, nas concentrações ensaiadas, os óleos essenciais não se mostraram tóxicos aos MNC humanos, ratificando os resultados prévios com azul de tripano.

Em paralelo, também não se observou efeito desses compostos sobre a proliferação de linfócitos, como ilustra a Figura 15. No entanto, quando PHA foi adicionada simultaneamente ao meio de cultura, observou-se diminuição dessa proliferação (Figura 16). Neste contexto, óleo essencial de *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana*, na concentração de 10^{-2} $\mu\text{l/ml}$, apresentaram efeito inibitório significativo sobre a proliferação de linfócitos quando comparados a MNC tratados com PHA e 20 $\mu\text{l/ml}$ de etanol (IP=3,46 \pm 0,4). A espécie *gaudichaudiana* apresentou a inibição mais significativa à 10^{-2} $\mu\text{l/ml}$, com IP de 2,06 \pm 0,1 [n=4; $F(13,36)=2,98$; $p<0,01$], enquanto para 10^{-3} e 10^{-4} $\mu\text{l/ml}$ os valores de IP foram, respectivamente, de 2,40 \pm 0,1 (n=4) e 2,88 \pm 0,1 (n=4). Para *B. dracunculifolia* o IP foi de 2,11 \pm 0,4 [n=4; $F(13,36)=2,98$; $p<0,05$], na dose de 10^{-2} $\mu\text{l/ml}$, e de 2,58 \pm 0,25 e 2,67 \pm 0,4 para 10^{-3} e 10^{-4} $\mu\text{l/ml}$. Para *B. articulata*, atividade inibitória, porém não significativa, foi observada, com valores de IP de 2,61 \pm 0,2, 2,57 \pm 0,2 e 2,39 \pm 0,2 (n=3), respectivamente, para as concentrações de 10^{-4} a 10^{-2} $\mu\text{l/ml}$. Finalmente, a espécie *crispa*, apresentou IP de 2,46 \pm 0,01 (n=3), 2,55 \pm 0,2 (n=4) e 2,21 \pm 0,2 (n=3), para 10^{-4} a 10^{-2} $\mu\text{l/ml}$. Enquanto o IP obtido para a PHA foi de 3,14 \pm 0,16 (n=6).

Tabela 6. Efeito dos óleos essenciais de espécies de *Baccharis* sobre a viabilidade de células mononucleares.

Óleo essencial	Viabilidade (%)		
	$10^{-4}\mu\text{l/ml}$	$10^{-3}\mu\text{l/ml}$	$10^{-2}\mu\text{l/ml}$
<i>B. articulata</i>	96,09±3,08	95,83±1,58	91,48±8,52
+ PHA	91,36±8,63	96,10±3,89	99,21±0,79
<i>B. crispa</i>	95,99±4,01	91,48±8,52	96,91±1,80
+ PHA	83,78±16,21	92,62±7,34	96,29±3,71
<i>B. dracunculifolia</i>	96,92±2,91	85,86±8,87	94,43±5,18
+ PHA	> 99	97,40±2,60	> 99
<i>B. gaudichaudiana</i>	84,91±15,09	91,67±8,32	95,80±4,20
+ PHA	> 99	87,97±12,03	91,15±8,85

Mononucleares (MNC) obtidos de sangue periférico de voluntários sadios foram tratados com concentrações indicadas de óleos essenciais de *Baccharis*, incubados a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos, os MNC foram simultaneamente expostos a fitohemaglutinina. Cada valor representa a porcentagem média da viabilidade ± EPM dos eventos detectados por citometria de fluxo dos experimentos contendo óleo essencial e o obtido no controle (n=3).

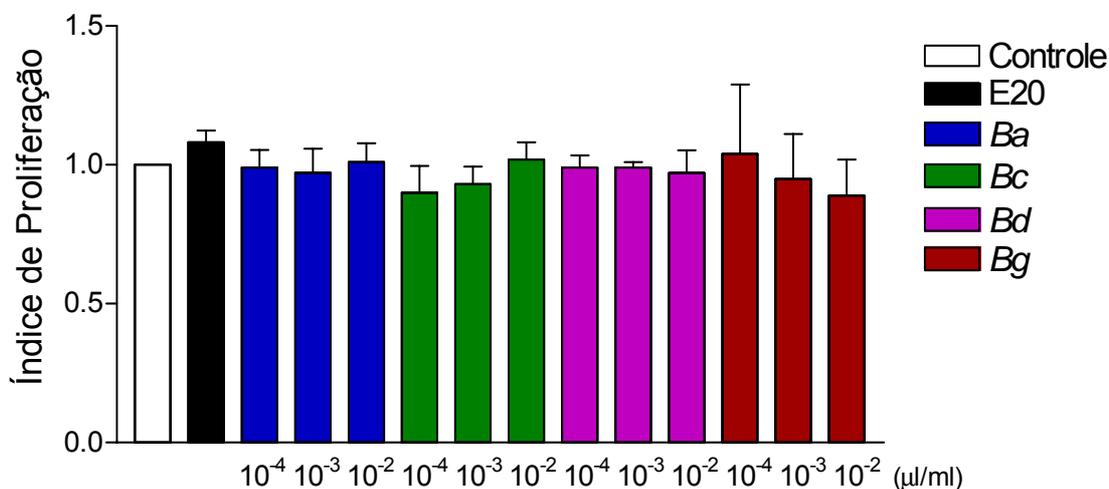


Figura 15. Efeito *in vitro* de óleos essenciais de espécies de *Baccharis* sobre a proliferação de linfócitos humanos. Mononucleares obtidos de sangue periférico foram tratados com as concentrações indicadas de óleo essencial de *B. articulata* (Ba), *B. crispa* (Bc), *B. dracunculifolia* (Bd) e *B. gaudichaudiana* (Bg), e incubados a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Cada coluna representa a média ± EPM do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo óleo essencial e o número obtido no controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. E20 indica a concentração de etanol (20μl/ml) usada para incorporação dos óleos essenciais no meio, usada para monitorar o efeito do solvente.

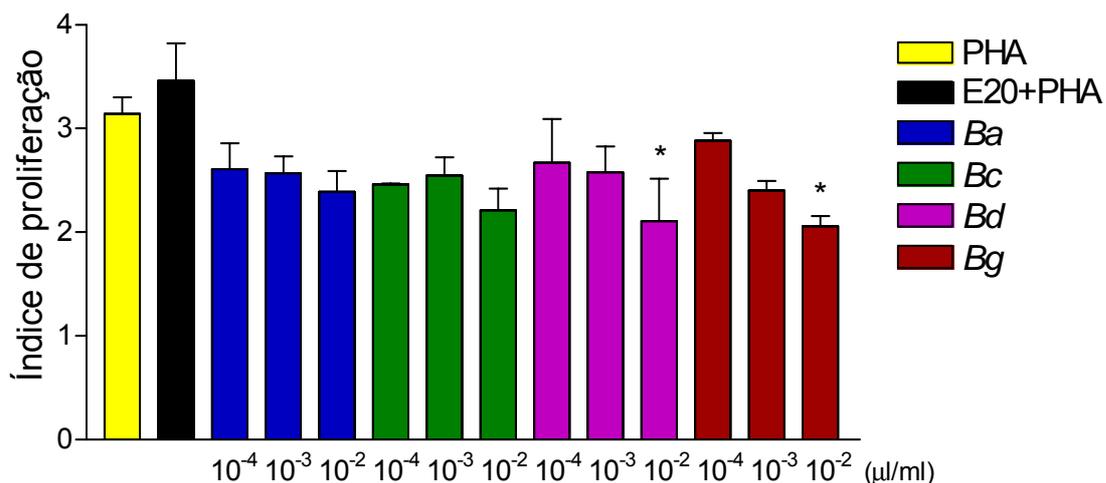


Figura 16. Efeito *in vitro* de óleos essenciais de espécies de *Baccharis* sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina. Mononucleares (MNC) obtidos de sangue periférico foram tratados com fitohemaglutinina (PHA) e com concentrações indicadas de óleo essencial de *B. articulata* (*Ba*), *B. crispa* (*Bc*), *B. dracunculifolia* (*Bd*) e *B. gaudichaudiana* (*Bg*) e incubados a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Cada coluna representa a média do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados, por citometria de fluxo, na região R2 dos experimentos contendo óleo essencial e o número obtido no controle de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$ em relação a MNC tratados com PHA e 20µl/ml de etanol (E20+PHA).

