

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Fracionamento bioguiado de *Baccharis trimera* visando a atividade anti-inflamatória

Cristiane Bernardes de Oliveira

Porto Alegre, 2009.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Fracionamento bioguiado de *Baccharis trimera* visando a atividade anti-inflamatória

Dissertação apresentada por
Cristiane Bernardes de Oliveira
para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Grace Gosmann

Porto Alegre, 2009

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em Nível de Mestrado, área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Matérias-Primas Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.03.2009, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Marilene Garrido

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Jarbas Alves Montanha

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

O48f Oliveira, Cristiane Bernardes de
Fracionamento bioguiado de baccharis trimera visando a atividade anti-inflamatória / Cristiane Bernardes de Oliveira. – Porto Alegre : UFRGS, 2009. – xx, 106 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Baccharis trimera. 2. Asteraceae. 3. Carqueja. 4. Atividade anti-inflamatória. 5. Atividade antioxidante. 6. Pleurisia. I. Gosmann, Grace. II. Título.

CDU: 615.2.011

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria C. F. Ferreira – CRB10/480

Agradecimentos

À Prof. Dra. Grace Gosmann. Não tenho palavras para agradecer a oportunidade, a confiança, a orientação, a amizade, o carinho, o apoio, o estímulo e o exemplo profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira pela confiança e colaboração nos experimentos biológicos desenvolvidos neste trabalho.

À Prof. Dra. Melissa Guerra Simões Pires pela amizade, carinho, e disponibilidade no auxílio deste trabalho.

À Prof. Dra. Gilsane von Poser pela coleta da carqueja.

À minha amiga Andréia Spanamberg pelo incentivo e estímulo e ao seu orientador Prof. Dr. Laerte Ferreiro pela confiança e indicação.

Às minhas colegas queridas do PPGCF pelas várias horas de estudos juntas Fernanda de Costa, Caroline Venturi, Danieli Ceni, Luiza Salles, Camila Rodio, Clarissa Bettoni, Damiana Vianna e Greice Goerck.

À minha bolsista de iniciação científica Lucimara Nardi Comunello, pelo companheirismo, amizade e competência.

Às gurias do Laboratório de Fitoquímica: Anna Yendo, Adriana Barlette, Melissa Heinrich, Cíntia Kiekow, Tabitha Dahmer e principalmente a Luciana Dalla Vechia, minha companheira de Congresso e de lanchinhos da tarde, pela amizade, carinho, estímulo e pelos vários “Happy Hours” do nosso Laboratório.

À Simone Quintana e a Simone Gnoatto por terem me acolhido tão bem no Lab. 105 quando eu cheguei.

À minha sempre companheira nos últimos tempos de experimentos Aline Zimmer

Ao Adroaldo Lunardelli e ao Robson Henrich Amaral pelos incansáveis sábados de trabalho, pela responsabilidade e competência com que sempre realizaram o seu trabalho.

À Gabriela Lucca.

Aos colegas e Profs. do Laboratório de Biofísica Celular e Inflamação da PUC.

À Vanusa Manfredini pelas dicas de estatística e as suas bolsistas de iniciação científica Giovana Biancini e Camila Vanzine pelo auxílio na leitura das lâminas de diferencial citológico.

À Gilda Neves pela preciosa ajuda na estatística da ANOVA de duas vias.

Ao Michael, meu esposo, pelo amor, incentivo, e por sempre acreditar na minha capacidade, torcer pela minha vitória e por estar sempre do meu lado na conquista deste grande sonho.

À minha filhinha Gabriela pelo simples fato dela existir. A mamãe te ama muito.

Aos meus pais, Marli e Carlos Alberto pela vida, dedicação, amor e por terem cuidado com tanto carinho da Gabi para que eu pudesse realizar este grande sonho.

À minha sogra Maria Helena e a Dona Dorvalina pelo apoio, carinho e por também terem cuidado com tanto amor da Gabi, muitas vezes até altas horas da noite, para que eu pudesse realizar este trabalho.

Aos meus irmãos Bárbara e Carlos Eduardo pelo amor, amizade e companheirismo.

A todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, os quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação profissional e pessoal.

Ao CNPq pela bolsa de estudos nestes dois anos de trabalho, o qual proporcionou a realização do meu mestrado com dedicação exclusiva.

E a Deus por ser minha fonte de luz e inspiração.

Resumo

Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae), popularmente conhecida como carqueja, é nativa da América sendo amplamente empregada na medicina popular para problemas hepáticos, digestivos, e como anti-inflamatória. Em sua composição química destaca-se maior acúmulo de flavonas, flavonóis e de diterpenos labdanos e clerodanos. Diversos estudos vêm sendo realizados, em especial para as atividades anti-inflamatórias e antimicrobianas. Com isso, iniciou-se o fracionamento do extrato de *B. trimera* visando à identificação da fração ou compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória. Das partes aéreas de *B. trimera* foram obtidas as frações diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e aquosa, além das frações saponinas e flavonóides. Essas seis frações foram avaliadas para a atividade anti-inflamatória através do modelo de inflamação aguda da pleurisia induzida por carragenina e foram avaliados os seguintes parâmetros no líquido pleural: volume de exsudato, contagem de leucócitos totais, diferencial citológico, concentração protéica e determinação de NO no exsudato. Todas as frações testadas diminuíram significativamente os parâmetros analisados quando comparados ao grupo carragenina (ANOVA, $P < 0,05$), evidenciando assim potencial atividade anti-inflamatória. A determinação de fenóis totais e a atividade antioxidante foram avaliadas através dos métodos de Folin-Ciocalteu e através do ensaio espectrofotométrico com o radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH^{*}), respectivamente. As frações flavonóides e acetato de etila (1 mg/ml) apresentaram alto potencial antioxidante, não se diferenciando estatisticamente (ANOVA, $P < 0,05$) das substâncias de referência vitamina C, quercetina e luteolina nas mesmas concentrações, sugerindo dessa forma que a ação antioxidante destas frações deve-se à presença de flavonóides. A continuidade dos estudos fitoquímicos e a identificação do potencial antioxidante e anti-inflamatório de *B. trimera*, além de contribuir para a diferenciação química das espécies do gênero *Baccharis* poderão credenciá-la para o desenvolvimento de um fármaco com atividade anti-inflamatória e antioxidante.

Palavras-chaves: *Baccharis trimera*, atividade anti-inflamatória, pleurisia, atividade antioxidante

Abstract

Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae), popularly known as “carqueja”, is native to America and it is widely used in traditional medicine for gastrointestinal treatments, for liver diseases, as digestive and to anti-inflammatory purposes. It presented accumulation of flavones, flavonols and diterpenes. Several studies have been performed to study its anti-inflammatory and antimicrobial activities. Considering this, we initiated the fractionation of *B. trimera* extract in order to identify the fraction or compounds responsible for its anti-inflammatory activity. From the aerial parts of *B. trimera* it were obtained the fractions: dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol, aqueous and also saponins and flavonoids fractions. All fractions were characterized by TLC. These six fractions were evaluated for the anti-inflammatory activity using the carrageenan-induced pleurisy, as a model of acute inflammation via i.p. The following parameters were determined in the pleural fluid: the exudate volume, total leukocyte count, cytological differences, protein concentration and determination of NO. All tested fractions decreased significantly the analyzed parameters when compared to the carrageenan group (ANOVA, $P < 0.05$), showing potential anti-inflammatory activity. The determination of total phenols and antioxidant activity were evaluated by the Folin-Ciocalteu spectrophotometric assay and by the radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazil (DPPH•) method, respectively. The flavonoid and ethyl acetate fractions (1 mg / ml) showed high antioxidant potential that were similar (ANOVA, $P < 0.05$) from that of the reference substances: vitamin C, quercetin and luteolin in the same concentrations, thus suggesting that the antioxidant activity of these fractions is due to the presence of flavonoids. The phytochemical studies and the identification of potential antioxidant and anti-inflammatory activities of *B. trimera*, will contribute to the chemical differentiation of *Baccharis* species and also it should support the development of a drug with anti-inflammatory and antioxidant activity.

Keywords: *Baccharis trimera*, anti-inflammatory, pleurisy, antioxidant

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema geral da metodologia utilizada para a avaliação biológica das partes aéreas de <i>B. trimera</i>	5
Figura 2.. <i>B. trimera</i> collected in Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil (photo from author).....	15
Figura 3. neo-clerodane diterpene 1 isolated from <i>B. trimera</i>	17
Figura 4. Flavonoids isolated from <i>B. trimera</i>	27
Figura 5. TLC profile of aqueous extracts from <i>Baccharis</i> species.....	19
Figura 6. TLC profile of aqueous extracts from <i>Baccharis</i> species.....	28
Figura 7: Esquema de obtenção das frações a partir de <i>B trimera</i>	42
Figura 8. CCD da fração diclorometano (DM) e do extrato bruto (BRU). Fase móvel.....	51
Figura 9. CCD das frações <i>n</i> -butanol (BU), aquosa (AQ), acetato de etila (AE), e do extrato bruto (EBH). Fase móvel: CHCl ₃ :EtOH:AcOH (100:40:6, v/v/v). Agente cromogênico: anisaldeído sulfúrico, com posterior aquecimento a 100°C.....	51
Figura 10. CCD do fracionamento da fração acetato de etila (AE) + <i>n</i> -butanol (BU).....	52
Figura 11. CCD do fracionamento da fração <i>n</i> -butanol (BU) + acetato de etila (AE) em comparação com padrão quercetina (Q).....	53
Figura 12. Curva padrão do ácido gálico nas concentrações de 10 a 30 µg/mL.....	54
Figura 13. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu do extrato bruto hidroetanólico e das frações de <i>B. trimera</i>	56
Figura 14. Curva padrão da catequina nas concentrações de 10 a 50 µg/mL..	57
Figura 15. Curva padrão de ácido tânico nas concentrações de 100 a 500 µg/mL.....	58
Figura 16. Curva padrão do DPPH [•] nas concentrações de 5 a 150 µM.....	59
Figura 17. Representação gráfica da atividade antioxidante do extrato bruto hidroetanólico e das frações diclorometano, acetato de etila e <i>n</i> -butanol e dos padrões positivos quercetina e luteolina em diferentes concentrações frente ao DPPH [•] em 30 minutos de reação.....	60

Figura 18. Representação gráfica da atividade antioxidante das frações acetato de etila + n-butanol, aquosa, saponinas e flavonóides e dos padrões positivos quercetina e luteolina em diferentes concentrações frente ao DPPH* em 30 minutos de reação.....	60
Figura 19. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração do extrato bruto hidroetanólico versus a porcentagem da atividade antioxidante.....	61
Figura 20. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração diclorometano versus a porcentagem da atividade antioxidante.....	62
Figura 21. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração acetato de etila versus a porcentagem da atividade antioxidante.....	62
Figura 22. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração n-butanol versus a porcentagem da atividade antioxidante.....	63
Figura 23. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração acetato de etila + n-butanol versus a porcentagem da atividade antioxidante.....	63
Figura 24. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração aquosa versus a porcentagem da atividade antioxidante.....	64
Figura 25. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração saponinas versus a porcentagem da atividade antioxidante.....	64
Figura 26. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração flavonóides versus a porcentagem da atividade antioxidante.....	65
Figura 27. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração do padrão positivo quercetina versus a porcentagem da atividade antioxidante.....	65
Figura 28. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração do padrão positivo luteolina versus a porcentagem da atividade antioxidante.....	66
Figura 29. Atividade antioxidante do extrato bruto hidroetanólico e das frações de <i>B. trimera</i>	68
Figura 30. Concentração de NO da fração diclorometano.....	78

Figura 31. Concentração de NO da fração acetato de etila.....	79
Figura 32. Concentração de NO da fração <i>n</i> -butanol.....	81
Figura 33. Concentração de NO da fração aquosa.....	83
Figura 34. Análise estatística no líquido pleural das frações testadas.....	84
Figura 35. Análise estatística nos leucócitos totais das frações testadas.....	84
Figura 36. Análise estatística nos polimorfonucleares das frações testadas....	85
Figura 37. Análise estatística na concentração de proteínas totais das frações testadas.....	85
Figura 38. Análise estatística na concentração de NO das frações testadas...	86
Figura 39. Líquido pleural da fração saponinas	87
Figura 40. Leucócitos totais da fração saponinas.....	88
Figura 41. Polimorfonucleares da fração saponinas.....	88
Figura 42. Proteínas totais da fração saponinas.....	89
Figura 43. Determinação de NO da fração saponinas.....	89
Figura 44. Líquido pleural da fração flavonóides.....	91
Figura 45. Leucócitos totais da fração flavonóides.....	91
Figura 46. Polimorfonucleares da fração flavonóides.....	92
Figura 47 Proteínas totais da fração flavonóides.....	92
Figura 48 Determinação de NO da fração flavonóides.....	93

Lista de Tabelas

Tabela 1. Flavonoids isolated from <i>B. trimera</i>	18
Tabela 2. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações.....	54
Tabela 3. Determinação de fenóis por catequina.....	57
Tabela 4 Determinação de fenóis pela precipitação com proteínas.....	58
Tabela 5. CE ₅₀ das substâncias analisadas e seus respectivos valores equivalentes a 1 g de ácido ascórbico.....	67
Tabela 6. Pleurisia induzida por carragenina, após 30 minutos de pré-tratamento com a fração diclorometano (DM) nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p.....	65
Tabela 7. Pleurisia induzida por carragenina, após 30 minutos de pré-tratamento com a fração acetato de etila (AE) nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p.....	79
Tabela 8. Pleurisia induzida por carragenina, após 30 minutos de pré-tratamento com a fração <i>n</i> -butanol (BU) nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p.....	81
Tabela 9. Pleurisia induzida por carragenina, após 30 minutos de pré-tratamento com a fração aquosa (AQ) nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p...	82

Lista de Abreviaturas

AA = ácido araquidônico

AE = fração acetato de etila

AE+BUT = fração acetato de etila + *n*-butanol

AQ = fração aquosa

BUT ou BU = fração *n*-butanol

CE₅₀ = concentração efetiva para obter 50% do máximo da atividade estimada

Cg = carragenina

Dexa = dexametasona

DM = fração diclorometano

EAG = equivalentes de ácido gálico

EAT = equivalentes de ácido tânico

EBT = extrato bruto hidroetanólico

EC = equivalentes de catequina

FLA = fração flavonóides

LUT = luteolina

QEAA = quantidade equivalente em ácido ascórbico

QUER = quercetina

R_f = razão de frente

SAP = fração saponinas

VIT C = ácido ascórbico

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	7
CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica para <i>Baccharis trimera</i>	11
Abstract.....	13
Introduction.....	14
i. Name of the herb.....	14
ii. Origin and Distribution.....	16
iii. Parts used for medicinal purpose.....	16
iv. Chemical constituents of medicinal value.....	16
v. Mechanism of action.....	20
vi. Biological activities.....	20
vii. Uses / aliments where this products is used.....	25
viii. Dosage / mode of usage.....	25
ix. Adverse reactions / side effects.....	25
x. Contraindications.....	25
xi. Precautions for usage.....	25
xii. Processing needed in the use of this medicinal plant.....	26
xiii. Substitutes and adulterants identified dor this plant.....	26
xiv. Commercial products available already.....	28
xv. Scope for commercial production.....	29
xvi. Agro-tecniques for commercial production.....	29
xvii. References.....	30
CAPÍTULO 2: Análise fitoquímica e estudo da atividade antioxidante de <i>Baccharis trimera</i> através do método DPPH*	37
1. Introdução.....	39
2. Objetivos.....	40
3. Materiais e Métodos.....	40
3.1. Material vegetal.....	40
3.2. Preparação e fracionamento das frações de <i>Baccharis trimera</i>	41
3.2.1. Preparação do extrato bruto hidroetanólico.....	41
3.2.2. Preparação das frações: diclorometano, acetato de etila, <i>n</i> -butanol e aquosa.....	41
3.2.3. Obtenção das frações enriquecidas de saponinas e de flavonóides.....	42
3.3. Análise cromatográfica.....	42
3.4. Solventes e reagentes.....	43
3.5. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações.....	43
3.5.1. Preparação da amostra do extrato bruto hidroetanólico.....	43
3.5.2. Preparação da amostra da fração diclorometano.....	44
3.5.3. Preparação da amostra da fração acetato de etila.....	44
3.5.4. Preparação da amostra da fração <i>n</i> -butanol.....	44
3.5.5. Preparação da amostra da fração aquosa.....	45
3.5.6. Preparação da amostra da fração saponinas.....	45
3.5.7. Preparação da amostra da fração flavonóides.....	45
3.6. Determinação de fenóis por catequina e ácido tânico.....	46
3.6.1 Preparação das amostras para determinação de fenóis por	

catequina.....	47
3.6.2 Preparação das amostras para determinação de fenóis pela precipitação com proteínas.....	47
3.7. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	47
3.7.1 Método fotocolorimétrico do DPPH*.....	47
3.7.2. Preparação das amostras.....	47
3.7.3. Preparação da curva-padrão do DPPH*.....	48
3.7.4. Avaliação da capacidade de reação com 2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*).....	48
4 . Resultados e Discussão.....	49
4.1. Rendimento do extrato bruto hidroetanólico.....	49
4.2. Rendimento das frações diclorometano, acetato de etila, <i>n</i> -butanol e aquosa.....	49
4.3. Rendimento das frações enriquecidas de saponinas e de flavonóides.....	49
4.4. Análise cromatográfica do extrato bruto hidroetanólico e das frações de <i>B. trimera</i>	49
4.5. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	53
4.6. Determinação de fenóis por catequina.....	56
4.7. Determinação de fenóis pela precipitação com proteínas.....	57
4.8. Método fotocolorimétrico do DPPH*.....	59
CAPÍTULO 3: Avaliação da atividade anti-inflamatória das frações de <i>B. trimera</i>	71
1. Introdução	73
2. Objetivos.....	74
3. Materiais e Métodos.....	74
3.1. Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	74
3.1.1. Ensaio de pleurisia.....	74
3.1.2. Indução da pleurisia e coleta do exsudato.....	75
3.1.3 Análise dos parâmetros inflamatórios.....	75
3.1.3.1. Volume do exsudato.....	75
3.1.3.2. Contagem de células totais.....	75
3.1.3.3. Diferencial citológico.....	76
3.1.3.4. Determinação de proteínas totais.....	76
3.1.3.5. Determinação de óxido nítrico (NO).....	76
3.2. Comitê de ética.....	76
3.3. Análise estatística.....	76
4. Resultados e Discussão.....	76
4.1. Frações diclorometano, acetato de etila, <i>n</i> -butanol e aquosa administradas nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p.....	77
4.2. Fração saponinas administrada nas doses de 15, 22,5 e 30 mg/kg, i.p....	86
4.3. Fração flavonóides administrada nas doses de 5, 10 e 15 mg/kg, i.p.....	89
CONCLUSÕES FINAIS	97
REFERÊNCIAS	101

INTRODUÇÃO GERAL

Introdução Geral

O uso de plantas com fins medicinais no tratamento, cura e prevenção de doenças é quase tão antigo quanto à espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres e mercados populares (MACIEL *et al.*, 2002). Observações sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais, comprovados pela população, contribuem de forma significativa para divulgar as virtudes terapêuticas dos vegetais, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar da maioria das plantas não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, e, sobretudo dos países em desenvolvimento, mantêm a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MACIEL *et al.*, 2002; VEIGA Jr. *et al.*, 2005). O uso popular de medicamentos ou fórmulas medicamentosas que empregam extratos totais ou parcialmente purificados, infusões ou destilados representam parcela significativa no tratamento de doenças, principalmente em países em desenvolvimento onde residem 80% da população mundial (BALANDRIN *et al.*, 1985).

A família ASTERACEAE concentra um grande número de espécies com potencial terapêutico, destacando o gênero *Baccharis* utilizado tanto na medicina popular como na produção de fitoterápicos (BORELLA *et al.*, 2006).

B. trimera popularmente conhecida como carqueja, é amplamente empregada na *forma* de chás pela população no Brasil para problemas hepáticos, digestivos e como anti-inflamatória (TORRES *et al.*, 2000). Em sua composição química destaca-se maior acúmulo de flavonas, flavonóis e de diterpenos labdanos e clerodanos. (VERDI *et al.*, 2005; ABAD and BERMEJO, 2007) Diversos estudos vêm sendo realizados com *B. trimera*, em especial as atividades anti-inflamatória e antimicrobiana, bem como analgésica, antidiabética, antihepatotóxica, atividade antimutagênica e efeito relaxante muscular (SOICKE and LENG-PESCHLOW, 1987; GENÉ *et al.*, 1992, 1996; TORRES *et al.*, 2000; DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; 2005; BETONI *et al.*, 2006).

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o extrato aquoso de *B. trimera* diminuiu a inflamação e o dano celular em pleurisia induzida por veneno de *Dirphia* sp. (LEITE *et al.*, 2007).

Neste contexto, considerando o conjunto de estudos realizados com *B. trimera* e o amplo potencial terapêutico apresentado por esta espécie vegetal, o presente trabalho apresenta como objetivo geral o fracionamento de *B. trimera*, visando à identificação e caracterização da fração ou frações responsáveis pela atividade anti-inflamatória e antioxidante.

O presente trabalho foi estruturado em três capítulos:

Capítulo 1: Revisão bibliográfica de *Baccharis trimera*

Capítulo 2: Análise fitoquímica e estudo da atividade antioxidante de *Baccharis trimera* através do método DPPH*.

Capítulo 3: Avaliação da atividade anti-inflamatória de *B. trimera*.

A figura 1 apresenta um esquema geral das etapas de metodologia experimental empregada na preparação e avaliação biológica de *B. trimera* investigadas neste trabalho.

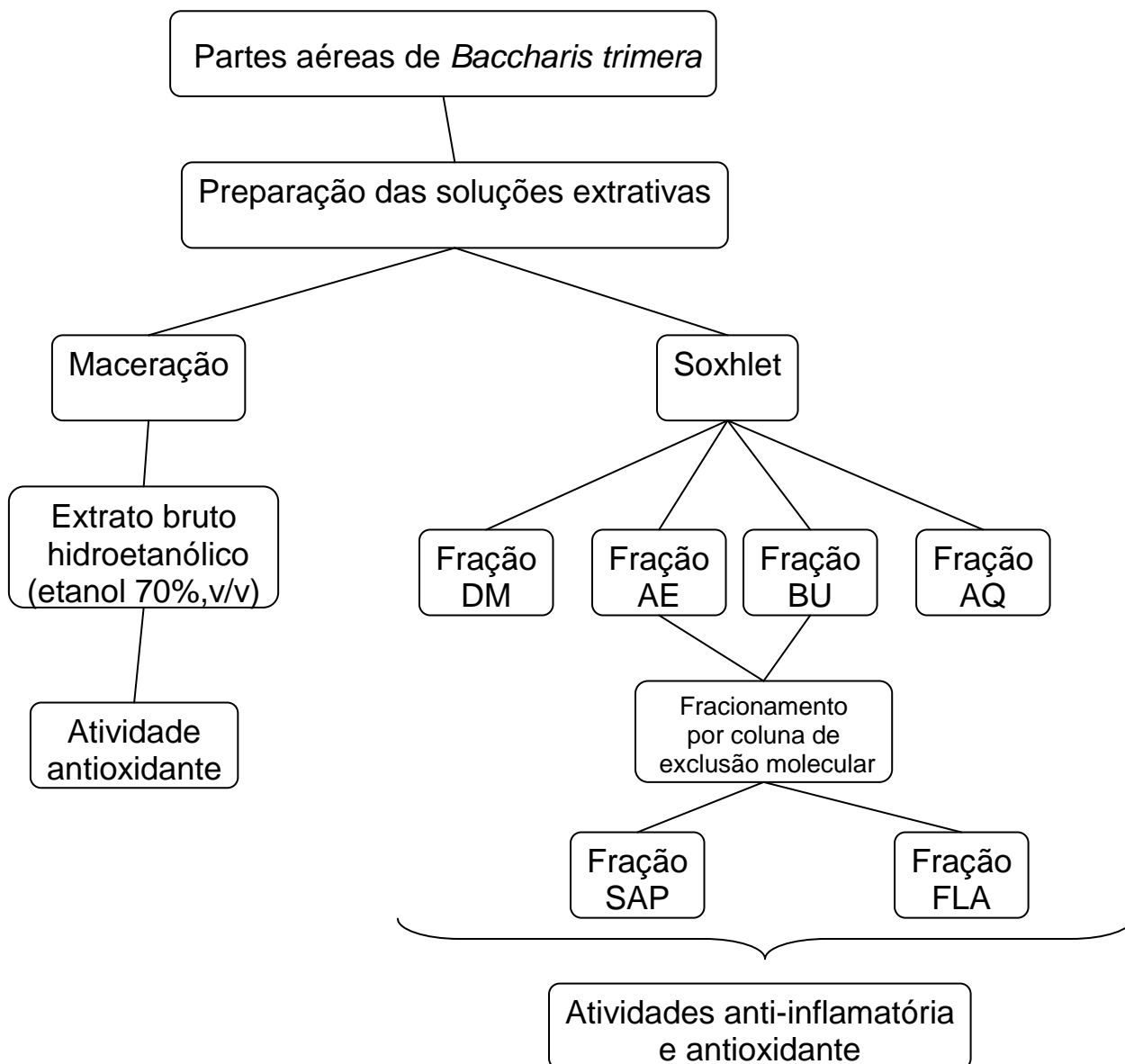


Figura 1. Esquema geral da metodologia utilizada para a avaliação biológica das partes aéreas de *B. trimera*.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

1. Realizar a análise fitoquímica e determinar a quantificação de fenólicos totais do extrato hidroetanólico e das frações de *B. trimera*.
2. Identificar o grupo de substâncias (fração) responsável pela atividade anti-inflamatória na pleurisia induzida por carragenina.
3. Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto hidroetanólico e das frações de *Baccharis trimera* através do ensaio espectrofotométrico com o radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]).

Objetivos Específicos

1. Realizar a análise fitoquímica através de cromatografia em camada delgada (CCD) do EBH e das frações de DM, AE, BU, AQ, SAP e FLA de *B. trimera*.
2. Realizar a quantificação de fenóis do EBH e das frações de DM, AE, BU, AQ, SAP e FLA de *B. trimera* através dos métodos Folin-Ciocalteu, por Catequinas e pela Precipitação com proteínas.
3. Avaliar as frações de DM, AE, BU, AQ, SAP e FLA de *B. trimera* frente aos parâmetros inflamatórios: volume de exsudato, leucócitos totais, diferencial citológico, proteínas totais e óxido nítrico.
4. Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do EBH e das frações DM, AE, BU, AE+BU, AQ, SAP e FLA de *Baccharis trimera* através do ensaio espectrofotométrico com o radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]).

