

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Maria Beatriz De Oliveira Rabelo

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *Baccharis***

Belo Horizonte

2020

Maria Beatriz De Oliveira Rabelo

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE
ESPÉCIES DO GÊNERO *Baccharis***

Versão Final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua, UFMG.

Coorientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga, UFMG.

Coorientadora: Prof. Dra. Izabella Thaís da Silva, UFSC.

Belo Horizonte

2020

R114e Rabelo, Maria Beatriz de Oliveira.
Estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica de espécies do gênero *Baccharis* / Maria Beatriz de Oliveira Rabelo. – 2020.
142 f. : il.

Orientador: Rodrigo Maia de Pádua.
Coorientadores: Fernão Castro Braga e Izabella Thaís da Silva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Câncer – Teses. 2. *Baccharis* – Teses. 3. Atividade citotóxica – Teses. 4. Agentes antineoplásicos – Teses. 5. Linhagem celular tumoral – Teses. 6. Plantas medicinais – Teses. 7. Matéria médica vegetal – Teses. I. Pádua, Rodrigo Maia de. II. Braga, Fernão Castro. III. Silva, Izabella Thaís da. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 616.994

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759



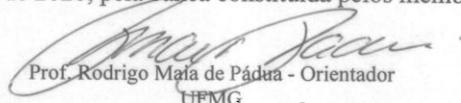
FOLHA DE APROVAÇÃO

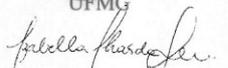
ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Baccharis*

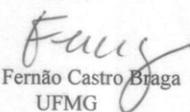
MARIA BEATRIZ DE OLIVEIRA RABELO

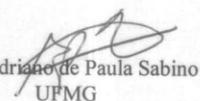
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

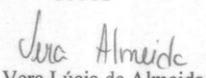
Aprovada em 06 de março de 2020, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Rodrigo Maia de Pádua - Orientador
UFMG


Prof. Izabella Thais da Silva
UFSC


Prof. Fernão Castro Braga
UFMG


Prof. Adriano de Paula Sabino
UFMG


Dra. Vera Lúcia de Almeida
FUNED

Belo Horizonte, 6 de março de 2020.

AGRADECIMENTOS

Aos Laboratórios de Farmacognosia e Fitoquímica da Faculdade de Farmácia.

À equipe do Prof. Dr. Geraldo Wilson Fernandes pela parceria no projeto “Serviços ecossistêmicos providos por espécies nativas da Mata Atlântica”.

Ao grupo “Serviços de Fitoquímica e Prospecção Farmacêutica” da FUNED.

Às agências de fomento Capes e CNPq.

“Todo caminho da gente é resvaloso. Mas, também, cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta... O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.”

Guimarães Rosa

RESUMO

Com o crescente número de casos de câncer nas últimas décadas, essa doença se tornou um alarmante problema mundial. Os tratamentos farmacológicos disponíveis carecem de especificidade e induzem graves efeitos adversos, demandando a pesquisas por novas opções terapêuticas. Uma fonte promissora de compostos com atividade anticâncer são as plantas, com uso medicinal ou não, que cada vez mais contribuem para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos. Neste contexto, foi realizada uma triagem citotóxica de 14 extratos etanólicos de espécies do gênero *Baccharis* frente a linhagens tumorais humanas, uma vez que algumas substâncias já isoladas, como ácidos fenólicos, flavonoides e terpenos, mostraram o potencial farmacológico de espécies desse gênero. Os extratos de *B. imbricata* e *B. megapotamica* apresentaram promissora atividade citotóxica e foram selecionados para o fracionamento biomonitorado. A avaliação preliminar da composição química dos extratos e frações dessas duas espécies foi realizada por UPLC-ESI-MS/MS e permitiu a caracterização do perfil fitoquímico dessas plantas, compostas principalmente por derivados do ácido clorogênico e por flavonoides. A avaliação da atividade citotóxica das frações foi realizada em linhagens de câncer de pulmão (A549), carcinoma de próstata (DU145) e carcinoma hepatocelular (HepG2) e em cultura de células saudáveis (fibroblastos gengivais humanos). A fração diclorometânica de *B. imbricata* foi selecionada para dar prosseguimento aos estudos e foi novamente fracionada em DCM 1 e DCM 2. O refracionamento de DCM 2 por HPLC-FR em escala preparativa permitiu o isolamento e a elucidação estrutural inequívoca do betuletol, um flavonol dimetoxilado, que já foi descrito na literatura. Essa substância já foi identificada em brotos de *B. dracunculifolia*, porém ainda não havia sido descrita em *B. imbricata*.

Palavras-chaves: *Baccharis*. Câncer. Avaliação citotóxica. Linhagens tumorais.

ABSTRACT

With the growing number of cancer cases in recent decades, this disease has become an alarming worldwide problem. The pharmacological treatments available lack specificity and induce serious adverse effects, demanding research for new therapeutic options. A promising source of compounds with anti-cancer activity are plants, whether medicinal or not, which increasingly contribute to the development of antineoplastic drugs. In this context, a cytotoxic screening with 14 ethanol extracts of species of the genus *Baccharis* was performed against human tumor cells, since some substances already isolated, such as phenolic acids, flavonoids and terpenes, showed the pharmacological potential of species of this genus. The extracts of *B. imbricata* and *B. megapotamica* showed promising cytotoxic activity and were selected for biomonitoring fractionation. The preliminary evaluation of the chemical composition of the extracts and fractions of these two species was carried out by UPLC-ESI-MS/MS and allowed the characterization of the phytochemical profile of these plants, composed mainly of derivatives of chlorogenic acid and flavonoids. The evaluation of the cytotoxic activity of the fractions was performed in lung cancer cells (A549), prostate carcinoma cells (DU145) and hepatocellular carcinoma cells (HepG2) and in healthy cell culture (human gingival fibroblasts). The dichloromethane fraction of *B. imbricata* was selected to continue the studies and was again divided into DCM 1 and DCM 2. Refraction of DCM 2 by HPLC-RF on a preparative scale allowed the isolation and elucidation unambiguous of betuletol, a dimethoxylated flavonol, which has already been described in the literature. This substance has already been identified in shoots of *B. dracunculifolia*, but it has not yet been described in *B. imbricata*.

Keywords: *Baccharis*. Cancer. Cytotoxic evaluation. Tumor cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas de compostos derivados de produtos naturais, comercializados como medicamentos antineoplásicos	32
Figura 2: Fluxograma do fracionamento dos extratos etanólicos por partição sequencial entre solventes imiscíveis	48
Figura 3: Fluxograma do refracionamento de Fr. Dcm, derivada do extrato de <i>B. imbricata</i>	50
Figura 4: Comparação dos perfis cromatográficos, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos etanólicos de folhas e caules das espécies de <i>B. brevifolia</i> (A) e <i>B. calvescens</i> (B). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).	57
Figura 5: Comparação dos perfis cromatográficos, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de partes aéreas de duas amostras de <i>B. opuntioides</i> . (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	58
Figura 6: Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para o extrato etanólico e respectivas frações de <i>B. imbricata</i>	63
Figura 7: Espectro no UV (A) referente ao pico 2i ($T_r = 3,01$ min), espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 517 $[M+H]^+$ e m/z 515 $[M-H]^-$ (B) e as estruturas putativas dos fragmentos relacionados (extrato etanólico de <i>B. imbricata</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	67
Figura 8: Espectro no UV (A) referente ao pico 3i ($T_r = 3,43$ min), espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 531 $[M+H]^+$ e m/z 529 $[M-H]^-$ (B) e as estruturas putativas dos fragmentos relacionados (extrato etanólico de <i>B. imbricata</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	68
Figura 9: Espectro no UV (A) referente ao pico 3i ($T_r = 3,43$ min), espectro de massas (MS/MS) do íon m/z 543 $[M-H]^-$ (B) e as estruturas putativas dos fragmentos relacionados (extrato etanólico de <i>B. imbricata</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	69
Figura 10: Espectro no UV (A) referente ao pico 5i ($T_r = 4,48$ min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 331 $[M+H]^+$ e m/z 329 $[M-H]^-$ (B) (extrato etanólico de <i>B. imbricata</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	71
Figura 11: Espectro no UV (A) referente ao pico 6i ($T_r = 4,57$ min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 317 $[M+H]^+$ e m/z 315 $[M-H]^-$ (B) (extrato etanólico de <i>B. imbricata</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	72

Figura 12: Espectro no UV (A) referente ao pico 7i (Tr = 5,25 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 287 [M+H] ⁺ e m/z 285 [M-H] ⁻ (B) (extrato etanólico de <i>B. imbricata</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	74
Figura 13: Espectro no UV (A) referente ao pico 8i (Tr = 5,60 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 301 [M+H] ⁺ e m/z 299 [M-H] ⁻ (B) (extrato etanólico de <i>B. imbricata</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	75
Figura 14: Espectro no UV (A) referente ao pico 9i (Tr = 5,76 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 331 [M+H] ⁺ e m/z 329 [M-H] ⁻ (B) (extrato etanólico de <i>B. imbricata</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	76
Figura 15: Espectro no UV (A) referente ao pico 9i (Tr = 5,76 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 315 [M+H] ⁺ e m/z 313 [M-H] ⁻ (B) (extrato etanólico de <i>B. imbricata</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	77
Figura 16: Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para o extrato etanólico e respectivas frações de <i>B. megapotamica</i>	78
Figura 17: Espectro no UV (A) referente ao pico 1m (Tr = 1,95 min), espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 355 [M+H] ⁺ e m/z 353 [M-H] ⁻ (B) e as estruturas putativas dos fragmentos relacionados (extrato etanólico de <i>B. megapotamica</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	82
Figura 18: Espectro no UV (A) referente ao pico 3m (Tr = 3,01 min), espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 517 [M+H] ⁺ e m/z 515 [M-H] ⁻ (B) e as estruturas putativas dos fragmentos relacionados (extrato etanólico de <i>B. megapotamica</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).....	83
Figura 19: Espectro no UV (A) referente ao pico 2m (Tr = 2,79 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 611 [M+H] ⁺ e m/z 609 [M-H] ⁻ (B) (extrato etanólico de <i>B. megapotamica</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)	84
Figura 20: Espectro no UV (A) referente ao pico 4m (Tr = 3,92 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 303 [M+H] ⁺ e m/z 301 [M-H] ⁻ (B) (Fr. Dcm de <i>B. megapotamica</i>). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental- item 4.8) ...	85
Figura 21: Exemplos de tricotecenos macrocíclicos sem insaturação em C2'-C3' (A) e com a insaturação em C2'-C3' (B)	86
Figura 22: Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para o extrato etanólico e frações de <i>B. imbricata</i> . Condições cromatográficas: eluente tolueno/acetona (8:2); revelador: anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento	97

Figura 23: Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para as frações DCM 2 e DCM 1 e espectros no UV dos principais picos correspondentes.	99
Figura 24: Esquema de fracionamento do extrato etanólico de <i>B. imbricata</i>	100
Figura 25: Perfil cromatográfico obtido por HPLC-RF em escala preparativa para o fracionamento de DCM 2. (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.10)	102
Figura 26: Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD para fração F7 e espectro de UV correspondente ao pico majoritário (Tr = 5,81 min). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)	103
Figura 27: Espectros de massas obtidos por UPLC-ESI-MS para a fração F7, isolada da fração DCM 2. (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)	104
Figura 28: Esquemas de possíveis estruturas para o derivado da fração F7	104
Figura 29: Espectro de RMN de ¹ H de F7 em DMSO-d6 (400 MHz)	105
Figura 30: Esquemas de possíveis estruturas para o derivado da fração F7	106
Figura 31: Mapa de contornos HSQC obtido para F7 em DMSO-d6 (400 MHz para ¹ H)	106
Figura 32: Mapa de contornos HMBC (14Hz) obtido para F7 em DMSO-d6 (400 MHz para ¹ H)	107
Figura 33: Esquemas de possíveis estruturas para o derivado da fração F7	108
Figura 34: Mapa de contornos HMBC (14Hz) obtido para F7 em DMSO-d6 (400 MHz para ¹ H)	109
Figura 35: Esquemas de possíveis estruturas para o derivado da fração F7	109
Figura 36: Mapa de contornos HMBC (3 Hz) obtido para F7 em DMSO-d6 (400 MHz para ¹ H)	110
Figura 37: Seção expandida da região da hidroxila quelatogênica (5-OH) do mapa de contornos HMBC (3 Hz) obtido para F7 em DMSO-d6 (400 MHz para ¹ H)	111
Figura 38: Mapa de contornos HMBC (14Hz) obtido para F7 em DMSO-d6 (400 MHz para ¹ H)	112
Figura 39: Correlações ¹ H - ¹³ C observadas no mapa de contornos HMBC (via J ² , J ³ e J ⁴) obtido para F7	114
Figura 40: Mapa de contornos NOESY de F7 em DMSO-d6 (400 MHz)	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de <i>Baccharis</i> coletadas e os respectivos números das exsicatas	45
Tabela 2: Rendimento extrativo da maceração do material vegetal coletado	46
Tabela 3: Rendimento extrativo da percolação das espécies de <i>Baccharis</i> selecionadas	47
Tabela 4: Rendimento das frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis ..	49
Tabela 5: Rendimento das frações obtidas do extrato de <i>B. imbricata</i>	49
Tabela 6: Rendimento das frações DCM 1 e DCM 2, obtidas do refractionamento de Fr. Dcm.....	50
Tabela 7: Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-ESI-MS/MS	51
Tabela 8: Condições definidas para a análise de extratos e frações dos materiais vegetais.....	52
Tabela 9: Gradiente de eluição empregado na análise de HPLC-RF em escala preparativa	53
Tabela 10: Resultados da avaliação citotóxica dos extratos de espécies de <i>Baccharis</i> , obtidos por maceração, em células A549	59
Tabela 11: Análise por UPLC-ESI-MS/MS do extrato etanólico e frações de <i>B. imbricata</i> . (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)	64
Tabela 12: Análise por UPLC-ESI-MS/MS do extrato etanólico e frações de <i>B. megapotamica</i> . (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8) ...	79
Tabela 13: Resultados da avaliação citotóxica dos extratos obtidos por percolação e das frações das espécies selecionadas, em células A549, DU145 e HepG2	87
Tabela 14: Resultados da avaliação da citotoxicidade das frações selecionadas em culturas de fibroblasto gengival humano	94
Tabela 15: Resultados da avaliação citotóxica das frações DCM 1 e DCM 2, em células A549.....	96
Tabela 16: Dados de RMN de ¹ H de F7 (DMSO-d ₆ ; 400 MHz), atribuições dos sinais de ¹³ C e comparação com dados da literatura	113
Tabela 17: Correlações heteronucleares ¹ H- ¹³ C observadas nos mapas de contornos HMBC para F7 (DMSO-d ₆ ; 400 MHz).....	114

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ATCC®	American Type Culture Collection
CC ₅₀	Concentração Citotóxica a 50%
CCD	Cromatografia em camada delgada
CI ₅₀	Concentração Inibitória a 50%
cm	Centímetro
CPCNP	Carcinoma pulmonar de células não pequenas
CPCP	Carcinoma pulmonar de células pequenas
d	Dupleto
DAD	Diode Array Detector
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium – Gibco
DMSO- <i>d</i> ₆	Hexadeutero dimetilsulfóxido
DSMZ®	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
ED ₅₀	Dose efetiva a 50%
ESI	Electrospray Ionization
Fr.	Fração
g	Gramma
GI ₅₀	Inibição de crescimento de 50%
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C

HMBC	Heteronuclear correlation through Multiple quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPV	Papilomavírus
HSQC	Heteronuclear Single Bond Coherence
Hz	Hertz
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
<i>J</i>	Constantes de acoplamento
<i>m/z</i>	Razão massa carga
MEM	Minimal Essential Medium – Gibco
mg	Miligrama
MIC	Concentração Inibitória Mínima
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
MS	Mass Spectrometry
MTT	Brometo de 3 (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio
NCI-60	60 Human Tumor Cell Lines Screen
NCI-EUA	Nacional Cancer Institute
nm	Nanômetro
NOESY	Nuclear Overhauser Effect
OMS	Organização Mundial da Saúde

ppm	Partes por milhão
PSA	Antígeno específico da próstata
PTX	Paclitaxel
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
s	Simpleto
SFB	Soro Fetal Bovino
SRB	Sulforrodamina B
TGI	Inibição total do crescimento
TMS	Tetrametilsilano
Tr	Tempo de Retenção
u.m.a.	Unidade de Massa Atômica
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultravioleta
λ_{max}	Máximo de absorção no UV-Vis
δ	Deslocamento Químico
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar

LISTA DE FÓRMULAS ESTRUTURAIS

- (1) ácido cafeico
- (2) ácido felúrico
- (3) ácido *p*-cumárico
- (4) bacarina
- (5) artepelina C
- (6) quercetina
- (7) luteolina
- (8) apigenina
- (9) ácido gálico
- (10) ácido clorogênico
- (11) acetato de carquejila
- (12) drupanina
- (13) plicatina B
- (14) nevadensina
- (15) gardenina B
- (16) pectolinaringenina
- (17) penduletina
- (18) apigenina-4,7-dimetil éter
- (19) naringenina-4,7-dimetil éter
- (20) cirsimaritina
- (21) ácido oleanólico
- (22) ácido ursólico
- (23) ácido ent-15 β -senecioil-oxi-kaur-16-en-19-óico
- (24) ácido ent-kaur-16-en-19-óico
- (25) ácido ent-16-oxo-17-nor-cauran-19-óico
- (26) o β -pineno
- (27) pulegona
- (28) α -terpineol
- (29) gaudichaudol C
- (30) gaudichaudona
- (31) acetato de articulina
- (32) baccharina

- (33) baccharinol
- (34) timol
- (35) carvacrol
- (36) *p*-metoxitimol
- (37) *p*-cimeno-2,3-diol
- (38) ácidos sinápico
- (39) ácido dimetoxicinâmico
- (40) ácido 5-*O*-cafeoilquínico
- (41) ácido 4-*O*-cafeoilquínico
- (42) ácido 3-*O*-cafeoilquínico
- (43) ácido 5-*O*-feruloilquínico
- (44) ácido 4-*O*-feruloilquínico
- (45) ácido 3-*O*-feruloilquínico
- (46) ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico
- (47) ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico
- (48) ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico
- (49) ácido 3,4,5-tri-*O*-cafeoilquínico
- (50) nepetina
- (51) eupafolina
- (52) isosakuranetina
- (53) sakuranetina
- (54) di-hidrooroxilina A
- (55) isocanferídeo
- (56) canferol
- (57) rutina
- (58) 5,7-dimetoxiflavona
- (59) 5,7,4'-trimetoxiflavona
- (60) crisina
- (61) 3',4'-dimetoxiflavona
- (62) roridina A
- (63) roridina E
- (64) roridina D
- (65) verrucarina A
- (66) verrucarina J

- (67) betuletol
- (68) jaceosidina
- (69) desmetoxicentaureidina
- (70) cirsiolol
- (71) dimetoxisudachitina

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1 Câncer	24
3.2 Avaliação do potencial anticâncer.....	29
3.3 Quimioterápicos antineoplásicos.....	30
3.4 Gênero Baccharis	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Equipamentos.....	42
4.2 Solventes e reagentes.....	43
4.3 Vidrarias e materiais diversos	43
4.4 Reveladores para Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	44
4.5 Material Vegetal.....	44
4.6 Preparo dos extratos vegetais.....	46
4.7 Fracionamento dos extratos obtidos por percolação	47
4.8 Análise por UPLC-ESI-MS/MS.....	51
4.9 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	52
4.10 Refracionamento da fração DCM 2 em escala preparativa.....	52
4.11 Elucidação estrutural das substâncias isoladas	53
4.12 Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos de folhas e caules	56
5.2 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos obtidos por maceração	58
5.3 Análise dos extratos selecionados e respectivas frações por UPLC-ESI-MS/MS	61
5.4 Avaliação da atividade citotóxica das frações de <i>B. imbricata</i> e <i>B. megapotamica</i>	86
5.5 Avaliação da atividade citotóxica das frações selecionadas em cultura de células saudáveis	93

5.6 Avaliação da atividade citotóxica das frações DCM 1 e DCM 2.....	95
5.7 Análise das frações DCM 1 e DCM 2 por CCD e por UPLC-ESI-MS/MS.....	96
5.8 Refracionamento de DCM 2 por HPLC-RF em escala preparativa.....	100
5.9 Elucidação estrutural do sólido obtido na fração F7.....	103
6 CONCLUSÕES.....	118
7 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	119
REFERÊNCIAS.....	120
APÊNDICE A: Cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de partes aéreas de <i>Baccharis myriocephala</i> (Serra da Calçada), <i>Baccharis altimontana</i> (Parque Nacional do Caparaó) e <i>Baccharis hemiptera</i> (Parque Nacional do Caparaó).....	134
APÊNDICE B: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de <i>Baccharis reticularia</i> (Serra da Calçada).....	135
APÊNDICE C: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de <i>Baccharis retusa</i> e <i>Baccharis calvescens</i> (Serra da Calçada.....	136
APÊNDICE D: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de <i>Baccharis imbricata</i> e <i>Baccharis magnifica</i> (Parque Nacional do Caparaó).....	137
APÊNDICE E: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de <i>Baccharis megapotamica</i> e <i>Baccharis parvidentata</i> (Parque Nacional do Caparaó).....	138
APÊNDICE F: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de <i>Baccharis parvidentata</i> (Parque Nacional do Caparaó).....	139
APÊNDICE G: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de <i>Baccharis platypoda</i> (Parque Nacional do Caparaó).....	140
APÊNDICE H: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas de diferentes amostras de <i>Baccharis reticularia</i> (Serra da Calçada) e <i>Baccharis calvescens</i> (Parque Nacional do Caparaó).....	141
APÊNDICE I: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas de diferentes amostras de <i>Baccharis parvidentata</i> (Parque Nacional do Caparaó).....	142
APÊNDICE J: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas de diferentes amostras de <i>Baccharis platypoda</i> (Parque Nacional do Caparaó).....	143

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema mundial, sendo responsável por quase 13% dos óbitos globais. Esse percentual é equivalente aos sete milhões de mortes anuais provocadas, em conjunto, pela infecção por HIV/AIDS, tuberculose e malária (LÓPEZ-GÓMEZ *et al.*, 2013). Segundo a *American Cancer Society* (ACS, 2018), uma proporção substancial de cânceres poderia ser evitada, incluindo os causados pelo uso de tabaco, excesso de peso corporal, inatividade física e consumo excessivo de álcool, através de mudanças comportamentais. Já os cânceres causados por agentes infecciosos, tais como papilomavírus (HPV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV) e *Helicobacter pylori* poderiam ser evitados pela vacinação ou tratamento da infecção.

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são considerados medidas importantes para reduzir as taxas de mortalidade em pacientes com câncer. Embora muitos agentes antineoplásicos estejam atualmente disponíveis para o tratamento, os efeitos colaterais causados por esses fármacos representam uma limitação na terapia (HEIDARI-SORESHJANI *et al.*, 2017). Assim, torna-se essencial encontrar novos métodos para o controle do câncer, o que justifica o crescimento da pesquisa por novos fármacos mais seletivos e eficazes, como, por exemplo, os agentes antineoplásicos de origem natural (ALEEBRAHIM-DEHKORDY *et al.*, 2017). Vários antineoplásicos utilizados na atualidade são obtidos de plantas, que tem a capacidade de sintetizar micromoléculas de alta complexidade e com vários centros quirais, obtidos graças a uma complexa rede de sistemas enzimáticos envolvidos na biossíntese desses metabólitos especiais. Normalmente, a síntese dessas substâncias por processos químicos clássicos não é viável economicamente. Dessa forma, os fitofármacos, tem adquirido papel imperativo no tratamento do câncer (OCHWANG'I *et al.*, 2014). A título de exemplo, pode-se destacar os alcaloides da vinca, tais como a vimblastina e a vincristina, isolados de *Catharanthus roseus* L. (Apocynaceae), e usados no tratamento de leucemias, linfomas, câncer de testículos, de mama, de pulmão e sarcoma de Kaposi; bem como o paclitaxel, um diterpeno obtido de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), utilizado na terapia do câncer de ovário, mama e pulmão (GREENWELL; RAHMAN, 2015). Dessa forma, produtos naturais de plantas com ação citotóxica apresentam um real potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais e diversos deles encontram-se em uso clínico.

O gênero *Baccharis* apresenta ampla distribuição geográfica, grande variedade de espécies e possui vasta utilização na medicina popular, tanto no Brasil como em outros países da América do Sul. Além de seu grande potencial para produção de metabólitos especiais e da descrição de diversos usos populares, estão citados na literatura inúmeros estudos de atividades biológicas, que destacam os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos e anti-inflamatórios de espécies desse gênero (VERDI *et al.*, 2005). Com isso, as espécies do gênero *Baccharis* podem representar novas fontes de substâncias citotóxicas, com potencial para o desenvolvimento de fármacos antitumorais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade citotóxica de espécies do gênero *Baccharis* e realizar o estudo fitoquímico da planta selecionada.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Obter extratos brutos de folhas e caules de plantas do gênero *Baccharis* coletadas;

2.2.2 Realizar a triagem citotóxica *in vitro* dos extratos frente a linhagem tumoral A549, por meio do ensaio colorimétrico da sulforrodamina B (SRB);

2.2.3 Realizar a desreplicação dos extratos selecionados e respectivas frações utilizando UPLC-DAD-ESI-MS/MS;

2.2.4 Avaliar os efeitos citotóxicos dos extratos selecionados e das respectivas frações frente as linhagens tumorais A549, DU145 e HepG2;

2.2.5 Avaliar os efeitos citotóxicos das frações mais ativas em uma linhagem de células saudáveis (fibroblasto gengival humano) e selecionar a fração mais seletiva para o isolamento dos compostos;

2.2.6 Isolar e elucidar a estrutura química dos constituintes da fração selecionada, utilizando as ferramentas espectroscópicas usuais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Câncer

O termo câncer é utilizado para designar uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Outros termos comuns usados são tumores malignos e neoplasias. Existem quase 200 tipos de câncer que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos (DE ALMEIDA *et al.*, 2005). Nesse processo, as células apresentam aparência e morfologia alteradas, sendo tais características usadas como indicativo do estágio da doença (AGUS *et al.*, 2013).

As neoplasias podem surgir a partir de alterações nos protooncogenes, que são inativos em células normais. Assim que ativados, esses genes se transformam em oncogenes, esses sim responsáveis pela malignização, ou seja, pela transformação das células normais em células tumorais (CROCE, 2008).

Múltiplas alterações genéticas são necessárias para o desenvolvimento de tumores e a origem dessas anormalidades não são, geralmente, bem definidas. Sabe-se que influências ambientais, fatores epigenéticos, mutações aleatórias e complicações sistêmicas, como inflamações e disfunções metabólicas, podem iniciar as denominadas mutações somáticas “adquiridas”. Em contrapartida, os tumores decorrentes de mutações genéticas herdadas correspondem a apenas 10% dos casos (REAGAN, 2019). Embora o câncer possa ocorrer em pessoas de todas as idades, é mais frequente entre indivíduos com idade mais avançada. À título ilustrativo, pode-se citar as alterações no sistema imunológico relacionadas à idade, o acúmulo de mutações genéticas aleatórias, a exposição mais prolongada a agentes cancerígenos, e as alterações hormonais ocorridas durante a vida (HEJMADI, 2010).

A carcinogênese, ou seja, a formação do câncer, é um processo complexo que, em geral, ocorre lentamente e se divide em três estágios: iniciação, promoção e progressão. Na primeira etapa, a iniciação, as células tem contato com o agente carcinogênico, que provoca danos ao DNA e modificações em alguns genes. Na promoção, as células alteradas estão em contato constante com o agente cancerígeno para que haja a transformação em célula maligna, o que ocorre de forma lenta e gradual. E, por fim, o estágio de progressão, que é caracterizado pela multiplicação

desordenada das células, sendo um processo irreversível que resulta no aparecimento de sinais clínicos (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Segundo Hanahan e Weinberg (2011) o câncer pode ser caracterizado por seis marcadores, que definem a capacidade do crescimento do tumor e a disseminação metastática, fornecendo uma base sólida para a compreensão da doença. Esses marcadores são: a sustentação da sinalização proliferativa, que determina a capacidade do tumor de sustentar a proliferação crônica; o desvio dos supressores de tumor, que regulam negativamente a proliferação celular, a fim de limitar o crescimento excessivo das células; a invasão e metástase, que começa com a invasão local, seguida de intravasamento das células cancerosas para vasos sanguíneos e linfáticos e posterior crescimento de tumores em outros tecidos e órgãos; a imortalidade replicativa, na qual a célula é capaz de proliferar sem evidência de senescência; a indução da angiogênese, já que os novos vasos são necessários para sustentar os tumores em expansão; e a resistência à morte celular programada, que geralmente incluem estratégias para limitar ou contornar a apoptose.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo com 8,8 milhões de óbitos anuais. Ademais, aproximadamente 14 milhões de novos casos são registrados por ano globalmente e calcula-se que o número de casos deva aumentar em 70% nas próximas décadas. Câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado são os tipos mais comuns de câncer em homens, enquanto câncer de mama, colorretal, pulmão, colo do útero e estômago são os mais comuns entre as mulheres (WHO, 2018).

3.1.1 Câncer de pulmão

Desde 1985, o câncer de pulmão é o mais incidente e o de maior mortalidade em todo mundo. Além disso, cerca de 13% de todos os casos novos de câncer são de pulmão. Em 2018, foram estimados 1,76 milhões de mortes por esse tipo de câncer. No Brasil, a estimativa para o triênio 2020-2022 é de aproximadamente 30 mil novos casos, sendo mais prevalente em homens (WHO, 2018; INCA, 2019a).

O principal fator de risco para esse tipo de câncer é o tabagismo, seguido da exposição à poluição do ar, infecções pulmonares de repetição, doença pulmonar obstrutiva crônica, fatores genéticos (que predisõem a ação carcinogênica de

compostos inorgânicos de asbesto e hidrocarbonetos policíclicos), fatores hormonais (principalmente em mulheres) e histórico familiar (COURAUD *et al.*, 2012; INCA, 2019a).

O câncer de pulmão pode ser classificado em dois subtipos: o carcinoma pulmonar de células pequenas (CPCP) e carcinoma pulmonar de células não pequenas (CPCNP). O primeiro corresponde a 15% dos casos e o CPCNP corresponde a 85%, sendo dividido em três tipos de tumores, o carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma e carcinoma de células grandes (CERSOSIMO, 2002).

O carcinoma de células escamosas está fortemente relacionado ao tabagismo e é caracterizado pelo surgimento de células escamosas nas células epiteliais dos tubos brônquicos, no centro dos pulmões. O adenocarcinoma, o tipo mais comum em fumantes e não fumantes, ocorre na periferia do pulmão, e geralmente origina-se em pequenas células alveolares, que secretam muco e outras substâncias. Comparado aos outros tipos, apresenta melhor prognóstico, já que tende a crescer mais lentamente. Por fim, o carcinoma de células grandes, que começa na parte central dos pulmões e algumas vezes nos linfonodos e na parede torácica, sendo também associado ao uso do tabaco (KENFIELD *et al.*, 2008; ZAPPA; MOUSA, 2016).

Em relação ao tratamento, normalmente é necessária a intervenção cirúrgica, seguida de quimioterapia, ou ainda combinada com a radioterapia. Nos casos mais avançados, utiliza-se também alguns fármacos para o controle dos sintomas, dentre eles paclitaxel, gemcitabina, pemetrexed, irinotecano, cisplatina e carboplatina. (KOH *et al.*, 2012). Entretanto, a baixa sobrevida dos pacientes com câncer de pulmão se deve, na maioria das vezes, ao diagnóstico tardio da doença, geralmente com casos de metástase avançados (WHO, 2014).

3.1.2 Câncer de próstata

No Brasil, o câncer de próstata é o mais prevalente em homens (29,2 %), com exceção ao câncer de pele não melanoma e, é considerado uma doença da terceira idade, já que a maior parte dos casos ocorrem a partir dos 65 anos (INCA, 2019a). Segundo a OMS, em 2018 esse tipo de câncer apresentou aproximadamente 1,28 milhões de casos em todo o mundo (WHO, 2018).

A classificação dos tipos de câncer de próstata segue o Escore de Gleason, que se baseia em uma análise a partir do tecido obtido por cirurgia ou biópsia. Esse sistema determina uma graduação referente ao padrão arquitetural do tumor (onde 1 corresponde ao tumor bem diferenciado e 5 a pouco diferenciado) e a soma dessas graduações leva a uma pontuação, que varia de 2 a 10, sendo '2' correspondente ao tumor menos agressivo e '10' ao mais agressivo (LÖBLER *et al.*, 2012).

Dentre os fatores de risco estabelecidos para o câncer de próstata estão a idade, o histórico familiar e a raça/etnia (GANN, 2002) e existem evidências sobre o impacto da dieta, da obesidade e do hábito de fumar no desenvolvimento da doença (RUNDLE *et al.*, 2013; MURPHY *et al.*, 2013). Em relação ao diagnóstico, as principais ferramentas utilizadas são o exame retal, a concentração sérica de PSA (antígeno específico da próstata) e biópsias guiadas por ultrassom transretal (HEIDENREICH *et al.*, 2008).

O PSA é uma proteína produzida por células epiteliais da próstata, que pode apresentar-se elevada no cenário do câncer, como também em outras doenças, incluindo hiperplasia prostática benigna, infecção e infarto prostático (NIH, 2017). Devido à falta de especificidade desse marcador, o diagnóstico do câncer pode ser aprimorado com modelos que combinam o uso do PSA com outros biomarcadores, tais como PCA3 (*Prostate Cancer Antigen 3*) e formas moleculares do PSA (proPSA, BPSA e iPSA) (FERRO *et al.*, 2016). Há ainda outros marcadores importantes como o gene de fusão TMPRSS2:ERG, a proteína Anexina A3 (ANXA3) e a enzima Calicreína Glandular Prostática (hK2) (SCHMID *et al.*, 2014).

O tratamento do câncer de próstata depende do estágio da doença, da idade e do estado de saúde do paciente, sendo necessária uma avaliação individual de cada caso. De forma geral, a intervenção cirúrgica, a radioterapia e a terapia hormonal são as opções disponíveis, adotadas isoladamente ou em combinação (INCA, 2019c). Nos casos em que a doença é classificada de baixo risco, pode-se adotar o monitoramento ativo, que consiste na realização periódica de exames de PSA e toque retal. Algumas propostas de tratamento localizado são a crioterapia, a braquiterapia e as ondas ultrassônicas, que tem por objetivo obter necrose tecidual. Já a quimioterapia é utilizada quando a terapia hormonal não é capaz de conter a doença ou em casos metastáticos (CASTILLEJOS-MOLINA; GABILONDO-NAVARRO, 2016).

3.1.3 Câncer de fígado

De acordo com a OMS, o câncer de fígado é uma das causas mais comuns de morte por câncer, sendo que em 2018 foram registrados 782 mil óbitos no mundo (WHO, 2018). Esse tipo de câncer pode ser classificado em primário, quando a doença começa no próprio órgão, ou em metastático, que em geral é decorrente de tumores malignos no intestino grosso ou no reto (INCA, 2018).

Dentre os tipos de câncer de fígado primários estão o carcinoma hepatocelular, que é o mais frequente, seguido pelo colangiocarcinoma, originado nos ductos biliares do fígado. Ambos estão entre os cânceres com pior prognóstico, com uma sobrevida global em torno de 15%. Há ainda o hepatoblastoma, um tumor maligno que atinge recém-nascidos e o angiossarcoma, que se origina nos vasos sanguíneos hepáticos (HARRINGTON, 2014).

Grande parte dos casos desse tipo câncer se desenvolveram em decorrência de doenças hepáticas subjacentes, relacionadas principalmente a infecções crônicas pelo vírus da hepatite B (HBV), da hepatite C (HCV), pelo álcool ou por doença hepática gordurosa. Outros fatores de risco relacionados são o tabagismo, a exposição a aflatoxinas e a produtos químicos, hábitos alimentares e algumas condições hereditárias, como hemocromatose e doença de Wilson (BOSCH *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, vários alvos foram caracterizados a fim de desenvolver novos medicamentos para tratar o câncer hepático. Porém, grande parte desses fármacos falharam nos ensaios clínicos de fase III. O único medicamento de primeira linha disponível atualmente para o tratamento do câncer primário é o sorafenibe (ZHENG *et al.*, 2019). O diagnóstico precoce pode ser feito buscando sinais e sintomas como massa e dor no abdômen superior, fadiga, perda de apetite, icterícia e perda de peso sem motivo conhecido (NIH, 2019).

A remoção cirúrgica ainda é o tratamento mais indicado tanto para tumores hepáticos primários, quanto para os metastáticos (INCA, 2018). Com o desenvolvimento de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, associadas aos esquemas quimioterápicos e a modulação do volume tumoral, é possível aumentar a sobrevida de pacientes com câncer metastático (DORR; BARTELS; MORGUK, 2020).

3.2 Avaliação do potencial anticâncer

As terapias disponíveis atualmente para o tratamento do câncer incluem a cirurgia, que consiste na remoção do tumor e, portanto, é válida mais para tumores sólidos; a radioterapia, que é o tratamento com raios-X e a quimioterapia, com a utilização de agentes antineoplásicos. Porém, apesar dos avanços no tratamento, os efeitos adversos da radioterapia e da quimioterapia ainda são bastante significativos (ALY, 2012).

Nesse contexto, a busca por novos medicamentos anticâncer se faz necessária e a avaliação biológica desses agentes inclui várias técnicas *in vitro* e *in vivo*. Como a triagem *in vivo* é dispendiosa e requer um grande uso de animais e aprovações do comitê de ética animal, a melhor forma de rastrear potenciais agentes anticâncer é por técnicas *in vitro*, sendo os compostos mais promissores testados posteriormente por métodos mais elaborados (SIDDIQUI; KHANVILKAR; JAGDALE, 2017).

Assim, em 1955, o *Nacional Cancer Institute* (NCI-EUA) iniciou um programa de triagem, a fim de buscar novos compostos com potencial atividade citotóxica (DEVITA; CHU, 2008). Esse instituto define de maneira distinta os termos citotóxico, antitumoral e anticâncer. O termo citotóxico é referente a agentes tóxicos para células tumorais em testes *in vitro*, podendo causar morte celular por diferentes mecanismos. Já a atividade antitumoral é determinada para ensaios *in vivo* em modelos animais, enquanto o termo anticâncer se refere apenas a agentes com atividade em humanos. Assim, no programa de triagem, denominado *60 Human Tumor Cell Lines Screen* (NCI-60), são testados vários compostos quanto as suas potenciais atividades citotóxica e antiproliferativa, utilizando, aproximadamente, 60 diferentes tipos de linhagens celulares de tumores humanos, que representam o câncer de pulmão, de cólon, de cérebro, de ovário, de mama, de próstata, de rim, a leucemia e o melanoma (SHOEMAKER, 2006).

Desde 2007, todos os compostos submetidos ao NCI-60 são testados inicialmente em uma concentração única, frente a todas as linhagens celulares. Apenas os que satisfizerem os critérios pré-determinados de inibição de proliferação seguem para o teste com cinco concentrações de amostra. A metodologia utilizada inclui o ensaio colorimétrico da sulforrodamina B e os parâmetros de concentração-resposta são

calculados a partir do GI₅₀ (inibição de crescimento de 50%), do TGI (inibição total do crescimento) e do LC₅₀ (concentração letal a 50%) (NCI, 2015).

3.3 Quimioterápicos antineoplásicos

A multiplicidade das causas do câncer, juntamente com as mutações associadas, torna essa doença heterogênea e de difícil tratamento. Além disso, há uma relativa semelhança entre as células malignas e as células normais, o que dificulta muito a terapia. Assim, o tratamento de escolha geralmente envolve a combinação de diferentes técnicas, como a cirurgia e a quimioterapia (BRANDÃO *et al.*, 2010).

A quimioterapia, que se baseia na destruição das células neoplásicas, começou a ser usada no início do século XX e teve seu avanço após a Segunda Guerra Mundial. Atualmente, existem vários esquemas quimioterápicos mais ativos, muitos dos quais são usados no cenário neoadjuvante, seja para reduzir o tamanho do tumor primário e permitir melhores resultados na cirurgia, seja no tratamento de metástases (DEVITA; CHU, 2008).

Para o tratamento de câncer, os antineoplásicos disponíveis são classificados de acordo com seu mecanismo de ação. Os fármacos que possuem efeito sobre células em processo de divisão são denominados fármacos ciclo-celular específicos, dentre eles os antimetabólitos, os alcaloides e os hormônios, enquanto que outros fármacos são capazes de induzir a morte de células que não estejam em estado de proliferação e são chamados de fármacos ciclo-celular não específicos (antibióticos, complexos de platina, agentes alquilantes diversos) (DE ALMEIDA *et al.*, 2005).

Em 1943 foi utilizado o primeiro medicamento anticâncer, a mostarda nitrogenada, para tratar um paciente com linfoma não-Hodgkin e, desde então, surgiram cerca de 200 quimioterápicos, dentre eles os citotóxicos clássicos, os medicamentos de suporte, os anti-hormonais e a terapia de alvos moleculares, que inclui as pequenas moléculas (entidades químicas) e os agentes biológicos (proteínas e anticorpos) (GONZALEZ-FIERRO; DUEÑAS-GONZÁLEZ, 2019).

Estudos recentes indicaram que, dentre os 207 fármacos aprovados para o tratamento de câncer no período de 1930 a 2014, somente 17% eram de origem totalmente sintética e que 83% deles foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Exemplos importantes de anticancerígenos derivados de plantas são os alcaloides da Vinca, derivados da *Catharanthus roseus*, que era utilizada pela população africana no tratamento de diabetes. Durante os testes, foi observada supressão da medula óssea dos animais tratados com o extrato, levando, posteriormente, ao isolamento da vimblastina e da vincristina, que hoje são utilizadas no tratamento do câncer de ovário, na leucemia linfoblástica aguda, no linfoma de Hodgkin e no sarcoma de Kaposi (MOUDI *et al.*, 2013).

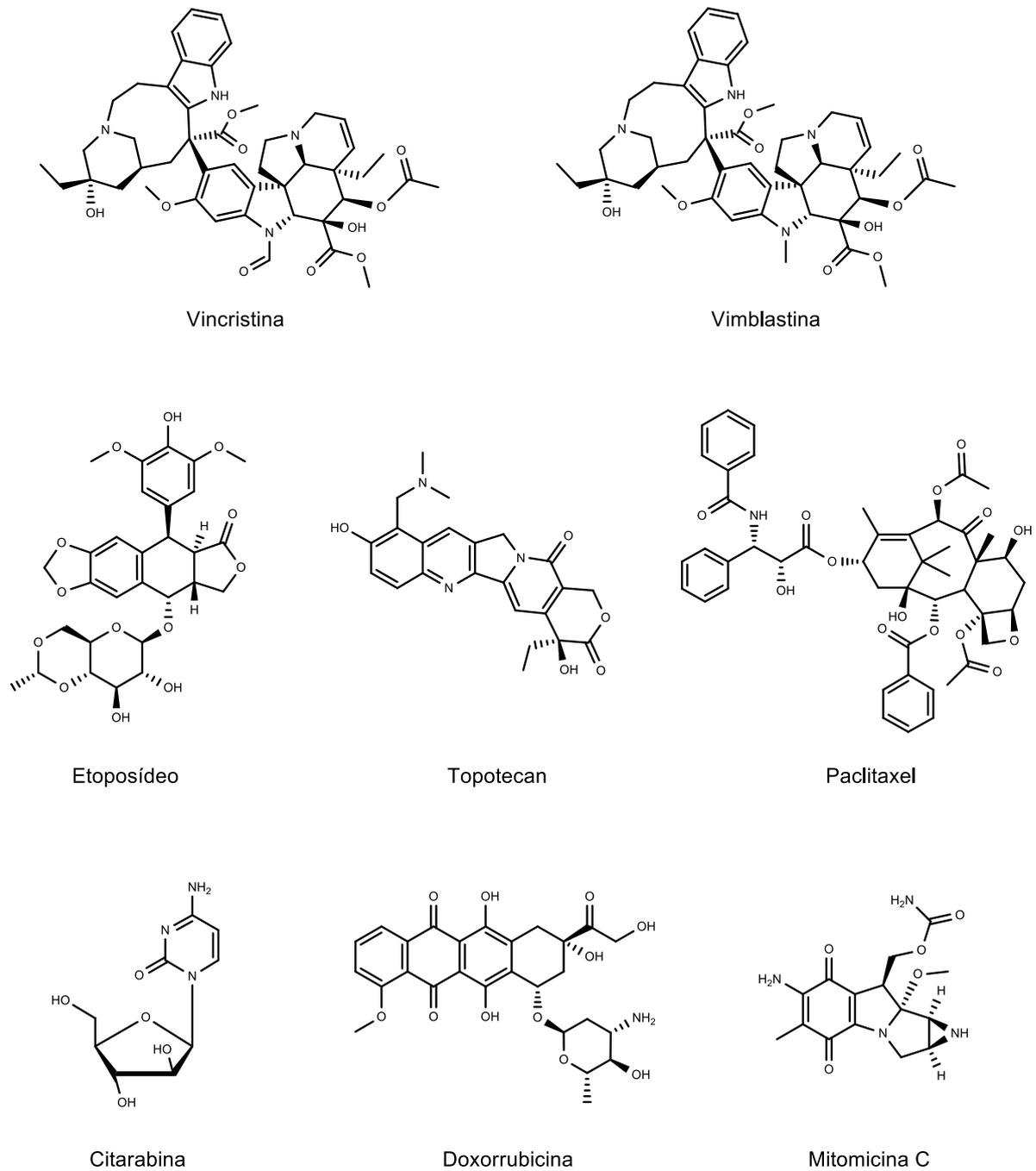
Outra descoberta relevante foram as substâncias presentes em espécies do gênero *Podophyllum*, usadas pela população da América e da Ásia no tratamento do câncer de pele e verrugas. A partir da podofilotoxina, que é uma lignana ariltetralínica, foram obtidos derivados como o etoposídeo e o teniposídeo, com significativa atividade anticâncer (LIU; YANG; TIAN, 2007). Também existe a camptotecina, um alcaloide isolado da *Camptotheca acuminata*, que deu origem ao irinotecan e ao topotecan, cujo mecanismo de ação é a inibição da topoisomerase I (THOMAS; RAHIER; HECHT, 2004).

Uma das maiores histórias de sucesso na pesquisa de produtos naturais é a descoberta do paclitaxel. Em 1962 a casca da *Taxus brevifolia* foi coletada pela primeira vez e, através do programa de triagem do NCI, foi demonstrada a atividade antitumoral dos extratos dessa espécie. Somente em 1971 o princípio ativo foi identificado. Entretanto, havia ainda o problema da produção do medicamento, já que seria necessária muita matéria-prima vegetal para se obter a quantidade mínima do composto isolado. Após anos de intensa pesquisa e desenvolvimento, a indústria farmacêutica conseguiu realizar a semissíntese do paclitaxel e disponibilizar o medicamento para o mercado (AMARAL *et al.*, 2019).