Simultaneamente, a capacidade desses óleos essenciais em interferir com a transformação blástica foi avaliada, observando-se o deslocamento dos MNC da região R1 para a R2 no citômetro de fluxo, cujos resultados estão demonstrados na Tabela 7. De forma geral, observou-se que, quando incubadas somente com os óleos essenciais, a maioria das células permaneceu na região R1, independente da concentração, com a população em R2 não ultrapassando 25%.

Análise de citocentrifugados dessas populações demonstrou que mais de 90% dessas células permaneceram com morfologia de linfócitos, confirmando os dados obtidos por citometria de fluxo (Tabela 8), sugerindo que os óleos essenciais, por si só, não têm a habilidade de induzir MNC humanos a proliferar (Figura 15). Entretanto, quando expostos, simultaneamente a PHA (Figura 16), o aumento do número de células em R2 foi evidente, passando esses a constituir a população predominante. Este comportamento também foi confirmado pela análise morfológica de citocentrifugados corados, com predominância da população de blastos em todas as culturas onde PHA estava presente (Tabela 8).

Tabela 7. Efeito *in vitro* de óleos essenciais de espécies de *Baccharis* sobre a transformação blástica de linfócitos humanos estimulados ou não por fitohemaglutinina.

		Transformação blástica (%)		
Controle		17,8±2,8		
+ PHA		80,2±2,8		
Etanol 20µl/ml		16,2±3,4		
+ PHA		83,5±4,2		
Óleo essencial	10 ⁻⁴ µl/ml	10 ⁻³ µl/ml	10 ⁻² µl/ml	
<i>B. articulata</i>	19,7±4,6	17,8±4,0	18,4±3,8	
+ PHA	80,6±2,4	81,7±1,8	81,7±1,8	
<i>B. crispa</i>	14,2±4,2	22,0±3,4	25,8±7,3	
+ PHA	67,7±4,5	67,3±5,1	67,0±5,3	
<i>B. dracunculifolia</i>	15,1±4,9	17,5±3,7	19,8±3,6	
+ PHA	80,9±2,9	80,4±3,3	81,5±2,5	
<i>B. gaudichaudiana</i>	19,8±2,0	19,1±7,8	19,5±6,8	
+ PHA	72,2±1,4	69,3±4,0	64,4±9,1	

Células mononucleares (MNC) obtidas de sangue periférico foram expostas à concentrações indicadas de óleo essencial de espécies de *Baccharis*, incubados a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos, os MNC foram, simultaneamente, expostos à fitohemaglutinina (PHA). Cada coluna representa a porcentagem média ± EPM dos valores resultantes da relação entre R1 e R2, descrita na sessão de Material e Métodos, obtidos por citometria de fluxo (n=3).

Reforçando ainda esses dados, foi observado diminuição no número médio de AgNOR por célula após exposição dos linfócitos aos óleos essenciais de espécies de *Baccharis*, na concentração de 10⁻²µl/ml, concomitantemente com o mitógeno PHA (Figura 17). O efeito foi similar para os quatro óleos essenciais avaliados, onde para *B. articulata*, o número médio de AgNOR foi de 1,71±0,28 [n=2; F(5,9)=17,35; p<0,01]. Já para *B. crispa* 1,76±0,05 (n=3; F(5,9)=17,35; p<0,01), para *B. dracunculifolia* 1,80±0,0 [n=2; F(5,9)=17,35; p<0,05] e, finalmente, para *B. gaudichaudiana* 1,74±0,13 [n=3; F(5,9)=17,35; p<0,01].

Tabela 8. Influência de óleos essenciais de *Baccharis* sobre a morfologia de linfócitos, avaliada em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa.

	Linfócitos (%)		Blastos (%)			
Controle	85		15			
+ PHA	30		70			
Etanol 20µl/ml	89		11			
+ PHA	15		85			
Óleos essenciais	10 ⁻⁴ µl/ml		10 ⁻³ µl/ml		10 ⁻² µl/ml	
	Linfo (%)	Blastos (%)	Linfo (%)	Blastos (%)	Linfo (%)	Blastos (%)
<i>B. articulata</i>	99	01	97	03	98	02
+ PHA	06	94	09	91	09	91
<i>B. crispa</i>	-	-	-	-	-	-
+ PHA	43	57	44	56	45	55
<i>B. dracunculifolia</i>	94	06	96	04	95	05
+ PHA	22	78	18	82	19	81
<i>B. gaudichaudiana</i>	-	-	-	-	-	-
+ PHA	34	66	42	58	46	54

Mononucleares (MNC) obtidos de sangue periférico foram expostos às concentrações de óleo essencial de espécies de *Baccharis* como indicado, incubados a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Em alguns experimentos, os MNC foram simultaneamente expostos à fitohemaglutinina. A morfologia de linfócitos (linfo) e linfoblastos (blastos) foi avaliada em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa, sob imersão em microscópio comum. Cada valor representa a média de dois experimentos, onde um mínimo de 100 células foi observado por experimento. (-): não realizado.

Com a finalidade de se esclarecer o comportamento induzido pelos óleos essenciais, experimentos com o óleo de *B. dracunculifolia* foram realizados. Dessa forma, em alguns, PHA foi adicionada às culturas de MNC previamente incubadas por 24 horas com o óleo essencial, na concentração de 10⁻²µl/ml e, em outros, o óleo essencial foi adicionado após 72 horas de incubação dos MNC com PHA.

O IP obtido para MNC incubados previamente com o óleo essencial e 24 horas depois acrescidos de PHA ($Bd_{t0}+PHA_{t24}$) foi de 1,15±0,07 [$F(4,11)=15,64$; $p<0,05$] e, para a população previamente incubada por 72 horas com o mitógeno e posteriormente acrescida do óleo essencial ($Bd_{t72}+PHA_{t0}$), o IP foi de 1,28±0,1 [$F(4,11)=15,64$; $p<0,01$], sendo ambos significativos em relação ao grupo tratado apenas com etanol, com IP de 1,67±0,07 ($E20_{t0}+PHA_{t24}$) e 1,91±0,07 ($E20_{t72}+PHA_{t0}$) (Figura 18), enquanto para a PHA o IP obtido foi de 2,15±0,2. Estes resultados sugerem que os óleos essenciais interferem tanto na fase de ativação de linfócitos como na de proliferação, e que outras investigações devem ser realizadas para o esclarecimento do mecanismo de ação.

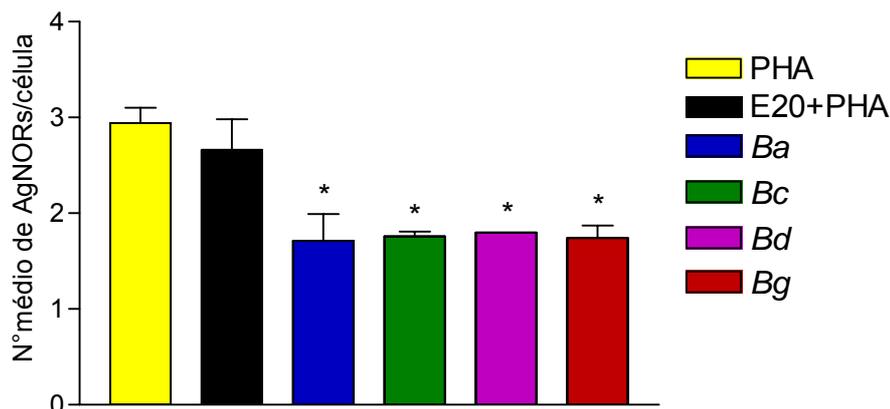


Figura 17. Efeito *in vitro* de óleos essenciais de espécies de *Baccharis* sobre a formação de AgNOR em linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina. Mononucleares humanos foram incubados por cinco dias na presença de PHA e com 10^{-2} μ l/ml de óleo essencial de *B. articulata* (Ba), *B. crispa* (Bc), *B. dracunculifolia* (Bd) e *B. gaudichaudiana* (Bg). Citocentrifugados foram corados para revelação de AgNOR, como descrito na sessão de Material e Métodos. As colunas representam o nº médio de AgNOR \pm DP/célula ($n=2-3$, experimentos independentes). * $p \leq 0,05$ em relação a MNC tratados com PHA e 20 μ l/ml de etanol (E20+PHA).

