

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

PATRÍCIA GARDÊNIA ASSIS SOUZA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Baccharis myriocephala* E AVALIAÇÃO
SOBRE A LIBERAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS**

BELO HORIZONTE

2022

PATRÍCIA GARDÊNIA ASSIS SOUZA

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Baccharis myriocephala* E AVALIAÇÃO
SOBRE A LIBERAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial, para obter o grau de mestra em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana

Coorientadores: Prof. Dr. Fernão Castro Braga
Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua

Colaboradores: Prof. Dr. José Dias de Souza Filho
Dra. Katia Michelle Freitas

BELO HORIZONTE

2022

S729e Souza, Patrícia Gardênia Assis.
Estudo fitoquímico de *Baccharis myriocephala* e avaliação sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios [recurso eletrônico] / Patrícia Gardênia Assis Souza. – 2022.
1 recurso eletrônico (94 f. : il.) : pdf

Orientadora: Priscilla Rodrigues Valadares Campana.

Coorientadores: Fernão Castro Braga.

Rodrigo Maia de Pádua.

Colaboradores: José Dias de Souza Filho.

Katia Michelle Freitas.

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

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. *Baccharis* – Teses. 2. Flavonoides – Teses. 3. Plantas medicinais – Teses. I. Campana, Priscilla Rodrigues Valadares. II. Braga, Fernão Castro. III. Pádua, Rodrigo Maia de. IV. Souza Filho, José Dias de. V. Freitas, Katia Michelle. VI. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. VII. Título.

CDD: 615.537



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

“ESTUDO FITOQUÍMICO DE Baccharis myriocephala E AVALIAÇÃO SOBRE A LIBERAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS”

PATRÍCIA GARDÊNIA ASSIS SOUZA

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.

Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Grasiely Faria de Sousa
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Priscilla Rodrigues Valadares Campana - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Rodrigo Maia de Pádua - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Fernão Castro Braga - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 19 de agosto de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Rodrigues Valadares Campana, Professora do Magistério Superior**, em 19/08/2022, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lirlândia Pires de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 19/08/2022, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no



art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernão Castro Braga, Professor do Magistério Superior**, em 19/08/2022, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Grasiely Faria de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 19/08/2022, às 16:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Maia de Padua, Professor do Magistério Superior**, em 19/08/2022, às 16:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1668817** e o código CRC **EB223599**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que desde o início teve este propósito para minha vida.

Aos meus pais, por todo amor e carinho, principalmente pelo incentivo aos estudos e por acreditarem nos meus sonhos. Vocês e meus irmãos são a base da minha vida.

Sou imensamente grata a minha orientadora Prof^a. Priscilla Campana pela confiança depositada em mim. Agradeço pela oportunidade, apoio e dedicação durante a realização desse trabalho. Obrigada pela paciência e por tornar esse trabalho possível.

Não posso esquecer dos meus co-orientadores, os Prof^o. Fernão e Prof^o. Rodrigo que se disponibilizaram e me ajudaram durante todo esse processo. A colaboração de vocês foi fundamental.

Em destaque, agradeço a Dr^a. Katia, pelo treinamento, confiança e apoio durante os ensaios biológicos, mas não apenas por isso, agradeço pela dedicação, animação, sabedoria, competência, incentivo. Enfim, pelo apoio incondicional durante esses anos. Eu tenho um carinho e uma admiração muito grande por você, um exemplo de pessoal e profissional tornando-se um espelho para mim. Tenho muito orgulho de você e me sinto honrada pela sua amizade.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica, em destaque a Rosa, Jane, Wellerson, Marina, Raquel, Juliana e André, não somente pelas contribuições diretas ao trabalho, mas pelos momentos de descontrações, pelo momento do cafezinho, conversas e conselhos que tornaram o ambiente de trabalho mais leve e agradável.

As meninas do Laboratório de Farmacognosia, Maria Beatriz e Alessandra, que participaram desde o início do Projeto *Baccharis*, que me ajudaram e me aconselharam sobre esse projeto.

Um agradecimento especial a Dr^a. Rosângela, uma amiga e colega desde a Faculdade de Farmácia, que me incentivou a tentar a seleção do mestrado na UFMG e plantou essa ideia desde o início. Sou grata a doutoranda Janekely, colega do laboratório que se tornou uma grande amiga e meu principal apoio afetivo durante minha estada em Minas Gerais. Também não posso deixar de mencionar a minha colega de casa, a Thais, uma amiga que partilhei muitos momentos divertidos, conversas e desabafos.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho. Agradecer é admitir que houve um momento que se precisou de alguém, é reconhecer que o homem jamais poderá lograr para si o dom de ser autossuficiente. Ninguém e nada cresce sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor (Autor desconhecido).

“E eu Te direi
Que vai valer a pena
Vai valer a pena
Vai valer a pena mesmo eu sei”

Livres para Adorar

RESUMO

As plantas medicinais são amplamente utilizadas como remédios caseiros ou como tratamento alternativo e/ou complementar devido à variedade de metabólitos constituintes. O gênero *Baccharis* (Asteraceae) se destaca pelo uso popular para alívio da dor, para tratamento de doenças gastrointestinais e como anti-inflamatório. Algumas espécies de *Baccharis* são conhecidas na literatura por ações terapêuticas atribuídas aos ácidos fenólicos, flavonoides e terpenos. Assim, esse gênero é considerado uma fonte promissora para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com ação anti-inflamatória. No presente trabalho, realizou-se o estudo do potencial anti-inflamatório *in vitro* de algumas espécies desse gênero e o estudo fitoquímico de *B. myriocephala*. Após a avaliação preliminar dos extratos etanólicos de 12 espécies de *Baccharis* sobre a liberação dos mediadores pró-inflamatórios TNF, IL-1 β e IL-6 em células THP-1 estimuladas por LPS *in vitro*, observou-se que o extrato de partes aéreas de *B. myriocephala* reduziu significativamente a liberação desses mediadores na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$. Nesse contexto, seguiu-se o fracionamento e isolamento das substâncias através de técnicas cromatográficas. A partir da fração obtida em acetato de etila, foram isoladas e identificadas duas flavonas, hispidulina e cirsimaritina, caracterizada por RMN, empregando experimentos 1D (1 H e 13C) e 2D (HSQC e HMBC). Os dois compostos isolados foram avaliados *in vitro* frente à liberação de IL-1 β nas concentrações 3, 10 e 30 μM . A hispidulina apresentou inibição máxima na concentração de 10 μM , reduzindo em $57,1 \pm 16,3\%$ a liberação da citocina IL-1 β enquanto a cirsimaritina inibiu em $69,8 \pm 4,3\%$ a liberação dessa citocina, quando avaliada na mesma concentração. Em conclusão, o estudo resultou na identificação e determinação estrutural de duas flavonas a partir do extrato etanólico de partes aéreas de *B. myriocephala*, com potencial atividade anti-inflamatória.

Palavras-chaves: *Baccharis*; *Baccharis myriocephala*; atividade anti-inflamatória; flavonas.

ABSTRACT

Medicinal plants are widely used as home remedies or as an alternative and/or complementary treatment due to the variety of chemical constituents. The genus *Baccharis* (Asteraceae) stands out for its popular use for pain relief, for the treatment of gastrointestinal diseases and as an anti-inflammatory agent. Some *Baccharis* species are known in the literature for therapeutic actions attributed to phenolic acids, flavonoids and terpenes. Thus, this genus is considered a promising source for the development of new therapeutic agents with anti-inflammatory action. In the present work, the study of the *in vitro* anti-inflammatory potential of some species of this genus and the phytochemical study of *B. myriocephala* were carried out. After a screening process regarding the evaluation of the effect of the extracts on the release of the pro-inflammatory mediators TNF, IL-1 β and IL-6 in THP-1 cells stimulated by LPS *in vitro*, it was observed that the ethanolic extract of aerial parts from *B. myriocephala* significantly reduced the release of these mediators at a concentration of 30 $\mu\text{g/mL}$. In this context, the fractionation and isolation of substances through chromatographic techniques followed. From the fraction obtained in ethyl acetate, two flavones were isolated and identified, hispidulin and cirsimaritin, characterized by NMR, using 1D (^1H and ^{13}C) and 2D (HSQC and HMBC) experiments. The two isolated compounds were evaluated *in vitro* for their effects on the release of IL-1 β at concentrations at 3, 10 and 30 μM . Hispidulin had maximum inhibition at 10 μM , reducing the release of IL-1 β by $57.1 \pm 16.3\%$, while cirsimaritin inhibited the release of this cytokine by $69.8 \pm 4.3\%$ when evaluated at the same concentration. In conclusion, the study resulted in the identification of two flavones from the ethanolic extract of aerial parts of *B. myriocephala*, with potential anti-inflammatory activity.

Keywords: *Baccharis*; *Baccharis myriocephala*; anti-inflammatory activity; flavones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ativação de NF- κ B	23
Figura 2: Posição taxonômica do gênero <i>Baccharis</i>	23
Figura 3: Estrutura básica dos flavonoides e subclasses	30
Figura 4: Viabilidade das células THP-1 tratadas com o extrato etanólico de 12 espécies de <i>Baccharis</i> . Os dados representam a média \pm DP em hexaplicata. **** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,5 comparando com o veículo (DMSO+EtOH 1:4)	47
Figura 5: Efeito de extratos etanólicos (30 μ g/mL) de espécies de <i>Baccharis</i> sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios em células THP-1 estimuladas com LPS. Os dados representam a média \pm DP em triplicata. **** p < 0,0001; *** p < 0,001; ** p < 0,01 comparando com células+LPS (-). Dx: dexametasona (10 μ M); Oblong: <i>B. oblongifolia</i> ; Oreo: <i>B. oreophila</i> ; Myrio: <i>B. myriocephala</i>	49
Figura 6: Efeito das frações (30 μ g/mL) de <i>B. myriocephala</i> sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios em células THP-1 estimuladas com LPS. Os dados representam a média \pm DP em triplicata. **** p < 0,0001; *** p < 0,001; comparando com células+LPS (-). Dx: dexametasona (10 μ M); DCM: fração diclorometano; EtOAc: fração acetato de etila; MeOH/H ₂ O: fração metanol/água (1:1)	51
Figura 7: Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC do extrato etanólico de partes aéreas de <i>B. myriocephala</i> espectros de absorção no UV registrados para os picos 1, 4, 5, 6 e 7 (A) e 3, 8 e 9 (B). Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.9).....	52
Figura 8: Perfil cromatográfico obtido por UPLC-PDA-ESI-MS do extrato etanólico de <i>B. myriocephala</i> . A) Detecção no PDA por maxplot. B) TIC registrado no modo positivo de ionização por <i>electrospray</i> (ESI ⁺). C) TIC registrado no modo negativo de ionização por <i>electrospray</i> (ESI). Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.11)	53
Figura 9: Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC para a fração diclorometano obtida do extrato etanólico das partes aéreas de <i>B. myriocephala</i> e espectros de absorção no UV registrados para os picos 1, 2 e 3 (A) e 4 (B). Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.9)	55
Figura 10: Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC para fração acetato de etila obtida do extrato etanólico de partes aéreas de <i>B. myriocephala</i> e espectros de absorção no UV registrados para os picos 1 (A), 2 e 4 (B) e 3 e 5 (C). Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.9)	56

Figura 11: Perfil cromatográfico obtido por UPLC-PDA-ESI-MS da fração EtOAc. A) Detecção no PDA por maxplot. B) TIC registrado no modo positivo de ionização por <i>electrospray</i> (ESI ⁺). C) TIC registrado no modo negativo de ionização por <i>electrospray</i> (ESI ⁻)	57
Figura 12: Estruturas das possíveis flavonas presentes na fração EtOAc obtida do extrato de <i>B. myriocephala</i>	58
Figura 13: Espectro cromatográfico obtido por RP-HPLC em escala preparativa da fração EtOAc. Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.10)	59
Figura 14: Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-PDA para Flav1A (A), Flav1B (B), Flav2 (C) e Flav3 (D) obtidas da fração EtOAc. Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.11)	60
Figura 15: Espectros de massas registrados nos modos de ionização ESI negativo (A) e ESI positivo (B) para Flav2	60
Figura 16: Espectros de massas registrados nos modos de ionização ESI negativo (A) e ESI positivo (B) para Flav3	61
Figura 17: Espectro de RMN de ¹ H de Flav2 em DMSO-d ₆ obtido em 600 MHz	62
Figura 18: Espectro de RMN de ¹³ C de Flav2 em DMSO-d ₆ obtido em 150 MHz	63
Figura 19: Sub-espectro DEPT-135 de Flav2 em DMSO-d ₆ obtido em 150 MHz	63
Figura 20: Mapa de contornos de HSQC obtidos para Flav2 em DMSO-d ₆ em 600 MHz para ¹ H e 150 MHz para ¹³ C.....	65
Figura 21: Mapa de contornos de HMBC obtidos para Flav2 em DMSO-d ₆ em 600 MHz para ¹ H e 150 MHz para ¹³ C.....	65
Figura 22: Seção expandida da região de hidrogênios do mapa de contornos HMBC HMBC obtidos para Flav2 em DMSO-d ₆ em 600 MHz para ¹ H e 150 MHz para ¹³ C. .	66
Figura 23: Espectro de RMN de ¹³ C de Flav3 em DMSO-d ₆ obtidos em 150 MHz	68
Figura 24: Sub-espectro de DEPT-135 de Flav3 em DMSO-d ₆ obtidos em 150 MHz ..	69
Figura 25: Seção expandida da região de hidrogênios metínicos (δ H 3,91 e 3,73 ppm) do mapa de contornos HSQC obtido para Flav3.	69
Figura 26: Efeito das substâncias hispidulina e cirsimaritina (3, 10 e 30 μ M) isoladas de <i>B. myriocephala</i> sobre a liberação de IL-1 β em células THP-1 estimuladas com LPS (100 ng/mL). Os dados representam a média \pm DP em triplicata. **** p < 0,0001; *** p < 0,001; * p < 0,5 comparando com células+LPS (0). Dx: dexametasona (10 μ M).	72
Figura 27: Efeito das frações de <i>B. myriocephala</i> (10 e 30 μ g/mL) sobre a produção de EROs em células THP-1 estimuladas com LPS (100 ng/mL). Os dados representam a	

média ± DP em hexaplicata. ** p < 0,01; comparando com células+LPS (-). Veículo: (DMSO+EtOH 1:4); Dx: dexametasona (10 µM); DCM: fração diclorometano; EtOAc: fração acetato de etila; MeOH/H₂O: fração metanol/água (1:1) 73

Figura 28: Células THP-1 coradas com DCFH-DA. Branco: células+meio; LPS: lipopolissacarídeo (100 ng/mL); DEXA: dexametasona (10 µM); DCM 10: fração diclorometano 10 µg/mL; DCM 30: fração diclorometano 30 µg/mL. 74

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Amostras de espécies do gênero <i>Baccharis</i>	37
Tabela 1: Rendimento extrativo dos extratos etanólicos de espécies <i>Baccharis</i> obtidos por maceração assistida por sonicação.....	38
Tabela 2: Rendimento dos extratos de <i>B. oblongifolia</i> , <i>B. oreophila</i> e <i>B. myriocephala</i> obtidos por percolação.	39
Tabela 3: Rendimento das frações obtidas por filtração do extrato etanólico de <i>B. myriocephala</i> em sílica gel.....	39
Tabela 4: Gradiente de eluição empregado nas análises por HPLC em escala preparativa.	41
Tabela 5: Rendimento das frações obtidas no refração da fração EtOAc oriunda do extrato etanólico de partes aéreas de <i>B. myriocephala</i> por HPLC em escala preparativa.	41
Tabela 6: Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-MS	42
Tabela 7: Percentual de inibição de liberação das citocinas pró-inflamatórias para os extratos etanólicos.....	49
Tabela 8: Substâncias identificadas putativamente por UPLC-PDA-ESI-MS no extrato etanólico de <i>B. myriocephala</i>	53
Tabela 9: Dados obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS da fração EtOAc	57
Tabela 10: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H de Flav2 (DMSO-d ₆ , <i>J</i> em Hz) obtidos em 600 MHz para ¹ H e 150 MHz para ¹³ C.....	66
Tabela 11: Dados de RMN de ¹³ C e ¹ H de Flav3 (DMSO-d ₆ , <i>J</i> em Hz) obtidos em 600 MHz para ¹ H e 150 MHz para ¹³ C.....	70

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

°C – Graus Celsius

δ – Deslocamento químico

λ_{max} – Comprimento de onda máximo

μg – Microgramas

μL – Microlitros

μM – Micromolar

ANOVA – Análise de Variância

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CI₅₀ – Metade da Concentração Inibitória Máxima

DAMP – Padrões Moleculares Associados a Danos

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMSO-d₆ – Dimetilsulfóxido deuterado

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DP – Desvio Padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

Dx – Dexametasona

ELISA – “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

ESI – “Electrospray Ionization”

EtOAc – Acetato de etila

EtOH – Etanol

H₂O - Água

HMBC – “Heteronuclear correlation through multiple quantum coherence”

HPLC-PDA – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência acoplada a Detector de Conjunto de Fotodiodo

HSQC – “Heteronuclear single bond coherence”

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IL – Interleucina

INF- ($\alpha/\beta/\gamma$) – Interferon- (Alfa, Beta, Gama)

IV – Infravermelho

LPS – Lipopolissacarídeo

mg – Miligramas

m/z – Razão massa/carga

MeOH - Metanol

Mhz – Megahertz

MS – Espectrometria de Massas

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio

NF-κB – Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

NK – “Natural Killer”

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPD – *orto*-Fenilenodiamina

PAMP – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PDA – Conjunto de Fotodiodo

PHE – Extrato fenólico

PMA – Acetato Miristato de Forbol

Ppm – Partes por milhão

PRP – Receptores de Reconhecimento de Padrões

RMN de ¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RP-HPLC – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência de Fase Reversa

SAP – Extrato de Saponina

SFB – Soro Fetal Bovino

TGF-β – Fator de transformação do crescimento beta

TLR – Receptores semelhantes a Toll

TLR4 – Receptor tipo Toll 4

TNFα – Fator de Necrose Tumoral Alfa

Tr – Tempo de Retenção

UPLC-PDA-ESI-MS – Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência acoplada a Detector de Conjunto de Fotodiodo e Espectrômetro de Massas com Fonte de Ionização Electrospray

UV/VIS – Ultravioleta/Visível

LISTA DE FÓRMULAS ESTRUTURAIS

- (1) sakuranetina
- (2) khusimone
- (3) espatulenol
- (4) kingidiol
- (5) cirsimaritina
- (6) 8-metoxicirsilineol
- (7) xantomicrol
- (8) sideritoflavona
- (9) betuletol
- (10) genkwarina
- (11) oblongifoliosídeo A
- (12) oblongifoliosídeo B
- (12) linalool
- (13) óxido cariofileno
- (14) kuwanona E
- (15) kuwanona G
- (16) norartocarpanona
- (17) ourateina D
- (18) hispidulina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 O PROCESSO INFLAMATÓRIO	20
3.1.1 Via de sinalização da inflamação por NF- κ B	22
3.2 O GÊNERO BACCHARIS	23
3.2.1 Propriedades farmacológicas e composição química de espécies do gênero Baccharis	24
3.2.2 Baccharis myriocephala.....	29
3.2.3 Flavonoides e atividade anti-inflamatória	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 EQUIPAMENTOS	33
4.2 SOLVENTES E REAGENTES	34
4.3 VIDRARIAS E MATERIAIS DIVERSOS	35
4.4 REVELADORES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	36
4.5 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	36
4.6 PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	37
4.7 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	37
4.8 OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS DAS ESPÉCIES BIOATIVAS	38
4.9 CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES DE B. MYRIOCEPHALA	39
4.10 REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ETOAC DE B. MYRIOCEPHALA POR HPLC EM ESCALA PREPARATIVA	40
4.11 OBTENÇÃO DOS PERFIS CROMATOGRÁFICOS POR UPLC-PDA-ESI-MS	41
4.12 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	42
4.13 ENSAIOS BIOLÓGICOS	42
4.13.1 Cultivo celular	42
4.13.1.1 Descongelamento celular	42
4.13.1.2 Contagem celular utilizando azul de Tripan	43
4.13.2 Avaliação da viabilidade celular	43
4.13.3 Ensaios in vitro de inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios.....	44
4.13.3.1 Protocolo de ELISA	44
4.13.4 Ensaios in vitro da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	45
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS DE BACCHARIS SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS THP-1	46

5.2 EFEITO DE EXTRATOS E FRAÇÕES SOBRE A LIBERAÇÃO DE MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS IN VITRO.....	47
5.3 ESTUDO FITOQUÍMICO DE B. MYRIOCEPHALA	51
5.3.1 Caracterização cromatográfica do extrato etanólico de B. myriocephala	51
5.3.2 Fracionamento biomonitorado do extrato etanólico de B. myriocephala	54
5.3.3 Refracionamento da fração EtOAc por HPLC em escala preparativa	58
5.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	61
5.4.1 Elucidação estrutural de Flav2.....	61
5.4.2 Elucidação estrutural de Flav3.....	67
5.5 EFEITO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADOS SOBRE OS MEDIADORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS IN VITRO	71
5.6 EFEITO IN VITRO DAS FRAÇÕES SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	72
6 CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE A - ESPECTRO DE RMN DE ¹H DE FLAV3 EM DMSO-D₆ OBTIDO EM 600 MHZ.	89
APÊNDICE B - SEÇÃO EXPANDIDA DO ESPECTRO DE RMN DE ¹H DE FLAV3 EM DMSO-D₆ OBTIDO EM 600 MHZ. HIDROGÊNIO DO ANEL PARA-SUBSTITUÍDO (A), HIDROGÊNIO ΔH 6,91 PPM DO ANEL A (B) E DOS HIDROGÊNIO METÍNICOS ΔH 3,91 E 3,73 PPM (C).....	90
APÊNDICE C - MAPA DE CONTORNOS DE HSQC OBTIDOS PARA FLAV3 EM DMSO-D₆ EM 600 MHZ PARA ¹H E 150 MHZ PARA ¹³C.....	91
APÊNDICE D - MAPA DE CONTORNOS DE HMBC OBTIDOS PARA FLAV3 EM DMSO-D₆ EM 600 MHZ PARA 1H E 150 MHZ PARA 13C.	92
APÊNDICE E - SEÇÃO EXPANDIDA DA REGIÃO DE HIDROGÊNIO METÍNICOS (ΔH 3,91 E 3,73 PPM) DO MAPA DE CONTORNOS HMBC OBTIDO PARA FLAV3.....	93

1. INTRODUÇÃO

A utilização das plantas com fins medicinais para alívio dos sintomas, tratamento ou prevenção de diversas doenças é de conhecimento milenar e fundamentada no acúmulo de informações, teorias e crenças por diferentes grupos étnicos (BRASIL, 2015). A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos" (WHO, 1998).

As plantas medicinais são amplamente utilizadas como remédios caseiros ou como tratamento alternativo e/ou complementar principalmente onde a disponibilidade dos serviços de saúde é limitada. Estimativas da OMS indicam que cerca de 80% da população mundial utiliza ervas para cuidados de saúde primária, principalmente em países em desenvolvimento (BRASIL, 2006; WHO, 2009). Portanto, tais plantas são importantes para a o desenvolvimento de fármacos, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como protótipos na síntese biomimética, além de possibilitarem a descoberta de novas propriedades terapêuticas ainda não atribuídas a substâncias conhecidas (WHO, 1998).

A ampla biodiversidade vegetal no Brasil e os estudos dos metabólitos secundários que são extraídos de plantas possibilita a descoberta de substâncias com diversas aplicações terapêuticas potenciais, incluindo a atividade anti-inflamatória. O efeito de diversas plantas medicinais sobre o processo inflamatório já foi bastante investigado e encontra-se bem documentado em diversos estudos (RIBEIRO *et al.*, 2018). Várias classes de metabólitos especiais já foram investigadas e se mostraram ativas em modelos de doenças inflamatórias crônicas (COTE *et al.*, 2022; KUNNUMAKKARA *et al.*, 2018). As plantas são, portanto, consideradas uma fonte importante para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

A inflamação está associada a diversas doenças, e o processo inflamatório é iniciado em decorrência de lesões, infecções, irritações ou qualquer outro evento, fisiológico ou não, que interrompa a homeostase (MEDZHITOV, 2008). O principal objetivo desse processo é proteger o hospedeiro e restaurar a homeostase. Para tal, uma complexa cascata de sinalização é ativada, em um processo auto-regulado, que envolve a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF), as interleucinas (IL) -1 β e -6 e mediadores lipídicos. Portanto, a inflamação é um mecanismo fisiológico de defesa e as citocinas e

quimiocinas são mediadores importantes na regulação da inflamação (CHEN et *al.*, 2018; CHOVIATYIA, MEDZHITOV, 2014).

As plantas do gênero *Baccharis* possuem efeito sobre o processo de sinalização inflamatória, podendo atenuar a inflamação (OLIVEIRA et *al.*, 2012; TAGUCHI et *al.*, 2015). As atividades farmacológicas das espécies do gênero *Baccharis* são atribuídas aos constituintes fitoquímicos já identificados, por exemplo: flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos, entre outros (VERDI et *al.*, 2005).

Assim, no presente trabalho avaliou-se o potencial anti-inflamatório de espécies vegetais do gênero *Baccharis* e realizou-se o fracionamento biomonitorado de *B. myriocephala* a fim de se obter substâncias bioativas com potencial anti-inflamatório.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a potencial atividade anti-inflamatória de espécies do gênero *Baccharis* ocorrentes em Minas Gerais, e realizar o estudo fitoquímico de espécie selecionada visando identificar seus constituintes bioativos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Preparar os extratos de folhas, caules e partes aéreas de plantas do gênero *Baccharis* coletadas no Parque Nacional de Itatiaia (RJ/MG).

2.2.2 Avaliar a atividade dos extratos vegetais obtidos em ensaios de liberação de citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1 β e IL-6, por células THP-1 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS).

2.2.3 Realizar a caracterização química de extratos selecionados utilizando técnicas cromatográficas hifenadas (HPLC-PDA e UPLC-PDA-ESI-MS).

2.2.4 Realizar o fracionamento do extrato selecionado biomonitorado por ensaios de liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β e IL-6).

2.2.5 Isolar e elucidar a estrutura química dos constituintes isolados, utilizando métodos espectroscópicos usuais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O processo inflamatório

O médico Cornelius Celsius, no século I d.C., foi o primeiro a definir os sintomas clínicos da inflamação. Foram descritos quatro sinais cardinais da inflamação, quais sejam: rubor (devido à hiperemia), tumor (inchaço), calor (associado ao aumento do fluxo sanguíneo) e dor (RESENDE, 2015). Em 1858, Rudolf Virchow, descreveu a *functio laesa* (perda da função) como a quinta característica da inflamação (HEIDLAND et al., 2006).

A inflamação (do Latim *inflamare*, atear fogo) pode ser definida como uma reação a lesões traumáticas, danos químicos ou físicos, de natureza autoimune ou em resposta a agentes infecciosos (RESENDE, 2015). É um mecanismo fisiológico que envolve a liberação de substâncias sinalizadoras, principalmente proteínas e mediadores lipídicos, o recrutamento de células imunes, e visa reestabelecer a homeostase tecidual (GALVÃO et al., 2019).

O processo inflamatório pode ser iniciado por fatores extrínsecos, como bactérias, vírus ou alérgenos, ou por fatores endógenos que surgem em decorrência de danos celulares, como a liberação de moléculas pelas células necróticas, que possuem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Esses padrões são reconhecidos pelas células circulantes e ativam o sistema imunológico (MEDZHITOV, 2008).

Observam-se na inflamação fenômenos vasculares, tais como dilatação dos vasos e aumento do fluxo sanguíneo, e fenômenos exsudativos, caracterizados por extravasamento de líquido e leucócitos para o espaço extravascular, que contribuem para a migração leucocitária ao local da injúria. O processo inflamatório é mediado pela síntese e liberação de diversas substâncias, denominadas mediadores da inflamação (CHOVATIYA, MEDZHITOV, 2014).