CAPÍTULO 1

Capítulo 1. Revisão bibliográfica para *Baccharis trimera*

Esta revisão da literatura foi aceita com o título “*Baccharis trimera* (Less.) DC. Carqueja” para publicação na Série “Recent Progress in Medicinal Plants (Ethnomedicine and Molecular Target II, vol-28., Studium Press, LLC, USA)

Abstract: Medicinal teas prepared from the aerial parts of *Baccharis trimera* are used in folk medicine to treat gastrointestinal and liver diseases and inflammatory processes. Although *B. trimera* is the official species of the Brazilian Pharmacopoeia, the reported studies on chemical composition and biological activity were mainly conducted using animals and aqueous or ethanolic extracts. The compounds found in *B. trimera* were diterpenoids, flavonoids, saponins and volatile oils. There are very few experiments of cultivation with *B. trimera*. Due its popular use, it is a target for intense wild harvest due the high demand in the commercial market of plants. As the species presented lead compounds, it is very important to continue its investigation in order to contribute to new drug discovery.

Keywords: *Baccharis trimera*, carqueja, Asteraceae, medicinal plant, terpenes, flavonoids.

Introduction: *Baccharis trimera* (Less.) DC., a member of Asteraceae, is a shrub native to South Brazil, Paraguay, Uruguay and Argentina. Its aerial parts have been used in folk medicine as diuretic and digestive, for liver diseases and to anti-inflammatory purposes^{2,8,43}.

B. trimera is the official species of the Brazilian Pharmacopoeia and it is used in several phytomedicines commercialized in Brazil to gastrointestinal disorders in the form of tinctures, elixirs and tablets^{1,10}.

Literature cites mainly the presence of volatile oil, flavones, flavonol, saponins and diterpenes^{18,31,38,43}. In relation to pharmacological activity, several studies demonstrated the anti-inflammatory and antibacterial activities of its ethanol and aqueous extracts, as well as analgesic, antioxidant, antidiabetic, antihepatotoxic, antimutagenic activities and vascular relaxant effect^{5,13,29,30,42}. A diterpenoid compound with anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties was isolated from *B. trimera*¹⁹.

i. Name of the herb:

- Common names:

Baccharis trimera is known in Brazil as carqueja, carqueja verdadeira, carqueja amarga, vassourinha. In Paraguay, as carquejilla, carqueija, chirca melosa, and in Argentina as carqueja, bacanta, cacalia-amara, caclia-doce, carqueja-amara, carqueja-amarga, cuchi-cuchi, quinsu-cucho, três-espigas, bacanta, bacárida, cacaia-amarga, cacália-amarga, cacália-amargosa, carqueja-do-mato, carquejinha, condamina, quina-de-condamiana, tiririca-de-babado, vassoura³.

- Botanical name:

Baccharis trimera (Less.) DC.²⁴

- Family:

ASTERACEAE. Taxonomically *B. trimera* belongs to the subtribe Baccharidinae Hoffman, tribe Astereae and Asteraceae family; belonging to section *Caulopterae*^{3,4,24}.

- Description of different parts:

B. trimera is a perennial green herb that grows vertical to a height of 1–2 m and produces yellowish-white flowers at the upper part of the branches. The green, flat, winged stems assume the leaf photosynthetic role, as foliar appendages are absent. It is ramified, having sections of the branches around 0.5-1.5 cm of width and it has very small and oval leaves^{3,4,10}. (Fig 2)



Figure 2. *B. trimera* collected in Guaíba, Rio Grande do Sul, Brazil (photo from author)

ii. Origin and Distribution:

There are many species of *Baccharis* in Brazil and Andes territory indicating that one of these areas is probably the origin of this genus. *Baccharis* has more than 400 species native to tropical and subtropical America. It is a herb found in Bolivia, Brazil, Colombia and Peru, as well as in tropical parts of Argentina, Paraguay, and Uruguay. In Brazil, it is found in the states of Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul^{3,4,16,17,38}.

There are some experiments about cultivation using seeds or propagation by cuttings^{6,9,11}.

iii. Parts used for medicinal purpose:

Aerial parts^{2,8,17}

iv. Chemical constituents of medicinal value:

Flavonoids, together with diterpenes, are the major compounds found in *Baccharis* and they are described as good chemical markers to ASTERACEAE family^{2,43}.

To *B. trimera*, there are no studies relating the biological activity and the chemical composition.

1. Diterpenes

Diterpenes, the major compounds found in *Baccharis*, are represented mainly by clerodanes and less common by *ent*-labdanes and kauranes⁴³. From the aerial parts of *B. trimera*, the presence of *neo*-clerodane type^{18,19,44} have been reported.

(Fig 3)

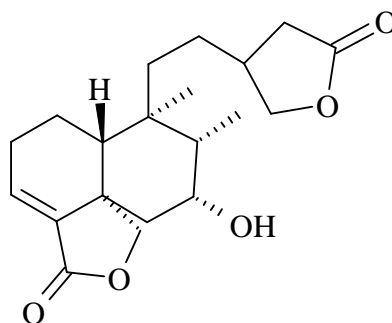


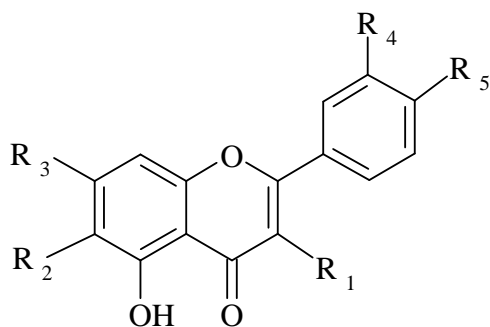
Figure 3. neo-clerodane diterpene **1** isolated from *B. trimera*

2. Phenolic Compounds

To *B. trimera*, flavonoids are the main phenolic compounds identified according Table 1. Their chemical structures are presented in Fig 4. The content of two flavones was determined in native and cultivated populations and there were no differences when comparing both populations³⁶.

Table 1. Flavonoids isolated from *B. trimera*

Flavonoid	Extract	Reference
apigenin	ethyl acetate, methanol	Soicke and Leng-Peschlow, 1987, Nakasugi and Komai, 1998
7,4'-di-O-methyl- apigenin	methanol	Gianello <i>et al.</i> , 2000
cirsimaritin	methanol	Nakasugi and Komai, 1998
eupatorin	ethyl acetate, ethanol 50%. chloroform	Herz <i>et al.</i> , 1977, Mello and Petrovick, 2000 Torres <i>et al.</i> , 2000
genkwanin	methanol	Nakasugi and Komai, 1998, Gianello <i>et al.</i> , 2000
hispidulin	ethyl acetate, methanol	Soicke and Leng-Peschlow, 1987, Nakasugi and Komai, 1998
isoquercetin	aqueous	Simões-Pires <i>et al.</i> , 2005b
Luteolin	ethyl acetate	Soicke and Leng-Peschlow, 1987
Nepetin	ethyl acetate, aqueous	Soicke and Leng-Peschlow, 1987, Simões-Pires <i>et al.</i> , 2005b
quercetin	ethyl acetate, aqueous, ethanol 50%	Soicke and Leng-Peschlow, 1987, Simões-Pires <i>et al.</i> , 2005b, Mello and Petrovick, 2000
3-O-methyl- quercetin	ethanol 50%	Mello and Petrovick, 2000
5,6-dihydroxy- 7,3',4'- trimethoxyflavone	methanol	Borella <i>et al.</i> , 2006
Rutin	butanolic fraction from aqueous extract	Gené <i>et al.</i> , 1996



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Apigenin	H	H	OH	H	OH
Cirsimaritin	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH
Eupatorin	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃
Genkwanin	H	H	OCH ₃	H	OH
Hispidulin	H	OCH ₃	OH	H	OH
Luteolin	H	H	OH	OH	OH
Nepetin	H	OCH ₃	OH	OH	OH
Quercetin	OH	H	OH	OH	OH

Figure 4. Flavonoids isolated from *B. trimera*

3. Triterpenes

The presence of saponins in *B. trimera* was verified using qualitative tests as foam index^{7,10,22}. It was observed the presence of five saponins in its butanolic fraction and after acid hydrolysis the major aglycone was identified as 3,16-dihydroxyolean-12-en-28-oic acid (an echinocystic acid derivative) by UV-VIS, EI-MS and NMR¹³.

4. Volatile Oil

Volatile oils from different sources including wild and cultivated *B. trimera* showed variations in their chemical composition^{20,37,38}. The quantitative determinations varied from 0.08% to 0.9% of volatile oil and up to 26 compounds have been identified^{14,20,37,38}. Although some authors³⁸ suggested that carquejyl acetate may be a chemical marker for *B. trimera*, the lack of carquejol and carquejyl acetate was also reported^{20,37}. The variation pattern in the volatile oil could be due genetic variability of *B. trimera* or in part environmentally determined³⁷. Some main components presented in its volatile oil were: carquejol, carquejyl acetate, (*E*)-caryophyllene, germacrene D, globulol, ledol, α -pinene, spathulenol, other monoterpenes and sesquiterpenes.

v. Mechanism of action:

Still unknown.

vi. Biological activities:

The assays described in literature used only animals.

1. Anti-inflammatory, ulcerogenic and analgesic activity:

Animal experiments indicated the anti-inflammatory effect of the aqueous extract (100 mg/kg, i.p.) of *B. trimera* due the marked inhibition of paw edema of 61% while the anti-inflammatory naproxen (5 mg/kg i.p.) inhibited the paw edema in 47% in the same experiment. Aqueous extract was not active when administered orally¹².

The anti-inflammatory activity of the butanolic extract from *B. trimera* has also been evaluated by paw edema tests using several phlogistic agents. The results

showed that, at doses of 80 and 100 mg/kg i.p., the butanolic extract markedly inhibited carrageenan (90%) and dextran (71%) induced inflammation. However, the intraperitoneal administration of butanolic fraction induced a gastric mucosa irritation¹³.

Nevertheless, intraperitoneal administration of butanol extract (100 mg/kg) reduced in 95% the number of abdominal constrictions in mice following acetic acid while indomethacin (2.5 mg/kg) produced 72% of inhibition¹³.

Anti-inflammatory activity of the aqueous extract of *B. trimera* was also evaluated using the inoculation of the poison of *Dirphia* sp. as a model of acute inflammation pleurisy. The treatment of inflammation was effective in reducing leukocytes (mainly PMN leukocytes, which are the cells increased in the characteristically acute inflammation) and the activity of lactate dehydrogenase (LDH, released as a result of injury or cell death). These data showed that the extract of *B. trimera* presented an anti-inflammatory action at doses of 800 to 1600 mg/kg i.p.²¹.

In conclusion, these results indicated that *B. trimera* showed potent anti-inflammatory and analgesic properties.

2. Antihepatotoxic activity:

Antihepatotoxic activity was investigated in mice intoxicated with phalloidin (3.4 mg/kg, i.p.). In this experiment, five flavonoids (apigenin, hispidulin, luteolin, nepetin and quercetin) isolated from the crude ethyl acetate extract of *B. trimera* were tested. This crude extract administered intravenously (20 mg/kg) increased the survival rate from 26% to 100%. The most active flavonoid was hispidulin (32 mg/kg) which increase the survival rate to 80%. A mixture of these five flavonoids in equal weight relation (final dose: 35 mg/kg) increased the survival rate to 70%. *B. trimera*

extract protected against phalloidin intoxication and this effect may be ascribed to its flavonoid components, especially to hispidulin⁴⁰.

3. Antimicrobial and bactericidal activity:

South Brazilian *Baccharis* species were studied for antibacterial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria using disk diffusion and broth dilution assays. Crude extract of *B. trimera* (1000 µg) exhibited inhibitory activity against *S. aureus* having minimum bactericidal concentration (MBC) of 25 mg/ml³⁰.

It was also found synergism between 13 antimicrobial drugs and 8 plants extracts against *S. aureus* strains. Although the antimicrobial activity of the methanol extract from *B. trimera*, one of the plants tested, was not high (MIC_{90%} 7.23 mg/ml), it showed synergism with tetracycline, chloramphenicol, netilmicin, erythromycin, penicillin and vancomycin against *S. aureus* strains⁵.

The antimicrobial activity was tested with *B. trimera* extracts against the more important contagious bovine mastitis pathogens. Sample solutions were made by hydroalcoholic extraction (EHA) or decoction (DEC) and tested against *S. aureus*, *S. agalactiae* and *P. aeruginosa* using chlorhexidine (0.18%) as control. EHA and DEC extracts were as effective as the control against *S. agalactiae*³⁵.

4. Antimutagenic activity:

Antimutagenic activity from methanol extract of *B. trimera* was examined and strongly reduced the mutagenicity of 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]-indole. Four active substances were identified in the methanol extract: 5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone (genkwanin), 5,4'-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone (cirsimaritin), 5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavone (hispidulin) and 5,7,4'-trihydroxyflavone

(apigenin). It is possible that these flavones are the major active substances in *B. trimera* considering that structure–activity relationship studies demonstrated a decreasing tendency of the antimutagenic activity when the moiety of the hydroxyl group of flavones was replaced by the methoxyl group, except for cirsimaritin²⁶.

Otherwise, the mutagenic activity of the infusion of *B. trimera* (6.85 and 68.5 mg/ml) was evaluated. The tested concentrations did not cause significant cytotoxic action, as well as chromosome alterations in the rats' bone marrow cells³³.

5. Antioxidant activity:

Antioxidant activities of extracts and respective fractions from *B. trimera* were determined using TRAP (evaluation of total antioxidant potential) and TBARS (prevention of formation of thiobarbituric acid reactive species) assays. Evaluation of TRAP levels of aqueous extract (25 µg/ml) showed a higher antioxidant activity when compared to Trolox[®] (1 mM). Dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol fractions and aqueous residue were also tested (2.5 µg/ml) to evaluate TRAP levels. *n*-Butanol fraction showed the highest antioxidant activity among fractions. In TBARS, the extract and fractions (2.5 µg/ml) were effective in the prevention of lipid peroxidation by inhibiting the formation of thiobarbituric acid reactive species and cell mortality induced by hydrogen peroxide²⁹. So, the more polar fractions from *B. trimera* are those having higher antioxidant activity.

Similar results were demonstrated using DPPH radical as a TLC spray reagent. The aqueous extract of *B. trimera* showed radical scavenging activity due its flavonoid content³⁹.

6. Molluscicidal Activity

A clerodane diterpene **1** (Fig 3) and the flavone eupatorin were isolated from the ethyl acetate extract of *B. trimera*. These compounds (100 ppm) showed molluscicidal activity on *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host of *Schistosoma mansoni*, the trematode that causes schistosomiasis³⁴.

7. Other Activities

Pharmacological tests of two pure compounds isolated from chloroform fraction from *B. trimera*, eupatorin and diterpene **1** (300 µg/ml), revealed the clerodane diterpene **1** as the active compound to block the Ca₂⁺-induced concentrations of KCl-depolarized portal vein preparations of rats⁴². So, the diterpene **1** presented relaxant effect on rat vascular smooth muscle. This same clerodane diterpene showed anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties against *Bothrops* snake venom (IC₅₀ 0.3-1.0 mM) thus showing that this inhibitor is a potential anti-ophidian tool¹⁹.

Crude ethanolic extract, the aqueous and butanolic fractions from *B. trimera* were evaluated on glycemia of diabetic and non-diabetic mice. None of the extracts or fractions (200-2000 mg/kg, per os) induced any effect after acute administration on non-diabetic mice. Otherwise, in diabetic mice, only the aqueous fraction (2000 mg/kg, twice daily) reduced the glycemia after a 7-day treatment. These results suggested that *B. trimera* has a potential antidiabetic property²⁷.

The effect of a hydroethanolic extract of *B. trimera* (8.4 mg/kg) administered orally was investigated on pregnant rats. No clinical signs of maternal toxicity and no changes in hematological parameters were observed, but urea levels and kidney weights differed significantly and histopathological alterations were found in kidneys

and livers in treated groups. So, the hydroethanolic extract of *B. trimera* administered to pregnant rats was toxic to maternal kidneys and liver cells, although such alterations were reversible once administration is discontinued¹⁵.

The 50% hydroethanol extract of *B. trimera* did not present adaptogen activity considering various assays²³.

vii. Uses / ailments where this product is used:

B. trimera is used as a tea after meals as tonic, digestive and diuretic^{3,8,14}. It is widely used also in maté, a common drink at southern Brazil prepared with leaves of *Ilex paraguariensis*³. The bitter principles of the plant make it also appealing to the beverage industry and its volatile oil is consumed by cosmetic industriessilva^{10,25,37}.

viii. Dosage / mode of usage:

No clinical trials of *B. trimera* as a single agent have been reported, therefore, the typical daily dose is 1 a 4 g.

ix. Adverse reactions / side effects:

There are no studies about them.

x. Contraindications:

As there are no studies, contraindications have not yet been identified. For this reason, it should not be used by pregnant women and during the lactation period.

xi. Precautions for usage:

Unknown.

xii. Processing needed in the use of this medicinal plant:

It is not described.

xiii. Substitutes and adulterants identified for this plant:

Although *Baccharis* species use is traditional, the botanical differentiation among these species is complex, the correct nomenclature, the synonyms of the members, and especially botany morphology are controversial. A discussion on the taxonomic issue is found in some publications^{2,3,16,17,38}.

Considering the morphological similarity of some native species, the differences among the three winged species *B. trimera*, *B. cylindrica* and *B. usterii* are very difficult to identify in the absence of flowers^{2,3}. So, an analytical method to differentiate them using the chemical composition was developed³¹. Aqueous extracts from *B. articulata* (BA) and its isolated compound 4'-O- β -D-glucopyranosyl-3',5'-dimethoxybenzyl-caffeate (Ball)²⁸, *B. cylindrica* (BC), *B. spicata* (BS), *B. trimera* (BT) and *B. usterii* (BU) were chemically characterized by thin-layer chromatography (TLC). It was used one mobile phase (CHCl₃:EtOH:HOAc, 60:40:6, v/v) and two color reagents: anisaldehyde-H₂SO₄ heating to 100 °C to detect terpenoid compounds and Natural Reagent to visualize phenolic compounds. Spots were observed under long-wave UV light after being sprayed by the color reagent. Figures 5 and 6 present the chemical differences of BA, Ball, BC, BS, BT and BU by TLC. It was possible to observe qualitative and quantitative differences on the chemical profile of the aqueous extracts from these species. Terpenoids and phenolic compounds could be used as chemical markers to the differentiation of the studied species³¹.

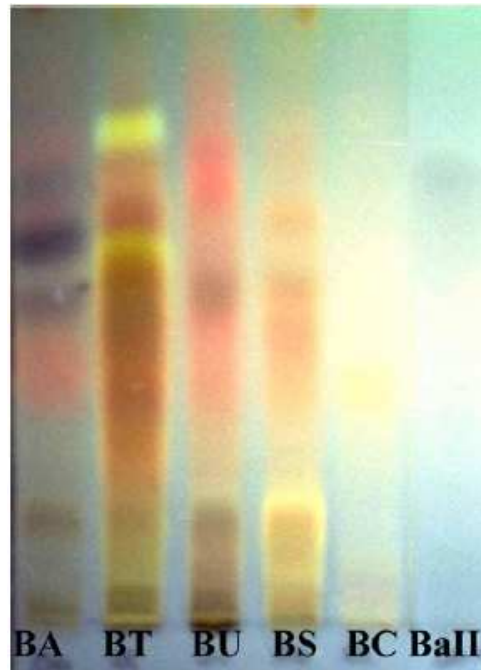


Figure 5. TLC profile of aqueous extracts from *Baccharis* species. Chromatographic system: Si gel GF₂₅₄, CHCl₃:EtOH:HOAc (60:40:6, v/v), anisaldehyde-H₂SO₄ then heating (100 °C)/UV₃₅₆. For sample codes see text.

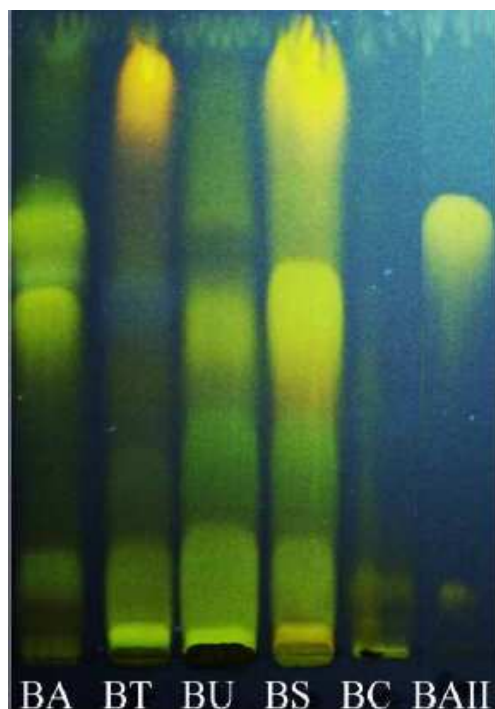


Figure 6. TLC profile of aqueous extracts from *Baccharis* species. Chromatographic system: Si gel GF₂₅₄, CHCl₃:EtOH:HOAc (60:40:6, v/v), natural reagent/UV₃₅₆. For sample codes see text.

xiv. Commercial products available already:

In Brazil, some products are registered by the Brazilian regulatory agency as phytotherapeutic products containing only *B. trimera* or *B. trimera* and other plants¹. As for example, Água Inglesa Catarinense, Hepatilon, Carqueja Amarga Bionatus, Salsaparilha Composto, Água Inglesa Granada.

Many other products are commercialized as tea.

xv. Scope for commercial production:

Although commercial cultivation of this plant is still rare, its cultivation would be a good strategy to circumvent the environmental problem caused by the wild extraction, but it can be difficult, because this species has wide genetic variability^{16,17,25}. Soil requirements to produce volatile oil and biomass production are also presented³². The cultivation of *B. trimera* by establishing an efficient method of plant propagation is important to obtain high raw material quality for the phytotherapeutic industry. There are studies concerning the use of different parts of the stems and substrates on propagation of *B. trimera* by cuttings as well as the effects of seasonal factors on germination and field establishment^{11,41}. The basic requirements for a successful production are using seeds and nursery material of good quality and known origin, the soil needs to be free of contamination, the plant needs to be adapted to the climate and soil of the region, the culture should be preferably organic, the water should be clean and of good quality, and it is extremely important to have careful management and harvest of the plants. It is also necessary a drying unit and an appropriate storage of raw material⁹.

xvi. Agro-techniques for commercial production:

The cultivation may be through seeds and also propagation by scions from stems^{11,41}. The increasing number of selected plants used in the field showed a marked improvement for the characteristic re-growth capacity, biomass production, and simultaneous flowering. In this way, a cultivar of *B. trimera*, named CPQBA 1, was developed at the Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center at Campinas State University, Campinas, SP, Brazil²⁵.

For cultivation, it is necessary to leave a space of 30 x 30 cm between plants.