Em relação aos compostos derivados de outras fontes naturais pode-se citar a citarabina, a trabectedina e a brostostina como provenientes de organismos marinhos e a actinomicina D, a mitomicina C, a bleomicina e a doxorubicina, que são provenientes de fontes microbianas. Além disso, já existem novas gerações de taxanos, antraciclinas, alcaloides da Vinca e camptotecinas. Todos esses fármacos apresentam uma variedade de mecanismos de ação, como por exemplo alquilação do DNA, interação com os microtúbulos, inibição das topoisomerasas e interferência na transdução de sinal do tumor (NOBILI *et al.*, 2009). As estruturas químicas de alguns

compostos derivados de produtos naturais e que, atualmente, são comercializados como medicamentos antineoplásicos, estão representadas na **Figura 1**.

Figura 1: Estruturas químicas de compostos derivados de produtos naturais, comercializados como medicamentos antineoplásicos



Fonte: (PubChem) / (FDA, 2020)

3.4 Gênero *Baccharis*

O gênero *Baccharis* (Asteraceae) é constituído por cerca de 500 espécies, distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas. A família Asteraceae é um grupo bastante numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies (VERDI *et al.*, 2005). A origem do nome *Baccharis* (Bakkharis) vem do grego, antiga denominação para algumas plantas arbustivas, e chegou a ser empregado para designar espécimes diferentes das que hoje em dia recebem esse nome (BUDEL *et al.*, 2005).

Atualmente existem aproximadamente 167 espécies do gênero *Baccharis* no Brasil, pertencentes a quatro subgêneros. Há ocorrência registrada em todos os biomas brasileiros, com a maioria das espécies encontradas no sul, sudeste e centro-oeste, apresentando considerável relevância na medicina popular, além de aspectos econômicos e ambientais (CAMPOS *et al.*, 2016).

Tradicionalmente, espécies de *Baccharis* são consumidas principalmente na forma de infusões com indicações para tratar enfermidades do estômago e fígado, anemias, inflamações, diabetes, feridas e úlceras, febre, infecções bacterianas e fúngicas, sendo também descritas como eficazes para o processo de desintoxicação do organismo (VERDI *et al.*, 2005; ABAD; BERMEJO, 2007).

Exemplos disso é o uso popular de *Baccharis articulata* (carquejilla) e *Baccharis crispa* (carqueja) como diuréticas e digestivas; *Baccharis illinita* (chá-ventura, erva milagrosa) por suas atividades anti-inflamatórias, cicatrizantes e anti-infecciosas, bem como por sua ação protetora contra úlceras estomacais e o uso de *Baccharis trinervis* (chilca) no tratamento de febre alta, edemas, feridas e câibras musculares (ABAD; BERMEJO, 2007). *Baccharis genistelloides* é também muito utilizada no Brasil para tratar uma variedade de doenças, tais como desordens digestivas e do fígado, malária, úlceras, diabetes, anemia, diarreia, inflamações urinárias, amigdalite e verminoses, entre outras (MELO *et al.*, 2001).

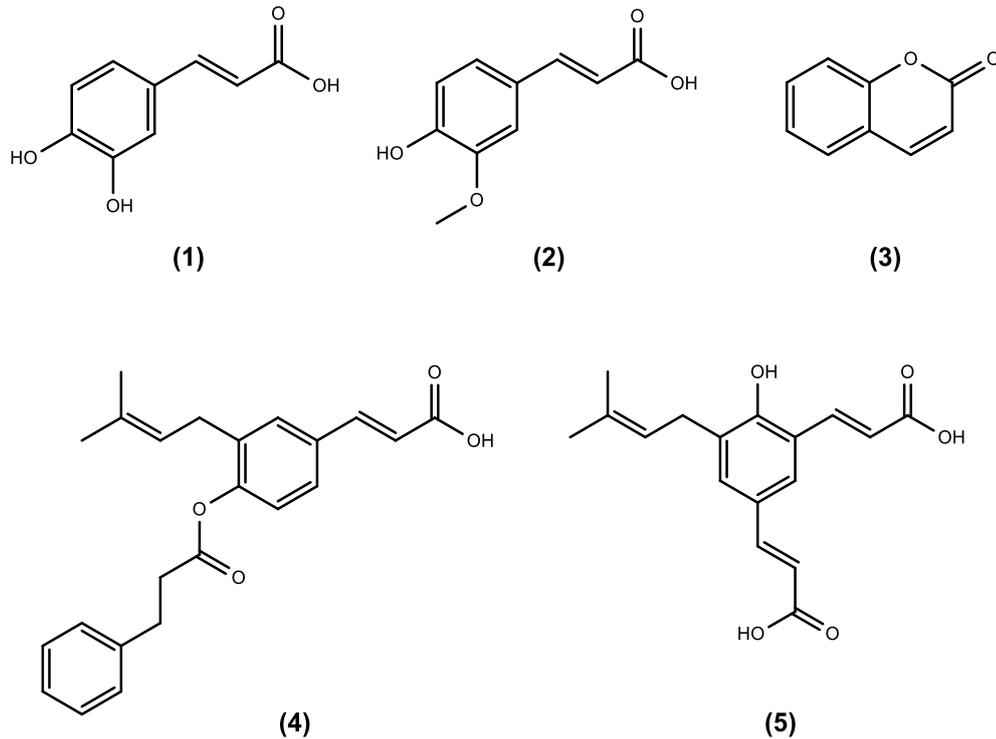
A fitoquímica do gênero *Baccharis* tem sido extensivamente estudada desde o início do século XX e, atualmente, mais de 150 substâncias já foram isoladas e tiveram suas estruturas elucidadas. Embora o gênero compreenda uma grande quantidade de

espécies, apenas cerca de 120 foram estudadas quimicamente. Os compostos mais frequentes são os flavonoides e os terpenóides (KARAM *et al.*, 2013).

Cerca de 30 espécies de *Baccharis* tiveram suas atividades biológicas estudadas, destacando-se os efeitos alelopático, antimicrobiano, citotóxico, anti-inflamatório, antifúngico, antioxidante, antiviral, gastroprotetor e hepatoprotetor. Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e atividades biológicas destacam-se *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (VERDI *et al.*, 2005; ABAD e BERMEJO, 2007; CAMPOS *et al.*, 2016).

Baccharis dracunculifolia, comumente conhecida como alecrim-do-campo e vassoura, é utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamação, distúrbios hepáticos e úlceras estomacais (FIGUEIREDO-RINHEL *et al.*, 2013). Estudos fitoquímicos realizados com essa espécie demonstraram a presença de vários constituintes, incluindo ácido cafeico (**1**), ácido felúrico (**2**), ácido p-cumárico (**3**), bacarina (**4**) e artepelinina C (**5**) (LEMOS *et al.*, 2007). No Brasil em particular, as abelhas (*Apis mellifera*) utilizam néctares florais de *B. dracunculifolia* para produzir própolis verde, cujos benefícios saudáveis, incluindo o efeito hepatoprotetor, são bem descritos na literatura (SEO *et al.*, 2003; BÚFALO *et al.*, 2009; VEIGA *et al.*, 2017).

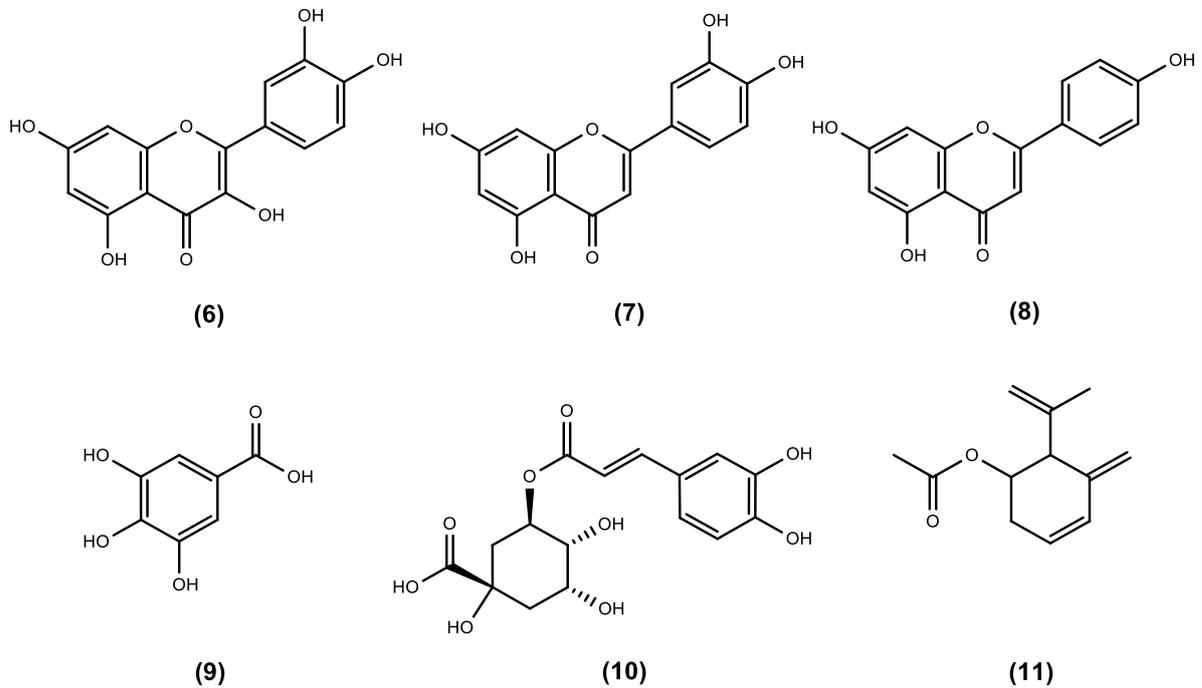
Guimarães *et al.* (2012) relataram que *B. dracunculifolia* exibiu potente atividade antioxidante em ratos, capaz de proteger as mitocôndrias do fígado contra o dano oxidativo e tal ação contribui, provavelmente, para os efeitos antioxidante e hepatoprotetor da própolis verde. Além disso, o extrato diclorometânico das folhas dessa mesma espécie apresentou atividade antifúngica e antibacteriana, principalmente contra *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*, com valores de CI_{50} de 65 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (FILHO *et al.*, 2008), bem como atividade *in vitro* contra *Leishmania donovani*, com CI_{50} de 45 $\mu\text{g/mL}$ (FILHO *et al.*, 2009). Costa *et al.* (2019) descreveram a atividade cicatricial do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *B. dracunculifolia* em modelo de úlcera induzida por ácido acético, demonstrando a regeneração significativa do tecido lesado.



B. trimera está amplamente difundida na América do Sul e é também conhecida como carqueja. Decocções ou infusões medicinais preparadas com esta planta são usadas na medicina popular para tratar doenças do fígado, reumatismo, diabetes, assim como distúrbios digestivos e renais (JANUÁRIO *et al.*, 2004). Dentre os compostos já isolados dessa espécie estão alguns flavonoides (ex.: quercetina **(6)**, luteolina **(7)**, apigenina **(8)**), ácidos fenólicos (ex.: ácido gálico **(9)**, ácido cafeico **(1)**, ácido clorogênico **(10)**) e monoterpenos, como o acetato de carquejila **(11)**, descrito como marcador da espécie (RABELO; COSTA, 2018).

Gené *et al.* (1996) sugeriram que *B. trimera* apresenta fortes propriedades anti-inflamatórias e analgésicas que parecem ser devidas, pelo menos em parte, à inibição da biossíntese das prostaglandinas, enquanto (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012) avaliaram as atividades antioxidante e anti-inflamatória de seis extratos (diclorometano, acetato de etila, butanol, aquoso, enriquecido em saponinas e fenólicos) das partes aéreas de *B. trimera*, verificando que o extrato fenólico apresentou o maior potencial antioxidante em relação aos demais extratos. Além disso, foi demonstrada a atividade gastroprotetora e curativa do extrato hidroetanólico, também das partes aéreas dessa mesma espécie, em modelos animais (LÍVERO *et al.*, 2016), bem como o efeito cardioprotetor, já que o extrato etanólico foi capaz de reverter as alterações

histopatológicas cardíacas e renais, e também reduzir a frequência cardíaca e a pressão arterial nos modelos experimentais utilizados (SOUZA *et al.*, 2019).

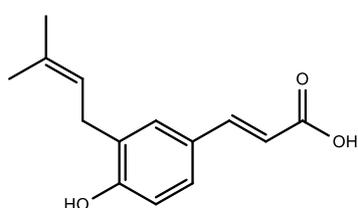


Extratos em hexano e diclorometano das partes aéreas de *Baccharis grisebachii* mostraram-se eficazes contra as espécies de fungos *Trichophyton rubrum* e *Cryptococcus neoformans*, além de exibir atividade contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), com Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 125 µg/mL (extrato em hexano) e 250 µg/mL (extrato em diclorometano) (FERESIN *et al.*, 2001). Dentre os compostos já isolados de *B. grisebachii* estão alguns derivados do ácido p-cumárico (3) (ex.: drupanina (12) e plicatina B (13)) e alguns flavonoides (ex.: nevadensina (14) e gardenina B (15)) (FERESIN *et al.*, 2003).

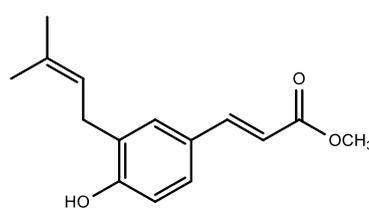
Compostos isolados de *Baccharis pedunculata*, incluindo os flavonoides pectolinarigenina (16) e penduletina (17), foram testados para atividade antifúngica, sendo eficazes contra alguns fungos patogênicos e fitopatogênicos humanos (RAHALISON *et al.*, 1995). O extrato etanólico de partes aéreas de *Baccharis conferta* e de alguns compostos isolados, entre eles os flavonoides apigenina-4,7-dimetil éter (18), naringenina-4,7-dimetil éter (19), pectolinarigenina (16) e cirsimaritina (20), apresentaram importante atividade antiespasmódica (WEIMANN *et al.*, 2002).

Passero *et al.* (2011) mostraram a atividade inibitória de alguns compostos (ácido cafeico **(1)**, pectolinarigenina **(16)** e uma fração composta por ácido oleanólico **(21)** e ácido ursólico **(22)**) isolados do extrato etanólico de *Baccharis uncinella*, contra as formas amastigota e promastigota de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*. Ademais, três diterpenos (ácido ent-15 β -senecioil-oxi-kaur-16-en-19-óico **(23)**, ácidos ent-kaur-16-en-19-óico **(24)** e ent-16-oxo-17-nor-cauran-19-óico **(25)**) isolados das partes aéreas de *Baccharis retusa*, foram eficazes contra as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (UENO *et al.*, 2018).

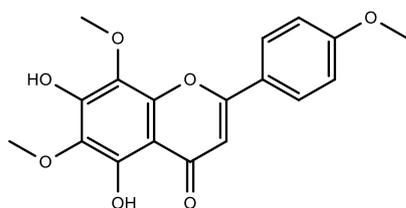
O óleo essencial, extraído das partes aéreas de *B. salicifolia*, demonstrou atividade aleloquímica em besouros adultos da espécie *Tribolium castaneum*, evidenciando um papel importante no controle de pragas. Os terpenos isolados do óleo que produziram maior atividade tóxica foram o β -pineno **(26)**, a pulegona **(27)** e o α -terpineol **(28)** (GARCÍA *et al.*, 2005). A toxicidade do óleo essencial das folhas de quatro espécies de *Baccharis* (*B. articulata*, *B. ochracea*, *B. psiadioides* e *B. trimera*) foi testada contra o *Alternaria alternata*, um patógeno que causa doenças em plantas. Os óleos essenciais de *B. ochracea* e *B. trimera* apresentaram inibição do crescimento do fungo e foram capazes de controlar o câncer de tronco (em tomates) causado por esse patógeno (TOMAZONI *et al.*, 2019).



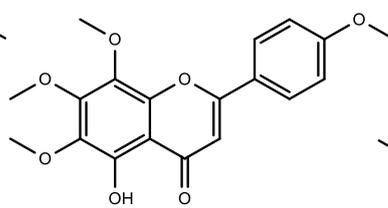
(12)



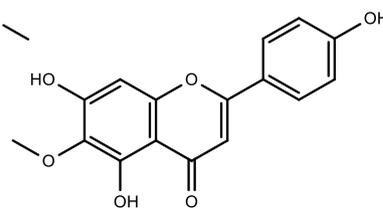
(13)



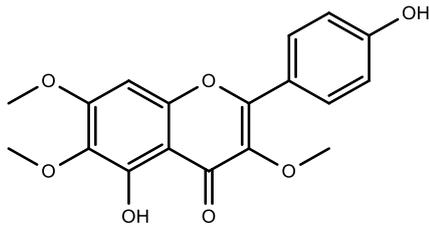
(14)



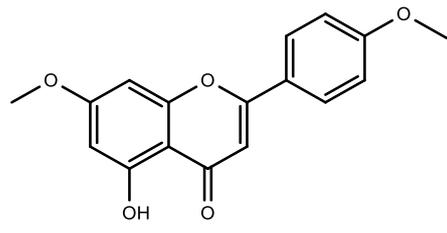
(15)



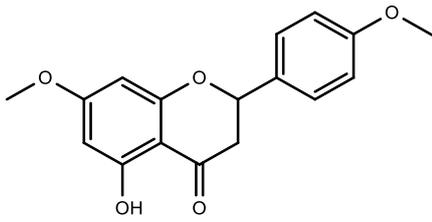
(16)



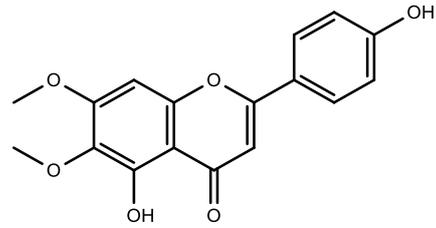
(17)



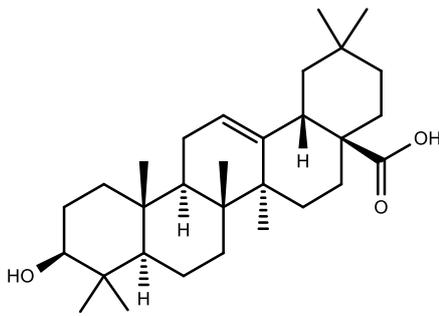
(18)



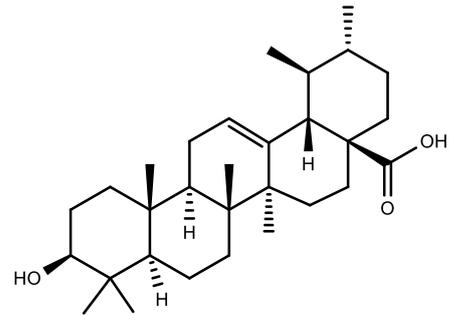
(19)



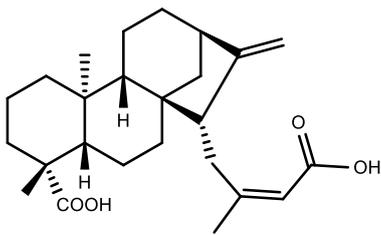
(20)



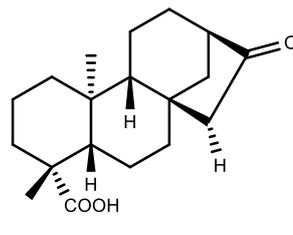
(21)



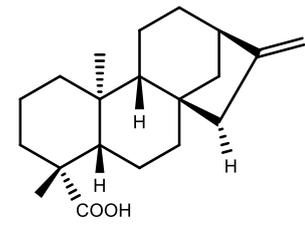
(22)



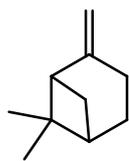
(23)



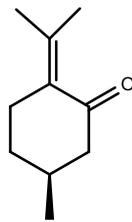
(24)



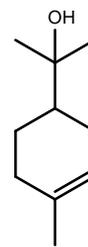
(25)



(26)



(27)



(28)

3.4.1 Atividade citotóxica de espécies do gênero *Baccharis*

Alguns compostos isolados das partes aéreas de *B. gaudichaudiana*, como o gaudichaudol C (**29**), a gaudichaudona (**30**) e o acetato de articulina (**31**), apresentaram atividade citotóxica significativa frente a células de leucemia linfocítica murina (P388) e de fibrosarcoma (HT-1080) (FULLAS *et al.*, 1994). Já a *B. coridifolia* apresentou atividade antioxidante e citotóxica *in vitro* contra células de carcinoma humano da nasofaringe (KB) (MONGELLI *et al.*, 1997).

A baccharina (**32**) e o baccharinol (**33**), isolados dos caules e folhas de *B. megapotamica*, apresentaram potente atividade citotóxica *in vitro*, frente a células de carcinoma de nasofaringe (KB), e *in vivo*, em modelo murino de leucemia (P388) (KUPCHAN *et al.*, 1977b). Outros tricotecenos macrocíclicos foram encontrados em inflorescências e sementes de *B. coridifolia*, que também apresentaram toxicidade em camundongos, com sintomas de sedação, cólicas abdominais e convulsões (HABERMEHL *et al.*, 1985) e em *B. artemisioides*, que se mostrou tóxica frente a modelos de *Artemia salina* e sementes de *Lepidium sativum* (RIZZO *et al.*, 1997).

Fukuda *et al.* (2006) relataram atividade citotóxica de alguns constituintes voláteis de folhas de *B. dracunculifolia* frente a células leucêmicas (L1210), tais como: timol (**34**) ($CI_{50} = 33.3 \mu M$), carvacrol (**35**) ($CI_{50} = 66.6 \mu M$), *p*-metoxitimol (**36**) ($CI_{50} = 27.7 \mu M$) e *p*-cimeno-2,3-diol (**37**) ($CI_{50} = 45,1 \mu M$). De Oliveira *et al.* (2013) investigaram as propriedades antiproliferativas dos compostos fenólicos e dos terpenóides, obtidos de extratos (diclorometânico, acetato de etila e butanólico) das partes aéreas de *B. trimera*, em células de carcinoma cervical humano (SiHa), e verificaram que ambos os compostos (fenóis e terpenos) inibiram a proliferação das células, além de promover um aumento significativo nos níveis de lactato desidrogenase no meio de cultura, indicando perda da integridade da membrana celular. Em relação a elucidação dos mecanismos de morte celular, verificou-se que os compostos fenólicos causaram a morte por necrose, enquanto os terpenos induziram a apoptose.

Um estudo feito por Jaramillo-García *et al.* (2018) avaliou os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos extratos aquosos de folhas de *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia, em células de ovário de hamster chinês (CHO). Os resultados demonstraram efeitos citotóxicos, do tipo concentração-dependente, em células CHO, por meio dos ensaios de sobrevivência clonal e do MTT (ensaio de redução do

brometo de [3 (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio]) em concentrações maiores que 0,05 mg/mL. Os efeitos genotóxicos também foram evidenciados nos extratos, e sugeriu-se que os flavonoides, fenilpropanoides, cumarinas e diterpenos pudessem ser os responsáveis pelos efeitos observados.

A atividade citotóxica do óleo essencial de cladódios de *B. milleflora* foi avaliada em linhagens de células Jurkat (células de leucemia T), HL-60 (células de leucemia promielocítica) e Raji (células linfoblastoides derivadas de um linfoma de Burkitt), obtendo-se valores de CI_{50} inferiores a 50 $\mu\text{g/mL}$, por meio do ensaio de MTT. Ademais, a alteração no ciclo celular foi demonstrada devido à inibição da proliferação dos três tipos de células utilizadas. Em geral, o óleo essencial promoveu o acúmulo das células na fase G0/G1 e também induziu a fragmentação nuclear, além de induzir morte celular através de mecanismos necróticos e apoptóticos (PEREIRA *et al.*, 2017).

Ao analisar a atividade antiproliferativa dos flavonoides isolados do extrato acetônico (partes aéreas) de *B. scandens*, frente às linhagens de células leucêmicas humanas, Cabrera *et al.* (2016) comprovaram que a gardenina B (**15**) era o composto com maior atividade citotóxica frente às linhagens HL-60 (células de leucemia promielocítica humana) e U-937 (células derivadas de linfoma), apresentando valores de CI_{50} entre 1,6 e 3,0 μM . Além disso, efeitos na viabilidade celular foram acompanhados pela indução de morte por apoptose, evidenciado pela fragmentação do DNA, e formação de corpos apoptóticos. A morte celular induzida pela gardenina B (**15**) foi associada à indução significativa das atividades e clivagens das enzimas caspases, assim como a geração de espécies reativas de oxigênio dependentes da concentração. Em conclusão, a morte celular induzida pelo composto estava associada à ativação das vias apoptóticas extrínseca e intrínseca da apoptose.

Ao avaliar a potencial atividade citotóxica do extrato metanólico das folhas de *B. obtusifolia*, em linhagens celulares de câncer de cólon (RKO) e astrocitoma (D-384), observou-se uma alta porcentagem de inibição (89,2% e 60,6%, respectivamente) das células tumorais (ROMERO-BENAVIDES *et al.*, 2018). De Oliveira *et al.* (2014) compararam a atividade antiproliferativa dos extratos etanólicos de própolis verde e das folhas de *B. dracunculifolia*, além dos dois principais compostos dessa espécie, a bacarina (**4**) e a artepelina C (**5**), frente a diferentes linhagens tumorais, demonstrando

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Balança analítica Metler, modelo AB 204
- Balança analítica Sartorius, modelo BP 211D
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400
- Bombas de vácuo Fabbe (modelo 0320) e Edwards (modelo C 560786)
- Bomba peristáltica de bancada Watson Marlow, modelo 120S
- Capela de fluxo laminar vertical Veco, modelo BioProtector 09
- Centrífuga Hermle Z323K
- Chapa agitadora
- Coluna para UPLC Waters Acquity UPLC® BEH HILIC (150 x 2,1 mm, 1,7 µm)
- Coluna para HPLC-RF preparativo Agilent Prep-C18 (21,2 x 250 mm, 10 µm)
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance DRX – 400 MHz
- Estufa de CO₂ Forma Scientific, modelo 3158
- Estufa de cultura Fanem, modelo 502 A
- Estufa de secagem com renovação de ar, Fanem
- Evaporador rotatório Büchi, modelo B-480
- Leitor de microplacas Tecan, modelo Infinite M200, com software i-control para processamento de dados
- Liofilizador de bancada Liotop, modelo L101
- Microcentrífuga Cientec, modelo CT-14000
- Micropipetas HTL, vol. ajustável de 10 - 100 µL e 100 - 1000 µL
- Microscópio Olympus, modelo CKX41
- Phmetro Metrohm, modelo 827 pH lab
- Pré-coluna Waters Acquity UPLC® BEH HILIC (5 x 2,1 mm, 1,7 µm).
- Pipetador automático Drummond, modelo Pipet Aid XP
- Purificador de água Milli-Q Plus
- Sistema de UPLC-MS/MS ACQUITY Ultra Performance LC™, Waters,

composto por detector de arranjos de diodo (DAD) modelo PDA 2996 e detector de espectrometria de massas ACQUITY TQ (Water), equipado com fonte de ionização por spray de elétrons Z-spray (ESI) e software Mass Lynx™ (versão 4.1, Waters)

- Soprador térmico serigráfico Steinel, modelo HL-500
- Ultra centrífuga Hermle, modelo Z 323 K
- Ultrafreezer Liotop®, modelo UFR80
- Vórtex Mixer, Vixar

4.2 Solventes e reagentes

- Ácidos grau P.A.: ácido fórmico e ácido clorídrico, Merck
- Ácidos grau HPLC: ácido fórmico e ácido fosfórico, Merck
- Bicarbonato de sódio P.A., LS Chemicals
- Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich
- Dimetilsulfóxido-d6, Sigma-Aldrich
- Meio de cultura RPMI-1640, R4130, Sigma
- Meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium), Gibco
- Meio de cultura DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium), Gibco
- Pastilhas de tampão fosfato salino, Sigma
- Sílica gel 60 G, Merck
- Sílica gel 60, 230-400 mesh, Merck
- Sílica gel 60, 70-230 mesh, Merck
- Solventes grau HPLC acetonitrila e metanol, Tedia
- Solventes grau padrão analítico (P.A.): acetona, metanol e álcool etílico, Quimex; álcool etílico 95%, Fmaia, tolueno, Merck
- Soro fetal bovino estéril, Gibco, Invitrogen
- Tubo de plástico tipo safe-lock de 2 mL, MDI
- Unidade filtrante PTFE 0,22 e 0,45 µm, Corning

4.3 Vidrarias e materiais diversos

- Borrifador de vidro
- Câmara de Neubauer, Labor Optik

- Capilar para aplicação em CCD
- Cromatoplasmas de vidro de 10 ×10 cm
- Cubas cromatográficas de vidro Pyrex
- Frascos para cultura celular com tampa com filtro, não tratados, de 25 cm² e 75 cm², Corning
- Kit de coloração de lâminas panótico
- Microplaca de 96 poços para cultivo celular, CellStar 655180, Greiner-Bio-One
- Microplaca de 96 poços para imunoenensaio, Nunc F, MaxiSorp, Invitrogen
- Microtubo plástico de 2 mL e 1,5 mL do tipo *safe-lock*, Axygen
- Pipetas sorológicas descartáveis, estéreis, de 5 mL e 10 mL, Sarstedt
- Ponteiras plásticas, Corning
- Seringas e agulhas de diferentes dimensões
- Sistema de filtração esterilizante, descartável, membrana de 0,22 µm, capacidade para 500 mL e 1000 mL, Corning
- Tubos plásticos do tipo Falcon com volumes de 15 e 50 mL, TPP
- Tubo de plástico tipo *safe-lock* de 2 mL, MDI
- Vials de vidro com tampa e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de HPLC e UPLC-MS

4.4 Reveladores para Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

- **Reagente anisaldeído - ácido sulfúrico** (WAGNER; BLADT, 1996):
Misturaram-se 0,5 mL de anisaldeído, 10,0 mL de ácido acético glacial, 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, sob resfriamento, nesta ordem.

4.5 Material Vegetal

O material vegetal foi coletado na Serra da Calçada (MG) e no Parque Nacional do Caparaó (MG/ES), pela equipe do Prof. Dr. Geraldo Wilson Fernandes, Laboratório de Ecologia Evolutiva - Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Foi feito o cadastro do projeto “Serviços Ecosistêmicos providos por espécies nativas da Mata Atlântica” no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen A5BF5D0).

A identificação das espécies foi feita pelo taxonomista Gustavo Heiden e as exsicatas estão depositadas no Herbário ECT (Herbário da Embrapa Clima Temperado, Pelotas). Os números das exsicatas correspondentes a cada espécie coletada estão representados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Espécies de *Baccharis* coletadas e os respectivos números das exsicatas

Código	Identificação Botânica	Exsicata
Serra da Calçada (MG)		
B. sp1	<i>Baccharis brevifolia</i> DC.	ECT 6259
B. sp2	<i>Baccharis myriocephala</i> DC.	ECT 6257
B. sp3	<i>Baccharis reticularia</i> DC.	ECT 6258
B. sp4	<i>Baccharis reticularia</i> DC.	ECT 6262
B. sp5	<i>Baccharis retusa</i> DC.	ECT 6260
Parque Nacional do Caparaó (MG/ES)		
B. sp1	<i>Baccharis altimontana</i> G.Heiden <i>et al.</i>	ECT 5981
B. sp2	<i>Baccharis calvescens</i> DC.	ECT 5549
B. sp3	<i>Baccharis calvescens</i> DC.	ECT 5977
B. sp4	<i>Baccharis hemiptera</i> G.Heiden <i>et al.</i>	ECT 5982
B. sp5	<i>Baccharis imbricata</i> Malag.	ECT 5912
B. sp6	<i>Baccharis magnifica</i> G.Heiden, Leoni & J.N.Nakaj.	ECT 5983
B. sp7	<i>Baccharis megapotamica</i> Spreng.	ECT 5986
B. sp8	<i>Baccharis opuntioides</i> Mart. ex Baker	ECT 5972
B. sp9	<i>Baccharis opuntioides</i> Mart. ex Baker	ECT 5987
B. sp10	<i>Baccharis parvidentata</i> Malag.	ECT 5542
B. sp11	<i>Baccharis parvidentata</i> Malag.	ECT 5916
B. sp12	<i>Baccharis parvidentata</i> Malag.	ECT 5984
B. sp13	<i>Baccharis platypoda</i> DC.	ECT 5971
B. sp14	<i>Baccharis platypoda</i> DC.	ECT 5974

As amostras botânicas foram secas em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura máxima de 40 °C. Em seguida, o material foi separado em folhas e caules, quando possível, e posteriormente pulverizado em moinho de facas. As drogas vegetais pulverizadas foram armazenadas em sala com temperatura controlada.

4.6 Preparo dos extratos vegetais

Os materiais vegetais pulverizados de *Baccharis* ssp. foram submetidos à maceração com etanol 96° GL. Assim, 7g de droga vegetal foram submetidos a extração com etanol (3x21mL) por 15 minutos em ultrassom. O etanol foi eliminado em fluxo de ar, à temperatura ambiente, por 72 horas, em seguida o extrato foi liofilizado e armazenado em sala com temperatura controlada (25° C). O rendimento extrativo calculado de cada amostra está representado na **Tabela 2**.

Tabela 2: Rendimento extrativo da maceração do material vegetal coletado

Código	Espécie	Parte da planta	Droga vegetal (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)	Número do extrato
Serra da Calçada (MG)						
B. sp1	<i>B. brevifolia</i>	Folhas	7,003	0,991	14,1	1
		Caules	7,005	0,432	6,2	2
B. sp2	<i>B. myriocephala</i>	Partes aéreas	7,009	0,544	7,8	3
B. sp3	<i>B. reticularia</i>	Folhas	7,016	1,403	19,9	4
		Caules	7,006	0,353	5,0	5
B. sp4	<i>B. reticularia</i>	Folhas	7,006	1,171	16,9	6
		Caules	7,000	0,315	4,5	7
B. sp5	<i>B. retusa</i>	Folhas	7,011	1,263	18,0	8
		Caules	7,008	0,297	4,2	9
Parque Nacional do Caparaó (MG/ES)						
B. sp1	<i>B. altimontana</i>	Partes aéreas	7,039	1,080	15,3	10
B. sp2	<i>B. calvescens</i>	Folhas	7,007	0,757	10,8	11
		Caules	7,000	0,447	6,4	12
B. sp3	<i>B. calvescens</i>	Folhas	7,048	0,681	9,7	13
		Caules	7,046	0,305	4,3	14
B. sp4	<i>B. hemiptera</i>	Partes aéreas	7,027	0,561	7,9	15
B. sp5	<i>B. imbricata</i>	Folhas	7,028	1,577	22,4	16
		Caules	7,004	0,394	5,6	17
B. sp6	<i>B. magnifica</i>	Folhas	7,039	0,642	9,1	18
		Caules	7,008	0,652	9,3	19
B. sp7	<i>B. megapotamica</i>	Folhas	7,048	0,479	6,8	20
		Caules	7,028	0,211	2,9	21

B. sp8	<i>B. opuntioides</i>	Partes aéreas	7,01	0,775	11,0	22
B. sp9	<i>B. opuntioides</i>	Partes aéreas	7,001	0,957	13,7	23
B. sp10	<i>B. parvidentata</i>	Folhas	7,02	0,494	7,0	24
		Caules	7,022	0,256	3,6	25
B. sp11	<i>B. parvidentata</i>	Folhas	7,027	0,633	9,0	26
		Caules	7,024	0,343	4,9	27
B. sp12	<i>B. parvidentata</i>	Folhas	7,013	0,695	9,9	28
		Caules	7,024	0,440	6,3	29
B. sp13	<i>B. platypoda</i>	Folhas	7,021	1,373	19,6	30
		Caules	7,029	0,780	11,1	31
B. sp14	<i>B. platypoda</i>	Folhas	7,004	1,598	22,8	32
		Caules	7,035	0,783	11,1	33

As espécies de *Baccharis* cujos extratos apresentaram potencial atividade no ensaio *in vitro* de citotoxicidade foram selecionadas e submetidas à uma percolação exaustiva com etanol 96°GL. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 45°C. Posteriormente, o extrato foi liofilizado e armazenado em dessecador. O rendimento extrativo calculado de cada amostra está representado na **Tabela 3**.

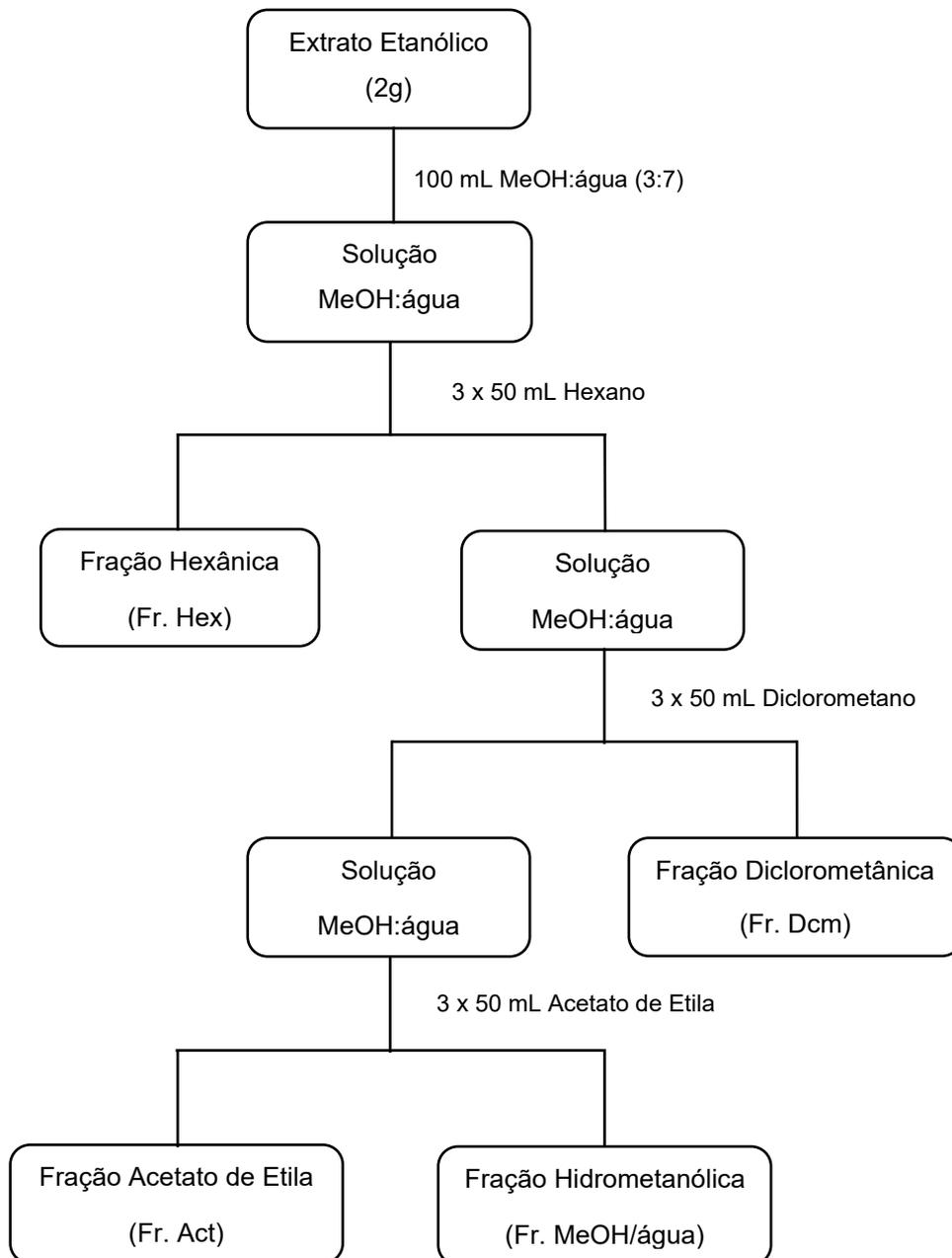
Tabela 3: Rendimento extrativo da percolação das espécies de *Baccharis* selecionadas

Espécie	Parte da planta	Droga vegetal (g)	Extrato Etanólico (g)	Rendimento (%)
<i>Parque Nacional do Caparaó (MG/ES)</i>				
<i>B. imbricata</i>	Folhas	100,008	39,200	39,2
<i>B. megapotamica</i>	Folhas	100,107	20,740	20,7

4.7 Fracionamento dos extratos obtidos por percolação

Uma porção (2g) de cada extrato obtido por percolação exaustiva foi solubilizada em 100 mL de solução metanol/água (3:7) e submetida à partição sequencial com 3 × 50 mL de *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila (**Figura 2**).

Figura 2: Fluxograma do fracionamento dos extratos etanólicos por partição sequencial entre solventes imiscíveis



Após a remoção dos solventes em evaporador rotatório, à temperatura máxima de 45°C, foram obtidas as frações hexânica (Fr. Hex), diclorometânica (Fr. Dcm), acetato de etila (Fr. Act) e hidrometanólica (Fr. MeOH/água). As frações foram liofilizadas e o rendimento de cada uma foi calculado (**Tabela 4**).

Tabela 4: Rendimento das frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis

Extrato Etanólico (g)	Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
<i>B. imbricata</i>			
2,074	Fr. Hex	0,180	8,7
	Fr. Dcm	0,539	25,9
	Fr. Act	0,128	6,2
	Fr. MeOH/água	0,867	41,8
<i>B. megapotamica</i>			
2,077	Fr. Hex	0,158	7,6
	Fr. Dcm	0,109	5,2
	Fr. Act	0,286	13,8
	Fr. MeOH/água	1,391	66,9

Posteriormente, o mesmo procedimento foi realizado em maior escala com o extrato de *B. imbricata*, visando a obtenção de uma maior quantidade da fração diclorometânica (Fr. Dcm). As frações foram liofilizadas e os rendimentos foram calculados (**Tabela 5**).

Tabela 5: Rendimento das frações obtidas do extrato de *B. imbricata*

Extrato Etanólico (g)	Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
24,070	Fr. Hex	0,920	3,8
	Fr. Dcm	10,558	43,9
	Fr. MeOH/água	11,524	47,9

Um refracionamento da fração diclorometânica (Fr. Dcm), derivada do extrato de *B. imbricata*, foi feito sob condições básicas (**Figura 3**). A parte inicial desse procedimento foi realizada em tubos do tipo falcon (50 mL), sendo o volume inicial dividido em dois tubos. Cada extração com a solução básica (NaOH 5% p/v) era seguida de centrifugação (velocidade de rotação: 2.000 rpm // tempo: 3 minutos //

temperatura: 25°C). Foram obtidas duas novas frações, denominadas DCM 1 e a DCM 2. Os rendimentos foram calculados e estão representados na **Tabela 6**.

Figura 3: Fluxograma do refractionamento da Fr. Dcm, derivada do extrato de *B. imbricata*

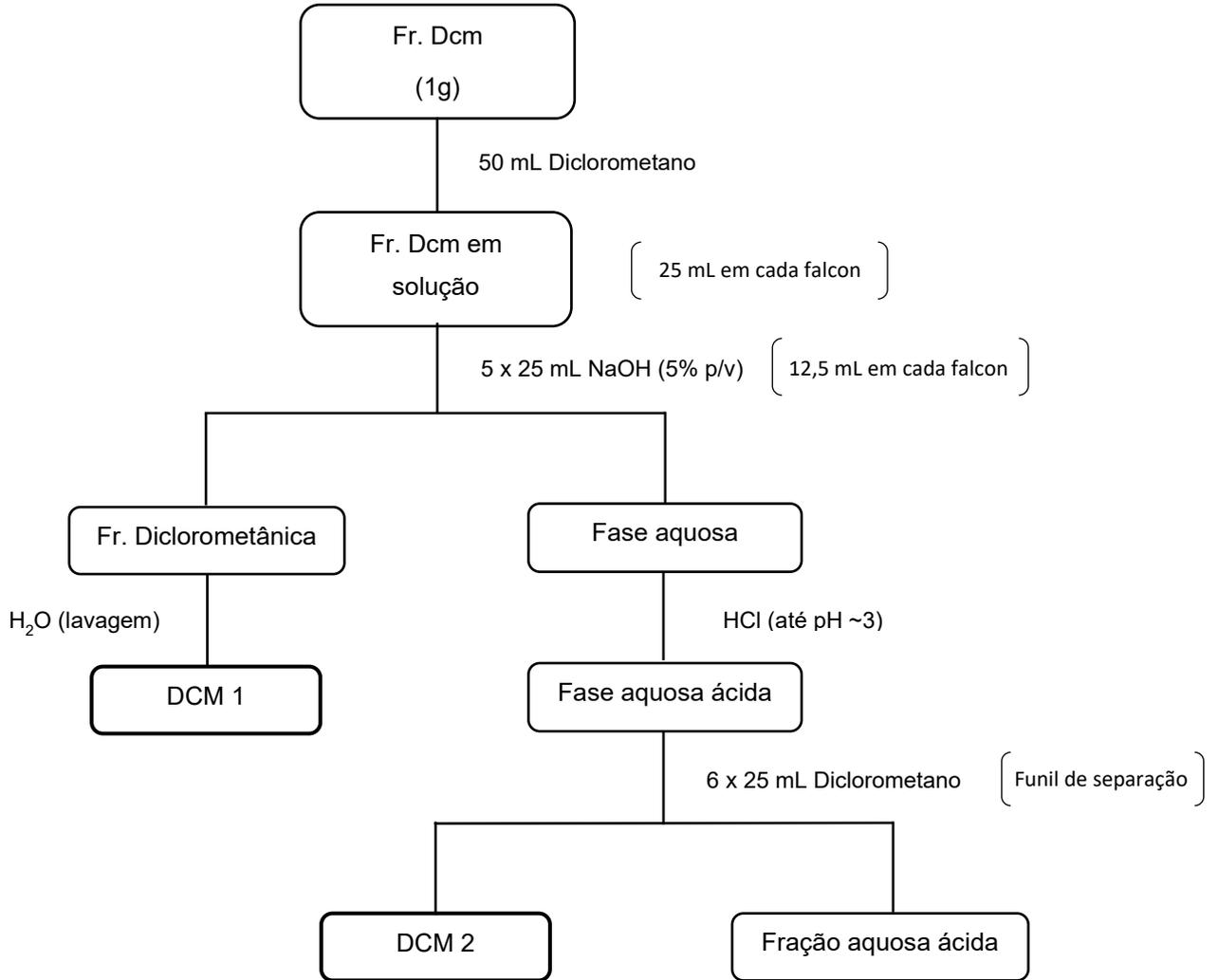


Tabela 6: Rendimento das frações DCM 1 e DCM 2, obtidas do refractionamento da Fr. Dcm

Fr. Dcm (g)	Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
9,704	DCM 1	6,387	65,8
	DCM 2	1,098	11,3

4.8 Análise por UPLC-ESI-MS/MS

Amostras de 2 mg dos extratos etanólicos e das frações obtidas foram solubilizadas em ACN grau HPLC, com auxílio de ultrassom por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, à 10.000 rpm, os sobrenadantes foram filtrados em membrana de PVDF (0,22 µm) e transferidos para vials previamente identificados.

Para a obtenção dos perfis cromatográficos 4 µL das soluções obtidas foram injetadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) (Waters), com detector de arranjo de diodos (DAD), acoplada a espectrômetro de massas com ionização por electrospray e analisador quadrupolo. Para tal, foi utilizada uma coluna de fase reversa (Acquity UPLC® BEH HILIC; 150 x 2,1 mm, 1,7 µm, Waters), em combinação com uma pré-coluna (UPLC® BEH HILIC; 5 x 2,1 mm, 1,7 µm, Waters) com eluição em gradiente de ACN:H₂O suplementados com 0,1% v/v de ácido fórmico (**Tabela 7**), em um fluxo de 0,300 mL/min e detecção no ultravioleta (UV) no intervalo de 205 a 500 nm.