Os mediadores envolvidos na sinalização inflamatória variam de acordo com o tipo de receptor de reconhecimento de padrões (PRRs) ativado em resposta à PAMPs ou DAMPs, sendo o primeiro passo no desenvolvimento da resposta imune inata. Esses mediadores podem ser classificados em sete grupos de acordo com suas propriedades bioquímicas: aminas ou peptídeos vasoativos, fragmentos do sistema complemento, mediadores lipídicos, quimiocinas, citocinas e enzimas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008).

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular, como interleucina (IL), interferon (INF), fator de necrose tumoral (TNF) e fator de crescimento tumoral (TGF). As citocinas pró-

inflamatórias, como TNF, IL-1 β e IL-6 possuem diversos papéis na sinalização inflamatória, incluindo a diferenciação, proliferação e sobrevivência de células do sistema imune, e potencialização de sinais apoptóticos. As quimiocinas ou citocinas quimioatrativas, desempenham um papel sobre a fisiologia leucocitária ao controlar o tráfego de leucócitos. Por exemplo, a IL-8 ou CXCL8, promovem a migração coordenada de células do sistema imune em direção ao sítio da injúria (CARRAZZONI, 2016; CARVALHO, 2018; SUGIMOTO *et al.*, 2019; YAO, NARUMIYA, 2019).

Os mediadores pró-inflamatórios são produzidos majoritariamente em decorrência da ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). Outras vias também são ativadas, levando à liberação de mediadores lipídicos, prostaglandinas e leucotrienos (MUSSBACHER *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2020).

Os PRRs incluem receptores do tipo Toll (TLR), tipo RIG-I, tipo NOD, tipo AIM2 e lecitina tipo C (BRUBAKER, 2015). A família de TLR é a mais estudada e é responsável pela detecção de PAMPs ou DAMPs no exterior da célula, em endossomos e lisossomos intracelulares. Os receptores do tipo Toll são classificados em duas subfamílias com base em sua localização, TLRs localizados na membrana plasmática das células ou TLRs dentro dos endossomos, conhecidos como receptores transmembranares do tipo I e desempenham um papel integral no sistema imunológico inato (KAWASAKI *et al.*, 2014).

O reconhecimento dos PAMPs ou DAMPs é multifacetado e pode ativar especificamente um tipo de TLR. Por exemplo, o TLR4 de mamífero detecta componentes da superfície celular microbiana, como o lipopolissacarídeo (LPS) presente em bactérias Gram-negativas (FITZGERALD *et al.*, 2020; NIE *et al.*, 2018). A ativação desse receptor desencadeia uma cascata de vias de sinalização intracelular, incluindo as vias de proteína cinase ativada por mitógenos (MAPKs) e estimulam a translocação do fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) (CHEN *et al.*, 2018).

A eliminação dos sinais referentes à presença de patógenos ou lesão tecidual sinaliza o declínio do processo pró-inflamatório e a ativação do processo resolutivo, com uma série de eventos moleculares e celulares que levam à restauração da estrutura do tecido e da função dos órgãos em busca do equilíbrio homeostático (SUGIMOTO *et al.*, 2016).

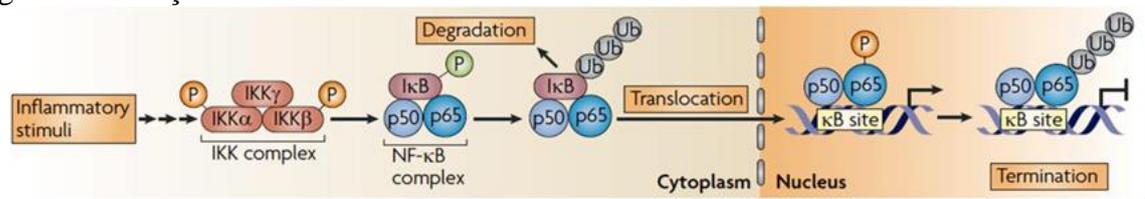
3.1.1 Via de sinalização da inflamação por NF- κ B

O fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) é um regulador crítico das respostas inflamatórias e homeostase, sendo um fator crucial na patogênese da doença inflamatória (KOK et al., 2021). Em 1986, essa proteína foi descrita pela primeira vez como fator de transcrição que conduz a expressão da cadeia κ de imunoglobulinas em células B, mas atualmente, sabe-se que o NF- κ B é expresso em quase todas as células do corpo humano e que regula a expressão de milhares de genes envolvidos em processos de imunidade, crescimento celular e apoptose (MUSSBACHER et al., 2019; SINGH et al., 1986).

Tendo em vista a importância desse fator de transcrição no processo inflamatório e na imunidade, diversos estudos foram conduzidos para compreender as vias de sinalização que culminam em sua ativação. A atividade do NF- κ B não é desencadeada apenas por citocinas inflamatórias, como TNF- α ou IL-1 β , mas também por componentes da parede celular bacteriana, como lipopolissacarídeos, por vírus, ou por condições de danos físicos. Com os avanços nos estudos, alguns pesquisadores classificaram, didaticamente, a ativação em (i) via canônica, que é desencadeada por TNF α , IL-1 ou LPS; (ii) via não canônica, induzida pelo ligante CD40 ou linfotoxina β ; e (iii) vias de sinalização atípicas, como a iniciada por dano ao DNA (LAWRENCE, 2009; MUSSBACHER et al., 2019).

Na ausência de estímulos, os dímeros de NF- κ B permanecem no citoplasma em estado inativado, ligados a uma molécula de proteína inibidora (I κ B), inibindo a translocação de NF- κ B para o núcleo. A via canônica de ativação consiste na degradação de I κ B α desencadeada através de sua fosforilação por um complexo I κ B quinase (IKK). Portanto, a fosforilação de I κ B ocorre por meio do complexo IKK, que é composto por duas cinases cataliticamente ativas IKK α e IKK β , e uma subunidade regulatória denominada IKK γ (Figura 1). Uma vez ativado, o NF- κ B é translocado para o núcleo, ligando-se à região promotora do gene alvo, iniciando a transcrição gênica (LIU et al., 2017; SINGH et al., 2020).

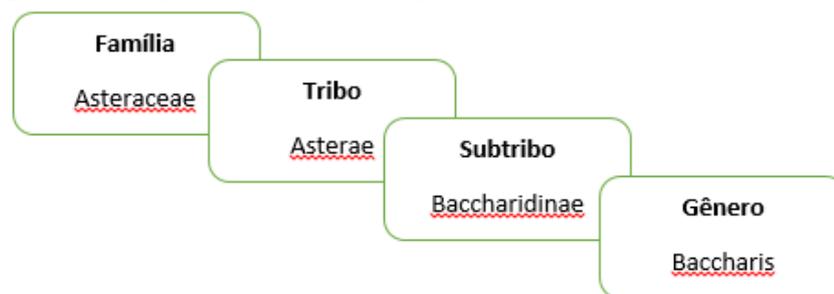
Após a ativação do NF- κ B a resposta biológica é variada e sujeita-se ao tipo de célula, da permissividade das regiões promotoras, que é regulada por mecanismos epigenéticos e, ainda, das vias de feedback adicionais (co-estimuladores ou repressores), que se cruzam com a via do NF- κ B (MUSSBACHER et al., 2019).

Figura 1: Ativação de NF- κ B

Fonte: Ghosh & Hayden, 2008.

3.2 O Gênero *Baccharis*

O gênero *Baccharis*, descrito por Linné, em 1753, pertence a tribo Astereae e subtribo Baccharidinae, sendo esse o maior gênero da família Asteraceae (Figura 2). O nome *Baccharis* (*Bakkharis*) tem origem grega, sendo uma antiga denominação utilizada para algumas plantas arbustivas (BUDEL *et al.*, 2005).

Figura 2: Posição taxonômica do gênero *Baccharis*

Fonte: Adaptado de BUDEL, 2005.

Esse gênero compreende mais de 500 espécies, distribuídas principalmente na América do Sul. Há uma grande concentração de espécies no Brasil e nos Andes, indicando que toda essa área é o provável centro de origem do táxon (BUDEL *et al.*, 2005; VERDI *et al.*, 2005).

No Brasil, sobretudo, encontram-se nas regiões sul, sudeste e centro-oeste e, são descritas pelo menos 178 espécies de *Baccharis*, das quais mais de 150 substâncias foram isoladas e identificadas (CAMPOS *et al.*, 2016; HEIDEN *et al.*, 2016). As espécies mais conhecidas são a *Baccharis dracunculifolia* e a *Baccharis trimera*, sendo essa última descrita na 6ª edição da Farmacopeia Brasileira. As espécies desse gênero apresentam-se como subarbustos perenes, possuem ramos cilíndricos, caules triaxiais e medem em média de 0,5 a 4,0 m de altura, por vezes afilados ou com raras folhas sésseis e pecioladas (BRASIL, 2019; ZUCCOLOTTO, 2017).

Diferentes espécies de *Baccharis* são utilizadas com finalidades medicinais. As espécies *B. articulata* e *B. crispa* são empregadas no Brasil para o alívio da dor. As espécies *B. articulata*,

B. crispa, *B. trimera*, *B. serratifolia* e *B. vaccinoides* são utilizadas tradicionalmente em diversos países da América do Sul como digestivas, coleréticas e colagogas e no alívio de distúrbios estomacais. Já as espécies *B. coridifolia*, *B. trimera*, *B. ilinita*, *B. latifolia*, *B. obtusifolia*, *B. petlandii* e *B. subalata* são utilizadas no tratamento de reumatismo, doenças hepáticas e na cicatrização de feridas. Outras espécies como a *B. dracunculifolia*, *B. teindalenis* e *B. tricuneata* são utilizadas como antimicrobianas. Diversas espécies são empregadas no tratamento da esterilidade feminina e da impotência masculina (ABAD, BERMEJO, 2007; LOSQUI et al., 2009; STOLZ et al., 2014).

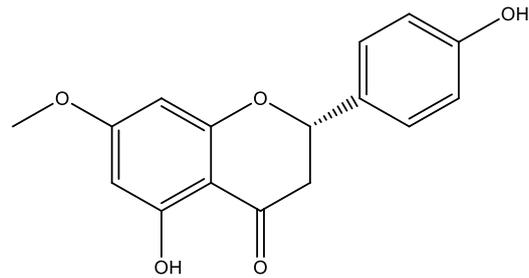
Além disso, os óleos essenciais de *Baccharis* têm sido utilizados há séculos como agentes terapêuticos na medicina tradicional. Os óleos essenciais desse gênero têm sido investigados por suas várias atividades biológicas, incluindo antimicrobiana e antifúngica (OLIVEIRA et al., 2019; PEREIRA et al., 2016), anti-inflamatória (FLORÃO et al., 2012) e larvicida contra *Aedes aegypti* (BOTAS et al., 2017).

Apesar do extenso uso medicinal das espécies e do número significativo de substâncias já isoladas, somente 30% das espécies deste gênero apresentam algum tipo de estudo químico ou biológico (CAMPOS et al., 2016). Portanto, o emprego terapêutico dessas plantas exige o conhecimento prévio de seus compostos para a avaliação das potencialidades terapêuticas e toxicidade.

3.2.1 Propriedades farmacológicas e composição química de espécies do gênero *Baccharis*

Substâncias fenólicas (ácidos fenólicos e flavonoides), sesquiterpenos, diterpenos com esqueletos clerodânicos, labdânicos e caurânicos, triterpenos, tricotecenos e fenilpropanoides, como os derivados do ácido cumárico são alguns dos constituintes isolados de espécies de *Baccharis*. Os flavonoides e terpenoides são considerados os grupos de maior ocorrência no gênero (VERDI et al., 2005; ZUCCOLOTTO, 2017).

O fracionamento do extrato etanólico de partes aéreas de *B. retusa*, biomonitorado por ensaio de atividade antimicrobiana, levou ao isolamento da flavanona 5,4-diidroxi-7-metoxi-flavanona, denominada sakuranetina (**1**). Essa flavanona apresentou atividade antimicrobiana frente a seis espécies do gênero *Candida*, duas espécies do gênero *Cryptococcus* e frente a *Saccharomyces cerevisiae*, com valores de concentração inibitória mínima variando entre 0,32 e 0,63 µg/mL (GRECCO et al., 2014).



A sakuranetina (1), isolada de folhas de *B. retusa*, também foi capaz de atenuar a inflamação pulmonar em modelo murino de sensibilização por ovalbumina. Os camundongos tratados com sakuranetina (20 mg.kg⁻¹ por via intranasal) reduziu significativamente o número de eosinófilos, a concentração da citocina IL-5 e da quimiocina RANTES em comparação ao grupo sensibilizado a partir do homogenato pulmonar (TOLEDO et al., 2013).

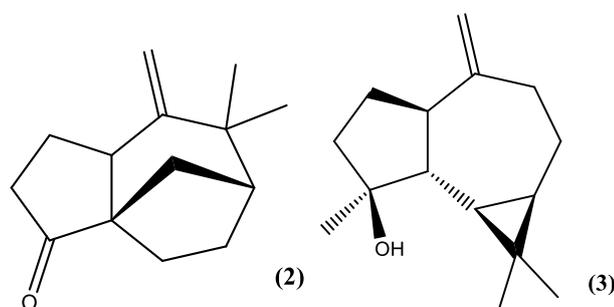
Santos e colaboradores (2010) demonstraram a atividade anti-inflamatória do extrato de *Baccharis dracunculifolia* em modelos *in vivo* de nocicepção e inflamação em roedores. O extrato foi administrado por via intraperitoneal, nas doses de 50 a 400 mg/kg, e apresentou atividade anti-inflamatória, diminuído o edema de pata traseira induzido por carragenina em ratos, e propriedade antinociceptiva quando administrado por via oral em modelos agudos e crônicos de dor.

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 do volume de exsudação e da migração de leucócitos polimorfonucleares (PAUL et al., 2009).

Oliveira e colaboradores (2012) avaliaram a atividade anti-inflamatória e antioxidante de extratos enriquecidos em fenólicos (PHE) e em saponinas (SAP) obtidos de partes aéreas de *B. trimera*. O extrato PHE apresentou a melhor atividade antioxidante em ensaio de redução do DPPH, com CI₅₀ de 1,57 µg/mL. Esse extrato também foi avaliado *in vivo* em modelo de pleurisia induzida por carragenina e reduziu levemente o volume de exsudato (21,31 ± 0,16% de inibição, *p* <0,001) e moderadamente a migração de leucócitos totais e células polimorfonucleares (63,35 ± 13,53% e 46,79 ± 19,65% de inibição respectivamente, *p* <0,05), na dose de 15 mg/kg, administrada por via intraperitoneal, quando comparado ao grupo carragenina. Nos animais tratados com SAP, na dose de 30 mg/kg, o volume de exsudato foi levemente diminuído (22,34 ± 0,22% de inibição, *p* <0,01) quando comparado ao grupo carragenina. Observou-se também redução significativa na migração de leucócitos totais e células polimorfonucleares em comparação ao grupo não tratado.

Os óleos essenciais de espécies de *Baccharis* também vêm sendo estudados. O óleo obtido por hidrodestilação de folhas de *B. reticularia*, constituído majoritariamente por monoterpenos e sesquiterpenos foi capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase com um valor de CI_{50} de 301,9 $\mu\text{g/mL}$ (BOTAS et al., 2017). Souza e colaboradores (2021) avaliaram o efeito inseticida de óleos essenciais de sete espécies de *Baccharis*. As espécies *B. calvescens*, *B. mesoneuræ*, *B. oblongifolia*, causaram mortalidade em mais de 80% dos adultos de *D. sukuzii* na concentração de 80 mg/L em bioensaios de ingestão e aplicação tópica.

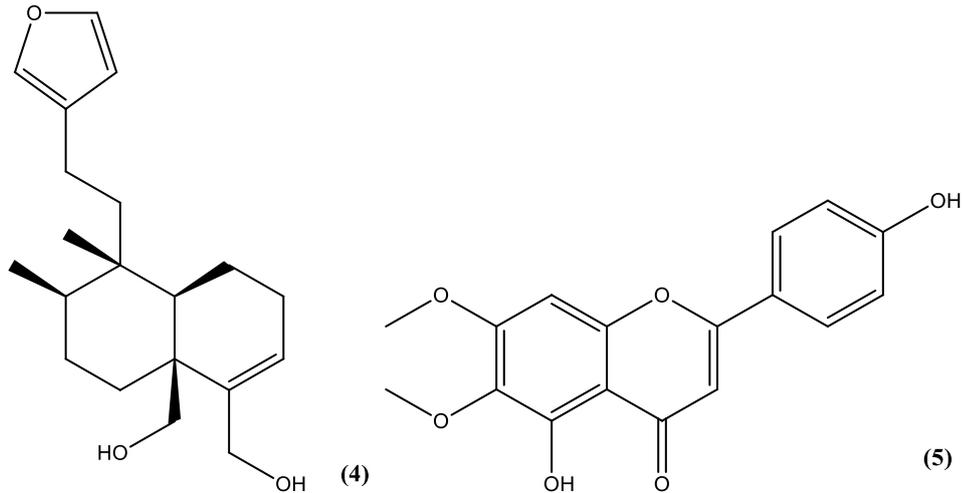
O óleo essencial obtido das folhas de *B. oreophila* apresentou efeito antimicrobiano contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* com zona de inibição média de $10,33 \pm 0,5$ mm, cujos compostos majoritários identificados foram os sesquiterpenos oxigenados khusimone (**2**) (16,37%) e espatulenol (**3**) (16,12%) (OLIVEIRA et al., 2019).



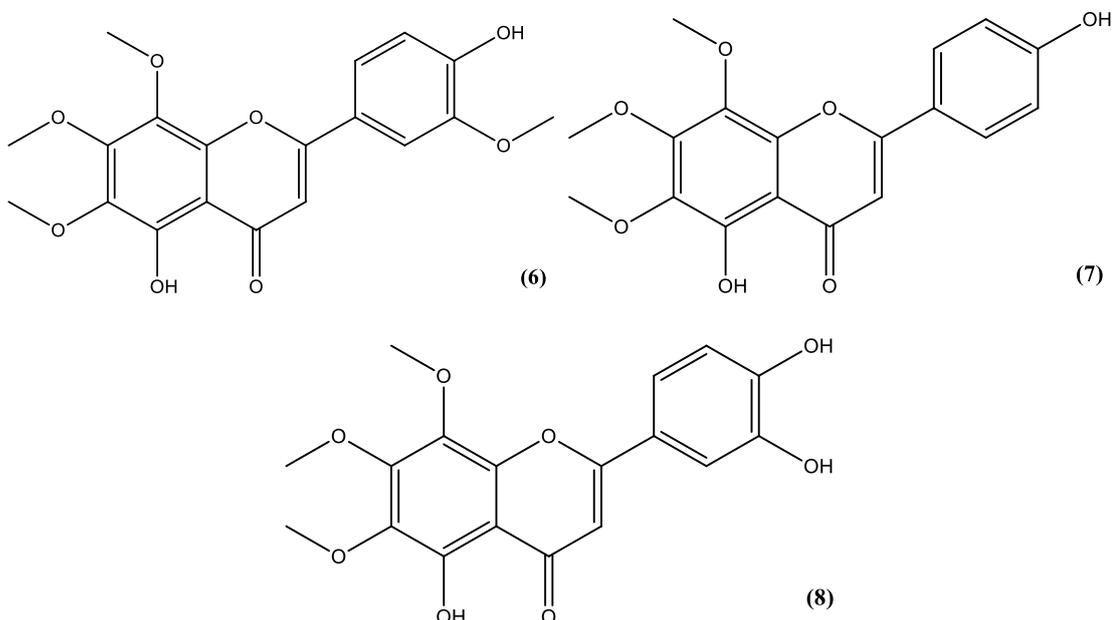
Budel e colaboradores (2018) avaliaram a composição química dos óleos essenciais de cinco espécies de *Baccharis*. A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas constatou que os constituintes frequentemente encontrados são monoterpenóides e sesquiterpenóides, como: α -pineno, β -pineno, limoneno, α -bisabolol, espatulenol e kongol.

Silva e colaboradores (2018) avaliaram a toxicidade aguda da tintura de *B. trimera* administrada em dose única de 2000 mg/kg a ratos, por via oral com a ajuda da sonda esofágica. Não houve morte e nem alterações significativas dos parâmetros bioquímicos e nos parâmetros hematológicos nos grupos tratados com o extrato. Em seguida avaliou-se a atividade antimicrobiana desse extrato, pelo método de difusão em disco, observando-se atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

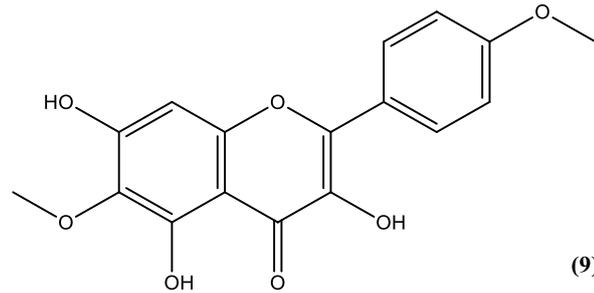
O extrato diclorometânico de partes aéreas de *B. conferta* foi analisado quanto à atividade anti-inflamatória no modelo de edema de orelha de camundongos induzido por 12-*O*-tretradecanoilforbol-13-acetato. O extrato reduziu o edema em $78,5 \pm 0,72\%$, após administração de 1,0 mg diretamente na orelha do animal. A inflamação foi reduzida com a aplicação tópica das substâncias isoladas kingidiol (**4**) e cirsimaritina (**5**) (SILVIA et al., 2020).



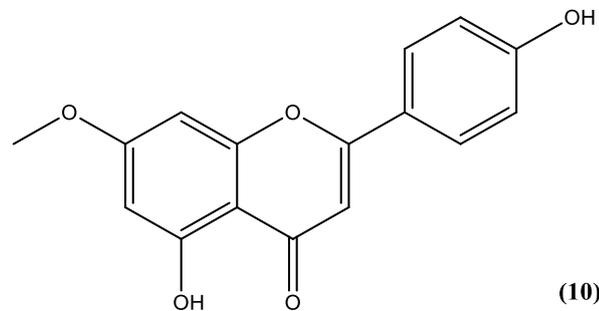
Sotillo e colaboradores (2021) isolaram três flavonas metoxiladas (8-metoxicirsilineol (6), xantomicol (7) e sideritoflavona (8)) de partes aéreas de *B. densiflora* e testaram a toxicidade em linhagem celular de câncer de mama. Suas estruturas são semelhantes, mas apresentam perfis de toxicidade muito diferentes. Eles descobriram que a sideritoflavona é 50 vezes mais tóxica para as células JIMT-1 em comparação com o xantomicol, apesar de os compostos diferirem apenas por um grupo hidroxila.



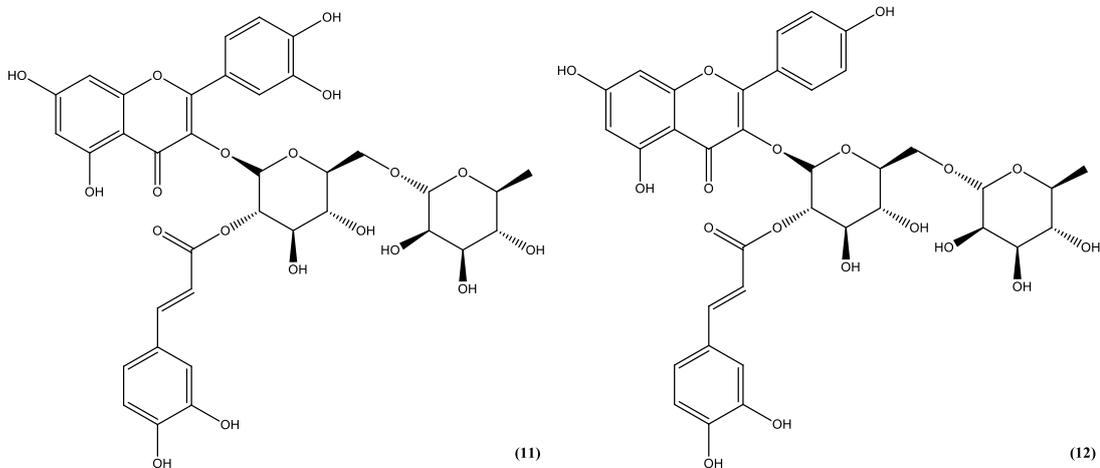
Uma triagem de atividade citotóxica realizada com extratos de 14 espécies do gênero *Baccharis* demonstrou o potencial citotóxico das espécies *B. imbricata* e *B. megapotamica* frente à linhagem tumoral A549 na concentração de 20 µg/mL. O fracionamento biomonitorado de *B. imbricata* resultou no isolamento e identificação do flavonol betuletol (9) (RABELO, 2020).



O potencial anti-inflamatório de 13 espécies desse gênero foi avaliado *in vitro* em células THP-1 estimuladas por LPS. O extrato etanólico de *B. calvescens* reduziu significativamente a liberação de IL-1 β na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ e seu estudo fitoquímico biomonitorado resultou no isolamento de duas flavonas a cirsimaritina (**5**) e genkwarina (**10**) (FRADE, 2020).



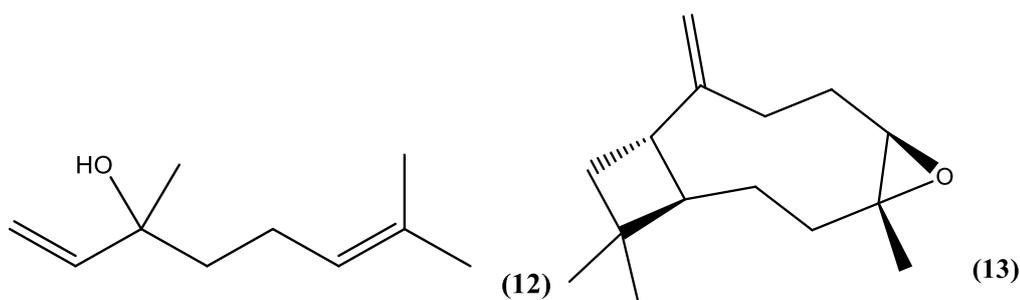
Zampiere e colaboradores (2019) isolaram dois novos flavonoides, oblongifoliosídeo A (**11**) e oblongifoliosídeo B (**12**), juntamente com 8 substâncias já conhecidas, a partir de folhas de *B. oblongifolia*. As substâncias isoladas foram testadas quanto à sua atividade antirradicalar usando um ensaio DPPH, e oblongifoliosídeo A e oblongifoliosídeo B (CI_{50} 13,3 \pm 0,5 e 12,4 \pm 0,2, respectivamente) apresentaram maior atividade em comparação ao Trolox (45,4 \pm 1,7).



3.2.2 *Baccharis myriocephala*

Baccharis myriocephala DC., pertencente a seção Caulopterae que ocorre exclusivamente na América do Sul, é um subarbusto ramificado com caule trialado (HEIDEN *et al.*, 2009). Esta característica é comum entre as outras espécies desta seção e por serem morfológica e anatomicamente semelhantes, são conhecidas popularmente como carqueja (BUDEL *et al.*, 2005).

Struiving e colaboradores (2020) avaliaram a composição química do óleo essencial das folhas de *B. myriocephala* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As substâncias identificadas em maior percentual foram: linalool (**12**), espatulenol (**3**) e óxido de cariofileno (**13**). Após o fracionamento do extrato das folhas de *B. myriocephala* por partição com variação de pH, a composição química da fração obtida em acetato de etila foi caracterizada, identificando-se sete flavonoides e quatro ácidos fenólicos utilizando a técnica HPLC-DAD. As análises dos picos cromatográficos das frações obtidas em acetato de etila em pH ácido e básico, resultou na identificação do ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, epicatequina, rutina, quercitrina, quercetina, kaempferol e luteolina. Os pesquisadores também determinaram que essa fração tem atividade captadora de radicais livre no ensaio do DPPH, o que significa que as substâncias presentes na amostra exibiram capacidade doadora de hidrogênio de acordo com o estudo.



Nenhum outro relato sobre o estudo fitoquímico e atividade biológica para essa espécie foi encontrado na revisão bibliográfica realizada.

