

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
JULIANA SILVEIRA DE PAIVA

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E FARMACOLÓGICO
COMPARATIVO ENTRE ESPÉCIES CONHECIDAS COMO
ALECRIM

Mogi das Cruzes SP
2006

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
JULIANA SILVEIRA DE PAIVA

ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E FARMACOLÓGICO
COMPARATIVO ENTRE ESPÉCIES CONHECIDAS COMO
ALECRIM

Dissertação de Mestrado submetida à
banca examinadora para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a Dr^a. Nilsa Sumie Yamashita Wadt

Mogi das Cruzes SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Paiva, Juliana Silveira de

Estudo farmacognóstico e farmacológico comparativo entre espécies conhecidas como alecrim / Juliana Silveira de Paiva. – 2007.

93 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, 2006.

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador: Prof. Dr^a. Nilsa Sumie Yamashita Wadt

1. Alecrim - Farmacognosia 2. Farmacologia – Plantas medicinais I. Título II. Wadt, Nilsa Sumie Yamashita

CDD 615.312

ATAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia vinte de dezembro de dois mil e seis, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Estudo farmacognóstico e farmacológico comparativo entre as espécies conhecidas como Alecrim" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Juliana Silveira de Paiva**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 48 (quarenta e oito), a saber: 24 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Nilsa Sumie Yamashita Wadt e Elisa Espósito da Universidade de Mogi das Cruzes e Joana D'Arc do Instituto Biológico, sob a presidência do primeiro, como orientador da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou a candidata. Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

Aprovado por unanimidade
(aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/majoria)

Mogi das Cruzes, 20 de dezembro de 2006

Comissão Examinadora

Julgamento

Nilsa Sumie Yamashita Wadt
Prof.^a Dr.^a Nilsa Sumie Yamashita Wadt

aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))

Elisa Espósito
Prof.^a Dr.^a Elisa Espósito

APROVADA
(aprovado(a)/reprovado(a))

Joana D'Arc Felício de Souza
Prof.^a Dr.^a Joana D'Arc Felício de Souza

Aprovado
(aprovado(a)/reprovado(a))

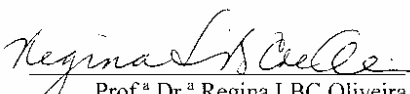
ADENDO

ADENDO À ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Às quatorze horas do dia vinte de dezembro de dois mil e seis, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Estudo farmacognóstico e farmacológico comparativo entre as espécies conhecidas como Alecrim" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Juliana Silveira de Paiva**.

Em adendo, o número de créditos alcançados pela mesma é o total de 52 (cinquenta e dois), a saber: 28 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação.

Mogi das Cruzes, 20 de dezembro de 2006


Prof.^a Dr.^a Regina LBC Oliveira
Gestora da Pós-Graduação em Biotecnologia

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Irineu e Elza, pelo constante esforço e dedicação, sempre me auxiliando e me direcionando ao melhor caminho e a todas as pessoas que de alguma forma tenham contribuído para meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela luz que sempre me conduziu por todo caminho e que possibilitou a finalização deste trabalho.

Aos meus pais, Elza e Irineu, pelo amor, estímulo e apoio ao longo de toda a minha vida.

Ao meu namorado Danilo pelo amor e paciência nos momentos de nervosismo.

À minha irmã, Fabiana, e ao meu cunhado Jefftty pela torcida e ajuda.

À minha avó Zazá que esteve sempre rezando por mim.

À minha orientadora Prof. Dra. Nilsa S. Yamashita Wadt pela paciência, confiança, pelo constante apoio e dedicação durante todo o transcorrer do mestrado.

À Prof. Dra. Sônia Gil, pelo grande incentivo no ingresso ao Mestrado.

À Maria Carolina Pimentel pela amizade, paciência e auxílio na execução deste trabalho.

Ao amigo paciente Adriano Luís pelo fornecimento dos exemplares do alecrim-do-campo.

À Prof. Ingrid, Prof. Dr. Tiago Rodrigues e à aluna Natalia Guimarães pela ajuda imprescindível na realização de algumas etapas do projeto.

Ao Prof. Msc. Marcelo Pena pelo auxílio na análise dos óleos essenciais.

À Virgínia del Carmem Oliveira, da Fundação Ezequiel Dias, pela enorme contribuição ao levantamento bibliográfico do alecrim-do-campo.

Aos Prof. Msc., e amigos, Tiago Martinello e Guilherme Matsutani,

À Prof. Dra. Regina Oliveira pelo apoio durante todo o curso.

“A todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste projeto...”

“A vida não é uma pergunta a ser respondida.
É um mistério a ser vivido...”

Buda

PAIVA, J. S. de. **Estudo farmacognóstico e farmacológico comparativo de espécies conhecidas popularmente como Alecrim.** Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2006. 93p.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar fitoquimicamente e farmacologicamente, analisando-se a atividade antimicrobiana e antioxidante, assim como a toxicidade aguda, de duas plantas, o *Rosmarinus officinalis* L. e a *Baccharis dracunculifolia* DC., conhecidas popularmente como alecrim. Desenvolveu-se e avaliou-se também a estabilidade de formulações de gel-creme, para uso oral, contendo extrato e óleo essencial, em diferentes concentrações, das espécies citadas acima. Metodologia: Exemplares das plantas foram submetidos à secagem e analisados fitoquimicamente através de reações colorimétricas e de precipitação, sendo, em seguida, empregados no preparo de extratos glicólicos utilizando-se o método de percolação fracionada, tendo o propilenoglicol 70% como líquido extrator. O óleo essencial foi extraído da planta fresca através de arraste por vapor d'água (Clevenger) e analisado quanto a sua composição química por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas. O ensaio de atividade antimicrobiana empregou método fotométrico, onde avaliou-se a turvação dos meios após tempo de contato da amostra (extratos a 5 e 10% e óleo essencial a 0,5 e 1%) com o microrganismo, seguido de plaqueamento de 1mL desta solução para contagem de unidades formadoras de colônias. Os microrganismos testados foram *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* por serem estes significantes em patologias bucais. Determinou-se a ação antioxidante dos extratos a 0,1% através da inibição da lipoperoxidação da membrana mitocondrial. No ensaio de toxicidade aguda acompanhou-se, durante 14 dias consecutivos, fatores como comportamento, consumo de água e alimento, assim como peso corpóreo, de grupos de camundongos submetidos à administração de uma dose única dos extratos a 5, 10 e 20%. Realizou-se também o desenvolvimento de formulação de gel-creme, à qual incorporou-se concentrações de 5 e 10% de extrato glicólico e 0,5 e 1% de óleo essencial, separadamente, sendo as mesmas submetidas a estudo de estabilidade acelerado, avaliando-se características organolépticas, pH, viscosidade e separação de fases durante um período de três meses. Resultados e Discussões: ambas as espécies estudadas apresentaram compostos da classe dos taninos, flavonóides e óleo essencial. Com relação à composição química do óleo essencial, o *Rosmarinus officinalis* L., mostrou como componente majoritário a cânfora, já a *Baccharis dracunculifolia* DC., a principal substância presente foi o e-nerolidol. Pôde-se observar uma propriedade antimicrobiana mais elevada para a *Baccharis*, pois todas as concentrações testadas, tanto de óleo essencial como de extrato, atingiram resultados significativos, frente aos três microrganismos avaliados. A ação antioxidante das duas plantas foi semelhante, já que a absorvância média para a *B. dracunculifolia* DC. e para o *R. officinalis* L., foi igual a 0,165 e 0,164, respectivamente, sendo as mesmas praticamente iguais ao controle negativo, demonstrando, desta forma, uma atividade antioxidante extremamente significativa. Quanto à toxicidade aguda, nenhuma das amostras apresentou alterações significantes. O mesmo ocorreu no teste de

estabilidade acelerado, mostrando que todas as formulações mantiveram-se estáveis pelo período de três meses.

Palavra-chave: Alecrim. *Rosmarinus officinalis* L.. *Baccharis dracunculifolia* DC.

PAIVA, J. S. de. **Estudo farmacognóstico e farmacológico comparativo de espécies conhecidas popularmente como Alecrim.** Dissertação de Mestrado em Biotecnologia, Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2006. 93p.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate phytochemically and pharmacologically, analyzing the antimicrobial and antioxidant activity, as well as the acute toxicity of two plants, *the Rosmarinus officinalis* L. and *the Baccharis dracunculifolia* DC., popular known as rosemary. It was also developed and evaluated the two above mentioned species' stability of gel-cream formulas, for application in oral mucosis, containing extract and essential oil, in different concentration. Methodology: Plants samples were subject to drying and were phytochemically analyzed through colorimetric and precipitation reactions and then being used to prepare glycolic extracts, utilizing the fractionated percolation method, having the propylene glycol 70% as the extractor liquid. The essential oil was extracted from the fresh plant, using the Clevenger method and analyzed by its chemical composition through the gas chromatography in connection with spectrophotometry of masses. The analysis of antimicrobial activity used photometric method, in which it was evaluated the turvation after sample's (extracts at 5 and 10% and essential oil at 0.5 and 1%.) contact with the microorganism, followed by the pour plate technique of one ml of this solution for counting the units which create the colonies. The microorganisms tested were the *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and the *Streptococcus mutans* to their significance in oral pathology. It was determined the antioxidant activity of the extracts at 0.1%, through the inhibition of the membrane mitochondrial lipoperoxidation. In the analysis of the cute toxicity, it was observed, during 14 consecutive days, factors such as behavior, water and food intake, as well as corporal weight of mice groups, subjects to the administration of only one dose of extract at 5, 10 and 20%. A gel-cream was formulated, in which was incorporated concentrations of 5 and 10% glycolic extract and 0.5 and 1% of essential oil, separately, being the above mentioned concentrations subject to a study of the accelerated stability, evaluation its organoleptics, pH, viscosity and separation of phases during a period of three months. Results and discussions: both the species studied presented compositions of tannins class, flavonoids and essential oil. In regards to the chemical composition of the essential oil, *Rosmarinus officinalis* L., showed as a major component can, as *Bacchus dracunculifolia* DC., the main substance present was e-nerolidol. A higher antimicrobial property can be observed for *Baccharis*, as for all the tested concentrations including the essential oil as an extract, reached significant results compared with the three evaluated microorganisms. The antioxidant action of the two plants was similar as an average absorption for a *B. dracunculifolia* DC. and for *R. officinalis* L., were equal at .165 and .164, respectively, being practically equals control negative, demonstrating in this way an extreme significance in antioxidant activity. In regards to the acute toxicity, none of the samples presented alterations. The same occurred in the test of accelerated stability, showing that all the formulas maintained stable for a period of three months.

Palavra-chave: Rosemary. *Rosmarinus officinalis* L.. *Baccharis dracunculifolia* DC.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Tabela 1 | Componentes da formulação creme lanette® e gel de carbopol 940®..... | 48 |
| Tabela 2 | Análise farmacognóstica de taninos nas drogas vegetais <i>R. officinalis</i> L. e <i>B. dracunculifolia</i> DC. | 53 |
| Tabela 3 | Análise farmacognóstica de flavonóides nas drogas vegetais <i>R. officinalis</i> L. e <i>B. dracunculifolia</i> DC. | 54 |
| Tabela 4 | Análise farmacognóstica de óleo essencial nas drogas vegetais <i>R. officinalis</i> L. e <i>B. dracunculifolia</i> DC. | 54 |
| Tabela 5 | Perfil fitoquímico do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L. e <i>B. dracunculifolia</i> DC. obtido por Cromatografia Gasosa. | 57 |
| Tabela 6 | Absorbância e contagem média (UFC / mL) de diferentes concentrações de extrato e óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. e <i>B. dracunculifolia</i> DC. frente à bactéria <i>S. aureus</i> | 62 |
| Tabela 7 | Absorbância e contagem UFC / mL de diferentes concentrações de extrato e óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. e <i>B. dracunculifolia</i> DC. frente à bactéria <i>S. mutans</i> | 63 |
| Tabela 8 | Absorbância e contagem UFC / mL de diferentes concentrações de extrato e óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. e <i>B. dracunculifolia</i> DC. frente ao fungo <i>Candida albicans</i> | 63 |
| Tabela 9 | Variação de peso médio dos animais machos durante o período de 14 dias consecutivos. | 67 |
| Tabela 10 | Variação de peso médio dos animais fêmeas durante o período de 14 dias consecutivos. | 67 |
| Tabela 11 | Variação média do consumo de água e alimento dos diferentes grupos empregados no estudo de Toxicidade Aguda. | 68 |
| Tabela 12 | Análise da variação de pH das amostras de gel-creme acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias..... | 70 |
| Tabela 13 | Análise da variação de pH das amostras de gel-creme contendo extrato e óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L., em diferentes | |

| | | |
|------------------|--|----|
| | concentrações, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias..... | 71 |
| Tabela 14 | Análise da variação de pH das amostras de gel-creme contendo extrato e óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC., em diferentes concentrações, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias..... | 73 |
| Tabela 15 | Características organolépticas das amostras-padrão de gel-creme (GC) contendo diferentes concentrações de extratos e óleos essenciais (OE) do <i>R. officinalis</i> L. e da <i>B. dracunculifolia</i> DC. | 75 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Planta <i>Rosmarinus officinalis</i> L..... | 22 |
| Figura 2 | Ácido rosmarínico..... | 26 |
| Figura 3 | Carnosol..... | 26 |
| Figura 4 | Ácido carnósico..... | 26 |
| Figura 5 | Planta <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC..... | 32 |
| Figura 6 | Cromatograma do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. obtido por Cromatografia Gasosa..... | 59 |
| Figura 7 | Cromatograma do óleo essencial de <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC. obtido por Cromatografia Gasosa..... | 59 |
| Figura 8 | Atividade antioxidante dos extratos de <i>R. officinalis</i> L. e <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC., onde (-) suspensão mitocondrial; (+) suspensão mitocondrial + Fe ⁺² / citrato; ER 0,1% - extrato <i>R. officinalis</i> L. 0,1% + suspensão mitocondrial + Fe ⁺² / citrato; EB 0,1% - extrato <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC. 0,1% + suspensão mitocondrial + Fe ⁺² / citrato..... | 65 |
| Figura 9 | Variação de pH das amostras de gel-creme acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias..... | 71 |
| Figura 10 | Variação de pH das amostras de gel-creme contendo extrato de <i>R. officinalis</i> L. a 5 e 10%, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias..... | 72 |
| Figura 11 | Variação de pH das amostras de gel-creme contendo óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L. a 5 e 10%, acondicionadas em | |

| | | |
|------------------|--|----|
| | temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias..... | 72 |
| Figura 12 | Varição de pH das amostras de gel-creme contendo extrato de <i>B. dracunculifolia</i> DC. a 5 e 10%, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias..... | 74 |
| Figura 13 | Varição de pH das amostras de gel-creme contendo óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> DC. a 0,5 e 1%, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias..... | 74 |
| Figura 14 | Varição de viscosidade das amostras de gel-creme acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias..... | 77 |
| Figura 15 | Varição de viscosidade das amostras de gel-creme com extrato de <i>B. dracunculifolia</i> DC., 5 e 10%, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias..... | 77 |
| Figura 16 | Varição de viscosidade das amostras de gel-creme com extrato de <i>R. officinalis</i> L., 5 e 10%, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias..... | 78 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|--|
| ATTC | American Type Culture Collection |
| <i>B. dracunculifolia</i> DC. | <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC. |
| BAD | Agar Batata Dextrose |
| BHA | Butilhidróxianisol |
| BHT | Butilhidróxitolueno |
| <i>C. albicans</i> | <i>Candida albicans</i> |
| CG | Cromatografia gasosa |
| CG/EM | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| DPPH | 2, 2-difenil-2-picrilhidracil hidrato |
| FIOCRUZ | Fundação Oswaldo Cruz |
| GTF | Glucosiltransferase |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| MDA | Malondialdeído |

| | |
|--------------------------|--|
| OE | Óleo essencial |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| <i>R. officinalis</i> L. | <i>Rosmarinus officinalis</i> L. |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>S. mutans</i> | <i>Streptococcus mutans</i> |
| SF | Solução fisiológica |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TSA | Agar Triptona Soja |
| TSB | Caldo Triptona Soja |
| UFC / mL | Unidades formadoras de colônias por mL |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1. Histórico das plantas medicinais | 16 |
| 1.2. Toxicidade | 17 |
| 1.3. Importância dos novos compostos antioxidantes e antimicrobianos | 19 |
| 1.4. Microbiota oral | 20 |
| 1.5. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | 22 |
| 1.5.1. Caracteres macroscópicos e microscópicos | 23 |
| 1.5.2. Constituição química e propriedades gerais | 23 |
| 1.5.3. Indicações, formas de administração e posologia | 30 |
| 1.5.4. Efeitos adversos e toxicidade | 31 |
| 1.6. <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC. | 32 |

| | |
|--|-----------|
| 1.6.1. Caracteres macroscópicos e microscópicos..... | 33 |
| 1.6.2. Constituição química e propriedades gerais..... | 34 |
| 1.7. Gel-creme e estudo de estabilidade..... | 35 |
| 2. OBJETIVO..... | 37 |
| 3. MÉTODO..... | 38 |
| 3.1. Coleta e processamento das plantas (<i>R. officinalis</i> L. e <i>B. dracunculifolia</i> DC.)..... | 38 |
| 3.2. Análise dos metabólitos secundários das drogas vegetais..... | 38 |
| 3.2.1. Taninos..... | 38 |
| 3.2.2. Flavonóides..... | 39 |
| 3.2.3. Saponinas..... | 40 |
| 3.2.4. Alcalóides..... | 40 |
| 3.2.5. Antraquinonas..... | 41 |
| 3.2.6. Cardiotônicos..... | 41 |
| 3.2.7. Óleos essenciais..... | 43 |
| 3.3. Preparo dos extratos fluídos..... | 43 |
| 3.4. Obtenção dos óleos essenciais..... | 43 |
| 3.4.1. Perfil fitoquímico dos óleos essenciais..... | 44 |
| 3.5. Atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais..... | 44 |
| 3.5.1. Padronização dos microrganismos..... | 44 |
| 3.5.2. Preparo das amostras..... | 45 |
| 3.5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana..... | 45 |
| 3.5.3.1. Método A..... | 45 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5.3.2. Método B..... | 46 |
| 3.6. Atividade antioxidante..... | 47 |
| 3.7. Toxicidade aguda..... | 47 |
| 3.8. Desenvolvimento da formulação de gel-creme..... | 48 |
| 3.8.1. Formulação gel-creme..... | 48 |
| 3.8.2. Farmacotécnica da formulação..... | 49 |
| 3.8.3. Estudo de estabilidade acelerado..... | 49 |
| 3.8.3.1. Análises físico-químicas..... | 50 |
| 3.8.3.1.1. Características organolépticas..... | 50 |
| 3.8.3.1.2. Determinação de pH..... | 51 |
| 3.8.3.1.3. Avaliação da viscosidade..... | 51 |
| 3.8.3.1.4. Centrifugação..... | 51 |
| 3.9. Tratamento dos dados (análise estatística)..... | 51 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 52 |
| 4.1. Análise farmacognóstica..... | 52 |
| 4.2. Perfil fitoquímico dos óleos essenciais..... | 55 |
| 4.3. Atividade antimicrobiana..... | 60 |
| 4.4. Atividade antioxidante..... | 64 |
| 4.5. Toxicidade aguda..... | 66 |
| 4.5.1. Peso..... | 66 |
| 4.5.2. Consumo de água e alimento..... | 68 |
| 4.5.3. Comportamento geral..... | 69 |

| | |
|---|----|
| 4.6. Estudo de estabilidade acelerado..... | 69 |
| 4.6.1. Análises físico-químicas..... | 69 |
| 4.6.1.1. Determinação de pH..... | 69 |
| 4.6.1.2. Centrifugação..... | 74 |
| 4.6.1.3. Características organolépticas..... | 75 |
| 4.6.1.4. Análise da viscosidade..... | 76 |
| 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES | 79 |
| 6. REFERÊNCIAS | 81 |
| ANEXOS | 93 |

1. INTRODUÇÃO

Grande parte dos conhecimentos que o homem obteve em relação ao uso medicinal de plantas foi conseguida através da própria experimentação, onde se conseguiu distinguir as espécies com propriedades terapêuticas, tóxicas e nutritivas.

O emprego de plantas medicinais, descrito há séculos, tem crescido constantemente e, atualmente, o mercado dos medicamentos fitoterápicos apresenta um desenvolvimento de cerca de 10% ao ano.

Embora em nosso país tenhamos uma vasta biodiversidade, e, portanto, um grande potencial para a criação de novos fitoterápicos, apenas 8% das espécies realmente foram avaliadas quanto às suas atividades farmacológicas e toxicológicas.

O surgimento de microrganismos resistentes aos antibióticos usuais, os efeitos adversos de drogas sintéticas, as inúmeras patologias desencadeadas por radicais livres, a ausência de alternativas para o tratamento de diversas doenças têm motivado as pesquisas de novos compostos de origem natural, assim como seus estudos de toxicidade e ação terapêutica.

Várias são as espécies com este potencial e, neste sentido, podemos citar o *Rosmarinus officinalis* L., conhecido popularmente como alecrim, com propriedades antioxidante e antimicrobiana comprovadas cientificamente, dentre inúmeras outras.

Em contramão, raros são os relatos sobre a planta *Baccharis dracunculifolia* DC., alecrim-do-campo ou vassourinha, abordada, quase que unicamente, por ser a fonte de resina, para as abelhas, para a fabricação da própolis-verde, sendo este dotado de grande atividade contra muitos microrganismos.

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo realizar o estudo farmacognóstico e farmacológico, analisando as atividades antimicrobianas e antioxidante, assim como a toxicidade aguda, comparativamente, entre as espécies *Rosmarinus officinalis* L. e *Baccharis dracunculifolia* DC.

1.1. Histórico das plantas medicinais

Tempos antes de o homem aprender a escrever ele já utilizava plantas com fins alimentares e também medicinais. Muitos de seus conhecimentos foram obtidos através da própria experimentação, por meio da qual se descobriu as espécies com propriedades nutritivas, medicamentosas e venenosas (PINTO, 2002).

A China é tida como o país com mais longa e ininterrupta tradição no uso de plantas. No livro “Cânone das Ervas”, de 2700 a.C., o imperador chinês Shen Hung já relatava o emprego de 252 espécies, em variadas patologias, muitas delas utilizadas até hoje (MENEZES, 2005).