It can be grown in regions up to 800 feet high, adapting very well to many soil types. It grows abundantly in areas of fields and pastures of Brazil. It is recommended to use a fertilizer with manure from cattle, birds and organic compounds, when necessary and the plants should be watered at regular intervals. The harvest of branches should be made before flowering, cutting up to 10 cm of the soil surface to allow the regrowth. It is not recommended to get branches with more than 7 mm tick. The branches must be crushed to facilitate drying⁹.

xvii. References:

1. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, Brazil. www.anvisa.gov.br (Accessed Dec. 2008).
2. Abad M.J. and Bermejo M. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update, *Arkivoc* 76-96
3. Barroso G.M. and Bueno O.L. 2002. Compositas- 5. Subtribo: Baccharidinae. *In*: R. Reitz, *ed.*, Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, Herbário Barbosa Rodrigues. p. 810-815.
4. Barroso, G.M. 1976. Compositae– Subtribo Baccharidinae Hoffmann– Estudo das espécies ocorrentes no Brasil, *Rodriguésia* [on line] **28** (40): 1-273
5. Betoni, J.E.C., Mantovani, R.P., Barbosa, L.N., Stasi L.C.D. and Fernandes Jr. A. 2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **101** (4): 387-390.
6. Bona, C.M. de, Biasi, L.A., Zanette F. and Nakashima T. 2005. Propagation of three species of *Baccharis* by cuttings, *Ciencia Rural* [on line] **35** (1): 223-226

7. Borella, J.C., Duarte, D.P., Novaretti, A.A.G., Menezes Jr., A., França, S.C., Rufato, C.B., Santos, P.A.S., Veneziani R.C.S. and Lopes N.P. 2006. Seasonal variability in the content of saponins from *Baccharis trimera* (Less.) DC (carqueja) and isolation of flavone. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* [on line] **16** (4): 557-561
8. Dickel, M.L., Rates S.T.K. and Ritter M.R. 2007. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil, *Journal of Ethnopharmacology* **109**: 60-71
9. EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brazil. 2006. Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas. www.campinas.snt.embrapa.br/plantasMedicinais/carqueja.pdf (Accessed Dec. 2008).
10. FARMACOPÉIA Brasileira, 4rd Ed.; Atheneu: São Paulo, 2004.
11. Ferreira, A.G., Cassol, B., Rosa, S.G.T. da, Silveira, T.S. da, Stival A.L. and Silva A.A. 2001. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil, *Acta Botanica Brasilica* [online] **15**(2): 231-242
12. Gené, R.M., Marin E. and Adzet T. 1992. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*, *Planta Medica* **58**: 565-566
13. Gené, R.M., Cartañá, C., Adzet, T., Marin, E., Parella T. and Cañigüeral S. 1996. Antiinflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of active constituents, *Planta Medica* **62**: 232-335
14. Gianello, J.C., Ceñal, J.P., Giordano, O.S., Tonn, C.E., Petenatti, M.E., Petenatti E.M. and Del Vitto L.A. 2000. Medicamentos Herbarios en el Centro-Oeste Argentino. II. "Carquejas": Control de calidad de las drogas oficiales y sustituyentes, *Acta Farmacéutica Bonaerense* **19** (2): 99-103

15. Grance, S.R.M., Teixeira, M.A., Leite, R.S., Guimarães, E.B., Siqueira, J.M. de, Filiu, W.F. de O., Vasconcelos S.B. de S. and Vieira M. do C. 2008. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats, *Journal of Ethnopharmacology* **117**(1): 28-33
16. Heiden, G., Iganci, J.R.V., Bobrowski V.L. and Macias L. 2007. Biogeografia de *Baccharis* sect. *Caulopterae* (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil, *Rodriguésia* [online] **58** (4): 787-796
17. Heiden, G. O gênero *Baccharis* L. secção *Caulopterae* DC. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul. 2005. Monografia (Curso de Ciências Biológicas), Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. 238p. Accessed <http://prg.ufpel.edu.br/sisbi/bibct/bio2005.html>
18. Herz, W., Pilotti, A., Söderholm, A.C., Shuhama I.K. and Vichnewski W. 1977. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*, *Journal of Organic Chemistry* **50**: 3913-3916
19. Januário, A.H., Santos, S.L., Marcussi, S., Mazzi, M.V., Pietro, R.C.L.R., Sato, D.N., Ellena, J., Sampaio, S.V., França S.C. and Soares A.M. 2004. neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties, *Chemico-Biological Interactions* **150**: 243-251
20. Lago, J.H.G., Romoff, P., Fávero, O.A., Soares, M.G., Baraldi, P.T., Corrêa A.G. and Souza F.O. 2008. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de "Campos de Altitude" da mata atlântica paulista, *Química Nova* [on line] **31** (4): 727-730.
21. Leite, C.E., Lunardelli, A., Castaman, T.A., Paul E.L. and Oliveira J.R. 2007. Extrato aquoso de *Baccharis trimera* (Asteraceae) diminui a inflamação e o dano

- celular em pleurisia induzida por veneno de *Dirphia* sp. (Saturniidae), *Revista Brasileira de Análises Clínicas* [on line] **39** (1): 29-32
22. Mello J.C.P. and Petrovick P.R. 2000. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC.(Asteraceae) hidroalcoholic extracts, *Acta Farmacéutica Bonaerense* **19** (3): 211-215
23. Mendes, F.R., Tabach R. and Carlini E.A. 2007. Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity, *Phytotherapy Research* **21**: 517-522
24. MOBOT www.tropicos.org (Accessed Dec 08).
25. Montanari Jr., I., Pereira, B., Mello W.C. and Figueira G.M. 2008. Primeiro registro de cultivar de planta medicinal nativa do Brasil, *Horticultura Brasileira* [on line] **26** (2) (CD-ROM). www.abhorticultura.com.br (Accessed Dec 08).
26. Nakasugi T. and Komai K. 1998. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal Plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 2560–2564
27. Oliveira, A.C.P., Endringer, D.C., Amorin, L.A.S., Brandão M.G. and Coelho M.M. 2005. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice, *Journal of Ethnopharmacology* **102**: 465-469
28. Oliveira, S.Q. de, Dal-Pizzol, F., Gosmann G., Guillaume, D., Moreira J.C.F. and Schenkel E.P. 2003. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity, *Free Radical Research* **37**: 555-559
29. Oliveira, S.Q. de, Dal-Pizzol, F., Moreira, J.C.F., Schenkel E.P. and Gosmann G. 2004. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*, *Acta Farmacéutica Bonaerense* **23** (3): 365-368

30. Oliveira, S.Q. de, Trentin, V.H., Kappel, V.D., Barelli, C., Gosmann G. and Reginatto F.H. 2005. Screening of antibacterial activity of south Brazilian *Baccharis* species, *Pharmaceutical Biology* **43** (5): 434-438
31. Oliveira, S.Q. de, Barbon G. and Gosmann G. 2006. Differentiation of South Brazilian *Baccharis* Species by TLC, *Journal of liquid Chromatography & Related Technologies* **29**: 2603-2609
32. Palácio, C.P.A.M., Biasi, L.A., Nakashima T. and Serrat B.M. 2007. Biomassa e óleo essencial de carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC.) sob influência de fontes e doses de nitrogênio, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* [online] **9** (3): 58-63
33. Peron, A.P., Felipes, J., Mattge, G.I., Cantagalli, L.B., Mariucci R.G. and Vicentini V.E.P. 2008. Mutagenic evaluation of the medicinal plants *Baccharis trimera* Less. and *Solanum melongena* L. in Wistar rats bone marrow cells, *Revista Brasileira de Biociências* [on line] **6** (2): 127–130
34. Santos Filho, D. dos, Sarti, S.J., Vichnewski, W., Bulhões M.S. and Leitão Filho H. de F. 1980. Atividade moluscicida em *Biomphalaria glabrata*, de uma lactona diterpênica e de uma flavona isoladas de *Baccharis trimera* (Less.) A.P. de Candole, *Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto* **17**: 43-47
35. Schuch, L.F.D., Wiest, J.M., Coimbra, H.S., Prestes, L.S., Toni L. and Lemos J.S. 2008. Antibacterial activity kinetics of medicinal plants extracts against bovine mastitis pathogens, *Ciência Animal Brasileira* **9** (1): 161-169
36. Silva, F.G., Januário, A.H., Pinto, J.E.B.P., Nascimento, V.E., Barizan, W.S., Sales J.F. and França S.C. 2006. Flavonoids content in native and cultivated populations of “carqueja” [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] harvested at dry and humid season, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* [online] **8**: 19-25.

37. Silva, F.G., Oliveira, C.B.A., Pinto, J.E.B.P., Nascimento, V.E., Santos, S.C., Seraphin J.C. and Ferri P.H. 2007. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online] **18** (5): 990-997.
38. Simões-Pires, C.A., Debenedetti, S., Spegazzini, E., Mentz, L.A., Matzenbacher, N.I., Limberger R.P. and Henriques A.T. 2005a. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach, *Plant System and Evolution* **253**: 23-32
39. Simões-Pires, C.A., Queiroz, E.F., Henriques A.T. and Hostettmann K. 2005b. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation, *Phytochemical Analysis* **16**: 307-314
40. Soicke H. and Leng-Peschlow E. 1987. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties, *Planta Medica* **53**: 37-39
41. Sousa, L.A., Sacramento L.V.S. and Ming L.C. 2006. Cutting propagation of three accessions of *Baccharis trimera* in reproductive development phase, *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* [online] **8** (4): 189-192
42. Torres, L.M.B., Gambarni, M.T., Roque, N.F., Landman, M.T.L., Souccar C. and Lapa A.J. 2000. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle, *Phytochemistry* **55**: 617-619
43. Verdi, L.G., Brighente I.M.C. and Pizzolatti M.G. 2005. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos, *Química Nova* [on line] **28** (1): 85-94.

44. Zdero, C., Bohlmann, F., Solomon, J.C., King R.M. and Robinson H. 1989. *ent-clerodanes and others constituents from Bolivian Baccharis species*, *Phytochemistry* **28** (2): 531-542.

CAPÍTULO 2

Capítulo 2: Análise fitoquímica e estudo da atividade antioxidante de *Baccharis trimera* através do método DPPH.

1. Introdução

O desenvolvimento de fitoterápicos envolve várias etapas, desde a garantia da quantidade da matéria-prima vegetal, a avaliação biológica dos produtos intermediários e finais, até a prova da manutenção da qualidade e eficácia do produto final. Para tanto, é indispensável o conhecimento de características das matérias-primas e processos envolvidos, assim como o atendimento a critérios de qualidade. Para muitas plantas medicinais, que apresentam uso popular consagrado, ainda são escassos estudos fitoquímicos e farmacológicos mais aprofundados e sistematizados, o que implica na ausência da descrição de parâmetros de qualidade de diversas plantas em monografias de farmacopéias ou outros códigos oficiais.

A população brasileira já se habituou à utilização de espécies vegetais amargas quando tem problemas hepáticos ou relacionados com digestão, por isto *B. trimera*, a carqueja, como popularmente é denominada, é uma das espécies mais utilizadas nesta ocasião (BORELLA *et al.*, 2006). A sua grande utilização levou a sua inclusão na primeira e na quarta edição da Farmacopéia Brasileira e é utilizada em muitos fitoterápicos comercializados no Brasil para desordens gastrointestinais na forma de tinturas, elixir e tabletes (FARMACOPÉIA Brasileira; ANVISA, 2008).

Ensaio biológicos objetivando atribuir ações farmacológicas para esta espécie foram desenvolvidos, evidenciando efeito anti-inflamatório e analgésico (GENE *et al.*, 1996), vasorelaxante da musculatura lisa (TORRES *et al.*, 2000), hipoglicemiante (OLIVEIRA *et al.*, 2005), gastroprotetor (GONZÁLES *et al.*, 2000) e hepatoprotetor (SOICKE and LENG-PESCHLOW, 1987). Os estudos químicos evidenciaram algumas categorias de compostos naturais, tais como diterpenóides (HERZ *et al.*, 1977, TORRES *et al.*, 2000), flavonóides (SOICKE and LENG-PESCHLOW, 1987), saponinas (Gene *et al.*, 1996) e óleos essenciais (AGOSTINI *et al.*, 2005).

Os flavonóides têm sido estudados em relação ao seu efeito na redução da fragilidade vascular e no aumento da permeabilidade celular, por inibirem a oxidação *in vitro* de lipoproteínas de baixa densidade, por estimularem a ação das enzimas

catalase, superóxido dismutases e glutathione peroxidase. Os flavonóides são referidos como captadores de ânions superóxido e de radicais peróxido lipídicos (SOUZA, 2002).

Diversos trabalhos relatam para *B. trimera* a presença de flavonóides, como quercetina, luteolina, apigenina, hispidulina entre outros (VERDI *et al.*, 2005). A algumas dessas substâncias isoladas, é atribuído potencial antioxidante, principalmente em ensaios realizados *in vitro* (SILVA *et al.*, 2002)

Baseado nestes fatos, este trabalho tem por objetivo caracterizar e fracionar as partes aéreas de *B. trimera*, por cromatografia em camada delgada e cromatografia por exclusão molecular, além de determinar a quantificação dos fenólicos totais presentes no extrato bruto hidroetanólico e nas frações de *B. trimera* através do método de Folin-Ciocalteu. A determinação de fenólicos totais foi realizada também através da determinação de fenóis por catequina e pela precipitação com proteínas com o objetivo de comparar os resultados obtidos. E, finalmente, considerando os flavonóides presentes nesta espécie vegetal, o potencial antioxidante de *B. trimera* foi investigado através de ensaio *in vitro* de DPPH[•].

2. Objetivos

Realizar a análise fitoquímica e determinar a quantificação de fenólicos totais do extrato hidroetanólico e das frações de *B. trimera*.

Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto hidroetanólico e das frações de *Baccharis trimera* através do ensaio espectrofotométrico com o radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]), frequentemente utilizado para determinar a capacidade de espécies vegetais na captura de radicais livres.

3. Materiais e Métodos

3.1. Material vegetal:

As partes aéreas de *B. trimera* (Less.) A. P. de Candolle (carqueja) foram coletadas na região de Pedras Brancas na cidade de Guaíba, no Rio Grande do Sul, Brasil, em abril de 2007 e posteriormente identificadas pelo botânico Prof. Dr. Nelson Ivo Matzenbacher da PUCRS. O Material testemunho está depositado no herbário

do departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN: 152107).

Após secagem em estufa de ar circulante em temperatura não superior a 40 °C, as partes aéreas de *B. trimera* foram moídas e este material foi empregado para as análises fitoquímicas e biológicas.

3.2. Preparação e fracionamento das frações de *Baccharis trimera*.

3.2.1. Preparação do extrato bruto hidroetanólico

1 kg das partes aéreas frescas e rasuradas de *B. trimera* foram maceradas em etanol a 70% na proporção de 10 g do material vegetal/100 ml de etanol, durante 15 dias. Uma segunda maceração foi realizada após filtração do primeiro macerado. Após retirada do etanol em evaporador rotatório, o extrato bruto foi liofilizado e utilizado para os ensaios de determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu e para o ensaio do potencial antioxidante através do método de DPPH*.

3.2.2. Preparação das frações: diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e aquosa

As partes aéreas moídas de *B. trimera* foram extraídas através de aparelho Soxhlet com solventes de polaridade crescente, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol por 24 h cada e concentradas em evaporador rotatório. O resíduo vegetal foi submetido à decocção por 3 horas sendo, então, a fase aquosa liofilizada para obtenção da fração aquosa. Obtiveram-se assim quatro frações que foram avaliadas para a atividade anti-inflamatória *in vivo* e para a atividade antioxidante *in vitro* (Figura 7).

Todas as frações foram caracterizadas através de cromatografia em camada delgada. Verificou-se através do perfil cromatográfico que as frações acetato de etila e *n*-butanol eram similares, sendo uma mistura de saponinas e flavonóides. Assim, com o objetivo de obter uma fração enriquecida de saponinas e outra enriquecida de flavonóides, essas duas frações foram reunidas.

3.2.3. Obtenção das frações enriquecidas de saponinas e de flavonóides

A partir de 1 g da fração resultante da reunião das frações acetato de etila + *n*-butanol foi realizado sucessivos fracionamentos através de cromatografia em coluna de exclusão molecular, empregando-se como fase estacionária Sephadex LH-20 (GE Healthcare®) e fase móvel etanol absoluto para obtenção de duas novas frações: uma fração majoritária de saponinas e uma fração majoritária de compostos fenólicos denominadas, respectivamente, fração saponinas e fração flavonóides (Figura 7). Ambas as frações também foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e avaliadas para a atividade anti-inflamatória *in vivo* e para a atividade antioxidante *in vitro*.

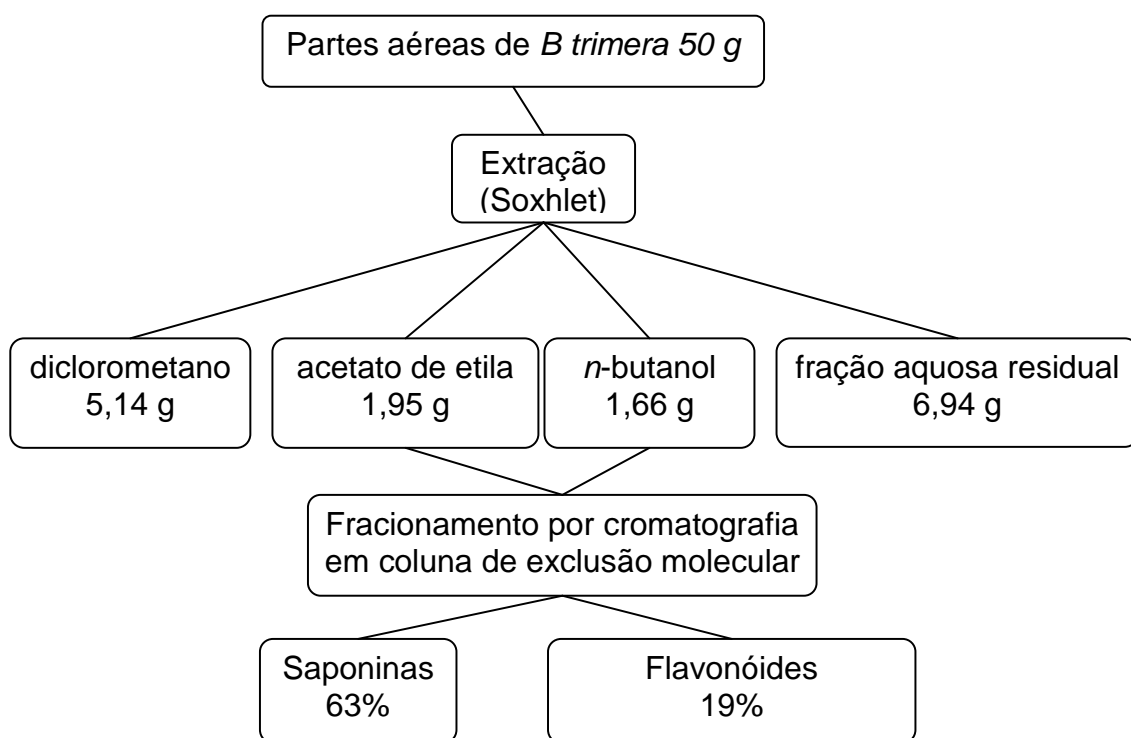


Figura 7: Esquema de obtenção das frações a partir de *B trimera*.

3.3. Análise cromatográfica:

Para as cromatografias em camada delgada foram utilizadas cromatofolhas de alumínio GF₂₅₄ da marca Fluka. Os cromatogramas foram observados sob luz UV₂₅₄ e UV₃₆₆ nm e borrifados com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico, com

posterior aquecimento a 100 °C até o máximo desenvolvimento de coloração. Alguns cromatogramas foram revelados com reagente natural e posterior aquecimento a 100 °C (STAHL, 1969).

Foram empregados diferentes sistemas eluentes: clorofórmio:etanol:ácido acético (100:40:6, v/v), ciclohexano:acetato de etila (9:1, v/v), butanol:ácido acético:água (2:1:1, v/v) e acetato de etila:acetona:ácido acético:água (60:20:10:10, v/v).

3.4. Solventes e reagentes

Todos os solventes utilizados foram de grau p.a. O reagente Folin-Ciocalteu é da marca comercial Próton Química. As substâncias de referência DPPH^{*} catequina, ácido tânico, luteolina e quercetina, são da marca comercial Sigma. As substâncias SDS/TEA (sodiododecilsulfato/trietanolamina), BSA (albumina de soro bovino) e ácido ascórbico são da marca comercial Merck.

3.5. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (BONOLI et al, 2004).

Para este ensaio foram testados o extrato bruto hidroetanólico e as frações diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol, aquosa, flavonóides e saponinas.

Para preparação da curva padrão do ácido gálico foram preparados 4 mL de solução de ácido gálico em metanol na concentração de 500 µM e realizadas as diluições das soluções padrões para as concentrações 10, 15, 20, 25 e 30 µM. Para cada concentração acima, o volume de 7,0 ml foi agitado manualmente com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo, 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada por 30 s. Finalmente, as soluções foram diluídas para 20 mL com água destilada em balão volumétrico. Após 2 h, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, exceto o extrato. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata.

3.5.1 Preparação da amostra do extrato bruto hidroetanólico

7,5 mg de amostra obtida segundo item 3.2.1 foram diluídos em 50 mL de metanol. Retirou-se uma alíquota de 7 mL que foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo, 2 mL de

Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada manualmente por 30 s e deixada repousar. Finalmente, as soluções foram diluídas para 20 mL com água destilada em balão volumétrico. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, exceto o extrato. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata.

3.5.2. Preparação da amostra da fração diclorometano

30 mg de amostra obtida segundo item 3.2.2 foram diluídos em 50 mL de metanol. Retirou-se uma alíquota de 5 mL e diluiu-se a 7 mL com metanol. Esta alíquota de 7 mL foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo, 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada manualmente por 30 s e deixada repousar. Finalmente, as soluções foram diluídas para 20 mL com água destilada em balão volumétrico. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, exceto o extrato. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata.

3.5.3. Preparação da amostra da fração acetato de etila

7,5 mg de amostra obtida do item 3.2.2 foram pesados e diluídos em 50 mL de metanol. Retirou-se uma alíquota de 0,7 mL e diluiu-se a 7 mL com metanol. Esta solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo, 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada manualmente por 30 s e deixada repousar. Finalmente, as soluções foram diluídas para 20 mL com água destilada em balão volumétrico. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, exceto o extrato. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata.

3.5.4. Preparação da amostra da fração n-butanol

30 mg de amostra obtida do item 3.2.2 foram diluídos em 50 mL de metanol. Retirou-se uma alíquota de 5 mL e diluiu-se a 7 mL com metanol sendo agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo, 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada manualmente por 30 s e deixada repousar. Finalmente, as soluções foram diluídas

para 20 mL com água destilada em balão volumétrico. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, exceto o extrato. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata.

3.5.5. Preparação da amostra da fração aquosa

7,5 mg de amostra obtida segundo item 3.2.2 foram pesados e diluídos em 50 mL de metanol. Retirou-se uma alíquota de 3 mL e diluiu-se a 7 mL com metanol. Esta solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo, 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada manualmente por 30 s e deixada repousar. Finalmente, as soluções foram diluídas para 20 mL com água destilada em balão volumétrico. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, exceto o extrato. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata.

3.5.6. Preparação da amostra da fração saponinas

7,5 mg de amostra obtida do item 3.2.3 foram pesados e diluídos em 50 mL de metanol. Retirou-se uma alíquota de 10 mL que foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 minuto; passado este tempo, 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada manualmente por 30 s e deixada repousar. Finalmente, as soluções foram diluídas para 20 mL com água destilada em balão volumétrico. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, exceto o extrato. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata.

3.5.7. Preparação da amostra da fração flavonóides

7,5 mg de amostra obtida segundo o item 3.2.3 foram diluídos em 50 mL de metanol. Retirou-se uma alíquota de 0,7 mL e diluiu-se a 7 mL com metanol. Esta solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 min; passado este tempo, 2 mL de Na₂CO₃ a 15% foram adicionados à mistura e agitada manualmente por 30 s e deixada repousar. Finalmente, as soluções foram diluídas para 20 mL com água destilada em balão volumétrico. Após 2 h, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm, tendo como "branco" o

metanol e todos os reagentes, exceto o extrato. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata.

3.6. Determinação de fenóis por catequina e ácido tânico:

Foram pesados, em triplicata, 2 mg da fração flavonóides e 10,5 mg do extrato bruto hidroetanólico de *Baccharis trimera* e adicionados 2,5 mL de acetona 70%. As amostras foram homogeneizadas e deixadas 20 minutos no ultrassom sendo após centrifugadas por 10 minutos (3000 rpm) . O sobrenadante foi retirado e reservado. Ao precipitado remanescente, foram adicionados mais 2,5 mL de acetona 70% e colocados novamente no ultrassom por 20 minutos e centrifugado após por 10 minutos. Os sobrenadantes das duas extrações foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório para a retirada da acetona. Este concentrado resultante das duas extrações foi utilizado para determinação do conteúdo de fenóis por catequina e ácido tânico.

Para preparação da curva padrão de catequina foram preparados 10 mL de solução de catequina em metanol na concentração 1000 μM e realizadas as diluições das soluções padrões para as concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 μM . A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 280 nm de todas as concentrações, tendo como branco o metanol. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata.

Para a preparação da curva padrão do ácido tânico foram preparados 25 mL de solução de ácido tânico em metanol na concentração 1000 μM e realizadas as diluições das soluções padrões para as concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 μM . Foram adicionados 2 mL de solução tampão de BSA (albumina de soro bovino) a 1 mL de cada solução padrão. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, o precipitado foi dissolvido em 4 mL de SDS/TEA e 1 mL de FeCl_3 0,16%. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 510 nm de todas as concentrações, tendo como branco o metanol e todos os reagentes, exceto o ácido tânico. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata.

3.6.1 Preparação das amostras para determinação de fenóis por catequina (Adaptado de: SEDDON and DOWNEY, 2008)

As amostras obtidas segundo item 3.5 foram redissolvidas em 10 ml de metanol 50% em balão volumétrico. Uma alíquota de 1 mL desta última solução foi finalmente diluída em 10 mL de metanol 50% em balão volumétrico, as quais foram utilizadas para a realização da leitura da absorbância em 280 nm. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata.

3.6.2 Preparação das amostras para determinação de fenóis pela precipitação com proteínas (Adaptado de: Hagerman and Butler, 1978.)

As amostras obtidas segundo item 3.5 foram redissolvidas em 10 ml de metanol 50% em balão volumétrico.

Foram colocados 2 mL da solução BSA (albumina de soro bovino) em um tubo de centrifuga e adicionados 1 mL da solução obtida acima, foi agitado manualmente e deixado repusar na geladeira. As amostras foram retiradas da geladeira após 24h, centrifugadas por 15 min (3000 rpm) e retirou-se o sobrenadante. O precipitado foi redissolvido em 4 mL de SDS/TEA (sodiododecilsulfato/trietanolamina) e 1 mL de FeCl₃. Após 15 minutos fez-se a leitura da absorbância em 510nm. Utilizou-se como branco: 4 mL de SDS/TEA e 1 mL de FeCl₃. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata.

3.7. Atividade antioxidante *in vitro*

3.7.1 Método fotocolorimétrico do DPPH*

A avaliação da atividade antioxidante frente ao radical DPPH* foi realizada através de medidas espectrofotométricas do consumo do radical, na presença de substâncias antioxidantes (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995, TREVISAN *et al.*, 2006 e CHAN *et al.*, 2007). Como substâncias antioxidantes de referência foram utilizados o ácido ascórbico e os flavonóides quercetina e luteolina.

3.7.2. Preparação das amostras:

Para este ensaio foi utilizado o extrato bruto hidroetanólico, a fração diclorometano, a fração acetato de etila, a fração *n*-butanol, a fração acetato de etila + *n*-butanol, a fração aquosa, a fração flavonóides e a fração saponinas.

Todas as amostras foram analisadas nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL e 100 µg/mL. Para tanto, se preparou uma solução metanólica do extrato bruto e das frações com concentração de 1 mg/mL da qual alíquotas foram retiradas para obtenção da concentração final desejada. As substâncias antioxidantes de referência (o ácido ascórbico, e os flavonóides, quercetina e luteolina) foram preparadas nas mesmas concentrações do extrato bruto hidroetanólico e das frações (25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL e 100 µg/mL).

3.7.3. Preparação da curva-padrão do DPPH*

Foram preparados 100 ml de solução estoque de DPPH* em metanol na concentração de 150 µM, mantida sob refrigeração e protegida da luz. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a $\lambda = 517$ nm de todas as concentrações (5, 10, 25,50, 75, 100 e 150 µM.), tendo como branco o metanol. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata.

3.7.4. Avaliação da capacidade de reação com 2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH*)

Para avaliação da atividade antioxidante adicionaram-se 1400 µL da solução 150 µM do radical DPPH* em metanol à 100 µL das soluções amostra do extrato bruto hidroetanólico e das frações de *B. trimera* e das substâncias antioxidantes de referência. Deixou-se reagir em temperatura ambiente por 30 minutos em local protegido da luz.