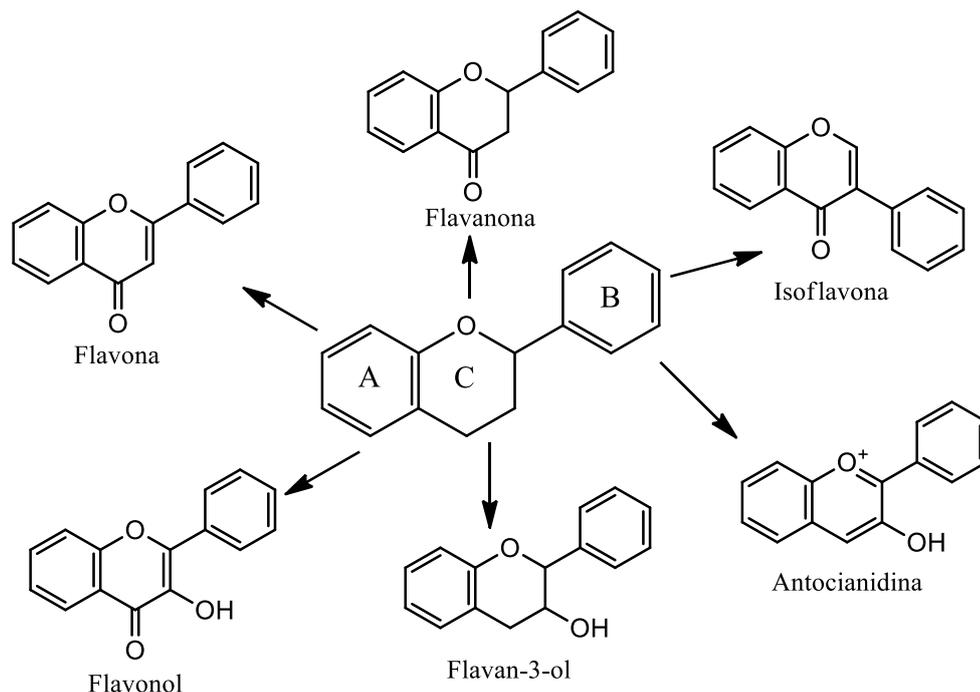
3.2.3 Flavonoides e atividade anti-inflamatória

Os flavonoides representam uma das classes de substâncias fenólicas mais importantes. São diversificados entre os produtos de origem vegetal e estão amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo encontrados em diversas partes anatômicas das plantas, especialmente as partes aéreas. A estrutura química dos flavonoides está baseada no núcleo *flavilium*, o qual consistem

em 15 átomos de carbono com arranjo estrutural do tipo C6-C3-C6, ou seja, composto por dois anéis aromáticos (A e B), conectados por uma ponte de três carbonos, formando um anel heterocíclico (anel C) (Figura 3) (MACHADO *et al.*, 2008). Mais de 15.000 compostos identificados são agrupados em, relativamente, poucas subclasses de flavonoides, com base em seu esqueleto e/ou origem biossintética. As principais subclasses são as flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavan-3-óis e antocianinas (DIAS *et al.*, 2021; SAJID *et al.*, 2021).

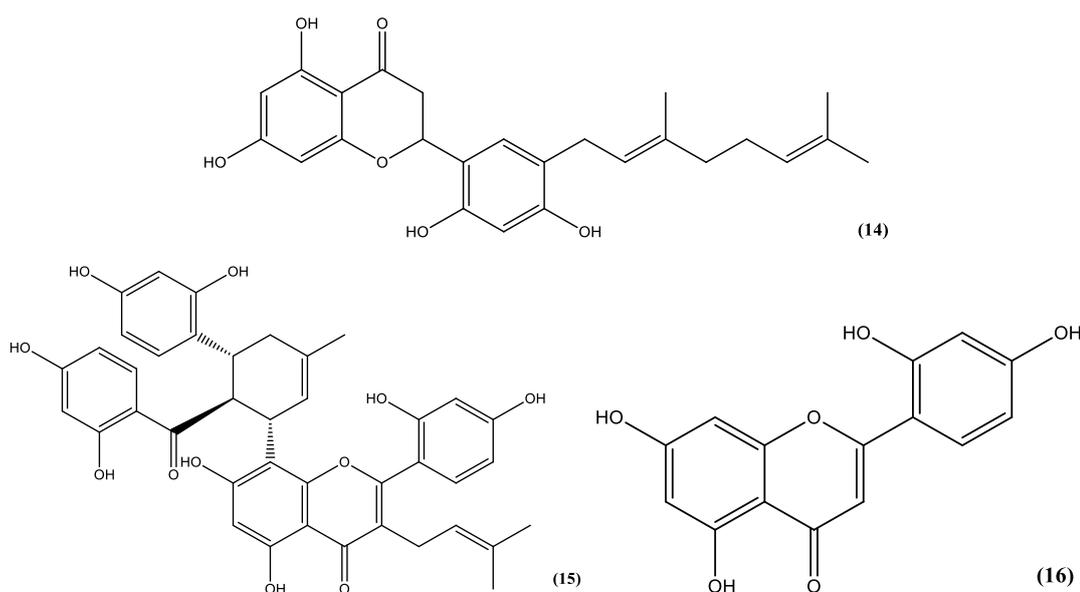
Os flavonoides apresentam grande interesse científico. Diversas atividades biológicas vêm sendo investigadas, tais como, atividades antialérgica, antiviral (JO *et al.*, 2019; LANI *et al.*, 2016), antimicrobiana (SILVA *et al.*, 2018) antifúngica (ABOODY *et al.*; 2020), anti-inflamatória (OLIVEIRA *et al.*, 2012) e vasodilatadora (LIMA *et al.*, 2012). Esses efeitos biológicos são atribuídos principalmente à propriedade de proteção contra a peroxidação lipídica por íons metálicos eliminadores ou atuação como quelantes de radicais livres responsáveis pela geração de espécies reativas, capazes de danificar uma ampla gama de biomoléculas essenciais (VIEIRA *et al.*, 2011).

Figura 3: Estrutura básica dos flavonoides e subclasses



Taguchi e colaboradores (2015) relataram redução na inflamação pulmonar, induzida por administração intranasal de elastase, após tratamento com a sakuranetina (**1**) (20 mg/kg, via intranasal), uma flavanona metoxilada isolada das partes aéreas de *Baccharis retusa*. Os autores relataram redução no edema alveolar, na deposição de fibras elásticas e de colágeno, além de redução dos níveis de citocinas, especialmente TNF e IL-1 β . Um possível mecanismo proposto para a atividade anti-inflamatória observada para a sakuranetina foi a regulação da ativação do NF- κ B, diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias. Santana e colaboradores (2019), também avaliaram o efeito anti-inflamatório da sakuranetina (**1**) *in vitro* em células RAW 264.7 estimuladas por LPS, e *in vivo* em modelo de inflamação alérgica crônica. Observou-se que esse flavonoide, nas concentrações 10, 20 e 50 μ g/mL, reduziu os níveis de óxido nítrico, IL-1 β e IL-6 na análise *in vitro*. Na avaliação *in vivo*, o tratamento com sakuranetina, pela via intranasal, na dose 20 mg/kg reduziu os níveis séricos de IgE, a inflamação pulmonar (migração de eosinófilos, neutrófilos e liberação de citocinas IL-13, IL-4 e RANTES) e produção de muco epitelial respiratório em animais sensibilizados com ovalbumina.

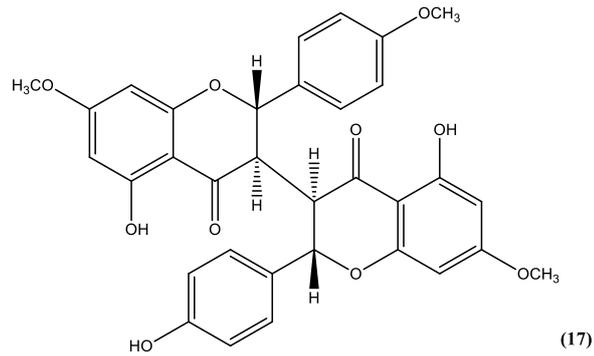
Lim e colaboradores (2013) observaram que o extrato de etanólico das cascas da raiz de *Morus alba* inibiu os sintomas semelhantes à bronquite em modelo de inflamação das vias aéreas induzida por LPS em camundongos. Os flavonoides isolados, kuwanona E (**14**), kuwanona G (**15**) e norartocarpanona (**16**), inibiram significativamente a produção de IL-6 nas células epiteliais do pulmão (A549) e a produção de NO nos macrófagos pulmonares (MH-S).



As mansoninas A, B e F, flavanonas heterotriméricas glicosiladas isoladas dos frutos de *Mansoa hirsuta* apresentaram inibição significativa na liberação de TNF em células THP-1 estimuladas por LPS, (CI₅₀ 48,1 \pm 1,8; 20,0 \pm 1,4; 19,3 \pm 1,3 μ M, respectivamente). Investigação preliminar

demonstrou que as mansoninas A e F foram capazes de inibir a fosforilação da subunidade p-65 do NF- κ B, indicando provável inibição da via de sinalização do NF- κ B (CAMPANA *et al.*, 2014; CAMPANA *et al.*, 2016).

A biflavanona metoxilada ourateina D (**17**), isolada do extrato de cascas de *Ouratea spectabilis*, apresentou inibição seletiva sobre a liberação da citocina CCL-2 em células THP-1 estimuladas por LPS, na concentração 10 μ M (ROCHA *et al.*, 2020).



4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Agitador magnético e chapa aquecedora Corning, modelo 6796-220.
- Autoclave vertical analógica.
- Balança analítica Metler, modelo AB 204.
- Balança analítica Sartorius, modelo BP 211D.
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000.
- Banho-maria Fanem, modelo 146.
- Banho ultratermostático Servylab, modelo MCT 100 plus.
- 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.
- Coluna para HPLC LiChrospher® 100 RP18, 150 × 4,6 mm d.i; com partículas de 5µm – Merck; com pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (10 × 4,6 mm d.i.), partículas de 5 µm - Merck.
- Coluna analítica para UPLC BEH C-18 (2,1 × 50 mm d.i.), partículas de 1,7 µm; Acquity - Waters.
- Coluna preparativa para HPLC em escala preparativa C-18 (250 × 21, 5 mm), partículas de 7 µm, Zorbax, Agilent.
- Destilador de água Fabbe, modelo A 95.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Ascend™ – 600 MHz.
- Espectrômetro ultravioleta-visível, com feixe duplo, HITACHI, modelo U-2900.
- 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 Thermo Scientific™, modelo Varioskan Lux, com software SkanIt.
- Liofilizador de bancada Liotop, modelo L101.
- Microcentrífuga Quimis, modelo Q222E14.

- Micropipetas HTL, vol. ajustável de 0,5 - 10 µL; 10 - 100 µL; 20 - 200 µL e 100 - 1000 µL.
- Microscópio invertido, modelo CKX41, Olympus.
- Phmetro Metrohm, modelo 827 pH lab.
- Pipetador multicanal automático 10 - 200 µL, Transferpette®.
- Purificador de água Milli-Q Plus – Direct-Q 3 Millipore.
- Sistemas de imagem celular EVOS, ThermoFisher Scientific.
- Sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) Waters® 2695, constituído por injetor automático, detector de conjunto de fotodiodo (PDA) 2996, bomba quaternária L-6200^a com degaseificador de linhas, e sistema computadorizado operado pelo programa Empower, Waters®.
- Sistema de cromatografia a líquido de ultra eficiência (UPLC) - Waters®, composto por detector de conjunto de fotodiodo (PDA) e espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização por *electrospray* (ESI), analisador de massas do tipo quadrupolo e sistema computadorizado operado pelo programa MassLynx.
- Soprador térmico serigráfico Steinel, modelo HL-500.
- Ultrafreezer Liobras.
- Vórtex Mixer, Vixar.

4.2 Solventes e reagentes

- 2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich.
- Ácidos grau P.A.: ácido sulfúrico e ácido clorídrico, Merck.
- Ácido grau HPLC: ácido fórmico, Sigma-Aldrich.
- Albumina de soro bovino (BSA), Sigma-Aldrich.
- Bicarbonato de sódio, Sigma-Aldrich.
- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich.
- Dexametasona, Sigma-Aldrich.
- Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), Sigma.
- Kit ELISA IL-1 β humano, DY201 Duo Set, R&D Systems.
- Kit ELISA IL-6 humano, DY206 Duo Set, R&D Systems.
- Kit ELISA TNF- α humano, DY210 Duo Set, R&D Systems.
- Lipopolissacarídeo (LPS), Sigma-Aldrich.

- Meio de cultura RPMI-1640, R4130, Sigma-Aldrich.
- *orto*-Fenilenodiamina (OPD), Sigma-Aldrich.
- Pastilhas de tampão fosfato salino, Sigma-Aldrich.
- Peróxido de hidrogênio P.A., Sigma-Aldrich.
- Sílica gel 60 G, Sigma-Aldrich.
- Sílica gel 60, 230-400 mesh, Merck.
- Solventes grau HPLC: acetonitrila e metanol, Tedia.
- Solventes grau padrão analítico (P.A.): acetato de etila, acetona, diclorometano, dimetilsulfóxido, etanol, hexano, hidróxido de sódio, metanol, tolueno.
- Soro fetal bovino, Gibco, Invitrogen.
- Thiazolyl Blue Tetrazolium, Sigma-Aldrich.
- Tween 20, Synth.

4.3 Vidrarias e materiais diversos

- Balão de vidro de fundo redondo com junta esmerilhada, 500 e 1000 mL.
- Becker graduado de diferentes tamanhos.
- Borrifador de vidro.
- Câmara de Neubauer, Labor Optik.
- Capilar para aplicação em CCD.
- Contador manual numérico 4 dígitos.
- Cromatoplasmas de vidro de 5 × 10 cm e 10 × 10 cm.
- Cromatofolhas, Alugram XTRA SIL. Gel 60 UV254, Macherey-Nagel.
- Cubas cromatográficas de vidro Pirex.
- Erlenmeyer graduado de diferentes tamanhos.
- Frascos de cintilação de vidro âmbar de 20 mL.
- Frascos para cultura celular com tampa com filtro, não tratados, de 25 e 75 cm², Corning.
- Kitazato, 250 mL.
- Microplaca de 24 poços para cultivo celular, K12-024, Kasvi.
- Microplaca de 96 poços para cultivo celular, K12-096, Kasvi.
- Microplaca de 96 poços para imunensaio, Nunc F, MaxiSorp, Invitrogen.

- Microtubo plástico de 2 mL e 1,5 mL do tipo *safe-lock*, Kasvi.
- Pipetas sorológicas descartáveis, estéreis, de 2 mL, 5 mL, 10 mL e 25 mL, Sarstedt.
- Placa de toque de porcelana.
- Ponteiras plásticas, Sarstedt.
- Seringas e agulhas de diferentes dimensões.
- Sistema de filtração esterilizante, descartável, membrana de 0,22 µm, capacidade para 500 mL e 1000 mL, Corning.
- Tubos criogênicos com rosca de 2 mL, Olen.
- Tubos de ensaio de vidro para coletor de frações.
- Tubos de plásticos em polipropileno com volumes de 15 e 50 mL, Kasvi.
- Tubos para RMN Eco 300-600mhz, 7 polegadas, 178 × 5 mm d.i.
- *Vials* de vidro com tampa e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de HPLC e UPLC-MS, Waters.

4.4 Reveladores para cromatografia em camada delgada (CCD)

- Reagente anisaldeído (WAGNER & BLANDT, 1996):
Misturaram-se, lentamente, 0,5 mL de anisaldeído, 10,0 mL de ácido acético glacial, 85,0 mL de metanol e 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, sob resfriamento, nesta ordem.
- Reagente de produtos naturais/polietilenoglicol – NP/PEG (WAGNER & BLANDT, 1996):
1º Reagente: solução metanólica com 1% de 2-aminoetil difenilborinato (m/v); mantido sob resfriamento
2º Reagente: solução etanólica com 5% de polietilenoglicol (m/v).

4.5 Coleta e Identificação botânica

As espécies de *Baccharis* empregadas nesse trabalho foram coletadas pelo professor Dr. Geraldo Wilson Fernandes, do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais, no Parque Nacional do Itatiaia (RJ/MG), e identificadas pelo pesquisador Dr. Gustavo Heiden da Embrapa Clima Temperado (ECT), Pelotas. As exsiccatas foram depositadas no Herbário ECT e os respectivos números de identificação estão dispostos no Quadro 1. O acesso ao Patrimônio Genético (PG) foi cadastrado

no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A5BF5D0.

Quadro 1: Amostras de espécies do gênero *Baccharis*.

Número exsicata	Espécie	Parte da Planta
ECT 5934	<i>Baccharis grandmucromata</i>	Caule
		Folha
ECT 5931	<i>Baccharis itatiaiae</i>	Caule
		Folha
ECT 5937	<i>Baccharis máxima</i>	Caule
		Folha
ECT 5928	<i>Baccharis montana</i>	Caule
		Folha
ECT 5917	<i>Baccharis myriocephala</i>	Partes aéreas
ECT 5930	<i>Baccharis oblongifolia</i>	Caule
		Folha
ECT 5919	<i>Baccharis oreophila</i>	Caule
		Folha
ECT 5911	<i>Baccharis phyllicifolia</i>	Caule
		Folha
ECT 5929	<i>Baccharis pseudomyriocephala</i>	Caule
		Folha
ECT 5944	<i>Baccharis regnellii</i>	Caule
		Folha
ECT 5950	<i>Baccharis stylosa</i>	Caule
		Folha
ECT 5942	<i>Baccharis uncinella</i>	Caule
		Folha

4.6 Preparo do Material Vegetal

As amostras vegetais 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 23 materiais vegetais, oriundos de 12 espécies.

4.7 Obtenção dos extratos

A obtenção dos extratos foi realizada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa. Para tal, pesou-se aproximadamente 7,0 g de cada material vegetal previamente seco e pulverizado. A extração foi realizada por maceração assistida por sonicação (ciclo de 15 min), empregando-se etanol a 96 °GL (21 mL), seguida de centrifugação (227 × g, 7 min) e filtração do sobrenadante em papel de filtro. Foram realizados três ciclos extrativos para cada material vegetal. Os

extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar devidamente identificados e o etanol foi eliminado em temperatura ambiente em capela de exaustão de gases. A água residual foi eliminada em liofilizador e os extratos foram mantidos em dessecador sob pressão reduzida. O rendimento extrativo foi calculado e os resultados estão dispostos na **Tabela 1**.

Todos os extratos foram avaliados quanto à capacidade de inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias em células THP-1 estimuladas por LPS *in vitro*, conforme descrito no item 5.2. Os resultados obtidos permitiram selecionar as espécies para continuação do trabalho fitoquímico.

Tabela 1: Rendimento extrativo dos extratos etanólicos de espécies *Baccharis* obtidos por maceração assistida por sonicação.

Espécie	Parte da planta	Droga vegetal (g)	Extrato obtido (g)	Rendimento (% m/m)
<i>B. grandmucromata</i>	Caules	7,008	0,159	2,268
<i>B. itatiaiae</i>	Caules	7,009	0,575	8,202
<i>B. máxima</i>	Caules	7,009	0,140	2,003
<i>B. montana</i>	Caules	7,005	0,158	2,260
<i>B. myriocephala</i>	Partes aéreas	7,004	0,364	5,193
<i>B. oblongifolia</i>	Folhas	7,010	0,299	4,262
<i>B. oreophila</i>	Caules	7,002	0,074	1,051
<i>B. phyllicifolia</i>	Caules	7,017	0,158	2,256
<i>B. pseudomyriocephala</i>	Caules	7,018	0,244	3,482
<i>B. regnelli</i>	Caules	7,003	0,113	1,614
<i>B. stylosa</i>	Caules	7,002	0,249	3,562
<i>B. uncinella</i>	Caules	7,011	0,194	2,769

4.8 Obtenção e fracionamento dos extratos das espécies bioativas

A partir dos resultados obtidos para os extratos nos ensaios de inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios *in vitro* (item 5.2), os materiais vegetais de *B. oblongifolia* (folhas, 200 g), *B. oreophila* (caule, 50 g) e *B. myriocephala* (partes aéreas, 150 g) foram submetidos a 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 2).

Tabela 2: Rendimento dos extratos de *B. oblongifolia*, *B. oreophila* e *B. myriocephala* obtidos por percolação.

Espécie	Parte da planta	Material vegetal (g)	Extrato obtido (g)	Rendimento (%)
<i>B. oblongifolia</i>	Folhas	200,0	26,37	13,18
<i>B. oreophila</i>	Caule	50,0	4,65	9,3
<i>B. myriocephala</i>	Partes aéreas	150,0	17,13	11,42

Posteriormente, esses extratos foram avaliados quanto à inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios *in vitro*, e o extrato etanólico de partes aéreas de *B. myriocephala* foi submetido ao fracionamento rápido em sílica gel, empregando eluição com solventes de polaridades crescentes (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol/água 1:1). Para tanto, uma porção de aproximadamente 2,0 g do extrato etanólico de *B. myriocephala* foi solubilizada em 3,0 mL de MeOH em banho ultrassom. Em seguida, essa mistura foi incorporada à 5,0 g de sílica gel 60 (0,04-0,063 mm/ 230-400 mesh; Sigma-Aldrich). Na sequência, um funil de placa sinterizada foi empacotado com 35,0 g da mesma sílica e a amostra incorporada em sílica foi depositada no topo do funil. A eluição ocorreu sequencialmente com 4 porções de 50 mL de cada solvente empregado. As frações foram coletadas separadamente e mantidas em capela de exaustão para evaporação de seus respectivos solventes. Para a fração metanol/água foi necessário utilizar o evaporador rotativo para eliminar o metanol, em seguida a solução foi congelada no ultrafreezer por 24h e liofilizada para a eliminação da água. Esse processo foi repetido 5 vezes e o rendimento foi calculado (Tabela 3).

Tabela 3: Rendimento das frações obtidas por filtração do extrato etanólico de *B. myriocephala* em sílica gel.

	Extrato	Fr. Hexano	Fr. DCM	Fr. EtOAc	Fr. MeOH:H₂O
Massa (mg)	10.000	2,0	246,5	1300,5	3254,5
Rendimento (%)	-	0,02	2,46	13,0	32,5

Legenda: Fr: fração; DCM: diclorometano; EtOAc: acetato de etila; MeOH: metanol; H₂O: água.

4.9 Caracterização cromatográfica do extrato e das frações de *B. myriocephala*.

O extrato etanólico de *B. myriocephala* e as frações obtidas foram avaliados por cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel (tipo G, sem indicador de fluorescência; Sigma-Aldrich) empregando diferentes fases móveis e reveladores até encontrar a melhor condição de

análise para cada amostra. Para essa análise, uma pequena porção de cada amostra foi solubilizada em metanol em uma placa de toque e aplicada em cromatofolha de alumínio de sílica gel 60 com indicador de fluorescência. A eluição foi feita com tolueno/acetona/metanol (6:3:1) e para revelação utilizou-se anisaldeído ou NP/PEG (MEDIC-SARIC, 2004).

Em seguida, o perfil cromatográfico das amostras foi obtido empregando a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (HPLC), utilizando sistema HPLC (Waters® 2695), com detector de conjunto de fotodiodos (PDA - Waters® 2996). Utilizou-se a coluna LiChrospher® 100 RP18 (150 × 4,6 mm; 5 µm, Merck) e pré-coluna (10 × 4,6 mm; 5 µm, 100 Å, Merck). O volume de injeção das amostras foi de 10 µL, na concentração de 1 mg/mL em MeOH grau HPLC. Para solubilização, a amostra foi mantida em banho de ultrassom por 10 minutos, centrifugada à 10.000 rpm (6708 × g) por 5 minutos e transferida para um *vial*. O fluxo de eluição foi de 1 mL/min, sendo a fase móvel constituída por água deionizada e acetonitrila (ACN), ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico. A eluição foi realizada com gradiente linear de 5% a 95% de ACN em 60 minutos, seguida por 10 minutos em modo isocrático à 95% ACN para limpeza da coluna e 5 minutos para retornar à condição inicial. Foi guardado um intervalo de 10 minutos entre as corridas para re-equilíbrio da coluna nas condições iniciais de análise.

4.10 Refracionamento da fração EtOAc de *B. myriocephala* por HPLC em escala preparativa

A fração EtOAc, obtida do fracionamento rápido em sílica gel do extrato etanólico de partes aéreas de *B. myriocephala*, 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 (Agilent Prep-C18; 21,2 × 250 mm, 10 µm). O volume de injeção das amostras foi de 1000 µL, na concentração de 20 mg/mL em MeOH grau HPLC. Para a solubilização, a amostra foi mantida em banho de ultrassom por 10 minutos, centrifugada 6708 × g por 5 minutos, filtrada em membrana de politetrafluoretileno não estéril (0,22 µm, 13mm, Allcrom) e transferida para um *vial*. O fluxo de eluição foi de 10 mL/min e a detecção foi realizada em dois comprimentos de onda, 280 e 330 nm. O eluente utilizado foi água deionizada (A) e acetonitrila (B), empregando-se o gradiente descrito na **Tabela 4**. A coleta das frações foi realizada manualmente e baseada nos tempos de retenção dos picos detectados no cromatograma. Esse procedimento foi repetido 30 vezes, totalizando 610 mg de massa injetada. As frações obtidas foram reunidas e o solvente orgânico foi eliminado em evaporador rotativo sobre pressão reduzida, à temperatura máxima de 50 °C e, sequencialmente, liofilizadas. As massas e os rendimentos obtidos foram calculados (Tabela 5).

Tabela 4: Gradiente de eluição empregado nas análises por HPLC em escala preparativa.

Tempo (min)	A%	B%
0	65	35
25	25	75
27	5	95
33	5	95
35	65	35

A: água; B: acetonitrila

Tabela 5: Rendimento das frações obtidas no refração da fração EtOAc oriunda do extrato etanólico de partes aéreas de *B. myriocephala* por HPLC em escala preparativa.

Banda	Código	Tempo (min)	Massa (mg)	Rendimento (% m/m)
Pico 1A	Flav1A	11,04	1,33	0,21
Pico 1B	Flav1B	11,81	1,56	0,25
Pico 2	Flav2	14,63	59,69	9,78
Pico 3	Flav3	18,81	23,38	3,83

4.11 Obtenção dos perfis cromatográficos por UPLC-PDA-ESI-MS

O extrato de partes aéreas de *B. myriocephala*, as frações obtidas e substâncias isoladas por HPLC em escala preparativa foram submetidas à caracterização por UPLC acoplada a detector PDA em interface com espectrômetro de massas (MS) com analisador triplo quadrupolo e fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Para obtenção dos perfis cromatográficos, empregou-se coluna de fase reversa (Acquity BEH C18; 50 × 2,1 mm, 1,7 μm), detecção no PDA com varredura de 200-500 nm, fluxo de 0,3 mL/min e temperatura da coluna de 40 °C. A detecção no espectrômetro de massas foi realizada em modo exploratório (*Scan*) e foi monitorada uma faixa de massas de 100 a 1000 Daltons com ionização nos modos positivo e negativo.

O eluente utilizado foi água deionizada (A) e acetonitrila (B), ambos acidificados com 0,1% de ácido fórmico, empregando-se o gradiente descrito na **Tabela 6**. O volume de injeção das amostras foi de 3 μL, na concentração de 1 mg/mL para o extrato e as frações e 0,5 mg/mL para os constituintes isolados. Para a solubilização (MeOH grau HPLC), as amostras foram pesadas em microtubos plásticos do tipo *safe-lock* e mantidas em banho de ultrassom por 10 minutos,

centrifugadas à $6708 \times g$ por 5 minutos, filtrada em membrana de politetrafluoretileno não estéril (0,22 μm , 13 mm, Allcrom) e transferidas para *vials* devidamente identificados.

Tabela 6: Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-MS

Tempo (min)	A%	B%
0	95	5
10	5	95
10,50	95	5
13	95	5

A: água; B: acetonitrila; ambos 0,1% ácido fórmico

4.12 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C com experimentos mono e bidimensionais foram obtidos no Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em espectrômetro Bruker Ascend™, operando a 600 MHz, pelo Prof^o José Dias de Souza Filho. Para as análises, 15 mg de Flav2 e Flav3 foram pesados em microtubos plásticos do tipo *safe-lock* 1,5 mL, solubilizados em DMSO deuterado (600 μL) e transferidos para os tubos de RMN. O processamento dos espectros foi realizado utilizando programa TopSpin® 4.1.4 (TopSpin® Bruker Software, EUA).