Outro registro bastante antigo, de 1500 a.C., aproximadamente, é o documento egípcio Papiro de Ébers, no qual são descritas inúmeras plantas e mais de 800 “receitas” das mesmas, destinadas tanto para o preparo de medicamentos quanto de cosméticos (PINTO, 2002).

Séculos à frente, surgiram mais dois grandes nomes: Dioscórides e Galeno. O primeiro, um médico grego, escreveu a obra “Matéria Médica”, referência para grande parte dos conhecimentos da medicina em todo o mundo. Neste compêndio, além das propriedades das espécies e das patologias para as quais serviam, também descrevia como escolher e conservar tais ervas. A beladona, por exemplo, continua sendo utilizada segundo a mesma propriedade já descrita há vinte séculos: antiespasmódica (CUNHA, 2006)

Galeno, por sua vez, considerado o “Pai da Farmácia”, pormenorizou em muitos de seus livros, a técnica de preparo de formulações contendo ativos de origem vegetal (PINTO, 2002).

Já na Idade Média, conhecida como idade das trevas, o progresso científico foi dificultado pela Igreja católica, que não via com bons olhos a aprendizagem científica e tinham a doença como um castigo de Deus. Desta forma, a medicina, assim como o uso de plantas medicinais, restringiu-se ao interior dos mosteiros (CUNHA, 2006).

No século XV, época do Renascimento, com a invenção da imprensa, houve uma maior difusão do conhecimento, além de um estímulo ao pensamento científico. Entretanto, com o advento da Revolução Industrial, o uso de plantas medicinais passou a ser ridicularizado e ultrapassado (MENEZES, 2005).

O surgimento de microrganismos resistentes aos antibióticos usuais, assim como efeitos adversos e toxicidade de drogas sintéticas e, a ausência de alternativas para o tratamento de diversas patologias, motivou o crescimento na utilização de plantas medicinais e de pesquisas de novos compostos a partir das mesmas. Além disso, o menor custo dos fitoterápicos também favorece o acesso da população a esses medicamentos (PISTELLI *et al*, 2005; VARGAS *et al*, 2004).

Em 1985, a Organização Mundial de Saúde (OMS) constatou que 80% da população mundial recorriam ao uso de plantas medicinais como tratamento primário à saúde (CALIXTO, 2000).

Cerca de 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, sendo 25% deles a partir de plantas. Além disso, das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas, assim como 60% dos antitumorais e antimicrobianos disponíveis no mercado, também derivam desta mesma fonte (BRASIL, 2006; CALIXTO, 2000).

Estima-se que o mercado global de fitoterápicos cresce 10% ao ano e acredita-se que no ano de 2001 tenha sido alcançada a cifra de US\$ 550 milhões, somente no Brasil (BRASIL, 2006).

Entretanto, mesmo verificando-se este crescimento e a grande biodiversidade que o Brasil possui, apenas 8% de nossas espécies foram pesquisadas quanto aos seus compostos bioativos e 1.100 espécies avaliadas em suas propriedades medicinais. Portanto, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas (BRASIL, 2006; Jr VEIGA e PINTO, 2005).

1.2. Toxicidade

Grande parte dos usuários de plantas medicinais acredita que o consumo das mesmas seja totalmente inofensivo, isto é, não resulta em nenhum efeito danoso à saúde; entretanto, este é um pensamento errôneo, visto que, assim como qualquer outra substância, possíveis efeitos adversos ou mesmo tóxicos podem ocorrer com a sua utilização (NORTON, 2001).

Aliás, não há por que, inicialmente, considerá-la inócua, uma vez que do reino vegetal são obtidas substâncias extremamente tóxicas, como por exemplo, a estricnina (a partir da *Strychnos nux-vomica*) e a digitoxina (*Digitalis purpurea* L. ou *Digitalis lanata* Ehrh.) (SIMÕES et al, 2002).

Durante todo o processo de evolução, as plantas foram (e ainda são) constantemente ameaçadas por microrganismos patógenos ou não, vírus e outros animais. Como resposta, elas desenvolveram vários mecanismos de defesa, incluindo a síntese de substâncias químicas inibidoras da ação destes predadores, através de efeitos gastrintestinais, cardíacos, nervosos ou ainda irritantes ao contato (NORTON, 2001).

Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxicidade, bem como a interação com outras drogas ocorrem regularmente, entretanto não são usualmente relatados. Visto não haver respeito aos limites de uso dos fitoterápicos, assim como a falta de informações sobre efeitos colaterais, o consumo de plantas medicinais, da maneira como tem sido feito, representa, cada vez mais, um risco à saúde humana (Jr VEIGA e PINTO, 2005).

Segundo a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), cerca de duas mil pessoas são envenenadas por ano, por plantas, no Brasil, sendo 60% delas crianças com idade inferior a nove anos e, na maioria dos casos, com plantas ornamentais, dada sua aparência atraente. A incidência em adultos é decorrente do uso abusivo de plantas de propriedades já conhecidas (SINITOX, 2006)

Em 1998, este número apresentava-se ligeiramente reduzido, em torno de 1700, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) (LOBATO, 2004).

Somente na região Sudeste, foram registrados 857 casos de intoxicação por plantas, sendo 477 deles no Estado de São Paulo, no ano de 2000 (SINITOX, 2006).

Uma avaliação toxicológica de qualquer composto ou mesmo medicamento é de extrema importância, pois fornece informações a respeito da forma correta de emprego, bem como as medidas preventivas e curativas quando do seu uso inadequado (LARINI, 1997).

Vários são os tipos de avaliação que podem ser efetuadas, dentre elas podemos citar o ensaio de toxicidade aguda, o qual consiste em uma análise estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância ou um conjunto das mesmas, como por exemplo, em extrato fluído, uma tintura ou extrato seco de plantas medicinais, assim como do próprio fitoterápico. Através dele pode-se identificar os riscos para a saúde resultantes da exposição de curta duração por determinada via de administração. Por definição, “a toxicidade aguda é o efeito nefasto que se produz dentro de um curto período de tempo e que resulta da administração de uma dose única ou de várias doses de uma substância em um período de 24h” (BRITO, 1994).

1.3. Importância dos novos compostos antioxidantes e antimicrobianos

A descoberta de novos compostos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas tem sido considerada de extrema importância nos dias atuais. Primeiro, em função dos processos oxidativos, ocasionados por radicais livres, serem os principais responsáveis por uma série de lesões, como por exemplo, nas respostas inflamatórias sistêmicas, septicemia, transplantes de órgãos, hepatites fulminantes e até mesmo, no próprio envelhecimento e, segundo, devido ao crescente aumento de microrganismos resistentes aos antibióticos disponíveis no mercado, além dos muitos possíveis efeitos colaterais dos mesmos (ANDRADE Jr. *et al*, 2005; SOARES, 2002; NETO *et al*, 2000).

Os radicais livres são, de maneira geral, moléculas que possuem oxigênio e apresentam um elétron não pareado em sua órbita externa, sendo, portanto, espécies extremamente reativas. Essas moléculas podem ser geradas tanto por fontes endógenas (ação de enzimas como a oxidase, cicloxigenase, peroxidases entre outras; presença de metais de transição no interior das células e sistemas de transportes de

elétrons) como exógenas (poluição do ar, radiações, fumo). Considera-se como maior via biológica de formação destes radicais livres o transporte de elétrons associado às membranas mitocondriais. Na realidade, a maior parte do oxigênio envolvido na função respiratória efetuada por essas organelas é reduzida diretamente à água, e apenas de 2 a 3% transformam-se nestas espécies reativas (ANDRADE Jr. *et al*, 2005; SOARES, 2002).

Com relação à resistência a antimicrobianos, verifica-se há décadas o aumento de microrganismos que não são mais suscetíveis aos antibióticos a que costumavam ser. Neste sentido, cepas resistentes à benzilpenicilina foram descobertas nos anos 40, assim como *Staphylococcus aureus* – meticilina resistentes nos anos 80, entre inúmeros outros casos (NETO *et al*, 2000).

De modo geral, os microrganismos têm a habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos, o que, na realidade também pode ser considerado como consequência inevitável da atividade humana, ao impor novos tipos de pressão seletiva aos mesmos (LOGUERCIO *et al*, 2005; NETO *et al*, 2000).

Para contornar este problema algumas atitudes podem ser tomadas, como o controle do uso de antibióticos, desenvolvimento de pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e a continuidade dos estudos para descoberta de novas drogas, tanto sintéticas como naturais. As de origem natural, por sua vez, possuem a vantagem de poderem ser desenvolvidas com uma rapidez relativamente maior do que as sintéticas, empregando-se ferramentas como a etnofarmacologia, e serem, também, mais econômicas (VARGAS *et al*, 2004).

Desta forma, desde 1977, a OMS tem estimulado o estudo de plantas, cujo uso popular aponta para propriedades medicinais, a fim de comprovar cientificamente os benefícios do consumo destas e de medicamentos fitoterápicos, assim como seus riscos quando utilizados indevidamente (LOGUERCIO *et al*, 2005).

1.4. Microbiota oral

A cavidade oral humana apresenta-se vastamente colonizada por uma série de microrganismos que nela encontram condições ideais de sobrevivência. Estima-se que este seja o habitat de cerca de 500 diferentes espécies bacterianas, sendo cem delas específicas desta região (AL-HEBSHI *et al*, 2006; BARROS *et al*, 1998).

Grande parte destes microrganismos não representa riscos à saúde, entretanto alguns deles são considerados patogênicos, ou seja, causadores de doenças. Existem ainda as espécies oportunistas, isto é, as que constituem a microbiota usual da boca sem causar nenhum prejuízo ao indivíduo, mas que, em determinado momento, como por exemplo, uma deficiência do sistema imunológico, se aproveitam e passam a desencadear certas patologias. Neste último caso, estão envolvidas em vários processos infecciosos sistêmicos como a endocardite, infecções respiratórias e até mesmo abscessos cerebrais (AL-HEBSHI *et al*, 2006; MARTINS *et al*, 2002b).

Os gêneros *Staphylococcus ssp.* e *Candida ssp.* podem ser considerados como microrganismos oportunistas, sendo as espécies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Candida albicans* (*C. albicans*) algumas das mais comumente encontradas e com elevada capacidade de adesão na mucosa oral (MONROY *et al*, 2005; MARTINS *et al*, 2002b).

A levedura *C. albicans* está relacionada, juntamente com outros microrganismos, a processos inflamatórios da mucosa oral, como, por exemplo, a estomatite. Embora vários estudos já tenham sido realizados com plantas medicinais para avaliação de sua atividade contra este microrganismo, nenhum deles resultou em uma formulação eficiente para uso em humanos ou animais (DUARTE *et al*, 2005).

Além destes, temos também o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) principal agente causador da placa bacteriana e, conseqüentemente, da cárie dental. A placa dentária apresenta-se constituída por um agregado estruturado e não calcificado de microrganismos que permanecem aderidos à superfície do dente (GEBARA *et al*, 1996).

O *S. mutans* é o responsável, juntamente com o *Streptococcus sobrinus*, pela produção de enzimas denominadas glucosiltransferases (GTF), as quais catalisam a formação de glucanos solúveis e insolúveis em água, a partir de açúcares, principalmente, da sacarose. Estas substâncias sedimentam-se sobre os dentes, facilitando a adesão das bactérias sobre os mesmos, formando assim, uma barreira que

previne a difusão dos ácidos produzidos pelas mesmas, levando, então, ao surgimento da placa bacteriana (essencialmente, um biofilme). Desta forma, através da diminuição, ainda maior, do pH (acidificação), seguida pela fermentação de carboidratos que estejam disponíveis, há um aumento na probabilidade de desmineralização do esmalte do dente, possibilitando, assim, o estabelecimento da cárie e até mesmo de uma gengivite (ROMERO, 2005; LEITÃO *et al*, 2004; KOO *et al*, 2002; SIMÕES *et al*, 2002; KATSURA *et al*, 2001).

Existem várias formas de controlar-se este processo, sendo uma delas a prevenção da proliferação bacteriana na superfície dental empregando-se agentes antimicrobianos, os quais podem agir inativando a glucosiltransferase, inibindo a adesão inicial ou o próprio crescimento do *S. mutans* (KATSURA *et al*, 2001; GEBARA *et al*, 1996).

1.5. *Rosmarinus officinalis* L.



Figura 1: Planta *Rosmarinus officinalis* L. (REYNAUD, 2006)

A família *Lamiaceae*, à qual pertence à planta *Rosmarinus officinalis* L. (*R. officinalis*), ilustrado pela figura 1, compreende 150 gêneros com cerca de 2800

espécies distribuídas por todo o mundo, sendo muitas delas empregadas como plantas medicinais e também como condimentos (alfavaca, manjerição, hortelã-pimenta) ou flores ornamentais (PORTE, GODOY, 2001).

O Alecrim, como é popularmente conhecido o *Rosmarinus officinalis* L., teve sua origem na região Mediterrânea. Devido à sua procedência, seu nome, em latim, significa “orvalho do mar” e, possivelmente, foi introduzido no Brasil pelos colonos. Encontra-se, atualmente, disseminado em vários países como: Itália, Iugoslávia, Espanha, Grécia, Turquia, França e Portugal; desenvolvendo-se muito bem em terrenos secos e expostos ao sol (PORTE e GODOY, 2001; PDR, 1998; COSTA, 1994; CORREA, 1984).

Apresenta como sinônimos vulgares os termos alecrim, rosmarino, rosmarinho, alecrim-de jardim, alecrim-de-cheiro; como sinônimo científica, *Rosmarinus latifolius* Miller, *R. angustifolius* Miller e *R. chilensis* Molina, sendo denominado em outras línguas como Rosemary ou old man (inglês), rosmarin (alemão), encensoir (francês), rosmarino (italiano), romero ou rosmario (espanhol), entre outras denominações (MARTIN *et al.*, 2004; CORREA, 1984; OLIVEIRA e AKISUE, 1996).

1.5.1. Caracteres macroscópicos e microscópicos

Caracteriza-se como um arbusto perene, alcançando até 1m de altura, com folhas de 1,5 a 3,5cm de comprimento e 2 a 4 mm de largura, de aspecto lenhoso (devido à presença de numerosos pêlos ramificados), lineares a lanceoladas, opostas, com as margens inteiras enroladas para dentro, semelhante à pequenas agulhas, de sabor ligeiramente adstringente a amargo e odor aromático característico. Efetuando-se um corte transversal em uma de suas folhas, podemos observar microscopicamente, epiderme superior, com células muito pequenas, protegida por cutícula espessa e ondulada, a hipoderme, constituída por duas fileiras de células incolores, com paredes espessas, caniculadas, mais desenvolvidas na região dos feixes líbero-lenhosos, o parênquima clorofiliano em paliçada, dispendo-se em arco entre os feixes citados acima, o parênquima lacunoso e a epiderme inferior, constituída de células pequenas e com numerosos estomas, pêlos de proteção e glândulas. Quando reduzidas a pó

apresentam coloração verde-acinzentada a verde-amarelada. Suas flores variam do azul ao branco e estão dispostas em pequenos cachos nas axilas de brácteas ovado-lanceoladas e caducas, com a corola e cálice bilabiados, persistente, tomentoso, com dois estames (BRITISH, 2005; MARTINS, 2002a.; COSTA, 1994; D'AMÉLIO, 1999; EVANS, 1991; OLIVEIRA e AKISUE, 1996).

1.5.2. Constituição química e propriedades gerais

O *R. officinalis* L foi primeiramente citado nos anos 116 – 27 a.C. e já desde a antiguidade tem sido muito utilizado pelos gregos e romanos em rituais religiosos, assim como condimento em diversos tipos de pratos, emprego que até hoje é disseminado (CORRÊA, 1984).

Há várias propriedades farmacológicas associadas ao alecrim, algumas comprovadas cientificamente outras somente mencionadas segundo crenças populares. Na medicina popular, por exemplo, é vastamente empregado, como digestivo, adstringente, diurético, diaforético, anti-séptico, carminativo, antiespasmódico, emenagogo, estimulante da circulação, antidepressor, antiparasitário e cicatrizante, entre outros usos. Aproveitando-se de sua propriedade cicatrizante, velhas parteiras européias costumavam polvilhar o pó das folhas dessa planta sobre o cordão umbilical de recém-nascidos (MAHMOUD *et al.*, 2005; KABOUCHE *et al.*, 2005; CUNHA *et al.*, 2003; PORTE e GODOY, 2001; D'AMÉLIO, 1999).

Relata-se, além das propriedades mencionadas acima, uma atividade diurética e antipirética de extratos fluídos de *R. officinalis* L., assim como seu efeito hepatoprotetor (MARTIN *et al.*, 2004; HALOUI, 2000).

A atividade terapêutica desencadeada pelo alecrim, tal como de qualquer outra planta, dependerá do tipo de preparação utilizada (extrato, tintura ou óleo essencial, por exemplo), assim como de seu processo extrativo (percolação, maceração, hidrodestilação, prensagem etc), onde são fatores importantes: o tamanho das partículas da droga, a temperatura e pH da extração, o emprego ou não de agitação (SIMÕES *et al.*, 2002; NORIEGA *et al.*, 2005).

Anteriormente à extração propriamente dita, parâmetros como órgão da planta, estágio de desenvolvimento da mesma, época da colheita, período do dia, processo de secagem, conservação entre inúmeros outros, devem ser levados em consideração, visto serem estes os principais determinantes da composição química do produto final obtido (SIMÕES et al, 2002).

Em estudo realizado com o *R. officinalis* L., quanto ao teor de óleo essencial da planta coletada em três diferentes épocas do ano, verificou-se que no verão houve um maior rendimento da substância, ainda que todas as amostras tenham sido coletadas no mesmo período do dia. Acredita-se que em temperaturas mais altas exista um maior estímulo das glândulas em produzir o óleo essencial, visto haver uma superior perda do mesmo em função de sua volatilidade. Além disso, recomenda-se que a colheita da planta seja efetuada pela manhã, pois o óleo essencial obtido apresenta-se mais aromático do que nos horários mais quentes (SILVA, 2005).

Quanto ao processo de secagem, por exemplo, foram analisadas três temperaturas de secagem do alecrim, 40, 60 e 80°C em estufa com circulação forçada de ar, e foi constatado haver perdas de 24 a 49% de óleo essencial nas duas temperaturas mais elevadas. À 80°C uma maior quantidade de substâncias foi afetada em relação ao rendimento, sendo elas: o mirceno, p-pineno, borneol, 1,8-cineol e cânfora, entre outras. À 60°C, somente a cânfora apresentou alteração (CARDOSO et al, 2005; MELO et al, 2004).

Em vista disto, torna-se difícil estabelecer uma constituição exata e constante da planta e até mesmo efetuar comparações entre diferentes resultados encontrados na literatura.

De qualquer forma, são várias as classes de substâncias que estão presentes no *R. officinalis* L e, sua presença ou ausência, e maior ou menor concentração, estão diretamente relacionadas aos fatores descritos acima.

Como principais componentes do alecrim, em geral, temos os compostos polifenólicos, incluindo-se neste grupo flavonóides, taninos, ácidos fenólicos, diterpenos e triterpenos fenólicos, sendo estes os responsáveis pelas muitas das atividades terapêuticas relatadas (MORENO, 2006; MAHMOUD, 2005; CUNHA et al, 2003; NAKATANI, 2000; NASCIMENTO, 2000).

Nos extratos de *R. officinalis* L., portanto, na porção não volátil do mesmo, Duke (1992) e Bisset (1994) descreveram a presença de flavonóides, como a luteolina, a diosmina, a diosmetina e a apigenina, assim como seus correspondentes glicosídeos, o que pôde ser confirmado, anos mais tarde, por D'Amélio (1999), Nascimento *et al.*, (2000), Cunha *et al.* (2003) e Oluwatuyi (2004), tendo este último isolado ainda, o composto 4, 7-dimetoxi-5-hidroxi-flavona, inédito até então (del BANO *et al.*, 2004; PDR, 1998).

Relata-se, também, a existência de ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico, como o ácido caféico, ácido clorogênico e o ácido rosmarínico (éster do ácido caféico), sendo este último de maior importância farmacológica, relacionando-se às atividades antioxidante, antimicrobiana e antimutagênica (MORENO *et al.*, 2006; OLUWATUYI *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2003; SOTELO-FÉLIX, 2002; PDR, 1998).

Há também pesquisas que indicam o emprego de tal substância como agente terapêutico no tratamento da Doença de Alzheimer, o que já pôde ter sido verificado, indiretamente, há anos, quando gregos empregavam o alecrim para “reforçar” a memória (MORENO *et al.*, 2006; LOEFLER, 2004; PORTE e GODOY, 2001).

A Farmacopéia Britânica estabelece que as folhas secas de alecrim contenham, no mínimo, 3% de derivados hidroxicinâmicos, expressados como ácido rosmarínico, cuja estrutura química encontra-se descrita logo abaixo na figura 2 (BRITISH, 2005).

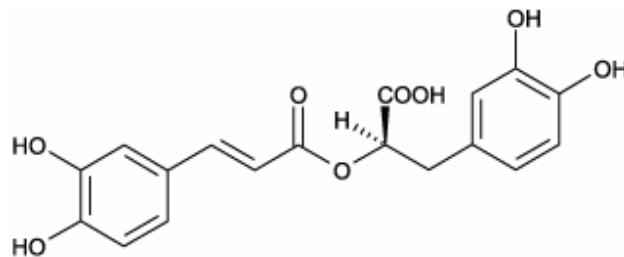


Figura 2: Ácido Rosmarínico (BRITISH, 2005)

Além destes compostos, estão presentes, como mencionado anteriormente, os diterpenóides fenólicos: ácido carnósico e carnosol (os principais) e ainda o rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, rosmaridifenol e rosmariquinona; também envolvidos na atividade antioxidante da planta. As figuras 3 e 4, descritas logo abaixo apresentam

suas respectivas estruturas químicas (OLUWATUYI, KAATZ, GIBBONS, 2004; PORTE e GODOY, 2001; NAKATANI, 2000; PDR, 1998; BISSET, 1994).