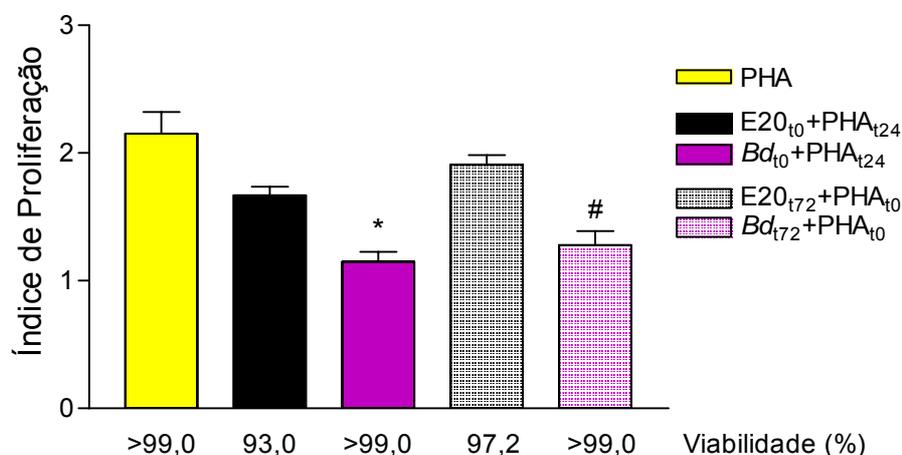


Figura 18. Efeito *in vitro* do óleo essencial de *B. dracunculifolia* sobre a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina. Mononucleares obtidos de sangue periférico foram tratados com 10^{-2} μ l/ml de óleo essencial de *B. dracunculifolia* e, após 24 horas, adicionou-se fitohemaglutinina (PHA) (t_{24}); em outros experimentos, incubou-se as células com PHA por 72 horas e, em seguida, adicionou-se o óleo essencial (t_{72}), as culturas foram incubadas a 37°C, por cinco dias, em atmosfera de CO₂. Cada coluna representa a média \pm EPM do índice de proliferação obtido da relação entre o número de eventos detectados por citometria de fluxo na região R2 dos experimentos contendo etanol ou óleo essencial e o número obtido no Controle (não tratado) de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$ em relação a etanol incubado 24 horas antes da PHA (E20_{t10}+PHA_{t24}). # $p \leq 0,05$ em relação a etanol acrescentado 72 horas após a adição de PHA (E20_{t72}+PHA_{t10}). ANOVA, seguida do teste de Tukey.

Muitos compostos derivados de plantas utilizadas na medicina popular têm sido relatados com atividade imunomodulatória e existe um crescente interesse na identificação e caracterização dessas substâncias (Atal *et al.*, 1986; Lee *et al.*, 1995; Sharma *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1991).

Com relação à atividade imunomodulatória de óleos essenciais, merecem destaques os estudos com o óleo essencial de *Anethum graveolens*, *Mentha piperita* e *Pinus sylvestres*, os quais demonstraram inibição dose-dependente da atividade mitótica de linfócitos humanos incubados com PHA (Lazutka *et al.*, 2001). O oposto foi observado para a fração do óleo essencial de *Azadirachta indica*, denominado NIM-76 que, quando testada *in vitro*, promoveu a proliferação de linfócitos na presença de PHA, efeito imunoestimulatório que também foi observado com linfócitos isolados de baço de ratos tratados com o óleo (SaiRam *et al.*, 1997).

Interessante ressaltar que há relatos de que compostos monoterpenóides possuem diferentes modos de ação em relação a células procarióticas e eucarióticas. Enquanto para células bacterianas são tóxicos, para células eucarióticas modificam a apoptose e diferenciação, interferem com as modificações após tradução de proteínas celulares e induzem ou inibem enzimas hepáticas detoxificantes (Loza-Tavera, 1999).

Portanto, monoterpenos presentes nos óleos essenciais das espécies de *Baccharis* estudadas, como linalool, α -terpineol, mirceno e limoneno, podem ser os responsáveis pelos efeitos observados, por interferirem nos mecanismos envolvidos com a proliferação de linfócitos. Além disso, é possível que as variações de efeitos observadas entre as espécies possa derivar da diferença existente entre os constituintes e/ou suas quantidades.

4.6 ATIVIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Baccharis* SOBRE O CRESCIMENTO BACTERIANO

As doenças infecciosas representam um grave e crescente problema de saúde mundial. Mudanças contínuas de hábitos sociais, avanços tecnológicos e alterações relacionadas aos próprios microorganismos têm contribuído, simultaneamente, para o surgimento de novas doenças e para o reaparecimento de doenças antes controladas (Cohen, 2000). Muitos dos microorganismos que causam danos à saúde humana possuem resistência à drogas pelo uso inadequado dos antibióticos. Dessa forma, há a necessidade de se encontrar novas substâncias que

possam combatê-los e seria interessante se essas drogas fossem provenientes de fontes naturais locais (Sartoratto *et al.*, 2004).

Assim, estudou-se a influência dos óleos essenciais de *Baccharis* sobre o crescimento bacteriano de cepas padrões de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, bactérias potencialmente patogênicas ao homem e tidas como agentes responsáveis por quadros infecciosos comuns. Neste contexto, *Staphylococcus aureus* é agente causador de uma miríade de lesões cutâneas (bolhas, carbúnculos e impetigo), além de faringite, endocardite, pneumonia e intoxicação alimentar. Constitui a principal causa de infecção de pacientes com queimaduras graves e feridas cirúrgicas e só é superado pela *Escherichia coli* como causa principal de infecção hospitalar (Cotran *et al.*, 1994). O *Enterococcus faecalis* causa principalmente endocardite e infecções do trato urinário (Cotran *et al.*, 1994).

Como ilustrado na Tabela 9, os óleos essenciais inibiram o crescimento das bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, de forma dose-dependente, mas não tiveram efeito sobre as gram-negativas. Em geral, o efeito inibitório foi maior sobre *S. aureus* (Figura 19), à exceção daquele observado para o óleo essencial de *B. articulata* (10 μ l), que demonstrou maior atividade sobre *E. faecalis* (15,50 \pm 0,71 mm). *B. dracunculifolia*, por sua vez, foi a espécie que demonstrou maior atividade sobre *S. aureus* na maior concentração avaliada, com halo de inibição de 15,50 \pm 1,32 mm.

Entretanto, a atividade inibitória observada foi inferior àquela promovida pelos antibióticos padrões recomendados pelo NCCLS, ensaiados sob condições metodológicas semelhantes. É provável que essas diferenças resultem do fato de que os antibióticos usados são substâncias com elevado grau de pureza, em contraste com os óleos essenciais investigados, os quais possuem grande variedade de compostos quimicamente distintos em sua composição, como demonstrado na introdução deste trabalho.

Além disso, a variação observada na intensidade dos efeitos promovidos pelas diferentes espécies de *Baccharis* pode ser resultante da capacidade de difusão de cada óleo essencial no ágar, onde substâncias com potencial antibacteriano poderiam ficar retidas no papel de filtro.

Tabela 9. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *B. articulata*, *B. crispa*, *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana* sobre bactérias gram-positivas.

