



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102014031505-5

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102014031505-5

(22) Data do Depósito: 16/12/2014

(43) Data da Publicação Nacional: 27/09/2016

(51) Classificação Internacional: A61K 36/28; A01N 65/12; A61P 39/06; A61P 35/00; A61P 31/04; A61P 31/10; A01P 7/04.

(54) Título: MÉTODO DE EXTRAÇÃO E USO DO ÓLEO ESSENCIAL, EXTRATO E FRAÇÕES COM ATIVIDADE ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DAS PARTES AÉREAS E RAIZ DE BACCHARIS MILLEFLORA (LESS.) DC., ASTERACEAE

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: RUA JOÃO NEGRÃO, 280 2º ANDAR, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80010-200; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA, Instituição de Ensino e Pesquisa. CGC/CPF: 80257355000108. Endereço: Av. Carlos Cavalcanti, nº4748 Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, BRASIL(BR), 84030-900

(72) Inventor: OBDULIO GOMES MIGUEL; MARILIS DALLARMI MIGUEL; DANIELA GASPARDI FOLQUITTO; CAMILA BUGNOTTO PEREIRA; JULIANE NADAL DIAS SWIECH; SANDRA MARIA WARUMBI ZANIN; JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS; PAULO YITOR FARAGO; LUÍS ANTÔNIO ESMERINO; ROSILDA APARECIDA KOYALICZ; DÉBORA MARIA BORSATO; JANE MANFRON BUDEL; BEATRIZ HELENA LAMEIRO DE NORONHA SALES MAIA; CARLA CRISTINE KANUNFRE.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 16/12/2014, observadas as condições legais

Expedida em: 06/04/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

MÉTODO DE EXTRAÇÃO E USO DO ÓLEO ESSENCIAL, EXTRATO E FRAÇÕES COM ATIVIDADE ANTITUMORAL, ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DAS PARTES AÉREAS E RAIZ DE BACCHARIS MILLEFLORA (LESS.) DC., ASTERACEAE

Campo da Invenção

[001]. A presente patente de invenção tem como objetivo o processo de obtenção para uso humano, veterinário e ambiental das propriedades medicinais, nutricionais, farmacêuticas, cosméticas, anti-inflamatórias, imunológicas, antioxidantes, toxicológicas, antitumorais, antimicrobianas, inseticidas, repelentes, antifúngicas, alelopáticas e estimulantes no campo humano, veterinário, agronômico, alimentício e ambiental provenientes do óleo essencial, do extrato, das frações e dos componentes e produtos derivados das partes aéreas e raiz da espécie *Baccharis milleflora* (Less.) DC., Asteraceae.

[002]. A invenção está relacionada também as formas farmacêuticas e dosagens galênicas líquidas, semi-sólidas e sólidas, tais como ampolas, xaropes, soluções, suspensões, emulsões, pomadas, cremes, aerossol, pós, cápsulas, tabletes, comprimidos, cápsulas, drágeas, preparações hipocráticas, galênicas e magistrais, todas as quais contendo preparações originárias da espécie vegetal *Baccharis milleflora* (Less.) DC., Asteraceae.

Histórico da Invenção

[003]. A presente invenção refere-se a um estudo científico inédito por identificar as propriedades medicinais, nutricionais, farmacêuticas, cosmética, anti-inflamatórias, imunológicas, antioxidantes, toxicológicas, antitumorais, antimicrobianas, inseticidas, repelentes, antifúngicas, alelopáticas e estimulantes no campo

humano, veterinário, agronômico, alimentício e ambiental provenientes do óleo essencial, do extrato, das frações e dos componentes e produtos derivados das partes aéreas e raiz da espécie *Baccharis milleflora* (Less.) DC., Asteraceae.

[004]. *Baccharis milleflora* pertence à família Asteraceae, também conhecida como Compositae, é a maior família das Magnoliophyta (Angiospermae), compreendendo 25.000 espécies pertencentes a 1.600 gêneros dispostos em 17 tribos e três subfamílias, Asteroideae, Cichorioideae e Barnadesioideae (BARROSO, 1991; JOLY, 1998; BREMER 1994). No Brasil, essa família apresenta aproximadamente 300 gêneros e 2.000 espécies (SOUZA & LORENZI 2005).

[005]. A inflorescência característica das Asteraceae é o capítulo, formado por flores sésseis, bissexuadas, unissexuadas e estéreis, assentadas sobre um receptáculo comum (BARROSO, 1991; JOLY, 1998; SOUZA & LORENZI 2005). Os representantes da família Asteraceae apresentam folhas simples, alternas, opostas ou verticiladas, geralmente inteiras ou ligeiramente denteadas, porém nunca compostas, apresentando a forma de uma espátula (PENNA, 1921). Possuem tricomas glandulares que secretam óleos essenciais. Essas estruturas estão localizadas principalmente em depressões na epiderme e recebem diferentes designações como glândulas, pêlos glandulares e pêlos secretores (SOLEREDER, 1908).

[006]. Os óleos essenciais secretados atuam como uma barreira química, produzindo compostos tóxicos ou repelentes, liberando exsudatos que formaram camadas contínuas na superfície foliar, aumentando a refração de luz e diminuindo a temperatura. Segundo Cronquist (1988), o sucesso evolutivo do táxon parece ser devido à presença de numerosos compostos de defesa como terpenoides, derivados de ácido cafeico, flavonoides, alcaloides e pela

associação de poliacetilenos e lactonas sesquiterpênicas, do que propriamente a sua morfologia floral especializada.