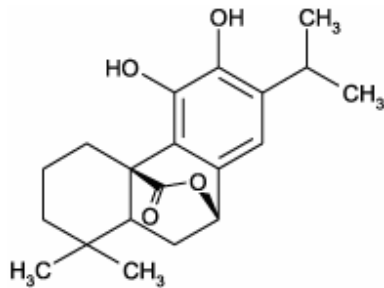


Figura 3: Carnosol (AXXORA, 2006)

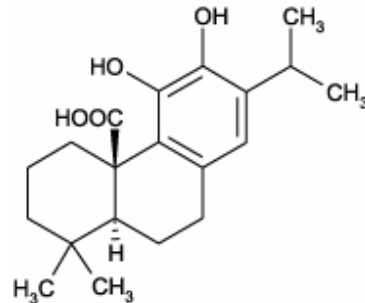


Figura 4: Ácido carnósico (PDR, 1998)

Moreno *et al* (2006) avaliaram a atividade antioxidante, através do método DPPH (2, 2-difenil-2-picrilhidracil hidrato – substância geradora de radicais livres), de extratos de folhas e flores, separadamente e, ainda de diferentes frações de um extrato metanólico das folhas, contendo respectivamente, ácido rosmarínico, ácido carnósico e carnosol. Primeiramente, verificou-se que os extratos obtidos a partir das folhas do alecrim apresentaram maior conteúdo de ácido rosmarínico e ácido carnósico, quando em comparação com a extração das flores, fato também comprovado por Munné-Bosh e Alegre (2001). Dentre os compostos fracionados, o ácido carnósico foi o que apresentou maior atividade antioxidante, sendo também reconhecido como o composto com tal propriedade que se encontra em maior concentração na planta, podendo estar localizado nos cloroplastos e nas membranas intracelulares das folhas do alecrim (WELLWOOD e COLE, 2004; MUNNÉ-BOSCH e ALEGRE, 2001).

Acredita-se que a atividade desta substância, em inibir processos oxidativos, seja decorrente da presença de dois grupamentos hidroxilas em posição -orto nos carbonos 11 e 12 (MUNNÉ-BOSCH e ALEGRE, 2001).

Embora sua excelente atividade esteja comprovada, o ácido carnósico, apresenta instabilidade na presença de vários fatores ambientais como luz, água, altas temperaturas e oxigênio, quando então é oxidado, gerando o carnosol e, deste, rosmanol e epirosmanol (MORENO *et al.*, 2006; PORTE e GODOY, 2001).

Os compostos resultantes são também considerados efetivos, sendo o isorosmanol quatro vezes mais potente que o butilhidroxitolueno (BHT), um agente antioxidante sintético, e o carnosol, o dobro dele (NAKATANI, 2000).

Tanto o butilhidroxitolueno quanto o butilhidroxianisol (BHA) atuam seqüestrando radicais livres e, assim sendo, deveriam funcionar como agentes antimutagênicos ou anticarcinogênicos. Entretanto, estudos mostram que os mesmos promovem a inibição da comunicação intercelular em culturas, o que seria um efeito característico de substâncias promotoras da carcinogênese (RAMALHO e JORGE, 2006; NAKATANI, 2000; GOMES-CARNEIRO *et al*, 1997).

Este tema é ainda muito controverso, mas de qualquer forma, tendo em vista os indícios de problemas, que podem ser provocados pelo consumo destes aditivos sintéticos, pesquisas têm sido direcionadas para a descoberta de produtos naturais com tal atividade.

Neste contexto, o alecrim torna-se uma alternativa interessante, tendo apenas como uma adversidade seu odor forte, o que muitas vezes prejudica a aceitabilidade sensorial do produto pelo consumidor. Para contornar este problema, há também a possibilidade de empregar-se isoladamente o carnosol, o qual se apresenta como uma lactona diterpênica inodora e insípida (PORTE e GODOY, 2001).

Verifica-se também na literatura o efeito hepatoprotetor de extratos aquosos em casos de toxicidade induzida pelo fármaco azatioprina, estando esta atividade mais uma vez relacionada à ação antioxidante da planta, e, portanto aos flavonóides e outros compostos fenólicos, visto que a substância torna-se tóxica por induzir o estresse oxidativo e elevar os níveis de malondialdeído no fígado (AMIN e HAMZA, 2005; CUNHA *et al*, 2003).

Fahin *et al.* (1999) avaliaram o mesmo efeito, entretanto, tendo como agente hepatotóxico o tetracloreto de carbono e concluíram haver uma potente ação protetora do fígado, sendo esta, superior, até mesmo, ao fármaco silimarina, conhecido e efetivo agente hepatoprotetor.

Com relação à atividade antimicrobiana, existem muitos estudos relacionados aos óleos essenciais, no entanto, poucas pesquisas envolvem os extratos.

Nascimento *et al.* (2000) testaram a propriedade de extratos de várias espécies de plantas, dentre elas o alecrim, contra uma ampla gama de microrganismos como, por exemplo: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, dentre um total de catorze espécies, sendo algumas resistentes a antibióticos. Desta forma, pode-se verificar apenas a suscetibilidade das cepas de *Bacillus subtilis* e *Candida albicans* ao extrato etanólico de *R. officinalis* L..

Celiktas *et al.* (2005) estudaram a alteração da ação antimicrobiana de extratos metanólicos, obtidos a partir do alecrim coletado em quatro diferentes épocas do ano, frente aos mesmos microrganismos citados acima, entre outros, onde se concluiu que não houve efetividade contra praticamente nenhum deles, havendo somente uma baixa atividade contra o *S. aureus*.

Em contramão, Moreno *et al.* (2006) comprovaram efeitos bacteriostáticos e bactericidas frente aos microrganismos *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e ainda, atividade fungistática em relação à *C. albicans*, quando tratados com extratos com diferentes líquidos extratores: água, metanol e acetona. Dada a baixíssima atividade antimicrobiana do extrato aquoso, descartou-se, baseando-se nas estruturas químicas dos compostos, a possibilidade do ácido rosmarínico ser o responsável por tal propriedade, identificando o mesmo como sendo o ácido carnósico.

Além da porção não-volátil do alecrim, descrita anteriormente, temos também em sua composição o óleo essencial. Esta substância, de modo genérico, caracteriza-se como uma mistura complexa de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES *et al.*, 2002).

De acordo com a Farmacopéia Britânica (2005), o óleo essencial do *R. officinalis* L. apresenta-se como um líquido de coloração amarelo-pálida a incolor e de odor característico.

Os óleos voláteis são extraídos, principalmente através de hidrodestilação, podendo ainda ser obtidos por prensagem dos órgãos ou por meio de solventes apolares como o éter. Encontram-se em estruturas especializadas, majoritariamente, nas folhas e flores (CUNHA *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2002).

O limite aceitável para o rendimento de óleo essencial a partir de folhas do alecrim é de, no mínimo, 1,2 % (BRITISH, 2005; CUNHA *et al.*, 2003).

Quanto à sua composição química, Giordani *et al* (2004), através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, determinaram como compostos majoritários o α -pineno (26,19%), o 1, 8-cineol (24,36%) e a cânfora (18,85%). Resultados semelhantes foram encontrados por Kabouche *et al* (2005), Lopez *et al* (2005), Porte e Godoy (2001), os quais também detectaram como principais compostos o 1,8 – cineol e a cânfora.

Tognolini *et al* (2006) e Saccheti *et al* (2005), analisaram em maior concentração a verbenona (21,76%), a cânfora (14,6%), o acetato de bornila (12,3%), enquanto que o alfa-pineno, o 1, 8-cineol e o canfeno alcançaram teores não muito expressivos, 6,65; 7,26; e 2,29%, respectivamente.

Celiktas *et al* (2005) estudaram os óleos produzidos em três diferentes regiões da Turquia durante quatro períodos do ano e concluíram que nos locais de clima mais quente havia maior produção do composto 1,8 –cineol, menor fabricação de cânfora e verbenona, e quantidade semelhante quanto ao alfa-pineno, quando em comparação com o óleo obtido em clima frio.

Outros compostos também presentes, em menor concentração, no óleo essencial de alecrim são: alfa-cimeno, linalol, alfa-terpineol, geraniol, limoneno entre outros (TOGNOLINI *et al*, 2006; SACCHETI *et al*, 2005; GIORDANI *et al*, 2004; PDR, 1998).

Várias são as propriedades relacionadas ao óleo essencial do *R. officinalis* L. dentre as quais podemos citar, principalmente, o uso em fragrâncias, devido a seu forte odor aromático, a ação estimulante do sistema circulatório e nervoso e sua atividade antimicrobiana (SIMÕES *et al*, 2002; D'AMÉLIO, 1999).

A atividade nos dois sistemas mencionados acima está ligada à presença de cânfora no óleo essencial. Esta substância estimula centros medulares, especialmente os da respiração e circulação, via nervo olfatório, o que justifica seu emprego na recuperação de pessoas inconscientes, através de inalação. Além disso, a cânfora, quando aplicada externamente, promove a diminuição da temperatura local causando vasoconstrição, melhorando, desta forma, a circulação, sendo recomendada nos casos de reumatismo e dores musculares (CUNHA *et al*, 2003; PORTE e GODOY, 2001).

Quanto à sua ação antimicrobiana, encontra-se na literatura uma série de estudos utilizando-se diferentes cargas e cepas microbianas, o que muitas vezes dificulta sua correlação.

Kabouche *et al* (2005) verificaram uma fraca atividade do óleo essencial, destilado no momento do ensaio, portanto, considerado “fresco”, contra *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* e nenhuma sensibilidade significativa por parte de cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* entre outras. Os autores relacionaram estes resultados, até então, nunca obtidos, ao conteúdo da substância 2-etil-4, 5-dimetilfenol presente no óleo.

Em contraposição, Celiktas *et al* (2005), analisando o óleo de diferentes localidades e climas, concluíram haver maior atividade antimicrobiana nas amostras contendo maior teor de cânfora e verbenona, portanto as de temperaturas mais amenas. Além disso, observaram uma suscetibilidade mais elevada dos microrganismos *Enterococcus fecalis* e *Proteus vulgaris*, havendo também efetividade contra *Candida albicans*, resultado este confirmado por Giordani *et al* (2004) e Hammer *et al* (1999), havendo, entretanto, diferenças muito significativas quanto ao valor de concentração mínima inibitória, 5,6 µg/ mL e 0,01g/ mL, e de cargas microbianas, 10⁶ e 10⁴ unidades formadoras de colônias / mL (UFC / mL), respectivamente.

Estudos também descreveram a eficácia do óleo essencial de alecrim, não somente em relação à *C. albicans*, mas também contra a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo sua potência semelhante ao óleo essencial do tomilho (*Thymus vulgaris*) tomado como agente antifúngico de referência (SACCHETTI *et al*, 2005).

1.5.3. Indicações, formas de administração e posologia

São variadas as formas de administração do *R. officinalis* L, desde infusões até cremes e comprimidos, passando ainda, por preparações líquidas, banhos e extratos secos (BISSET, 1994; PDR, 1998)

Externamente, o óleo ou a pomada, assim como outras formas semi-sólidas, contendo de 3 a 10% de óleo essencial, são muito utilizados em casos de reumatismos,

assim como, em banhos para estímulo da circulação (30 a 50g para 1 litro de água quente) (CUNHA *et al*, 2003; PDR, 1998; BISSET, 1994)

Nos casos de alopecia, emprega-se o extrato glicólico nas concentrações de 2 a 6% em xampus, enquanto a tintura é utilizada entre 10 a 20% (BATISTUZZO *et al*, 2002).

Internamente, pode-se preparar um vinho de alecrim (na proporção de 20mg da droga para 1 litro de vinho, devendo permanecer em repouso por 5 dias) ou utilizar-se a própria droga na terapia de desordens gastrintestinais (como estimulante das funções digestivas ou carminativo), na dosagem diária de 4 a 6 g (CUNHA *et al*, 2003; PDR, 1998; BISSET, 1994).

No preparo de infusões, recomenda-se a adição de água fervente sobre 2g da droga (por xícara), em contato por 10 minutos, de 2 a 3 vezes ao dia. Para extratos secos (5:1), o consumo ideal diário é de 1 a 3 cápsulas com 300mg cada (CUNHA *et al*, 2003).

1.5.4. Efeitos adversos e toxicidade

Dada sua atividade emenagoga, isto é, estimulante da menstruação, é contra-indicado durante a gravidez, podendo induzir o aborto em doses mais elevadas, e também em casos de doença inflamatória pélvica, assim como quando há excesso de sangramento durante a menstruação. Acredita-se que o mecanismo de ação esteja relacionado com os receptores adrenérgicos do útero (McGUFFIN *et al*, ano, PDR, 1998).

Lemonica *et al* (1996) trataram ratos Wistar, diariamente, com um extrato aquoso de *R. officinalis* L. durante dois diferentes períodos da prenhez: pré-implantação e organogênico (onde ocorre a embriogênese, histogênese e morfogênese) e verificaram não haver problemas após a implantação do feto. Observaram, apenas, indícios de aumento na interrupção da gravidez no grupo tratado durante a fase de pré-implantação, embora os valores encontrados não tenham sido considerados significativos.

O óleo essencial do alecrim deve também ser evitado em indivíduos com pressão alta ou epilepsia, devido a seu conteúdo de cânfora (CRUZ, 2006).

Quanto ao seu uso externo, foram relatados casos de dermatite de contato, tanto de origem ocupacional como durante o uso terapêutico. Também se descobriu a relação desta reação adversa com a exposição ao sol, indicando, assim, fotodermatite (ARMISÉN, RODRIGUEZ, VIDAL, 2003; PDR, 1998).

Portanto, quando empregado de maneira correta e dentro da faixa terapêutica, o alecrim não apresenta riscos à saúde.

1.6. *Baccharis dracunculifolia* DC.



Figura 5: Planta *Baccharis dracunculifolia* DC. (RADIOBRÁS, 2006)

A planta *Baccharis dracunculifolia* DC. (*B. dracunculifolia*), ilustrada na figura 8, pertence à família Asteraceae e seu gênero, *Baccharis*, é constituído por mais de 500 espécies, possuindo algumas sem importância econômica, as quais podem até mesmo apresentar toxicidade a animais como o gado e outras, como é o caso da *B. dracunculifolia* DC., que são eficientes hospedeiras de insetos herbívoros e polinizadores, já que permanecem verdes e floridas durante o ano todo, e possuem potencial para recuperação de áreas degradadas (GOMES, FERNANDES, 2002; ARDUIN, 2000; BASTOS, OLIVEIRA, 1998).

Está distribuída, principalmente, nas regiões sudoeste ao sul do Brasil, estendendo-se até a Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia, sendo comum em cerrados e pastagens abandonadas. Popularmente, é conhecida pelo nome de alecrim, alecrim-do-campo, alecrim-de-vassoura, vassourinha, entre outros, apresentando as sinônimas científicas *B. bracteata* Hook, *B. leptospermoides* DC., *B. tandilensis* Spreng (SALATINO *et al*, 2005; BUDEL *et al.*, 2004; KUMAZAWA *et al*, 2003; BASTOS, OLIVEIRA, 1998).

Poucos são os relatos sobre esta planta, e os que a descrevem, normalmente a relacionam com a própolis-verde. Esta substância é produzida pelas abelhas através do emprego de um tipo de resina, cuja principal origem botânica, em algumas regiões do Brasil como São Paulo e Minas Gerais, é a espécie *B. dracunculifolia* DC. (SALATINO *et al*, 2005; SHIMAZAWA *et al*, 2005; SFORCIN *et al*, 2005; KUMAZAWA *et al*, 2003).

Desta forma, dada as várias atividades biológicas desencadeadas pela própolis-verde como, por exemplo, antioxidante, antitumoral, antiinflamatória, antiviral e antimicrobiana, tem crescido o interesse em conhecer melhor a constituição química do alecrim-do-campo e avaliar-se, também, suas propriedades terapêuticas (PARK *et al*, 2004; VARGAS *et al*, 2004).

1.6.1. Caracteres macroscópicos e microscópicos

A *B. dracunculifolia* DC. é um arbusto perene, alcançando de 2 a 3m de altura que apresenta folhas simples, alternas, sésseis, uninérveas, membranáceas e anfiestomáticas, medindo de 1 a 2cm de comprimento e 3 a 4mm de espessura. Possuem nervura central saliente na face abaxial, coloração verde-claro, tricomas glandulares bisseriados e os tectores, geralmente, longos. Esses tricomas, por sua vez, apresentam abundante secreção de óleos essenciais e são freqüentes em folhas jovens, mas raros nas adultas (TEIXEIRA *et al.*, 2005; BUDEL *et al.*, 2004; ARDUIN, 2000; OLIVEIRA, BASTOS, 1998).

Os feixes vasculares são colaterais, e, freqüentemente, fibras pericíclicas e cavidades esquizógenas estão presentes abaixo do floema. O caule possui aspecto lenhoso e mede cerca de 2m de altura e 5mm de diâmetro, sendo constituído de

epiderme unisseriada com tricomas, tectores (unicelulares) e glandulares (pluricelulares). Verificam-se também, inclusões de oxalato de cálcio, na forma de octaedros de diferentes tamanhos, nas células da medula e ainda, um revestimento epicuticular (ARDUIN, 2000; BUDEL *et al.*, 2004).

1.6.2. Constituição química e propriedades gerais

Poucos são os artigos abordando a constituição química da espécie *B. dracunculifolia* DC., entretanto mais escassos ainda são os estudos quanto à atividades biológicas propriamente ditas.

Quanto aos seus componentes, verifica-se nesta espécie a presença de vários compostos polifenólicos como flavonóides, taninos, ácidos fenólicos (ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2005; SALATINO *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2004).

Extratos etanólicos a partir da resina de folhas recém brotadas, não-desenvolvidas e desenvolvidas da *B. dracunculifolia* DC. apresentaram perfis semelhantes, qualitativamente, quanto aos compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides, quando analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Entretanto, quantitativamente, verificou-se que os extratos de folhas não desenvolvidas possuíam uma concentração menor destas substâncias, quando comparado às folhas novas. Como composto principal dos extratos, com exceção do obtido a partir das folhas desenvolvidas, encontrou-se a artepilina C (derivada do ácido cinâmico), conhecida por sua propriedade antimicrobiana, antioxidante e antitumoral. Nos extratos de folhas já desenvolvidas não se detectou a artepilina C, como item majoritário, o ácido cinâmico ou o canferol (PARK *et al.*, 2005; SALATINO *et al.*, 2005; PARK *et al.*, 2004).

Um outro composto fenólico encontrado no alecrim-do-campo são os taninos e, acredita-se que sua concentração na planta seja modificada durante o crescimento, períodos reprodutivo e vegetativo, assim como, a disponibilidade de água e nutrientes, visto que tais fatores influenciam no balanço carbono-nitrogênio na planta (ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 1999).

Espírito-Santo *et al* (1999) verificaram que a produção dos taninos, nesta espécie, ocorre durante todo o ano, sendo mais pronunciada no período de dezembro a abril, sem possuir relação com a temperatura, mas sim com a disponibilidade de água e luz, maiores nesta época do ano.

Dado o fato do alecrim-do-campo ser uma das principais origens botânicas da própolis-verde, como já mencionado anteriormente, vários autores relacionam a composição química desta substância com a da planta lhe deu origem (ALENCAR *et al*, 2005; KUMAZAWA *et al*, 2003).

Kumazawa *et al* (2003) analisando amostras de extratos etanólicos de folhas jovens *B. dracunculifolia* DC. e do própolis concluíram que ambos possuem composição química semelhante: a artepilina C, ácido caféico, o ácido 4, 5-dicafeoilquínico e 3, 4-dicafeoilquínico, ácido clorogênico, (substâncias com potencial antioxidante), 6-metoxicanferol dentre outros.

Assim como Park *et al* (2004, 2005) e Alencar *et al* (2005), Kumazawa *et al* (2003) também identificaram como componente principal a artepilina C.

Também se constatou a presença de substâncias como a apigenina (uma flavona), o ácido ferrúlico, o ácido cumárico e o ácido cinâmico (os três últimos, ácidos fenólicos) (ALENCAR *et al*, 2005).

Nagatani *et al* (2002), por sua vez, identificaram derivados de lignina e de sesquiterpenos.

Quanto ao óleo essencial do alecrim-do-campo, Arduin (2000), descreveu como constituintes principais o nerolidol (sendo o majoritário), α e β -pinenos, δ -cadineno e limoneno. Já Loaysa *et al* (1995) verificaram como componente majoritário o β -pineno (17,23%), seguido pelo δ -cadineno (12,97%), limoneno (4,17%), T-cadinol (3,86%) entre outros.

Informações como indicações de uso, formas de administração, posologia, efeitos adversos e toxicidade não foram encontrados em literatura.

1.7. Gel-creme e estudo de estabilidade

O gel-creme, caracteriza-se por ser uma forma farmacêutica semi-sólida, constituída, basicamente, pela união, em diferentes proporções de um gel e uma emulsão.

As emulsões são sistemas heterogêneos constituídos por um líquido imiscível intimamente disperso num outro líquido sob a forma de gotículas, sendo a união destas fases dependente da adição de um agente emulsificante, assim como do emprego de aquecimento e agitação no processo de emulsificação (PRISTA, 1995; ANSEL, 2000; LACHMAN, 2001).

Os géis, por sua vez, são colóides nos quais a interação do líquido com partículas muito finas induz o aumento da viscosidade, tornando-se uma massa com partículas organizadas no meio de dispersão. Esses colóides formam uma rede com natureza elástica e gelatinosa (PRISTA, 1995).

De modo geral, uma formulação deve apresentar características estáveis ao longo do tempo. A fim de avaliar estas características deve-se submeter às formulações desenvolvidas a um estudo de estabilidade, o qual fornecerá indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término de sua validade (ANVISA, 2004; RIBEIRO, 1996).

Desta forma, através do perfil de estabilidade é possível avaliar seu desempenho, segurança e eficácia, além de sua aceitação pelo consumidor (ANVISA, 2004; RIBEIRO, 1996).

2. OBJETIVO

Avaliar química e farmacologicamente duas espécies conhecidas, popularmente, como alecrim, o *Rosmarinus officinalis* L. e *Baccharis dracunculifolia* DC.

Objetivos específicos

- Estudar fitoquimicamente as duas espécies de plantas.
- Estudar a atividade antimicrobiana (microbiota oral) e antioxidante dos extratos e óleos essenciais das espécies citadas acima.
- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos glicólicos.
- Desenvolver uma formulação gel-creme contendo diferentes concentrações de extratos e óleos essenciais, assim como realizar o estudo de estabilidade acelerado das mesmas.