Em relação ao espectro de massas, as análises foram realizadas em modo exploratório (*Scan*) e os íons monitorados no modo de ionização positivo e negativo, separadamente, sendo o intervalo de relação massa/carga (*m/z*) de 20 a 1974 Da. Os parâmetros utilizados na análise em espectrometria de massas estão representados na **Tabela 8**. Além disso, os extratos obtidos por percolação e suas respectivas frações foram também analisados em modo sequencial ou tandem (MS/MS) e os espectros de ESI-MS/MS foram registrados com energia de colisão com rampa de 15 até 70 eV na faixa de *m/z* 100 a 2000 Da.

Tabela 7: Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-ESI-MS/MS

Tempo	% A	% B
0	95	5
10	5	95
15	5	95
16	95	5
18	95	5

A: água; B: acetonitrila

Tabela 8: Condições definidas para a análise de extratos e frações dos materiais vegetais

Condições de detecção no modo ESI +/-	
Capilaridade (kV)	3,5
Cone (V)	30
Extrator (V)	3
RF Lens (V)	0,10
Temperatura de dessolvatação (°C)	350
Temperatura na fonte (°C)	120
Gás de dessolvatação (L/h)	550
Cone (L/h)	60

4.9 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

No perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel, 30 µL das soluções de 5 mg/mL do extrato e das frações de *B. imbricata* foram aplicadas com capilar em cromatoplaça de vidro 10 X 10 cm, com fase estacionária de sílica gel 60 com indicador de fluorescência. A eluição foi feita com tolueno/acetona (8:2) e para revelação utilizou-se anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento com o auxílio de soprador térmico.

4.10 Refracionamento da fração DCM 2 em escala preparativa

A fração DCM 2, obtida pelo refracionamento de Fr. Dcm de *B. imbricata*, foi refracionada por HPLC-FR em escala preparativa (Waters 1525 Binary HPLC Pump/ Waters 2489 UV-Visible Detector/ Waters 2707 Autosampler). Foi utilizada uma coluna de fase reversa (Agilent Prep-C18; 21,2 x 250 mm, 10 µm) e porções da amostra foram injetadas no sistema de HPLC na concentração de 30 mg/mL em ACN. Para a solubilização, a amostra foi mantida em banho de ultrassom por 10 minutos e transferida para um *vial* adequadamente identificado e uma porção de 800 µL foi injetada no cromatógrafo. O fluxo de eluição foi de 14 mL/min e a detecção foi realizada em 254 e 350 nm. O eluente utilizado foi água (A) e acetonitrila (B), empregando-se o gradiente descrito na **Tabela 9**. A coleta das frações foi baseada nos picos detectados no cromatograma correspondentes a cada uma das substâncias. Foram realizados doze fracionamentos por HPLC preparativa com porções da fração DCM 2, totalizando 361,2 mg de massa injetada.

Tabela 9: Gradiente de eluição empregado na análise de HPLC-RF em escala preparativa

Tempo	% A	% B
0	95	5
20	50	50
32	50	50
37	5	95
39	5	95
40	95	5
50	95	5

A: água; B: acetonitrila

4.11 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

Os espectros de RMN unidimensionais (^1H) e os mapas de contorno bidimensionais (HSQC, HMBC e NOESY) foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance DRX400, do Laboratório de Análises em Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química-UFMG, pelo Prof. José Dias de Sousa Filho. Como padrão interno utilizou-se o tetrametilsilano (TMS) e as amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- d_6). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

4.12 Ensaios biológicos *in vitro*

4.12.1 Cultivo celular

Foram utilizadas as seguintes linhagens tumorais humanas: A549 (adenocarcinoma de pulmão) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) adquiridas do ATCC[®] (*American Type Culture Collection*), e DU145 (adenocarcinoma de próstata insensível à terapia antiandrogênica), adquirida do DSMZ[®] (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*). Além disso, foram empregados fibroblastos humanos não-tumorais oriundos de cultura primária de tecido gengival humano, cedidos gentilmente pela Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC, número 021/2009).

Para manutenção e crescimento das culturas celulares foram utilizados os meios: MEM (Minimal Essential Medium - Gibco), para a linhagem tumoral A549, DMEM (Dulbeccos's Modified Eagle Medium - Gibco) para os fibroblastos gengivais e RPMI-1640 para as linhagens tumorais HepG2 e DU145. A esses meios foram adicionados 0,22% de bicarbonato de sódio, para manutenção do pH entre 7,2 e 7,4 e a suplementação foi realizada com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Cada linhagem celular foi mantida em frascos de cultura estéreis de 75 cm², a temperatura de 37 C° e em atmosfera umedecida de 5% de CO₂.

4.12.2 Triagem citotóxica pelo ensaio com sulforrodamina B (SRB)

O ensaio de avaliação do potencial citotóxico empregando a SRB foi realizado conforme a metodologia proposta por (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

Suspensões de cada linhagem celular foram distribuídas em placas de 96 cavidades (1x10⁴ células/cavidade) e incubadas por 24 h, a 37 °C, em estufa de CO₂. Após esse intervalo, foram realizados os tratamentos com as diferentes amostras, além dos controles positivos (paclitaxel para as linhagens tumorais), em diferentes concentrações, por meio de diluições seriadas na razão 1:2, e as placas foram incubadas por 48 h.

Depois desse período, foram adicionados, em cada cavidade, 100 µL de solução de ácido tricloroacético (10% v/v), para fixação das células, e a placa foi incubada a 4°C por uma hora. Em seguida as cavidades foram lavadas com água destilada por quatro vezes. Após período de secagem, adicionaram-se 100 µL de solução ácida de sulforrodamina B (0,057% p/v), mantendo a placa por 30 min em temperatura ambiente. A solução foi removida e a placa lavada por três vezes com ácido acético (1% v/v). Posteriormente, foi adicionada solução de Tris Base 10 mM (pH 10,5) em cada cavidade, para leitura das absorvâncias em espectrofotômetro, a 510 nm.

Os valores de absorvância medidos para cada concentração de cada amostra testada foram transformados em porcentagens de viabilidade (X%), em relação aos controles celulares (CC), os quais foram considerados 100% viáveis. Para tal, foi utilizado a seguinte fórmula:

$$X\% = \frac{(\text{absorvância amostra}) \times 100}{CC}$$

4.12.3 Análises estatísticas

Os percentuais de viabilidade foram transferidos para o software de estatística *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software Inc., EUA), e, através de análise de regressão não linear, calculou-se os valores de CI_{50} , ou seja, a concentração de cada amostra que reduz em 50% a viabilidade celular. Os valores de CI_{50} calculados representam a média de três experimentos independentes e são expressos com seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comparação dos perfis cromatográficos dos extratos de folhas e caules

Todos os extratos obtidos por maceração foram analisados por UPLC-ESI-MS e observou-se uma semelhança entre os perfis cromatográficos dos extratos de folhas e caules da mesma espécie. Nos cromatogramas dos extratos obtidos a partir de folhas observa-se uma tendência dos picos a apresentarem maior intensidade, em relação àqueles dos extratos de caules (**Figura 4**). Os cromatogramas obtidos para as demais espécies encontram-se em anexo (APÊNDICES A, B, C, D, E, F e G).

Diante disso, optou-se por utilizar somente os extratos obtidos a partir de folhas nos testes de citotoxicidade, já que a quantidade de droga vegetal e a intensidade dos picos observados revelaram-se maiores em relação àqueles obtidos para os caules. Adicionalmente, no caso da maceração, os rendimentos extrativos dos extratos das folhas foram mais elevados que os obtidos para os caules.

Em relação as amostras com as mesmas identificações botânicas, também foi observado uma semelhança entre os perfis cromatográficos (APÊNDICES H, I e J), optando-se assim por testar apenas um dos extratos de uma mesma espécie. A única exceção foi observada nos dois extratos das partes aéreas de *B. opuntioides*, que apesar da mesma identificação botânica, apresentam perfis cromatográficos com baixa similaridade (**Figura 5**). O perfil de metabólitos secundários nas plantas pode ser determinado por diferentes fatores. As características genótípicas e a fenologia são elementos que determinam o perfil fitoquímico de uma espécie. Além disso, fatores bióticos (patógenos e herbívoros) e abióticos (luz, temperatura, nutrientes e disponibilidade de água), bem como condições geográficas, podem afetar diretamente a composição química de uma planta (FILIPPINI *et al.*, 2010; MOURA *et al.*, 2010).

Figura 4: Comparação dos perfis cromatográficos, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos etanólicos de folhas e caules das espécies de *B. brevifolia* (A) e *B. calvescens* (B). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).

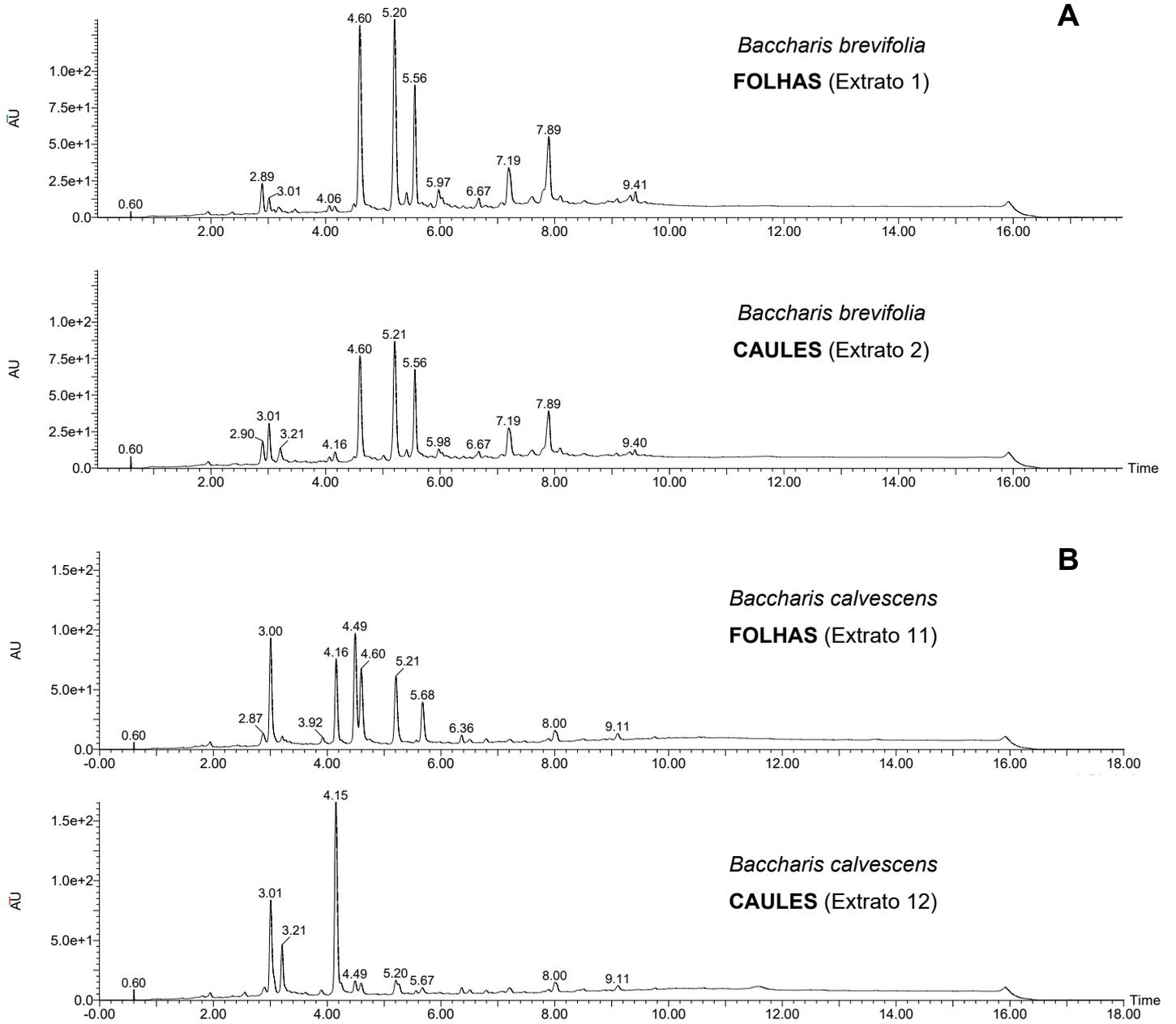
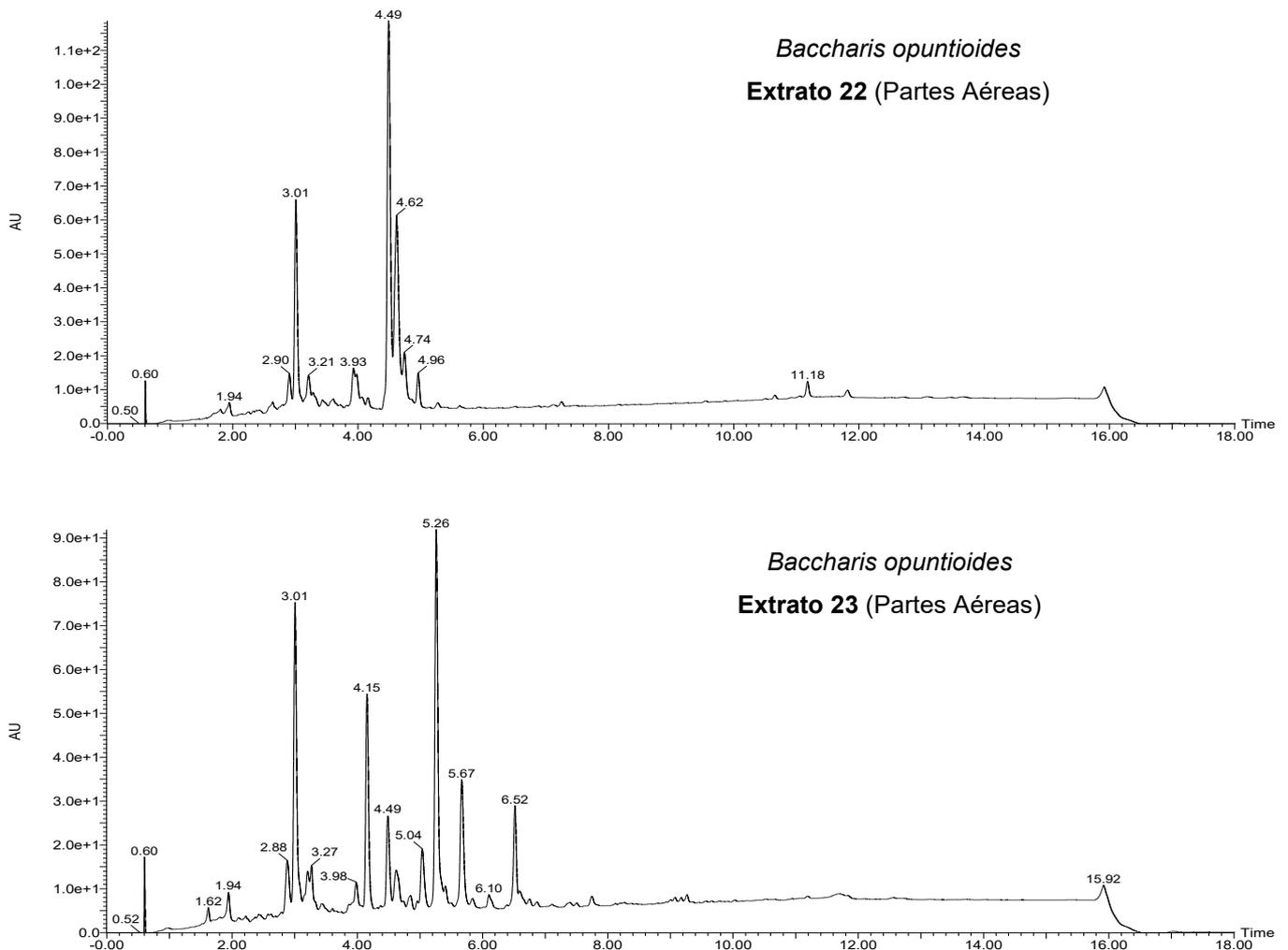


Figura 5: Comparação dos perfis cromatográficos, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de partes aéreas de duas amostras de *B. opuntioides*. (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8).



5.2 Avaliação da atividade citotóxica dos extratos obtidos por maceração

Os modelos de triagem citotóxica fornecem dados preliminares importantes para ajudar na seleção de extratos de plantas com potenciais propriedades antineoplásicas (BASKAR *et al.*, 2010). O ensaio de sulforrodamina B (SRB) é um exemplo disso, pois foi desenvolvido justamente para o programa de descoberta de medicamentos antineoplásicos em larga escala do *Nacional Cancer Institute* (NCI), dos Estados Unidos. Esse ensaio se baseia na capacidade do corante SRB de se ligar à resíduos básicos de proteínas e, quando extraído quantitativamente das células, é solubilizado

para medição da densidade óptica (DO). É um método apropriado e sensível para medir a citotoxicidade induzida por uma substância e útil para quantificar a clonogenicidade, além de ser uma técnica rápida e barata (VOIGT, 2005).

Diante dos relatos na literatura sobre a atividade citotóxica de espécies do gênero *Baccharis*, frente a diferentes modelos experimentais, foi realizada uma triagem citotóxica, com a linhagem tumoral A549 (adenocarcinoma de pulmão), de todos os extratos de folhas obtidos por maceração.

Utilizou-se o método da sulforrodamina B (SRB), descrito na sessão 4.11.2 e, a concentração máxima testada estabelecida foi de 100 µg/mL, para todos os extratos. Para o controle positivo foi utilizado o paclitaxel (PTX), em uma concentração máxima de 1 µM. O solvente de diluição das amostras foi o DMSO e o limite de concentração tóxica desse solvente nos experimentos (<1%) não foi ultrapassado, conforme estabelecido por Vichai e Kirtikara (2006). Os valores de CI_{50} dos extratos em células A549 encontram-se reunidos na **Tabela 10**.

Tabela 10: Resultados da avaliação citotóxica dos extratos de espécies de *Baccharis*, obtidos por maceração, em células A549

Número do extrato	Extrato	CI_{50} (µg/mL)	IC 95%
<i>Serra da Calçada (MG)</i>			
1	<i>B. brevifolia</i>	63,42 ± 0,40	47,05 - 85,48
3	<i>B. myriocephala</i>	83,39 ± 0,37	55,32 - 125,70
6	<i>B. reticularia</i>	> 100	-
8	<i>B. retusa</i>	> 100	-
<i>Parque Nacional do Caparaó (MG/ES)</i>			
10	<i>B. altimontana</i>	> 100	-
11	<i>B. calvescens</i>	93,09 ± 0,35	65,85 - 131,60
15	<i>B. imbricata</i>	42,24 ± 0,54	32,63 - 54,67
16	<i>B. hemiptera</i>	> 100	-
18	<i>B. magnifica</i>	81,10 ± 0,35	43,93 - 149,70
20	<i>B. megapotamica</i>	1,38 ± 0,22	0,82 - 2,30

22	<i>B. opuntioides</i>	> 100	-
23	<i>B. opuntioides</i>	> 100	-
24	<i>B. parvidentata</i>	> 100	-
32	<i>B. platypoda</i>	> 100	-
-	PTX	0,02 ± 0,12 µM	0,01 - 0,03

Valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão

Faixa de Concentração: (Extratos: 0,78 - 100 µg/mL); (PTX: 0,008 - 1,0 µM)

^aCI₅₀ = concentração que inibiu em 50% o crescimento das células A549

^bIC95% = intervalo de confiança de 95%

De acordo com o NCI, um extrato bruto é considerado promissor para purificação adicional quando apresenta valores de CI₅₀ menores que 30 µg/mL (JAIN; JAIN, 2011). No presente trabalho foram considerados os extratos que apresentaram valores de CI₅₀ menores que 50 µg/mL. Dessa forma, os extratos de *B. imbricata* (CI₅₀ = 42,24 ± 0,54 µg/mL) e de *B. megapotamica* (CI₅₀ = 1,38 ± 0,22 µg/mL) foram selecionados para dar prosseguimento aos estudos.

As espécies *B. brevifolia*, *B. myriocephala*, *B. calvescens* e *B. magnifica* apresentaram valores de CI₅₀ 63,42 ± 0,40 µg/mL; 83,39 ± 0,37 µg/mL; 93,09 ± 0,35 µg/mL e 81,10 ± 0,35 µg/mL respectivamente, e por isso não foram selecionadas. O mesmo ocorreu com os extratos de *B. reticularia*, *B. retusa*, *B. altimontana*, *B. hemiptera*, *B. opuntioides*, *B. parvidentata* e *B. platypoda*, cujos valores de CI₅₀ extrapolaram a faixa de concentração preestabelecida.

Em estudos da espécie *B. megapotamica*, conhecida por causar intoxicação severa em gado na América do Sul, foi relatada a presença de tricotecenos macrocíclicos, que até então eram substâncias encontradas apenas em espécies de fungos do solo (JARVIS *et al.*, 1988). Assim, Kupchan *et al.* (1976) demonstraram a atividade inibitória *in vitro*, frente a células KB (carcinoma de nasofaringe) e *in vivo*, em P388 (modelo murino de leucemia), do extrato etanólico dessa mesma espécie. Posteriormente foram isolados os compostos responsáveis pela atividade antileucêmica relatada (KUPCHAN *et al.*, 1977a; JARVIS *et al.*, 1987). Em relação a *B. imbricata*, não foram encontrados estudos que relatassem a atividade citotóxica dessa espécie.

As espécies de *B. imbricata* e *B. megapotamica* foram selecionadas para a realização de uma percolação exaustiva e subsequente fracionamento entre solventes imiscíveis (hexano, diclorometano e acetato de etila), conforme descrito na sessão 4.7. A percolação é um método extrativo mais eficiente que a maceração, já que, continuamente, o solvente saturado é substituído, levando ao esgotamento do material vegetal (ZHANG; LIN; YE, 2018). O fracionamento de extratos vegetais, com o procedimento clássico de partição entre solventes imiscíveis, tem por objetivo separar os compostos considerando sua solubilidade e seu coeficiente de partição em diferentes solventes (REGINATTO, 2017).

5.3 Análise dos extratos selecionados e respectivas frações por UPLC-ESI-MS/MS

Os estudos de desreplicação caracterizam-se pela separação de componentes de matrizes complexas, utilizando métodos cromatográficos e espectroscópicos, muitas vezes concomitantemente com estudos de bioatividade. Destacam-se para esse tipo de estudo as técnicas hífenadas e, baseando-se na comparação das informações obtidas em bancos de dados, é possível detectar compostos já conhecidos ou até elucidar estruturalmente novos componentes (LANG *et al.*, 2008). A espectrometria de massas em tandem (MS/MS) é utilizada para produzir informações estruturais para elucidação de analitos, já que é possível obter fragmentações específicas de determinado íon precursor (CHROMacademy, 2018).

Esses métodos têm sido empregados na identificação de metabólitos secundários em extratos e frações vegetais, como é o caso do estudo feito por Rameshkumar *et al.* (2013), que identificou diversos compostos fenólicos, conhecidos e inéditos, utilizando UPLC-MS/MS, no extrato das folhas de *Merremia emarginata*, uma planta com propriedades nefroprotetoras cultivada na Índia. Outro exemplo é relatado por TORRES *et al.* (2018), que investigaram a composição química de extratos de própolis por UPLC-Q/TOF-MS/MS, identificando vários flavonoides e terpenos como constituintes principais.

No presente trabalho, a técnica de UPLC-ESI-MS/MS foi adotada com o objetivo de identificar os principais metabólitos especiais presentes nos extratos e frações de *B. imbricata* e *B. megapotamica*, a fim de avaliar previamente o perfil fitoquímico dessas

espécies. Utilizou-se como estratégia a comparação dos dados espectrométricos e espectroscópicos das substâncias analisadas com aqueles já descritos na literatura para substâncias já identificadas em outras espécies desse mesmo gênero. Dessa forma, foi efetuada uma revisão da literatura extensiva e os dados obtidos (estrutura química, massa molar, etc.) foram compilados em uma tabela, utilizada como base de dados para as análises desenvolvidas nesse trabalho.

Entre os principais constituintes do gênero *Baccharis* descritos na literatura, os compostos fenólicos e os terpenóides são os metabólitos especiais mais citados. De maneira geral, os flavonoides e os diterpenos são as classes mais encontradas no gênero. Dentre as substâncias identificadas em maior número nas espécies estão os flavonoides: quercetina, canferol, apigenina e aromadendrina; os ácidos fenólicos: artepilina C, drupanina, ácido ferúlico, ácido cafeico e ácido dicafeoilquinico e os terpenóides: ácido oleanólico e α -espinasterol (CAMPOS *et al.*, 2016).

A análise dos extratos de *B. imbricata* e *B. megapotamica*, bem como das respectivas frações obtidas foi feita por UPLC-ESI-MS/MS. Os cromatogramas do extrato e das frações de *B. imbricata* e *B. megapotamica* encontram-se representados na **Figura 6** e **Figura 16**, respectivamente.

Com base nos espectros no ultravioleta (UV), foi possível identificar, em ambos os extratos etanólicos e respectivas frações, substâncias com cromóforos característicos. Assim, observou-se a presença de compostos derivados do ácido clorogênico, que apresentam absorção no UV com $\lambda_{\text{máx}}$ em aproximadamente 325 nm e em 296 nm (ombro) (BELAY; GHOLAP, 2009), bem como flavonóis ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = 350-385 / banda II = 250-290) flavonas ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = 310-350 nm / banda II = 250-290) e flavanonas ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = ombro a 300-330 nm / banda II = 270-295) (TSIMOGIANNIS *et al.*, 2007). A relação massa/carga (m/z) de cada pico do extrato, os fragmentos obtidos por MS/MS e os possíveis compostos correspondentes de *B. imbricata* (**Tabela 11**) e *B. megapotamica* (**Tabela 12**) são apresentados.

Considerando a dificuldade de identificar todos os picos do cromatograma do extrato de *B. megapotamica*, os dados de alguns picos que apresentavam melhor resolução na fração diclorometânica (Fr. Dcm) foram selecionados para a tabela.

Figura 6: Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para o extrato etanólico e respectivas frações de *B. imbricata*.

(Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)

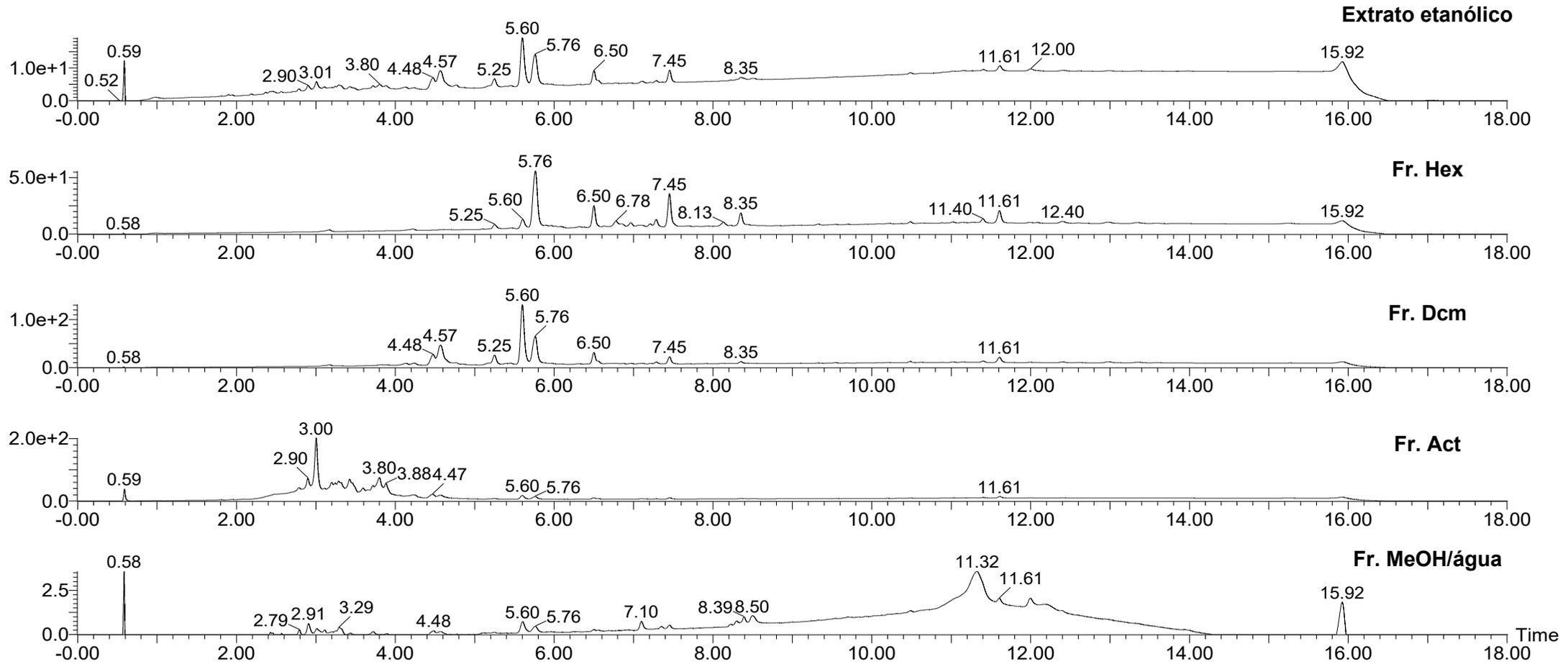


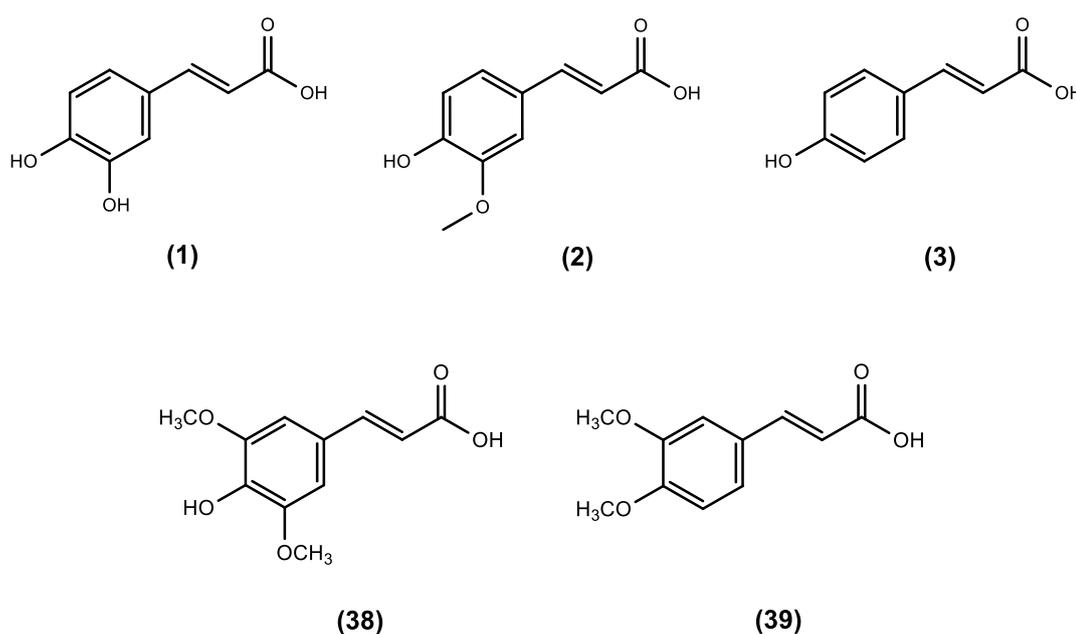
Tabela 11: Análise por UPLC-ESI-MS/MS do extrato etanólico e frações de *B. imbricata*. (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)

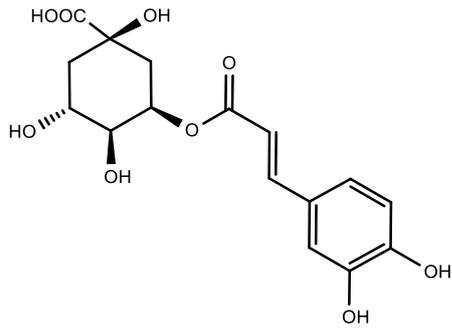
Pico	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	[M+H] ⁺ (m/z)	Íons dos Fragmentos m/z (%)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íons dos Fragmentos m/z (%)	Identificação
1i	2.90	325 295 (ombro)	579	409 (100), 405 (61), 393 (50), 361 (98), 325 (53)	577	367 (100)	Não identificado
2i	3.01	325 295 (ombro)	517	163 (100)	515	191 (79), 179 (100), 173 (79)	Ácido di-O-cafeoilquínico
3i	3.43	325 295 (ombro)	531	177 (100), 151 (64), 143 (100), 133 (100)	529	193 (100), 179 (17), 175 (72), 173 (93)	Ácido O-cafeoil-O-feruloilquínico
4i	3.80	325 295 (ombro)	-	-	543	349 (62), 349 (8), 193 (36), 193 (36), 179 (100), 173 (36), 155 (64)	Ácido di-O-feruloilquínico
5i	4.48	355 270	331	316 (13), 301 (100), 298 (59)	329	299 (100), 271 (65)	Flavonol (dimetilado)
6i	4.57	333 270	317	302 (100), 257 (54)	315	300 (47), 271 (100), 255 (89), 167 (58)	Flanona (metilada)
7i	5.25	325(ombro) 288	287	161 (95), 153 (100)	285	269 (100), 243 (33), 164 (32)	Flavanona
8i	5.60	361 270	301	286 (54), 269 (38), 258 (40), 177 (35), 153 (31), 139 (57)	299	284 (100), 242 (20), 150 (22)	Flavonol (metilado)
9i	5.76	360 / 332 268 / 272	331	316 (100), 301 (39), 287 (14)	329	299 (18), 271 (100)	Flavona (dimetilada)
10i	6.50	223	401	317 (100)	399	315 (100), 300 (44)	Não identificado
11i	7.45	223	305	191 (100)	-	-	Não identificado

(%): abundância relativa

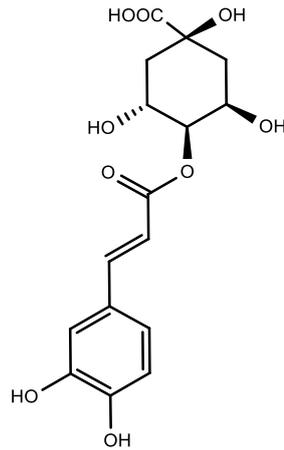
Os ácidos clorogênicos constituem uma família de ésteres formados entre o ácido quínico e resíduos de certos ácidos *trans*-cinâmicos, mais comumente os ácidos cafeico (1), ferúlico (2) e *p*-cumárico (3). Os ácidos sinápico (38) e dimetoxicinâmico (39) também ocorrem em algumas espécies vegetais (ZHENG; CLIFFORD, 2008). Os passos iniciais da biossíntese dos ácidos clorogênicos ocorrem pela via fenilpropanoide e, as enzimas que catalisam as conversões, produzem inicialmente o ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-CQA) (40). O composto mais abundante em plantas é o 5-CQA (40) e acredita-se que os demais isômeros (4-CQA (41) e 3-CQA (42)) sejam derivados dele, embora não haja dados sobre enzimas específicas envolvidas nessas conversões. Além disso, pouco se sabe sobre a biossíntese dos di- e tri-CQAs. No que diz respeito a produção do ácido feruloilquínico (FQA) (5-FQA (43), 4-FQA (44) e 3-FQA (45)), a enzima CCoAOMT (*S*-adenosil-L-metionina:cafeoil-CoA-3-*O*-metiltransferase) catalisa a conversão da cafeoil-CoA em feruloil-CoA (CLIFFORD *et al.*, 2017).

Técnicas como LC/MSⁿ têm sido utilizadas para caracterizar esses compostos e diferenciar isômeros de ácido monoacil- e diacil-clorogênicos. Os padrões de fragmentação são altamente diagnósticos na isomeria estrutural dos substituintes, constituindo uma ferramenta confiável e preditiva (JAISWAL; KUHNERT, 2010).

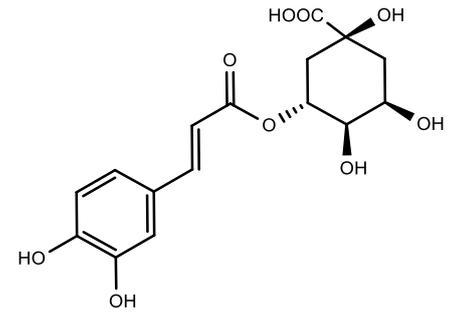




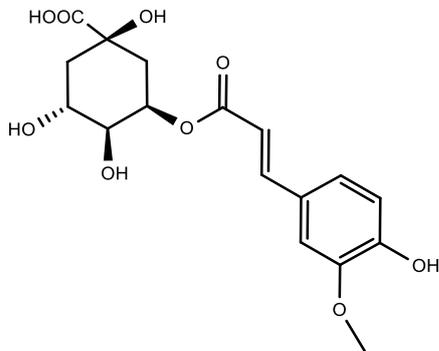
(40)



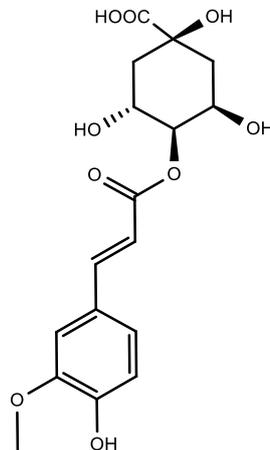
(41)



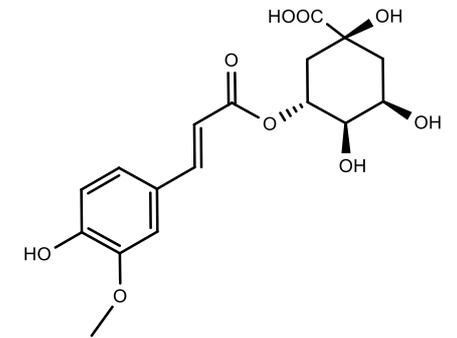
(42)



(43)



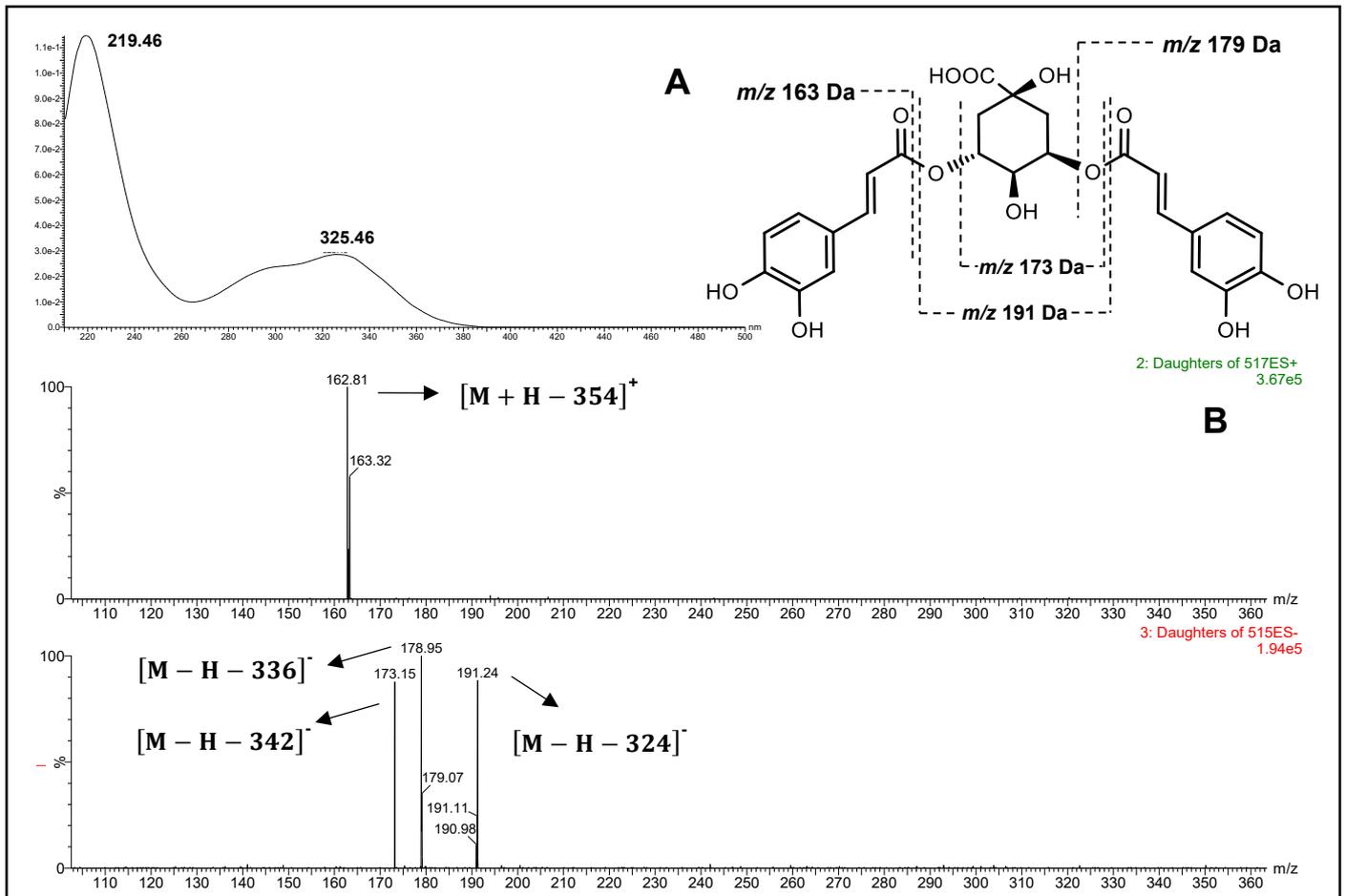
(44)



(45)

No pico 2i ($\lambda_{\text{máx}} = 325 \text{ nm}$ e 295 nm (ombro)), o íon em m/z 515 $[\text{M-H}]^-$ apresenta fragmentos em m/z 191, que pode corresponder ao [ácido quínico - H] $^-$; em m/z 179, correspondente a [cafeoil - H] $^-$ e em m/z 173, equivalente ao [ácido quínico - H₂O - H] $^-$ (**Figura 7**), sugerindo a presença de um isômero do ácido di-cafeoilquínico (di-CQA) (CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005).

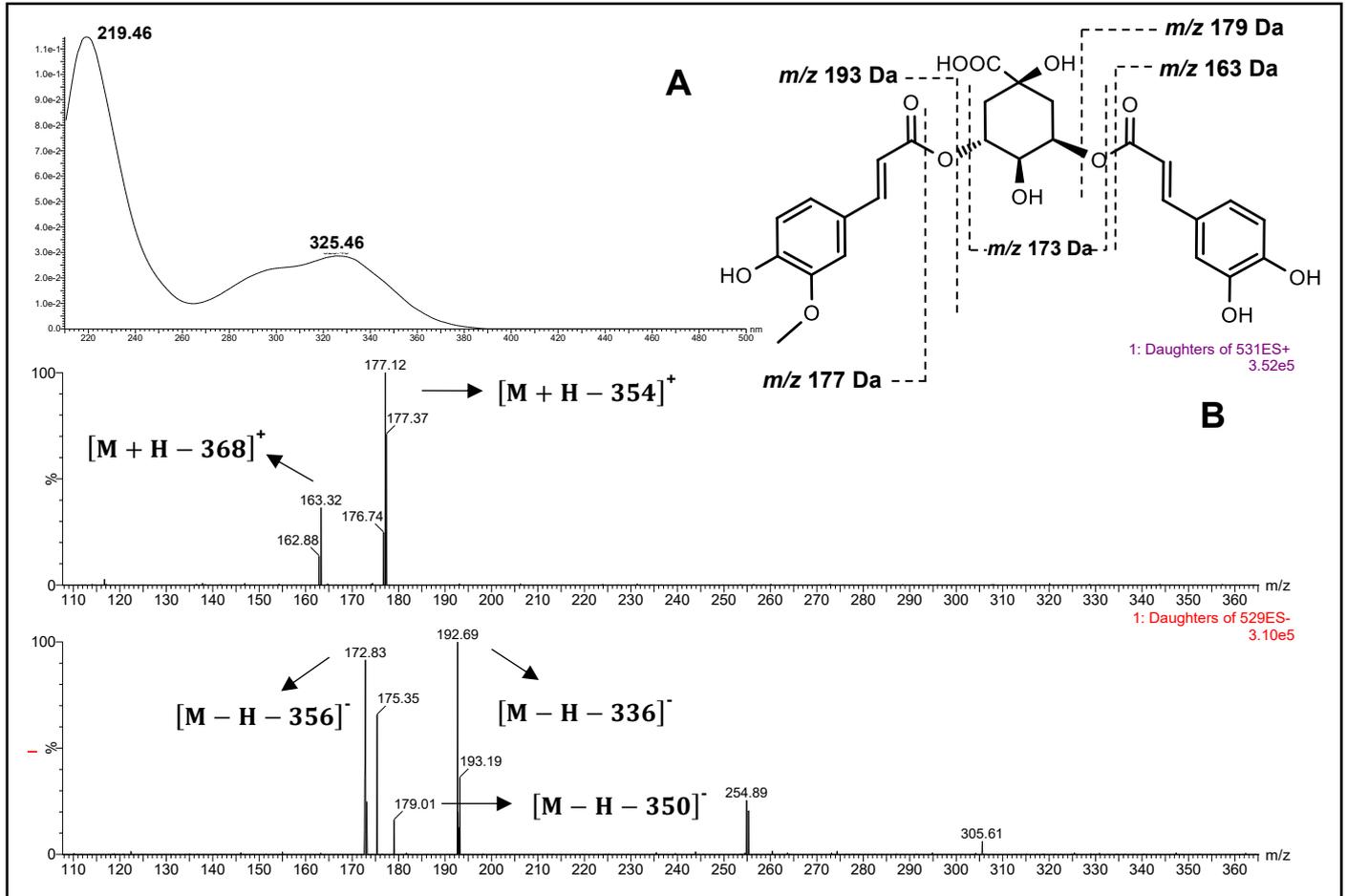
Figura 7: Espectro no UV (A) referente ao pico 2i (Tr = 3,01 min), espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 517 $[M+H]^+$ e m/z 515 $[M-H]^-$ (B) e as estruturas putativas dos fragmentos relacionados (extrato etanólico de *B. imbricata*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)



*Foi utilizado como exemplo um dos isômeros do ácido di-*O*-cafeoilquínico, o 3,5-diCQA.

