

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DOS EXTRATOS BRUTOS AQUOSOS DE *SOLIDAGO MICROGLOSSA* DC
(ASTERACEAE), *CYMBOPOGON CITRATUS* DC (POACEAE) E *MENTHA VILLOSA*
HUDS. (LABITAE) SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

RITA DE CÁSSIA MASCARENHAS NETTO

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia para
a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia, MG
Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DOS EXTRATOS BRUTOS AQUOSOS DE *SOLIDAGO MICROGLOSSA* DC
(ASTERACEAE), *CYMBOPOGON CITRATUS* DC (POACEAE) E *MENTHA VILLOSA*
HUDS. (LABITAE) SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

RITA DE CÁSSIA MASCARENHAS NETTO

Professor Dr. Nilson Penha-Silva

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia, MG
Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DOS EXTRATOS BRUTOS AQUOSOS DE *SOLIDAGO MICROGLOSSA* DC
(ASTERACEAE), *CYMBOPOGON CITRATUS* DC (POACEAE) E *MENTHA VILLOSA*
HUDS. (LABITAE) SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

RITA DE CÁSSIA MASCARENHAS NETTO

Professor Dr. Nilson Penha-Silva
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em ___/___/2007.

Vera Lúcia de Campos Brites

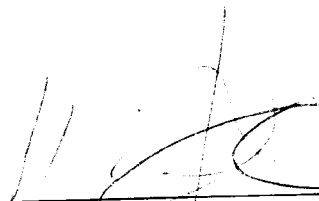
Uberlândia, MG
Fevereiro de 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITO DOS EXTRATOS BRUTOS AQUOSOS DE *SOLIDAGO MICROGLOSSA* DC
(ASTERACEAE), *CYMBOPOGON CITRATUS* DC (POACEAE) E *MENTHA VILLOSA*
HUDS. (LABITAE) SOBRE A ESTABILIDADE DE ERITRÓCITOS HUMANOS**

RITA DE CÁSSIA MASCARENHAS NETTO


Aprovado pela Banca Examinadora em: **08/02/2007**
Nota: 100



Professor Dr. Nilson Penha-Silva



Professora Cynthia Barbosa Firmino



Professor Dr. Miguel Antonio Facury Neto

Uberlândia, MG
Fevereiro de 2007

“Já perdoei erros quase imperdoáveis, tentei substituir pessoas insubstituíveis e esquecer pessoas inesquecíveis. Já fiz coisas por impulso, (...). Já abracei pra proteger, já dei risada quando não podia, fiz amigos eternos, (...). Já gritei e pulei de tanta felicidade, (...). Mas vivi! E ainda vivo! Não passo pela vida... Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é MUITO para ser insignificante.”

(Charlie Chaplin)

A Deus, que me conforta em todos os momentos da minha vida. Aos meus pais, Marcos e Eloísa, que me proporcionam caminhos para a concretização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e esperança nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais e irmãos, pela companhia, compreensão, paciência e acima de tudo, pela credibilidade em mim.

A minha família, por acreditarem no meu esforço e pela dedicação para finalizar essa etapa na vida.

Ao Professor Dr. Nilson Penha-Silva, pela orientação e auxílio neste trabalho.

Às amigas Mariana Vaini de Freitas, Cynthia Barbosa Firmino, Juliana Carla da Costa Huss, Tatiana Theodoro de Souza e Francislene Glória de Freitas Reis, pelo apoio, ajuda nos experimentos, lições de Bioquímica e, principalmente, de vida. Obrigada pela amizade!

Ao corpo docente da Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, pelo auxílio prestado na execução das coletas de sangue.

Às voluntárias sempre dispostas a colaborarem com esta pesquisa.

Ao Professor Dr. Fábio de Oliveira, do Instituto de Ciências Biomédicas, e a todos do seu laboratório, por disponibilizarem equipamentos para realização do meu trabalho.

Aos amigos da BIO58, pelo companheirismo e amizade.

Às amigas, Mariana, Alice e Flávia, mais do que isso, irmãs, que sempre me apoiaram, acreditaram e junto a mim, concretizamos sonhos e ainda planejamos muitos outros.

Aos professores que durante todo o curso estiveram ao meu lado, auxiliando e orientando em relação ao trabalho e também à vida.

Às pessoas que, mesmo à distância, me deram força para alcançar meus objetivos.

Às amizades recentemente estabelecidas e que fazem a diferença.

A todos aqueles que direta ou indiretamente me incentivaram e me deram suporte nessa jornada.

ABSTRACT

Effect of the aqueous crude extracts of *Solidago microglossa* DC (Asteraceae), *Cymbopogon citratus* DC (Poaceae) and *Mentha villosa* HUDS. (Labiatae) on the stability of human erythrocytes

Student: **Rita de Cássia Mascarenhas Netto**

Advisor: **Nilson Penha-Silva**

In this work, we studied the effects of the crude aqueous extracts of *Solidago microglossa*, *Cymbopogon citratus* and *Mentha villosa* on the stability of human erythrocytes against hypotonic shock (osmotic fragility), characterized by the NaCl concentration capable to promote 50% of hemolysis (H_{50}) and by the intensity (P_H) and amplitude (dS) of the lysis transition. The parameters we obtained in the presence of each of the extracts were compared with those obtained in its absence by analysis of variance according the Tukey test, with statistically significant differences been indicated by values of $p < 0.05$. The crude extracts of *Cymbopogon citratus* and *Mentha villosa* caused significant decreases in the values of H_{50} and P_H and significant increases in the values of dS. This indicates that these extracts present anti-hemolytic actions. The crude extract of *Solidago microglossa* caused a significant increase in H_{50} , which means that this plant present an hemolytic action, and a decrease in the P_H values associated to an increase in dS, what indicates that *Solidago microglossa* also presents an antagonistic anti-hemolytic action. The more accentuated anti-hemolytic action was that observed for *Mentha villosa*.

Keywords: *Cymbopogon citratus*; Erythrocytes; Membrane stability; *Mentha villosa*; Medicinal plants; *Solidago microglossa*.

SUMÁRIO

	Página
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVO	09
MATERIAL E MÉTODOS	10
Preparação dos extratos brutos vegetais (EBV).....	10
Coleta das amostras de sangue.....	10
Verificação da qualidade e quantidade dos EBV.....	11
Ação dos EBV na fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos.....	11
Cálculos e análises estatísticas.....	12
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	25
CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Curva representativa da fragilidade osmótica dos eritrócitos de todas as voluntárias.....	15
Figura 2. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na ausência (controle) e presença do extrato aquoso bruto de <i>S. microglossa</i>	16
Figura 3. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na ausência (controle) e presença do extrato aquoso bruto de <i>M. villosa</i>	17
Figura 4. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na ausência (controle) e presença do extrato aquoso bruto de <i>C. citratus</i>	18
Figura 5. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença dos extratos aquosos brutos de <i>Mentha villosa</i> e de <i>Solidago microglossa</i>	19
Figura 6. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença dos extratos aquosos brutos de <i>Cymbopogon citratus</i> e de <i>Solidago microglossa</i>	20
Figura 7. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença dos extratos aquosos brutos de <i>Mentha villosa</i> e de <i>Cymbopogon citratus</i>	21

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Valores de pH e densidade dos extratos vegetais obtidos a 25 °C.....	14
Tabela 2. Comparação entre os valores H_{50} obtidos na curvas de fragilidade osmótica dos diferentes extratos vegetais e do controle.....	22
Tabela 3. Comparação entre os valores da profundidade de hemólise (P_H) obtida na curvas de fragilidade osmótica dos diferentes extratos vegetais e do controle	23
Tabela 4. Comparação entre os valores da amplitude da transição de hemólise obtidos nas curvas de fragilidade osmótica, na ausência (controle) e presença de cada um dos extratos vegetais.....	24

ABREVIACOES

dS	Amplitude de hemólise
EBV	Extrato Bruto Vegetal
FOE	Fragilidade Osmótica Eritrocitria
H₅₀	Concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise dos eritrócitos
K₄EDTA	Anticoagulante
NaCl	Cloreto de Sódio
P_H	Profundidade de hemólise (intensidade)
ROM	Metabólitos Reativos do Oxignio
SD	Desvio padrão

INTRODUÇÃO

Tecidos, células, organelas, cromossomos, proteínas e membranas constituem complexos de organização biológicos cuja organização e estabilização é uma tarefa importante da natureza, uma vez que todas suas funções específicas dependem de sua integridade estrutural (BERNARDINO NETO, 2006). Devido à vulnerabilidade destes componentes à ação de agentes desnaturantes, como temperatura, extremos de acidez e alcalinidade (CRIBIER; MORROT; ZACHOWSHI, 1993), alguns organismos desenvolveram mecanismos para estabilização de suas estruturas, sendo um deles a produção e concentração de solutos que têm sido coletivamente designados como osmólitos.

Os osmólitos são capazes de estabilizar estruturas de complexos organizacionais biológicos *in vitro* e então garantir sua função biológica, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BOROWITZA; BROWN, 1974; BOWLUS; SOMERO, 1979; POLLARD; WYN JONES, 1979; YANCEY, 1985; NIKOLOPOULOS; MANETAS, 1991; VIANA; GARROTE FILHO; PENHA-SILVA, 2005; FONSECA et al., 2006). As membranas são exemplos de complexos organizacionais biológicos estabilizados pelos osmólitos.

As membranas são essencialmente constituídas de lipídeos e polímeros de aminoácidos muitas vezes conjugados com carboidratos (DANIELLI; DAVSON, 1935). A membrana plasmática de um eritrócito possui cerca de 20 tipos de proteínas proeminentes e várias outras com funções diferentes, como o transporte de solutos (STORRY, 2004). Os eritrócitos têm sido utilizados como um bom instrumento de estudo das estruturas biológicas, especialmente de sua estabilidade, uma vez que a hemólise provocada por qualquer fator de estresse ambiental libera hemoglobina, a qual pode ser quantificada pela leitura espectrofotométrica da absorbância da luz visível em 540 nm. Neste comprimento de onda a absorbância é proporcional à extensão da lise dos eritrócitos ou hemólise (NELSON; COX, 2000; MOECKEL et al., 2002).

Muitas células animais e vegetais podem-se adaptar a condições de hipotonicidade e hipertonicidade, como ocorre na maioria dos mamíferos, inclusive nos humanos, os quais usam pequenos solutos orgânicos no interior das células para atingir o equilíbrio osmótico em elevadas concentrações de NaCl presentes no meio extracelular.

A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) pode ser definida como a resistência dos eritrócitos à hemólise, avaliada pelo uso de soluções tamponadas de NaCl em água destilada em concentrações decrescentes de 0,9 a 0% (JAIN, 1986). O controle do volume celular através da eliminação ativa de solutos é um dos mecanismos pelos quais a lise da membrana

eritrocitária é evitada *in vivo* (MAKINDE; BOBADE, 1994). As células, quando suspensas em meio hipotônico, aumentam até atingir um volume crítico de hemólise antes de serem lisadas (JAIN, 1973). Assim sendo, a fragilidade celular varia conforme a concentração de sal e segue uma distribuição normal em animais sadios (JAIN, 1973), havendo, entretanto, diferenças entre as espécies (JAIN, 1986). A fragilidade osmótica dos eritrócitos depende basicamente da esfericidade dos eritrócitos e da tonicidade do meio (DELANO, 1995).

Vários fatores intrínsecos e extrínsecos influenciam a fragilidade osmótica dos eritrócitos, ocorrendo diminuição ou aumento desta em condições diversas (JAIN, 1986). Segundo Perk et al. (1964), a fragilidade osmótica é influenciada por fatores como a forma, o volume e o tamanho do eritrócito, o tipo e a quantidade de hemoglobina, as diferenças na viscoelasticidade das membranas e na composição química e estrutural das mesmas. Aparentemente, as células menores apresentariam uma capacidade limitada de expansão e atingiriam o volume hemolítico crítico mais precocemente. O tempo de vida da célula também é muito importante já que os eritrócitos velhos são mais frágeis que os jovens e correspondem a aproximadamente 30% da população eritrocitária. Além disso, segundo Jain (1973), Makinde e Bobade (1994), podem ocorrer variações fisiológicas (por exemplo, variações pós-prandiais) ou patológicas (presença de hematozoários, uremia, cirrose, processos auto-imunes, etc.).