3. MÉTODO

3.1. Coleta e processamento das plantas (*R. officinalis* L. e *B. dracunculifolia* DC.)

A planta fresca *B. dracunculifolia* DC. foi coletada em um sítio à cerca de 5 km (localização por GPS: 760m, S 23°29.840') da Rodovia Mogi Dutra, na cidade de Mogi das Cruzes. O *Rosmarinus officinalis* L., por sua vez, foi comprado na Quitanda Cheiro Verde, localizada no Mercado Municipal da mesma cidade. Ambos foram coletados nos meses de julho a setembro durante o período da manhã (informações estas também confirmadas pelo fornecedor do *R. officinalis* L.), sendo recolhidas somente folhas e flores.

Exemplares das duas plantas foram depositados no Herbário Mogiense da Universidade de Mogi das Cruzes.

Parte do material foi submetido à secagem à sombra, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz solar e da chuva, para posterior avaliação farmacognóstica e preparo dos extratos. Para a obtenção dos óleos essenciais foi utilizado o restante do material, ainda fresco.

3.2. Análise dos metabólitos secundários das drogas vegetais

3.2.1. Taninos (COSTA, 2000, WADT, 2000)

Solução Extrativa (sol.extrativa)

Ferveu-se cerca de 2g da folha seca pulverizada com 10 mL de água, por 5 minutos. Filtrou-se a solução através de algodão, completando-se, em seguida, seu volume final (10 mL) com água fria.

Reações de identificação

Reação com a gelatina (COSTA, 2000)

Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 mL da sol. extrativa e 1 gota de ácido clorídrico 1N. Acrescentou-se, gota a gota, a solução de gelatina 2,5% e verificou-se a formação de precipitado.

Reação com acetato de chumbo 10% (COSTA, 2000)

Em um tubo de ensaio colocou-se 5 mL da sol. extrativa, adicionando-se a ele 10 mL de ácido acético 10% e 10 mL de acetato de chumbo 10%. Verificou-se a formação de precipitado e ou turvação, indicando-se assim, a presença de galotaninos. Efetuou-se o mesmo ensaio sem a adição de ácido acético.

Reação com acetato de cobre 3% (WADT, 2000)

Em um tubo de ensaio colocou-se 5 mL de sol. extrativa, adicionando-se a ele 2 a 3 gotas de uma solução de acetato de cobre 3%. Observou-se a formação de precipitado e ou turvação.

Reação com cloreto férrico 2% (COSTA, 2000; WADT, 2000)

Em um tubo de ensaio colocou-se 1 mL da solução extrativa, 10 mL de água e 1 gota de solução de cloreto férrico 2%. Verificou-se a coloração final. A presença de taninos pirogálicos torna a solução azul à violeta, enquanto que, os pirocatéquicos a colorem de verde a castanho.

3.2.2. Flavonóides (COSTA, 2000)

Solução extrativa

Ferveu-se 0,2g da folha seca pulverizada, em banho-maria, por cerca de 2 minutos, com 5 mL de metanol. Resfriou-se a solução, filtrou-se através de papel de filtro pregueado e evaporou-se, em banho-maria, até sua secura. Lavou-se o resíduo com um pouco de clorofórmio, o qual foi descartado. O processo foi realizado por quatro vezes, obtendo-se assim, quatro resíduos separadamente, os quais foram empregados em reações distintas.

Reações

Reação de Shinoda ou da cianidina

Dissolveu-se o resíduo em 5 mL de álcool 60°, acrescentou-se 1 mL de ácido clorídrico concentrado e 0,1g de pequenos fragmentos de magnésio metálico. Observou-se o desenvolvimento de coloração vermelha, rósea ou castanha.

Reação com cloreto férrico

Dissolveu-se o resíduo com alguns mL de álcool etílico. Adicionou-se 1 gota da solução de cloreto férrico 4,5%. Observou-se a coloração final (verde para flavonas e isoflavonas, verde-castanha para flavonóis e flavanonas, amarela para chalconas)

Reação com cloreto de alumínio 5%

Dissolveu-se o resíduo, referente à extração genérica acima, em um pouco de água. Adicionou-se 2 gotas desta solução, em ambos os lados de um papel de filtro previamente dividido em duas partes distintas. Sobre somente um dos lados, acrescentou-se 2 gotas de cloreto de alumínio 2% (em álcool etílico 95°). Aguardou-se a secagem do papel e observou-se, sob luz ultravioleta de ondas longas (366nm), a intensificação de fluorescência na região de contato do extrato com o reativo, bem como a mudança ou intensificação da coloração amarelo-esverdeada.

Reação com hidróxidos alcalinos

Dissolveu-se o resíduo em 1 mL de hidróxido de sódio 1N, observando-se a coloração final obtida, caracterizando-se reação positiva para flavonóides; a cor amarela.

3.2.3. Saponinas (COSTA, 2000, WADT, 2000)

Ferveu-se 0,5g da folha seca pulverizada em 100 mL de água por 2 a 3 minutos. A solução obtida foi filtrada através de papel de filtro e resfriada, completando-se, em seguida, seu volume inicial.

Utilizando-se oito tubos de ensaio, adicionou-se ao primeiro e segundo deles 5 mL do extrato anteriormente obtido. Ao segundo e demais tubos, até o oitavo, acrescentou-se 5 mL de água. Foi retirada uma alíquota de 5 mL do tubo 2, a qual foi repassada para o tubo 3, assim, sucessivamente, até o oitavo, desprezando-se 5 mL deste último.

Todos os tubos foram agitados, ao mesmo tempo, por 15 segundos, sendo então deixados em repouso por mais 15 segundos. Mediu-se, quando visualizada, a altura da espuma persistente.

3.2.4. Alcalóides (COSTA, 2000)

Cerca de 1g da folha seca foi pulverizada e levada à fervura com 15 mL de ácido clorídrico 1%. Filtrou-se o sobrenadante por algodão, recebendo o filtrado em funil de separação. Alcalinizou-se o filtrado com solução de hidróxido de amônia 10%, seguindo-se a agitação da solução com 15 mL de clorofórmio. Aguardou-se a separação das fases e retirou-se a fase clorofórmica colocando-a em uma cápsula de porcelana. Procedeu-se à evaporação, em banho-maria, do extrato clorofórmico, obtendo-se, por fim, um resíduo. Redissolveu-se este resíduo, triturando-o, com o auxílio de um bastão de vidro, com 12 mL de ácido clorídrico 1%. A solução final foi dividida em três tubos de ensaio, onde adicionou-se, respectivamente, 3 gotas dos reativos de Dragendorff, Mayer e Bertrand. Observou-se, em seguida, a formação de precipitado.

3.2.5. Antraquinonas (COSTA, 2000, WADT, 2000)

Reação de Borntraeger

Ferveu-se 0,2g da folha seca com 10 mL de ácido sulfúrico 2N por cerca de 2 minutos. Resfriou-se a solução e filtrou-se através de papel de filtro, recolhendo-se o filtrado em um funil de separação. Ao funil, adicionou-se 10 mL de éter etílico, agitou-se e aguardou-se sua decantação, separando-se a camada etérea para um tubo de ensaio. Acrescentou-se ao tubo 2 mL de hidróxido de sódio 2N, agitou-se e aguardou-se, novamente, a separação de fases. Observou-se a coloração obtida nas duas fases, sendo características positivas para a presença de antraquinonas, o aparecimento de coloração vermelha intensa na fase aquosa e ausência de coloração na fase etérea.

Pesquisa de antraquinonas livres

Agitou-se 0,3g da folha seca pulverizada com 5 mL de éter. Decantou-se a solução e transferiu-se o líquido sobrenadante para um tubo de ensaio. Repetiu-se o procedimento, juntou-se os solventes separados em um mesmo tubo. A este extrato etéreo, adicionou-se cerca de 1 mL de hidróxido de amônia 10%. Agitou-se e observou-se a formação de coloração rósea ou vermelha (COSTA, 1994).

3.2.6. Cardiotônicos (COSTA, 2000; WADT, 2000)

Solução extrativa

Ferveu-se cerca de 2g da folha seca com 20 mL de álcool etílico 50% e 10 mL de acetato de chumbo 10%, por 2 minutos. Centrifugou-se e resfriou-se a solução resultante. Ao líquido decantado, adicionou-se 15 mL de clorofórmio e procedeu-se a agitação. Repetiu-se o procedimento mais uma vez. A fim de destruir a emulsão formada, centrifugou-se novamente. Retirou-se, em seguida, a fase clorofórmica, agitando-a com quantidade suficiente (qs) de sulfato de sódio anidro e filtrando-a através de algodão.

Reação de Liebermann-Burchard (identificação do núcleo esteroidal)

Concentrou-se 3 mL do extrato até secura, em banho-maria, seguindo-se a adição ao resíduo de 1 mL de uma mistura recém-preparada de 50 mL de anidrido acético e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Aguardou-se 5 minutos e observou-se a

coloração na zona de contato, caracterizando reação positiva com o surgimento das cores castanho e verde.

Reação Salkowski (identificação do anel lactônico pentagonal)

Concentrou-se 5 mL do extrato *secura*. Ao mesmo, adicionou-se 1 mL de clorofórmio e 1 mL de ácido sulfúrico R, sem agitação. Observou-se a coloração na zona de contato, caracterizando reação positiva com o surgimento das cores rosa ou amarela.

Reação de Baljet (identificação do anel lactônico pentagonal)

Evaporou-se 3 mL da solução extrativa. Adicionou-se 7 a 8 gotas de solução de ácido pícrico a 0,5% e 2 gotas de hidróxido de amônio 1N. Observou-se o aparecimento de cor alaranjada intensa na solução final.

Reação de Kedde (identificação do anel lactônico pentagonal)

Evaporou-se, em banho-maria, 6 mL do extrato concentrado até *secura*. Adicionou-se ao resíduo 2 mL de álcool etílico 50°, 2 mL de água, 2 mL do reativo de Kedde (solução de ácido dinitrobenzóico 2%) e 2 mL de hidróxido de potássio 1N. Aguardou-se 5 minutos e observou-se a coloração final, caracterizando reação positiva com o surgimento das cores castanho-avermelhado ou vermelho violeta.

Reação de Keller-Kiliani (identificação de 2 desoxiaçúcares)

Evaporou-se, em banho-maria, 5 mL do extrato concentrado até *secura*. Adicionou-se 1 mL de ácido acético concentrado e 2 gotas de cloreto férrico 2%, assim como 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, sem agitação. Observou-se a coloração na zona de contato e na porção superior, caracterizando reação positiva com o surgimento das cores castanho-avermelhada e azul-esverdeada, respectivamente.

3.2.7. Óleos essenciais (COSTA, 1994, WADT, 2000)

Triturou-se cerca de 2g da folha seca com quantidade de éter suficiente para umedecê-la. Foi adicionado 1 gota desse extrato em papel de filtro e aguardou-se a evaporação do éter. Por fim, verificou-se a formação de mancha oleosa, assim como odor característico.

3.3. Preparo dos extratos líquidos

Para obtenção dos extratos glicólicos, de ambas as espécies, utilizou-se o método de Percolação Fracionada, empregando como solvente uma solução contendo 70% de propilenoglicol e 30% de água destilada (FARMACOPÉIA, 1959).

3.4. Obtenção dos Óleos Essenciais

Submeteu-se ao processo de hidrodestilação, em aparelho de Clevenger para arraste dos óleos essenciais, as porções frescas (flores e folhas) das plantas estudadas (FARMACOPÉIA, 1988).

3.4.1. Perfil fitoquímico dos óleos essenciais

Encaminhou-se amostras do óleo essencial do *R. officinalis* L. e da *Baccharis dracunculifolia* DC. ao Laboratório de Química da Universidade do Rio Grande do Sul para execução das análises qualitativa e quantitativa dos constituintes químicos presentes nos mesmos, através da técnica de cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG – EM), respectivamente. Utilizou-se 1µL das amostras. Realizou-se a cromatografia gasosa em um cromatógrafo Shimadzu CG-17A com detector de ionização de chama, equipado com o programa Shimadzu CG 10, usando a coluna capilar de sílica DB-5 (30m x 0.25 mm x 0.25 µm) sendo as temperaturas do injetor e detector de 220°C e 250°C, respectivamente. Programou-se a temperatura do forno da coluna de 60°-300°C à 3°C/min empregando-se hélio como gás de arraste (1mL/min) em todas as análises.

Determinou-se a composição percentual através da integração automática da área dos picos obtidos por CG correspondente aos componentes químicos.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG – EM) foi realizada em um sistema CG capilar Shimadzu – EM quadrupólo (QP 5000) operando a 70 elétron-volts (70 eV) nas mesmas condições descritas anteriormente para a CG. Identificou-se as substâncias por comparação dos índices de retenção de Kovats, determinados relativamente ao tempo de retenção de uma série de n-alcenos, e do espectro de massas com uma base de dados contendo padrões comparativos freqüentemente encontrados em óleos voláteis (ADAMS, 1995; JENNINGS, SHIBAMOTO, 1980).

3.5. Atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais

Microrganismos: *Staphylococcus aureus* (American Type Cultura Collection - ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Streptococcus mutans* (isolado a partir de mucosa oral pelo Núcleo de Ciências Ambientais – NCA - da Universidade de Mogi das Cruzes) (AL-HEBSHI *et al*, 2006; MONROY *et al*, 2005; CICCONE *et al*, 2004; MEILLER *et al*, 2001; GEBARA *et al*, 1996)

OBS: todas as soluções, meios de cultura e vidrarias empregados no teste foram previamente esterilizados a 121°C , 1 atm por 20 minutos.

3.5.1. Padronização dos microrganismos

A partir de culturas-estoque, os microrganismos foram repicados em estrias, na superfície do meio inclinado Agar Triptona Soja (TSA), para as bactérias e em Agar Batata Dextrose (BDA), para a levedura, sendo então incubados, a 37°C por 24h e 48h respectivamente. A massa celular, resultante do crescimento, foi recolhida em cerca de 5 mL de solução salina estéril. A partir da suspensão original de cada microrganismo foram feitas diluições sucessivas (10^{-1} a 10^{-7}), também em solução fisiológica estéril,

sendo as três últimas plaqueadas, em duplicata, através da técnica de semeadura em profundidade. As placas foram incubadas a 37°C por 24h (para bactérias) e 48h (para levedura) e então submetidas à contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) (UNITED, 2004; WADT, 2000).

3.5.2. Preparo das amostras

Testou-se os extratos e óleos em diferentes concentrações (5 e 10% para extratos e 0,5 e 1% para os óleos essenciais), sendo empregado como diluentes: solução salina 0,9% (no caso dos extratos) e solução salina 0,9% + 0,5% tween 20 (no caso dos óleos essenciais).

3.5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

3.5.3.1. Método A

Realizou-se este ensaio baseando-se na metodologia de Wadt (2000) com algumas modificações.

Em tubo de ensaio de 50 mL, adicionou-se 1 mL da cultura microbiana, de carga equivalente a 10^5 UFC/ mL (MEILLER *et al*, 2001), 1 mL da amostra a ser testada (extratos a 5 e 10% e óleos essenciais a 0,5 e 1%), deixando-os em contato, por 10 minutos. Após este período, adicionou-se 8 mL do meio de cultura Caldo Triptona Soja (TSB), agitou-se os tubos e retirou-se alíquota de 1 mL para plaqueamento por semeadura em profundidade, empregando-se meio de cultura TSA para bactérias e, BDA para levedura. Após incubação dos tubos e placas, a 37°C, por 24h (para bactérias) e 48h (para levedura), realizou-se a leitura da turbidez, espectrofotometricamente, em 500 nm, e a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) visualmente. Empregou-se como “branco” as respectivas amostras em meio de cultura TSB, sem a adição de microrganismos.

Efetou-se todo o teste em triplicata para os tubos e duplicata para as placas. Executou-se o teste três vezes. Para o controle positivo, reproduziu-se o ensaio

substituindo-se a amostra por 1 mL de solução salina e como controle negativo, somente o meio de cultura estéril.

A fim de descartar-se a interferência dos solventes utilizados no preparo dos extratos e solubilização dos óleos essenciais, realizaram-se dois testes, separadamente, empregando-se como amostra o propilenoglicol 70% e o tween 20 a 0,5% (HAMMER *et al*, 1999).

Para comprovar a eficiência do tempo de contato entre a amostra e o microrganismo (10 minutos) reproduziu-se o ensaio de modo semelhante, modificando-se, somente, a adição do microrganismo, efetuando-se a mesma subseqüentemente à adição do meio de cultura TSB.

3.5.3.2. Método B

O método B de avaliação da atividade antimicrobiana das amostras baseou-se no ensaio de difusão em ágar.

Efetuuou-se a camada base com 25mL de meio de cultura TSA, para as bactérias e BDA, para a levedura, em placas de Petri de 150mm de diâmetro. Após solidificação, adicionou-se 10mL do mesmo meio sólido citado anteriormente, previamente inoculado com o microrganismo em teste (carga 10^5 UFC/ mL). Decorrido o tempo de solidificação desta segunda camada, perfurou-se na mesma 5 “poços” de cerca de 4mm de diâmetro.

Aplicou-se 0,2mL das amostras, preparadas conforme item 4.5.2., mantendo-as, posteriormente, em temperatura ambiente por aproximadamente 120 minutos, a fim de promover a difusão das amostras antes do desenvolvimento dos microrganismos.

Incubou-se as placas a 37°C, por 24h, para bactérias e, 48h para a levedura. Decorrido o tempo de incubação realizou-se a leitura e medida do halo de inibição, utilizando-se um paquímetro, visualizados a olho nu.

Além das diferentes concentrações de extratos e dos óleos essenciais, de ambas as espécies estudadas, efetuou-se o teste também com o veículo dos extratos, propilenoglicol 70% e com o Tween 0,05%, utilizado na diluição dos óleos.

Realizou-se o ensaio em triplicata (UTYARNA, 2003).

3.6. Atividade antioxidante

Determinou-se a atividade antioxidante dos extratos, na concentração de 0,1%, como inibição da lipoperoxidação da membrana mitocondrial, esta, por sua vez, avaliada pela formação de malondialdeído (MDA). Incubou-se a suspensão mitocondrial (1,0 mg de proteína), juntamente com a amostra, em um meio contendo cloreto de potássio 130 mmol/L e HEPES-KOH 10 mmol/L, pH 7,4 a 30°C, adicionado de succinato de potássio 5 mmol/L, rotenona 2,5 $\mu\text{mol/L}$, $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 50 $\mu\text{mol/L}$ e citrato de sódio 2 mmol/L (substratos para a suspensão mitocondrial), por 30 minutos, a 37°C (volume final de 1,0 mL). Para determinação do MDA, adicionou-se 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1 % (m/v) (preparado em hidróxido de sódio 50 mmol/L), 0,1 mL de hidróxido de sódio 10 mol/L e 0,5 mL de ácido fosfórico 20 % (v/v), seguido por incubação durante 20 minutos, a 85°C. Extraiu-se o complexo MDA-TBA com 2,0 mL de *n*-butanol, determinou-se a absorvância, espectrofotometricamente em 532 nm e calculou-se a quantidade de MDA formada utilizando-se $\epsilon=1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Realizou-se o experimento em triplicata utilizando-se diferentes preparações mitocondriais e usando-se Fe^{2+} /citrato como agente indutor da lipoperoxidação. Efetuou-se, paralelamente, um ensaio controle, incubando-se a suspensão mitocondrial com o volume utilizado do veículo dos extratos, o propilenoglicol 70%, na ausência de ferro. (BUEGE, 1978; SILVA *et al*, 1999).

3.7. Toxicidade aguda

OBS: Conforme anexo 1, o ensaio de toxicidade aguda passou por aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo animais.

Testaram-se três concentrações crescentes dos extratos de *Baccharis dracunculifolia* DC. e do *Rosmarinus officinalis* L. (5, 10 e 20%). Realizou-se o mesmo ensaio empregando-se controles negativos: solução salina 0,9% e propilenoglicol 70% (veículo dos extratos).

- Empregaram-se oito grupos de dez camundongos cada, com peso em torno de 20g (espécie Swiss, provenientes do Biotério da Universidade de Mogi das Cruzes), sendo estes divididos em duas caixas, contendo cinco machos em uma e cinco fêmeas em outra.
- Diluiu-se as amostras nas concentrações acima mencionadas, em solução salina e administrou-se aos animais, em uma única dose, na proporção de 1 mL por 100g de peso.
- A partir da administração, observaram-se, durante um período de 14 dias consecutivos (inicialmente aos primeiros 30, 60, 120, 240 e 360 minutos e, depois, a cada 24h), parâmetros como comportamento geral (incluindo letargia, piloereção, dor entre outros), consumo de alimentos e de água.
- Decorrido o período supracitado, sacrificou-se os animais através de deslocamento cervical (BRITO, 1994).

3.8. Desenvolvimento da Formulação de Gel-Creme

3.8.1. Formulação Gel-Creme (OLIVEIRA, 2005)

Tabela 1: Componentes da formulação creme lanette® e gel de carbopol 940.

| Creme Lanette (35%) | Gel de Carbopol 940 (65%) |
|----------------------------|----------------------------------|
| Lanette N® (FO).....14% | Carbopol 940®1,5% |
| Phenonip® (FA).....0,5% | Phenonip®.....0,5% |
| BHT (FO).....0,05% | BHT0,05% |

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| EDTA (FA).....0,1% | EDTA.....0,1% |
| Água destilada (FA).....85,35% | Trietanolamina.....qs pH ~ 7,0 |
| | Água destilada.....qsp 100% |

* FA – fase aquosa FO – fase oleosa

3.8.2. Farmacotécnica da formulação

A formulação foi preparada em três etapas distintas, a saber:

1º - Preparo do Creme Lanette N®.

Preparou-se a emulsão através do método clássico de fabricação de emulsões, onde são aquecidos em torno de 70°C, separadamente, fase aquosa e oleosa. Depois de atingida a temperatura desejada, verteu-se a fase oleosa sobre a aquosa, sob agitação constante e não vigorosa (a fim de evitar a aeração do creme), até a formação da emulsão.

2º - Preparo de Gel de Carbopol®.

Em recipiente de inox, adicionou-se a água e os demais componentes, com exceção do Carbopol 940®. Homogeneizou-se através de agitação com bastão. Adicionou-se, lentamente e sem agitação, o Carbopol 940 sobre a superfície da água, deixando a mistura em repouso por cerca de 24h para hidratação do polímero. Passado este período procedeu-se a agitação da solução e corrigiu-se seu pH em torno de 7,0, empregando-se trietanolamina.