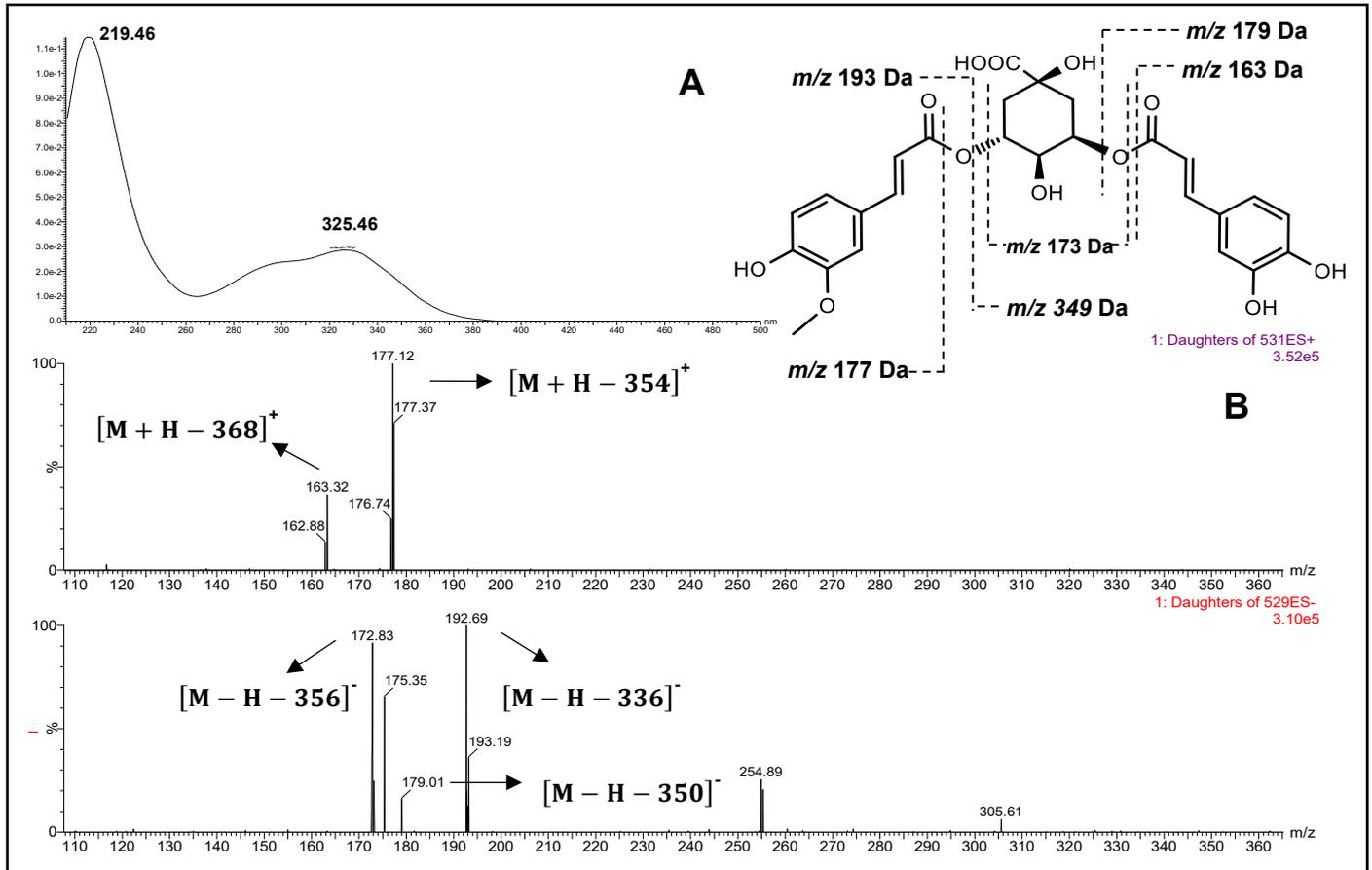
O pico 3i ($\lambda_{\text{máx}} = 325$ nm e 295 nm (ombro)), com o íon em m/z 529 $[M-H]^-$, apresenta fragmentos em m/z 193 e 179 equivalentes ao $[\text{feruloil} - H]^-$ e ao $[\text{cafeoil} - H]^-$, respectivamente, e em m/z 173, correspondente ao $[\text{ácido quínico} - H_2O - H]^+$ (**Figura 8**), o que indica a possível presença de um isômero do ácido cafeoil-feruloilquínico (CFQA) (CLIFFORD *et al.*, 2003). Já o pico 4i ($\lambda_{\text{máx}} = 325$ nm e 295 nm (ombro)), com íon em m/z 543 $[M-H]^-$ e fragmentos em m/z 349, 193, 173 equivalentes ao $[\text{ácido feruloilquínico} - H_2O - H]^-$, ao $[\text{feruloil} - H]^-$ e ao $[\text{ácido quínico} - H_2O - H]^+$ (**Figura 9**), respectivamente, apontando para presença putativa de um isômero do ácido di-feruloilquínico (di-FQA) (CLIFFORD *et al.*, 2006).

Figura 8: Espectro no UV (A) referente ao pico 3i (Tr = 3,43 min), espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 531 $[M+H]^+$ e m/z 529 $[M-H]^-$ (B) e as estruturas putativas dos fragmentos relacionados (extrato etanólico de *B. imbricata*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)



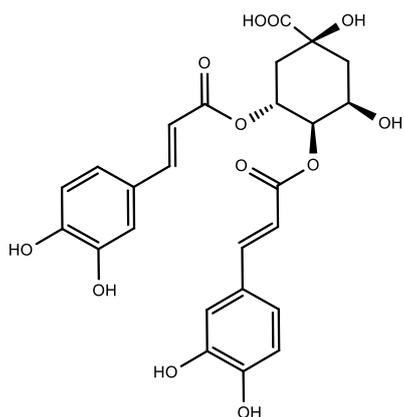
*Foi utilizado como exemplo um dos isômeros do ácido feruloil-cafeoilquínico, o 3F-5CQA.

Figura 9: Espectro no UV (A) referente ao pico 3i (Tr = 3,43 min), espectro de massas (MS/MS) do íon m/z 543 $[M-H]^-$ (B) e as estruturas putativas dos fragmentos relacionados (extrato etanólico de *B. imbricata*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)

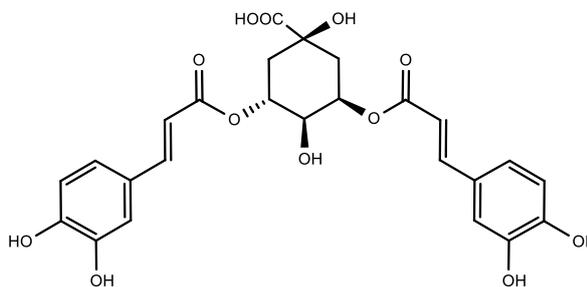


*Foi utilizado como exemplo um dos isômeros do ácido feruloil-cafeoilquínico, o 3F-5CQA.

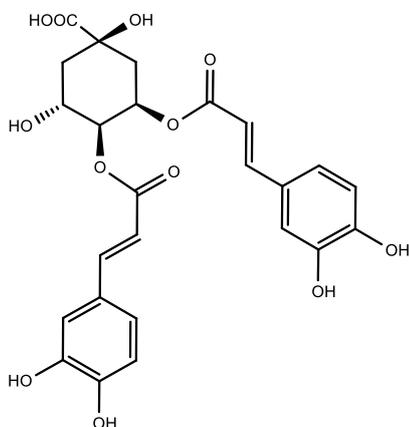
É importante ressaltar, que alguns derivados do ácido clorogênico já foram descritos para espécies de *Baccharis*, como os 3,4-diCQA (46), 3,5-diCQA (47) e 4,5-diCQA (48), presentes nas espécies *B. retusa*, *B. trimera*, *B. incarum*; o ácido 5-CQA encontrado em *B. chilco*, *B. trimera*, *B. grisebachii* e o ácido 3,4,5-triCQA (49), presente em *B. trimera* (ZAMPINI; ISLA; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2009; GRECCO *et al.*, 2012; ABOY *et al.*, 2012).



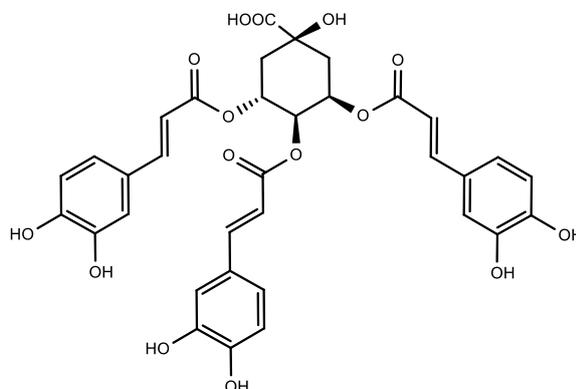
(46)



(47)



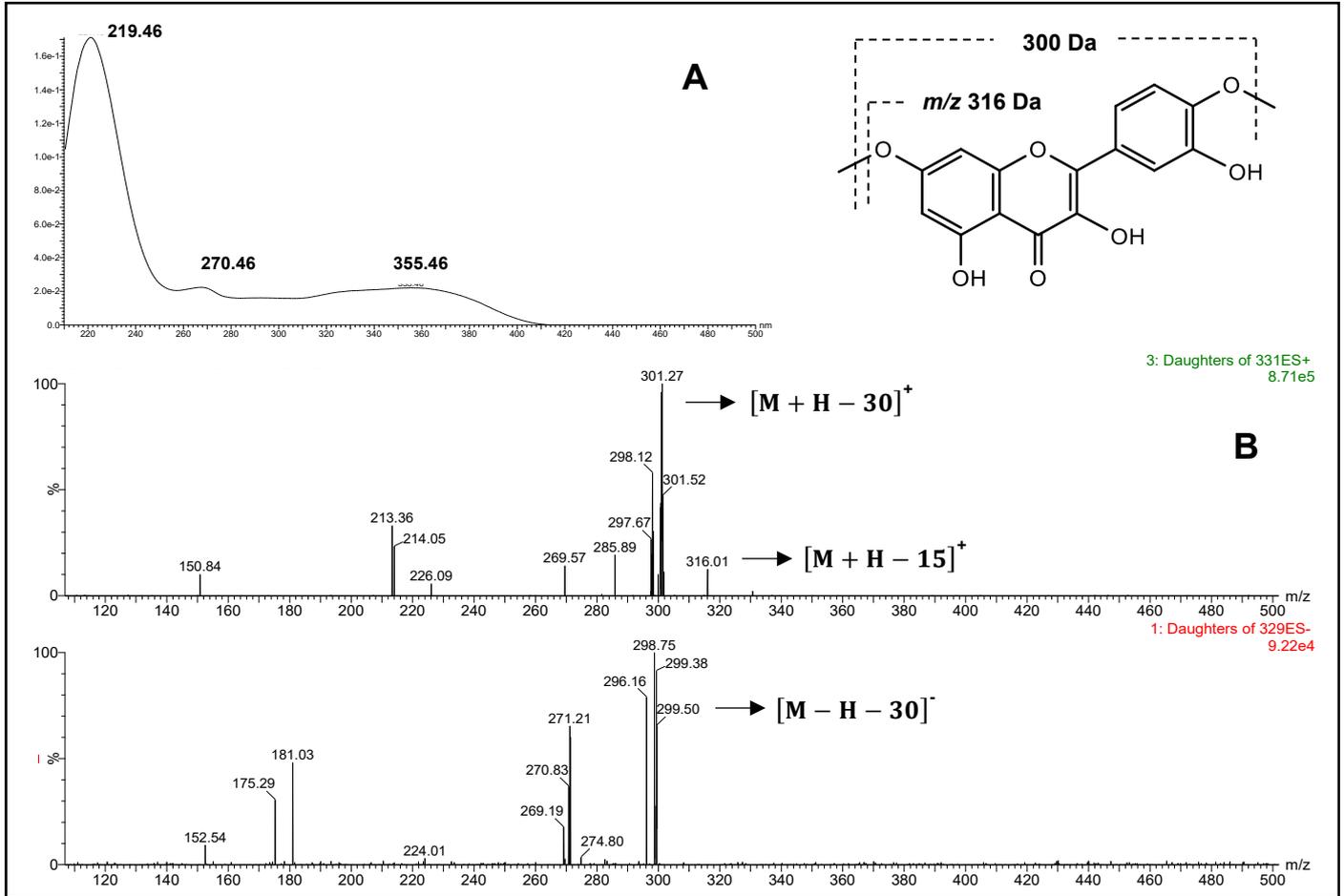
(48)



(49)

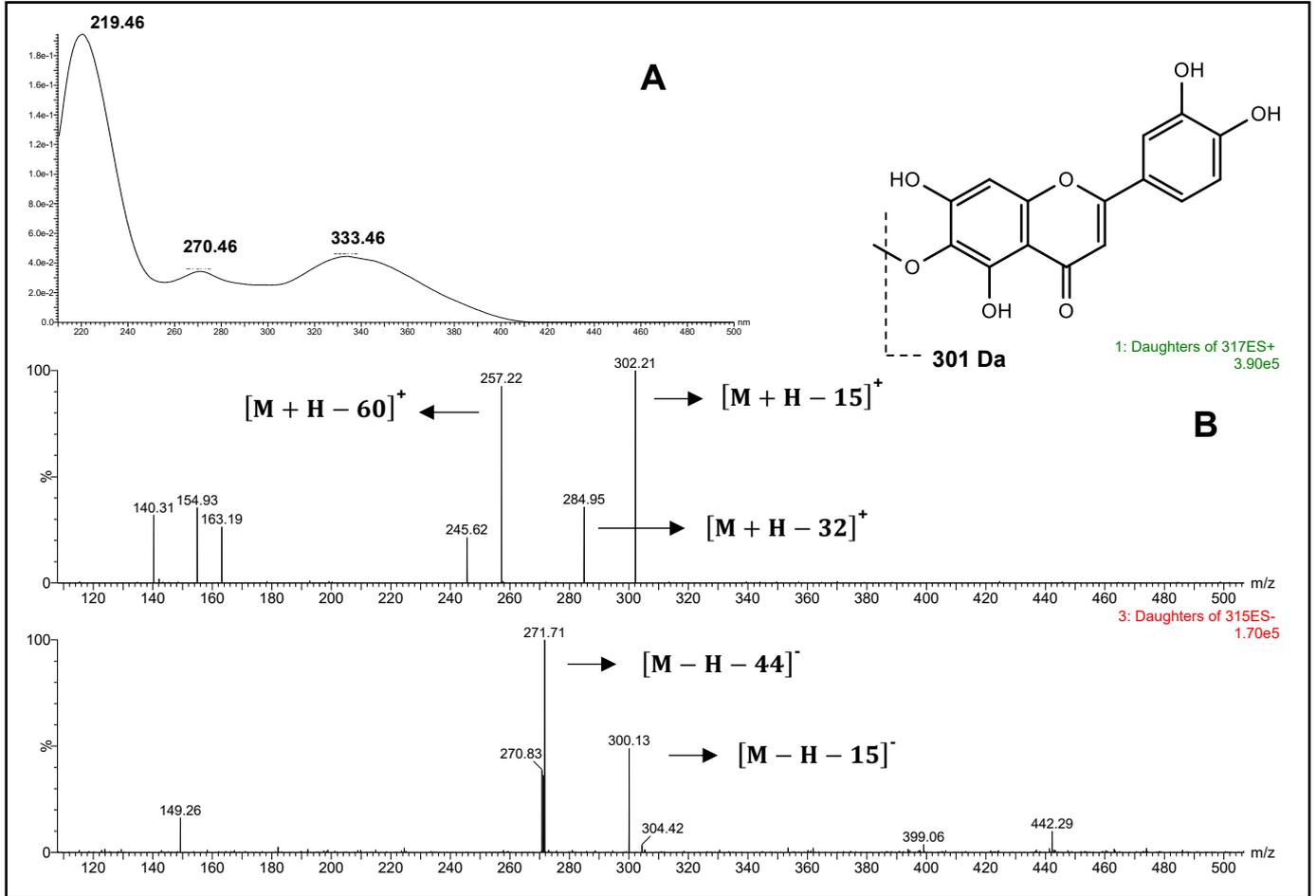
Em relação aos flavonoides, existem vários que já foram descritos para esse gênero e com a análise do extrato de *B. imbricata* é possível inferir a presença de alguns deles nessa espécie. O pico 5i com íon em m/z 331 $[M-H]^-$ e fragmentos de m/z 316 e 301 se referem a um flavonol ($\lambda_{m\acute{a}x}$: banda I = 355 nm / banda II = 270 nm) com dois grupos metoxila (**Figura 10**). Não existe na literatura nenhum composto com essas características que foi isolado de espécies de *Baccharis*. O pico 6i com íon em m/z 315 $[M-H]^-$ e fragmentos de m/z 300 e 271 indica a presença de uma flavona metoxilada ($\lambda_{m\acute{a}x}$: banda I = 333 nm / banda II = 270 nm) (**Figura 11**), sendo a nepetina (**50**) e a eupafolina (**51**) compostos com essas características já isolados de *B. flabellata*, *B. gaudichaudiana*, *B. trimera* e *B. linearis* (SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987; AKAIKE *et al.*, 2003).

Figura 10: Espectro no UV (A) referente ao pico 5i (Tr = 4,48 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 331 $[M+H]^+$ e m/z 329 $[M-H]^-$ (B) (extrato etanólico de *B. imbricata*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)

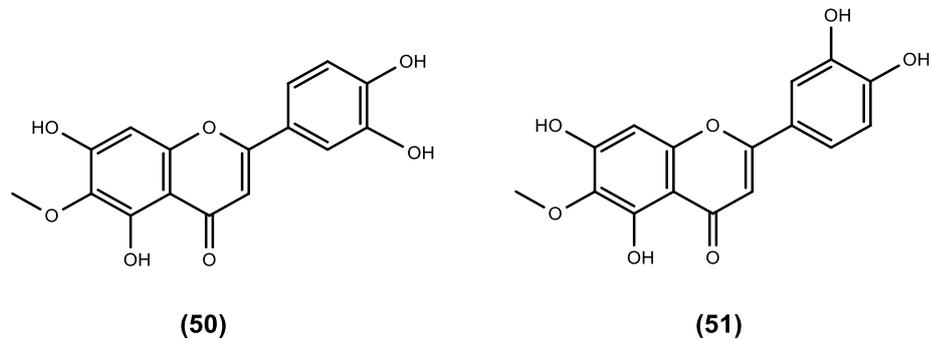


*Foi utilizado como exemplo a ombuina.

Figura 11: Espectro no UV (A) referente ao pico 6i (Tr = 4,57 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 317 $[M+H]^+$ e m/z 315 $[M-H]^-$ (B) (extrato etanólico de *B. imbricata*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)



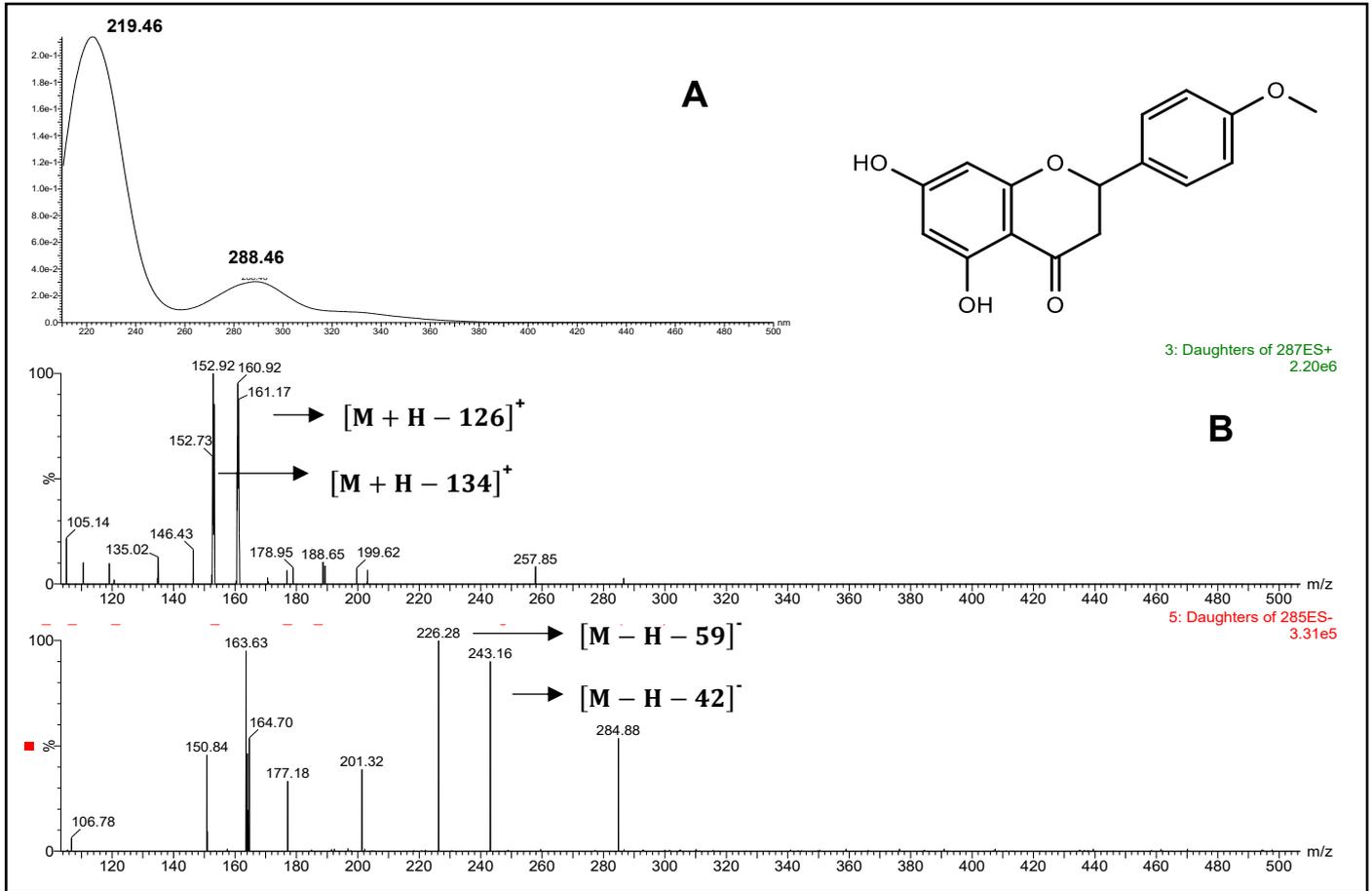
*Foi utilizado como exemplo a eupafolina.



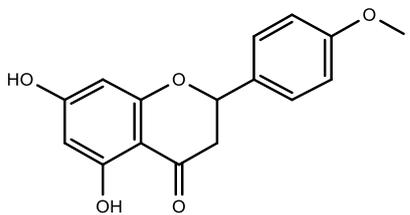
Com o pico 7i, que possui íons em m/z 287 $[M+H]^+$ e 285 $[M-H]^-$, é possível sugerir a presença de uma flavanona ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = 325 ombro nm / banda II = 288 nm) (**Figura 12**), e dentre os exemplos já isolados com essas características estão a

isosakuranetina (**52**), a sakuranetina (**53**) e a di-hidrooroxilina A (**54**) identificadas em *B. dracunculifolia*, *B. retusa*, *B. salicifolia* e *B. uncinella* (DEL CORRAL *et al.*, 2012; GRECCO *et al.*, 2012; GRECCO *et al.*, 2010). O pico 8i com íon em m/z 301 $[M+H]^+$ e fragmentos de m/z 286, 269, 258, 242, 153, 139 e em m/z de 299 $[M-H]^-$ com fragmento m/z 284 indica a presença de um flavonol metoxilado ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = 361 nm / banda II = 270 nm) (**Figura 13**). Na literatura, o único composto já isolado de *Baccharis* que corresponde a essas características é o isocanferídeo (**55**), derivado do canferol (**56**), encontrado em *B. papillosa* (ESCOBAR *et al.*, 2009). É possível identificar alguns fragmentos semelhantes na ionização do canferol com íon de m/z 287 $[M+H]^+$, que produz fragmentos com m/z 269, 259, 258, 165, 153 e 133 (MARCH; MIAO, 2004).

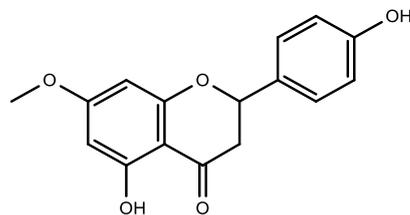
Figura 12: Espectro no UV (A) referente ao pico 7i (Tr = 5,25 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 287 $[M+H]^+$ e m/z 285 $[M-H]^-$ (B) (extrato etanólico de *B. imbricata*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)



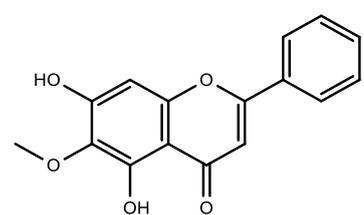
*Foi utilizado como exemplo a isosakuranetina



(52)

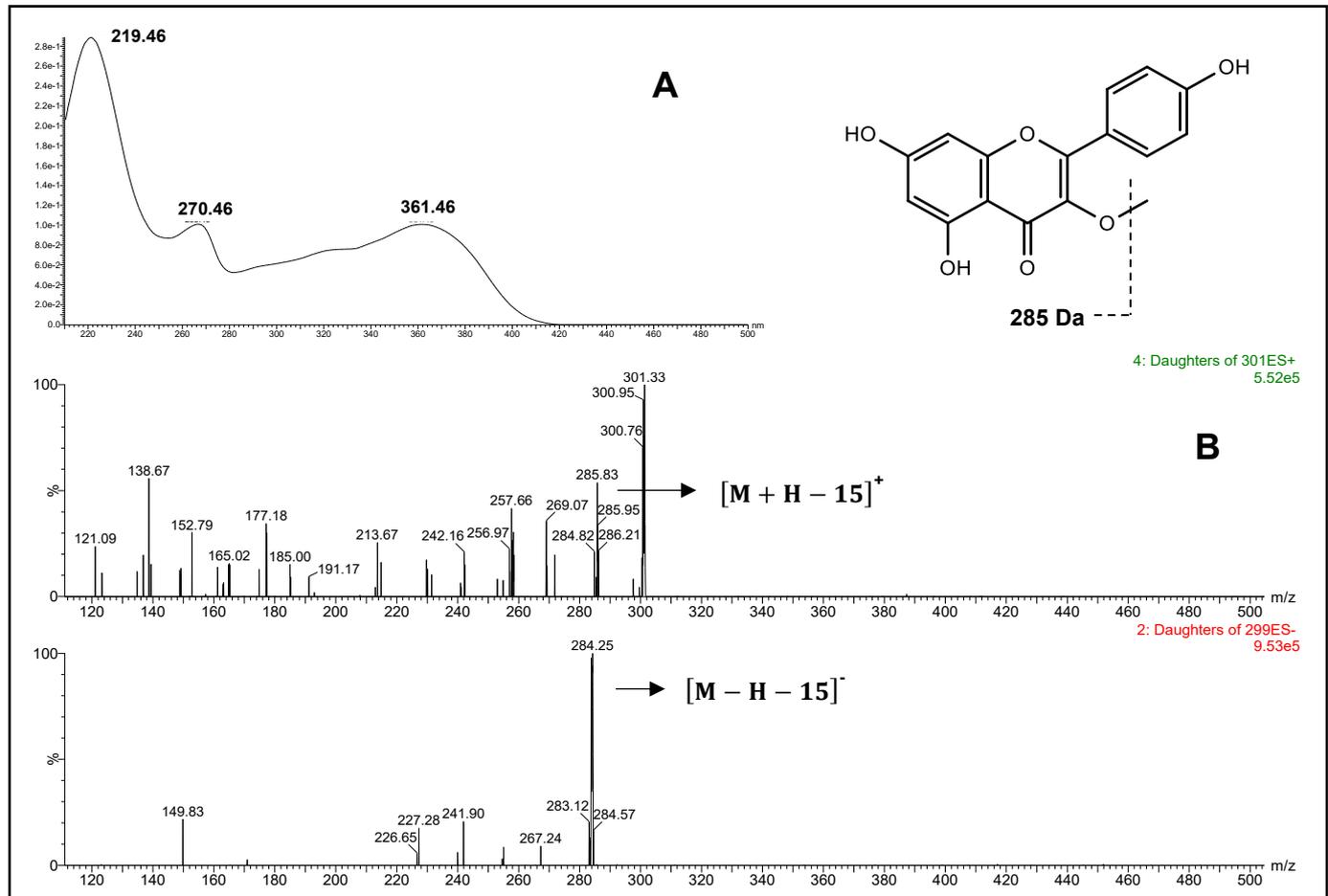


(53)

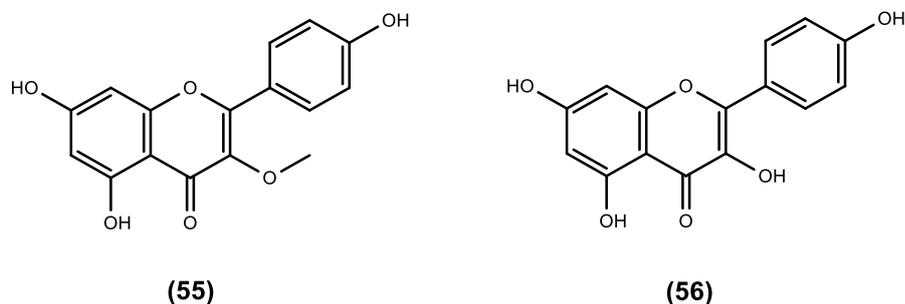


(54)

Figura 13: Espectro no UV (A) referente ao pico 8i (Tr = 5,60 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 301 $[M+H]^+$ e m/z 299 $[M-H]^-$ (B) (extrato etanólico de *B. imbricata*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)



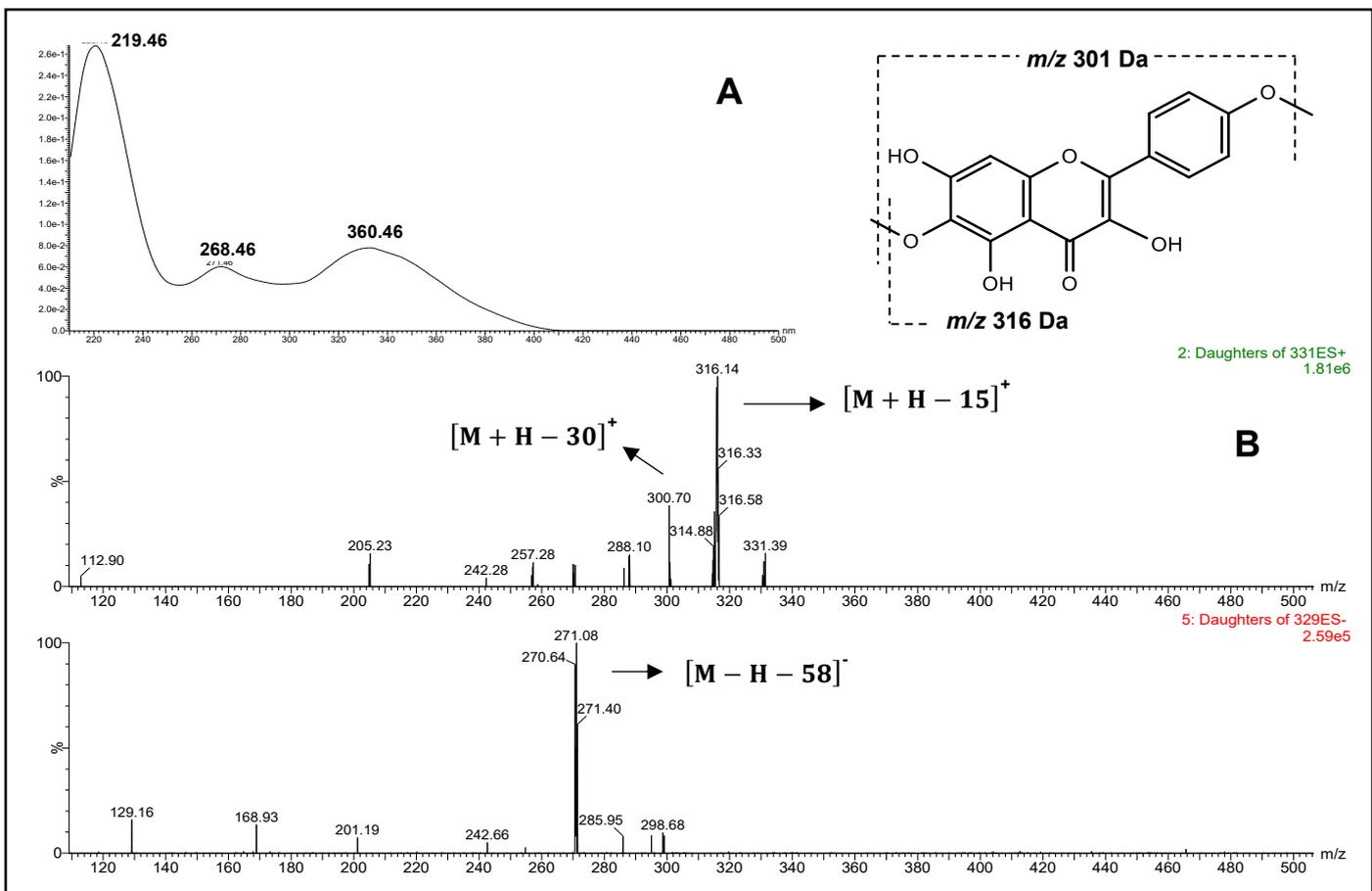
*Foi utilizado como exemplo isocanferideo.



O pico 9i com íon em m/z 331 $[M+H]^+$ e fragmentos de m/z 316 e 301 sugerem a presença de um flavonol dimetoxilado ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = 360 nm / banda II = 268 nm) (Figura 14). Não foi relatado na literatura nenhuma substância com essas

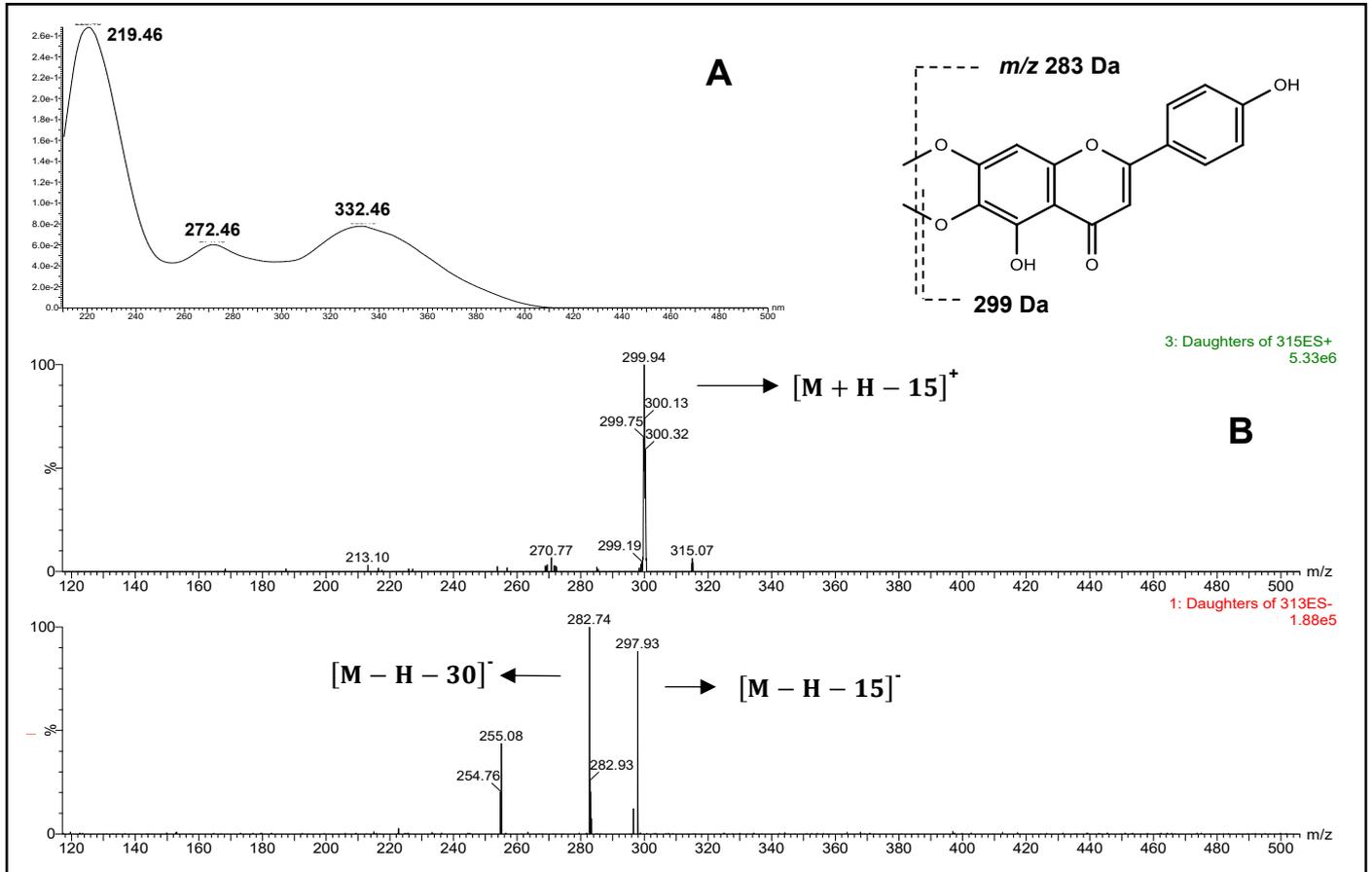
características isolada de espécies de *Baccharis*. Além disso, foi possível identificar também nesse pico íons em m/z 315 $[M+H]^+$ e em m/z 313 $[M-H]^-$, com fragmentos de m/z 300 e 298, respectivamente, sugerindo a presença de uma flavona dimetoxilada ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = 332 nm / banda II = 272 nm) (**Figura 15**) e, uma possível co-eluição de dois compostos. Também já foram identificados flavonas dimetoxiladas como a cirsimarina (**20**) em *B. rufescens* (CIFUENTE *et al.*, 2001) e a pectolinarigenina (**16**) em *B. uncinella* (GRECCO *et al.*, 2010), *B. pedunculata* (RAHALISON *et al.*, 1995) e *B. conferta* (WEIMANN *et al.*, 2002).

Figura 14: Espectro no UV (A) referente ao pico 9i ($T_r = 5,76$ min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 331 $[M+H]^+$ e m/z 329 $[M-H]^-$ (B) (extrato etanólico de *B. imbricata*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)

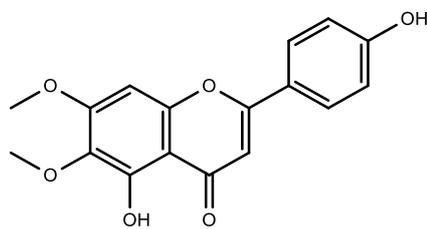


*Foi utilizado como exemplo o betuletol.

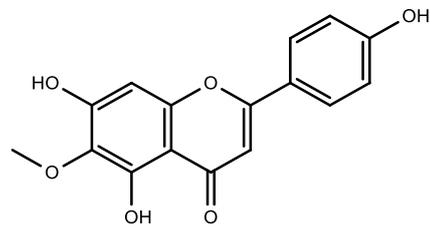
Figura 15: Espectro no UV (A) referente ao pico 9i (Tr = 5,76 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 315 $[M+H]^+$ e m/z 313 $[M-H]^-$ (B) (extrato etanólico de *B. imbricata*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)



*Foi utilizado como exemplo a cirsimarina.



(20)



(16)

Figura 16: Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para o extrato etanólico e respectivas frações de *B. megapotamica*.

(Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)

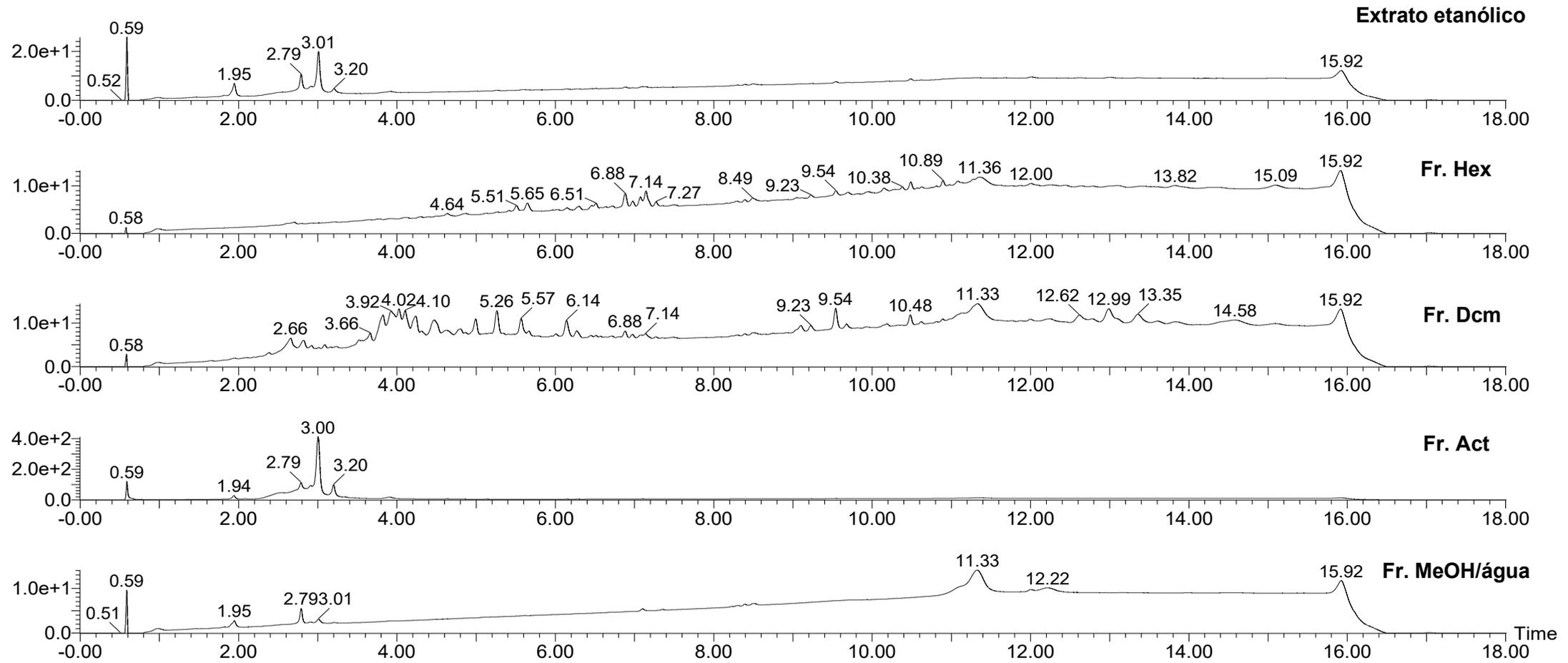


Tabela 12: Análise por UPLC-ESI-MS/MS do extrato etanólico e frações de *B. megapotamica*. (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)

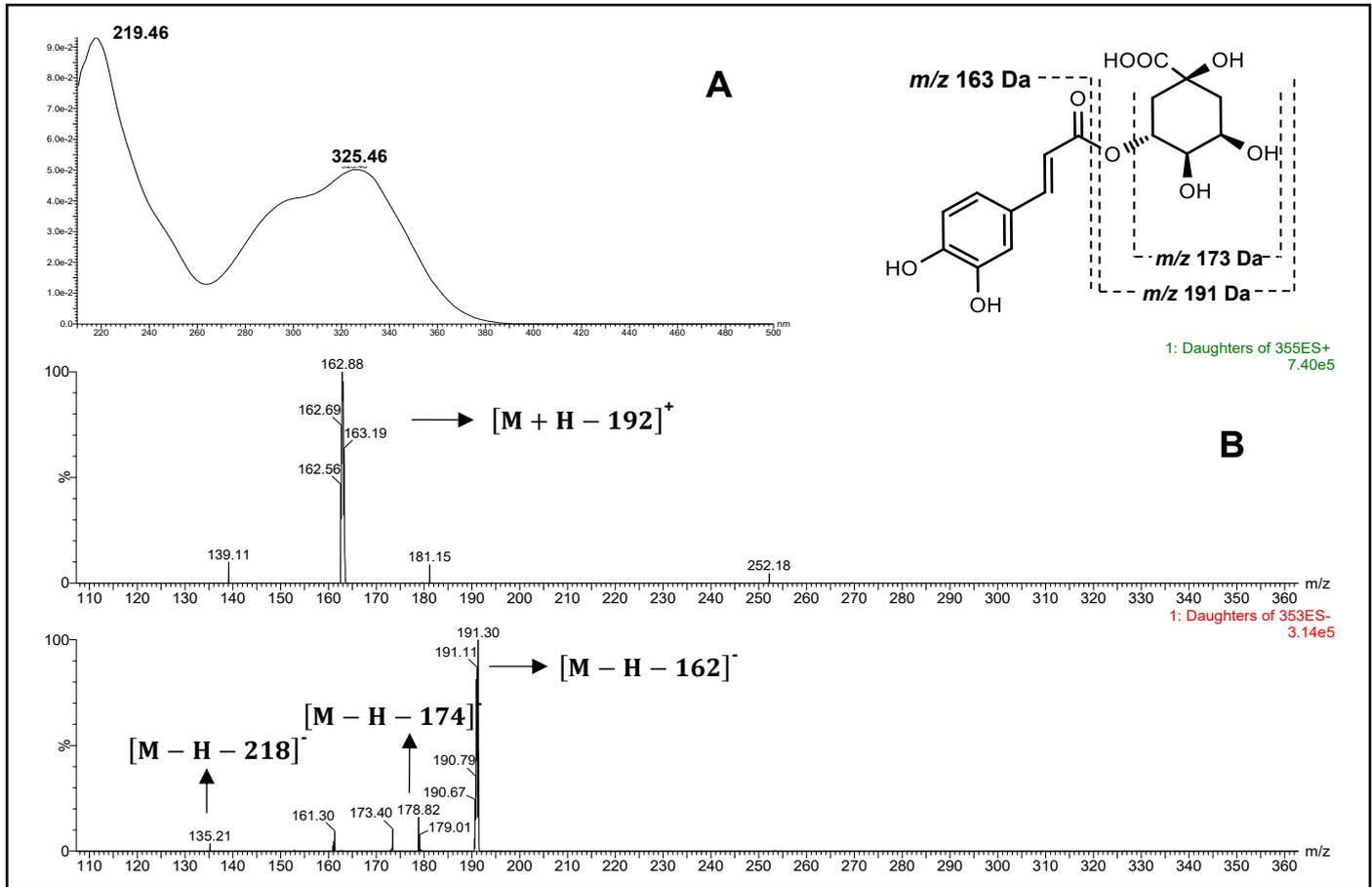
Pico	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	[M+H] ⁺ (m/z)	Íons dos Fragmentos m/z (%)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íons dos Fragmentos m/z (%)	Identificação
1m	1.95	325 295 (ombro)	355	163 (100)	353	191 (100), 179 (15), 173 (11), 161 (10), 135 (5)	Ácido O-cafeoilquínico
2m	2.79	333 295 (ombro) 265	611	303 (100), 147 (18), 145 (26), 128 (31)	609	301 (100)	Rutina
3m	3.01	325 295 (ombro)	517	(100)	515	353 (21), 191 (100), 179 (58), 173 (38), 135 (20)	Ácido di-O-cafeoilquínico
Fração diclorometânica (Fr. Dcm)							
4m	3.92	365 260	303	285 (38), 274 (79), 257 (75), 247 (15), 229 (68), 165 (86), 153 (29), 137 (22), 121 (30)	301	179 (71), 151 (100), 121 (53)	Quercetina
5m	4.10	261 220	549	247 (30), 231 (7), 229 (40), 199 (49), 183 (30), 171 (30), 155 (18), 137 (100), 131 (97), 113 (28)	547	416 (53), 265 (52), 237 (65), 217 (100), 171 (76), 165 (58), 153 (60)	Tricoteceno macrocíclico
6m	4.23	261 220	581	247 (80), 199 (20), 183 (28), 173 (25), 171 (14), 155 (25), 137 (100), 121 (15)	-	-	Tricoteceno macrocíclico
7m	4.47	325 (ombro) 265	571	527 (15), 391 (17), 307 (100)	-	-	Não identificado
8m	4.99	325 (ombro) 265	515	231 (23), 195 (19), 137 (34), 112 (100)	-	-	Não identificado

9m	5.26	313 220	309	159 (68), 133 (66), 129 (64), 121 (100)	307	235 (30), 211 (53), 185 (72), 163 (58), 121 (100)	Não identificado
10m	5.57	317 222	307	173 (100), 159 (38), 131 (47)	305	249 (68), 213 (58), 183 (32), 135 (100), 125 (48), 107 (59)	Não identificado
11m	6.14	307 223	-	-	461	285 (100), 229 (28), 241 (23), 223 (33), 191 (23),	Não identificado

(%): abundância relativa

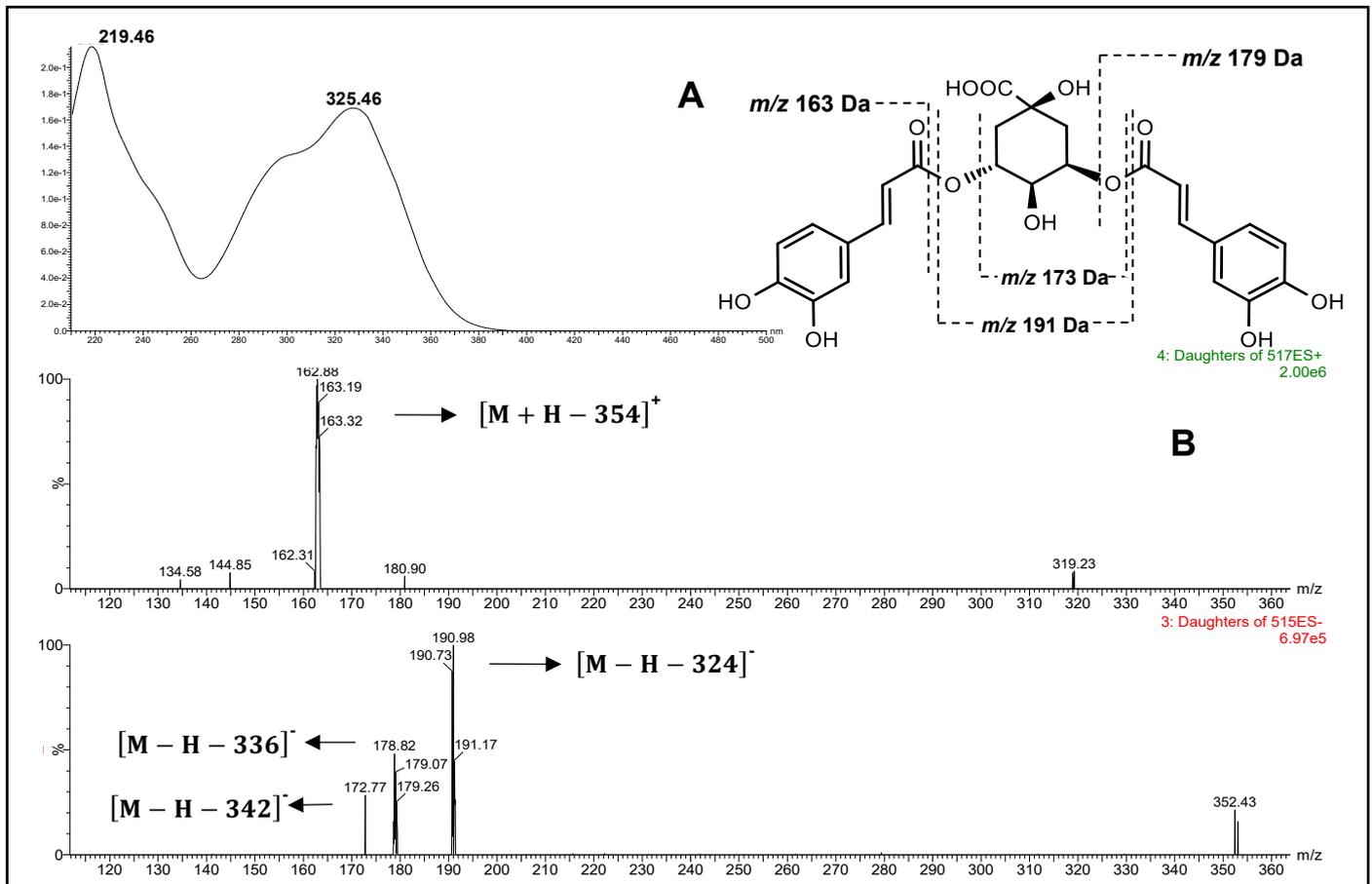
Quanto ao extrato etanólico de *B. megapotamica* também é possível observar a presença de derivados do ácido clorogênico. O pico 1m ($\lambda_{\text{máx}} = 325 \text{ nm}$ e 295 nm (ombro)) possui íon em m/z 353 $[\text{M-H}]^-$ e fragmentos em m/z 191, 179, 173 correspondentes ao $[\text{ácido quínico} - \text{H}]^-$; ao $[\text{cafeoil} - \text{H}]^-$ e ao $[\text{ácido quínico} - \text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$, respectivamente. Há ainda o fragmento em m/z 135, equivalente ao derivado descarboxilado do cafeoil (**Figura 17**). Assim, é possível inferir a presença de um isômero do ácido cafeoilquínico (CQA). Da mesma forma ocorre com o pico 3m ($\lambda_{\text{máx}} = 325 \text{ nm}$ e 295 nm (ombro)), com íon em m/z 515 $[\text{M-H}]^-$ e fragmentos de m/z 353, 191, 179, 173 e 135 correspondentes ao $[\text{ácido cafeoilquínico} - \text{H}]^-$, ao $[\text{ácido quínico} - \text{H}]^-$, ao $[\text{cafeoil} - \text{H}]^-$, ao $[\text{ácido quínico} - \text{H}_2\text{O} - \text{H}]^-$ e ao derivado cafeoil descarboxilado (**Figura 18**), respectivamente, sugerindo a presença de um isômero do ácido dicafeoilquínico (diCQA) (JAISWAL *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2016).