A base experimental para medição da FOE é o fato que quando alguma célula vermelha de uma população de RBC atinge um volume crítico (volume hemolítico) (JACOBS, GLASSMAN, PARPART, 1935), a hemoglobina difunde-se para fora da célula, usualmente sem romper sua membrana plasmática (PARPART et al., 1947).

Em pacientes humanos, o formato da célula é afetado por alterações na composição da membrana celular (WEED; REED, 1966; TELEN; KAUFMAN, 1999). Doenças associadas a alterações metabólicas como a insuficiência renal e a doença hepática, podem modificar a proporção de fosfolípidos e de colesterol na membrana eritrocitária e conseqüentemente afetar a FOE. Os eritrócitos maduros não são capazes de sintetizar lipídeos pela ausência da enzima acetil-CoA carboxilase (PITTMAN; MARTIN, 1966; TELEN; KAUFMAN, 1999); com isso, a membrana celular sofre alterações em sua composição lipídica de acordo com as alterações dos lipídios circulantes (DIMOPOULLOS; BEDELL, 1962; TELEN; KAUFMAN, 1999).

Lipídeos de membrana são vitais para manutenção da integridade e sobrevivência celular. A peroxidação dos lipídeos de membrana pode resultar na inativação de enzimas e ligações cruzadas dos lipídeos e proteínas a na morte celular (CHIO, TAPPEL, 1969; JAIN et

al., 1983). Segundo Jain (1989), a correlação significativa entre peroxidação lipídica induzida por glicose e o aumento da fragilidade osmótica das células vermelhas do sangue mostra que este processo de peroxidação pode causar mudanças nas propriedades da membrana dos eritrócitos. A propriedade mecânica das membranas pode ser alterada por mudanças na composição lipídica ou na concentração eletrolítica, que permite a presença de lipídeos eletronicamente alterados (LOGISZ, HOVIS; 2005).

A oxidação dos eritrócitos tem sido estudada extensivamente como um modelo de dano oxidativo de biomembranas, e mostrado que os metabólitos reativos do oxigênio (ROM) atacam a membrana dos eritrócitos causando a oxidação de lipídeos e proteínas, e eventualmente causam hemólise (KONDO et al., 1997; RACEK et al., 2001). Os ROM estariam envolvidos em muitas doenças degenerativas humanas. Os antioxidantes têm efeitos preventivos e terapêuticos nessas desordens (AMES, SHIGENAGA, HAGEN, 1993). Eles são capazes de danificar moléculas de fosfolipídeos e proteínas, o que tem um grande impacto nas atividades celulares bem como estruturas e funções das membranas (CROSS et al., 1987).

Estudos recentes têm descrito um aumento na fragilidade osmótica dos eritrócitos em modelos experimentais de estresse oxidativo (BATNA; FUCHS, 1997; KONDO et al., 1997; FERNANDEZ; FINK, 2000), sendo que o dano ao sistema antioxidante ou o aumento da produção de ROM são responsáveis por alterações na estrutura celular (TIANO et al., 2000). Um desequilíbrio no *status* oxidante/antioxidante das células conduz ao estresse oxidativo e isto determina uma cascata de eventos que leva à oxidação de lipídeos e proteínas (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000) e pode ser a causa da hemólise e anemia (SOARES et al., 2005).

Halliwell (1990) define antioxidante como substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com as do substrato oxidável (carboidratos, lipídeos, DNA ou proteínas), retarda ou previne significativamente a oxidação do substrato. O uso de antioxidantes sintéticos para prevenir danos dos radicais livres é frequentemente acompanhado de efeitos tóxicos. Isto torna interessante investigar componentes naturais com propriedades antioxidantes (PIETTA, 2000; LARSON, 1988).

A química de produtos naturais é um campo de pesquisa com infinito potencial, e é especialmente importante em países que possuem grande biodiversidade, como o Brasil. Nos últimos anos, o interesse na atividade antioxidante de extratos de plantas, ou substâncias isoladas, tem crescido, devido ao fato que radicais livres tem sido causas de algumas doenças, assim como do processo de envelhecimento (WILLCOX, ASH, CATIGNANI, 2004).

Maior interesse tem sido devotado à atividade antioxidante de flavonóides, devido às suas habilidades de reduzir a formação e de combater o efeito de radicais livres. Os flavonóides são um dos mais numerosos e difundidos grupos de constituintes naturais no reino das plantas, alguns deles porque inibem processos mediados por radicais livres. Como regra, flavonóides possuem baixa toxicidade, que, combinada com alta capacidade antioxidante, faz deles componentes extremamente úteis como agentes farmacológicos (BROWN et al., 1998; DUGAS et al., 2000).

Constituintes fenólicos, assim como os flavonóides, ácidos fenólicos, diterpenos e taninos são especialmente merecedores de notificar em função de suas altas atividades antioxidantes (SHAHIDI et al., 1992; RICE-EVANS et al., 1996). Muitas investigações indicam que estes componentes são de ótimo valor na prevenção do início e/ou progresso de muitas doenças humanas (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1989; HALLIWELL et al., 1992; WILLET, 1994; TSAO, AKHTAR, 2005). Este efeito pode ser explicado pela restauração do distúrbio de equilíbrio redox por diferentes fatores (ex. dieta, álcool, algumas drogas) e, em conseqüência, pela diminuição de danos em estruturas celulares (AMES et al., 1993).

A estabilização de células vermelhas contra hemólise hipotônica por várias substâncias tem sido extensivamente investigada, particularmente como um modelo para estudo do modo de ação de várias drogas (SEEMAN, 1966; ROTH, SEEMAN, 1971).

O consumo de plantas medicinais e de produtos fitoterápicos vem crescendo em todo o mundo, constituindo um segmento bastante promissor (BREVOORT, 1998; EISENBERG et al., 1998). Devido a isso, muitas pesquisas vêm sendo feitas para garantir maior segurança e credibilidade à utilização de princípios ativos destas plantas. Apesar deste fato, os produtos à base de plantas, ainda são disponibilizados para o consumo de forma precária, o que compromete a efetiva consolidação deste mercado em nosso país (BRANDÃO, 1997).

A forma de extração de princípios ativos de plantas é um fator muito importante, devido ao fato da planta conter certo número de substâncias que, na maior parte dos casos, agem como complexos, cujos diferentes componentes se completam e se reforçam na sua ação.

Desde os tempos mais remotos é conhecida a utilização de plantas na cura de diversos tipos de doenças. O homem, pela própria necessidade e carência de outros tipos de fontes, buscou na natureza a solução de seus males. Dessa forma não se sabe a data precisa do início da utilização das plantas para fins medicinais, pois sua história se entrelaça a própria história da humanidade, acumulando um conhecimento de milhares de anos. De uma forma geral, os estudiosos costumam apresentar a história das ervas medicinais a partir do oriente, em um

longo caminho que evoluiu até mais recentemente, para as Américas, se não consideramos também o próprio conhecimento vindo da comunidade indígena (BONTEMPO, 1994).

Todas as antigas civilizações têm suas próprias referências históricas em relação às plantas medicinais. Nos documentos mais antigos, a fitoterapia está ligada à magia e é vista muitas vezes como um “presente de Deuses”, que permite aos seres humanos vencer os poderes maléficos da terra. Até essas primeiras aplicações das plantas medicinais como agentes medicinais, demonstram uma compreensão surpreendente dos diferentes efeitos de cada espécie vegetal (BONTEMPO, 1994).

Torna-se inconcebível, portanto, uma prática que se perpetuou na história da civilização não tivesse na atualidade o merecido reconhecimento da ciência e daqueles que executam (STASI, 1996).

Fitoterapia é uma modalidade de terapia medicinal que constitui no uso de plantas na cura ou prevenção de doenças. Ela vem recebendo grande destaque nos últimos anos. O consumo individual de fitoterápicos aumentou em todo o mundo, tanto que atualmente o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares. No entanto, apesar da extensa e diversificada flora, o Brasil não tem uma atuação destacada no mercado mundial desses medicamentos (YUNES et al., 2001).

A arnica-do-Brasil é uma planta medicinal da família *Asteraceae*, espécie *Solidago microglossa* DC (CORRÊA, 1984), única do gênero registrada no Brasil, sendo entre nós usada como análoga da *Arnica montana* L. (BRAGA, 1976; CORRÊA, 1984). A planta tem sinonímia variada e compreende as designações: arnica sapé-macho, falsa-arnica, erva-lanceta, arnica-silvestre, lanceta, espiga-de-ouro, macela ou marcela-miúda (BRAGA, 1976; CORRÊA, 1984; CONTRERA et al., 1985). A ela são atribuídas propriedades anti-sépticas (CHEIKH et al., 1982; LIMA NETO et al., 1993; KOO et al., 2000), analgésicas (CERQUEIRA et al., 1987; ROCHA, 2006), antiinflamatória (ROCHA, 2006), cicatrizantes (CONTRERA et al., 1985; FACURY NETO; FAGUNDES; JULIANO, 2002; FACURY NETO et al., 2004), na absorção de edemas e hematomas, tratamento de contusões, distensões e inflamações superficiais da pele (MORAES-SANTOS, TORRES, LEONART, 1988; WOERDENBARG et al., 1994; SCHMIDT, 1996; LYSS et al., 1997; SCHAFFNER, 1997; NORRED, ZAMUDIO, PALMER, 2000), além de atividade imunológica (PUHLMANN, ZENK, WAGNER, 1991).

A farmacopeia Brasileira (1977) descreve a *Arnica montana* como fitoterápica. No Brasil, Torres (1985) demonstrou a presença de compostos que justificam o uso terapêutico da *Solidago microglossa* DC como substituto da *Arnica montana*. Dentre os compostos

farmacologicamente ativos se destacam flavonóides como a quercitrina, utilizada para o tratamento de problemas vasculares (FUCHS, ILIEV, 1949; TORRES, 1985; TORRES, AKISUE, ROQUE, 1987; HARBONE, WILLIAMS, 2000) e as lactonas sesquiterpênicas (LEVEN, WILLUHN, 1987; SCHMIDT et al., 1995; LYSS et al., 1997), fenóis, acetofenona, carotenóide, glicosídeo, óleo essencial, saponinas, terpenos (HALL et al., 1980; DEMARQUE et al., 1985), entre outros princípios ativos (TORRES, 1985).

Uma revisão sobre os flavonóides (HARBONE, WILLIAMS, 2000) destacou suas propriedades medicinais. Alguns têm atividade antioxidante (PIETTA; NAT, 2000; APÁTI et al., 2003), semelhante ou até maior que a atividade da vitamina E. Estudos recentes mostram que os flavonóides presentes na arnica podem alterar as propriedades funcionais de certas células como: mastócitos, basófilos, linfócitos, músculo liso e plaquetas (CRAKER; SIMON; LANES, 1988). Há evidências de ação protetora da arnica sobre o fígado contra os efeitos tóxicos do fenol (MARCHISHIN, 1983) e do tetracloreto de carbono, inibindo a taxa de formação de produtos da peroxidação lipídica (YAREMY, GRYGOVIERA, MESHCHISHEN, 1998). Esta ação de natureza antioxidante pode ser justificada pela presença de flavonóides (HARBONE, WILLIAMS, 2000).

Sanchez, Sato e Coelho (1994) demonstraram atividade mutagênica de extratos aquosos de *S. microglossa* e outras ervas medicinais brasileiras sobre linhagens de *Salmonella typhimurium*. Vários autores descreveram um efeito citotóxico antitumoral sobre diferentes tipos de tumores humanos (HALL et al., 1977; WOERDENBAG et al., 1994; HARBONE, WILLIAMS, 2000), o que pode significar uma de suas propriedades terapêuticas. A ineficácia dos extratos alcoólicos de arnica, na cicatrização de feridas, após uso tópico pode ser atribuído ao efeito do álcool sobre esse processo (FACURY NETO, et al., 2004).