Metanol foi utilizado como branco na leitura do espectrofotômetro e para a absorbância do controle utilizou-se a solução de DPPH* em metanol. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

Os resultados foram expressos através do percentual de atividade antioxidante (AA%) obtido através da fórmula abaixo:

$$\text{AA\%} = 100 - \left\{ \frac{\text{Abs. da amostra} \times 100}{\text{Abs. do Controle}} \right\}.$$

Os resultados também foram expressos como a quantidade equivalente em ácido ascórbico (QEAA) calculados conforme a seguinte equação:

$$QEAA_{(g)} = (CE_{50 \text{ (amostra)}} / CE_{50 \text{ (ácido ascórbico)}}) \times 1g$$

Onde:

CE_{50} (ácido ascórbico) = 5,68 µg/mL

CE_{50} (amostra) = valor obtido em µg/mL

4 . Resultados e Discussão

4.1. Rendimento do extrato bruto hidroetanólico

O extrato bruto hidroetanólico apresentou um rendimento de 130 g a partir de 1 kg das partes aéreas de *B. trimera*.

4.2. Rendimento das frações diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e aquosa

Considerando-se a extração das frações em aparelho soxhlet utilizando solventes de polaridade crescente (diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol) e da fase aquosa por decocção do resíduo vegetal a partir de 50 g das partes aéreas moídas de *Baccharis trimera*, obteve-se os seguintes rendimentos:

Fração diclorometano: 5,14 g (10,3%)

Fração acetato de etila: 1,95 g (3,9%)

Fração *n*-butanol: 1,66 g (3,3%)

Fração aquosa do resíduo vegetal: 6,94 g (13,8%)

4.3. Rendimento das frações enriquecidas de saponinas e de flavonóides

O rendimento das frações saponinas e flavonóides obtidos através do fracionamento em coluna de exclusão molecular, a partir da reunião das frações acetato de etila e *n*-butanol, foi de:

Fração saponinas: 0,63 g (63%)

Fração flavonóides: 0,19 g (19%)

4.4. Análise cromatográfica do extrato bruto hidroetanólico e das frações de *B. trimera*

Através de cromatografias analíticas em camada delgada foram comparadas as frações diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e aquosa com o extrato bruto hidroetanólico de *B. trimera*.

Foram empregados dois sistemas eluentes: clorofórmio:etanol:ácido acético (100:40:6, v/v) e ciclohexano:acetato de etila (9:1, v/v) para detectar os compostos mais polares e os compostos apolares, respectivamente. Como agente cromogênico foi utilizado anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento a 100°C com o qual os terpenos revelam com coloração azulada ou rosado-avermelhada (STAHL, 1969).

Na análise do perfil cromatográfico da fração diclorometano e do extrato bruto hidroetanólico (Figura 8) pode-se verificar o perfil mais apolar de *Baccharis trimera* utilizando como fase móvel ciclohexano:acetato de etila (9:1, v/v). Este cromatograma destaca-se pela presença de uma mancha de coloração azul com Rf.: 0,33. Na figura 8 pode-se observar a presença de compostos com polaridade semelhante entre ambos.

A comparação cromatográfica entre as frações acetato de etila, *n*-butanol e aquosa com o extrato bruto hidroetanólico é observada na figura 9. Neste cromatograma foi empregado o sistema eluente clorofórmio:etanol:ácido acético (100:40:6, v/v) e como agente cromogênico anisaldeído sulfúrico. Quanto ao perfil de substâncias encontradas nas frações, pode-se destacar a abundância de substâncias com coloração rosa e azulada, típica de terpenóides, frente a este revelador. Também se observa em menor proporção, a presença de compostos flavonoídicos caracterizados pela coloração amarela frente ao reagente natural (STAHL, 1969). É possível verificar que as frações *n*-butanol e acetato de etila têm perfil cromatográfico semelhante, enquanto que a fração aquosa apresenta a maior parte de compostos no ponto de aplicação.



Figura 8. CCD da fração diclorometano (DM) e do extrato bruto (BRU). Fase móvel: Diclorometano:Metanol (95:5 v/v). Agente cromogênico: anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento a 100°C.

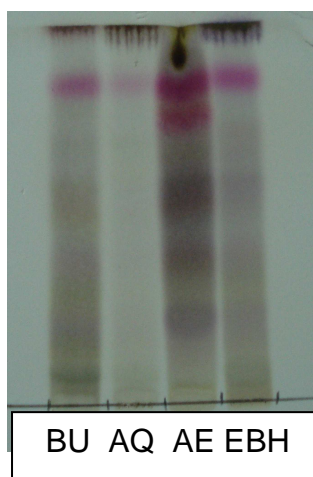


Figura 9. CCD das frações *n*-butanol (BU), aquosa (AQ), acetato de etila (AE), e do extrato bruto (EBH). Fase móvel: CHCl₃:EtOH:AcOH (100:40:6, v/v/v). Agente cromogênico: anisaldeído sulfúrico, com posterior aquecimento a 100°C.

Na figura 10 pode-se observar o cromatograma das frações (2 a 28) resultantes do fracionamento por exclusão molecular da fração acetato de etila + *n*-butanol. Uma análise geral desta cromatografia permite-nos dizer que existem semelhanças no perfil de substâncias da primeira porção do cromatograma, diferenciando do restante da cromatografia. Assim, é possível visualizar que houve a separação das saponinas

(3 a 7) e dos compostos fenólicos (8 e restante). As frações *n*-butanol e acetato de etila foram cromatografadas para comparação. Pode-se perceber que a fração *n*-butanol extraiu os compostos mais polares, enquanto a fração acetato de etila extraiu compostos com polaridades intermediárias. Para esta CCD foi empregado o sistema eluente clorofórmio:etanol:acetato de etila (100:40:6 v/v/v) e agente cromogênico: anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento a 100°C.

Na figura 11 as frações semelhantes foram reunidas, ou seja, as frações de saponinas (3 a 7), e os compostos fenólicos (8 e 9), (10 e 11), (15 a 20) e (21 a 28). Foram usadas para comparação as frações diclorometano, *n*-butanol, acetato de etila e o flavonóide quercetina. Pode-se verificar que a fração diclorometano realmente extraiu somente compostos apolares, pois não aparecem bandas nessa cromatografia, já a fração *n*-butanol, como no cromatograma da figura 9, extraíram compostos mais polares e a fração acetato de etila extraiu compostos intermediários. Analisando-se as bandas deste cromatograma, pode-se observar que elas possuem Rfs semelhantes ao do flavonóide quercetina, o que sugere que pode haver na carqueja quercetina ou outro composto fenólico semelhante. Foi utilizado como sistema eluente acetato de etila:acetona:ácido acético:água (60:20:10:10) e como agente cromogênico: reagente natural seguido de aquecimento a 100°C e posterior aplicação de anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento a 100°C.

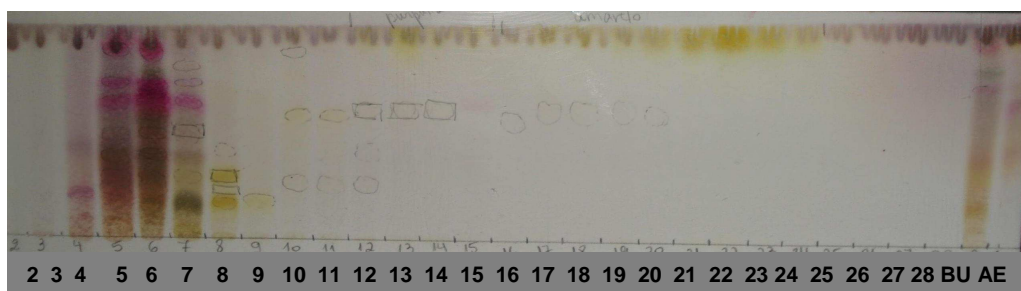


Figura 10. CCD do fracionamento da fração acetato de etila (AE) + *n*-butanol (BU). Fase móvel: clorofórmio:etanol:acetato de etila (100:40:6 v/v/v). Agente cromogênico: anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento a 100°C.

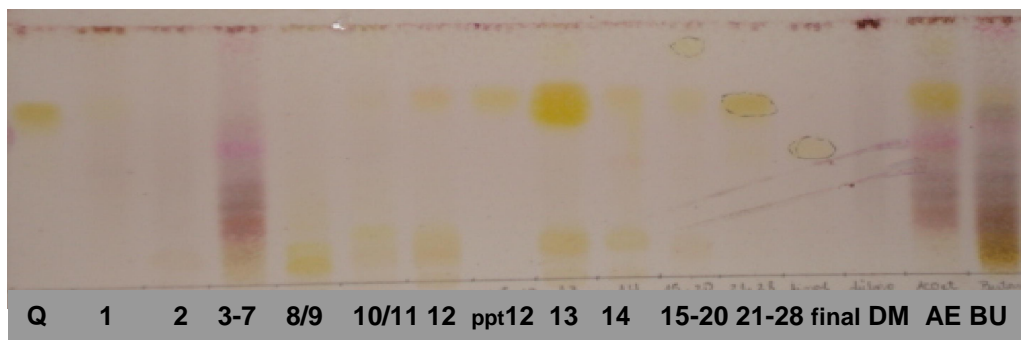


Figura 11. CCD do fracionamento da fração *n*-butanol (BU) + acetato de etila (AE) em comparação com padrão quercetina (Q). Aparecem também nesta cromatografia: a porção final da coluna (Final) e a fração diclorometano (DM). Fase móvel: acetato de etila:acetona:ácido acético:água (60:20:10:10). Agente cromogênico: reagente natural seguido de aquecimento a 100°C e anisaldeído sulfúrico com posterior aquecimento a 100°C.

Sendo assim, o extrato bruto hidroetanólico e as diferentes frações de *B. trimera* apontaram diferenças qualitativas quanto ao perfil de substâncias, sugerindo a existência de uma diversidade estrutural entre eles que pode servir como elemento importante na descoberta e isolamento de novas substâncias.

4.5. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (BONOLI *et al*, 2004).

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras em uma curva de calibração padrão de ácido gálico (10 a 30 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato

A equação do gráfico da curva de calibração de ácido gálico foi $y = 0,0297x - 0,035$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9989$ (Figura 12). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

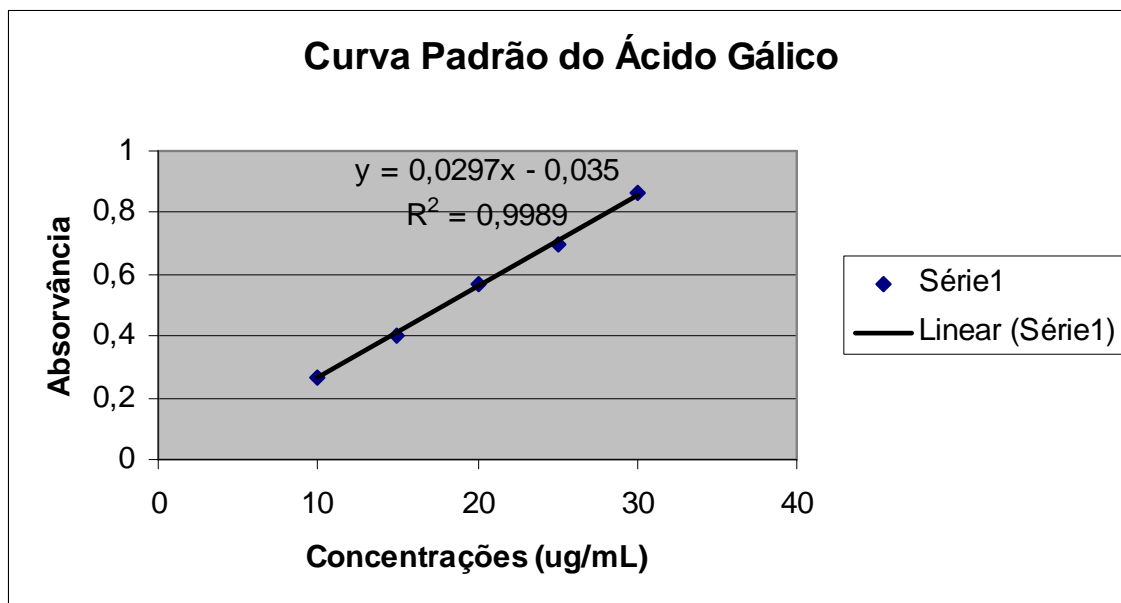


Figura 12. Curva padrão do ácido gálico nas concentrações de 10 a 30 $\mu\text{g/mL}$

Os resultados obtidos na determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de material vegetal seco, são apresentados na tabela 2

Tabela 2. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (BONOLI et al, 2004).

Amostra	Conteúdo fenólico ^a (EAG/ g do extrato) ^b
Extrato bruto hidroetanólico	119,79 \pm 4,49
Fração diclorometano	56,64 \pm 2,83
Fração acetato de etila	1292,18 \pm 139,18
Fração <i>n</i> -butanol	48,60 \pm 1,06
Fração aquosa	214,04 \pm 12,75
Fração saponinas	121,81 \pm 17,69
Fração flavonóides	1606,44 \pm 73,91

^a Média \pm desvio padrão do ensaio em triplicata

^b Dados de fenóis totais expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

Os resultados da determinação de fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteu do extrato bruto hidroetanólico e das frações de *B. trimera* apresentaram diferentes teores de compostos fenólicos. De todas as frações analisadas, a fração de flavonóides apresentou o maior teor de fenóis totais, seguida da fração acetato de etila. A fração *n*-butanol registrou o menor teor. A fração de saponinas apresentou um teor de fenólicos superior ao extrato bruto hidroetanólico, o que demonstra que durante o processo de fracionamento compostos fenólicos ficaram retidos nesta fração.

Os resultados apresentados pelas diferentes frações e pelo extrato bruto hidroetanólico obtidos na determinação de fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteu foram comparados e demonstraram diferença estatística significativa, para um intervalo de confiança de 5%, após análise por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. A fração acetato de etila e a fração flavonóides testadas pelo método de Folin-Ciocalteu não apresentaram diferença significativa entre si, entretanto apresentaram diferença estatística das demais frações e do extrato bruto com $P < 0,001$. (Figura 13)

Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

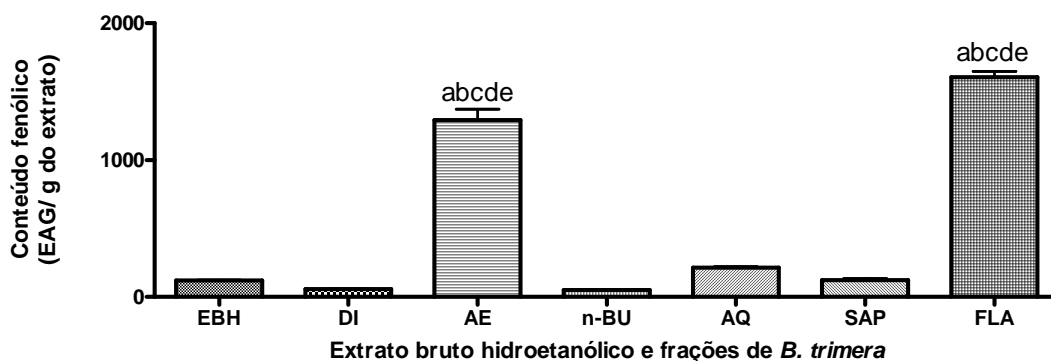


Figura 13. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu do extrato bruto hidroetanólico e das frações de *B. trimera*. Extrato bruto hidroetanólico (EBH), fração diclorometano (DI), fração acetato de etila (AE), fração *n*-butanol (n-BU), fração aquosa (AQ), fração saponinas (SAP), fração flavonóides (FLA). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Tukey; ^{abcde} $P < 0,001$, comparação dos grupos entre si. Valores são expressos como média \pm desvio padrão.

A fração flavonóides e a fração acetato de etila apresentaram altos teores de compostos fenólicos quando comparados a dados de outras espécies descritas na literatura como, por exemplo, para extratos etanólicos de *Anthemisia arvensis* (32,32 mg GAE/g) e *Terminalia brasiliensis* (763,63 mg GAE/g) (DJERIDANE et al., 2006, SOUZA et al., 2007).

4.6. Determinação de fenóis por catequina

A determinação de fenólicos foi realizada também através da determinação de fenóis por catequina com o objetivo de comparar os resultados obtidos com o método de Folin-Ciocalteu. Para isso utilizou-se somente o extrato bruto hidroetanólico e a fração flavonóides por ser a fração com maior teor de fenólicos.

O teor de compostos fenólicos foi determinado por interpolação da absorbância das amostras em uma curva de calibração padrão de catequina (10 a 50 $\mu\text{g/mL}$) e expressos como mg de EC (equivalentes de catequina) por g de extrato.

A equação do gráfico da curva de calibração da catequina foi $y = 0,134x + 0,0018$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9999$ (Figura 14). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

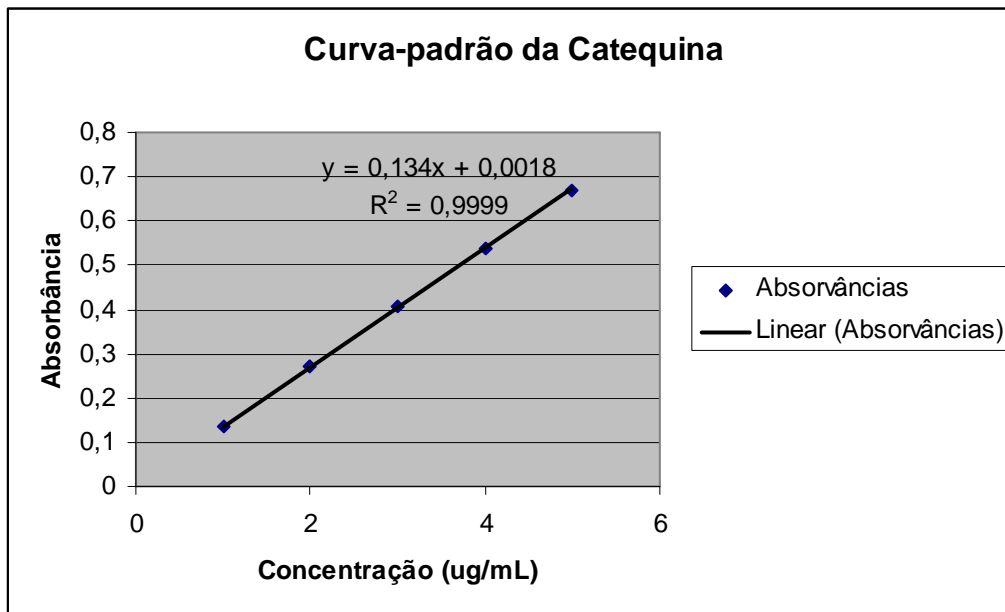


Figura 14. Curva padrão da catequina nas concentrações de 10 a 50 µg/mL

Os resultados obtidos para determinação de fenóis por catequina, está apresentado na tabela 3.

Tabela 3. Determinação de fenóis por catequina

Amostra	Conteúdo fenólico ^a (EC/ g do extrato) ^b
Extrato bruto hidroetanólico	29,3 ± 1,695002
Fração flavonóides	182,67 ± 41,43018

^a Média ± desvio padrão do ensaio em triplicata

^b Dados de fenóis expressos como mg de EC (equivalentes de catequina) por grama de extrato.

4.7. Determinação de fenóis pela precipitação com proteínas

A determinação de fenólicos foi realizada também através da determinação de fenóis pela precipitação com proteínas com o objetivo de comparar os resultados obtidos com o método de Folin-Ciocalteu. Para isso utilizou-se somente o extrato bruto hidroetanólico e a fração flavonóides por ser a fração com maior teor de fenólicos.

O teor de compostos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrão de ácido tânico

(100 a 500 µg/mL) e expressos como mg de EAT (equivalentes de ácido tânico) por g de extrato.

A equação do gráfico da curva de calibração de ácido tânico foi $y = 0,1459x + 0,0335$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9991$ (Figura 15). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

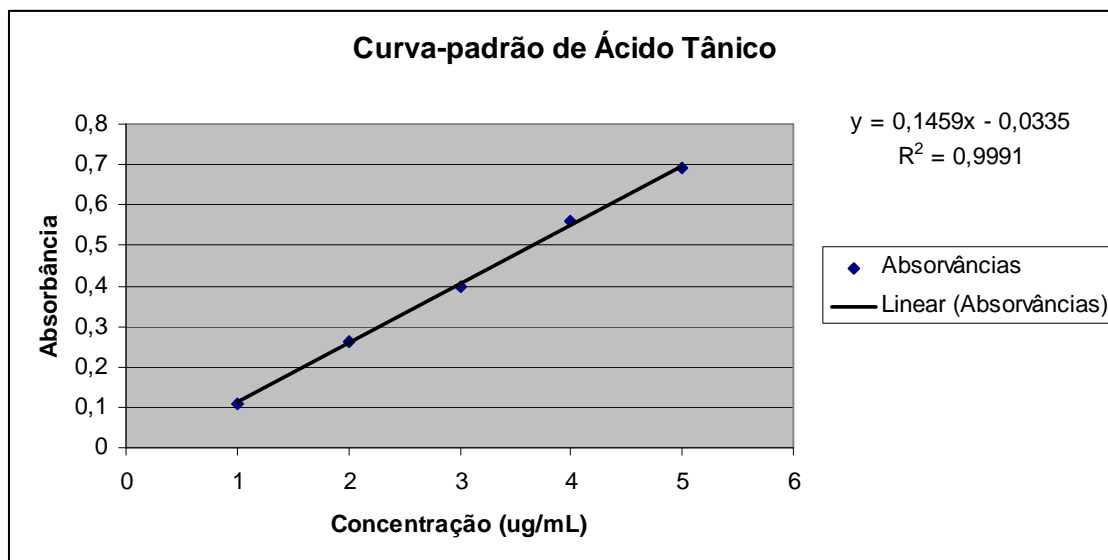


Figura 15. Curva padrão de ácido tânico nas concentrações de 100 a 500 µg/mL

Os resultados obtidos para determinação de fenóis pela precipitação com proteínas estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 Determinação de fenóis pela precipitação com proteínas

Amostra	Conteúdo fenólico ^a (EAT/ g do extrato) ^b
Extrato bruto hidroetanólico	0,0057 ± 0,000321
Fração flavonóides	1,4420 ± 0,075037

^a Média ± desvio padrão do ensaio em triplicata

^b Dados de fenóis expressos como mg de EAT(equivalentes de ácido tânico) por grama de extrato.

Como se pode verificar nos diferentes métodos de determinação de compostos fenólicos, os três ensaios realizados mostraram que a fração flavonóides apresenta os maiores teores de fenóis totais quando comparados ao extrato bruto hidroetanólico e as demais frações de *B. trimera*.

4.8. Método fotocolorimétrico do DPPH[•]

Este método é baseado na capacidade do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil em reagir com substâncias doadoras de H ($\text{DPPH}^{\bullet} + [\text{AH}]_n \rightarrow \text{DPPH-H} + [\text{A}^{\bullet}]_n$), incluindo compostos fenólicos (ROGINSKY and LISSI, 2005), sendo um método amplamente utilizado e relativamente rápido quando comparado a outras técnicas (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998; MENSOR *et al.*, 2001).

O consumo de DPPH[•] é, portanto, um índice para estimar a capacidade antioxidante na captura de radicais livres presentes no meio. No ensaio espectrofotométrico, a absorbância a 517 nm diminui como um resultado de uma alteração na coloração violeta característica para amarelo, uma vez que o radical é capturado por antioxidantes presentes na amostra através da doação de um átomo de H para formar a molécula estável DPPH-H (ESPÍN *et al.*, 2000).

Dados da curva-padrão do DPPH[•]

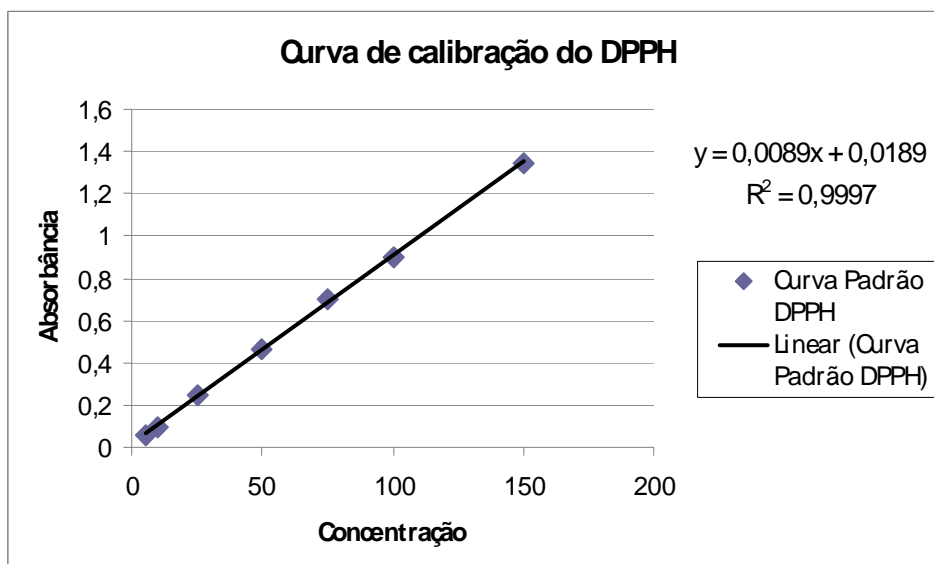


Figura 16. Curva padrão do DPPH[•] nas concentrações de 5 a 150 µM

As figuras 17 e 18 apresentam os resultados obtidos no tempo 30 minutos. O extrato bruto hidroetanólico e as frações de *B. trimera* foram analisados nas quatro

concentrações (25, 50, 75 e 100 µg/ml), em triplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 517 nm. Utilizaram-se como substâncias de referência os flavonóides quercetina e luteolina nas mesmas concentrações do extrato e das frações.