4.13 Ensaios biológicos

4.13.1 Cultivo celular

Para os ensaios *in vitro*, foram utilizadas células THP-1 (linhagem tumoral monocítica humana, ATCC TIB-202) cultivadas em frascos estéreis contendo meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco). O meio de cultura foi substituído a cada três ou quatro dias, de acordo com a densidade de células, que era diariamente observada e monitorada em microscópio invertido visando o acompanhamento da morfologia e de possíveis efeitos citopáticos.

4.13.1.1 Descongelamento celular

A linhagem celular de monócitos humanos THP-1 foi mantida em tubos criogênicos, contendo 1×10^6 células/mL de DMSO, em um tanque de nitrogênio líquido. Os criotubos foram deixados à temperatura ambiente até completo descongelamento. Na sequência, as células

foram transferidas para frasco estéril de crescimento de 25 cm² contendo 5 mL de RPMI e 20% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em incubadora, cuja atmosfera era de 5% de dióxido de carbono (CO₂) à temperatura de 37 °C durante 24 horas. No dia seguinte, as células foram transferidas para um tubo de polipropileno (tipo Falcon) de 15 mL e centrifugado a 1000 rpm (101 × g) por 5 minutos para a retirada do criopreservador.

4.13.1.2 Contagem celular utilizando azul de Tripán

Para a contagem do número de células, a suspensão celular aspirada das garrafas de cultivo foi transferida para tubo tipo Falcon estéril e centrifugada à 101 × g por 5 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspense em 10 mL de meio RPMI à 10% SFB. Na sequência, 100 µL da suspensão celular foi homogeneizado em 100 µL do corante azul de Tripán (0,3%) e uma alíquota de 10 µL foi colocada na câmara de Neubauer para a realização da contagem. O fundamento desse método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido à formação de poros na membrana, o que permite a penetração do corante e assim as células não viáveis exibem coloração azul após tratamento.

4.13.2 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das células foi avaliada empregando-se brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) conforme descrito por Mosman (1983). O ensaio colorimétrico baseia-se na redução do MTT, um sal tetrazólico, o qual após incubado com células viáveis, é reduzido por ação de enzimas mitocondriais, como a succinato-desidrogenase, alterando sua coloração de amarelo para violeta (formazan). Considera-se que a quantidade de cristais de formazan formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

As células foram semeadas em microplacas de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^4 células/poço em meio RPMI contendo 10% (v/v) de SFB, perfazendo um volume final de 100 µL por poço. As células monocíticas foram diferenciadas em macrófagos pela adição forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, 20 ng/mL/poço) e incubadas em estufa umidificada à 37 °C e 5% de CO₂ para a aderência. Após 24 horas, o sobrenadante foi descartado, e adicionados 100 µL das soluções de extrato ou frações das plantas preparadas nas concentrações 10, 30 e 90 µg/mL em meio RPMI contendo 2,0 % de SFB (0,1% DMSO). As placas foram então incubadas novamente nas mesmas condições por 20 h. Decorrido o tempo de incubação, os sobrenadantes foram descartados e os poços lavados com PBS duas vezes. Foram adicionados 100 µL/poço

da solução de MTT em RPMI (0,5 mg/mL) e incubadas por 4h, vedadas com papel alumínio. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO), para dissolução dos cristais de formazan e a densidade óptica foi medida usando um leitor de microplacas Varioskan Lux a 570 nm. A atividade de redução do MTT foi expressa em porcentagem da absorbância das células tratadas em relação a absorbância das células não tratadas. Foi realizado três replicatas biológicas, cada uma com hexaplicatas experimentais. As amostras induziram redução na viabilidade celular inferior a 10% foram consideradas não tóxicas, assim, elegíveis para a avaliação de seus efeitos sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada com base na fórmula abaixo.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância das células tratadas}}{\text{Média absorbância controle}} \times 100$$

4.13.3 Ensaios *in vitro* de inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios

Após a contagem celular (item 4.13.1.2), 400 µL de suspensão celular na densidade de 1×10^6 células/poço foram transferidas para microplaca de 24 poços. A placa foi incubada por 18 horas sob as mesmas condições descritas anteriormente. Findo este período, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados com PBS por duas vezes. Foram adicionados 380 µL das soluções dos extratos etanólicos das espécies de *Baccharis* na concentração 30 µg/mL ou dexametasona 10 µM (Sigma-Aldrich) utilizada como controle positivo. As placas foram incubadas à 37 °C por 3 horas e, na sequência, foi adicionada uma alíquota de 20 µL de solução de LPS na concentração final de 100 ng/mL (YANG et al., 2016). As placas permaneceram em incubação por 18 horas. Então, o sobrenadante foi retirado para quantificação dos mediadores pró-inflamatórios por ELISA e as células aderidas foram utilizadas para avaliação da viabilidade celular. Os kits de ELISA para determinação de TNF, IL-1β e IL-6 humano foram obtidos da R&D Systems e utilizados de acordo com os procedimentos descritos pelo fabricante. Esse procedimento também foi realizado com as frações obtidas a partir do extrato vegetal, nas concentrações 30 µg/mL e com substâncias isoladas, nas concentrações 3, 10 e 30 µM.

4.13.3.1 Protocolo de ELISA

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100 µL/poço do anticorpo de captura de TNF, IL-1β (4 µg/mL) e IL-6 (2 µg/mL), solubilizados em PBS estéril. A placa foi mantida à 4 °C durante 24 horas (overnight). Após a incubação, as placas foram lavadas (5 vezes) com

tampão de lavagem (PBS/Tween 20 0,1% v/v) em um lavador de placas automático. Após as placas serem completamente secas, adicionou-se 100 µL/poço da solução de tampão de bloqueio, reservou-a por 1:30 h em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, as placas foram lavadas e secas conforme já descrito e, em seguida, foi adicionado 100 µL/poço das amostras ou dos padrões disponíveis nos kits da R&D Systems. As placas foram novamente incubadas por 24h à 4 °C. Seguindo o terceiro dia de ensaio, as placas foram novamente lavadas e secas, adicionou-se 100 µL/poço do anticorpo de detecção TNF, IL-6 (50 ng/mL) e IL-1 β (200 ng/mL) e manteve-se as placas por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e secas, e adicionou-se 100 µL/poço de estreptavidina e aguardou-se 20 minutos. Na sequência, realizou-se a última lavagem e secagem das placas e adicionou-se 100 µL/poço de *orto*-fenilenodiamina (OPD) em tampão citrato (0,4 mg/mL) e 0,02% (v/v) de peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após observar a conversão do substrato incolor em um produto cromogênico amarelo, adicionando 50 µL/poço de ácido clorídrico 1 mol/L. O produto de oxidação do OPD foi detectado em leitor de microplacas em 492 nm. A concentração de TNF, IL-6 e IL-1 β foi calculada pela utilização da curva de calibração construída para cada citocina.

4.13.4 Ensaios *in vitro* da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

A determinação dos níveis intracelulares de EROs em células THP-1 estimuladas por LPS foi realizada pela sonda diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA, 5 µM), um éster não-fluorescente, que quando internalizado pelas células sofre ação de esterases intracelulares resultando na formação de um composto intermediário (DCFH) que pode ser oxidado pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) formando o composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF) (HIRABAYASHI *et al.*, 1985). Após a contagem celular (item 4.13.2), 100 µL de suspensão celular foram semeados em placa de cultura celular de 96 poços na concentração de 5×10^4 células/poço em meio RPMI contendo 10% de SFB, adicionando PMA (20 ng/mL). A placa foi incubada em estufa umidificada à 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas para a aderência das células. Após, o sobrenadante foi descartado, as células foram pré-tratadas por 3 horas com 90 µL das frações obtidas em DCM, EtOAc e MeOH/H₂O nas concentrações 10 e 30 µg/mL ou dexametasona 10 µM como controle positivo. Após o período de tratamento, foi adicionado uma alíquota de 10 µL de solução de LPS em concentração final de 100 ng/mL. A placa foi incubada por 24 horas e posteriormente foi lavada duas vezes com PBS. Em seguida, foi adicionado 100 µL de solução diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína em meio RPMI sem fenol, protegida da luz, e incubada por 30 min para a leitura. Após, a placa foi novamente lavada com

PBS e foi adicionado 100 μ L de RPMI sem fenol para leitura. A fluorescência de DCF em células foi detectada em comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 535 nm utilizando um leitor de microplacas de fluorescência (Synergy, Biotek InstrumentsTM, Vermont, USA). A produção de EROs foi expressa em porcentagem em relação ao controle positivo (100%) e as placas foram analisadas por microscópio de imunofluorescência pelo sistema de imagem celular EVOS.

4.14 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e a diferença entre os grupos foi avaliada por ANOVA seguida de testes de comparação múltipla de Dunnett's. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa *Prism GraphPad* 8.0 (GraphPad Software Inc., EUA). Os resultados foram considerados significativamente distintos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, inicialmente, realizou-se uma triagem com 12 extratos etanólicos de *Baccharis* ocorrentes no Parque Nacional do Itatiaia (MG) (Tabela 1). Os extratos foram avaliados quanto a citotoxicidade nas concentrações 10, 30 e 90 μ g/mL, pelo método do MTT em células THP-1. Após avaliar a viabilidade celular, 10 extratos foram selecionados para avaliar *in vitro* o potencial anti-inflamatório.

5.1 Avaliação do efeito dos extratos de *Baccharis* sobre a viabilidade de células THP-1

O efeito dos 12 extratos vegetais, provenientes de caules, folhas ou partes aéreas de espécies diferentes de *Baccharis* (Tabela 1, pág. 38) sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios foi avaliado *in vitro*. Inicialmente, avaliou-se a citotoxicidade dos extratos frente à linhagem THP-1. O ensaio de citotoxicidade baseou-se na redução do MTT, no qual as células foram tratadas com os extratos nas concentrações 10, 30 e 90 μ g/mL para análise indireta da viabilidade celular (Figura 4). Apenas dois extratos, *B. pseudomyriocephala* e *B. uncinella* que apresentaram viabilidade celular inferior a 80% em mais de uma concentração avaliada e foram, portanto, consideradas tóxicas e não elegíveis para a realização do ensaio de quantificação de citocinas pró-inflamatórias. Alguns extratos foram tóxicos apenas na maior concentração (90 μ g/mL), logo, 30 μ g/mL foi a concentração padronizada para avaliação da inibição da liberação de citocinas.

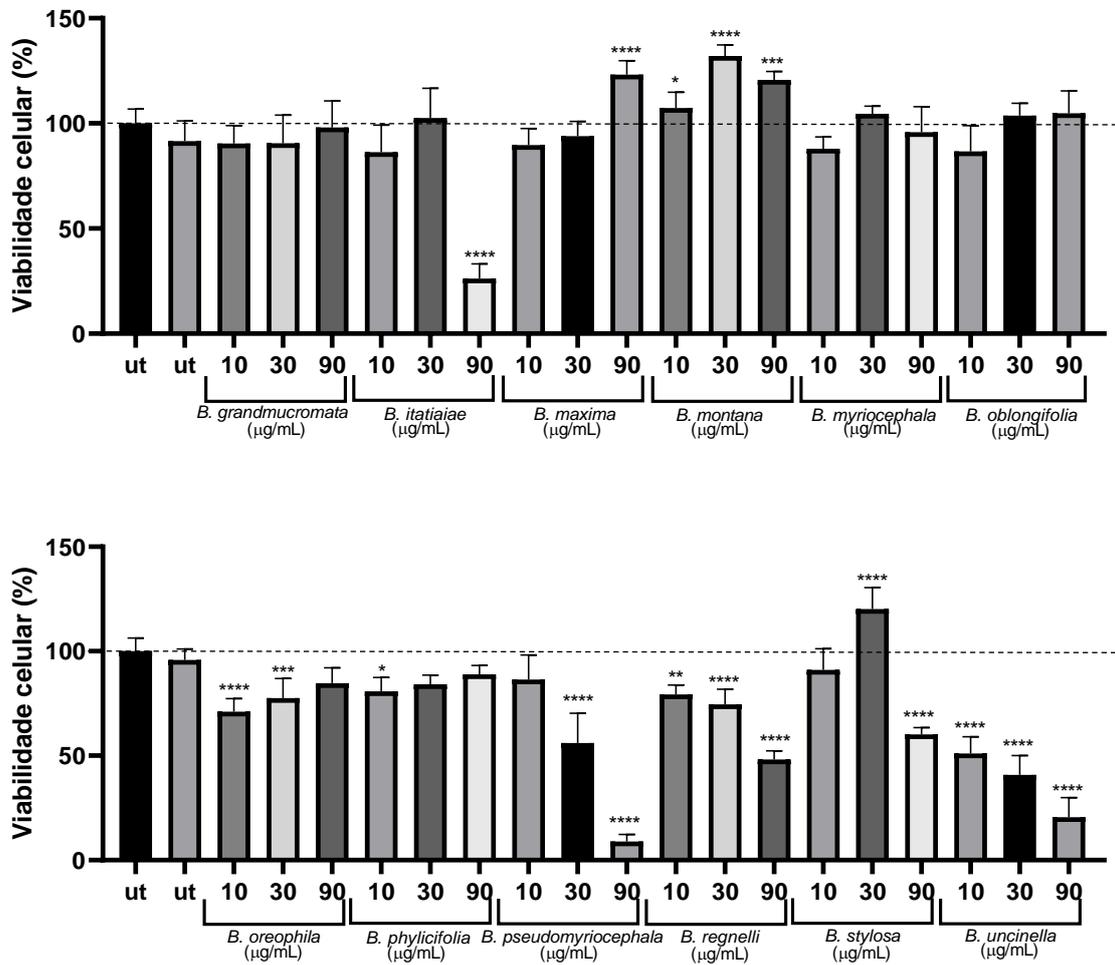


Figura 4: Viabilidade das células THP-1 tratadas com o extrato etanólico de 12 espécies de *Baccharis*. Os dados representam a média \pm DP em hexaplicata. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,5$ comparando com o veículo (DMSO+EtOH 1:4)

5.2 Efeito de extratos e frações sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios *in vitro*

O potencial anti-inflamatório de algumas espécies de *Baccharis* foi demonstrado em modelos *in vitro* e *in vivo* (OLIVEIRA *et al.*, 2012; PAUL *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2018). Os 10 extratos etanólicos que apresentaram viabilidade celular superior a 80% pelo método do MTT na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, foram avaliados quanto ao potencial de inibição da liberação das citocinas IL-1 β e TNF *in vitro* em células THP-1 estimuladas por LPS.

As células THP-1 foram pré-tratadas com os extratos (30 µg/mL) ou dexametasona (10 µM) por três horas e em seguida estimuladas com LPS (100 ng/mL). Após 18 horas de incubação, o sobrenadante foi retirado para quantificação dos mediadores pró-inflamatórios.

Dentre os dez extratos avaliados, os extratos de *B. oblongifolia*, *B. oreophila*, *B. myriocephala*, *B. regnelli* e *B. stylosa* apresentaram inibição significativa (> 40%) na liberação de IL-1β, sendo o maior percentual de inibição observado para o extrato de *B. stylosa*, reduzindo em 64,6 ± 5,5% a liberação desta citocina. Já para TNF, os extratos de *B. montana*, *B. oblongifolia*, *B. oreophila* e *B. myriocephala* apresentaram inibição superior a 40%, sendo o maior percentual de inibição observado para o extrato de *B. oblongifolia*, com inibição máxima de 92,3 ± 5,2%. Com base nesses resultados, as espécies *B. oblongifolia*, *B. oreophila* e *B. myriocephala* foram selecionados para avaliação do efeito sobre a liberação de IL-6 (Figura 5). Os extratos etanólicos de folhas de *B. oblongifolia*, caule de *B. oreophila* e partes aéreas de *B. myriocephala* inibiram significativamente a liberação de IL-6 em células THP-1 estimuladas por LPS, promovendo 89,8 ± 0,67%, 61,0 ± 5,49% e 89,4 ± 0,93% de inibição, respectivamente. Os valores de redução da liberação das citocinas pró-inflamatórias estão resumidos na **Tabela 7**, e provavelmente estão relacionadas aos constituintes fenólicos, uma vez que as substâncias com atividade anti-inflamatória relatadas para as espécies do gênero *Baccharis* são polifenólicas, como ácidos fenólicos, fenilpropanoides e flavonoides (GRECCO et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2019; ROSERO et al., 2022; SILVIA et al., 2020; STRUIVING et al., 2020).

Diferentes compostos fenólicos foram identificados em extratos de *Baccharis* com potencial aplicação na terapêutica de doenças inflamatórias, devido a modulação da liberação de citocinas. Rosero e colaboradores (2022) avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico de folhas de *B. macranta* em diferentes concentrações (25 a 500 µg/mL) e obtiveram efeito biológico superior ao controle positivo (diclofenaco, 25 a 500 µg/mL) para algumas concentrações avaliadas pelo método de estabilização de glóbulos vermelhos. Abab e colaboradores (2006) avaliaram a potencial atividade anti-inflamatória dos extratos hexânico, diclorometânico, etanólico e aquoso de quatro espécies de *Baccharis*. A maioria dos extratos inibiu fortemente a produção de PGE₂, COX-2 e NO em macrófagos estimulados com LPS. Os pesquisadores também avaliaram os níveis de inibição de TNF em macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com LPS, constatando que apenas os extratos hexânicos de *B. obtusifolia* e *B. pentlandii*, extratos hexânicos e aquosos de *B. latifolia* e o extrato aquoso de *B. subulata* não tiveram efeito significativo sobre o TNF.

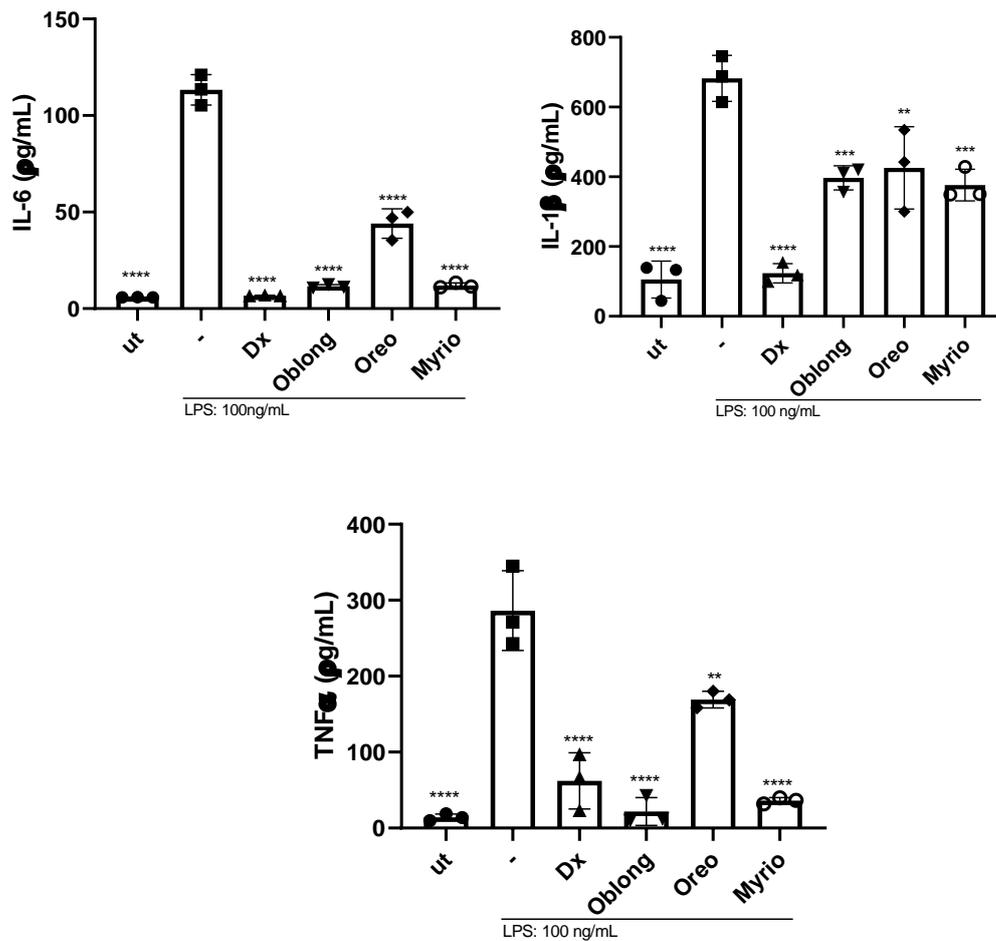


Figura 5: Efeito de extratos etanólicos (30 $\mu\text{g/mL}$) de espécies de *Baccharis* sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios em células THP-1 estimuladas com LPS. Os dados representam a média \pm DP em triplicata. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ comparando com células+LPS (-). Dx: dexametasona (10 μM); Oblong: *B. oblongifolia*; Oreo: *B. oreophila*; Myrio: *B. myriocephala*.

Tabela 7: Percentual de inibição de liberação das citocinas pró-inflamatórias para os extratos etanólicos.

	IL-6 (\pm DP %)	IL-1 β (\pm DP %)	TNF α (\pm DP %)
<i>B. grandmucromata</i>	-	-35,5 \pm 3,5	-36,7 \pm 4,3
<i>B. itatiaiae</i>	-	-159,4 \pm 9,9	-69,1 \pm 2,4
<i>B. maxima</i>	-	-24,7 \pm 33,8	19,8 \pm 7,1
<i>B. montana</i>	-	15,9 \pm 11,3	45,6 \pm 8,2
<i>B. myriocephala</i>	89,4 \pm 0,93	44,9 \pm 5,4	87,38 \pm 1,2
<i>B. oblongifolia</i>	89,8 \pm 0,67	41,8 \pm 4,1	92,3 \pm 5,2

<i>B. oreophila</i>	61,0 ± 5,49	37,6 ± 14,1	40,8 ± 3,1
<i>B. phyllicifolia</i>	-	32,2 ± 12,8	24,5 ± 12,6
<i>B. regnellii</i>	-	45,4 ± 5,8	36,6 ± 15,0
<i>B. stylosa</i>	-	64,6 ± 3,5	-52,4 ± 10,1

DP: desvio padrão

Considerando os resultados apresentados, o extrato de partes aéreas de *B. myriocephala* foi escolhido para o estudo fitoquímico, conforme descrito a seguir (item 5.3). Portanto, o extrato foi fracionado e as frações obtidas em diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) e metanol/água (MeOH/H₂O) (1:1) foram avaliadas quanto ao potencial inibitório da liberação de citocinas *in vitro* nas mesmas condições anteriores. As frações DCM, EtOAc e MeOH/H₂O inibiram significativamente a liberação de IL-6 em células THP-1 estimuladas por LPS, promovendo 84,4 ± 1,0%, 89,2 ± 0,3% e 44,4 ± 1,6% de inibição, respectivamente. Para TNF, o percentual de inibição foi maior para a fração EtOAc, com inibição de 91,3 ± 2,0%, já a fração DCM reduziu em 44,5 ± 6,2% a liberação desta citocina. As frações avaliadas não reduziram significativamente a liberação da citocina IL-1β e a fração EtOAc aumentou a produção dessa citocina.

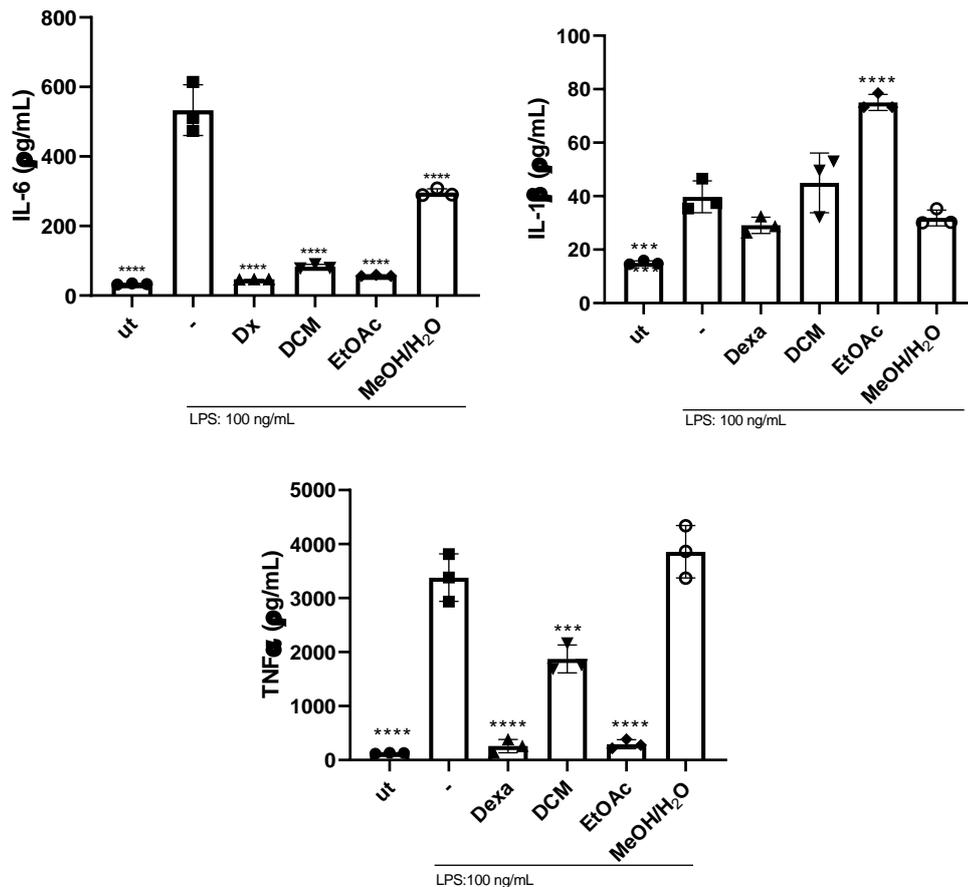


Figura 6: Efeito das frações (30 µg/mL) de *B. myriocephala* sobre a liberação de mediadores pró-inflamatórios em células THP-1 estimuladas com LPS. Os dados representam a média ± DP em triplicata. **** p < 0,0001; *** p < 0,001; comparando com células+LPS (-). Dx: dexametasona (10 µM); DCM: fração diclorometano; EtOAc: fração acetato de etila; MeOH/H₂O: fração metanol/água (1:1)

5.3 Estudo fitoquímico de *B. myriocephala*

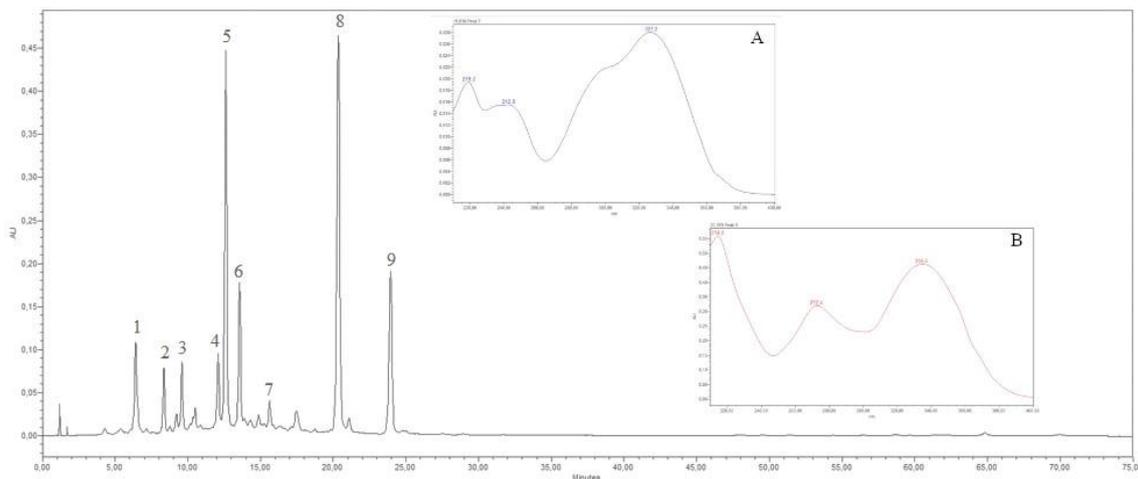
5.3.1 Caracterização cromatográfica do extrato etanólico de *B. myriocephala*

O extrato de partes aéreas de *B. myriocephala* foi obtido por percolação exaustiva com etanol 96° GL à temperatura ambiente tendo um rendimento de 11,42% (17,13 g). A composição química do extrato foi analisada por CCD de sílica gel seguida por RP-HPLC.