Microrganismos	Halo de inibição (mm)							
	1,25µl	2,5µl	5µl	10µl				
<i>Baccharis articulata</i>								
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,50±0,71	11,00±0,00	12,17±0,29	13,67±1,15				
<i>Enterococcus faecalis</i>	—	7,00±0,00	7,50±0,71	15,50±0,71				
<i>Baccharis crispa</i>								
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,00±2,83	12,00±1,41	14,00±0,00	14,50±0,71				
<i>Enterococcus faecalis</i>	—	7,00±0,00	8,00±0,00	8,00±0,00				
<i>Baccharis dracunculifolia</i>								
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,00±2,83	13,00±2,83	14,33±2,08	15,50±1,32				
<i>Enterococcus faecalis</i>	—	—	8,00±0,00	8,50±0,71				
<i>Baccharis gaudichaudiana</i>								
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,50±2,12	9,75±1,25	11,00±1,41	11,00±1,41				
<i>Enterococcus faecalis</i>	—	—	Traços	—				
Controle								
Controle (concentração)	Halo de inibição (mm)							
	<i>S. aureus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	NCCLS	Obtidos	NCCLS	Obtidos	NCCLS	Obtidos	NCCLS	Obtidos
Ampicilina (10 µg)	27-35	35	NA	NA	16-22	20	NA	NA
Aztreonam (30 µg)	NA	NA	NA	NA	28-36	32	23-29	26
Eritromicina (15 µg)	22-30	26	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Oxacilina (1 µg)	18-24	26	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Sulfametoxazol e trimetoprima (25 µg)	NA	NA	> 20	31	NA	NA	NA	NA
Ticarcilina e Ac. clavulânico (75/10 µg)	29-37	NT	NA	NA	24-30	25	20-28	24
Tobramicina (10 µg)	19-29	25	NA	NA	18-26	19	19-25	24
Etanol absoluto* (10µl)	—	—	—	—	—	—	—	—

Óleos essenciais de espécies de *Baccharis*, nas concentrações indicadas, foram incorporados em discos de papel de filtro (6mm) e distribuídos sobre ágar Mueller Hinton contendo suspensão de *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* de acordo com a concentração 0,5 da escala de McFarland, correspondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Após 24 horas de incubação a 36°C, observou-se a formação de halos de inibição, cujos diâmetros foram determinados em mm com o auxílio de uma régua. Os valores representam a média \pm 1DP de dois experimentos independentes e incluem o diâmetro dos discos. (—): ausência de halo de inibição, (NA): não apropriado, (NT): não testado, (*): solvente utilizado para incorporação dos óleos essenciais. Antibióticos recomendados pelo NCCLS foram usados como controle de sensibilidade das estirpes bacterianas.

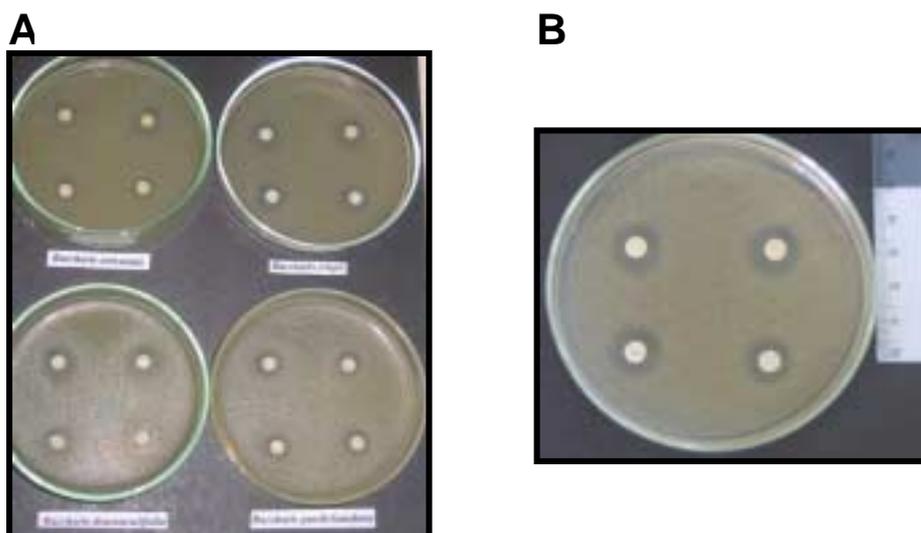


Figura 19. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de *Baccharis*. As fotos representam os efeitos dos óleos essenciais de *B. articulata*, *B. crispa*, *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana*, nas concentrações de 1,25 - 10 μ l, sobre o crescimento da bactéria gram-positiva *S. aureus* através do teste de difusão em ágar Mueller Hinton (A). Em destaque, o efeito obtido para o óleo essencial de *B. dracunculifolia* (B).

Embora com discrepâncias nos espectros de atividade e potência, efeitos antimicrobianos de óleos essenciais têm sido relatados. Por exemplo, Nakati (1994) demonstrou que bactérias gram-positivas são mais sensíveis à sua ação inibitória sobre o crescimento, em contraste com Deans e Ritchie (1987), os quais não encontraram diferenças de ação sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas. Vários fatores podem contribuir para estas diferenças, como a volatilidade e a pobre solubilidade da maioria dos óleos essenciais, principalmente quando se utiliza métodos de difusão ou diluição dessas misturas em meio microbiológico geralmente de natureza aquosa. Diferenças na composição dos óleos como já citado, assim como no processamento das amostras, também podem influenciar as propriedades antimicrobianas, uma vez que relacionam-se com o perfil e concentração de ativos (Delaquis *et al.*, 2002), e pouco se sabe sobre os efeitos de interações entre constituintes individuais, considerando que estas podem acarretar efeitos aditivos, sinérgicos ou mesmo antagonistas (Davidson e Parish, 1989).

Neste contexto, destilação fracionada dos óleos essenciais de *Anethum graveolens*, *Coriandrum sativum* e *Eucalyptus dives* demonstrou que a inibição e o espectro da atividade antimicrobiana das frações diferiu e, em alguns casos, excedeu à do óleo essencial bruto, sugerindo complexas interações entre os

componentes. Isto foi evidente para o óleo de *Anethum graveolens*, o qual, possuindo quantidades equivalentes de D-limoneno e carvone, demonstrou pouca atividade quando comparada à fração enriquecida com D-limoneno para os microorganismos testados (Delaquis *et al.*, 2002). Outros relatos, ainda, indicam o limoneno como mais ativo contra bactérias gram-positivas e fungos em comparação à bactérias gram-negativas (Baratta *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 1999). Interessante é o fato de que D-limoneno é um composto que foi detectado com particular relevância no óleo essencial de *B. dracunculifolia*. Além disso, óleo essencial de *B. notoserjila*, cujos principais componentes incluem α -pineno, limoneno, β -cariofileno e espatulenol, todos presentes em quantidades variáveis nas espécies estudadas, demonstraram atividade antibacteriana discreta tanto para bactérias gram-positivas quanto gram-negativas (Cobos *et al.*, 2001). Portanto, é possível que a presença desses compostos tenha contribuído para os efeitos microbicidas observados.

Efeitos tóxicos à estrutura e função da membrana geralmente são utilizados para explicar a ação antimicrobiana de óleos essenciais (Andrews *et al.*, 1980; Knobloch *et al.*, 1988; Uribe *et al.*, 1985) e, em muitos casos, tem-se indicado que sua atividade é devida à presença de monoterpenos (Beylier, 1979; Knobloch *et al.*, 1988; Morris *et al.*, 1979), os quais parecem exercer danos à membrana (Sikkema *et al.*, 1995) que, pelo seu caráter lipofílico, causam partição de suas estruturas, resultando em expansão, aumento de fluidez e inibição de enzimas (Sikkema *et al.*, 1994a).

A inibição para *S. aureus* foi similar para os óleos essenciais das espécies estudadas, as quais possuem limoneno, linalool, α -terpineol, β -elemeno, β -cariofileno, *epi* β -santaleno, γ -gurjuneno, γ -muuroleno, biciclogermacreno, α -muuruleno, γ -cadineno, δ -cadineno, α -calacoreno, ledol e espatulenol em sua composição, os quais possivelmente tenham colaborado para a ação antimicrobiana observada.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biológico dos óleos essenciais de *B. articulata*, *B. dracunculifolia*, *B. crispa* e *B. gaudichaudiana*, espécies comuns no Paraná e conhecidas popular e coletivamente como carquejas, usando modelos *in vitro* clássicos.