A planta *Cymbopogon citratus* DC Staf., pertencente à família Poaceae, é uma espécie originária da Índia e largamente distribuída por vários países tropicais, entre eles o Brasil, onde assume diferentes sinonímias conforme a região: capim-limão (MG), capim-santo (BA), erva-cidreira (SP), capim-cidrão, entre outros. Em vários estados brasileiros, o capim-limão (*Cymbopogon citratus*) é muito usado como fortificante, digestivo, antitussígeno, antigripal, analgésico, anti-hemético, anticardíopático, antitérmico, antiinflamatório de vias urinárias, diurético, diaforético, antiálgico e sedativo (STEHLMANN; BRANDÃO, 1994; MATOS et al., 1982; RAMAKERS et al., 1994; ALENCAR et al., 1994; VAN DEN BERG, 1980; MATTOS; DAS GRAÇAS, 1980; NOGUEIRA, 1983; PAVIANI, 1964; CARLINI et al., 1986). O capim-limão (*Cymbopogon citratus*) tem efeito sobre a pressão arterial, cuja ação anti-hipertensiva, e também diurética, foi citada por Carbajal et al. (1989). No Brasil, tem sido

empregada popularmente como remédio para vários distúrbios gastrintestinais e nervosos, não apresentando efeitos tóxicos (Lorenzetti et al., 1991).

Sua maior importância econômica reside na produção de óleo essencial, rico em citral, componente que apresenta efeitos antiespasmódico, tanto no tecido uterino como no intestinal, porém sem atividade sobre musculatura esquelética e cardíaca (FERREIRA, 1984). Estudos sugerem que atividade antimicrobiana de *C. citratus* é devido aos componentes α - e β -citral presentes no óleo (ONAWUNMI et al., 1984), além da ação antifúngica (ONAWUNMIM, 1989; LIMA et al., 1993; EL-KAMIL et al., 1998). De acordo com Teske e Trentini (1994), nas folhas de *Cymbopogon citratus* são encontrados flavonóides, alcalóides e saponinas.

Propriedades terapêuticas semelhantes ao *Cymbopogon citratus* também são popularmente atribuídas à *Melissa officinalis* L. (Labiatae) e à *Lippia alba* N.E.Br (Verbenaceae), ambas designadas por capim-cidreira ou erva-cidreira (LIBERALLI et al., 1946; FERRO et al., 1996; GOMES et al., 1997), e à *Killinga odorata* Vahl (Cyperaceae), conhecida por capim cheiroso, capim-santo e também por erva-cidreira (LIBERALLI et al., 1946; SILVA et al., 1977; CORRÊA, 1992; CHERNOVICZ, 1996).

A planta *Mentha villosa*, da família Labiatae, popularmente conhecida como hortelã-rasteira, hortelã-comum e hortelã-da-folha-miúda (MATOS, 2001), é uma erva cultivada freqüentemente no Brasil, para uso culinário e também terapêutico, como tranqüilizante e no tratamento de doenças parasitárias como amebíases, giardíase e tricomoníase urogenital, e esquistossomoses (BORBA et al., 1990; SANTANA et al., 1992; MELO et al., 1992; HIRUMA, 1993), distúrbios estomacais e cólicas menstruais (ALENCASTRO et al., 1965; MATTOS, 1994). Esta planta tem sido explorada pela indústria farmacêutica local sob o nome de *Mentha crispata*. Vários estudos têm sido desenvolvidos com constituintes da planta, como o óleo essencial extraído de suas partes aéreas, que contém óxido de piperitenona (rotundifolona) (ALMEIDA et al., 1996; LAHLOU et al., 2001; CRAVEIRO et al., 1990; HIRUMA, 1993), para o qual foram demonstradas atividades analgésicas (ALMEIDA et al., 1996) e relaxantes da musculatura lisa intestinal que envolve ação intracelular nas fibras musculares (SOUSA et al., 1997).

Lahlou et al. (2001), mostraram que o óleo essencial de *Mentha villosa* é capaz de induzir hipotensão em ratos anestesiados mesmo após vagotomia cervical bilateral. Nunes Guedes et al. (2004) sugere que o óleo essencial pode estimular receptores muscarínicos no coração para diminuir a velocidade e contração deste. Algumas espécies de *Mentha*, em particular a *Mentha arvensis*, possuem diversos efeitos tóxicos sobre a fertilidade em fêmeas (KANJANAPOTHI et al., 1981, MENGUE; MENTZ; SCHENKEL, 2001) e machos, como

alterações da viabilidade dos espermatozoides (MATHUR, 1991). Porém, Dimech et al. (2006), em recente estudo, concluiu que a administração subcrônica do extrato hidroalcoólico de *Mentha crispa*, sinônimo de *Mentha villosa*, não possui atividade contraceptiva sobre o sistema reprodutor de ratos Wistar.

A etnofarmacologia define a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem, e acaba se tornando uma grande ferramenta na estratégia de se pesquisar novos fármacos (SILVA, 1998; SIMÕES et al., 2000).

Estudos têm demonstrado que botânica e medicina estão relacionadas, uma vez que é conhecida a ação de alguns extratos de plantas com atividade farmacológica e pequena ação citotóxica (WANG, NG, XU, 1995). O grande aumento verificado no uso de fitoterápicos pode ser atribuído a vários fatores, como o encarecimento dos remédios alopáticos, sua grande gama de efeitos colaterais e o desenvolvimento de resistência dos patógenos aos medicamentos (FURLAN, 1999). Além disso, muitas pesquisas farmacológicas e terapêuticas têm confirmado a eficácia de muitas plantas medicinais. Apesar do crescimento da credibilidade da fitoterapia, plantas têm sido utilizadas indiscriminadamente de forma popular, sem uma base científica para sua eficácia, constituindo um grande problema de saúde pública.

A utilização de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais, tem ocorrido de forma indiscriminada, sem nenhuma base científica sólida, recebendo um destaque exagerado como indispensáveis à boa saúde, a ponto de despertar preocupação para botânicos, químicos, médicos e farmacêuticos (SECCO, 1990).

A verificação mínima de algumas plantas sobre a fragilidade osmótica celular é de grande valia para entender os efeitos adversos causados pelo uso excessivo de algumas delas.

OBJETIVO

Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo, verificar o efeito de algumas plantas medicinais, *Solidago microglossa* DC (arnica-do-Brasil), *Cymbopogon citratus* DC (capim-cidreira) e *Mentha villosa* (hortelã-comum), sobre a estabilidade de membrana de eritrócitos humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos descritos neste trabalho (preparação do extrato vegetal, verificação e determinação dos extratos, ação dos extratos vegetais na fragilidade e os cálculos e análises estatísticas) foram executados no Laboratório de Enzimologia, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, sob a supervisão do Professor Dr. Nilson Penha Silva.

Preparação dos extratos brutos vegetais (EBV)

Neste estudo, foram utilizadas partes aéreas de três plantas medicinais: *Solidago microglossa* DC (arnica-do-Brasil), *Cymbopogon citratus* DC (capim-cidreira), *Mentha villosa* (hortelã-comum), as quais foram catalogadas pelo Instituto de Biologia e Pesquisa Botânica da Universidade Federal de Uberlândia.

Cada planta foi seca ao abrigo da luz solar e pulverizada. A 20 g de pó acrescentou-se 200 mL de água. Após agitação por 24 horas à temperatura ambiente e repouso por 20 minutos, o sobrenadante foi separado por decantação. O resíduo obtido da decantação, uma vez que tratado por duas vezes com 100 mL de água e realizada a extração por agitação durante 12 horas, prosseguiu com decantação do sobrenadante após repouso de 20 minutos. Os volumes dos 3 sobrenadantes foram agrupados, filtrados, e conservados sob refrigeração. Em nenhum momento foi utilizado procedimento de fervura para não desnaturar proteínas porventura presentes no extrato vegetal.

Dados como densidade e pH dos extratos vegetais foram determinados.

Coleta das amostras de sangue humano

A execução deste estudo foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia.

O sangue foi colhido por punção endovenosa de doadores humanos em tubos de vacuntainer (6 mL) contendo K₄EDTA como anticoagulante. Para execução desta pesquisa, coletou-se sangue de 12 voluntárias saudáveis entre 20 a 30 anos, após jejum noturno de 8 a 12 horas. A coleta do sangue foi feita na Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia (ESTES).

Verificação e determinação da quantidade e qualidade dos EVs sobre as hemácias em salina a 0,9%

A partir do extrato bruto de cada planta foi realizado um teste para verificar a absorvância das concentrações dos EVs em 540 nm, e obter o volume adequado utilizado nas análises sobre a fragilidade osmótica. Para isso, foram testados doses crescentes dos EVs: 0, 20, 40, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 μL , em um volume fixo de salina 0,9% (1 mL), e adição de água desionizada completando volume final de 2 mL. Foram acrescentados 20 μL de sangue a cada tubo. Após o teste, segundo critério de análise dos valores de absorvância, por cada extrato vegetal, foram determinados os volumes a serem utilizados: 100 μL de *Solidago microglossa*, 500 μL de *Mentha villosa* e 500 μL *Cymbopogon citratus*.

Ação dos extratos vegetais na fragilidade osmótica de eritrócitos humanos

A cada um dos frascos de Eppendorf de uma série de frascos contendo 1 ml de solução de NaCl em concentrações entre 0 e 1,0%, na ausência e presença do extrato vegetal, após pré-incubação durante 10 minutos a 37 °C, foram adicionados 20 μL de sangue. Após homogeneização e incubação a 37 °C durante 20 minutos, os tubos foram centrifugados a 1.300xg por 10 minutos em temperatura ambiente. Os sobrenadantes, contendo várias concentrações de hemoglobina proveniente da lise de eritrócitos, tiveram sua absorvância de luz em 540 nm avaliada em espectrofotômetro visível (Micronal). Os experimentos foram conduzidos com cada tubo em duplicata.

A percentagem de hemólise em cada tubo foi determinada pelo uso da seguinte equação:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{A}{A_{\text{max}}} \times 100\% \quad (1),$$

onde A e A_{max} representam os valores de absorvância em cada tubo e o valor médio máximo de absorvância obtido.

As dependências da porcentagem de hemólise com a concentração de NaCl foram ajustadas a linhas de regressão sigmoidal de acordo com a equação de Boltzmann:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(S - H_{50})/dS}} \quad (2),$$

onde A_1 e A_2 representam as porcentagens máxima e mínima de hemólise, S é a concentração de cloreto de sódio, H_{50} é a concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise dos

eritrócitos, e dS a amplitude da concentração do sal associada à transição da hemólise dos eritrócitos pelo choque hipotônico.

Este procedimento permitiu a determinação dos valores de H_{50} na ausência e presença de cada um dos extratos vegetais, como também dos valores da intensidade de hemólise dados pela profundidade da alteração na densidade óptica (P_H):

$$P_H = A_1 - A_2 \quad (3),$$

onde A_1 representa absorvância máxima e A_2 , absorvância mínima.

Cálculos e análises estatísticas

Os cálculos, as edições dos dados e as análises estatísticas foram executados com a utilização do aplicativo OriginPro 7,5 (Microcal, Northampton, Massachusetts, USA). Cada linha de regressão sigmoideal foi considerada significativa quando p era menor que 0,05, adotando análise de variância (ANOVA ou teste de Tukey).

RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os valores obtidos de pH e densidade dos extratos vegetais, somente a título de caracterização parcial.

A figura 1 apresenta a curva coletiva de fragilidade osmótica obtida para as amostras de sangue de todas as voluntárias. Ela mostra que há um considerável grau de homogeneidade na fragilidade osmótica dos eritrócitos de todas as voluntárias.

Além disso, a figura 1 também foi construída com o objetivo de mostrar como foram determinados os valores médios máximos (A_1) e mínimos (A_2) de $A_{540\text{ nm}}$, de H_{50} , da amplitude da transição (dS) e da intensidade da hemólise ou profundidade da alteração de densidade óptica associada ao choque hipotônico. A concentração salina capaz de promover 50% de lise dos eritrócitos (H_{50}) foi obtida a partir do valor na abscissa no ponto correspondente à taxa de 50% de hemólise na ordenada, obtido pela média entre A_1 e A_2 .

As figuras 2, 3 e 4 apresentam as transições de lise por choque hipotônico obtidas na presença dos extratos vegetais de *S. microglossa*, *M. villosa* e *C. citratus*, respectivamente. A título de comparação, cada uma dessas figuras apresenta também a transição de hemólise obtida na ausência dos extratos vegetais.

As figuras 5, 6 e 7 apresentam duas a duas as transições de lise por choque hipotônico obtidas na presença dos extratos vegetais, no intuito de evidenciar possíveis diferenças no comportamento dos extratos.