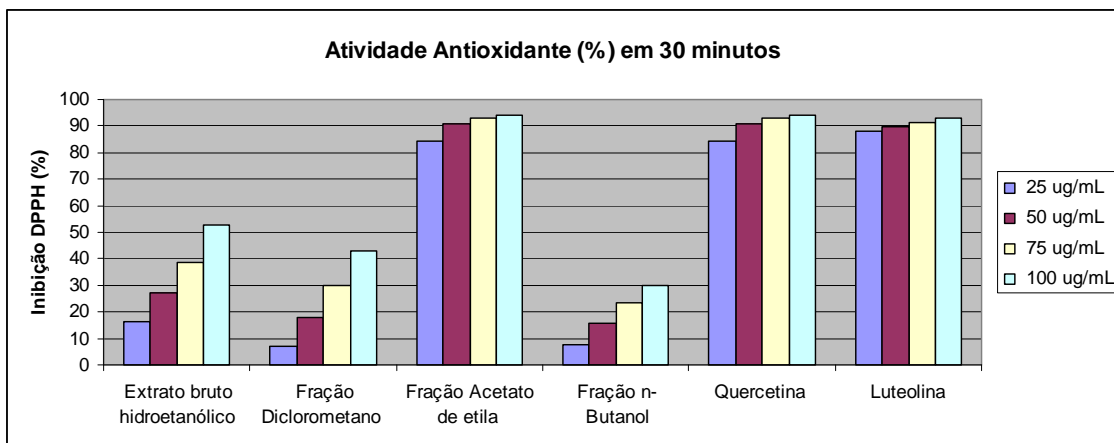


Figura 17. Representação gráfica da atividade antioxidante do extrato bruto hidroetanólico e das frações diclorometano, acetato de etila e n-butanol e das substâncias de referência quercetina e luteolina em diferentes concentrações frente ao DPPH* em 30 minutos de reação.

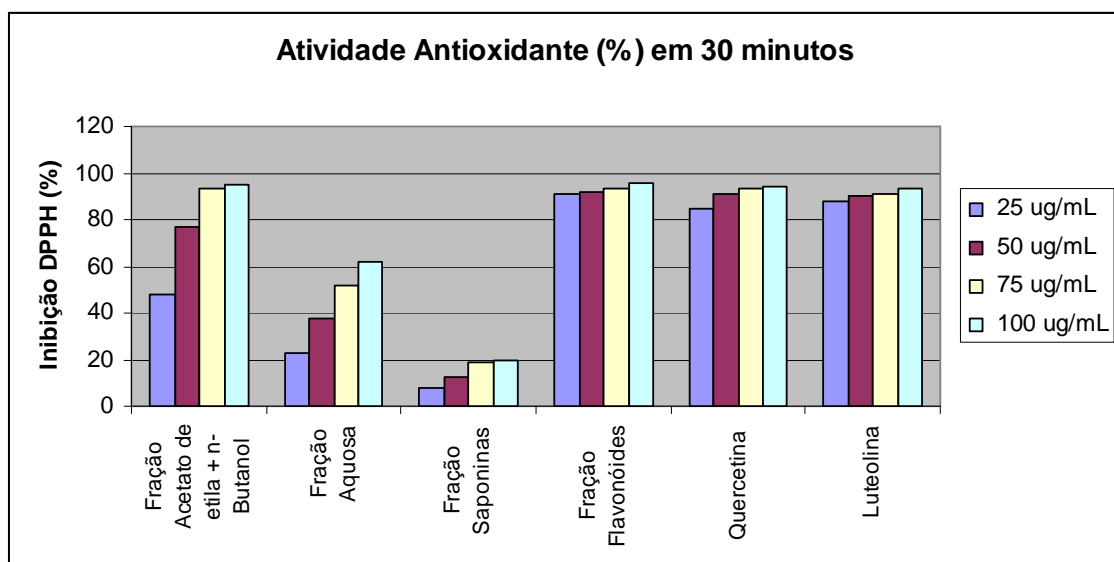


Figura 18. Representação gráfica da atividade antioxidante das frações acetato de etila + n-butanol, aquosa, saponinas e flavonóides e das substâncias de referência quercetina e luteolina em diferentes concentrações frente ao DPPH* em 30 minutos de reação.

Dentre os resultados obtidos frente ao DPPH* pelo método fotométrico, podemos destacar que as frações de flavonóides, acetato de etila e acetato de etila

+ *n*-butanol apresentaram uma atividade similar às substâncias de referência quercetina e luteolina. Esse comportamento não foi observado para a fração de saponinas, que apresentou o pior desempenho em relação as frações *n*-butanol e diclorometano, as quais tiveram comportamento semelhante.

A concentração efetiva para obter 50% do máximo da atividade estimada em 100% é dita CE_{50} , sendo calculada por regressão linear das curvas-padrão construídas das concentrações das amostras testadas, onde a abscissa (*x*) representa a concentração da amostra e a ordenada (*y*) é a média de 3 análises do percentual de atividade antioxidante.

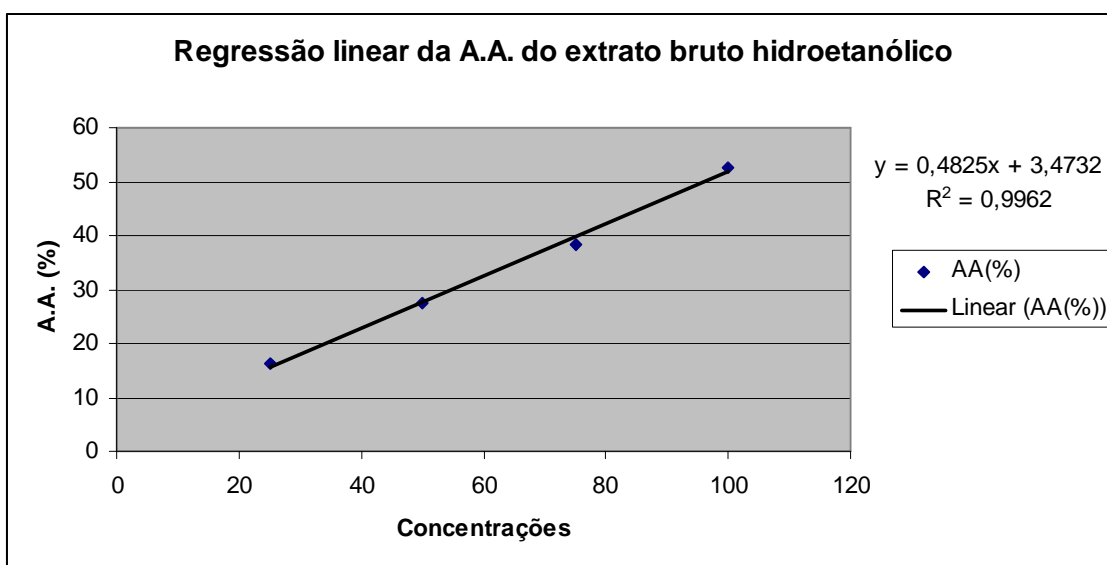


Figura 19. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração do extrato bruto hidroetanólico versus a porcentagem da atividade antioxidante.

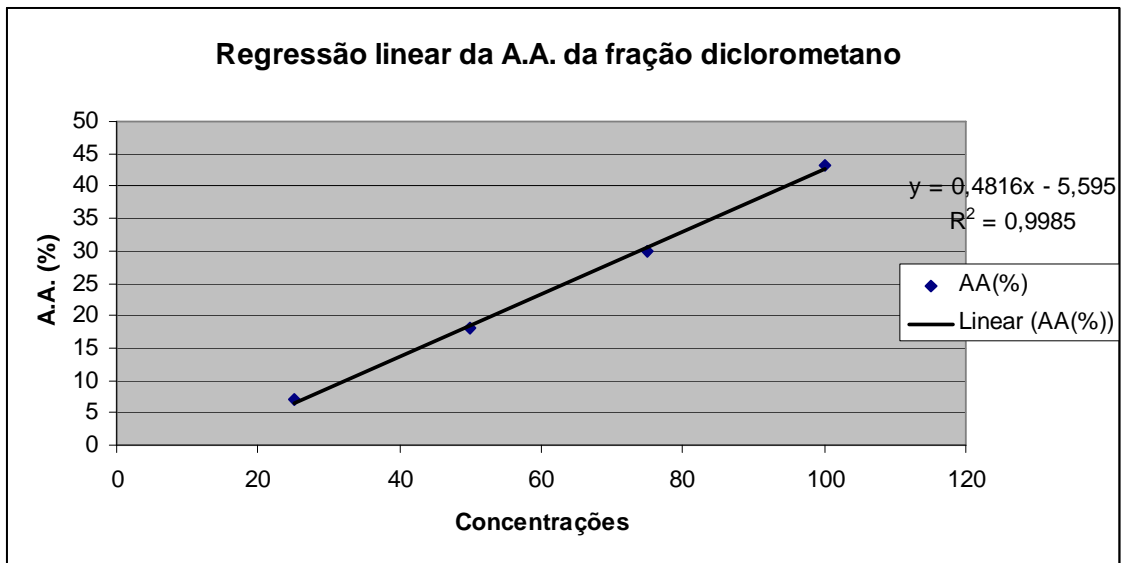


Figura 20. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração diclorometano versus a porcentagem da atividade antioxidante.

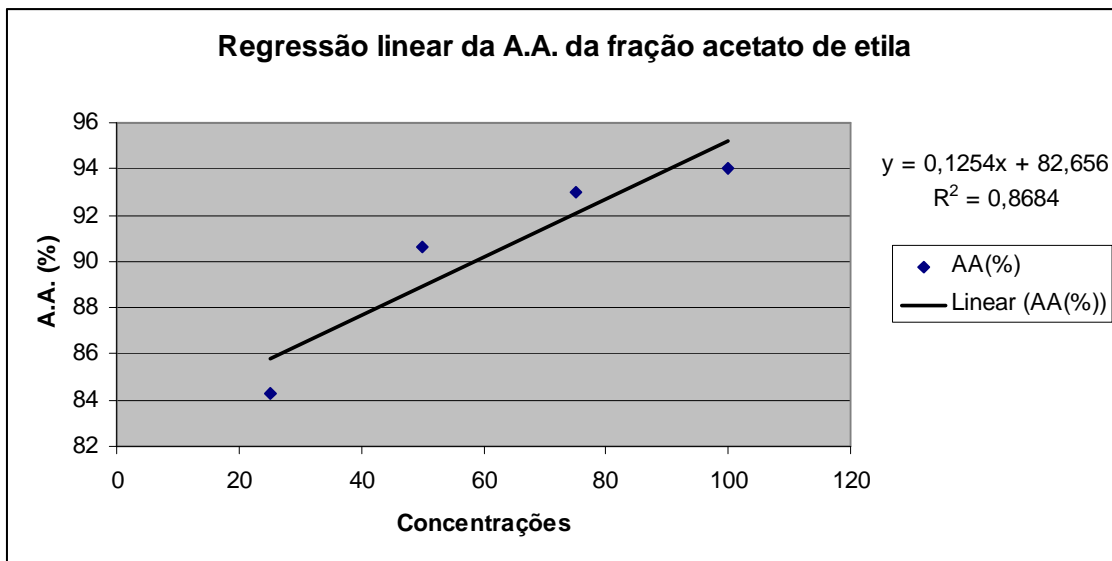


Figura 21. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração acetato de etila versus a porcentagem da atividade antioxidante.

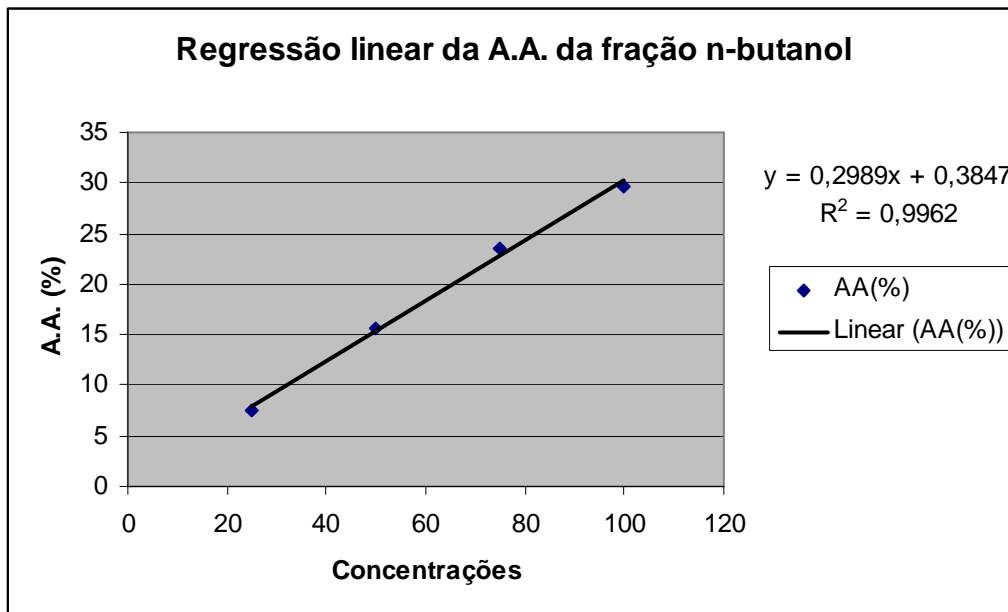


Figura 22. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração n-butanol versus a porcentagem da atividade antioxidante.

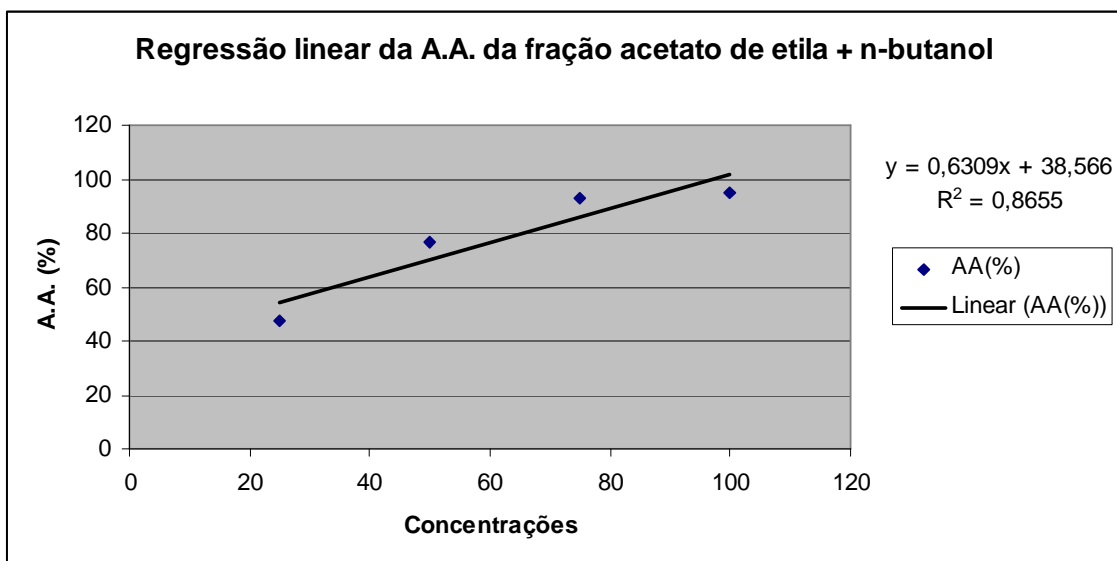


Figura 23. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração acetato de etila + n-butanol versus a porcentagem da atividade antioxidante.

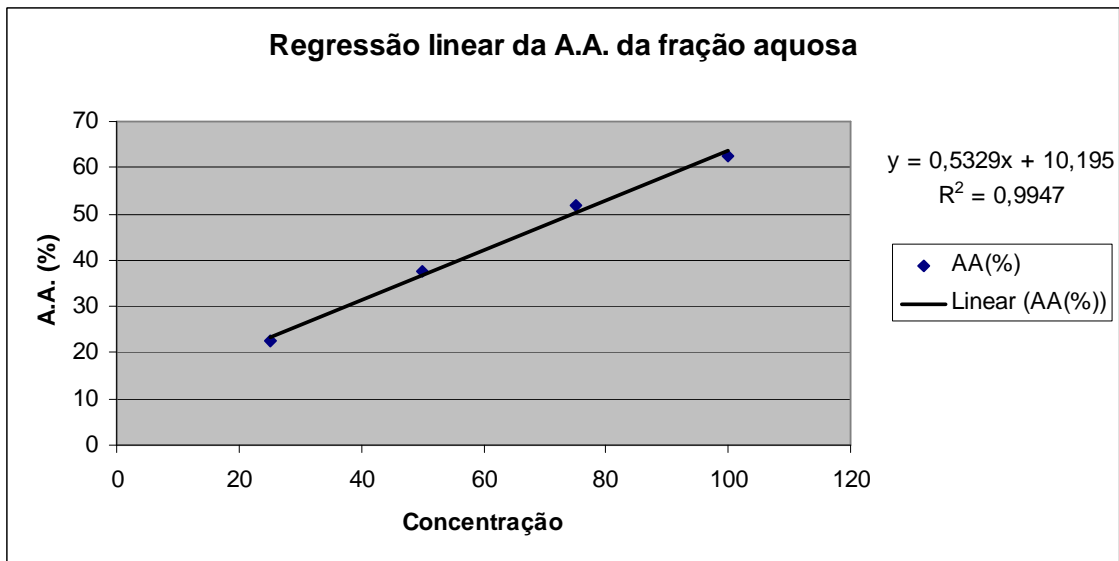


Figura 24. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração aquosa versus a porcentagem da atividade antioxidante.

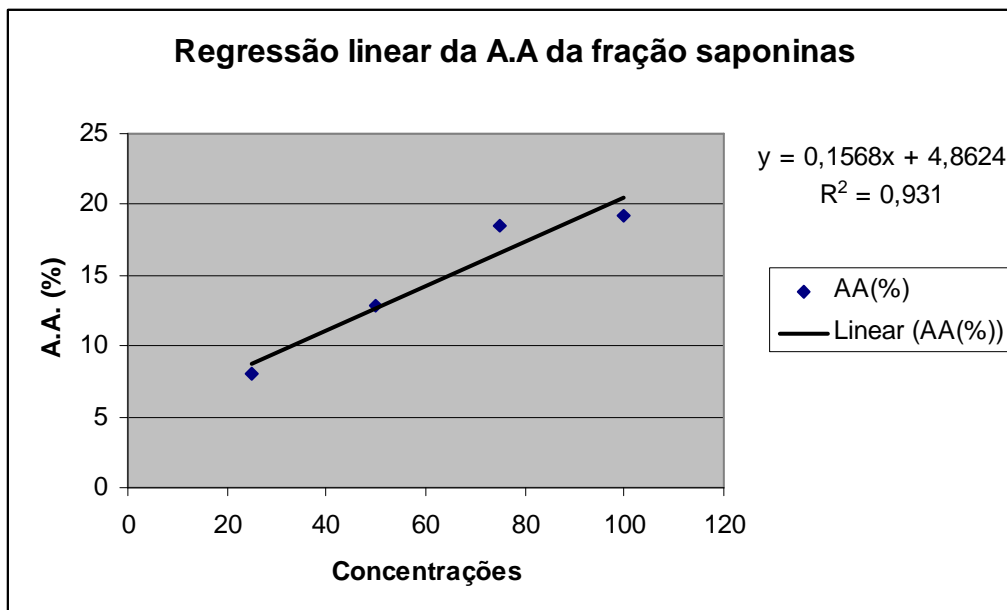


Figura 25. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração saponinas versus a porcentagem da atividade antioxidante.

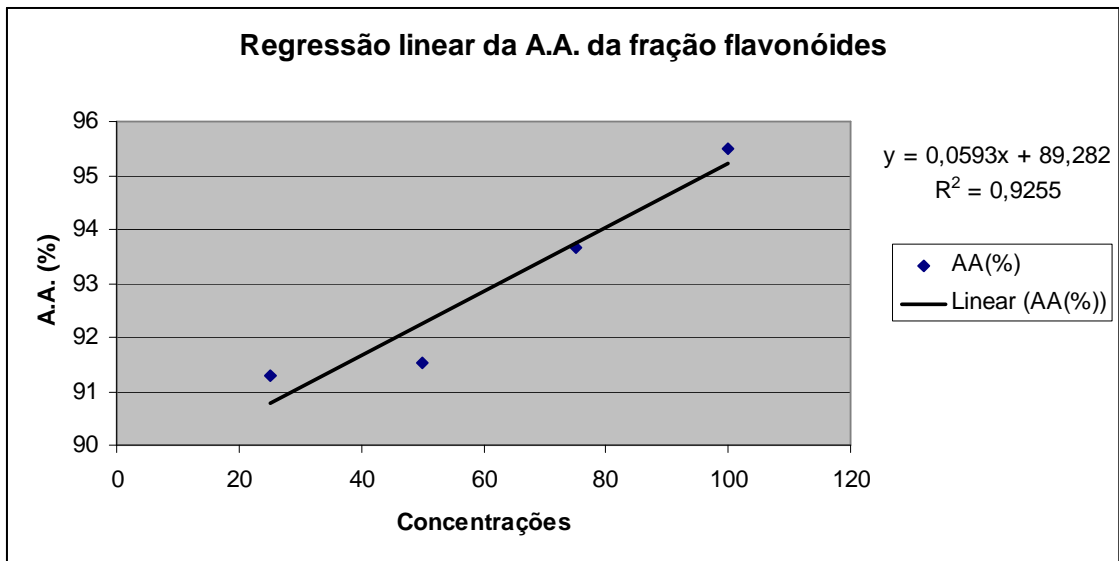


Figura 26. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da fração flavonóides versus a porcentagem da atividade antioxidante.

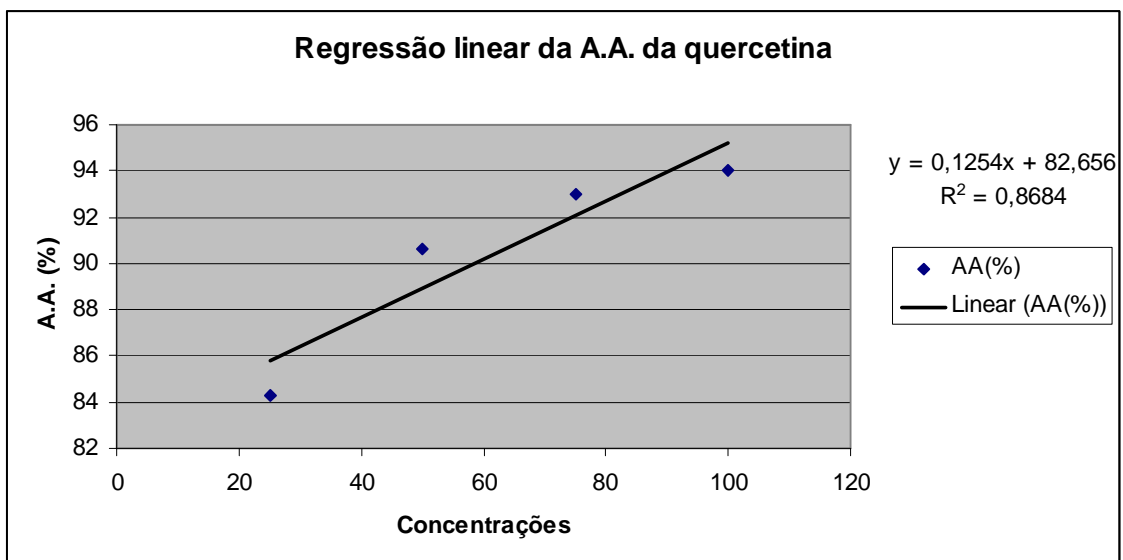


Figura 27. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da substância de referência quercetina versus a porcentagem da atividade antioxidante.

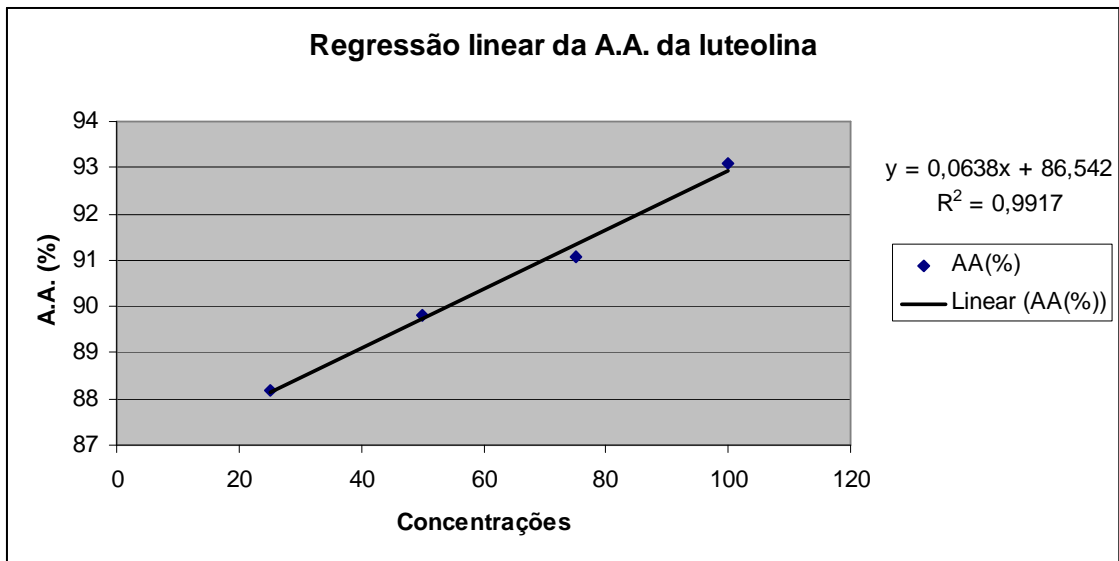


Figura 28. Representação do gráfico de regressão linear da curva de concentração da substância de referência luteolina versus a porcentagem da atividade antioxidante.

A CE_{50} para o ácido ascórbico foi de 5,68 $\mu\text{g/mL}$ para reduzir uma solução contendo 150 μM de DPPH*. Comparando este resultado com o obtido por Saito (2007) onde a CE_{50} foi de 6,54 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico para reduzir uma solução contendo 169,9 μM de DPPH*, extrapolando este CE_{50} para uma solução de 150 μM , obteríamos um valor teórico de 5,77 $\mu\text{g/mL}$, valor semelhante ao experimento aqui realizado. Entre os controles positivos, o ácido ascórbico foi o que obteve maior atividade antioxidante, seguido por luteolina e enfim pela quercetina.

A tabela 5 apresenta a CE_{50} de todas as amostras e das substâncias de referência analisadas assim como a quantidade equivalente em ácido ascórbico (QEAA) calculada conforme item 3.6.4

Tabela 5. CE₅₀ das substâncias analisadas e seus respectivos valores equivalentes a 1 g de ácido ascórbico.