Nestes modelos, essencialmente constituídos por misturas aquosas, a primeira etapa foi a incorporação dos óleos essenciais por meio de solventes orgânicos tradicionais. Dentre esses, tanto o etanol como o DMSO mostraram-se eficientes, permitindo obter uma coletânea de dados, a qual revelou alguns aspectos interessantes com relação às atividades biológicas investigadas. Os resultados apresentados e as considerações que deles puderam ser derivadas permitiram concluir que:

- concentrações superiores a 10^{-2} µl/ml dos óleos essenciais das espécies de *Baccharis* são tóxicas para leucócitos humanos
- os óleos essenciais de *B. articulata* e *B. dracunculifolia* têm atividade antiinflamatória, inibindo significativamente a quimiotaxia de granulócitos humanos induzida por caseína
- os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana* são dotados de potencial imunomodulatório, uma vez que inibem a proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina, por atuarem, possivelmente, sobre os mecanismos de ativação e proliferação celulares
- os óleos essenciais têm ação bactericida contra bactérias gram positivas, impedindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

Durante esses estudos, observou-se, também, que o perfil cromatográfico do óleo essencial de *B. dracunculifolia* obtido por HPLC, na faixa do UV se mantém após exposição à temperatura de 37°C por um período de até cinco dias, permitindo estudos de atividades biológicas *in vitro* usando células humanas. Outro aspecto importante observado foi o de que o DMSO inibe significativamente a proliferação de linfócitos humanos por atuar, provavelmente, sobre os mecanismos de ativação celular, sendo seu uso impróprio para incorporação de óleos essenciais em meio aquoso quando se deseja investigar atividades imunomodulatórias com MNC humanos.

Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, os resultados apresentados neste trabalho constituem uma base rica de dados inéditos ainda não

relatados referentes às atividades biológicas de óleos essenciais de espécies de *Baccharis*, sendo uma fonte preliminar de informações científicas importantes que estimulam investigações futuras.

REFERÊNCIAS

- Abe, S.; Maruyama, N.; Hayama, K.; Inouye, S.; Oshima, H. e Yamaguchi, H. (2004). Suppression of neutrophil recruitment in mice by geranium essential oil. *Mediators Inflamm* **13**: 21-24.
- Akaike, S.; Sumino, M.; Sekine, T.; Seo, S.; Kimura, N. e Ikegami, F. (2003). A new *ent*-clerodane diterpene from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. *Chem Pharm Bull* **51**: 197-199.
- Alonso, J. R. (1998). Tratado de fitomedicina - bases clínicas e farmacológicas. Buenos Aires, Isis.
- Andrews, R. E.; Parks, L. W. e Spence, K. D. (1980). Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **40**: 301-304.
- Assenmacher, M.; Manz, R.; Miltenyi, S.; Scheffold, A. e Radbruch, A. (1995). Fluorescence-activated cytometry cell sorting based on immunological recognition. *Clin Biochem* **28**: 39-40.
- Atal, C. K.; Sharma, M. L.; Kaul, A. e Khajuria, A. (1986). Immunomodulating agents of plant origin. I. Preliminary screening. *J Ethnopharmacol* **41**: 185-192.
- Baratta, M. T.; Dorman, H. J. D.; Deans, S. G.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G. e Ruberto, G. (1998). Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. *Flavour Frag J*. **13**: 235-244.
- Barroso, G. M. (1975-6). *Rodriguésia* **28**: 3. **apud** Verdi, L. G. 2005.
- Beylier, N. (1979). Bacteriostatic activity of some Australian essential oils. *Perfumer and Flavourist* **4**: 23-25.
- Bier, O. (1977). Bacteriologia e Imunologia. São Paulo, Melhoramentos.
- Bokoch, G. M. (1995). Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* **86**: 1648-1660.
- Brostoff, J. e Male, D. K. (1994). Clinical immunology - an illustrated outline. London, Mosby.
- Brunner, K. T.; Mael, J.; Cerottini, J. C. e Chapuis, B. (1968). Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunol* **14**: 181-196.
- Burgermeister, E.; Endl, J. e Scheuer, W. V. (2003). Activation of cytosolic phospholipase A2 in human T-lymphocytes involves inhibitor-kappaB and mitogen-activated protein kinases. *Eur J Pharmacol* **466**: 169-180.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *Int J Food Microbiol* **3**:223-253.
- Buss, A. D. e Waigh, R. D. (1995). Burger's medical chemistry and drug discovery. In Natural compounds as leads for new pharmaceuticals. Oxford, John Woley & Sons.
- Canet, V.; Montmasson, M. P.; Usson, Y.; Giroud, F. e Brugal, G. (2001). Correlation between silver-stained nucleolar organizer region area and cell cycle time. *Cytometry* **43**: 110-116.
- Cantrell, D. A. e Smith, K. A. (1984). The interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. *Science* **224**: 1312-1316.
- Cardillo, M. R. (1992). Ag-NOR technique in fine needle aspiration cytology of salivary gland masses. *Acta Cytol* **36**: 147-151.
- Carneiro, M. A. A. e Fernandes, G. W. (1996). Ciência Hoje. *Herbivoria* **20**: 35-39.

- Cassatela, M. A. (1995). The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* **16**: 21-26.
- Choi, S. Y.; Chae, H. D.; Park, T. J.; Ha, H. e Kim, K. T. (1999). Characterization of high affinity neurotensin receptor NTR1 in HL-60 cells and its down regulation during granulocytic differentiation. *Br J Pharmacol* **126**: 1050-1056.
- Chung, C. Y.; Potikyan, G. e Firtel, R. A. (2001). Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKa. *Mol Cell* **7**: 937-947.
- Civin, C. I. e Loken, M. R. (1987). Cell surface antigens on human marrow cells: dissection of hematopoietic development using monoclonal antibodies and multiparameter flow cytometry. *Int J Cell Cloning* **5**: 267-288.
- Cobos, M. I.; Rodriguez, J. L.; Oliva, M. L.; Demo, M.; Faillaci, S. M. e Zygadlo, J. A. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserigila*. *Planta Med* **67**: 84-86.
- Cohen, M. L. (2000). Changing patterns of infectious disease. *Nature* **406**: 762-767.
- Cooper, H. L. (1972). Studies on RNA metabolism during lymphocyte activation. *Transplant Rev* **11**: 3-38.
- Corrêa, M. P. (1984). Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Vol 1-6. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional.
- Cotran, R. S.; Kumar, V. e Robbins, S. L. (1994). Pathologic basis of disease Philadelphia, W.B. Saunders.
- Crocker, J. (1990, 92). Nucleolar organiser regions. In Pathology of the nucleus, U. J.C.E. (ed). Berlin, New York, Spring-Verlag.
- Crocker, J.; Boldy, D. A. e Egan, M. J. (1989). How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. *J Pathol* **158**: 185-188.
- Dacie, J. D. e Lewis, S. M. (1995). Practical haematology. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Davidson, P. M. e Parish, M. E. (1989). Methods for testing the efficacy of antimicrobials. *Food Technol* **52**: 148-154.
- De Oliveira, S. Q.; Dal-Pizzol, F.; Gosmann, G.; Guillaume, D.; Moreira, J. C. e Schenkel, E. P. (2003). Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. *Free Radic Res* **37**: 555-559.
- Deans, S. G. e Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* **5**: 165-180.
- Dekker, L. V. e Segal, A. W. (2000). Signals to move cells. *Science* **287**: 982-985.
- Delaquis, P. J.; Stanich, K.; Girard, B. e Mazza, G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol* **74**: 101-109.
- Derenzini, M.; Pession, A. e Trere, D. (1990). Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest* **63**: 137-140.
- Derenzini, M. e Ploton, D. (1991). Interphase nucleolar organizer regions in cancer cells. *Int Rev Exp Pathol* **32**: 149-192.
- Derenzini, M.; Romagnoli, T.; Mingazzini, P. e Marinozzi, V. (1988). Interphasic nucleolar organizer region distribution as a diagnostic parameter to differentiate benign from malignant epithelial tumors of human intestine. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **54**: 334-340.