Figura 17: Espectro no UV (A) referente ao pico 1m (Tr = 1,95 min), espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 355 $[M+H]^+$ e m/z 353 $[M-H]^-$ (B) e as estruturas putativas dos fragmentos relacionados (extrato etanólico de *B. megapota mica*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental- item 4.8)



*Foi utilizado como exemplo um dos isômeros do ácido cafeoilquínico, o 3-O-CQA.

Figura 18: Espectro no UV (A) referente ao pico 3m (Tr = 3,01 min), espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 517 $[M+H]^+$ e m/z 515 $[M-H]^-$ (B) e as estruturas putativas dos fragmentos relacionados (extrato etanólico de *B. megapotamica*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental- item 4.8)

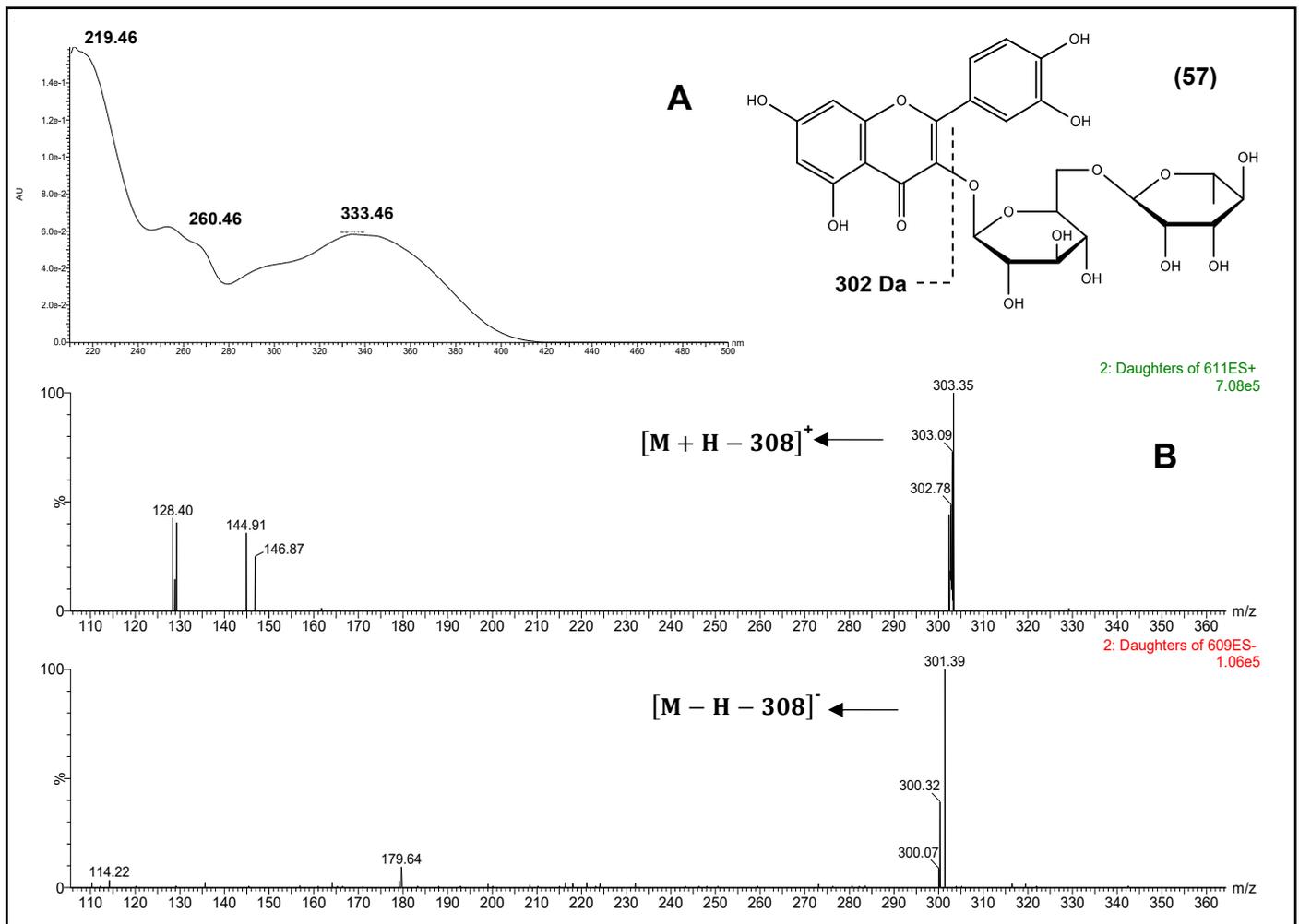


*Foi utilizado como exemplo um dos isômeros do ácido di-O-cafeoilquínico, o 3,5-diCQA.

O pico 2m ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = 333 nm / banda II = 265 nm), com tempo de retenção de 2,79 minutos, possui íon em m/z 611 $[M+H]^+$ e em m/z 609 $[M-H]^-$ e máximos de absorção no UV, característicos ao de flavonoides. É possível observar ainda no espectro de massas um íon em m/z 465, equivalente a $[M - 146 + H]^+$, indicando a perda de uma ramnose. Os fragmentos em m/z 303 e 301 são equivalentes a $[M + H - 308]^+$ e a $[M - H - 308]^-$ (**Figura 19**), sugerindo a perda de uma cadeia glicose-ramnose, o que pode indicar a presença da rutina (**57**) (MESQUITA *et al.*, 2018). No entanto, os valores de máximo de absorção das banda I e II encontrados foram discrepantes daqueles normalmente observados para a rutina ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = 359 nm

/ banda II = 259 nm) e, isso ocorreu, provavelmente, devido a co-eluição de uma outra substância (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Esse flavonoide já foi isolado das espécies de *B. gaudichaudiana* (AKAIKE *et al.*, 2003) e de *B. dentata* (SARTOR *et al.*, 2013).

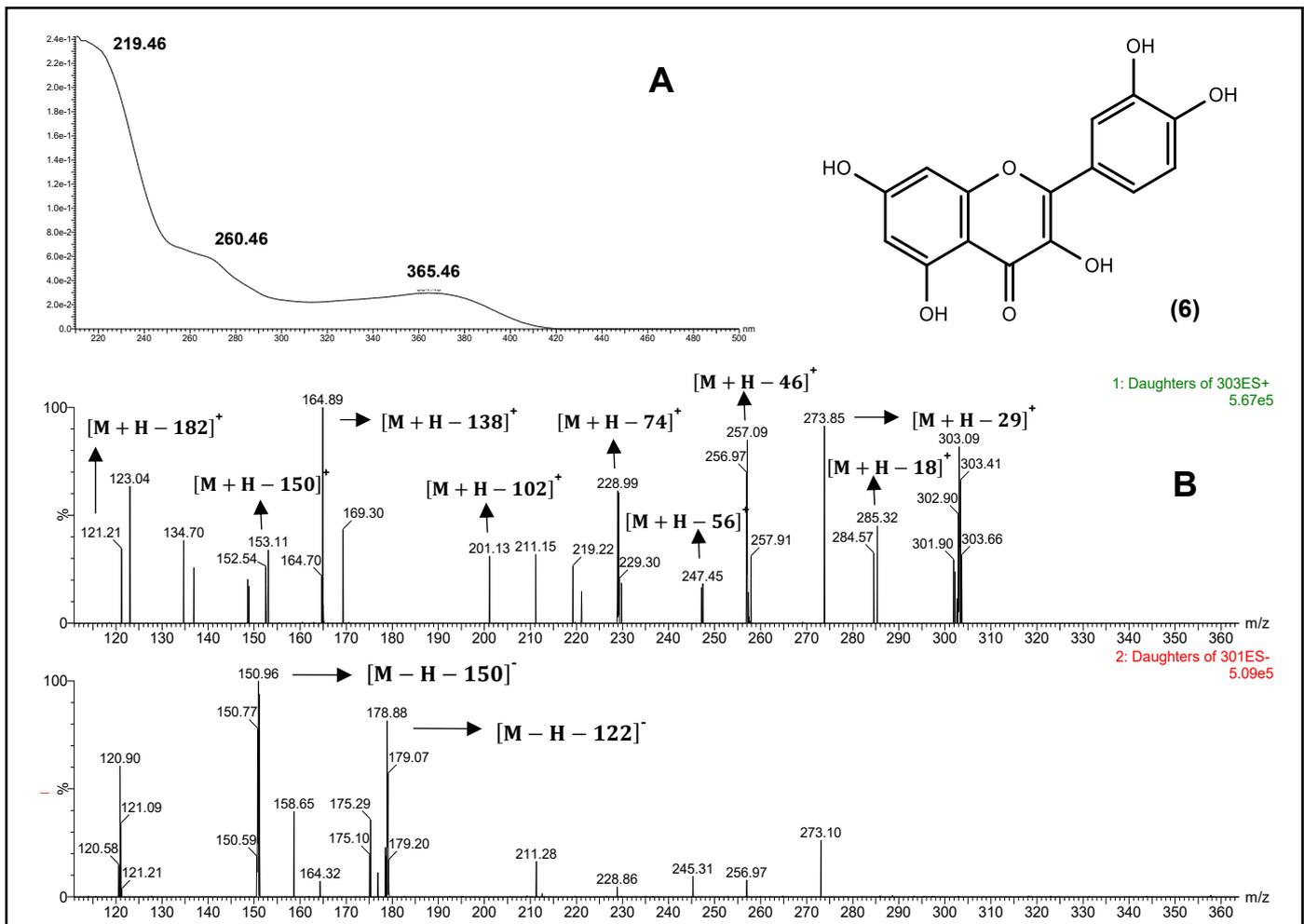
Figura 19: Espectro no UV (A) referente ao pico 2m (Tr = 2,79 min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 611 $[M+H]^+$ e m/z 609 $[M-H]^-$ (B) (extrato etanólico de *B. megapotamica*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)



O fracionamento desse extrato permitiu concentrar os compostos presentes em suas respectivas frações, resultando em uma melhor resolução para alguns picos, como pode ser observado nos cromatogramas da **Figura 8**. Com isso, pode-se analisar também alguns picos presentes na fração diclorometânica (Fr. Dcm).

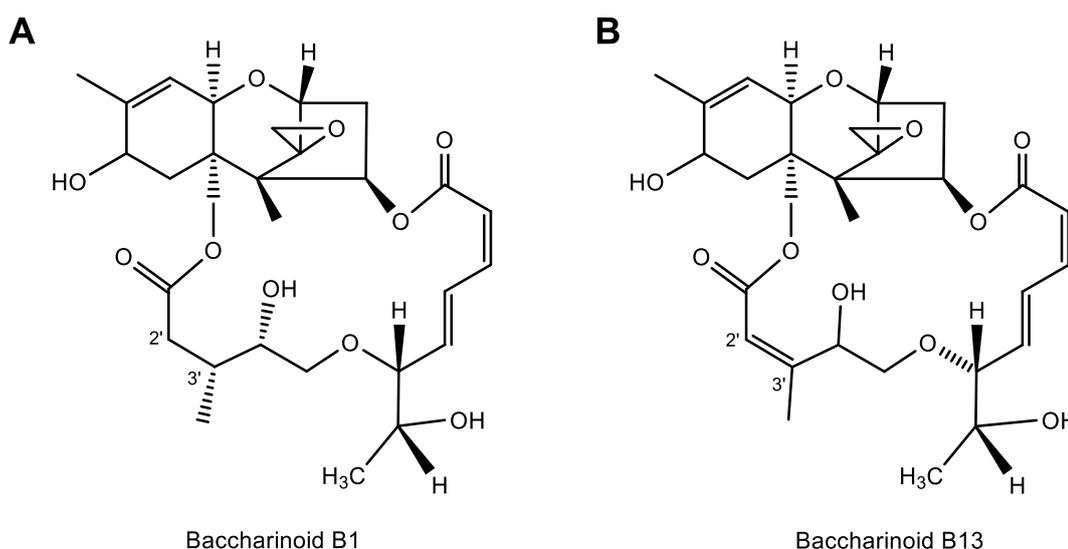
Scigelova *et al.* (2011) ilustra o espectro de fragmentação da quercetina (6), apresentando fragmentos com m/z 285, 257, 247, 229, 183, 165, 153, 137, 121, 111 e 95, derivados do íon em m/z 303 $[M+H]^+$. É possível inferir a presença desse flavonol ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = 365 nm / banda II = 260 nm) na Fr. Dcm de *B. megapotamica*, uma vez que os fragmentos obtidos com o íon em m/z 303 $[M+H]^+$ do pico 4m correspondem aos descritos na literatura (**Figura 20**). Não foi encontrado nenhum relato da presença de quercetina (6) em *B. megapotamica*, somente em outras espécies do gênero, como *B. pseudotenuifolia* (MOREIRA *et al.*, 2003), *B. illinita* (VERDI *et al.*, 2004) e *B. retusa* (GRECCO *et al.*, 2012).

Figura 20: Espectro no UV (A) referente ao pico 4m ($T_r = 3,92$ min) e espectro de massas (MS/MS) dos íons m/z 303 $[M+H]^+$ e m/z 301 $[M-H]^-$ (B) (Fr. Dcm de *B. megapotamica*). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)



Os picos 5m e 6m apresentam máximos de absorção no UV (260 e 220 nm) semelhantes aos descritos para alguns tricotecenos macrocíclicos. Segundo Sy-Cordero *et al.* (2010), o anel macrocíclico resulta em um único $\lambda_{\text{máx}}$ de aproximadamente 260 nm e, as estruturas que possuem uma insaturação adicional em C2'-C3', apresentam dois máximos de absorção, em 260 nm e em 230 nm. Exemplos desses compostos são representados na **Figura 10**. Além disso, alguns fragmentos obtidos com os íons em m/z 549 $[M+H]^+$ e em m/z 580 $[M+H]^+$ correspondem aos já descritos por Krishnamurthy; Beck e Isensee (1989), que ilustra como fragmentos mais comuns dos tricotecenos macrocíclicos os que possuem m/z 249, 231, 213, 199, 183, 171, 155, 137, 131 e 113.

Figura 21: Exemplos de tricotecenos macrocíclicos sem insaturação em C2'-C3' (A) e com a insaturação em C2'-C3' (B)



5.4 Avaliação da atividade citotóxica das frações de *B. imbricata* e *B. megapotamica*

As frações obtidas por partição foram submetidas aos mesmos testes de citotoxicidade citados anteriormente e, além da A549 (carcinoma de pulmão), também foram utilizadas as linhagens tumorais DU145 (carcinoma de próstata) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). Testou-se também os extratos obtidos por percolação, frente as três linhagens utilizadas. As concentrações máximas testadas também foram de 100 $\mu\text{g/mL}$ e o controle positivo utilizado foi o paclitaxel (PTX), em uma

concentração máxima de 1 μM . Os valores de Cl_{50} das frações (hexânica, diclorometânica, acetato de etila e hidrometanólica) de *B. imbricata* e *B. megapotamica* estão representados na **Tabela 13**.

Tabela 13: Resultados da avaliação citotóxica dos extratos obtidos por percolação e das frações das espécies selecionadas, em células A549, DU145 e HepG2

<i>Baccharis imbricata</i>						
	A549		DU145		HepG2	
	Cl_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC 95%	Cl_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC 95%	Cl_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC 95%
Extrato	$80,56 \pm 0,35$	51,63 - 125,7	$71,97 \pm 0,33$	56,82 - 91,18	$47,44 \pm 0,43$	41,18 - 54,66
Fr. Hex	$28,00 \pm 0,46$	24,17 - 32,43	$27,74 \pm 0,63$	14,23 - 54,07	$16,60 \pm 0,43$	14,19 - 19,41
Fr. Dcm	$39,96 \pm 0,52$	30,41 - 52,53	$39,58 \pm 0,64$	18,70 - 83,74	$19,69 \pm 0,41$	17,56 - 22,08
Fr. Act	> 100	-	$98,86 \pm 0,47$	56,96 - 171,6	$73,63 \pm 0,28$	64,69 - 83,82
Fr. MeOH/água	> 100	-	> 100	-	> 100	-
<i>Baccharis megapotamica</i>						
	A549		DU145		HepG2	
	Cl_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC 95%	Cl_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC 95%	Cl_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	IC 95%
Extrato	$2,77 \pm 0,25$	1,800 - 4,270	$3,04 \pm 0,30$	2,320 - 3,986	$1,39 \pm 0,22$	1,123 - 1,720
Fr. Hex	< 0,78	-	$2,20 \pm 0,28$	1,391 - 3,487	< 0,78	-
Fr. Dcm	< 0,78	-	< 0,78	-	< 0,78	-
Fr. Act	$6,30 \pm 0,32$	4,922 - 8,067	$10,04 \pm 0,41$	7,749 - 13,02	$3,93 \pm 0,38$	3,355 - 4,605
Fr. MeOH/água	> 100	-	$83,86 \pm 0,40$	55,36 - 127,1	$69,91 \pm 0,32$	55,44 - 88,16
PTX	$0,02 \pm 0,07\mu\text{M}$	0,006 - 0,064	< 0,008	-	< 0,008	-

Valores representam a média de três experimentos independentes \pm desvio padrão

Faixa de Concentração: (Extratos e Frações: 0,78 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (PTX: 0,008 – 1,0 μM)

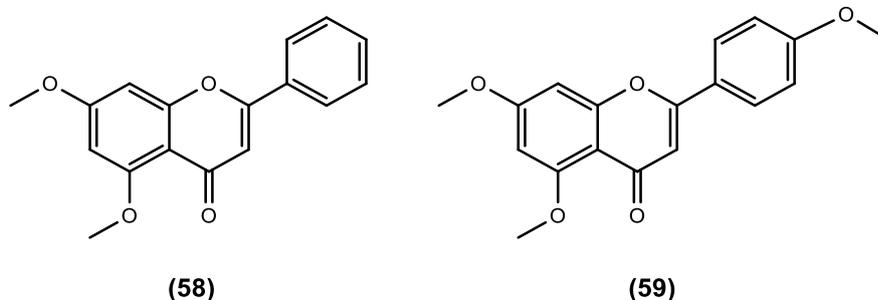
^a Cl_{50} = concentração que inibiu em 50% o crescimento das células A549, DU145 e HepG2

^bIC95% = intervalo de confiança de 95%

A fração hexânica (Fr. Hex.) de *B. imbricata* apresentou o potencial citotóxico mais promissor em todas as linhagens testadas, seguida da diclorometânica (Fr. Dcm), que apresentou citotoxicidade frente as células HepG2 ($CI_{50} = 19,69 \mu\text{g/mL}$) e citotoxicidade moderada frente as demais linhagens (CI_{50} de $39,96 \mu\text{g/mL}$ e $39,58 \mu\text{g/mL}$ para A549 e DU145, respectivamente). Em relação a *B. megapotamica*, as frações hexânica (Fr. Hex), diclorometânica (Fr. Dcm) e acetato de etila (Fr. Act) foram potencialmente citotóxicas para todas as linhagens testadas, com valores de CI_{50} menores que $15 \mu\text{g/mL}$. As frações hidrometanólicas de ambas as espécies não apresentaram citotoxicidade ou foram pouco ativas.

Conforme a desreplicação, mostrada na sessão anterior (item 5.3), ficou evidenciado a presença putativa de alguns flavonoides no extrato etanólico e nas frações Fr. Hex e Fr. Dcm de *B. imbricata*. Adicionalmente, foi possível inferir que os derivados observados apresentam núcleos básicos flavonoídicos di- ou mono-metilados.

Walle *et al.* (2007) compararam o efeito inibitório de flavonas metiladas e não-metiladas em células SCC-9 (carcinoma humano de células escamosas de língua), verificando que os compostos 5,7-dimetoxiflavona (**58**) e 5,7,4'-trimetoxiflavona (**59**) apresentaram-se 10 vezes mais potentes para inibir a proliferação celular que os correspondentes análogos não metilados: a crisina e a apigenina. Li *et al.* (2007) demonstraram que polimetoxiflavonoides apresentaram potente efeito inibitório em linhagem de células HL-60 (leucemia promielocítica) além de induzirem a apoptose. Ademais, esses compostos não mostraram citotoxicidade em células normais de leucócitos polimorfonucleares humanos (PMN).

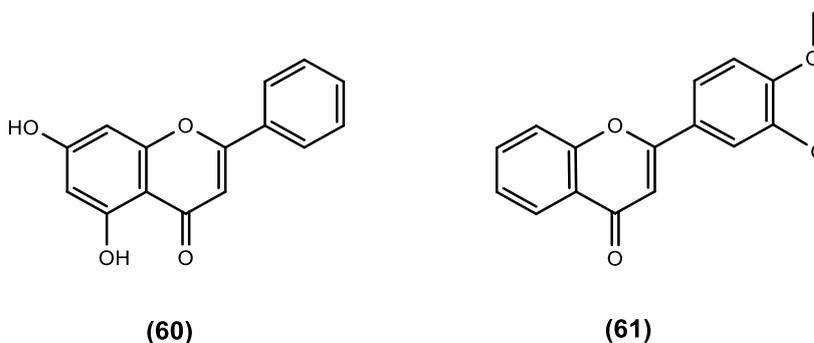


Ao investigar a eficácia da 5,7-dimetoxiflavona (**58**), um análogo metilado da crisina (**60**), no tratamento de leucemia linfoblástica aguda (LLA), observou-se que esse composto era capaz de induzir a parada do ciclo celular e aumentar a taxa de

apoptose. Os valores de CI_{50} variaram de 2,8 a 7,0 $\mu\text{g/mL}$ nas diferentes linhagens celulares de leucemia utilizadas (YCUB-2, YCUB-4, YCUB-5, YCUB-6 e YCUB-8) e os níveis de glutathione foram reduzidos. O uso concomitante desse flavonoide com medicamentos anticâncer, como citarabina e a vincristina, surpreendentemente antagonizou a citotoxicidade dos fármacos referência, não sendo recomendada essa combinação (GOTO *et al.*, 2012).

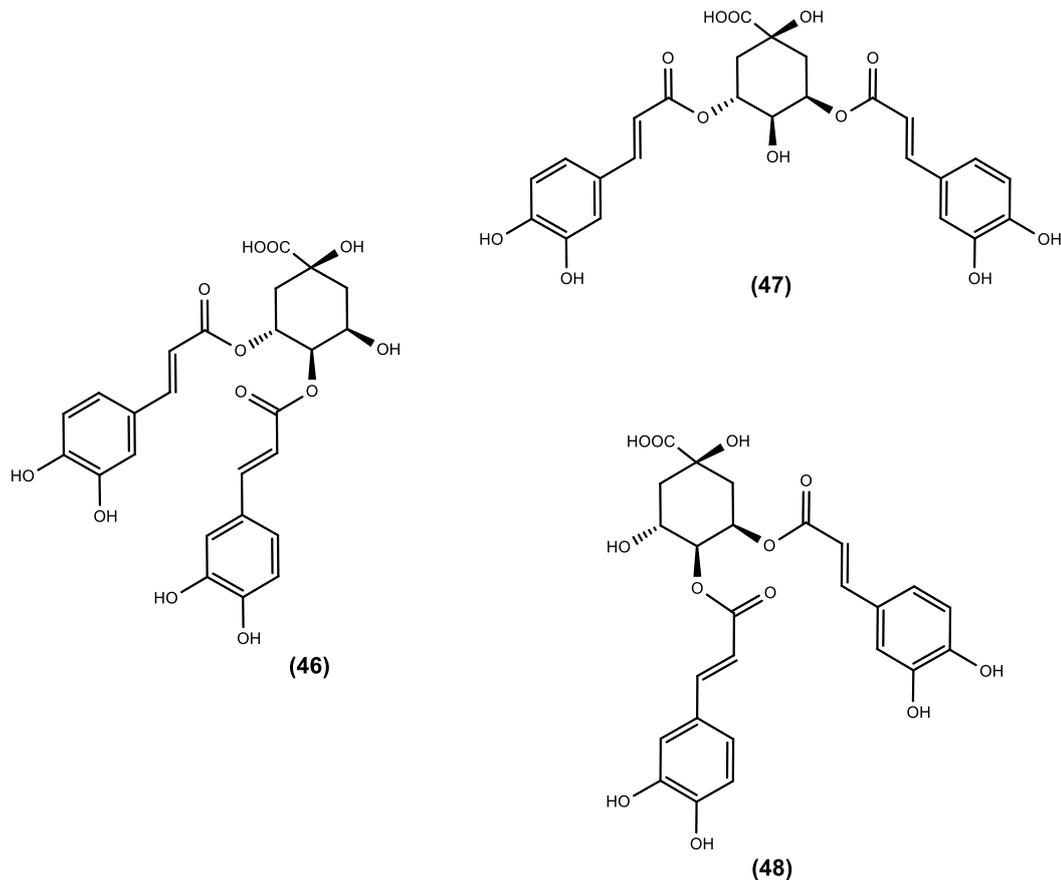
Um estudo da relação estrutura-atividade demonstrou que a insaturação entre C2-C3 e a presença da carbonila na posição 4, contribuem para o potencial citotóxico dos flavonoides. Além disso, o padrão de substituição do anel B e a metilação dos grupos hidroxil são importantes características relacionadas a citotoxicidade dessas substâncias (PLOCHMANN *et al.*, 2007). Dentre os mecanismos de ação envolvidos na atividade antiproliferativa desses compostos estão a inibição da enzima topoisomerase, indução de parada do ciclo celular, inibição de proteínas cinase, inibição da angiogênese e ação antioxidante (RAVISHANKAR *et al.*, 2013).

Ao avaliar a citotoxicidade causada pela exposição dos hepatócitos normais de truta arco-íris (CRL-2301) a flavonoides hidroxilados (crisina **(60)**, apigenina **(8)**, luteolina **(7)** e quercetina **(6)**) e a flavonas metiladas (5,7-dimetoxiflavona **(58)** e 3',4'-dimetoxiflavona **(61)**), observou-se que os compostos hidroxilados apresentaram maior toxicidade e inibiram a síntese de DNA. Isso foi atribuído a formação de metabólitos tóxicos a partir de reações de peroxidação, principalmente na metabolização da crisina **(60)**. Em contrapartida, os compostos metilados não foram tóxicos na maior concentração utilizada (25 μM) e não sofreram reações de peroxidação (TSUJI; WALLE, 2008).



inibitória do crescimento celular na linhagem HL-60 (leucemia promielocítica), atribuída a indução da apoptose.

Kurata *et al.* (2007) verificaram que os di-CQAs isolados de folhas de batata doce (*Ipomoea batatas* L.) eram capazes de suprimir a proliferação de células das linhagens de câncer de estômago humano (Kat0III), de câncer de cólon (DLD-1) e de leucemia promielocítica (HL-60). Ademais, Puangpraphant *et al.* (2011) demonstraram que uma fração contendo 3,4-diCQA (**46**) e 3,5-diCQA (**47**) e o 4,5-diCQA (**48**) inibiram a proliferação de células humanas de câncer de cólon, RKO e HT-29, além de induzirem a apoptose por ativação das caspases-3 e -8.

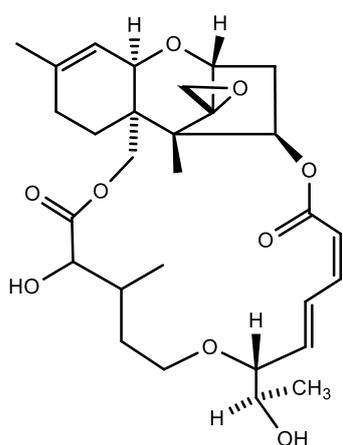


A quercetina (**6**) é um flavonoide comumente encontrado em espécies vegetais e suas propriedades quimiopreventivas estão bem estabelecidas. A interação com receptores celulares e a modificação do sinal de transdução na carcinogênese são exemplos de

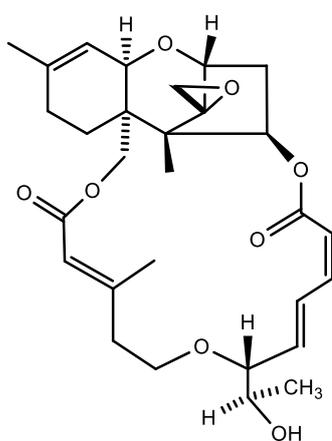
ação desse composto (MURAKAMI; ASHIDA; TERAQ, 2008). Granado-Serrano *et al.* (2006) demonstraram que a quercetina (**6**) induziu a morte celular em células HepG2 (carcinoma hepatocelular) por via apoptótica, através dos mecanismos de ativação de caspases e pelo bloqueio dos sinais regulados por proteínas cinases. Além disso, esse flavonol apresentou efeito inibitório concentração-dependente frente a células de leucemia promielocítica (HL-60), com valor de Cl_{50} de 14 mg/mL (ARAÚJO *et al.*, 2013).

A atividade citotóxica dos tricotecenos macrocíclicos está bem descrita na literatura. Os baccharinoides, isolados de *B. megapotamica*, pertencem a essa classe de compostos, juntamente com as verrucarinas e as roridinas. A estrutura dos baccharinoides está intimamente relacionada a das roridinas (JARVIS *et al.*, 1987).

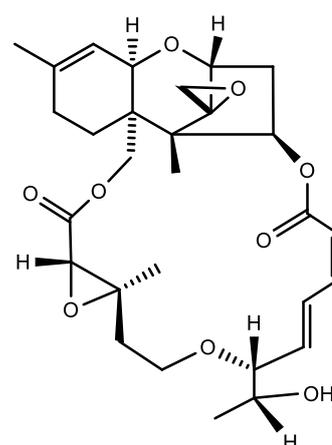
Relatos mostram o potencial citotóxico da roridina A (**62**) frente a células KB (carcinoma epidermoide oral humano), BC1 (câncer de mama) e Vero (fibroblasto de rim de macaco Africano) (ISAKA *et al.*, 1999) e da roridina E (**63**) frente as linhagens THP-1 (leucemia monocítica humana), HL-60 (leucemia promielocítica), V79 (fibroblastos de hamster chins) (ODA *et al.*, 2010). Esses e outros tricotecenos, como roridina D (**64**), verrucarina A (**65**) e verrucarina J (**66**) já foram identificados também em outras espécies de *Baccharis* (RIZZO *et al.*, 1997).



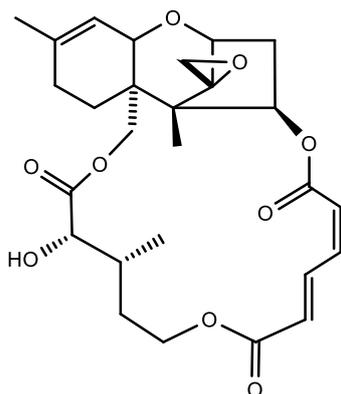
(62)



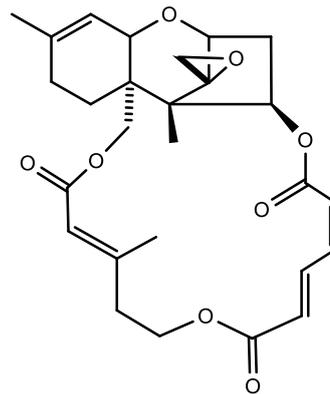
(63)



(64)



(65)



(66)

A descoberta dos tricotecenos macrocíclicos foi um marco na busca por agentes citotóxicos, porém logo se descobriu sua pronunciada toxicidade e baixa seletividade. O que se pode dizer desses compostos é que a atividade anticâncer, a seletividade e a citotoxicidade são fortemente influenciadas pela estereoquímica, embora os mecanismos de ação e os alvos moleculares ainda sejam desconhecidos (DE CARVALHO; WEICH; ABRAHAM, 2016).

Diante disso, é possível inferir o porquê da citotoxicidade observada frente as linhagens tumorais testadas tanto do extrato etanólico, como das frações de *B. megapotamica*, que apresentaram valores de CI_{50} relativamente baixos. Os compostos que foram identificados possuem atividade citotóxica já descrita na literatura, em diferentes modelos testados.

5.5 Avaliação da atividade citotóxica das frações selecionadas em cultura de células saudáveis

A maioria dos medicamentos antineoplásicos mais eficazes disponíveis hoje possuem uma toxicidade relacionada, o que muitas vezes não permite a cura completa da doença. Isso se deve à falta de seletividade para as células cancerígenas, que se diferenciam das células normais pela aquisição de habilidades, como a proliferação contínua e a resistência a morte celular. As vias envolvidas na aquisição dessas capacidades tornam as células tumorais únicas e, podem ser exploradas para obter uma terapia direcionada às células tumorais (CATANZARO *et al.*, 2019).

Na busca por novos fármacos anticâncer, os métodos de rastreamento mais comuns empregam testes de citotoxicidade em linhagens de células cancerígenas, revelando compostos com a mais alta atividade citotóxica. Embora os medicamentos anticâncer sejam projetados para matar células, essa atividade deve ser seletiva em relação às

células tumorais. Portanto, é interessante utilizar, no estágio primário de triagem, ensaios de toxicidade em células saudáveis para selecionar os compostos menos tóxicos dentre os mais ativos (POPIOŁKIEWICZ *et al.*, 2005).

Assim, foi avaliada a seletividade das frações com maior citotoxicidade (Fr. Hex e Fr. Dcm de *B. imbricata* e Fr. Hex, Fr. Dcm e Fr. Act de *B. megapotamica*) frente a cultura de fibroblasto gengival humano. Os testes seguiram os mesmos parâmetros citados anteriormente, sendo as concentrações máximas testadas de 100 µg/mL. O limite de concentração tóxica do DMSO (< 1%) não foi ultrapassado. Os valores de CC₅₀ estão representados na **Tabela 14**.

Tabela 14: Resultados da avaliação da citotoxicidade das frações selecionadas em culturas de fibroblasto gengival humano

<i>Baccharis imbricata</i>		
	CC ₅₀ (µg/mL)	IC 95%
Fr. Hex	25,04 ± 0,50	21,05 - 29,79
Fr. Dcm	34,32 ± 0,42	30,88 - 38,14
<i>Baccharis megapotamica</i>		
	CI ₅₀ (µg/mL)	IC 95%
Fr. Hex	< 0,78	-
Fr. Dcm	< 0,78	-
Fr. Act	3,59 ± 0,33	2,55 a 5,06

Valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão

Faixa de Concentração: 0,78 - 100 µg/mL

^aCC₅₀ = concentração que reduziu em 50% a viabilidade dos fibroblastos gengivais

^bIC95% = intervalo de confiança de 95%

Os valores de CC₅₀ apresentaram-se próximos ou menores aos de CI₅₀ obtidos, indicando que as frações são igualmente tóxicas para esse modelo de células saudáveis.

Assim, a Fr. Dcm de *B. imbricata* foi escolhida para dar prosseguimento aos estudos e chegar ao isolamento dos compostos, já que a mesma apresentou valores promissores de CI_{50} frente as linhagens tumorais testadas e valor de CC_{50} maior que as demais frações estudadas. Além disso, é a fração de maior rendimento obtida do extrato etanólico da espécie, como mostrado na sessão 4.7.

5.6 Avaliação da atividade citotóxica das frações DCM 1 e DCM 2

Considerando a composição da Fr. Dcm de *B. imbricata*, optou-se por um refraçãoamento com extração por solução alcalina, conforme descrito na sessão 4.7, a fim de separar compostos com caráter ácido, principalmente fenólicos, dos demais compostos presentes.

Em relação aos flavonoides, sabe-se que os heterosídeos são solúveis em água e álcoois diluídos, ao passo que as agliconas são normalmente solúveis em solventes orgânicos apolares e, pelo caráter fenólico, também em soluções alcalinas (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTO, 2017). Com base nessa característica, realizou-se uma extração líquido-líquido com uma solução de NaOH 5% (p/v), já que em meio alcalino, as hidroxilas fenólicas encontram-se desprotonadas e, conseqüentemente, os compostos são mais solúveis em solução aquosa. Com a posterior acidificação, as agliconas voltam a sua forma não-ionizada e podem ser extraídas com solvente lipofílicos imiscíveis em água.

Assim, duas frações foram obtidas, a DCM 1, que corresponde aos compostos que não se protonaram em meio básico, e a DCM 2, enriquecida em compostos fenólicos, no caso, principalmente os flavonoides.

A atividade dessas duas novas frações obtidas, foi testada frente a linhagem tumoral A549, seguindo as mesmas condições empregadas nos testes de citotoxicidade utilizados anteriormente. As concentrações máximas testadas também foram de 100 $\mu\text{g/mL}$ e o controle positivo utilizado foi o paclitaxel (PTX), em uma concentração máxima de 1 μM . Os valores de CI_{50} obtidos estão representados na **Tabela 15**.

Tabela 15: Resultados da avaliação citotóxica das frações DCM 1 e DCM 2, em células A549

<i>Baccharis imbricata</i>		
	CI ₅₀ (µg/mL)	IC 95%
DCM 1	36,68 ± 0,35	30,41 - 44,26
DCM 2	59,28 ± 0,39	47,57 - 73,89

Valores representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão

Faixa de Concentração: 0,78 - 100 µg/mL

^aCI₅₀ = concentração que inibiu em 50% o crescimento das células A549

^bIC95% = intervalo de confiança de 95%

A fração com melhor potencial citotóxico foi a DCM 1, embora a fração enriquecida em flavonoides (DCM 2) também tenha apresentado atividade citotóxica moderada.

Segundo George, Dellaire e Rupasinghe (2017), já foi demonstrado que os flavonoides são capazes de inibir vários pontos na progressão do crescimento celular, incluindo invasão, metástase, angiogênese, mecanismos apoptóticos e parada do ciclo celular, possuindo assim papel importante na prevenção e no tratamento do câncer, o que pode explicar os resultados obtidos para a fração DCM 2.

Em relação a fração DCM 1, pode-se considerar a presença de compostos como os terpenos, que apresentam menor polaridade. Relatos da literatura apontam para a capacidade dos terpenóides em inibir a proliferação celular e a metástase, indicando o potencial anticâncer desses compostos (HUANG *et al.*, 2012), o que justificaria os valores de CI₅₀ obtidos para a fração DCM 1.

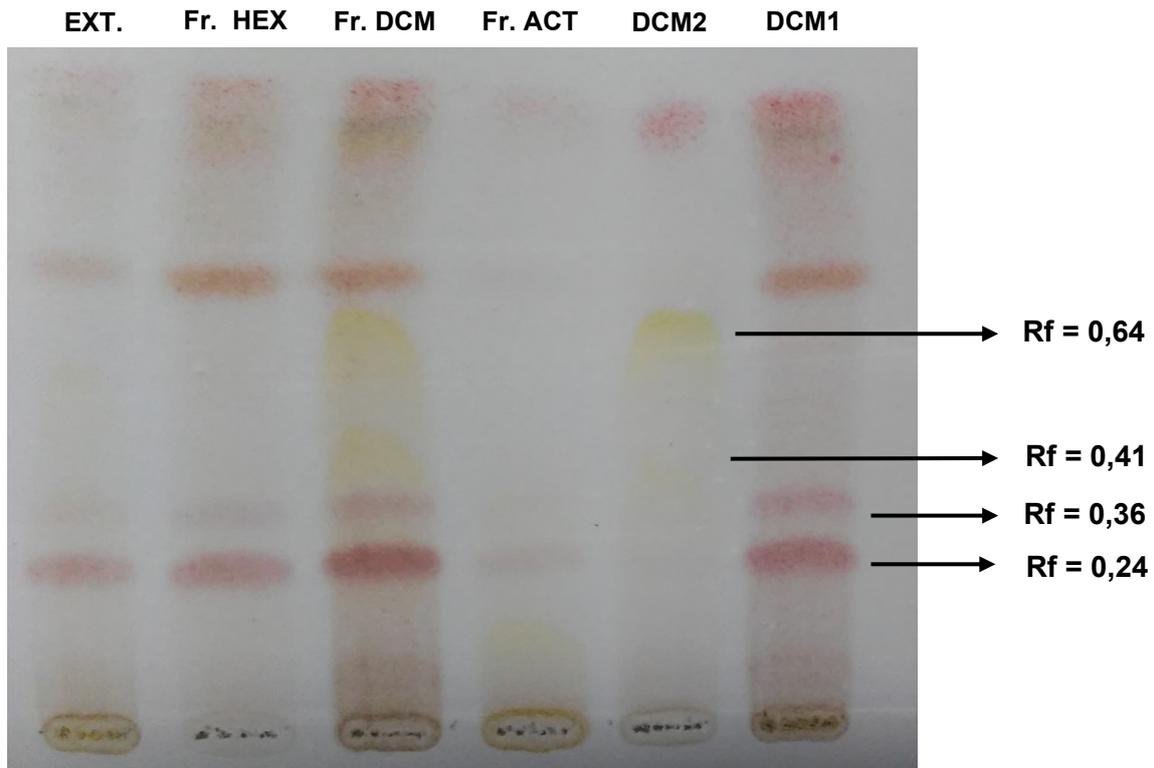
5.7 Análise das frações DCM 1 e DCM 2 por CCD e por UPLC-ESI-MS/MS

A análise química preliminar das frações DCM 1 e DCM 2 de *B. imbricata* foram feitas por CCD em sílica gel, em comparação com o extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila, conforme apresentado na **Figura 22**.

É possível observar na cromatoplaça a presença de duas bandas de cor amarelada, com R_f's de 0,64 e 0,41 e duas bandas de cor avermelhada com R_f's de 0,36 e 0,24

na Fr. Dcm. Essas mesmas bandas são observadas nas frações DCM 2 e DCM 1 respectivamente. As bandas de cor amarelada são características de flavonoides (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

Figura 22: Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para o extrato etanólico e frações de *B. imbricata*. (Condições cromatográficas: eluente tolueno/acetona (8:2); revelador: anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento)



Em seguida foi realizada a análise das frações DCM 1 e DCM 2 por UPLC-ESI-MS/MS, visando a confirmação da extração seletiva dos flavonoides em relação aos demais compostos. Os cromatogramas das frações são apresentados na **Figura 23**, juntamente com os espectros de UV obtidos para os principais picos.