Amostra	CE ₅₀ (µg/mL)	QEAA (g)
Ácido ascórbico	5,68	1,0000
Extrato bruto hidroetanólico	72,40	12,7465
Fração diclorometano	81,51	14,3503
Fração acetato de etila	11,07	1,9489
Fração acetato de etila/n-butanol	29,89	5,2623
Fração n-butanol	84,67	14,9067
Fração aquosa	66,16	11,6479
Fração saponinas	87,30	15,3697
Fração flavonóides	7,75	1,3644
Quercetina	11,07	1,9489
Luteolina	10,27	1,8081

As frações ricas em compostos fenólicos, como acetato de etila e flavonóides obtiveram maior atividade antioxidante. Observou-se que aproximadamente 1,36 e 1,95 g dessas frações possuem a atividade antioxidante equivalente a 1g de ácido ascórbico. A menor atividade antioxidante foi observada na fração saponinas, n-butanol e diclorometano, isto deve estar relacionado ao baixo teor de compostos fenólicos.

Os resultados apresentados pelas diferentes frações e pelo extrato bruto hidroetanólico na concentração de 100 µg/mL após 30 minutos de reação com o DPPH[•] foram comparados. Foi observado que as frações acetato de etila, acetato de etila + butanol e flavonóides não apresentaram diferença estatística significativa, para um intervalo de confiança de 5%, após análise por ANOVA, seguida pelo teste de Tukey em relação às substâncias de referência vitamina C e dos flavonóides quercetina e luteolina, conforme observado na figura 29.

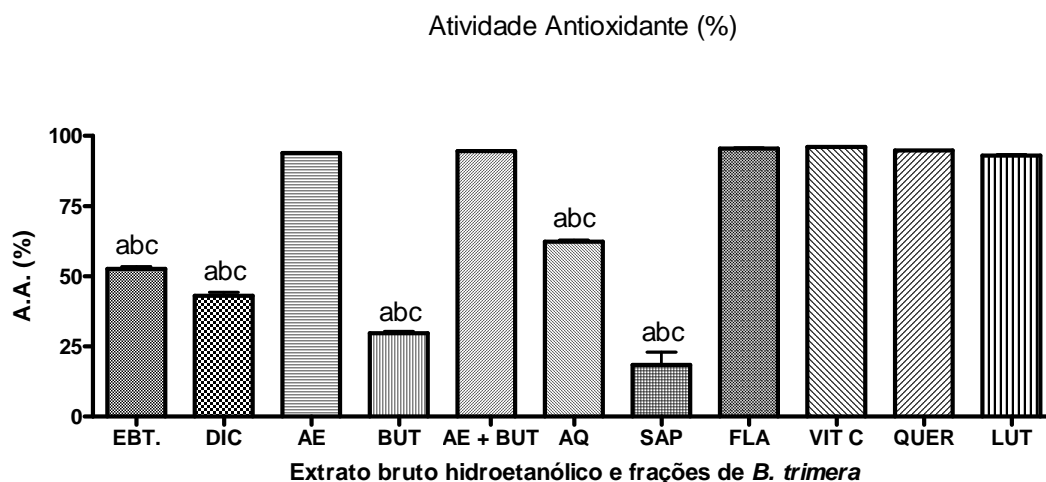


Figura 29 Atividade antioxidante do extrato bruto hidroetanólico e das frações de *B. trimera*. Extrato bruto hidroetanólico (EBT), fração diclorometano (DM), fração acetato de etila (AE), fração *n*-butanol (BUT), fração acetato de etila + *n*-butanol (AE+BUT), fração aquosa (AQ), fração saponinas (SAP), fração flavonóides (FLA), ácido ascórbico (VIT C), quercetina (QUER), luteolina (LUT). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Tukey; ^{abc} $P < 0,001$, comparados com os grupos ácido ascórbico, quercetina e luteolina, respectivamente. Valores são expressos como média \pm desvio padrão.

O dano causado por espécies reativas de oxigênio, atualmente, é considerado um fator contribuinte de diversas doenças, incluindo alguns tipos de câncer, diabetes, doenças do sistema cardiovascular e Mal de Alzheimer (HOUGHTON *et al.*, 2007). Assim identificar um potencial antioxidante de um composto pode credenciá-lo a ser uma molécula bioativa mais completa ao considerarmos o conjunto de propriedades que ele representa.

Pesquisas têm demonstrado que os flavonóides inibem a peroxidação lipídica, *in vitro*, no estágio de iniciação, por atuar como antioxidante, eliminando ânion superóxido e radicais hidroxilas. Tem sido proposto que flavonóides interrompem a reação em cadeia dos radicais livres, doando átomos de hidrogênio ao radical peroxila, formando um radical de flavonóide. O radical flavonóide, então reage com o radical livre, terminando, assim a propagação da reação em cadeia (SILVA *et al.*, 2002).

Sendo assim, as frações de flavonóides, acetato de etila e acetato de etila + *n*-butanol de *B. trimera* apresentaram excelente potencial antioxidante, equiparando-se às substâncias de referência vitamina C, quercetina e luteolina.

Baseado no mecanismo de redução da molécula de DPPH[•] e no conhecimento prévio da química desta espécie vegetal é possível inferir que a ação antioxidante destas frações deve-se à presença de substâncias com grupamentos hidroxila disponíveis, tais como os flavonóides.

CAPÍTULO 3

Capítulo 3: Avaliação da atividade anti-inflamatória das frações de *B.*

trimera.

1. Introdução

Com o objetivo de impedir o desenvolvimento do quadro inflamatório, tem-se utilizado anti-inflamatórios esteróides e/ou agentes anti-inflamatórios não-esteróides (AINES). Sabe-se que a cascata do ácido araquidônico (AA) é responsável pela biotransformação de importantes mediadores celulares envolvidos no processo inflamatório. A inibição seletiva de enzimas dessa cascata biossintética tem sido atraente sítio de intervenção terapêutica para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas e agudas, sendo reconhecido, que a ação dos anti-inflamatórios esteróides e não-esteróides se faz por inibir as cicloxigenases (COX₁ e COX₂) (SUYENAGA, 2002). A utilização de medicamentos também tem trazido muitos efeitos colaterais. O uso prolongado dos AINES leva ao desenvolvimento de complicações no trato gastrointestinal, principalmente o desenvolvimento de úlcera péptica (HAWKINS and HANKS, 2000), os derivados esteróides podem introduzir intensas e diversas alterações metabólicas, bem como mudanças na resposta imune a diferentes estímulos (PARK *et al.*, 2001).

Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos tem sido uma área amplamente investigada, principalmente aqueles oriundos de produtos naturais, servindo como matéria-prima para a síntese de novas substâncias bioativas (SUYENAGA, 2002; TUNG *et al.*, 2008). Inúmeras classes de substâncias obtidas de diferentes plantas tem sido estudadas. Dentre os constituintes químicos, foram relatados estudos sobre a atividade anti-inflamatória de terpenos, alcalóides e compostos fenólicos como as cumarinas e flavonóides. Esta constante busca tem como seu objetivo principal o melhoramento da atividade anti-inflamatória e a redução dos efeitos colaterais.

Diversos estudos vêm sendo realizados com *B. trimera*, em especial as atividades anti-inflamatória e antimicrobiana, bem como analgésica, antidiabética, antihepatotóxica, atividade antimutagênica e efeito relaxante muscular (SOICKE and LENG-PESCHLOW, 1987; GENÉ *et al.*, 1992, 1996; TORRES *et al.*, 2000; DE OLIVEIRA *et al.*, 2004; 2005; BETONI *et al.*, 2006).

Neste contexto, a atividade anti-inflamatória de frações de *B. trimera* será avaliada através do modelo de inflamação aguda da pleurisia induzida por carragenina, em ratos. Foram avaliados os seguintes parâmetros inflamatórios no líquido pleural: volume de exsudato, contagem de leucócitos totais, diferencial citológico, concentração protéica e determinação de óxido nítrico (NO) no exsudato.

2. Objetivos:

Identificar o grupo de substâncias (fração) responsável pela atividade anti-inflamatória na pleurisia induzida por carragenina.

Avaliar parâmetros inflamatórios na líquido pleural

3. Materiais e Métodos:

3.1. Atividade anti-inflamatória *in vivo*

Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Biofísica Celular e Inflamação da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul sob orientação do Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira; conforme literatura (LUNARDELLI *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2007).

3.1.1. Ensaio de pleurisia

Foram utilizados *Rattus norvegicus* (Wistar) fêmeas adultas, com peso entre 180 g a 220 g (entre 2 a 3 meses de idade) do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) de Porto Alegre. Os animais foram mantidos com temperatura e umidade controladas, sob ciclo de claro e escuro de 12 h: 12 h, com livre acesso à ração e água, todos da mesma linhagem e socialização.

Para este ensaio foram formados quatro grupos experimentais: o grupo salina tratado com solução salina estéril (Salina) (0,2 ml de NaCl, 0,9%, intrapleural e 1 ml de NaCl, 0,9%, i.p.), o grupo carragenina (Cg) (0,2 ml de carragenina,1%, intrapleural e 1 ml de NaCl, 0,9%, i.p.); o grupo dexametasona (Dexa) (0,2 ml de carragenina,1%, intrapleural e 0,5 mg/kg de dexametasona, s.c.) e o grupo tratado com as frações (0,2 ml de carragenina,1%, intrapleural e 1 ml das frações nas suas respectivas doses, i.p.). Os grupos foram compostos de 5-7 animais cada.

Todas as frações de *B. trimera* foram administrados por via intraperitoneal (volume final de 1 mL) 30 minutos antes da administração da carragenina no espaço

pleural dos animais. As frações diclorometano (DM), acetato de etila (AE), *n*-butanol (BU) e aquosa (AQ) foram administradas nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p. A fração de saponinas (SAP) nas doses de 15, 22,5 e 30 mg/kg, i.p., enquanto que a fração de flavonóides (FLA) foi administrada nas doses de 5, 10 e 15 mg/kg, i.p. Todas as frações foram preparadas em solução salina contendo 1% de DMSO.

3.1.2. Indução da pleurisia e coleta do exsudato

Trinta minutos após a administração das frações de *B. trimera* por via i.p., os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) para a administração de uma dose de 0,2 ml de carragenina a 1% através de uma incisão ao nível do sexto espaço intercostal esquerdo.

Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados com pentobarbital na dose de 120 mg/kg por via intraperitoneal. Após a parada respiratória, foi realizada a toracotomia paraesternal bilateral com exposição da cavidade torácica, procedendo a seguir, a lavagem do espaço pleural com 2,0 ml de solução salina estéril (NaCl 0,9%) contendo 1% de EDTA para aspiração do exsudato. Os exsudatos que apresentaram contaminação sanguínea foram descartados. Os exsudatos foram coletados e os seguintes parâmetros inflamatórios foram analisados: volume de exsudação, contagem de leucócitos totais, diferencial citológico, concentração protéica e determinação de óxido nítrico (NO).

3.1.3 Análise dos parâmetros inflamatórios

3.1.3.1. Volume do exsudato

O volume do exsudato foi mensurado através da diferença entre o volume total coletado e o volume injetado na cavidade pleural (2,0 ml de solução salina).

3.1.3.2. Contagem de leucócitos totais

A contagem de leucócitos totais foi estimada através da diluição da amostra em líquido de Thoma (1:20) e posterior contagem em câmara de Neubauer.

3.1.3.3. Diferencial citológico

A contagem diferencial de leucócitos no exsudato pleural foi realizada em lâminas citológicas coradas (May-Grünenwald e Giemsa), onde se determinou o percentual de células polimorfonucleares.

3.1.3.4. Determinação de proteínas totais

O líquido pleural removido dos animais foi centrifugado a 1200 x g por 10 minutos e a concentração protéica foi mensurada pela técnica do Biureto (Labtest Kit®).

3.1.3.5. Determinação de óxido nítrico (NO)

Para a análise do NO no exsudato foi utilizada a reação de Griess para quantificar o nitrito segundo a técnica descrita por HABASHY *et al* (2005). Todas as amostras do fluido pleural obtidas neste ensaio após a centrifugação foram coletadas, separadas e armazenadas a -20°C para realização desta técnica.

3.2. Comitê de ética:

A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos para experimentação animal relatados por LAROCHE e ROUSSELET (1990), GOLDIM (1995), as normas do Conselho Canadense de Cuidados com Animais (CCAC, 2003) e da Resolução número 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) e aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS sob registro CEUA 08/0010.

3.3. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e analisados estatisticamente por Análise da Variância (ANOVA) seguidos de *post test* Bonferroni. $P < 0,05$ foram considerados como indicativo de significância.

4. Resultados e Discussão

O modelo de pleurisia é um modelo experimental de inflamação aguda que permite quantificar e correlacionar a migração celular e o exsudato extravasado. Neste trabalho foi analisada a pleurisia induzida por carragenina, observando os

efeitos sobre o volume do exsudato, a migração leucocitária, a concentração protéica e a concentração de óxido nítrico.

4.1. Frações diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e aquosa administradas nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p.

Os animais pré-tratados com a fração diclorometano nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p. (Tabela 6) reduziram significativamente o volume de exsudato, a migração leucocitária, o influxo de polimorfonucleares e a concentração protéica quando comparados com o grupo carragenina.

Quando comparados ao grupo salina (salina intrapleural/salina i.p.) as três doses analisadas da fração diclorometano não apresentaram diferenças estatísticas nos parâmetros leucócitos totais, influxo de polimorfonucleares e concentração protéica. No parâmetro volume de exsudato a dose de 75 mg/kg, i.p. da fração diclorometano foi a única que não se diferenciou estatisticamente do grupo salina.

Como na comparação com o grupo salina, os parâmetros leucócitos totais, influxo de polimorfonucleares e concentração protéica nas três doses administradas não se diferenciaram estatisticamente da dexametasona. Já para o volume de exsudato a dose de 75 mg, i.p. da fração diclorometano foi a única que não se diferenciou estatisticamente do grupo dexametasona.

Para a concentração de óxido nítrico (Figura 30) todas as doses testadas diminuiriam significativamente a concentração de NO quando comparadas ao grupo carragenina e ao grupo salina. Em relação ao grupo dexametasona, as doses de 50 e 75 mg/kg, i.p. não diferiram estatisticamente da dexametasona.

Tabela 6. Pleurisia induzida por carragenina, após 30 minutos de pré-tratamento com a fração diclorometano (DM) nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ versus grupo salina; ^a $P < 0,05$, ^{aa} $P < 0,01$, ^{aaa} $P < 0,001$ versus grupo carragenina e [&] $P < 0,05$, ^{&&} $P < 0,01$, ^{&&&} $P < 0,001$ versus dexametasona

Grupos	Volume de exsudato (mL)	Leucócitos ($\times 10^6$ /cavidade)	PMNs ($\times 10^6$ /cavidade)	Proteínas (g/dL)
Salina	2,06 \pm 0,05	10,57 \pm 2,55	3,12 \pm 0,38	0,16 \pm 0,12
Cg	2,96 \pm 0,15 ***	36,19 \pm 12,74 ***	43,70 \pm 18,71 ***	2,25 \pm 0,46 ***
Dexa	2,12 \pm 0,09 ^{aaa}	19,05 \pm 3,57	2,79 \pm 0,46 ^{aaa}	0,50 \pm 0,04 ^{aaa}
DM 25 mg/kg	2,46 \pm 0,13 ** ^{aaa} &&	8,79 \pm 2,53 ^{aa}	5,90 \pm 0,42 ^{aa}	0,54 \pm 0,20 ^{aaa}
DM 50 mg/kg	2,42 \pm 0,19 ** ^{aaa} &	7,52 \pm 0,98 ^{aa}	4,30 \pm 0,49 ^{aaa}	0,62 \pm 0,34 ^{aaa}
DM 75 mg/kg	2,34 \pm 0,18 ^{aaa}	8,03 \pm 1,99 ^{aa}	4,00 \pm 0,69 ^{aaa}	0,69 \pm 0,12 ^{aaa}

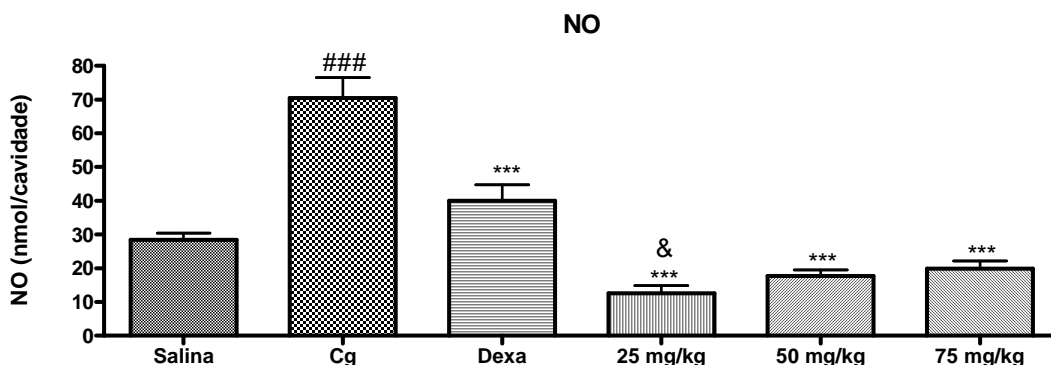


Figura 30. Concentração de NO da fração diclorometano (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni; ^{###} $P < 0,001$, comparados com o grupo grupo salina. ^{***} $P < 0,001$, comparados com a carragenina. [&] $P < 0,05$ comparados com a dexametasona. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

Para os animais pré-tratados com a fração acetato de etila nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p. (Tabela 7) também houve redução significativa de todos os parâmetros analisados quando comparados ao grupo carragenina.

Quando comparados ao grupo salina (salina intrapleural/salina i.p.), como na fração diclorometano, as três doses analisadas da fração acetato de etila não apresentaram diferenças estatísticas nos parâmetros leucócitos totais, influxo de polimorfonucleares e concentração protéica. No parâmetro volume de exsudato a dose de 75 mg/kg, i.p. foi a única que não se diferenciou estatisticamente do grupo salina.

Em comparação com o grupo dexametasona, os parâmetros leucócitos totais, influxo de polimorfonucleares e concentração protéica nas três doses administradas não se diferenciaram estatisticamente do grupo dexametasona. Já para o volume de exsudato as doses de 50 e 75 mg, i.p. da fração acetato de etila foram as que não se diferenciaram estatisticamente do grupo dexametasona.

Em relação à determinação de NO (Figura 31) foi observado que todas as três doses testadas da fração acetato de etila diferiram significativamente do grupo carragenina. Em comparação com os grupos dexametasona e salina, as doses não apresentaram diferença significativa.

Tabela 7. Pleurisia induzida por carragenina, após 30 minutos de pré-tratamento com a fração acetato de etila (AE) nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ versus grupo salina; ^a $P < 0,05$, ^{aa} $P < 0,01$, ^{aaa} $P < 0,001$ versus grupo carragenina e [&] $P < 0,05$, ^{&&} $P < 0,01$ versus grupo dexametasona

Grupos	Volume de exsudato (mL)	Leucócitos ($\times 10^6$ /cavidade)	PMNs ($\times 10^6$ /cavidade)	Proteínas (g/dL)
Salina	2,06 \pm 0,05	10,57 \pm 2,55	3,11 \pm 0,38	0,16 \pm 0,12
Cg	2,96 \pm 0,15 ***	36,19 \pm 12,74 ***	43,70 \pm 18,71 **	2,25 \pm 0,46***
Dexa	2,12 \pm 0,09 ^{aaa}	19,05 \pm 3,57 ^{aa}	2,79 \pm 0,46 ^{aaa}	0,50 \pm 0,04 ^{aaa}
AE 25 mg/kg	2,45 \pm 0,23 ** ^{aaa &&}	17,71 \pm 7,50 ^{aa}	10,45 \pm 5,16 ^a	0,48 \pm 0,26 ^{aaa}
AE 50 mg/kg	2,35 \pm 0,12 * ^{aaa}	11,97 \pm 4,04 ^{aaa}	2,66 \pm 1,96 ^{aa}	0,59 \pm 0,43 ^{aaa}
AE 75 mg/kg	2,32 \pm 0,08 ^{aaa}	6,42 \pm 1,34 ^{aaa &}	2,43 \pm 0,15 ^{aa}	0,48 \pm 0,21 ^{aaa}

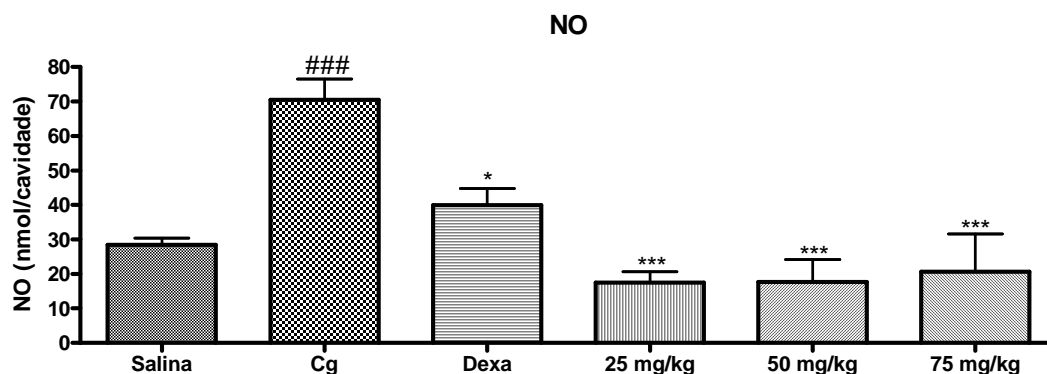


Figura 31. Concentração de NO da fração acetato de etila (Salina=grupo limpo, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$, comparados com o grupo salina. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ comparados com a carragenina. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

Para os animais pré-tratados com a fração *n*-butanol (Tabela 8) as 3 doses testadas diminuíram significativamente o volume de exsudato e o influxo de polimorfonucleares quando comparados ao grupo carragenina. Para os parâmetros leucócitos totais e concentração de proteínas as doses de 50 e 75 mg/kg, i.p. se diferiram estatisticamente do grupo carragenina

Em relação ao grupo salina, para os parâmetros volume de exsudato, leucócitos totais e concentração de proteínas as doses que não se diferiram estatisticamente da salina foram as de 50 e 75 mg/kg, i.p. No parâmetro influxo de polimorfonucleares todas as doses não se diferenciaram estatisticamente do grupo salina.

Com o grupo dexametasona, os resultados foram semelhantes ao grupo salina. Para os parâmetros volume de exsudato, leucócitos totais e concentração de proteínas as doses que não se diferiram estatisticamente da dexametasona foram as de 50 e 75 mg/kg, i.p. No parâmetro influxo de polimorfonucleares todas as doses não se diferenciaram estatisticamente do controle dexametasona.

Foi possível observar para fração *n*-butanol que a dose de 75mg/kg, i.p. apresentou diferença estatística da dose de 25 mg/kg, i.p. quando avaliado o volume de exsudato e o número de leucócitos totais migrados para o foco inflamatório. Desta forma podemos afirmar que nestes dois parâmetros a dose de 75 mg/kg, i.p. apresentou melhor atividade que a dose de 25 mg/kg, i.p.

Em relação à determinação de NO (Figura 32) podemos dizer que todas as doses da fração *n*-butanol não se diferenciaram estatisticamente quando comparadas ao grupo salina, enquanto que para o grupo carragenina todas se diferenciaram estatisticamente da carragenina. As três doses testadas diminuíram significativamente a concentração de NO quando comparadas ao grupo dexametasona.

Tabela 8. Pleurisia induzida por carragenina, após 30 minutos de pré-tratamento com a fração *n*-butanol (BU) nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ versus grupo salina, ^a $P < 0,05$, ^{aa} $P < 0,01$, ^{aaa} $P < 0,001$ versus grupo carragenina, & $P < 0,05$, && $P < 0,01$, &&& $P < 0,001$ versus grupo dexametasona e # $P < 0,05$ versus dose de 75 mg/kg, i.p.

Grupos	Volume de exsudato (mL)	Leucócitos ($\times 10^6$ /cavidade)	PMNs ($\times 10^6$ /cavidade)	Proteínas (g/dL)
Salina	2,06 \pm 0,05	10,57 \pm 2,55	3,11 \pm 0,38	0,16 \pm 0,12
Cg	2,96 \pm 0,15 ***	36,19 \pm 12,74 **	43,70 \pm 18,71 ***	2,25 \pm 0,46 ***
Dexa	2,12 \pm 0,09	19,05 \pm 3,57 ^{aaa}	2,79 \pm 0,46 ^{aaa}	0,50 \pm 0,04 ^{aaa}
BU 25 mg/kg	2,51 \pm 0,23 *** ^{aaa} &&& #	20,20 \pm 14,54 * ^a #	15,25 \pm 12,79 ^a	1,31 \pm 0,55 *** ^a &
BU 50 mg/kg	2,33 \pm 0,13 ^{aaa}	11,45 \pm 3,00 ^{aa}	2,86 \pm 0,58 ^{aaa}	1,01 \pm 0,37 ** ^{aa}
BU 75 mg/kg	2,25 \pm 0,14 ^{aaa b}	9,93 \pm 2,40 ^{aaa}	2,80 \pm 0,42 ^{aaa}	0,92 \pm 0,28 * ^{aaa}

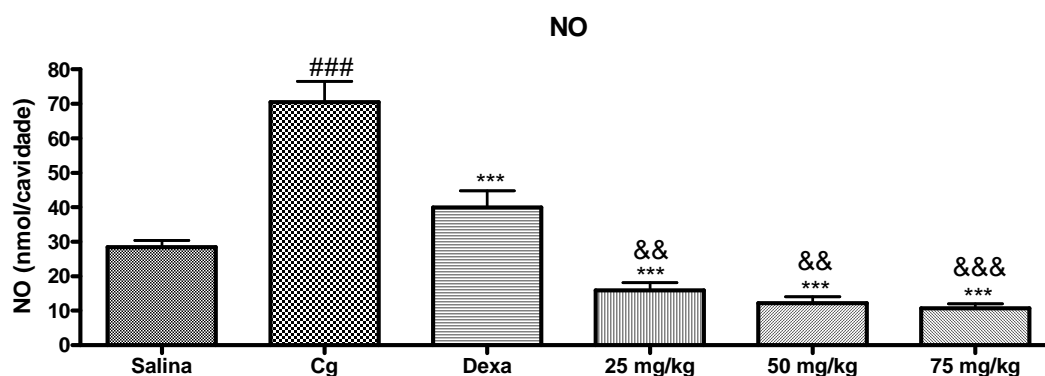


Figura 32. Concentração de NO da fração *n*-butanol (Salina=grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona).. Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$, comparados com o grupo salina. *** $P < 0,001$, comparados com a carragenina. &&& $P < 0,001$, && $P < 0,01$ comparados com a dexametasona. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

Para os animais pré-tratados com a fração aquosa nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p. (Tabela 9) não apresentou diferenças estatísticas nas 3 doses testadas quando comparadas ao grupo salina na avaliação dos parâmetros volume de exsudato e leucócitos totais. No influxo de polimorfonucleares e na concentração de proteínas, a dose de 25 mg/kg, i.p. se diferenciou estatisticamente do grupo salina.