A análise por CCD mostrou a presença de manchas amarelas após revelação com anisaldeído sulfúrico, evidenciando a presença de compostos fenólicos, provavelmente da classe dos flavonoides.

A investigação dos constituintes químicos do extrato por RP-HPLC foi realizada empregando-se um gradiente exploratório de eluição (5 - 95% de ACN em 60 min). Os picos majoritários

observados no cromatograma (Figura 7) foram enumerados de 1 a 9. Os picos 1, 4, 5, 6 e 7, eluídos com tempo de retenção (Tr) 6,4; 12,0; 12,6; 13,5 e 15,6 minutos, respectivamente, tiveram espectros de absorção no PDA semelhantes, com máximos de absorção em torno de 219, 242 e 327 nm (espectro A). Esses valores são compatíveis com o espectro de absorção no UV descrito para ácidos fenilpropanóicos (OLENNIKOV et. al., 2019). Já os picos 3, 8 e 9, eluídos com Tr 9,6; 20,3 e 23,9 minutos, apresentaram espectro de absorção no UV com λ_{max} 272 e 334 nm (espectro B) sugerindo a presença de flavonas (HARBORNE et. al., 1975).



O

Figura 7: Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC do extrato etanólico de partes aéreas de *B. myriocephala* espectros de absorção no UV registrados para os picos 1, 4, 5, 6 e 7 (A) e 3, 8 e 9 (B). Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.9)

perfil cromatográfico do extrato etanólico de *B. myriocephala* também foi obtido por UPLC-PDA-ESI-MS, com registro dos cromatogramas por maxplot (200 a 500 nm) e de íons totais (TIC) nos modos positivo e negativo de ionização (Figura 8). A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é uma técnica que possibilita a análises de diversas substâncias com ampla caracterização de polaridade e massa molecular. O cromatograma evidenciou a presença de dez picos eluídos até 5 minutos. A caracterização química foi realizada pela análise dos tempos de retenção (Tr) das substâncias, os comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máx}}$) de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis) e os íons protonados e desprotonados observados no espectro de massas para cada uma delas. Os dados obtidos foram comparados com informações da literatura para constituintes já isolados e/ou relatados para o gênero *Baccharis* visando identificar os prováveis constituintes do extrato. No entanto, é importante destacar que não foram realizados experimentos de massas sequenciais que permitissem a obtenção de informações de fragmentação dos íons identificados no cromatograma de íons totais. As substâncias sugeridas e os dados espectrométricos obtidos estão dispostos na **Tabela 8**.

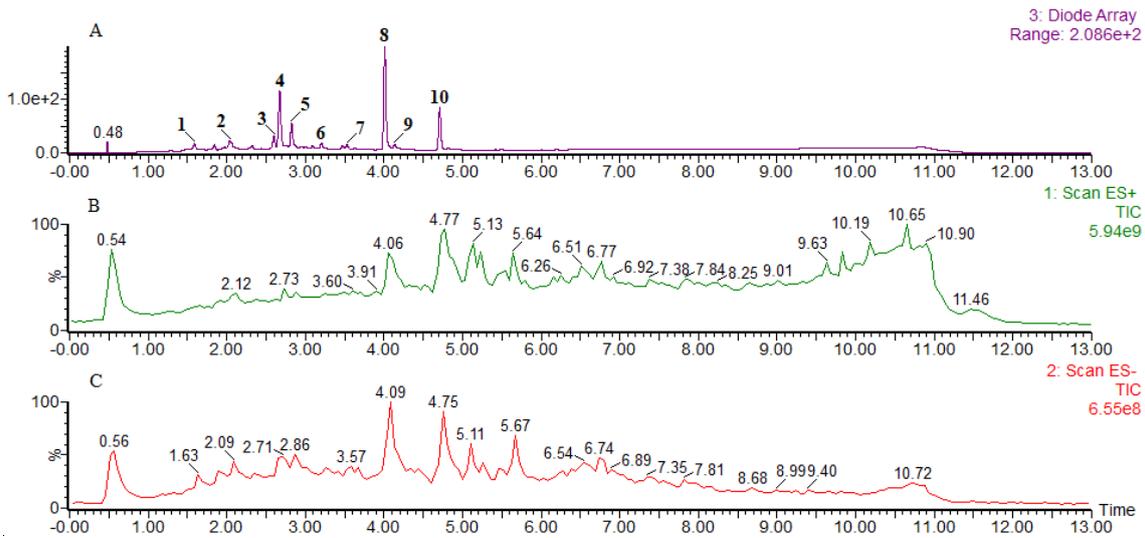


Figura 8: Perfil cromatográfico obtido por UPLC-PDA-ESI-MS do extrato etanólico de *B. myriocephala*. A) Detecção no PDA por maxplot. B) TIC registrado no modo positivo de ionização por *electrospray* (ESI⁺). C) TIC registrado no modo negativo de ionização por *electrospray* (ESI⁻). Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.1.1)

Tabela 8: Substâncias identificadas putativamente por UPLC-PDA-ESI-MS no extrato etanólico de *B. myriocephala*.

Pico	Tr (min)	UV-Vis ($\lambda_{m\acute{a}x}$)	[M-H] ⁺ (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	MM (g/mol)	Substância sugerida	Referência
1	1,59	215-326	355	353	354	ácido <i>O</i> -cafeoilquínico	REZENDE et al. 2014 ARAÚJO et al. 2017
2	2,04	271-331	565	563	564	isochaftosídeo	GOMES et al. 2014
3	2,60	216-325	517	515	516	ácido di- <i>O</i> -cafeoilquínico	REZENDE et al. 2014 ARAÚJO et al. 2017
4	2,67	217-327	517	515	516	ácido di- <i>O</i> -cafeoilquínico	REZENDE et al. 2014 ARAÚJO et al. 2017
5	2,82	217-327	517	515	516	ácido di- <i>O</i> -cafeoilquínico	REZENDE et al. 2014 ARAÚJO et al. 2017
6	3,20	215-326	609	-	-	N.I	-
7	3,53	345	317	315	316	nepetina ou padalitina	OLIVEIRA et al. 2001
8	4,01	273-333	301	299	300	crisoeriol ou hispidulina	BOUZABATA et al. 2022
9	4,13	273-345	301	299	300	crisoeriol ou hispidulina	BOUZABATA et al. 2022
10	4,71	274-333	315	313	314	cirsimaritina ou pectolinaringenina	MENA et al. 2016

Observação: Tr = tempo de retenção; $\lambda_{m\acute{a}x}$ = máximo de absorção no UV; [M-H]⁺ = íon base protonado; [M-H]⁻ = íon base desprotonado; MM = massa molar; m/z = razão massa/carga; N.I = não identificado

Em seguida, procedeu-se ao fracionamento do extrato visando obter frações de composição química mais simplificada e objetivando uma análise biológica monitorada a fim de isolar substâncias biologicamente ativas.

5.3.2 Fracionamento biomonitorado do extrato etanólico de *B. myriocephala*

O fracionamento do extrato etanólico de partes aéreas de *B. myriocephala* foi realizado por filtração em sílica gel empregando eluição com solventes de polaridades crescentes, iniciando com *n*-hexano, e sequencialmente com diclorometano, acetato de etila e metanol/água (1:1). A massa obtida da fração hexânica (2,0 mg) foi insuficiente para as análises subseqüentes. As frações obtidas em diclorometano (DCM) e em acetato de etila (EtOAc), que apresentaram inibição significativa da liberação de mediadores pró-inflamatórios *in vitro* (item 5.2), foram avaliadas por CCD, RP-HPLC e UPLC-PDA-ESI-MS. Já a fração hidrometanólica (MeOH/H₂O 1:1), que inibiu somente a produção da interleucina 6 (IL-6), foi analisada apenas por CCD.

Na análise das frações por CCD, não se observou manchas na fração DCM após revelação com NP/PEG, provavelmente, devido à baixa concentração de constituintes fluorescentes, já que o cromatograma desta fração indicou a possibilidade de conter flavonoides (Figura 9). Já a fração EtOAc, apresentou bandas de fluorescência amarelada, com cauda, indicando a presença de flavonoides, enquanto na fração MeOH/H₂O observou-se mancha fluorescente retida no ponto de aplicação devido a elevada polaridade dos constituintes desta fração.

O perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC para a fração DCM indicou a presença de quatro picos majoritários (Figura 9), no qual evidenciou-se a presença de substâncias com máximos de absorção no UV compatíveis aos flavonoides, picos 1, 2 e 3 com espectros de absorção no UV com λ_{max} 274 e 334 nm (espectro A) e ácidos fenólicos do tipo C₆-C₃, pico 4 com espectros de absorção no UV com λ_{max} 235 e 321 nm (espectro B). É importante destacar a baixa intensidade dos picos no cromatograma dessa fração, o que é compatível com o resultado obtido por CCD.

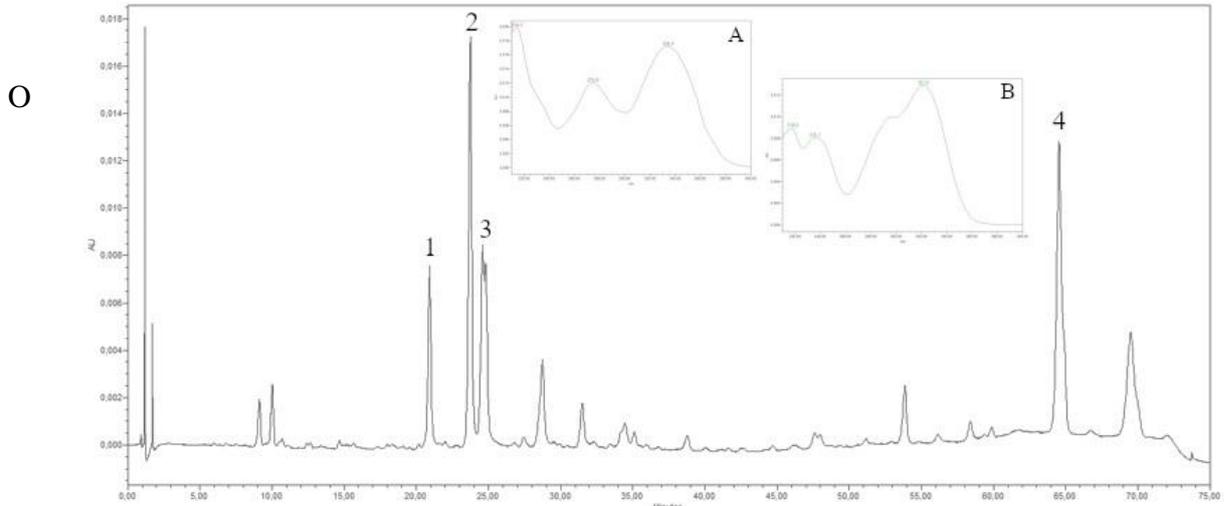


Figura 9: Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC para a fração diclorometano obtida do extrato etanólico das partes aéreas de *B. myrioccephala* e espectros de absorção no UV registrados para os picos 1, 2 e 3 (A) e 4 (B). Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.9)

perfil cromatográfico registrado para a fração EtOAc apresentou-se mais simples (Figura 10), com cinco picos eluídos entre 12 e 24 minutos. Os dois picos majoritários eluíram com Tr 20,12 e 23,73 min, e seus espectros de absorção no UV apresentaram λ_{max} 272 e 334 (espectro C), compatíveis com a estrutura de flavonas. Os picos minoritários, eluídos em 17,28 e 20,88 minutos apresentaram espectro no UV com máximos de absorção em 270 e 347 nm (espectro B), também compatíveis com a estrutura de flavona, enquanto a substância eluída em 12,38 min apresentou espectro no UV com λ_{max} 242 e 327 nm (espectro A), condizente com a absorção de ácidos fenólicos (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

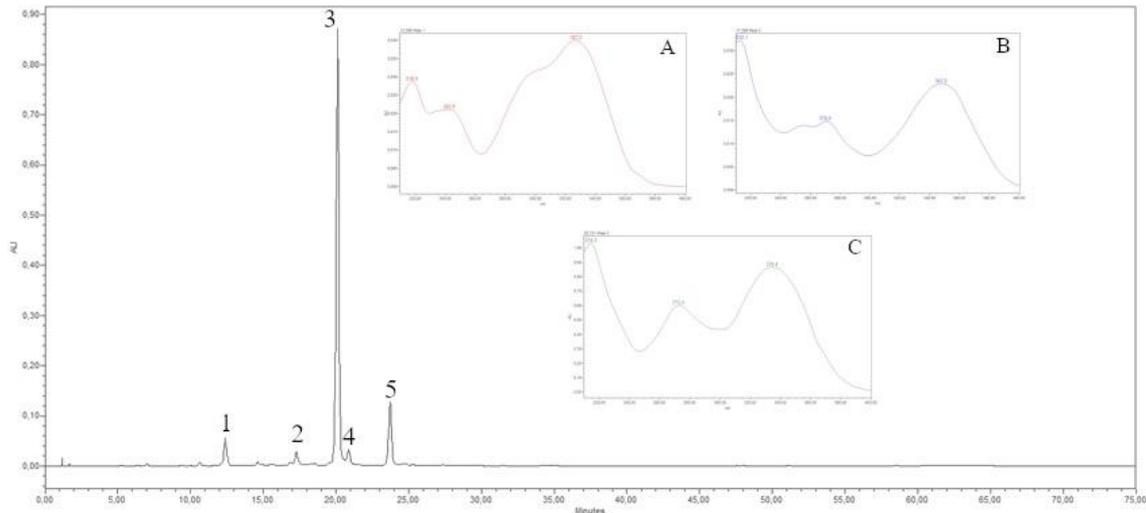


Figura 10: Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC para fração acetato de etila obtida do extrato etanólico de partes aéreas de *B. myrioccephala* e espectros de absorção no UV registrados para os picos 1 (A), 2 e 4 (B) e 3 e 5 (C). Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.9)

Considerando o perfil mais simplificado observado para a fração EtOAc, e a maior massa disponível, essa fração foi escolhida para o prosseguimento do trabalho. Inicialmente, esta fração também foi analisada por UPLC-PDA-ESI-MS. O cromatograma revelou a presença de dois picos majoritários, eluídos em 3,99 e 4,68 min, com espectro no PDA compatível com flavonas, conforme descrito anteriormente (Figura 11). Os espectros de massas obtidos nos modos positivo e negativo de ionização para a substância eluída em 3,99 min apresentaram picos em m/z 301 e 299, referentes aos íons da molécula protonada $[M+H]^+$ e desprotonada $[M-H]^-$, respectivamente, indicando tratar-se de uma flavona com massa molar 300 g/mol. Já a substância eluída em 4,68 min apresentou picos em m/z 315 e 313, referentes aos íons da molécula protonada $[M+H]^+$ e desprotonada $[M-H]^-$, respectivamente, indicando tratar-se de uma flavona com massa molar 314 g/mol.

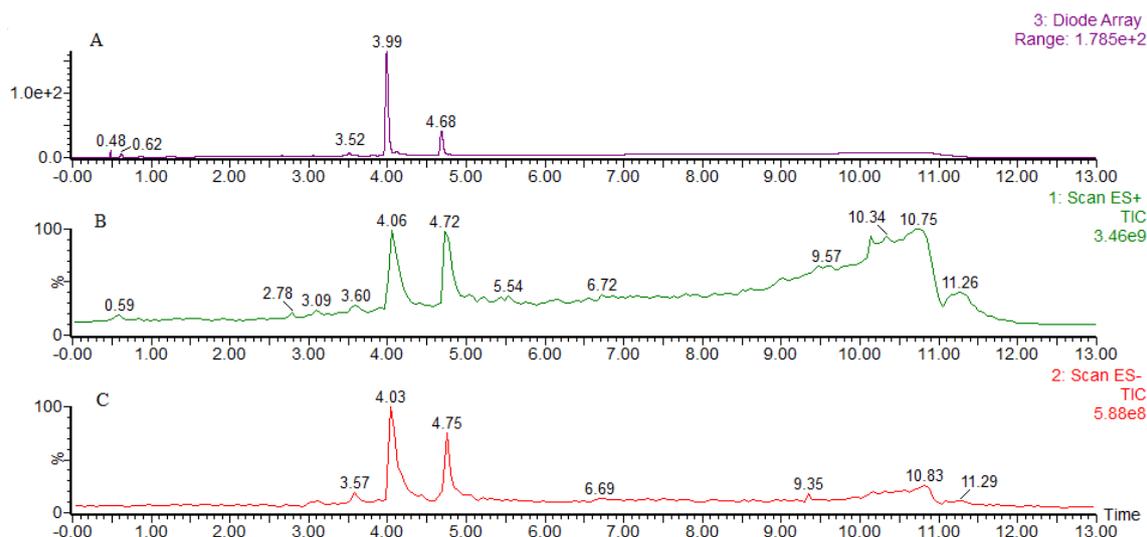


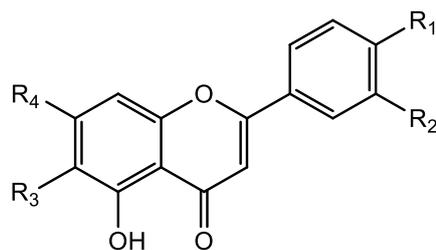
Figura 11: Perfil cromatográfico obtido por UPLC-PDA-ESI-MS da fração EtOAc. A) Detecção no PDA por maxplot. B) TIC registrado no modo positivo de ionização por *electrospray* (ESI⁺). C) TIC registrado no modo negativo de ionização por *electrospray* (ESI⁻)

A análise conjunta dos dados obtidos, tempo de retenção das substâncias, perfil de absorção no UV e massa molar, permitiram, em comparação com dados da literatura de substâncias isoladas de espécies de *Baccharis*, sugerir possíveis estruturas para as flavonas constituintes da fração EtOAc, conforme disposto na **Tabela 9**. As estruturas químicas das flavonas sugeridas estão representadas na **Figura 12**. A flavona hispidulina foi previamente isolada de *B. pseudotenuifolia*, *B. uncinella*, *B. conferta*, *B. trimera* e *B. gaudichaudiana*, a cirsimatina de *B. calvescens*, *B. rufescens*, *B. conferta* e *B. trimera* e nepetina de *B. gaudicohaudiano* (CAMPOS *et al.*, 2016; FRADE, 2020; NAKASUGI e KOMAI, 1998; SILVIA *et al.*, 2020).

Tabela 9: Dados obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS da fração EtOAc

Pico	Tr (min)	UV-Vis ($\lambda_{m\acute{a}x}$)	[M-H] ⁺ (<i>m/z</i>)	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	MM (g/mol)	Substância sugerida	Referência
1	3,52	217-347	315	317	316	nepetina ou padalitina	OLIVEIRA <i>et al.</i> 2001
2	3,99	273-333	301	299	300	crisoeriol ou hispidulina	BOUZABATA <i>et al.</i> 2022
3	4,68	274-333	315	313	314	cirsimaritina ou pectolinarigenina	MENA <i>et al.</i> 2016

Observação: Tr = tempo de retenção; $\lambda_{m\acute{a}x}$ = máximo de absorção no UV; [M-H]⁺ = íon base protonado; [M-H]⁻ = íon base desprotonado; MM = massa molar; *m/z* = razão massa/carga



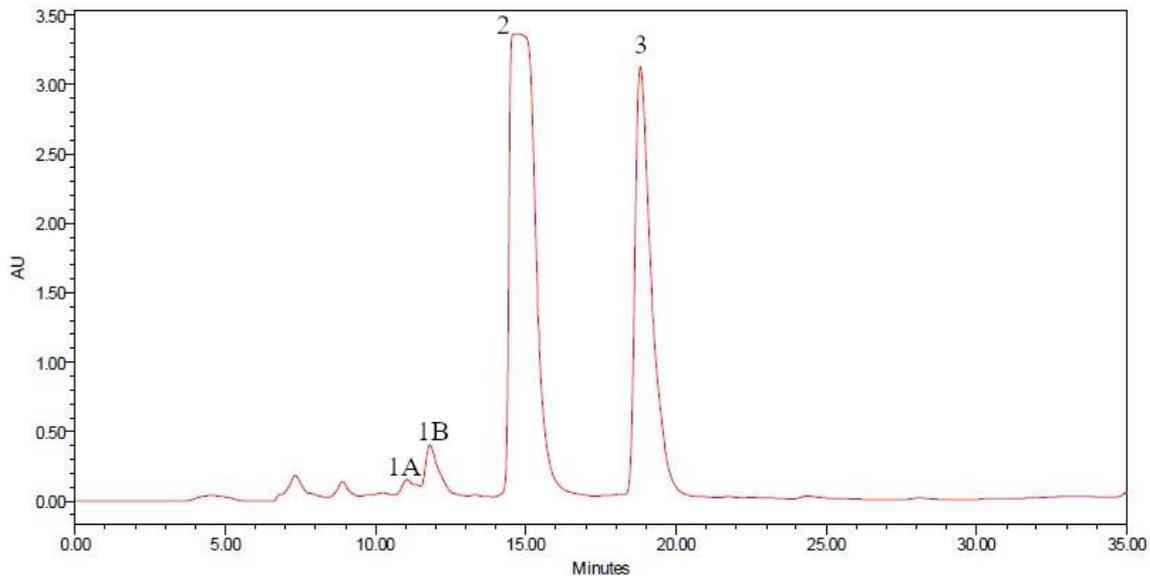
R1	R2	R3	R4	
OH	OH	OMe	OH	nepetina
OH	OH	OH	OMe	padalitina
OH	OMe	H	OH	crisoeriol
OH	H	OMe	OH	hispidulina
OH	H	OMe	OMe	cirsimaritina
OMe	H	OMe	OH	pectolinarigenina

Figura 12: Estruturas das possíveis flavonas presentes na fração EtOAc obtida do extrato de *B. myriocephala*

5.3.3 Refracionamento da fração EtOAc por HPLC em escala preparativa

A fração EtOAc obtida do extrato etanólico de partes aéreas de *B. myriocephala* inibiu significativamente a liberação de mediadores pró-inflamatórios *in vitro* (item 5.2) e seu perfil cromatográfico apresentou-se simplificado, conforme resultados apresentados no item anterior. Esta fração foi, portanto, selecionada para refração por HPLC em escala preparativa visando ao isolamento das substâncias bioativas. As condições cromatográficas foram otimizadas a fim de permitir uma melhor separação dos picos. Foram realizadas 30 injeções separadas, totalizando-se 610 mg de fração injetados, e a coleta dos picos foi feita manualmente de acordo com o espectro registrado no UV em 280 e 330 nm.

De acordo com o perfil cromatográfico registrado em 330 nm (Figura 13), foram coletados 4 picos, eluídos nos tempos de retenção 11,04; 11,81; 14,63 e 18,81 minutos, e, identificados como Flav1A (1,33 mg), Flav1B (1,56 mg), Flav2 (59,69 mg) e Flav3 (23,38 mg), os quais, foram analisados por UPLC-PDA-ESI-MS.



As

Figura 13: Espectro cromatográfico obtido por RP-HPLC em escala preparativa da fração EtOAc. Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.10) substâncias Flav1A e Flav1B apresentaram-se impuras (Figura 14) e a pequena massa obtida impossibilitou a realização de processos adicionais de purificação. No entanto, os cromatogramas registrados por UPLC-PDA para as substâncias Flav2 e Flav3 indicaram um pico único para cada uma delas, com tempo de retenção de 4,0 e 4,7 minutos, respectivamente (Figura 14). A substância Flav2 apresentou o pico do íon desprotonado em m/z 299 no modo negativo de ionização $[M-H]^-$ e protonado em m/z 301 no modo positivo de ionização $[M+H]^+$ (Figura 15). Enquanto para Flav3 foi observado o pico do íon $[M-H]^-$ em m/z 313 e o pico do íon $[M+H]^+$ em m/z 315 (Figura 16). As análises por espectrometria de massas das substâncias indicaram uma diferença de 14 unidades de massa entre Flav2 e Flav3, que corresponde à substituição de um hidrogênio por um grupo metila. Essas informações corroboram tanto com a proposta inicial quanto as análises pelo nosso grupo de pesquisa em processo de desreplicação dos extratos de *Baccharis* (FRADE, 2020).

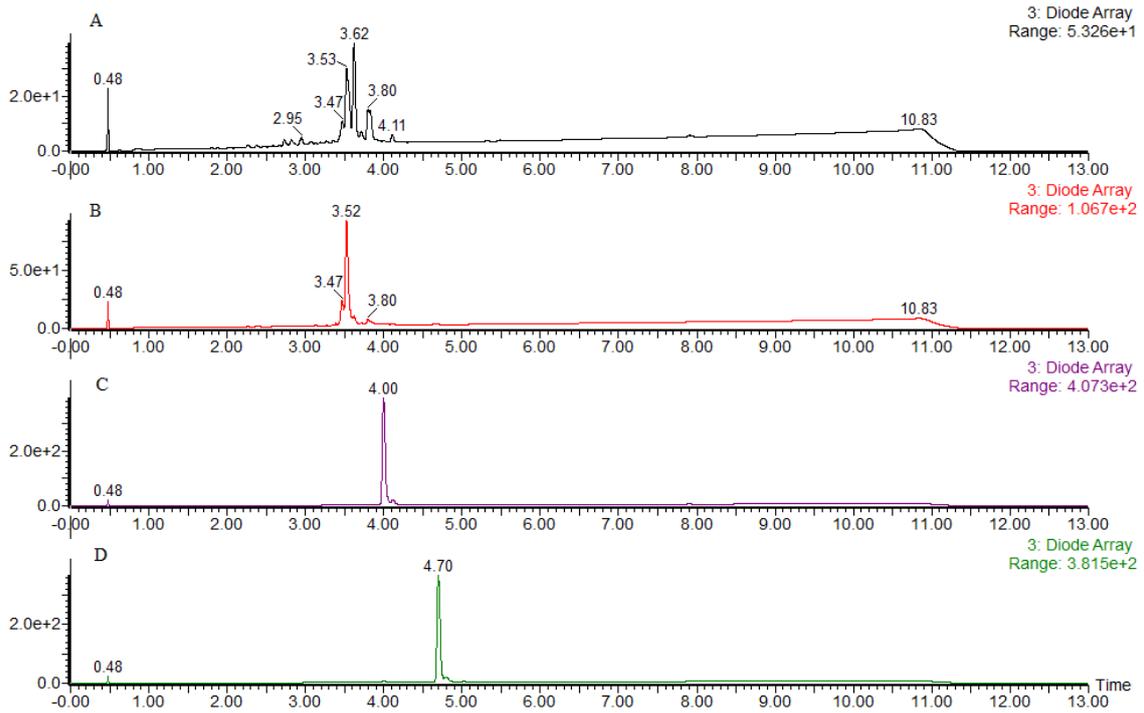


Figura 14: Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-PDA para Flav1A (A), Flav1B (B), Flav2 (C) e Flav3 (D) obtidas da fração EtOAc. Condições cromatográficas: vide parte experimental (item 4.11)

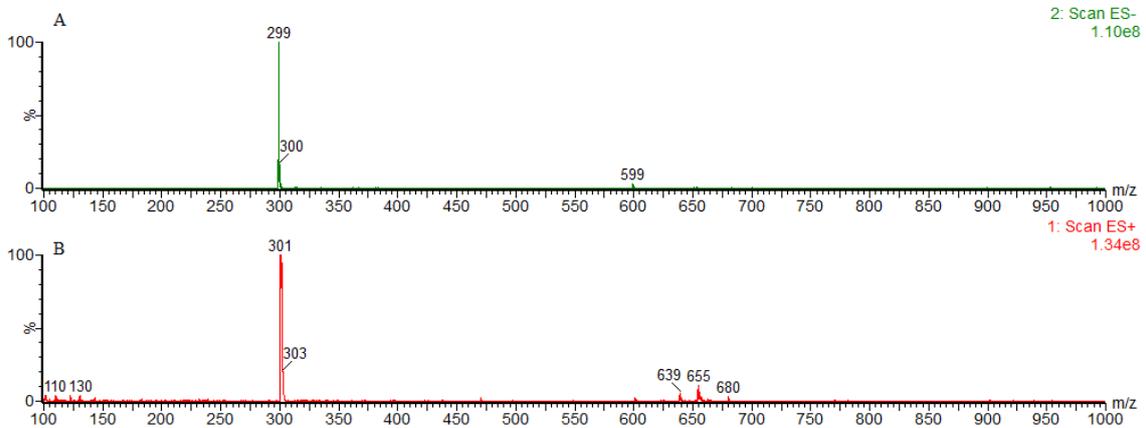


Figura 15: Espectros de massas registrados nos modos de ionização ESI negativo (A) e ESI positivo (B) para Flav2

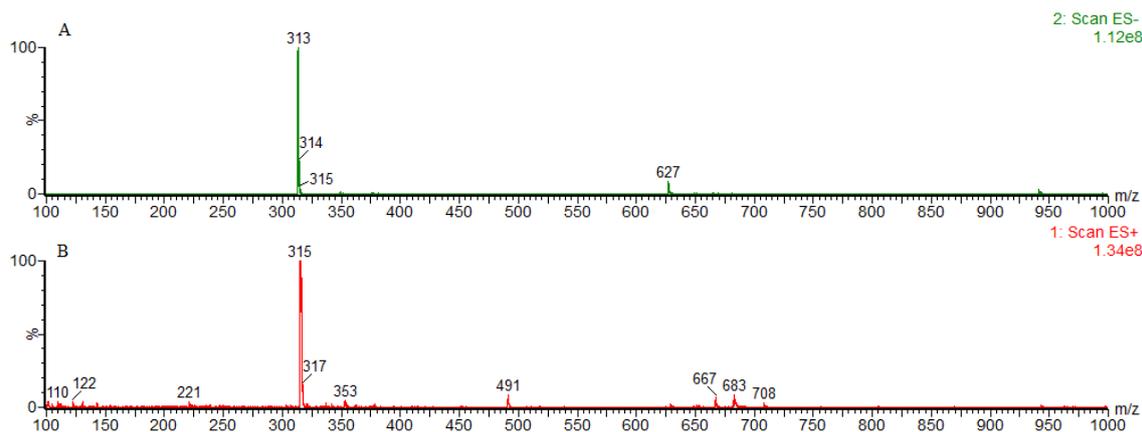


Figura 16: Espectros de massas registrados nos modos de ionização ESI negativo (A) e ESI positivo (B) para Flav3

5.4 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

As substâncias isoladas por RP-HPLC em escala preparativa Flav2 e Flav3, que apresentaram pureza satisfatória confirmada pelas análises por UPLC-PDA-ESI-MS, após liofilizadas apresentaram-se como sólidos de coloração amarelada e tiveram suas estruturas elucidadas a partir de espectros de RMN.