- Dervan, P. A.; Gilmartin, L. G.; Loftus, B. M. e Carney, D. N. (1989). Breast carcinoma kinetics. Argyrophilic nucleolar organizer region counts correlate with Ki67 scores. *Am J Clin Pathol* **92**: 401-407.
- Dupont, P. (1966). *Bull. Soc. Bretagne* **41**: 141. *apud* Verdi, L. G. 2005.
- Eldin, S. e Dunford, A. (2001). Fitoterapia na atenção primária à saúde. São Paulo, Manole.
- Feske, S.; Draeger, R.; Peter, H. H.; Eichmann, K. e Rao, A. (2000). The duration of nuclear residence of NFAT determines the pattern of cytokine expression in human SCID T cells. *J Immunol* **165**: 297-305.
- Fullas, F.; Hussain, R. A.; Chai, H. B.; Pezzuto, J. M.; Soejarto, D. D. e Kinghorn, A. D. (1994). Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. *J Nat Prod* **57**: 801-807.
- Gaines, H.; Andersson, L. e Biberfeld, G. (1996). A new method for measuring lymphoproliferation at the single-cell level in whole blood cultures by flow cytometry. *J Immunol Methods* **195**: 63-72.
- Gery, I.; Gershon, R. K. e Waksman, B. H. (1972). Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J Exp Med* **136**: 128-142.
- Gery, I. e Waksman, B. H. (1972). Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J Exp Med* **136**: 143-155.
- Gillis, S.; Ferm, M. M.; Ou, W. e Smith, K. A. (1978). T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* **120**: 2027-2032.
- Goodpasture, C. e Bloom, S. E. (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* **53**: 37-50.
- Greaves, M. e Janosy, G. (1972). Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands. *Transplant Rev* **11**: 87-130.
- Griffin, S. G.; Wyllie, S. G.; Markham, J. L. e Leach, D. N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Frag J.* **14**: 322-332.
- Gustafson, J. E.; Liew, Y. C.; Chew, S.; Markham, J.; Bell, H. C.; Wyllie, S. G. e Warmington, J. R. (1998). Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol* **26**: 194-198.
- Hall, P. A.; Crocker, J.; Watts, A. e Stansfeld, A. G. (1988). A comparison of nucleolar organizer region staining and Ki-67 immunostaining in non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathol* **12**: 373-381.
- Hall, P. A. e Levison, D. A. (1990). Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol* **43**: 184-192.
- Hayes, A. J. e Markovic, B. (2002). Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food Chem Toxicol* **40**: 535-543.
- Heywood, V. H. (1993). Flowering plants of the world. New York, Oxford University Press.
- Hindler, J. (1998). In Antimicrobial susceptibility testing. Essential procedures for clinical microbiology. Washington, Asm Press.
- Homolka, J.; Ziegenhagen, M. W.; Gaede, K. I.; Entzian, P.; Zissel, G. e Muller-Quernheim, J. (2003). Systemic immune cell activation in a subgroup of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiration* **70**: 262-269.

- Howell, W. M. e Black, D. A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**: 1014-1015.
- Ivanyi, J. L.; Kiss, A. e Telek, B. (1992). Nucleolar organizer regions in acute and chronic leukaemias. *Acta Histochem* **93**: 453-461.
- Jacquet, B.; Canet, V.; Giroud, F.; Montmasson, M. P. e Brugal, G. (2001). Quantitation of AgNORs by flow versus image cytometry. *J Histochem Cytochem* **49**: 433-438.
- Janeway, C. A. (2002). *Imunologia: o sistema imunológico na saúde e na doença*. Porto Alegre, Artmed.
- Janossy, G. e Greaves, M. F. (1972). Lymphocyte activation. II. discriminating stimulation of lymphocyte subpopulations by phytoimitogens and heterologous antilymphocyte sera. *Clin Exp Immunol* **10**: 525-536.
- Jarvis, B. B.; Mokhtari-Rejali, N.; Schenkel, E. P.; Barros, C. S. e Matzenbacher, N. I. (1991). Trichothecene mycotoxins from brazilian *Baccharis* species. *Phytochem* **30**: 789-797.
- Johansson, S.; Goransson, U.; Luijendijk, T.; Backlund, A.; Claeson, P. e Bohlin, L. (2002). A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *J Nat Prod* **65**: 32-41.
- Joly, A. B. (1967). *Botânica: introdução a taxonomia vegetal*, 7 ed. São Paulo, Cia Editora Nacional.
- Junera, H. R.; Masson, C.; Geraud, G. e Hernandez-Verdun, D. (1995). The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *J Cell Sci* **108 (Pt 11)**: 3427-3441.
- Juven, B. J.; Kanner, J.; Schved, F. e Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *J Appl Bacteriol* **76**: 626-631.
- Knobloch, K.; Pauli, A.; Weis, N. e Weigand, H. (1988). Antibacterial activity and antifungal properties of essential oil components. *J Essential Oil Res* **1**: 119-128.
- Kristensen, F.; Walker, C.; Joncourt, F.; Bettens, F. e de Weck, A. L. (1982). Human lymphocyte proliferation. I. Correlation between activated and proliferating T-lymphocytes. *Immunol Lett* **5**: 59-63.
- Kubbies, M.; Schindler, D.; Hoehn, H. e Rabinovitch, P. S. (1985). Cell cycle kinetics by BrdU-Hoechst flow cytometry: an alternative to the differential metaphase labelling technique. *Cell Tissue Kinet* **18**: 551-562.
- Kumazawa, S.; Yoneda, M.; Shibata, I.; Kanaeda, J.; Hamasaka, T. e Nakayama, T. (2003). Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **51**: 740-742.
- Lavabre, M. (1997). *Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais.*, 4 ed. Rio de Janeiro, Record.
- Lazutka, J. R.; Mierauskiene, J.; Slapsyte, G. e Dedonyte, V. (2001). Genotoxicity of dill (*Anethum graveolens* L.), peppermint (*Mentha piperita* L.) and pine (*Pinus sylvestris* L.) essential oils in human lymphocytes and *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol* **39**: 485-492.
- Lee, C.; Liu, Q. H.; Tomkowicz, B.; Yi, Y.; Freedman, B. D. e Collman, R. G. (2003). Macrophage activation through CCR5- and CXCR4-mediated gp120-elicited signaling pathways. *J Leukoc Biol* **74**: 676-682.

- Lee, G. I.; Ha, J. Y.; Min, K. R.; Nakagawa, H.; Tsurufuji, S.; Chang, I. M. e Kim, Y. (1995). Inhibitory effects of oriental herbal medicines on IL-8 induction in lipopolysaccharide-activated rat macrophages. *Planta Med* **61**: 26-30.
- Lee, G. R.; Foerster, J.; Lukens, J.; Paraskevas, F.; Greer, J. P. e Rodgers, G. M. (1999a). Wintrobe's clinical hematology, 10 ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Lee, W.; Kim, Y.; Lee, K. Y.; Kang, C. S.; Lee, K. S.; Shim, S. I. e Han, K. (1999b). AgNOR of human interphase cells in relation to acrocentric chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* **113**: 14-18.
- Leek, R. D.; Alison, M. R. e Sarraf, C. E. (1991). Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. *J Pathol* **165**: 43-51.
- Lewis, S. L. e Van Epps, D. E. (1983). Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation* **7**: 363-375.
- Lomas, D. A.; Ip, M.; Chamba, A. e Stockley, R. A. (1991). The effect of in vitro and in vivo dexamethasone on human neutrophil function. *Agents Actions* **33**: 279-285.
- Lorente, I.; Ocete, M. A.; Zarzuelo, A.; Cabo, M. M. e Jimenez, J. (1989). Bioactivity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*. *J Nat Prod* **52**: 267-272.
- Loza-Tavera, H. (1999). Monoterpenes in essential oils. Biosynthesis and properties. *Adv Exp Med Biol* **464**: 49-62.
- Lyons, A. B. (2000). Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* **243**: 147-154.
- Macey, M. G. (1994). Flow cytometry - clinical applications. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Mackai, I. R. e Rosen, F. S. (2000). T-cell function and migration. *New Engl J Med* **343**: 1020-1034.
- Makman, M. H.; Bilfinger, T. V. e Stefano, G. B. (1995). Human granulocytes contain an opiate alkaloid-selective receptor mediating inhibition of cytokine-induced activation and chemotaxis. *J Immunol* **154**: 1323-1330.
- Malagarriga Heras, R. D. P. (1976). *Mem Soc Cienc Nat* **23**: 129. *apud* Verdi, L. G. 2005.
- Mamaev, N. N. e Mamaeva, S. E. (1990). Nucleolar organizer region activity in human chromosomes and interphase nuclei of normal, leukemic, and tumor cells as evaluated by silver staining. *Int Rev Cytol* **121**: 233-266.
- Manfron, J.B. Comunicação pessoal em agosto de 2005.
- Mans, D. R.; da Rocha, A. B. e Schwartzmann, G. (2000). Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* **5**: 185-198.
- Margni, R. A. (1990). Inmunologia e inmuoquímica. Buenos Aires, Médica Panamericana.
- Martin, S.; Padilla, E.; Ocete, M. A.; Galvez, J.; Jimenez, J. e Zarzuelo, A. (1993). Anti-inflammatory activity of the essential oil of *Bupleurum frutescens*. *Planta Med* **59**: 533-536.
- Maruyama, N.; Sekimoto, Y.; Ishibashi, H.; Inouye, S.; Oshima, H.; Yamaguchi, H. e Abe, S. (2005). Suppression of neutrophil accumulation in mice by cutaneous application of geranium essential oil. *J Inflamm (Lond)* **2**: 1.