3º - Preparo Gel-Creme

A emulsão foi adicionada sobre o gel, aos poucos e sob agitação com espátula de inox, na proporção de 35% (creme) e 65% (gel).

4º - Incorporação dos ativos

Foram incorporadas duas concentrações de extrato, 5 e 10%, e óleo essencial, 0,5 e 1%, ao gel-creme desenvolvido, através da simples adição dos mesmos e homogeneização com espátula de inox.

3.8.3. Estudo de Estabilidade Acelerado

Realizou-se o estudo de estabilidade acelerado das seguintes formulações:

- Gel-creme com extrato de *R. officinalis* L. 5%
- Gel-creme com extrato de *R. officinalis* L. 10%
- Gel-creme com óleo essencial de *R. officinalis* L. 0,5%
- Gel-creme com óleo essencial de *R. officinalis* L. 1%
- Gel-creme com extrato de *B. dracunculifolia* DC. 5%
- Gel-creme com extrato de *B. dracunculifolia* DC. 10%
- Gel-creme com óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC. 0,5%
- Gel-creme com óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC. 1%
- Gel-creme (base sem incorporação de ativos)

Foram retiradas amostras de 100g cada do gel-creme e das formulações com extrato, e 20g cada para as que continham óleo essencial, sendo estas acondicionadas em potes plásticos brancos e armazenadas, em duplicata, sob diferentes condições de temperatura: estufa ($50 \pm 2^\circ\text{C}$), geladeira ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) e temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Como padrão, manteve-se uma amostra de cada formulação em temperatura ambiente.

Efetuuou-se o estudo durante um período de seis meses, durante o qual realizou-se análises físico-químicas e microbiológicas.

Os testes físico-químicos (pH, viscosidade, centrifugação, características organolépticas) foram realizados logo após o preparo da formulação (tempo 0), com 24h, 7, 15, 30, 60 e 90dias.

Todos os testes foram realizados após as amostras atingirem a temperatura ambiente (ANVISA, 2004).

3.8.3.1. Análises físico-químicas

3.8.3.1.1. Características organolépticas

Avaliaram-se os aspectos cor e odor das formulações, através do método visual e diretamente pelo olfato, respectivamente, comparando-se com as amostras-padrão (ANVISA, 2004).

3.8.3.1.2. Determinação de pH

Diluiu-se as amostras a 10% e, posteriormente, efetuou-se a determinação potenciométrica, empregando-se um pHmetro (FARMACOPÉIA, 1977).

3.8.3.1.3. Avaliação da Viscosidade

Avaliou-se a viscosidade utilizando-se o Viscosímetro de Brookfield. Para tanto, estabeleceu-se fusos e velocidades adequados e quantidade suficiente de amostra (RIBEIRO, 1996; BABY, 2004)

3.8.3.1.4. Centrifugação

Submeteu-se as amostras (3g) à centrifugação, por 10 minutos à 3000 rpm, e em seguida, avaliou-se as mesmas visualmente, de forma a identificar separação de fases, coalescência entre outras características de instabilidade da formulação. Expressaram-se os resultados conforme descrição no item 4.8.3.1.1. *Características organolépticas* (BABY, 2004).

3.9. Tratamento dos dados (análise estatística)

Submeteram-se os dados de atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais, assim como os do ensaio de Toxicidade aguda à análise pelo Teste estatístico ANOVA empregando-se α 5% e, quando necessário, ao teste de Tukey.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Análise Farmacognóstica

A análise fitoquímica dos constituintes da droga pode ser realizada de diversas maneiras como, por exemplo, através de reações cromáticas e de precipitação, e tem por objetivo determinar as classes de compostos químicos que constituem a mesma. Desta forma, é possível também relacionar estes componentes com as atividades biológicas desempenhadas pela planta.

Após avaliação fitoquímica do *R. officinalis* L. (alecrim) e da *B. dracunculifolia* DC. (alecrim-do-campo), como descrito nas tabelas 2, 3 e 4, pôde-se verificar que ambas possuem composição semelhante, apresentando as classes de compostos: taninos, flavonóides e óleo essencial.

Identificou-se os taninos, por meio de reações gerais que caracterizam o grupo como um todo, como a reação com a gelatina, baseada na propriedade de precipitação de proteínas por estas substâncias e, também, por ensaios que identificam grupamentos químicos isoladamente (taninos hidrolisáveis e condensados), sendo o caso das reações com acetato de chumbo e cloreto férrico, esta última menos específica por apresentar resultado positivo com outros compostos polifenólicos (SIMÕES *et al*, 2002).

A reação com o acetato de chumbo levou à identificação de taninos pirogálicos e condensados no *R. officinalis* L. e na *B. dracunculifolia* DC.. Este ensaio foi efetuado inicialmente com a adição de ácido acético diluído, em função deste reagente conservar

dissolvidos, na solução, os taninos condensados, possibilitando-se a identificação dos galotaninos (pirogálicos) pela formação de precipitado (COSTA, 2000). Um segundo teste compreendeu a adição de um agente oxidante, no caso, o cloreto férrico, devido aos taninos serem compostos facilmente oxidáveis. A alteração de coloração para verde a castanho confirmou, em ambas as plantas, a existência de pirocatéquicos (taninos condensados). Uma hipótese para a não confirmação dos galotaninos (hidrolisáveis) na reação anterior poderia ser sua concentração na amostra, talvez, inferior a dos taninos condensados.

A precipitação que ocorre em quase todos os ensaios de pesquisa destes compostos pode ser explicada pela oxidação e polimerização destas substâncias, tornando-as menos solúveis na água (COSTA, 2000).

Os resultados encontrados para a *Baccharis dracunculifolia* DC. mostram-se de acordo com Espírito-Santo *et al* (1999) os quais identificaram taninos na constituição da planta e também relacionaram sua concentração com uma maior disponibilidade de água e nutrientes, assim como, sua produção mais acentuada nos meses de dezembro a abril pela maior incidência de luz e maior teor de umidade, características do clima de Belo Horizonte nesta época do ano.

Embora as amostras estudadas no presente trabalho não tenham sido analisadas quantitativamente com relação aos taninos, acredita-se que o fato das mesmas terem sido adquiridas entre julho e setembro, não alterou significativamente o teor destes compostos fenólicos devido à região de coleta, Mogi das Cruzes, apresentar um clima extremamente úmido durante praticamente todo o ano.

Quanto ao *R. officinalis* L., apenas Cunha *et al* (2003), dentre os vários estudos sobre o alecrim, mencionou a presença de taninos.

Os flavonóides, por sua vez, podem, assim como os taninos, serem caracterizados por algumas reações cromáticas como a da cianidina (ou Shinoda), com hidróxidos alcalinos, cloreto férrico e de alumínio (COSTA, 2000).

Os ensaios foram conduzidos, baseados na presença de hidroxilas fenólicas nestes compostos, as quais explicam várias propriedades como solubilidade em hidróxidos alcalinos e conseqüente surgimento de coloração amarela; redução dos derivados flavônicos, através da adição de ácido e magnésio metálico e também no

aparecimento de fluorescência intensa de tonalidade amarelada, quando em contato com cloreto de alumínio, sob luz ultravioleta (COSTA, 2000).

Conforme verificou-se e, de acordo com Oluwatuyi *et al* (2004), Cunha *et al* (2003), D'Amélio (1999), Bisset (1994), Duke (1992) os flavonóides presentes no alecrim, em sua maioria, pertencem à classe das flavonas, como, por exemplo, a apigenina, luteolina e a diosmina.

Alencar *et al* (2005) também descreveu as flavonas no alecrim-do-campo, assim como Park *et al* (2004) encontrou o canferol (um flavonol).

As demais classes de compostos pesquisadas não foram encontradas no *R. officinalis* L. e na *B. dracunculifolia* DC..

Tabela 2: Análise farmacognóstica de taninos nas drogas vegetais *R. officinalis* L. e *B. dracunculifolia* DC.

| Tipo de ensaio | <i>R. officinalis</i> L. | <i>B. dracunculifolia</i> DC. |
|---|--------------------------|-------------------------------|
| Acetato de chumbo 10% (com ácido acético) | + (precipitado) | + (precipitado) |
| Acetato de chumbo 10% (sem ácido acético) | + (precipitado) | + (precipitado) |
| Acetato de cobre 3% | + (precipitado) | + (precipitado) |
| Cloreto férrico 2% | + (verde) | + (castanho) |
| Gelatina 2,5% | + (precipitado) | + (precipitado) |

Índice: + presença - ausência

Tabela 3: Análise farmacognóstica de flavonóides nas drogas vegetais *R. officinalis* L. e *B. dracunculifolia* DC.

| Tipo de ensaio | <i>R. officinalis</i> L. | <i>B. dracunculifolia</i> DC. |
|----------------|--------------------------|-------------------------------|
|----------------|--------------------------|-------------------------------|

| | | |
|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Reação de Shinoda ou cianidina | + (castanha) | + (rósea) |
| Reação com cloreto férrico 4,5% | + (verde) | + (verde) |
| Cloreto de alumínio 5% | + | + |
| | (fluorescência amarela intensa) | (fluorescência amarela intensa) |
| Hidróxidos alcalinos | + (amarelo) | + (amarelo) |
| Índice: + presença - ausência | | |

Tabela 4: Análise farmacognóstica de óleo essencial nas drogas vegetais *R. officinalis* L. e *B. dracunculifolia* DC.

| Tipo de ensaio | <i>R. officinalis</i> L. | <i>B. dracunculifolia</i> DC. |
|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Extração com éter (mancha e odor) | + | + |
| Índice: + presença - ausência | | |

4.2. Perfil fitoquímico dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas extremamente complexas de substâncias lipofílicas, em geral odoríferas e líquidas. A produção destas substâncias nas plantas está geralmente associada à presença de estruturas secretoras especializadas, tais como tricomas glandulares, como é o caso do *R. officinalis* L., ductos de óleos ou resinas, que contêm grande variedade de terpenos, considerados os sítios primários de acúmulos desse material.

Embora saibamos que a composição química dos óleos essenciais é determinada geneticamente, assim como específica para determinado órgão da planta e

característica para seu estágio de desenvolvimento, outros fatores, como as condições ambientais (temperatura, exposição ao sol, umidade relativa) em que ocorre o cultivo e mesmo a coleta, podem alterar significativamente o resultado final. De modo geral, apresentam em sua constituição, principalmente compostos terpênicos, como os monoterpenos, os sesquiterpenos e seus derivados, sendo os primeiros os mais freqüentes (TROMBETTA *et al*, 2005; BREHM-STECHER, JOHNSON, 2003; SIMÕES *et al*, 2002).

Segundo Trombetta *et al* (2005), acredita-se, que os monoterpenos possuam atividade antimicrobiana por desencadearem efeitos tóxicos na estrutura e na função das membranas das células dos microrganismos, como, por exemplo, alterações na fluidez e permeabilidade e interação com componentes internos da célula, ações estas, explicadas, principalmente, pelo caráter lipofílico destas substâncias.

Para avaliarmos a composição química dos óleos voláteis das duas espécies estudadas, empregamos a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG – EM), onde pudemos identificar as substâncias presentes, como pode ser visto na tabela 5 e figuras 6 e 7, através da comparação dos tempos de retenção e do espectro de massas das mesmas com uma base de dados contendo padrões comparativos freqüentemente encontrados em óleos voláteis (ADAMS, 1995; JENNINGS, SHIBAMOTO, 1980).

No *R. officinalis* L. foram identificadas vinte diferentes substâncias, a maioria de origem monoterpênica.

Como componente majoritário, encontramos os monoterpenos cânfora (32,4%), seguida pelo 1,8-cineol (17,6%), o mirceno (10,3%) e o alfa-pineno (9,2%), resultados semelhantes aos descritos por Kabouche *et al* (2005), Lopez *et al* (2005), Porte e Godoy (2001) e Giordani *et al* (2004).

Segundo Limberger *et al* (2001) várias são as atividades biológicas relacionadas à substância 1,8-cineol (ou eucaliptol) entre elas a broncodilatadora, sedativa, antiinflamatória e analgésica. Já o composto alfa-pineno apresenta propriedades antiinflamatória, expectorante e antimicrobiana.

Atti-Santos *et al* (2005), analisando 19 amostras de óleo essencial de alecrim, encontrou como compostos principais o alfa-pineno (40,55 a 45,10%), o 1,8-cineol

(17,40 a 19,35%), canfeno (4,73 a 6,06%) e verbenona (2,32 a 3,86%), sendo que, em relação à concentração, apenas o 1,8-cineol e a verbenona estão em concordância com o encontrado no presente trabalho.

Considerando também o clima frio (nos meses de julho a setembro) da região, onde foram obtidas as amostras, de acordo com Celiktas *et al* (2005), deveríamos ter encontrado valores altos de cânfora e verbenona e mais baixos de 1,8-cineol, o que não se verificou completamente na prática.

Já Tognolini *et al* (2006) e Saccheti *et al* (2005) verificaram um teor mais expressivo de verbenona no alecrim estudado, entretanto, encontramos 4,7% deste composto.

Ao contrário do *R. officinalis* L., a *B. dracunculifolia* DC. apresentou em sua composição, principalmente, estruturas sesquiterpênicas (quinze dos vinte e cinco itens identificados), estando em predominância o e-nerolidol (33,35%), em acordo com Arduin (2000) e Ferracini *et al* (1995).

Ferracini *et al* (1995), também verificou haver uma maior razão entre os constituintes monoterpênicos / sesquiterpênicos em épocas do ano com maior índice de chuvas, o que justificaria a maior quantidade de sesquiterpenos na amostra avaliada em nosso estudo, visto a mesma ter sido coletada em uma época do ano onde não há uma incidência de chuvas muito elevada.

Em concentrações menores, também foram detectados o biciclogermacreno (6,18%), o β -pineno (7,3% - um monoterpene) e o espatulenol (6,08%), o limoneno (5,57%) e o β -cariofileno (5,51%) dentre outros. O β -cariofileno é conhecido por sua propriedade antiinflamatória.

Arduin (2000) e Loaysa *et al* (1995), também descreveram a presença de α e β -pinenos, e limoneno (monoterpenos) e δ -cadineno (sesquiterpeno), sendo, nos estudos de Loyasa, o β -pineno o composto majoritário. No presente estudo, esta substância foi caracterizada como o monoterpene em maior concentração, mas não como majoritário.

Tabela 5: Perfil fitoquímico do óleo essencial de *R. officinalis* L. e *B. dracunculifolia* DC. obtido por Cromatografia Gasosa.

| <i>R. officinalis</i> L. | | <i>B. dracunculifolia</i> DC. | |
|---------------------------------|----------|--------------------------------------|----------|
| Composto | % | Composto | % |
| Alfa-pineno | 9,2 | Alfa-pineno | 2,29 |
| Beta-pineno | 4,7 | Beta-pineno | 7,3 |
| Mirceno | 10,3 | Mirceno | 0,68 |
| Limoneno | 3,0 | Limoneno | 5,57 |
| Beta-cariofileno | 4,3 | Beta-cariofileno | 5,51 |
| Alfa-terpineno | 0,3 | Não identificado | 0,3 |
| Orto-cimeno | 0,7 | Beta-elemeno | 0,9 |
| Alfa-fencheno | 3,8 | Triciclono | 0,55 |
| 1, 8-cineol | 17,6 | Aromadendreno | 0,97 |
| Gama-terpineno | 1,1 | Alfa-humuleno | 1,31 |
| Terpinoleno | 0,6 | Beta-santaleno | 1,32 |
| Linalol | 0,9 | Não identificado | 1,06 |
| Não identificado | 0,1 | Germacreno D | 5,21 |
| Não identificado | 0,4 | Biciclogermacreno | 6,18 |
| Cânfora | 32,4 | Alfa-muuroleno | 1,03 |
| Não identificado | Traços | Gama-cardineno | 0,85 |
| Borneol | 1,1 | Delta-cardineno | 4,06 |
| n-nonanol | 0,2 | Cadina-1, 4 – dieno | 1,55 |

| | | | |
|-----------------------|-----|-------------------------------|-------|
| Terpinen-4-ol | 0,8 | e-nerolidol | 33,35 |
| Alfa-terpineol | 1,5 | Não identificado | 0,37 |
| Verbenona | 4,7 | Espatulenol | 6,08 |
| Acetato de isobornila | 1,2 | Oxido de cariofileno | 3,44 |
| Alfa-humuleno | 0,8 | Globulol | 1,44 |
| Não identificado | 0,1 | Epi-globulol | 0,13 |
| | | Oxido de humuleno I | 1,42 |
| | | Alfa-muurolol | 2,15 |
| | | Cubenol | 0,34 |
| | | Não identificado | 3,46 |
| | | Eudesma-(4), 7-dien-1-beta-ol | 0,66 |

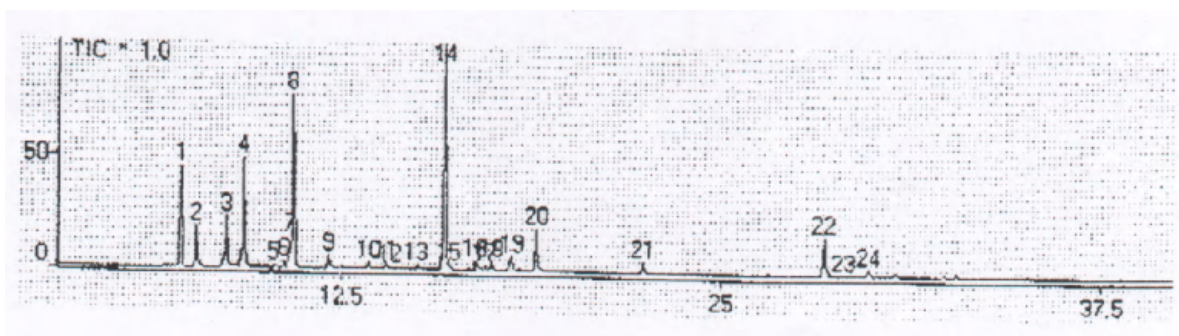


Figura 6: Cromatograma do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. obtido por Cromatografia Gasosa. Picos: (1) Alfa-pineno, 7,269; (2) Alfa-fencheno, 7,769; (3) Beta-pineno, 8,779; (4) Mirceno, 9,322; (5) Alfa-terpineno, 10,346; (6) Orto-cimeno, 10,359; (7) Limoneno,

10,862; (8) 1,8-cineol, 10,95; (9) Gama-terpineno, 12,142; (10) Terpinoleno, 13,449; (11) Linalol, 14,02; (12) não identificado, 13,133; (13) não identificado, 15,059; (14) Cânfora, 15,98; (15) não identificado, 16,092; (16) Borneol, 17,005; (17) N-nonanol, 17,319; (18) Terpinen-4-ol, 17,533; (19) Alfa-terpineol, 18,173; (20) Verbenona, 18,97; (21) Acetato de isobornila, 22,491; (22) Beta-cariofileno, 28,438; (23) não identificado, 29,1; (24) Alfa-humuleno, 29,879.

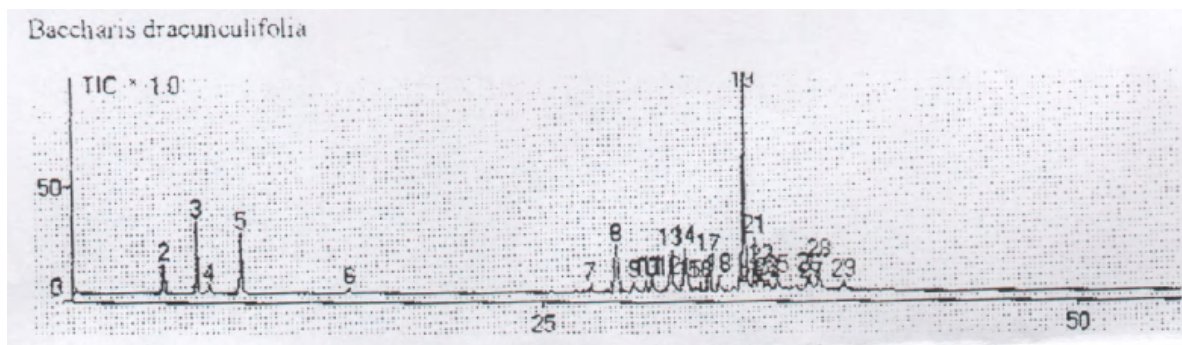


Figura 7: Cromatograma do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. obtido por Cromatografia Gasosa. Picos: (1) Triciclono, 7,242; (2) Alfa-pineno, 7,292; (3) Beta-pineno, 8,806; (4) Mirceno, 9,348; (5) Limoneno, 10,873; (6) não identificado, 15,947; (7) Beta-elemeno, 27,26; (8) Beta-cariofileno, 28,427; (9) Aromadendreno, 29,257; (10) Alfa-humuleno, 29,868; (11) Beta-santaleno, 30,166; (12) não identificado, 30,865; (13) Germacreno D, 31,684; (14) Bicyclgermacreno, 31,684; (15) Alfa-muuroleno, 31,831; (16) Gama-cardineno, 32,385; (17) Delta-cardineno, 32,773; (18) Cadina-1,4-dieno, 33,221; (19) E-nerolidol, 34,458; (20) não identificado, 34,75; (21) Espatuleno, 34,978; (22) Óxido de cariofileno, 35,245; (23) Globulol, 35,55; (24) Epi-globulo, 35,65; (25) Óxido de humuleno I, 35,979; (26) Alfa-muurolo, 37,463; (27) Cubenol, 37,621; (28) não identificado, 37,95; (29) Eudesma-(4),7-dien-1-beta-ol, 39,138.

4.3. Atividade antimicrobiana

Dado o constante surgimento de novos microrganismos resistentes a antimicrobianos, torna-se imprescindível tomar algumas medidas para contornar tal problema como, por exemplo, uma política de uso racional destas substâncias, estudo dos mecanismos genéticos de resistência e, principalmente, o desenvolvimento contínuo e a pesquisa de novas moléculas com esta propriedade, tanto de origem vegetal quanto as sintéticas. Empregando-se ferramentas como a etnofarmacologia,

este processo de desenvolvimento torna-se ainda relativamente mais rápido e com um menor custo.

Com esta finalidade, a propriedade antimicrobiana das plantas *R. officinalis* L. e *Baccharis dracunculifolia* DC. foi avaliada. A escolha dos microrganismos foi baseada nas cepas que estão em maior evidência, do ponto de vista patológico, na mucosa oral, como, por exemplo, os microrganismos oportunistas *S. aureus* e *C. albicans* e, ainda o *S. mutans*, este último intimamente relacionado à formação de placa bacteriana e cárie dental (AL-HEBSHI *et al*, 2006; MONROY *et al*, 2005; CICCONE *et al*, 2004).