5.4.1 Elucidação estrutural de Flav2

Os espectros de massas obtidos para Flav2 foram compatíveis com a proposta de massa molar 300 g/mol, que corresponde a uma fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_6$. O espectro de RMN de 1H obtido para essa flavona apresentou 4 sinais de ressonância referentes a seis hidrogênios com valores de deslocamento químico na região de hidrogênios aromáticos, além de um sinal referente a 3 hidrogênios na região de prótons alifáticos, dados compatíveis com uma flavona metoxilada (Figura 17). Observou-se a presença de dois dupletos, em δH 7,91 e 6,91 ppm, com integral relativa a 2 hidrogênios cada, e constante de acoplamento (J) de 8,6 Hz, compatível com hidrogênios *orto*-acoplados. Esses dados são compatíveis com a presença de um sistema de spin do tipo AA'BB', referente a um anel aromático *p*-dissubstituído. Observou-se, ainda, a presença de um singlete em δH 6,58 ppm, referente a um hidrogênio, que foi atribuído a H-6 ou H-8 do anel A da flavona, indicando tratar-se de um anel pentassubstituído, além de um singlete em δH 6,76 ppm, referente a um hidrogênio, atribuído ao hidrogênio H-3. Por fim, observou-se um singlete em δH 3,74 ppm, com integral relativo a 3 hidrogênios, atribuído a um grupo metila, e um singlete em δH 13,07 ppm, indicando a presença da hidroxila.

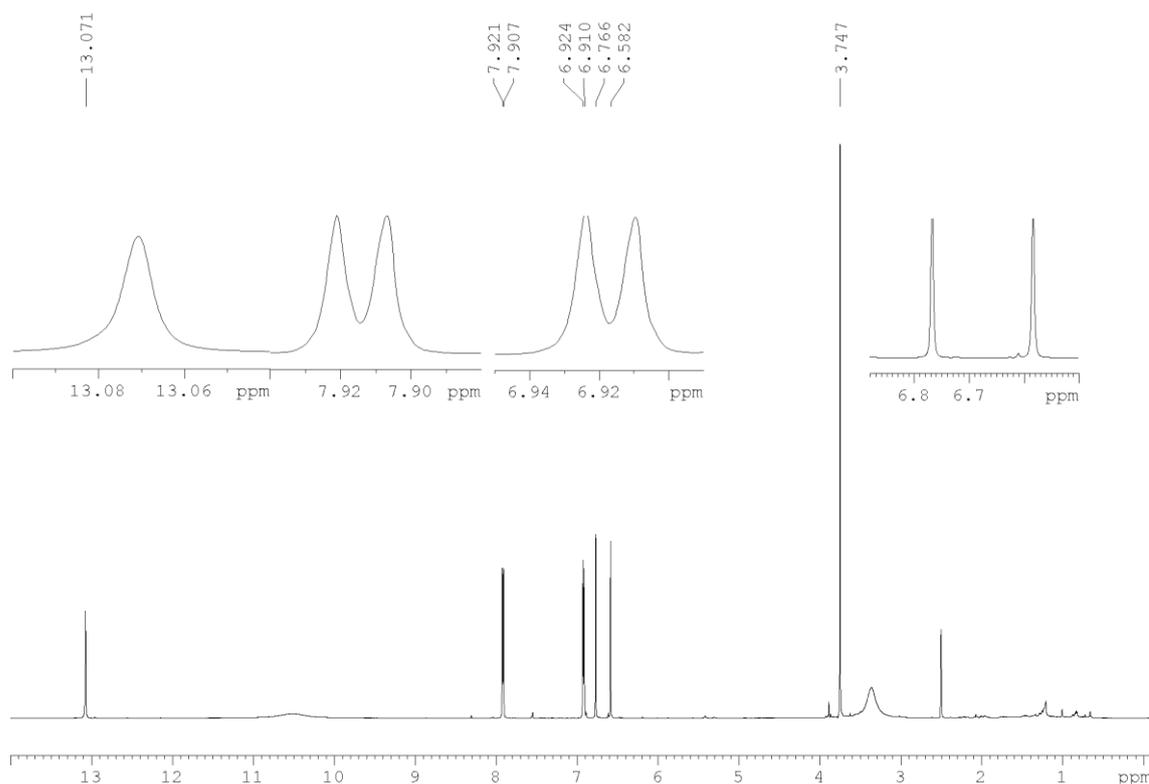


Figura 17: Espectro de RMN de ^1H de Flav2 em DMSO-d_6 obtido em 600 MHz

A análise do espectro de RMN de ^{13}C indicou a presença de 14 sinais, referentes a 16 átomos de carbono, condizentes com a estrutura de uma flavona metoxilada (Figura 18). A análise do subespectro DEPT-135 revelou a presença de cinco sinais relativos a carbonos hidrogenados e ausência de carbonos metilênicos (Figura 19). O sinal em δC 182,1 ppm foi atribuído ao carbono carbonílico C-4 e o sinal em δC 59,9 ppm foi atribuído ao carbono metílico. A atribuição de todos os sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C registrado para Flav2 encontra-se descrita na **Tabela 10**.

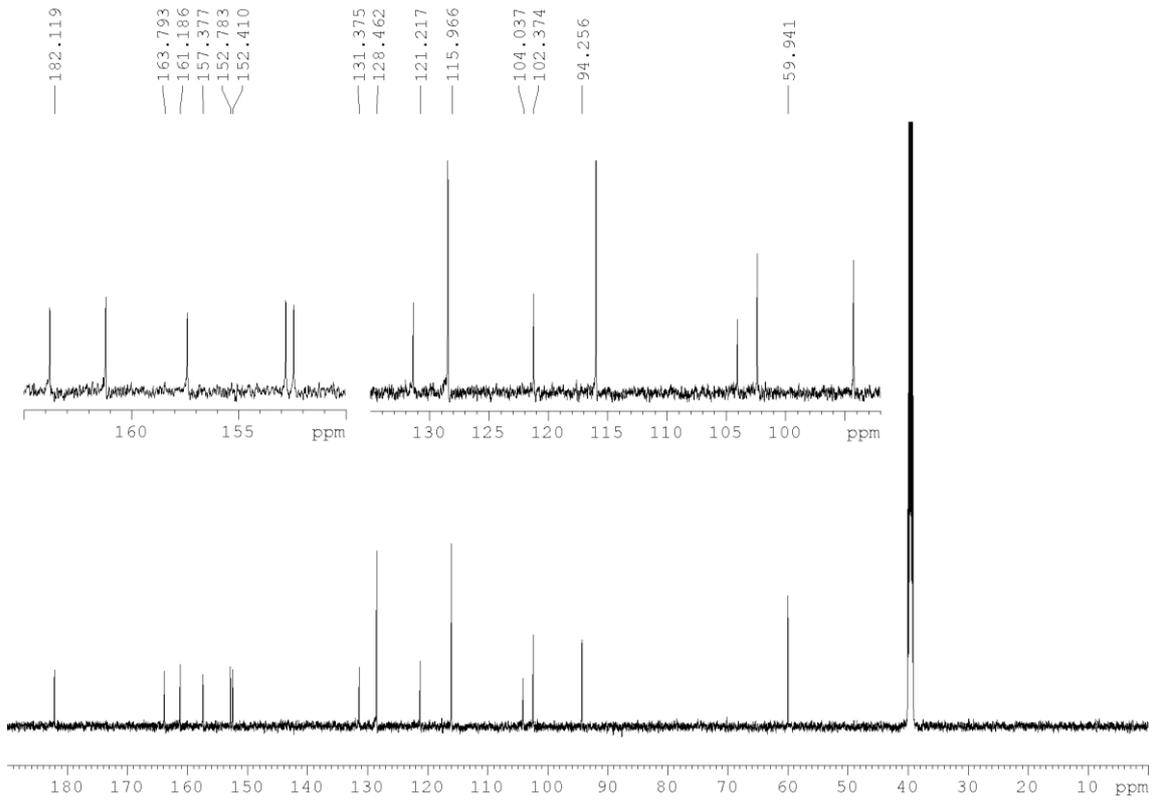


Figura 18: Espectro de RMN de ^{13}C de Flav2 em DMSO-d₆ obtido em 150 MHz

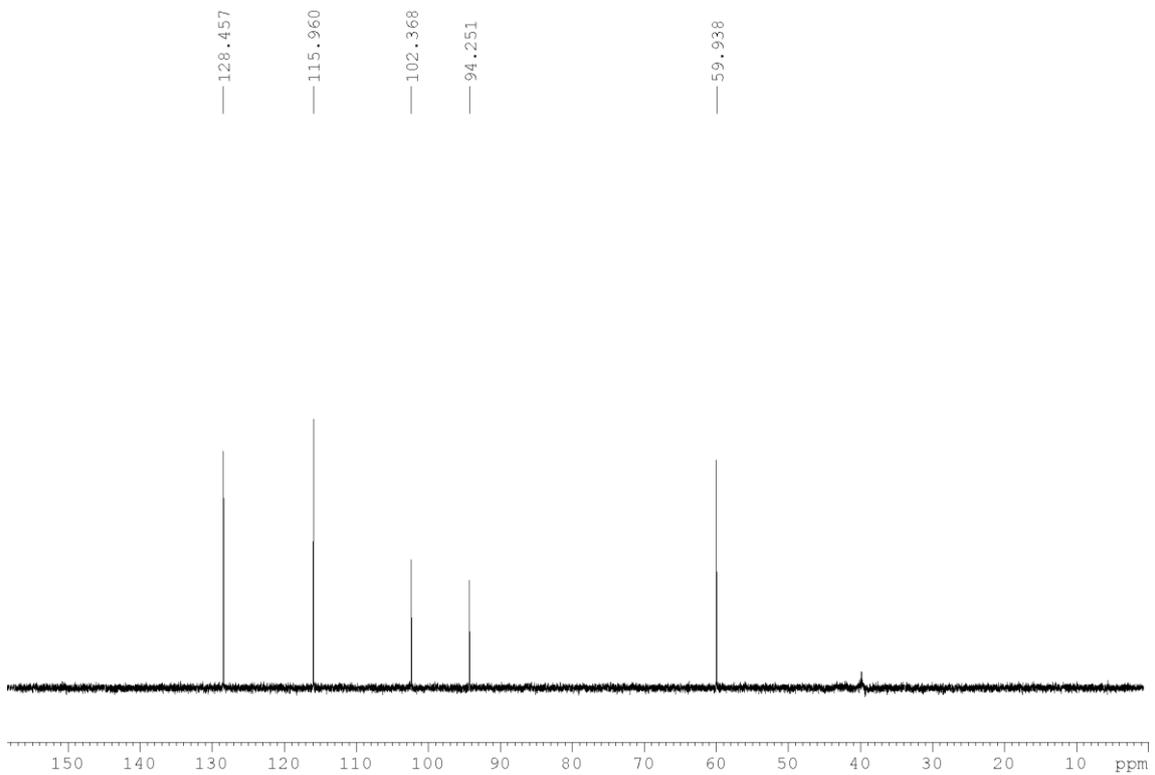


Figura 19: Sub-espectro DEPT-135 de Flav2 em DMSO-d₆ obtido em 150 MHz

A atribuição dos sinais de ressonância de ^{13}C foi feita a partir da análise das correlações evidenciadas no mapa de correlação heteronuclear HSQC (J_1) (Figura 20). Assim, os hidrogênios do anel aromático *para*-substituído em δH 7,91 e 6,91 ppm apresentam manchas de correlação com os carbonos em δC 128,4 ppm (C2' e C6') e δC 115,9 ppm (C3' e C5'), respectivamente. Os singletos, referentes a um hidrogênio, em δH 6,76 e 6,58 ppm estão correlacionados com os carbonos em δC 102,3 e 94,2 ppm, respectivamente. E por fim, observou-se mancha de correlação entre o carbono alifático em δC 59,9 ppm e o singletos, referente a três prótons, em δH 3,74 ppm.

As análises do mapa de correlações heteronucleares HMBC (Figura 21 e 22) permitiram concluir as atribuições dos átomos de carbono. Observaram-se manchas de correlação (J_3 e J_2) entre os sinais dos dupletos H-2'/H-6' (δH 7,91 ppm) e H-3'/H-5' (δH 6,91 ppm) e o sinal atribuído ao carbono hidroxilado C4' (δC 161,1 ppm), bem como ao carbono C-1' (δC 121,2 ppm) e C-2 (δC 163,7 ppm). Por sua vez, o sinal referente a H-3 (δH 6,76 ppm) apresentou mancha de correlação em J_2 com o sinal da carbonila em δC 182,1 ppm. Já o sinal referente ao próton H-8 (δH 6,58 ppm) apresentou mancha de correlação em J_2 com os sinais atribuídos a C-9 (δC 157,3 ppm) e C-7 (δC 152,4 ppm), além de correlação em J_3 com os carbonos C-6 (δC 131,3 ppm) e C-10 (δC 104,0 ppm). Para os prótons referentes ao grupo metila (δH 3,74 ppm), observou-se apenas um sinal de correlação em J_3 com o sinal atribuído ao carbono C-6, confirmando a localização do grupamento metila nesta posição.

As análises dos espectros de RMN mono e bidimensionais indicam que Flav2 é uma flavona metoxilada, cujos valores de deslocamento químico e padrão de substituição dos anéis aromáticos permitiram identificá-la como sendo a substância hispidulina (4',5,7-triidroxi-6-metoxiflavona) (**18**). Vários flavonoides já foram isolados de espécies vegetais do gênero *Baccharis*. A hispidulina já foi previamente isolada de *B. conferta*, *B. pseudoternuifolia*, *B. uncinella*, *B. flabellate*, *B. trimera* e *B. gaudichaudina* (NAKASUGI e KOMAI, 1998; SILVIA et al., 2020). Esse é o primeiro relato de isolamento desse flavonoide a partir de partes aéreas de *B. myriocephala*.

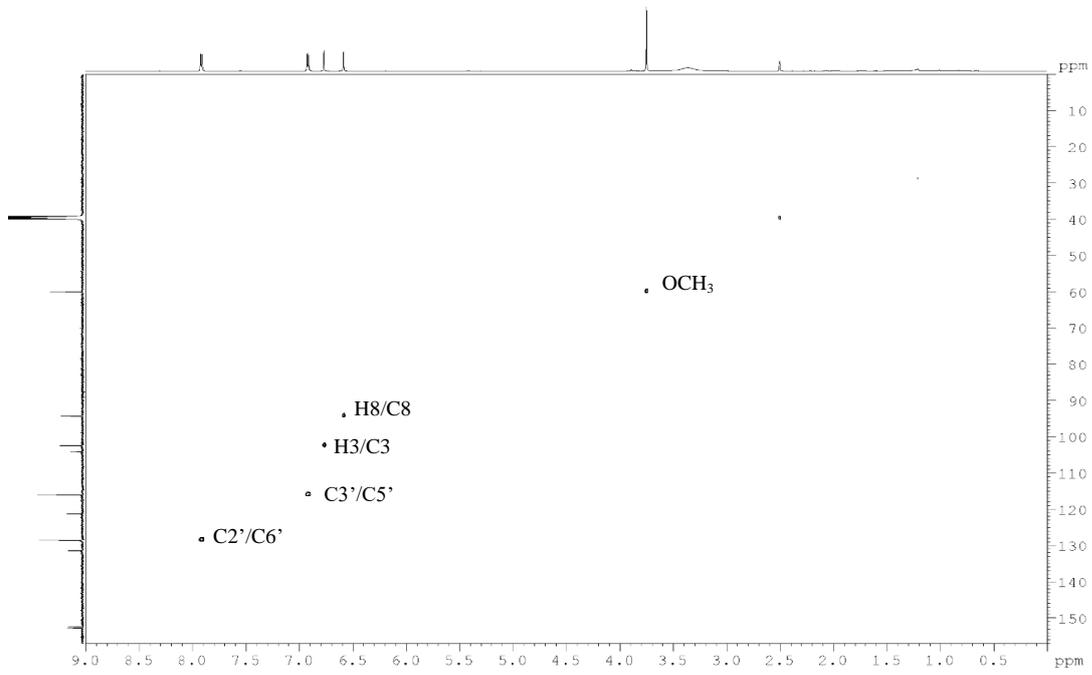


Figura 20: Mapa de contornos de HSQC obtidos para Flav2 em DMSO-d₆ em 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C.

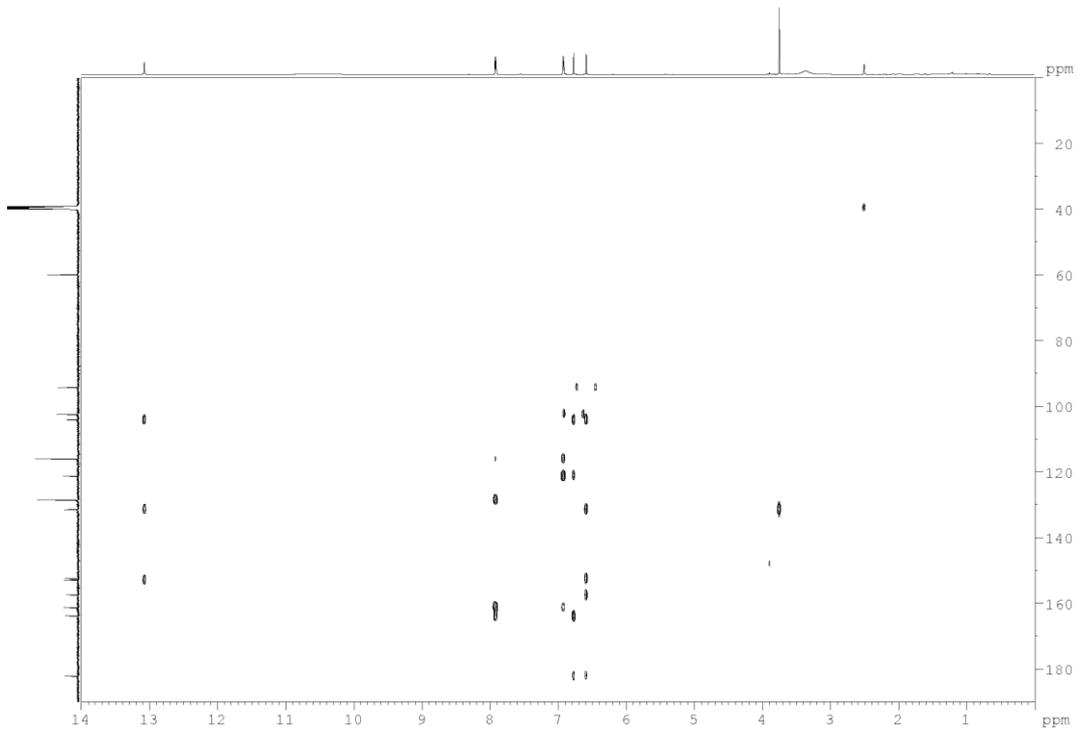


Figura 21: Mapa de contornos de HMBC obtidos para Flav2 em DMSO-d₆ em 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C.

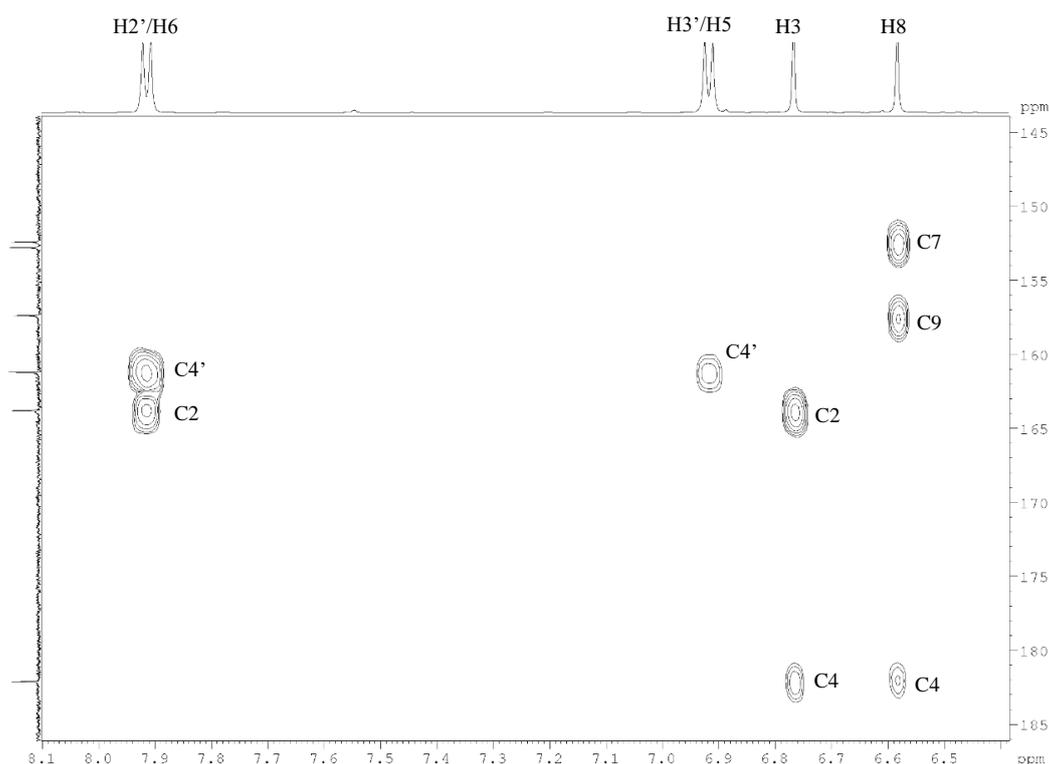


Figura 22: Seção expandida da região de hidrogênios do mapa de contornos HMBC obtidos para Flav2 em DMSO- d_6 em 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C .

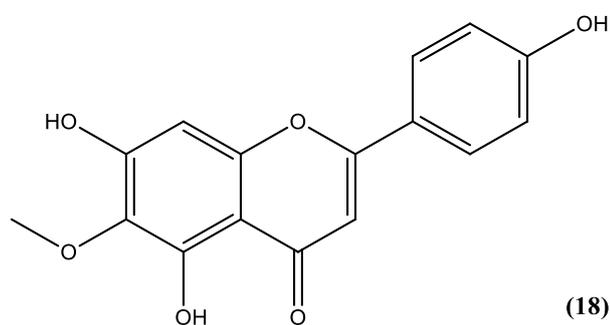
Os dados de deslocamento químico de hidrogênio e carbono e as correlações heteronucleares para a hispidulina estão resumidos na **Tabela 10**. Adicionalmente, os dados obtidos no presente trabalho puderam ser comparados com aqueles obtidos por Nakasugi e Komai (1998). Os pesquisadores isolaram a hispidulina do extrato metanólico de partes aéreas de *B. trimera*, os espectros foram registrados a 270 MHz em um espectrômetro JNM-EX 270, e utilizaram o mesmo solvente do presente estudo.

Tabela 10: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H de Flav2 (DMSO- d_6 , J em Hz) obtidos em 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (J (Hz))	HMBC ^1H - ^{13}C	Hispidulina ¹ $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	163,8	-	-	163,7
3	102,4	6,76 (s)	C1'; C2; C4; C10	102,3
4	182,1	-	-	182,0
5	152,8	-	-	152,7
6	131,4	-	-	131,4
7	157,4	-	-	157,8

8	94,2	6,58 (s)	C4; C6; C7; C9; C10	94,3
9	152,4	-	-	152,5
10	104,0	-	-	103,8
6-OCH₃	59,9	3,74 (s)	C6	59,9
1'	121,2	-	-	121,2
2' e 6'	128,5	7,91 (d, <i>J</i> = 8,6)	C4'; C2	128,4
3' e 5'	116,0	6,91 (d, <i>J</i> = 8,6)	C1'; C4';	115,9
4'	161,2			161,2

¹Nakasugi e Komai, 1998.



5.4.2 Elucidação estrutural de Flav3

Os espectros de massas obtidos por UPLC-PDA-ESI-MS para Flav2 e Flav3 indicaram uma diferença de 14 unidades de massa entre as duas substâncias. Essa diferença corresponde à substituição de um hidrogênio por um grupo metila. As análises dos espectros de RMN mono e bidimensionais confirmaram que esse Flav3 é semelhante a Flav2, com grande similaridade dos sinais. A principal diferença entre os espectros é a presença de um sinal adicional no subspectro DEPT-135 e no espectro de RMN de ¹³C na região dos carbonos alifáticos (Figura 23 e 24). O espectro de RMN de ¹H obtido para essa flavona apresentou dois sinais com valores de deslocamento químico característicos de hidrogênios alifáticos em δ H 3,91 e 3,73 ppm, com integral de 3 hidrogênios cada, indicando tratar-se de uma flavona di-metoxilada (APÊNDICES A-B). Os sinais desses singletos (δ H 3,91 e 3,73 ppm) apresentaram manchas de correlação com os sinais de carbono em δ C 56,4 e 60,0 ppm, respectivamente, no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 25) (APÊNDICE C). Por fim, a partir das análises do mapa de contornos heteronucleares HMBC (APÊNDICE D-E), foi realizado as atribuições dos átomos de carbono. Esses dados corroboram os dados do espectro de massas, compatível com a proposta de massa molar 314 g/mol, que corresponde a uma fórmula molecular C₁₇H₁₄O₆, confirmando a presença de dois grupos metila na molécula. A atribuição de todos os sinais

observados no espectro de RMN de ^{13}C registrado para Flav3 encontram-se descrita na **Tabela 11**.

