

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

ALESSANDRA CAROLINE MONTES FRADE

**FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE A  
LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DE  
ESPÉCIES DO GÊNERO *BACCHARIS***

BELO HORIZONTE

2020

ALESSANDRA CAROLINE MONTES FRADE

**FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE A  
LIBERAÇÃO DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DE  
ESPÉCIES DO GÊNERO *BACCHARIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

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

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

Coorientadora: Profa. Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana, FAFAR, UFMG

BELO HORIZONTE

2020

F799f Frade, Alessandra Caroline Montes.  
Fitoquímica e avaliação do efeito sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias de espécies do gênero *Baccharis* / Alessandra Caroline Montes Frade. – 2020.  
129 f. : il.

Orientador: Rodrigo Maia de Pádua.  
Coorientadora: Izabella Thaís da Silva.  
Coorientadora: Priscilla Rodrigues Valadares Campana.

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

1. Baccharis – Teses. 2. Plantas medicinais – Teses. 3. Plantas – Análise – Teses. 4. Agentes antiinflamatórios – Teses. 5. Citocinas – Teses. I. Pádua, Rodrigo Maia de. II. Silva, Izabella Thaís da. III. Campana, Priscilla Rodrigues Valadares. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 615.321



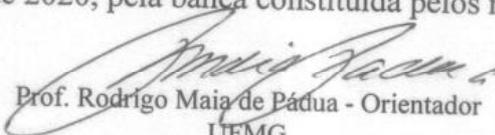
## FOLHA DE APROVAÇÃO

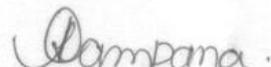
**FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DO EFEITO SOBRE A LIBERAÇÃO DE  
CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO BACCHARIS**

**ALESSANDRA CAROLINE MONTES FRADE**

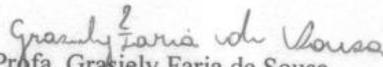
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 05 de março de 2020, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof. Rodrigo Maia de Pádua - Orientador  
UFMG

  
Profa. Priscilla Rodrigues Valadares Campana - Coorientadora  
UFMG

  
Profa. Izabella Thais da Silva  
UFSC

  
Profa. Graziely Faria de Sousa  
UFMG

  
Prof. Renes de Resende Machado  
UFMG

Belo Horizonte, 5 de março de 2020.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo apoio e amor. Por sempre acreditarem que sou capaz de realizar meus sonhos e aceitar as minhas loucuras.

Ao Gustavo pelas conversas e conselhos, que eu deveria seguir. Por ser uma ilha de sensatez no meio do caos.

Ao Professor Rodrigo pelo convívio, paciência e aprendizado. Por acreditar no meu potencial, desde a graduação, contribuindo para a minha formação profissional e pessoal. Pelo convite para fazer parte desse projeto incrível. E, principalmente, pela orientação e disposição em sempre ajudar nos experimentos.

Aos Professores Fernão e Geraldinho que encabeçam o Projeto *Baccharis*. Pela oportunidade de fazer parte dele, contribuindo para o meu crescimento profissional. Sem vocês isso não seria possível.

À minha coorientadora Priscilla, pelas conversas, muitas vezes primordiais para a realização do projeto, e por sempre estar disponível para me auxiliar nos experimentos biológicos.

À coorientadora Izabella, que mesmo de longe sempre se preocupou com a realização desse projeto.

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia, em especial a Gabi, Karla, Jacque e Ana pelas conversas, risadas e ajuda na realização desse trabalho. Sem vocês o trabalho seria muito chato, obrigada.

À Bia, por fazer parte do Projeto *Baccharis*, o que o tornou muito mais divertido. Obrigada pelas discussões e conselhos ao longo do projeto. Por dividir as angústias e realizações ao longo do processo de realização da dissertação, além de dividir a responsabilidade de escrever um capítulo de livro. Sem você provavelmente teria perdido a sanidade,

Aos colegas do Laboratórios de Fitoquímica por serem solícitos, pela colaboração e auxílio. Em especial, ao Well pelas conversas muitas vezes politizadas e a Marina, pela ajuda nos ensaios biológicos e por se tornar uma ótima amiga.

Agradeço a Dra. Cláudia Gontijo, que de forma muito gentil disponibilizou o moinho da Funed para a pulverização do material vegetal. E ao professor José Dias pela obtenção dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

À Maiana e a Flávia pelas aventuras gastronômicas, muitas vezes necessárias.

Agradeço aos amigos do #todostemwhastapp, pelas conversas, piadas e risadas e por me puxarem para fora da “bolha UFMG”, o que foi essencial ao longo desses dois anos, para que eu não sucumbisse as loucuras do mestrado. Em especial ao Frede pelas caronas.

Valeu!

“Quem é *você*?” Perguntou a Lagarta

Não era um começo de conversa muito animador. Alice respondeu, meio encabulada: “Eu... eu mal sei, Sir, neste exato momento... pelo menos sei quem eu *era* quando me levantei esta manhã, mas acho que já passei por várias mudanças desde então.”

Lewis Carroll

## RESUMO

As plantas medicinais são uma fonte importante de compostos bioativos, com destaque para o gênero *Baccharis* (Asteraceae), que é nativo das Américas, possui cerca de 500 espécies, sendo 167 delas encontradas no Brasil. Esse gênero se destaca pelo uso popular como anti-inflamatório e no tratamento de doenças gastrointestinais, sendo suas ações terapêuticas atribuídas às altas concentrações de metabólitos especiais tais como flavonoides e terpenos. Assim, o gênero *Baccharis* é considerado uma fonte promissora de novos compostos para o tratamento de doenças inflamatórias como as artrites gotosa e reumatoide. Neste contexto, realizou-se o estudo da potencial atividade anti-inflamatória *in vitro* de espécies desse gênero e o fracionamento biomonitorado de *B. calvescens*. Foram coletadas 20 amostras de 13 espécies de *Baccharis* em diferentes regiões do estado de Minas Gerais, o que resultou na produção de 34 extratos hidroetanólicos. Após análise dos perfis cromatográficos, 13 extratos foram selecionados para a avaliação do efeito sobre a liberação dos mediadores pró-inflamatórios TNF e IL-1 $\beta$  em células THP-1 estimuladas por LPS *in vitro*. O extrato de folhas de *B. calvescens* apresentou redução significativa na liberação da citocina IL-1 $\beta$  na concentração de 20  $\mu$ g/mL. O fracionamento por partição entre solventes imiscíveis do extrato ativo resultou na fração ativa diclorometânica (DCM), que foi refractionada em DCM1, e DCM2, sendo a última rica em compostos fenólicos. As frações obtidas foram ativas e promoveram a redução da liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$ , com a fração DCM1 sendo mais ativa que a DCM2, sugerindo que os constituintes não fenólicos apresentam maior atividade em relação aos fenólicos. Através de técnicas cromatográficas (HPLC em escala preparativa) e espectroscópicas (UV, UPLC-ESI-MS e RMN), foram isoladas e identificadas duas flavonas da fração DCM2, a cirsimaritina e a genkwanina, além de identificados putativamente por UPLC-ESI-MS o 3,5-O-dicafeoilquínico, apigenina e naringenina, no extrato hidroetanólico de folhas de *B. calvescens*. A escassez de estudos fitoquímicos de espécies do gênero *Baccharis* na literatura corrobora com a importância desse estudo, que apresentou resultados inéditos da atividade biológica e composição química de *B. calvescens*.

Palavras-chave: *Baccharis*; *Baccharis calvescens*; atividade anti-inflamatória; citocinas.

## ABSTRACT

Medicinal plants are an important source of bioactive compounds, especially the genus *Baccharis* (Asteraceae), which is native to the Americas, has about 500 species, 167 of which are found in Brazil. This genus stands out for its popular use as an anti-inflammatory and the treatment of gastrointestinal diseases, and its therapeutic actions are attributed to high concentrations of special metabolites such as flavonoids and terpenes. Thus, the genus *Baccharis* is considered a promising source of new compounds for the treatment of inflammatory diseases such as gouty rheumatoid and arthritis. In this context, the study of the potential in vitro anti-inflammatory activity of species of this genus and the biomonitoring fractionation of *B. calvescens* was carried out. Twenty samples of 13 *Baccharis* species were collected in different regions of the state of Minas Gerais, which resulted in the production of 34 hydroethanolic extracts. After analyzing the chromatographic profiles, 13 extracts were selected to evaluate the effect on the release of the pro-inflammatory mediators TNF and IL-1 $\beta$  in THP-1 cells stimulated by LPS in vitro. The leaf extract of *B. calvescens* showed a significant reduction of the release of the cytokine IL-1 $\beta$  at a concentration of 20  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Fractionation by partition between immiscible solvents of the active extract resulted in the active fraction dichloromethane (DCM), which was refracted into DCM1, and DCM2, the latter being rich in phenolic compounds. The fractions obtained were active and reduced the release of the pro-inflammatory cytokines TNF and IL-1 $\beta$ , with the DCM1 fraction being more active than the DCM2, suggesting that non-phenolic constituents have greater activity than phenolics. Through chromatographic (preparative scale HPLC) and spectroscopic techniques (UV, UPLC-ESI-MS, and NMR), two flavones of the DCM2 fraction, cirsimaritin and genkwanina, were isolated and identified, in addition to being putatively identified by UPLC-ESI-MS o 3,5-O-Dicafeoilquin, apigenin, and naringenin, in the hydroethanolic extract of leaves of *B. calvescens*. The scarcity of phytochemical studies of species of the genus *Baccharis* in the literature corroborates the importance of this study, which presented unprecedented results of the biological activity and chemical composition of *B. calvescens*.

Keywords: *Baccharis*; *Baccharis calvescens*; anti-inflammatory activity; cytokines

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Patogênese da artrite gotosa. ....	31
<b>Figura 2:</b> Fluxograma do fracionamento do extrato hidroetanólico de <i>B. calvescens</i> por partição sequencial entre solventes imiscíveis. Fr.MeOH/água, fração metanol/água; Fr. Hex, fração hexânica; Fr. DCM, fração diclorometânica e Fr. EtOAc, fração em acetato de etila. ....	47
<b>Figura 3:</b> Fluxograma da purificação da fração diclorometânica de <i>B. calvescens</i> por partição com solução alcalina. Fr. DMC, fração diclorometânica. ....	49
<b>Figura 4:</b> Perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos das 13 espécies do gênero <i>Baccharis</i> selecionadas no presente estudo. A) <i>B. altimontana</i> , ext. folhas; B) <i>B. brevifolia</i> , ext. folhas; C) <i>B. calvescens</i> , ext. folhas; D) <i>B. hemiptera</i> , ext. partes aéreas; E) <i>B. imbricata</i> , ext. folhas; F) <i>B. magnifica</i> , ext. folhas G) <i>B. megapotamica</i> , ext. folhas; H) <i>B. myriocephala</i> , ext. partes aéreas; I) <i>B. opuntioides</i> , ext. partes aéreas; J) <i>B. parvidentata</i> , ext. folhas; K) <i>B. platypoda</i> , ext. folhas; L) <i>B. reticularia</i> , ext. folhas; M) <i>B. retusa</i> , ext. folhas. ....	59
<b>Figura 5:</b> Estruturas das possíveis substâncias fenólicas identificadas putativamente nas espécies de <i>Baccharis</i> em estudo. ....	64
<b>Figura 6:</b> Redução da liberação de mediadores pró-inflamatórios dos extratos hidroetanólicos de folhas de espécies do gênero <i>Baccharis</i> na concentração de 20 µg/mL em células THP-1 estimuladas com LPS (1 ng/mL). Os dados representam a média ± DP em triplicata. *** p < 0,001, comparado com cel + LPS + DMSO: controle tratado com o veículo; cel + meio e cel + LPS: células não tratadas; DMSO: solvente (controle); Dx: dexametasona (0,2 µM). A) IL-1β; B) TNF. ....	67
<b>Figura 7:</b> Perfil cromatográfico dos extratos de <i>B. calvescens</i> registrados em 240 nm. A) extrato hidroetanólico obtido por percolação; B) extrato hidroetanólico obtido por maceração. Para condições cromatográficas ver item 4.10. ....	69
<b>Figura 8:</b> Perfil cromatográfico das frações de <i>B. calvescens</i> . A) fração hexânica; B) fração diclorometânica (DCM); C) fração acetato de etila (AcOEt); D) fração metanol:água. Para condições cromatográficas ver item 4.10. ....	69
<b>Figura 9:</b> Esquema de fragmentação de flavonoides. ....	70
<b>Figura 10:</b> Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 1. A) UV característico de ácidos fenólicos. B) Padrão de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estrutura do 3,5-O-dicafeoilquinico. ....	72
<b>Figura 11:</b> Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 2. A) UV característico de flavanona. B) Padrão de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estrutura da naringenina. ....	73

<b>Figura 12:</b> Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 3. A) UV característico de flavonas. B) Padrão de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estrutura da apigenina. ....	74
<b>Figura 13:</b> Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 4. A) UV característico de flavonas. B) Padrão de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estruturas dos possíveis isômeros. ....	75
<b>Figura 14:</b> Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 5. A) UV característico de flavona. B) Padrão de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estruturas dos possíveis isômeros. ....	76
<b>Figura 15:</b> Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 5. A) UV característico de flavona. B) Padro de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estruturas dos possíveis isômeros. ....	77
<b>Figura 16:</b> Redução da liberação de mediadores pró-inflamatórios dos extratos hidroetanólicos e frações de <i>B. calvescens</i> na concentração de 20 µg/mL em células THP-1 estimuladas com LPS (1 ng/mL). Os dados representam a média ± DP em triplicata. *** p < 0,001, comparado com cel + LPS + DMSO: controle tratado com o veículo; cel + meio e cel + LPS: células não tratadas; DMSO: solvente (controle); Dx: dexametasona (0,2 µM); Extr. Macer: extrato maceração; Ext. Perc: extrato percolação; F. DCM: fração diclorometano; F. EtOAc: acetato de etila. A) IL-1β; B) TNF. ....	78
<b>Figura 17:</b> Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para o extrato hidroetanólico e as frações de <i>B. calvescens</i> . Condições cromatográficas: eluente tolueno: acetona (8:2) acidificada 1% com ácido acético; revelador: anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento. Ext: extrato hidroetanólico; Hex, fração hexânica; DCM, fração diclorometânica e EtOAc, fração em acetato de etila. ....	81
<b>Figura 18:</b> Perfil cromatográfico das frações DCM, DCM1 e DCM2. A) Separação dos flavonoides após a partição em meio alcalino. B) Espectro de UV dos picos majoritários de DCM2, característicos de flavonoides. Para condições cromatográficas ver item 4.10. ....	82
<b>Figura 19:</b> Redução da liberação de mediadores pró-inflamatórios dos extratos hidroetanólicos e frações DCM, DCM1 e DCM2 de <i>B. calvescens</i> na concentração de 20 µg/mL em células THP-1 estimuladas com LPS (1 ng/mL). Os dados representam a média ± DP em triplicata. *** p < 0,001, comparado com cel + LPS + DMSO: controle tratado com o veículo; cel + meio e cel + LPS: células não tratadas; DMSO: solvente (controle); Dx: dexametasona (0,2 µM); F. DCM: fração diclorometano. A) IL-1β; B) TNF. ....	83

<b>Figura 20:</b> Perfil cromatográfico da fração DCM2 de <i>B. calvescens</i> e gráfico do gradiente de eluição utilizado no HPLC em escala preparativa. Para condições cromatográficas ver item 4.11 .....	84
<b>Figura 21:</b> Perfil cromatográfico dos picos 4A e 4B. A) Espectro DAD. B) Espectro de UV e padrões de fragmentação no modo positivo e negativo. Para condições cromatográficas ver item 4.10 .....	85
<b>Figura 22:</b> Perfil cromatográfico das substâncias 5 e 6 isoladas no HPLC em escala preparativa. A) Espectro DAD. B) Espectro de UV e padrões de fragmentação no modo positivo e negativo. Para condições cromatográficas ver item 4.10 .....	87
<b>Figura 23:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância 5 em $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (400 MHz). .....	89
<b>Figura 24:</b> Mapa de contornos HSQC obtidos para substância 5 em $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (400 MHz para $^1\text{H}$ e 100 MHz para $^{13}\text{C}$ ). .....	90
<b>Figura 25:</b> Mapa de contornos HMBC obtidos para substância 5 em $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (400 MHz para $^1\text{H}$ e 100 MHz para $^{13}\text{C}$ ). .....	91
<b>Figura 26:</b> Seção expandida da região de hidrogênios aromáticos do mapa de contornos HMBC obtido para substância 5 em $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (400 MHz para $^1\text{H}$ e 100 MHz para $^{13}\text{C}$ ). .....	92
<b>Figura 27:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância 6 em $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (400 MHz). .....	95
<b>Figura 28:</b> Mapa de contornos HSQC obtidos para substância 6 em $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (400 MHz para $^1\text{H}$ e 100 MHz para $^{13}\text{C}$ ). .....	96
<b>Figura 29:</b> Mapa de contornos HMBC obtidos para substância 6 em $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (400 MHz para $^1\text{H}$ e 100 MHz para $^{13}\text{C}$ ). .....	97
<b>Figura 30:</b> Seção expandida da região de hidrogênios aromáticos do mapa de contornos HMBC obtido para substância 6 em $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (400 MHz para $^1\text{H}$ e 100 MHz para $^{13}\text{C}$ ). .....	98

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Citocinas pró e anti-inflamatórias e suas funções.....	28
<b>Quadro 1:</b> Amostras de espécies do gênero <i>Baccharis</i> pró e anti-inflamatórias e suas funções.....	44
<b>Tabela 2:</b> Rendimento extrativo por maceração de material vegetal de espécies do gênero <i>Baccharis</i> .....	45
<b>Tabela 3:</b> Rendimento extrativo por percolação das folhas de <i>B. calvescens</i> .....	46
<b>Tabela 4:</b> Rendimento obtido no fracionamento por partição entre solventes imiscíveis do extrato hidroetanólico de <i>B. calvescens</i> .....	46
<b>Tabela 5:</b> Rendimento obtido no segundo fracionamento por partição entre solventes imiscíveis do extrato hidroetanólico de <i>B. calvescens</i> .....	47
<b>Tabela 6:</b> Rendimento obtido na purificação da fração DCM de <i>B. calvescens</i> .....	48
<b>Tabela 7:</b> Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-ESI/MS. ....	50
<b>Tabela 8:</b> Gradiente de eluição empregado nas análises por HPLC em escala preparativa.....	51
<b>Tabela 9:</b> Fracionamento de DCM2 de <i>B. calvescens</i> por HPLC em escala preparativa. ....	52
<b>Tabela 10:</b> Dados espectroscópicos e possíveis constituintes do extrato etanólico de espécies de <i>Baccharis</i> por UPLC-ESI-MS. ....	61
<b>Tabela 11:</b> Características das substâncias putativas fenólicas identificadas e sua frequência nas espécies de <i>Baccharis</i> em estudo. ....	63
<b>Tabela 12:</b> Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato hidroetanólico de <i>Baccharis calvescens</i> por UPLC-ESI-MS/MS. ....	71
<b>Tabela 13:</b> Espectro de RMN de <b>5</b> “cirsimaritina”, obtidos em d6-DMSO (400 MHz para <sup>1</sup> H e 100 MHz para <sup>13</sup> C) comparados com dados da literatura utilizando o mesmo solvente. ....	93
<b>Tabela 14:</b> Espectro de RMN de <b>6</b> “genkwanina”, obtidos em d6-DMSO (400 MHz para <sup>1</sup> H e 100 MHz para <sup>13</sup> C) comparados com dados da literatura utilizando o mesmo solvente. ....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°GL - Grau Gay Lussac

°C - Grau Celsius

$\delta$  - Deslocamento químico

$\lambda_{\text{máx}}$  - Comprimento de onda máximo

$\mu\text{m}$  - Micrômetros

$\mu\text{g}$  - Microgramas

$\mu\text{L}$  - Microlitros

AP-1 - Fator de transcrição 1

CCD - Cromatografia em camada delgada

CCL2 - Proteína quimioatrativa de monócitos

CI<sub>50</sub> - Concentração inibitória 50%

CLRs - Receptores de lectina do tipo C

COX-2 - Ciclo-oxigenase-2

CXCL1 - Quimiocina (C-X-C) ligante 1

CXCL2 - Quimiocina (C-X-C) ligante 2

d.i. - Diâmetro interno

d6-DMSO - Dimetilsulfóxido deuterado

Da - Dalton

DAMPs - Padrões moleculares associados a danos

DCM - Diclorometano

DCM1 - Fração diclorometano 1

DCM2 - Fração diclorometano 2

DP - Desvio padrão

DQ - Departamento de Química

Dx - Dexametasona

ECT - Embrapa Clima Temperado

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

ESI - Ionização por Eletronspray

HMBC - *Heteronuclear correlation through multiple quantum coherence*

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

HSQC - *Heteronuclear single bond coherence*

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta

iNOS - Oxido nítrico sintase

$J$  - Constante de acoplamento escalar

LPS - Lipopolissacarídeo

$m/z$  - Razão massa/carga

MHz - Megahertz

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos

MSU - Cristais de urato monossódico

MyD88 - Fator de diferenciação mielóide 88

NF- $\kappa$ B - Factor nuclear kappa B

NLRs - Receptores de domínio de oligomerização ligador de nucleotídeos

OPD - Orto-fenilendiamina

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PBS - Tampão fosfato-salino

PGE<sub>2</sub> - Prostaglandina E<sub>2</sub>

PMA - Acetato miristato de forbol

PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões

Rf - Fator de retenção

RLRs - Receptores do tipo gene induzível por ácido retinóico-1

RMN <sup>13</sup>C - Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN <sup>1</sup>H - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

rpm - Rotação por minuto

SFB - Soro fetal bovino

SRB - Sulforrodamina B

TCA - Ácido tricloroacético

THP-1 - Célula monocítica humana

TLR4 - Receptores do tipo Toll 4

TLRs - Receptores do tipo Toll

TMS - Tetrametilsilano

TNFR1 - Receptor de fator de necrose 1

TNFR2 - Receptor de fator de necrose 2

TNF - Fator de necrose tumoral

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

UPLC-MS - Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência associada à Espectrometria de Massas

UV - Ultravioleta

## LISTA DE FÓRMULAS ESTRUTURAIS

- (1) luteolina
- (2) apigenina
- (3) eremanolida C
- (4) licnopholida
- (5) lupeol
- (6)  $\beta$ -sitosterol
- (7)  $\beta$ -amirina
- (8) estigmasterol
- (9) colchicina
- (10) artepillina C
- (11) espatulenol
- (12) isosakuranetina
- (13) triterpeno óxido de baccharis
- (14) ácido ursólico
- (15) ácido 2 $\alpha$ -hidroxi-ursólico
- (16) lactona do ácido hautriwáico
- (17) baccharina
- (18) isobaccharina
- (19) baccharinol
- (20) isobaccharinol
- (21) sakuranetina
- (22) cirsimaritina

(23) pectolinarigenina

(24) genkwanina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2 OBJETIVO</b> .....	25
2.1 Objetivo Geral .....	25
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	25
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	26
3.1 O processo inflamatório.....	26
3.2 Artrite Gotosa .....	30
3.3. Produtos Naturais com atividade anti-inflamatória.....	32
3.4. O gênero <i>Baccharis</i> .....	35
<b>3.4.1 Metabólitos especiais</b> .....	36
<b>3.4.2 Atividades biológicas</b> .....	36
<b>3.4.3 Ação anti-inflamatória de espécies de <i>Baccharis</i></b> .....	38
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	40
4.1 Equipamentos .....	40
<b>4.2 Solventes e reagentes</b> .....	41
<b>4.3 Vidrarias e materiais diversos</b> .....	42
4.4 Reveladores para Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	42
4.5 Coleta e Identificação botânica.....	43
4.6. Preparo do Material Vegetal .....	43
4.7 Obtenção dos extratos para triagem inicial.....	45
4.8 Obtenção e fracionamento dos extratos de <i>Baccharis calvescens</i> .....	45
4.9 Refracionamento da fração DCM de <i>B. calvescens</i> .....	48
4.10 Obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos e frações por UPLC-ESI-MS e CCD .....	49
4.11 Refracionamento da fração DCM2 de <i>B. calvescens</i> por HPLC em escala preparativa .....	51
4.12 Elucidação estrutural das substâncias isoladas.....	52
4.13 Ensaios biológicos <i>in vitro</i> .....	52

4.13.1 Cultivo celular .....	52
4.13.2 Avaliação da viabilidade celular .....	52
4.13.3 Determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$ produzidas por células THP-1 estimuladas com LPS.....	54
4.13.4 Protocolos de ELISA para ensaios <i>in vitro</i> .....	54
4.13.5 Análise estatística.....	55
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
5.1 Desreplicação dos extratos utilizando UPLC-ESI-MS.....	56
5.2 Efeito <i>in vitro</i> dos extratos hidroetanólicos de espécies do gênero <i>Baccharis</i> sobre mediadores pró-inflamatórios .....	65
5.3 Estudo fitoquímico de <i>Baccharis calvescens</i> .....	68
5.4 Efeito <i>in vitro</i> dos extratos hidroetanólicos e frações de <i>B. calvescens</i> sobre mediadores pró-inflamatórios .....	77
5.5 Refracionamento da fração DCM de <i>B. calvescens</i> .....	79
5.6. Efeito <i>in vitro</i> das frações DCM1 e DCM2 de <i>B. calvescens</i> sobre mediadores pró-inflamatórios .....	83
5.7 Refracionamento da fração DCM2 de <i>B. calvescens</i> por HPLC em escala preparativa .....	84
5.8 Elucidação estrutural das substâncias isoladas.....	88
<b>5.8.1 Elucidação estrutural da substância 5 .....</b>	<b>88</b>
<b>5.8.2 Elucidação estrutural da substância 6 .....</b>	<b>94</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>100</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>102</b>
APÊNDICE A.....	111
APÊNDICE B.....	112
APÊNDICE C: .....	113
APÊNDICE D .....	114
APÊNDICE E.....	115
APÊNDICE F:.....	116

APÊNDICE G: .....	117
APÊNDICE H: .....	118
APÊNDICE I: .....	119
APÊNDICE J: .....	120
APÊNDICE K: .....	121
APÊNDICE L .....	122
APÊNDICE M .....	123
APÊNDICE N .....	124
APÊNDICE O .....	125
APÊNDICE P .....	126
APÊNDICE Q: .....	127
APÊNDICE R: .....	128
APÊNDICE S: .....	129
APÊNDICE T: .....	130

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, em diferentes civilizações, as plantas foram uma importante fonte de medicamentos para o tratamento de um amplo espectro de doenças, sendo o primeiro recurso terapêutico utilizado pela humanidade (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014; FÜRST; ZÜNDORF, 2014). Apesar dos avanços no arsenal terapêutico dos últimos séculos, a Organização Mundial da Saúde estima que 80% da população de países em desenvolvimento ainda seja dependente de plantas medicinais como opção terapêutica primária, devido aos altos custos das terapias convencionais (OMS, 2002; ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011).

As plantas medicinais constituem uma fonte valiosa para obtenção de substâncias a serem exploradas terapeuticamente (LIMA *et al*, 2011). Estima-se que mais de 60% dos fármacos aprovados nos últimos 30 anos foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Esse fato pode ser explicado pela alta diversidade química de seus compostos e suas estruturas tridimensionais complexas, contendo grupos funcionais com orientação espacial adequada para a interação com alvos biológicos (KOEHN; CARTER, 2005; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014), fornecendo, desta forma, um ponto de partida para novos compostos sintéticos (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Atualmente, as principais pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novas terapias medicamentosas estão relacionadas aos processos inflamatórios, às doenças infecciosas e ao câncer, com mais de 50 fármacos aprovados para cada uma dessas patologias nos últimos 30 anos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Dentre as doenças de natureza inflamatória destacam-se aquelas de condições reumáticas, que compreendem mais de 150 doenças e síndromes, geralmente progressivas e associadas à dor. Dentre elas encontra-se a artrite gotosa, descrita como uma doença metabólica decorrente da hiperprodução e/ou diminuição da excreção de ácido úrico, levando à deposição de cristais de urato monossódico nas articulações e tecidos moles (BATISTA; WIBELINGER, 2011).

O gênero *Baccharis* é um dos maiores da família Asteraceae, com cerca de 500 espécies distribuídas no continente americano. Seu uso tradicional no

tratamento de enfermidades, como distúrbios gastrointestinais (dores de estômago, úlceras, diarreia e disenteria), dores musculares, edema, feridas e doenças reumáticas (FLORÃO *et al*, 2012) já foi relatado em diferentes países como Brasil, Argentina, Colômbia, Chile, Bolívia, Venezuela e México (ABAD; BERMEJO, 2007). Com destaque para a ação anti-inflamatória (relatada para extratos de *B. coridifolia*, *B. illinita*, *B. salicifolia*, *B. pentlandii* e *B. teindalensis*) e antirreumática (relatada para extratos de *B. floribunda*, *B. trimera*, *B. latifolia*, *B. obtusifolia*, *B. subalata* e *B. pentlandii*) (ABAD; BERMEJO, 2007).

Apesar do vasto uso popular de plantas desse gênero, uma pesquisa bibliográfica recente revelou que apenas 30% de todas as espécies do gênero *Baccharis* foram investigadas em nível químico ou biológico, o que posiciona esse gênero como um “hot spot” para a descoberta de novos compostos bioativos (CAMPOS *et al*, 2016).

Neste contexto, o presente estudo busca bioprospectar diferentes espécies do gênero *Baccharis* colaborando para a identificação de compostos bioativos, promissores no tratamento de doenças inflamatórias como a artrite gotosa. Além de contribuir para a conservação da biodiversidade nacional, mostrando sua importância na área médica e industrial.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Realizar o estudo fitoquímico e a avaliação da atividade anti-inflamatória de espécies do gênero *Baccharis*.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Preparar os extratos das folhas, caules e partes aéreas de plantas do gênero *Baccharis*.

2.2.2. Caracterizar a composição química dos extratos utilizando técnicas cromatográficas hifenadas (cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas, UPLC-ESI-MS).

2.2.3. Realizar o estudo fitoquímico de *Baccharis calvescens* visando isolar, purificar e elucidar a estrutura química das substâncias obtidas.

2.2.4. Avaliar o efeito dos extratos e frações sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) em células THP-1 estimuladas com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS).

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 O processo inflamatório

A inflamação é uma resposta protetora a um estímulo nocivo, que envolve células do sistema imunológico, vasos sanguíneos e diversos mediadores inflamatórios com o objetivo de restaurar a homeostasia. Esse processo pode ser causado por agentes físicos (traumas, queimaduras), químicos (substâncias agressivas e irritantes) ou biológicos (patógenos, células danificadas e reações autoimunes) (CHEN *et al*, 2018; KOTAS; MEDZHITOV, 2015). O processo inflamatório pode ser classificado como agudo ou crônico e consiste em cinco sintomas clínicos, conhecidos com sinais cardinais clássicos: rubor (vermelhidão causada pela hiperemia), tumor (inchaço provocado pelo aumento da permeabilidade vascular permitindo a entrada do exsudato no espaço intersticial), calor (causado pelo aumento de fluxo sanguíneo e da atividade metabólica), dor (causada pela sensibilização de nociceptores) e perda da função dos órgãos envolvidos no processo inflamatório (MEDZHITOV, 2010).

A inflamação aguda é uma resposta adaptativa envolvida no processo de eliminação do agente agressor, reparo do tecido lesionado (cicatrização) e restauração da homeostase tecidual. Possui duração curta de minutos a alguns dias, e é caracterizada pelo aumento da permeabilidade do endotélio vascular, permitindo extravasamento de componentes séricos (líquidos e proteínas plasmáticas) e extravasamento de células imunes (leucócitos e monócitos), mediado por uma rede de sinalização química multifatorial (MEDZHITOV, 2008; CHEN; NUÑEZ, 2010).

A resposta inflamatória se inicia quando sensores de reconhecimento presentes em células imunes inatas como macrófagos, mastócitos e células dendríticas reconhecem a presença de patógenos ou substâncias que surgem durante um dano tecidual. Esse reconhecimento ocorre através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que identificam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; EDDIE IP; MEDZHITOV, 2015).

As classes de famílias de PRRs incluem: proteínas transmembranares com os receptores do tipo Toll (TLRs), receptores de lectina do tipo C (CLRs), bem como proteínas citoplasmáticas, como receptores do tipo gene induzível por ácido retinóico-1, (RLRs) e receptores de domínio de oligomerização ligador de nucleotídeos (NLRs) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; CHEN; NUÑEZ, 2010).

Após o reconhecimento dos PAMPs ou DAMPs, os PRRs ativam vias de sinalização intracelular que induzem a produção de citocinas e quimiocinas para eliminar o agente nocivo e restaurar o tecido danificado. O tipo de sinalização desencadeada depende do receptor e do tipo celular envolvido na resposta inflamatória. Por exemplo, na presença de bactérias gram-negativas, os lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular desse patógeno, são reconhecidos pelo receptor TLR4, causando a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), através de duas vias de sinalização, uma dependente da proteína MyD88 e outra dependente da proteína TIRAP (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; CHEN *et al*, 2018 REN *et al*, 2020).

A ativação do NF- $\kappa$ B promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas, que modificam a permeabilidade do endotélio, recrutam células inflamatórias, regulam a morte celular no tecido inflamatórios e induzem a produção de proteínas na fase aguda. As citocinas são proteínas predominantemente liberadas pelas células imunes (macrófagos, mastócitos e linfócitos), que regulam a inflamação por meio de uma complexa rede de interações (MEDZHITOV, 2008; LAWRENCE, 2009; CHEN *et al*, 2018; SU *et al*, 2019).

Uma classe importante de citocinas liberadas durante o processo inflamatório são as quimiocinas, que atuam no controle da adesão, quimiotaxia e ativação leucocitária. Na resposta inflamatória aguda, as quimiocinas CXCL1 e CXCL2 atuam na ativação de neutrófilos, e a CCL2 atua no recrutamento de monócitos após estímulos pró-inflamatórios (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011; PALOMINO; MARTI, 2015). O fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) são importantes citocinas envolvidas no processo inflamatório. Entretanto, outras citocinas também participam do processo

inflamatório, sendo algumas pró-inflamatórias e outras anti-inflamatórias (**Tabela 1**) (CHEN *et al*, 2018; SU *et al*, 2019).

**Tabela 1:** Citocinas pró e anti-inflamatórias e suas funções

Citocina	Família	Principal fonte	Função
IL-1 $\beta$	IL-1	Macrófagos, monócitos	Pró-inflamatório, proliferação, apoptose, diferenciação
IL-4	IL-4	Linfócitos T	Anti-inflamatório, proliferação de linfócitos T e B, diferenciação de linfócitos B
IL-6	IL-6	Macrófagos, linfócitos T, adipócitos	Pró-inflamatório, produção de citocinas
IL-8	CXC	Macrófagos, células epiteliais, endoteliais	Pró-inflamatório, quimiotaxia, angiogênese
IL-10	IL-10	Monócitos, linfócitos B e T	Anti-inflamatório, inibição de citocinas pró-inflamatórias
IL-12	IL-12	Células dendríticas, macrófagos, neutrófilos	Pró-inflamatório, diferenciação celular, ativação de células NK
IL-11	IL-6	Fibroblasto, neurônios, células epiteliais	Anti-inflamatório, diferenciação e indução de proteína de fase aguda
TNF	TNF	Macrófagos, células NK e CD4+, linfócitos, adipócitos	Pró-inflamatório, produção de citocinas, proliferação celular, apoptose
IFN- $\gamma$	INF	Células T, NK e NKT	Pró-inflamatório, inata, imunidade antiviral adaptativa
GM-CSF	IL-4	Células T, macrófagos, fibroblastos	Pró-inflamatório, ativação de macrófagos, aumento da função de neutrófilos e monócitos
TGF- $\beta$	TGF	Macrófagos, células T	Anti-inflamatório, inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias

Fonte: Adaptado de CHEN *et al*, 2018

O TNF pode ser expresso na membrana celular ou na forma solúvel e atua através de dois receptores transmembranares: receptor de TNF1 (TNFR1), e receptor de TNF2 (TNFR2). O TNFR1 é expresso constitutivamente em todas as células nucleadas, enquanto a expressão do TNFR2 ocorre tipicamente nas células do sistema imunológico. Sua produção ocorre principalmente por monócitos e macrófagos, mas também por células B, células T e fibroblastos (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010; SEDGER; MCDERMOTT, 2014).

O aspecto mais estudado do TNF é a sua capacidade de promover a inflamação. Após trauma, infecção ou exposição ao LPS, essa citocina é rapidamente liberada sendo um dos mediadores iniciais mais abundantes no tecido inflamado. Atua na estimulação da síntese de outras citocinas envolvidas na cascata pró-inflamatória, e no aumento da produção de mediadores de sinal lipídicos, como prostaglandinas e fator de ativação plaquetária. Assim, o TNF tem um papel central na ativação e recrutamento de células inflamatórias, bem como no desenvolvimento de muitas doenças inflamatórias crônicas. Por exemplo, na artrite reumatoide o TNF, juntamente com a IL-1 $\beta$ , promove o aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e aumento do recrutamento de neutrófilos nas articulações (CHOY; PANAYI, 2001; PARAMESWARAN; PATIAL, 2010; SEDGER; MCDERMOTT, 2014).

Outra citocina pró-inflamatória importante é a IL-1 $\beta$ , que tem função fundamental no recrutamento de neutrófilos associado à presença de patógenos, como bactérias e vírus, ou associada ao dano celular, como na presença de cristais de ácido úrico. A IL-1 $\beta$ , também atua na regulação positiva das moléculas de adesão pela vasculatura. Assim como o TNF, a produção de IL-1 $\beta$  ocorre principalmente por macrófagos e monócitos, entretanto, outros tipos de células, como epiteliais, endoteliais e fibroblastos também podem produzir (SIMS; SMITH, 2010; WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010; EDDIE IP; MEDZHITOV, 2015).

A via de produção de IL-1 $\beta$  está relacionada a um complexo multi proteico denominado inflamassoma, que atua como ativador das caspases pró-inflamatórias. Existem vários tipos de inflamassomas, que são nomeados de acordo com os PRRs expressos. O NLRP3, também conhecido como NALP3 ou CIAS1, é provavelmente o mais estudado. Ele controla a produção de IL-1 $\beta$ , ativando a Caspase 1, que cliva a pro-IL-1 $\beta$  na forma ativa IL-1 $\beta$  (REN; TORRES, 2009; ZHAO *et al*, 2018; ABDULLAHA *et al*, 2019).

Quando a resposta inflamatória aguda falha, o processo inflamatório persiste e adquire novas características, como a presença de infiltrado de macrófagos e linfócitos, indução de angiogênese, formação de granulomas e necrose tecidual. Tornando-se uma inflamação prolongada, com duração de semanas, meses ou

anos, na qual a destruição tecidual e a tentativa de reparar os danos ocorrem simultaneamente. Artrite gotosa, artrite reumatoide e aterosclerose múltipla são exemplos de doenças inflamatórias crônicas (NATHAN; DING, 2010).