Embora existam inúmeros trabalhos avaliando a propriedade antimicrobiana de plantas medicinais, muitas são as dificuldades em conseguirmos relacioná-los e chegar-se a uma conclusão, pois além dos diversos métodos disponíveis, há também fatores diferenciais como, por exemplo, crescimento e carga microbiana, solubilidade dos extratos e óleos essenciais nos meios de cultura, uso e quantidade de agentes emulsificantes, entre outros.

No presente trabalho, avaliamos a atividade antimicrobiana por meio de dois ensaios, primeiramente o método fotométrico, isto é a leitura da turbidez do meio onde se encontram em contato microrganismo e amostra e, secundariamente, após o tempo de contato, a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Empregamos ambos, pois o teste fotométrico, embora de resposta rápida, sem efeitos de difusão e de fácil operação, mede apenas a massa celular e não o número de células, não sendo, portanto, quantitativo (PINTO, KANEKO, 2000).

Segundo Avancini *et al* (2000) a concentração mínima inibitória (CMI) de uma substância pode ser definida como a menor concentração onde não se visualiza crescimento microbiano (ausência de turvação), assim como, a concentração bactericida mínima (CBM) é também a menor concentração (plaqueada a partir dos tubos de CMI sem turvação) com ausência de desenvolvimento do microrganismo em placa.

Partindo-se deste princípio, consideraram-se as amostras com baixo valor de absorvância, seguidas de uma alta contagem de UFC como indicativo de uma possível atividade bacteriostática ou fungistática, visto ter ocorrido uma inibição inicial no crescimento do microrganismo, com posterior regeneração e desenvolvimento, quando

transferido para um meio de cultura novo, com nutrientes e condições favoráveis (ver tabelas 6, 7 e 8).

Desta forma, pôde-se observar que o extrato de *B. dracunculifolia* DC., a 5 e 10%, assim como o óleo essencial a 0,5 e 1%, apresentaram, quanto ao ensaio fotométrico, ação significativa ($P < 0,05$) contra os três microrganismos testados.

O extrato de *R. officinalis* L., por sua vez, mostrou efetividade ($P < 0,05$) frente ao *S. aureus* e *S. mutans*, apenas na concentração de 10%. O óleo essencial à 1% apresentou atividade em relação aos três microrganismos testados, entretanto a 0,5% somente o *S. aureus* e a *C. albicans* foram susceptíveis.

As substâncias relacionadas anteriormente, nas concentrações testadas, não mostraram atividade bactericida, porém todas elas promoveram a redução de um a dois ciclos logarítmicos de crescimento microbiano, à exceção do extrato da *B. dracunculifolia* DC. 10%, responsável pela diminuição em três ciclos logarítmicos de reprodução de *S. aureus*.

Estas pequenas reduções sugerem que, em maiores concentrações, os extratos e óleos essenciais das duas plantas estudadas, possam apresentar atividade bactericida, podendo, conforme sua potência, até mesmo serem empregados como agentes desinfetantes ou anti-sépticos, substâncias estas que requerem uma redução de cinco a seis ciclos logarítmicos.

O resultado obtido para o óleo essencial do alecrim mostra-se semelhante ao que foi descrito por Hammer *et al* (1999), embora, este, tenha determinado a concentração mínima inibitória deste óleo (1%), em teste empregando a mesma levedura e o *S. aureus* (carga de 10^4 UFC / mL). Já Kabouche *et al* (2005) considerou que a mesma substância não apresenta atividade contra esta bactéria, entretanto, empregou no estudo o dobro da carga de microrganismo (10^8 UFC / mL) e a concentração de apenas 0,01% do óleo essencial, impossibilitando, desta forma, uma correta relação entre os trabalhos.

Alguns autores relacionam a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais à presença de substâncias com núcleos aromáticos e grupos funcionais polares, os quais, possivelmente sensibilizam a bicamada lipídica das células dos microrganismos, levando à alteração da atividade dos canais de cálcio, com conseqüente aumento na

permeabilidade e liberação dos constituintes intracelulares vitais ou então, por serem compostos muito reativos, formam pontes de hidrogênio com sítios ativos de enzimas, inativando-as (PORTE, GODOY, 2001).

Os valores encontrados nos controles realizados, controle positivo (microrganismo + meio de cultura), controle dos solventes (propilenoglicol 70% + microrganismo + meio de cultura), empregados como veículo dos extratos, e solução de tween 20 (tween 20 0,5 % + microrganismo + meio de cultura), utilizada para aumentar a solubilidade dos óleos essenciais no teste (HAMMER *et al*, 1999), com exceção do ensaio frente ao *S. aureus*, não diferiram ($P>0,05$) significativamente entre si, o que nos indicou não haver atividade antimicrobiana contra a *C. albicans* e o *S. mutans*. Já frente ao *S. aureus*, o propilenoglicol a 70% demonstrou ligeira ação antibacteriana, quando da avaliação da turbidez, embora, pela contagem de UFC/mL tenha sido semelhante ao controle positivo. Por outro lado, segundo Rowe *et al* (2003), o solvente propilenoglicol, possui propriedade conservante e, portanto, antimicrobiana, nas concentrações de 15 a 30%, o que, portanto, não pôde ser comprovado nos ensaios desenvolvidos no presente trabalho.

Desta forma, para poder-se confirmar uma real propriedade bactericida ou fungicida, testes com concentrações maiores das amostras devem ser realizados.

Tabela 6: Absorbância e contagem média (UFC / mL) de diferentes concentrações de extrato e óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e *B. dracunculifolia* DC. frente a bactéria *S. aureus*.

| Amostra | <i>R. officinalis</i> L. | | <i>B. dracunculifolia</i> DC. | |
|--|--------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|
| | Absorbância | UFC / mL | Absorbância | UFC / mL |
| Extrato 5% | 1,310 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 1,120 | $> 6,5 \cdot 10^4$ |
| Extrato 10% | 0,536 | $2,59 \cdot 10^4$ | 0 | $6 \cdot 10^2$ |
| Óleo Essencial 0,5% | 0,265 | $3,05 \cdot 10^4$ | 0,066 | $2,04 \cdot 10^4$ |
| Óleo Essencial 1% | 0 | $1,37 \cdot 10^4$ | 0,057 | $2,08 \cdot 10^4$ |
| Controle positivo (meio+ 10^5 UFC/mL*) | 1,534 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 1,534 | $> 6,5 \cdot 10^4$ |
| Controle negativo (meio estéril) | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | |
|----------------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|
| Tween 0,5% | 1,451 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 1,451 | $> 6,5 \cdot 10^4$ |
| Propilenoglicol 70% | 1,378 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 1,378 | $> 6,5 \cdot 10^4$ |

* carga microbiana

Tabela 7: Absorbância e contagem UFC / mL de diferentes concentrações de extrato e óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e *B. dracunculifolia* DC. frente a bactéria *S. mutans*.

| Amostra | <i>R. officinalis</i> L. | | <i>B. dracunculifolia</i> DC. | |
|---|--------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|
| | Absorbância | UFC / mL | Absorbância | UFC / mL |
| Extrato 5% | 1,153 | $4,83 \cdot 10^4$ | 0,883 | $8,03 \cdot 10^3$ |
| Extrato 10% | 0,786 | $3,91 \cdot 10^4$ | 0,435 | $2,64 \cdot 10^3$ |
| Óleo Essencial 0,5% | 1,375 | $4,87 \cdot 10^4$ | 1,016 | $3,04 \cdot 10^4$ |
| Óleo Essencial 1% | 0,935 | $7,10 \cdot 10^3$ | 0,833 | $1,27 \cdot 10^4$ |
| Controle positivo (meio+10^5 UFC/mL*) | 1,611 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 1,611 | $> 6,5 \cdot 10^4$ |
| Controle negativo (meio estéril) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tween 0,5% | 1,673 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 1,673 | $> 6,5 \cdot 10^4$ |
| Propilenoglicol 70% | 1,526 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 1,526 | $> 6,5 \cdot 10^4$ |

* carga microbiana

Tabela 8: Absorbância e contagem UFC / mL de diferentes concentrações de extrato e óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e *B. dracunculifolia* DC. frente a levedura *Candida albicans*.

| Amostra | <i>R. officinalis</i> L. | | <i>B. dracunculifolia</i> DC. | |
|---|--------------------------|--------------------|-------------------------------|--------------------|
| | Absorbância | UFC / mL | Absorbância | UFC / mL |
| Extrato 5% | 1,103 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 0,756 | $3,95 \cdot 10^4$ |
| Extrato 10% | 1,064 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 0,622 | $4,80 \cdot 10^3$ |
| Óleo Essencial 0,5% | 0,479 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 0,610 | $7,71 \cdot 10^3$ |
| Óleo Essencial 1% | 0 | $4,84 \cdot 10^4$ | 0,485 | $2,01 \cdot 10^3$ |
| Controle positivo (meio+10^5 UFC/mL*) | 0,956 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 0,956 | $> 6,5 \cdot 10^4$ |

| | | | | |
|---|-------|--------------------|-------|--------------------|
| Controle negativo (meio estéril) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tween 0,5% | 0,912 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 0,912 | $> 6,5 \cdot 10^4$ |
| Propilenoglicol 70% | 0,901 | $> 6,5 \cdot 10^4$ | 0,901 | $> 6,5 \cdot 10^4$ |

4.4. Atividade antioxidante

Inúmeras doenças degenerativas, como câncer, esclerose múltipla e o próprio processo de envelhecimento estão relacionados com a ação de radicais livres formados em nosso organismo, assim sendo, a descoberta de novos compostos ou substâncias que apresentem atividade antioxidante é considerada de extrema importância e necessária para avanços no tratamento ou cura de tais processos e patologias. Além disso, substâncias antioxidantes também possuem um papel significativo na área de alimentos, visto inibirem os processos oxidativos que levam a alteração de sabores e odores destes produtos.

Para avaliação do potencial antioxidante dos extratos de *B. dracunculifolia* DC. e *R. officinalis* L. empregamos uma suspensão mitocondrial, extraída de ratos, visto ser esta organela uma produtora, constante, de radicais livres, e avaliamos o grau de lipoperoxidação através da formação de malondialdeído (MDA), um dos principais compostos gerados durante o processo oxidativo (BUEGE, 1978; SILVA *et al*, 1999).

O MDA formado foi então quantificado através de sua reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), onde resultou em um complexo de coloração avermelhada, o qual absorve em comprimento de onda entre 532 e 535 nm. Para viabilizar esta reação e a fim de aumentar sua sensibilidade e velocidade, empregamos um meio ácido e temperatura elevada (85°C) (BUEGE, 1978; SILVA *et al*, 1999).

Tanto o extrato de alecrim quanto o do alecrim-do-campo foram capazes de inibir completamente a lipoperoxidação induzida por Fe^{2+} /citrato em mitocôndrias isoladas, na concentração de 0,1% ($P < 0,05$). A inibição foi semelhante para ambos os extratos que reduziram os níveis de MDA na presença de ferro aos níveis do controle.

Tais resultados comprovam o que já havia sido verificado por Moreno *et al* (2006) o qual encontraram uma potente atividade antioxidante de extratos (solventes metanol e

acetona) de alecrim, através do método do 2,2-difenil-2-picrihidracil hidrato (DPPH). Acredita-se que esta ação seja desencadeada, principalmente, pela substância ácido carnósico e, secundariamente, pelo ácido rosmarínico, presentes em maior concentração nas folhas do alecrim, as quais, possivelmente, estão no extrato glicólico, considerada a polaridade semelhante dos solventes. Outros compostos, também presentes no alecrim, possivelmente responsáveis por esta propriedade foram descritos por Nakatani (2000), Porte e Godoy (2001) e Moreno *et al.* (2006) e são eles carnosol, rosmanol e epirosmanol.

Em ensaio preliminar (dados não descritos no trabalho), onde empregamos uma concentração dez vezes maior de extrato, 1%, obtivemos resultados contrastantes, visto haver uma ação potencializadora do processo oxidativo, tanto no *R. officinalis* L. quanto na *B. dracunculifolia* DC. e não mais, antioxidante. Este fato demonstrou haver um possível efeito pró-oxidante em concentrações mais elevadas já mencionado para outras substâncias como o alfa-tocoferol (RAMALHO, JORGE, 2006).

Leal e Meireles (2001) também verificaram a atividade pró-oxidante em quantidades mais elevadas de extrato (não citadas no trabalho), assim como em extratos de gengibre.

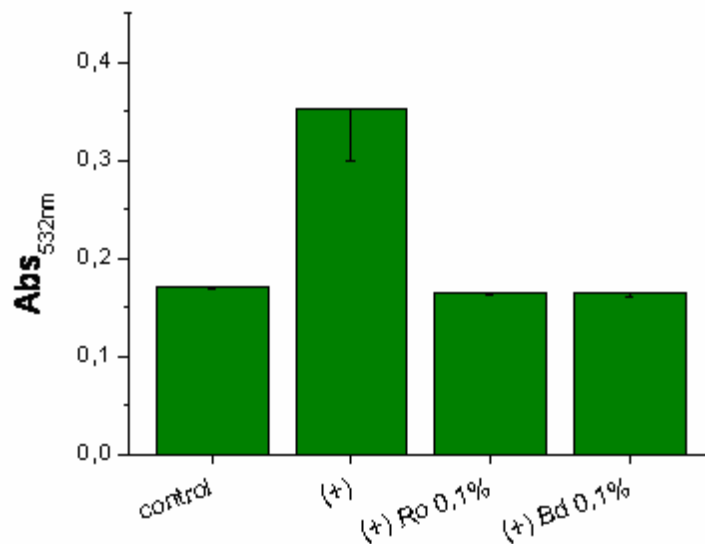


Figura 8: Atividade antioxidante dos extratos de *R. officinalis* L. e *Baccharis dracunculifolia* DC., onde (-) suspensão mitocondrial; (+) suspensão mitocondrial + Fe⁺² / citrato; ER 0,1% - extrato *R. officinalis* L. 0,1% + suspensão mitocondrial + Fe⁺² /

citrato; **EB 0,1%** - extrato *Baccharis dracunculifolia* DC. 0,1% + suspensão mitocondrial + Fe⁺² / citrato.

Análise estatística

| Amostra | Média (absorbância) | Desvio Padrão |
|--|---------------------|---------------|
| Controle negativo (suspensão mitocondrial) | 0,171 | 0,002 |
| Controle positivo (suspensão mitocondrial + Fe ⁺² / citrato) | 0,352 | 0,03 |
| Suspensão mitocondrial + Fe ⁺² / citrato + Extrato <i>R. officinalis</i> L. 0,1% | 0,164 | 0,001 |
| suspensão mitocondrial + Fe ⁺² / citrato + Extrato <i>B. dracunculifolia</i> DC. 0,1% | 0,165 | 0,002 |

O controle positivo (suspensão mitocondrial + indutor de oxidação) apresentou P<0,001 quando comparado ao controle negativo (suspensão mitocondrial); ao tratamento com extrato de *R. officinalis* L. e extrato de *B. dracunculifolia* DC. 0,1%.

Os ensaios com os extratos, entre si, apresentaram P>0,05, assim como os mesmos frente ao controle negativo.

4.5. Toxicidade Aguda

4.5.1. Peso

Neste trabalho não se avaliou a toxicidade aguda dos óleos essenciais, de ambas as espécies estudadas, em função da necessidade de emprego de grande quantidade de amostra no ensaio.

Embora não se encontre na literatura informações a respeito da toxicidade aguda dos extratos glicólicos de *R. officinalis* L. e *B. dracunculifolia* DC., pôde-se verificar que os animais, tanto o grupo de fêmeas quanto o de machos (ver tabelas 9 e 10), submetidos ao tratamento com os extratos nas concentrações de 5, 10 e 20%, não sofreram alterações significativas (P>0,05) em relação ao peso corpóreo quando comparados ao grupo controle, ao qual administrou-se solução fisiológica.

Além disso, analisou-se também a toxicidade do solvente empregado na obtenção dos extratos, propilenoglicol 70%, onde se observou comportamento semelhante ($P>0,05$) ao demonstrado pelos próprios extratos.

Tabela 9: Variação de peso médio dos animais machos durante o período de 14 dias consecutivos.

| Dias | Grupos | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|
| | SF | Propil | EB 5% | EB 10% | EB 20% | ER 5% | ER 10% | ER 20% |
| 1º | 0,58 | 0,90 | -0,50 | 0,14 | -0,63 | -0,63 | -0,83 | -0,35 |
| 2º | 0,36 | -0,21 | -0,02 | -0,17 | 0,17 | 0,56 | 0,15 | 0,21 |
| 3º | 0,13 | 0,18 | 0,13 | 0,48 | 0,18 | 0,49 | 0,13 | 0,16 |
| 4º | 0,42 | 0,41 | -0,24 | 0,14 | -0,04 | 0,41 | 0,20 | -0,18 |
| 5º | -0,24 | -0,24 | 0,10 | -0,05 | 0,68 | -0,18 | 0,07 | 0,22 |
| 6º | -0,62 | -0,31 | -0,39 | -1,09 | -0,16 | 0,24 | 0,16 | 0,14 |
| 7º | 0,31 | -0,09 | 0,25 | 0,89 | -0,33 | -0,07 | -0,05 | -0,14 |
| 8º | -0,52 | -0,46 | -0,22 | -0,62 | 0,08 | 0,14 | -0,10 | 0,26 |
| 9º | -0,10 | 0,38 | 0,43 | 0,09 | 0,44 | -1,02 | 0,24 | -0,06 |
| 10º | -0,15 | -0,53 | -0,25 | -0,05 | -0,02 | 0,29 | 0,22 | 0,27 |
| 11º | -0,18 | 0,05 | -0,07 | -0,05 | 0,08 | 0,50 | 0,32 | 0,53 |
| 12º | 0,32 | 0,38 | 0,14 | 0,37 | 0,66 | -0,39 | 0,06 | 0,30 |
| 13º | 0,07 | 0,12 | 0,21 | -0,14 | -0,24 | -0,08 | 0,30 | 0,20 |
| 14º | 0,13 | 0,17 | 0,23 | -0,33 | -0,07 | 0,22 | -0,20 | -0,07 |
| Média | 0,04 | 0,05 | -0,01 | -0,03 | 0,06 | 0,03 | 0,05 | 0,11 |
| σ | 0,35 | 0,39 | 0,27 | 0,47 | 0,36 | 0,46 | 0,29 | 0,23 |

* SF – solução fisiológica; Propil – propilenoglicol 70%; EB – extrato *B. dracunculifolia* DC.; ER – extrato *R. officinalis* L.; σ – desvio padrão.

Análise estatística

As comparações entre todos os grupos apresentaram $P>0,05$.

Tabela 10: Variação de peso médio dos animais fêmeas durante o período de 14 dias consecutivos.

| Dias | Grupos | | | | | | | |
|--------------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|
| | SF | Propil | EB 5% | EB 10% | EB 20% | ER 5% | ER 10% | ER 20% |
| 1º | -0,02 | 0,11 | 0,20 | 0,01 | 0,31 | 0,02 | 0,21 | -0,12 |
| 2º | 0,29 | 0,05 | 0,05 | -0,22 | -0,45 | -0,12 | 0,00 | -0,33 |
| 3º | 0,02 | 0,15 | -0,39 | 0,01 | -0,10 | -0,24 | -0,03 | -0,15 |
| 4º | -0,46 | -0,54 | -0,45 | -0,28 | -0,29 | -0,10 | -0,16 | -0,17 |
| 5º | -0,38 | 0,36 | 0,53 | -0,04 | 0,53 | 0,04 | 0,11 | 0,62 |
| 6º | 0,18 | -1,02 | -0,20 | -0,41 | 0,42 | 0,08 | -0,04 | 0,05 |
| 7º | 0,30 | 0,37 | 0,15 | -0,18 | 0,02 | 0,22 | 0,42 | 0,16 |
| 8º | -0,43 | -0,27 | -0,55 | -0,35 | -0,11 | -0,20 | -0,21 | 0,05 |
| 9º | 0,18 | 0,32 | 0,41 | 0,90 | 0,32 | 0,47 | 0,53 | -0,23 |
| 10º | -0,53 | 0,00 | -0,36 | -0,69 | 0,16 | 0,11 | 0,23 | 0,64 |
| 11º | 0,41 | -0,10 | 0,05 | -0,05 | 0,18 | 0,20 | 0,19 | 0,58 |
| 12º | 0,16 | 0,33 | 0,26 | 0,30 | 0,21 | 0,51 | 0,20 | -0,12 |
| 13º | 0,17 | -0,03 | 0,41 | 0,39 | 0,19 | 0,14 | 0,03 | 0,19 |
| 14º | -0,23 | -0,26 | 0,34 | 0,63 | 0,14 | 0,24 | -0,04 | 0,23 |
| Média | -0,02 | -0,04 | 0,03 | 0,001 | 0,11 | 0,10 | 0,10 | 0,10 |
| σ | 0,32 | 0,39 | 0,36 | 0,43 | 0,27 | 0,22 | 0,21 | 0,32 |

* SF – solução fisiológica; Propil – propilenoglicol 70%; EB – extrato *B. dracunculifolia* DC.; ER – extrato *R. officinalis* L.; σ – desvio padrão.

Análise estatística

As comparações entre todos os grupos apresentaram $P > 0,05$.

4.5.2. Consumo de Água e Alimento

Com relação ao consumo diário de alimentos (ração) e água (ver tabela 11), verificou-se não haver qualquer tipo de alteração significativa dos grupos tratados com os extratos, nas diferentes concentrações, quando comparados ao grupo controle (solução salina) ($P > 0,05$). O grupo tratado com o propilenoglicol também não apresentou resultados discrepantes dos demais ($P > 0,05$).