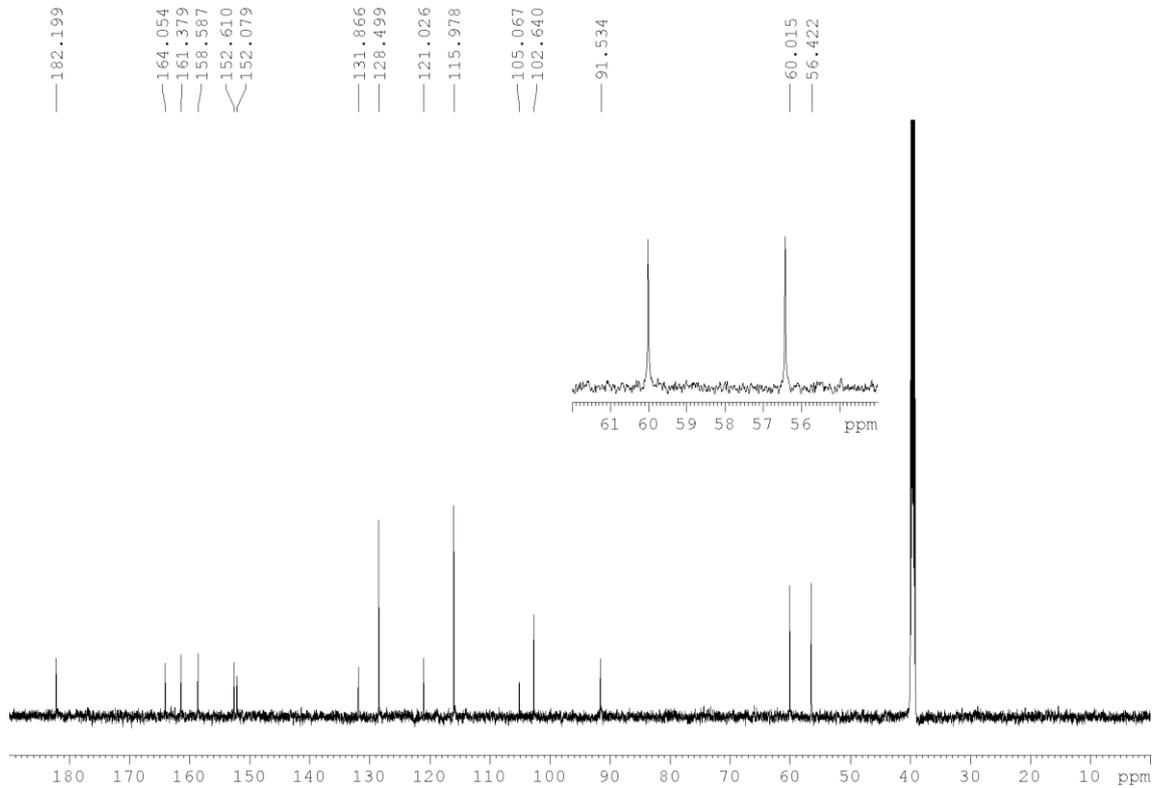


Figura 23: Espectro de RMN de ^{13}C de Flav3 em DMSO- d_6 obtidos em 150 MHz

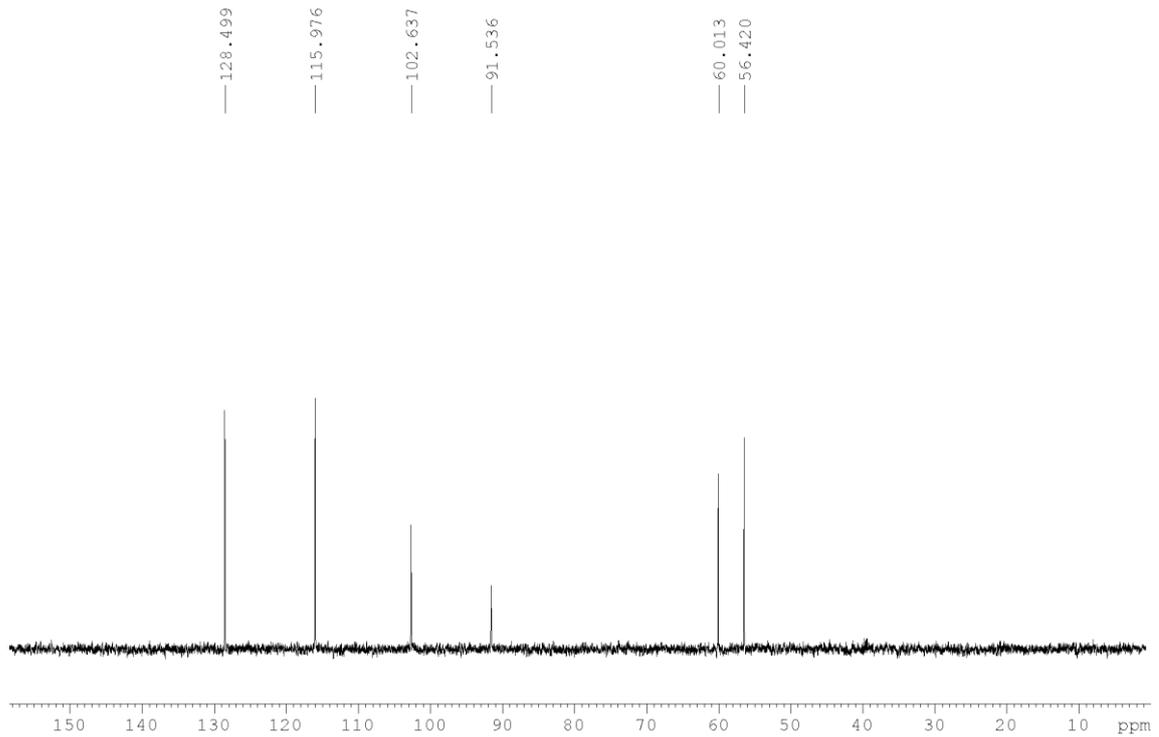


Figura 24: Sub-espectro de DEPT-135 de Flav3 em DMSO-d₆ obtidos em 150 MHz

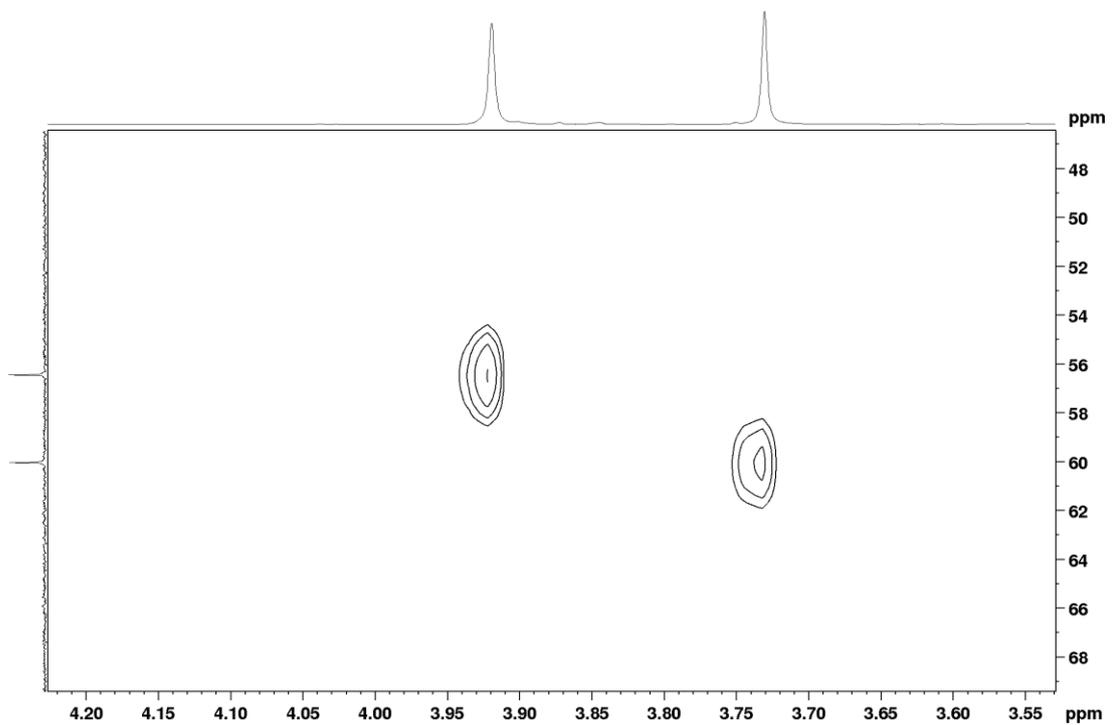


Figura 25: Seção expandida da região de hidrogênios metínicos (δ H 3,91 e 3,73 ppm) do mapa de contornos HSQC obtido para Flav3.

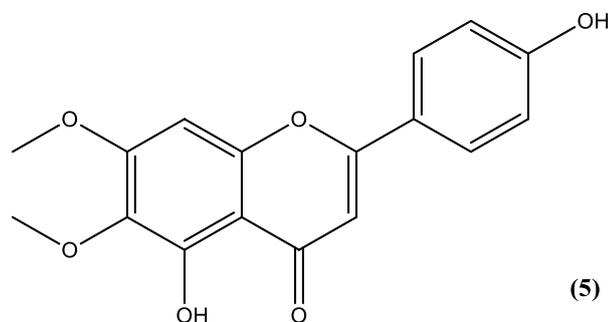
Portanto, após as análises dos espectros de RMN mono e bidimensionais, a substância Flav3 foi identificada como a substância cirsimarina (4',5'-diidroxil-6,7'-di-metoxiflavona) (5).

Esses achados experimentais corroboram aos relatos de Nakasugi e Komai (1998) para a elucidação estrutural. A **Tabela 11** resume os dados de deslocamento químico de hidrogênio e carbono, adicionalmente, os dados encontrado pelos pesquisadores. As duas substâncias, hispidulina e cirsimaritina, já foram isoladas do extrato de partes aéreas de *B. conferta* (SILVIA et al., 2020). A cirsimaritina foi previamente isolada pelo nosso grupo de pesquisa a partir de folhas de *B. calvescens*. (FRADE, 2020). Esse é o primeiro relato de isolamento dessa substância de partes aéreas de *B. myriocephala*.

Tabela 11: Dados de RMN de ^{13}C e ^1H de Flav3 (DMSO- d_6 , J em Hz) obtidos em 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (J (Hz))	HMBC ^1H - ^{13}C	Cirsimaritina $\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
2	164,05			164,0
3	102,64	6,83 (s)	C1'; C2; C4; C9; C10	102,7
4	182,19			182,2
5	152,07			152,6
6	131,86			131,9
7	158,58			158,6
8	91,53	6,91 (s)	C4; C7; C9; C10	91,5
9	152,61			152,1
10	105,06			105,1
6-OCH ₃	60,01	3,73 (s)	C6	60,0
7-OCH ₃	56,42	3,91 (s)	C7	56,4
1'	121,03			121,1
2' e 6'	128,50	7,95 (d, $J = 8,6$)	C4'	128,5
3' e 5'	115,98	6,92 (d, $J = 8,6$)	C1'; C4';	116,0
4'	161,38			161,3

¹Nakasugi e Komai, 1998.



5.5 Efeito das substâncias isolados sobre os mediadores pró-inflamatórios *in vitro*

Após o isolamento e elucidação estrutural por métodos espectroscópicos usuais, as substâncias hispidulina e cirsimaritina (3, 10 e 30 μM) foram avaliadas *in vitro* sobre a liberação da citocina IL-1 β nas mesmas condições anteriores (Figura 26). A hispidulina, inibiu em $45,5 \pm 1,6\%$; $57,1 \pm 16,3\%$ e $25,2 \pm 4,0\%$ a liberação dessa citocina quando avaliada nas concentrações 3, 10 e 30 μM , respectivamente. Já a cirsimaritina, inibiu significativamente a produção de IL-1 β nas duas menores concentrações (3 e 10 μM), reduzindo a liberação em $42,0 \pm 2,8\%$ e $69,8 \pm 4,3\%$, respectivamente.

Estudos anteriores analisaram *in vitro* e *in vivo* o efeito da hispidulina em diabetes (WANG^a et al., 2020), lesão renal (KIM, LEEM, 2022), hipertrofia cardíaca (WANG^b et al., 2020) e anticancerígena (LV et al., 2020). Shin e colaboradores (2021) relataram os efeitos inibitórios da produção de óxido nítrico (NO) de hispidulina em estudo *in vitro* utilizando macrófagos murinos da linhagem RAW264.7 estimulados com LPS. A hispidulina, isolada de *Artemisia argyi*, nas concentrações 100, 50 e 25 μM suprimiu a produção de NO de maneira dependente da concentração. Em modelo de inflamação alérgica, a hispidulina (10, 20 e 30 μM), inibiu a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-4) em linhagem de mastócitos humanos RBL-2H3 (KIM et al., 2019).

O potencial anti-inflamatório de cirsimaritina foi relatado por Shin e colaboradores (2017). Os autores observaram que a cirsimaritina (1 – 10 $\mu\text{g/mL}$) inibiu a produção de NO, IL-6 e TNF em macrófagos RAW267.7 estimulados com LPS (100 ng/mL).

Esses achados corroboram a atividade inibitória de liberação de citocinas pró-inflamatórias apresentada pelo extrato EtAOc de *B. myriocephala*, demonstrando que a hispidulina e a cirsimaritina tem um papel importante nessa atividade.

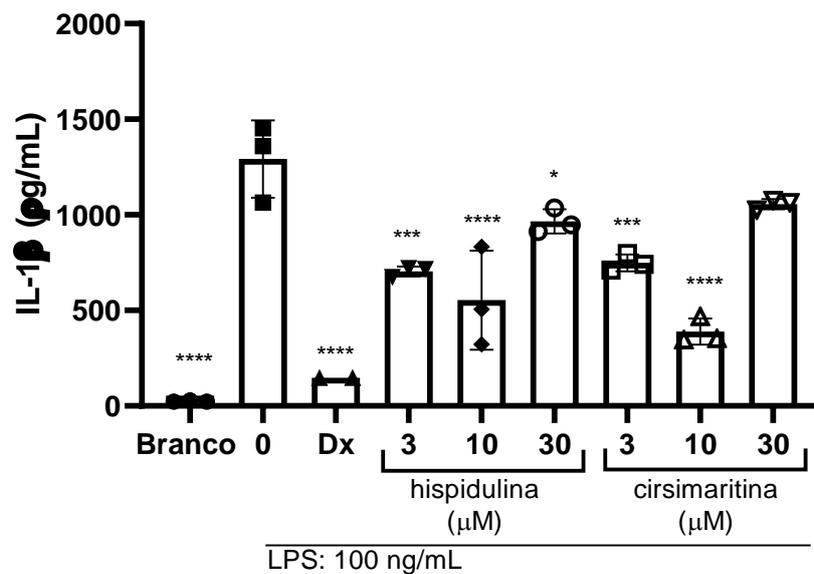


Figura 26: Efeito das substâncias hispidulina e cirsimaritina (3, 10 e 30 μM) isoladas de *B. myriocephala* sobre a liberação de IL-1 β em células THP-1 estimuladas com LPS (100 ng/mL). Os dados representam a média \pm DP em triplicata. **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; * $p < 0,5$ comparando com células+LPS (0). Dx: dexametasona (10 μM).

5.6 Efeito *in vitro* das frações sobre a produção de espécies reativas de oxig nio

Espécies reativas de oxig nio (EROs) são um grupo de moléculas com pelo menos um átomo de oxig nio, o qual possui maior reatividade do que o oxig nio molecular (HERB *et al.*, 2021). As EROs são produzidas como subprodutos de processos metabólicos oxidativos (SUN *et al.*, 2020) e em resposta a sinais exógenos, como patógenos ou sinais endógenos, como citocinas (MEUREN *et al.*, 2022). Em baixas concentrações de EROs, as células são capazes de se defender contra os danos causados por essas espécies por meio da assistência de enzimas antioxidantes. No entanto, quando os níveis de EROs excedem a capacidade do sistema de defesa intracelular ocorre a indução de estresse oxidativo, processo que está implicado no aparecimento e progressão de muitas doenç as cr nicas (KIM *et al.*, 2020).

O efeito das frações DCM, EtOAc e MeOH/H₂O (10 e 30 $\mu\text{g/mL}$) sobre a produção de EROs foi avaliada *in vitro* (Figura 27). A fração obtida em DCM reduziu (18,7 \pm 8,83% e 20,32 \pm 4,06%) a formação de espécies reativas de oxig nio nas duas concentrações avaliadas, enquanto as outras frações não reduziram significativamente a formação de EROs.

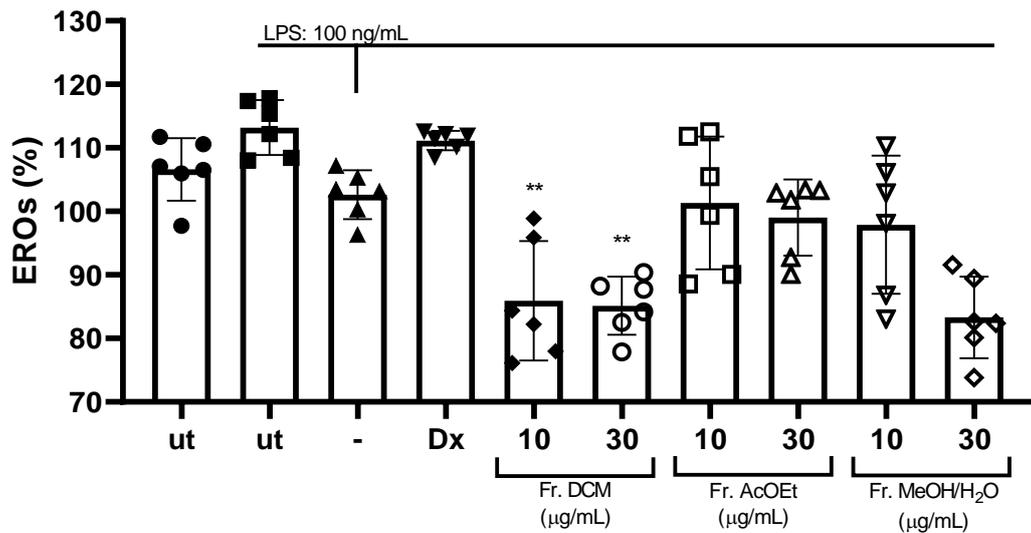


Figura 27: Efeito das frações de *B. myrioccephala* (10 e 30 µg/mL) sobre a produção de EROs em células THP-1 estimuladas com LPS (100 ng/mL). Os dados representam a média ± DP em hexaplicata. ** p < 0,01; comparando com células+LPS (-). Veículo: (DMSO+EtOH 1:4); Dx: dexametasona (10 µM); DCM: fração diclometano; EtOAc: fração acetato de etila; MeOH/H₂O: fração metanol/água (1:1)

Para a análise do efeito de EROs, as células foram coradas com a sonda diacetato 2',7'-diclorohidrofluoresceína (DCFH-DA, 5 µM), e após serem oxidadas, formaram o composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF). Portanto, a microplaca foi visualizada por microscopia de fluorescência pelo sistema de imagem celular EVOS (Figura 28).

Araújo e colaboradores (2017) relataram o potencial de *Baccharis trimera* em inibir a produção de EROs. Eles identificaram cinco flavonoides e nove ácidos fenólicos por LC-DAD-ESI-MS. Após avaliar o efeito antioxidante do extrato, os pesquisadores observaram que *B. trimera* (25

e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresenta excelente potencial para modular a produção de EROs em comparação com os padrões de quercetina e rutina.

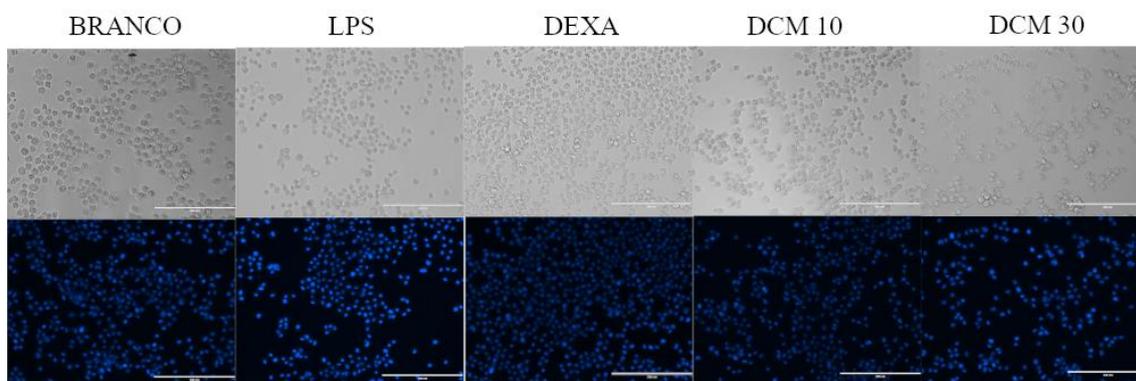


Figura 28: Células THP-1 coradas com DCFH-DA. Branco: células+meio; LPS: lipopolissacarídeo (100 ng/mL); DEXA: dexametasona (10 μM); DCM 10: fração diclorometano 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; DCM 30: fração diclorometano 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Os resultados experimentais de Zhang e colaboradores (2020) demonstraram que a atividade antioxidante dos flavonoides está correlacionada a sua estrutura. A quantidade e posicionamento dos grupos hidroxilas do anel B dos flavonoides, influenciam os mecanismos da atividade antioxidante. As substâncias que não possuem o grupo *orto*-di-hidroxi no anel B, tiveram uma redução na atividade antioxidante, pois as hidroxilas na posição *orto* contribui muito para o efeito de eliminação de radicais do flavonoide. A quercetina, que possui um grupo 3',4'-*O* – dihidroxi, teve a maior atividade com EC_{50} $8,77 \pm 0,09 \mu\text{M}$. Os autores avaliaram a atividade antioxidante de 60 flavonoides em três ensaios diferentes, incluindo a atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), a capacidade de absorção de radicais de oxigênio e a atividade antioxidante celular em células HepG2.

Os constituintes majoritários da fração EtOAc, a hispidulina e a cirsimaritina, são flavonas que não possuem sistema *orto*-dihidroxi, sendo hidroxiladas apenas na posição 4' do anel B, o que pode justificar a ausência de atividade antioxidante dessa fração. Já a caracterização cromatográfica da fração DCM, revelou a presença de ácidos fenólicos e outras flavonas além da cirsimaritina e hispidulina, que não foram identificados e podem ser os responsáveis pela atividade antioxidante observada.

6. CONCLUSÃO

A avaliação do efeito das espécies de *Baccharis* sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* revelou três espécies (*B. oblongifolia*, *B. oreophila* e *B. myriocephala*) capazes de inibir significativamente a produção de TNF, IL-1 β e IL-6. O estudo fitoquímico biomonitorado do extrato etanólico de partes aéreas de *Baccharis myriocephala* resultou no isolamento de duas flavonas metoxiladas, hispidulina e cirsimarina, que inibiram significativamente a liberação de IL-1b *in vitro*, contribuindo para a potencial atividade anti-inflamatória observada para o extrato.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P. Baccharis (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v. 7, p. 76-96. 2007.
- ABOODY, M. S. A.; MICKYMARAY, S. Anti-Fungal Efficacy and Mechanisms of Flavonoids. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, p. 45-87, 2020.
- ALHARRIS, E.; ALGHETAA, H.; SETH, R.; CHATTERJEE, S.; SINGH, N. P.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P. Resveratrol Attenuates Allergic Asthma and Associated Inflammation in the Lungs Through Regulation of miRNA-34a That Targets FoxP3 in Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 2018.
- ARAÚJO, G. R.; RABELO, A. C. S.; MEIRA, J. S.; JÚNIOR, J. V. R.; BORGES, W. C.; SÁ, R. G.; BATISTA, M. A.; LEMOS, D. S.; SOUZA, G. H. B.; BRANDÃO, G. C.; CHAVES, M. M.; COSTA, D. C. *Baccharis trimera* inhibits reactive oxygen species production through PKC and down-regulation p47^{phox} phosphorylation of NADPH oxidase in SK Hep-1 cells. **Experimental Biology and Medicine**, n. 242, n. 3, p. 333-343, 2017. Doi: 10.1177/1535370216672749.
- BANSAL, S.; CHHIBBER, S. Curcumin alone and in combination with augmentin protects against pulmonary inflammation and acute lung injury generated during Klebsiella pneumoniae B5055-induced lung infection in BALB/c mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 429-437, 2010.
- BOTAS, G. S.; CRUZ, R. A. S.; ALMEIDA, F. B.; DUARTE, J. L.; ARAÚJO, R. S.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R.; CARVALHO, J. C. T.; SANTOS, M. G.; ROCHA, L.; PEREIRA, V. L. P.; FERNANDES, C. P. Baccharis reticularia DC. and Limonene Nanoemulsions: Promising Larvicidal Agents for Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) Control. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1990-2004, 2017.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira - VI. II. 6th ed. Brasília: Fiocruz, 2019a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Práticas Integrativas e Complementares. Práticas Integrativas e Complementares no SUS, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. - Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRUBAKER, S. W.; BONHAM, K. S.; ZANONI, I.; KAGAN, J. C. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 33, p. 257-290, 2015. Doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, P. V.; MATZENBACHER, N. I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 268-271, 2005.

BUDEL, J. M.; WANG, M.; RAMAN, V.; ZHAO, J.; KHAN, S. I.; REHMAN, J. U.; TECHEN, N.; TEKWANI, B.; MONTEIRO, L. M.; HEIDEN, G.; TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V.; KHAN, I. A. Essential Oils of Five *Baccharis* Species: Investigations on the Chemical Composition and Biological Activities. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2620, 2018. Doi: 10.3390/molecules23102620.

CAMPANA, P. R. V.; COLEMAN, C. M.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, D.; BRAGA, F. C. Mansoins C-F, oligomeric flavonoid glucosides isolated from *Mansoa hirsuta* fruits with potential anti-inflammatory activity. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 2279-2286, 2016.

CAMPANA, P. R. V.; COLEMAN, C. M.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, D.; BRAGA, F. C. TNF-alpha inhibition elicited by mansoins A and B, heterotrimeric flavonoids isolated from *Mansoa hirsuta*. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 824-830. 2014.

CAMPOS, F. R.; BRESSAN, J.; JASINSKI, V. C. G.; ZUCCOLOTTO, T.; DA SILVA, L. E.; CERQUEIRA, L. B. *Baccharis* (Asteraceae): Chemical Constituents and Biological Activities. **Chem. Biodiversity**, v. 13, p. 1-17, 2016.

CARRAZZONI, A. S. H. S. G. G. Avaliação do potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. (Melastomataceae). 2016. 97f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

CARVALHO, D. C. M. Atividade anti-inflamatória da Marinobufagina em modelos *in vivo* e *in vitro*. 2018. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

CHEN, L.; DENG, H.; CUI, H.; FANG, J.; ZUO, Z.; DENG, J.; LI, Y.; WANG, X.; ZHAO, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204-7218, 2018. Doi: 10.18632/oncotarget.23208.

CHOVATIYA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, Inflammation and defense of homeostasis. **Mol Cell**, v. 54, n. 2, p. 281–288, 2014. Doi:10.1016/j.molcel.2014.03.030.

COTE, B.; ELBARBRY, F.; BUI, F.; SU, J. W.; SEO, K.; NGUYEN, A.; LEE, M.; RAO, D. A. Mechanistic Basis for the Role of Phytochemicals in Inflammation-Associated Chronic Diseases. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 871, 2022. doi: 10.3390/molecules27030781.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach, 3a. ed., Wiley: England, 2009.

DOURADO, R. S.; LADEIRA, A. M. Identificação de flavonoides em *Hypericum cordatum* (Vell.) N. Robson (Clusiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 4, p. 611-620, 2008.

FAJGENBAUM, D.C.; JUNE, C.H. Cytokine Storm. **The New England journal of medicine**, v. 383, n. 23, p. 2255–2273, 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2026131>.

FITZGERALD, K. A.; KAGAN, J. C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. **Cell**, v. 180, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>.

FRADE, A. C. M. Fitoquímica e atividade antiartrítica de espécies do gênero *Baccharis*. 2020. 128f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

GALVÃO, I.; SUGIMOTO, M. A.; VAGO, J. P.; MACHADO, M. G.; SOUSA, L. P. Mediators of Inflammation.

GOMES, A. C. C.; SAMPAIO, L. S.; SILVA, P. A.; LAMAS, M. E.; SAKURAGUI, C. M.; JUNIOR, C. B. B.; SIMAS, N. K.; KUSTER, R. M. *In vitro* effect of isoscahftoside isolated from *Syngonium podophyllum* on pig kidney Na⁺, K⁺-ATPASE. **Química nova**, v. 37, n. 10, p. 1606-1609, 2014. Doi: 10.5935/0100-4042.20140257.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, n. 8, v. 11, p. 837-848, 2008.