Embora as figuras 2 a 7 nos dêem uma idéia sobre o padrão de interferência de cada extrato vegetal na lise de eritrócitos por choque hipotônico, é importante que nós comparemos os valores obtidos de H_{50} , P_H e dS.

Os valores obtidos de H_{50} , P_H e dS foram mostrados nas tabelas 2, 3 e 4. Houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores de H_{50} obtidos na presença dos extratos vegetais de *M. villosa* e *S. microglossa* em relação ao controle, mas não do extrato de *C. citratus* e relação ao controle (tabela 2). Os valores de H_{50} obtidos na presença dos extratos vegetais também foram significantemente diferentes entre si. Em relação à intensidade de hemólise (P_H) também houve diferenças significantes entre os resultados obtidos na presença de todos os extratos vegetais em relação ao controle, bem como entre os próprios extratos vegetais (tabela 3). As amplitudes das transições de hemólise (dS) também foram significantemente diferentes nas soluções de todos os extratos vegetais em relação ao controle, bem como entre si mesmas (tabela 4).

Tabela 1. Valores de pH e densidade dos extratos vegetais obtidos a 25 °C.

Amostra	pH	Densidade (g/cm³)
<i>Mentha villosa</i>	5,37	1,018
<i>Cymbopogon citratus</i>	5,20	1,012
<i>Solidago microglossa</i>	5,53	1,020

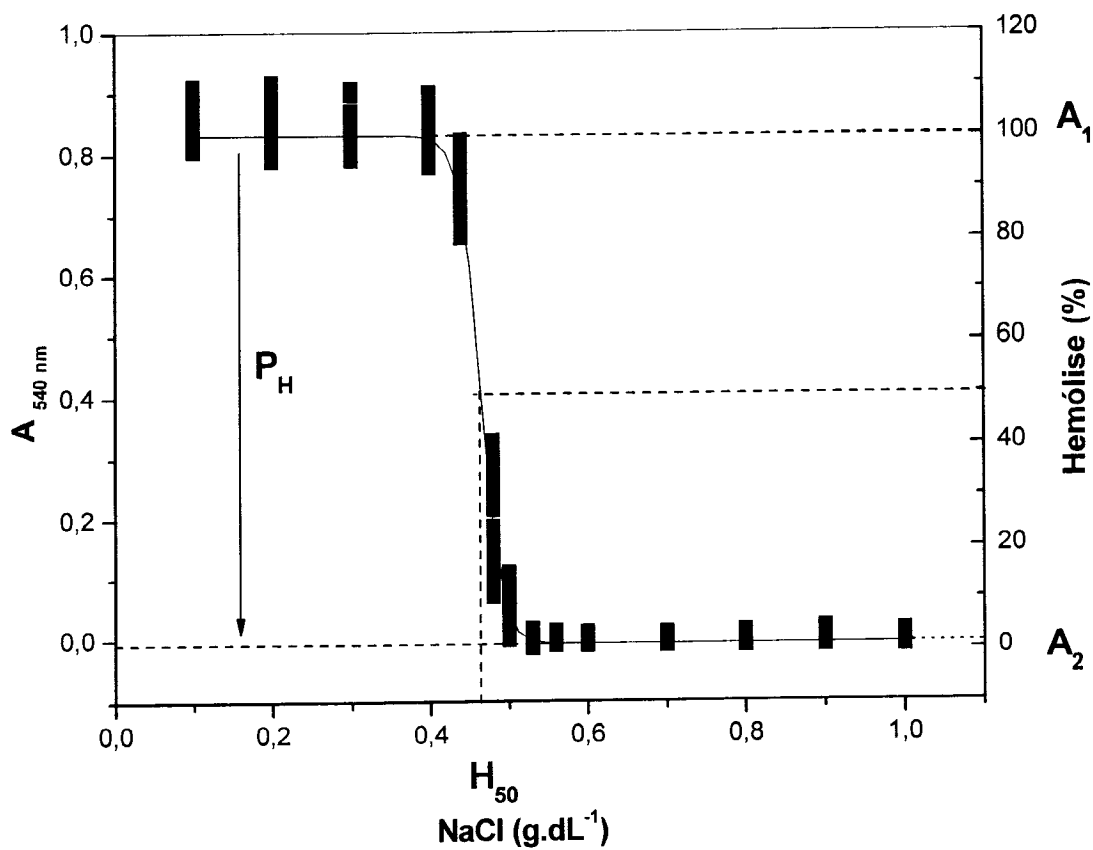


Figura 1. Curva representativa da fragilidade osmótica dos eritrócitos de todas as voluntárias, mostrando como foram obtidos os valores de H_{50} , que representa a concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise, e valores de P_H , que representa a variação de densidade óptica ou intensidade de hemólise.

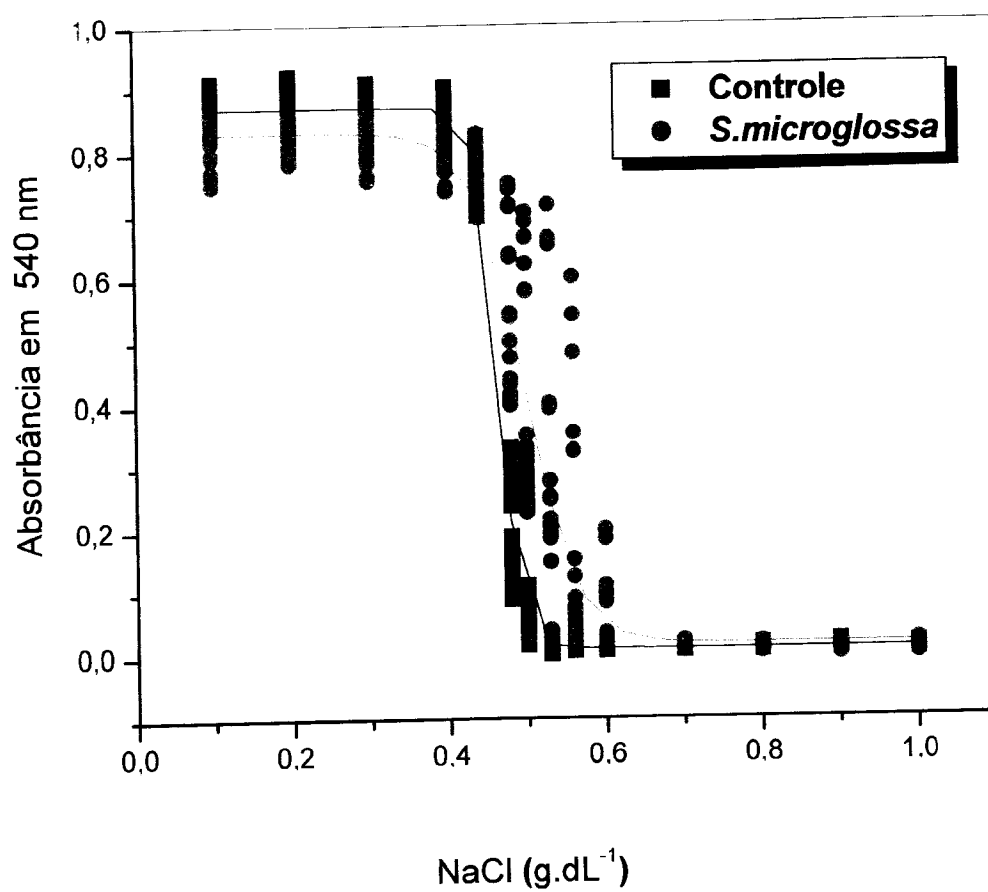


Figura 2. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na ausência (controle) e presença do extrato aquoso bruto de *S. microglossa*.

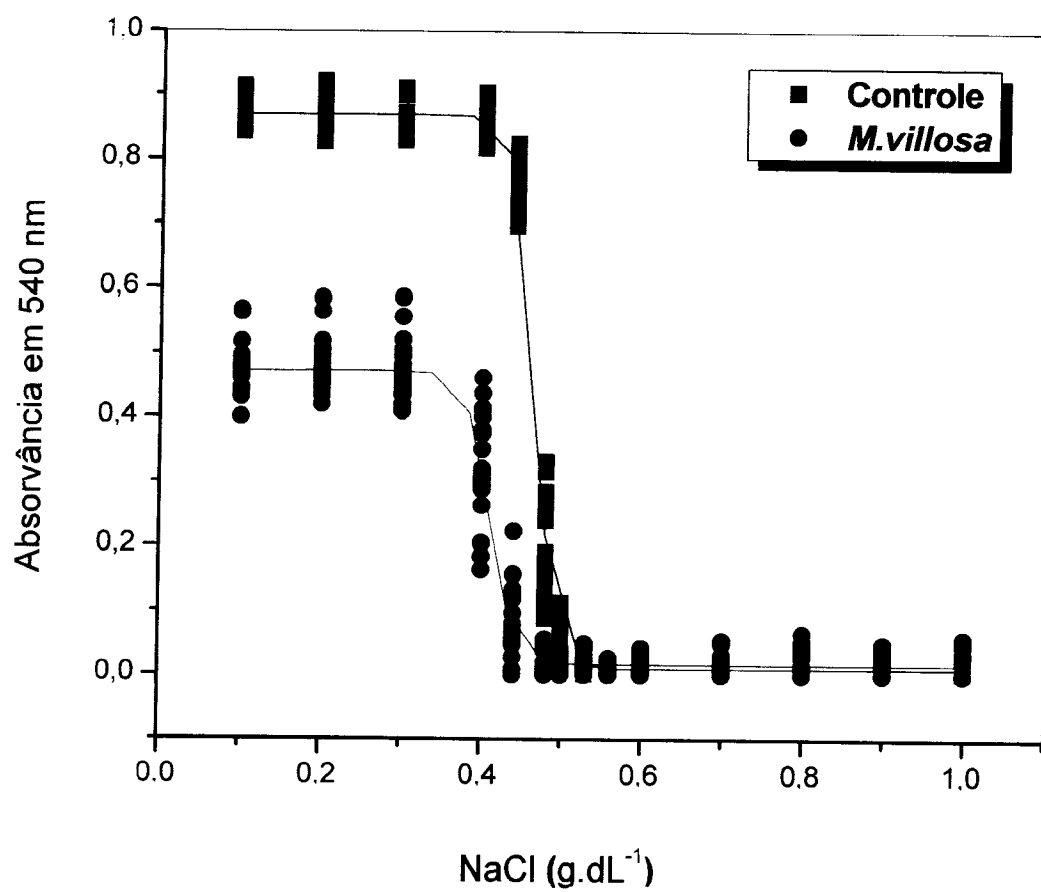


Figura 3. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na ausência (controle) e presença do extrato aquoso bruto de *M. villosa*.

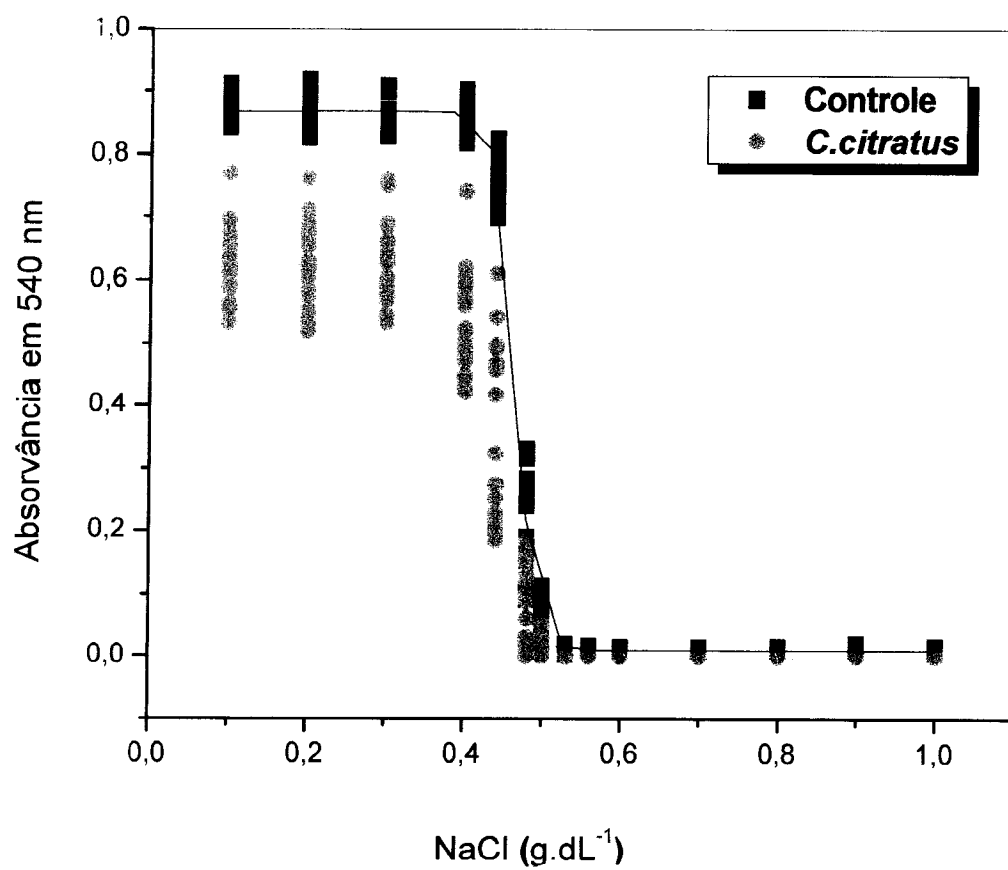


Figura 4. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na ausência (controle) e presença do extrato aquoso bruto de *C. citratus*.