Tabela 11: Variação média do consumo de água e alimento dos diferentes grupos empregados no estudo de Toxicidade Aguda.

| Grupos | Sexo | Média | | σ |
|---|------|-------------------------------|-------------------------------|------|
| | | Variação Consumo de água (mL) | Média Consumo de Alimento (g) | |
| Solução fisiológica | M | 0,38 | 9,46 | 5,14 |
| | F | 1,15 | 5,83 | 6,08 |
| Extrato <i>R. officinalis</i> L. 5% | M | 0,77 | 9,09 | 4,50 |
| | F | 0,38 | 6,91 | 5,52 |
| Extrato <i>R. officinalis</i> L. 10% | M | 0,38 | 7,21 | 5,58 |
| | F | 0 | 5,40 | 3,42 |
| Extrato <i>R. officinalis</i> L. 20% | M | 0,77 | 7,60 | 4,26 |
| | F | 0,77 | 7,86 | 4,44 |
| Extrato <i>B. dracunculifolia</i> DC. 5% | M | 0,77 | 8,86 | 5,89 |
| | F | 0,38 | 5,94 | 5,58 |
| Extrato <i>B. dracunculifolia</i> DC. 10% | M | 0,38 | 10,10 | 5,53 |
| | F | 0 | 5,40 | 5,71 |
| Extrato <i>B. dracunculifolia</i> DC. 20% | M | 0,38 | 5,58 | 4,91 |
| | F | 0,38 | 8,53 | 4,89 |
| Propilenoglicol 70% | M | 0,38 | 13,30 | 4,03 |
| | F | 0,38 | 9,89 | 4,69 |

* M – macho; F – fêmea; σ – desvio padrão.

Análise estatística

As comparações entre todos os grupos, tanto relativas ao consumo de alimentos quanto ao de água, apresentaram $P > 0,05$.

4.5.3. Comportamento geral

Não houve alterações comportamentais dos animais durante o decorrer do ensaio, sendo apenas observado uma ligeira letargia e piloereção, em algumas das cobaias, incluindo as que receberam solução salina (grupo controle), nas primeiras horas subseqüentes à aplicação, havendo completa recuperação em menos de cinco horas.

4.6. Estudo de Estabilidade Acelerado

4.6.1. Análises físico-químicas

4.6.1.1. Determinação de pH

Pôde-se observar através do tempo zero das tabelas abaixo, que as adições dos extratos à base tornaram a mesma ligeiramente mais ácida, tanto para amostras contendo o alecrim quanto para as que continham o alecrim-do-campo. Tal fato é justificado pelo pH dos próprios extratos, 5,35 para o *R. officinalis* L. e 5,30 para a *B. dracunculifolia* DC.

Já os óleos essenciais das duas espécies, mesmo apresentando caráter levemente ácido (em torno de 5,0), não foram capazes de provocar grande alteração no pH da base em função da pequena quantidade dos mesmos incorporada a ela (0,5 e 1%).

As amostras contendo extratos, na concentração de 5 e 10%, de ambas as plantas (ver tabelas 13 e 14, figuras 10 e 12), não apresentaram alterações significativas ($P > 0,05$) quanto ao valor de pH observados em diferentes condições de armazenamento, durante todo o período de estudo (90 dias), assim como a base gel-creme (ver tabela 12 e figura 9), sem incorporação de nenhum ativo.

As que possuíam óleo essencial de alecrim e alecrim-do-campo, nas duas concentrações testadas (ver tabelas 13 e 14, figuras 11 e 13), mostraram uma diminuição significativa de pH ($P < 0,05$) quando comparados o armazenamento em estufa com o de ambiente e geladeira, sendo mais pronunciada a diferença entre as amostras conservadas em estufa frente às armazenadas em geladeira ($P < 0,01$). Isto pode ter ocorrido em função da maior degradação dos óleos essenciais em temperaturas mais elevadas, dada sua volatilidade.

Tabela 12: Análise da variação de pH das amostras de gel-creme acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias.

| Amostra | Local | pH |
|---------|-------|----|
|---------|-------|----|

| | | 0 | 24h | 7d | 15d | 30d | 60d | 90d | Média | σ |
|-----------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|-------|----------|
| | Geladeira | 6,70 | 6,68 | 6,73 | 6,79 | 6,76 | 6,72 | 6,71 | 6,79 | 0,10 |
| Gel-creme | Ambiente | 6,70 | 6,78 | 6,78 | 6,74 | 6,66 | 6,63 | 6,62 | 6,73 | 0,04 |
| | Estufa | 6,70 | 6,68 | 6,75 | 6,75 | 6,83 | 6,93 | 6,92 | 6,73 | 0,07 |

* d – dias; σ – desvio padrão

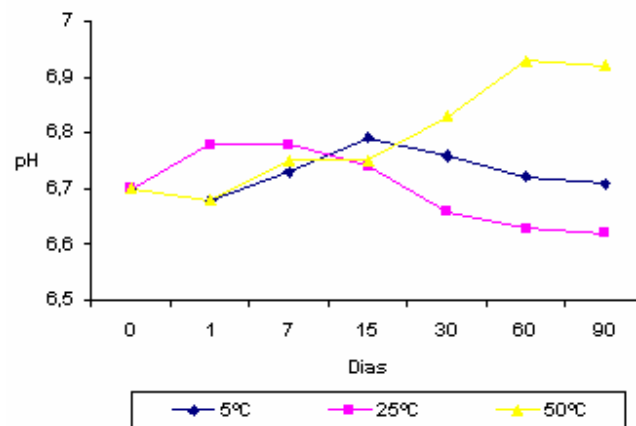


Figura 9: Variação de pH das amostras de gel-creme acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias.

Tabela 13: Análise da variação de pH das amostras de gel-creme contendo extrato ou óleo essencial de *R. officinalis* L., em diferentes concentrações, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias.

| Amostra | Local | pH | | | | | | | | σ |
|---|-----------|------|------|------|------|------|------|------|-------|----------|
| | | 0 | 24h | 7d | 15d | 30d | 60d | 90d | Média | |
| GC + E. <i>R. officinalis</i> L. 5% | Geladeira | 6,41 | 6,37 | 6,55 | 6,54 | 6,55 | 6,61 | 6,44 | 6,50 | 0,09 |
| | Ambiente | 6,41 | 6,41 | 6,44 | 6,45 | 6,52 | 6,66 | 6,62 | 6,50 | 0,10 |
| | Estufa | 6,41 | 6,53 | 6,61 | 6,44 | 6,39 | 6,27 | 6,09 | 6,39 | 0,17 |
| GC + E. <i>R. officinalis</i> L. 10% | Geladeira | 6,20 | 6,16 | 6,39 | 6,29 | 6,40 | 6,47 | 6,35 | 6,32 | 0,11 |
| | Ambiente | 6,20 | 6,26 | 6,33 | 6,42 | 6,45 | 6,54 | 6,23 | 6,16 | 0,22 |

| | | | | | | | | | | |
|--|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | Estufa | 6,20 | 6,27 | 6,42 | 6,29 | 6,14 | 6,02 | 5,75 | 6,35 | 0,13 |
| GC + OE. <i>R. officinalis</i> L. 0,5% | Geladeira | 6,71 | 6,74 | 6,78 | 6,74 | 6,86 | 6,81 | 6,76 | 6,77 | 0,05 |
| | Ambiente | 6,71 | 6,76 | 6,76 | 6,73 | 6,68 | 6,61 | 6,68 | 6,70 | 0,05 |
| | Estufa | 6,71 | 6,69 | 6,66 | 6,60 | 6,04 | 5,81 | 5,70 | 6,32 | 0,45 |
| GC + OE. <i>R. officinalis</i> L. 1% | Geladeira | 6,92 | 6,86 | 6,69 | 6,75 | 6,81 | 6,85 | 6,76 | 6,81 | 0,08 |
| | Ambiente | 6,92 | 6,70 | 6,73 | 6,73 | 6,66 | 6,59 | 6,70 | 6,72 | 0,10 |
| | Estufa | 6,92 | 6,59 | 6,52 | 6,54 | 6,33 | 6,21 | 6,19 | 6,48 | 0,25 |

* d – dias; E – extrato; OE – óleo essencial; σ – desvio padrão

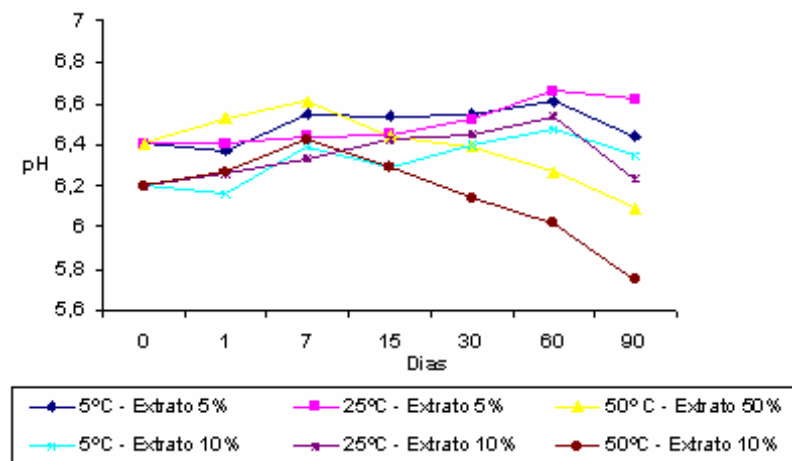


Figura 10: Variação de pH das amostras de gel-creme contendo extrato de *R. officinalis* L. a 5 e 10%, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias.

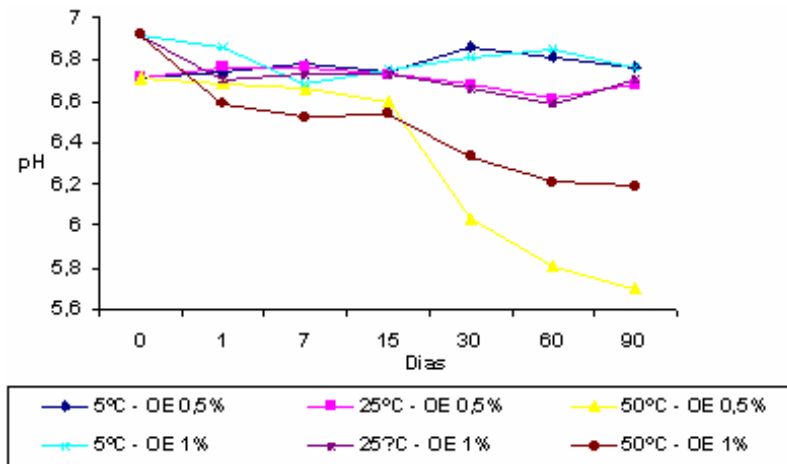


Figura 11: Variação de pH das amostras de gel-creme contendo óleo essencial de *R. officinalis* L. a 0,5 e 1%, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias.

Tabela 14: Análise da variação de pH das amostras de gel-creme contendo extrato ou óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC., em diferentes concentrações, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias.

| Amostra | Local | pH | | | | | | | Média | σ |
|--|-----------|------|------|------|------|------|------|------|-------|----------|
| | | 0 | 24h | 7d | 15d | 30d | 60d | 90d | | |
| GC + E. <i>B. dracunculifolia</i> DC. 5% | Geladeira | 6,61 | 6,34 | 6,56 | 6,49 | 6,56 | 6,64 | 6,31 | 6,50 | 0,13 |
| | Ambiente | 6,61 | 6,35 | 6,43 | 6,49 | 6,57 | 6,67 | 6,42 | 6,51 | 0,11 |
| | Estufa | 6,61 | 6,54 | 6,52 | 6,41 | 6,17 | 6,11 | 6,09 | 6,35 | 0,22 |
| GC + E. <i>B. dracunculifolia</i> DC. 10% | Geladeira | 6,21 | 6,18 | 6,38 | 6,25 | 6,32 | 6,34 | 6,12 | 6,26 | 0,09 |
| | Ambiente | 6,21 | 6,18 | 6,24 | 6,27 | 6,31 | 6,37 | 6,09 | 6,24 | 0,09 |
| | Estufa | 6,21 | 6,22 | 6,27 | 6,15 | 6,05 | 5,87 | 5,67 | 6,11 | 0,14 |
| GC + OE. <i>B.</i> | Geladeira | 6,85 | 6,82 | 6,75 | 6,66 | 6,80 | 6,91 | 6,83 | 6,80 | 0,08 |

| | | | | | | | | | | |
|--|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>dracunculifolia</i> DC. 0,5% | Ambiente | 6,85 | 6,81 | 6,77 | 6,74 | 6,73 | 6,66 | 6,74 | 6,70 | 0,08 |
| | Estufa | 6,85 | 6,62 | 6,62 | 6,55 | 6,40 | 6,23 | 6,20 | 6,50 | 0,23 |
| GC + OE. <i>B.</i> <i>dracunculifolia</i> DC. 1% | Geladeira | 6,73 | 6,73 | 6,78 | 6,73 | 6,80 | 6,82 | 6,74 | 6,76 | 0,04 |
| 1% | Ambiente | 6,73 | 6,78 | 6,77 | 6,76 | 6,68 | 6,61 | 6,59 | 6,70 | 0,08 |
| | Estufa | 6,73 | 6,61 | 6,57 | 6,51 | 6,28 | 6,00 | 5,91 | 6,37 | 0,32 |

* d – dias; E – extrato; OE – óleo essencial; σ – desvio padrão

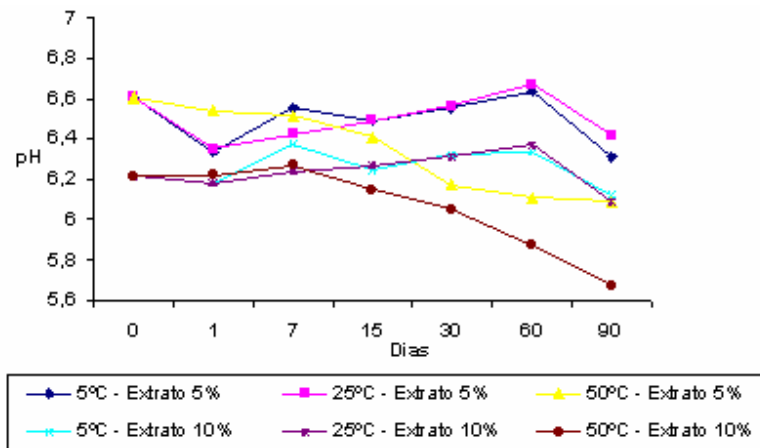


Figura 12: Variação de pH das amostras de gel-creme contendo extrato de *B. dracunculifolia* DC., a 5 e 10%, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias.

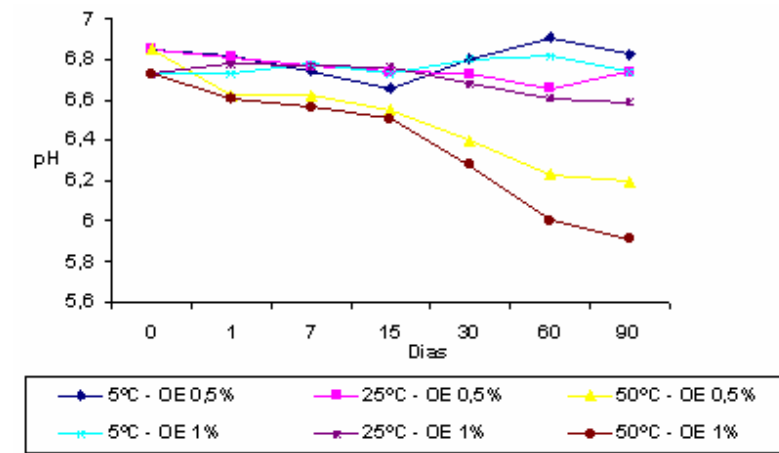


Figura 13: Variação de pH das amostras de gel-creme contendo óleo essencial de *B. dracunculifolia* DC., a 0,5 e 1%, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias.

4.6.1.2. Centrifugação

Todas as amostras avaliadas, quanto aos aspectos visuais de instabilidade, como por exemplo, separação de fases e coalescência, permaneceram íntegras durante o período de três meses do estudo de estabilidade.

4.6.1.3. Características organolépticas

As amostras contendo óleo essencial, das duas espécies estudadas, não apresentaram nenhuma alteração quanto à cor durante o período de 90 dias do estudo de estabilidade acelerado. Notou-se apenas uma sensível perda de odor nas amostras armazenadas em estufa, após 30 dias, o que seria justificável pela própria propriedade volátil dos óleos essenciais.

Com relação à base contendo os extratos, novamente tanto o alecrim quanto o alecrim-do-campo comportaram-se de modo semelhante, sendo que as amostras mantidas em estufa mostraram, após 60 dias, uma intensificação em sua coloração (maior para a concentração de 10% de extrato). Esta alteração, embora não seja

possível identificá-la, pode ser decorrente da degradação de substâncias presentes na formulação, como as matérias-primas da base ou dos constituintes do próprio extrato. Estas reações são aceleradas em temperaturas mais elevadas, daí sua melhor observação nas amostras conservadas em estufa (50°C).

Tabela 15: Características organolépticas das amostras-padrão de gel-creme (GC) contendo diferentes concentrações de extratos (ext.) e óleos essenciais (OE) do *R. officinalis* L. e da *B. dracunculifolia* DC.

| Amostras | Cor | Odor |
|--|--|---|
| Gel-creme (GC) | Branco, translúcido, sem partículas visíveis. | Característico |
| GC + extrato <i>R. officinalis</i> L. 5% | Amarelo-claro, opaco | Característico |
| GC + extrato <i>R. officinalis</i> L. 10% | Pardo, opaco | Característico |
| GC + Óleo essencial <i>R. officinalis</i> L. 0,5% | Branco, translúcido | Característico (+ intenso que o extrato) |
| GC + Óleo essencial <i>R. officinalis</i> L. 1% | Branco, translúcido | Característico (+ intenso que o extrato) |
| GC + extrato <i>B. dracunculifolia</i> DC. 5% | Amarelo-claro, opaco | Característico |
| GC + extrato <i>B. dracunculifolia</i> DC. 10% | Pardo, opaco | Característico |
| GC + Óleo essencial <i>B. dracunculifolia</i> DC. 0,5% | Branco, translúcido | Característico (+ intenso que o extrato) |
| GC + Óleo essencial <i>B. dracunculifolia</i> DC. 1% | Branco, translúcido | Característico (+ intenso que o extrato) |

4.6.1.4. Análise da viscosidade

Dado o baixo rendimento durante o processo de obtenção do óleo essencial, tanto da *B. dracunculifolia* DC. quanto do *R. officinalis* L., diminuiu-se a quantidade das amostras que continham tais substâncias destinadas ao estudo de estabilidade, impossibilitando, desta forma, a avaliação da viscosidade através do viscosímetro de Brookfield. Assim sendo, as amostras de gel-creme incorporadas com óleo essencial a 0,5 e 1% (de ambas as espécies estudadas) foram analisadas apenas visualmente quanto ao parâmetro de viscosidade, mantendo-se, após os 90 dias, sem alterações.

Quanto às amostras que continham o extrato das plantas a 5 e 10%, verificou-se, conforme pode ser observado na tabela 16, variações durante o início do ensaio e o término do mesmo, entretanto, nenhuma destas alterações foi considerada significativa ($P > 0,05$). Além disso, as variações observadas (ver tabela 16), embora pareçam elevadas, visualmente, são imperceptíveis para o consumidor leigo, como por exemplo, valores entre 113000cps e 101000cps, observados na amostra de gel-creme (base) acondicionada em geladeira.

As figuras 14, 15 e 16, facilitam a visualização do comportamento semelhante das amostras em diferentes condições de armazenamento (estufa, geladeira e temperatura ambiente). Comparando-se os valores iniciais de viscosidade, por exemplo, pôde-se observar que os mesmos decaíram conforme o aumento da concentração de extrato, fato este justificado pela maior quantidade de líquido (extrato) incorporado à base (gel-creme).

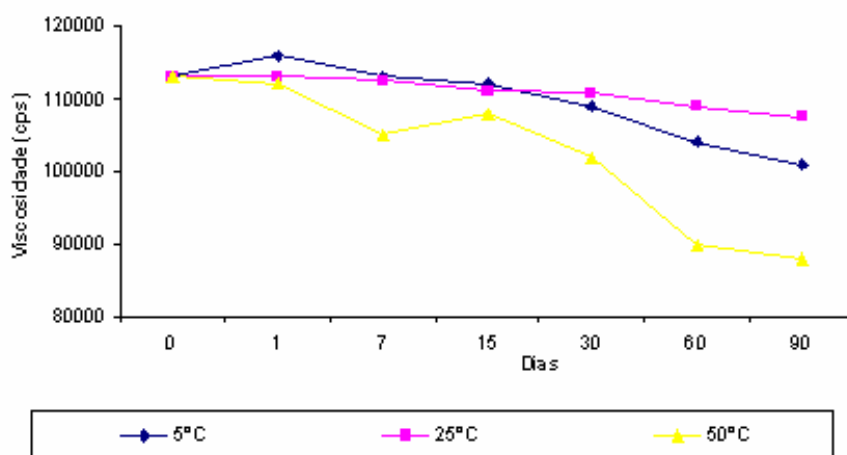


Figura 14: Variação de viscosidade das amostras de gel-creme acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias.

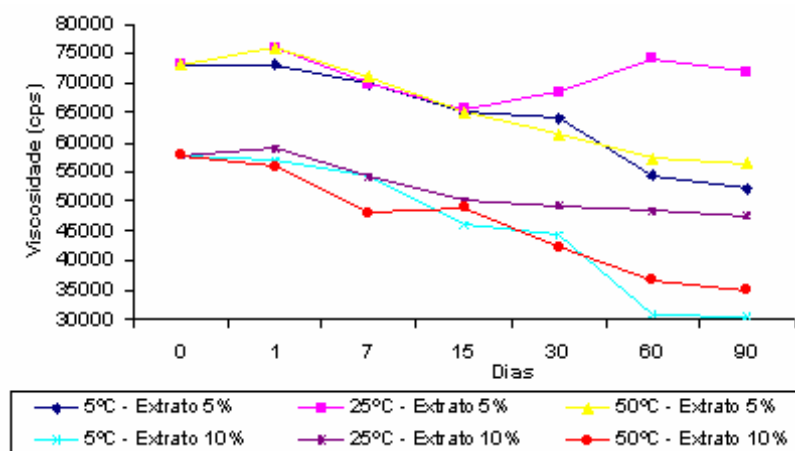


Figura 15: Variação de viscosidade das amostras de gel-creme com extrato de *B. dracunculifolia* DC., 5 e 10%, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias.