[007]. Devido ao seu extraordinário poder de adaptação ambiental, pode ser encontrada nos mais diversos habitats, preferencialmente em ambientes campestres, e em condições climáticas variadas, em regiões tropicais, subtropicais até temperadas, prevalecendo em formações campestres e montanhosas e, menos frequentemente, em formações florestais Cronquist (1981). Segundo Jones (1977) e Bremer (1994), esta família é abundante no sudoeste dos estados Unidos, México e extremo sul do Brasil, estando presente também ao longo dos Andes, no mediterrâneo, sudoeste e centro da Ásia, África do Sul e Austrália, sendo considerada cosmopolita (HEYWOOD, 1996). As pesquisas envolvendo as Asteraceae iniciaram com o trabalho de Baker (1873; 1876; 1882; 1884), sendo observado um aumento nos estudos com os representantes dessa família, não somente quanto à sua morfologia, anatomia e fitoquímica, mas também em relação à sua sistemática, o que permite um melhor conhecimento sobre o enquadramento taxonômico de espécies de Asteraceae (HOLMES 1996; BREMER 1994).

[008]. Muitas espécies são utilizadas pela indústria, na alimentação (*Helianthus annuus* L.), na produção de cosméticos, inseticidas, corantes e como ornamentais (*Chrysanthemum coronarium* L.). Entre as aplicações terapêuticas das espécies da família Asteraceae, as mais frequentes são: antiflogística, hepatoprotetora, anti-helmíntica, antisséptica e anti-neoplásico, apresentando assim elevada importância econômica e farmacológica (JONES 1977, BREMER 1994; SOUZA & LORENZI 2005).

[009]. O gênero *Baccharis* L., compreende cerca de 500 espécies, localizadas dos Estados Unidos até a Argentina (GIULIANO,

2001). Cerca de 120 espécies estão descritas no Brasil, sendo encontrada com mais frequência no Sul (BUDEL et al. 2005). Várias *Baccharis* tem demonstrado atividade biológica como *B. coridifolia* DC. (MONKS et al., 2002), *B. sagittalis* (Less.) DC. (CIFUENTE et al., 2002), *B. unbelliformis* DC. (CESPEDES, et al. 2002), *B. trinervis* Pers. (SANCHEZ et al. 2002).

[010]. *Baccharis* L. (seção Caulopterae DC.) está representada por aproximadamente 30 espécies e esta limitada à América do Sul (GIULIANO, 2001). O Brasil apresenta a principal diversidade de espécies para a seção (BARROSO, 1976). No Rio Grande do Sul 15 espécies do grupo Trimeria foram citadas (DIESEL, 1987). Esse Grupo compreende muitas espécies que apresentam expansões caulinares ou asas que constituem os cladódios. Essas espécies são popularmente chamadas de carqueja no Brasil e na Argentina e apresentam dois ou três cladódios alados, que são morfologicamente similares.

[011]. *Baccharis milleflora* (Less.) DC., vulgarmente conhecida como carqueja, carqueja-do-Lajeado é usada na medicina popular como diurético e estomáquico (BUDEL et al. 2005). Encontra-se no Sudeste e Sul do Brasil e ocupa campos secos ou molhados, pântanos, margens de florestas, campos de altitude elevada e locais sombreados (HEIDEN et al., 2009; SCHNEIDER, 2009).

[012]. Muitos óleos essenciais e seus compostos isolados são reconhecidos como poderosos antioxidantes naturais, podendo substituir os antioxidantes sintéticos (BOZIN et al., 2006). Diversos ensaios foram desenvolvidos para screening de atividade antioxidante de extratos vegetais. Os mais utilizados são o ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico)), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e a redução do íon férrico (FRAP) (THAIPONG et al., 2006).

[013]. Em um estudo realizado por Ferronato et al. (2006), por meio do método da oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoléico, foi possível avaliar a atividade antioxidante de óleos essenciais produzidos por *B. uncinella* D.C. e *B. dracunculifolia* D.C. Os resultados mostraram que os dois óleos avaliados podem inibir a formação de espécies reativas de oxigênio em até 65,66% para *B. dracunculifolia* e 52,18% para *B. uncinella*.

[014]. Bacchi et al. (2009), verificaram a atividade antioxidante do extrato bruto liofilizado, extrato liofilizado da "resina", pó da droga e frações clorofórmica, acetato de etila, etanol e etanol 50% de *Baccharis trimera* (Less) DC, usando o método que reduz o radical 2,2'-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Os autores concluíram que as amostras apresentaram resultados expressivos de atividade antioxidante quando comparados a vitamina E (IC₅₀ = 16,71 μ g/mL). Os valores de IC₅₀ encontrados para o pó da droga, extrato bruto liofilizado, extrato bruto liofilizado da "resina" e frações clorofórmica, acetato de etila, etanol absoluto e etanol 50% foram de 22,74 μ g/mL, 21,83 μ g/mL, 22,6 μ g/mL, 24,93 μ g/mL, 23,05 μ g/mL, 17,18 μ g/mL, 18,19 μ g/mL, respectivamente.

[015]. Nos dias atuais, tem-se observado uma crescente busca por novos princípios ativos com atividades antimicrobianas, devido principalmente ao surgimento e à disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais (MENDES et al., 2011). No intuito de defender-se contra microrganismos e predadores, muitas plantas produzem em seu metabolismo secundário óleos essenciais, os quais, também atuam na atração de agentes polinizadores (CURIONI, 2006).

[016]. Pesquisadores têm avaliado o efeito de compostos naturais sobre microrganismos causadores de diversas doenças pelos métodos de difusão em ágar, em disco de papel, bioautografia e

microdiluição. O método da bioautografia é utilizado na determinação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Este método reúne a cromatografia em camada delgada e a difusão em ágar e permite a determinação do potencial antimicrobiano de uma substância de forma qualitativa. Este teste permite uma triagem inicial para dar continuidade ou não na pesquisa com o óleo testado (VALGAS, 2007). O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* DC. Stapf por meio da bioautografia apresentou atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*; *Aspergillus niger*; *Candida albicans*; *Escherichia coli*; *Bacillus subtilis*; *Enterococcus faecalis* (PEREIRA, 2010).