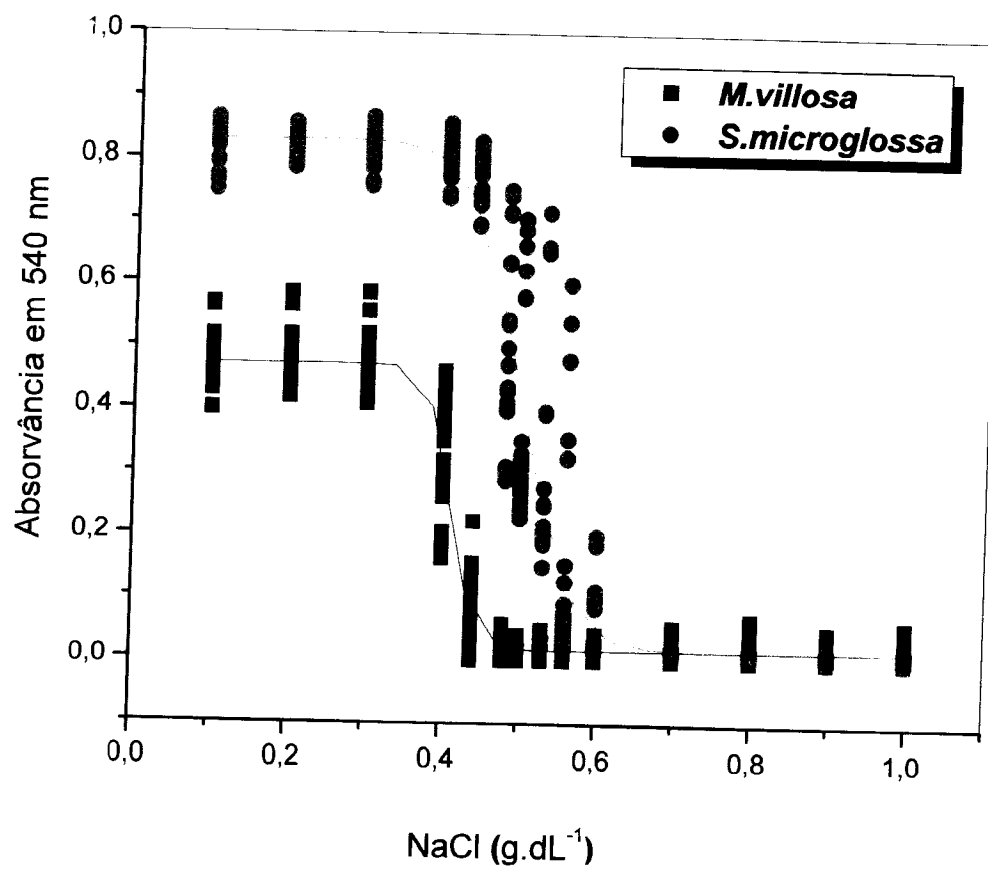


Figura 5. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença dos extratos aquosos brutos de *Mentha villosa* e de *Solidago microglossa*.

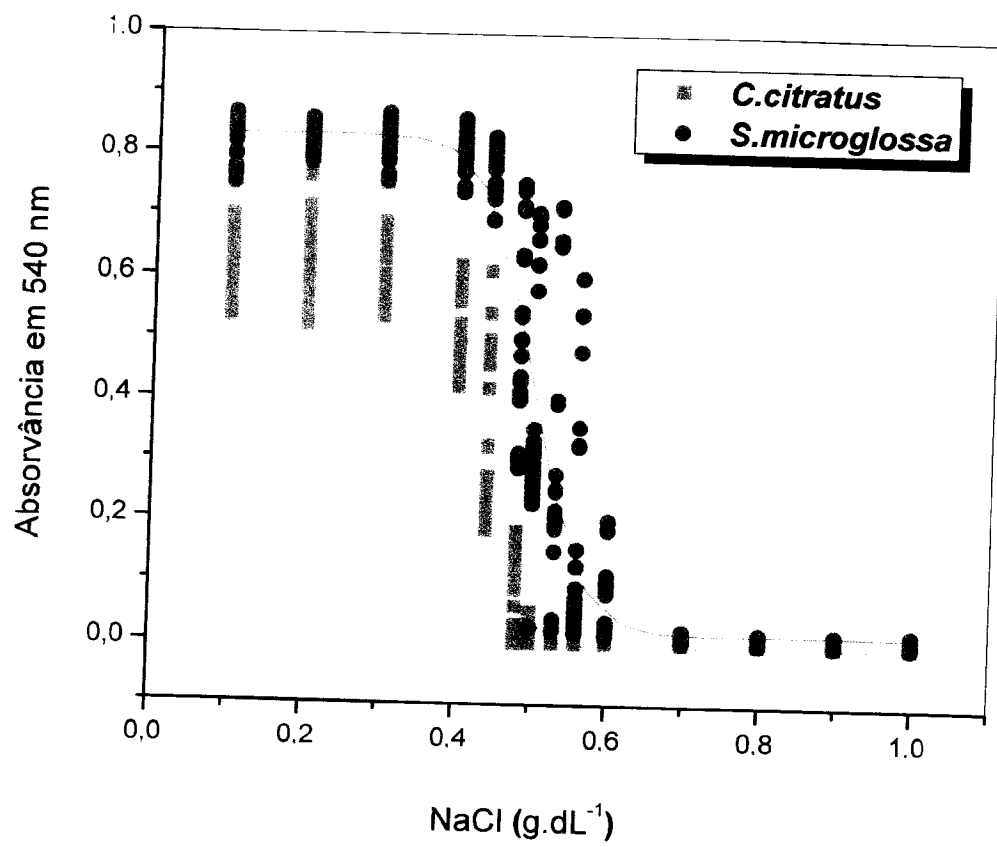


Figura 6. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença dos extratos aquosos brutos de *Cymbopogon citratus* e de *Solidago microglossa*.

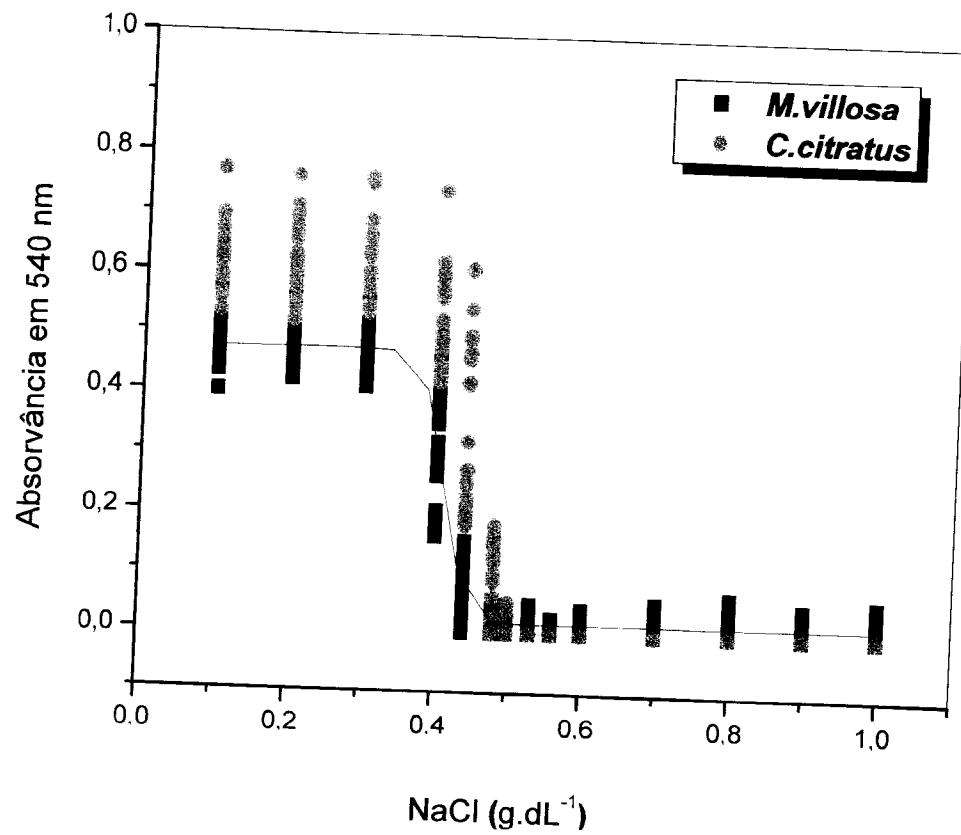


Figura 7. Curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos na presença dos extratos aquosos brutos de *Mentha villosa* e de *Cymbopogon citratus*.

Tabela 2. Comparação entre os valores H_{50} obtidos na curvas de fragilidade osmótica dos diferentes extratos vegetais e do controle (na ausência de extratos vegetais).

Amostra	N	Média \pm SD	P
Controle	12	0,4634 \pm 0,0044	a, c
<i>Mentha villosa</i>	12	0,4115 \pm 0,0107	a, d, e
<i>Cymbopogon citratus</i>	12	0,4445 \pm 0,0165	d, f
<i>Solidago microglossa</i>	12	0,5030 \pm 0,0337	c, e, f

^a Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre controle e *Mentha villosa*

^b Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre controle e *Cymbopogon citratus*

^c Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre controle e *Solidago microglossa*

^d Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre *Mentha villosa* e *Cymbopogon citratus*

^e Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre *Mentha villosa* e *Solidago microglossa*

^f Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre *Cymbopogon citratus* e *Solidago microglossa*

Tabela 3. Comparação entre os valores da profundidade de hemólise (P_H) obtida na curvas de fragilidade osmótica dos diferentes extratos vegetais e do controle (ausência de extrato vegetal).

Amostra	N	Média \pm SD	p
Controle	12	0,8617 \pm 0,0243	*
<i>Mentha villosa</i>	12	0,4571 \pm 0,0307	*
<i>Cymbopogon citratus</i>	12	0,6283 \pm 0,0588	*
<i>Solidago microglossa</i>	12	0,8078 \pm 0,0243	*

*Diferenças estatisticamente ($p < 0,05$) entre todas as amostras quando comparadas duas a duas por análise de variância segundo o teste de Tukey.

Tabela 4. Comparação entre os valores da amplitude da transição de hemólise obtidos nas curvas de fragilidade osmótica, na ausência (controle) e presença de cada um dos extratos vegetais.

Amostra	dS ± SD	p
Controle	0,0128 ± 0,0002	*
<i>Mentha villosa</i>	0,0149 ± 0,0009	*
<i>Cymbopogon citratus</i>	0,0188 ± 0,0011	*
<i>Solidago microglossa</i>	0,0322 ± 0,0022	*

*Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre as amostras quando comparadas duas a duas por análise de variância pelo teste de Tukey.