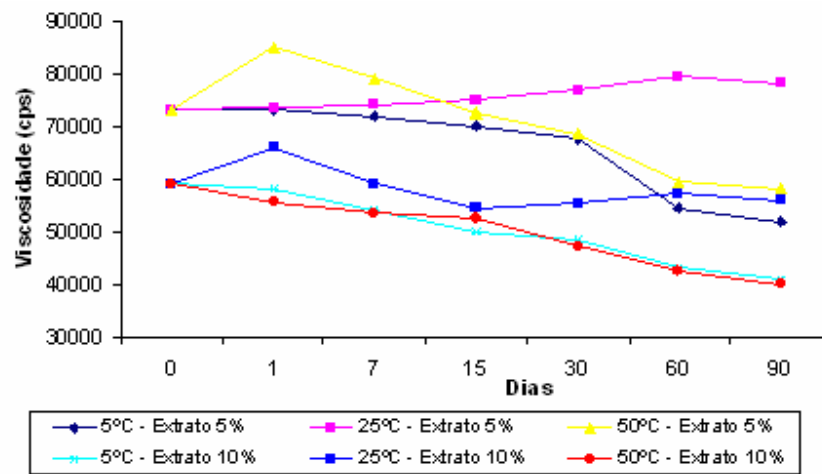


Figura 16: Variação de viscosidade das amostras de gel-creme com extrato de *R. officinalis* L., 5 e 10%, acondicionadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa, durante o período de 90 dias.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Os diversos ensaios desenvolvidos no presente trabalho permitiram-nos concluir:

- a. Fitoquimicamente, ambas as espécies estudadas, *Rosmarinus officinalis* L. e *Baccharis dracunculifolia* DC. são constituídas por substâncias das classes dos taninos, flavonóides e óleo essencial.
- b. O óleo essencial do *R. officinalis* L. apresenta-se rico em compostos monoterpênicos, sendo a cânfora seu elemento majoritário. Já a porção volátil da *B. dracunculifolia* DC., ao contrário do alecrim, é formada principalmente por substâncias sesquiterpênicas, tendo em maior concentração o e-nerolidol.
- c. Quanto à atividade antimicrobiana, de modo geral, tanto o extrato quanto o óleo essencial do alecrim-do-campo, frente aos microrganismos *S. aureus*, *C. albicans* e *S. mutans*, mostraram atividade superior quando comparados ao alecrim.
- d. Em relação à atividade antioxidante, os extratos das duas espécies, na concentração de 0,1%, apresentaram ação extremamente significativa, pois inibiram completamente a lipoperoxidação induzida por Fe^{+2} / citrato, em mitocôndrias. Por outro lado, notou-se uma atividade pró-oxidante quando em doses superiores (1%).
- e. Os extratos das duas espécies estudadas, nas concentrações de 5, 10 e 20%, não apresentaram toxicidade.
- f. As formulações de gel-creme incorporadas com os extratos de ambas as plantas, nas concentrações de 5 e 10% mantiveram-se estáveis durante o estudo de estabilidade acelerado, quanto a aspectos físicos, como características organolépticas e físico-químicos, por exemplo, pH, viscosidade e separação de fases. Já as formulações acrescidas de óleo essencial a 0,5 e 1%, apresentaram diminuição significativa no pH quando conservadas em temperatura elevada (estufa).

Mesmo tendo-se realizado inúmeros ensaios com a espécies *R. officinalis* L. e *B. dracunculifolia* DC. no presente trabalho, alguns experimentos não puderam ser efetuados, muitas vezes por falta de equipamentos ou mesmo tempo hábil.

Como sugestão, de modo a obter resultados ainda mais conclusivos, poderia ser efetuada uma caracterização dos compostos pertencentes aos extratos, assim como foi feito nos óleos essenciais, de forma a conseguir-se identificar a(s) substância(s) responsáveis pelos efeitos (antioxidantes e antimicrobianos) observados até então.

Analisar a variação sazonal dos constituintes de interesse presentes nas espécies abordadas.

Realizar uma curva dose-resposta também para as atividades farmacológicas observadas, podendo-se determinar a CMI e a CBM.

Extrair uma maior quantidade de óleo essencial de forma a possibilitar a execução de ensaios de toxicidade aguda e estudos de estabilidade mais completos.

Avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana, assim como o nível de toxicidade das formulações onde se adicionou os extratos e óleos essenciais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectrometry**. New York: Academic Press, 1995.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estudo de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf> Acesso em: 30 jun 2006.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; GUZMAN, J. P.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 909 – 915, 2005.

AL-HEBSHI, N.; AL-HARONI, M.; SKAUG, N. *In vitro* antimicrobial and resistance-modifying activities of aqueous crude khat extracts against oral microorganisms. **Archives of Oral Biology**, v. 51, p. 184, 2006.

AMIN, A.; HAMZA, A.A. Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. **Life Sciences**, v. 77, n. 3, p. 266 – 278, 2005.

ANDRADE Jr., D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60 – 68, 2005.

ANSEL, Howard.C., POPOVICH, Nicholas.G., ALLEN, Loyd.V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6.ed. São Paulo: Premier, 2000. p. 299-311.

ARDUIN, M. **Estudo morfológico comparado de galhas entomógenos em *B. concinna* e *B. dracunculifolia* da Serra do Cipó**. Dissertação de Doutorado do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2000.

ARMISÉN, M.; RODRIGUEZ, V.; VIDAL, C. Photoaggravated allergic contact dermatitis due to *Rosmarinus officinalis* cross-reactive with *Thymus vulgaris*. **Contact Dermatitis**, v. 48, p. 52 – 53, 2003.

ATTI-SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G. F.; ROTA, L. D.; RECH, J. C.; PANSERA, M. R.; AGOSTINI, F.; SERAFINI, L. A.; MOYNA, P. Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. **Brazilian Arch. Biol. Technol.**, v. 48, n. 6, p. 1035 – 1039, 2005.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 52, n. 3, p. 230 – 234, 2000.

AXXORA Plataform. **Natural products & Antibiotics**. Disponível em: http://www.axxora.com/natural_products-ALX-270-254/opfa.1.1.ALX-270-254.1547.4.1.html Acesso em: 01 dez. 2006.

BABY, A. R.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE V.; KANEKO, T. M.; CONSIGLIERI, V. O.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade de Produtos de Aplicação Tópica. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 130-138, 2004.

BARROS, V. M. R.; ITO, I. Y.; AZEVEDO, R. V.; MORELLO, D.; ROSATELI, P. A. Estudo comparativo da eficiência de três métodos de anti-sepsia intrabucal na redução do número de estreptococos do sulco gengival. **Revista Odontológica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 201 – 206, 1998.

BASTOS, E. M.; OLIVEIRA, V. D. C. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) visando à identificação da origem botânica da própolis. **Acta Bot. Brasílica.**, São Paulo, v. 12, n. 3, p. 431 – 439, 1998.

BATISTUZZO, J. A. O.; IATYA, M.; ETO, Y. **Formulário médico-farmacêutico**. 2. ed. São Paulo: Tecnopress, 2002. p. 389.

BISSET, N. G. **Herbal drugs and phytopharmaceuticals**. 2. ed. London: CRC Press, 1994. p. 428 – 430.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. In: MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Política Nacional de Plantas medicinais e fitoterápicos*. Brasília, 2006.

BREHM-STECHER, B.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *S. aureus* and *E. coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol and apritone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3357 – 3360, 2003.

BRITISH Pharmacopeia. V. II. London: The Stationery Office, 2005. p. 1743 – 1745.
BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Editora da Unicamp, 1994. p. 15 – 22.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, P. V. Morfoanatomia Foliar e Caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC. , Asteraceae. **Acta Farm. Bonaerense**, Argentina, v. 23, n. 4, p. 477 – 483, 2004.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. In: GLEISCHER, S.; PACKER, L. **Methods in Enzimology**. New York: Academic Press, v. 52C, 1978. p. 302-310.

BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O.; COSTA, R. B. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botânica Brasileira**, São Paulo, v. 19, n. 1, p.39-44, 2005.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179 – 189, 2000.

CARDOSO, J. C. W.; COSTA, L. C. B.; CORRÊA, R. M.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K.V.; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 4, p. 956 – 959, 2005.

CELIKTAS, O. Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V.; OZEK, T.; BASER, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553 - 559, 2006.

CICCONE, J. C.; VERRI, M. P.; NAVARRO, M. F. L.; SALVADOR, S. L.; PALMA-DIBB, R. G. Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano de diferentes materiais restauradores. **Materials Research**, v. 7, n. 2, p. 231 – 234, 2004.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v. 1. p. 53 – 54.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994, v. 1. p. 549- 551.

COSTA, A. F. **Farmacognosia: Farmacognosia Experimental**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000, v. 3. p. 620 – 621, 731 – 734, 753, 754, 775 – 777, 803, 804.

CRUZ, M. G. F. D. L.. **O uso de óleos essenciais na terapêutica**. Disponível: <[http://www.ufmt.br/etnoplan/artigos/%D3leos%20essenciais%20e%20terapE Autica.pdf](http://www.ufmt.br/etnoplan/artigos/%D3leos%20essenciais%20e%20terapE%20Autica.pdf)> Acesso em: 11 jun 2006.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. p. 49 – 51, 92 – 93.

CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia**. Disponível: <http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf> Acesso em: 05 fev. 2006

D'AMÉLIO, F. S. **Botanicals – A Phytocosmetic Deskreference**. London: CRC Press, 1999. p. 186, 187.

Del BANO, M.J.; LORENTE, J.; CASTILLO, J.; BENAVENTE, G. O.; MARIN, M.P.; Del RIO, J.A.; ORTUNO, A.; IBARRA, I. Flavonoid distribution during the development of leaves, flowers, stems and roots of *Rosmarinus officinalis* L. postulation of a biosynthetic pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 4987 – 4992, 2004.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305, 2005.

DUKE, J. A. **Handbook of phytochemical constituents of grass herbs and other economic plants**. Florida: CRC Press, 1992. p. 530 – 533.

ESPÍRITO-SANTO, M. M.; FERNANDES, G. W.; ALLAIN, L. R.; REIS, T. R. F. Tannins in *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae): effects of seasonality, water availability and plant sex. **Acta Botânica Brasileira**, v. 13, n. 2, p. 167 – 174, 1999.

EVANS, William Charles. **Trease y Evans farmacognosia**. 13. ed. Madrid: Interamericana, 1991. p. 465.

FAHIN, F. A.; ESMAT, A. Y.; FADEL, H. M.; HASSAN, K. F. S. Estudos aliados no efeito do *Rosmarinus officinalis* nos efeitos experimentais hepatotóxicos e mutagênicos. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 50, n. 6, p. 413 – 427, 1999.

FARMACOPEIA Estados Unidos do Brasil. 2 ed. São Paulo: Siqueira, 1959 p. 378.
FARMACOPEIA BRASILEIRA. 3. ed. São Paulo: Andrei, 1977, p. 989, 990.

FARMACOPEIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1988. p. V. 4. 2. 6.

FERRACINI, V. L.; PARAIBA, L. C.; LEITÃO, H. F.; SILVA, A. G.; NASCIMENTO, L. R.; MARSAIOLI, A. J. Essential oils of seven *Baccharis* species. **J. Essential Oil Research**, n. 7, p. 355 – 367, 1995.

GEBARA, E. C. E.; ZARDETTO, C. G. D. C.; MAYER, M. P. A. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Revista Brasileira de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 10, n. 4, p. 251 – 256, 1996.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; MIKAIL, C.; ABOU, L.; PORTUGAL, H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*: potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 12, p. 990 – 995, 2004.

GOMES, V.; FERNANDES, G. W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). **Acta Bot. Brasilica**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 421 – 427, 2002.

GOMES-CARNEIRO, M. R.; RIBEIRO-PINTO, L. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Environmental risk factors for gastric cancer: the toxicologist's standpoint. **Cad. Saúde Pública**, v. 13, n. 1, p.27 – 38, 1997.

HALOUI, M.; LOUEDEC, L.; MICHEL, J.B.; LYOUSSI, B. Experimental diuretic effects of *Rosmarinus officinalis* and *Centaurium erythraea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 3, p. 465 – 472, 2000

JENNINGS, W; SHIBAMOTO, T. **Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography**. New York: Academic Press, 1980.

Jr VEIGA, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519 – 528, 2005.

KABOUCHE, Z.; BOUTAGHANE, N.; LAGGOUNE, S.; KABOUCHE, A.; AIT-KAKI, Z.; MENLABED, K. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 129 – 133, 2005.

KATSURA, H.; TSUKIYAMA, R.; SUZUKI, A.; KOBAYASHI, M. *In vitro* antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 11, p. 3009 – 3013, 2001.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1302 – 1309, 2002.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, n. 6, p. 740 – 742, 2003.

LACHMAN, Leon; LIEBERMAN, Herbert A; KANING, Joseph L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001, v. 2, p. 855-906, 907-953, 1277-1355.

LARINI, L. **Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Malone Ltda., 1997. p. 43 – 48.

LEITÃO, D. P. S.; FILHO, A. A. S.; POLIZELLO, A. C. M.; BASTOS, J. K.; SAPADARO, C. C. Comparative evaluation of *in-vitro* effects of Brazilian Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 11, p. 1834 – 1839, 2004.

LEMONICA, I.P.; DAMASCENO, D.C.; Di-STASI, L.C. Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Brazilian Journal Med. Biol. Res.**, v. 29, n. 2, p. 223 – 227, fev. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list> Acesso em: 19 abril 2005.

LIMBERGER, R. P.; FARIAS, F. M.; SOBRAL, M.; ZUANAZZI, J. A.; HENRIQUES, A. T. Composição química do óleo volátil de *Psidium cattleianum*, *P. guajava*, *P. incanum* e *P. luridum* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 82, n. 1, p. 53 – 55, 2001.

LOBATO, J. Para conhecer as plantas tóxicas do Brasil. **Ciência Hoje on-line**, 17 fev. 2004. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/controlPanel/materia/view/2572>> Acesso em: 12 jul. 2005.

LOEFFLER, D. A. Using animal models to determine the significance of complement activation in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 1, n. 18, out. 2004. Disponível em: <<http://www.jneuroinflammation.com/content/pdf/1742-2094-1-18.pdf>> Acesso em: 10 julho 2006

LÓPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, C. Solid and Vapor-Phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6939 – 6946, 2005.

LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; JEAN, F. I. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 2, p. 381 – 389, 1995.

MAHMOUD, A. A.; AL-SHIHRY, S.; SON, B. W. Diterpenoid quinines from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Phytochemistry**, v. 66, n. 14, p. 1685 – 1690, jul./2005.
MARTIN, S. M. M.; NARANJO, J. L. P.; SALVADÓ, A. C.; RUIZ, C. M. Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis* L. en rata. **Rev. Cubana Plant Méd**, v. 9, n. 1, 2004, p. 258 – 264.

MARTINS, M. B. G. Estudos de microscopia óptica e de microscopia eletrônica de varredura em folhas de *Mentha spicata* e de *Mentha spicata* x *Suaveolens* (Lamiaceae). **Bragantia**, Campinas, v. 61, n. 3, p. 205 – 218, 2002a.

MARTINS, C. A. P.; ITO, C. Y. K.; JORGE, A. O. C. Presence of *staphylococcus* spp. and *candida* spp. in the human oral cavity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 236-240, 2002b.

McGUFFIN, M.; HABBS, C.; UPTON, R.; GOLDBERG, A. **American Herbal Products Association's botanical safety handbook**. Boca Raton: CRC Press, 1997, p. 169 – 171.

MEILLER, T. F.; KELLEY, J. I.; JABRA-RIZK, M. A.; DePAOLA, L. G.; BAQUI, A. A. M. A.; FALKLER, W. A. *In vitro* studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. V. 91, n. 6, p. 663 – 669, 2001.

MELO, E. C.; RADUNZ, L. L.; MELO, R. C. A. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais. **Engenharia na Agricultura**, Viçosa, v. 12, n. 4, p. 307 – 315, 2004.

MENEZES, R. F. De histórias de medicamentos, reações adversas e vigilância sanitária à farmacovigilância. **Boletim Sobravime**, n. 44, 2005. Disponível em: http://acd.ufrj.br/consumo/leituras/lm_sobravime4445_2005.pdf Acesso em: 10 dez. 2005.

MONROY, T. B.; MALDONADO, V. M.; MARTINEZ, F. F.; BARRIOS, B. A.; QUINDÓS, G.; VARGAS, L. O. S. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prosthesis. **Oral Medicine and Pathology**, v. 10, p. 27 – 39, 2005.

MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of Rosemary. **Plant Physiology**, v. 125, n. 2, p. 1094 – 1102, 2001.

NAKATANI, N. Phenolic antioxidants from herbs and spices. **BioFactors**, v. 13, p. 141 – 146, 2000.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiogram-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4., p. 247 – 256, 2000.

NETO, V. A.; LEVE, G. C.; LOPES, H. V.; MENDONÇA, J. S.; BALDY, J. L. S. **Antibióticos na prática médica**. 5. ed. São Paulo: Rocca, 2000. p. 52, 70.

NORIEGA, P.; RÖPKE, C. D.; CAMILO, C. M.; FREITAS, P. C. D.; BARROS, S. B. M. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do nerolidilcatecol de *Pothomorphe umbellata* (L). Miq. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 261 – 296, 2005

NORTON, S. Plant Toxicology. In: KLAASSEN, Curtis D. **Toxicology: The basic science of poisons**. 6. ed. New York: McGraw Hill, 2001. p. 965 – 947.

OLIVEIRA, P. C. B., DABBUR, F. S.; PAIVA, J. S. Estabilidade físico-química de creme-gel submetido a processo de homogeneização em moinho coloidal. Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia - Universidade de Mogi das Cruzes, 2005, 78p.

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

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. p. 376 – 377.

OLUWATUYI, M.; KAATZ, G. W.; GIBBONS, S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 24, p. 3249 – 3254, 2004.

PARK, Y. K.; GUZMAN, J. F. P.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian própolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100 – 1103, 2004.

PARK, Y. K.; FUKUDA, I.; ASHIDA, H.; NISHIUMI, S.; YOSHIDA, K.; DAUGSCH, A.; SATO, H. H.; PASTORE, G. M. Suppressive effects of ethanolic extracts from propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 10306 – 10309, 2005.

PDR for Herbal Medicines. New Jersey: Medical Economics Company, 1998. p. 1101 – 1102.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. São Paulo: Atheneu editora, 2000. p. 265.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45 – 61, 2002.

PISTELLI, L.; BERTOLLI, A.; MORELLI, I.; MENICHINI, F.; MUSMANNO, R. A.; MAGGIO, T. D.; CORATZA, G. Chemical and antibacterial evaluation of *Hypericum triquetrifolium* Turra. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 787, 2005.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **B. Ceppa**, v.19, n. 2, p. 193 – 210, 2001.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995, v. 1, p. 93-103, 597-669.

RADIOBRÁS. Estudo mostra o potencial da própolis verde de Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia**, 2003. Disponível em: <http://www.radiobras.com.br/ct/materia.phtml?materia=86595>. Acesso em 21 jun. 2006.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 756 – 760, 2006.

REYNAUD, J. **Dicotylédones**. Disponível em: <http://www.ispb.univ-lyon1.fr/cours/botanique/Photographies/liste%20dicot.htm>. Acesso em: 10 nov. 2006

RIBEIRO, A. M.; KHURY, E.; GOTTARDI, D. **Validação de testes de estabilidade para produtos cosméticos**. IN: Congresso Nacional de Cosmetologia, ABC. Agosto, 1996; p. 349-356.

ROMERO, T. Arma natural contra cáries. **Agência FAPESP**, São Paulo, maio 2005. Disponível em: [http://www.agencia.fapesp.br/boletim_print.php?data\[id_materia_boletim\]=3761](http://www.agencia.fapesp.br/boletim_print.php?data[id_materia_boletim]=3761) Acesso em: 23 dez. 2005.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; WELLER, P. J. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 4. ed. USA: Pharmaceutical Press, 2003. p. 521 – 523.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCANGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621 – 632, 2005.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian Própolis. **Advance Access Publication**, v. 2, n. 1, p. 33 – 38, 2005.

SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 301, 2005.

SHIMAZAWA, M.; CHIKAMATSU, S.; MORIMOTO, N.; MISHIMA, S.; NAGAI, H.; HARA, H. Neuroprotection by brazilian green propolis against in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. **Advance Access Publication**, v. 2, n. 2, p. 201 – 207, 2005.

SILVA, F. **Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de plantas medicinais submetidas a processos de secagem e armazenamento**. Dissertação de Doutorado – Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas 2005, 168p.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94 – 103, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 4. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2002. p. 165 – 169, 185, 397, 405 – 406, 539.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Casos Registrados de Intoxicação Humana e Envenenamento no Brasil. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/sinitox>> Acesso em: 20 jul. 2006.

SOARES, S. E. Ácido fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71 – 81, 2002.

SOTELO-FÉLIX, J. I.; FONG, D. M.; MURIEL, P.; SANTILLÁN, R. L.; CASTILLO, D.; YAHUACA, P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 145 – 154, 2002.

TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MEIRA, R. M. S. A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of green própolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **eCAM**, v. 2, n. 1, p. 85 – 92, 2005.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANANO, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474–2478, 2005.

UTYARNA, I. K. A. **Avaliação antimicrobiana e citotóxica do vinagre e do ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas**. Ribeirão Preto: Mestrado – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto – USP, 2003. 113p.

WADT, N. S. Y. **Estudo da variação ontogenética de princípios ativos de *Leonurus sibiricus* L. E suas ações farmacológicas**. São Paulo: Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2000. 150p.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159 – 163, 2004.

WELLWOOD, C.R.; COLE, R.A. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* L., accessions for optimization of antioxidant yield. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 20, p. 6101 – 6107, 2004.

8. ANEXO**COMISSÃO DE ÉTICA EM MANIPULAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
CEMEA/UMC**

À Mestranda

JULIANA SILVEIRA DE PAIVA

PARECER

O trabalho intitulado: "ESTUDO FARMACOGNÓSTICO E FARMACOLÓGICO COMPARATIVO ENTRE AS ESPÉCIES CONHECIDAS COMO ALECRIM" de autoria da mestranda JULIANA SILVEIRA DE PAIVA, sob orientação do Profª. Dra. NILSA YAMASHITA WADT, foi considerado APROVADO por esta comissão. Consideramos a seleção, alojamento, manipulação e número de sujeitos experimentais adequados aos princípios bioéticos da utilização de animais em experimentação.

Sem mais no momento, despedimo-nos.

Mogi das Cruzes, 07 de fevereiro de 2006.



MAURÍCIO MARQUES DE OLIVEIRA
PRESIDENTE DA CEMEA-UMC