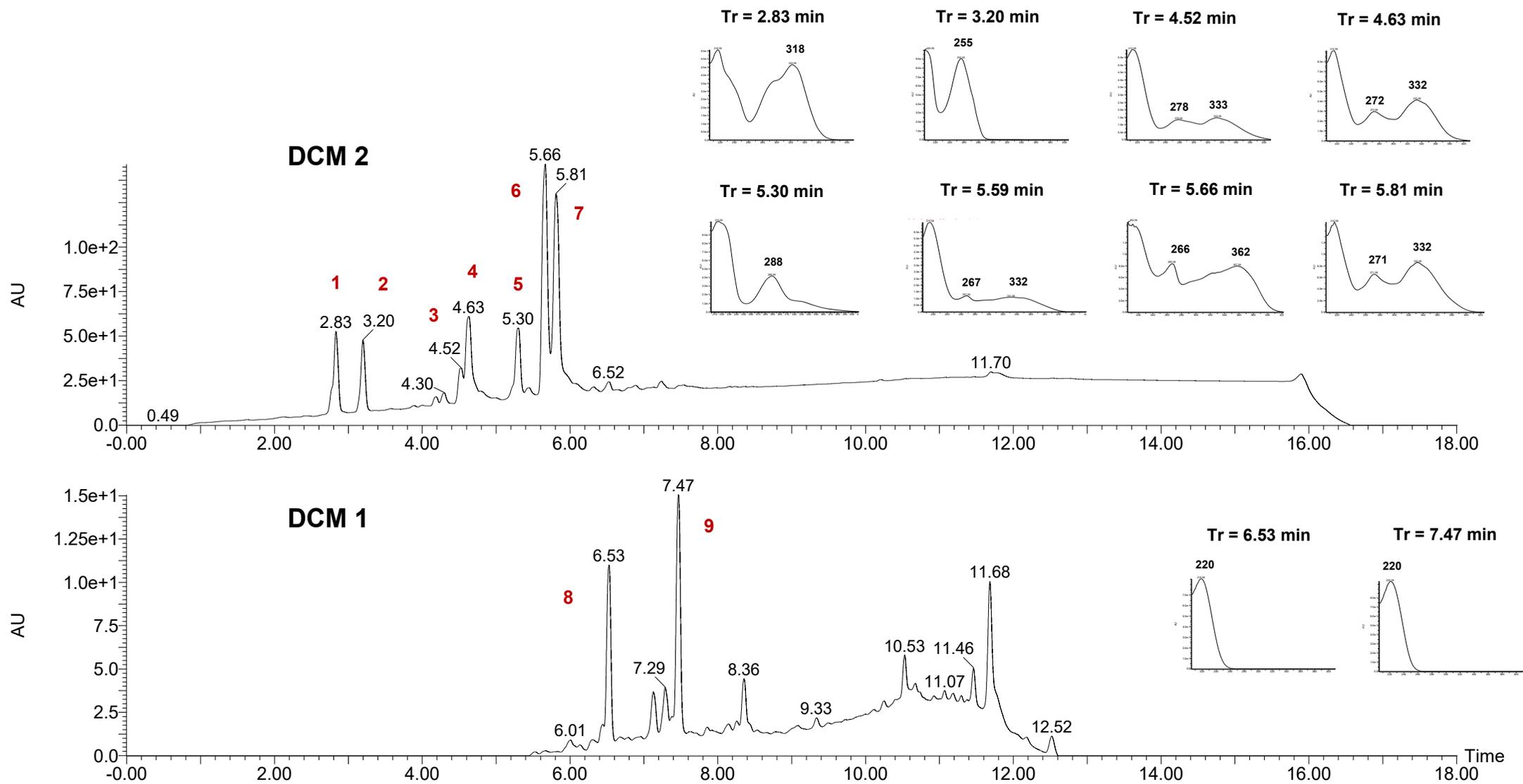
No cromatograma da fração DCM 1 observa-se a presença de picos com tempos de retenção acima de 6 minutos, indicando a presença de compostos de média a baixa polaridade. Além disso, os espectros no ultravioleta apresentam máximos de absorção em torno de 220 nm, o que aponta para compostos que não possuem cromóforos com elevado índice de conjugação.

No cromatograma da fração DCM 2 é possível observar a presença de dois picos (1 e 2) cujo espectro no UV corresponde ao de compostos derivados do ácido clorogênico e de fenilpropanoides, respectivamente. Os demais picos apresentam absorção no ultravioleta correspondentes a flavonas (picos 3, 4, 6 e 7 com $\lambda_{\text{máx}}$ de 278/333 nm, 272/332 nm, 267/332 nm e 271/333 nm, respectivamente), a uma flavanona (pico 5 com $\lambda_{\text{máx}}$ de 288/330 (ombro) nm) e a um flavonol (pico 6 com $\lambda_{\text{máx}}$ de 266/362 nm).

Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a estratégia de extração seletiva dos compostos fenólicos empregando partição entre uma solução alcalina e um solvente lipofílico foi bem-sucedida. Obtiveram-se duas frações contendo substâncias com características químicas distintas e isso facilitou o processo de isolamento desenvolvido no presente trabalho que empregou uma coluna de octadecilsilano (RP-18) acoplada a um aparelho de HPLC preparativo. O emprego de uma coluna empacotada com sílica gel pode ser considerado improdutivo, devido a baixa resolução observada na cromatoplaca (**Figura 22**). No total foram observados seis picos com máximos de absorção no UV característicos de flavonoides, enquanto na cromatoplaca observaram-se apenas duas manchas com valores de $R_f = 0,41$ e $0,64$, respectivamente.

Figura 23: Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para as frações DCM 2 e DCM 1 e espectros no UV dos principais picos correspondentes.

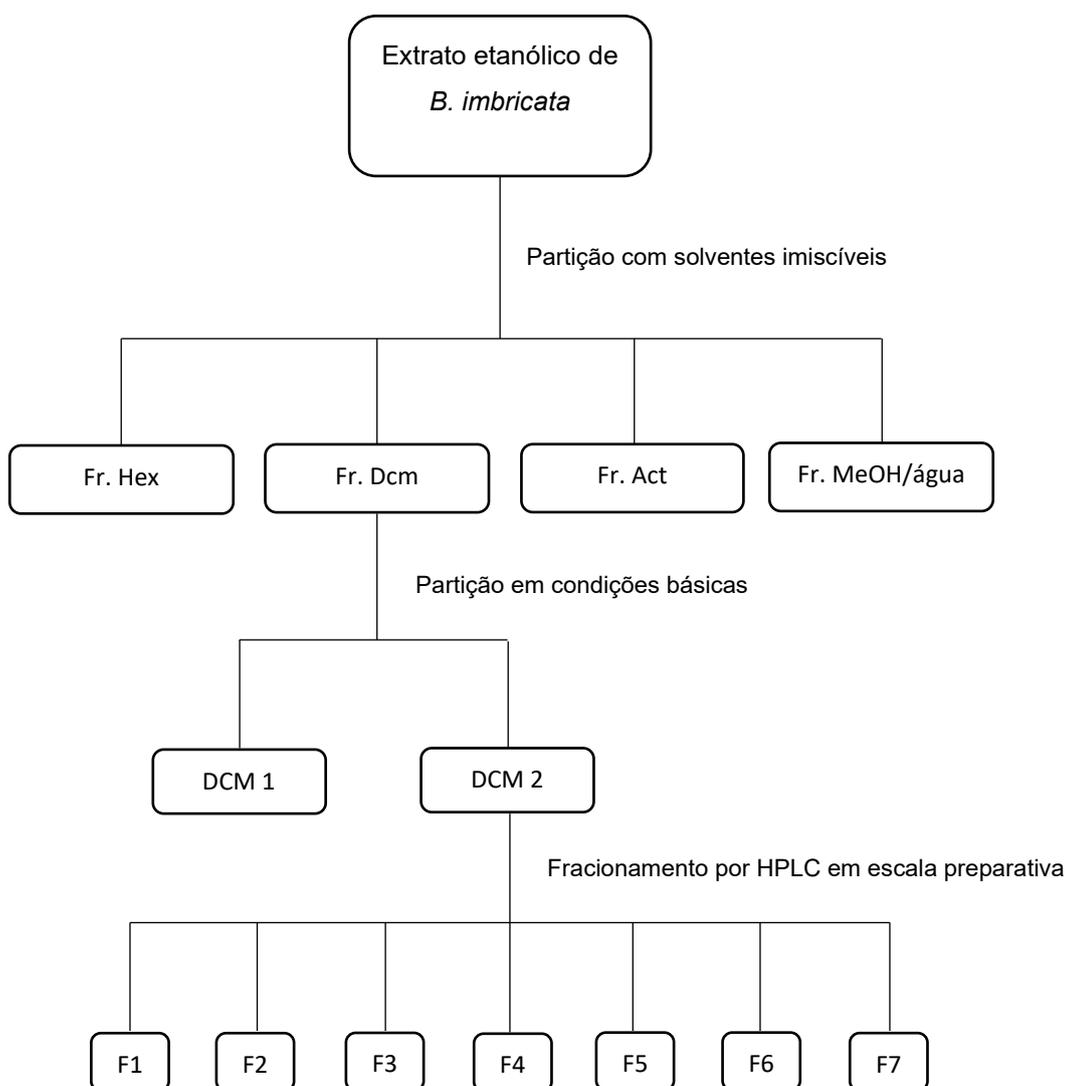
(Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)



5.8 Refracionamento de DCM 2 por HPLC-RF em escala preparativa

Embora não seja a fração com melhor atividade citotóxica, optou-se por priorizar o estudo da DCM 2, pela presença putativa de flavonoides e pela maior facilidade de isolamento de substâncias dessa classe, uma vez que apresentam maior sensibilidade frente ao detector de ultravioleta empregado no aparelho de HPLC em escala preparativa. Além disso, como não há na literatura estudos com substâncias isoladas de *B. imbricata*, a caracterização dos metabólitos secundários dessa espécie se faz necessária. O esquema de fracionamento adotado está representado na **Figura 24**.

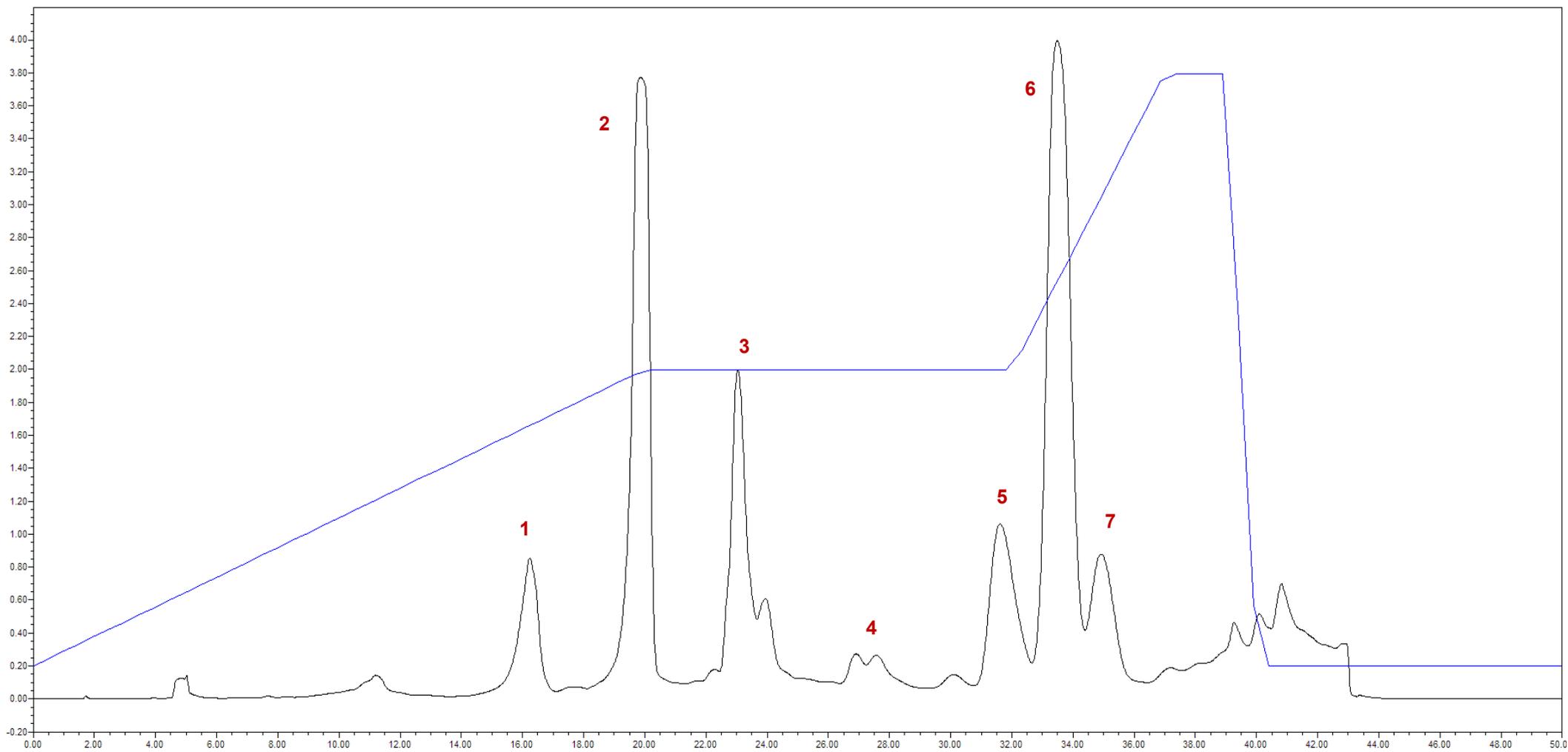
Figura 24: Esquema de fracionamento do extrato etanólico de *B. imbricata*



O isolamento das substâncias presentes nessa fração foi realizado por HPLC-RF em escala preparativa. As condições cromatográficas foram otimizadas visando a separação de cada pico e o modo de detecção no UV utilizou dois comprimentos de onda, 254 e 350 nm, empregados para monitorar o processo de purificação. Após as injeções, as frações foram coletadas e recuperadas por partição com diclorometano, em condições ácidas. As frações obtidas foram denominadas F1 (pico 1; 6,0 mg, 1,7% m/m), F2 (pico 2; 12,9 mg, 3,6% m/m), F3 (pico 3; 17,1 mg, 4,7% m/m), F4 (pico 4; 8,2 mg, 2,3% m/m), F5 (pico 5; 13,2 mg, 3,5% m/m), F6 (pico 6; 19,2 mg, 5,3% m/m) e F7 (pico 7; 4,0 mg, 1,1% m/m), conforme o cromatograma da **Figura 25**.

Posteriormente, essas frações foram analisadas em UPLC-ESI-MS/MS e verificou-se que algumas possuíam mais de uma substância, normalmente de características semelhantes. A fração correspondente ao pico 7 apresentou apenas um pico majoritário e, por isso, foi selecionada para a elucidação estrutural. As demais frações serão purificadas e as substâncias terão suas estruturas elucidadas futuramente.

Figura 25: Perfil cromatográfico obtido por HPLC-RF em escala preparativa para o fracionamento de DCM 2. (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.10)



5.9 Elucidação estrutural do sólido obtido na fração F7

A fração F7 foi analisada por UPLC-ESI-MS e o cromatograma apresentou um pico majoritário com $T_r = 5,81$ minutos e máximos de absorção no UV em 269/361 nm (**Figura 26**), sugerindo tratar-se de um flavonol. Os íons com m/z 331 e 329, no modo positivo e negativo respectivamente, correspondem à molécula protonada $[M+H]^+$ e desprotonada $[M-H]^-$ (**Figura 27**).

Figura 26: Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD para fração F7 e espectro de UV correspondente ao pico majoritário ($T_r = 5,81$ min). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8)

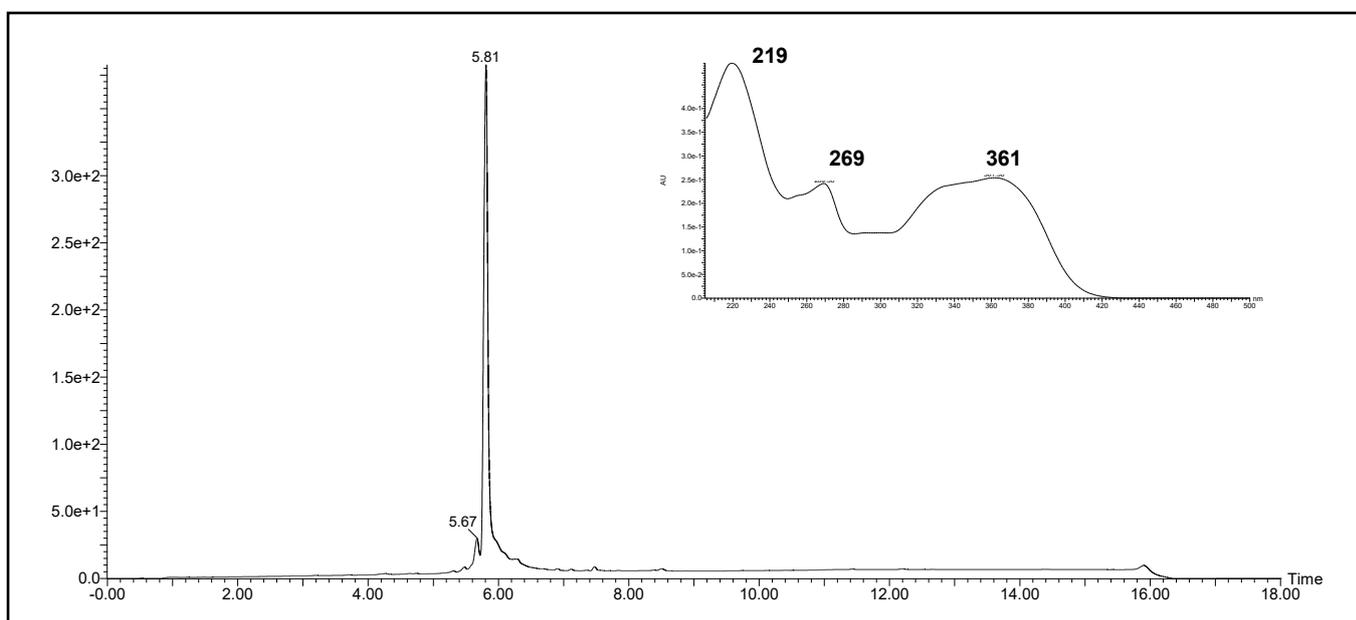
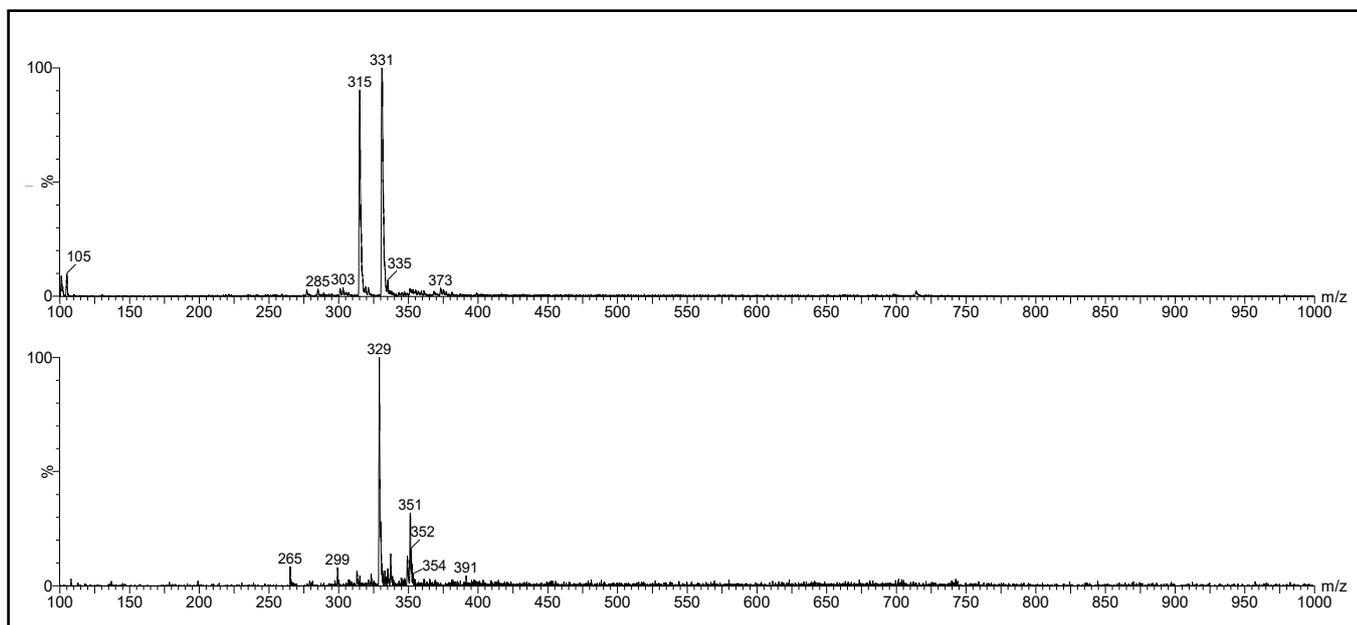
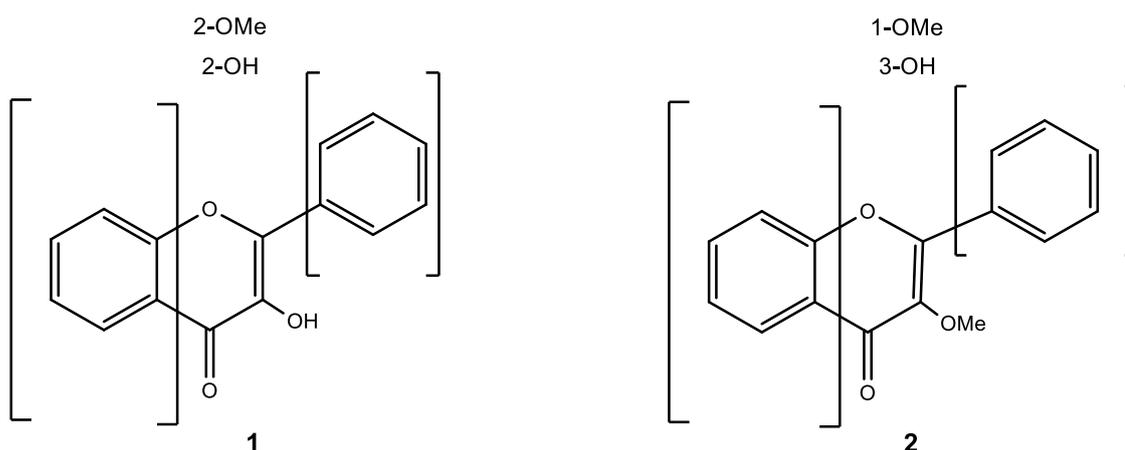


Figura 27: Espectros de massas obtidos por UPLC-ESI-MS para a fração F7, isolada da fração DCM2. (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental – item 4.8)



Tendo em vista a massa molecular (330 Da) e os máximos de absorção no UV obtidos, sugere-se que o produto seja um flavonol. De forma simplificada, pode-se representar esquematicamente duas estruturas básicas para esse derivado (**Figura 28**).

Figura 28: Esquemas de possíveis estruturas para o derivado da fração F7



Foram obtidos os espectros de RMN de ^1H e os mapas de contorno bidimensionais HSQC, HMBC e NOESY. Não foi obtido o espectro de RMN de ^{13}C devido a pouca quantidade de amostra disponível. Dessa forma, os deslocamentos químicos dos

sinais de carbono foram obtidos indiretamente a partir dos experimentos HSQC (J^1) e HMBC (J^2 , J^3 e J^4).

Na análise dos espectros de RMN de ^1H (**Figura 29**), ressonâncias referentes a cinco prótons aromáticos foram evidentes, dois dupletos em δH 7,11 e 8,14, com constante de acoplamento de 8,0 Hz, correspondentes a 2 hidrogênios cada, e uma simpleto em δH 6,57, correspondente a um hidrogênio. Esses dados são compatíveis com a presença de um anel aromático *p*-dissubstituído (anel B) e de um anel aromático pentassubstituído (anel A). Além disso, dois simpletos foram observados em δH 3,77 e 3,85, correspondentes à três hidrogênios cada, sugerindo a presença de dois grupos metoxila. Sinais relativos à ressonância dos prótons de três grupos hidroxilas também foram evidentes no espectro de RMN de ^1H (δH 9,53; 10,75 e 12,52 ppm). Dessa forma, pode-se atribuir o padrão de oxigenação do anel B na posição 4', além de identificar a presença de um único hidrogênio (simpleto) no anel A. Ainda, o valor de deslocamento químico de um dos grupos hidroxila em δH 12,52 é sugestivo da presença de uma hidroxila quelatogênica na posição 5 (**Figura 30**).

Figura 29: Espectro de RMN de ^1H de F7 em DMSO- d_6 (400 MHz)

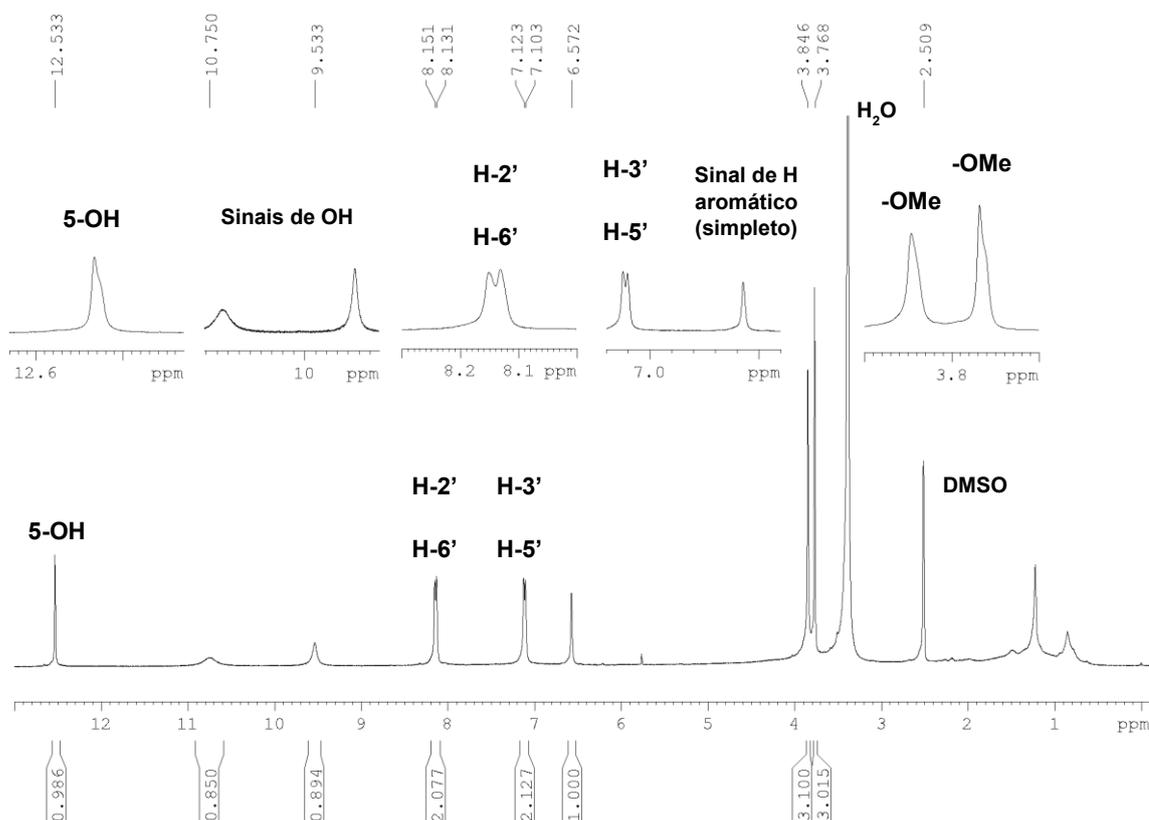
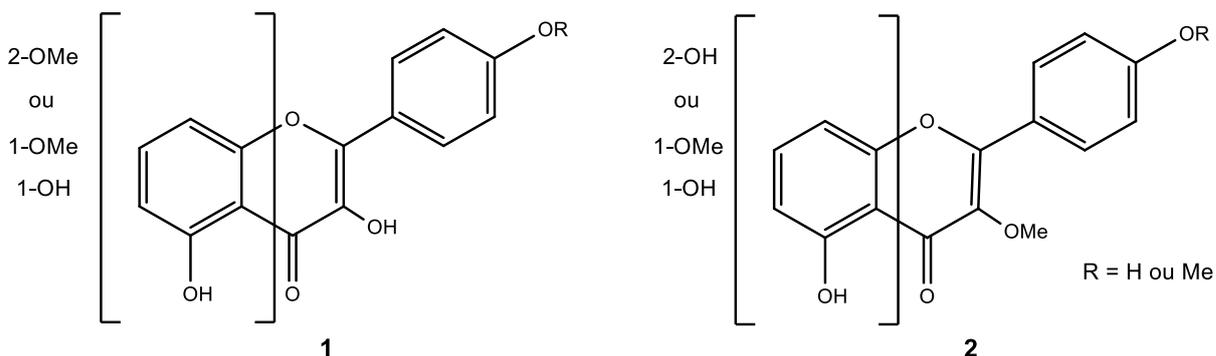
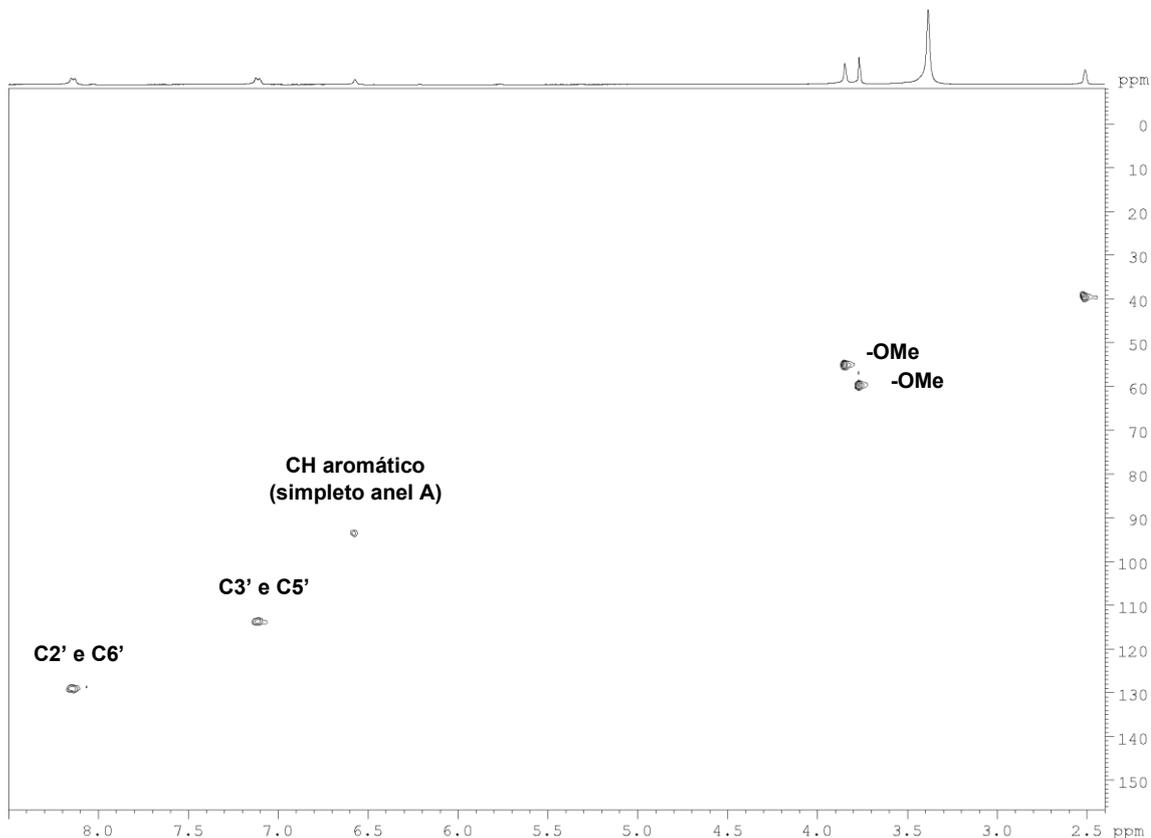


Figura 30: Esquemas de possíveis estruturas para o derivado da fração F7

A análise do mapa de contornos HSQC (**Figura 31**) indicou a correlação dos sinais de hidrogênio do anel aromático *p*-dissubstituído (δ H 7,11 e 8,14 ppm), com as ressonâncias dos carbonos em δ C 113,8 ppm (C3' e C5') e 129,1 ppm (C2' e C6'), respectivamente, enquanto o sinal em δ H 6,57 ppm apresentou correlação com o sinal de carbono em δ C 93,5 ppm. Já para os grupos metoxila (δ H 3,77 e 3,85 ppm), observou-se a correlação dos sinais com as ressonâncias dos carbonos em δ C 59,8; 55,1, respectivamente.

Figura 31: Mapa de contornos HSQC obtido para F7 em DMSO-d₆ (400 MHz para ¹H)

O mapa de correlações heteronucleares HMBC foi decisivo para determinar a estrutura de forma inequívoca do flavonol isolado no presente trabalho. Pode-se observar as correlações entre os sinais de H-3' e H-5' (δ H 7,11 ppm) e os sinais dos carbonos C4' (δ C 160,4 ppm) e C1' (δ C 123,2 ppm). Adicionalmente, pode-se observar as correlações dos sinais de H-2' e H-6' (δ H 8,14 ppm) com os sinais dos carbonos C2 (δ C 146,4 ppm) e C4' (δ C 160,4 ppm). O sinal referente ao simpleto do grupo metila (δ H 3,85 ppm) apresentou correlação com o sinal do carbono atribuído a C4', fixando um grupo metila ligado a essa posição (**Figura 32**). Desta forma, pode-se atribuir todos os sinais de carbonos presentes no anel B do flavonol, acrescido do sinal referente ao carbono C2. Assim, pode-se minimizar o número de estruturas químicas possíveis para o derivado flavonol (**Figura 33**).

Figura 32: Mapa de contornos HMBC (14Hz) obtido para F7 em DMSO-d6 (400 MHz para ^1H)

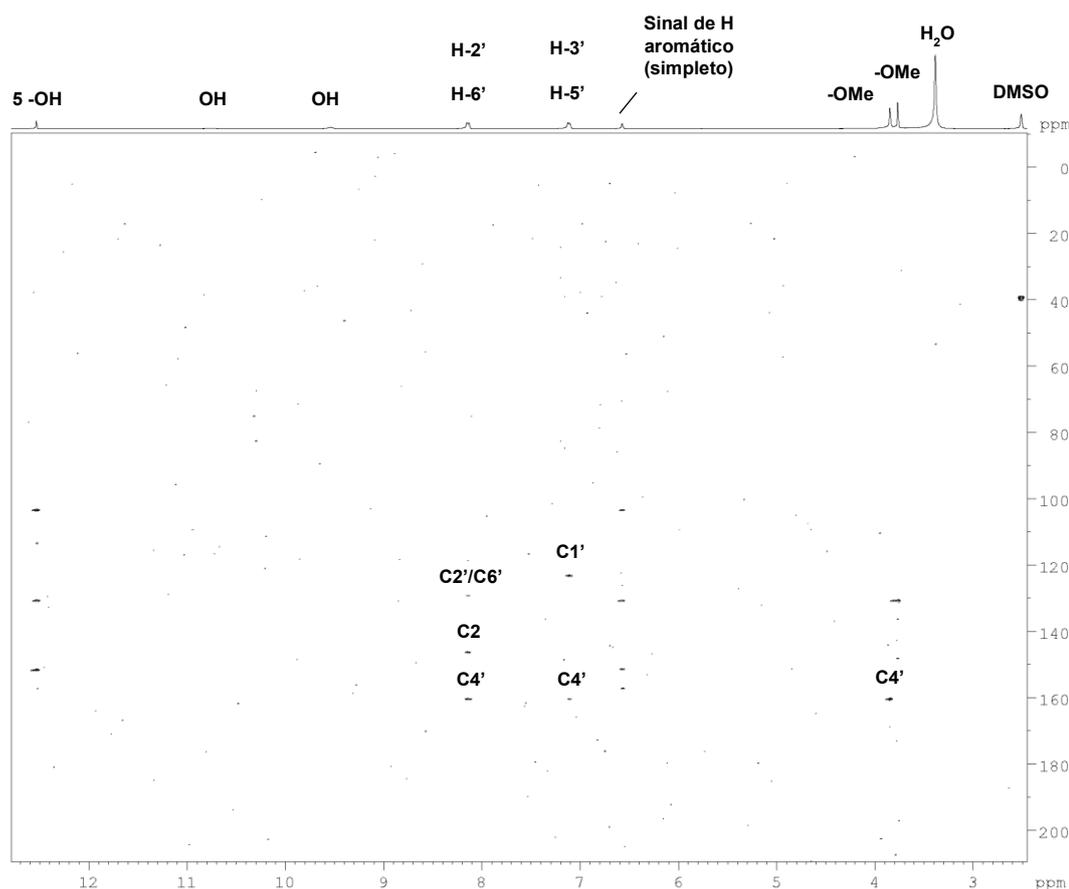
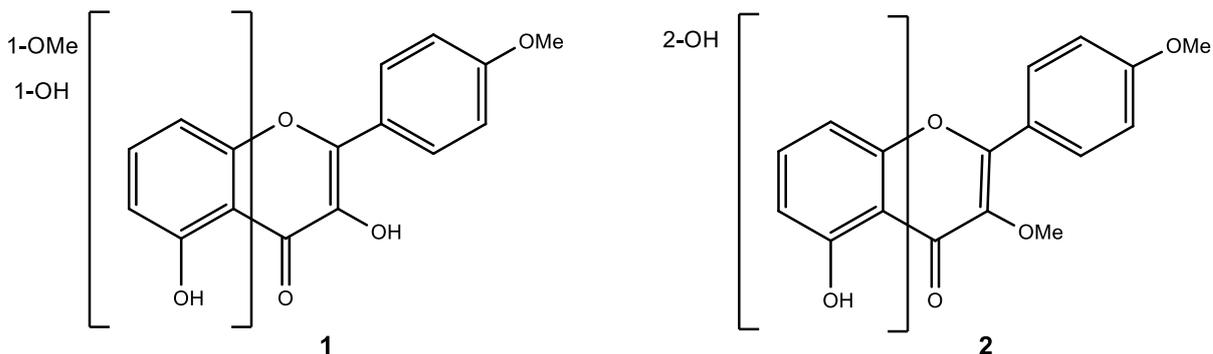
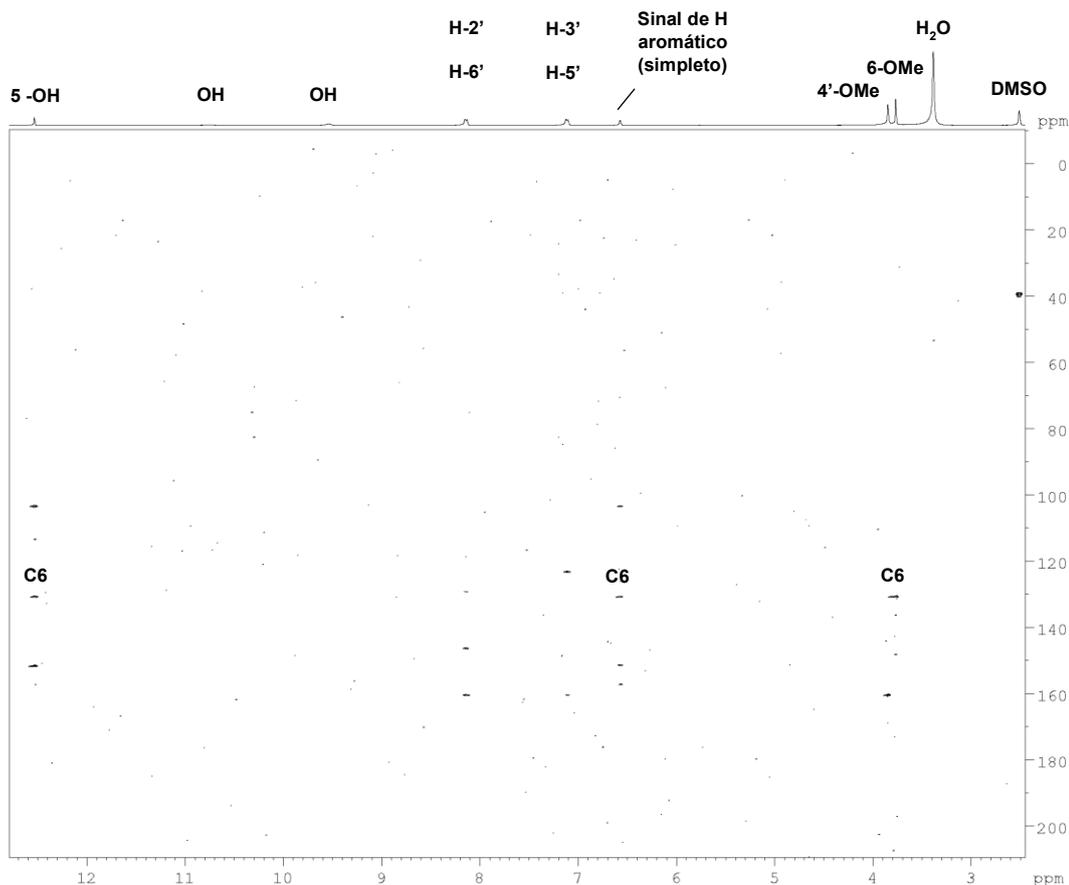


Figura 33: Esquemas de possíveis estruturas para o derivado da fração F7

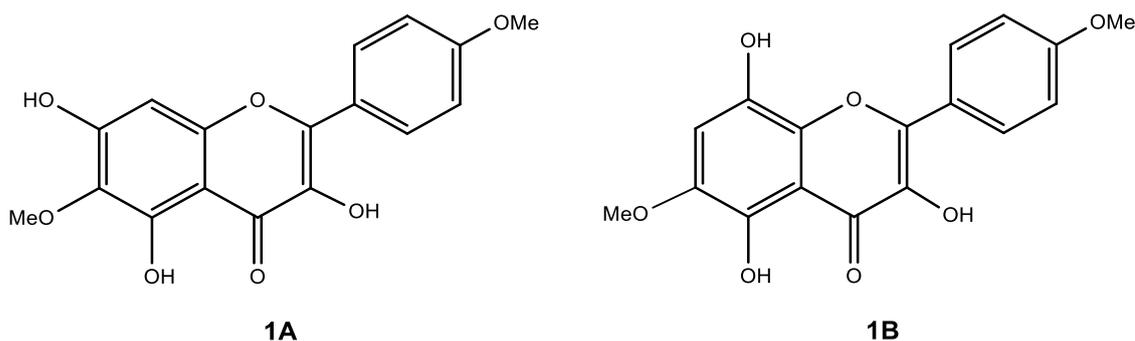
O sinal referente ao outro simpleto do grupo metoxila (δH 3,77 ppm) apresentou correlação com o sinal do carbono atribuído a C6 (δC 130,8 ppm), fixando um grupo metoxila ligado a essa posição (**Figura 34**). Biossinteticamente, a presença de funções oxigenadas com padrão de substituição meta no anel A são esperadas devido a rota biossintética do acetato, a partir do malonil-Coa (HALBWIRTH, 2010). No caso desse flavonol isolado, observa-se um padrão de substituição do anel A pouco frequente, com um grupo metoxila em C6. Substituintes do anel A podem ser introduzidos na posição 6 por enzimas específicas, como é o caso da deoxigenase dependente de 2-oxoglutarato, responsável pela 6-hidroxilação de flavonóis parcialmente metilados na planta semiaquática *Chrysosplenium americanum* (ANZELLOTTI; IBRAHIM, 2000; ANZELLOTTI; IBRAHIM, 2004). O sinal atribuído ao carbono metoxilado C6 (δC 130,8 ppm) apresentou sinais de correlação com o sinal da hidroxila quelatogênica 5-OH (δH 12,53 ppm) e com o sinal referente ao único hidrogênio do anel A (δH 6,57 ppm) (**Figura 34**).

Figura 34: Mapa de contornos HMBC (14Hz) obtido para F7 em DMSO-d6 (400 MHz para ^1H)



Desta forma, pode-se descartar as estruturas químicas que indicam a presença de um grupo metoxila na posição C3 (**Figura 33-2**), pois a posição desse substituinte no anel C inviabiliza a presença dessas correlações. Como consequência, existem apenas duas estruturas possíveis para o derivado flavonol isolado no presente trabalho (**Figura 35**).

Figura 35: Esquemas de possíveis estruturas para o derivado da fração F7



O experimento HMBC apresentou adicionalmente as correlações do sinal atribuído a hidroxila quelatogênica em 5-OH (δ_H 12,53 ppm) com os seguintes sinais de carbono: C4 (δ_C 176,2 ppm), C5 (δ_C 151,7 ppm), C7 (δ_C 157,2 ppm), C9 (δ_C 151,7 ppm) e C10 (δ_C 103,5 ppm) (**Figuras 36 e 37**).