[017]. A atividade antimicrobiana do óleo essencial das plantas *Curcuma longa* L. e *Achillea millefolium* L., foi verificada frente a 20 cepas de microrganismos isolados de material clínico humano. Por intermédio dos testes de microdiluição em caldo, os óleos de *A. millefolium* e de *C. longa* demonstraram ação antimicrobiana considerada moderada ($0,625 \text{ mg mL}^{-1}$) em 63,2% e 68,4% das leveduras testadas, respectivamente (RIBEIRO et al., 2010). Os óleos essenciais das folhas de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus* foram investigados quanto a atividade antimicrobiana por MIC e apresentaram inibição frente às cepas Gram-positivas testadas, porém não foi evidenciado atividade frente às cepas Gram-negativas nas concentrações testadas, o que permite aferir atividade bacteriana de estreito espectro (MURARI et al, 2008). Dessa forma, evidencia-se que óleos essenciais, principalmente os provenientes de Asteraceae, são metabólitos secundários de potencial interesse clínico, devido as diferentes atividades biológicas que apresentam.

[018]. Ferronato et al. (2007), avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* e *Baccharis uncinella* pelo método de difusão em disco de papel. Os

óleos essenciais quando avaliados sobre as bactérias patogênicas *Escherichia coli* (ATCC 25922-beta-lactamase negativa), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923-suscetível a oxacilina e penicilina), mostraram-se eficientes em inibir o crescimento dos microrganismos testados.

[019]. Muitos compostos naturais podem ser possíveis agentes antitumorais, efeito que pode ser verificado primeiramente através de ensaios de citotoxicidade *in vitro*. O ensaio do corante vital MTT é uma ferramenta útil para avaliar o potencial citotóxico de compostos, pois avalia a função celular em nível mitocondrial. Esse método analisa a viabilidade e o estado metabólico da célula baseado na redução do sal 3-(4,5-dimetil- 2-tiazolil)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT) em azul de formazano, a partir de enzimas desidrogenases presentes somente em células ativas (MOSMMANN, 1983). Diversos óleos essenciais e extratos de Asteraceae foram avaliados quanto ao efeito antitumoral. No estudo realizado por Momesso et al. (2009), com as folhas de *Ageratum conyzoides* L., (Asteraceae), constatou-se que o tratamento com o extrato de *A. Conyzoides* na dose de 50 mg/kg de peso foi eficaz, inibindo o crescimento tumoral.

[020]. Compostos isolados de espécies de *Baccharis* têm demonstrado atividades citotóxicas. O tricoteceno baccharin, isolado de *B. megapota mica* foi ativo contra leukemia implantada em ratos. Os tricotecenos macrocíclicos dos grupos roridinas e verrucacinas, encontrados em *B. coridifolia* apresentaram atividade contra células (KB) derivadas de carcinoma humano de nasofaringe (Kupchan et al. 1976; Kupchan et al. 1977). Diterpenoides isolados de *B. gaudichaudiana*, os lábdanos gaudichaudols, os clerodanos gaudichaudona e acetato de articulina apresentaram atividade

citotóxica em células de leucemia linfocítica P-388, bem como em outras linhagens celulares humanas (Fullas et al. 1994). A partir das folhas de *B. leijia* foram isolados uma série de neo-clerodanos contendo um grupo hidroxila livre em C-18 com importante toxicidade para *Artemia salina* (Labbe et al. 1991).

[021]. Esses resultados aumentam o interesse na investigação da citotoxicidade frente à células tumorais de espécies de *Baccharis*, com o propósito de encontrar diferentes opções terapêuticas para o tratamento do câncer. Entretanto, não há relatos na literatura sobre a investigação de possíveis atividades terapêuticas de *Baccharis milleflora* (Less.) DC.

Algumas Patentes relacionadas ao gênero *Baccharis*

[022]. *Baccharis* oxide synthase (5.4.99.51) C12Y 504/99052. Alpha-seco-amyrin synthase (5.4.99.52) C12Y 504/99053. Marneral synthase (5.4.99.53).

[023]. Quality control method and application of baccharis type propolis. ZHANG CUIPING; HU FULIANG; HUANG SHUAI; LIU JIA, 06/11/2013.

[024]. *Baccharis dracunculifolia* propolis quality control method. ZHANG CUIPING; HU FULIANG; HUANG SHUAI. 08/03/2013.

[025]. Anti-leukemic trichothecene epoxides. Kupchan Deceased., Morris S., Jarvis, Bruce B., Dailey Jr., Richard G. 08/14/1979

[026]. Extracts of baccharis sp. or green propolis for use as sanitizer. Jairo Kenupp Bastos. Niege Araçari Jacometti Cardoso FURTADO 19/09/2009.

[027]. Baccharis plant named 'Starn'. Ronald E. Gass 22/02/2000.

[028]. Baccharis plant named 'Kolmmyst'. Peter R. Kolster 29/04/2003.

Citação das Figuras

[029]. As figuras e tabelas em anexo servirão para o melhor entendimento da presente patente de invenção.

[030]. FIGURA 1: Atividade antioxidante do óleo essencial (OE) de *Baccharis milleflora* nas quatro estações do ano, utilizando o método de redução do complexo fosfomolibdênico.

[031]. FIGURA 2: Avaliação da atividade antitumoral do óleo essencial de *Baccharis milleflora* (3, 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em células Jurkat, HL-60 e Raji.

Tabelas

[032]. TABELA 1: Atividade antioxidante do óleo essencial (OE) de *Baccharis milleflora* utilizando o método do DPPH.

	IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Desvio padrão
OE. Outono	16,21	± 0,33
OE. Inverno	15,48	± 0,91
OE. Primavera	16,72	± 0,80
OE. Verão	21,06	± 0,27
Ac. ascórbico	6,36	±0,06
Ac. gálico	6,37	±0,05

OE, Óleo essencial de *Baccharis milleflora*.

[033]. TABELA 2: Atividade antimicrobiana do óleo essencial (OE) de *Baccharis milleflora* nas quatro estações do ano.