DISCUSSÃO

O teste de fragilidade osmótica (FO) das células vermelhas do sangue (RBC) é baseado na medida da resistência dos RBC à lise em função do decréscimo da concentração de NaCl no meio (BESSIS, 1973). Se uma dada população de RBC possui células individuais que difiram uma das outras no volume em que a hemoglobina é permitida difundir, a resistência osmótica deverá assumir uma probabilidade normal de distribuição (HUNTER, 1940; GUESS; WING, 1942). A determinação de mudanças nas curvas de FO no ponto de 50% de hemólise (fragilidade do corpúsculo médio) e inspeção da curva de fragilidade inteira são meios usuais de estudar a fragilidade osmótica dos RBC (DACIE; LEWIS, 1995).

Neste trabalho nós utilizamos sangue de voluntários do gênero feminino, entre 20 e 30 anos, para evitar diferenças determinadas pelo gênero ou pela idade (ARAKI; RIFKIND, 1980; BOWDLER et al., 1981; DETRAGLIA et al., 1974; FERNÁNDEZ-ALBERTI; FINK, 2000), em decorrência de alterações hormonais e metabólicas. A ocorrência de doenças, como hemoglobinopatias, anemias macrocíticas e microcíticas, que interferem na estabilidade de eritrócitos (PARPART et al., 1947; BOLTON, 1949; SUESS et al., 1978; HIN et al., 2006) foi utilizada como um critério de exclusão neste trabalho.

Com objetivo de verificar a ação dos extratos vegetais na estabilidade da membrana do eritrócito, foram adotados parâmetros para análise das alterações na fragilidade osmótica. Os valores de H_{50} (concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise dos eritrócitos), dS (amplitude da concentração do sal associada à transição da hemólise dos eritrócitos pelo choque hipotônico) e P_H (profundidade da alteração na densidade óptica ou intensidade de hemólise) foram analisados.

A observação da figura 1 indica que os eritrócitos das 12 doadoras apresentaram um padrão homogêneo de fragilidade osmótica, o que torna válida a utilização dessa curva como um controle para análise do efeito dos extratos vegetais sobre a transição de hemólise de seus eritrócitos (figuras 2 a 7).

A tabela 2 apresenta os valores médios de H_{50} com seus respectivos desvios-padrões e a análise da significância estatística das diferenças observadas entre os diferentes grupos. Os extratos vegetais brutos de *Solidago microglossa* ($0,5030 \pm 0,0337$) e de *Mentha villosa* ($0,4115 \pm 0,0107$) apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle ($0,4634 \pm 0,0044$), ou seja, ambas as plantas afetaram a curva de fragilidade

osmótica, uma vez que alteraram a concentração de NaCl que promoveu 50% de hemólise dos eritrócitos (H_{50}). Porém, essas plantas apresentaram efeitos antagônicos. O extrato de *Solidago microglossa* (figura 2) contribuiu para a ocorrência de hemólise numa concentração salina superior em relação ao controle. Isso significa que a *Solidago microglossa* apresenta algum constituinte de natureza hemolítica em sua composição. Já o extrato de *M. villosa* promoveu uma diminuição no valor de H_{50} , ou seja, ele protegeu os eritrócitos contra a lise por hipotonicidade (figura 3). Isso significa que o extrato de *M. villosa* tem algum constituinte anti-hemolítico em sua composição. Entretanto, o extrato bruto de *Cymbopogon citratus* não alterou de modo significativo o valor de H_{50} em relação ao controle (Figura 4), embora o valor médio em si tenha diminuído. Isso significa que no que diz respeito à concentração salina necessária para determinar hemólise, o extrato bruto de *Cymbopogon citratus* não teria ação hemolítica nem anti-hemolítica.

Entretanto, a questão é mais complexa, porque a transição de hemólise da fragilidade osmótica também pode ser caracterizada de outras formas.

Uma outra maneira de analisar a natureza do efeito do extrato sobre a hemólise é pela magnitude da variação de densidade óptica, que expressa a quantidade de hemólise ocorrida (P_H). As diferenças observadas entre os valores desse parâmetro foram significativamente diferentes em todas as comparações feitas dos extratos em relação ao controle e deles entre si (tabela 3). Como os valores de P_H de todos os extratos foram menores que os valores do controle, isso pode significar que todos os extratos tenham uma ação protetora contra a hemólise. Essa possibilidade parece razoável, porque na presença de qualquer um desses extratos a transição de hemólise seguiu o padrão sigmoidal, com a ocorrência de um “plateau” bem definido com a diminuição da tonicidade do meio.

A natureza do efeito do extrato vegetal sobre a lise dos eritrócitos deve ser também analisada pela magnitude da amplitude da transição de hemólise em função da diminuição da tonicidade do meio (dS). Os resultados obtidos para esse parâmetro foram mostrados na tabela 4. Foram significantes todas as diferenças observadas nos valores de dS dos ensaios realizados na presença dos extratos em relação ao controle e dos extratos entre si. Como os valores de dS foram sempre maiores na presença dos extratos vegetais em relação ao controle, isso significa que a lise dos eritrócitos pela hipotonicidade foi enfraquecida pela presença dos extratos vegetais. Isso também deve significar a ocorrência de alguma ação de natureza anti-hemolítica pelos extratos vegetais.

A ação terapêutica de plantas depende da sua constituição química (GILOOLY et al., 1983; BRUNE et al., 1991; HURRELL et al., 1999). Os vegetais sintetizam compostos

químicos, que sofrem modificações estruturais, tornando-se um recurso natural potencialmente ativo na forma de fitoterápico padronizado e eficaz (DI STASI, 1996). É válido ressaltar que substâncias que em princípio podem ser consideradas como terapêuticas, também causam efeitos indesejados ou tóxicos (CORRÊA, 1984).

Esses resultados nos levam a admitir que as plantas *Mentha villosa* (hortelã-rasteira), *Cymbopogon citratus* (capim-cidreira) e *Solidago microglossa* (arnica-do-Brasil) apresentam princípios ativos capazes de promover estabilização de eritrócitos humanos contra lise hipotônica, embora a *Solidago microglossa* apresente também um princípio de natureza hemolítica em sua composição.

Há na literatura alguma evidência sobre a existência de constituintes anti-hemolíticos nas plantas utilizadas?

Diversas plantas, inclusive aquelas consideradas neste trabalho, possuem componentes como os flavonóides, que segundo Chaudhuri et al. (2007) são incorporados nas membranas de “ghosts” de eritrócitos (eritrócitos vazios). Isso seria a causa da proteção dos eritrócitos contra lise hipotônica. A membrana dos eritrócitos torna-se mais ordenada e íntegra na presença de flavonóides. A ação antioxidante dos flavonóides na membrana das células vermelhas do sangue também inibe significativamente a peroxidação lipídica (DECKER, 1995; ARORA et al., 2000).

Por outro lado, há na literatura alguma evidência sobre a existência de algum fator hemolíticos na *Solidago microglossa*? Segundo Torres (1985), a *Solidago microglossa* é rica em saponina (glicosídeo espinasterial), classe de substâncias com reconhecida atividade hemolítica. As saponinas podem formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolipídios de membranas, alterando a permeabilidade da membrana celular (SIMÕES et al., 2003). Assim, a atividade hemolítica que constatamos para a *S. microglossa* pode ser atribuída à presença de substâncias como as saponinas.

Uma comparação entre o comportamento dos diferentes extratos vegetais entre si (figuras 5, 6 e 7), permite que possamos ter uma idéia sobre as diferenças existentes em seus potenciais anti-hemolíticos. O extrato bruto de *M. villosa* foi aquele que promoveu a maior diminuição observada nos valores de H_{50} (tabela 2) e na intensidade da hemólise (tabela 3), embora os dois outros extratos vegetais tenham enfraquecido de forma mais acentuada o efeito da hipotonicidade sobre a hemólise (tabela 4). Embora o óleo essencial de *M. villosa* seja rico em óxido de piperitenona e mentol (MARTINS et al., 2000), constituintes importantes em suas ações terapêuticas, é provável que a ação anti-hemolítica seja determinada pela ação de flavonóides.

CONCLUSÕES

Os extratos brutos aquosos de *Mentha villosa* (hortelã-rasteira), *Cymbopogon citratus* (capim-cidreira) e *Solidago microglossa* (arnica-do-Brasil) apresentam constituintes químicos capazes de promover estabilização de eritrócitos humanos contra lise hipotônica.

De forma antagônica, a *Solidago microglossa* também apresenta um constituinte de natureza hemolítica em sua composição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3ª. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- ALENCAR, V. P.; MELO, M. F. F. D.; OLIVEIRA, R. A. G. As plantas medicinais utilizadas pelos agentes de saúde da Paraíba. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13, 1994, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UFCE, 1994. 227 p.
- ALENCASTRO, F.M.M.R.; SCATONE, Z.; PRISCO, J.T.; LABORIAU, L.F.G. Contribuição para uma bibliografia do gênero *Mentha* L. **Associação Brasileira de Pesquisa de plantas aromáticas e óleos essenciais**, Campinas, 354 p., 1965.
- ALMEIDA, R.N.; HIRUMA, C.A.; BARBOSA-FILHO, J.M. Analgesic effect of rotundifolone in rodents. **Fitoterapia**, v. 67, n. 4, p. 334-38, 1996.
- AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 7915-7922, 1993.
- APÁTI, P.; SZENTMIHÁLYI, K.; KRISTÓ, Sz.T.; PAPP, I.; VINKLER, P.; Szoke, É.; Kéry, Á. Herbal remedies of *Solidago* correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Hungary. v. 32, p. 1045-1053, 2003.
- ARAKI, K.; RIFKIND, J.M. Age dependent changes in osmotic hemolysis of human erythrocytes. **Journal of Gerontology**, v. 35, p. 499-505, 1980.
- ARORA, A.; BYREM, T.M.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, p. 102-109, 2000.
- BATNA, A.; FUCHS, C. Spitteller lipid peroxidation in presence of ebslen. **Chemistry Physics of Lipids**, v. 87, p. 149-158, 1997.
- BERNADINO NETO, M. **Origem da estabilização de eritrócitos por sorbitol**. 2006. 67f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.
- BESSIS, M. **Living blood cells and their ultrastructure**. New York: Springer Verlag, 1973.
- BOLTON, J.H. The distribution curve of erythrocyte fragility. **Blood**, v. 4, p. 172-178, 1949.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; BASTARD, J.P.; JAUDON, M.C.; DELATTRE, J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. **Diabetes & Metabolism**, v. 26, n. 163-176, 2000.
- BONTEMPO, M. **Medicina Natural**. São Paulo: Nova Cultural, 1994.

¹ SILVA, A.M.; PINHEIRO, M.S.F.; FRANÇA, M.M. **Guia para normalização de trabalhos técnicos científicos**: Projetos de pesquisa, trabalhos acadêmicos, dissertações e teses. 5ª. Ed. Uberlândia, EDUFU, 2006.

BORBA, M.O.P.; KOBAYASHI, S.; ACA, E.B.; MEDEIROS, F.P. Frações ativas de *Mentha crispata* sobre a cultura de *Entamoeba histolytica* - cepa saw 1627 (Parte II). **XI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 1990.

BORGES, A.S.C. **Efeito do extrato de *Solidago microglossa* DC sobre a dissolução de coágulos e a hidrólise de N^o-benzoil-D,L-arginina-para-nitroanilida**. 2001. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

BOROWITZKA, L.J.; BROWN, A.D. The salt relations of marine and halophilic species of the intracellular green alga *Dunaliella*: the role of glycerol as a compatible solute. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 96, n. 1, p. 37-52, 1974.

BOWDLER, A.J.; DOUGHERTY, R.M.; BOWDLER, N.C. Age as a factor affecting erythrocyte osmotic fragility in males. **Gerontology**, v. 27, p. 224-231, 1981

BOWLUS, R.D.; SOMERO, G.N. Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selections of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 208, n. 2, p. 137-151, 1979.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Mossoró, 1976. 233 p.

BRANDÃO, M.G.L. Recomendações para a utilização de drogas e extratos vegetais pelas farmácias de manipulação. **Infarma**, v. 6, n. 1-2, p. 6-9, 1997

BREVOORT, P. The Booming, U.S. Botanical Market. A new overview. **HersalJram**, v.44, 33-46, 1998.

BROWN, J.E.; KHODR, H.; HIDER, R.C.; RICE-EVANS, C.A. **Biochemistry Journal**, v. 330, p. 1173-1178, 1988.