Figura 36: Mapa de contornos HMBC (3 Hz) obtido para F7 em DMSO-d6 (400 MHz para 1H)

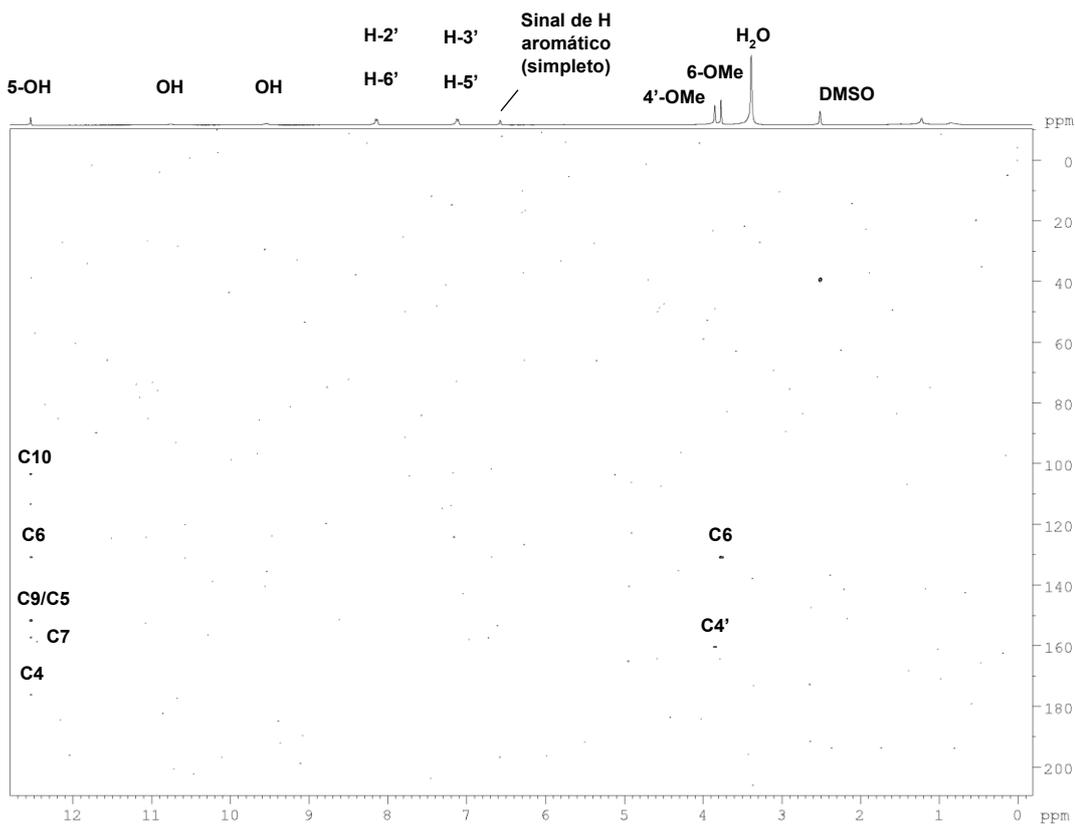
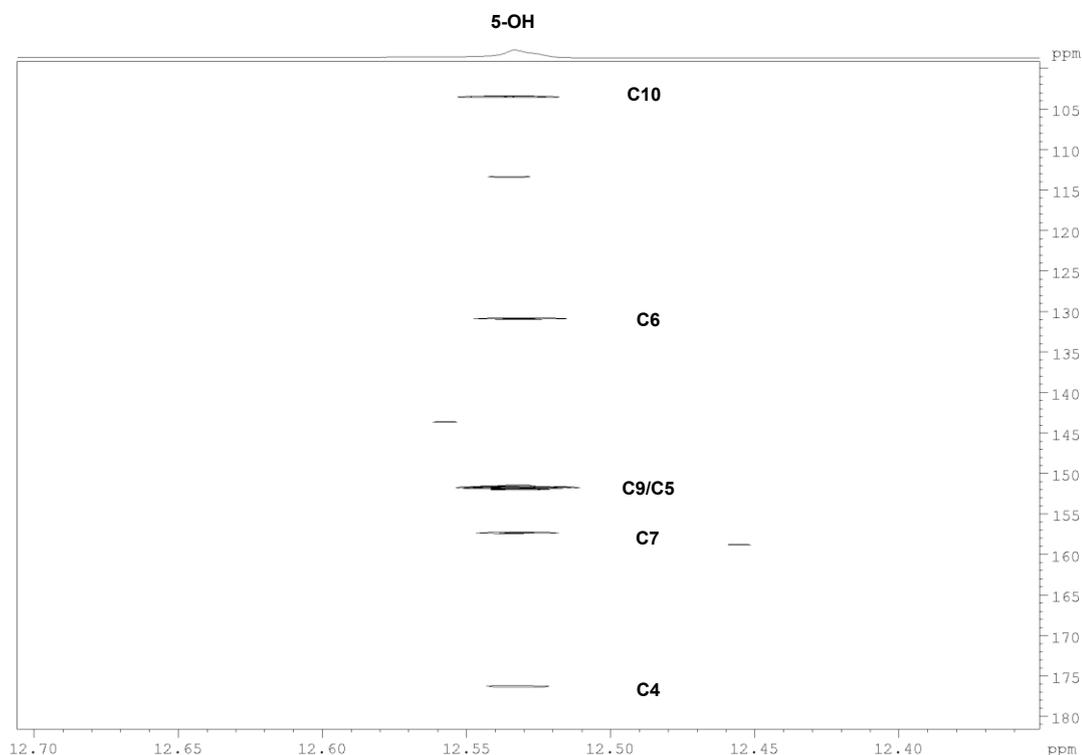


Figura 37: Seção expandida da região da hidroxila quelatogênica (5-OH) do mapa de contornos HMBC (3 Hz) obtido para F7 em DMSO-d₆ (400 MHz para ¹H)



O hidrogênio aromático (δ_H 6,57 ppm) também apresentou manchas de correlação com os carbonos C6, C7, C9 e C10 (**Figura 38**), indicando a atribuição desse hidrogênio em C8, que pode ser confirmada com base na comparação cuidadosa dos dados RMN obtidos no presente trabalho com aqueles publicados para o betuletol (**Tabela 16**). A hidroxila em C7 demonstra que o padrão de oxigenação meta (oxigenação em C5, C7) é observado no anel A do flavonol (HALBWIRTH, 2010).

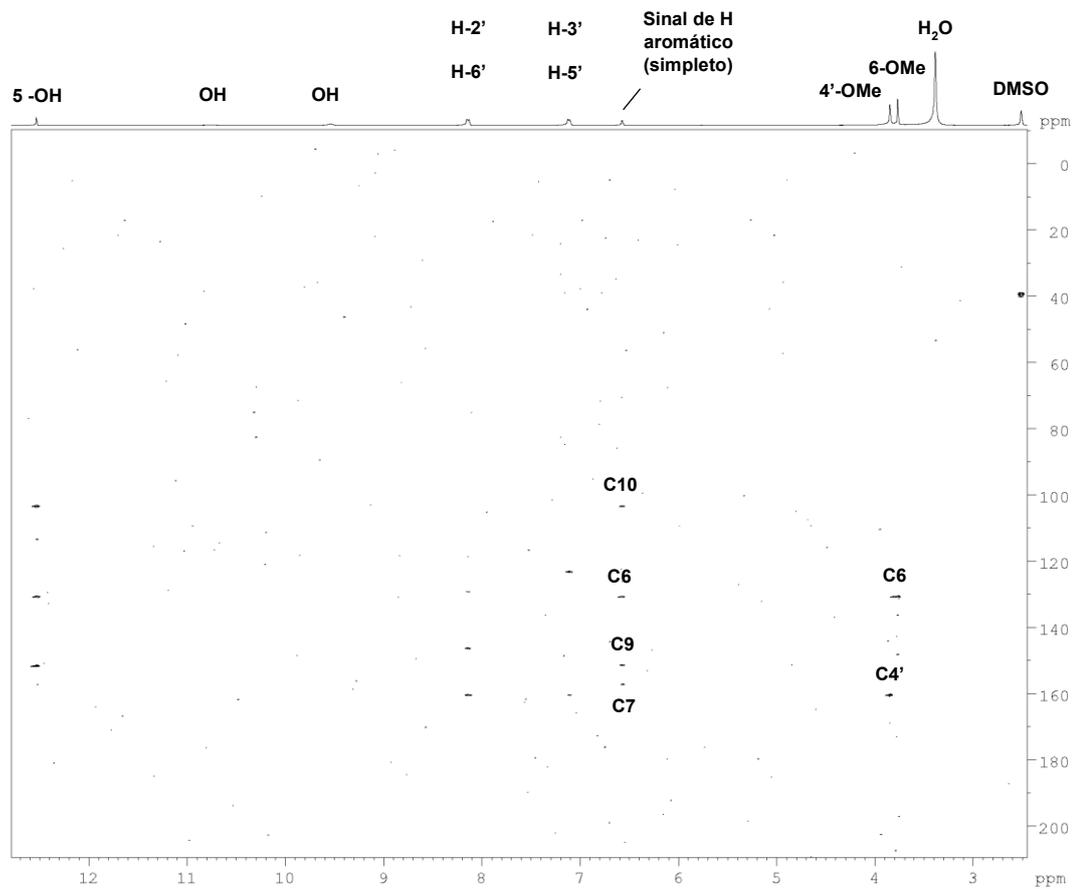
Figura 38: Mapa de contornos HMBC (14Hz) obtido para F7 em DMSO-d6 (400 MHz para ^1H)

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H de F7 (DMSO- d_6 ; 400 MHz), atribuições dos sinais de ^{13}C e comparação com dados da literatura

Posição	F7			Betuletol **
	δH (ppm)	J (Hz)	δC (ppm)*	δC (ppm)
2	-	-	146,4	146,3
3	-	-	-	135,7
4	-	-	176,2	176,2
5	-	-	151,7	151,7
6	-	-	130,8	130,8
7	-	-	157,2	157,2
8	6,57 s	-	93,5	93,8
9	-	-	151,7	151,4
10	-	-	103,5	103,4
1'	-	-	123,2	123,2
2'	8,14 d	8,0	129,1	129,3
3'	7,11 d	8,0	113,8	113,9
4'	-	-	160,4	160,4
5'	7,11 d	8,0	113,8	113,9
6'	8,14 d	8,0	129,1	129,3
6-OMe	3,77 s	-	59,8	59,9
4'-OMe	3,85 s	-	55,1	55,3
5-OH	12,53	-	-	-

d: duplete; s: simpleto

*Atribuídos pela análise dos espectros nesse trabalho

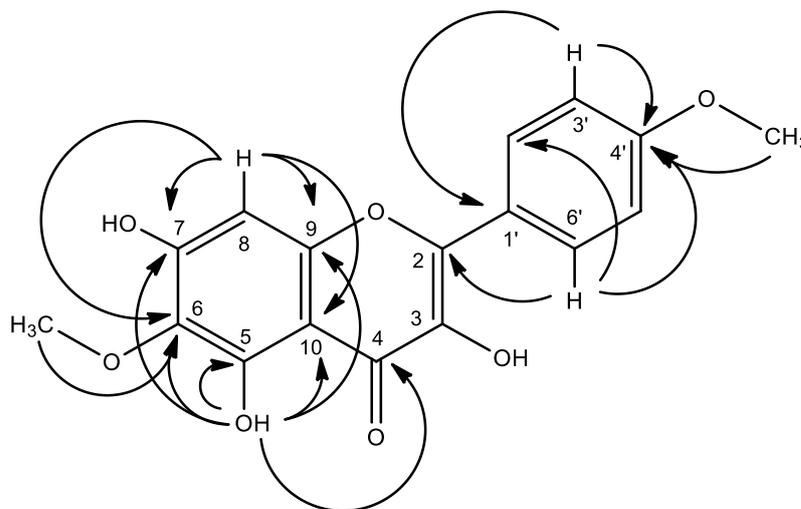
** Referência: Horie *et al.* (1998) (^{13}C RMN 100.4 MHz, DMSO- d_6)

A **Tabela 17** e a **Figura 39** mostram de forma concisa todas as correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas nos mapas de contorno HMBC.

Tabela 17: Correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas nos mapas de contornos HMBC para F7 (DMSO- d_6 ; 400 MHz)

F7	
^1H	^{13}C
8	6, 7, 9, 10
2'	2, 4', 6'
6'	2, 4', 2'
3', 5'	1', 4'
6-OMe	6
4'-OMe	4'
5-OH	4, 5, 6, 7, 9, 10

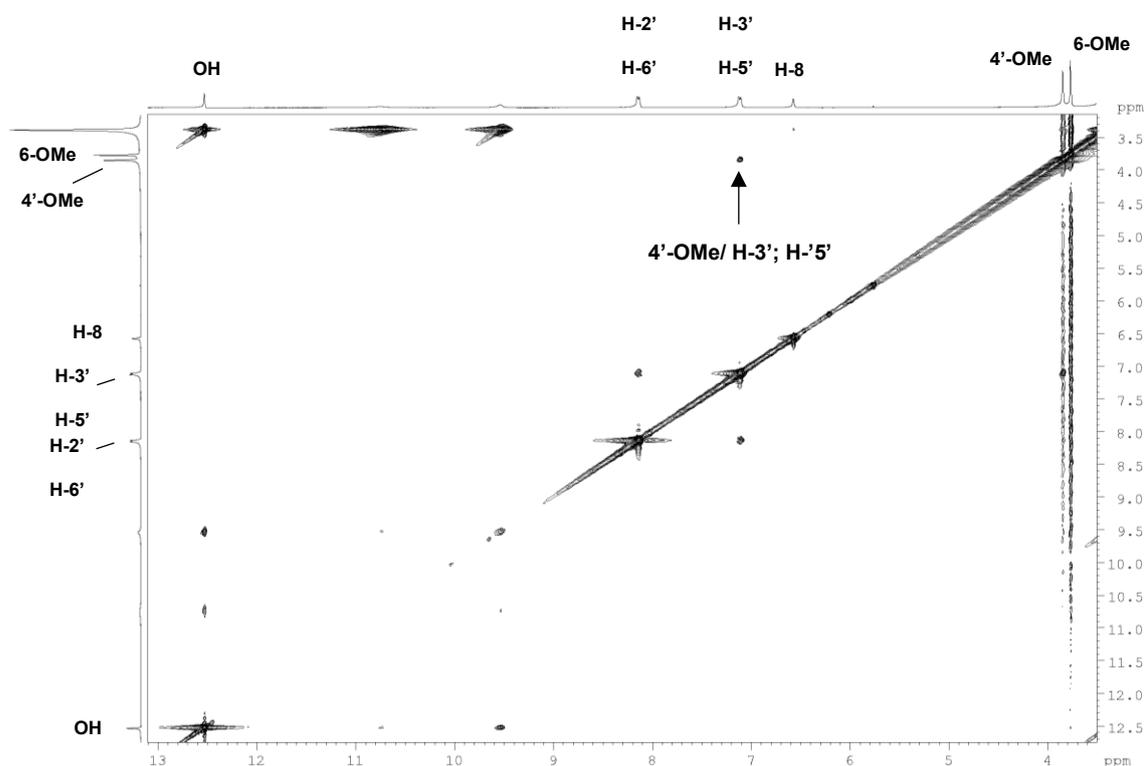
Figura 39: Correlações ^1H - ^{13}C observadas no mapa de contornos HMBC (via J^2 , J^3 e J^4) obtido para F7.



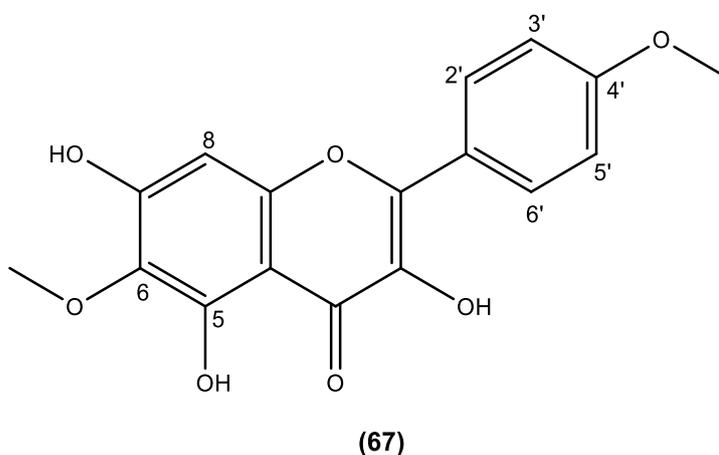
*As correlações correspondentes a H-2' e H-5' citadas na Tabela 17 não foram demonstradas, por serem as mesmas representadas por H-6' e H-3', respectivamente.

Através do mapa de contorno NOESY (**Figura 40**), foi possível observar a correlação entre os hidrogênios do grupo metila em δH 3,85 e os prótons aromáticos em δH 7,11, comprovando novamente a presença de um substituinte metoxila em C4', no anel B.

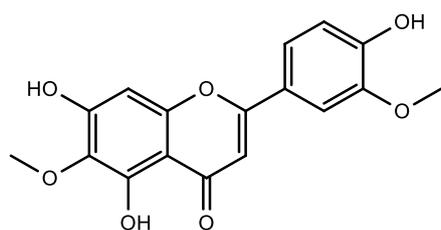
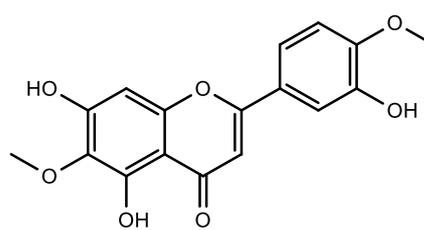
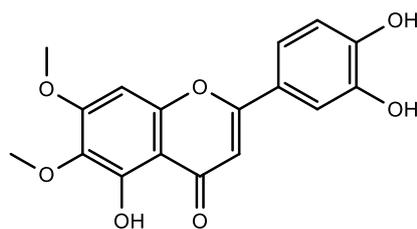
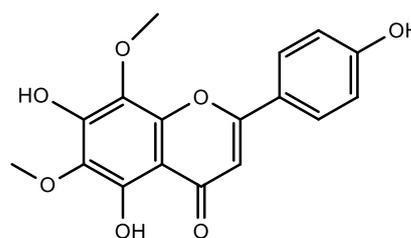
Figura 40: Mapa de contornos NOESY de F7 em DMSO-d6 (400 MHz)



A análise conjunta dos dados espectroscópicos permitiu a identificação inequívoca do composto isolado, que possui dois grupos metoxilas (em C4' e em C6) e três hidroxilas (em C3, C5 e C7) e é denominado 3,5,7-tri-hidroxi-6,4'-dimetoxi-flavona ou betuletol **(67)** (PubChem). Os deslocamentos químicos dos carbonos que foram relatados correspondem aos dados descritos por Horie *et al.* (1998), que avaliaram sistematicamente os espectros de RMN de ^{13}C de diversas flavonas que possuíam uma metoxila na posição C4'. Ressalta-se que o único carbono na qual não foi obtido o deslocamento químico é carbono C3, que está localizado no anel C.



Dentre os isômeros dimetoxilados dessa substância que já foram isolados de espécies de *Baccharis* estão a 5,7,4'-tri-hidroxi-6,3'-dimetoxi-flavona (jaceosidina **(68)**) e a 5,7,3'-tri-hidroxi-6,4'-dimetoxi-flavona (desmetoxicentaureidina **(69)**), encontrados em *B. grisebachii* e *B. gaudichaudiana*; a 5,3',4'-tri-hidroxi-6,7-dimetoxi-flavona (cirsiol **(70)**), encontrado em *B. rufescens* e a 4',5,7-tri-hidroxi-6,8-dimetoxi-flavona (dimetoxisudachitina **(71)**), encontrada em *B. grisebachii* (TAPIA *et al.*, 2004; AKAIKE *et al.*, 2003; SIMIRGIOTIS *et al.*, 2003).

**(68)****(69)****(70)****(71)**

O betuletol **(67)** já foi identificado por LC-MS em brotos de *B. dracunculifolia* e isolado do extrato metanólico de própolis brasileira (MIDORIKAWA *et al.*, 2003), apresentando atividade citotóxica frente as linhagens HT-1080 (fibrosarcoma) e cólon L5-26 (células de carcinoma de cólon murino) com valores de ED₅₀ de 5,83 e 4,95 µg/mL, respectivamente (BANSKOTA *et al.*, 1998).

Segundo Rubio *et al.* (2006), o betuletol-3-metil-eter, derivado do betuletol **(67)**, apresentou potente atividade citotóxica frente a linhagem HL-60 (leucemia promielocítica), com CI₅₀ de 1,80 µM e também frente a outras linhagens tumorais humanas como A431 (carcinoma epidermoide) (CI₅₀ = 3,00 µM), HeLa (carcinoma cervical) (CI₅₀ = 9,1 µM), SK-OV-3 (carcinoma de ovário) (CI₅₀ = 21 µM) e HOS (osteosarcoma) (CI₅₀ = 6,8 µM). Posteriormente foi demonstrado que esse mesmo

derivado também apresentou citotoxicidade a células que superexpressavam as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x_L e frente a diferentes linhagens de leucemia humana, tais como U937 (linfoma histiocítico humano), K-562 (leucemia mieloide crônica), THP-1 (leucemia monocítica humana), Jurkat (células de leucemia T) e Molt-3 (leucemia linfoblástica aguda) (RUBIO *et al.*, 2010).

6 CONCLUSÕES

Na triagem para atividade citotóxica dos 14 extratos selecionados, todos de espécies de *Baccharis*, dois mostraram-se promissores frente a linhagem tumoral utilizada (A549). A desreplicação dos extratos mais ativos (o de *Baccharis imbricata* e o de *Baccharis megapotamica*), e das respectivas frações, feita através da análise em UPLC-ESI-MS/MS, levou a identificação de alguns metabólitos secundários das duas espécies, dentre eles compostos fenólicos e flavonoides.

O fracionamento biomonitorado dos extratos permitiu a seleção das frações mais ativas e, a avaliação dessas frente a cultura de fibroblastos gengivais humanos, levou a escolha da fração diclorometânica (Fr. Dcm) de *B. imbricata*, por apresentar menor citotoxicidade frente as células saudáveis e maior rendimento extrativo. Com posteriores refracionamentos de Fr. Dcm, foi possível isolar e identificar o flavonol betuletol. Essa substância já foi relatada na literatura, porém pela primeira vez foi isolada dessa espécie de *Baccharis*.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Posteriormente, as demais substâncias das duas frações DCM 1 e DCM 2 serão isoladas e identificadas, dando prosseguimento a caracterização dos metabólitos secundários de *B. imbricata*. Além disso, o betuletol, será testado nos modelos de células tumorais utilizados (A459, HepG2 e DU145), para avaliação do potencial citotóxico.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P. Baccharis (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v. 7, p. 76–96, 2007.
- ABOY, A. L. *et al.* Assay of caffeoylquinic acids in Baccharis trimera by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1219, p. 147–153, 2012.
- ACS. **Cancer Resources**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer.html>>. Acesso em: 15 jan. 2020.
- AGUS, D. B. *et al.* A physical sciences network characterization of non-tumorigenic and metastatic cells. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–12, 2013.
- AKAIKE, S. *et al.* A New ent-Clerodane Diterpene from the Aerial Parts of Baccharis gaudichaudiana. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 2, p. 197–199, 2003.
- ALEEBRAHIM-DEHKORDY, E. *et al.* Medicinal plants, effective plant compounds (compositions) and their effects on stomach cancer. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 8, n. 96, p. 1–10, 2017.
- ALY, H. A. A. Cancer therapy and vaccination. **Journal of Immunological Methods**, v. 382, n. 1–2, p. 1–23, 2012.
- AMARAL, R. G. *et al.* Natural Products as Treatment against Cancer: A Historical and Current Vision. **Clinics in Oncology**, v. 4, n. 1562, p. 1–5, 2019.
- ANZELLOTTI, D.; IBRAHIM, R. K. Novel flavonol 2-oxoglutarate dependent dioxygenase: Affinity purification, characterization, and kinetic properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 382, n. 2, p. 161–172, 2000.
- ANZELLOTTI, D.; IBRAHIM, R. K. Molecular characterization and functional expression of flavonol 6-hydroxylase. **BMC Plant Biology**, v. 4, p. 1–12, 2004.
- ARAÚJO, K. C. F. *et al.* Bioconversion of quercetin and rutin and the cytotoxicity activities of the transformed products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 93–96, 2013.
- BANSKOTA, A. H. *et al.* Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 896–900, 1998.
- BASKAR, A. A. *et al.* Chemopreventive potential of β -Sitosterol in experimental colon cancer model - an In vitro and In vivo study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, 2010.
- BELAY, A.; GHOLAP, A. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in

coffee beans by UV-Vis spectroscopy. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 3, n. 11, p. 234–240, 2009.

BOSCH, F. X. *et al.* Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. **Gastroenterology**, v. 127, n. 5, p. 5–16, 2004.

BRANDÃO, H. N. *et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

BUDEL, J. M. *et al.* O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 268–271, 2005.

BÚFALO, M. C. *et al.* Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 5, p. 1669–1680, 2009.

CABRERA, J. *et al.* Gardenin B-induced cell death in human leukemia cells involves multiple caspases but is independent of the generation of reactive oxygen species. **Chemico-Biological Interactions**, v. 256, p. 220–227, 2016.

CAMPOS, R. *et al.* *Baccharis* (Asteraceae): Chemical Constituents and Biological Activities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, p. 1–17, 2016.

CASTILLEJOS-MOLINA, R. A.; GABILONDO-NAVARRO, F. B. Prostate cancer. **Salud Pública de México**, v. 58, n. 2, p. 279–284, 2016.

CATANZARO, E. *et al.* Antitumor Potential of Marine and Freshwater Lectins. **Marine drugs**, v. 18, n. 11, p. 1–40, 2019.

CERSOSIMO, R. J. Lung cancer: A review. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 59, n. 7, p. 611–642, 2002.

CHROMACADEMY. **Mass Spectrometry MS Interpretation General Interpretation Strategies**, 2018. Disponível em: <www.chromacademy.com>

CIFUENTE, D. A. *et al.* Antiinflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sophiifolia* in mice. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 6, p. 529–531, 2001.

CLIFFORD, M. N. *et al.* Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900–2911, 2003.

CLIFFORD, M. N. *et al.* Characterization by LC-MSⁿ of four new classes of p-coumaric acid-containing diacyl chlorogenic acids in green coffee beans. **Journal of Agricultural and Food**

Chemistry, v. 54, n. 12, p. 4095–4101, 2006.

CLIFFORD, M. N. *et al.* Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: Discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. **Natural Product Reports**, v. 34, n. 12, p. 1391–1421, 2017.

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3821–3832, 2005.

COSTA, P. *et al.* Hydroalcoholic extract from *Baccharis dracunculifolia* recovers the gastric ulcerated tissue, and p-coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. **BioFactors**, v. 45, n. 3, p. 479–489, 2019.

COURAUD, S. *et al.* Lung cancer in never smokers - A review. **European Journal of Cancer**, v. 48, n. 9, p. 1299–1311, 2012.

CROCE, C. M. Oncogenes and Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 5, p. 502–511, 2008.

DE ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

DE CARVALHO, M.; WEICH, H.; ABRAHAM, W.-R. Macrocyclic trichothecenes as antifungal and anticancer compounds. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 1, p. 23–35, 2016.

DE OLIVEIRA, C. *et al.* The Inhibitory Effects of Phenolic and Terpenoid Compounds from *Baccharis trimera* in Siha Cells: Differences in Their Activity and Mechanism of Action. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 11022–11032, 2013.

DE OLIVEIRA, C. B. *et al.* Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1113–1123, 2012.

DE OLIVEIRA, P. *et al.* Comparative Evaluation of Antiproliferative Effects of Brazilian Green Propolis, Its Main Source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents Artepillin C and Baccharin. **Planta Médica**, v. 80, p. 490–492, 2014.

DEL CORRAL, S. *et al.* Phytotoxic halimanes isolated from *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pad.) Pers. **Phytochemistry**, v. 5, p. 280–283, 2012.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Research**, v. 68, n. 21, p. 8643–8653, 2008.

DORR, N. M.; BARTELS, M.; MORGUK, M. H. Current treatment of colorectal liver

metastases. **Anticancer Research**, v. 40, n. 1, p. 1–7, 2020.

ESCOBAR, Z. *et al.* Phenolic Compounds From *Baccharis Papillosa* Subsp. *Papillosa*. **Revista Boliviana de Química**, v. 26, n. 2, p. 111–117, 2009.

FDA. **Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs**. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>>. Acesso em: 4 jan. 2020.

FERESIN, G. E. *et al.* Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 1, p. 103–107, 2001.

FERESIN, G. E. *et al.* Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 73–80, 2003.

FERRO, M. *et al.* Biomarkers in localized prostate cancer. **Future Oncology**, v. 12, n. 3, p. 399–411, 2016.

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G. *et al.* Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 655–664, 2013.

FILHO, A. A. DA S. *et al.* Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung. C**, v. 63, n. 1–2, p. 40–46, 2008.

FILHO, A. A. DA S. *et al.* In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, n. 8, p. 478–482, 2009.

FILIPPINI, R. *et al.* Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of *Hypericum perforatum*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 2, p. 115–119, 2010.

FUKUDA, M. *et al.* Studies on the Constituents of the Leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their Cytotoxic Activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 10, p. 1465–1468, 2006.

FULLAS, F. *et al.* Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. **Journal of natural products**, v. 57, n. 6, p. 801–807, 1994.

GANN, P. H. Risk factors for Prostate cancer. **Reviews in Urology**, v. 4, n. 5, p. 3–10, 2002.

GARCÍA, M. *et al.* Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. **Pest Management Science**, v. 61, n. 6, p. 612–618, 2005.

GENÉ, R. M. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of its active constituents. **Planta Medica**, v. 62, n. 3, p. 232–235, 1996.

GEORGE, V. C.; DELLAIRE, G.; RUPASINGHE, H. P. V. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 45, p. 1–14, 2017.

GIBELLINI, L. *et al.* Quercetin and cancer chemoprevention. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–15, 2011.

GONZALEZ-FIERRO, A.; DUEÑAS-GONZÁLEZ, A. Drug repurposing for cancer therapy, easier said than done. **Seminars in Cancer Biology**, p. 1–9, 2019.

GOTO, H. *et al.* Methylated chrysin reduced cell proliferation, but antagonized cytotoxicity of other anticancer drugs in acute lymphoblastic leukemia. **Anti-Cancer Drugs**, v. 23, n. 4, p. 417–425, 2012.

GRANADO-SERRANO, A. B. *et al.* Quercetin Induces Apoptosis via Caspase Activation, Regulation of Bcl-2, and Inhibition of PI-3-Kinase/Akt and ERK Pathways in a Human Hepatoma Cell Line (HepG2). **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 11, p. 2715–2721, 2006.

GRECCO, S. DOS S. *et al.* Triterpenoids and phenolic derivatives from *Baccharis uncinella* C.DC. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology journal**, v. 38, p. 1234–1237, 2010.

GRECCO, S. DOS S. *et al.* Phenolic derivatives from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 42, p. 21–24, 2012.

GREENWELL, M.; RAHMAN, P. K. S. . Medicinal Plants : Their Use in Anticancer Treatment. **International Journal of Pharmaceutical Science Research**, v. 6, n. 10, p. 4103–4112, 2015.

GUIMARÃES, N. S. S. *et al.* *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3–4, p. 1091–1097, 2012.

HABERMEHL, G. G. *et al.* Macrocyclic trichothecenes: Cause of livestock poisoning by the Brazilian plant *Baccharis coridifolia*. **Toxicon**, v. 23, n. 5, p. 731–743, 1985.

HALBWIRTH, H. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 595–621, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Leading Edge Review Hallmarks of Cancer: The Next

Generation. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 646–674, 2011.

HARRINGTON, M. Immune therapy for liver cancer. **Lab Animal**, v. 43, n. 8, p. 257, 2014.

HEIDARI-SORESHJANI, S. *et al.* Phytotherapy of nephrotoxicity-induced by cancer drugs: An updated review. **Journal of Nephropathology**, v. 6, n. 3, p. 254–263, 2017.

HEIDENREICH, A. *et al.* EAU Guidelines on Prostate Cancer. **European Urology**, v. 53, n. 1, p. 68–80, 2008.

HEJMADI, M. **Introduction to Cancer Biology**. 2 Edition ed. bookboon.com: bookboon.com, 2010.

HORIE, T. *et al.* ¹³C NMR spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 865–874, 1998.

HUANG, M. *et al.* Terpenoids: Natural products for cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 12, p. 1801–1818, 2012.

INCA. **Tipos de câncer | Câncer de Fígado**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-figado>>. Acesso em: 5 jan. 2020.

INCA. **Estimativa 2020 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2019: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>.

INCA. **Tipos de câncer | INCA Câncer de Pulmão**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao>>. Acesso em: 28 dec. 2019b.

INCA. **Tipos de câncer | Câncer de Próstata**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acesso em: 5 jan. 2020c.

ISAKA, M. *et al.* Antimalarial activity of macrocyclic trichothecenes isolated from the fungus *Myrothecium verrucaria*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 2, p. 329–331, 1999.

IWAI, K. *et al.* In vitro antioxidative effects and tyrosinase inhibitory activities of seven hydroxycinnamoyl derivatives in green coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4893–4898, 2004.

JAIN, R.; JAIN, S. K. Screening of in vitro cytotoxic activity of some medicinal plants used traditionally to treat cancer in Chhattisgarh state, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. SUPPL. 2, p. S147–S150, 2011.

JAISWAL, R. *et al.* Profiling and characterization by LC-MSn of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate esters in maté (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5471–5484, 2010.

JAISWAL, R.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for liquid chromatography/ multi-stage spectrometric identification of 3,4,5-triacetyl chlorogenic acids in green Robusta coffee beans. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, p. 2283–2294, 2010.

JANUÁRIO, A. H. *et al.* Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): Anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, n. 3, p. 243–251, 2004.

JARAMILLO-GARCÍA, V. *et al.* Chemical characterization and cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of *Baccharis trinervis* (Lam, Persoon) from Colombia and Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, n. July 2017, p. 210–220, 2018.

JARVIS, B. B. *et al.* Isolation of Macrocyclic Trichothecenes from a Large-Scale Extract of *Baccharis megapotamica*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 52, p. 45–56, 1987.

JARVIS, B. B. *et al.* The mystery of trichothecene antibiotics in *Baccharis* species. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 4, p. 736–744, 1988.

KARAM, T. K. *et al.* Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Revisteria Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 280–286, 2013.

KENFIELD, S. A. *et al.* Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. **Tobacco Control**, v. 17, n. 3, p. 198–204, 2008.

KOH, P. K. *et al.* Targeted agents in non-small cell lung cancer (NSCLC): Clinical developments and rationale for the combination with thoracic radiotherapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 6, p. 626–640, 2012.

KRISHNAMURTHY, T.; BECK, D. J.; ISENSEE, R. K. Mass Spectral Investigations on Trichothecene Mycotoxins -VIII - Thermospray Ionization and Collisionally Activated Dissociation of Macrocyclic Trichothecenes. **Biomedical and Environmental Mass Spectrometry**, v. 18, p. 287–300, 1989.

KUPCHAN, S. M. *et al.* Baccharin, a novel potent antileukemic trichothecene triepoxide from *Baccharis megapotamica*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, n. 22, p. 7092–7093, Oct. 1976.

KUPCHAN, S. M. *et al.* Isolation of potent new antileukemic trichothecenes from *Baccharis megapotamica*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 26, p. 4221–4225, 1977a.

KUPCHAN, S. M. *et al.* Isolation of potent new antileukemic trichothecenes from *Baccharis megapotamica*. **The Journal of organic chemistry**, v. 42, n. 26, p. 4221–5, 23 Dec. 1977b.

KURATA, R. *et al.* Growth suppression of human cancer cells by polyphenolics from

sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 185–190, 2007.

LANG, G. *et al.* Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: New methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1595–1599, 2008.

LEMOS, M. *et al.* *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 4, p. 603–608, 2007.

LI, S. *et al.* Isolation and syntheses of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones as inhibitors of HL-60 cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 3381–3389, 2007.

LIU, Y.-Q.; YANG, L.; TIAN, X. Podophyllotoxin: Current Perspectives. **Current Bioactive Compounds**, v. 3, n. 1, p. 37–66, 2007.

LÍVERO, F. A. DOS R. *et al.* Hydroethanolic extract of *Baccharis trimera* promotes gastroprotection and healing of acute and chronic gastric ulcers induced by ethanol and acetic acid. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 389, n. 9, p. 985–998, 2016.

LÖBLER, R. *et al.* Avaliação do Escore de Gleason como fator prognóstico em pacientes com câncer de próstata em hormonioterapia. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 27, p. 21–23, 2012.

LÓPEZ-GÓMEZ, M. *et al.* Cancer in developing countries: The next most preventable pandemic. The global problem of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 1, p. 117–122, 2013.

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

MARCH, R. E.; MIAO, X. S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 231, n. 2–3, p. 157–167, 2004.

MELO, S. DE F. *et al.* Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 496, p. 33–38, 2001.

MESQUITA, L. M. S. *et al.* Modulatory effect of polyphenolic compounds from the mangrove

tree rhizophora mangle l. On non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance in high-fat diet obese mice. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 1–20, 2018.

MIDORIKAWA, K. *et al.* Buds of *Baccharis dracunculifolia*: potent source of biologically active caffeoquinic acids and labdane-type diterpenes of Brazilian propolis. **Journal Trad. Med.**, v. 20, p. 187–194, 2003.

MISHIMA, S. *et al.* Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 20, p. 5814–5818, 2005.

MONGELLI, E. *et al.* In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. **Journal of ethnopharmacology**, v. 58, n. 3, p. 157–63, Nov. 1997.

MOREIRA, F. D. P. M. *et al.* Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* - Bioatividade sobre *Artemia salina*. **Quimica Nova**, v. 26, n. 3, p. 309–311, 2003.

MOUDI, M. *et al.* Vinca Alkaloids. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1131–1135, 2013.

MOURA, J. C. M. S. *et al.* Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 4, p. 360–376, 2010.

MURAKAMI, A.; ASHIDA, H.; TERAOKA, J. Multitargeted cancer prevention by quercetin. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 315–325, 2008.

MURPHY, A. B. *et al.* Smoking and Prostate Cancer in a Multi-Ethnic Cohort. **Prostate**, v. 73, n. 14, p. 1518–1528, 2013.

NAVEED, M. *et al.* Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 97, n. October 2017, p. 67–74, 2018.

NCI. **NCI-60 Human Tumor Cell Lines Screen**. Disponível em: <https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/default.htm>. Acesso em: 29 dec. 2019.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 Mar. 2016.

NIH. **Prostate-Specific Antigen (PSA) Test - National Cancer Institute**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/prostate/psa-fact-sheet>>. Acesso em: 5 jan. 2020.

NIH. **Liver and Bile Duct Cancer**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/types/liver>>. Acesso em: 5 jan. 2020.

NOBILI, S. *et al.* Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v. 59, n. 6, p. 365–378, 2009.

OCHWANG'I, D. O. *et al.* Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 3, p. 1040–1055, 2014.

ODA, T. *et al.* 12'-Hydroxyl group remarkably reduces Roridin E cytotoxicity. **Mycoscience**, v. 51, n. 4, p. 317–320, 2010.

OLIVEIRA, P. A. *et al.* Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 79, n. 4, p. 593–916, 2007.

PASSERO, L. F. D. *et al.* Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae). **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 529–536, 1 Mar. 2011.

PAVLICA, S.; GEBHARDT, R. Protective effects of ellagic and chlorogenic acids against oxidative stress in PC12 cells. **Free Radical Research**, v. 39, n. 12, p. 1377–1390, 2005.

PEREIRA, C. B. *et al.* Cytotoxic mechanism of *Baccharis milleflora* (Less.) DC. essential oil. **Toxicology in Vitro**, v. 42, n. May, p. 214–221, 2017.

PLOCHMANN, K. *et al.* Structure-activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 460, n. 1, p. 1–9, 2007.

POPIOŁKIEWICZ, J. *et al.* In vitro toxicity evaluation in the development of new anticancer drugs - Genistein glycosides. **Cancer Letters**, v. 229, n. 1, p. 67–75, 2005.

PUANGPRAPHANT, S. *et al.* Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 10, p. 1509–1522, 2011.

PUBCHEM. **The PubChem Project: chemical structure.** Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 4 jan. 2020a.

PUBCHEM. **PubChem: Betuletol.** Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Betuletol>>. Acesso em: 7 feb. 2020b.

RABELO, A. C. S.; COSTA, D. C. A review of biological and pharmacological activities of *Baccharis trimera*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 296, n. September, p. 65–75, 2018.

RAHALISON, L. *et al.* Antifungal Principles of *Baccharis pedunculata*. **Planta Medica**, v. 61,

n. 04, p. 360–362, 4 Aug. 1995.

RAMESHKUMAR, A. *et al.* Profiling of phenolic compounds using UPLC-Q-TOF-MS/MS and nephroprotective activity of Indian green leafy vegetable *Merremia emarginata* (Burm. f.). **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 94–101, 2013.

RAVISHANKAR, D. *et al.* Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 12, p. 2821–2831, 2013.

REAGAN, M. Causes of Cancer: genetic, epigenetic, viral, microenvironmental and environmental contributions to cancer. In: **Cancer: Prevention, Early Detection, Treatment and Recovery, Second Edition.**, p. 53–74.

REGINATTO, F. H. Introdução à Análise Fitoquímica. In: LTDA., A. E. (Ed.). . **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, RS, p. 174.

RIZZO, I. *et al.* Macrocyclic trichothecenes in *Baccharis coridifolia* plants and endophytes and *Baccharis artemisioides* plants. **Toxicon**, v. 35, n. 5, p. 753–757, 1997.

ROMERO-BENAVIDES, J. C. *et al.* Phytochemical Study and Evaluation of the Cytotoxic Properties of Methanolic Extract from *Baccharis obtusifolia*. **International Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1–5, 2018.

RUBIO, S. *et al.* Phenylbenzopyrones structure-activity studies identify betuletol derivatives as potential antitumoral agents. **European Journal of Pharmacology**, v. 548, n. 1–3, p. 9–20, 2006.

RUBIO, S. *et al.* Betuletol 3-methyl ether induces G2-M phase arrest and activates the sphingomyelin and MAPK pathways in human leukemia cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 49, n. 1, p. 32–43, 2010.

RUNDLE, A. *et al.* Obesity and future prostate cancer risk among men after an initial benign biopsy of the prostate. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 22, n. 5, p. 898–904, 2013.

SARTOR, T. *et al.* Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 355–359, 2013.

SCHMID, M. *et al.* The role of biomarkers in the assessment of prostate cancer risk prior to prostate biopsy: Which markers matter and how should they be used? **World Journal of Urology**, v. 32, n. 4, p. 871–880, 2014.

SCIGELOVA, M. *et al.* Fourier transform mass spectrometry. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 10, n. 7, p. 1–19, 2011.

SEO, K. W. *et al.* The protective effects of propolis on hepatic injury and its mechanism. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 3, p. 250–253, 2003.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 813–823, 2006.

SIDDIQUI, S.; KHANVILKAR, V. V.; JAGDALE, D. In Vitro Methods of Screening of Anti-Cancer Agent. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 9, p. 409–424, 2017.

SIMIRGIOTIS, M. J. *et al.* An ent-kaurene derivative from aerial parts of *Baccharis rufescens*. **Anales des la Asociacion Quimica Argentina**, v. 91, n. 4–6, p. 109–116, 2003.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic Properties. **Planta Medica**, v. 53, n. 01, p. 37–39, 24 Feb. 1987.

SOUZA, M. *et al.* *Baccharis trimera* (Less.) DC: An Innovative Cardioprotective Herbal Medicine Against Multiple Risk Factors for Cardiovascular Disease. **Journal of Medicinal Food**, v. 00, n. 0, p. 1–9, 2019.

SY-CORDERO, A. A. *et al.* Dereplication of macrocyclic trichothecenes from extracts of filamentous fungi through UV and NMR profiles. **Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 9, p. 539–544, 2010.

TAPIA, A. *et al.* Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2–3, p. 155–161, Dec. 2004.

THOMAS, C. J.; RAHIER, N. J.; HECHT, S. M. Camptothecin: Current perspectives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 1585–1604, 2004.

TOMAZONI, E. Z. *et al.* Inhibition of *Alternaria* stem canker on tomato by essential oils from *Baccharis* species. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 54, n. 9, p. 781–790, 2019.

TORRES, A. R. *et al.* Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 51, n. 6, p. 1–10, 2018.

TSIMOGIANNIS, D. *et al.* Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 593–606, 2007.

TSUJI, P. A.; WALLE, T. Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, n. 1, p. 37–44, 2008.

- UENO, A. K. *et al.* Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 125, p. 55–58, 1 Mar. 2018.
- VEIGA, R. S. *et al.* Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911–920, 2017.
- VERDI, L. . *et al.* Kaurene diterpenes and flavonoids from *Baccharis illinita* flowers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 9, p. 837–840, Sep. 2004.
- VERDI, L. G. *et al.* GÊNERO *Baccharis* (ASTERACEAE): ASPECTOS QUÍMICOS, ECONÔMICOS E BIOLÓGICOS. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85–94, 2005.
- VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.
- VOIGT, W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. In: **Methods in molecular medicine**, v. 110p. 39–48.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Second Edi ed. Berlim: Springer, 1996.
- WALLE, T. *et al.* Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids-Methylated versus unmethylated flavones. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n. 9, p. 1288–1296, 2007.
- WALLE, T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? **Seminars in Cancer Biology**, v. 17, n. 5, p. 354–362, 2007.
- WEIMANN, C. *et al.* Spasmolytic effects of *Baccharis conferta* and some of its constituents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 1, p. 99–104, 2002.
- WHO. **World Cancer Report 2014**International Agency for Research on CancerLyonInternational Agency for Research on Cancer, , 2014.
- WHO. **Cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 28 dec. 2019.
- YANG, C. S.; PRABHU, S.; LANDAU, J. Prevention of carcinogenesis by tea polyphenols. **Drug Metabolism Reviews**, v. 33, n. 3–4, p. 237–253, 2001.
- ZAMPINI, I. C.; ISLA, M. I.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Antimicrobial and antioxidant compounds from the infusion and methanolic extract of *baccharis incarum* (WEDD.) Perkins.

Journal of the Chilean Chemical Society, v. 54, n. 4, p. 477–481, 2009.

ZAPPA, C.; MOUSA, S. A. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. **Translational Lung Cancer Research**, v. 5, n. 3, p. 288–300, 2016.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2018.

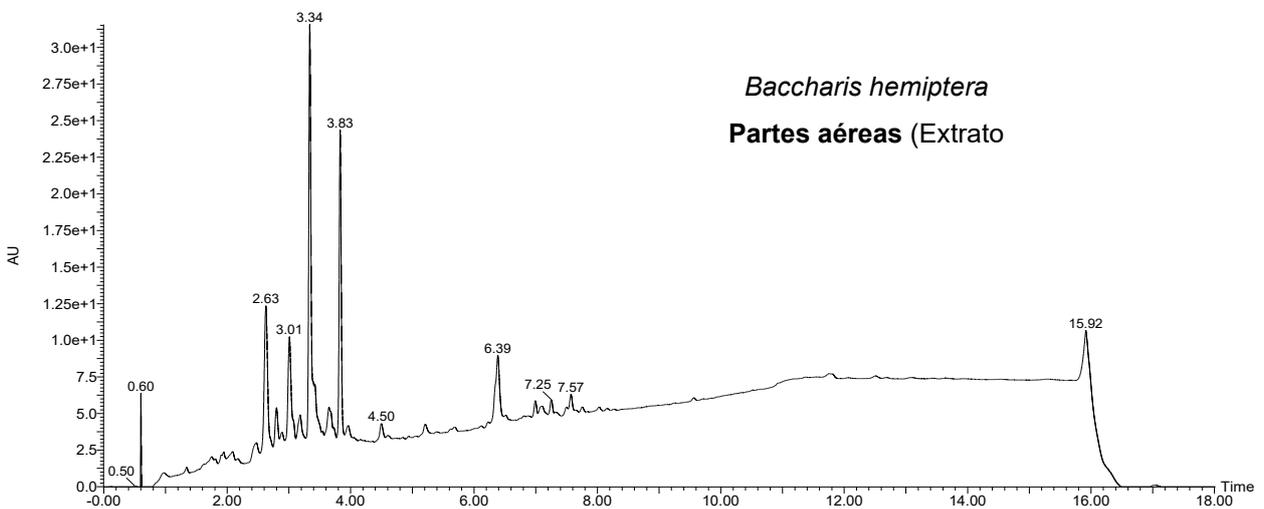
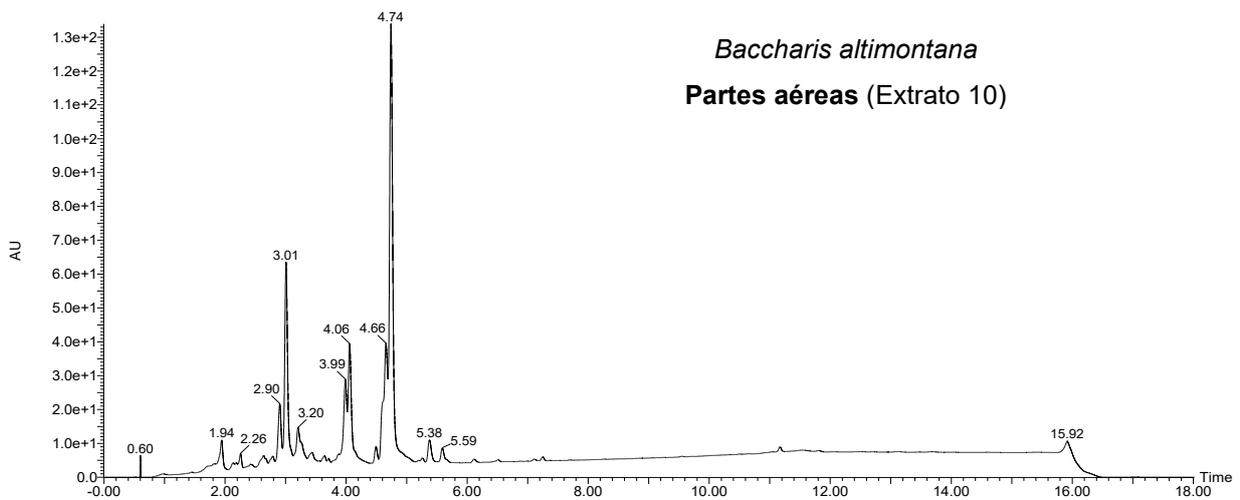
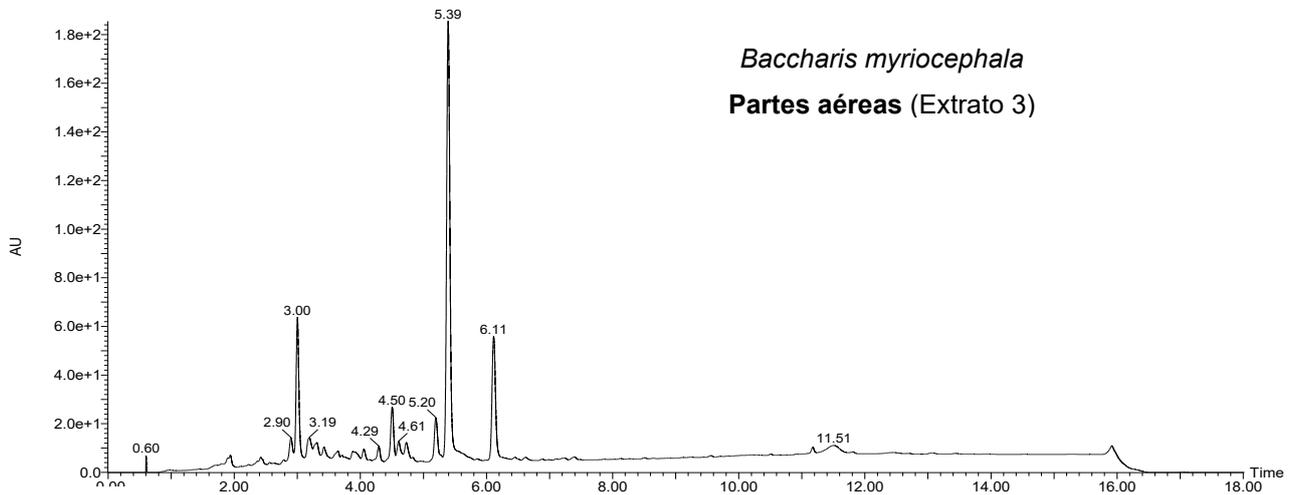
ZHANG, S. H. *et al.* Typical ultraviolet spectra in combination with diagnostic mass fragmentation analysis for the rapid and comprehensive profiling of chlorogenic acids in the buds of *Lonicera macranthoides*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 13, p. 3659–3672, 2016.

ZHENG, W.; CLIFFORD, M. N. Profiling the chlorogenic acids of sweet potato (*Ipomoea batatas*) from China. **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 147–152, 2008.

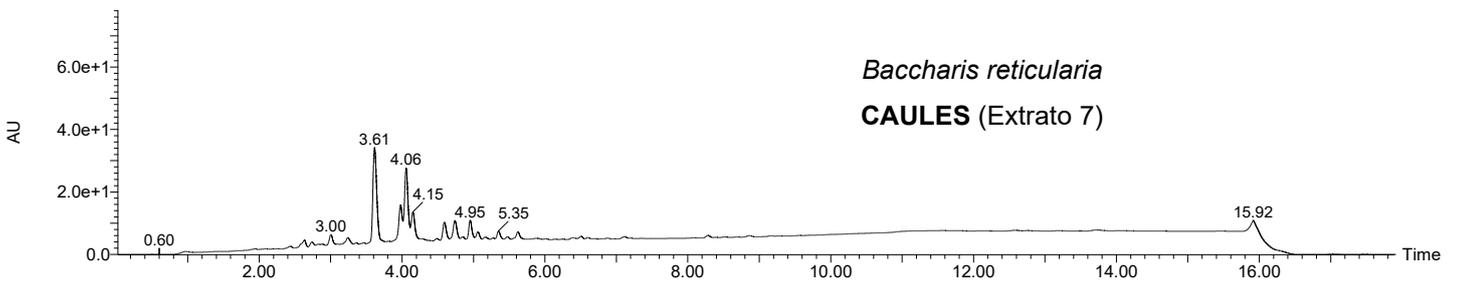
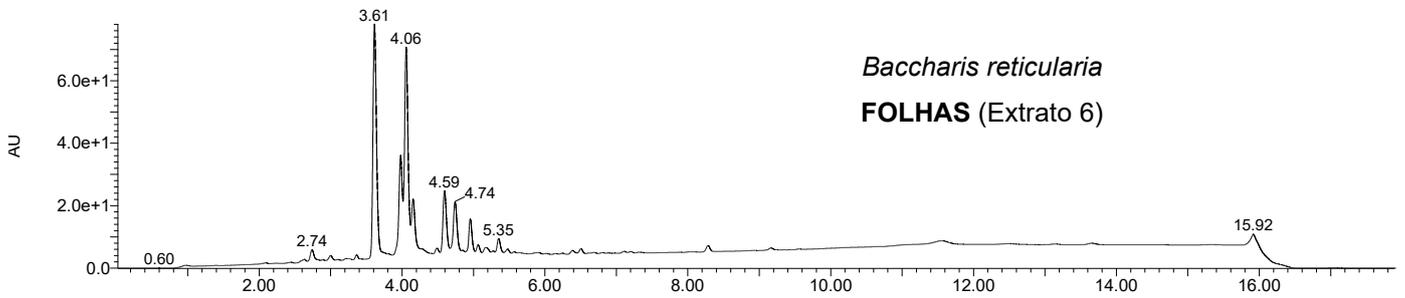
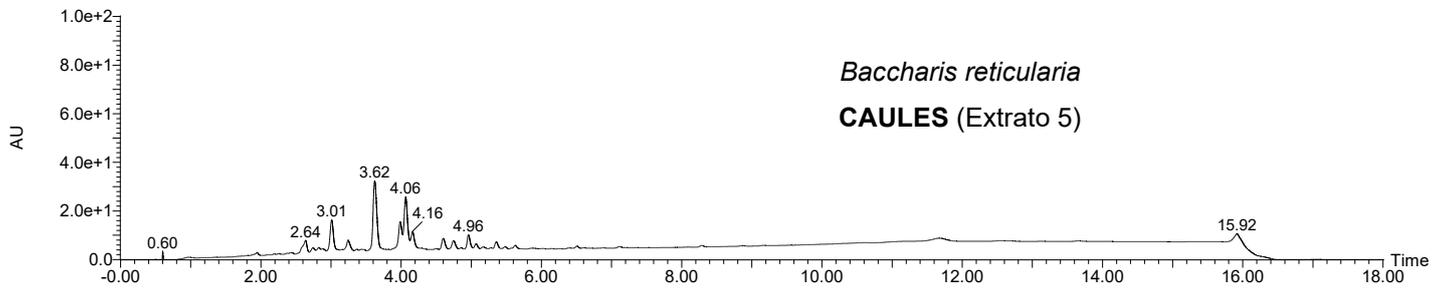
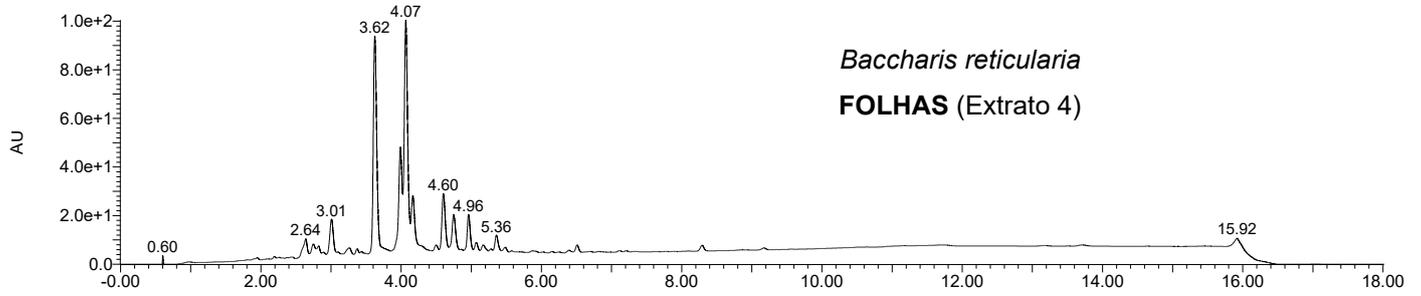
ZHENG, X. *et al.* A potential target for liver cancer management, lysophosphatidic acid receptor 6 (LPAR6), is transcriptionally up-regulated by the NCOA3 coactivator. **J. Biol. Chem.**, v. 6, p. 1–28, 2019.

ZUANAZZI, J. Â. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. In: ARTMED EDITORA LTDA, **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, RS, p. 420.

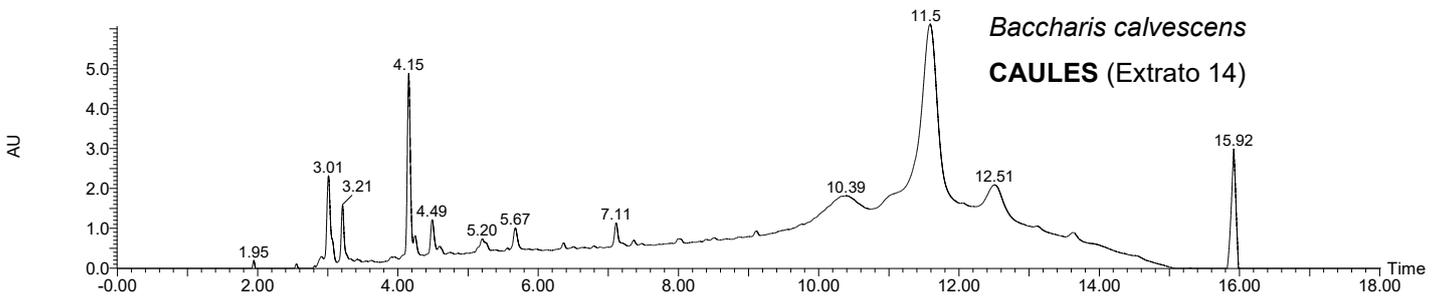
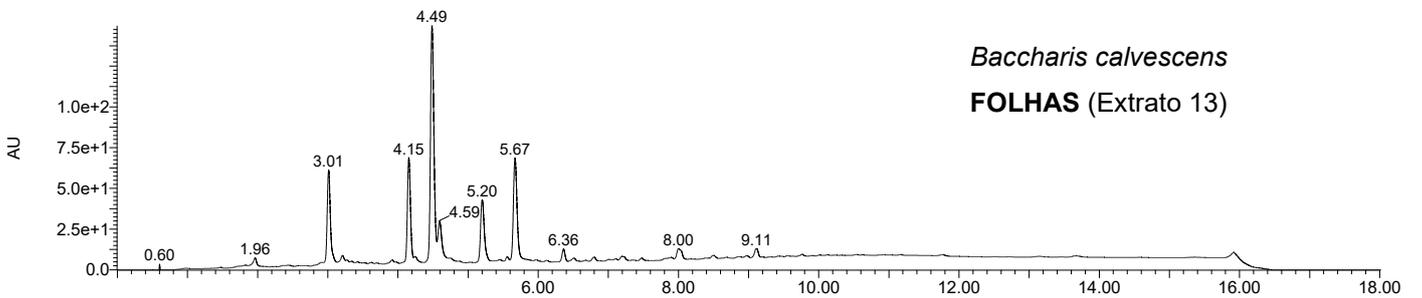
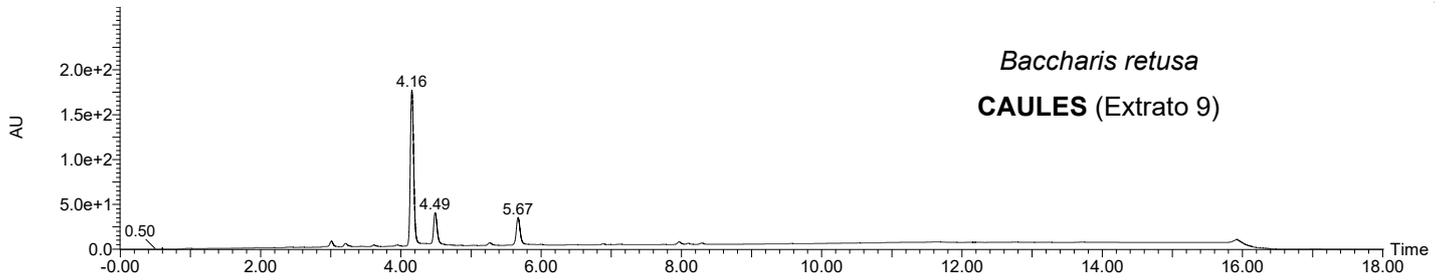
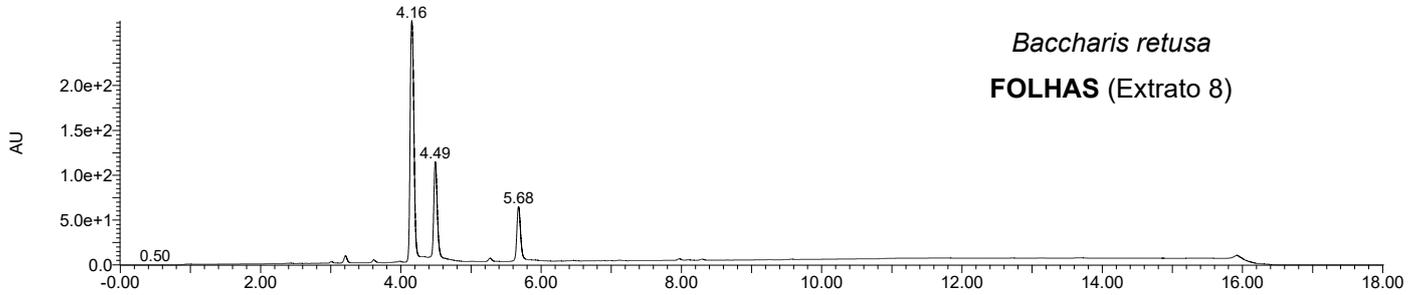
APÊNDICE A: Cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de partes aéreas de *Baccharis myriocephala* (Serra da Calçada), *Baccharis altimontana* (Parque Nacional do Caparaó) e *Baccharis hemiptera* (Parque Nacional do Caparaó)



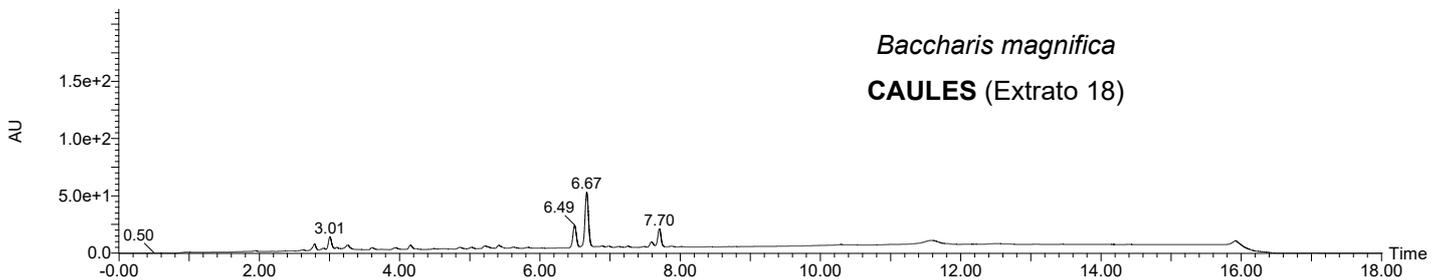
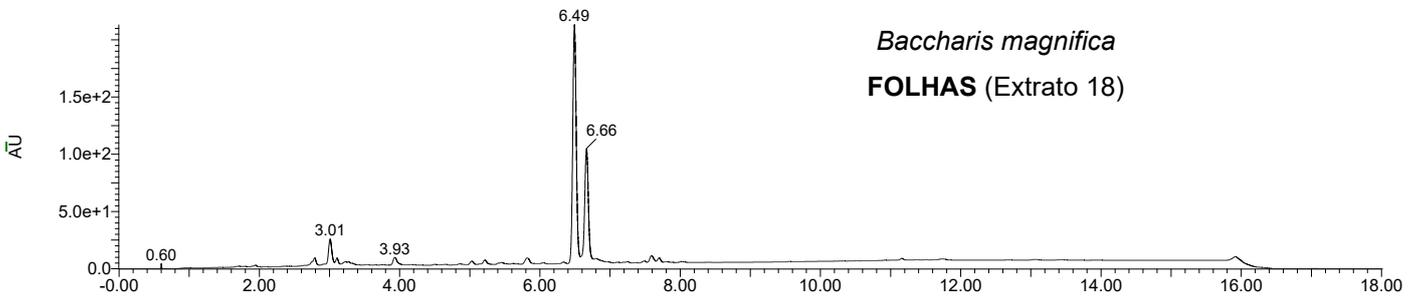
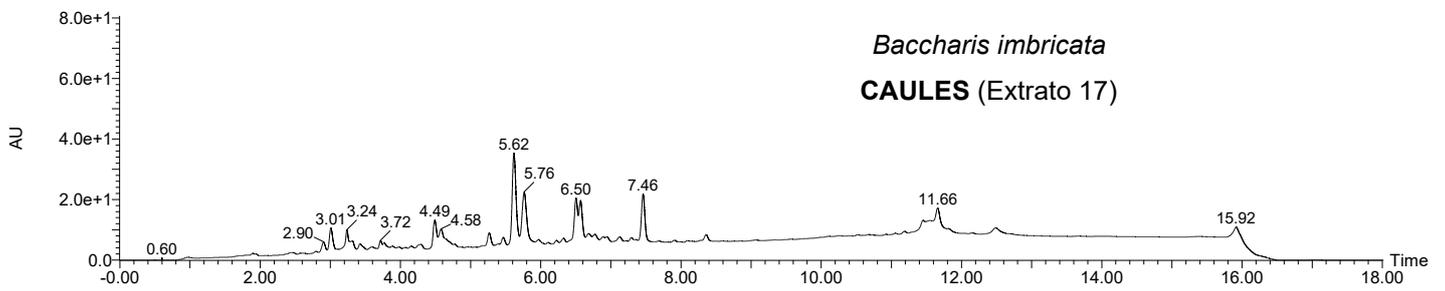
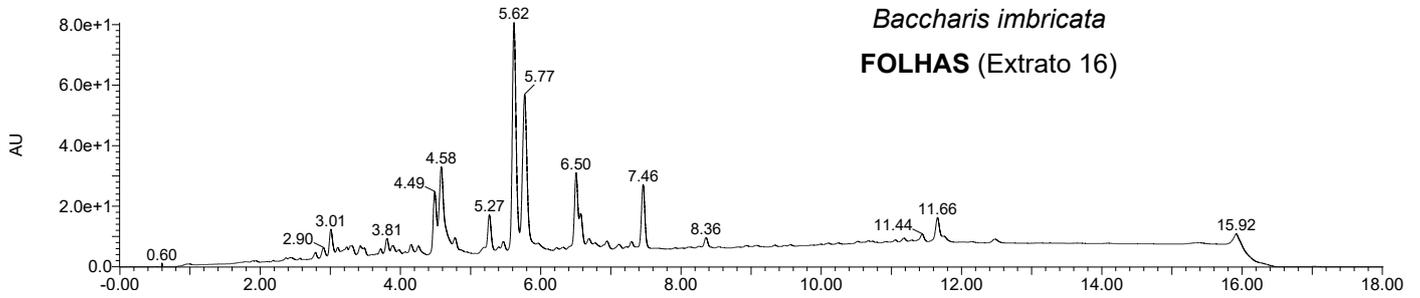
APÊNDICE B: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de *Baccharis reticularia* (Serra da Calçada)



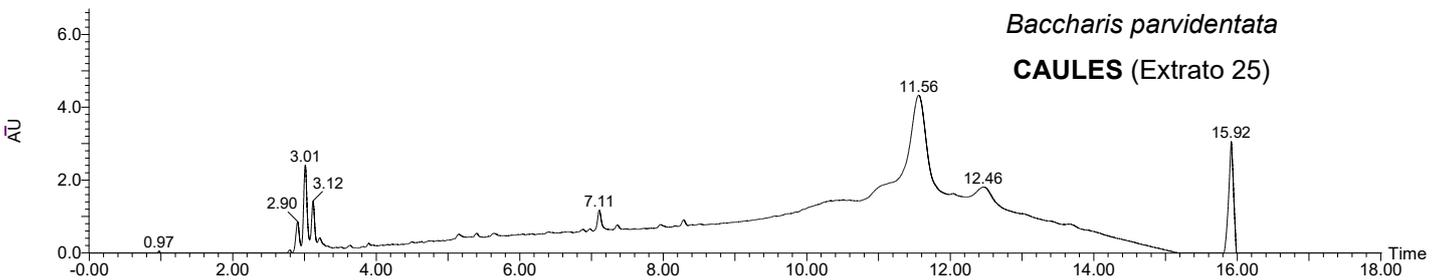
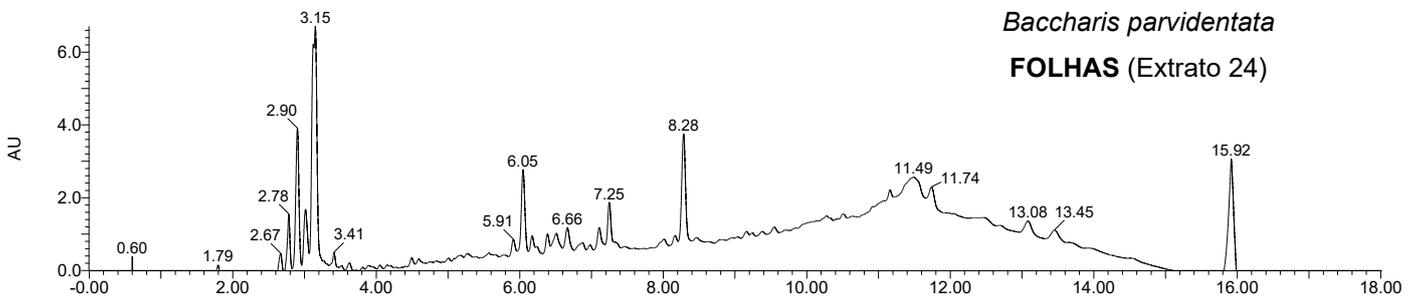
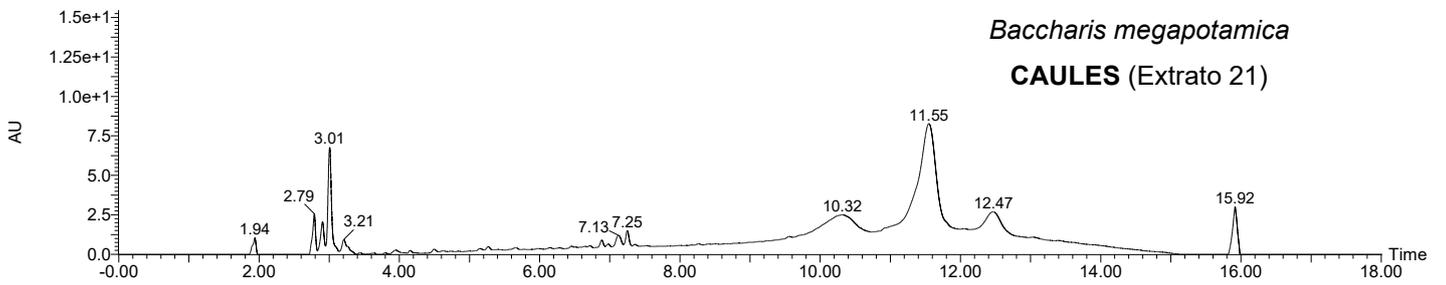
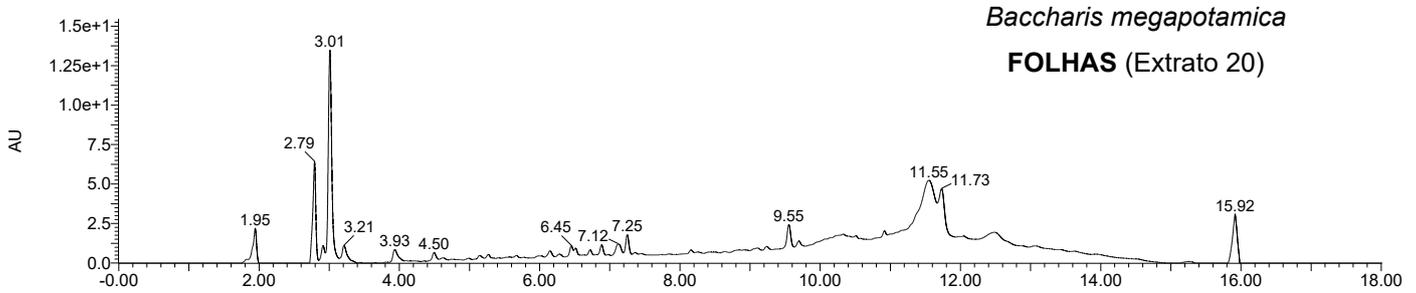
APÊNDICE C: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de *Baccharis retusa* e *Baccharis calvenscens* (Serra da Calçada)



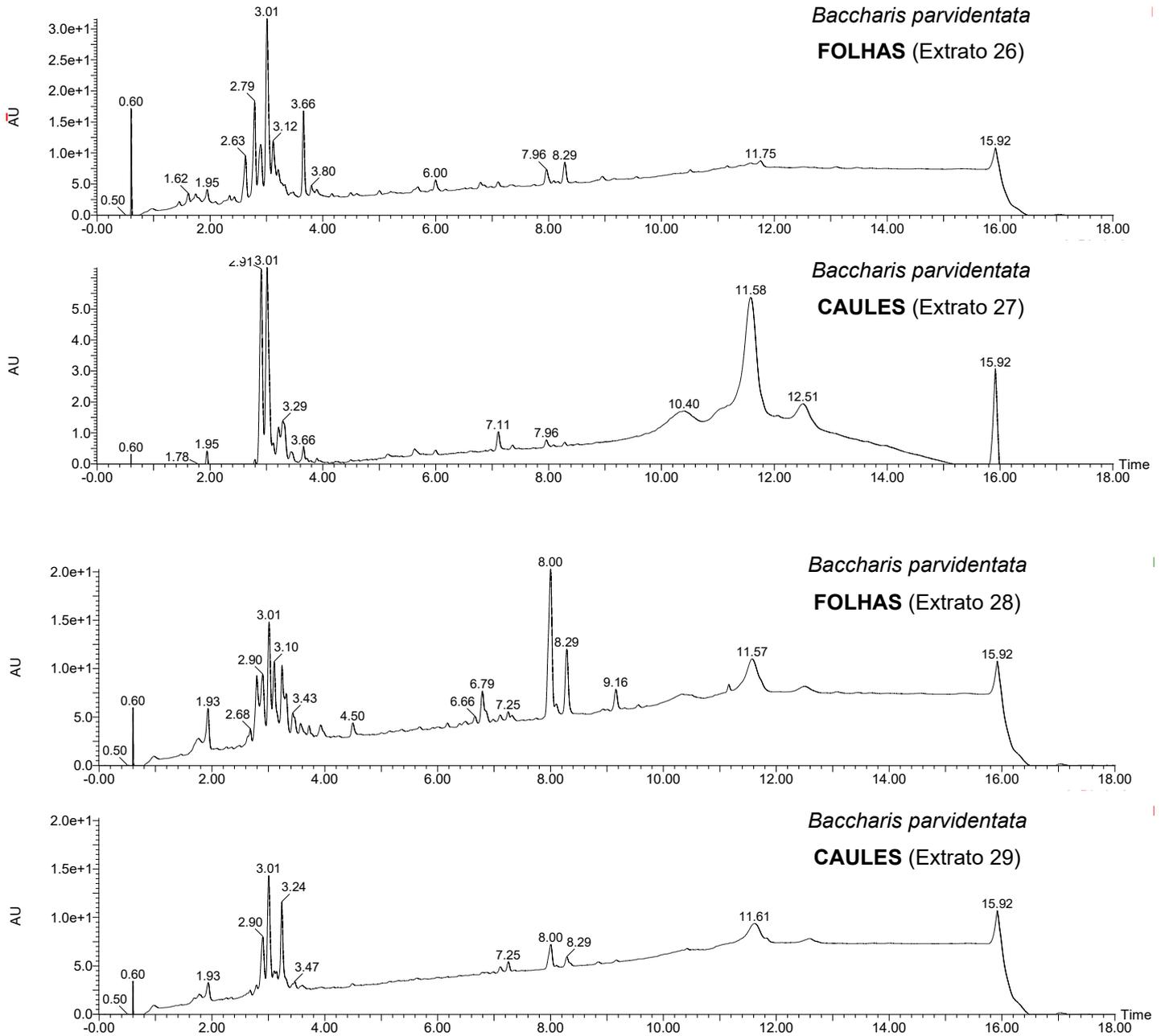
APÊNDICE D: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de *Baccharis imbricata* e *Baccharis magnifica* (Parque Nacional do Caparaó)



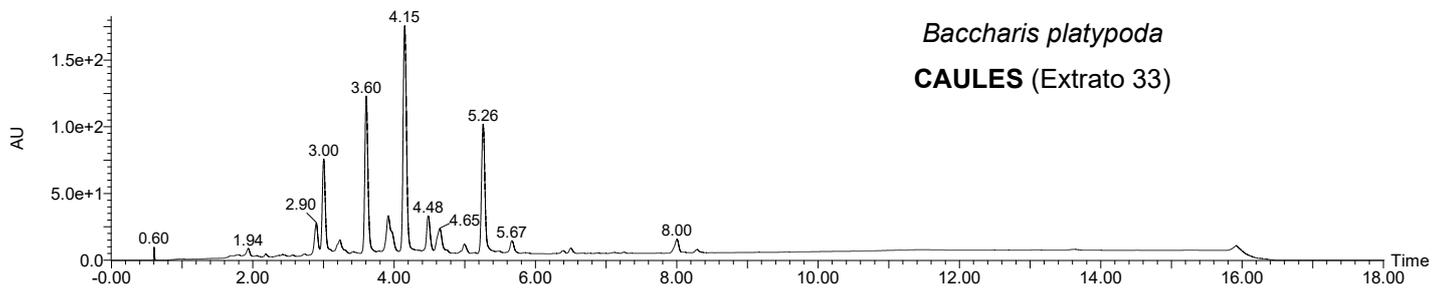
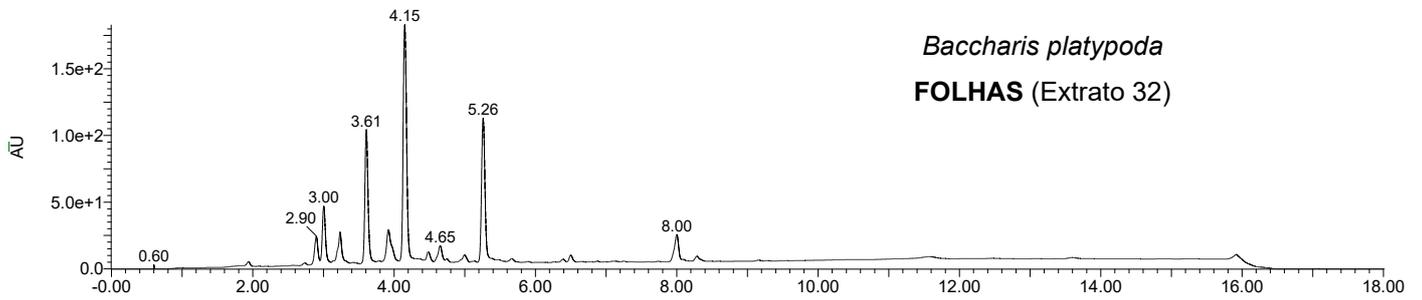
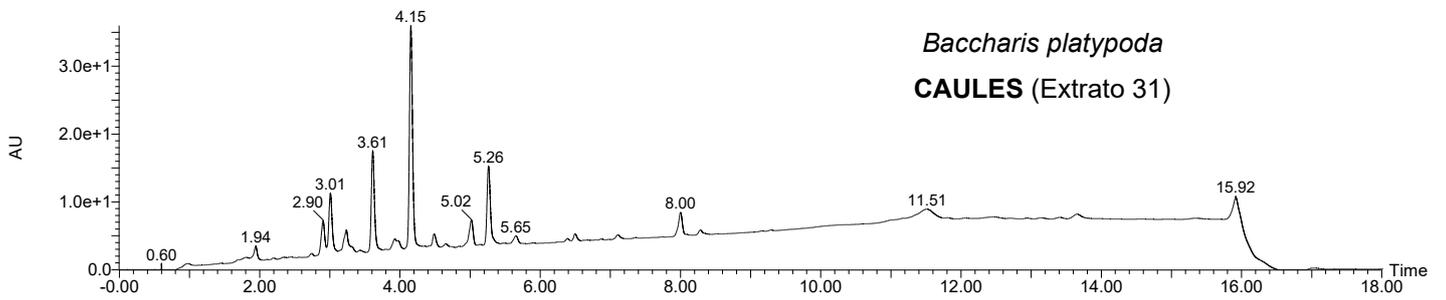
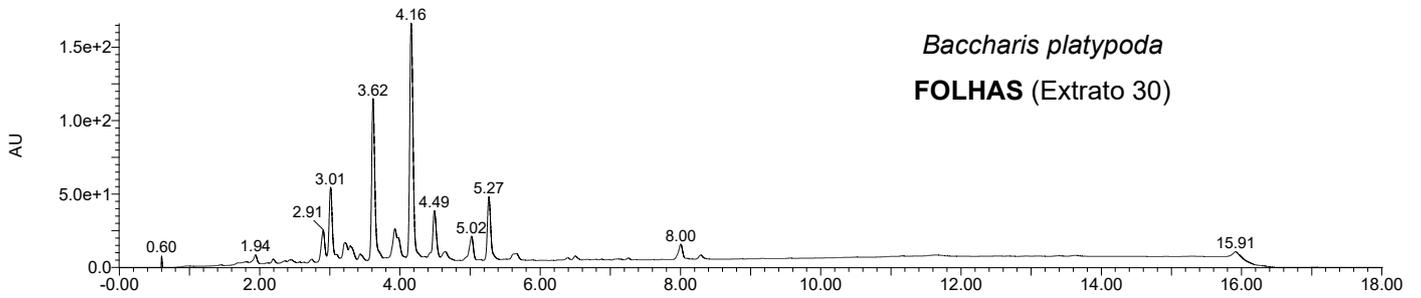
APÊNDICE E: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de *Baccharis megapotamica* e *Baccharis parvidentata* (Parque Nacional do Caparaó)



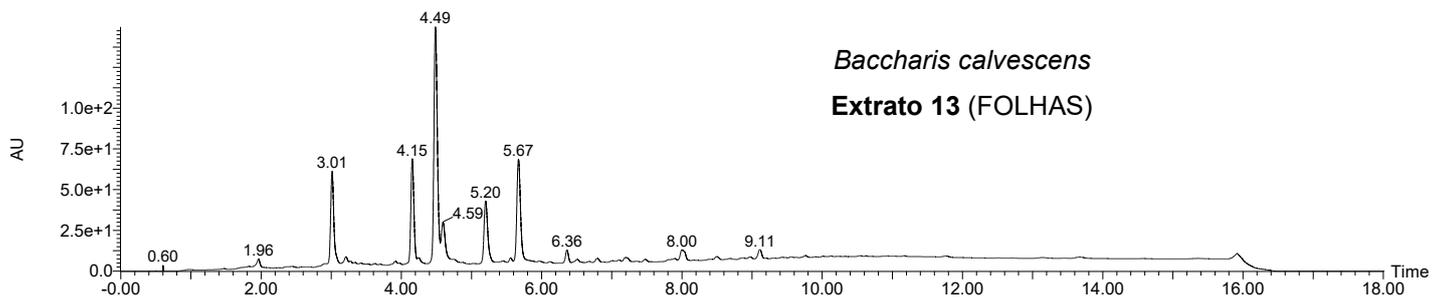
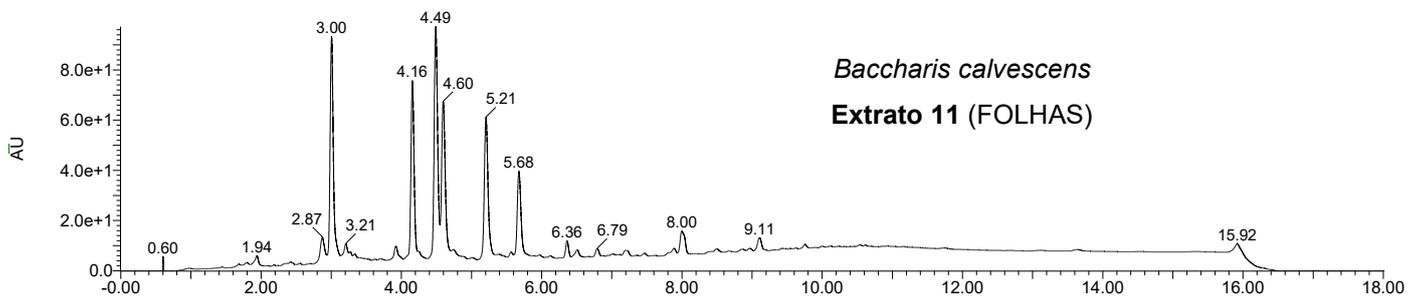
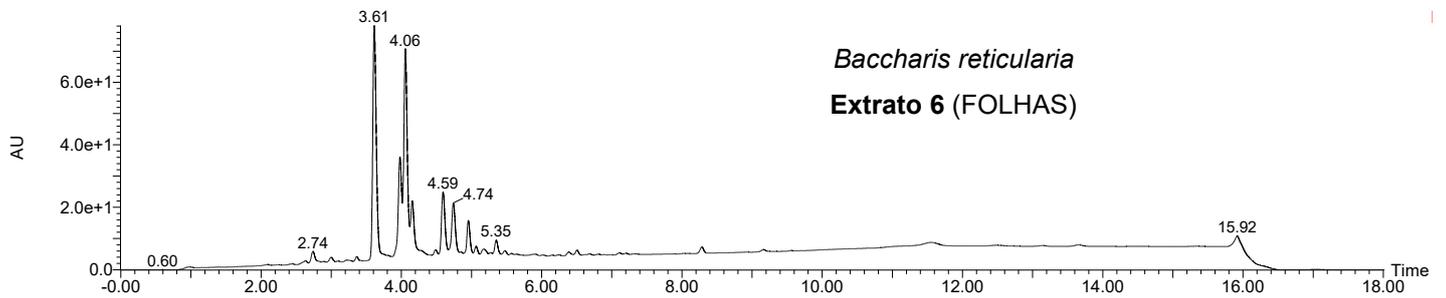
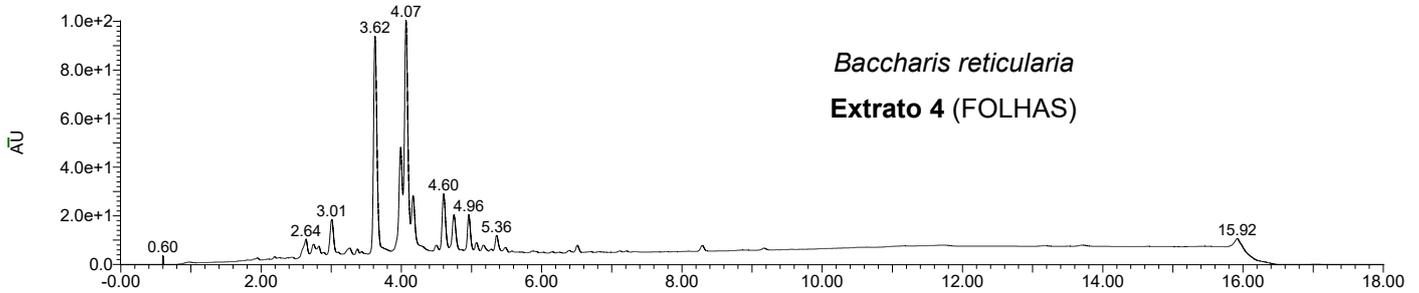
APÊNDICE F: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de *Baccharis parvidentata* (Parque Nacional do Caparaó)



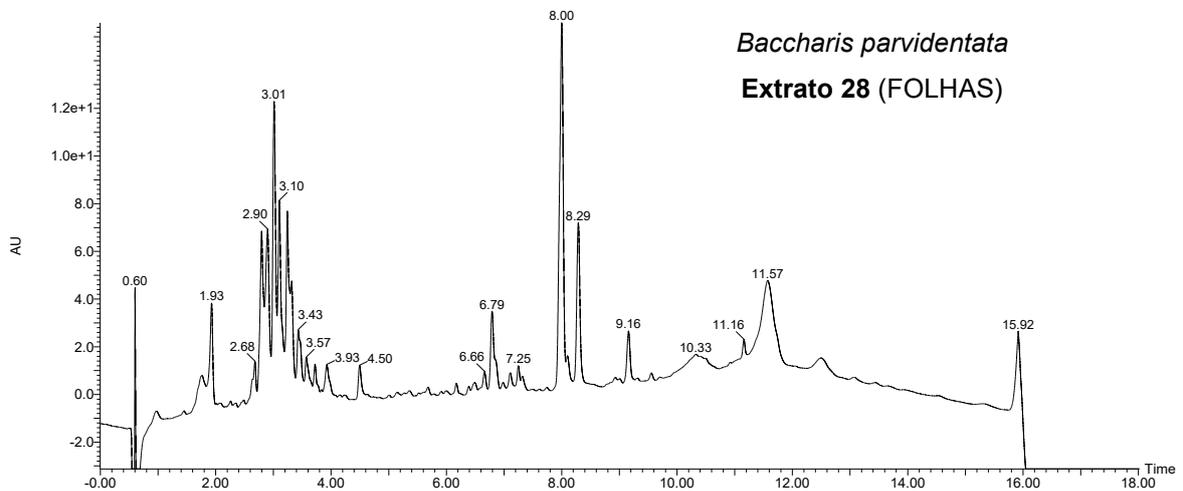
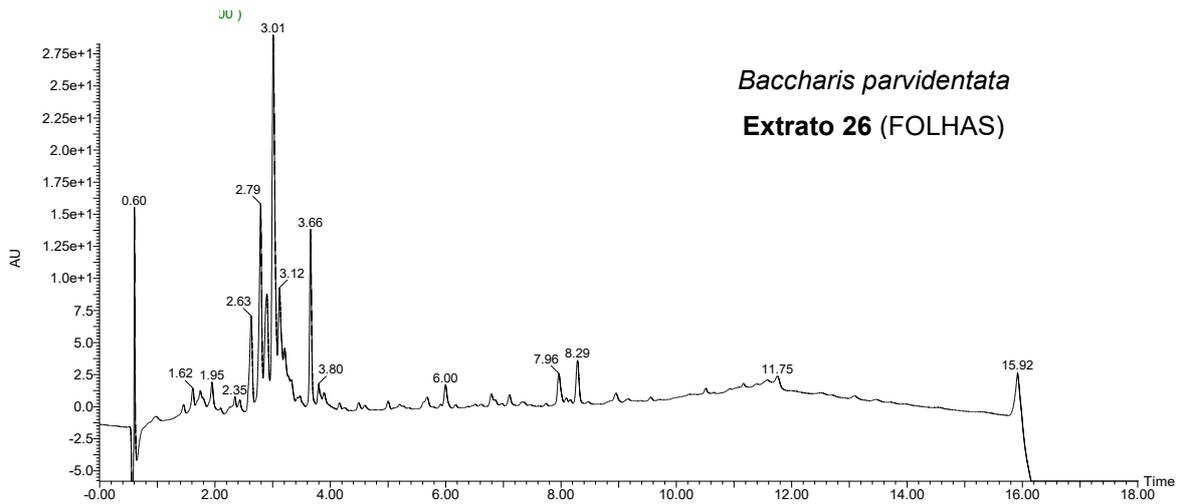
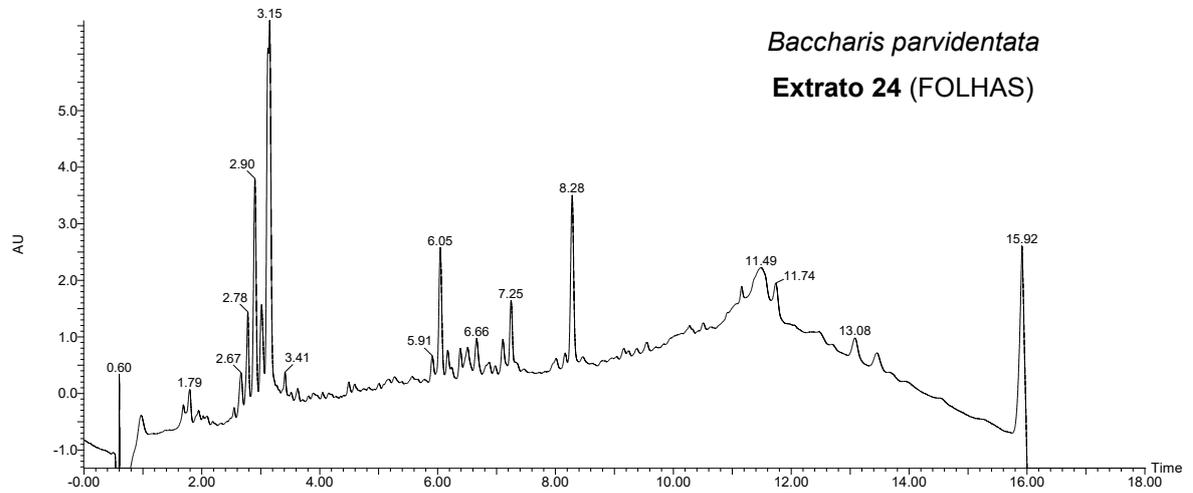
APÊNDICE G: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas e caules de *Baccharis platypoda* (Parque Nacional do Caparaó)



APÊNDICE H: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas de diferentes amostras de *Baccharis reticularia* (Serra da Calçada) e *Baccharis calvescens* (Parque Nacional do Caparaó)



APÊNDICE I: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas de diferentes amostras de *Baccharis parvidentata* (Parque Nacional do Caparaó)



APÊNDICE J: Comparação dos cromatogramas, obtidos por UPLC-DAD, dos extratos de folhas de diferentes amostras de *Baccharis platypoda* (Parque Nacional do Caparaó)