Amostras	CIM - CBM (mg/mL)				
	<i>C. albicans</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
OE Outono	>10	>10	>10	>10	5 - 10
OE Inverno	>10	>10	>10	>10	2,5 - 5
OE Primavera	>10	>10	>10	>10	2,5 - 5
OE Verão	>10	>10	>10	>10	5 - 10
Clorexidine	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

Descrição Detalhada da Invenção

[034]. A presente invenção refere-se ao processo de obtenção e uso dos extratos e do óleo essencial das partes aéreas e raiz de *Baccharis milleflora* (Less.) DC.

Obtenção do material botânico:

[035]. O material vegetal foi coletado na região de Uvaranas, na cidade de Ponta Grossa, Paraná, Brasil (latitude: 25° 5' 23" S e longitude: 50° 6' 23"W). As coletas foram realizadas pela manhã

durante as quatro estações do ano de 2013. As exsiccatas foram identificadas sob os números 192141 e 388373 e depositadas no Herbário do Instituto de Ciências Naturais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Museo Botânico Municipal de Curitiba no Paraná, respectivamente.

Processo de obtenção dos extratos e frações:

[036]. A extração foi realizada em ciclo fechado com etanol absoluto, em aparelho de Soxhlet. As partes aéreas de *B. milleflora* (3200g) foram moídas e depositadas em aparelho de Soxhlet e submetidas à extração em etanol até esgotamento total. O extrato obtido foi filtrado com algodão e submetido à concentração em Soxhlet à temperatura de 50°C até redução em 1/5 de seu volume inicial.

[037]. Os solventes utilizados nos procedimentos fitoquímicos e analíticos apresentaram grau analítico (P.A.) ou cromatográfico (CLAE), quando necessário. O extrato bruto foi usado para a obtenção das frações por partição líquido/líquido, em aparelho de Soxhlet com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: hexano, diclorometano e acetato de etila. A partição iniciou com hexano, e a fase solúvel em hexano foi reservada, o resíduo foi novamente particionado com diclorometano e posteriormente em acetato de etila, as partes solúveis foram levadas a secar em Soxhlet. Ao final do processo de extração e fracionamento obtiveram-se quatro frações: hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente. Uma amostra de cada fração foi separada para realização dos testes biológicos e o restante foi utilizado para isolamento de compostos.

Extração e determinação quantitativa do óleo essencial:

[038]. O óleo essencial de 100 g das folhas dessecadas da espécie em estudo foi determinado quantitativamente. A extração foi realizada por meio de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger (USP XXV, 2002), com duração de 6 horas. A quantidade de óleo essencial extraído foi medido em tubo graduado. A porcentagem de óleo essencial existente na massa de 100 g de folhas correspondeu ao valor lido no tubo graduado. O material obtido foi estocado em tubos Eppendorf, em temperatura de $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Identificação dos compostos voláteis do óleo essencial:

[039]. A identificação dos constituintes voláteis foi realizada por meio do cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 6890 equipado com o detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5975 e coluna de capilaridade HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). A cromatografia gasosa associada à espectroscopia de massa foi realizada usando injetor split, com injetor na temperatura de 220°C , sendo da coluna 60°C , com rampa de aquecimento de $3^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura final 240°C e temperatura do detector 250°C . O hélio foi usado como gás de arraste a $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O sistema de ionização de elétrons CG-MS foi 70 eV. As análises quantitativas foram realizadas usando um cromatógrafo a gás Hewlett-Packard 5890 equipado com detector de ionização de chama sob as mesmas condições descritas anteriormente. A amostra do óleo foi dissolvida em acetato de etil (20 mg mL^{-1}) para as análises. Os índices de retenção foram determinados de pela injeção de padrões de hidrocarbonetos e as amostras do óleo essencial sob as mesmas condições. Os componentes do óleo essencial foram identificados com os dados da literatura e perfis do espectro de massa da biblioteca. A quantificação cromatográfica gasosa com detector

de ionização de chama foi obtida usando cromatógrafo GC-FID e foi expressa como média $\pm$ desvio padrão para três amostras do óleo essencial.

[040]. De acordo com as análises por cromatografia gasosa foram identificados no óleo essencial de *Baccharis milleflora* (Less.) DC, obtido a partir da coleta realizada no inverno, os seguintes compostos majoritários: germacreno D 9,03%, transcariofilno 9,99 %, biciclogermacreno 12,89%.

Avaliação da atividade antioxidante:

[041]. Para avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial de *B. milleflora* foram utilizados os métodos do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999) e do complexo fosfomolibdênio (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

[042]. Para o método do DPPH, foram preparadas soluções de óleo essencial das quatro estações, em metanol, em diferentes concentrações (35,0; 30,0; 25,0; 20,0; 15,0; 10,0; 5,0; 1,0; 0,5 mg/mL). Foram utilizadas soluções de DPPH (0,1mM) e controles positivos: ácido ascórbico e ácido gálico, nas concentrações de 1000 a 0,387 μ g/mL, obtidas por diluições seriadas, em metanol. Em microplacas de 96 poços foram transferidos 20 μ l das soluções de óleo essencial de *B. milleflora* bem como das soluções de controles positivos e branco (metanol) e 100 μ l da solução de DPPH. As placas foram homogeneizadas durante 1 minuto e a leitura foi realizada em leitor de microplacas (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA) no comprimento de onda de 517nm, imediatamente após a mistura e ao final de um período de 30 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente. A atividade antioxidante (AA) foi determinada sob a forma de porcentagem, calculada pela taxa de declínio da absorbância da

solução de DPPH com o óleo ou padrões, após 30 minutos de reação, em relação a solução de referência (DPPH em metanol), de acordo com a equação 1 :

$$\%AA = 100 - [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}} / A_{\text{controle}}) \times 100]$$

Onde, A = cada valor de absorvância.

[043]. Os resultados da atividade antioxidante de *B. milleflora* utilizando o método do DPPH estão apresentados na tabela 1.