- McConnell, E. J.; Wagoner, M. J.; Keenan, C. E. e Raess, B. U. (1999). Inhibition of calmodulin-stimulated (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity by dimethyl sulfoxide. *Biochem Pharmacol* **57**: 39-44.
- Merchant, D.; Kahn, R. e Murphy, W. (1964). Handbook of cell and organ culture, Broken Arrow, Burgess Publishing.
- Michel, M. C. (1998). Concomitant regulation of Ca²⁺ mobilization and G13 expression in human erythroleukemia cells. *Eur J Pharmacol* **348**: 135-141.
- Midorikawa, K.; Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Nagaoka, T.; Matsushige, K.; Message, D.; Huertas, A. A. e Kadota, S. (2001). Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochem Anal* **12**: 366-373.
- Molt, O. e Trka, A. (1983). *Porfum. Kostmet.* **64**: 488. *apud* Verdi, L. G. 2005.
- Morris, J. A.; Khettry, A. e Seitz, E. W. (1979). Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J Am Oil Chem Soc* **56**: 595-603.
- Mors, W. B.; Rizzini, C. T. e Pereira, N. A. (2000). Medicinal plants of Brazil. Michigan, Reference Publications.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55-63.
- Myers, R. L. (1995). Immunology - a laboratory manual. Dubuque, WCB Publishers.
- Nakatani, N. (1994). Antioxidative and antimicrobial constituents of herbs and spices. *Dev. Food Sci.* **34**: 251-271.
- NCCLS M100-S14 (2004). Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing. An NCCLS Informational Supplement, **24**: 66-67. 40 ed. NCCLS, Wayne, Pa.
- Ofner, D.; Hittmair, A.; Marth, C.; Ofner, C.; Totsch, M.; Daxenbichler, G.; Mikuz, G.; Margreiter, R. e Schmid, K. W. (1992). Relationship between quantity of silver stained nucleolar organizer regions associated proteins (Ag-NORs) and population doubling time in ten breast cancer cell lines. *Pathol Res Pract* **188**: 742-746.
- Oppenheim, M. M. e Rosenstreich, D. L. (1976). Mitogens in immunobiology. New York, NY Academic Press.
- Parham, P. (2001). O sistema imune. Porto Alegre, Artmed.
- Park, Y. K.; Alencar, S. M. e Aguiar, C. L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem* **50**: 2502-2506.
- Pasotti, D.; Mazzone, A. e Ricevuti, G. (1992). Sistema nervoso e sistema immunitario: ruolo della morfina e dei peptidi oppioidi su alcune funzioni dei granulociti neutrofili. *Minerva Med* **83**: 433-438.
- Ploton, D.; Menager, M.; Jeannesson, P.; Himber, G.; Pigeon, F. e Adnet, J. J. (1986). Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* **18**: 5-14.
- Qu, J.; Hosoi, K.; Shimojima, T.; Oi, T. e Ikeda, K. (1995). Effects of FMLP and LPS on [Ca²⁺]_i of peritoneal exudate polymorphonuclear leukocytes following onset of inflammation. *J Periodontal Res* **30**: 153-158.
- Quesenberry, P. J. e Colvin, G. A. (2001). Hematopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In Hematology, E. Beutler, M. A. Lichtman, B. S. Coller, T. J. Kipps e U. Seligsohn (eds). New York, McGraw-Hill.
- Rabgaoui, N.; Guerin, M. C. e Torreilles, J. (1994). Casein-derived peptides can modulate the production of 5-hydroxyeicosatetraenoic acid in human neutrophils. *Biochem Cell Biol* **72**: 305-311.

- Rao, A.; Luo, C. e Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**: 707-747.
- Rao, Y. V. e Chakrabarti, R. (2005). Stimulation of immunity in Indian major carp *Catla catla* with herbal feed ingredients. *Fish Shellfish Immunol* **18**: 327-334.
- Raymond, W. A. e Leong, A. S. (1989). Nucleolar organizer regions relate to growth fractions in human breast carcinoma. *Hum Pathol* **20**: 741-746.
- Reeves, G. e Todd, I. (2000). Lectures notes on immunology. Oxford, Blackwell Science.
- Reynaud, D.; Demin, P. M.; Sutherland, M.; Nigam, S. e Pace-Asciak, C. R. (1999). Hepoxilin signaling in intact human neutrophils: biphasic elevation of intracellular calcium by unesterified hepoxilin A3. *FEBS Lett* **446**: 236-238.
- Robbers, J. E.; Speedie, M. K. e Tyler, V. E. (1997). Farmacognosia e Farmacobiocotecnologia. São Paulo, Premier.
- Robinson, J. P. (1993). Handbook of flow cytometry methods. New York, Willey-Liss.
- Roitt, I. M.; Male, D. K. e Brostoff, J. (2003). Imunologia (São Paulo, Manole).
- Roussel, P. e Hernandez-Verdun, D. (1994). Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res* **214**: 465-472.
- SaiRam, M.; Sharma, S. K.; Ilavazhagan, G.; Kumar, D. e Selvamurthy, W. (1997). Immunomodulatory effects of NIM-76, a volatile fraction from Neem oil. *J Ethnopharmacol* **55**: 133-139.
- Santos, N. C.; Figueira-Coelho, J.; Martins-Silva, J. e Saldanha, C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* **65**: 1035-1041.
- Santos, N. C.; Prieto, M. J. E.; Morna-Gomes, A.; Betbeder, D. e Castanho, M. A. R. B. (1997). Structural characterization (shape and dimensions) and stability of polysaccharide/lipid nanoparticles. *Biopolymers* **41**: 511-520.
- Sartoratto, A.; Machado, A. L. M.; Delarmelina, C.; Figueira, M. G.; Duarte, M. C. T. e Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* **35**: 275-280.
- Sawai, M.; Takase, K.; Teraoka, H. e Tsukada, K. (1990). Reversible G1 arrest in the cell cycle of human lymphoid cell lines by dimethyl sulfoxide. *Exp Cell Res* **187**: 4-10.
- Scott, M. J.; Hoth, J. J.; Gardner, S. A.; Peyton, J. C. e Cheadle, W. G. (2003). Natural killer cell activation primes macrophages to clear bacterial infection. *Am Surg* **69**: 679-686.
- Sedgwick, A. D. e Willoughby, D. A. (1985). Iniciation of the inflammatory response and its prevention. In Handbook of inflammation, I. L. Bonta, M. A. Bray e M. J. Parnham (eds). New York, Elsevier.
- Shapiro, H. M. (1985). Practical flow cytometry. New York, Alan R. Liss.
- Sharma, K. e Sharma, O. P. (2001). Analysis of precocenes in the essential oil of *Ageratum* spp. by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal* **12**: 263-265.
- Sharma, M. L.; Rao, C. S. e Duda, P. L. (1994). Immunostimulatory activity of *Picrorhiza kurroa* leaf extract. *J Ethnopharmacol* **41**: 185-192.
- Shome, D. K. e Khurana, N. (1999). Distinctive AgNOR patterns of myeloid and lymphoid blasts in acute leukemia. *Am J Hematol* **61**: 149-152.