Em relação ao grupo dexametasona todas as doses avaliadas da fração aquosa em todos parâmetros avaliados não se diferenciaram estatisticamente da dexametasona.

Quanto ao grupo carragenina, as doses de 50 e 75 mg/kg, i.p., reduziram significativamente todos os parâmetros avaliados quando comparados à carragenina enquanto que a dose de 25 mg/kg, i.p., não reduziu significativamente a mobilização de polimorfonucleares embora tenha reduzido significativamente o número de leucócitos totais, o volume de exsudação plasmática e a concentração protéica quando comparados ao grupo carragenina.

Na determinação da concentração de NO (Figura 33), todas as doses administradas (25, 50 e 75 mg/kg, i.p.) da fração aquosa se diferenciaram estatisticamente do grupo carragenina, enquanto que não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao grupo salina e ao grupo dexametasona.

Tabela 9. Pleurisia induzida por carragenina, após 30 minutos de pré-tratamento com a fração aquosa (AQ) nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p. Resultados expressos como média \pm desvio padrão. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ versus grupo salina e ^a $P < 0,05$, ^{aa} $P < 0,01$, ^{aaa} $P < 0,001$ versus grupo carragenina.

Grupos	Volume de exsudato (mL)	Leucócitos (x10 ⁶ /cavidade)	PMNs (x10 ⁶ /cavidade)	Proteínas (g)
Salina	2,06 \pm 0,05	10,57 \pm 2,55	3,12 \pm 0,38 43,70 \pm 18,71	0,16 \pm 0,12
Cg	2,96 \pm 0,15 ***	36,19 \pm 12,74 ***	***	2,25 \pm 0,46 ***
Dexa	2,12 \pm 0,09 ^{aaa}	19,05 \pm 3,57 ^a	2,79 \pm 0,46 ^{aaa}	0,50 \pm 0,04 ^{aaa}
AQ 25 mg/kg	2,35 \pm 0,34 ^{aaa}	15,12 \pm 11,99 ^{aa}	38,15 \pm 4,59 *	0,99 \pm 0,81 * ^{aaa}
AQ 50 mg/kg	2,16 \pm 0,15 ^{aaa}	7,28 \pm 6,40 ^{aaa}	2,00 \pm 0,28 ^{aa}	0,44 \pm 0,22 ^{aaa}
AQ 75 mg/kg	2,16 \pm 0,12 ^{aaa}	8,96 \pm 5,46 ^{aaa}	3,70 \pm 1,10 ^{aa}	0,34 \pm 0,26 ^{aaa}

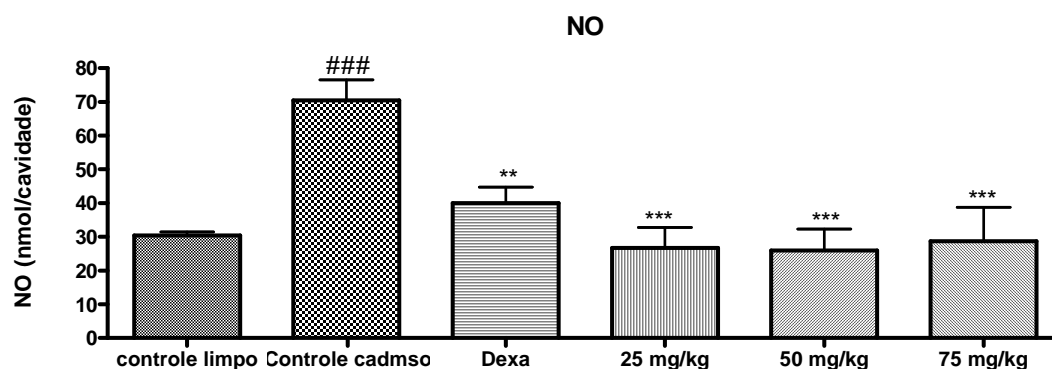


Figura 33. Concentração de NO da fração aquosa (Salina=grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$, comparados com o grupo salina. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, comparados com a carragenina. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

Com o objetivo de verificar uma possível diferença estatística entre as frações de *B. trimera* (diclorometano, acetato de etila, n-butanol e aquosa) e entre suas diferentes doses (25, 50 e 75 mg/kg, i.p.) foi realizado a Análise de Variância (ANOVA) de 1 via seguida do teste de Bonferroni e posterior análise da ANOVA de 2 vias., seguidas do teste de Bonferroni, segundo as figuras abaixo (Figuras 34 a 38).

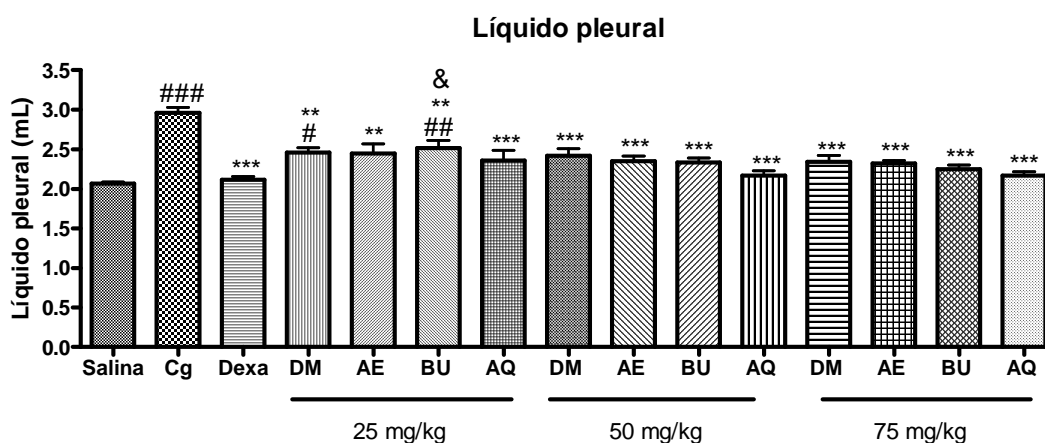


Figura 34. Análise estatística do líquido pleural das frações testadas (Salina=grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona, DM= fração diclorometano, AE=fração acetato de etila, BU= fração *n*-butanol , AQ= fração aquosa). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$ comparados com o grupo salina. *** $P < 0.001$, ** $P < 0,01$ comparados com a carragenina. & $P < 0.05$ comparados com a dexametasona. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

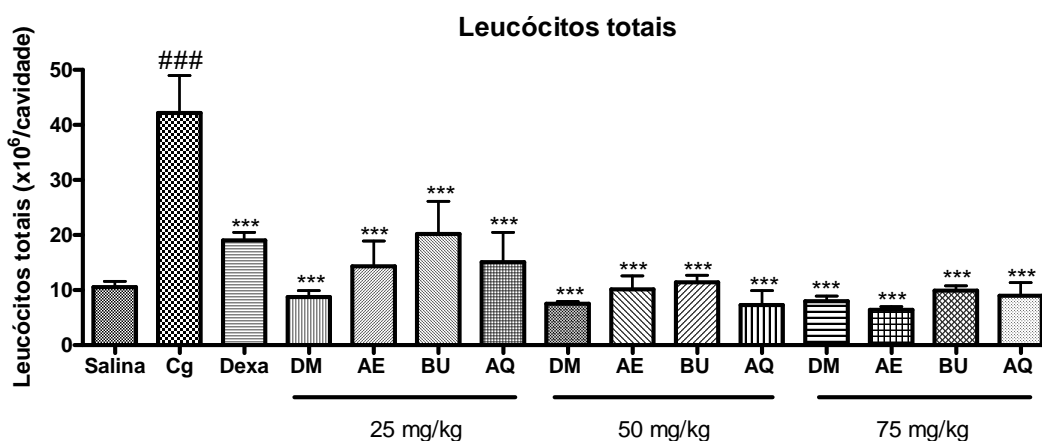


Figura 35. Análise estatística nos leucócitos totais das frações testadas (Salina=grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona, DM= fração diclorometano, AE=fração acetato de etila, BU= fração *n*-butanol , AQ= fração aquosa). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0.001$ comparados com o grupo salina. *** $P < 0.001$ comparados com a carragenina. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

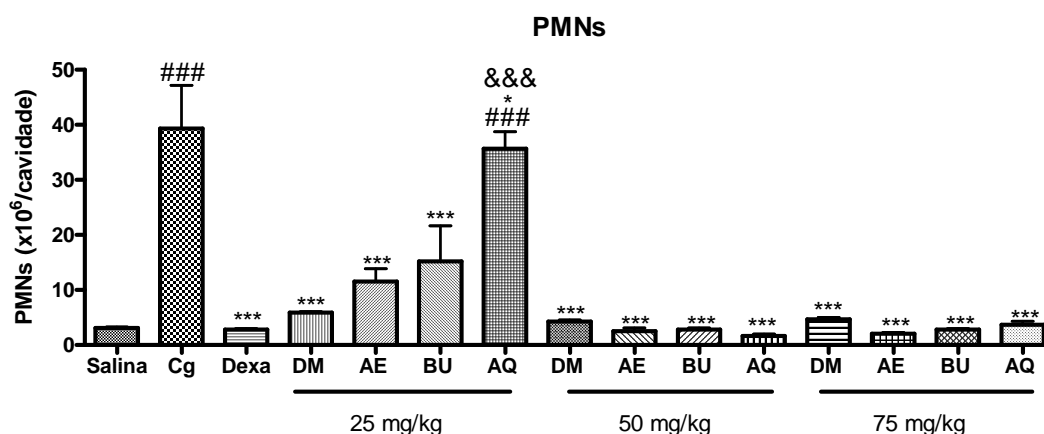


Figura 36. Análise estatística nos polimorfonucleares das frações testadas (Salina=grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona, DM= fração diclorometano, AE=fração acetato de etila, BU= fração n-butanol , AQ= fração aquosa). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$ comparados com o grupo salina. *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ comparados com a carragenina. &&& $P < 0.001$ comparados com a dexametasona. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

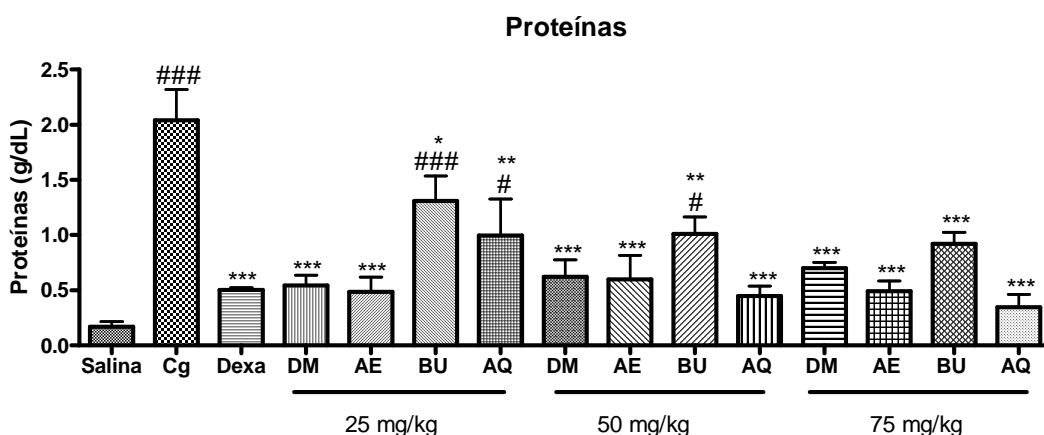


Figura 37. Análise estatística na concentração de proteínas totais das frações testadas (Salina=grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona, DM= fração diclorometano, AE=fração acetato de etila, BU= fração n-butanol , AQ= fração aquosa). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$, # $P < 0.05$ comparados com o grupo salina. *** $P < 0.001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0.05$ comparados com a carragenina. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

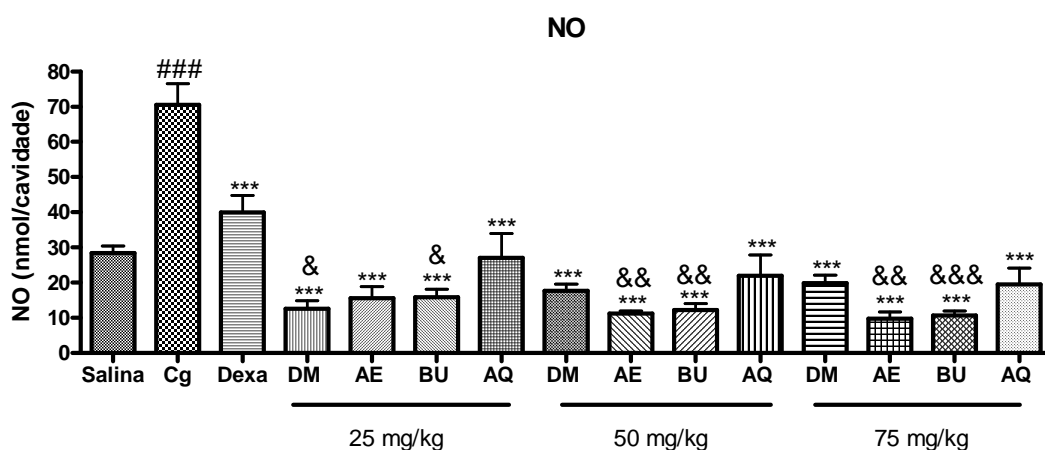


Figura 38. Análise estatística na concentração de NO das frações testadas (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona, DM= fração diclorometano, AE=fração acetato de etila, BU= fração n-butanol , AQ= fração aquosa). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$ comparados com o grupo salina. *** $P < 0,001$ comparados com a carragenina. &&& $P < 0,001$, && $P < 0,01$, & $P < 0,05$ comparados com a dexametasona. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

Segundo os resultados obtidos foram observadas algumas diferenças estatísticas entre algumas doses das frações de *B. trimera* em alguns parâmetros analisados. Estes resultados foram verificados para a análise de ANOVA 1 via (exposto anteriormente) bem como na análise de ANOVA 2 vias. No entanto, estes resultados não são suficientes para nos apontar qual a fração mais ativa para a atividade anti-inflamatória.

4.2. Fração saponinas administrada nas doses de 15, 22,5 e 30 mg/kg, i.p.

As figuras 39 a 42 referem-se ao pré-tratamento com a fração de saponinas, nas doses de 15, 22,5 e 30 mg/kg, i.p, obtida do fracionamento em coluna das frações de acetato de etila + *n*-butanol.

A dose de 30 mg/kg, i.p. da fração saponinas diminuiu significativamente o extravasamento de fluido para cavidade pleural, o número de leucócitos totais, a inibição da migração de polimorfonucleares bem como a concentração de proteínas para o foco inflamatório quando comparada ao grupo carragenina. Esta mesma dose não se diferenciou estatisticamente do grupo dexametasona nem do grupo salina.

A dose de 22,5 mg/kg não apresentou diferença estatística no extravasamento de fluidos para cavidade pleural nem na diminuição da

concentração de proteínas quando comparada ao grupo carragenina. Já para a diminuição do número de leucócitos totais esta dose apresentou diferenças estatísticas quando comparada ao grupo carragenina e ao grupo dexametasona. Para o influxo de polimorfonucleares foi observado que a dose de 25 mg/kg, i.p. se diferenciou estatisticamente dos grupos salina, carragenina e dexametasona.

A dose de 15 mg/kg, i.p. se diferenciou estatisticamente do grupo salina e do grupo carragenina no parâmetro líquido pleural. Em relação aos leucócitos totais, influxo de polimorfonucleares e a concentração de proteínas ela se diferenciou estatisticamente quando comparado ao grupo carragenina.

Para esta amostra (saponinas), no entanto, a única dose que apresentou redução dos níveis de NO quando comparada ao grupo carragenina foi a dose de 30 mg/kg. Esta dose apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo salina, entretanto não apresentou diferença estatística quando comparada ao grupo dexametasona.

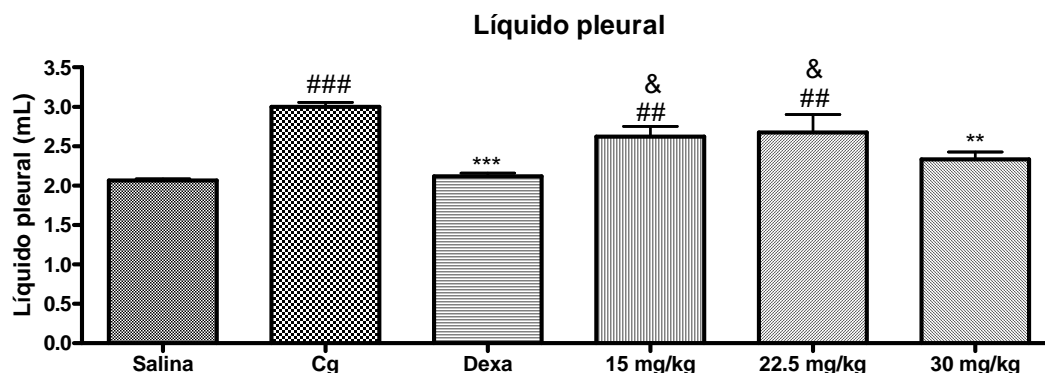


Figura 39. Líquido pleural da fração saponinas (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$, ## $P < 0,01$ comparados com o grupo salina. *** $P < 0.001$, ** $P < 0,01$, comparados com a carragenina. & $P < 0.05$ comparados com a dexametasona. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

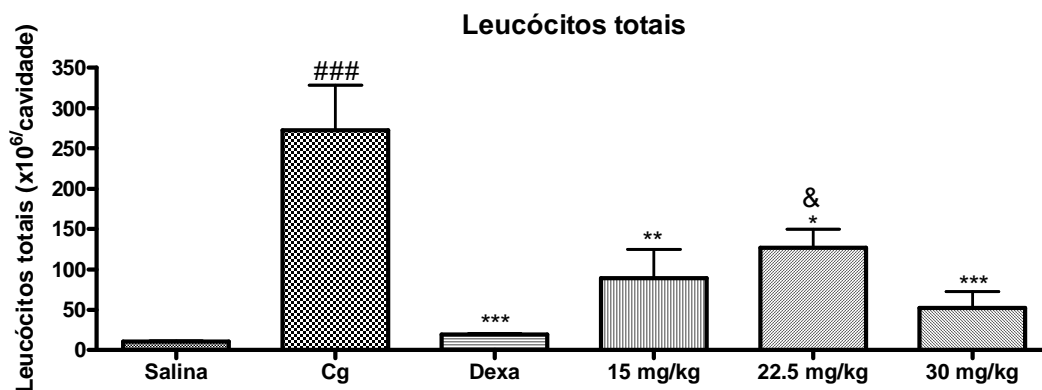


Figura 40. Leucócitos totais da fração saponinas (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$ comparados com o grupo salina *** $P < 0.001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ comparados com a carragenina. & $P < 0.05$ comparados com a dexametasona. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

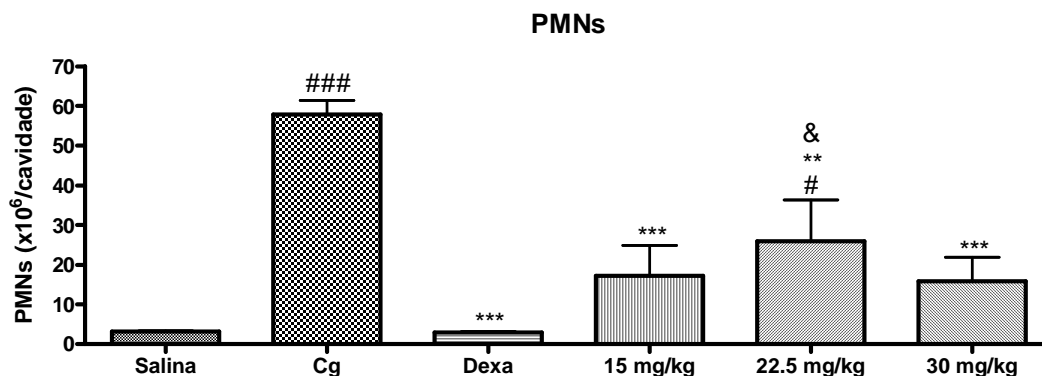


Figura 41. Polimorfonucleares da fração saponinas (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$, # $P < 0,05$ comparados com o grupo salina. *** $P < 0.001$, ** $P < 0,01$, comparados com a carragenina. & $P < 0.05$ comparados com a dexametasona. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

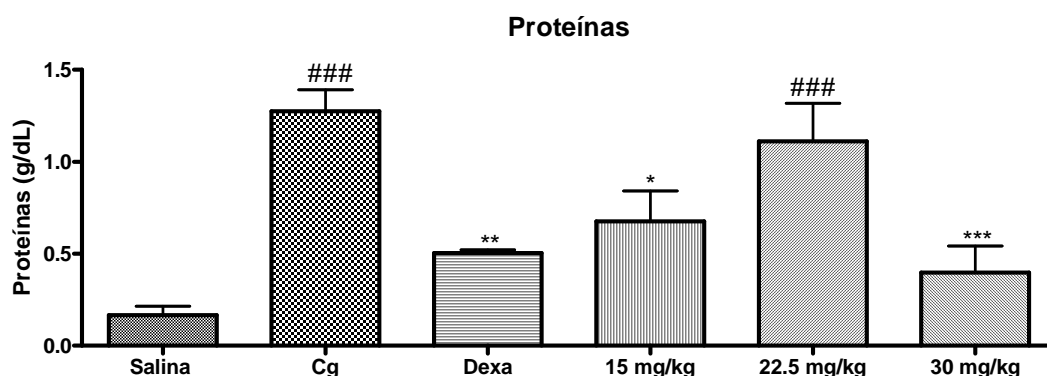


Figura 42. Proteínas totais da fração saponinas (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ;### $P < 0,001$, comparados com o grupo salina. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ comparados com a carragenina. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

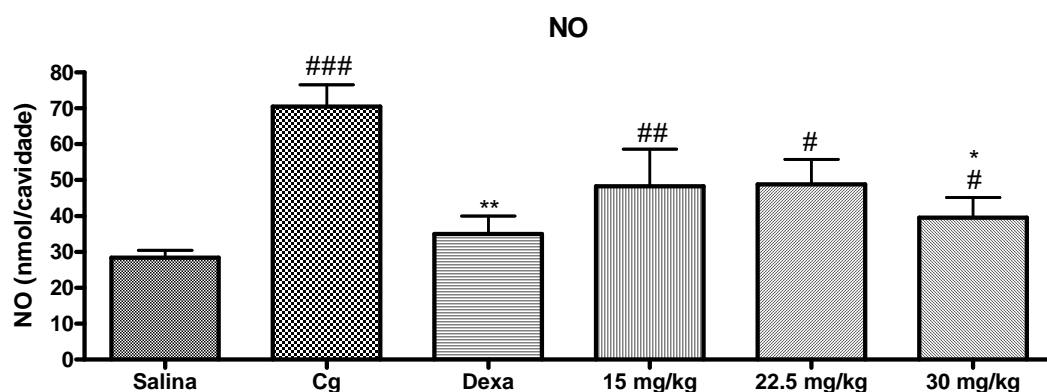


Figura 43. Determinação de NO da fração saponinas (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ;### $P < 0,001$, ## $P < 0,01$, # $P < 0,05$ comparados com o grupo salina ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ comparados com a carragenina. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

4.3. Fração flavonóides administrada nas doses de 5, 10 e 15 mg/kg, i.p.

O pré-tratamento com a fração de flavonóides, na dose de 15 mg/kg, i.p (Figuras 44 a 48), obtida do fracionamento em coluna das frações de acetato de etila + *n*-butanol reduziu significativamente o extravasamento de fluido para a cavidade pleural, o número de leucócitos totais, a concentração de proteínas totais e a migração de polimorfonucleares para o foco inflamatório, quando comparados com o grupo carragenina. Esta dose não demonstrou diferença significativa quando comparada ao grupo salina e ao grupo dexametasona.

A dose de 10 mg/kg, i.p. desta mesma amostra também foi capaz de reduzir significativamente o número de leucócitos totais, a migração de polimorfonucleares e a concentração de proteínas quando comparadas ao grupo carragenina. Quando comparada com o grupo salina, esta dose apresentou diferença estatística no volume de extravasamento de fluido para cavidade pleural, na migração de polimorfonucleares e na concentração de proteínas totais. Em relação ao grupo dexametasona, a dose de 10 mg/kg apresentou diferença estatística no volume de extravasamento de fluido para cavidade pleural e na migração de polimorfonucleares.

A dose de 5 mg/kg, i.p. quando avaliado o volume de líquido pleural demonstrou diferença estatística do grupo salina e do grupo dexametasona, não se diferenciando estatisticamente somente do grupo carragenina. Em relação aos leucócitos totais não apresentou diferenças estatísticas quando comparadas aos grupos salina, carragenina e dexametasona. Já para a migração de polimorfonucleares demonstrou diferença estatística nos grupos salina, carragenina e dexametasona. Enfim, para a concentração de proteínas esta dose apresentou diferença estatística quando comparada ao grupo salina e carragenina.

No entanto, na redução dos níveis de NO todas as doses testadas (5, 10 e 15 mg/kg, i.p.) da fração flavonóides apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao grupo carragenina e não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao grupo salina e ao grupo dexametasona.