### 3.2 Artrite Gotosa

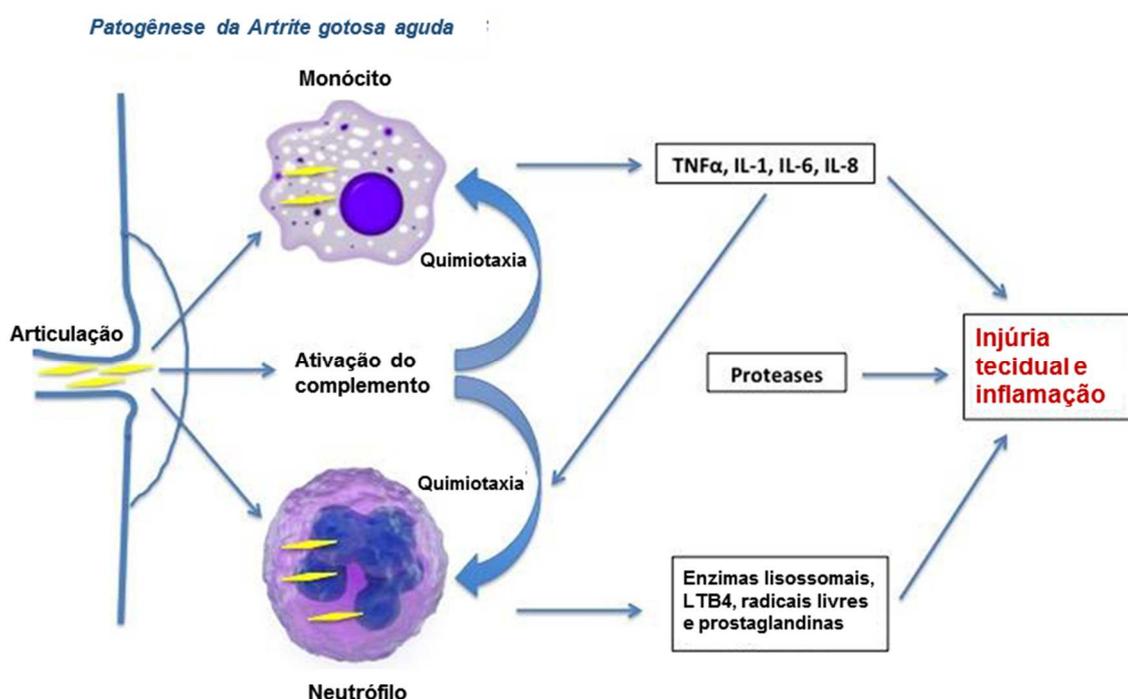
As condições reumáticas compreendem mais de 150 doenças e síndromes, geralmente progressivas e associadas à dor. São caracterizadas pela limitação significativa da mobilidade e da destreza, gerando prejuízos socioeconômicos, devido à diminuição significativa da produtividade do trabalho e aumento na utilização dos recursos de saúde (SALAFFI; GIACOBAZZI; DI CARLO, 2018).

Artrite gotosa ou gota é uma doença caracterizada pelo acúmulo de cristais de urato monossódico em articulações, tecido sinovial, ossos e pele, independentemente da presença ou ausência de manifestações clínicas (AZEVEDO *et al*, 2017). Batista e Wibeling (2011) descrevem a gota como uma doença metabólica decorrente da hiperprodução e/ou diminuição da excreção de ácido úrico, levando à deposição de cristais de urato monossódico nas articulações e tecidos moles.

Os cristais de ácido úrico depositados na cavidade articular iniciam o processo inflamatório ao serem englobados por células fagocitárias sinoviais, levando à liberação de enzimas lisossomais e à produção de quimiocinas inflamatórias. Macrófagos bem diferenciados têm a capacidade de conter esses cristais, sem induzir uma resposta inflamatória, enquanto, monócitos menos diferenciados produzem quantidades exageradas de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8. Além disso, ocorre a liberação de histamina e IL-1 $\beta$  por mastócitos, que resulta em aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação. Fatores quimiotáticos produzidos por monócitos e mastócitos e a vasodilatação local também estimulam a quimiotaxia de neutrófilos, agravando a crise aguda da doença. O ataque agudo de gota é autolimitado, com duração de horas a alguns dias, devido a remoção e fagocitose dos cristais de ácido úrico por macrófagos, suprimindo assim a ativação celular e a produção de quimiocinas (**Figura 1**) (RAGAB; ELSHAHALY; BARDIN, 2017; LING; BOCHU, 2014).

Uma característica da artrite gotosa é sua cronicidade, causada por episódios recorrentes de crise aguda, gerando uma inflamação crônica. Esse quadro se manifesta por sinovite crônica, erosões ósseas, danos na cartilagem e formação de tofos, uma massa formada por grandes quantidades de cristais acumulados. A presença de tofos palpáveis indica uma gota crônica não tratada (WILSON; SASEEN, 2016).

**Figura 1:** Patogênese da artrite gotosa.



Fonte: (RAGAB; ELSHAHALY; BARDIN, 2017)

A gota pode ser classificada como primária ou secundária. Na primária, o defeito metabólico responsável pela hiperuricemia é desconhecido e corresponde a 90% dos casos. Já a gota secundária é causada por uma doença conhecida, genética ou não, que resulta em hiperuricemia. Fatores genéticos, alcoolismo, obesidade, dieta e estilo de vida podem estar envolvidos no surgimento da hiperuricemia em indivíduos predispostos (ANDRADE-FILHO; PENA; AYMORÉ, 2011). Acredita-se que a prevalência mundial da doença seja de 1 a 4 %, sendo mais frequente em homens (RAGAB; ELSHAHALY; BARDIN, 2017).

O tratamento medicamentoso é realizado com colchicina, AINE's, e AIE's, que podem ser associados em casos graves, sendo mais eficazes quando administrados após o início do ataque de gota. Outras alternativas terapêuticas são os inibidores de IL-1 (anakinra e canacinumabe) e redutores de urato (alopurinol, febuxostato, probenecida, sulfipirazona, benzobromarona e lesinurad) (WILSON; SASEEN, 2016).

Os redutores de urato são indicados em casos de gota grave ou associada à litíase do ácido úrico, como também em pacientes com doenças cardiovasculares ou renais, com hiperuricemia ( $> 8$  mg / dL) ou idade jovem ( $< 40$  anos), devido às crises frequentes (RAGAB; ELSHAHALY; BARDIN, 2017).

Outro fator importante para um tratamento bem sucedido é a mudança no estilo de vida. Alimentos ricos em purinas como alimentos cozidos ou processados, especialmente de origem animal e frutos do mar, provocam hiperuricemia, agravando casos de gota e, portanto, devem ser evitados. Entretanto, alimentos ricos em purinas de origem vegetal, como feijão, lentilha, cogumelos, ervilha, legumes e produtos lácteos, não apresentam risco de hiperuricemia e podem ser consumidos. A vitamina C aumenta a excreção renal do ácido úrico, podendo ser usada como suplemento no tratamento da gota. A redução do consumo de bebidas alcoólicas e a prática de exercícios físicos também são recomendados (RAGAB; ELSHAHALY; BARDIN, 2017).

### **3.3. Produtos Naturais com atividade anti-inflamatória**

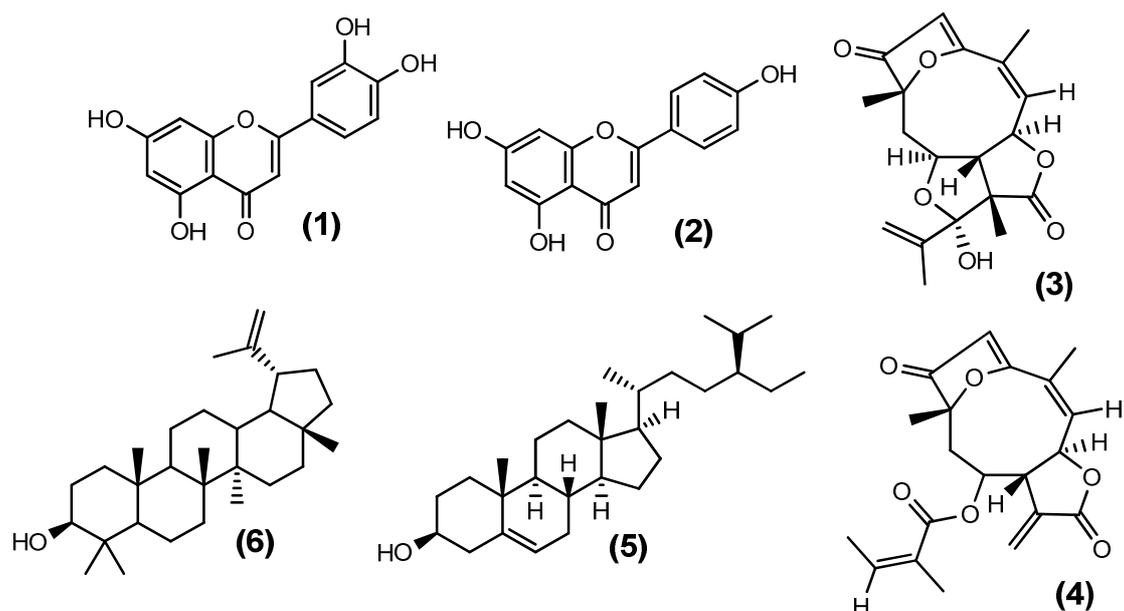
Plantas medicinais são tradicionalmente utilizadas no tratamento de doenças inflamatórias, sendo que vários produtos naturais isolados de plantas já tiveram a atividade anti-inflamatória avaliada em ensaios *in vitro* e *in vivo*. (BERNSTEIN *et al*, 2018). Diversas classes de metabólitos especiais estão envolvidos na modulação da sinalização pró-inflamatória como flavonoides, alcaloides, lignanas e terpenos (ALAMGEER *et al*, 2020).

As estratégias farmacológicas utilizadas para avaliar produtos naturais com potencial atividade anti-inflamatória se concentram na busca por agonistas de glicocorticoides, inibidores da biossíntese de eicosanoides e bloqueadores da

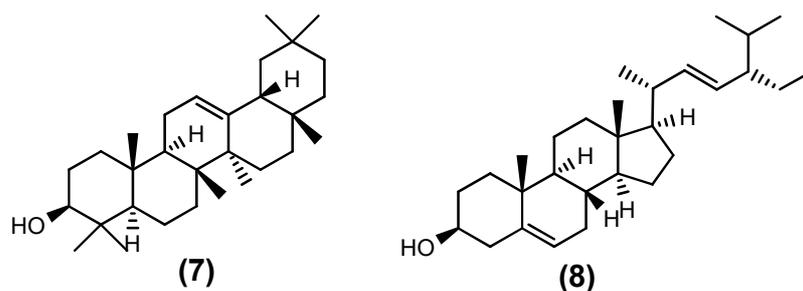
sinalização de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IL-1 $\beta$  (KOEBERLE; WERZ, 2014), através da inibição da ativação de fatores de transcrição responsáveis pela expressão de genes pró-inflamatórios, como AP-1 e NF- $\kappa$ B (BERNSTEIN *et al*, 2018). Diversos estudos demonstram que extratos e substâncias isoladas apresentam atividade anti-inflamatória em modelos pré-clínicos de artrite, reduzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios e a infiltração de células do sistema imune nas articulações.

Gusman e colaboradores (2015) avaliaram o efeito de extratos etanólicos de 18 plantas brasileiras utilizadas tradicionalmente no tratamento de doenças inflamatórias, como artrite reumatoide e aterosclerose. O estudo *in vitro* utilizando células THP-1 estimuladas por LPS demonstrou que os extratos de *Caryocar brasiliense*, *Casearia sylvestris*, *Coccoloba cereifera* e *Terminalia glabrescens* foram capazes de inibir, de forma concentração-dependente, a produção de TNF, nas concentrações de 62,5; 125 e 250  $\mu$ g/mL. Estudos fitoquímicos mostraram que esses extratos são ricos em polifenóis, como flavonoides e proantocianidinas, que desempenham um papel importante para o potencial anti-inflamatório.

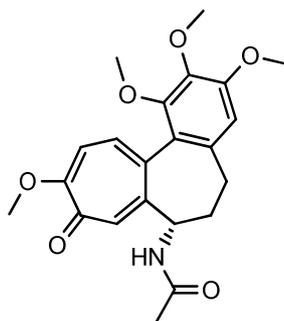
A atividade antiartrítica foi avaliada para as partes aéreas de *Lychnophora trichocarpa*, espécie do cerrado brasileiro, popularmente utilizada no tratamento de dores, hematomas, reumatismo e doenças inflamatórias. Utilizando modelo de artrite gotosa induzida por cristais de urato monossódico (MSU), os camundongos tratados por via oral com o extrato etanólico (125 e 250 mg/kg), a fração em acetato de etila (125 e 250 mg/kg) e substâncias isoladas (25 mg/kg) apresentaram redução do edema de pata, nos níveis de urato, e na atividade da enzima xantina oxidase do fígado. A composição química do extrato foi caracterizada, sendo identificados luteolina (1), apigenina (2), eremanolida C (3), licnopholida (4),  $\beta$ -sitosterol (5) e lupeol (6) (DE SOUZA *et al*, 2012).



Outra espécie brasileira investigada para atividade anti-inflamatória foi a *Tabebuia roseoalba*, que também teve o extrato etanólico das folhas (125, 250 e 500 mg/kg) e substâncias isoladas (15 mg/kg) avaliados em modelos *in vivo* de artrite gotosa induzida por MSU. O extrato, e as substâncias  $\beta$ -amirina (7) e estigmasterol (8) foram capazes de reduzir os níveis séricos de ácido úrico em camundongos hiperuricêmicos através da inibição da atividade hepática da xantina oxidase, além de diminuir o edema da pata (FERRAZ-FILHA *et al*, 2016).



Dentre os produtos naturais com ação antiartrítica, o que mais se destaca é a colchicina (9), um protoalcaloide tricíclico originalmente isolado das flores de *Colchicum autumnale*, planta utilizada desde a antiguidade devido suas propriedades laxantes e anti-inflamatórias, principalmente para o tratamento da gota. Atualmente é empregada na terapia padrão para a gota (profilaxia e crises agudas) sendo também utilizada no tratamento da febre familiar do Mediterrâneo e da doença de Behcet (KARAMANOU *et al*, 2018).



(9)

A colchicina exerce sua ação anti-inflamatória ligando-se às tubulinas dos microtúbulos interferindo na formação do fuso mitótico. Na artrite gotosa, essa ação altera a atividade dos neutrófilos, pois impede a diapedese, a mobilização e a degranulação lisossomal, que libera, além de substâncias pró-inflamatórias, agentes quimiotáticos de leucócitos. A desestabilização dos microtúbulos também inibe a formação do inflamassoma NLRP3, importante para o processamento e a liberação das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 induzida por cristais de ácido úrico (AZEVEDO *et al*, 2017; ANGELIDIS *et al*, 2018).

### 3.4. O gênero *Baccharis*

*Baccharis* é um dos maiores gêneros da família Asteraceae, com cerca de 500 espécies, distribuídas por todo o continente Americano, sendo que 90% ocorrem na América do Sul (BUDEL *et al*, 2005; KARAM *et al*, 2013; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005), onde acredita-se ser o centro de origem do gênero, devido à alta concentração de espécies (BUDEL *et al*, 2005; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). No Brasil, já foram descritas 167 espécies de *Baccharis*, distribuídas principalmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (CAMPOS *et al*, 2016).

As plantas do gênero *Baccharis* são, geralmente, arbustos com 0,5 a 4,0 m de altura (BUDEL *et al*, 2005; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005;), possuem caules e ramos verdes com expansões trialadas (KARAM *et al*, 2013). Podem ser amplamente caracterizadas pelo indumento, geralmente tufado das folhas e hastes, com tricomas fundidos que têm apenas uma célula basal adjacente e a ocorrência comum na forma dioica (CAMPOS *et al*, 2016).

Muitas espécies do gênero são consideradas plantas medicinais usadas popularmente no tratamento de enfermidades variadas, como distúrbios gastrointestinais (incluindo dores de estômago, úlceras, diarreia e disenteria), doenças do fígado, resfriados, dores musculares, cólicas, febre, edema, feridas, tontura, anemia, reumatismo e diabetes (FLORÃO *et al*, 2012). *Baccharis trimera* (“carqueja”) e *Baccharis dracunculifolia* (“alecrim-do-campo” ou “vassourinha”) são as espécies mais conhecidas e estudadas. *B. trimera* é usada popularmente para tratar esterilidade feminina e impotência masculina (KARAM *et al*, 2013), distúrbios hepáticos e gastrointestinais (CAMPOS *et al*, 2016; KARAM *et al*, 2013), obesidade (CAMPOS *et al*, 2016), e como anti-inflamatória (CAMPOS *et al*, 2016; FLORÃO *et al*, 2012). Enquanto, *B. dracunculifolia* é utilizada como cicatrizante, diurético, digestivo, antidiarreico, antiespasmódico (FERRONATTO *et al*, 2007; FUKUDA *et al*, 2006), antimicrobiano (SILVA FILHO *et al*, 2008; FERRONATTO *et al*, 2007; FUKUDA *et al*, 2006) e anti-inflamatório. Essa última também se destaca por ser a origem botânica da própolis verde (SANTOS *et al*, 2010).

#### **3.4.1 Metabólitos especiais**

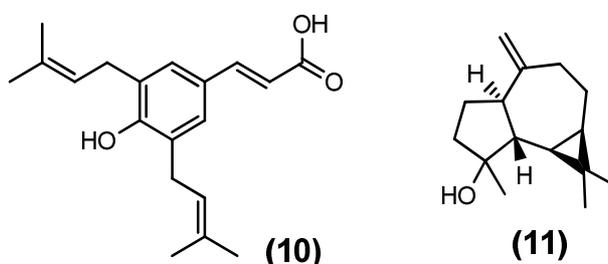
Aproximadamente 120 espécies do gênero *Baccharis* foram estudadas quimicamente, sendo descritas substâncias de diferentes classes: flavonoides, triterpenos, diterpenos, clerodânicos, labdânicos e kaurânicos, sesquiterpenos, germacrenos, tricotecenos e fenilpropanoides, como os ácidos cumáricos. Dentre esses, os flavonoides e terpenos apresentam o maior número de atividades biológicas descritas na literatura. Os flavonoides também são considerados importantes marcadores quimiotaxonômicos para o gênero (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

#### **3.4.2 Atividades biológicas**

Cerca de 30 espécies de *Baccharis* foram objeto de estudos de atividade biológica descritos na literatura, entre elas estão: *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). As

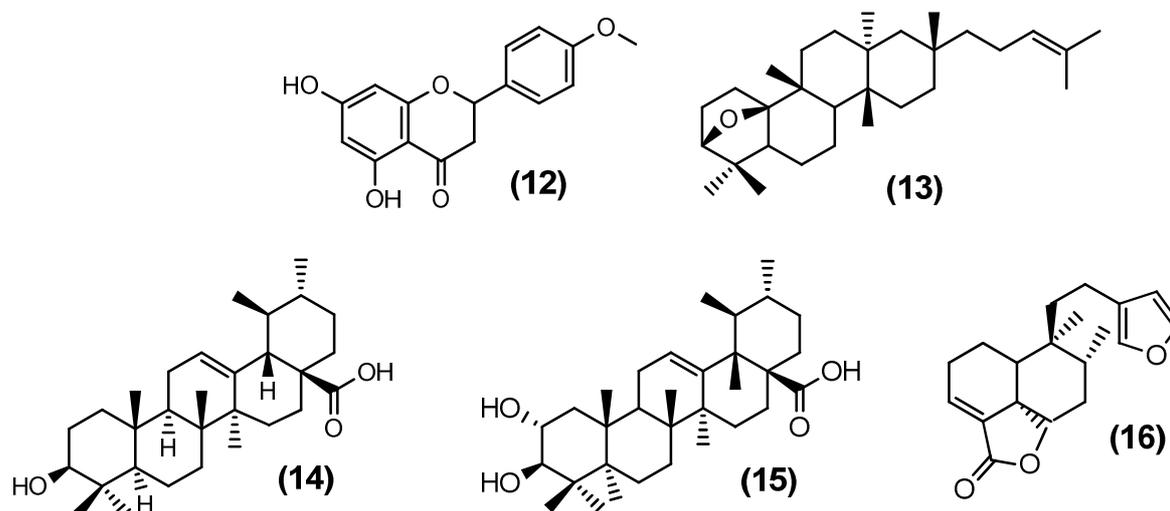
atividades mais frequentemente descritas foram: antioxidante, antimicrobiana, leishmanicida, anti-*Trypanosoma cruzi*, anti-inflamatória, antinociceptiva e citotóxica.

Para *B. dracunculifolia*, são descritas muitas atividades biológicas, como antioxidante, relatada para extrato glicólico de folhas e atribuída a compostos fenólicos e flavonoides (GUIMARÃES *et al*, 2012), assim, como a própolis verde, obtida da espécie, que teve a ação antioxidante atribuída à substância artepillina C (10) (VEIGA *et al*, 2017). Outra atividade relatada para a espécie, foi a citotóxica frente a células leucêmicas L 1210, com destaque para o espatulenol (11), composto isolado do extrato hidroetanólico de suas folhas, que apresentou um valor de  $CI_{50}$  de 13,6  $\mu$ M (FUKUDA *et al*, 2006).



Silva Filho e colaboradores realizaram uma série de estudos sobre a atividade biológica da *B. dracunculifolia*. Em 2004, relataram atividade anti-*Trypanosoma cruzi* para a forma tripomastigota de compostos isolados do extrato hidroetanólico de folhas. O flavonoide isosakuranetina (12) e o triterpeno óxido de baccharis (13), na forma isolada, apresentaram  $CI_{50}$  247,6  $\mu$ M e 249,8  $\mu$ M, respectivamente, sendo os constituintes mais ativos, dentre os avaliados (SILVA FILHO *et al*, 2004). Em 2008, os autores relataram atividade antimicrobiana para extratos diclorometânico de folhas de *B. dracunculifolia* e hidroetanólico da própolis da espécie, que apresentaram  $CI_{50}$  de 65  $\mu$ g/mL e 9  $\mu$ g/mL, respectivamente, frente à *C. kusei*. Substâncias isoladas desses extratos, ácido ursólico (14) e 2 $\alpha$ -hidroxi-ursólico (15) apresentaram atividade antibacteriana para *S. aureus* resistente à meticilina, com valores de  $CI_{50}$  de 5  $\mu$ g/mL e 3  $\mu$ g/mL, respectivamente, enquanto a isosakuranetina (12) apresentou atividade antifúngica para *C. neoformans* ( $CI_{50}$  de 15  $\mu$ g/mL e MIC de 40  $\mu$ g/mL) (SILVA FILHO *et al*, 2008). Por fim, em 2009, os autores relataram atividade leishmanicida dos extratos hidroetanólicos de folhas e da própolis verde obtida

dessa espécie, que apresentaram valores de  $CI_{50}$  de 45  $\mu\text{g/mL}$  e 49  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Substâncias isoladas do extrato hidroetanólico das folhas também foram avaliadas e o ácido ursólico (14) e a lactona do ácido hautriwáico (16) exibiram a atividade leishmanicida mais potente, com  $CI_{50}$  de 3,7  $\mu\text{g/mL}$  e 7,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (SILVA FILHO *et al*, 2009).



### 3.4.3 Ação anti-inflamatória de espécies de *Baccharis*

O uso popular de espécies de *Baccharis* geralmente está relacionado à redução da resposta inflamatória (CAMPOS *et al*, 2016; KARAM *et al*, 2013). Nesse contexto, estudos recentes apontam esse gênero como uma potencial fonte de agentes anti-inflamatórios.

Em modelo experimental de pleurisia induzida por carragenina em ratos, o extrato aquoso de partes aéreas de *B. trimera*, administrado por via intraperitoneal nas doses de 400 e 800 mg/kg, causou redução significativa no volume de exsudação, na migração de leucócitos e na contagem diferencial de células (DE OLIVEIRA *et al*, 2012; PAUL *et al*, 2009). Em outro estudo, o extrato aquoso de partes aéreas de *B. trimera*, administrado por via intraperitoneal nas doses 3, 30 e 300  $\mu\text{g/kg}$ , apresentou redução significativa do edema de pata traseira induzido por carragenina em camundongos, sendo a ação relacionada com a inibição da síntese dos metabólitos do ácido araquidônico (NOGUEIRA *et al*, 2011).

A aplicação tópica de 20 µL de solução alcoólica do extrato hidroetanólico bruto de folhas de *B. illinita* foi eficaz na redução da inflamação de orelha induzida por acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol e ácido araquidônico em camundongos, inibindo, de forma dose-dependente, o edema, além de reduzir a migração de polimorfonucleares (BOLLER *et al*, 2010). O extrato hidroetanólico bruto de folhas de *B. dracunculifolia* foi avaliado por Santos e colaboradores (2010) utilizando modelos *in vivo* de nocicepção e inflamação em roedores. O extrato foi administrado por via intraperitoneal, nas doses de 50-400 mg/kg, e apresentou atividade anti-inflamatória, diminuindo o edema de pata traseira induzido por carragenina em ratos, e propriedades antinociceptivas orais relevantes em modelos agudos e crônicos de dor.

Florão e colaboradores (2012) estudaram os óleos essenciais de quatro diferentes espécies de *Baccharis*: *B. articulata*, *B. genistelloides*, *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana*. Os ensaios *in vitro* envolvendo células mononucleares humanas periféricas (compostas principalmente por linfócitos) e granulócitos humanos, particularmente neutrófilos, demonstraram que todos os óleos essenciais apresentaram inibição da proliferação celular de linfócitos, sendo o óleo essencial de *B. dracunculifolia* o mais promissor.

Coelho e colaboradores (2004) avaliaram em camundongos, utilizando modelo experimental de artrite induzida por colágeno, a ação antiartrítica do extrato aquoso das partes aéreas de *B. genistelloides*. O tratamento por via oral (gavagem) nas doses de 42 mg/kg ou 4,2 mg/kg do extrato, por 60 dias, promoveu respostas de inibição da artrite induzida por colágeno de 75% e 50%, respectivamente. Esses resultados demonstraram o potencial do uso do extrato no tratamento de artrite. Adicionalmente, os autores também avaliaram a ação genotóxica do extrato, através do ensaio de cometa, e não observaram evidências de danos ao DNA hepático ou renal.

Nesse contexto, a avaliação dos efeitos anti-inflamatórios das espécies do gênero *Baccharis* contribui para a identificação de novos compostos bioativos promissores, gerando um grande repertório de potenciais tratamentos para doenças inflamatórias como a artrite gotosa. Assim, esse projeto visa colaborar com o desenvolvimento e novos candidatos a fármacos anti-inflamatórios.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Equipamentos

- Balança analítica Metler, modelo AB 204.
- Balança analítica Sartorius, modelo BP 211D.
- Balança semi-analítica Bel Mark modelo 500 Classe II
- Banho-maria Fanem, modelo 146.
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400.
- Bombas de vácuo Fabbe (modelo 0320) e Edwards (modelo C 560786).
- Capela de fluxo laminar vertical Veco, modelo BioProtector 09.
- Centrífuga Hermle Z323K.
- Chapa agitadora.
- Coluna fase reversa para UPLC, Acquity UPLC BEH C18, Waters; 5,0 × 2,1 mm d.i. 1,7 µm
- Coluna de fase reversa para UPLC em escala preparativa (Agillient 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 CO<sub>2</sub> 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.
- Lavador de microplacas Bio-Rad, modelo ImmunoWash 1575.
- 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; 20-200 µL e 100-1000 µL.
- Microscópio Olympus, modelo CKX41.
- Phmetro Metrohm, modelo 827 pH lab.
- Pipetador automático Drummond, modelo Pipet Aid XP.
- Pistola de calor soprador térmico DeWalt, modelo D26411-B2

- Pré-coluna, Acquity UPLC BEH C18 VanGuard pre-column, Waters; 2,1 x 5 mm d.i. 1,7  $\mu\text{m}$
- Purificador de água Milli-Q Plus.
- Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, em escala preparativa, Waters® 1525, em escala preparativa constituído por injetor automático Waters 2707 Autosampler, detector de arranjos de diodos, Waters 2489 UV-Visible Detector, bomba binária, Binary HPLC Pump e sistema computadorizado operado pelo programa ChemStation.
- Sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC), Waters, composto por detector de arranjos de diodo (DAD) e espectrômetro de massas de alta resolução equipado com fonte de ionização por electrospray Z-spray (ESI), analisador de massas do tipo triplo quadrupolo (TQD), Waters Micromass, e sistema computadorizado operado pelo programa MassLink.
- Ultra centrífuga Hermle, modelo Z 323 K.
- Vórtex Mixer, Vixar.

#### 4.2 Solventes e reagentes

- Ácidos grau P.A.: ácido fórmico, ácido sulfúrico e ácido clorídrico, Merck.
- Ácidos grau HPLC: ácido fórmico e ácido fosfórico, Merck.
- Albumina de soro bovino (BSA), Sigma.
- Bicarbonato de sódio P.A., LS Chemicals.
- Dexametasona, Sigma.
- Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich.
- Fosfato de sódio bibásico, Merck.
- Kit ELISA IL-1 $\beta$  humano, DY201 Duo Set, R&D Systems.
- Kit ELISA TNF humano, DY210 Duo Set, R&D Systems.
- Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O111:B4, Sigma.
- Meio de cultura RPMI-1640, R4130, Sigma.
- *orto*-Fenilenodiamina (OPD), Aldrich.
- Pastilhas de tampão fosfato salino, Sigma.
- Peróxido de hidrogênio P.A., Synth.
- Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA), Sigma.

- Sílica gel 60 G Merck.
- Solventes grau HPLC acetonitrila e metanol, Tedia.
- Solventes grau padrão analítico (P.A.): acetona, diclorometano e metanol, Dinâmica; álcool etílico 95%, Fmaia, tolueno, Merck.
- Soro fetal bovino estéril, Gibco, Invitrogen.
- Tween 80, Sigma-Aldrich.
- Unidade filtrante PTFE 0,22 e 0,45  $\mu\text{m}$ , Corning.

#### **4.3 Vidrarias e materiais diversos**

- Borrifador de vidro.
- Câmara de Neubauer, Labor Optik.
- Cromatoplasmas de vidro de 10  $\times$  10 cm.
- Cubas cromatográficas de vidro Pyrex.
- Frascos de penicilina de vidro de 20 mL.
- Frascos para cultura celular com tampa com filtro, não tratados, de 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup>, Corning.
- Microplaca de 96 poços para cultivo celular, CellStar 655180, Greiner-Bio-One.
- Microplaca de 96 poços para imunoenensaio, Nunc F, MaxiSorp, Invitrogen.
- 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  $\mu\text{m}$ , capacidade para 500 mL e 1000 mL, Corning.
- Soprador térmico.
- 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 98%, 85,0 mL de metanol, 10,0 mL de ácido acético glacial e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, sob resfriamento, nesta ordem.

#### **4.5 Coleta e Identificação botânica**

As espécies de *Baccharis* (SisGen nº A5BF5D0) foram coletadas pelo professor Dr. Geraldo Wilson Fernandes, do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, e identificadas pelo pesquisador Dr. Gustavo Heiden da Embrapa Clima Temperado, Pelotas (ECT). As exsicatas foram depositadas no Herbário ECT, no qual os números de identificação estão copilados no **Quadro 1**. Os locais de coletas selecionados foram Parque Nacional do Caparaó (ES/MG) e Serra da Calçada (MG). Foram coletadas um total de 20 amostras de plantas de 13 espécies diferentes.

#### **4.6. Preparo do Material Vegetal**

As amostras botânicas foram secas em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura máxima de 40 °C. Posteriormente, as folhas e caules foram separados (quando possível), pulverizados em moinho de facas e acondicionadas em sacos de papel identificados e armazenados em sala com climatização (21 °C), totalizando 34 materiais vegetais.

**Quadro 2:** Amostras de espécies do gênero *Baccharis* pró e anti-inflamatórias e suas funções

Local	Código da Planta	Número exsicata	Identificação Botânica	Parte da Planta	Número do Extrato
Serra da Calçada	B. sp1	ECT 6262	<i>Baccharis reticularia</i>	Folha	1
				Caule	2
	B. sp2	ECT 6260	<i>Baccharis retusa</i>	Folha	3
				Caule	4
	B. sp3	ECT 6259	<i>Baccharis brevifolia</i>	Folha	5
				Caule	6
	B. sp4	ECT 6258	<i>Baccharis reticularia</i>	Folha	7
				Caule	8
	B. sp5	ECT 6257	<i>Baccharis myriocephala</i>	Partes aéreas	9
	Parque do Caparaó	B. sp1	ECT 5549	<i>Baccharis calvescens</i>	Folha
Caule					11
B. sp2		ECT 5977	<i>Baccharis calvescens</i>	Folha	12
				Caule	13
B. sp3		ECT 5912	<i>Baccharis imbricata</i>	Folha	14
				Caule	15
B. sp4		ECT 5916	<i>Baccharis parvidentata</i>	Folha	16
				Caule	17
B. sp5		ECT 5542	<i>Baccharis parvidentata</i>	Folha	18
				Caule	19
B. sp6		ECT 5982	<i>Baccharis hemiptera</i>	Partes aéreas	20
B. sp7		ECT 5972	<i>Baccharis opuntiioides</i>	Partes aéreas	21
B. sp8		ECT 5986	<i>Baccharis megapotamica</i>	Folha	22
				Caule	23
B. sp9		ECT 5984	<i>Baccharis parvidentata</i>	Folha	24
				Caule	25
B. sp10		ECT 5983	<i>Baccharis magnifica</i>	Folha	26
				Caule	27
B. sp11		ECT 5981	<i>Baccharis altimontana</i>	Partes aéreas	28
B. sp12		ECT 5987	<i>Baccharis opuntiioides</i>	Partes aéreas	29
B. sp13	ECT 5971	<i>Baccharis platypoda</i>	Folha	30	
			Caule	31	
B. sp14	ECT 5978	<i>Baccharis opuntiioides</i>	Partes aéreas	32	
B. sp15	ECT 5974	<i>Baccharis platypoda</i>	Folha	33	
			Caule	34	

#### 4.7 Obtenção dos extratos para triagem inicial

Uma porção (7 g) de cada material vegetal seco e pulverizado foi extraído com etanol a 96° GL (21 mL) por maceração assistida por sonicação (15 min), seguida de centrifugação (1500 rpm, 7 min) e filtração do sobrenadante em papel de filtro. O ciclo extrativo foi repetido três vezes para cada material vegetal. Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar identificados e o etanol foi eliminado a temperatura ambiente em capela de exaustão de gases. A água residual foi eliminada em liofilizador e os frascos armazenados em dessecador à vácuo. O rendimento extrativo foi calculado (**Tabela 2**).

**Tabela 3:** Rendimento extrativo por maceração de material vegetal de espécies do gênero *Baccharis*

Número Extrato*	Rendimento (%)	Número Extrato*	Rendimento (%)
1	16,7	18	7,0
2	4,5	19	3,7
3	18,0	20	8,0
4	4,2	21	11,0
5	14,2	22	6,8
6	6,2	23	3,0
7	20,0	24	9,9
8	5,0	25	6,3
9	7,8	26	9,1
10	10,8	27	9,3
11	6,4	28	15,3
12	9,7	29	13,7
13	4,3	30	19,6
14	22,5	31	11,1
15	5,6	32	6,3
16	9,0	33	22,8
17	4,9	34	11,1

\*Descrição no quadro 1, pág. 43

#### 4.8 Obtenção e fracionamento dos extratos de *Baccharis calvescens*

O material vegetal (200 g) de *B. calvescens* foi submetido à percolação exaustiva com etanol 96° GL à temperatura ambiente. O etanol foi eliminado em evaporador rotativo sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 50°C. Os extratos foram secos em liofilizador para a retirada de água residual e

armazenados em dessecador à vácuo. O rendimento global extrativo foi calculado (**Tabela 3**).

**Tabela 4:** Rendimento extrativo por percolação das folhas de *B. calvescens*

Material vegetal (g)	Extrato obtido (g)	Rendimento (%)
200,01	60,41	30,20

Posteriormente, o extrato foi fracionado por partição entre solventes imiscíveis. Assim, uma porção do extrato (2 g) 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**). O extrato de *B. calvescens* não foi totalmente solúvel em metanol/água. Assim, a fração não solúvel do extrato foi solubilizada nos primeiros 50 mL dos solventes utilizados na partição. O resíduo insolúvel na solução metanol/água (3:7), foi pouco solúvel em hexano e totalmente solúvel em diclorometano. Os solventes orgânicos foram eliminados em evaporador rotativo sobre pressão reduzida, à temperatura máxima de 50°C. O rendimento global extrativo foi calculado (**Tabela 4**).

**Tabela 5:** Rendimento obtido no fracionamento por partição entre solventes imiscíveis do extrato hidroetanólico de *B. calvescens*

	Extrato	Fr. Hexano	Fr. DCM	Fr. AcOEt	Fr. MeOH:H <sub>2</sub> O
<b>Massa (g)</b>	2,0	0,04	0,72	0,21	0,73
<b>Rendimento (%)</b>	-	1,81	35,64	10,27	36,60

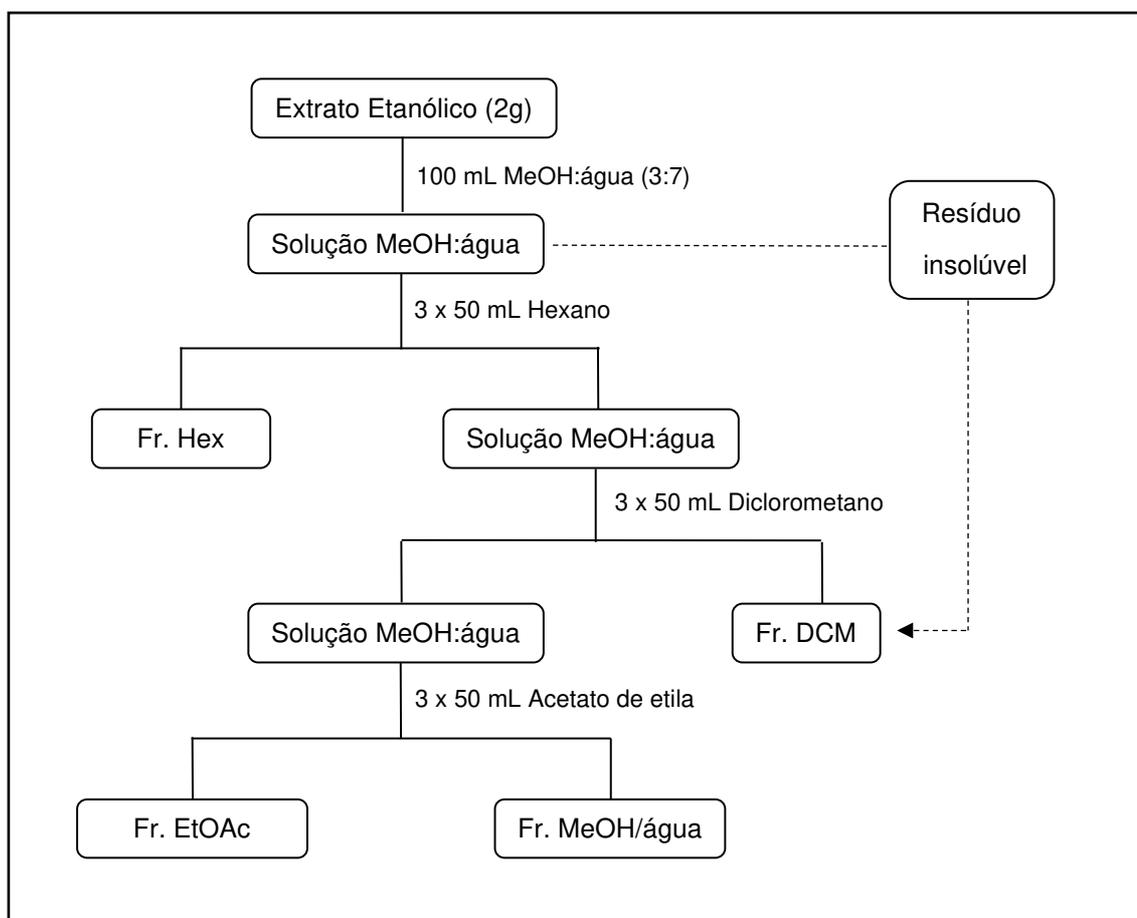
Fr. DCM: fração diclorometânica; Fr. AcOEt: fração acetato de etila; Fr. MeOH:H<sub>2</sub>O: fração metanol/água

Posteriormente, o mesmo procedimento foi realizado com o objetivo de obter uma maior quantidade da fração diclorometânica. O rendimento global extrativo foi calculado (**Tabela 5**).

**Tabela 6:** Rendimento obtido no segundo fracionamento por partição entre solventes imiscíveis do extrato hidroetanólico de *B. calvescens*.

	Extrato	Fr. Hexano	Fr. DCM	Fr. MeOH:H <sub>2</sub> O
<b>Massa (g)</b>	42,57	1,05	19,95	19,57
<b>Rendimento (%)</b>	-	2,45	46,41	45,54

**Figura 2:** Fluxograma do fracionamento do extrato hidroetanólico de *B. calvescens* por partição sequencial entre solventes imiscíveis. Fr.MeOH/água, fração metanol/água; Fr. Hex, fração hexânica; Fr. DCM, fração diclorometânica e Fr. EtOAc, fração em acetato de etila.



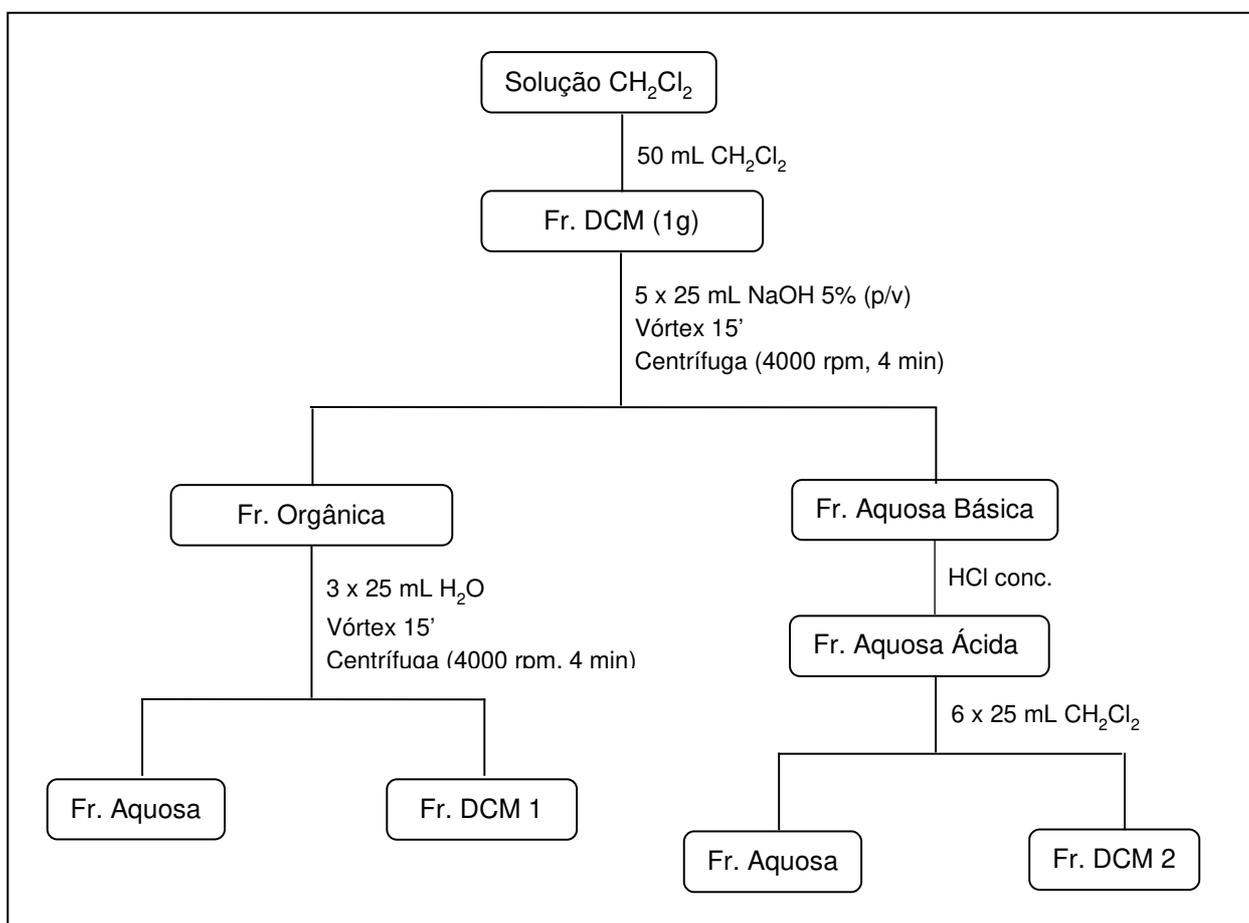
#### 4.9 Refracionamento da fração DCM de *B. calvescens*

Para o refracionamento da fração DCM, uma porção de 1g da amostra foi solubilizada em 50 mL de diclorometano, uma parcela de 25 mL da solução foi transferida para tubos de centrifuga do tipo Falcon de 50 mL e submetidas a partição com 5 x 25 mL de solução de NaOH 5% (p/v), via agitação em vórtex, seguida de centrifugação (4000 rpm, 3 min). A fase aquosa foi separada e a fase orgânica foi lavada com 3 x 25 mL de água via agitação em vórtex, seguida de centrifugação (4000 rpm, 3 min). Após a separação das fases o diclorometano foi eliminado em evaporador rotário sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 50°C. Essa fração foi denominada DCM1. A fase aquosa básica, foi acidificada com HCl até pH 3 e posteriormente submetido a partição 6 x 25 mL de diclorometano utilizando um funil de separação. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo sobre pressão reduzida, à temperatura máxima de 50°C. Essa fração foi denominada DCM2 (**Figura 3**) e a fase aquosa foi descartada. Com o objetivo de obter quantidades preparativas das frações, repetiu-se esse procedimento 14 vezes. As frações DCM1 e DCM2 foram secas em liofilizador para a retirada de água residual e armazenadas em dessecador à vácuo. O rendimento foi calculado (**Tabela 6**).

**Tabela 7:** Rendimento obtido na purificação da fração DCM de *B. calvescens*

	DCM	DCM1	DCM2
<b>Massa (g)</b>	14,217	11,160	2,926
<b>Rendimento (%)</b>	-	78,5	20,6

**Figura 3:** Fluxograma da purificação da fração diclorometânica de *B. calvescens* por partição com solução alcalina. Fr. DMC, fração diclorometânica.



#### 4.10 Obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos e frações por UPLC-ESI-MS e CCD

Os perfis cromatográficos foram obtidos empregando um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) (Waters) acoplado a detector DAD na faixa de 200 a 500 nm e em interface com espectrômetro de massas triplo quadrupolo (TQD) (Waters Micromass) no modo de ionização positivo e negativo. Para a análise dos extratos, utilizou-se coluna de fase reversa (Acquity UPLC BEH C18 2,1 x 50 mm d.i. 1,7  $\mu$ m) em combinação com uma pré-coluna (Acquity UPLC BEH C18 VanGuard pre-column, Waters; 2,1 x 5 mm d.i. 1,7  $\mu$ m) e detecção no UV na faixa de 210 a 500nm. A eluição foi feita com gradiente de água (A) e acetonitrila (B), ambos suplementados com 0,1 % de ácido fórmico, fluxo de 0,3 mL/min e temperatura da coluna de 40 °C (**Tabela 7**). O volume de

injeção das amostras foi de 4  $\mu$ L, na concentração de 2 mg/mL em ACN, após filtração em filtro de 0,22  $\mu$ m. Em todas as etapas foram empregados solventes grau HPLC e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q. ACN foi utilizada como branco nas análises. Todas as amostras foram analisadas, em corrida exploratória de 18 minutos.

**Tabela 8:** Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-ESI/MS.

Tempo (min)	A%	B%
0	95	5
10	5	95
15	5	95
16	95	5
18	95	5

A: água; B: acetonitrila suplementados 0,1% de HCOOH

Para a fonte de ionização por electrospray (ESI), no modo positivo e negativo, as seguintes condições foram empregadas: voltagem do capilar de 3,50 kV; voltagem do cone de 60 V; temperatura da fonte de 120 °C; enquanto a temperatura e o fluxo do gás de dessolvatação foram de 350 °C e 600 L/h, respectivamente. O intervalo de massas avaliado foi da relação carga/massa ( $m/z$ ) de 20 a 1974 Da.

No perfil cromatográfico obtido por cromatografia em camada delgada (CCD), foi utilizado cromatoplaca de vidro 10 x10 cm, com fase estacionária sílica gel 60 (0,063 - 0,5 mm). A concentração de cada amostra aplicada na cromatoplaca foi ajustada para 5 mg/mL em acetona, sendo aplicados 30  $\mu$ L, por banda de 0,5 cm. A fase móvel empregada para eluição foi tolueno: acetona (8:2) acidificada 1% com ácido acético, para evitar a desprotonação das hidroxilas fenólicas e melhorar resolução da cromatoplaca. Para a revelação utilizou-se anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento com o auxílio de soprador térmico.

#### 4.11 Refracionamento da fração DCM2 de *B. calvescens* por HPLC em escala preparativa

A fração DCM2, obtida na purificação da fração DCM de *B. calvescens* foi refracionada por HPLC em escala preparativa (Waters 1525 Binary HPLC Pump/ Waters 2489 UV-Visible Detector/ Waters 2707 Autosampler), utilizando coluna de fase reversa (Agillent Prep-C18; 21,2 x 250 mm, 10 µm). O volume de injeção das amostras foi de 800 µL, 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. O fluxo de eluição foi de 14 mL/min e a detecção foi obtida em dois comprimentos de onda, 254 e 350 nm. O eluente utilizado foi água (A) e acetonitrila (B), empregando-se o gradiente descrito na **Tabela 8**. A coleta das frações foi realizada manualmente e baseada nos tempos de retenção dos picos detectados no cromatograma. Esse procedimento foi repetido 12 vezes, totalizando 362,9 mg de massa injetada. As frações obtidas foram reunidas, acidificadas com HCl e submetidas a extração com diclorometano. O solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo sobre pressão reduzida, à temperatura máxima de 50°C. As massas e os rendimentos obtidos foram calculados (**Tabela 9**).

**Tabela 9:** Gradiente de eluição empregado nas análises por HPLC em escala preparativa.

Tempo (min)	A%	B%
0	95	5
20	62	38
32	62	38
38	5	95
40	5	95
40,5	95	5
50	95	5

A: água; B: acetonitrila

**Tabela 10:** Fracionamento de DCM2 de *B. calvescens* por HPLC em escala preparativa.

<b>Frações</b>	<b>Tr (min)</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Pico 1	22,8	0,9	0,25
Pico 2	24,25	6,3	1,74
Pico 3	29,18	7,1	1,96
Pico 4A	30,65	14,8	4,08
Pico 4B	31,42	18,3	5,05
Pico 5	38,17	14,3	3,94
Pico 6	39,79	26,3	7,25

#### **4.12 Elucidação estrutural das substâncias isoladas**

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) monodimensionais ( $^1\text{H}$ , e  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensionais (HSQC e HMBC) foram obtidos no Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em espectrômetro Bruker Avance DRX - 400 MHz à 25 °C, pelo Prof. José Dias de Sousa Filho. O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno para ambos os núcleos. O solvente empregado para as análises foi o dimetilsulfóxido deuterado ( $d_6$ -DMSO)

#### **4.13 Ensaios biológicos *in vitro***

##### **4.13.1 Cultivo celular**

Para a avaliação do potencial de redução de citocinas pró-inflamatórias *in vitro*, foram utilizadas células THP-1 (células de leucemia monocítica humana aguda, ATCC TIB-202) cultivadas em frascos estéreis contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e mantidas em atmosfera umedecida de 5% de  $\text{CO}_2$  à 37 °C.

##### **4.13.2 Avaliação da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de sulforodamina B (SRB), modificado, sendo necessária a diferenciação das células monocíticas em macrófagos através do estímulo com acetato miristato de forbol (PMA). Esse

método é fundamentado na capacidade do corante SRB de se ligar aos componentes proteicos das células previamente fixadas com ácido tricloroacético (TCA), permitindo a determinação da biomassa celular total viáveis (VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

Uma suspensão das células THP-1 cultivadas foi preparada na densidade de  $1,0 \times 10^6$  células/mL, obtida através de centrifugação (800 rpm, 5 min) do conteúdo de um frasco de cultura e ressuspensão sequencial do pellet com RPMI suplementado com 10% de SFB. Alíquotas de 100  $\mu$ L desta suspensão e 2  $\mu$ L de PMA foram transferidas para uma microplaca de 96 poços, que foi incubada durante 6 horas em estufa com atmosfera umedecida de 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C, para a diferenciação e adesão celular. Posteriormente, o meio original foi eliminado e as células foram carenciadas com alíquotas de 100  $\mu$ L de meio RPMI suplementado com 2% SFB e incubadas novamente nas mesmas condições por 12 horas. Após esse período, os extratos foram solubilizados em 100  $\mu$ L de DMSO e submetidos a diluições sequencias com meio RPMI 2% SFB para subsequente plaqueamento na concentração fixa de 20  $\mu$ g/mL. A microplaca foi novamente incubada nas mesmas condições por 18 horas.

Após o período de incubação, foram adicionados 100  $\mu$ L da solução de TCA (10% v/v) à 4 °C, para promover a fixação celular e a microplaca foi incubada à 4 °C por 1 h. Em sequência, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados cuidadosamente por quatro vezes 200  $\mu$ L de água destilada, e a placa foi mantida em repouso para secagem por 24 h. Após esse período, 100  $\mu$ L da solução de SRB 0,057 % m/v foram adicionados, e a placa foi mantida a temperatura ambiente por 30 minutos. O excesso de corante presente nos poços foi removido por meio de quatro ciclos de lavagem com 200  $\mu$ L de solução de ácido acético (1% v/v) e a placa deixada para secar, novamente, por 24 horas. Posteriormente, 100  $\mu$ L de solução Tris Base 10 mM (pH 10,5) foram adicionados, para a extração do corante ligado as proteínas. A placa foi agitada durante 5 minutos no leitor de microplacas e a densidade óptica foi medida a 510 nm em espectrofotômetro (Tecan, Infinite M200).

A viabilidade celular foi calculada de acordo com a fórmula  $(A - B / C - B) \times 100$ , onde A, B e C correspondem às absorbâncias das amostras, branco e controle

negativo, respectivamente. As amostras que apresentaram viabilidade celular superior a 90% foram consideradas não tóxicas e foram consideradas elegíveis para a realização do ensaio de quantificação de citocinas pró-inflamatórias.

#### **4.13.3 Determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$ produzidas por células THP-1 estimuladas com LPS**

A avaliação do potencial efeito de redução das citocinas pró-inflamatórias *in vitro* foi feita por imunoenensaio (WEISS *et al*, 2004) utilizando células THP-1 estimuladas por LPS. Para isso, 100  $\mu$ L de suspensão celular ( $1 \times 10^5$  células) em meio RPMI suplementado com 2% de SFB foram transferidos para uma microplaca de 96 poços, que foi incubada durante 24 horas em atmosfera umedecida de 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C. Após incubação, os extratos foram solubilizados em DMSO e submetidos a diluições sequenciais com meio RPMI suplementado com 2% de SFB nas concentrações pré-estabelecidas. Uma porção de 100  $\mu$ L da solução das amostras foi adicionada aos poços correspondentes da microplaca e a placa foi incubada por 3 horas nas mesmas condições. Posteriormente, 20  $\mu$ L de LPS (1 ng/mL) foram adicionados aos poços, e a microplaca foi novamente incubada por 12 horas nas mesmas condições. Após esse período, a microplaca foi centrifugada (1800 rpm, 5 min) e 100  $\mu$ L do sobrenadante foi coletado para a quantificação das citocinas pelo método de ELISA, conforme o protocolo descrito abaixo.

#### **4.13.4 Protocolos de ELISA para ensaios *in vitro***

Para a determinação da concentração de citocinas pró-inflamatórias foram utilizados kits de ELISA da R&D Systems (DY210-KIT TNF, DY201-KIT IL-1 $\beta$ ), e o ensaio foi realizado conforme as orientações do fabricante.

Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 100  $\mu$ L/poço de anticorpo de captura de TNF ou IL-1 $\beta$  (4  $\mu$ g/mL) solubilizados em PBS. As microplacas foram mantidas à 4 °C durante 12 horas. Após a incubação, as microplacas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS/Tween 20 0,1% v/v) em um lavador de placas automático (Bio-Rad, ImmunoWash 1575). As microplacas

foram completamente secas e, na sequência, foram adicionados 200 µL da solução de bloqueio (1% de albumina de soro bovino em PBS), em todos os poços, e mantidas sob agitação por 2 horas. Após esse período, as microplacas foram novamente lavadas e secas. Em seguida, foram adicionados 100 µL das amostras ou dos padrões de TNF (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,6, pg/mL) e IL-1β (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 e 7,81 pg/mL) e as microplacas foram incubadas por 18 horas à 4 °C e posteriormente lavadas e secas. Em seguida, 100 µL de solução de anticorpos de detecção de TNF (500 ng/mL) ou IL-1β (200 ng/mL) foram adicionados em todos os poços, e as microplacas foram mantidas sob agitação por 2 horas. Após este período, as placas foram lavadas e secas e, na sequência adicionaram-se 100 µL de uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (R&D system), em todos os poços. As microplacas foram incubadas por 30 minutos na ausência de luz, para posterior lavagem e secagem vigorosa das microplacas. Em seguida, foram adicionados 100 µL de uma solução de o-fenilenodiamina (OPD) em tampão citrato (0,4 mg/mL) e 2,4 µL de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após 30 minutos com a adição de 50 µL de ácido clorídrico a 1 mol/L. O produto de oxidação do OPD foi detectado em leitor de microplacas em 490 nm (Tecan, Infinite M200).

A concentração de TNF e IL-1β foi calculada através da utilização da curva padrão de concentração-resposta construída para cada citocina.

#### **4.13.5 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada empregando o programa Prism GraphPad 5.0 (GraphPad Software Inc., EUA) utilizando ANOVA, seguida do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos como média ± DP e considerados significativamente distintos quando  $p < 0,05$ . As amostras foram testadas em triplicata nas concentrações adequadas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desreplicação dos extratos utilizando UPLC-ESI-MS

As estratégias de desreplicação dependem de técnicas analíticas e da pesquisa de banco de dados para determinar a identidade de compostos ativos no estágio inicial da pesquisa. Desta forma, a desreplicação permite a identificação de substâncias já conhecidas, o que racionaliza a busca e minimiza esforços no isolamento de substâncias previamente descritas. Assim, os recursos são direcionados para o isolamento de produtos naturais inéditos ou pouco comuns (GAUDÊNCIO; PEREIRA, 2015).

Os métodos hifenados usam a combinação de dois (ou mais) métodos de separação e detecção, o que permite uma identificação rápida de compostos presentes em uma matriz complexa, como é o caso dos extratos provenientes de plantas. Assim, análises por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS) são frequentemente empregadas nos estudos fitoquímicos para a identificação de metabólitos especiais presentes em extratos e frações derivados de plantas. Desta forma, o uso dessas técnicas é uma ferramenta com alta seletividade e sensibilidade, fornecendo informações importantes para a identificação de substâncias já descritas ou inéditas (GAUDÊNCIO; PEREIRA, 2015).

No presente trabalho, a técnica de UPLC-ESI-MS foi empregada, inicialmente, com o objetivo de obter perfis cromatográficos das amostras e identificar metabólitos secundários presentes nos extratos. Assim, os extratos foram distribuídos em grupos de acordo com a similaridade dos perfis cromatográficos e apenas um extrato de cada grupo foi analisado *in vitro* objetivando reduzir o número de análises e os custos. A estratégia utilizada nas análises foi buscar na literatura dados (massa molecular, espectro de UV e de massas) das substâncias já isoladas de plantas do gênero *Baccharis* e construir uma tabela de consulta com esses dados compilados (dados não mostrados). Uma vez que, não existe comercialmente um banco de dados de produtos naturais analisados por UPLC-ESI-MS, devido à grande dificuldade de padronização dos diferentes parâmetros utilizados nas análises.

Os espectros de massas foram obtidos tanto no modo de ionização positivo quanto no negativo. Os dados de absorção no UV ( $\lambda_{\max}$ ) foram importantes, principalmente, para a identificação de diferentes classes de flavonoides como flavanonas ( $\lambda_{\max}$  275-295 nm e ombro de 300-330 nm); flavonas ( $\lambda_{\max}$  250-280 nm e 310-330 nm) e flavonóis (3-OH livre) ( $\lambda_{\max}$  250-280 nm e 350-385 nm) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

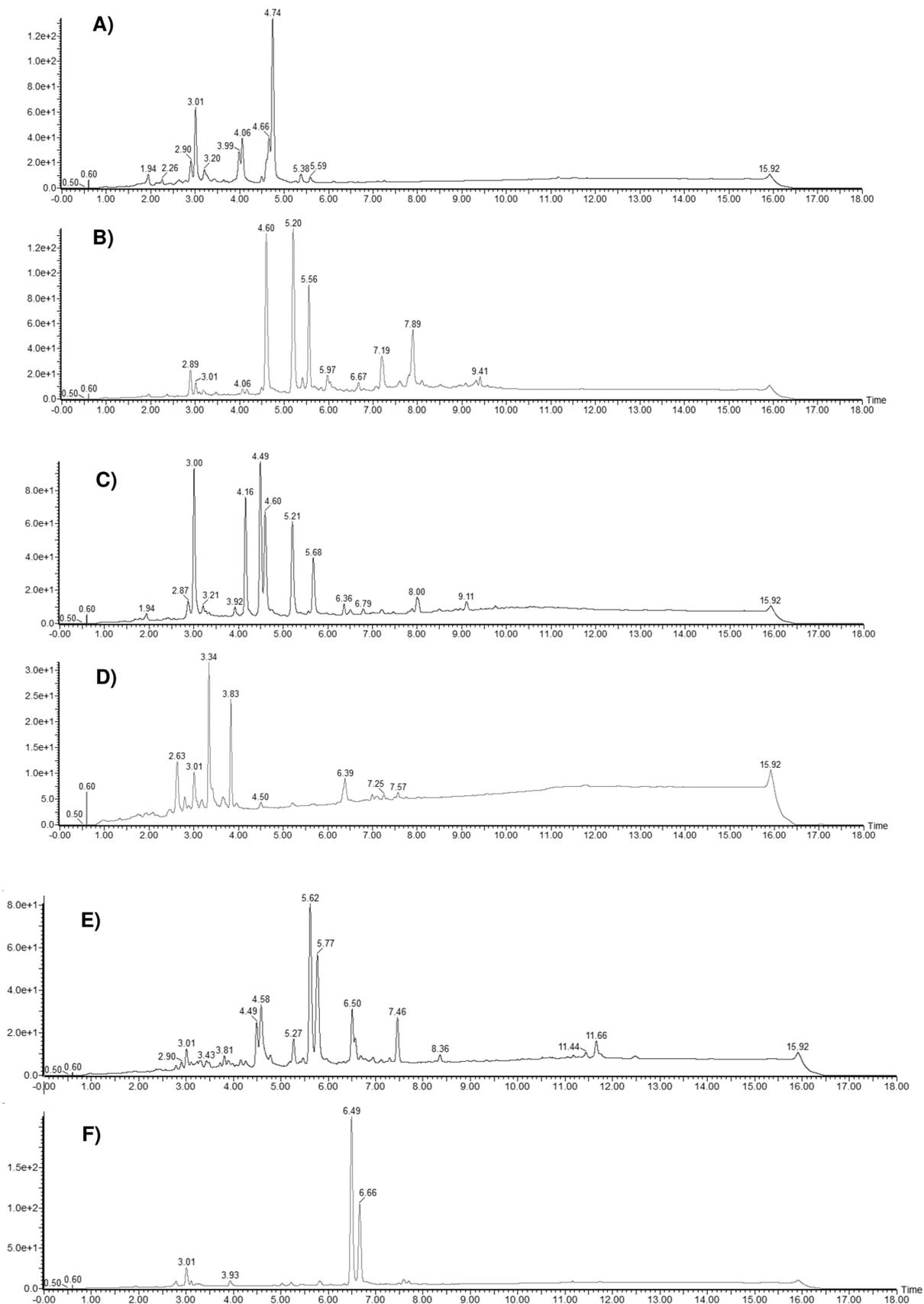
Após as análises, os extratos foram subdivididos em 13 grupos de acordo com a similaridade dos perfis cromatográficos (**Figura 4, pág. 57**). A **Tabela 10 (pág. 59)** apresenta os dados obtidos pelas análises de UPLC-ESI-MS. Inicialmente, nesse estudo, foram avaliadas apenas as substâncias polifenólicas que apresentam como característica a capacidade de se fragmentar, tanto no modo positivo quanto no modo negativo de ionização. Desta forma, alguns picos nos cromatogramas não foram considerados devido o perfil do espectro de UV não ser característico de substâncias fenólicas. A partir dos dados da tabela construída com dados compilados da literatura, foram sugeridas estrutura de substâncias fenólicas putativas (**Figura 5, pág. 62**). Uma limitação do uso da espectrometria de massas na identificação putativa de compostos consiste na dificuldade de diferenciar facilmente isômeros de posição, por isso, na tabela pode-se encontrar mais de uma substância para o mesmo espectro de massas e tempo de retenção.

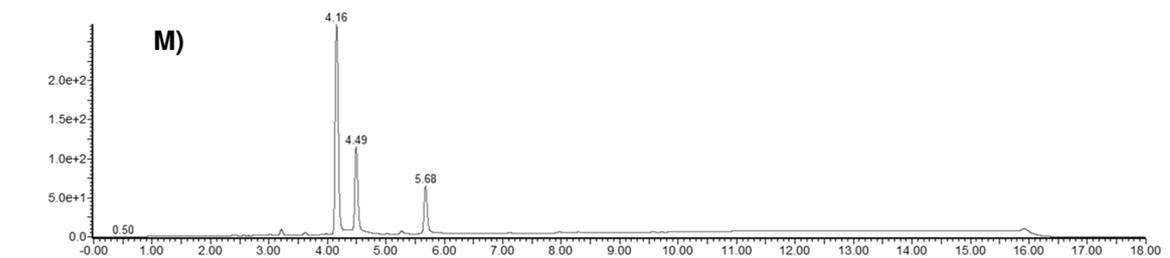
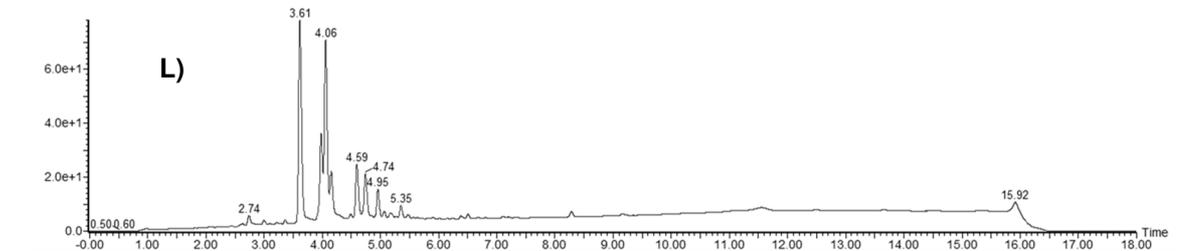
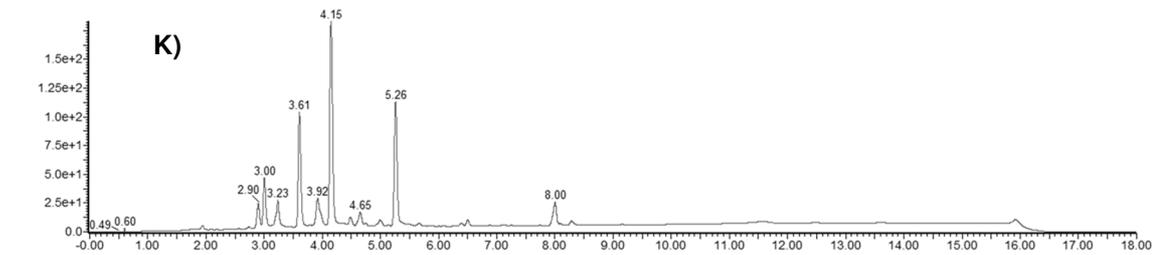
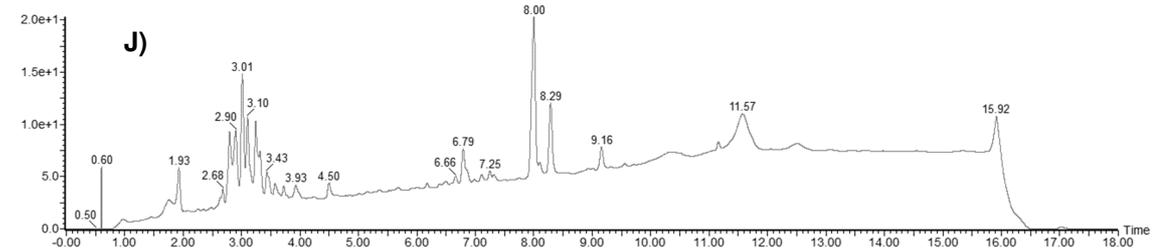
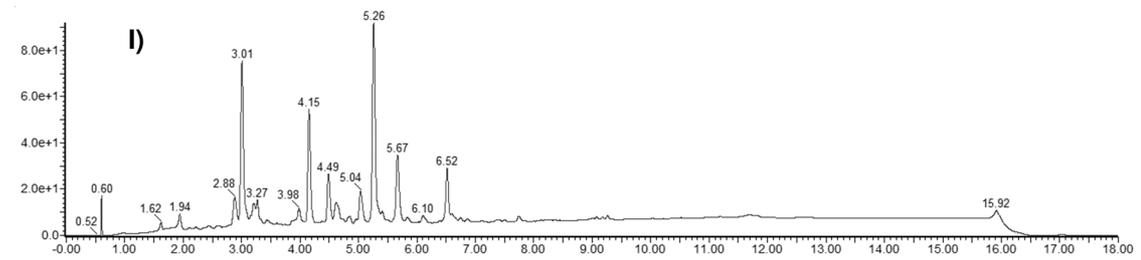
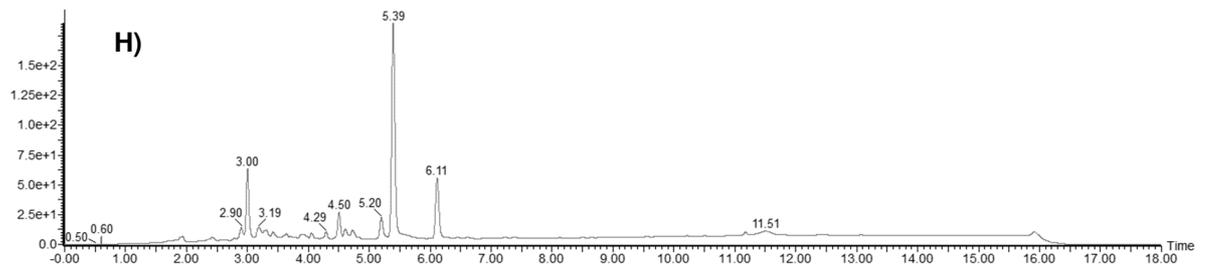
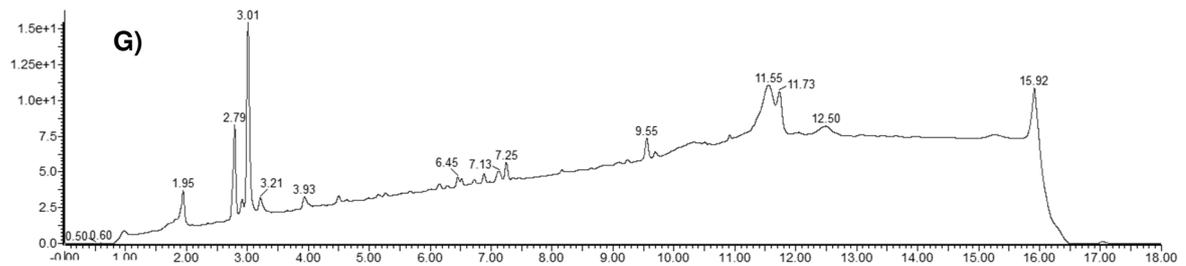
A análise dos perfis cromatográficos obtidos (**Apêndice A-T, págs. 109 a 128**) não evidenciou uma diferença significativa entre perfis de plantas da mesma espécie, que foram coletadas em diferentes locais. Também não houve diferenças significativas entre os perfis de folha e caule para as espécies nas quais essa distinção foi possível. Desta forma, para os ensaios *in vitro*, optou-se por analisar as folhas, de um exemplar de cada espécie, devido a maior quantidade de material vegetal disponível e ao maior rendimento dos extratos hidroetanólicos.

As substâncias putativas obtidas a partir das análises foram classificadas com base na massa molecular em 11 grupos, totalizando, 28 possíveis substâncias fenólicas para as espécies analisadas (**Tabela 11, pág.61**). Os isômeros derivados do ácido clorogênico, ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico e ácido 3,5-di-O-

cafeoilquínico, foram as substâncias mais frequentes, sendo identificados em 9 espécies. Os flavonoides são encontrados em 10 grupos, destes apenas três grupos (III, VIII e X) não apresentaram um grupo metoxila ligado ao núcleo flavônico. Pode-se observar uma predominância de derivados monometoxilados (II, IV, V e IX) enquanto grupos com núcleo flavônicos dimetoxilados e trimetoxilados foram observados em dois grupos (VI e VII) e em um (XI) grupo, respectivamente. Com base nesses resultados, observa-se que a presença de flavonoides metoxilados representa uma importante característica química/biossintética de espécies do gênero *Baccharis*.

**Figura 4:** Perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos das 13 espécies do gênero *Baccharis* selecionadas no presente estudo. A) *B. altimontana*, ext. folhas; B) *B. brevifolia*, ext. folhas; C) *B. calvescens*, ext. folhas; D) *B. hemiptera*, ext. partes aéreas; E) *B. imbricata*, ext. folhas; F) *B. magnifica*, ext. folhas G) *B. megapotamica*, ext. folhas; H) *B. myriocephala*, ext. partes aéreas; I) *B. opuntioides*, ext. partes aéreas; J) *B. parvidentata*, ext. folhas; K) *B. platypoda*, ext. folhas; L) *B. reticularia*, ext. folhas; M) *B. retusa*, ext. folhas.





**Tabela 11:** Dados espectroscópicos e possíveis constituintes do extrato etanólico de espécies de *Baccharis* por UPLC-ESI-MS.

Grupo	Ter (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	MM	Possíveis substâncias Putativas
<i>B. altimontana</i> (Extrato 28)	3,01	218	515,35	517,30	516	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico
		327	(100%)	(50%)		Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico
	4,06	271	315,15	317,04	316	3-O-Metilquercetina
		345	(100%)	(100%)		Nepetina Eupafolina
4,66	276	299,27	301,16	300	Crisoeriol	
	345	(100%)	(100%)		Hispidulina	
4,74	272	329,13	331,21	330	Jaceosidina	
		345	(100%)		(100%)	Desmetoxicentaureidina Cirsiliol 4',5,7-Triidroxi-6,8-dimetoxiflavona
<i>B. brevifolia</i> (Extratos 5 e 6)	4,60	273	299,15	300,78	300	Crisoeriol
		333	(100%)	(100%)		Hispidulina
5,20	275	313,19	315,15	314	Cirsimaritina	
		333	(100%)		(100%)	Pectolinarigenina
<i>B. calvescens</i> (Extratos 10, 11, 12 e 13)	3,00	218	515,16	517,37	516	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico
		327	(100%)	(50%)		Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico
	4,16	288	271,18	272,75	272	Naringenina
			(100%)	(100%)		
	4,49	267	268,91	270,80	270	Apigenina
			333	(100%)		(100%)
4,60	272	298,96	300,78	300	Crisoeriol	
		333	(100%)		(100%)	Hispidulina
5,21	275	313,13	314,71	314	Cirsimaritina	
		333	(100%)		(100%)	Pectolinarigenina
5,68	267	283,02	285,10	284	Genkwanina	
		333	(100%)		(100%)	Apigenina-5-metil éter 2'-Metoxicrisina
<i>B. hemiptera</i> (Extrato 20)	3,01	219	515,35	516,86	516	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico
<i>B. imbricata</i> (Extratos 14 e 15)	4,49	267	329,07	331,27	330	Jaceosidina
		358	(80%)	(100%)		Desmetoxicentaureidina Cirsiliol 4',5,7-Triidroxi-6,8-dimetoxiflavona
	4,58	270	299,08	301,16	300	Crisoeriol
		334	(100%)	(100%)		Hispidulina
5,27	288	286,99	285,03	286	Isosakuranetina	
		(100%)	(100%)		Diidrooroxilina A Sakuranetina	
5,62	266	299,08	301,16	300	Crisoeriol	
		362	(100%)		(100%)	Hispidulina
<i>B. magnifica</i> (Extratos 26 e 27)	3,01	219	515,35	516,99	516	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico
<i>B. megapotamica</i> (Extratos 22 e 23)	3,01	219	515,23	517,49	516	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico
<i>B. myriocephala</i> (Extrato 9)	3,00	217	515,16	517,24	516	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico
		327	(100%)	(50%)		Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico
	5,20	275	313,13	315,21	314	Cirsimaritina
332		(100%)	(100%)	Pectolinarigenina		
5,39	274	343,24	344,88	344	Nevadensina	
		345	(100%)		(100%)	Xantomicrol Eupatilina Penduletina 3,4',7-Trimetilquercetina
<i>B. opuntoides</i> (Extratos 21, 29 e 32)	3,01	218	515,29	517,18	516	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico
		327	(100%)	(100%)		Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico
4,15	288	271,11	273,13	272	Naringenina	

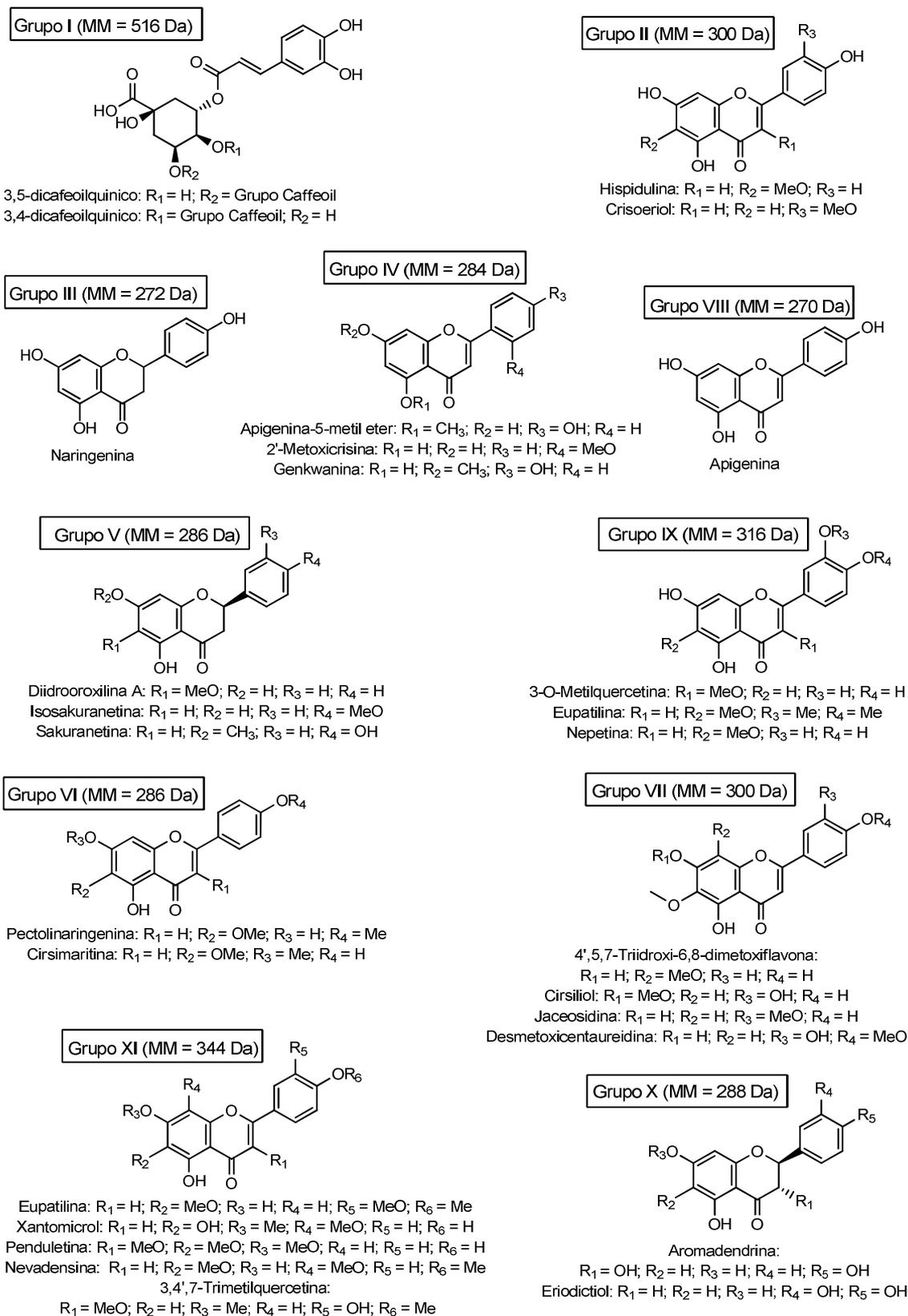
	4,49	267 334	269,16 (100%)	271,1 (100%) <sup>1</sup>	270	Apigenina
	5,26	288	285,22 (100%)	287,11 (100%)	286	Isosakuranetina Dihidrooxilina A Sakuranetina
	5,67	267 333	283,21 (100%)	285,10 (100%)	284	Genkwanina Apigenina-5-metil éter 2'-Metoxicrisina
<i>B. parvidentata</i> (Extratos 16, 17, 18, 19, 24 e 25)	3,01	218 328	515,23 (100%)	516,17 (50%)	516	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico
	3,00	218 327	515,16 (100%)	517,18 (50%)	516	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico
<i>B. platypoda</i> (Extratos 30, 31, 33 e 34)	3,61	287	287,11 (100%)	288,75 (100%)	288	Aromadendrina Eriodictiol
	4,15	288	271,24 (100%)	272,69 (100%)	272	Naringenina
	5,26	288	285,16 (100%)	286,67 (100%)	286	Isosakuranetina Dihidrooxilina A Sakuranetina
	3,61	287	287,05 (100%)	289,00 (100%)	288	Aromadendrina Eriodictiol
<i>B. reticularia</i> (Extratos 1, 2, 7 e 8)	4,06	270 346	315,02 (100%)	316,85 (100%)	316	3-O-Metilquercetina Nepetina Eupafolina
	4,59	272 333	299,08 (100%)	301,16 (100%)	300	Crisoeriol Hispidulina
	4,74	272 345	329,13 (100%)	331,08 (100%)	330	Jaceosidina Desmetoxicentaureidina Cirsiliol 4',5,7-Triidroxi-6,8-dimetoxiflavona
	4,16	287	271,11 (100%)	272,69 (100%)	272	Naringenina
<i>B. retusa</i> (Extratos 3 e 4)	4,49	267 333	269,16 (100%)	270,99 (100%)	270	Apigenina
	5,68	267 333	283,21 (100%)	285,16 (100%)	284	Genkwanina Apigenina-5-metil éter 2'-Metoxicrisina

Tr: tempo de retenção; MM: massa molecular

**Tabela 12:** Características das substâncias putativas fenólicas identificadas e sua frequência nas espécies de *Baccharis* em estudo.

Grupo	Substância Putativa	Número de espécies	Classe	Grupo Metoxila	Posição
I (MM = 560 Da)	Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico	9	Ácido fenólico	-	-
	Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico	9	Ácido fenólico	-	-
II (MM = 300 Da)	Crisoeriol	6	Flavona	1	3'
	Hispidulina	6	Flavona	1	6
III (MM = 272 Da)	Naringenina	4	Flavanona	-	-
IV (MM = 284 Da)	2'-Metoxicrisina	3	Flavona	1	5'
	Apigenina-5-metil éter	3	Flavona	1	5
	Genkwanina	3	Flavona	1	7
V (MM = 286 Da)	Diidrooroxilina A	3	Flavanona	1	6
	Isosakuranetina	3	Flavanona	1	4'
	Sakuranetina	3	Flavanona	1	7
VI (MM = 314 Da)	Cirsimaritina	3	Flavona	2	6, 7
	Pectolinaringenina	3	Flavona	2	6, 4'
VII (MM = 330 Da)	4',5,7-Triidroxi-6,8-dimetoxiflavona	3	Flavona	2	6, 8
	Cirsiliol	3	Flavona	2	6, 7
	Desmetoxicentaureidina	3	Flavona	2	4'
	Jaceosidina	3	Flavona	2	6, 3'
VIII (MM = 270 Da)	Apigenina	3	Flavona	-	-
IX (MM = 288 Da)	3-O-Metilquercetina	2	Flavona	1	3
	Eupafolina	2	Flavona	1	6
	Nepetina	2	Flavona	1	6
X (MM = 344 Da)	Aromadendrina	2	Flavanonol	-	-
	Eriodictiol	2	Flavanona	-	-
XI (MM = 344 Da)	3,4',7-Trimetilquercetina	1	Flavona	3	3, 7, 4'
	Eupatilina	1	Flavona	3	6, 3', 4'
	Nevadensina	1	Flavona	3	6, 8, 4'
	Penduletina	1	Flavona	3	3, 6, 7
	Xantomicrol	1	Flavona	3	6, 7, 8

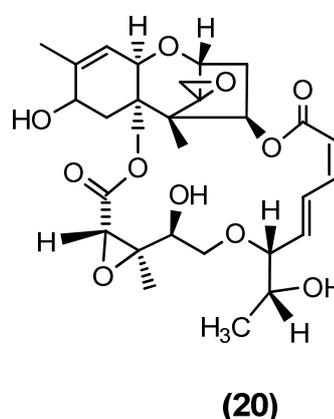
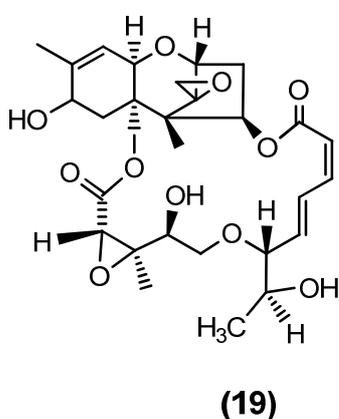
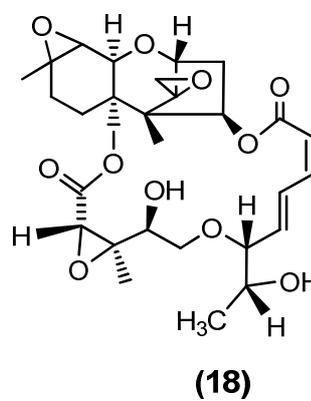
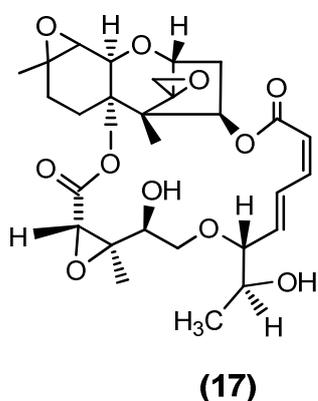
**Figura 5:** Estruturas das possíveis substâncias fenólicas identificadas putativamente nas espécies de *Baccharis* em estudo



## 5.2 Efeito *in vitro* dos extratos hidroetanólicos de espécies do gênero *Baccharis* sobre mediadores pró-inflamatórios

No total foram avaliados 13 extratos, destes, 12 apresentaram viabilidade celular acima de 90%, não apresentando toxicidade para as células THP-1 na concentração de 20 µg/mL avaliado pelo método da SRB. Apenas o extrato de *B. megapotamica* apresentou toxicidade, reduzindo em 20% a viabilidade celular sendo, portanto, excluído dos testes de redução da liberação de citocinas *in vitro*.

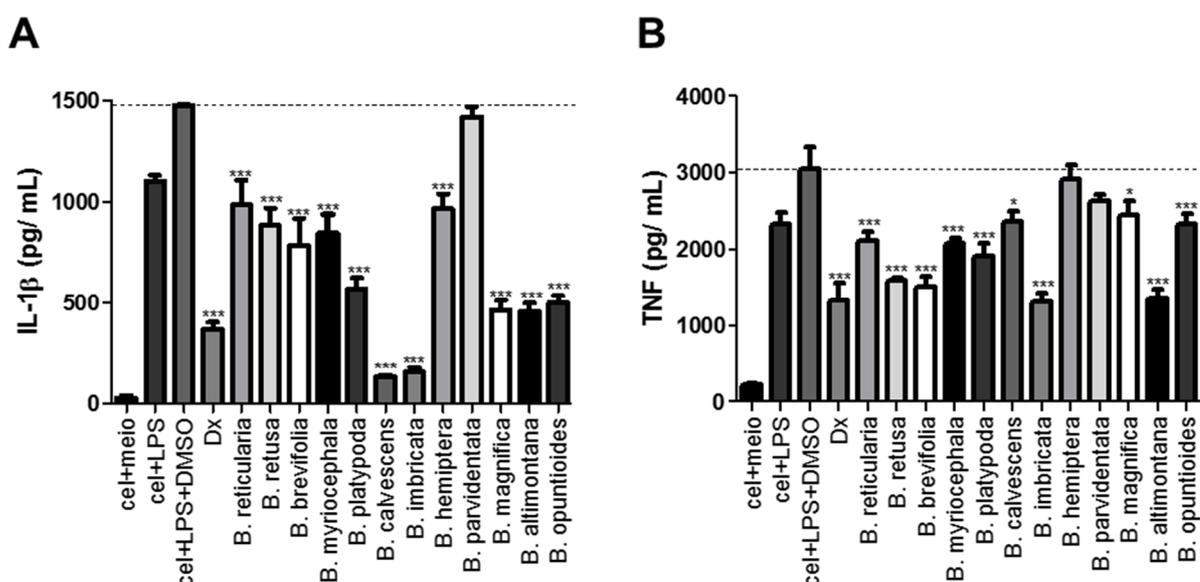
A citotoxicidade da *B. megapotamica* corrobora os dados da literatura, que relatam a morte de bovinos e ovinos causada pela intoxicação por essa espécie (PEDROSO *et al*, 2010). Estudos de KUPCHAN e colaboradores (1976) demonstraram atividade citotóxica do extrato etanólico frente às células KB (carcinoma nasofaríngeo) *in vitro* e em um modelo P-388 de leucemia murina *in vivo*, atribuindo esses efeitos a tricotecenos macrocíclicos, como baccharina (17), isobaccharina (18), baccharinol (19) e isobaccharinol (20).



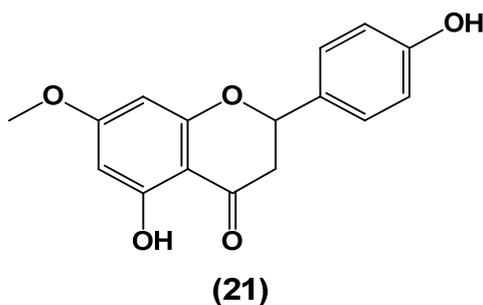
Em relação ao potencial de redução das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$ , não foi observado liberação significativa das citocinas pro-inflamatórias por células tratadas com a dexametasona (Dx), corticoide empregado como controle positivo, ou com os extratos selecionados sem a adição do estímulo inflamatório (LPS), indicando ausência de efeito pró-inflamatório para as amostras avaliadas.

Com o objetivo de selecionar extratos com alta atividade de redução de liberação de citocinas, foi selecionada uma única concentração dos extratos a ser testada, 20  $\mu$ g/mL (**Figura 6**). Observou-se maior efeito sobre a liberação da citocina IL-1 $\beta$ . Com exceção do extrato de *B. parvidentata*, todos apresentaram redução significativa da liberação de IL-1 $\beta$ , com destaque para os extratos de *B. calvescens* e *B. imbricata*, que promoveram  $90,85 \pm 0,85$  % e  $89,33 \pm 2,49$  % de redução, respectivamente. Em relação a liberação da citocina TNF, a redução foi mais moderada. Os extratos de *B. reticularia*, *B. retusa*, *B. brevifolia*, *B. myriocephala*, *B. platypoda*, *B. imbricata*, *B. altimontana* e *B. opuntioides* apresentaram redução significativa de liberação de TNF, com destaque para os extratos de *B. imbricata* e *B. altimontana*, que promoveram  $56,75 \pm 3,70$  % e  $55,57 \pm 4,04$  % de redução, respectivamente. Após a triagem inicial, o extrato de *B. calvescens* foi selecionado para o estudo fitoquímico e potencial de redução da liberação das citocinas pró-inflamatórias, devido sua seletividade da resposta/efeito em reduzir os níveis de IL-1 $\beta$ , citocina envolvida na fisiopatologia da artrite gotosa.

**Figura 6:** Redução da liberação de mediadores pró-inflamatórios dos extratos hidroetanólicos de folhas de espécies do gênero *Baccharis* na concentração de 20 µg/mL em células THP-1 estimuladas com LPS (1 ng/mL). Os dados representam a média ± DP em triplicata. \*\*\* p < 0,001, comparado com cel + LPS + DMSO: controle tratado com o veículo; cel + meio e cel + LPS: células não tratadas; DMSO: solvente (controle); Dx: dexametasona (0,2 µM). A) IL-1β; B) TNF.



Os resultados apresentados nesse trabalho, corroboram o uso popular das espécies do gênero *Baccharis* frente às doenças de caráter inflamatório. Dentre as 13 espécies desse estudo, a única espécie que apresentou dados citados na literatura sobre atividade anti-inflamatória foi a *B. retusa*. Taguchi e colaboradores (2015) demonstraram que a sakuranetina (21), uma flavanona isolada do extrato diclorometânico de partes aéreas de *B. retusa* diminuiu a inflamação pulmonar com redução dos níveis das citocinas TNF e IL-1β em camundongos com enfisema induzido por elastase. Outro estudo, também utilizou sakuranetina isolada de folhas de *B. retusa*, demonstrou a redução das populações de macrófagos, e dos níveis de TNF e IL-1β no pulmão de camundongos com lesão pulmonar aguda induzida por LPS (BITTENCOURT-MERNAK *et al*, 2017).



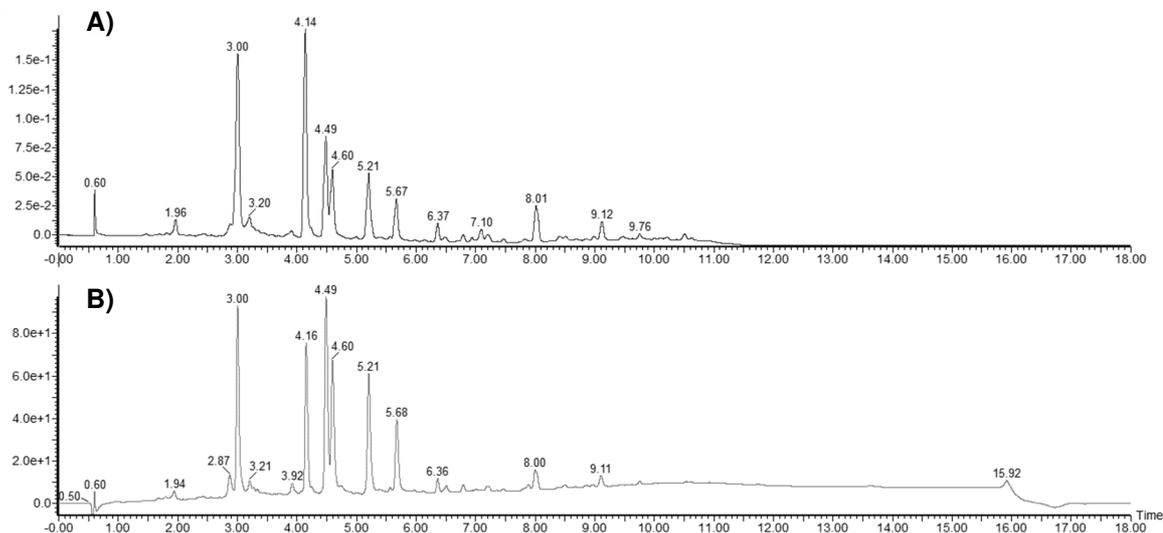
O uso tradicional de plantas do gênero *Baccharis* para o tratamento de doenças inflamatórias foi relatado para extratos de *B. coridifolia*, *B. illinita*, *B. salicifolia*, *B. pentlandii* e *B. teindalensis*, *B. floribunda*, *B. trimera*, *B. latifolia*, *B. obtusifolia*, *B. subalata* e *B. pentlandii*, em países como Brasil, Argentina, Colômbia, Chile, Bolívia, Venezuela e México (ABAD; BERMEJO, 2007).

Entretanto, estudos experimentais que comprovam a ação anti-inflamatória ainda são limitados a poucas espécies. Pode-se citar: extrato aquoso de partes aéreas de *B. trimera* (OLIVEIRA *et al*, 2012; NOGUEIRA *et al*, 2011; PAUL *et al*, 2009) extrato hidroetanólico bruto de folhas de *B. illinita* (BOLLER *et al*, 2010); extrato hidroetanólico bruto de folhas de *B. dracunculifolia* (SANTOS *et al*, 2010); extrato aquoso das partes aéreas de *B. genistelloides* (COELHO *et al*, 2004) e óleos essenciais de *B. articulata*, *B. genistelloides*, *B. dracunculifolia* e *B. gaudichaudiana* (FLORÃO *et al*, 2012). Os números limitados de trabalhos que investigam o potencial anti-inflamatório das espécies do gênero *Baccharis* demonstram a relevância do presente trabalho.

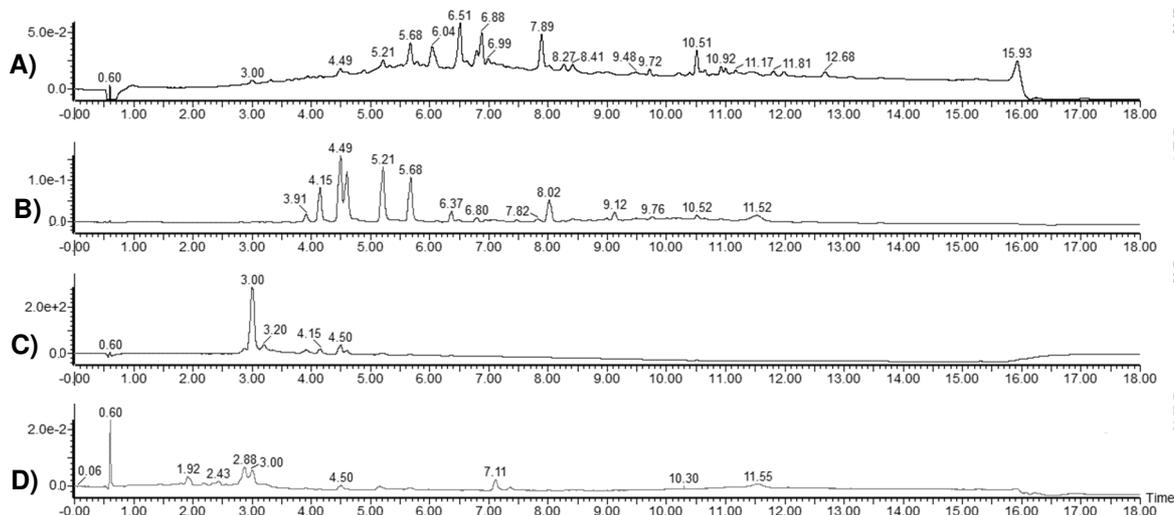
### 5.3 Estudo fitoquímico de *Baccharis calvescens*

O extrato hidroetanólico de *B. calvescens*, foi obtido por percolação exaustiva com EtOH 96 °GL, com rendimento de 30,2%, sendo maior que o obtido na extração por maceração (10,8%). Posteriormente, o fracionamento do extrato percolado foi realizado por partição líquido-líquido sequencial com *n*-hexano, diclorometano e acetato de etila, visando obtenção dos metabólitos especiais de acordo com sua polaridade. Para a investigação da composição química o extrato obtido por percolação e as frações obtidas foram analisados no UPLC-ESI-MS (Figuras 7 e 8).

**Figura 7:** Perfil cromatográfico dos extratos de *B. calvescens* registrados em 240 nm. A) extrato hidroetanólico obtido por percolação; B) extrato hidroetanólico obtido por maceração. Para condições cromatográficas ver item 4.10



**Figura 8:** Perfil cromatográfico das frações de *B. calvescens*. A) fração hexânica; B) fração diclorometânica (DCM); C) fração acetato de etila (AcOEt); D) fração metanol:água. Para condições cromatográficas ver item 4.10



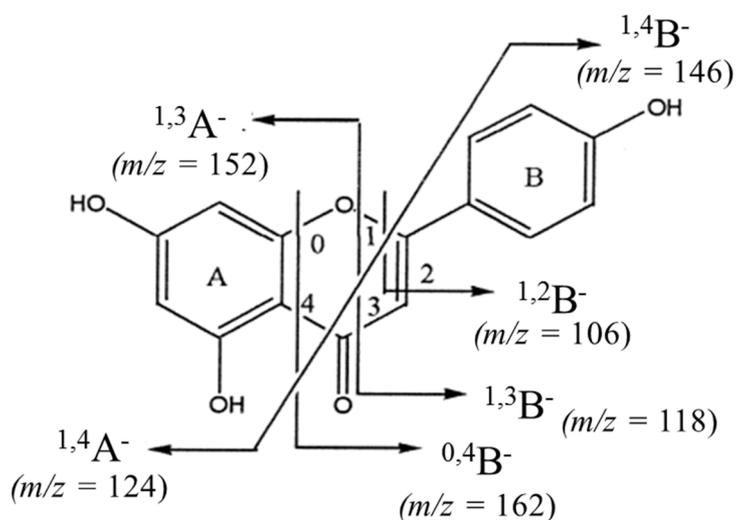
Não houve diferença significativa entre os perfis cromatográficos obtidos por maceração e percolação. Observou-se que na fração hexânica (rendimento de 1,81%) são observadas substâncias não fenólicas, cujos espectros de absorção

no UV obtidos *on line* não apresentam bandas de absorção próximas a 254 nm. Na fração DCM (rendimento de 35,6%) concentram-se os cinco flavonoides identificados na caracterização preliminar do extrato. Já a fração AcOEt (rendimento de 10,27%), apresentou um perfil menos complexo, sendo que o pico com maior absorção corresponde a um derivado do ácido dicafeoilquínico, enquanto a fração metanol:água (rendimento de 36,60%) não apresentou picos significantes.

Uma análise mais detalhada por UPLC-DAD-ESI-MS/MS foi realizada com o extrato visando identificar os isômeros fenólicos através do perfil de fragmentação. A **Tabela 12** apresenta os fragmentos registrados em análises no modo de ionização positivo e negativo, assim como o tempo de retenção (Tr) e UV ( $\lambda_{max}$ ) de seis picos.

A análise dos flavonoides foi realizada pela identificação dos padrões de fragmentação característicos dessa classe (**Figura 9**), como a quebra do anel heterocíclico em diferentes posições, permitindo a identificação da posição dos grupos substituintes (FABRE *et al*, 2001).

**Figura 9:** Esquema de fragmentação de flavonoides.



Fonte: Fabre *et al* (2001). Adaptado.

**Tabela 13:** Dados espectroscópicos e caracterização de constituintes do extrato hidroetanólico de *Baccharis calvescens* por UPLC-ESI-MS/MS.

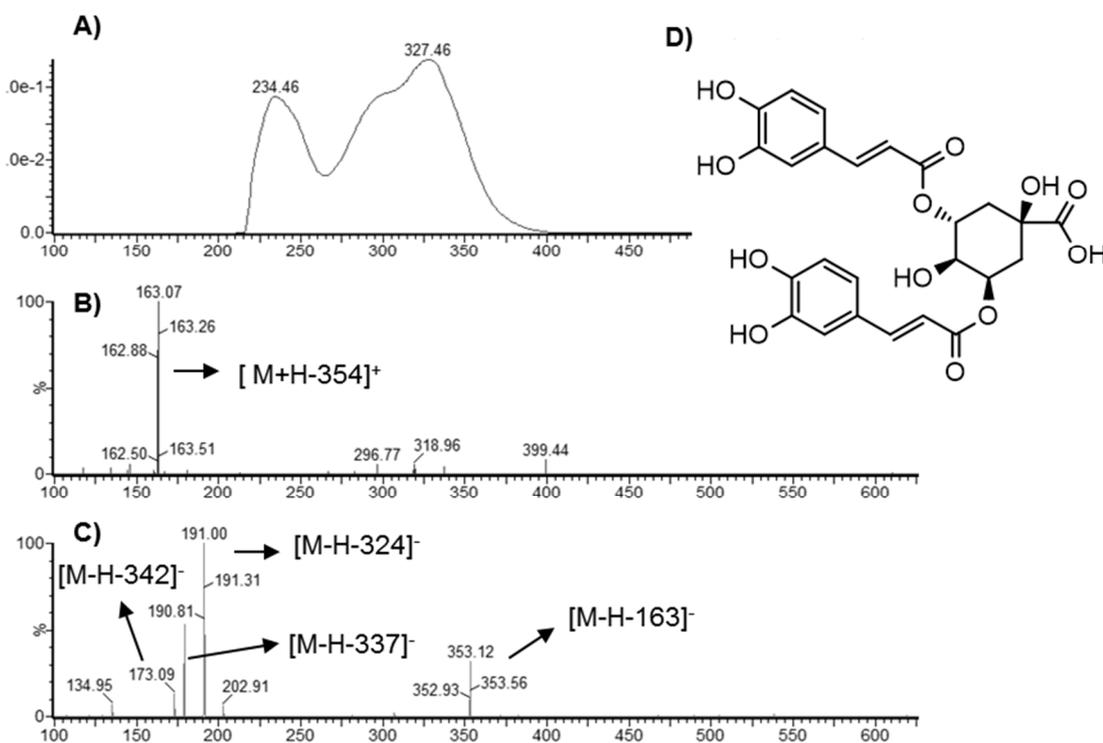
Substância	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Fragmentos [M+H] <sup>+</sup> (%)	Fragmentos [M-H] <sup>-</sup> (%)	Massa Molar	Identificação
1	3,00	235 327	163,1 [M+H-354] (100%)	353,1 [M-H-163] (20%) 191,0 [M-H-324] (100%) 179,3 [M-H-337] (50%) 173,0 [M-H-342] (10%)	516	Ácido 3,5-di-O-cafeoilquinico
2	4,14	288	153,1 [M+H-120] (100%)	151,0 [M-H-120] (100%) 118,9 [M-H-152] (30%) 177,1 [M-H-94] (30%)	272	Naringenina
3	4,49	267 333	271,2 [M+H] (100%)	269,2 [M-H] (100%) 225,1 [M-H-44] (30%) 181,0 [M-H-88] (30%) 151,0 [M-H-118] (30%)	270	Apigenina
4	4,60	268 333	286,0 [M+H-15] (100%)	284,4 [M-H- 15] (100%)	300	NI
5	5,21	275 333	315,1 [M+H] (10%) 300,2 [M+H-15] (20%) 282,1 [M+H-33] (100%) 254,2 1 [M+H-61] (70%)	298,5 [M-H- 15] (100%) 283,0 [M-H- 30] (60%)	314	NI
6	5,67	267 333	285,0 [M+H] (100%) 270,1 [M+H- 15] (30%)	268,1 [M-H-15] (100%)	284	NI

(%): abundância relativa; NI: não identificado

A substância 1, com Tr = 3,00 min (**Figura 10**), apresentou o espectro no UV característico de ácidos fenólicos ( $\lambda_{\text{máx}}$ : 235, ombro 295 e 327 nm). O espectro de fragmentação MS-MS no modo positivo do íon protonado [M+H]<sup>+</sup>, com relação massa/carga ( $m/z$ ) 517, apresentou pico base com  $m/z$  163,1, identificado como ácido clorogênico, após a eliminação neutra de uma molécula de água. O espectro MS-MS no modo negativo, correspondente à fragmentação do íon desprotonado [M-H]<sup>-</sup> com  $m/z$  515, mostrou um fragmento com  $m/z$  353,1 correspondente a perda de uma molécula de ácido clorogênico, enquanto os picos base com  $m/z$  191,0 e 173,0 correspondem ao ácido quínico o seu produto de desidratação. O fragmento com  $m/z$  179,3 demonstra a presença do ácido clorogênico na molécula. Através da intensidade dos fragmentos é possível identificar qual é o isômero do ácido dicafeoilquínico. Clifford e colaboradores (2005) afirmam que a intensidade baixa do pico com  $m/z$  179 (< 50%) e a ausência do íon com  $m/z$  335, formado pela perda de uma molécula de ácido clorogênico e água, é característica do isômero 3,5-di-O-cafeoilquinico, enquanto a observação de dados opostos aos acima relatados representa o

isômero 3,4-di-O-cafeoilquinico. Assim, com base nessas informações a substância pode ser identificada como o ácido 3,5-di-O-cafeoilquinico.

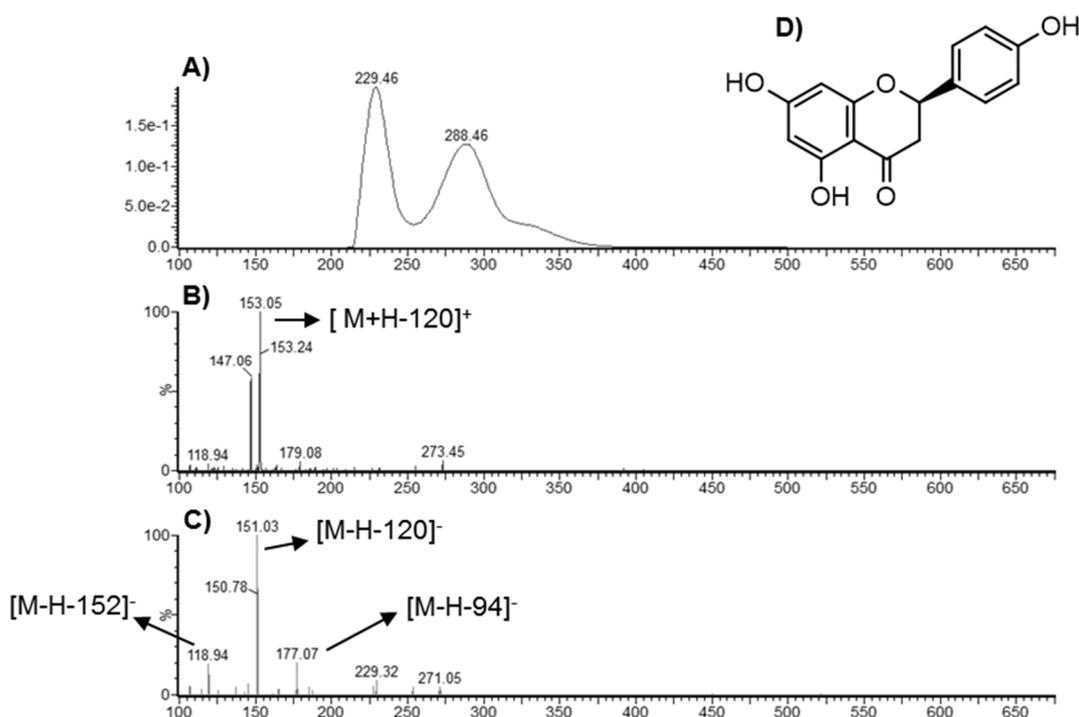
**Figura 10:** Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 1. A) UV característico de ácidos fenólicos. B) Padrão de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estrutura do 3,5-O-dicafeoilquinico.



A substância 2, com  $Tr = 4,14$  min, (**Figura 11**), apresentou espectro de UV característico de flavonoides, sendo típico de uma flavanona ( $\lambda_{\text{máx}}$ : 288 nm e ombro 330 nm). O espectro de fragmentação MS-MS no modo positivo do íon protonado  $[M+H]^+$  com  $m/z$  273, apresentou pico base com  $m/z$  153,1, correspondente ao anel A diidroxilado dos flavonoides após quebra <sup>1,3</sup>A do anel heterocíclico (**Figura 9, pág. 68**). O espectro MS-MS no modo negativo, correspondente à fragmentação do íon desprotonado  $[M-H]^-$  com  $m/z$  271, apresentou íon base com  $m/z$  151,0, que corresponde ao anel A diidroxilado de flavonoides e o pico com  $m/z$  119,0, correspondente ao anel B monoidroxilado,

após quebra nas posições <sup>1,3</sup>B do anel heterocíclico (**Figura 9, pág. 68**). O fragmento com  $m/z$  177,1 corresponde a perda do anel B (FABRE *et al*, 2001). Assim, a substância pode ser identificada como naringenina.

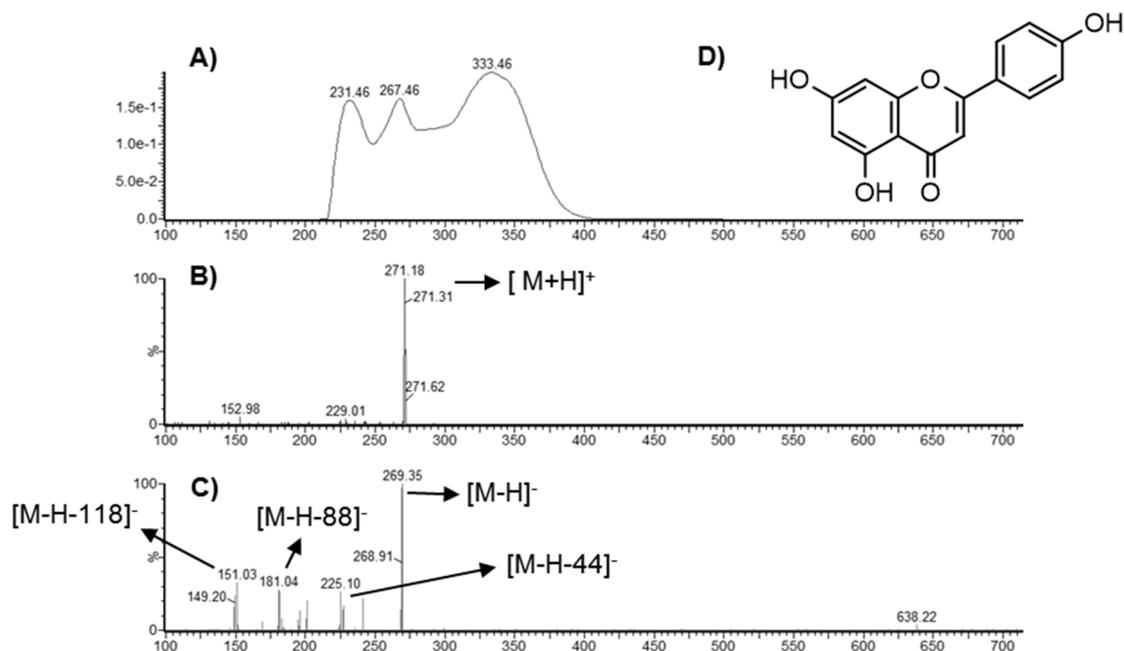
**Figura 11:** Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 2. A) UV característico de flavanona. B) Padrão de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estrutura da naringenina.



A substância 3, com  $Tr = 4,49$  (**Figura 12**), também apresentou espectro de UV característico para flavonoides, sendo típico de uma flavona ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 267 e 333 nm). O espectro de fragmentação MS-MS no modo positivo de fragmentação do íon protonado  $[M+H]^+$  com  $m/z$  271,2 mostrou como pico base o próprio íon molecular. O espectro MS-MS no modo negativo de fragmentação do íon desprotonado  $[M-H]^-$   $m/z$  269,2 também apresentou como pico base o íon molecular. Os fragmentos com  $m/z$  225,1 e 181,0 correspondem à eliminação de uma e duas moléculas de  $CO_2$ , respectivamente (FABRE *et al*, 2001). O fragmento com  $m/z$  151,0 corresponde ao anel A dihidroxilado após quebra do anel heterocíclico nas posições 1,3 (**Figura 9, pág. 68**) (FABRE *et al*, 2001).

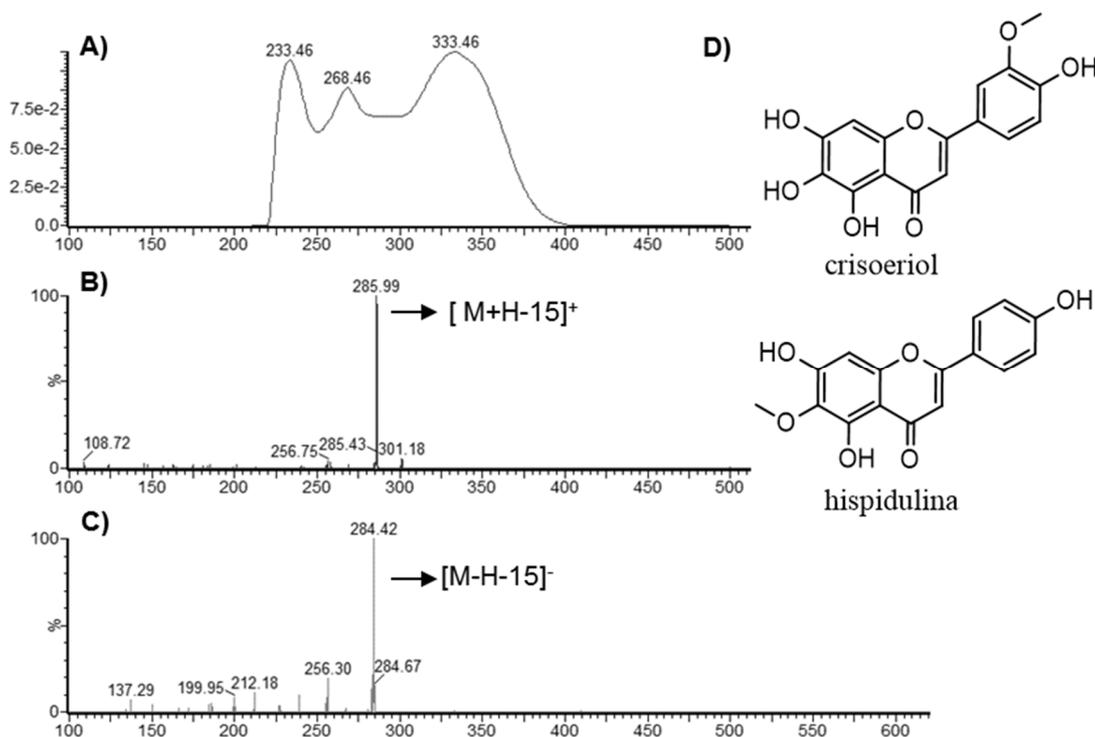
Com base nos fragmentos obtidos, a substância pode ser identificada como apigenina.

**Figura 12:** Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 3. A) UV característico de flavonas. B) Padrão de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estrutura da apigenina.



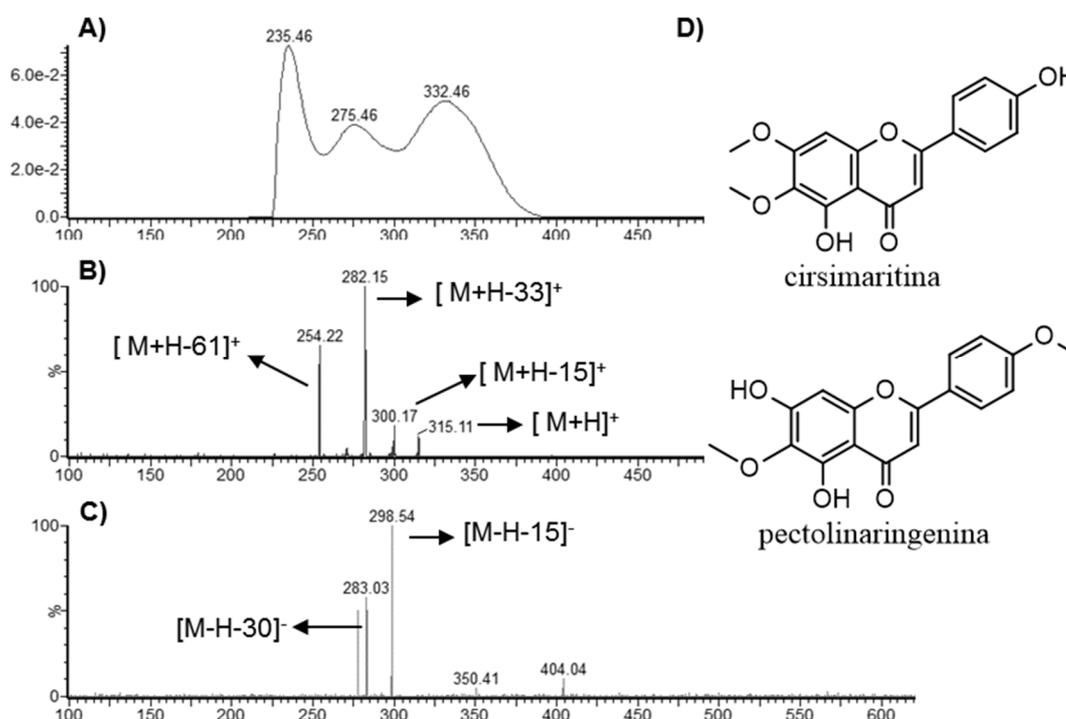
A substância 4, com  $Tr = 4,60$ , (**Figura 13**), apresentou espectro de UV característico de flavona ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 268 e 333 nm). O espectro de fragmentação MS-MS no modo positivo do íon protonado  $[M+H]^+$  com  $m/z$  301 mostrou que o pico base com  $m/z$  286,0 corresponde à eliminação de um grupo metila. O espectro MS-MS no modo negativo, correspondente à fragmentação do íon desprotonado  $[M-H]^-$  com  $m/z$  299 teve como pico base o íon com  $m/z$  284,4, que também corresponde à perda de um grupo metila. Não se observou as fragmentações típicas de flavonoides, relacionadas a quebra dos anéis A e B, portanto, não foi possível identificar inequivocamente a substância em relação aos isômeros possíveis, crisoeriol ou hispidulina.

**Figura 13:** Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 4. A) UV característico de flavonas. B) Padrão de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estruturas dos possíveis isômeros.



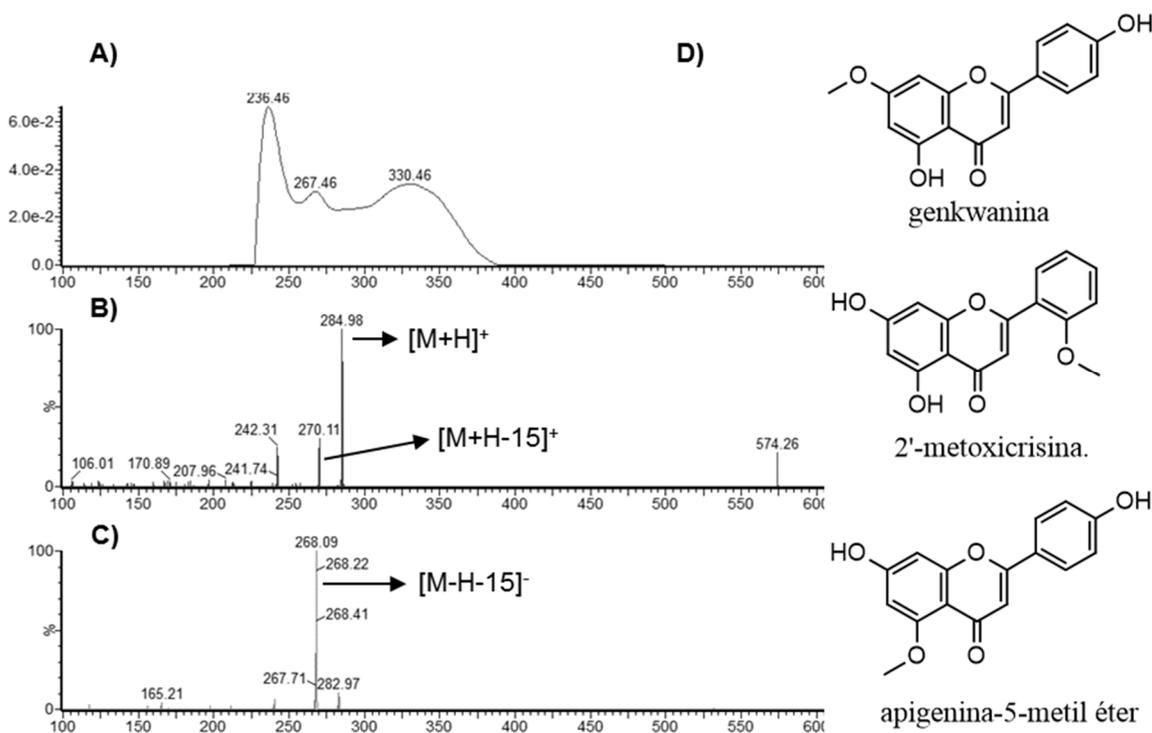
A substância 5, com  $Tr = 5,20$  (**Figura 14**), apresentou espectro de UV característico de flavona ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 275 e 333 nm). O espectro de fragmentação MS-MS no modo positivo, correspondente à fragmentação do íon protonado  $[M+H]^+$  com  $m/z$  315 teve como pico base o íon com  $m/z$  282,2, que corresponde à eliminação de um grupo metila e uma molécula de água. O fragmento com  $m/z$  300,2 corresponde à eliminação de uma molécula de água, enquanto o fragmento com  $m/z$  254,2 corresponde a perda de CO (SILVERSTEIN *et al*, 2006). O espectro MS-MS no modo negativo, correspondente à fragmentação do íon desprotonado  $[M-H]^-$  com  $m/z$  313, teve como pico base o íon com  $m/z$  298,5, correspondente à eliminação de um grupo metila. O fragmento  $m/z$  283,0 corresponde à eliminação de dois grupos metilas. Não foi possível identificar inequivocamente o composto em relação aos isômeros possíveis, cirsimaritina ou pectolinarigenina.

**Figura 14:** Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 5. A) UV característico de flavona. B) Padrão de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estruturas dos possíveis isômeros.



A substância 6 com  $Tr = 5,68$  (**Figura 15**), apresentou espectro de UV característico de flavona ( $\lambda_{m\acute{a}x}$ : 267 e 333 nm). O espectro de fragmentação MS-MS no modo positivo do íon protonado  $[M+H]^+$  com  $m/z$  285 apresentou pico base com  $m/z$  285,0 correspondente ao íon molecular e o pico com  $m/z$  270,17 que corresponde à eliminação de um grupo metila. O espectro MS-MS no modo negativo, de fragmentação do íon desprotonado  $[M-H]^-$   $m/z$  283 teve como pico base o íon com  $m/z$  268,1, que também corresponde à eliminação de um grupo metila. Não foi possível identificar inequivocamente o composto em relação aos isômeros possíveis, genkwanina, apigenina-5-metil éter ou 2'-metoxicrisina.

**Figura 15:** Espectros de UV e UPLC-ESI-MS/MS da substância 5. A) UV característico de flavona. B) Padrão de fragmentação no modo positivo. C) Padrão de fragmentação no modo negativo. D) estruturas dos possíveis isômeros.



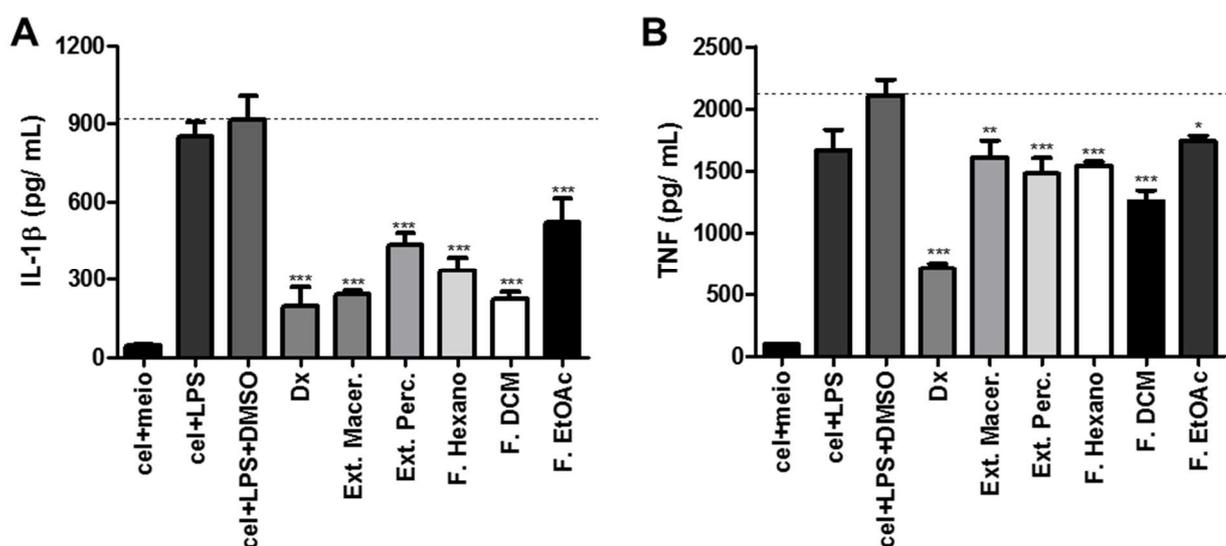
#### 5.4 Efeito *in vitro* dos extratos hidroetanólicos e frações de *B. calvescens* sobre mediadores pró-inflamatórios

O extrato hidroetanólico obtido por maceração assistida por ultrassom apresentou maior atividade inibitória na liberação das citocinas testadas em relação ao extrato hidroetanólico obtido por percolação exaustiva (**Figura 16**). A percolação exaustiva apresenta capacidade de extração maior, o que pode ser evidenciado pelo maior rendimento extrativo, no entanto, essa efetividade de extração não se correlacionou com a atividade do extrato resultante. Provavelmente os compostos com menor solubilidade em etanol têm menor importância na atividade do extrato.

Em relação as frações de *B. calvescens*, a fração DCM apresentou maior percentual de redução da liberação de IL-1 $\beta$  por células THP-1 estimuladas por LPS na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$ , promovendo  $75,64 \pm 3,14$  % de redução em relação ao grupo controle. Esta fração também apresentou redução significativa

na liberação de TNF, entretanto de forma muito mais modesta, com redução de  $40,62 \pm 4,25$  % na liberação da citocina (**Figura 16**).

**Figura 16:** Redução da liberação de mediadores pró-inflamatórios dos extratos hidroetanólicos e frações de *B. calvescens* na concentração de 20  $\mu\text{g/mL}$  em células THP-1 estimuladas com LPS (1  $\text{ng/mL}$ ). Os dados representam a média  $\pm$  DP em triplicata. \*\*\*  $p < 0,001$ , comparado com cel + LPS + DMSO: controle tratado com o veículo; cel + meio e cel + LPS: células não tratadas; DMSO: solvente (controle); Dx: dexametasona (0,2  $\mu\text{M}$ ); Extr. Macer: extrato maceração; Ext. Perc: extrato percolação; F. DCM: fração diclorometano; F. EtOAc: acetato de etila. A) IL-1 $\beta$ ; B) TNF.



A redução das citocinas pró-inflamatórias provavelmente está relacionada aos constituintes fenólicos da fração DCM, como flavonoides, uma vez que as substâncias responsáveis pelas atividades anti-inflamatórias relacionadas para as espécies de *Baccharis* são polifenólicas, como ácidos fenólicos, flavonoides e cumarinas (ABAD; BERMEJO, 2007).

Flavonoides apresentam potencial na terapêutica de doenças inflamatórias devido sua atuação na modulação da liberação de citocinas. Estudos desenvolvidos em macrófagos RAW 264,7 estimulados por LPS demonstram a

redução dos níveis de secreção de IL-6 e TNF por diferentes flavonoides como apigenina, crisina, diosmetina, kaempferol, luteolina, naringenina e quercetina, nas concentrações de 50 e 100 nM (MUELLER; HOBIGER; JUNGBAUER, 2010), cirsimarina, (25–100 µg/mL) (SHIN *et al*, 2017) e de iNOS, TNF, IL-1β e IL-6 por genkwanina, 50 µM, (GAO *et al*, 2014).

Na literatura existem diversos artigos demonstrando a atividade *in vivo* de flavonoides. Em diferentes modelos empregando camundongos, a apigenina (<10 µM) mostrou ação inibitória na produção de NO e prostaglandina E2 (PGE2), inibindo a expressão de iNOS e COX-2, respectivamente (PRINCE VIJEYA SINGH *et al*, 2004). Leal e colaboradores (2009) descreveram que em ratos e camundongos pré-tratados com isocampferídio (12,5, 25 e 50 mg/kg), por via oral ou intraperitoneal, ocorreu a redução do edema da pata induzido por carragenina, PGE2, histamina ou serotonina. O isocampferídio também inibiu o acúmulo de células inflamatórias no edema de pata e a migração de leucócitos e neutrófilos na cavidade peritoneal, no modelo de carragenina.

### **5.5 Refracionamento da fração DCM de *B. calvescens***

A fração DCM (14,28 g) mostrou-se constituída por flavonoides, após análises detalhada do perfil cromatográfico que apresentou vários picos com espectros de UV característicos desta classe de metabólitos especiais. Desta forma, foi realizada a extração seletiva desses compostos da fração DCM. A estratégia utilizada baseou-se na solubilização dos flavonoides em solução aquosa básica. Os grupos fenólicos presentes em flavonoides se desprotonam em soluções aquosas com pH básico, desta forma essas substâncias podem ser extraídas seletivamente de um solvente orgânico imiscível em água (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTO, 2017). Portanto, foi realizada uma extração líquido-líquido entre diclorometano e uma solução aquosa de NaOH 5% (p/v).

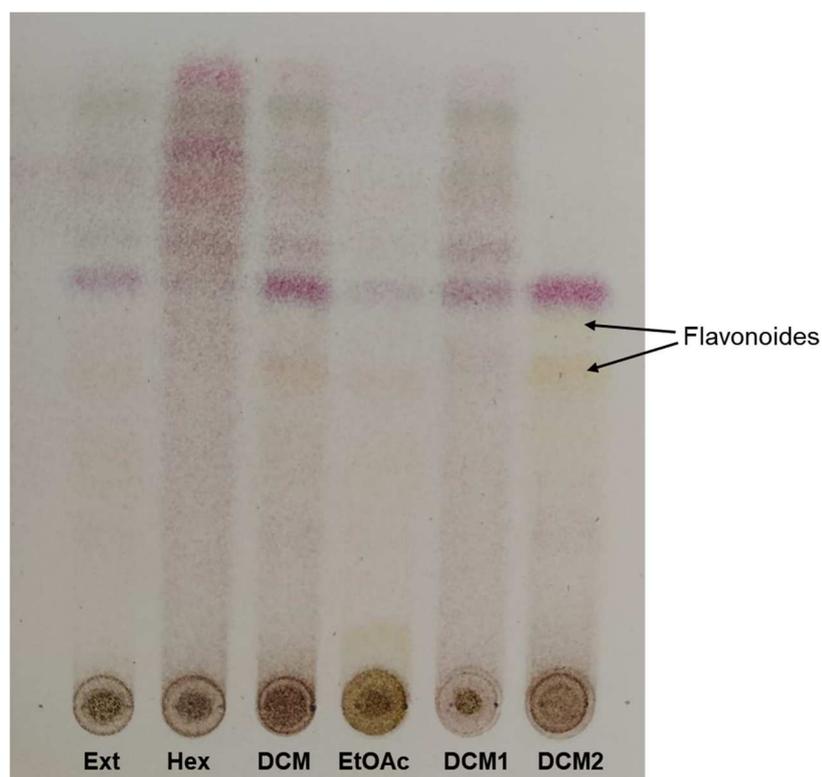
Após realização desta extração líquido-líquido seletiva, obteve-se uma fração em diclorometano, rica em substâncias não fenólicas, que após secagem do solvente foi denominada de DCM1 (11,16 g), e uma fração aquosa rica em flavonoides. A fração aquosa foi acidificada, para a reprotonação das hidroxilas

fenólicas, assim as moléculas neutras puderam ser novamente extraíveis com solventes orgânicos lipofílicos. A solução acidificada rica em flavonoides protonados foi submetida a partição com diclorometano. Após secagem do solvente, a fração foi denominada DCM2 (2,93 g).

Após os processos extrativos, obteve-se um rendimento de 78% para a fração DCM1, o que demonstra a presença majoritária de substâncias não fenólicas na fração DCM original.

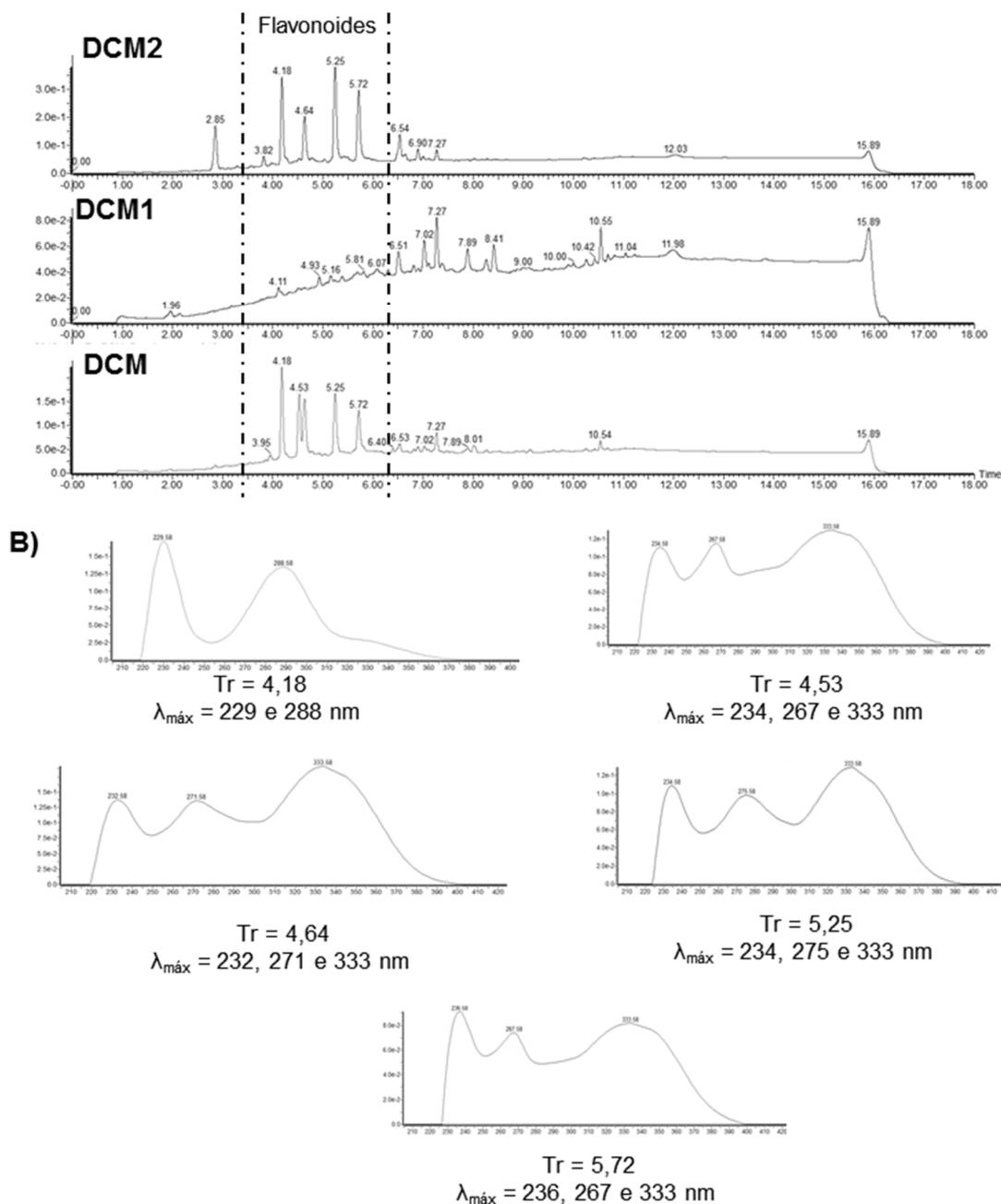
Foi realizada uma análise por CCD de sílica gel para a avaliação preliminar dos perfis cromatográficos das frações obtidas DCM1 e DCM2, em comparação com o extrato hidroetanólico e as frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila (**Figura 17**).

**Figura 17:** Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel para o extrato hidroetanólico e as frações de *B. calvescens*. Condições cromatográficas: eluente tolueno: acetona (8:2) acidificada 1% com ácido acético; revelador: anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento. Ext: extrato hidroetanólico; Hex, fração hexânica; DCM, fração diclorometânica e EtOAc, fração em acetato de etila.



A extração em solução alcalina se mostrou eficiente para a extração seletiva dos flavonoides. Observa-se que na CCD, as manchas relativas aos flavonoides ficaram concentradas na fração DCM2 (manchas amarelas, com  $R_f$ 's de 0,46 e 0,51). Esse resultado também foi confirmado por análises empregando UPLC-ESI-MS (**Figura 18**).

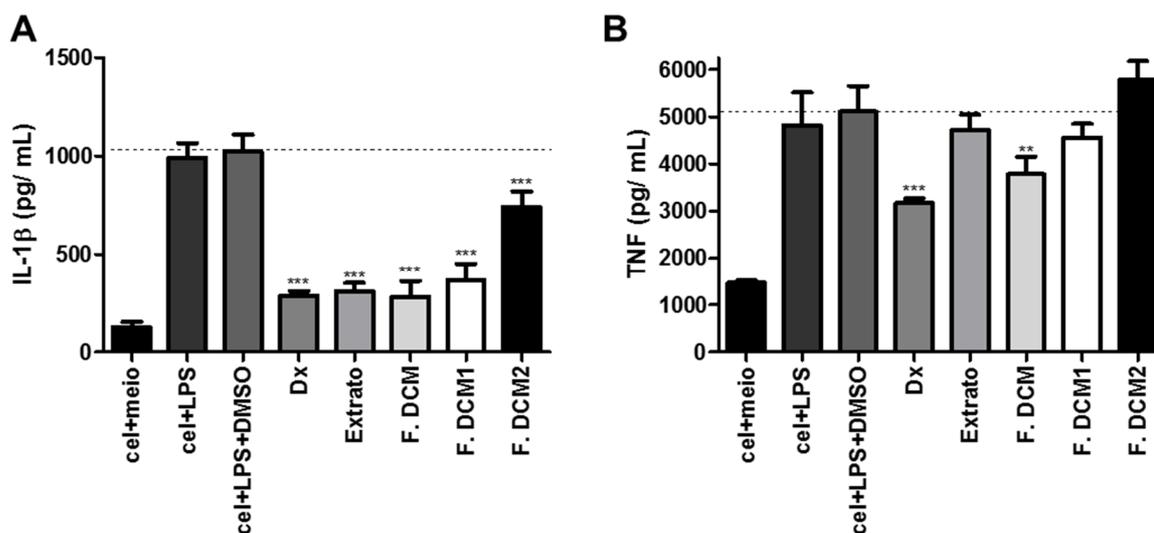
**Figura 18:** Perfil cromatográfico das frações DCM, DCM1 e DCM2. A) Separação dos flavonoides após a partição em meio alcalino. B) Espectro de UV dos picos majoritários de DCM2, característicos de flavonoides. Para condições cromatográficas ver item 4.10.



### 5.6. Efeito *in vitro* das frações DCM1 e DCM2 de *B. calvescens* sobre mediadores pró-inflamatórios

Em relação a redução da produção da citocina IL-1 $\beta$ , a fração DCM1 (redução de 64,17  $\pm$  8,39 %) foi mais ativa em comparação com a fração DCM2 (redução de 27,46  $\pm$  7,72 %) e não houve diferença significativa em relação a fração DCM original (redução de 72,55  $\pm$  8,01 %). Assim, pode-se concluir que constituintes não fenólicos apresentam maior atividade em relação aos constituintes fenólicos. Esse resultado foi inicialmente inesperado, uma vez, que existem vários relatos na literatura demonstrando relevante atividade anti-inflamatória de flavonoides. Nota-se também, que as duas frações obtidas, DCM1 e DCM2 não reduziram significativamente a liberação da citocina TNF (**Figura 19**).

**Figura 19:** Redução da liberação de mediadores pró-inflamatórios dos extratos hidroetanólicos e frações DCM, DCM1 e DCM2 de *B. calvescens* na concentração de 20  $\mu$ g/mL em células THP-1 estimuladas com LPS (1 ng/mL). Os dados representam a média  $\pm$  DP em triplicata. \*\*\*  $p < 0,001$ , comparado com cel + LPS + DMSO: controle tratado com o veículo; cel + meio e cel + LPS: células não tratadas; DMSO: solvente (controle); Dx: dexametasona (0,2  $\mu$ M); F. DCM: fração diclorometano. A) IL-1 $\beta$ ; B) TNF.

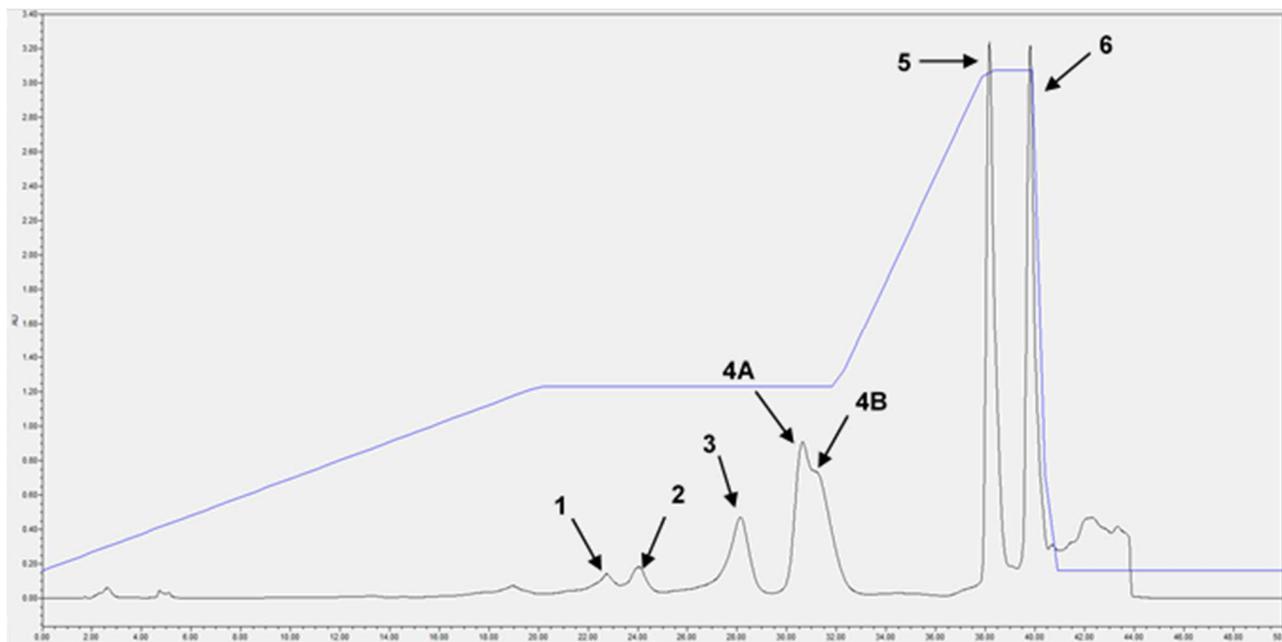


### 5.7 Refracionamento da fração DCM2 de *B. calvescens* por HPLC em escala preparativa

O isolamento das substâncias correspondentes aos quatro picos majoritários presentes na fração DCM2 (362,9 mg de massa injetada) foi realizado por HPLC em escala preparativa. As condições cromatográficas foram otimizadas visando permitir uma melhor separação dos picos. Foram realizadas 12 injeções e a coleta dos picos foi feita de forma manual.

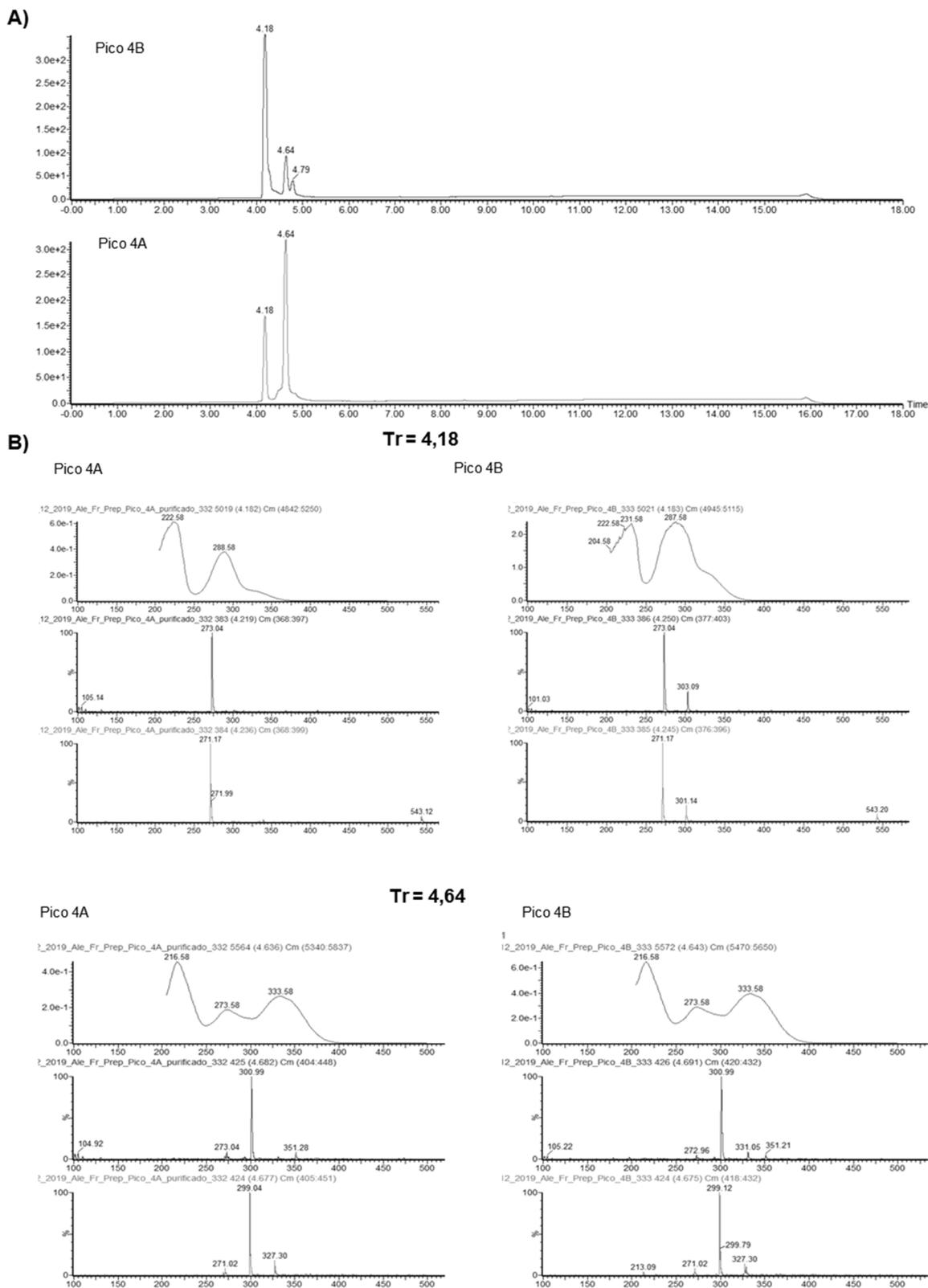
O perfil cromatográfico obtido após a injeção de amostra DCM2 no aparelho de HPLC em escala preparativa resultou na obtenção de 7 picos (**Figura 20**). Os picos 1 (0,9 mg) 2 (6,3 mg) e 3 (7,1 mg) não apresentaram picos majoritários após análise por UPLC-ESI-MS e não foram submetidos a purificações.

**Figura 20:** Perfil cromatográfico da fração DCM2 de *B. calvescens* e gráfico do gradiente de eluição utilizado no HPLC em escala preparativa. Para condições cromatográficas ver item 4.11



Os picos 4A e 4B, não puderam ser separados nas condições cromatográficas utilizadas. Após análises no UPLC-ESI-MS, observou que se referem a uma mistura de flavonoides (**Figura 21**).

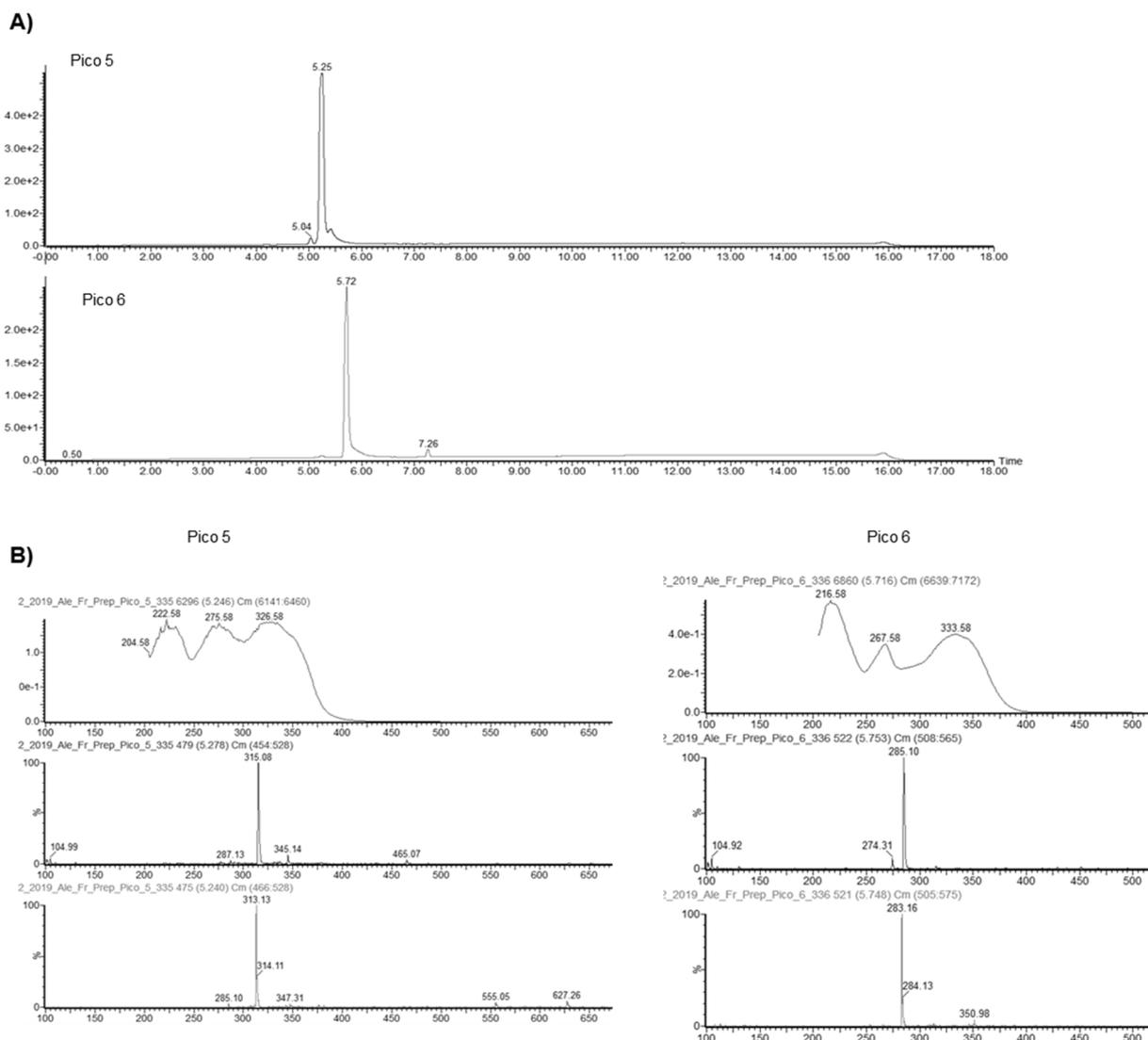
**Figura 21:** Perfil cromatográfico dos picos 4A e 4B. A) Espectro DAD. B) Espectro de UV e padrões de fragmentação no modo positivo e negativo. Para condições cromatográficas ver item 4.10



Os tempos de retenção e os perfis de fragmentação, tanto no modo positivo como no negativo, são compatíveis com os descritos na análise espectrométrica putativa por UPLC-ESI-MS/MS realizada anteriormente no extrato hidroetanólico (seção 5.3). Assim, os picos 4A e 4B correspondem a uma mistura de naringenina com um dos isômeros crisoeriol ou hispidulina.

Os picos majoritários foram os 5 e 6 com massas de 14,3 e 25,1 mg, respectivamente. Após análises no UPLC-ESI-MS, observou-se que o pico 5 se refere a uma flavona com massa molar de 314 g/mol, com estrutura putativa dos isômeros cirsimarina ou pectolinarigenina, identificados anteriormente, no extrato hidroetanólico por experimentos de massas sequencial. O pico 6 também se refere a uma flavona com massa molar de 284 g/mol com estrutura putativa dos isômeros 2-metoxicrisina, apigenina-5-metil éter ou genkwanina, também identificados anteriormente, na análise do extrato hidroetanólico por UPLC-ESI-MS-MS (**Figura 22**)

**Figura 22:** Perfil cromatográfico das substâncias 5 e 6 isoladas no HPLC em escala preparativa. A) Espectro DAD. B) Espectro de UV e padrões de fragmentação no modo positivo e negativo. Para condições cromatográficas ver item 4.10

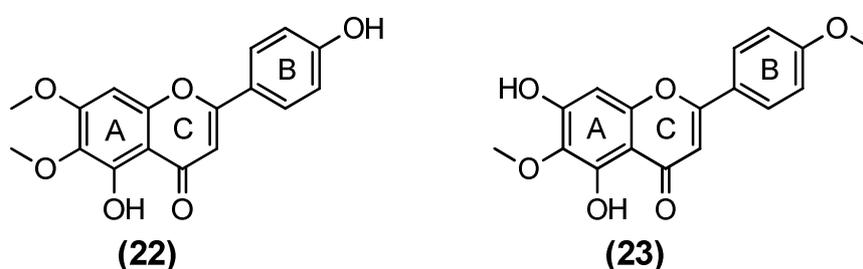


## 5.8 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

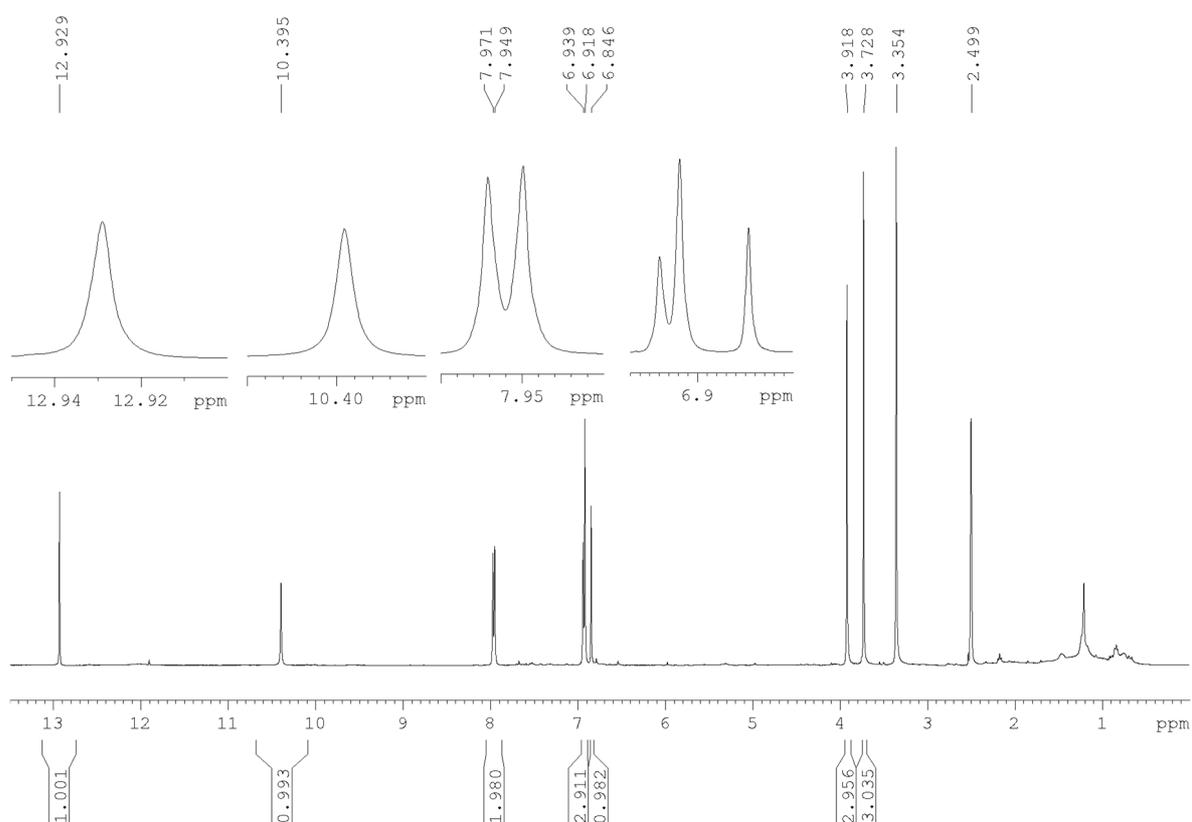
Os picos 5 e 6 foram isolados da fração DCM2 utilizando HPLC em escala preparativa. Os sólidos obtidos de cor amarelo escuro foram analisados por experimentos mono- e bidimensionais de RMN.

### 5.8.1 Elucidação estrutural da substância 5

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 23**) foi importante na identificação do isômero previamente sugerido por análises por UPLC-ESI-MS-MS. Pode-se observar ressonâncias referentes a seis prótons aromáticos, dois dupletos em  $\delta\text{H}$  6,93 e 7,96, com constante de acoplamento de 8,6 Hz, correspondentes a 2 hidrogênios cada, dois simpletos em  $\delta\text{H}$  6,85 e 6,92 ppm, correspondente a um hidrogênio cada. Esses dados são compatíveis com a presença de um anel aromático *para*-dissubstituído (anel B), de um anel aromático pentassubstituído (anel A) e de um núcleo flavônico (anel C). Pode-se também evidenciar dois simpleto em  $\delta\text{H}$  3,73 e 3,92 ppm correspondentes a três hidrogênios cada, sugerindo a presença de dois grupos metoxila. Os sinais relativos da ressonância dos prótons de duas hidroxilas também foram evidentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta\text{H}$  12,93 e 10,40 ppm), sendo a primeira com deslocamento químico sugestivo de hidroxila quelatogênica. Estes dados são condizentes com as estruturas dos dois isômeros com natureza flavônicas sugeridos pelas análises por UPLC-ESI-MS-MS (cirsimaritina (22) e pectolinarigenina (23)), que apresentam um padrão de oxigenação do anel B na posição 4' além de identificar a presença de um único hidrogênio (simpleto) no anel A.

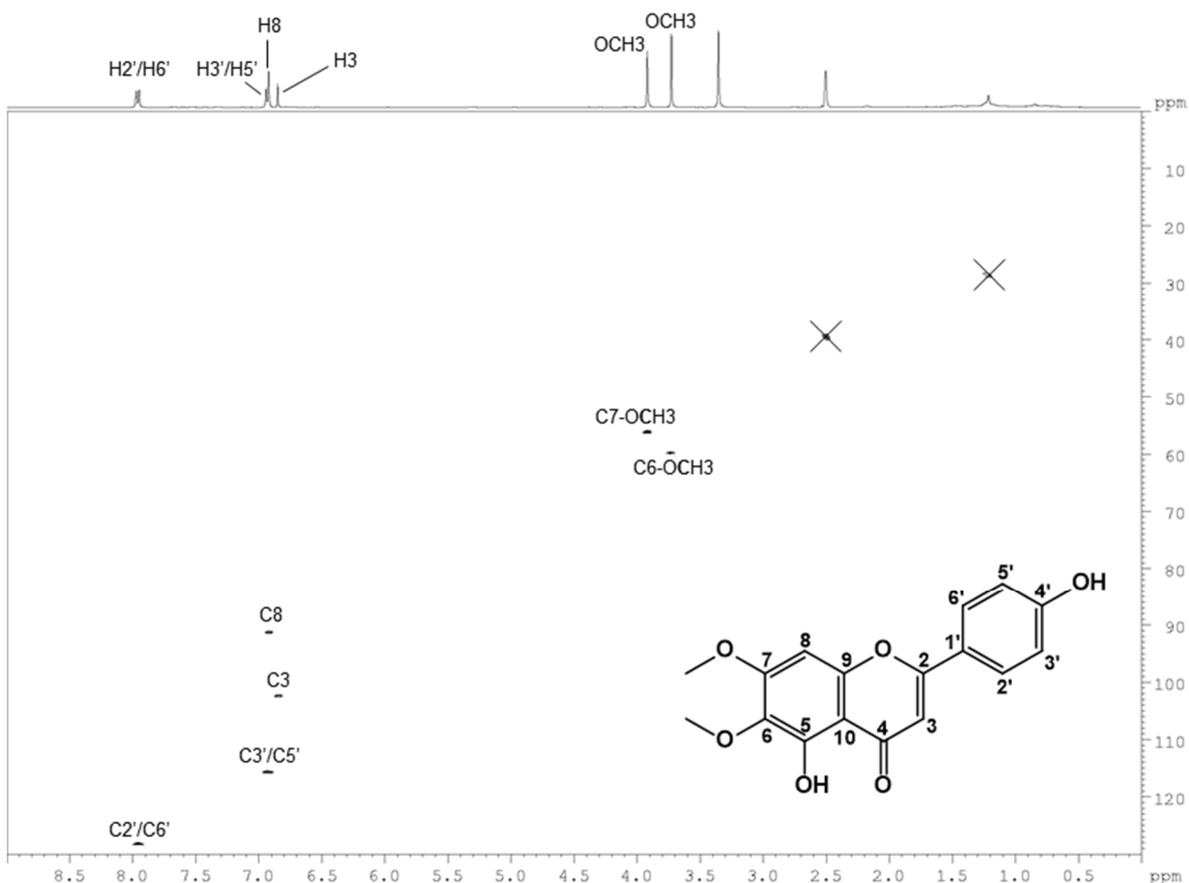


**Figura 23:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **5** em  $\text{d}_6\text{-DMSO}$  (400 MHz).



Devido a pequena quantidade das amostras obtidas, os deslocamentos químicos dos sinais de carbono foram obtidos indiretamente via experimentos de HSQC ( $J_1$ ) e HMBC ( $J_2$  e  $J_3$ ). A análise do mapa de contornos HSQC (**Figura 24**) indicou a correlação dos sinais dos hidrogênios do anel aromático (anel B) *para*-dissubstituído ( $\delta\text{H}$  6,93 e 7,96) com as ressonâncias dos carbonos em  $\delta\text{C}$  115,9 ppm e 128,4 ppm atribuídos a (C3' e C5') e (C2' e C6'), respectivamente. Referente ao anel aromático pentassubstituído (anel A) foi observada a correlação do sinal de hidrogênio ( $\delta\text{H}$  6,92) com o sinal de carbono ( $\delta\text{C}$  91,3 ppm) e pode também observar a correlação do hidrogênio ( $\delta\text{H}$  6,85) e o sinal de carbono atribuído a C-3 ( $\delta\text{C}$  102,4 ppm) localizado no anel C do núcleo flavônico.

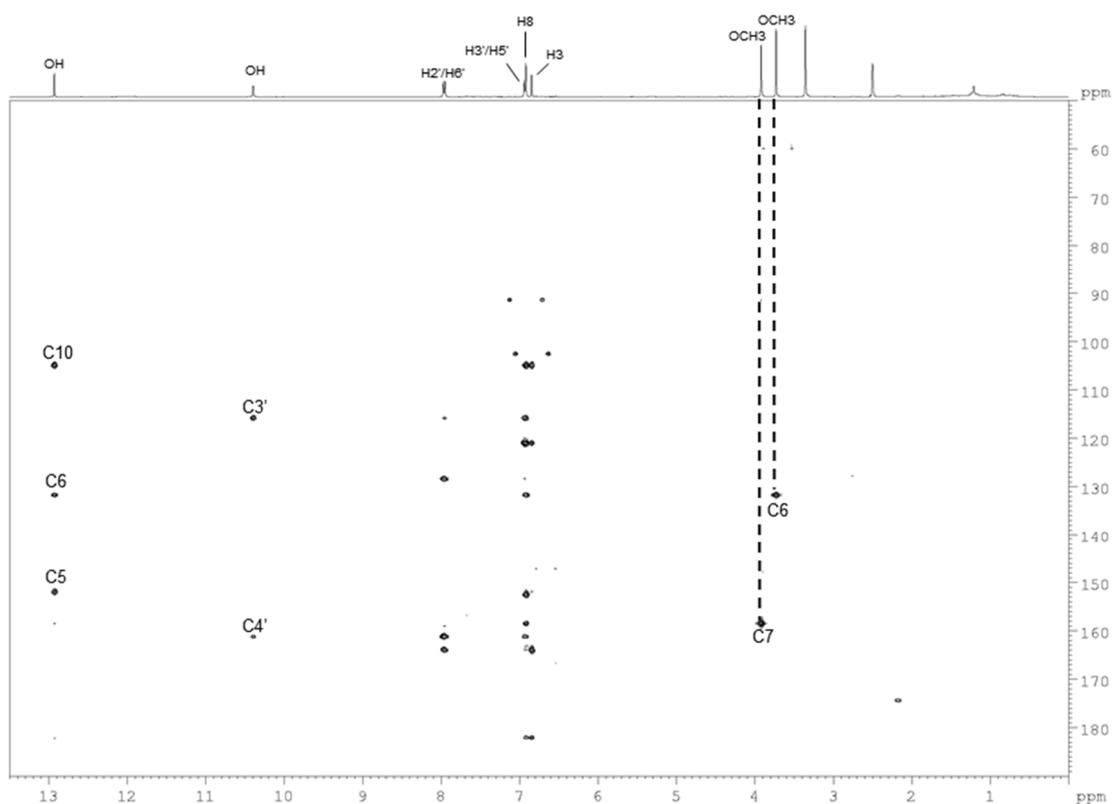
**Figura 24:** Mapa de contornos HSQC obtidos para substância **5** em d<sub>6</sub>-DMSO (400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C).



A conectividade entre <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (J<sub>2</sub> e J<sub>3</sub>) foram definidas a partir da análise do mapa de correlações heteronucleares HMBC (**Figuras 25 e 26**). Este experimento foi decisivo para determinação da estrutura da substância **5**. O sinal de hidrogênio referente a hidroxila quelatogênica ( $\delta$ H 12,93) apresentou correlações com os sinais atribuídos aos carbonos C5, C6 e C10 ( $\delta$ C 152,0; 131,8 e 105,0 ppm, respectivamente). Os sinais de hidrogênios dos grupos metoxilas ( $\delta$ H 3,73 e 3,92 ppm) apresentaram correlação com os sinais atribuídos aos carbonos C6 e C7 ( $\delta$ C 131,8 e 158,5 ppm). Estas correlações demonstram que os dois grupos metoxilas estão localizados em C6 e em C7 (**Figura 25, linhas pontilhadas**). Adicionalmente, o sinal de hidrogênio atribuído a hidroxila da posição 4' ( $\delta$ H 10,40 ppm) apresentou manchas de correlação com os sinais de carbono atribuídos a C3', C5' ( $\delta$ C 115,9 ppm) e C4' ( $\delta$ C 161,2 ppm).

Desta forma, pode-se concluir de forma inequívoca que a substância 5 corresponde a flavona cirsimaritina (22).

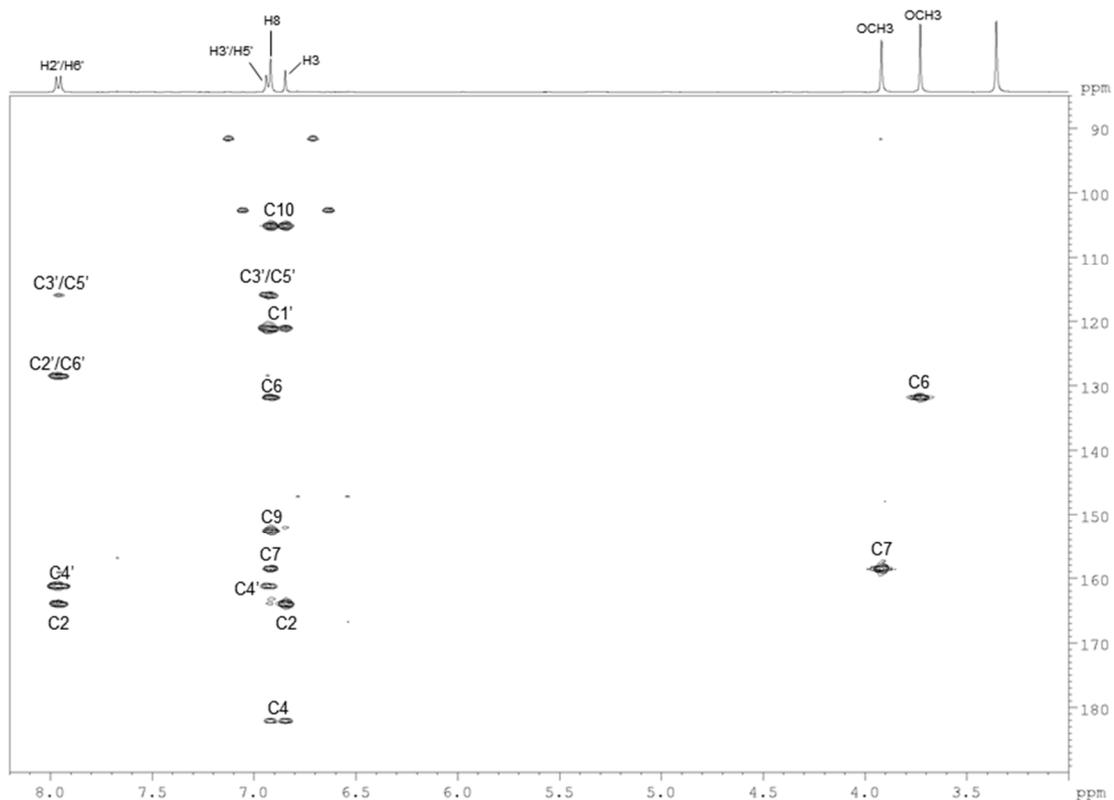
**Figura 25:** Mapa de contornos HMBC obtidos para substância 5 em d6-DMSO (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).



As demais correlações observadas confirmaram a estrutura química de 5. O sinal atribuído a H8 ( $\delta\text{H}$  6,92 ppm) apresentou manchas de correlação com os sinais de carbonos C6, C7, C9 e C10 ( $\delta\text{C}$  131,8; 158,5; 152,7 e 105,0 ppm, respectivamente) (**Figura 26**). Os sinais atribuídos aos hidrogênios H2' e H6' ( $\delta\text{H}$  7,96 ppm) apresentaram manchas de correlação com C3' e C5' ( $\delta\text{C}$  115,9 ppm), C4' ( $\delta\text{C}$  161,2 ppm) e C2 ( $\delta\text{C}$  164,0 ppm), enquanto os sinais de hidrogênios atribuídos a H3' e H5' ( $\delta\text{H}$  6,93 ppm) apresentaram manchas de correlação com os sinais do C1' ( $\delta\text{C}$  120,8 ppm) e C4' ( $\delta\text{C}$  161,2 ppm). O sinal de hidrogênio atribuído a H3 ( $\delta\text{H}$  6,85 ppm) apresentou manchas de correlação com os sinais

de carbonos C2, C4, C10, C1' ( $\delta_C$  164,0; 182,1; 105,0 e 120,8 ppm, respectivamente) (**Figura 26**).

**Figura 26:** Seção expandida da região de hidrogênios aromáticos do mapa de contornos HMBC obtido para substância **5** em d6-DMSO (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).



Os dados de deslocamento químico de hidrogênio e carbono para a cirsimarina estão resumidos na **Tabela 13**. Adicionalmente, os dados obtidos no presente trabalho puderam ser comparados com aqueles obtidos por Liu e colaboradores (1992). Os valores de deslocamentos químicos de todos os hidrogênios e carbonos apresentam grande similaridade.

**Tabela 14:** Espectro de RMN de **5** “cirsimaritina”, obtidos em d6-DMSO (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) comparados com dados da literatura utilizando o mesmo solvente.

Posição	5 “cirsimaritina” (Experimental)		Cirsimaritina (Literatura)	
	$\delta\text{H}$ (J em Hz)	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (J em Hz)	$\delta\text{C}$
2	-	164,0 C	-	164,0 C
3	6,85 s	102,4 CH	6,82 s	102,6 CH
4	-	182,1 C	-	182,0 C
5	-	152,0 C	-	152,5 C
6	-	131,8 C	-	131,9 C
7	-	158,5 C	-	158,5 C
8	6,92 s	91,3 CH	6,90 s	91,5 CH
9	-	152,7 C	-	152,5 C
10	-	105,0 C	-	105,0 C
1'	-	120,8 C	-	121,0 C
2'	7,96 d (8,6)	128,4 CH	7,94 d (9,6)	128,3 CH
3'	6,93 d (8,6)	115,9 CH	6,92 d (9,6)	115,8 CH
4'	-	161,2 C	-	161,0 C
5'	6,93 d (8,6)	115,9 CH	6,92 d (9,6)	115,8 CH
6'	7,96 d (8,6)	128,4 CH	7,94 d (9,6)	128,3 CH
HO-C5	12,93 s	-	12,91 s	-
CH <sub>3</sub> O-C6	3,73 s	59,8 CH	3,72 s	59,9 CH
CH <sub>3</sub> O-C7	3,92 s	56,3 CH	3,90 s	56,3 CH
HO-C4'	10,40 s	-	-	-

Fonte: (LIU *et al*, 1992)

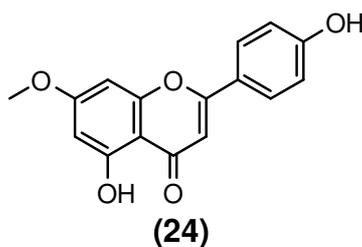
A cirsimaritina já foi isolada em outras espécies do gênero *Baccharis*, como *B. rufescens* (SIMIGIORTIS *et al*, 2003), *B. genistelloides* (KUROYANAGI *et al*, 1985), *B. tricuneata* (WAGNER *et al*, 1978), *B. conferta* (WEIMANN *et al*, 2002), *B. trimera* (NAKASUGI; KOMAI, 1998), *B. articulata*, *B. concata*, *B. eleagnoides* e *B. vaccioides* (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Shin e colaboradores (2017) relataram a atividade anti-inflamatória da cirsimaritina em estudo *in vitro* utilizando macrófragos RAW264.7 estimulados por LPS. A cirsimaritina isolada de *Cirsium japonicum* inibiu a produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas IL-6 e TNF, além de reduzir a expressão da enzima óxido nítrico sintase. Isso corrobora a atividade inibitória de liberação de citocinas pro-inflamatórias apresentada pelo extrato DCM de *B. calvescens*, demonstrando que a cirsimaritina pode ter um papel importante nessa atividade.

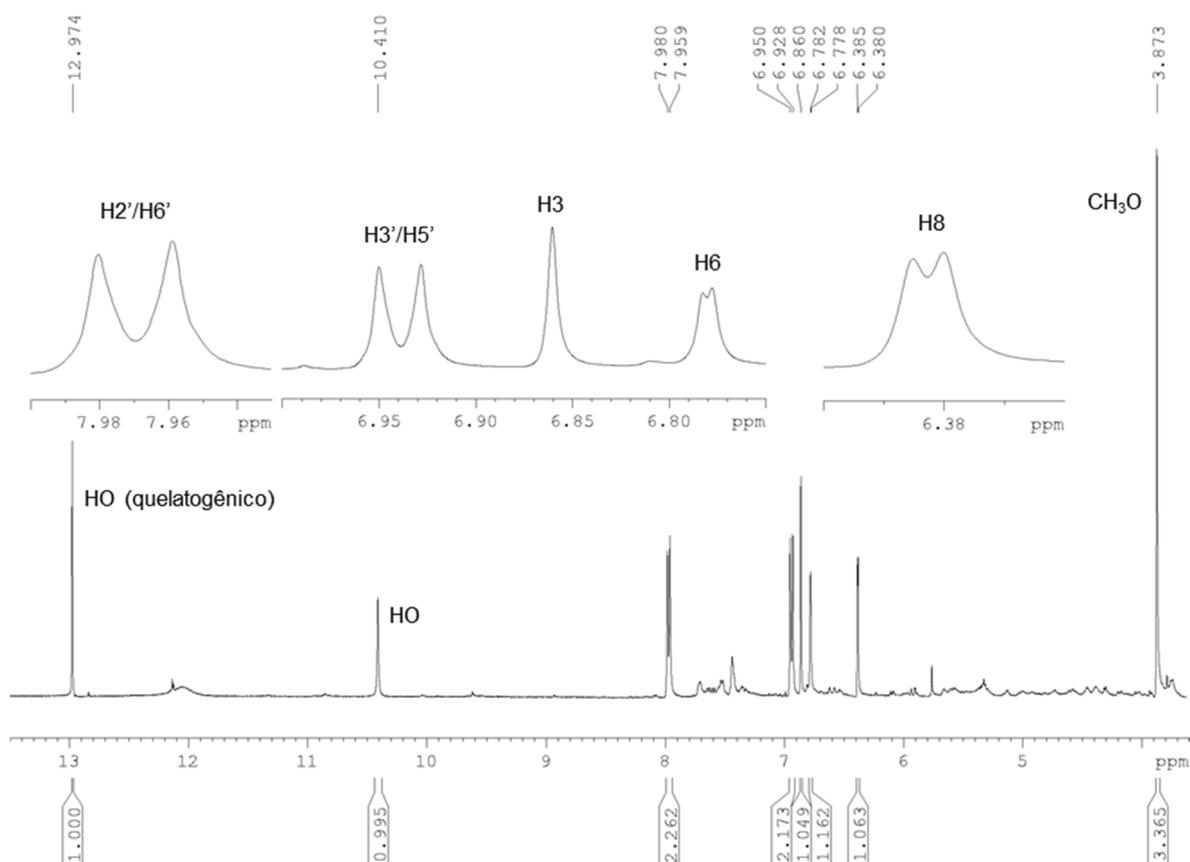
### 5.8.2 Elucidação estrutural da substância 6

Os espectros de massas obtidos por UPLC-MS para as substâncias dos picos 5 e 6 indicaram uma diferença de 30 unidades de massas entre essas substâncias (**Figura 22, pág. 85**). Essa diferença indica que a substância 5 é di-metoxilada, enquanto a substância 6 é mono-metoxilada. Os isômeros possíveis para a substância 6 descritos na análise putativa por UPLC-ESI-MS-MS foram: apigenina-5-metil éter, 2'-metoxicrisina e genkwanina (**Figura 15, pág. 75**).

Confirmando a similaridade estrutural entre as substâncias, os espectros de RMN obtidos para 6 foram semelhantes aos obtidos para 5. A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi decisiva para elucidação estrutural de 6 (**Figura 27**). O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de 6 evidenciou, de forma similar à substância 5, ressonâncias referentes a sete prótons aromáticos. Dois dupletos em  $\delta\text{H}$  6,94 e 7,97 com constante de acoplamento de 8,6 Hz, correspondentes a 2 hidrogênios cada, dois dupletos em  $\delta\text{H}$  6,38 e 6,78 com constante de acoplamento de 1,8 Hz, correspondentes a um hidrogênio cada e um simpleto em  $\delta\text{H}$  6,86, correspondente a um hidrogênio. Esses dados são compatíveis com a presença de um anel para-dissubstituído (anel B), um anel aromático tetrassubstituído (anel A) e de um núcleo flavônico (Anel C). Estes dados descartam a possibilidade da estrutura de 6 ser atribuída ao composto 2''-metoxicrisina, que não apresenta um anel B com padrão de substituição compatível. Além disso, um simpleto foi observado em  $\delta\text{H}$  3,87, correspondente a três hidrogênios, sugerindo a presença de um grupo metoxila. Os sinais relativos à ressonância dos prótons de duas hidroxilas também foram evidentes no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\delta\text{H}$  12,97 e 10,41 ppm). Desta forma, pode-se atribuir o padrão de oxigenação do anel B na posição 4', além de identificar a presença de dois hidrogênios meta posicionados no anel A da substância flavônica. Adicionalmente, o valor de deslocamento químico de um dos grupos hidroxila em  $\delta\text{H}$  12,97 é sugestivo da presença de uma hidroxila quelatogênica na posição C5. A presença de uma hidroxila na posição C-5 inviabiliza a possibilidade da substância 6 ser atribuída ao derivado apigenina-5-metil éter. Desta forma, a única estrutura condizente com os dados obtidos a partir do espectro de  $^1\text{H}$  RMN é a genkwanina. Os dados obtidos nos experimentos de HSQC e HMBC confirmam inequivocamente a estrutura de 6 como a genkwanina (24).



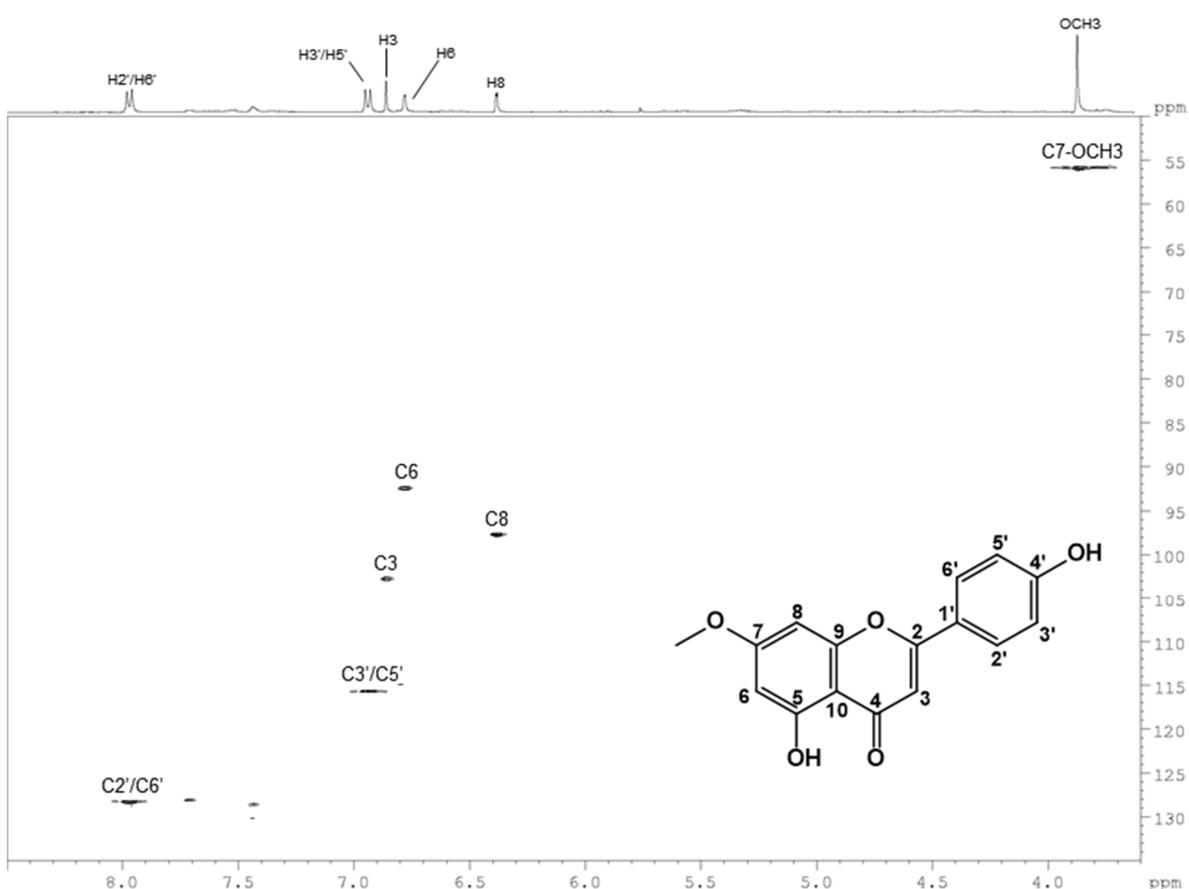
**Figura 27:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **6** em  $\text{d}_6\text{-DMSO}$  (400 MHz).



A análise do mapa de contornos HSQC (**Figura 28**) indicou a correlação dos sinais dos hidrogênios do anel aromático (anel B) *para*-dissubstituído ( $\delta\text{H}$  6,94 e 7,97 ppm) com as ressonâncias dos carbonos em  $\delta\text{C}$  115,6 ppm e 128,2 ppm atribuídos a (C3' e C5') e (C2' e C6'), respectivamente. No anel aromático tetrassubstituído (anel A) foi observada a correlação do sinal de hidrogênio atribuído a H6 ( $\delta\text{H}$  6,38) com o sinal de carbono ( $\delta\text{C}$  97,6 ppm) e o sinal de hidrogênio atribuído a H8 ( $\delta\text{H}$  6,78) com o sinal de carbono ( $\delta\text{C}$  92,3 ppm).

Adicionalmente, pode-se observar a correlação do sinal de H3 ( $\delta$ H 6,86) com o sinal de carbono ( $\delta$ C 102,7 ppm) localizado no anel C do núcleo flavônico e o sinal referente aos hidrogênios do grupo metoxila correlacionando com o carbono ( $\delta$ C 55,7 ppm).

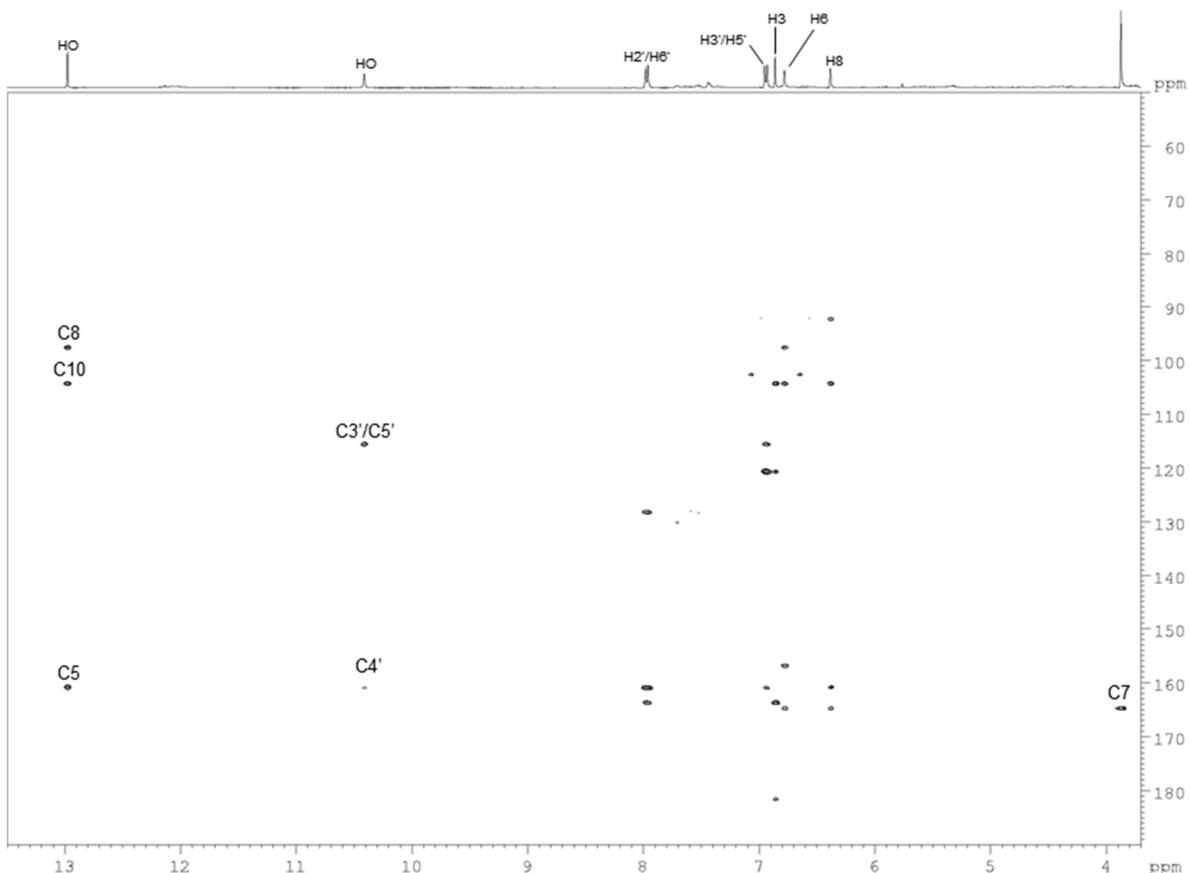
**Figura 28:** Mapa de contornos HSQC obtidos para substância **6** em d6-DMSO (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).



A conectividade entre  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $J_2$  e  $J_3$ ) foram definidas a partir da análise do mapa de correlações heteronucleares HMBC (**Figuras 29 e 30**). Este experimento confirmou a estrutura da flavona **6** como a genkwanina. O sinal de hidrogênio referente a hidroxila quelatogênica ( $\delta$ H 12,97) apresentou correlações com os sinais atribuídos aos carbonos C5, C8 e C10 ( $\delta$ C 156,8; 97,6 e 104,3 ppm, respectivamente). O sinal dos hidrogênios do grupo metoxila ( $\delta$ H 3,87 ppm) apresentou correlação com o sinal atribuído ao carbono C7 ( $\delta$ C

164,7ppm). Adicionalmente, o sinal de hidrogênio atribuído a hidroxila da posição 4' ( $\delta\text{H}$  10,41 ppm) apresentou manchas de correlação com os sinais de carbono atribuídos a C3', C5' ( $\delta\text{C}$  115,6 ppm) e C4' ( $\delta\text{C}$  160,9 ppm) (**Figura 29**).

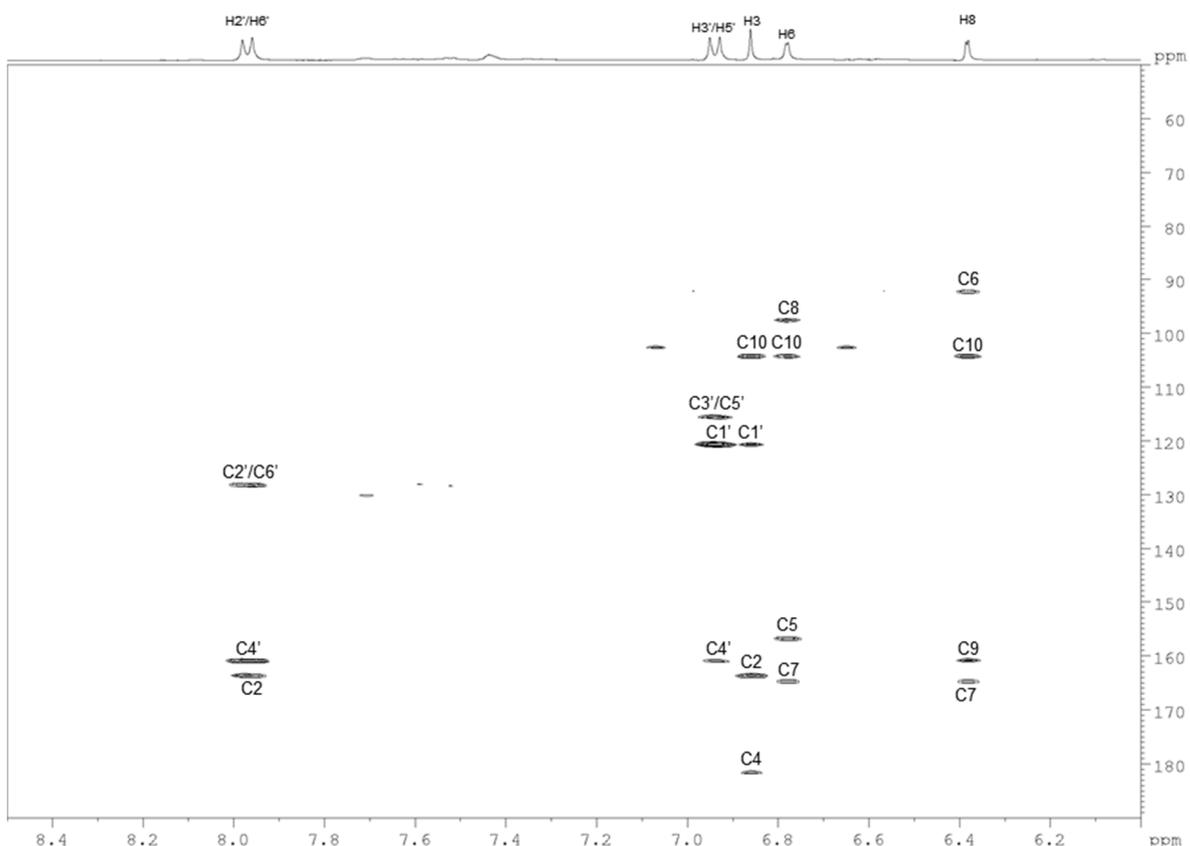
**Figura 29:** Mapa de contornos HMBC obtidos para substância **6** em d6-DMSO (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).



As demais correlações observadas confirmaram da mesma forma a estrutura química de **6**. O sinal atribuído a H6 ( $\delta\text{H}$  6,78 ppm) apresentou manchas de correlação com os sinais de carbonos C5, C7, C8 e C10 ( $\delta\text{C}$  156,8; 164,7; 97,6; 104,3 ppm, respectivamente) (**Figura 30**). O sinal atribuído a H8 ( $\delta\text{H}$  6,38 ppm) apresentou manchas de correlação com os sinais de carbonos C6, C7, C9 e C10 ( $\delta\text{C}$  92,3; 164,7; 160,9; 104,3 ppm, respectivamente). Os sinais atribuídos aos hidrogênios H2' e H6' ( $\delta\text{H}$  7,94 ppm) apresentaram manchas de correlação com C2' e C6' ( $\delta\text{C}$  128,2 ppm), C4' ( $\delta\text{C}$  160,9 ppm) e C2 ( $\delta\text{C}$  163,6 ppm), enquanto

os sinais de hidrogênios atribuídos a H3' e H5' ( $\delta$ H 6,94 ppm) apresentaram manchas de correlação com os sinais de C3' e C5' ( $\delta$ C 115,6 ppm), C1' ( $\delta$ C 120,7 ppm) e C4' ( $\delta$ C 160,9 ppm). O sinal atribuído a H3 ( $\delta$ H 6,86 ppm) apresentou manchas de correlação com os sinais de carbonos C2, C4, C10 e C1' ( $\delta$ C 163,6; 181,7; 104,3; 120,7 ppm), respectivamente (**Figura 30**).

**Figura 30:** Seção expandida da região de hidrogênios aromáticos do mapa de contornos HMBC obtido para substância **6** em d6-DMSO (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).



Os dados de deslocamento químico de hidrogênio e carbono para a substância **6** “genkwanina” estão resumidos na **Tabela 14**. Adicionalmente, os dados obtidos no presente trabalho puderam ser comparados com aqueles obtidos por Talzhanov e colaboradores (2005). Os valores de deslocamento químicos de todos os hidrogênios e carbonos apresentam grande similaridade.

**Tabela 15:** Espectro de RMN de **6** “genkwanina”, obtidos em d6-DMSO (400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) comparados com dados da literatura utilizando o mesmo solvente.

	6 “genkwanina” (Experimental)		Genkwanina (Literatura)	
Posição	$\delta\text{H}$ (J em Hz)	$\delta\text{C}$	$\delta\text{H}$ (J em Hz)	$\delta\text{C}$
2	-	163,6 C	-	164,0 C
3	6,86 s	102,7 CH	6,80 s	102,9 CH
4	-	181,7 C	-	181,7 C
5	-	156,8 C	-	157,1 C
6	6,78 d (1,8)	92,3 CH	6,36 d (2,2)	97,8 CH
7	-	164,7 C	-	165,0 C
8	6,38 d (1,8)	97,6 CH	6,74 d (2,2)	92,5 CH
9	-	160,9 C	-	161,1 C
10	-	104,3 C	-	104,6 C
1'	-	120,7 C	-	121,0 C
2'	7,94 d (8,6)	128,2 CH	7,94 d (8,8)	128,4 CH
3'	6,94 d (8,6)	115,6 CH	6,94 d (8,8)	115,8 CH
4'	-	160,9 C	-	161,1 C
5'	6,94 d (8,6)	115,6 CH	6,94 d (8,8)	115,8 CH
6'	7,94 d (8,6)	128,2 CH	7,94 d (8,8)	128,4 CH
HO-C5	12,9	-	12,93 s	-
CH <sub>3</sub> O-C7	3,87 s	55,7 CH	3,87 s	55,9 CH
HO-C4'	10,41 s	-	10,27 s	-

Fonte: (TALZHANOV *et al*, 2005)

Há relatos da presença de genkwanina em outras espécies do gênero *Baccharis*, *B. genistelloides* (KUROYANAGI *et al*, 1985), *B. trimera* (NAKASUGI; KOMAI, 1998), *B. articulata*, *B. eleagnoides*, *B. heterophylla*, *B. medulosa*, *B. notoserigila*, *B. patagonica*, *B. pedicellata*, *B. pteronioides*, *B. trinervis* e *B. vaccinioides* (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Sendo portanto uma flavona comum entre espécies desse gênero.

A atividade biológica da genkwanina foi relatada por Gao e colaboradores (2014) em estudo *in vitro* com macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS. A genkwanina reduziu a liberação dos mediadores pró-inflamatórios iNOS, TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6. Os autores também concluíram que essa flavona exerce seu efeito anti-inflamatório, principalmente, através da regulação da via miR-101 / MKP-1 / MAPK.

## 6 CONCLUSÕES

Análises por UPLC-ESI-MS demonstraram ter alta aplicabilidade em trabalhos de triagem, através da comparação rápida de seus perfis cromatográficos. Dos 34 extratos hidroetanólicos de espécies do gênero *Baccharis* obtidos, 13 foram selecionados para o estudo *in vitro*, utilizando esse método.

Os perfis cromatográficos dos extratos hidroetanólicos de folhas e caule das espécies do gênero *Baccharis* estudadas não apresentaram diferenças em sua composição. E observou-se a presença de compostos fenólicos, sendo identificadas 28 substâncias putativas.

Dos 12 extratos hidroetanólicos de diferentes espécies de *Baccharis* que tiveram a avaliação da atividade de inibição de produção de mediadores pró-inflamatórios (TNF e IL-1 $\beta$ ) testada perante células THP-1 estimuladas com LPS, o que apresentou o resultado mais promissor foi o de *B. calvescens*.

O estudo fitoquímico biomonitorado de *B. calvescens* demonstrou que o extrato diclorometânico possui promissora atividade anti-inflamatória e resultou no isolamento de duas flavonas a cirsimarina e genkwanina, substâncias inéditas para essa espécie.

## 7 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos, têm-se como perspectivas:

Finalizar a separação e elucidação estrutural dos flavonoides presentes na fração DCM2.

Isolar e elucidar a estrutura química dos constituintes presentes na fração DCM1 através de técnicas cromatográficas e espectrométricas usuais.

Avaliar o efeito das substâncias isoladas em modelo *in vitro* de inibição de produção de mediadores pró-inflamatórios (TNF e IL-1 $\beta$ ) em cultura de células THP-1 estimuladas com LPS.

Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato, frações diclorometânicas (DCM, DCM1 e DCM2) e substâncias isoladas em modelos *in vivo* de artrite gotosa induzida por MSU e de pleurisia induzida por LPS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (compositae): A review update. **Arkivoc**, v. 2007, n. 7, p. 76–96, 2007.

ABDULLAHA, M. *et al.* Discovery of Quinazolin-4(3H)-ones as NLRP3 Inflammasome Inhibitors Computational Design, Metal-Free Synthesis, and in Vitro Biological Evaluation.pdf. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 84, p. 5129–5140, 2019.

ALAMGEER *et al.* Phytochemicals targeting matrix metalloproteinases regulating tissue degradation in inflammation and rheumatoid arthritis. **Phytomedicine**, v. 66, n. November 2019, p. 153134, 2020.

ANGELIDIS, C. *et al.* Colchicine Pharmacokinetics and Mechanism of Action. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 659–663, 2018.

AZEVEDO, V. F. *et al.* Revisão crítica do tratamento medicamentoso da gota no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 4, p. 346–355, 2017.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431–441, 2005.

BATISTA, J. S.; WIBELINGER, L. M. Artrite gotosa no processo de envelhecimento humano. **Revista Kairós Gerontologia**, v. 14, n. 6, p. 123–134, 2011.

BERNSTEIN, N. *et al.* Antiinflammatory Potential of Medicinal Plants: A Source for Therapeutic Secondary Metabolites. **Advances in Agronomy**, v. 150, p. 131–183, 2018.

BITTENCOURT-MERNAK, M. I. *et al.* Prophylactic and therapeutic treatment with the flavonone sakuranetin ameliorates LPS-induced acute lung injury. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 312, n. 2, p. L217–L230, 2017.

BOLLER, S. *et al.* Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammatio. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 626–266, 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.

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

CHEN, G. Y.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 12, p. 826–837, 2010.

CHEN, L. *et al.* Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2018.

CHOY, E. H. S.; PANAYI, G. S. CYTOKINE PATHWAYS AND JOINT INFLAMMATION IN RHEUMATOID ARTHRITIS. **N Engl J Med**, v. 344, n. 12, p. 907–916, 2001.

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.

COELHO, M. G. P. *et al.* Anti-arthritic effect and subacute toxicological evaluation of *Baccharis genistelloides* aqueous extract. **Toxicology Letters**, v. 154, n. 1–2, p. 69–80, 2004.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703–723, 2014.

DE SOUZA, M. R. *et al.* Pharmacological basis for use of *Lychnophora trichocarpha* in gouty arthritis: Anti-hyperuricemic and anti-inflammatory effects of its extract, fraction and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 845–850, 2012.

EDDIE IP, W. K.; MEDZHITOV, R. Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation. **Nat Commun**, v. 6, p. 1–11, 2015.

FABRE, N. *et al.* Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass

Spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom** 2001, v. 12, p. 707–715, 2001.

FERRAZ-FILHA, Z. S. *et al.* Tabebuia roseoalba: In Vivo Hypouricemic and Anti-inflammatory Effects of Its Ethanolic Extract and Constituents. **Planta Medica**, v. 82, n. 16, p. 1395–1402, 2016.

FERRONATTO, R. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 224–230, 2007.

FLORÃO, A. *et al.* Essential oils from *Baccharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 6, p. 561–570, 2012.

FUKUDA, M. *et al.* Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 10, p. 1465–1468, 2006.

FÜRST, R.; ZÜNDORF, I. Plant-derived anti-inflammatory compounds: Hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

GAO, Y. *et al.* Genkwanin inhibits proinflammatory mediators mainly through the regulation of miR-101/MKP-1/MAPK pathway in LPS-activated macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.

GAUDÊNCIO, S. P.; PEREIRA, F. Dereplication: Racing to speed up the natural products discovery process. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 6, p. 779–810, 2015.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores: Características e funções fisiológicas. **Acta Medica Portuguesa**, v. 24, n. SUPPL.4, p. 967–976, 2011.

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.

GUSMAN, G. S. *et al.* Evaluation of the effects of some Brazilian medicinal plants on the production of TNF- $\alpha$  and CCL2 by THP-1 cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–11, 2015.

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.

KARAMANOU, M. *et al.* Isolating colchicine in 19th century: an old drug revisited. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, p. 654–658, 2018.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 12, p. 1871–1882, 2014.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206–220, 2005.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. **Cell.**, v. 160, n. 5, p. 816–827, 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Inflamação e Reparo. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. (Eds.). **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 910.

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, out. 1976.

KUROYANAGI, M. *et al.* Studies on the Constituents of *Baccharis genistelloides*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 11, p. 5075–5078, 1985.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- $\kappa$ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 1, n. 6, p. 1–10, 2009.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Effects of amburoside a and isokaempferide, polyphenols from *amburana cearensis*, on rodent inflammatory processes and myeloperoxidase activity in human neutrophils. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 104, n. 3, p. 198–205, 2009.

LIMA, G. R. DE M. *et al.* Database survey of anti-inflammatory plants in South America: a review. **International journal of molecular sciences**, v. 12, p. 2692–2749, 2011.

LIU, Y. L. *et al.* Isolation of potential cancer chemopreventive agents from eriodictyon californicum. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 3, p. 357–363, 1992.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1970.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.

MUELLER, M.; HOBIGER, S.; JUNGBAUER, A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 987–996, 2010.

NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal Plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 2560–2564, 1998.

NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 871–882, 2010.

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, 2016.

NOGUEIRA, N. P. A. *et al.* In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 513–522, 2011.

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

OMS, O. M. DE LA S. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. **Genebra**, p. 62, 2002.

OUYANG, W.; O'GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 871–891, 2019.

PALOMINO, D. C. AROLIN. T.; MARTI, L. C. AVALHEIR. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PARAMESWARAN, N.; PATIAL, S. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.**, v. 20, n. 2, p. 87–103, 2010.

PAUL, E. L. *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of baccharis trimera aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. **Inflammation**, v. 32, n. 6, p. 419–425, 2009.

PEDROSO, P. M. O. *et al.* Intoxicação por *Baccharis megapotamica* var. weirii em ovinos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 403–405, 2010.

PRINCE VIJEYA SINGH, J. *et al.* Protective role of Apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. **Phytomedicine**, v. 11, n. 4, p. 309–314, 2004.

REN, K.; TORRES, R. **Role of interleukin-1 $\beta$  during pain and inflammation** **Brain Research Reviews**, 2009.

REN, Q. *et al.* **Flavonoid fisetin alleviates kidney inflammation and apoptosis via inhibiting Src-mediated NF- $\kappa$ B p65 and MAPK signaling pathways in septic AKI mice** **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2020.

ROSA, C. DA; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311–318, 2011.

SANTOS, D. A. DOS *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 543–550, 2010.

SEDGER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators

of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 453–472, 2014.

SHIN, M. S. *et al.* Anti-inflammatory effects and corresponding mechanisms of cirsimaritin extracted from *Cirsium japonicum* var. *maackii* Maxim. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 14, p. 3076–3080, 2017.

SILVA FILHO, A. A. DA *et al.* In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 9, p. 1195–1199, 2004.

SILVA FILHO, A. A. DA *et al.* Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 63, n. 1–2, p. 40–46, 2008.

SILVA FILHO, A. A. DA *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.

SILVERSTEIN, R. *et al.* **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos, 2006.

SIMIGIORTIS, M. J. . *et al.* An ent-kaurene derivative from aerial parts from *Baccharis rufescens*. **The Journal of Argentine Chemical Society**, v. 91, n. 4–6, p. 109–116, 2003.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: Regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 89–102, 2010.

SU, X.-D. *et al.* Anti-inflammatory Potential of Saponins from *Aster tataricus* via NF- $\kappa$ B/ MAPK Activation.pdf. **Journal of Natural Products**, v. 82, p. 1139–1148, 2019.

TAGUCHI, L. *et al.* **A flavanone from *Baccharis retusa* (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF- $\kappa$ B, oxidative stress and metalloproteinases** *Respiratory Research*, 2015.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.

TALZHANOV, N. A. *et al.* Components of *Artemisia pontica*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 2, p. 178–181, 2005.

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. G.; BRIGHENTE, M. I. C.; PIZZOLATTI, M. G. GÊNERO *Baccharis* (ASTERACEAE): ASPECTOS QUÍMICOS, ECONÔMICOS E BIOLÓGICO. **Quim. 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.

WAGNER, H. *et al.* New Furanoid ent-Clerodanes from *Baccharis tricuneata*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 17, p. 3339–3345, 1978.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis, a thin layer chromatographic atlas**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 ( IL-1 ) Pathway. **Science Signaling**, v. 3, n. 105, p. 1–7, 2010.

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.

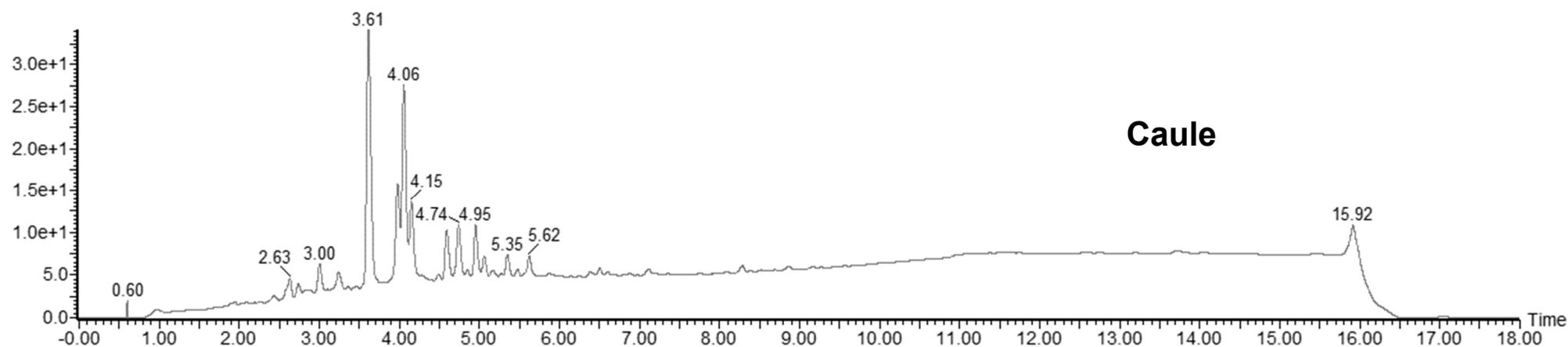
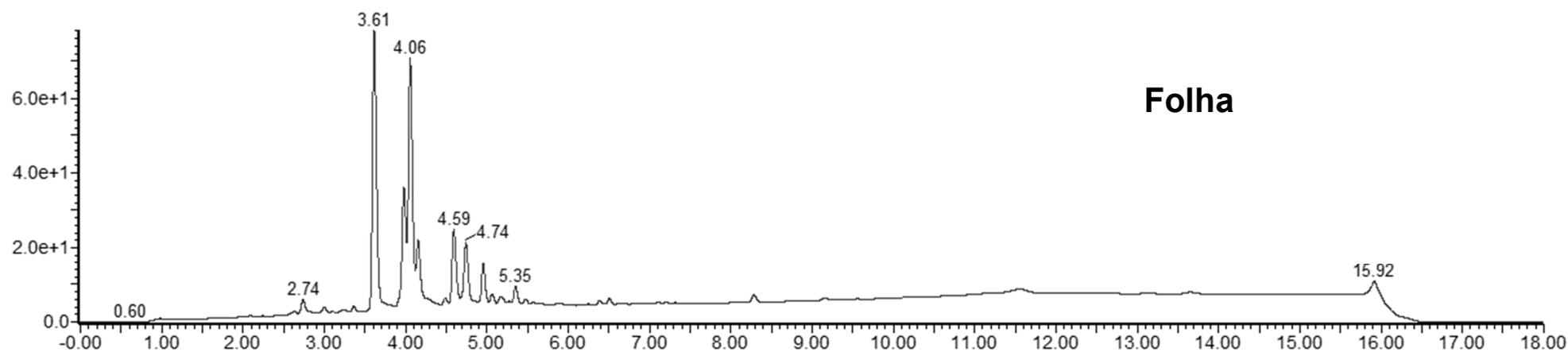
WEISS, T. *et al.* Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on activated human monocytic Cells: Inhibition of NF- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinase activation and of synthesis of proinflammatory cytokines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 1974–1982, 2004.

ZHAO, C. *et al.* NLRP3 inflammasome regulates Th17 differentiation in rheumatoid arthritis. **Clinical Immunology**, v. 197, n. September, p. 154–160, 2018.

ZUANAZZI, J. Â. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Eds.). . **FARMACOGNOSIA: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 209–233.

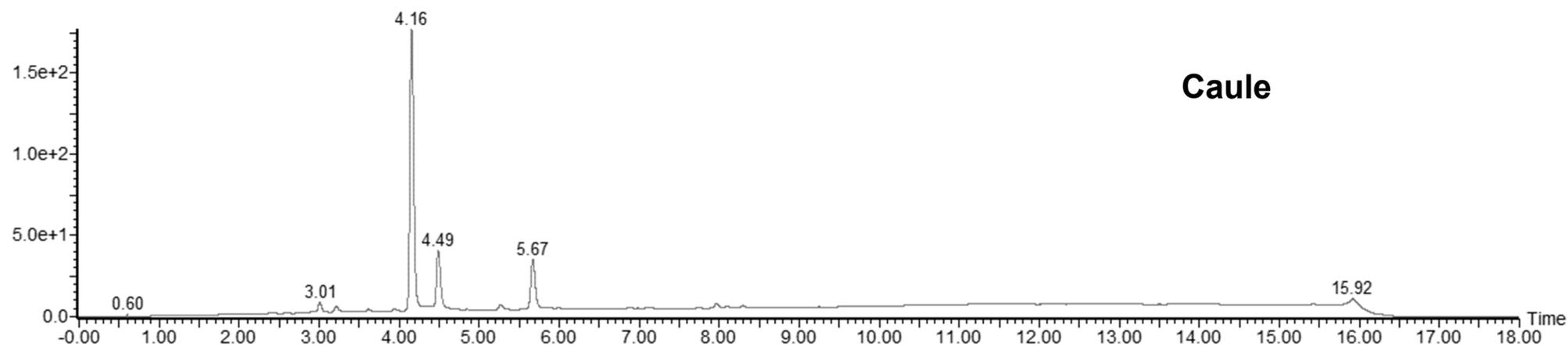
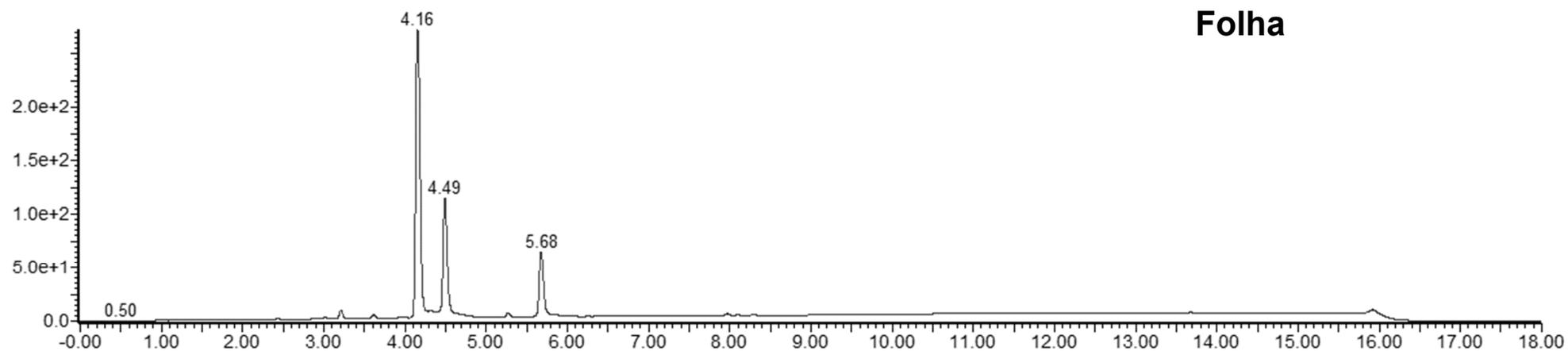
APÊNDICE A: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. reticularia*, Serra da Calçada (extratos 1 e 2)

### *Baccharis reticularia*



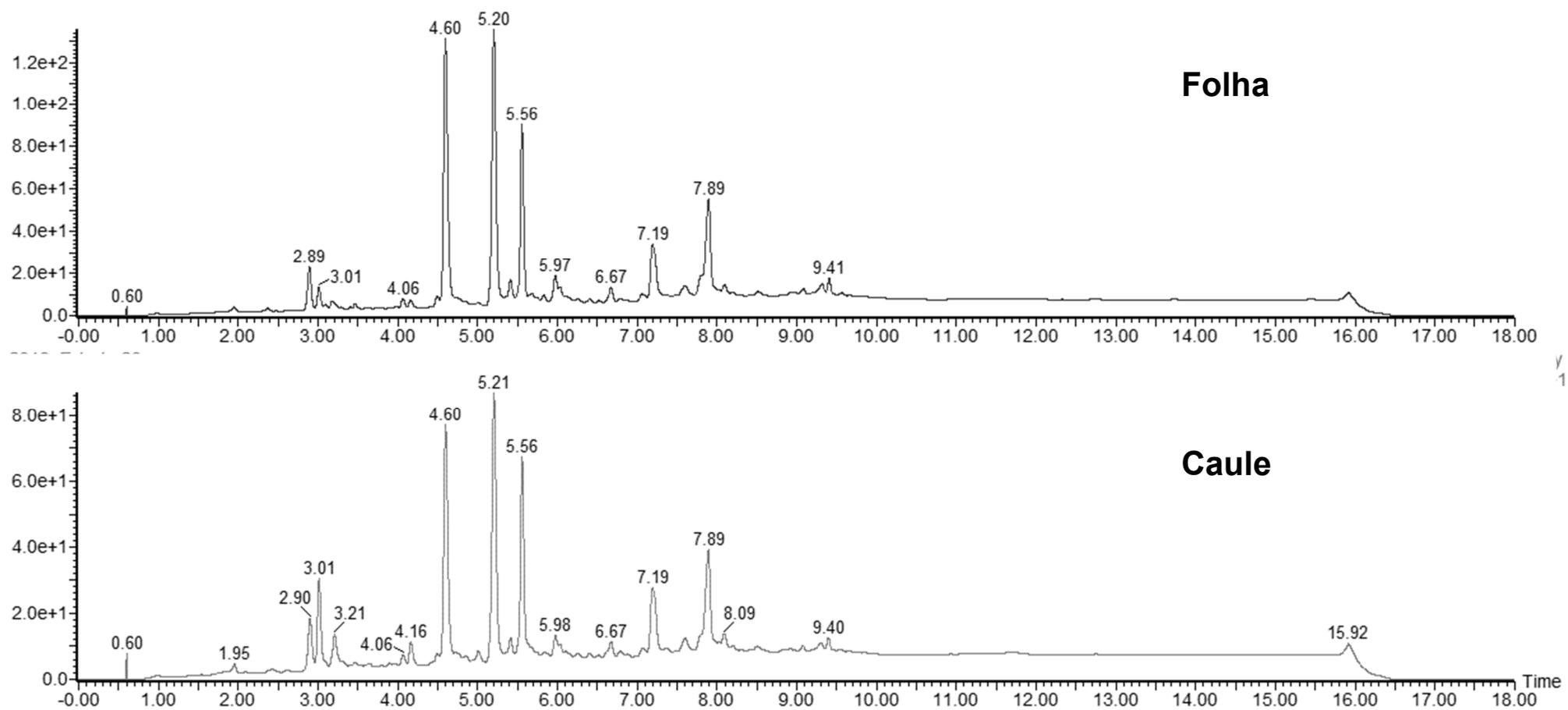
APÊNDICE B: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. retusa*, Serra da Calçada (extratos 3 e 4)

### *Baccharis retusa*



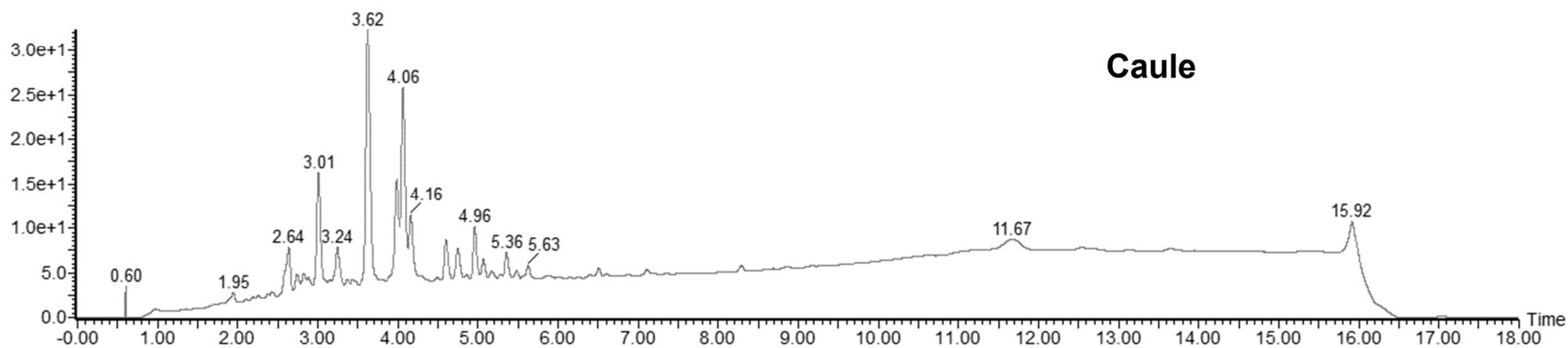
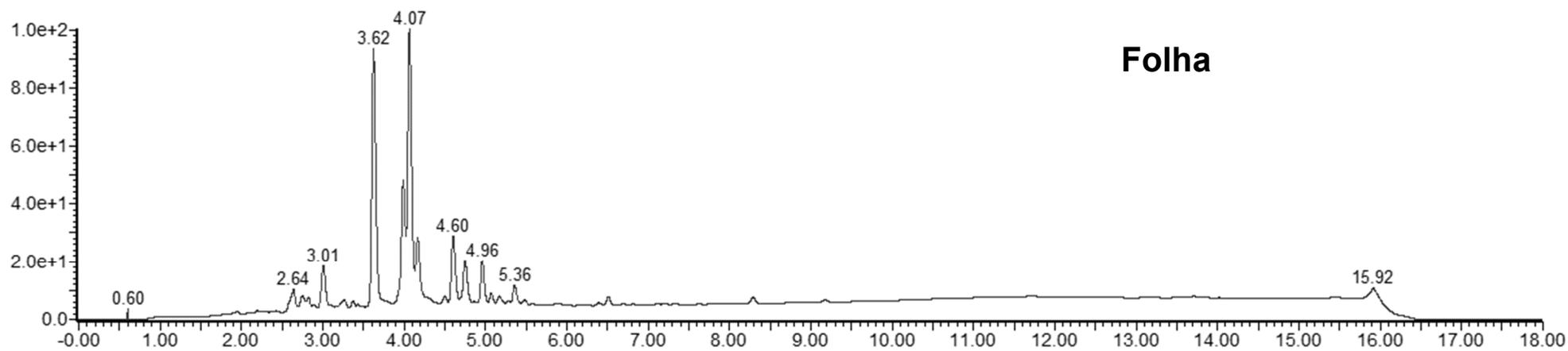
APÊNDICE C: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. brevifolia*, Serra da Calçada (extratos 5 e 6)

### *Baccharis brevifolia*



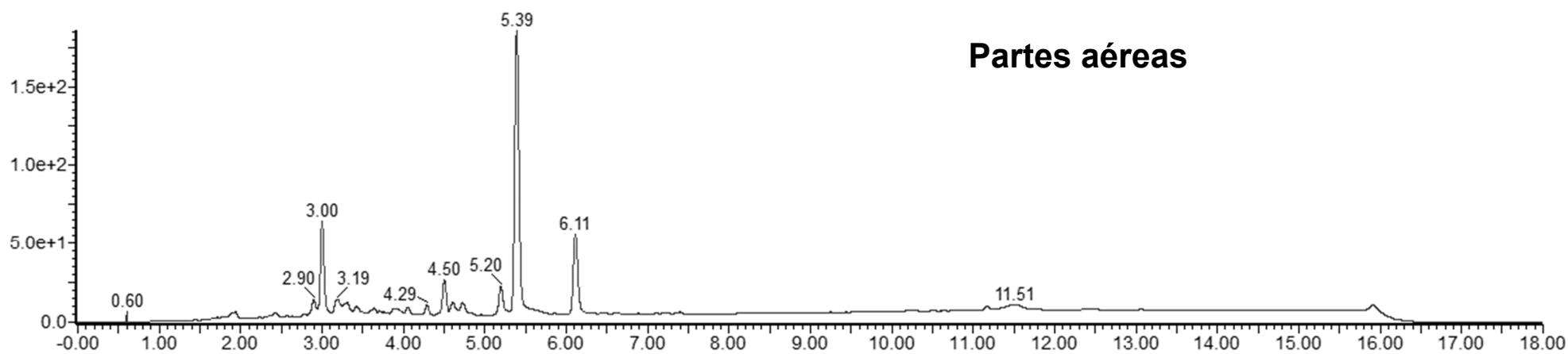
APÊNDICE D: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. reticularia*, Serra da Calçada (extratos 7 e 8)

### *Baccharis reticularia*



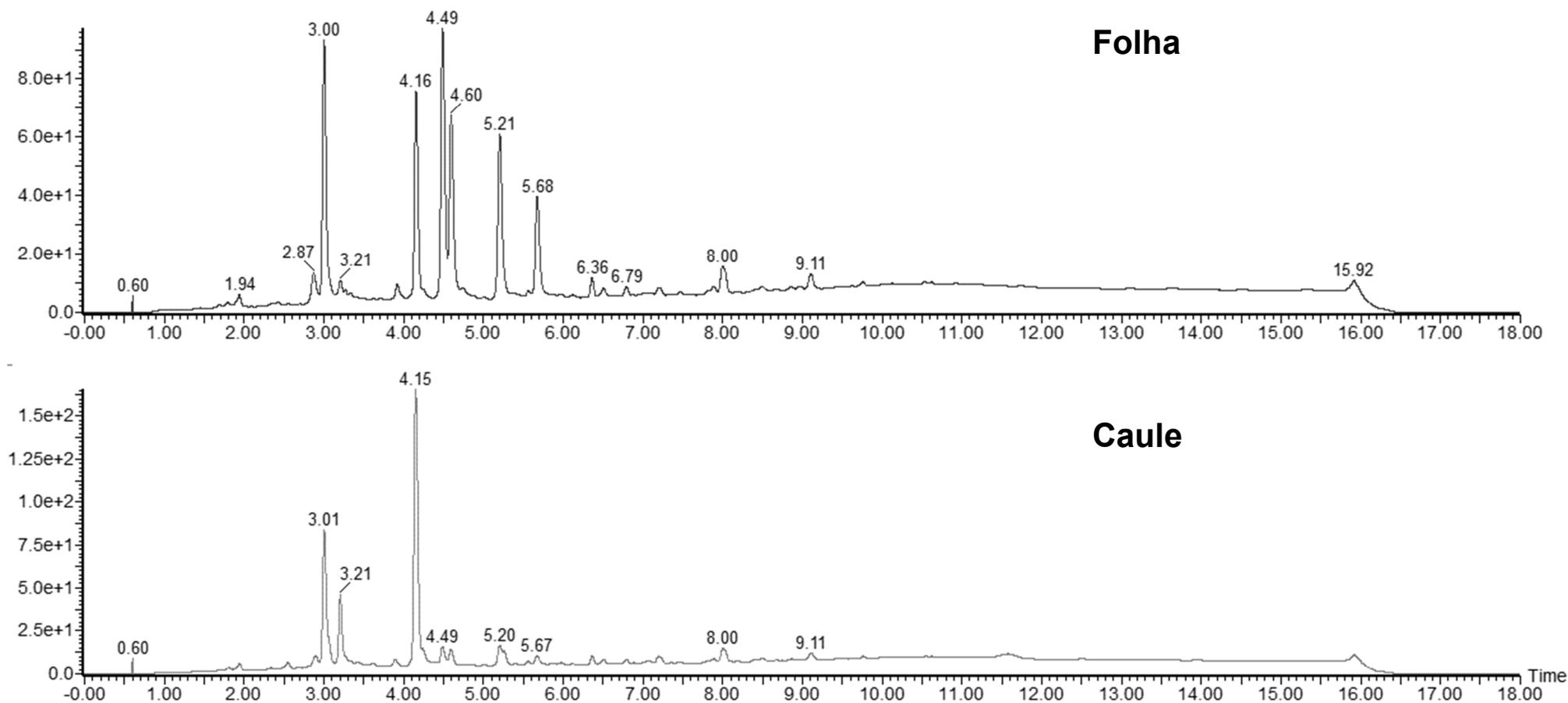
APÊNDICE E: Cromatograma do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *B. myriocephala*, Serra da Calçada (extrato 9)

***Baccharis myriocephala***



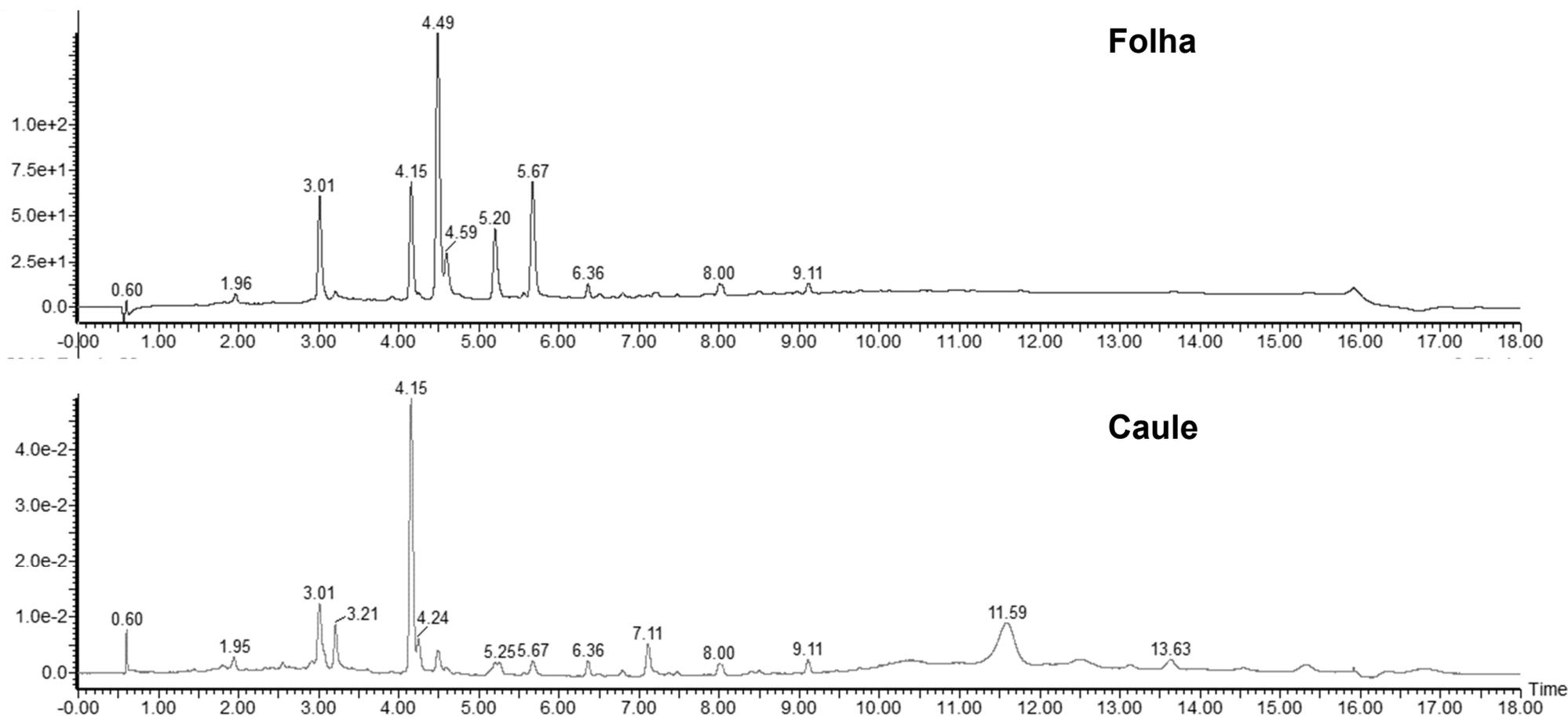
APÊNDICE F: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. calvenscens*, Parque do Caparaó (extratos 10 e 11)

### *Baccharis calvenscens*



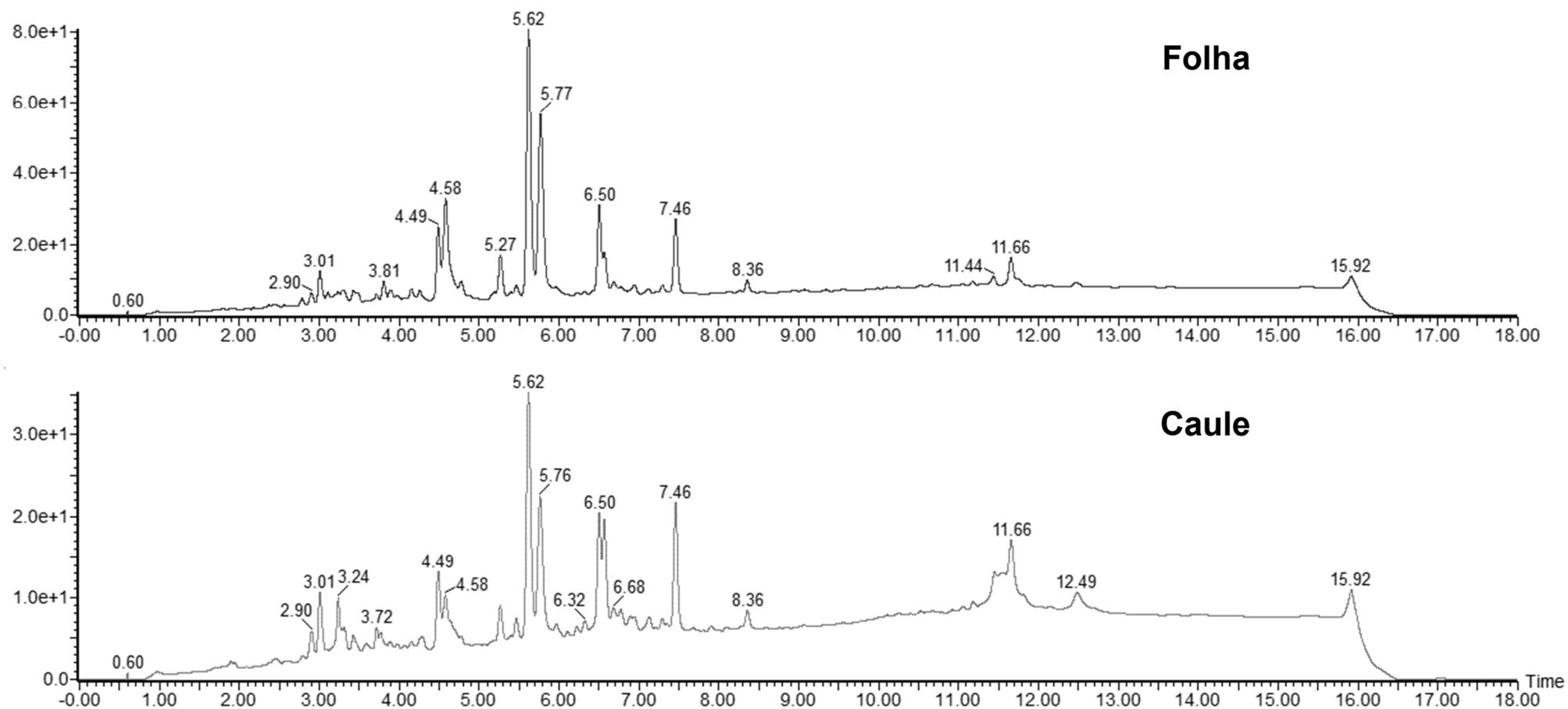
APÊNDICE G: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. calvenscens*, Parque do Caparaó (extratos 12 e 13)

### *Baccharis calvenscens*



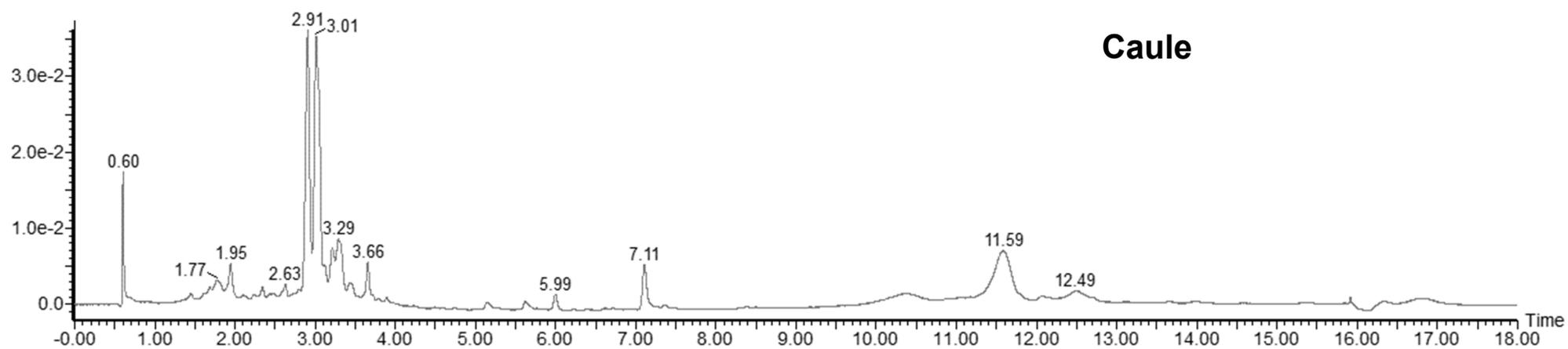
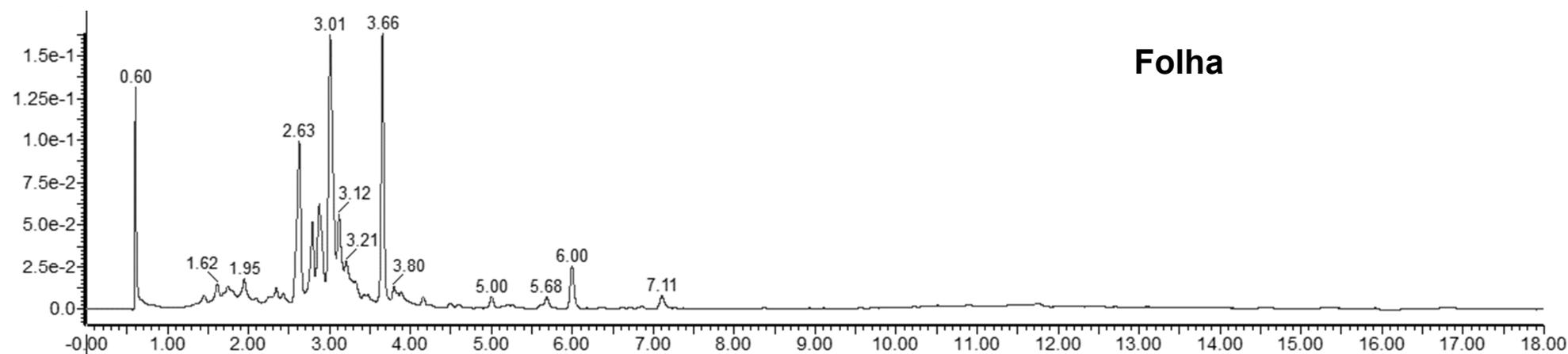
APÊNDICE H: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. imbricata*, Parque do Caparaó (extratos 14 e 15)

### *Baccharis imbricata*



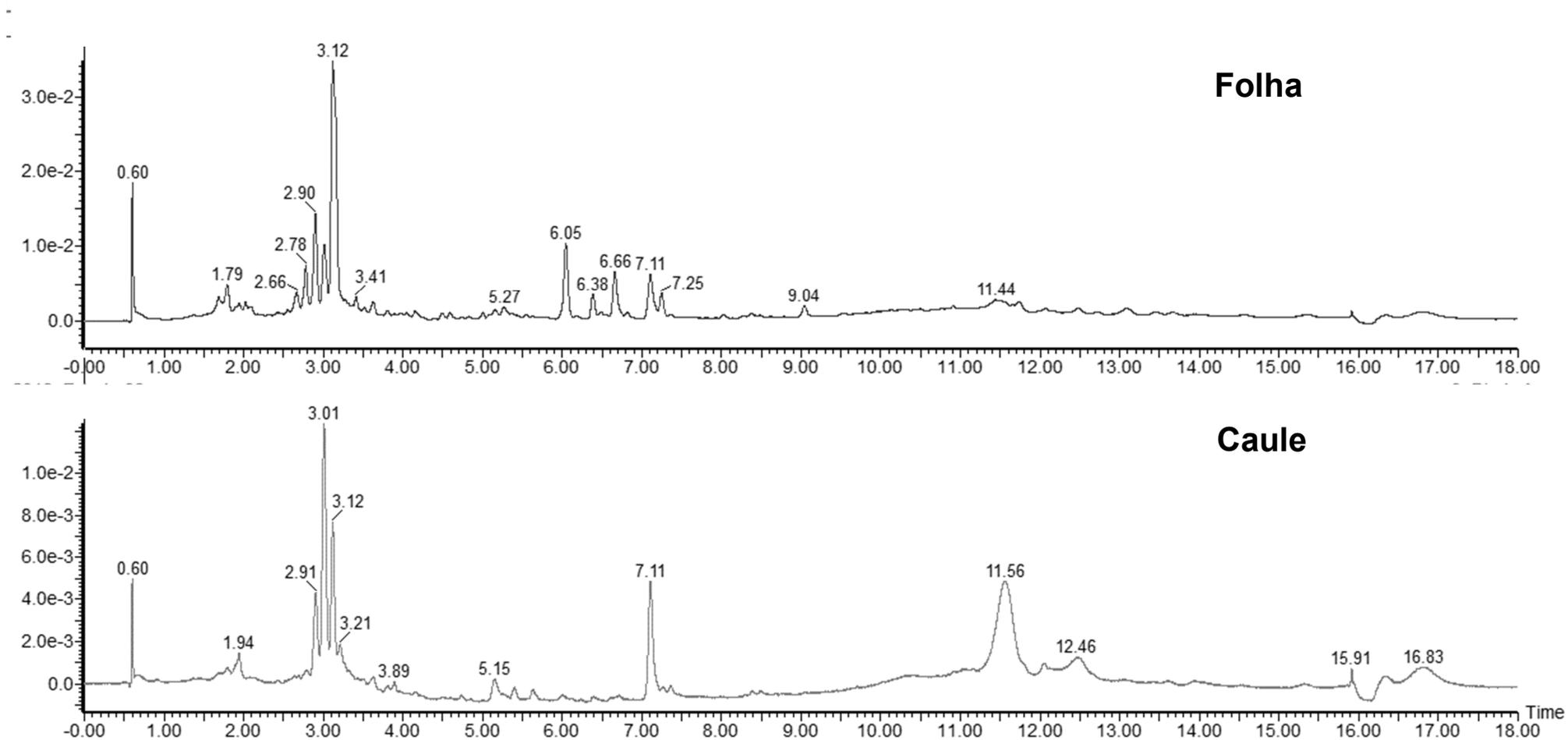
APÊNDICE I: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. parvidentata*, Parque do Caparaó (extratos 16 e 17)

### *Baccharis parvidentata*



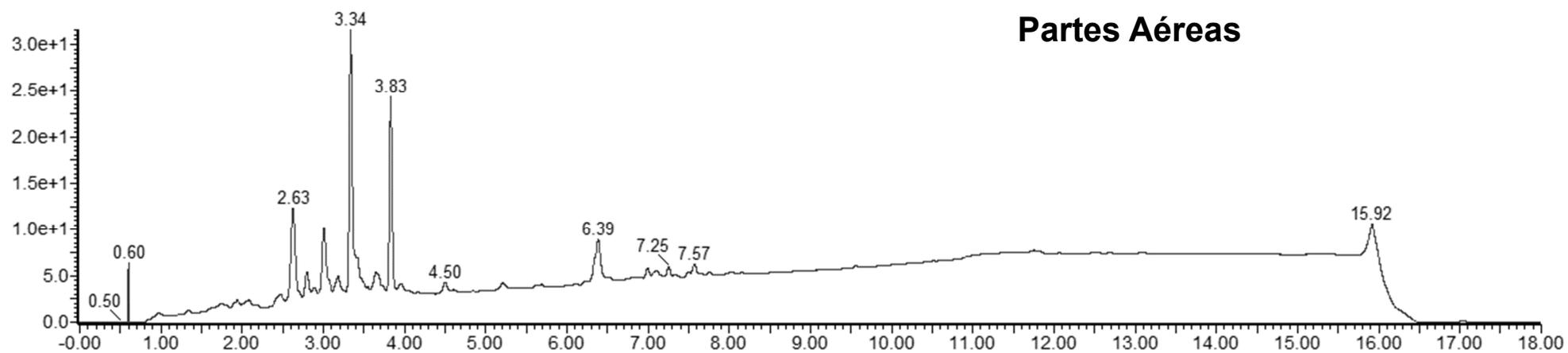
APÊNDICE J: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. parvidentata*, Parque do Caparaó (extratos 18 e 19)

### *Baccharis parvidentata*



APÊNDICE K: Cromatograma do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *B. hemiptera*, Parque do Caparaó (extrato 20)

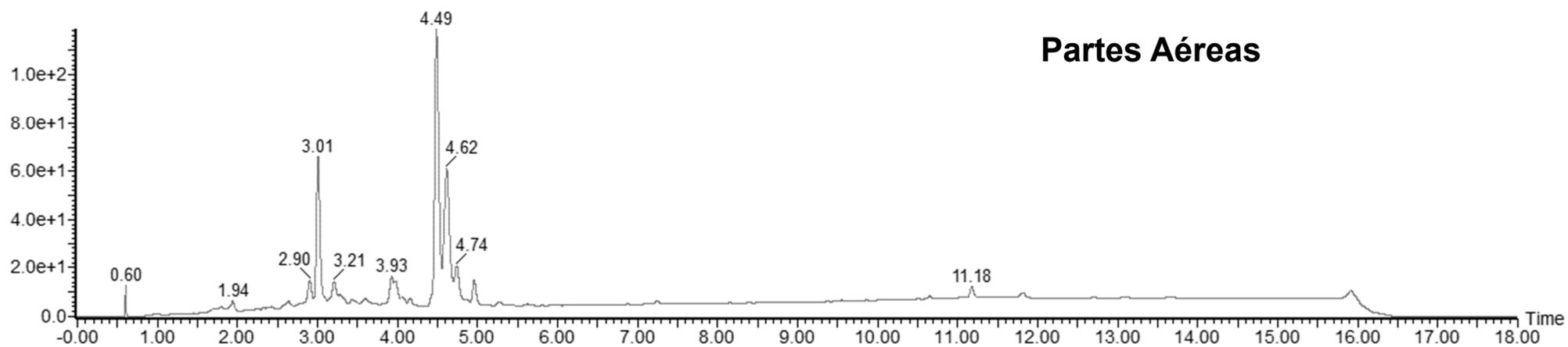
***Baccharis hemiptera***



APÊNDICE L: Cromatograma do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *B. opuntioides*, Parque do Caparaó (extrato 21)

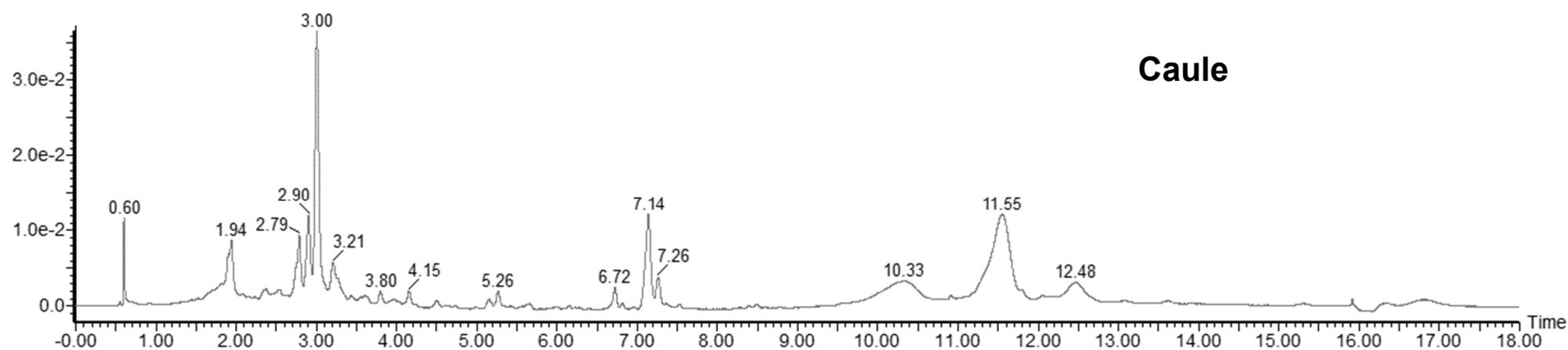
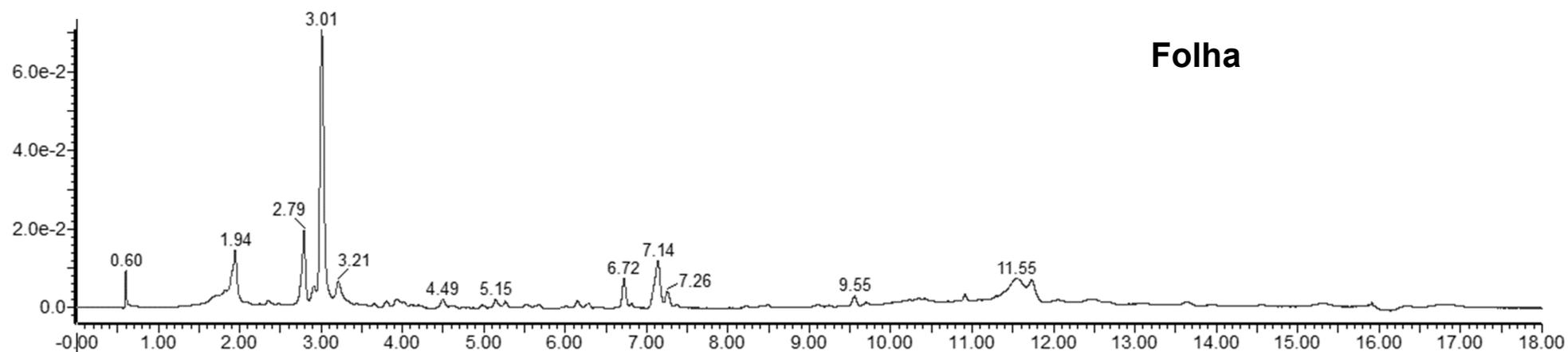
### *Baccharis opuntioides*

### Partes Aéreas



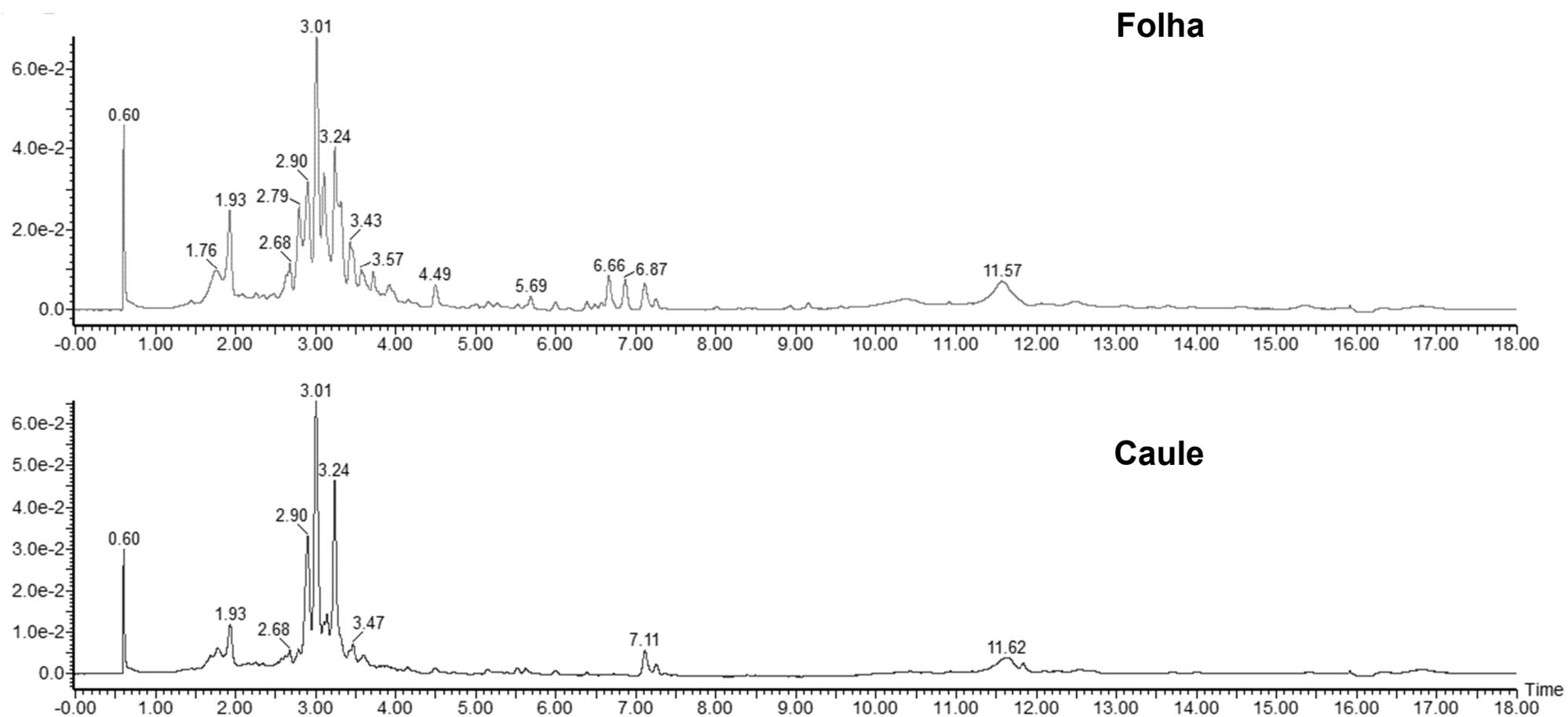
APÊNDICE M: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. megapotamica*, Parque do Caparaó (extratos 22 e 23)

### *Baccharis megapotamica*



APÊNDICE N: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. parvidentata*, Parque do Caparaó (extratos 24 e 25)

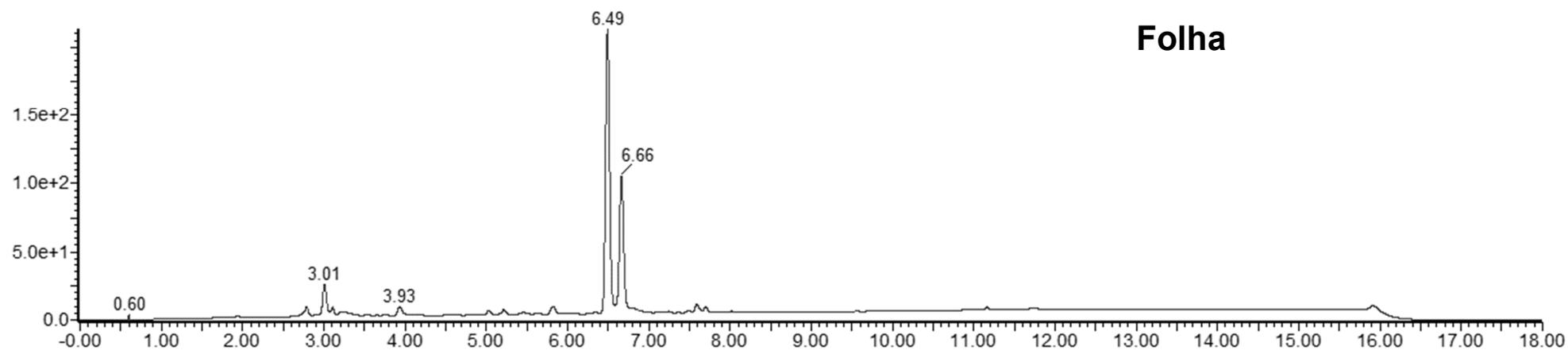
### *Baccharis parvidentata*



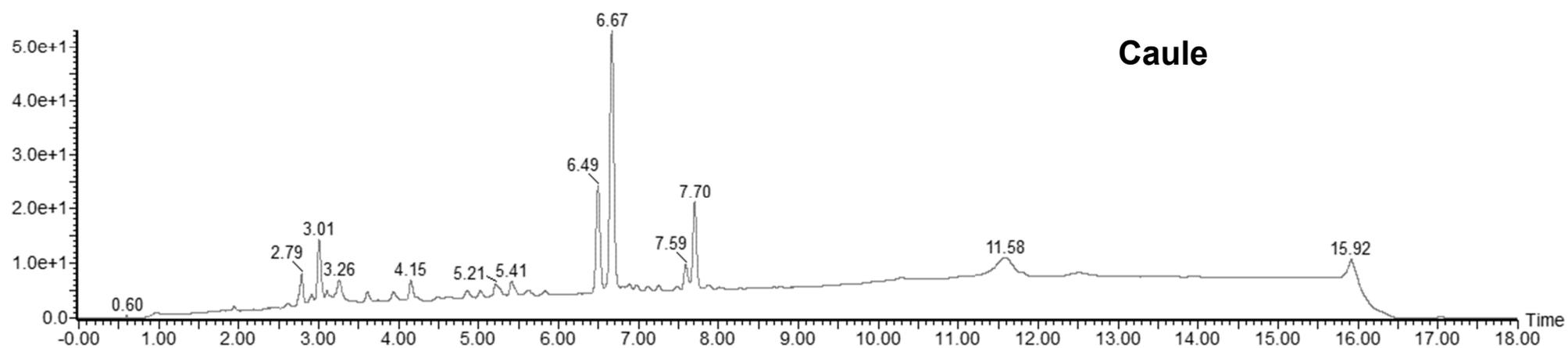
APÊNDICE O: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. magnifica*, Parque do Caparaó (extratos 26 e 27)

### *Baccharis magnifica*

Folha



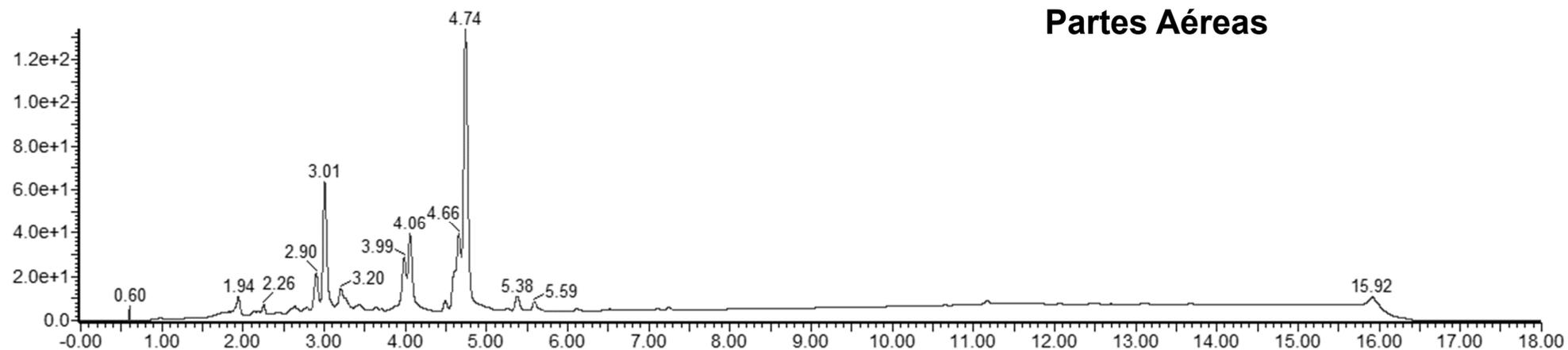
Caule



APÊNDICE P: Cromatograma do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *B. altimontana*, Parque do Caparaó (extrato 28)

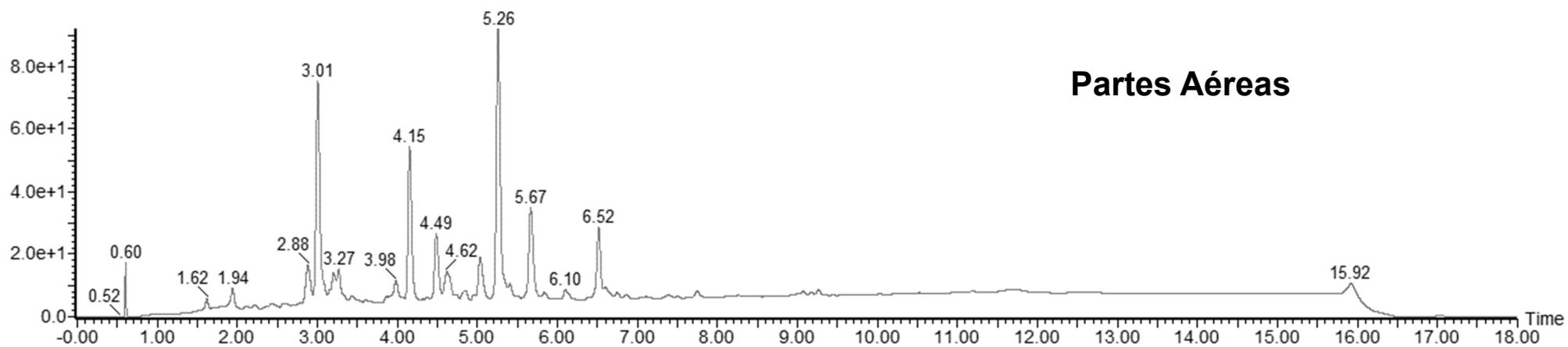
***Baccharis altimontana***

**Partes Aéreas**



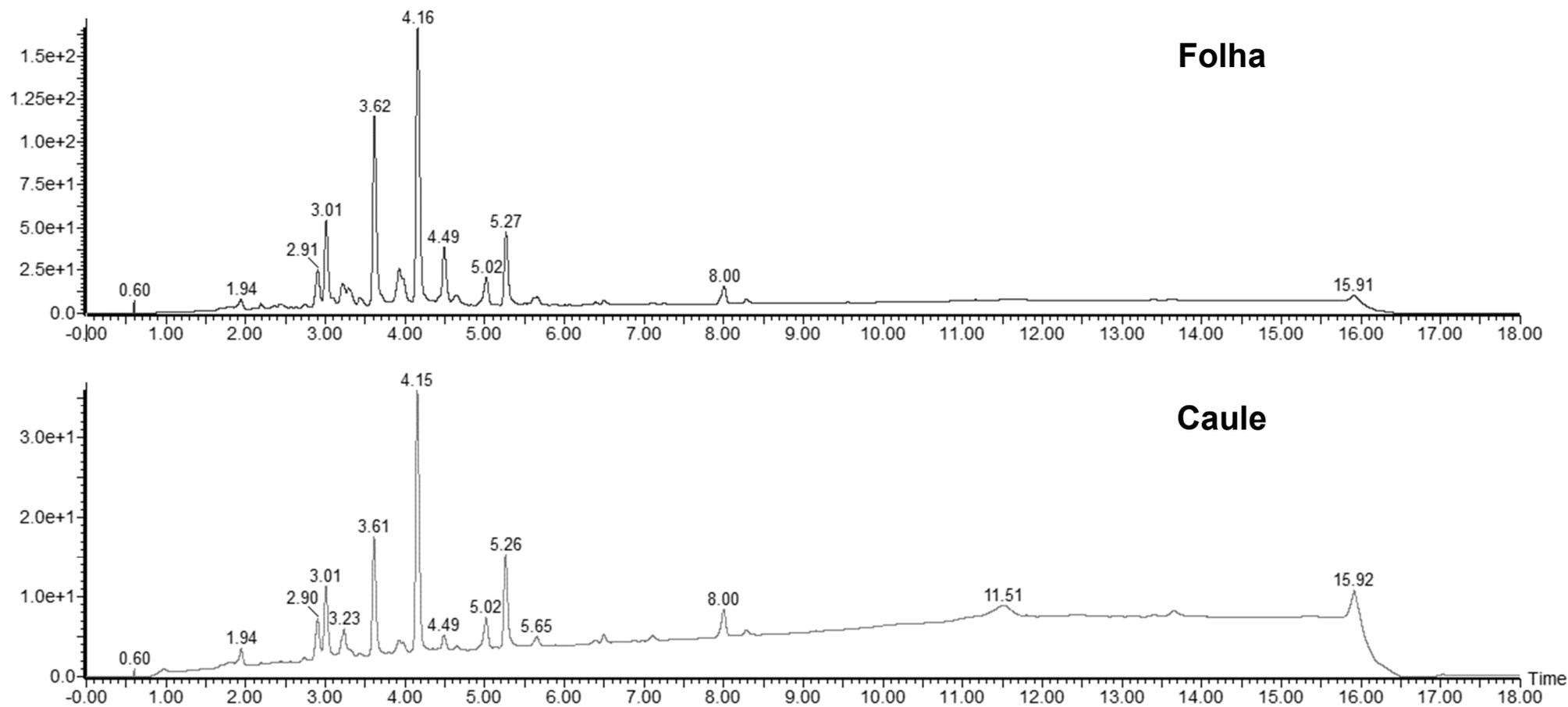
APÊNDICE Q: Cromatograma do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *B. opuntioides*, Parque do Caparaó (extratos 29)

### *Baccharis opuntioides*

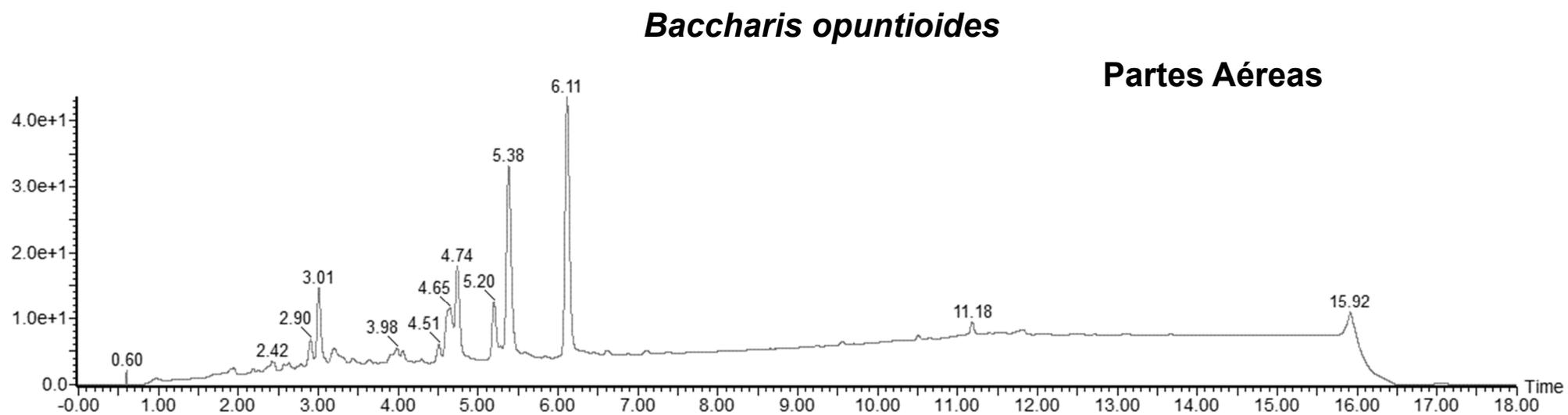


APÊNDICE R: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. platypoda*, Parque do Caparaó (extrato 30 e 31)

### *Baccharis platypoda*



APÊNDICE S: Cromatograma do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *B. opuntioides*, Parque do Caparaó (extratos 32)



APÊNDICE T: Cromatogramas dos extratos hidroetanólicos de folha e caule de *B. platypoda*, Parque do Caparaó (extrato 33 e 34)

### *Baccharis platypoda*