[044]. O método de redução do complexo fosfomolibdênico para a determinação da capacidade antioxidante total (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999), é baseado na redução do molibdênio VI a V pela amostra em análise. Essa redução possibilita a formação de um complexo verde entre fosfato e molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente, em triplicata, a 695 nm. Uma alíquota de 300 µL da amostra, em solução etanólica a 200 µg.mL⁻¹, foi acrescentada em um tubo de ensaio, juntamente com 3 mL do reativo (molibdato de amônio a 4 mmol.L⁻¹, fosfato de sódio 28 mmol.L⁻¹, ácido sulfúrico 0,6 mol.L⁻¹). O tubo foi fechado hermeticamente e levado ao banho-maria a 95°C por 90 min. O tubo foi resfriado e a leitura foi efetuada em espectrofotômetro UV/Vis SHIMADZU-1601 a 695 nm contra um branco (300 µL de etanol, acrescidos de 3 mL do reativo). Os padrões utilizados foram o ácido ascórbico, ácido gálico e a rutina a 200 µg.mL⁻¹. Para efeitos de cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante, conforme a equação 2.

$$\%AA = (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}} / A_{\text{ácido ascórbico}} - A_{\text{branco}}) \times 100$$

Onde, A = cada valor de absorvância.

[045]. Os resultados da atividade antioxidante de *B. milleflora* utilizando o método redução do complexo fosfomolibdênico estão apresentados na figura 1.

Avaliação da atividade antimicrobiana:

Microrganismos e preparo do inóculo

[046]. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando-se cepas provenientes da American Type of Culture Collection (ATCC) de *Escherichia coli* (ATCC 10530), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida albicans* (ATCC 10231), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). O inóculo foi preparado pela suspensão de colônias em solução salina até a turbidez de uma solução padrão de McFarland de 0,5. A suspensão McFarland 0,5 (1×10^8 UFC.mL⁻¹) foi diluída 1:10 para se conseguir uma diluição de 10^7 UFC.mL⁻¹. Um volume de 0,010 mL dessa suspensão foi inoculado no caldo, sendo a concentração final de microrganismos do teste aproximadamente 5×10^4 UFC.poço⁻¹.

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) pelo método de microdiluição em caldo

[047]. Inicialmente, os óleos de *Baccharis milleflora* (Less.) DC foram solubilizados em Tween 80 a uma concentração final de 1% e diluídos a 20 mg.mL⁻¹ no caldo Müeller-Hinton (CMH) para os testes com *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e com *E. coli* e no caldo Müeller-

Hinton com 2% de glicose (CMHG) para os ensaios com *C. albicans*. Todas as soluções resultantes foram filtradas por membrana 0,22 µm.

[048]. A determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais foi realizada segundo o método de microdiluição em caldo proposta pelo NCCLS (2003). Foram utilizadas microplacas com fundo em "U", esterilizadas com 96 orifícios (TPP®, EUA). A um volume de 200 µL de cada solução de óleo essencial, previamente adicionado em cada poço da microplaca, nas diluições seriadas de 20 a 0,078 mg.mL⁻¹, foi acrescido 10 µL de cada inóculo microbiano.

[049]. As microplacas foram tampadas e incubadas a 35°C por 24 h. O controle negativo foi realizado com Perio Gard® (0,12% de clorexidina) e para o controle positivo foi colocado apenas a cepa bacteriana (como preparada para as amostras) Para confirmação da presença de microrganismos viáveis nas concentrações não inibitórias, foi utilizado 10 µL do corante TCC (2, 3, 5 trifenil cloreto de tetrazólio) a 1% e incubados por 30 minutos em estufa a 35°C. Isto torna possível distinguir as amostras vivas, coloridas de vermelho daquelas mortas que mantêm a sua cor (GABRE, 1976; DESWAL & CHAND, 1997).

[050]. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi obtida por meio de semeadura, dos conteúdos dos poços das placas de microdiluição, em Agar Mueller-Hinton de aliquotas das diluições correspondentes a CIM e duas imediatamente anteriores. As concentrações imediatamente superiores a CIM são suficientes para demonstrar o efeito bactericida dos produtos naturais, visto que o efeito bacteriostático foi determinado pela ausência de crescimento nos poços da placa de microdiluição (POZZATTI et al., 2009). Após a semeadura, as placas de petri foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°, por 24h. A CBM foi considerada a menor

concentração que impediu o crescimento visível das bactérias ou permitiu a formação de até três Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

[051]. Os resultados dos ensaios antimicrobianos foram expressos como concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM). Os resultados da atividade antimicrobiana estão apresentados na Tabela 2.

Avaliação da Atividade Antitumoral:

Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT

[052]. As células Jurkat, HL-60 e Raji em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, foram semeadas em placas de 24 poços (0,25 x 10⁵ células/poço) e mantidas sob condições de cultura (37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂) por 24 h. Posteriormente, foram adicionadas diferentes concentrações dos óleos essenciais (3, 10, 30, 100 e 300 µg.mL⁻¹). Essas concentrações foram obtidas a partir da diluição das amostras em meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas por 24 consecutivas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após o período de incubação, o conteúdo de cada poço foi centrifugado, o sobrenadante foi desprezado e às células foi adicionado uma solução de MTT a 0,5 mg.mL⁻¹. Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C durante 30 min e ao abrigo da luz. Para a solubilização dos cristais de formazan, produto da redução do MTT, o dimetilssulfóxido (DMSO) foi adicionado e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 550 nm, foi realizada em leitor de placas (Biotek, µQuant). Meio RPMI 1640 e vincristina a 40 nmol.L⁻¹ ou 36,92 ng.mL⁻¹ foram empregados como controles negativo e positivo, respectivamente. A viabilidade celular foi determinada pela

comparação dos valores de absorbância obtidos para células tratadas e não tratadas. A citotoxicidade foi expressa como a concentração da amostra que induziu morte celular em 50% das células (IC_{50}) e foi calculada por regressão de Probit.

[053]. O efeito do óleo essencial das partes aéreas de *Baccharis milleflora* (Less.) DC sobre as células Jurkat, HL-60 e Raji, no tempo de exposição de 24 horas, está apresentado na figura 2.