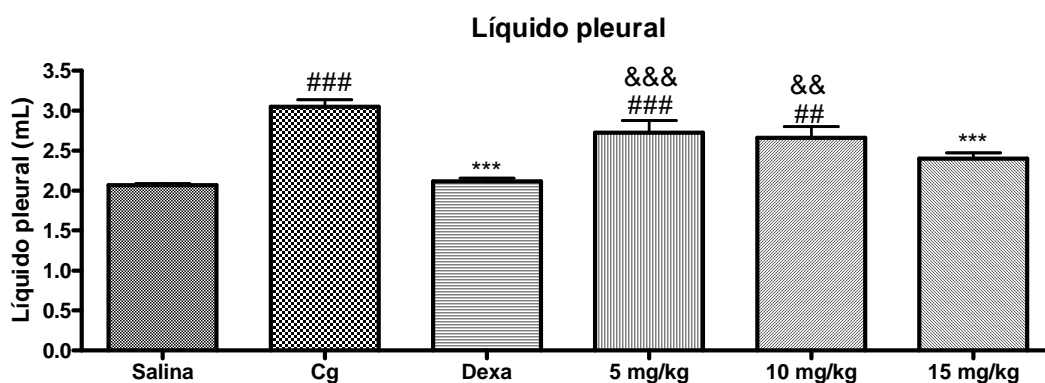


Figura 44. Líquido pleural da fração flavonóides (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexta=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$, ## $P < 0,01$ comparados com o grupo salina. *** $P < 0,001$ comparados com a carragenina. &&& $P < 0,001$, && $P < 0,01$ comparados com a dexametasona. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

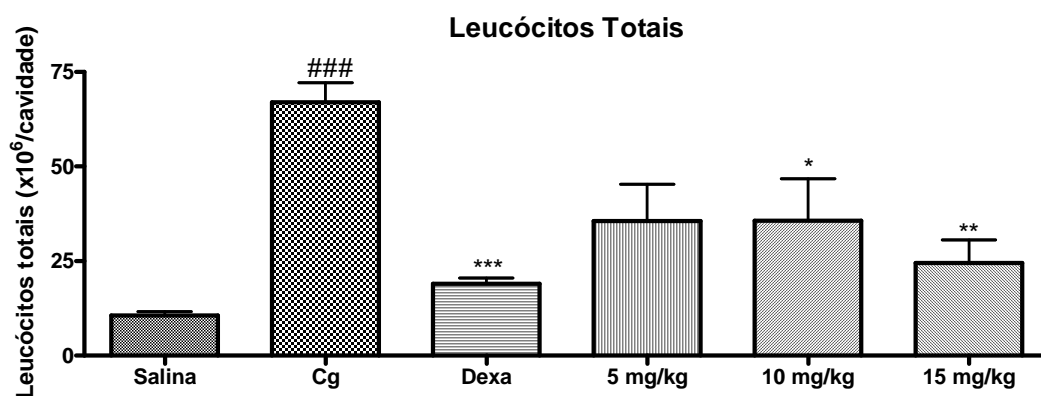


Figura 45. Leucócitos totais da fração flavonóides (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexta=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$ comparados com o grupo salina *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ comparados com a carragenina. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

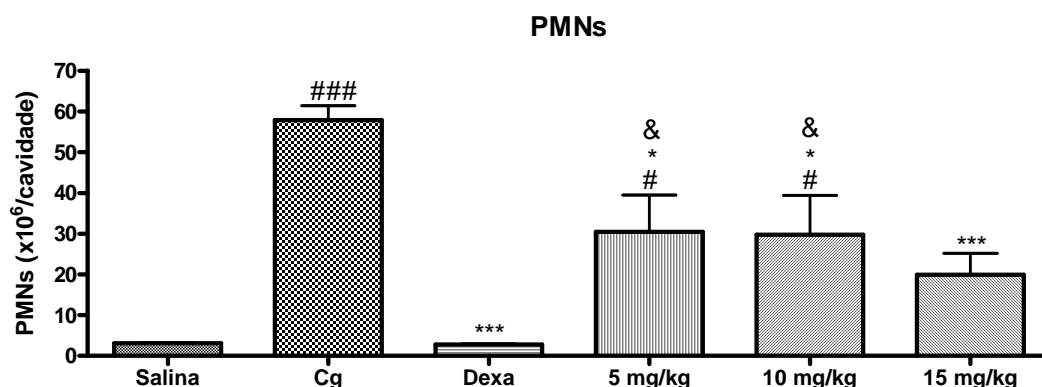


Figura 46. Polimorfonucleares da fração flavonóides (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$, # $P < 0,05$ comparados com o grupo salina. *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$ comparados com a carragenina. & $P < 0,05$ comparados com a dexametasona Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

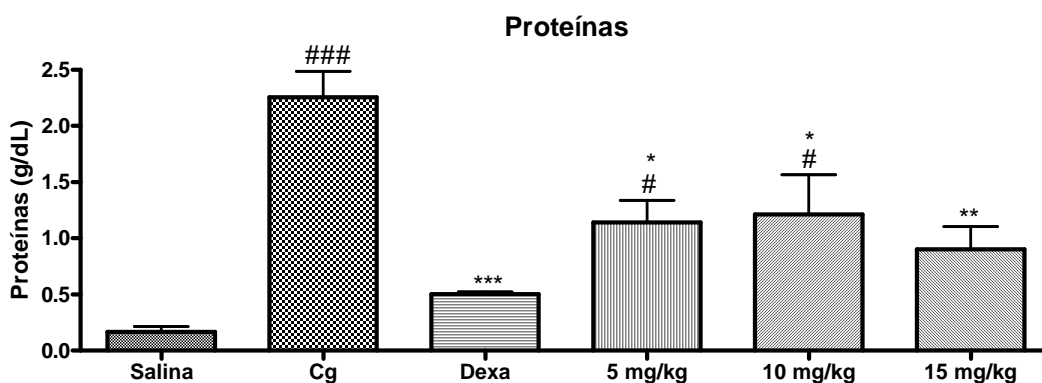


Figura 47 Proteínas totais da fração flavonóides (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ; ### $P < 0,001$, # $P < 0,05$ comparados com o grupo salina. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ comparados com a carragenina. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

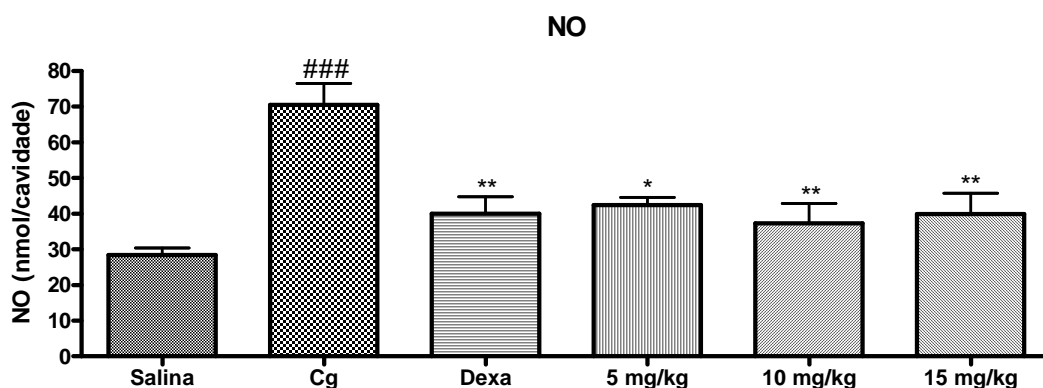


Figura 48 Determinação de NO da fração flavonóides (Salina= grupo salina, Cg=carragenina, Dexa=dexametasona). Diferenças estatísticas determinadas por ANOVA seguido de teste Bonferroni. ;### $P < 0,001$ comparados com o grupo salina. ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$ comparados com a carragenina. Valores são expressos como média \pm desvio padrão. (n= 5 a 7).

Num processo inflamatório agudo, ocorre a rápida infiltração de células, principalmente leucócitos polimorfonucleares, que são essenciais para a defesa e contribuem para a propagação e manutenção do processo inflamatório através de um processo complexo e dinâmico, resultante de diversos mecanismos de ação (RIOJA *et al.*, 2000).

Desta forma, uma resposta inflamatória aguda envolve células como macrófagos e neutrófilos, que secretam mediadores responsáveis pela iniciação, progressão e persistência da inflamação. Entre esses mediadores estão a prostaglandina E2 (PGE2), o óxido nítrico e a histamina.

A PGE2, sintetizada pela ciclooxigenase 2 (COX-2) está envolvida na produção de substâncias quimiotáticas e citocinas pró-inflamatórias. O óxido nítrico, sintetizado pelas óxido nítrico sintases (NOS), é responsável por vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular e formação de edema no local da inflamação (LEITE, *et al*, 2007; BOSCHI *et al.*, 2008). A histamina causa dilatação dos vasos sanguíneos da microcirculação, resultando em ruborização, baixa resistência periférica, e queda da pressão sanguínea sistêmica. Em associação a estes eventos a histamina também é responsável pelo aumento da permeabilidade capilar. Este evento clássico resulta da passagem de proteínas plasmáticas e fluídos pelos

espaços extracelulares, culminando no acúmulo de líquido e formação de edema (GOODMAN & GILLMANN, 2006).

A carragenina é um polissacarídeo amplamente utilizado para indução da reação inflamatória aguda em animais, uma vez que induz a liberação de diversos mediadores inflamatórios, tais como histamina e prostaglandinas. A injeção intrapleural da carragenina no grupo carragenina (pré-tratado com salina i.p.) induziu uma resposta inflamatória aguda caracterizada pelo aumento do volume de exsudato pleural e o número da migração de leucócitos para a cavidade inflamada.

O pré-tratamento dos animais com as frações (diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol, aquosa, saponinas e flavonóides) de *B. trimera* inibiram significativamente a migração celular diminuindo a migração de polimorfonucleares, que são as células aumentadas caracteristicamente na fase aguda da inflamação. Houve também significativa redução sobre a exsudação plasmática avaliada pelo volume de exsudação e concentração protéica do exsudato quando comparados ao grupo carragenina.

Essas frações de *B. trimera* demonstraram atividade anti-inflamatória estatisticamente semelhante a dexametasona.

O NO é uma espécie de radical livre endógeno que é sintetizado pelo L-arginina por óxido nítrico sintase (NOS) em várias células animais e tecidos. Uma pequena quantidade de NO é um importante regulador na homeostase fisiológica, enquanto uma grande quantidade de NO tem sido frequentemente relacionado com fisiopatologias de uma variedade de doenças e inflamação. Após exposição aos indutores, tais como LPS (lipossacarídeo de bactérias gram-negativas) ou carragenina, induz NOS (iNOS) que pode ser induzida em várias células, tais como macrófagos, células de Kupffer, células da musculatura lisa e hepatócitos. Portanto a determinação da produção de NO pode ser um método para se obter os efeitos anti-inflamatórios dos extratos de plantas (TUNG *et al.*, 2008).

As evidências da modulação da cicloxigenase pelo NO na pleurisia induzida por carragenina em ratos é descrita por Di ROSA e colaboradores, em 1996. A COX-2 e a iNOS tem demonstrado ser as isoformas predominantes de suas respectivas enzimas no processo inflamatório agudo (DI PAOLA *et al.*, 2005). A atividade da COX e da NOS atingem seu pico máximo em 6 horas e gradualmente vão reduzindo sua atividade até as 24 horas. Uma grande concentração de PMNs é caracterizado para COX-2, sugerindo que a atividade da COX, no primeiro estágio da resposta

inflamatória (2 h), seja primeiramente devido ao influxo de PMNs. Com o decorrer do tempo (6 h) da inflamação, as células mesoteliais da cavidade pleural e macrófagos também são registrados para COX-2 contribuindo para os elevados níveis da atividade da COX. A diminuição da atividade da NOS e COX nas 24 horas após a indução da carragenina, tem sido atribuídas a sua própria modulação.

Os nossos estudos mostraram que as frações diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol, aquosa (25, 50 e 75 mg/kg) e flavonóides (5, 10 e 15 mg/kg) nas três doses administradas por via i.p. foram capazes de inibir significativamente a produção de NO. Já a fração saponinas diminuiu significativamente a produção de NO apenas na dose de 30 mg/kg, i.p.

A inibição da produção de NO pode aumentar a migração de leucócitos simultaneamente com a produção de fatores quimiotáticos de neutrófilos, promovendo o rolamento e adesão dos neutrófilos para o endotélio além de desempenhar um papel fundamental na indução do processo apoptótico de migração dos neutrófilos (LUNARDELLI et al., 2006).

VARGAS et al. (2007) e MONTANHER et al. (2007) citam que muitos dos efeitos anti-inflamatórios e cardiovasculares, propostos por flavonóides e compostos fenólicos, interferem no metabolismo final do ácido araquidônico, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação de plaquetas, e de ativar sistemas de enzimas, incluindo cicloxigenases e lipoxigenases. Esses efeitos são devido a sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes. Além disso, estudos têm mostrado que os flavonóides aumentam a permeabilidade capilar e exercem um efeito inibitório na exsudação de proteínas e migração de leucócitos (SILVA et al., 2002).

MASCOLO et al (1988) verificaram que em animais tratados com quercetina houve a redução da formação de LTB₄ e PGE₂, no exsudato pleural, quando induzido por carragenina.

Em estudos sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos, as saponinas isoladas de extratos de plantas demonstraram capacidade de interferir nos mecanismos responsáveis pela locomoção de leucócitos (PRESIBELLA et al., 2003).

Os resultados do presente estudo estabeleceram que todas as seis frações (diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol, aquosa, saponinas e flavonóides) de *B. trimera* demonstraram uma potente atividade anti-inflamatória em modelo experimental *in vivo* e que quando comparadas, as frações diclorometano, acetato

de etila, n-butanol e aquosa, não se diferenciam estatisticamente entre si, portanto a atividade anti-inflamatória de *B. trimera* não depende unicamente da presença dos flavonóides, dependem também da presença das saponinas e de outros possíveis compostos ainda não identificados e/ou da ação de todos eles atuando conjuntamente.

CONCLUSÕES FINAIS

Conclusões Finais

A extração das partes aéreas de *B. trimera* em soxhlet forneceu quatro frações: a fração diclorometano, a fração acetato de etila, a fração *n*-butanol e a fração aquosa. A fração diclorometano e a fração aquosa tiveram os maiores rendimentos: 10% e 13%, respectivamente. O rendimento das frações saponinas e flavonóides obtidos através do fracionamento em coluna de exclusão molecular, a partir das frações acetato de etila e *n*-butanol, foi de 63% e 19%, respectivamente.

A comparação cromatográfica por CCD entre as frações acetato de etila, *n*-butanol e aquosa com o extrato bruto hidroetanólico demonstrou a presença abundante de substâncias com coloração rosa e azulada, típica de terpenóides, frente ao revelador anisaldeído sulfúrico. Também se observou em menor proporção, a presença de compostos flavonoídicos caracterizados pela coloração amarela frente ao reagente natural.

Sendo assim, o extrato bruto hidroetanólico e as diferentes frações de *B. trimera* apontaram diferenças qualitativas quanto ao perfil de substâncias, sugerindo a existência de uma diversidade estrutural entre eles que pode servir como elemento importante na descoberta e isolamento de novas substâncias.

Em relação à determinação de fenóis totais pelo método de Folin Ciocalteu, na forma de equivalente de ácido gálico (EAG), para as frações analisadas (DM, AE, BU, AQ, SAP e FLA), a fração de flavonóides apresentou o maior teor de fenóis totais (1606,44 EAG/ g), seguida da fração acetato de etila (1292,18 EAG/ g). A fração *n*-butanol registrou o menor teor (48,60 EAG/ g).

A determinação de fenólicos foi realizada também através da determinação de fenóis por catequina e pela precipitação com proteínas. O teor de compostos fenólicos nos três ensaios realizados mostrou que a fração flavonóides apresenta os maiores teores de fenóis totais quando comparados ao extrato bruto hidroetanólico e as demais frações de *B. trimera*.

A atividade antioxidante foi avaliada através do consumo de DPPH*. Dentre os resultados obtidos, podemos destacar que as CE₅₀ das frações de flavonóides (7,75 µg/mL), acetato de etila (11,07 µg/mL) e acetato de etila + *n*-butanol (29,89 µg/mL) apresentaram uma atividade antioxidante similar às substâncias de referência quercetina (11,07 µg/mL) e luteolina (10,27 µg/mL). Esse comportamento

não foi observado para a fração de saponinas (87,30 µg/mL), n-butanol (84,67 µg/mL) e diclorometano (81,51 µg/mL) que tiveram comportamento semelhante.

Sendo assim, as frações de flavonóides e acetato de etila de *B. trimera* apresentaram excelente potencial antioxidante, equiparando-se às substâncias de referência: ácido ascórbico, quercetina e luteolina. Baseado no mecanismo de redução da molécula de DPPH[•] e no conhecimento prévio da composição química desta espécie vegetal é possível inferir que a ação antioxidante destas frações deve-se à presença de substâncias com grupamentos hidroxila disponíveis, tais como os flavonóides.

A atividade anti-inflamatória das frações (diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol, e aquosa nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg, i.p.; saponinas nas doses de 15, 22,5 e 30 mg/kg, i.p. e flavonóides nas doses de 5, 10 e 15 mg/kg, i.p.) de *B. trimera* foi avaliada através do modelo de inflamação aguda da pleurisia induzida por carragenina, em ratos. Todas as frações de *B. trimera* apresentaram potente atividade anti-inflamatória nos parâmetros volume de exsudato, contagem de leucócitos totais, diferencial citológico e concentração protéica quando comparadas aos grupos: salina, carragenina e dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.).

Em relação a determinação de NO nossos estudos mostraram que as frações diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol, aquosa e flavonóides nas três doses administradas por via i.p. foram capazes de inibir significativamente a produção de NO. Já a fração saponinas diminuiu significativamente a produção de NO somente na dose de 30 mg/kg, i.p.

A atividade anti-inflamatória das frações de *B. trimera* parece estar associada não só a presença de flavonóides mas também pela presença de outros compostos como os terpenóides.

A fração de flavonóides parece ser a fração mais ativa uma vez que apresentou atividade anti-inflamatória semelhante a dexametasona nos parâmetros analisados na menor dose avaliada (15 mg/kg, i.p.) quando comparada as demais frações.

A potencial atividade antioxidante e anti-inflamatória apresentada pelas frações de *B. trimera* nos estimula e nos demonstra o quão promissor é o aprofundamento do estudo de sua atividade biológica visando a obtenção de novos fármacos.

REFERÊNCIAS

Referências

ABAD M.J. and BERMEJO M. *Baccharis* (Compositae): a review update, **Arkivoc** 76-96, 2007.

ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Ministério da Saúde, Brazil. www.anvisa.gov.br (Accessed Dec. 2008).

BETONI, J.E.C., MANTOVANI, R.P., BARBOSA, L.N., STASI L.C.D. AND FERNANDES Jr. A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **101**, n. 4, p. 387-390, 2006.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F.; **J. Agric. Food Chem.**, v. **52**, p. 5195, 2004.

BORELLA, J.C., DUARTE, D.P., NOVARETTI, A.A.G., MENEZES JR., A., FRANÇA, S.C., RUFATO, C.B., SANTOS, P.A.S., VENEZIANI R.C.S. and LOPES N.P. Seasonal variability in the content of saponins from *Baccharis trimera* (Less.) DC (carqueja) and isolation of flavone. **Brazilian Journal of Pharmacognosy [on line]**, v. **16** n. 4, p. 557-561, 2006.

BOSCHI, E.S., LEITE, C.E., SACIURA, V.C., CABERLON, E., LUNARDELLI, A., BITENCOURT, S., MELO, D.A.S., OLIVEIRA, J.R. Anti-inflammatory Effects of Low-Level Laser Therapy (660 nm) in the Early Phase in Carrageenan-Induced Pleurisy un Rat. **Laser in Surgery and Medicine**, v. **9999**, pg. 1-9, 2008.

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

CCAC. **Canadian Council on Animal Care**. 2003. Disponível em: http://www.ccac.ca/en/Current/PDFs/Guidelines_euthanasia_2drft_July07_en.pdf. Acesso em: agosto de 2007.

CFMV. **Conselho Federal de Medicinal Veterinária**. Resolução n.º 714, de 20/06/2002.

CHAN, E.W.C., LIM, Y.Y., CHEW, Y.L. Antioxidant activity of *Camelia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. **Food Chemistry**, v. **102**, p. 1214-1222, 2007.

DI PAOLA, R., MAZZON, E., MUIÀ, C., GENOVESE, T., MENEGAZZI, M., ZAFFINI, R., SUZUKI, H. and CUZZOCREA, S. Green tea polyphenol extract attenuates lung injury in experimental model of carrageenan-induced pleurisy in mice. **Respiratory Research**, v. **6**, p. 66, 2005.

DI ROSA, M., LALENTI, A., LANARO, A. SAUTEBIN, L. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. **54**, n. 4, p. 229-238, 1996

ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetables oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. **48**, p. 648-656, 2000.

FARMACOPÉIA Brasileira, 4rd Ed.; Atheneu: São Paulo, 2004.

GENÉ, R.M., MARIN E. and ADZET T. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*, **Planta Medica**, v. **58**, p. 565-566, 1992.

Gené, R.M., Cartañá, C., Adzet, T., Marin, E., Parella T. and Cañigueral S. Antiinflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of active constituents, **Planta Medica**, v. **62**, p. 232-335, 1996

GOODMAN, A. G. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed. New York: McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 2021 p., 2006

GOLDIM, J.R. **Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995.

GONZALES E., IGLESIAS I., CARRETERO E., VILLAR A. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. **J. Ethnopharmacology**, v. **70**, p. 329-333, 2000.

HABASHY, R.R., ABDEL-NAIM, A. B., KHALIFA, A. E., AL-AZIZI, M. Anti-inflammatory effects of jojoba liquid wax in experimental models. **Pharmacological Research**, v. **51**, p. 95-105, 2005

HAGERMAN and BUTLER, **J. Agric. Food Chem.**, vol. **26**, p. 809-812, 1978.

HAWKINS, C., HANKS, G.W. The gastrudiodenal toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A review of the literature. **J. Pain Sympt. Managem.**, v. **20**, n. 2, 2000.

HERZ, W., PILOTTI, A., SÖDERHOLM, A.C., SHUHAMA I.K. and VICHNEWSKI W. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*, **Journal of Organic Chemistry**, v. **50**, p. 3913-3916, 1977.

HOUGHTON, P. J., HOWES, M. J., LEE, C.C., STEVENTON, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. **110**, p. 391-400, 2007.

LAROCHE, M. J.; ROUSSELET, F. **Les animaux de laboratoire – Éthique et bonnes pratiques**. Masson, Paris., p.94,1990.

LEITE, C.E., LUNARDELLI, A., CASTAMAN, T.A., PAUL E.L. AND OLIVEIRA J.R. Extrato aquoso de *Baccharis trimera* (Asteraceae) diminui a inflamação e o dano celular em pleurisia induzida por veneno de *Dirphia sp.* (Saturniidae), **Revista Brasileira de Análises Clínicas [on line]**, v. **39**,n. 1, p. 29-32, 2007

LUNARDELLI, A.; LEITE, C. E.; PIRES, M. G. S.; OLIVEIRA, J. R. Extract of the bristles of *Dirphia* sp. Increases nitric oxide in a rat pleurisy model. **Inflammation Research**, v. **55**, p. 129-135, 2006.

MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA Jr., V.F., GRYNBERG, N.F. & ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. **25**, p. 429-438, 2002

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research**, v. **15**, p. 127-130, 2001.

MONTANHER, A.B., ZUCOLOTO, S.M., SCHENKEL, E.P.,FRÖDE, T.S. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. **109**, p. 281-288, 2007

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

OLIVEIRA, S.Q. de, DAL-PIZZOL, F., MOREIRA, J.C.F., SCHENKEL E.P. and GOSMANN G. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*, **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. **23**, n. 3, p. 365-368, 2004

OLIVEIRA, S.Q. de, TRENTIN, V.H., KAPPEL, V.D., BARELLI, C., GOSMANN G. and REGINATTO F.H. Screening of antibacterial activity of south Brazilian *Baccharis* species, **Pharmaceutical Biology**, v. **43**, n. 5, p. 434-438, 2005.

PARK, B.K., HEO, M.Y., PARK, H., KIM, H. P. Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 expression and skin inflammation in mice by wogonin, a plant flavone from *Scutellaria radix*. **Eur. J. Pharmacol.**, v.**425**, p. 153-157, 2001

RIOJA, I., UBEDA, A., TERCENIO, M. C., GUILLÉN, I., RIGUERA, R., QUINTELA, J. M., PEINADOR, C., GONZÁLEZ, L. M., ALCARAZ, M. J. An anti-inflammatory ditiriazine inhibiting leucocyte functions and expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2. **Eur. J. Pharmacol.**, v. **397**, p.207-217, 2000.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. **92**, p. 235-254, 2005.

SAITO, S.T. Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de chá-verde brasileiro (*Camelia sinensis* var *assamica*) cultivar IAC-259, Dissertação de mestrado. Porto alegre, UFRGS, 116 p., 2007.

SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI J. A., SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. **76**, p. 270-276, 1998.

SEDDON, T.J. AND DOWNEY, M.O.. Comparison of analytical methods for the determination of condensed tannins in grape skin. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, v. 14, p. 54-61, 2008

SILVA, R.R. da, OLIVEIRA, T.T. de, NAGEM, T.J., LEÃO, M. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. Revisão. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 35, p.127-133, 2002.

SOICKE H. and LENG-PESCHLOW E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties, *Planta Medica*, v. 53, p. 37-39, 1987

SOUZA, K.C.B. de. Avaliação biológica de preparações obtidas a partir das inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. (Marcela). Tese de doutorado. Porto Alegre: UFRGS, 254p., 2002.

STAHL, E. Thin-Layer Chromatography A Laboratory Handbook. 2th ed. New York Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1041 p., 1969.

SUYENAGA, E. S. Avaliação da atividade anti-inflamatória de flavonóides por ensaios *in vivo* e *in vitro*, Tese doutorado. Porto Alegre, UFRGS, 230 p.,2002

TORRES, L.M.B., GAMBERNI, M.T., ROQUE, N.F., LANDMAN, M.T.L., SOUCCAR C. and LAPA A.J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle, *Phytochemistry*, v. 55, p. 617-619, 2000.

TREVISAN, M.T.S., SILVA, M.G.V., PFUNDSTEIN, B., SPIEGELHALDER, B., OWEN, R.W. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 4378-4382, 2006.

TUNG, Y.T., CHUA, M.T., WANG, S.Y.,CHANG, S.T. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomun osmophloeum*) twigs. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 3908-3913, 2008.

VARGAS, A.J., GEREMIAS, D.S., PROVENSÍ, G., FORNARI, P.E., REGINATTO, F.H., GOSMANN, G., SCHENKEL, E.P., FRÖDE, T.S. *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy. *Fitoterapia*, v. 78, p. 112-119, 2007.

VEIGA Jr., V.F., PINTO, A.C. & MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v. 28, p. 519-528, 2005.

VERDI, L.G., BRIGHENTE I.M.C. and PIZZOLATTI M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos, *Química Nova [on line]*, v. 28, n.1 p. 85-94, 2005.