BRUNE, M.; HALLBERG, L.; SKANBERG, A. Determination of iron binding phenolic groups in foods. **Journal of Food Science**, v. 56, p. 128-131, 1991.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CARBAJAL, D; CASACO, A.; ARRUZABABALA, L.; GONZALEZ, R.; TOLON, T. Pharmacological study of *Cymbopogon citratus* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.25, p. 103-107, 1989.

CARLINI, E.A.; CONTAR, J.D.P.; SILVA-FILHO, A.R.; SILVEIRA-FILHO, M.L.; FROCHTENGARTEN, O.F.A.; BUENO, J. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J. Ethnopharmacology**, v. 17, p. 37-64, 1986.

CERQUEIRA, M.B.S.; SOUZA J.T.; AMADO, JR.R.; PEIXOTO, A.B.F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas de *Lichnophora ericoides* mart. (arnica). **Ciência e Cultura**, v. 39, p. 551-553, 1987.

CHAUDHURI, S.; BANERJEE, A.; BASU, K.; SENGUPTA, B; SENGUPTA, P.K. Interaction of flavonoids with red blood cell membrana lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. **Internacional Journal of Biological macromolecules**, 2007.

- CHEIKH, M.C.E.; MACHADO, M.I.; TAVEIRA, J.J.; REIS, C.; RODRIGUES, M.V. Estudo da atividade microbiana do óleo essencial da *Lichnophora ericoides* (arnica). **Revista de Patologia Tropical**, v. 11, p. 157-160, 1982.
- CHERNOVICZ, P. L. N. **A grande farmacopéia brasileira**. Formulário e guia médico. Rio de Janeiro: Itatiaia, 1996. v. 1, 728 p.
- CHIO, K. S.; TAPPEL, A. L. Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malonaldehyde. **Biochemistry**, n. 7, v. 8, p. 2827-2832, 1969.
- CONTRERA, M.G.D.; LOPES, R.A.; POZETTI, G.L.; BERNARDI, A.C.; CABREBRA, A. Ação da tintura-mãe de *Lichnophora ericoides*, *Aristolochia esperanzae* e *Solidago microglossa*, em feridas cutâneas do rato. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas**, v. 8, p. 13-17, 1985.
- CORRÊA, C. B. V. Contribuição ao estudo da *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. ex Britt & Wilson - erva cidreira. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 3, p. 57-64, 1992.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal do Ministério da Agricultura, 1984.
- CRAKER, L.; SIMON, E.; LANES E. **Herbs, spices and medicinal plants: recent advances in botany, horticulture, and pharmacology**. New York: Orix Press, v. 3, 1988, p. 103-144.
- CRAVEIRO A.A.; ALENCAR, J.W.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; MONTE, F.J.Q. Novos óleos essenciais de Labiadas do Nordeste. **XI Encontro da Sociedade Brasileira de Química**, Caxambu, 1990.
- CRIBIER, S.; MORROT, G.; ZACHOWSKI, A. Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins, Leukotrienes and essential Fatty Acids**, v. 48, p. 24-32, 1993.
- CROSS, C.; HALLIWELL, B.; BORISH, E.; PRYOR, W.; AMES, B.; SAUL, R.; MCCORD, J.; HARMAN, D. Oxygen radical and human disease, **Annals of Internal Medicine**, v. 107, p. 526-545, 1987.
- DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical hematology**. 8 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995.
- DANIELLI, J.F.; DAVSON, H. A contribution to the theory of permeability of thin films. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 5, p. 495-508, 1935.
- DECKER, E.A. The Role of Phenolics, Conjugated Linolenic Acid, Carnosine and Pyrroloquinoline Quinone as Nonessential Dietary Antioxidants. **Nutrition Reviews**, v. 53, n. 3, p.49-58, 1995.
- DELANO, M.D. Simple Physical Constraints in Hemolysis. **Journal of Theoretical Biology**, v. 175, p. 517-524, 1995.
- DEMARQUE, D. ; JOUANNY, J. ; POITEVIN, B. ; SAINT-JEAN, Y. **Homeopathie connaitre la matière médicale**. Paris : Centre d'Etudes et Documentations Homéopa, v. 1, 1985, p. 333-334.

- DETRAGLIA, M.; COOK, F.B.; STASIW, D.M.; CERNY, L.C. Erythrocyte fragility in aging. **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 345, p. 213-219, 1974.
- DI STASI, L. C. **Plantas medicinais**. Arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora UNESP, 1996.
- DIALLO, B.; VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRE, R.; KONOSHIMA, T.; KOZUKA, M.; TOKUDA, H.; **Journal of Natural Products**, v. 52, 879 p., 1989.
- DIMECH, G.S.; GONÇALVES, E.S.; ARAÚJO, A.V.; ARRUDA, V.M.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; WANDERLEY, A.G Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Mentha crispata* sobre a performance reprodutiva em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 2, p.152-157, 2006.
- DIMOPOULLOS, G.T., BEDELL, D.M. Studies of bovine erythrocytes in anaplasmosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 23, p. 813-820, 1962.
- DUGAS, A.J.; CASTANEDA-ACOSTA, J.; BONIN, G.C.; PRICE, K.L.; FISCHER, N.H.; WINSTON, G.W. Evaluation of the total peroxil radical-scavenging capacity of flavonoids: structure-activity relationships. **Journal of Natural Products**, n. 3, v. 63, p. 327-331, 2000.
- EISENBERG, D.M.; DAVIS, R.B.; ETTNER, S.; APPEL, S. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997. **Jama**, v. 280, n. 18, p. 1569-1619, 1998.
- EL-KAMIL, H.H.; AHMED, A.H.; MOHAMMED, A.S.; YAHIA, A.A.M.; EL-TAYEB, I.H.;ALI, A.A. Antibacterial properties of essential oils from *Nigella sativa* seeds, *Cymbopogon citratus* leaves and *Pulicaria undulata* aerial parts. **Fitoterapia**, v. 69, p. 77-78, 1998.
- FACURY NETO, M.A.; FAGUNDES, D.J.; BELETTI, M.E.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y.; PENHA-SILVA, N. Systemic use of *Solidago microglossa* DC in the cicatrization of open cutaneous wounds in rats. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 21, n. 4, p. 207-210, 2004.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3ª. ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977. p. 809-11.
- FERNÁNDEZ-ALBERTI, A.; FINK, N.E. Red blood cell osmotic fragility confidence intervals: a definition by application of a mathematical model. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 38, n. 5, p. 433-436, 2000.
- FERREIRA, M.S.C. **Estudo farmacológico do *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf**. 93 p. Dissertação (Mestrado) - UFC, Ceará, 1984.
- FERRO, V. O.; OLIVEIRA, I.; JORGE, L. J. F. Diagnose comparativa de três espécies vegetais comercializadas como “ervas cidreiras” *Lippia alba* (MILL) N.E.Br ex Britt & Wilson. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf e *Melissa officinalis* L. **Lecta**, Bragança Paulista, v. 14, n. 2, p. 53-63, 1996.
- FONSECA, L.C.; CORRÊA, N.C.R.; GARROTE-FILHO, M.S.; CUNHA, C.C.; PENHA-SILVA, N. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 543-548, 2006.

FUCHS, V.L.; ILIEV, U.M.V. Isolierung von quervitrin aus *Solidago virga aurea* L., *S. serotina* Ait und *S. canadensis* L. **Scientia Pharmaceutica**, v. 17, p. 128-131, 1949.

FURLAN, R.M. **Cultivo de plantas medicinais**. 2.ed. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1999.

GILLOOLY, M.; BOTHWELL, T.H.; TORRANCE, J.D.; MACPHAIL, A.P.; DERMAN, D.P.; BEWODA, W.R.; MILLS, W.; CHARLTON, R.W.; MEYER, F. The effect of organic acids, phytate and polyphenols on the absorption of iron from vegetables. **British Journal of Nutrition**, v. 49, p. 331-342, 1983.

GOMES, E. C. et al. Plantas utilizadas na medicina popular em Morretes, PR - estudos preliminares de um projeto de extensão. **Universidade e Sociedade**, Maringá, v. 12, n. 16, p. 18-23, 1997.

GOUVÊIA-E-SILVA, L.F. **Caracterização da estabilização de eritrócitos por etanol**, 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.

GUESS, G.; WING, M. Osmometric behavior of normal human erythrocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 21, 257 p., 1942.

HALL, I. H.; LEE, K.H.; STARNES, C.O.; SUMIDA, Y; WU, R.Y.; WADDELL, T.G.; COCHRAN, J.W.; GERHART, K.G. Antihyperlipidemic activity of sesquiterpene lactones and related compounds. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 69, p. 694-696, 1980.

HALL, I. H.; LEE, K.H.; STARNES, C.O.; WADDELL, T.G. Antitumor agents. 21. A proposed mechanism for inhibition of cancer growth by tenulin and helenalin and related cyclopentenones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 333-337, 1977.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Res. Comms.**, n. 1, v. 9, p. 1-32, 1990.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Clarendon Press, Oxford, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C.; CROSS, C.E. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, p. 598-619, 1992.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HIN, H.; CLARKE, R.; SHERLIKER, P.; ATOYEBI, W.; EMMENS, K.; BIRK, J.; SCHNEEDE, J.; UELAND, P.M.; NEXO, E.; SCOTT, J.; MOLLOY, A.; DONAGHY, M.; FROST, C.; EVANS, J.G. Clinical relevance of low serum vitamin B12 concentrations in older people: the Banbury B12 study. **Age Ageing**, v. 35, p. 416-422, 2006

HIRUMA, C.A. **Estudo químico e farmacológico do óleo essencial das folhas de *Mentha villosa* Huds.** 1993. Tese de doutorado. Universidade Federal da Paraíba, 1993.

HUNTER, F.T. A photoelectric method for the quantitative determination of erythrocyte fragility. **Journal Clinical Investigation**, v. 19, p. 691-694, 1940.

HURREL, R.F.; REDDY, M.; COOK, J.D. Inhibition of non-heme iron absorption in man by polyphenolic containing beverage. **British Journal of Nutrition**, v. 81, p. 289-295, 1999.

JACOBS, M.H.; GLASSMAN, H.N.; PARPART, A.K. Osmotic properties of the erythrocyte. VII. The temperature coefficients of certain hemolytic process. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 7, p. 197, 1935.

JAIN, N.C. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **Cornell Veterinarian**, v. 63, p. 411-423, 1973.

JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 4.ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1986, 1221 p.

JAIN, S. K.; MCVIE, R.; DUETT, J.; HERBST, J.J. Erythrocyte membrane lipid peroxidation and glycosylated hemoglobin in diabetes. **Diabetes**, v. 38, p. 1539-1543, 1989.

KANJANAPOTHI, D.; SMITASIRI, Y.; PANTHONG, A.; TAESOTIKUL, T.; RATHNAPANONE, V. Postcoital antifertility effect of *Mentha arvensis*. **Contraception**, v. 24, p. 559-567, 1981.

KONDO, H. et al. Peroxynitrite-induced hemolysis of human erythrocytes and its inhibition by antioxidants. **FEBS Letters**, v. 413, p. 236-238, 1997.

KOO, H.; GOMES, B.P.; ROSALEN, P.L.; AMBROSANO, G.M.; PARK, Y.K.; CURY, J.A. In vitro anti-microbial activity of Propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 45, p. 141-148, 2000.

LAHLOU, S.; CARNEIRO-LEÃO, R.F.L.; LEAL-CARDOSO, J.H.; TOSCANO, C.F. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* and its main constituent, piperipenone oxide, in normotensive anaesthetized rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Medical.**, v. 67, n. 7, p. 638-43, 2001.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, p. 969-978, 1988.

LEVEN, N.; WILLUHN, G. Sesquiterpene lactones from *Arnica chamissonis* less. VI- Identification and quantitative determination by high-performance liquid and gas chromatography. **Journal of chromatography**, v. 410, p. 329-342, 1987.

LIBERALLI, C. H.; HELOU, J. H.; FRANÇA, A. A. O "capimlimão" (*Cymbopogon citratus* Stapf). **Contribuição ao estudo das gramíneas aromáticas**. 1946.

LIMA E. O.; GOMPERTZ O. F.; GIESBRECHT A. M.; PAULO M. Q. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**, v. 36, p. 333-336, 1993.