Referências

[054]. BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COTA, C. G.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática das angiospermas do Brasil**. 3ed. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa. 1991.

[055]. AHMED, Y. *et al.* Isolation of steroids from n-hexane extract of the leaves of *Saurauia roxburghii* International Food Research Journal, v.20, p 2939-2943, 2013.

[056]. ANTONELLI, A. Higher level phyligeny and evolutionary trends in Campanulaceae subfam. Lobelioideae: Molecular signal overshadows morphology. Molecular Phylogenetics and Evolution; v. 46, p 1-18, 2008.

[057]. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. M7-A6, v.23 N°2, 2003.

[058]. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010.

[059]. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA, 2008), Manual

Clinical And Laboratory Standards Institute – CLSI (antigo NCCLS).

<www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi.asp>. Acesso em 08/2012.

[060]. Bacchi EM., Dias LFT., Melo ES., Hernandez LS. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(1B): 309-314, 2009

[061]. BAKER, J. G. 1873. *Compositae I Vernoniaceae*. In: Martius, C. F. P. von & Eichler, A. W. (eds.). *Flora brasiliensis* 6(2): 1-179.

[062]. _____. 1876. *Compositae II Eupatoriaceae*. In: Martius, C. F. P. von & Eichler, A. W. (eds.). *Flora brasiliensis* 6(2): 181-374.

[063]. _____. 1882. *Compositae III Asteroideae, Inuloideae*. In: Martius, C. F. P. von & Eichler, A. W. (eds.). *Flora brasiliensis* 6(3): 1-134.

[064]. _____. 1884. *Compositae IV Helianthoideae, Mutisiaceae*. In: Martius, C. F. P. von & Eichler, A. W. (eds.). *Flora brasiliensis* 6(3): 138-398.

[065]. BARROSO GM 1976. *Compositae - Subtribo Baccharidinae Hoffmann - Estudo das espécies ocorrentes no Brasil*. *Rodriguésia* 28: 1-273.

[066]. BORIO, E. B. L. *Lobelia langeana* Dusén. Contribuição para o estudo farmacognóstico. Tese para concurso à docência livre da cadeira de farmacognosia, da Faculdade de Farmácia da Universidade do Paraná, Brasil. 86p, 1959

[067]. BRAGA, R.E. Lobelias do Brasil. Contribuição para o seu estudo. **Tribuna Farmacêutica**; v 22, 1956.

[068]. BREMER, K. **Asteraceae: cladistics and classification**. Timber Press, Portland, 1994.

[069]. BUDEL J.M., M.R. DUARTE, C.A.M. SANTOS, P.V. FARAGO & N.I. MATZENBACHER (2005) Braz J Pharmacogn. 15: 268-71.

[070]. CESPEDES C.L., A. UCHOA, J.R. SALAZAR, F. PERICH & F. PARDO (2002) J. Agric. Food Chem. 50: 2283-92.

[071]. CIFUENTE DA, SIMIRGIOTIS MJ, FAVIER S, ROTELLI AE, PELZER LE 2001. Anti-inflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sophiifolia* in mice. *Phytother Res* 15: 529-531.

[072]. CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press. p.1262, 1981.

[073]. CRONQUIST, A. 1988. The Evolution and Classification of Flowering Plants. Second Edition. Bronx, NY: The New York Botanical Garden.

[074]. CURIONI, A.; ARIZIO, O. **Plantas aromáticas y medicinales**: labiadas. Buenos Aires: Hemisferio Sur, p. 194, 2006.

[075]. DESWAL, D.P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* T.) seeds. *Seed Science and Technology*, v.25, n.1, p.409-17, 1997.

[076]. DIESEL, S. 1987. Contribuição ao estudo taxonômico do gênero *Baccharis* L. (grupo Trimeris) no Rio Grande do Sul. *Pesquisas, Botânica* 38: 91-126.

[077]. DWOSKIN, L. P.; PETER CROOKS. A novel mechanism of action and potential use for lobeline as a treatment for psychostimulant abuse. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 89-98.

[078]. EYERMAN, D. J.; YAMAMOTO, B. K. Lobeline Attenuates Methamphetamine-Induced Changes in Vesicular Monoamine Transporter 2 Immunoreactivity and Monoamine Depletions in the Striatum. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 312, p.160-169, 2005.

[079]. FELPIN, F. X.; LEBETRON, J. History, chemistry and biology of alkaloids from *Lobelia inflata*. **Tetrahedron**; v. 60, p. 10127-10153, 2004.

[080]. FULLAS, F.; HUSSAIN, R. A.; CHAI, H-B.; PEZZUTO, J. M.; 1994. *J. Nat. Prod.* 57, 801.

[081]. GOULART, M. O. F. *et al.* Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e hidrogênio dos triterpenos jatrofolonas A e B. **Química Nova**, v 16, 1993.

[082]. FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; BEDNARSKI, F.; ALENCAR, S. M.; ONOFRE, S. B. Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *baccharis dracunculifolia* D.C. e *baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama*, v. 10, n. 2, p. 67-70, 2006.

[083]. FERRONATTO R, MARCHESAN ED, PEZENTI E, BEDNARSKI F, ONOFRE SB 2007. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Ver Bras Farmacogn* 17: 224-230

[084]. FOLQUITTO, D.G.; BUDEL, J. M.; PEREIRA, C. B; BROJAN, L. E. F.; FOLQUITTO, G. G.; MIGUEL, M. D.; SILVA, R. Z.; MIGUEL, O. G. Analytical Micrography and Preliminary Phytochemistry of the Leaves and Stems of *Lobelia exaltata* Pohl. (Campanulaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v 33, p. 245-50, 2014.

[085]. GABRE, D. F. Manual do teste de tetrazólio. Brasília: AGIPLAN, 1976. 85p.

[086]. GIULIANO D.A (2001) *Darwiniana*. 39: 131-54.

[087]. GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. **Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (Antibiotics monographs, 2)**. New York: Medical Encyclopedia Inc., 1955.