- Sibanda, S.; Chigwada, G.; Poole, M.; Gwebu, E. T.; Noletto, J. A.; Schmidt, J. M.; Rea, A. I. e Setzer, W. N. (2004). Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. *J Ethnopharmacol* **92**: 107-111.
- Siddiqui, R. A.; Akard, L. P.; Garcia, J. G.; Cui, Y. e English, D. (1999). Chemotactic migration triggers IL-8 generation in neutrophilic leukocytes. *J Immunol* **162**: 1077-1083.
- Sikkema, J.; Debont, J. A. e Poolman, B. (1994a). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* **269**: 8022-8028.
- Sikkema, J.; Debont, J. A. e Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* **59**: 201-222.
- Sikkema, J.; Debont, J. A. M. e Poolman, B. (1994b). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J Biol Chem* **269**: 8022-8028.
- Silva, G. A. A. B.; Siqueira, N. C. S.; Bauer, L. e Santana, B. M. S. (1978). Óleos essenciais na flora sulriogrande. *Tribuna Farmacêutica* **45-46**: 57-60.
- Silva, J.; Abebe, W.; Sousa, S. M.; Duarte, V. G.; Machado, M. I. e Matos, F. J. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J Ethnopharmacol* **89**: 277-283.
- Silva Júnior, A. A. (1997). Plantas medicinais e aromáticas (CD-ROM). Itajaí, Epagri.
- Silva, M. O. R. (1978). Brief history of inflammation. In Handbook of experimental pharmacology, J. R. Vane e S. H. Ferreira (eds). New York, Springer-Verlag.
- Simões, C. M. O. e Spitzer, V. (2000). Óleos Essenciais. In Farmacognosia - da planta ao medicamento., C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosman, J. C. P. Mello, L. A. Mentz e P. R. Petrovick, eds. (Porto Alegre/Florianópolis, Universidade UFRGS/UFSC).
- Simoies-Pires, C. A.; Queiroz, E. F.; Henriques, A. T. e Hostettmann, K. (2005). Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. *Phytochem Anal* **16**: 307-314.
- Smith, C. W.; Hollers, J. C.; Patrick, R. A. e Hassett, C. (1979). Motility and adhesiveness in human neutrophils. Effects of chemotactic factors. *J Clin Invest* **63**: 221-229.
- Smith, K. A. e Cantrell, D. A. (1985). Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 864-868.
- Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi-step paradigm. *Cell* **76**: 301-314.
- Springer, T. A. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Ann Rev Physiol* **57**: 827-872.
- Takeda, I. J. M. e Farago, P. V. (2001). Vegetação do parque estadual de Vila Velha: Guia de campo. Curitiba, Serzegráf.
- Teodoro-Luis, L. (1955). *Contr. Inst. Geobiol. (Brasil)* **5**: 1. **apud** Verdi, L. G. 2005.
- Trama, J.; Lu, Q.; Hawley, R. G. e Ho, S. N. (2000). The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J Immunol* **165**: 4884-4894.
- Trere, D. (2000). AgNOR staining and quantification. *Micron* **31**: 127-131.
- Trere, D.; Farabegoli, F.; Cancellieri, A.; Ceccarelli, C.; Eusebi, V. e Derenzini, M. (1991). AgNOR area in interphase nuclei of human tumours correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labelling and Ki-67 immunostaining. *J Pathol* **165**: 53-59.

- Trere, D.; Migaldi, M. e Trentini, G. P. (1995). Higher reproducibility of morphometric analysis over the counting method for interphase AgNOR quantification. *Anal Cell Pathol* **8**: 57-65.
- Trere, D.; Pession, A. e Derenzini, M. (1989). The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer regions as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* **184**: 131-137.
- Trere, D.; Pession, A.; Montanaro, L.; Chieco, P. e Derenzini, M. (1997). AgNOR protein expression and tumor growth rate of human carcinoma xenografts growing subcutaneously in nude mice. *Eur J Histochem* **41 Suppl 2**: 153-154.
- Tuteja, R. e Tuteja, N. (1998). Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **33**: 407-436.
- Ultee, A.; Bennik, M. H. e Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1561-1568.
- Uribe, S.; Ramirez, J. e Pena, A. (1985). Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J Bacteriol* **161**: 1195-1200.
- Verdi, L. G.; Brighente, I. M. C. e Pizzolatti, M. G. (2005). Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova* **28**: 85-94.
- Wang, F. I.; Yang, J. W.; Hung, S. Y. e Pan, I. J. (2001). In vitro migratory responses of swine neutrophils to *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Exp Anim* **50**: 139-145.
- Wang, J. Z.; Mao, X. J.; Ito, H. e Shimura, K. (1991). Immunomodulatory activity of polysaccharide from *Acanthopanax obovatus* roots. *Planta Med* **57**: 335-336.
- Wilkinson, P. C. (1974). Surface and cell membrane activities of leukocyte chemotactic factors. *Nature* **251**: 58-60.
- Wilkinson, P. C. (1988). Micropore filter methods for leukocyte chemotaxis. *Methods Enzymol* **162**: 38-50.
- Wilkinson, P. C. (1996). Cell Locomotion and chemotaxis: basic concepts and methodological approaches. *Methods* **10**: 74-81.
- Wilkinson, P. C. (1998). Assays of leukocyte locomotion and chemotaxis. *J Immunol Methods* **216**: 139-153.
- Wilkinson, P. C. e Haston, W. S. (1988). Chemotaxis: an overview. *Methods Enzymol* **162**: 3-16.
- Woolf, A. (1999). Essential oil poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol* **37**: 721-727.
- Zentay, Z.; Sharaf, M.; Qadir, M.; Drafta, D. e Davidson, D. (1999). Mechanism for dexamethasone inhibition of neutrophil migration upon exposure to lipopolysaccharide in vitro: role of neutrophil interleukin-8 release. *Pediatr Res* **46**: 406-410.
- Zhang, X. Q. e Eyzaguirre, C. (1999). Effects of hypoxia induced by Na₂S₂O₄ on intracellular calcium and resting potential of mouse glomus cells. *Brain Res* **818**: 118-126.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

- a) A proposta deste projeto é estabelecer um painel de ensaios biológicos *in vitro*, que possam, de forma dinâmica, demonstrar atividades biológicas de constituintes de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas pela população e, simultaneamente contribuir para a elucidação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos.
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário doar uma amostra de sangue a qual será obtida por punção venosa de uma de suas veias, localizadas na região da prega do cotovelo. A quantidade de sangue por você doada será destinada à separação dos leucócitos para padronização e realização de ensaios biológicos.
- c) Como em qualquer outro diagnóstico clínico-laboratorial, você poderá experimentar alguns leves desconfortos relacionados a essa coleta, porém de ordem passageira.
- d) Estão garantidas todas as informações pertinentes ao projeto que você queira obter, antes, durante e depois do estudo.
- e) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de se recusar a participar do estudo ou, se aceitar participar, retirar seu consentimento a qualquer momento.
- f) Se qualquer informação relacionada ao estudo for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a confidencialidade do doador seja mantida.
- g) Em caso de necessidade, você poderá comunicar-se imediatamente com Almeriane Maria Weffort-Santos, nos telefones 3360 4087 ou 3232 4037.
- h) Todas as despesas necessárias para a realização dessa pesquisa (exames, etc...) não são de responsabilidade do doador.
- i) Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro.
- j) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome e, sim, um código.

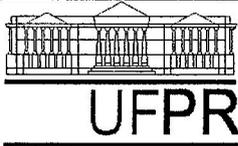
Eu, _____, abaixo assinado, li o texto acima e compreendi a natureza e o objetivo desse estudo do qual fui convidado a participar. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação no estudo a qualquer momento sem justificar minha decisão e concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Assinatura do doador

__/__/__
Data

Assinatura do Pesquisador

__/__/__
Data



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Curitiba, 28 de abril de 2.004.

Ilmo (a) Sr. (a)
ALMERIANE MARIA WEFFORT SANTOS

Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa **intitulado** “ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS ISOLADOS OU DERIVADOS DE PLANTAS MEDICINAIS”, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR em reunião do dia 28 de abril de 2.004.

Registro **CEP/SD**: 039.SI.003/04-01

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente

Prof. Dr. Miguel Ibrahim A. Hanna Sobrinho
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde