

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

**Efeito dos extratos brutos aquosos de *Artemisia absinthium* L.
(Compositae), *Lippia camara* L. (Verbenaceae) e *Bryophyllum sp*
(Crassulaceae) sobre a estabilidade de eritrócitos humanos**

Mariana Vaini de Freitas

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 *Artemisia absinthium* L.
(Compositae), *Lippia camara* L. (Verbenaceae) e *Bryophyllum sp*
(Crassulaceae) sobre a estabilidade de eritrócitos humanos**

Mariana Vaini de Freitas

Prof. 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 *Artemisia absinthium* L.
(Compositae), *Lippia camara* L. (Verbenaceae) e *Bryophyllum* sp
(Crassulaceae) sobre a estabilidade de eritrócitos humanos**

Mariana Vaini de Freitas

Professor Dr. Nilson Penha Silva
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em ____/____/2007

Professora Dra. Vera Lúcia de Campos Brites

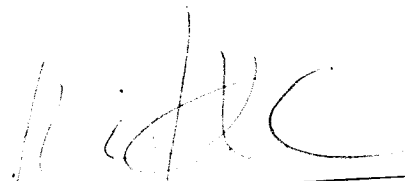
Uberlândia, MG
Fevereiro de 2007

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

**Efeito dos extratos brutos aquosos de *Artemisia absinthium* L.
(Compositae), *Lippia camara* L. (Verbenaceae) e *Bryophyllum* sp
(Crassulaceae) sobre a estabilidade de eritrócitos humanos**

Mariana Vaini de Freitas


Aprovada pela Banca Examinadora em: 08 / 02 / 2007
Nota: 100



Prof. Dr. Nilson Penha Silva



Prof. Dr. Miguel Antônio Facury Neto



Prof. Ms. Cynthia Barbosa Firmino

Uberlândia, MG
Fevereiro de 2007

À minha mãe, Madalena,
e ao meu pai, Valdir.
Tenho o amor, a dedicação
e a grande alegria de vocês
dentro de mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu porto seguro diante dos problemas e incentivo de sempre melhorar, respeitando as pessoas a minha volta. Aliás, Deus foi generoso em colocar no meu caminho colegas e amigos que me ajudaram a crescer como bióloga e ser humano.

Aos meus pais, Valdir e Madalena, novamente, e meu irmão, Rodrigo, pois todos os agradecimentos a eles ainda serão poucos diante da perseverança e carinho deles em construir uma família, sem dúvidas, estruturada e muito feliz. Meu curso, meus estágios, não teriam sido nada sem o apoio dessas pessoas maravilhosas.

Agradeço aos membros da minha família, especialmente, minha avó Ignês, minhas tias Cida e Vânia, por se interessarem no meu bem estar e na minha vida acadêmica.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Nilson Penha Silva, que foi realmente um professor na minha vida, uma vez que o tempo que fiquei no laboratório me deixou algo muito valioso: a vontade de sempre aprender e lutar pelo melhor. Obrigada, professor, pelos ensinamentos.

Agradeço à minha professora e amiga Ms. Cynthia Barbosa Firmino, pelas palavras sábias, conselhos e olhar de perseverança diante das barreiras mais difíceis. Um pouco do que sei e sou hoje devo a você. Que Deus e todos os seres bons continuem olhando por nós!

Agradeço às minhas grandes amigas, Alice, Rita e Flávia, pelo companheirismo, alegrias e sabedoria em todos os momentos. Nossas vidas foram entrelaçadas numa história muito bonita durante esses quatro anos, e espero que por muito mais...

À Paula, minha amiga e companheira de quarto, por ser paciente comigo, atenciosa, incentivadora do meu trabalho e um exemplo de dinamismo e alegria.

Agradeço às minhas colegas e, principalmente, amigas de laboratório, Juliana, Tatiana e novamente à Rita. O ambiente de trabalho se tornou minha casa com as histórias e os risos de vocês, e nossas viagens foram inesquecíveis. Desejo muito sucesso a vocês!

Aos meus amigos da faculdade, Carol, Ana Paula, Jairo, pelos momentos de estudos e alegrias... por sempre me ouvirem e aconselharem.

À minhas amigas Marla, Poliana e Patrícia, que mesmo distantes, tenho o incentivo e carinho delas dentro de mim. Obrigada pelos momentos bons.

Agradeço aos professores que passaram por mim durante o curso de Ciências Biológicas, especialmente à Dra. Celine, por me ensinar, eficientemente, normas técnicas para os trabalhos científicos e ainda, pela atenção diante de problemas. São ensinamentos que levo comigo para sempre.

Agradeço aos colegas de laboratório, Cleine, Mário, Leticia, e especialmente à Ms. Fran, que pelo pouco tempo de convívio, me ensinou a rigorosidade dos métodos científicos e incentivo de sempre melhorar. Obrigada pelos conselhos e atenção.

Ao Instituto de Genética e Bioquímica, pela estrutura e ambiente de trabalho propício para o desenvolvimento desta monografia.

À Escola Técnica de Saúde, pela estrutura inicial para a realização desse trabalho e também aos funcionários do Hospital das Clínicas pela paciência e coleta do sangue quando necessário.

Agradeço ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira, do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU, pelo espaço e estrutura cedidos para realização de alguns experimentos deste trabalho, além da primeira avaliação oficial deste projeto. O apoio foi realmente imprescindível e me fez pensar que a ciência não é maior que o sentimento de solidariedade com o próximo.

Aos funcionários da biblioteca, COMUT, pela atenção diante das minhas solicitações de artigos científicos e eficácia no trabalho que desenvolvem.

Agradeço, finalmente, a todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte deste trabalho... professores, técnicos, colegas... Obrigada a todos!

RESUMO

Esse trabalho analisou os efeitos dos extratos brutos aquosos de *Artemisia absinthium* L. (Compositae), *Lippia camara* L. (Verbenaceae) e *Bryophyllum sp* (Crassulaceae) sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos humanos. As transições de hemólise foram monitoradas por medidas de absorvância em 540 nm, ajustadas a curvas de regressão sigmoideal, dadas pela equação de Boltzmann, e caracterizadas pela concentração de NaCl capaz de produzir 50% de hemólise (H_{50}), pela intensidade (P_H) e pela amplitude (dS) do efeito de hemólise. Os parâmetros determinados na ausência e presença dos extratos vegetais foram comparados por análise de variância pelo teste de Tukey e considerados diferentes quando p menor que 0,05. Os extratos de *Artemisia absinthium* e de *Lippia camara* apresentaram efeito protetor sobre a estabilidade de eritrócitos humanos contra choque hipotônico, o que foi evidenciado pela diminuição dos valores de H_{50} e P_H pelos extratos vegetais em comparação ao controle ($p < 0,05$). O extrato de *Bryophyllum sp* apresentou ação hemolítica, uma vez que provocou aumento no valor de H_{50} em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), embora tenha ação anti-hemolítica evidenciada nos valores de P_H e dS.

Descritores: *Artemisia absinthium*; *Bryophyllum sp*; Eritrócitos; Estabilidade de membranas; *Lippia camara*.

ABSTRACT**Effect of the aqueous crude extracts of *Artemisia absinthium* L. (Compositae), *Lippia camara* L. (Verbenaceae) and *Bryophyllum sp* (Crassulaceae) on the stability of human erythrocytes**

This work analyzed the effects of the aqueous crude extracts of *Artemisia absinthium* L. (Compositae), *Lippia camara* L. (Verbenaceae) and *Bryophyllum sp* (Crassulaceae) on the osmotic fragility of human erythrocytes. The hemolysis transitions were monitored by measurements in the absorbance at 540 nm, adjusted to sigmoidal regression curves given by the Boltzmann equation, and characterized by the NaCl concentration capable to produce 50% of hemolysis (H_{50}), by the intensity (P_H) and the amplitude (dS) of the hemolysis effect. The parameters were determined in the absence and presence of the crude extracts and compared by analysis of variance according to the Tukey test. The values were considered different when p smaller than 0.05. The extracts of *Artemisia absinthium* and *Lippia camara* presented protective effect on the human erythrocytes against hypotonic shock, since they produced decrease in the values of H_{50} and P_H in comparison to the control solution ($p < 0.05$). The extract of *Bryophyllum sp* presented hemolytic action, since it produced increase in the H_{50} value in relation to the control group ($p < 0.05$), although it has evidenced anti-hemolytic action in the values of P_H and dS.

Keywords: *Artemisia absinthium*; *Bryophyllum sp*; Erythrocytes; Membrane stability; *Lippia camara*.

SUMÁRIO

Página

	01
INTRODUÇÃO	01
A membrana celular.....	01
Estabilidade de membranas biológicas.....	03
Eritrócitos como modelo de membrana biológica.....	03
Fragilidade osmótica eritrocitária.....	04
Ação de metabólitos reativos do oxigênio nos eritrócitos.....	04
Plantas medicinais na terapêutica humana.....	05
<i>Bryophyllum sp.</i>	06
<i>Artemisia absinthium</i>	06
<i>Lippia câmara</i>	07
Justificativa do trabalho.....	08
OBJETIVO	09
MATERIAL E MÉTODOS	09
Preparação do extrato vegetal (EV).....	09
Coleta das amostras de sangue humano.....	09
Verificação da quantidade e qualidade dos EVs.....	10
Determinação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos.....	11
Cálculos, análises estatísticas e edição dos dados experimentais.....	12
RESULTADOS	24
DISCUSSÃO	24
Gênero, idade e saúde dos voluntários.....	24
Fragilidade osmótica.....	25
Ação do extrato aquoso bruto de <i>Bryophyllum sp.</i>	26
Ação do extrato aquoso bruto de <i>Artemisia absinthium</i>	26
Ação do extrato aquoso bruto de <i>Lippia câmara</i>	27
Comparações das ações dos diferentes extratos vegetais testados.....	28
Considerações finais.....	29
CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Densidade e pH dos extratos brutos vegetais a 25 °C.....	13
Tabela 2. Comparação entre os valores de H ₅₀ de eritrócitos humanos obtidos na ausência (controle) e na presença dos diferentes extratos vegetais.....	17
Tabela 3. Comparação entre os valores de variação na densidade óptica ou intensidade de hemólise (P _H) obtidos na ausência (controle) e na presença dos diferentes extratos vegetais.....	18
Tabela 4. Comparação entre os valores da amplitude da transição de hemólise (dS) obtidos nas curvas de fragilidade osmótica do controle e na presença de cada um dos extratos vegetais.....	19

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Curva de fragilidade osmótica dos eritrócitos das voluntárias (controle).....	14
Figura 2. Comparação entre as curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente ao estresse hipotônico, no grupo controle e na presença do extrato bruto vegetal de <i>Bryophyllum sp.</i>	15
Figura 3. Comparação entre as curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente ao estresse hipotônico, no grupo controle e com o extrato bruto vegetal de <i>Artemisia absinthium.</i>	16
Figura 4. Comparação entre as curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente ao estresse hipotônico, no grupo controle e na presença do extrato bruto vegetal de <i>Lippia câmara.</i>	20
Figura 5. Transição de hemólise por choque hipotônico de eritrócitos humanos na presença de extratos brutos vegetais de <i>Artemisia absinthium</i> e <i>Bryophyllum sp.</i>	21
Figura 6. Transição de hemólise por choque hipotônico de eritrócitos humanos na presença de extratos brutos vegetais de <i>Lippia camara</i> e <i>Bryophyllum sp.</i>	22
Figura 7. Transição de hemólise por choque hipotônico de eritrócitos humanos na presença de extratos brutos vegetais de <i>Artemisia absinthium</i> e <i>Lippia câmara.</i>	23

INTRODUÇÃO

Os complexos organizacionais biológicos, como tecidos, células, organelas, cromossomos, membranas e proteínas, são muito vulneráveis à ação de agentes desnaturantes, como o calor, o frio, os extremos de acidez e de alcalinidade, e a uma série de solutos, como uréia, guanidina e etanol (CRIBIER; MORROT; ZACHOWSKI, 1993; VIANA; GARROTE-FILHO; PENHA-SILVA, 2005; FONSECA et al., 2006).

A membrana celular

Todas as células possuem uma membrana plasmática, mas as células eucarióticas têm o núcleo e organelas intracelulares também delimitadas por membranas (CAMPBELL, 2000). As membranas constituem uma barreira seletiva que possibilita a ocorrência dentro da célula de reações químicas que não seriam possíveis no meio extracelular (ALBERTS et al., 1997; VIEIRA; GAZZINELLI; MARES-GUIA, 1996; NELSON; COX, 2000; LODISH et al., 2003).

Além da função de compartimentação de tecidos e células, as membranas biológicas desempenham funções de transporte, catálise e recepção de sinais. Sua natureza semipermeável permite fluxos seletivos de substâncias para dentro e para fora da célula e organelas. A presença de enzimas inseridas na membrana mitocondrial interna permite a catálise do fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. Algumas proteínas de membrana funcionam com receptores de sinais químicos trazidos por hormônios; elas permitem a entrada do sinal hormonal e o disparo de várias respostas bioquímicas no interior da célula (CAMPBELL, 2000; ALBERTS et al., 1997).

Estabilidade de membranas biológicas

Para funcionar adequadamente, as membranas celulares devem congregiar fluidez e estabilidade. Entende-se por estabilidade de uma membrana a capacidade de manter sua estrutura contra os agentes que contribuem para a desagregação. A bioquímica explica estabilidade com uma manifestação funcional da estrutura e qualquer mudança na estrutura irá afetar sua função. O aumento da estabilidade de uma membrana não significa necessariamente uma melhor preservação de sua atividade biológica (GOUVÊA-E-SILVA, 2006), na medida em que o maior teor em ácidos graxos saturados nos fosfolipídios da membrana confere a ela

uma maior estabilidade, em detrimento de sua fluidez, que é essencial para o exercício de funções celulares. É por isso que uma membrana deve congrega o grau certo de estabilidade com seu grau necessário de fluidez (CRIBIER; MORROT; ZACHOWSKI, 1993).

Os agentes que promovem a desagregação da membrana induzem um estado de desorganização ou caos, pelo qual eles têm maior afinidade e, por essa razão, eles são chamados de agentes caotrópicos. Dentre os agentes caotrópicos, podemos citar o estresse hipotônico, os extremos de pH, o calor e uma série de solutos como o etanol, a uréia e a guanidina (TIMASHEFF, 1998; BENNION; DAGGET, 2003).

A estabilidade de uma membrana biológica pode ser afetada pelo estresse oxidativo metabólico. Os ácidos graxos polinsaturados presentes nos fosfolipídios das membranas biológicas são alvos da ação oxidativa dos metabólitos reativos do oxigênio (ROM), que incluem radicais livres como o superóxido (O_2^{\cdot}) e o radical hidroxila (HO^{\cdot}). Esse processo é designado na literatura como peroxidação de ácidos graxos polinsaturados de membranas ou simplesmente de lipoperoxidação de membranas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; SMITH et al., 2004).

As membranas celulares podem manter sua estabilidade em condições como a isotonicidade, o pH ótimo, a temperatura ótima e uma série de solutos estabilizantes, que podem ter diferentes mecanismos de ação, dentre os quais podemos citar o controle da osmolaridade da solução (TIMASHEFF, 1998; FONSECA et al., 2006). Dada à natureza lipídica e protéica das membranas biológicas naturais, é difícil dizer que componente da membrana é mais afetado pelo soluto. Mas essa tarefa é muito importante para o biotecnologista, porque ela permite conhecer a origem das condições que estabilizam uma membrana e, assim, fornecer subsídio para o desenvolvimento de novas tecnologias para estabilização de membranas.

Os biotecnologistas necessitam controlar a estabilidade dos complexos biológicos e, para isso, eles usam um arsenal de procedimentos que engloba o aumento da osmolaridade do meio com solutos coletivamente chamados de osmólitos (BROWN; SIMPSON, 1972; FONSECA et al., 2006; JOVANOVIĆ et al., 2006). Esta é uma estratégia frequentemente observada na natureza para combater certas condições de estresse ambiental, como altas concentrações de sais, calor e radicais livres (RHODES, 1987; SOMERO, 1986; YANCEY et al., 1982).

Eritrócitos como modelo de membrana biológica

Os eritrócitos constituem um modelo para estudo das membranas biológicas, principalmente de sua estabilidade, uma vez que a hemólise, provocada por fatores de estresse, libera hemoglobina que pode ser quantificada pela leitura espectrofotométrica da absorvância da luz visível em 540 nm. Essa absorvância é proporcional à extensão da lise dos eritrócitos (hemólise) (NELSON; COX, 2000; MOECKEL et al., 2002). O mecanismo de estabilidade da membrana de eritrócitos é um bom indicador do efeito de várias injúrias *in vitro* (MOHAN et al., 1992), constituindo-se em uma estrutura dinâmica que pode mostrar alterações significantes em suas interações, melhores ilustradas com detergentes e bem caracterizadas com drogas hemolíticas (AKI; YAMAMOTO, 1991).

Fragilidade osmótica eritrocitária

A fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) pode ser definida como a resistência dos eritrócitos à hemólise contra alterações na tonicidade do solvente. Ela é avaliada pelo uso de soluções tamponadas de NaCl em água destilada em concentrações decrescentes de 0,85% a 0% (JAIN, 1986). Um mecanismo pelo qual a lise da membrana eritrocitária é evitada *in vivo* envolve o controle do volume celular através da eliminação ativa de solutos (MAKINDE; BOBADE, 1994). As células suspensas em meio hipotônico aumentam até alcançar um volume crítico de hemólise antes de serem lisadas (JAIN, 1973). A fragilidade celular, portanto, é dependente da concentração de sal e segue uma distribuição normal em animais sadios (JAIN, 1973), podendo ocorrer diferenças entre as espécies (JAIN, 1986).

A integridade dos eritrócitos é determinada medindo as transformações na fragilidade osmótica, a qual é aplicada em diagnósticos de doenças hemolíticas, em estudos de permeabilidade da membrana e nas alterações no processo de destruição dessas células (SUESS et al., 1948; JAIN et al., 1983). Há vários fatores intrínsecos e extrínsecos que podem levar à diminuição ou aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos (JAIN, 1986). De acordo com Perk, Frei e Herz (1964), a fragilidade osmótica sofre influência de fatores como o volume, o tamanho e a forma dos eritrócitos, o tipo e a quantidade de hemoglobina, a viscoelasticidade e a composição química e estrutural das membranas. As células menores, a primeira vista, apresentam capacidade limitada de expansão e demonstram volume hemolítico crítico mais precocemente. O tempo de vida da célula é outra característica essencial, já que os eritrócitos senescentes são mais frágeis que os jovens e fazem parte de aproximadamente

30% da população eritrocitária. Além disso, variações fisiológicas (variações pós-prandiais) ou patológicas (presença de hematozoários, uremia, cirrose, processos autoimunes, hepatopatias, insuficiência renal, etc.) também podem afetar a estabilidade dos eritrócitos (JAIN, 1973; MAKINDE; BOBADE, 1994; ELIAS et al., 2004). A estabilidade de eritrócitos também pode ser afetada por outros fatores, como pequenas alterações no pH, temperatura, idade, quantidade de oxigênio e dióxido de carbono (SUESS et al., 1948), bem como por vários tipos de drogas (AKI; YAMAMOTO, 1991).

Ação de metabólitos reativos do oxigênio nos eritrócitos

A ação dos metabólitos reativos do oxigênio (ROM) é a causa de várias doenças, incluindo o câncer (ABDI; ALI, 1999). Os eritrócitos são extremamente susceptíveis à peroxidação lipídica induzida pelos radicais livres. Isso se deve a vários fatores, como a presença de ácidos graxos polinsaturados em suas membranas, a exposição contínua a altas concentrações de oxigênio e a presença de átomos de ferro no estado de oxidação +2 (hemoglobina), o que permite a conversão de peróxidos no radical hidroxila (BEGUM; TERAO, 2002; BORS et al., 1984; HORWITT et al., 1963). Os produtos da peroxidação lipídica estão presentes em vários processos inflamatórios (KWIATKOWSHA et al., 1999) e são a causa de algumas alterações na organização estrutural e funcional das membranas celulares, incluindo diminuição na fluidez da membrana, aumento na sua permeabilidade, inativação de enzimas e decréscimo nos ácidos graxos essenciais (van GINKEL; SEVANIAN, 1994). Por outro lado, os eritrócitos e o organismo humano apresentam mecanismos de defesa contra esses radicais livres, como a ação de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (ERITSLAND, 2000). Dentre eles, a ação antioxidante enzimática da catalase, glutathion peroxidase e a vitamina E (KOLANJIAPPAN et al., 2002).

Plantas medicinais na terapêutica humana

Muitas pesquisas vêm sendo feitas com plantas medicinais com o propósito de identificar princípios ativos que influenciam na estrutura celular do eritrócito. O consumo de plantas medicinais e de produtos fitoterápicos cresceu em todo o mundo, constituindo um setor bastante promissor (BREVOORT, 1998; EISENBERG et al., 1998). As ações farmacológicas de flavonóides, ligninas, alcalóides e terpenos, presentes em várias plantas, têm sido extensamente estudadas (LIEN; LI, 1985), a exemplo dos flavonóides com

atividades antioxidante e varredora de radicais livres (ZHOU; ZHENG, 1991; QUINN; TANG, 1996; SEYMOUR; LI; MORRISSEY, 1996), porém os produtos a base de plantas ainda estão disponíveis para o consumo de forma precária, o que impede a efetiva consolidação deste mercado em nosso país (BRANDÃO, 1997).

Durante os séculos, importantes contribuições foram feitas pela medicina tradicional à terapêutica, a despeito do progressivo empobrecimento do patrimônio de conhecimento secular devido à transição da sociedade para a civilização tecnológica (GUARRERA, 2005). As plantas são utilizadas em tratamentos médicos desde o início da civilização, rotineiramente aplicadas em muitas enfermidades, como nas doenças cardiovasculares (infarto congestivo do coração, hipertensão e angina) (MASHOUR et al., 1998). A história das ervas medicinais está muito relacionada ao Oriente, especialmente com a China, há mais de 5000 anos (REPETTO; LLESUY, 2002), mas também com as comunidades indígenas das Américas (BONTEMPO, 1994). Produtos químicos naturais constituem um campo de pesquisa com elevada potencialidade, especialmente importante em países com grande diversidade biológica como o Brasil (WILLCOX et al., 2004).

A Fitoterapia constitui em uma forma de terapia medicinal que vem, nos últimos anos, recebendo maior atenção, sendo definida como o uso de plantas no processo de cura e/ou prevenção de doenças. O consumo orientado ou não de fitoterápicos aumentou em todo o mundo. O mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de 22 bilhões de dólares por ano. Apesar da extensa e diversificada flora, o Brasil ainda não teve uma atuação destacada no mercado mundial desses produtos (YUNES et al., 2001).

Bryophyllum sp

Segundo Williams e Smith (1984), a planta *Bryophyllum sp* apresenta propriedades fitoquímicas e farmacológicas ainda pouco estudadas. Pertencente à família Crassulaceae e subfamília Kalanchoideae (STEVENS et al., 1995), que contêm alcalóides, nitratos e oxalatos solúveis. Conhecida popularmente como aranto, folha-santa ou fortuna, é utilizada no tratamento de úlceras (PEREZ; CORREA; BORGES, 1999), apresenta atividade ATPásica (FISHER-SCHLIEBS et al., 1997), quimiotóxica (KEMNER et al., 1997) e efeito terapêutico no tratamento da leishmaniose (Da SILVA et al., 1995). Há estudos com substâncias químicas dessa subfamília, principalmente os bufadienolídios, para os quais já foram descritas atividades sedativa (WAGNER et al., 1985), inseticida (SUPRATMAN et al., 2000), anti-tumoral (ZHANG et al., 1992; HASHIMOTO et al., 1997; SUPRATMAN et al., 2001; YEH

et al., 2003) e citotóxica (YAMAGISHI et al., 1988; YAMAGISHI et al., 1998; KUPCHAN et al., 1968; KUPCHAN et al., 1971).

Artemisia absinthium

O gênero *Artemisia* compreende, aproximadamente, 400–500 espécies, dependendo das delimitações dos autores, e encontra-se distribuído no hemisfério norte e com poucos exemplares no hemisfério sul (VALANT-VETSCHERA et al., 2003). Alguns compostos fitoquímicos têm sido aplicados na identificação das diferentes espécies deste gênero, dentre eles os poliacetilenos e ligninas (BOHLMANN et al., 1973; GREGER, 1982; WALLNÖFER et al., 1989), os sesquiterpenos (SEAMAN, 1982), e principalmente os flavonóides (SALEH et al., 1987; MARCO et al., 1988; BELENOVSKAJA, 1994; LEE et al., 1998; VALANT-VETSCHERA et al., 2003).

A espécie *Artemisia absinthium* L., da família Compositae (GUARRERA, 2005), é conhecida como artemísia e possui estudos que indicam suas aplicações fitoterápicas na medicina. Esta planta, nativa do Brasil, é aplicada na medicina popular em processos abortivos, estimulação de contrações uterinas e como emenagogo, os quais foram comprovados com testes de fertilidade e ovulação em ratos (RACK et al., 1987). As folhas são utilizadas popularmente contra helmintíases, como estimuladora de apetite e como anti-diarréico (GUARRERA, 1999; HERNÁNDEZ et al., 2003). A infusão de partes aéreas da planta também é aplicada como antiemética (GASTALDO; BARBERIS; FOSSATI, 1979; GUARRERA, 2005) e no tratamento de inflamação dos tendões (GUARRERA, 2005). A artemísia é citada no estudo realizado por Viegli et al. (2003) como uma das principais plantas aplicadas em medicina veterinária popular. Ela é usada para auxiliar a digestão de leite de vaca em bezerros jovens (BENIGNI; CAPRA; CATTORINI, 1964), como suplemento nutricional aos animais, no tratamento de complicações gastrointestinais em ruminantes, além de repelente de insetos (REZENTTI; TAIANI, 1988; GUARRERA, 1981; 1987; 1994; SEYOUM et al., 2002).

Lippia camara

O gênero *Lippia* L., da família Verbenaceae, encontra-se distribuído nas áreas tropicais e subtropicais da América e África, constituindo aproximadamente 250 espécies de ervas e pequenas árvores (JANSEN-JACOBS, 1988; MOLDENKE, 1965). No Brasil, o gênero

Lippia é representado por 120 espécies, das quais aproximadamente 50 ocorrem no Nordeste, que chamam atenção por sua aparência durante o período de floração e pela fragrância, em geral, forte e agradável (BEZERRA et al., 1981). Este gênero apresenta um grande número de estudos devido a suas ações biológicas, produção de óleos essenciais e pela abundância com que ocorre, sendo comumente denominada alecrim (ALENCAR et al., 1978; CRAVEIRO et al., 1980; MATOS et al., 1979; MATOS et al., 1980; VIANA et al., 1978; VIANA et al., 1980).

A literatura e a etnobotânica retratam propriedades sedativa, digestiva, espasmolítica, carminativa e emenagoga de algumas espécies de *Lippia* (AMOROSO; GÉLY, 1988; CORRÊA, 1992; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; LORENZI; MATOS, 2002; ZOGHBI et al., 1998). Pesquisas realizadas por Bezerra et al. (1981) identificaram 43 constituintes nos óleos essenciais do gênero *Lippia*, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, compostos aromáticos e seus derivados oxidados. Cariofileno, p-cimeno, humuleno, mirceno e γ -terpineno são os mais comuns. As características farmacológicas apresentadas foram a atividade moluscicida, o efeito espasmolítico em duodeno de coelho, o bloqueio das contrações produzidas pela acetilcolina em útero isolado de rata e ambos os efeitos contrátil e bloqueador de contrações em reto abdominal de sapo. A maioria dos resultados, de acordo com os autores, se deve à ação farmacológica dos constituintes timol e/ou carvacrol do óleo essencial de espécies de *Lippia*.

Justificativa do trabalho

Os avanços da medicina e atuais pesquisas na área da Botânica têm proporcionado descobertas de fitoterápicos (WANG et al., 1995), provocando um maior consumo desses medicamentos, na medida em que houve o encarecimento dos remédios alopáticos, maior adaptação dos patógenos aos remédios sintéticos, além das ações adversas das drogas (FURLAN, 1999). No entanto, a utilização de fitoterápicos de forma popular e excessiva ainda constitui um grande problema de saúde pública. A fragilidade osmótica, nesse sentido, constitui-se num procedimento básico de grande importância para verificação do efeito desses produtos naturais nos organismos animais, o que poderia evitar o uso indiscriminado de algumas plantas.

OBJETIVO

Analisar a fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos frente à ação de algumas plantas utilizadas na medicina popular, como *Artemisia absinthium* L. (Compositae), *Lippia camara* L. (Verbenaceae) e *Bryophyllum sp* (Crassulaceae).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas três plantas medicinais: *Artemisia absinthium* L. (artemísia), *Lippia camara* L. (alecrim) e *Bryophyllum sp* (aranto), as quais foram identificadas pelo Prof. Dr. Jimi Naoki Nakajima, do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia. A preparação dos extratos brutos aquosos dessas plantas e o estudo de seus efeitos sobre a estabilidade de eritrócitos humanos foram conduzidos no Laboratório de Enzimologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

O projeto foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa dessa instituição.

Preparação do extrato vegetal (EV)

A planta foi seca ao abrigo da luz solar e pulverizada. A 20 g de pó de partes aéreas da planta foram acrescentados 200 mL de água desionizada. Essa mistura ficou sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente e, após repouso de 20 minutos, o sobrenadante foi separado por decantação. Aos resíduos foram adicionados 100 mL de água desionizada e, após agitação por 12 horas, à temperatura ambiente, a mistura foi decantada por repouso de 20 minutos. Esse tratamento do resíduo foi feito ainda mais uma vez. Os volumes das três decantações foram agrupados e filtrados. Esta preparação não utiliza fervura e, portanto, não desnatura fatores termolábeis porventura presentes no extrato da planta.

A água desionizada, utilizada em todos os experimentos, evita que íons de sódio e potássio afetem a tendência de hemólise dos eritrócitos (SUESS et al., 1948).

Coleta das amostras de sangue humano

O sangue foi coletado em tubos de vacutainer (6 mL) contendo EDTA como anticoagulante por punção endovenosa em 12 voluntárias sadias, em jejum de 8 a 12 horas, na faixa etária de 20 a 30 anos. O procedimento da coleta ocorreu na Escola Técnica de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia.

Verificação da quantidade e qualidade dos EVs

Um teste preliminar, para verificar qual a quantidade de cada extrato vegetal deveria ser utilizada nos experimentos, foi feito usando diluições do extrato preparadas pela mistura de 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 μ L do extrato em 2 mL de solução com

concentração final de NaCl de 0,9%. Após adição de 20 μL de sangue em cada tubo, o grau de hemólise foi analisado pela medida da absorvância em 540 nm.

Determinação da fragilidade osmótica de eritrócitos humanos

A cada microtubo de Eppendorff de uma bateria de 14 microtubos, contendo soluções com concentrações entre 0 a 1% de NaCl, pré-incubados a 37 °C por 10 minutos, foram adicionados 20 μL de sangue. Após homogeneização e incubação dos tubos por 20 minutos a 37 °C, eles foram centrifugados a 1.300xg por 10 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes, contendo concentrações variáveis de hemoglobina conforme o grau de lise dos eritrócitos, foram avaliados quanto à densidade óptica em 540 nm num espectrofotômetro Micronal, modelo B-442. Os experimentos foram conduzidos com cada tubo em duplicata.

A fragilidade osmótica foi expressa em porcentagem de hemólise absoluta da seguinte forma:

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

onde A é a densidade óptica ou absorvância do sobrenadante em 540 nm e A_{max} é a absorvância máxima encontrada naquele comprimento de onda. A dependência da porcentagem de hemólise com a concentração de NaCl foi ajustada a uma linha de regressão sigmoidal de acordo com a seguinte forma da 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 relatado para transição da hemólise dos eritrócitos pelo choque hipotônico.

A partir das curvas de transição sigmoidal foram também determinados os valores de P_H , pela diferença entre o valores médios mínimo e máximo de A_{540} .

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

O valor de P_H foi dado em variação de densidade óptica e representa a quantidade de hemólise de cada experimento.

Cálculos, análises estatísticas e edição dos dados experimentais

Os cálculos, edições dos dados e análises estatísticas foram executados com a utilização do aplicativo OriginPro 7.5 (Microcal Inc.). A análise da linha de regressão sigmoidal foi considerada significativa quando p menor que 0,05.

RESULTADOS

Os ensaios para verificação da quantidade e qualidade dos EVs permitiram a seleção de volumes de 500 μ L dos extratos de *Artemisia absinthium* e *Bryophyllum sp* e 100 μ L do extrato de *Lippia camara* nos experimentos de fragilidade osmótica dos eritrócitos.

A Tabela 1 apresenta os valores de pH e densidade, a 25°C, dos extratos brutos vegetais da *Artemisia absinthium* L., *Lippia camara* L. e *Bryophyllum sp*, determinados a título de caracterização das soluções obtidas. O pH da água desionizada, utilizada no preparo dos extratos vegetais, apresentou o valor de 6,15.

A Figura 1 apresenta uma típica curva de fragilidade osmótica das voluntárias na ausência de extratos brutos vegetais (controle). A linha de regressão sigmoideal, traçada de acordo com a equação de Boltzmann, representa a dependência da porcentagem de hemólise com a concentração de NaCl. De acordo com essa curva, tem-se o valor de H_{50} , que é a concentração de NaCl que provoca 50% de hemólise nos eritrócitos humanos. A_1 e A_2 correspondem aos valores médios máximo e o mínimo de absorvância, e aos estados hemolisado e intacto dos eritrócitos, respectivamente. O P_H representa a variação de densidade óptica ou intensidade de hemólise na curva de fragilidade osmótica.

As Figuras 2, 3 e 4 mostram curvas de fragilidade osmótica dos eritrócitos das 12 voluntárias na ausência e presença de cada um dos extratos vegetais.

As Figuras 5, 6 e 7 apresentam as curvas de fragilidade osmóticas de eritrócitos na presença dos extratos vegetais, mostradas duas a duas para permitir a comparação entre os efeitos dos diferentes extratos brutos vegetais na hemólise por choque hipotônico.

As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam os resultados das análises de significância da variância, pelo teste de Tukey, dos valores de H_{50} , P_H e dS obtidos na ausência e presença de cada um dos extratos brutos vegetais testados.

Tabela 1: Densidade e pH dos extratos brutos vegetais a 25 °C.

Extrato vegetal	Densidade g/cm³	pH
<i>Artemisia absinthium</i>	1,012	5,92
<i>Lippia camara</i>	1,016	6,44
<i>Bryophyllum sp</i>	1,002	4,21

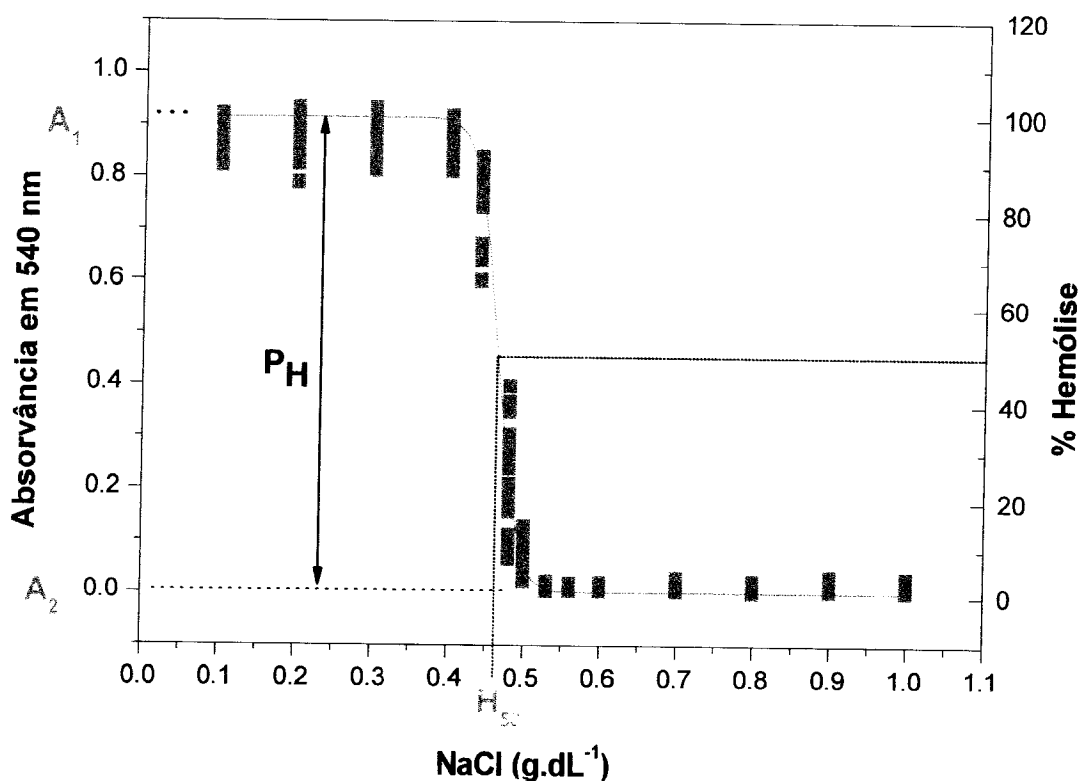


Figura 1: Curva de fragilidade osmótica dos eritrócitos das voluntárias. A linha de regressão sigmoidal representa a dependência da porcentagem de hemólise com a concentração de NaCl. H_{50} é a concentração de NaCl capaz de promover 50% de hemólise. A_1 e A_2 representam respectivamente os valores médio máximo e mínimo de absorvância. P_H representa a variação de densidade óptica ou intensidade de hemólise.

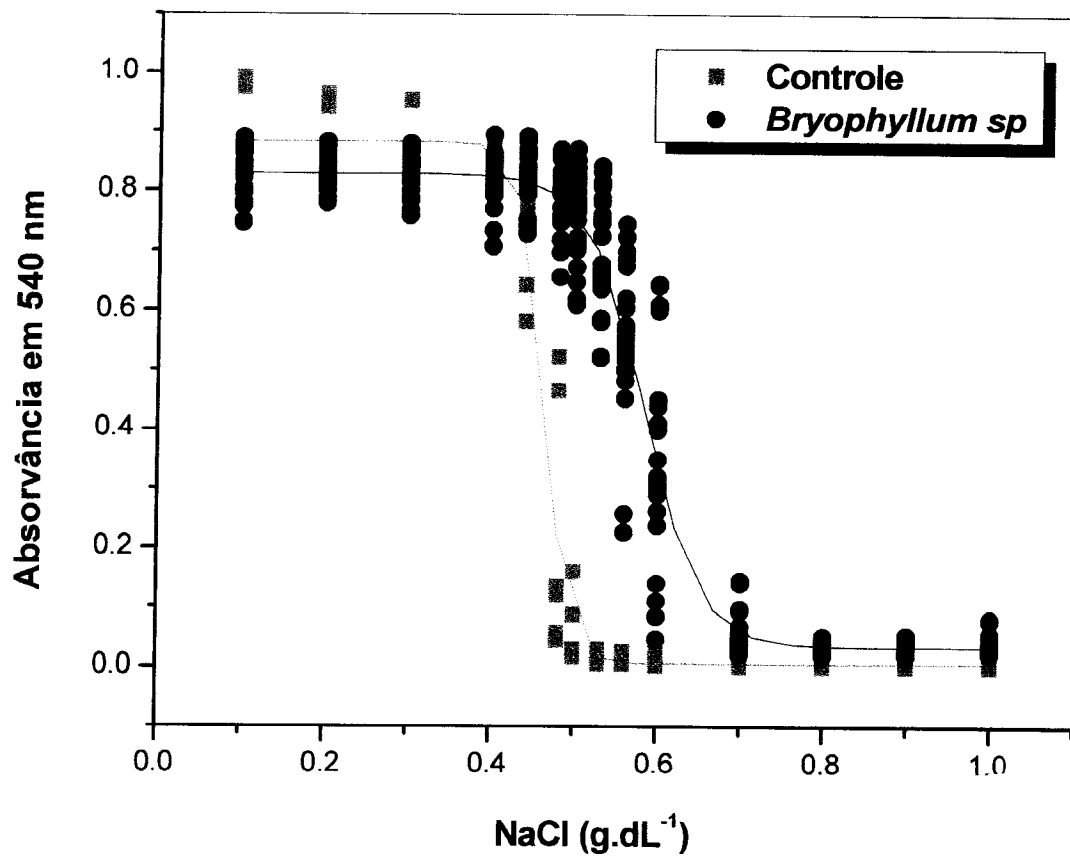


Figura 2: Comparação entre as curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente ao estresse hipotônico, no grupo controle e na presença do extrato bruto vegetal de *Bryophyllum sp.*

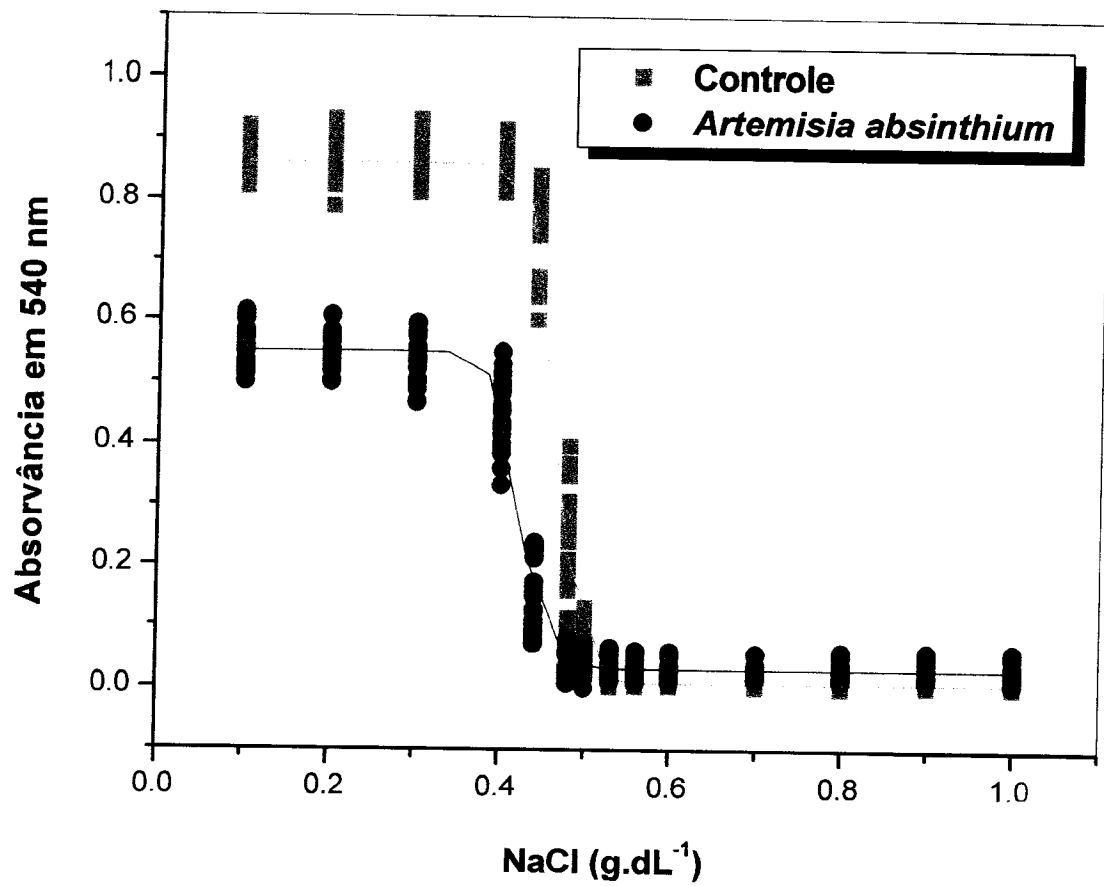


Figura 3: Comparação entre as curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente ao estresse hipotônico, no grupo controle e com o extrato bruto vegetal de *Artemisia absinthium*.

Tabela 2: Comparação entre os valores de H₅₀ de eritrócitos humanos obtidos na ausência (controle) e na presença dos diferentes extratos vegetais.

Amostra	N	Média ± dp	p
Controle	12	0,4634 ± 0,0042	a, b, c
<i>Artemisia absinthium</i>	12	0,4217 ± 0,0087	a, e
<i>Lippia camara</i>	12	0,4326 ± 0,0079	b, f
<i>Bryophyllum sp</i>	12	0,5851 ± 0,0253	c, e, f

^a Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre controle e *Artemisia absinthium*

^b Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre controle e *Lippia camara*

^c Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre controle e *Bryophyllum sp*

^d Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre *Artemisia absinthium* e *Lippia camara*

^e Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre *Artemisia absinthium* e *Bryophyllum sp*

^f Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre *Lippia camara* e *Bryophyllum sp*

Tabela 3: Comparação entre os valores de variação na densidade óptica ou intensidade de hemólise (P_H) obtidos na ausência (controle) e na presença dos diferentes extratos vegetais.

Amostra	N	Média \pm dp	p
Controle	12	0,8625 \pm 0,0243	*
<i>Artemisia absinthium</i>	12	0,5209 \pm 0,0293	*
<i>Lippia camara</i>	12	0,7964 \pm 0,0322	*
<i>Bryophyllum sp</i>	12	0,7592 \pm 0,0350	*

* Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as amostras comparadas duas a duas.

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

Amostra	N	dS ± dp	p
Controle	12	0,0117 ± 0,0007	c
<i>Artemisia absinthium</i>	12	0,0141 ± 0,003	e
<i>Lippia camara</i>	12	0,0127 ± 0,0041	f
<i>Bryophyllum sp</i>	12	0,0266 ± 0,0182	c, e, f

^a Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre Controle e *Artemisia absinthium*

^b Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre Controle e *Lippia camara*

^c Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre Controle e *Bryophyllum sp*

^d Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre *Artemisia absinthium* e *Lippia camara*

^e Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre *Artemisia absinthium* e *Bryophyllum sp*

^f Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) entre *Lippia camara* e *Bryophyllum sp*

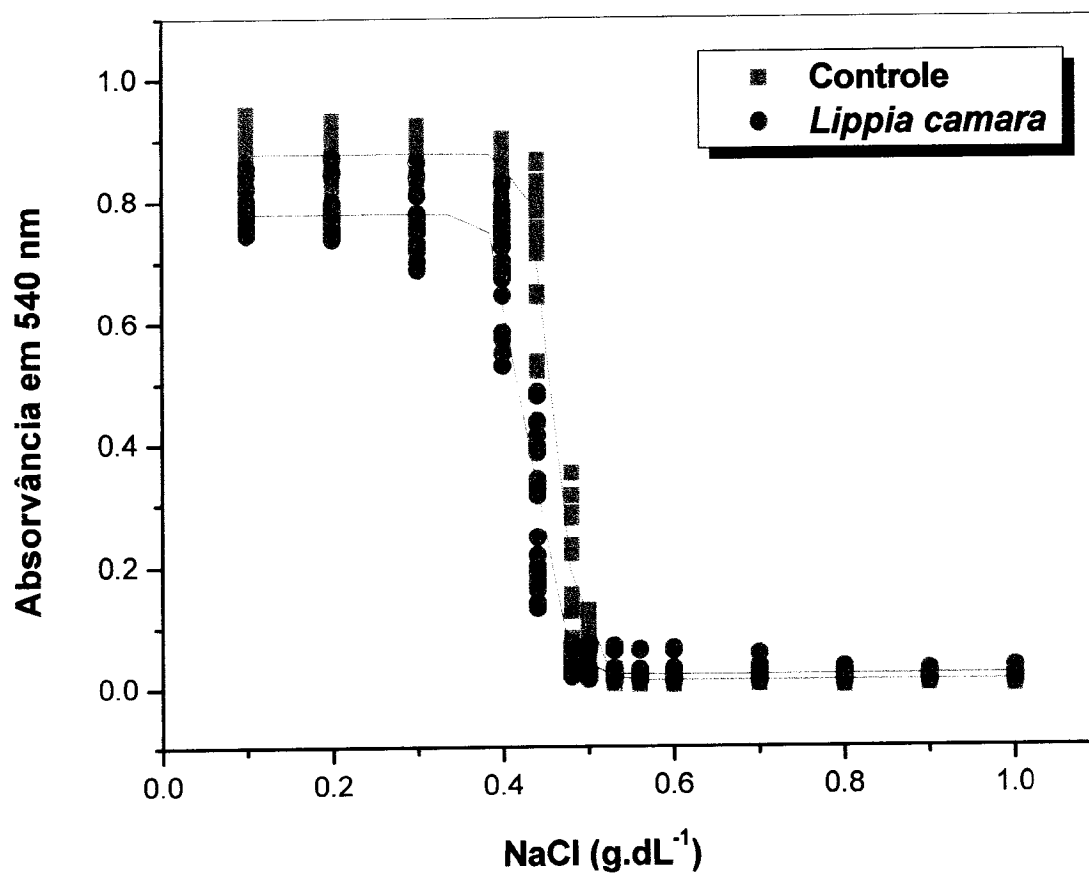


Figura 4: Comparação entre as curvas de fragilidade osmótica de eritrócitos humanos frente ao estresse hipotônico, no grupo controle e na presença do extrato bruto vegetal de *Lippia camara*.

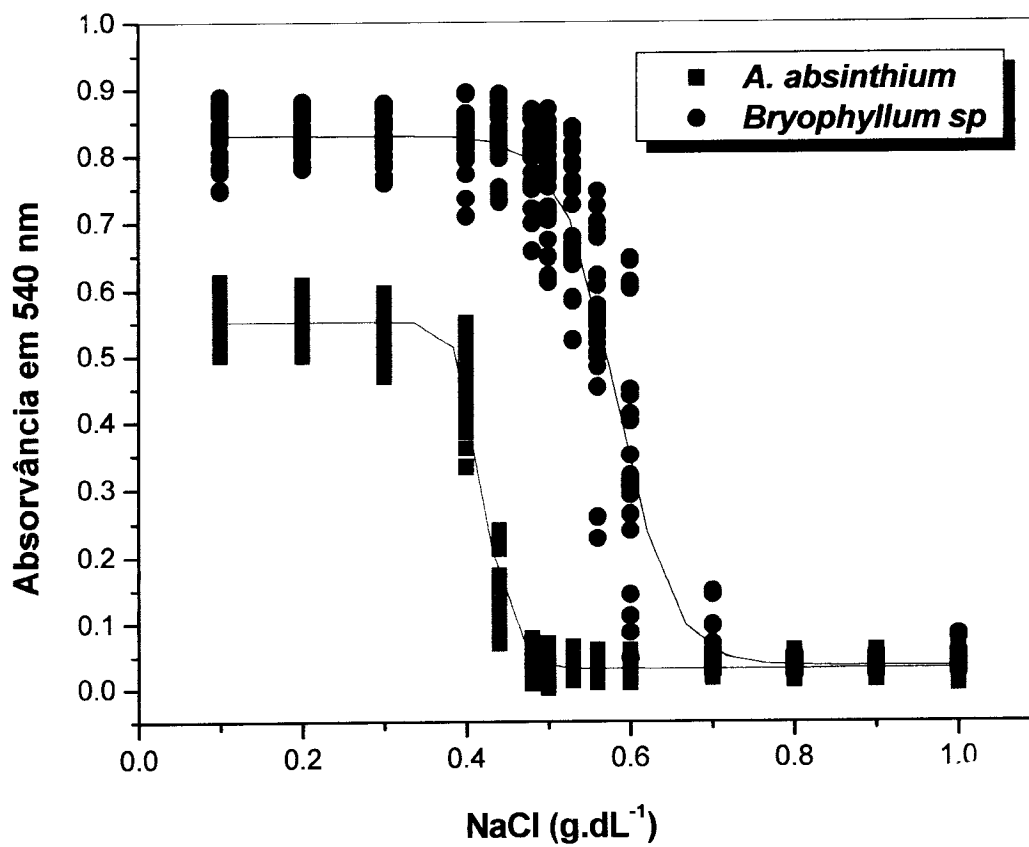


Figura 5: Transição de hemólise por choque hipotônico de eritrócitos humanos na presença de extratos brutos vegetais de *Artemisia absinthium* e *Bryophyllum sp.*

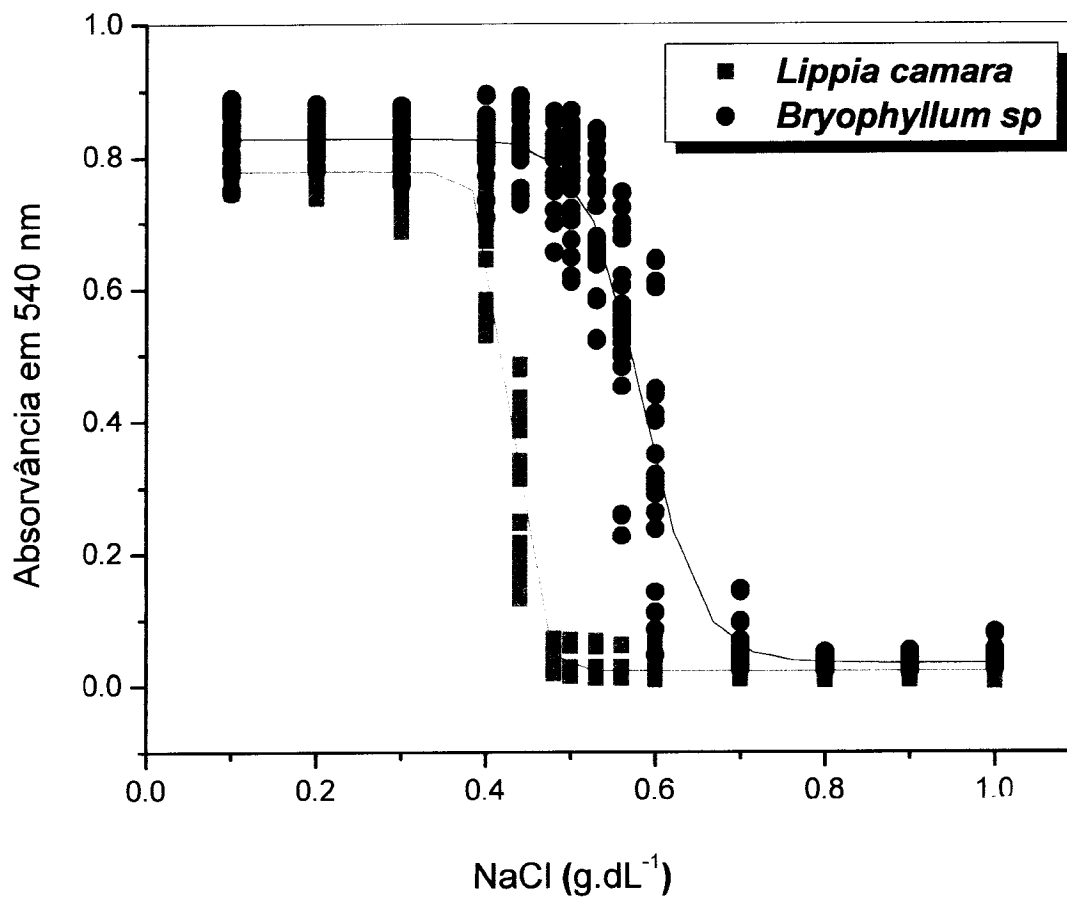


Figura 6: Transição de hemólise por choque hipotônico de eritrócitos humanos na presença de extratos brutos vegetais de *Lippia camara* e *Bryophyllum sp.*

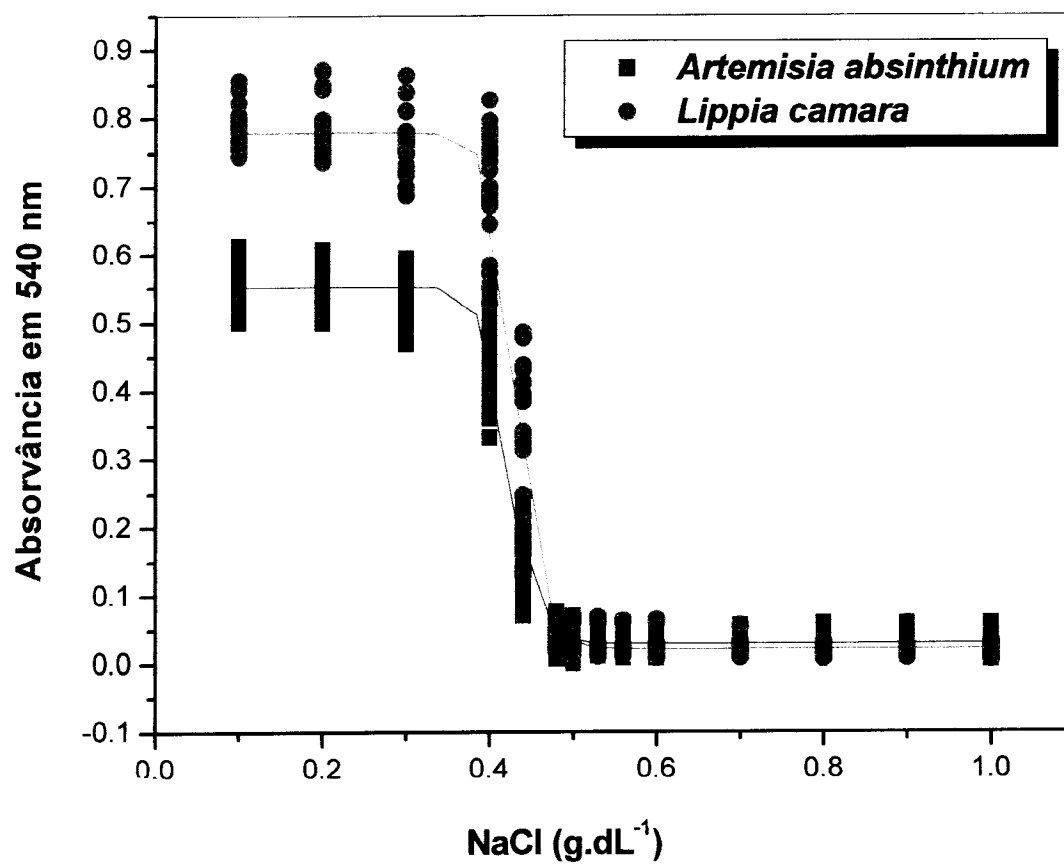


Figura 7: Transição de hemólise por choque hipotônico de eritrócitos humanos na presença de extratos brutos vegetais de *Artemisia absinthium* e *Lippia camara*.

DISCUSSÃO

Gênero, idade e saúde dos voluntários

Vários autores descrevem a correlação entre idade dos indivíduos e a fragilidade osmótica dos eritrócitos (ARAKI; RIFKIND, 1980; BOWDLER et al., 1981; DETRAGLIA et al., 1974; FERNÁNDEZ-ALBERT; FINK, 2000) e, diante disso, a faixa etária selecionada para os sujeitos desta pesquisa foi mantida entre 20 e 30 anos. Em indivíduos mais velhos há um padrão assimétrico na distribuição da fragilidade, uma vez que o aumento da fragilidade com a idade pode ser atribuído ao aumento da média do volume corpuscular dos eritrócitos, enquanto que a diminuição da taxa de hemólise com a idade é explicada por modificações nas propriedades das membranas dos eritrócitos. Os indivíduos centenários, especialmente, apresentam membranas com diferenças estruturais em relação às pessoas mais velhas da população em geral (RABINI et al., 2002; CAPRARI et al., 1999). Algumas doenças, como hemoglobinopatias e anemias macrocíticas (PARPART et al., 1947; SUESS et al., 1948; BOLTON, 1949; HIN et al., 2006) podem gerar instabilidade nos eritrócitos e alterar o padrão hemolítico dos mesmos; isto também é observado nos processos metabólicos oxidativos, uma vez que há formação de ROMs (CADENA; CHAN; GILL, 1994; EKENA; STEVENS, 1995). Essa foi a razão pela qual usamos apenas sangue de mulheres em jejum e aparentemente saudáveis.

Fragilidade osmótica

Como as células apresentam um mecanismo de regulação osmótica, a quantidade de fluidos que entra na célula depende da concentração dos eletrólitos ao redor da membrana plasmática (BOLTON, 1949). A fragilidade osmótica é, então, determinada pela entrada de água dentro da célula quando a concentração de sal é baixa no meio (choque hipotônico). Primeiramente, as células incham e passam de uma forma bicôncava para a forma de uma esfera e, então, se rompem (SUESS et al., 1948; JAIN, 1973; ARAKI; RIFKIND, 1980). A ruptura dos eritrócitos faz liberar hemoglobina, que, sendo uma proteína hidrossolúvel, pôde ser quantificada por espectrofotometria em 540 nm (NELSON; COX, 2000; MOECKEL et al., 2002). A curva de fragilidade osmótica segue uma regressão sigmoideal por apresentar um aumento na porcentagem de hemólise em menores concentrações salinas e pouca hemólise em altas concentrações salinas (BOLTON, 1949). Nesse sentido, a Figura 1 mostra os maiores

valores de absorvância decorrentes da hemólise, formando um platô, nas menores concentrações de NaCl, caracterizando o valor de A_1 , que correspondente a 100% de hemólise no experimento. Às concentrações mais elevadas de NaCl, dentro da faixa utilizada, os eritrócitos mantêm sua integridade e, portanto, a lise é evitada, razão pela qual os valores de absorvância são menores. É por isto que A_2 corresponde a um valor de hemólise um pouco acima de 0%, determinada por causas inespecíficas (Figura 1). A variação de densidade óptica ou intensidade de hemólise é representada pelo P_H na curva de fragilidade osmótica. Como os valores de P_H de todos os extratos brutos vegetais foram menores em comparação com o controle, isso pode significar que todos os extratos têm uma ação protetora contra a hemólise (Tabela 3).

Ação do extrato aquoso bruto de *Bryophyllum sp*

A citotoxicidade de vários extratos de plantas, *in vitro*, tem sido testada na membrana dos eritrócitos há algum tempo (SHARMA; SHARMA, 2001). As práticas tradicionais da medicina chinesa empregam algumas ervas com potencial tóxico em terapias específicas, sendo os principais constituintes destas certos tipos de alcalóides e esteróides (WONG; TSUI; KWAN, 2002). Os alcalóides são usados como vasoativos (PUSCHETT, 2006), no tratamento de doenças crônicas (KIMOTO et al., 1997; MORITA et al., 2002) e na apoptose de células tumorais (FURUSAWA et al., 1998; KONO et al., 2002).

A planta *Bryophyllum sp* provocou um aumento significativo no valor de H_{50} em comparação com o grupo controle (Tabela 2), compatível com a manifestação de uma ação hemolítica pelo *Bryophyllum sp* numa região de concentração salina (Figura 2) em que a fragilidade osmótica dos eritrócitos deveria ser quase zero (BOLTON, 1949; JAIN, 1973; 1986).

Alcalóides e bufadienolídios solúveis, presentes na subfamília Kalanchoideae, com ações citotóxicas descritas na literatura, seriam os possíveis responsáveis pelo aumento da fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos observada neste trabalho.

Entretanto, como o valor de P_H determinado pelo extrato vegetal foi menor em relação ao controle (Figura 2 e Tabela 3), isso significa que a intensidade total de hemólise foi também menor, o que sugere que o extrato aquoso bruto de *Bryophyllum sp* também apresenta uma ação anti-hemolítica associada antagonisticamente à ação hemolítica inferida pelo aumento no valor de H_{50} .

A amplitude da transição de hemólise em função da diminuição da tonicidade do meio (dS) foi também significativamente maior quando comparada com o teste controle e com os outros extratos vegetais, o que significa que a lise dos eritrócitos pela hipotonicidade do meio foi diminuída na presença do extrato vegetal de *Bryophyllum sp* (Tabela 4).

A presença de flavonóides, polifenóis, terpenos e fitosteróis no extrato aquoso de folhas das espécies de *Bryophyllum* (YAMAGISHI et al., 1998) é abordada na literatura como responsável pelo efeito antiinflamatório e antidiabético das ervas (OJEWOLE, 2005). Nesse contexto, uma ação anti-hemolítica do extrato de *Bryophyllum sp* pode ser sugerida no presente trabalho.

Ação do extrato aquoso bruto de *Artemisia absinthium*

O extrato aquoso bruto de *Artemisia absinthium* apresentou ação protetora dos eritrócitos humanos contra o choque hipotônico (Figura 3), uma vez que o valor de H_{50} da curva de fragilidade osmótica diminuiu em comparação com o controle ($0,4634 \pm 0,0042$) e o P_H também foi menor ($0,5209 \pm 0,0293$) com a ação do extrato vegetal em relação ao controle (Tabela 3). O valor da amplitude da transição de hemólise (dS) do extrato bruto aquoso da *A. absinthium*, comparado com o controle, não apresentou diferença estatisticamente significativa nos experimentos (Tabela 4).

Essa ação anti-hemolítica da *Artemisia absinthium* poderia ser explicada pela presença de alguns dos 40 tipos de flavonóides presentes na família Compositae (LAI et al., 2006). As flores e as folhas da família Compositae apresentam potencial contra bactérias, fungos e vírus, além de atividade antiinflamatória (MATSUDA et al., 2002), as quais podem ser atribuídas aos flavonóides, fenóis e ácidos fenólicos (HU et al., 1994).

Na literatura é reportada a propriedade antioxidante de diferentes flavonóides em vários modelos de membrana (OZGOVA et al., 2003; van ACKER et al., 2000; GORDON; ROEDIG-PENMAN, 1998). A interação destes com as membranas celulares evita a peroxidação lipídica e aumenta a estabilidade de eritrócitos intactos contra o choque hipotônico (CHAUDHURI et al., 2007).

Ação do extrato aquoso bruto de *Lippia camara*

O extrato aquoso bruto de *Lippia camara* também apresentou ação protetora contra o estresse hipotônico nos eritrócitos humanos (Figura 4), uma vez que promoveu uma

diminuição no valores de H_{50} (Tabela 2) e de P_H (Tabela 3) em comparação com o grupo controle. O valor da amplitude da transição de hemólise (dS) do extrato bruto aquoso de *L. camara*, comparado com o controle, não apresentou diferença estatisticamente significativa nos experimentos (Tabela 4).

A base desse efeito bioquímico nos eritrócitos humanos poderia ser sustentada pela presença de compostos como carvacrol e timol no extrato vegetal da *Lippia camara*. Vários estudos demonstram aplicações terapêuticas de espécies do gênero *Lippia* abundantes em timol e carvacrol. A atividade antimicrobiana desses fenóis foi extensamente analisada na literatura (DIDRY; DUBREUIL; PINKAS, 1994; CONSENTINO et al., 1999; GRIFFIN et al., 1999; SINGH et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003; BAGAMBOULA; UYTTENDAELE; DEBEVERE, 2004).

Ambas as substâncias, aparentemente, têm ação na permeabilidade da membrana celular e podem desintegrar a membrana externa de bactérias gram-negativas, liberando lipopolissacarídeos e aumentando a permeabilidade da membrana ao ATP (BURT, 2004; TUNC et al., 2007). Em contrapartida, a atividade antioxidante do carvacrol, timol e γ -terpineno (RUBERTO; BARATTA, 2000; ROSELLI et al., 2006; SHARIFIFAR et al., 2007) protege as membranas biológicas dos radicais livres e peroxidação lipídica. Nesse caso, é possível encontrar a dose apropriada do óleo essencial da planta e adquirir os constituintes na concentração de acordo com sua ação biológica (DUSAN et al., 2006). Ahmad e Aqil (2007), através da análise fitoquímica do extrato de várias plantas, encontraram alguns constituintes (taninos, flavonóides, glicosídeos, fenóis, saponinas) com atividade antibacteriana e sem efeito citotóxico, *in vitro*, em eritrócitos de ovelhas. Também foi analisado o efeito sedativo do timol em ratos (ORAFIDIYA et al., 2004; FREIRE et al., 2006).

Comparações das ações dos diferentes extratos vegetais testados

As ações dos extratos brutos sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos também foram comparadas entre si (Figuras 5, 6 e 7).

A comparação do comportamento do extrato vegetal de *Bryophyllum sp* foi com os comportamentos dos outros dois extratos (Figura 5 e 6) e destaca bem as diferenças de ações observadas entre o aranto (*Bryophyllum sp*) e cada um dos outros extratos vegetais.

A comparação mais merecedora de destaque é aquela feita entre os extratos de *Artemisia absinthium* e *Lippia camara* (Figura 7), uma vez que ambos apresentaram ação anti-

hemolítica. Quanto ao parâmetro H_{50} não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois extratos (Tabela 2), mas quanto ao parâmetro P_H , que mede a intensidade da hemólise, ele foi significativamente menor para a *Artemisia absinthium* em comparação com *Lippia camara*, o que sugere que a *Artemisia absinthium* teria uma ação protetora de membranas mais intensa do que a *Lippia camara*.

Considerações finais

Numerosas substâncias são reputadas como antioxidantes, a exemplo dos flavonóides (ZHOU; ZHENG, 1991; QUINN; TANG, 1996; SEYMOUR; LI; MORRISSEY, 1996) taninos, coumarinas, xantenes e procianidinas, o que as torna muito promissoras na terapêutica de várias patologias (REPETTO; LLESUY, 2002). As propriedades medicinais das plantas utilizadas popularmente são, em geral, atribuídas à presença de flavonóides e também influenciadas por compostos orgânicos e inorgânicos, a exemplo de cumarinas, ácidos fenólicos e micronutrientes (Cu, Mn, Zn) (CZINNER et al., 2001).

Os flavonóides e outros polifênóis integram os compostos fitoquímicos populares com benefícios potenciais à saúde. Estão presentes como metabólitos secundários nos vegetais e, nos últimos anos, têm feito parte da dieta humana. São caracterizados pela atividade antibacteriana (SHARIFIFAR et al., 2007) e antioxidante, sendo esta última devido ao potencial dos flavonóides em aprisionar radicais superóxido (O_2^{\cdot}) e hidroxila (HO^{\cdot}) (REPETTO; LLESUY, 2002). Em adição a essa importante ação, eles apresentam propriedades estabilizantes de membrana, efeito em processos intermediários de metabolismo e inibição da peroxidação lipídica em diferentes sistemas (ALANKO et al., 1999; REPETTO; LLESUY, 2002). Em várias espécies de *Artemisia* foram identificados flavonóides com potencial terapêutico (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970; VALANT-VETSCHERA et al., 2003) como, por exemplo, antimalárico (LIU et al., 1989).

Dentro deste contexto, torna-se muito importante aprofundar a análise dos constituintes bioquímicos responsáveis pelos efeitos anti-hemolíticos aqui descritos para os extratos vegetais aquosos de *Artemisia absinthium*, *Lippia camara* e *Bryophyllum sp.*

CONCLUSÕES

Os extratos brutos aquosos de *Artemisia absinthium* e de *Lippia camara* apresentaram efeito protetor na estabilidade dos eritrócitos humanos contra choque hipotônico, o que foi evidenciado pela diminuição dos valores de H_{50} e da profundidade da curva de fragilidade osmótica pelos extratos vegetais em comparação ao controle ($p < 0,05$).

A planta *Bryophyllum sp* apresentou ação hemolítica nos experimentos de fragilidade osmótica dos eritrócitos humanos, uma vez que houve aumento do valor de H_{50} em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), mas ela deve ter, antagonisticamente, alguma ação anti-hemolítica, uma vez que o extrato vegetal promoveu uma diminuição significativa na intensidade de hemólise e aumento da amplitude da concentração do sal relatado para transição da hemólise em relação ao grupo controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ABDI, S.; ALI, A. Role of oxygen free radicals in the pathogenesis and etiology of cancer. **Cancer Letters**, v. 142, p. 1-9, 1999.
- AHMAD, I.; AQIL, F. In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ES β L-producing multidrug-resistant enteric bacteria. **Microbiological Research**, p. 1-12, 2007.
- AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. **Biochemical Pharmacology**. v. 41, n. 1, p. 133-38, 1991.
- ALANKO, J.; RIUTTA, A.; HOLM, P.; MUCHA, I.; VAPATALO, H.; METSA-KETELA, T. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 193-201, 1999.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. 3^a. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
- ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; MATTOS, F.J.A.; ANDRADE, C.H.S. Óleos essenciais de *Lippia* spp, nativas do Nordeste. **Ciência e Cultura** (Supl.), v. 30, p. 334, 1978.
- AMOROSO, M.C.M.; GÉLY, A. Uso de plantas medicinais por caboclos do baixo Amazonas, Bacarena, PA, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, (Série Botânica)** Belém, v. 4, p. 79-131, 1988.
- ARAKI, K.; RIFKIND, J.M. Age dependent changes in osmotic hemolysis of human erythrocytes. **Journal of Gerontology**, v. 35, p. 499-505, 1980.
- BAGAMBOULA, C.F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cimene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**, v. 21, p. 33-42, 2004.
- BEGUM, A.N.; TERAQ, J. Protective effect of α -tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 66, p. 398-403, 2002.
- BELENOVSKAJA, L. *Artemisia*: the flavonoids and their systematic value. In: HIND, D.J.N.; BEENTJE, H.J. (Eds.), **Compositae – Systematics, Proceedings of the International Compositae Conference**. Royal Botanic Gardens, Kew. v. 1, p. 253-259, 1994.
- BENIGNI, R.; CAPRA, C.; CATTORINI, P.E. **Piante medicinali**. Milano: Inverni e della Beffa. v. 1-2, 1964.

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. 5.ed., Uberlândia: EDUFU, 2006.

- BENNION, B.J.; DAGGET, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 100, p. 5142-5147, 2003.
- BEZERRA, P.; FERNANDES, A.G.; CRAVEIRO, A.A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L.; VIANA, G.S.B.; MATOS, F.F., ROUQUAYROL, Mz. Composição química e atividade biológica de óleos essenciais de plantas do Nordeste – gênero *Lippia*. **Ciência e Cultura**, v. 33, p. 1-14, 1981.
- BOHLMANN, F.; BURKHARDT, T.; ZDERO, C. **Naturally Occurring Acetylenes**. New York, London: Academic Press. 1973.
- BOLTON, J.H. The distribution curve of erythrocyte fragility. **Blood**, v. 4, p. 172-178, 1949.
- BONTEMPO, M. **Medicina Natural**. São Paulo: Nova Cultural, 1994.
- BORS, W.; SARAN, M.; TAIT, D. (eds). **Oxygen radicals in chemistry and biology**. Walter de Gruyter, Berlin. 1984.
- 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.
- 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. **HerbalGram**, v. 44, p. 33-48, 1998.
- BROWN, A.D., SIMPSON, J.R. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. **Journal General Microbiology**, v. 72, p. 589-91, 1972.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.
- CADENA, D.L.; CHAN, C.L.; GILL, G.N. The intracellular tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor undergoes a conformational change upon autophosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 260-265, 1994.
- CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- CAPRARI, P.; SCUTERI, A.; SALVATI, A.M.; BAUCO, C.; CANTAFORA, A.; MASELLA, R.; MODESTI, D.; TARZIA, A.; MARIGLIANO, V. Aging and red blood cell membrane: a study of centenarians. **Experimental Gerontology**, v. 34, p. 47-57, 1999.
- 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**, In Press, Corrected Proof, 2007.
- CORRÊA, C.B.V. Anatomical and histochemical study of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britt. and Wilson—known as erva-cidreira. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, p. 57-64, 1992.

- COSENTINO, S.; TUBEROSO, C.I.; PISANO, B.; SATTA, M.; MASCIA, V.; ARZEDI, E.; PALMAS, F. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 130-135, 1999.
- CRAVEIRO, A.A.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. Óleos essenciais de novas espécies verbenáceas do Nordeste. **Ciência e Cultura** (Supl.), v.32, p. 469, 1980.
- CRIBIER, S.; MORROT, G.; ZACHOWSKI, A. Dynamics of the membrane lipid phase. **Prostaglandins, Leukotrienes and essential Fatty Acids**, v. 48, p. 24-32, 1993.
- CZINNER, E.; HAGYMASI, K.; BLAZOVICS, A.; KERY, A.; SZOKE, E.; LEMBERKOVISC, E. The *in vitro* effect of *Helichysi flos* on microsomal lipid peroxidation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 31-35, 2001.
- Da SILVA, S.A.; COSTA, S.S.; MENDONÇA, S.C.; SILVA, E.M.; MORAES, V.L.; ROSSI-BERGMANN, B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 60, 201 p., 1995.
- DETRAGLIA, M.; COOK, F.B.; STASIW, D.M.; CERNY, L.C. Erythrocyte fragility in aging. **Biochemistry Biophysical Acta**, v. 345, p. 213-219, 1974.
- DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas Mediciniais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. rev. e ampl., UNESP, São Paulo, p. 604. 2002.
- DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymozi, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 69, p. 25-28, 1994.
- DUSAN, F.; MARIÁN, S.; KATARÍNA, D.; DOBROSLAVA, B. Essential oils – their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 1435-1445, 2006.
- 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.
- EKENA, K.; STEVENS, T.H. The *Saccharomyces cerevisiae* MVP1 gene interacts with VPS1 and is required for vacuolar protein sorting. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, p. 1671, 1995.
- ELIAS, F.; LUCAS, S.R.R.; HAGIWARA, M.K.; KOGIKA, M.M.; MIRANDOLA, R.M.S. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, v. 34, p. 413-418, 2004.
- ERITSLAND, J. Safety considerations of polyunsaturated fatty acids. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, p. 197-201, 2000.
- FERNÁNDEZ-ALBERT, A.; FINK, N.E. Red blood cell osmotic fragility confidential intervals: a definition by application of mathematical model. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 38, p. 433-436, 2000.
- FISHER-SCHLIEBS, E.; BALL, E.; BERNDT, E.; BESEMFELDER-BUTZ, E.; BINZEL, M.L.; DROBNY, M.; MUHLENHOFF, D.; MULLER, M.L.; RAKOWSKI, K.;

- RATAJCZAK, R. Differential immunological cross-reactions with antisera against the V-ATPase of *Kalanchoe daigremontiana* reveal structural differences of V-ATPase subunits of different plant species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 378, 1131 p., 1997.
- 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.
- FREIRE, C.M.M.; MARQUES, M.O.M.; COSTA, M. Effect of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 161-166, 2006.
- FURLAN, R.M. **Cultivo de plantas medicinais**. 2.ed. Cuiabá: SEBRAE/MT, 1999.
- FURUSAWA, S.; WU, J.; FUJIMA, T.; NAKANO, S.; NEMOTO, S.; TAKAYANAGI, M.; SASAKI, K.; TAKAYANAGI, Y. Cepharanthine inhibits proliferation of cancer cells by inducing apoptosis. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v. 20, p. 87-97, 1998.
- GASTALDO P., BARBERIS G., FOSSATI F. Le piante della medicina tradizionale nei dintorni di Praglia (Appennino ligure-piemontese). **Atti. Accad. Lig. Sci. Lett.**, v. 35, p. 3-36, 1979.
- GORDON, M.H., ROEDIG-PENMAN, A. Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 97, p. 79-85, 1998.
- GOUVÊA-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.
- GREGER, H. New chemical markers within *Artemisia* (Compositae – Anthemideae). In: MARGARIS, N.; KOEDAM, A.; VOKOU, D. (eds.) **Aromatics plants: Basic and Applied Aspects**. Martinus Nijhoff, The Hague, p. 153-163, 1982.
- GRIFFIN, S.G.; WYLLIE, G.; MARKHAM, J.L.; LEACH, D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 322-332, 1999.
- GUARRERA, P.M. **Il patrimonio etnobotanico del Lazio**. Regione Lazio e Dipartimento di Biologia Vegetale, Roma. p. 301, 1994.
- GUARRERA, P.M. Ricerche etnobotaniche nelle Province di Macerata e di Ancona. **Rivista Italiana EPPOS**, v. 4, p. 220-228, 1981.
- GUARRERA, P.M. Traditional antihelminthic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 183-192, 1999.
- GUARRERA, P.M. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). **Fitoterapia**. v. 76, p. 1-25, 2005.
- GUARRERA, P.M. Usi tradizionali delle piante nel territorio della Majella. **Erbe e piante medicinale nella storia e nelle tradizioni popolari abruzzesi**, p. 17-45, 1987.

- HALLIWELL, B.E.; GUTTERIDGE, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In: HALLIWELL, B.E. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2a. ed. New York: Oxford University Press, 1989. p. 188-218.
- HASHIMOTO, S.; JING, Y.; KAWAZOE, N.; NAKAJO, S.; YOSHIDA, T. KUROIWA, Y.; NAKAYA, K. Bufalin reduces the level of topoisomerase II in human leukemia cells and affect the cytotoxicity of anticancer drugs. **Leukemia Research**, v. 21, p. 875-883, 1997.
- HERNÁNDEZ, T.; CANALES, M.; AVILA, J.G.; DURAN, A.; CABALLERO, J.; ROMO DE VIVAR, A.; LIRA, R. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 181-188, 2003.
- 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 revelance of low serum vitamin B12 concentrations in older people: the Banbury B12 study. **Age Ageing**, v. 35, p. 416-422, 2006.
- HORWITT, M.K.; CENTURY, B.; ZEMAN, A.A. Erythrocyte survival time and reticulocyte levels after tocopherol depletion in man. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 12, p. 99-106, 1963.
- HU, C.Q.; CHEN, Q.; SHI, Q.; KILKUSKIE, R.E.; CHENG, Y.C.; LEE, K.H. Anti-aids agents, 10. Acacetin-7-o- β -D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 42-51, 1994.
- 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^a. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1221 p.
- JAIN, S.K.; MOHANDAS, N.; CLARK, N.R.; SHOBEL, S.B. The effect of MDA, a product of lipid peroxidation on the deformability, dehydration and ⁵¹Cr survival of erythrocytes. **British Journal Haematology**, v. 53, p. 247-52, 1983.
- JANSEN-JACOBS, M.J. Verbenaceae. In: RINJ, A.R.A. (ed). **Flora oh the Guianas, Series A: Phanerogams**. fascicle 4, n.148., Koenigstein: Gorts-Van Hoetz Scientific Books. 1988, 116 p.
- JOVANOVIC, N.; BOUCHARD, A.; HOFLAND, G.W.; WITKAMP, G.J; CROMMELIN, D.J.A.; JISKOOT, W. Distinct effect of sucrose and trehalose on protein stability during supercritical fluid drying and freeze-drying. **European Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 336-45, 2006.
- KEMNER, J.M.; LIANG, X.; NESTER, E.W. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene *chvE* is part of a putative ABC-type sugar transport operon. **Journal of Bacteriology**, v. 179, 2452 p., 1997.
- KIMOTO, T.; SUEMITSU, K.; NAKAYAMA, H.; KOMORI, E.; OHTANI, M.; ANDO, S. Therapeutic experience of venomous snakebites by the Japanese viper (*Agkistrodon halys*

blomhoffi) with low dose of antivenin: report of 43 consecutive cases. **Nippon Geka Hokan**, v.66, p. 71-77, 1997.

KOLANJIAPPAN, K.; MANOHARAN, S.; KAYALVIZHI, M. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, p. 143-149, 2002.

KONO, K.; TAKAHASHI, J.A.; UEBA, T.; MORI, H.; HASHIMOTO, N.; FUKUMOTO, M. Effect of combination chemotherapy with biscoclaurine-derived alkaloid (Cepharanthine) and nimustine hydrochloride on malignant glioma cell lines. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 56, p. 101-108, 2002.

KUPCHAN, S.M.; HEMINGWAY, R.J.; HEMINGWAY, J.C. The isolation and characterization of hellebrigenin 3-acetate and hellebrigenin 3,5-diacetate, bufadienolide tumor inhibitors from *Bersama abyssinica*. **Tetrahedron Letters**, v. 20, p. 149-152, 1968.

KUPCHAN, S.M.; OGNYANOV, I.; MONIOT, J.L. Tumor inhibitors. LXIV. Isolation and structural elucidation of novel bufadienolides, the cytotoxic principles of *Bersama abyssinica*. **Bioorganic Chemistry**, v. 1, p. 13-31, 1971.

KWIATKOWSHA, S.; PIASECKA, G.; ZIEBA, M.; PIOTROWSKI, W.; NOWAK, D. Increased serum concentrations of conjugated dienes and malondialdehyde in patients with pulmonary tuberculosis. **Respiratory Medicine**, v. 93, p. 272-76, 1999.

LAI, J.; LIM, Y.H.; SU, J.; SHEN, H.; ONG, C.N. Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS. **Journal of Chromatography B**, In Press, Corrected Proof, p. 1-11, 2006.

LEE, S.J.; CHUNG, H.J.; MAIER, C.G.A.; WOOD, A.DIXON, R.A.; MABRY, T.J. Estrogenic flavonoids from *Artemisia vulgaris*. L. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3325-3329, 1998.

LIEN, E.J.; LI, W.J. **Advanced in Chinese Medicinal and Material Research**. Singapore: World Scientific Press, 1985. p. 433-54.

LIU, K.C.S.; YANG, S.L.; ROBERTS, M.F.; ELFORD, B.C.; PHILLIPSON, J.D. The contribution of flavonoids to the antimalarial activity of *Artemisia annua*. **Planta Medica**, v.55, p. 654, 1989.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSKY, S.L.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 5^a. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2003.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2002. 512 p.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids**, Springer, New York, 1970.

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. 343-48, 1994.

- MARCO, J.A.; BARBERA, O.; RODRIGUEZ, S.; DOMINGO, C.; ADELL, J. Flavonoids and other phenolics from *Artemisia hispanica*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 3155-3159, 1988.
- MASHOUR, N.H.; LIM, G.I.; FRISHMAN, W.H. Herbal medicine for the treatment of cardiovascular disease. **Archives of internal medicine**, v. 158, p. 2225-34, 1998.
- MATOS, F.F.; VIANA, G.S.B.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A. Atividade farmacológica do pseudo-hidrolato de *Lippia sidoides*. **Ciência e Cultura** (Supl.), v.31, p. 647, 1979.
- MATOS, F.J.A.; VIANA, G.S.B.; SILVEIRA, E.R. Estudo farmacológico do hidrolato de *Lippia chamissonis*. **Ciência e Cultura** (Supl), v. 32, p. 752, 1980.
- MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; TOGUCHIDA, S.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids and related compounds for aldose reductase inhibitory activity. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, p. 788- 795, 2002.
- 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. 2413-24, 2002.
- MOHAN, K.; GANGULY, N.K.; DUBEY, M.L.; MAHAJAN, R.C. Oxidative damage of erythrocytes infected with *P. falciparum*. An *in vitro* study. **Annals of Hematology**. v. 65, n. 3, p. 131-34, 1992.
- MOLDENKE, H.M. Materials toward a monograph of the genus *Lippia* I. **Phytologia**, v.12, p. 48-71, 331-34, 1965.
- MORITA, K.; NAKAMURA, M.; NAGAMACHI, M.; KISHI, T.; MIYACHI, Y. Seventeen cases of alopecia areata: combination of SADBE topical immunotherapy with other therapies. **Journal of Dermatology**, v. 29, p. 661-664, 2002.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 3. ed. New York: Worth, 2000. 1200 p.
- OJEWOLE J.A. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae) leaf aqueous extract. **Journal Ethnopharmacology**, v.99, p. 13-19, 2005.
- ORAFIDIYA, L.O.; AGBANI, E.O.; IWALEWA, E.O.; ADELUSOLA, K.A.A.; OYEDAPO, O.O. Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. **Phytomedicine**, v. 11, p. 71-76, 2004.
- OZGOVA, S.; HERMANEK, J.; GUT, I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1127-37, 2003.
- PARPART, A.K.; LORENZ, P.B.; PARPART, E.R.; GREGG, J.R.; CHASE, A.M. The osmotic resistance (fragility) of human red cells. **Journal of Clinical Investigation**., v. 26, p. 636-640, 1947.

- PEREZ, A.C.; CORREA, M.F.; BORGES, S.R. Anti-ulcer activity from the leaves of *Bryophyllum sp.* **Archives of Veterinary Science**, v. 4, p. 111-112, 1999.
- 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. 1241-48, 1964.
- PUSCHETT, J.B. The role of excessive volume expansion in the pathogenesis of preeclampsia. **Medical Hypotheses**, v. 67, p. 1125-1132, 2006.
- QUINN, L.A.; TANG, H.H. Antioxidant properties of phenolic compounds in macademia nuts. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, p. 1585-88, 1996.
- RABINI, R.A.; MORETTI, N.; STAFFOLANI, R.; SALVOLINI, E.; NANETTI, L.; FRANCESCHI, C.; MAZZANTI, L. Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membrane from centenarians. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 657-663 2002.
- RACK, V.S.N.; MENEZES, A.M.A.; GAUELHA, M.G.T. Antifertility screening of some indigenous plants of Brasil. **Fitoterapia**, v. 59, p. 17, 1987.
- REPETTO, M.G.; LLESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 523-534, 2002.
- REZENTTI, E.; TAIANI, R. **Sulla pelle del villano**. Museo Usi e Costumi della Gente Trentina, S. Michele all'Adige, 1988. p. 147-164.
- RHODES, D. Metabolic response to stress. In: DAVES, D.D. (Ed.). **The biochemistry of plants: a comprehensive treatise**. New York: Academic, p. 201-204, 1987.
- ROSELLI, M.; BRITTI, M.S.; LE HUËROU-LURON, I.; MARFAING, H.; ZHU, W.Y.; MENGHERI, E. Effect of different plants extracts and natural substances (PENS) against membrane damage induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 in pig intestinal cells. **Toxicology in Vitro**, In Press, Corrected Proof, p. 1-6, 2006.
- RUBERTO, G.; BARATTA, M.M.T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, p. 167-171, 2000.
- SALEH, N.A.M.; EL-NEGOUMY, S.I.; ABOU-ZAID, M.M. Flavonoids of *Artemisia judaica*, *A. monosperma* and *A. herba-alba*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 3059-3064, 1987.
- SALGUEIRO, L.R.; CAVALEIRO, C.; GONÇALVES, M.J.; CUNHA, A.P. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. **Planta Medica**, v. 69, p. 80-83, 2003.
- SEAMAN, F.C. Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. **Botanical review**, v. 48, p. 121-128, 1982.
- SEYMOUR, T.A.; LI, S.J.; MORRISSEY, M.T. Characterization of a natural antioxidant from shrimp shell waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 682-85, 1996.

- SEYOUM, A.; PALSSON, K.; KUNG'A, S. KABIRU, E.W.; LWANDE, W.; KILLEEN, G.F.; HASSALANI, A.; KONLS, B.G.J. Traditional use of mosquito-repellent plants in western Kenya and their evaluation in semi-field experimental huts against *Anopheles gambiae*: ethnobotanical studies and application by thermal expulsion and direct burning. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 225-231, 2002.
- SHARIFIFAR, F.; MOSHAFI, M.H.; KHODASHENAS, M.; KHOSHNOODI, M. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. **Food Control**, v. 18, p. 800-805, 2007.
- SHARMA, P.; SHARMA, J.D. In vitro hemolysis of human erythrocytes – by plant extracts with antiplasmodial. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 239-243, 2001.
- SINGH, A.; SINGH, R.K.; BHUNIA, A.K.; SIMMON, J.E. Use of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. In **Program listing. The 2001 IFT annual meeting**. New Orleans, LO., 2001.
- SMITH, C.M.; MARKS, A.D.; LIEBERMAN, M.A.; MARKS, D. B. **Basic Medical Biochemistry: a clinical approach**. 2^a. ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 2004.
- SOMERO, G.N. Protons, osmolytes and fitness of internal milieu for protein function. **American Journal of Physiology**, v. 251, n. 2, p. 197-213, 1986.
- STEVENS, J.F.; HART, H.; HAM, R.C.H.J.; ELEMA, E.T.; ENT, M.M.V.X.V.D.; WILDEBOER, M.; ZWAVING, J.H. Distribution of alkaloids and tannins in the Crassulaceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, p. 157-165, 1995.
- 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, 1948.
- SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C from *Kalanchoe pinnata*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 64, p. 1310-1312, 2000.
- SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H.; MURAKAMI, A.; SAKAI, H.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana x tubiflora*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 65, p. 947-949, 2001.
- TIMASHEFF, S.N. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. **Advances in Protein Chemistry**, v. 51, p. 355-432, 1998.
- TUNC, S.; CHOLLET, E.; CHALIER, P.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N. Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of *Penicillium notatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 263-270, 2007.
- VALANT-VETSCHERA, K.M.; FISCHER, R.; WOLLENWEBER, E. Exudate flavonóides in species of *Artemisia* (Asteraceae – Anthemideae): new results and chemosystematic interpretation. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 31, p. 487-498, 2003.

- van ACKER, F.A.; SCHOUTEN, O.; HAENEN, G.R.; van der VIJGH, W.J.; BAST, A. Flavonoids can replace alpha-tocopherol as an antioxidant. **FEBS Letters**, v. 473, p. 145-8, 2000.
- van GINKEL, G.; SEVANIAN, A. Lipid peroxidation induced membrane structural alterations. **Methods Enzymology**, v. 233, p. 273-88, 1994.
- VIANA, G.S.B.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A. Observações preliminares sobre a farmacologia de *Lippia sidoides*. **Ciência e Cultura** (Supl.), v. 30, p. 453, 1978.
- VIANA, G.S.B.; MATOS, F.J.A.; CRAVEIRO, A.A. Estudo farmacológico de plantas do gênero *Lippia*. **Ciência e Cultura** (Supl.), v. 32, p. 752, 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.
- VIEGI, L.; PIERONI, A.; GUARRERA, P.M.; VANGELISTI, R. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 221-244, 2003.
- VIEIRA, E.C.; GAZZINELLI, G.; MARES-GUIA, M. **Bioquímica celular e biologia molecular**. 2^a. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.
- WAGNER, H.; FISCHER, M.; LOTTER, H. Isolation and structure determination of daigremontianin, a novel bufadienolide from *Kalanchoe daigremontiana*. **Planta Medica**, p. 169-170, 1985.
- WALLNÖFER, B.; HOFER, O.; GREGER, H. Polyacetylenes from the *Artemisia* "Vulgares" group. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2687-2691, 1989.
- WANG, Z.T.; NG, T.B.; XU, G.J. Recent advances in pharmacognosy research in China. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 26, p. 1211-24, 1995.
- WILLCOX, J.K.; ASH, S.L.; CATIGNANI, G.L. Antioxidants and prevention of chronic diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 275-95, 2004.
- WILLIAMS, M.C.; SMITH, M.C. Toxicity of *Kalanchoe spp* to chicks. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, p. 543, 1984.
- WONG, S.; TSUI, S.; KWAN, S. Analysis of proprietary Chinese medicines for the presence of toxic ingredients by LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, p. 161-170, 2002.
- YAMAGISHI, T., HARUNA, M.; YAN, X.Z.; WU, R.Y.; CHANG, J.J.; LEE, K.H. Antitumor agents, 110. Bryophyllin B, a novel potent cytotoxic bufadienolide from *Bryophyllum pinnatum*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 1071-1079, 1998.
- YAMAGISHI, T.; YAN, X.Z.; WU, R.Y.; McPHAIL, D.R.; McPHAIL, A.T.; LEE, K.H. Structure and stereochemistry of bufadienolide A, a novel potent cytotoxic bufadienolide orthoacetate from *Bryophyllum pinnatum*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, p. 1615-1617, 1988.

YANCEY, P.H.; CLARK, M.E.; HAND, S.C.; BOWLUS, R.D.; SOMERO, G. Living with water stress: evolution of osmolytes systems. **Science**, v. 21, n. 4566, p. 1214-22, 1982.

YEH, J.Y.; HUANG, W.J.; KAN, S.F.; WANG, P.S. Effects of bufalin and cinobufagin on the proliferation of androgen dependent and independent prostate cancer cells. **Prostate**, v. 54, p. 112-124, 2003.

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.

ZHANG, L.S.; NAKAYA, K.; YOSHIDA, T.; KUROIWA, Y. Induction by bufalin of differentiation of human leukemia cells HL60, U937, and ML1 toward macrophage/monocyte-like cells and its potent synergistic effect on the differentiation of human leukemia cells in combination with other inducers. **Cancer Research**, v. 52, p. 4634-4641, 1992.

ZHOU, Y.C.; ZHENG, R.L. Phenolic compounds and an analog as superoxide anion scavengers and anti oxidants. **Biochemical Pharmacology**, v. 42, p. 1177-79, 1991.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown growing wild in Brazilian Amazon. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 411-414, 1998.