[088]. HARROD, S. B.; DWOSKIN, L. P.; BARDO, M. T. Lobeline produces conditioned taste avoidance in rats. Pharmacology Biochem Behav; v. 78, p 1-5, 2004.

[089]. HEIDEN G., J.R.V. IGANCI & L. MACIAS (2009) *Rodriguésia*. **60**: 943-83.

[090]. HEYWOOD, V.H. 1996. Flowering plants of the world, B.T. Batsford, London.

[091]. JOLY, A. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 12 ed. São Paulo: Nacional, 1998. 777 p.

[092]. HOLMES, W. C. 1996. A proposed sectional classification for *Mikania* (Eupatorieae). In: Hind, D. J. N. & Beentje, H. J. (eds.). *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference*, Kew, 1994. Vol. 1, Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 621-626.

[093]. JONES, S.B. 1977. Vernonieae – systematic review. In *The biology and chemistry of the 55 Compositae*, v. 1 (V.H. Heywood, J.B. Harborne & B.L. Turner, eds.). Academic Press, London, p.503-521.

[094]. JOSHI, S. *et al.* Essential oil composition and antimicrobial activity of *Lobelia pyramidalis* Wall. **EXCLI Journal**, v. 10, p. 274-279, 2011.

[095]. KUPCHAN, S. M.; JARVIS, B. B.; DAILEY, R. G.; BRIGHT, W.; BRYAN, R. F.; SHIZURI, Y. 1976. *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 7092.

[096]. KUPCHAN, S. M.; STREELMAN, D. R.; JARVIS, B. B.; DAILEY, R. G.; SNEDEN, A. T.; 1977. *J. Org. Chem.*, 42, 4221.

[097]. LABBE, C.; CASTILLO, M.; HERNANDEZ, M. 1991. *Phytochemistry* 30, 1607.

[098]. LAMMERS T.G. **Campanulaceae Flowering Eudicot plants The families and Genera of Vascular Plants**, v. 8, p. 26-56, 2007.

[099]. LAMMERS T. G.. Revision of the Infrageneric Classification of LOBELIA L. (CAMPANULACEAE: LOBELIOIDEAE). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 98, p. 37-62, 2011.

[100]. MA, Y.; WINK, M. Lobeline, a piperidine alkaloid from *Lobelia* can reverse P-gp dependent multidrug resistance in tumor cells. **Phytomedicine**, v. 15, p. 754-758, 2008.

[101]. MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; VIEIRA, A. B. R.; MENDONÇA, L. C. V.; SILVA, R. M. F.; ROLIM, N. P. J. BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Rev. Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 32, n.1, p.121-125, 2011.

[102]. MONKS N.R.; A. FERRAZ, S. BORDIGNON, K.R. MACHADO, M.F.S. LIMA, A.B. ROCHA & G. SCHWARTSMANN (2002) Pharm. Biol. 40: 494-500.

[103]. MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65: 55-63, 1983.

[104]. MURARI, A. L; CARVALHO F. H.; HEINZMANN B. M.; MICHELOT T. M.; HÖRNER R.; MALLMANN C. A. Composição e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus*. **Quím. Nova**, v.31, n.5. São Paulo. 2008.

[105]. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Methods for dilution in antimicrobial susceptibility tests*. Approved standard M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Villanova, PA, 1993.

[106]. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi*. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, p.28, 1998.

[107]. PENNA, M. *Calendula officinalis*. In:____ **Notas sobre plantas brasileiras** . Rio de Janeiro: Araújo Penna Filhos, 1921, p. 67-9.

[108]. PEREIRA, M. A. L. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por**

extração supercrítica supercrítica. Dissertação (Mestre em engenharia e tecnologia de materiais). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2010.

[109]. POZZATTI, P.; LORETO, E.S.; LOPES, P.G.M.; ATHAYDE, M.L.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. *Mycoses*. 2009;53(1):12-5.

[110]. PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a fosphomolybdenum complex: specific aplication to the determination of vitamin E. **Anal Biochem** 269: 337-341. 1999.

[111]. RIBEIRO, D. I.; ALVES, M. S.; FARIA, M. G. I.; SVIDZINSKI, T. I. E.; NASCIMENTO, I. A.; FERREIRA, F. B. P.; FERREIRA, G. A.; GAZIM, Z. C. Determinação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) e de *Achillea millefolium* (Asteraceae) cultivadas no Noroeste do Paraná. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 14, n. 2, p. 103-109, 2010.

[112]. ROSA, E. A. R. Contribuição ao estudo químico das espécies vegetais *Palicourea rigida* e *Palicourea coriacea* e avaliação das atividades antioxidante, antiinflamatória e moluscicida de *Palicourea rigida*. Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, 2009

[113]. SANCHEZ PALOMINO S., M.J. ABAD & L.M. BEDOYA (2002) Biol. Pharm. Bull. 25: 1147-50.

[114]. SCHNEIDER, A.A. (2009). "*Estudo taxonômico de Baccharis L. sect. Caulopterae DC. (Asteraceae: Astereae) no Brasil*", Instituto de Biociências, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 198.

[115]. SEN, *et al.* Analysis of IR, NMR and Antimicrobial Activity of β -Sitosterol Isolated from *Momordica charantia*. **Science Secure Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 9-13, 2012.

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

[117]. SOLEREDER, H. **Systematic anatomy of the dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied botany.** V.2, Oxford: Claredon Press, p.1182. 1908.

[118]. SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2005. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Plantarum, Nova Odessa.

[119]. TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V. **Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha: Guia de campo.** Curitiba: Serzegraf, 419 p., 2001.

[120]. TAMBOLI, A. M. *et al.* Antiepileptic activity of lobeline isolated from the leaf of *Lobelia nicotianaefolia* and its effect on brain

GABA level in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 537-542, 2012.

[121]. THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K. CISNEROS-ZEVALLOS L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **J. Food Comps. Anal** 19: 669-675, 2006.

[122]. TRINTA, E. F.; SANTOS, E. **Flora Ilustrada Catarinense – Campanulaceae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 80p, 1989.