LIMA NETO, D.A.; JOSÉ, J.L.; VEIGA, M.C.F.A.; GUIMARÃES, A.; GAMA, M.L.G. Atividade microbiana das plantas arnica, bardana e tanchagem. **A Folha Médica**, v. 160, p. 59-62, 1993.

LING, H. C.; KING, M. L.; CHEN, C. F.; HSU, K. P.; SU, M. H.; LIN, M. H. **Chem. Abs.**, v. 97, 1982.

- LOGISZ, C.C.; HOVIS, J.S. Effect of salt concentration on membrane lysis pressure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1717, p. 104-108, 2005.
- LORENZETTI, B.B.; SOUZA, G.E.P.; SARTIS, S.J.; SANTOS FILHO, D; FERREIR, S.H. Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 43-48, 1991.
- LYSS, G.; SCHMIDT, T.J.; MERFORT, I.; PAHL, H.L. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from arnica, selectively inhibits transcription factor NF-kappa B. **Biological Chemistry**, v. 378, p. 951-961, 1997.
- MAKINDE, M.O.; BOBADE, P.A. Osmotic fragility of erythrocytes in clinically normal dogs and dogs infected with parasites. **Research in Veterinary Science**, v. 57, p. 343-348, 1994.
- MARCHISHIN, S.M. Efficacy of the phenol compounds of Arnica in toxic lesion of liver. **Farmakol Toksikol.**, v. 46, p. 102-106, 1983.
- MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 2000. p. 136-137.
- MATHUR, R. Fructolysis effect of 50% ethanolic extract of *Mentha arvensis* linn. (leaves) in seminal vesicles of rat. **Acta European Fertility**, v. 22, p. 219-20, 1991.
- MATOS, F.J.A. Farmácias vivas. Fortaleza. In: **Edições UFC**, Fortaleza, CE, Brasil, 2001.
- MATOS, P. J. A .et al. Plantas medicinais de uso popular no Ceará. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 7., 1982, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 1982. 119 p.
- MATTOS, J. K. A.; DAS GRAÇAS, M. A. Coleção viva de ervas medicinais na Universidade de Brasília. Primeiro ano de observações. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 33, p. 96-103, 1980.
- MELO, A.M.; PINHO, S.; SANTANA, C.F.; SANTOS, E.R.; SOUZA, I.A. Primeiras observações sobre o uso da *Mentha crisp*a em tricomoníase urogenital. In: **XI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Curitiba, p. 160, 1993.
- MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 21-35, 2001.
- MOECKEL, G.W.; SHADMAN, R.; FOGEL, J.M.; SADRZADEH, S.M.H. Organic osmolytes betaine, sorbitol and inositol are potent inhibitors of erythrocytes membrane ATPase. **Life Sciences**, v. 71, n. 20, p. 2413-2424, 2002.
- MORAES-SANTOS, C.A.; TORRES, K.R.; LEONART, R. **Plantas medicinais (herbarium, flora et scientia)**. 2.ed. São Paulo: Ícone, 1988, p. 40-41.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3^a ed. New York: Worth, 2000, 1200 p.
- NIKOLOPOULOS, D.; MANETAS, Y. Compatible solutes and in vitro stability of salsola soda enzymes: praline incompatibility. **Phytochemistry**, v. 30, p. 411-413, 1991.

NOGUEIRA, M. J. C. **Fitoterapia popular e enfermagem comunitária**. Monografia (Graduação em Enfermagem) - Departamento de Enfermagem Médico - cirúrgica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

NORRED, C.L.; ZAMUDIO, S.; PALMER, S.K. Use of complementary and alternative medicines by surgical patients. **American Association of Nurse Anesthetists Journal**, v. 68, p. 13-18, 2000.

NUNES GUEDES, D.N.; SILVA, D.F.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA DE MEDEIROS, I. Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha villosa* in rats. **Phytomedicine**, v. 11, p. 490-497, 2004.

ONAWUNMI, G.O.; YISAK, W.A.B.; OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, p. 279-286, 1984.

ONAWUNMIM G. O. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. **Letters in Applied Microbiology**, v. 9, p. 105-108, 1989.

PARPART, A.K.; LORENZ, P.B.; PARPART, E.R.; GREGG, J.R.; CHASE, A.M. The osmotic resistance (fragility) of red cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 26, p. 636-640, 1947.

PAVIANI, T. I. Algumas considerações acerca da anatomia foliar de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. **Revista da Faculdade de Farmácia de Santa Maria**, Santa Maria, v. 10, p. 97-108, 1964.

PERK, K.; FREI, Y.F.; HERZ, A. Osmotic fragility of red blood cells of young and mature domestic and laboratory animals. **American Journal Veterinary Research**, v. 25, p. 1241-1248, 1964.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PITTMAN, J.G.; MARTIN, D.B. Fatty acid biosynthesis in human erythrocytes: evidence in mature erythrocytes for an incomplete long chain fatty acid synthesizing system. **Journal Clinical Investigation**, v. 45, p. 165-172, 1966.

POLLARD, A.; WYN-JONES, R.G. Enzymes activities in concentrated solution of glycinebetaine and other solutes. **Planta Berl**, v. 144, p. 291-298, 1979.

PUHLMANN, J.; ZENK, M.H.; WAGNER, H. Immunologically active polysaccharides of *Arnica montana* cell cultures. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1141-1145, 1991.

RACEK, J.; HERYNKOVA, R; HOLECEK, V.; FALTYSOVA, J.; KREJCOVA, I. What is the Source of Free Radicals Causing Hemolysis in Stored blood? **Physiological Research**, v. 50, p. 383-388, 2001.

RAMAKERS, G. et al. Estudo das plantas utilizadas como medicinais no Estado do Ceará. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13., 1994, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UFCE, 1994. 214 p.

- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.M.; PAGANDA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.
- ROCHA, A.A. **Obtenção e avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico bruto da arnica brasileira (*Solidago microglossa*, DC)**. Mestrado em Promoção da Saúde. Universidade de Franca, 69f., 2006.
- ROTH, S.; SEEMAN, P. All lipid-soluble anaesthetics protect red cells. **Natural New Biology**, v. 231, p. 284-285, 1971.
- SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.Z.; COELHO, M.C.L. Genotoxicity assesment through the Ames test of medicinal plants commoly used in Brazil. **Enviromental Toxicology and Water Quality: an International Journal**, v. 9, p. 87-93, 1994.
- SANTANA, C.F.; ALMEIDA, E.R.; DOS SANTOS, R.; SOUZA, I.A. Actions of *Mentha crispera* hydroethanolic extract in patients bearing intestinal protozoan. **Fitoterapia**, v. 63, p. 409-410, 1992.
- SCHAFFNER, W. Granny's remedy explained at molecular level: helenalin inhibits NF-kB. **Biological Chemistry**, v.378, 935 p., 1997.
- SCHMIDT, C. A double-blind, placebo-controlled trial: *Arnica montana* applied topically to subcutaneous mechanical injuries. **Journal of the American Institute oh Homeopathy**, v. 89, p. 186-193, 1996.
- SCHMIDT, T.J.; WILLUHN, G.; STEIGEL, A.; WENDISCH, D. Sesquiterpene lactones and inositol esters from *Arnica angustifolia*. **Planta Medica**, v. 61, p. 544-550, 1995.
- SECCO, R. S. Produtos naturais: alternativa segura? **Revista Ciência e Cultura**, v. 42, p. 807-10, 1990.
- SEEMAN, P.M. Membrane stabilization by drugs: tranquilizers, steroids and anesthetics. **Int. ver. Neurobiology**, v. 9, p. 145-221, 1966.
- SHAHIDI, F., JANITHA, P.K., WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. Critical Review in **Food Sciences and Nutrition**, v. 32, p. 67-103, 1992.
- SILVA, M. F.; LISBOA, P. L. B.; LISBOA, R. C. L. **Nomes vulgares de plantas amazônica**. Manaus: INPA, 1977.
- SILVA, S. R. **Plantas do cerrado utilizadas pelas comunidades da região do Grande Sertão Veredas**. Brasília: FUNATURA, 1998.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRG, 2003.
- SIMÕES, C. M. O. ;SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª. ed. Porto Alegre, Florianópolis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Universidade Federal de Santa Catarina, 2000.

- SOARES, J.C.M. et al. Effect of high concentration of reducing monosaccharide on α -aminolevulinatase activity of human erythrocyte in vitro. **American Journal of Biochemical and Biotechnology**, 2005.
- SOUSA, P.J.C.; MAGALHÃES, P.J.C.; OLIVEIRA, V.S.; LIMA, C.C.; LEAL-CARDOSO, J.H. Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of guinea pig. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 30, p. 787-91, 1997.
- STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.
- STEHLMANN, J. R.; BRANDÃO, M. G. L. Um estudo etnobotânico na localidade de Lavras Novas, Ouro Preto, MG: plantas na medicina popular. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13, 1994, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UFCE, 1994. 148 p.
- STORRY, J.R. Review: The function of blood group specific RBC membrane components. **Immunohematology**, v. 20, n. 4, p. 206-216, 2004.
- SUESS, J.; LIMENTANI, D.; DAMESHEK, W.; DOLLOFF, M. A quantitative method for the determination and charting of the erythrocyte hypotonic fragility. **Blood**, v. 3, p. 1290-1303, 1978.
- TELEN, M.J.; KAUFMAN, R.E. The mature erythrocyte. In: LEE, G.R. et al. **Wintrobe's clinical hematology**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1999. cap. 10, p. 193-227.
- TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. **Herbarium**. 2 ed. Curitiba: Laboratório Botânico, 1994, p. 410.
- TIANO, L.; FEDELI, D.; SANTRONI, A.M.; VILLARINI, M.; ENGMAN, L.; FALCIONI, G. Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. **Mutation Research**, v. 464, p. 269-277, 2000.
- TORRES, L.M.B. **Estudo químico da espécie *Solidago microglossa* DC.**, 1985, 175f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, USP, São Paulo, 1985.
- TORRES, L.M.B.; AKISUE, M.K.; ROQUE, N.F. Quercitrina em *Solidago microglossa* DC, a Arnica-do-Brasil. **Revista de Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 23, p. 33-40, 1987.
- TSAO, R.; AKHTAR, M.H. Nutraceutical and functional foods. I. Current trend in phytochemical antioxidant research. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 3, p. 10-17, 2005.
- VAN DENBERG, E. Contribuição à flora medicinal do Mato Grosso. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 33, p. 163-170, 1980.
- VIANA, Y.A.; GARROTE-FILHO, M.S.; PENHA-SILVA, N. Estabilização de proteínas por osmólitos. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 2, p. 83-88, 2005.
- WANG, Z.T.; NG, T.B.; XU, G.J. Recent advances in pharmacognosy research in China. **General Pharmacology: The vascular system**, v.26, n. 6, p. 1211-1224, 1995.

WEED, R.I.; REED, C.F. Membrane alterations leading to red cell destruction. **American Journal of Medicine**, v. 41, p. 681-694, 1966.

WILLCOX, J.K.; ASH, S.L.; CATIGNANI, G.L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical Review of Food Science Nutritional**, v. 44, p. 275-295, 2004.

WILLET, W.C. Diet and health - what should we eat? **Science**, v. 264, p. 532-538, 1994.

WOERDENBAG, H.J.; MERFORT, I.; PABREITER, C.M.; SCHMIDT, T.J; WILLUHN, G.; UDEN, W.; PRAS, N.; KAMPINGA, H.H.; KONINGS, A.W.T. Cytotoxicity of flavonoids and sesquiterpene lactones from *Arnica* species against GLC4 and COLO 320 cell lines. **Planta Medica**, v. 60, p. 434-437, 1994.

YANCEY, P.H. Organic osmotic effectors in cartilaginous fishes. In: GILLES, R.; GILLES-BAILLIEN, M. (Ed.). **Transport Processes, Iono- and Osmoregulation**. New York: Springer-Verlag, 1985, p. 424-436.

YAREMY, I.M.; GRYGORIEVA, N.P.; MESHCHISHEN, I.F. Effect of *Arnica montana* on the state of lipids peroxidation and protective glutathione system of rat liver in case of experimental toxic hepatitis. **Ukrainskii Biokhimicheskii Zhurnal**, v. 70, p. 78-82, 1998.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.