[123]. USP (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA). 25th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2002.

[124]. VALGAS, C. *et al.* Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, 369-380, 2007.

[125]. VIEIRA O. S. Estudos taxonômicos das espécies de *Lobelia* L. (Campanulaceae Juss.) que ocorrem no Brasil. Campinas, 1998. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Unicamp.

[126]. VIEIRA, O. S. Campanulaceae: *Lobelia* L.. In: Rafaela Campostrini Forzza *et al.* (Org.). Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil. 1 ed, Rio de Janeiro: Andrea Jakobsoon Estúdio: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010, v. 1, p. 833-835.

[127]. VIEIRA, A. O. S., GODOY, S. A. P. de 2012. *Campanulaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico

do Rio de Janeiro. Disponível em
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000073>>. Acesso em agosto de
2012.

[128]. ZHENG, G. Z.; HORTON, D. B.; PENTHALA, N. R.; NICKELL, J. R.; CULVER, J. P.; DEACIUC, A.; DWOSKIN, L. P.; CROOKS, P. A. Exploring the effect of *N*-substitution in nor-lobelane on the interaction with VMAT2: discovery of a potential clinical candidate for treatment of methamphetamine abuse. **Medchemcomm**, v 4, p. 564-568, 2014.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção dos componentes e produtos originários da espécie *Baccharis milleflora* (Less.) DC, Asteraceae, , **caracterizado pela** obtenção do extrato bruto etanólico em aparelho de Soxhlet utilizando etanol 96° GL, por meio das seguintes etapas:

- a) Moagem das partes aéreas de *Baccharis milleflora* (Less.) DC;
- b) Depósito do material moído em aparelho de Soxhlet e submissão à extração em ciclo fechado até esgotamento total;
- c) Filtragem do extrato obtido com algodão;
- d) Submissão à concentração em Soxhlet à temperatura de 50° até a redução em 1/5 de seu volume inicial.

2. Processo de obtenção dos componentes e produtos originários da espécie *Baccharis milleflora* (Less.) DC, Asteraceae, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** processo de hidrodestilação para obtenção do óleo essencial em aparelho de Clevenger, com duração de 6 horas, a partir das folhas dessecadas e estocado em tubos Eppendorf, em temperatura de $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

3. Processo de obtenção dos componentes e produtos originários das partes aéreas da espécie *Baccharis milleflora* (Less.) DC, Asteraceae, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** processo de obtenção das frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente do extrato bruto, caracterizado por partição líquido/líquido em aparelho de Soxhlet, iniciando com hexano, diclorometano, seguido por acetato de etila.

4. USO dos componentes e produtos originários da espécie vegetal *Baccharis milleflora* (Less.) DC, Asteraceae, de acordo com as

reivindicações 1, 2 e 3, **caracterizado pelo** uso das partes aéreas para fins de isolamento de substâncias, que podem ser empregadas na produção de medicamentos como comprimidos, ampolas, drágeas, cápsulas, xaropes, soluções, suspensões, pomadas, cremes, emulsões, aerossol, pós, tabletes, preparações hipocráticas, galênicas e magistrais.

DESENHOS

Figura 1

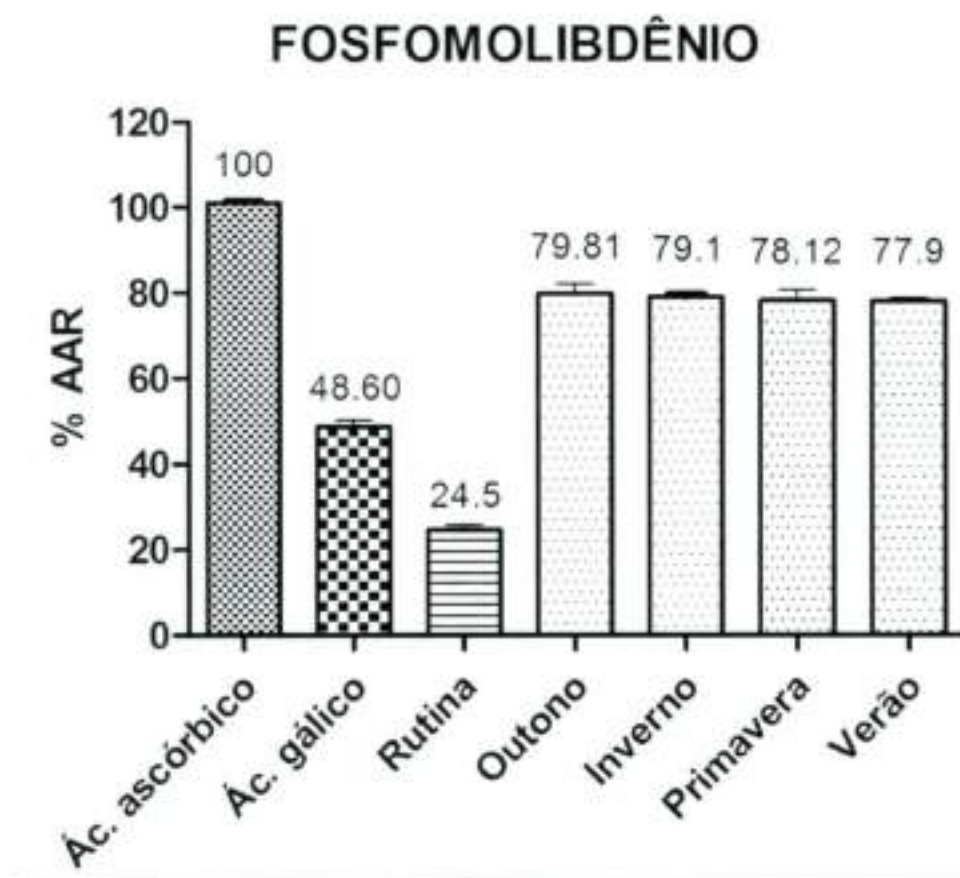


Figura 2