GRECCO, S. S.; DORIGUETO, A. C.; LANDRE, I. M.; SOARES, M. G.; MARTHO, K.; LIMA, R.; PASCON, R. C.; VALLIM, M. A.; CAPELLO, T. M.; ROMOFF, P.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G. Structural crystalline characterization of sakuranetin – an

antimicrobial flavanone from twigs of *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Molecules**, v. 19, p. 7528-7542, 2014.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. *The Flavonoids*; Academic Press: New York, 1975.

HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; MACIAS, L. *Baccharis* sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 943-983, 2009. DOI: 10.1590/2175-7860200960411.

HEIDEN, G.; PIRANI, J. R. Taxonomy of *Baccharis* subgen. *Tarchonanthoides* (Asteraceae: Astereae: Baccharidinae), a group from the southeastern South American grasslands and savannas. **Phytotaxa**, v. 241, n. 1, p. 1, 2016.

HEIDLAND, A.; KLASSEN, A.; RUTKOWSKI, P.; BAHNER, U. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? **Journal of Nephrology**, v.19, p. 102-109, 2006.

HERB, M.; SCHRAMM, M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 313, 2021. Doi: 10.3390/antiox10020313.

HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **Journal Immunol Methods**, v. 82, n. 2, p. 253-259, 1985. Doi: 10.1016/0022-1759(85)90357-6. PMID: 4045201.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L.; ZHAO, J.; et al. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020.

ILLIANO, A.; PINTO, G.; GAGLIONE, R.; ARCIELLO, A.; AMORESANO, A. Inflammation protein quantification by multiple reaction monitoring mass spectrometry in lipopolysaccharide-stimulated THP-1 cells. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 35, n. 20, e. 9166, 2021. Doi: 10.1002/rcm.9166.

JO, S.; KIM, S.; SHIN, D. H.; KIM, M-S. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, i. 1, p. 145-151, 2019.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 461, 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.

KHOMICH, O. A.; KOCHETKOV, S. N.; BARTOSCH, B.; IVANOV, A. V. Redox Biology of Respiratory Viral Infections. **Viruses**, v.10, n. 8, p. 392-419, 2018.

KIM, G. Y.; JEONG, H.; YOON, H. Y.; YOO, H. M.; LEE, J. Y.; PARK, S. H.; LEE, C. E. Anti-inflammatory mechanisms of suppressors of cytokine signaling target ROS via NRF-2/thioredoxin induction and inflammasome activation in macrophages. **BMB Reports**, v. 53, n. 12, p. 640-645, 2020. Doi: 10.5483/BMBRep.2020.53.12.161.

KIM, D. E.; MIN, K-J.; KIM, M-J.; KIM, S-H.; KWON, T. K. Hispidulin Inhibits Mast Cell-Mediated Allergic Inflammation through Down-Regulation of Histamine Release and Inflammatory Cytokines. **Molecules**, v. 24, n. 11, 2019. Doi: 10.3390/molecules24112131.

KIM, K.; LEEM, J. Hispidulin Ameliorates Endotoxin-Induced Acute Kidney Injury in Mice. **Molecules**, v. 27, n. 6, 2019. Doi: 10.3390/molecules27062019

KOK, F. O.; WANG, H.; RIEDLOVA, P.; GOODYEAR, C. S.; CARMODY, R. J. Defining the structure of the NF- κ B pathway in human immune cells using quantitative proteomic data. **Cellular Signalling**, v. 88, e. 110154, 2021. Doi: 10.1016/j.cellsig.2021.110154.

KUNNUMAKKARA, A. B.; SAILO, B. L.; BANIK, K.; HARSHA, C.; PRASAD, S.; GUPTA, S. C.; BHARTI, A. C.; AGGARWAL, B. B. Chronic diseases, inflammation, and spices: how are they linked? **Journal of Translational Medicine**, v. 16, n. 14, 2018. Doi: 10.1186/s12967-018-1381-2.

KUMAR, V. Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets. **International immunopharmacology**, v. 89, 2020. Doi:10.1016/j.intimp.2020.107087.

LANI, R.; HASSANDARVISH, P.; SHU, M-H.; PHOON, W. H.; CHU, J. J. H.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D.; BAKAR, S. A.; ZANDI, K. Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus. **Antiviral Research**, v. 133, p. 50-61, 2016.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, 2009. Doi: 10.1101/cshperspect.a001651.

LEE, J-P.; LI, Y-C.; CHEN, H-Y.; LIN, R-H.; HAUNG, S-S.; CHEN, H-L.; KUAN, P-C.; LIAO, M-F.; CHEN, C-J.; KUAN, Y-H. Protective effects of luteolin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury involves inhibition of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in neutrophils. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 7, p. 831-838, 2010.

LIM, H. J.; JIN, H-G.; WOO, E-R.; LEE, S. K.; KIM, H. P.; The root barks of *Morus alba* and the flavonoid constituents inhibit airway inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 169–175, 2013. Doi: 10.1021/jf802412m.

LIMA, F. O.; BEZERRA, A. S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia**, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S-C. NF- κ b signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 17023, 2017.

LOSQUI, Y. R.; ROZETE, F. S. S.; ALMEIDA, M. B.; BITTENCOURT A. H. C.; PEREIRA, S. P. F. Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) DC., (Asteraceae) sobre cultura de células *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 931-936, 2009.

LV, L.; ZHANG, W.; LI, T.; JIANG, L.; LU, X.; LIN, J. Hispidulin exhibits potent anticancer activity *in vitro* and *in vivo* through activating ER stress in non-small-cell lung cancer cells. **Oncology Reports**, v. 43, n. 6, p. 1995-2003, 2020.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MEDIC-SARIC, M.; JASPRICA, I.; SMOLCIC-BUBALO, A.; MORNAR, A. Optimization of Chromatographic Conditions in Thin Layer Chromatography of Flavonoids and Phenolic Acids. **Croatica chemica acta**, v. 77, p. 361-366, 2004.

MEDZHITOV R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-35, 2008. doi: 10.1038/Nature07201.

MELO, D. B.; PAYANT, B. E. N.; LIU, W. C.; UHL, S.; HOAGLAND, D.; MØLLER, R.; JORDAN, T. X.; OISHI, K.; PANIS, M.; SACHS, D.; WANG, T. T.; SCHWARTZ, R. E.; LIM, J. K.; ALBRECHT, R. A.; TENOEVER, B. R. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. **Cell**, v. 181, p. 1-10, 2020.

MENA, P.; CIRLINI, M.; TASSOTTI, M.; HERRLINGER, K. A.; DALL'ASTA, C.; RIO, D. D. Phytochemical Profiling of Flavonoids, Phenolic Acids, Terpenoids, and Volatile Fraction of a Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1576, 2016. Doi: 10.3390/molecules21111576.

MEUREN, L. M.; PRESTES, E. B.; PAPA, M. P.; CARVALHO, L. R. P.; MUSTAFÁ, Y. M.; COSTA, L. S.; POIAN, A. T.; BOZZA, M. T.; ARRUDA, L. B. Infection of Endothelial Cells by Dengue Virus Induces ROS Production by Different Sources Affecting Virus Replication, Cellular Activation, Death and Vascular Permeability. **Frontiers of Immunology**, v. 13, e. 810376, 2022. Doi: 10.3389/fimmu.2022.810376.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUSSBACHER, M.; SALZMANN, M.; BROSTJAN, C.; HOESEL, B.; SCHOERGENHOFER, C.; DATLER, H.; HOHENSINNER, P.; BASÍLIO, J.; PETZLBAUER, P.; ASSINGER, A.; SCHMID, J. A. Cell Type-Specific Roles of NF- κ B Linking Inflammation and Thrombosis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 85, 2019. Doi: 10.3389/fimmu.2019.00085.0.

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.

NICHOLLS, J. M.; POON, L. L. M.; LEE, K. C.; NG, W. F.; LAI, S. T.; et al. (2003). Lung pathology of fatal severe acute respiratory syndrome. **The Lancet**, v. 361, n. 9371, p. 1773-1778, 2003.

NIE, L.; CAI, S-Y.; SHAO, J-Z.; CHEN, J. Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. 1523, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.01523.

OLENNIKOV, D. N.; KASHCHENKO, N. I.; CHIRIKOVA, N. K.; VASIL'EVA, A. G.; GADIMLI, A. I.; ISAEV, J. I.; VENNOS, C. Caffeoylquinic Acids and Flavonoids of Fringed

Sagewort (*Artemisia frigida* Willd.): HPLC-DAD-ESI-QQQ-MSProfile, HPLC-DAD Quantification, in Vitro Digestion Stability, and Antioxidant Capacity. **MDI**, v. 8, n. 307, 2019. Doi:10.3390/antiox8080307.

OLIVEIRA, B. H.; NAKASHIMA, T.; FILHO, J. D. D.; FREHSE, F. L. HPLC analysis of flavonoids in *Eupatorium littorale*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, 2001. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532001000200019>.

OLIVEIRA, C. B.; COMUNELLO, L. N.; LUNARDELLI, A.; AMARAL, R. H.; PIRES, M. G. S.; SILVA, G. L.; MANFREDINI, V.; VARGAS, C. R.; GNOATTO, S. C. B.; OLIVEIRA, J. R.; GOSMANN, G. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1113-1123, 2012.

OLIVEIRA, C. B.; COMUNELLO, L. N.; MACIEL, E. S.; GIUBEL, S. R.; BRUNO, A. N.; CHIELA, E. C. F.; LENZ, G.; GNOATTO, S. C. B.; BUFFON, A.; GOSMANN, G. The Inhibitory Effects of Phenolic and Terpenoid Compounds from *Baccharis trimera* in Siha Cells: Differences in Their Activity and Mechanism of Action. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 11022-11032, 2013.

OLIVEIRA, C.T.; MAIA, B. H. L. N. S.; FERRIANI, A. P.; SANTOS, V. A. Q.; CUNHA, M. A. A.; TEIXEIRA, S. D. Chemical Characterization, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Potential of Essential Oil from the Leaves of *Baccharis oreophila* MALME. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 2, e. e180037, 2019. Doi:10.1002/cbdv.201800372

PATIL, K. R.; MAHAJAN, U. B.; UNGER, B. S.; GOYAL, S. N.; BELEMKAR, S.; SURANA, S. J.; OJHA, S.; PATIL C. R. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4367-4405, 2019.

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.

RESENDE, R. R. *Biotechnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações*. v. 3. São Paulo: Blucher, 2015.

REZENDE, T. P.; CORRÊA, J. O. A.; AARESTRUP, B. J. V.; AARESTRUP, F. M.; SOUSA, O. V.; FILHO, A. A. S. Protective Effects of *Baccharis dracunculifolia* Leaves Extract against Carbon Tetrachloride- and Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in Experimental Animals. **Molecules**, n. 19, v. 7, p. 9257-9272, 2014. Doi: 10.3390/molecules19079257

RIBEIRO, V. P.; ARRUDA, C.; EL-SALAM, M. A.; BASTOS, J. K. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253-268, 2018.

ROCHA, M. P.; CAMPANA, P. R. V.; PADUA, R. M.; SOUZA-FILHO, J. D.; FERREIRA, D.; BRAGA, F. C. 3,3''-Linked Biflavanones from *Ouratea spectabilis* and Their Effects 2 on the Release of Proinflammatory Cytokines in THP-1 Cells. **Journal of Natural Products**, in press. 2020.

ROSETO, S.; POZO, F. D.; SIMBAÑA, W.; ÁLVAREZ, M.; QUINTEROS, M. F.; CARRILLO, W.; MORALES, D. Polyphenols and Flavonoids Composition, Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Andean *Baccharis macrantha* Extracts. **Plants**, n. 11, v. 12, 2022. Doi: 10.3390/plants11121555.

SANTANA, F. P. R.; SILVA, R. C.; GRECCO, S. S.; PINHEIRO, A. J. M. C. R.; CAPERUTO, L. C.; COSTA, F. M. A.; CLAUDIO, S. R.; YOSHIZAKI, K.; MACCHIONE, M.; RIBEIRO, D. A.; TIBÉRIO, I. F. L. C.; NETO, L. G. L.; LAGO, J. H. G.; PRADO, C. M. Inhibition of MAPK and STAT3-SOCS3 by Sakuranetin Attenuated Chronic Allergic Airway Inflammation in Mice. **Mediators of Inflammation**, n. 2019, 2019. Doi: 10.1155/2019/1356356.

SANTOS, D. A.; FUKUI, M. J.; NANAYAKKARA, N. P. D.; KHAN, S. I.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F.; FILHO, A. A. S.; QUINTÃO, N. L. M. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 543–550, 2010.

SANTOS, M. S.; SILVA, J.; MENEZES, A. P. S.; et al. Biotoxicological analyses of trimeroside from *Baccharis trimera* using a battery of *in vitro* test systems. **Oxid. Med. Cell Longev**, v. 2018, e. 7804135, 2018.

SHIN, M. S.; PARK, J. Y.; LEE, J.; YOO, H. H.; HAHM, D. H.; LEE, S. C.; LEE, S.; HWANG, G. S.; JUNG, K.; KANG, K. S. 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.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.051>.

SHIN, S-M.; LEE, J.; LEE, J. W.; PARK, S. H.; LEE, I. K.; CHOI, J. A.; LEE, S. J.; KANG, K. S. Anti-Inflammatory Effect of *Artemisia argyi* on Ethanol-Induced Gastric Ulcer: Analytical, *In Vitro* and *In Vivo* Studies for the Identification of Action Mechanism and Active Compounds. **Plants**, v. 10, n.2, 2021.

SILVIA, G-R. A.; GABRIELA, T-T.; MARIBEL, H-R.; NAYELI, M-B.; LUIS, T-E. J.; ALEJANDRO, Z.; MANASÉS, G-C. Effect of Terpenoids and Flavonoids Isolated from *Baccharis conferta* Kunth on TPA-Induced Ear Edema in Mice. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1379-1392, 2020.

SINGH, H.; SEN, R.; BALTIMORE, D.; SHARP, P. A. A nuclear factor that binds to a conserved sequence motif in transcriptional control elements of immunoglobulin genes. **Nature**, v. 319, p. 154-158, 1986.

SINGH, S.; SINGH, T. G. Role of Nuclear Factor Kappa B (NF-KB) Signalling in Neurodegenerative Diseases: An Mechanistic Approach. **Current Neuropharmacology**, v. 18, n. 10, p. 918-935, 2020. Doi: 10.2174/1570159X18666200207120949.

SOTILLO, W. S.; TARQUI, S.; HUANG, X.; ALMANZA, G.; OREDSSON, S. Breast cancer cell line toxicity of a flavonoid isolated from *Baccharis densiflora*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, n. 188, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03349-4>

SOUZA, M. T.; SOUZA, M. T.; BERNARDI, D.; MELO, D. J.; ZARBIN, P. H. G.; ZAWADNEAK, M. A. C. Insecticidal and oviposition deterrent effects of essential oils of *Baccharis* spp. and histological assessment against *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). **Scientific reports**, v. 11, e. 3944, 2021. doi: 10.1038/s41598-021-83557-7

STOLZ, E. D.; MULLER, L. G.; TROJAN-RODRIGUES, M.; BAUMHARDT, E.; RITTER, M. R.; RATES, S. M. K. Survey of plants popularly used form pain relief in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, 2014.

STRUIVING, S.; HACKE, A. C. M.; SIMIONATTO, E. L.; SCHARF, D. R.; KLIMACZEWSKI, C. V.; BESTEN, M. A.; HEIDEN, G.; BOLIGON, A. A.; ROCHA, J. B. T.; VELLOSA, J. C. R.; NUNES, D. S.; GRANATO, D.; PEREIRA, R. P. Effects of Gender

and Geographical Origin on the Chemical Composition and Antiradical Activity of *Baccharis myriocephala* and *Baccharis trimera*. **Foods**, v. 9, n. 10, p. 1433, 2020. doi: 10.3390/foods9101433.

SUN, Y.; LU, Y.; SAREDY, J.; WANG, X.; DRUMMER IV, C.; SHAO, Y.; SAAOUD, F.; XU, K.; LIU, M.; YANG, W. Y.; JIANG, X.; WANG, H.; YANG, X. ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes. **Redox biology**, n. 37, e. 101696, 2020. Doi: 10.1016/j.redox.2020.101696.

TAGUCHI, L.; PINHEIRO, N. M.; OLIVO, C. R.; TOLEDO, A. C.; GRECCO, S. S.; et al. (2015). A flavanone from *Baccharis retusa* (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF- κ B, oxidative stress and metalloproteinases. **Respiratory Research**, v. 16, n. 1, p. 79-94, 2015.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820. 2010.

TAVARES, L. P.; TEIXEIRA, M. M.; GARCIA, C. C. The inflammatory response triggered by Influenza virus: a two-edged sword. **Inflammation Research**, v. 66, p. 283-302, 2017.

TOLEDO, A. C.; SAKODA, C. P. P.; PERINI, A.; PINHEIRO, N. M.; MAGALHÃES, R. M.; GRECCO, S.; TIBÉRIO, I. F. L. C.; MARTINS, M. A.; LAGO, J. H. G.; PRADO, C. M. Flavonone treatment reverses airway inflammation and remodelling in an asthma murine model. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 7, p. 1736–1749, 2013.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VIEIRA, T. O.; SEIFRIZ, I.; CHARÃO, C. C. T; OLIVEIRA, S. Q.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 4, p. 601-607, 2011.

WAGNER, H. and BLADT, S. Plant Drugs Analysis, a Thin Layer Chromatography. 2nd Edition, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2001.

WANG^a, Y.; WANG, A.; ALKHALIDY, H.; LUO, J.; MOOMAW, E.; NEILSON, A. P.; LIU, D. Flavone Hispidulin Stimulates Glucagon-Like peptide-1 secretion and Ameliorates

Hyperglycemia in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. **Mol Nutr Food Res.**, v. 64, n. 6, e. 1900978, 2020. Doi: 10.1002/mnfr.201900978.

WANG^b, Y.; XIE, Z.; JIANG, N.; WU, Z.; XUE, R.; DONG, B.; FAN, W.; DAI, G.; CHEN, C.; LI, J.; CHEN, H.; YE, Z.; FANG, R.; CHOY, M.; ZHAO, J.; DONG, Y.; LIU, C. Hispidulin Attenuates Cardiac Hypertrophy by Improving Mitochondrial Dysfunction. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 7, e. 582890, 2020. Doi: 10.3389/fcvm.2020.582890.

WONG, C. K.; LAM, C. W. K.; WU, A. K. L.; IP, W. K.; LEE, N. L. S.; CHAN, I. H. S.; LIT, L. C. W.; HUI, D. S. C.; CHAN, M. H. M.; CHUNG, S. S. C.; SUNG, J. J. Y. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome. **Clinical Experimental Immunol**, v. 136, n. 1, p. 95-103, 2004.

YANG, L.; GUO, H.; LI, Y.; MENG, X.; YAN, L.; DAN, ZHANG.; WU, S.; ZHOU, H.; PENG, L.; XIE, Q.; JIN, X. Oleoylethanolamide exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced THP-1 cells by enhancing PPAR α signaling and inhibiting the NF- κ B and ERK1/2/AP-1/STAT3 pathways. **Sci Rep**, v. 6, n. 34611, 2016. doi: 10.1038/srep34611.

YAO, C.; NARUMIYA, S. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 3, p. 337-354, 2019.

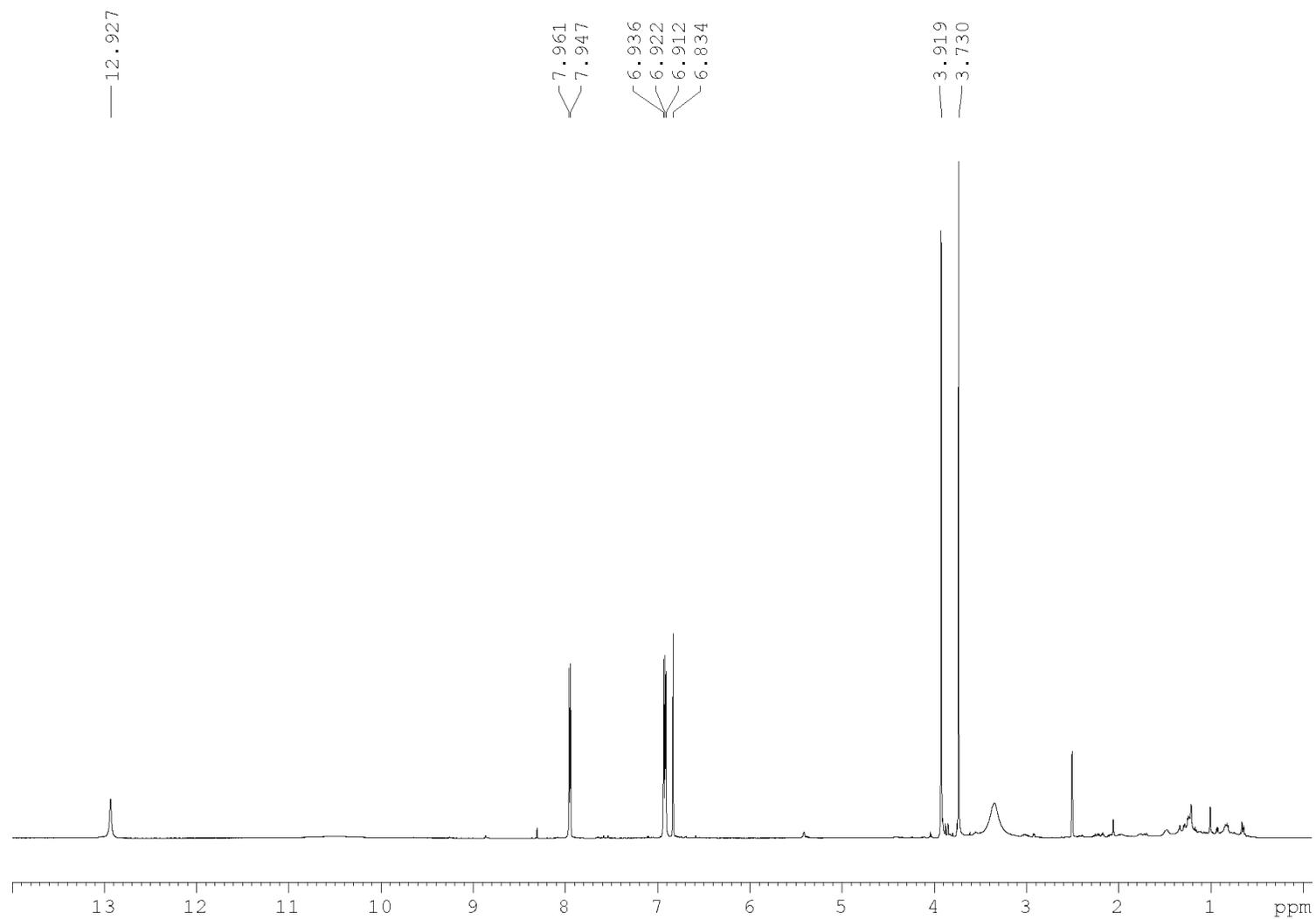
ZAMPIERI, P. R. F. TAMAYOSE, C. I.; FÁVERO, O. A.; ROMOFF, P.; FERREIRA, M. J. P. Two New Flavonoids from the Leaves of *Baccharis oblongifolia* (Ruiz and Pav.) Pers. (Asteraceae). **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 3198, 2019. Doi: 10.3390/molecules24173198.

ZANDI, K.; TEOH, B.T.; SAM, S.S.; WONG, P.F.; MUSTAFA, M.R.; ABUBAKAR, S. Antiviral activity of four types of bioflavonoids against Dengue virus type-2. **Virology Journal**, v. 8, p. 560, 2011.

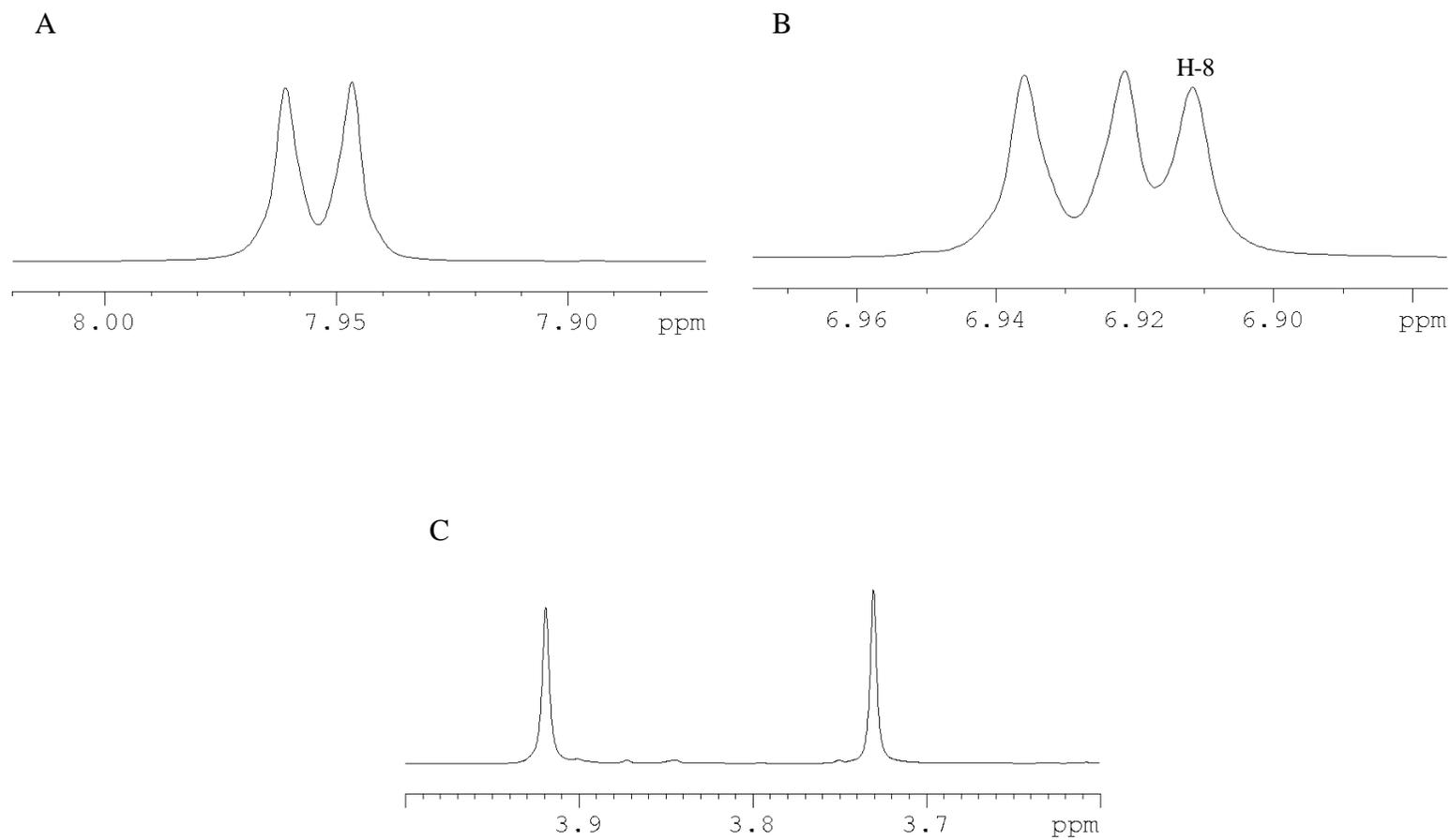
ZHANG, Q.; YANG, W.; LIU, J.; LIU, H.; LV, Z.; ZHANG, C.; CHEN, D.; JIAO, Z. Identification of Six Flavonoids as Novel Cellular Antioxidants and Their Structure-Activity Relationship. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, e. 4150897. Doi: 10.1155/2020/4150897.

ZHOU, B-P.; LU, P-X.; CHEN, Q.; PING, T. X.; JUAN, G. Y.; XIN, L. J.; XING, L.; WEI, L. Z.; CHUN, C. X. SARS. **Diagnostic Imaging of Emerging Infectious Diseases**, p. 5-27, 2015.

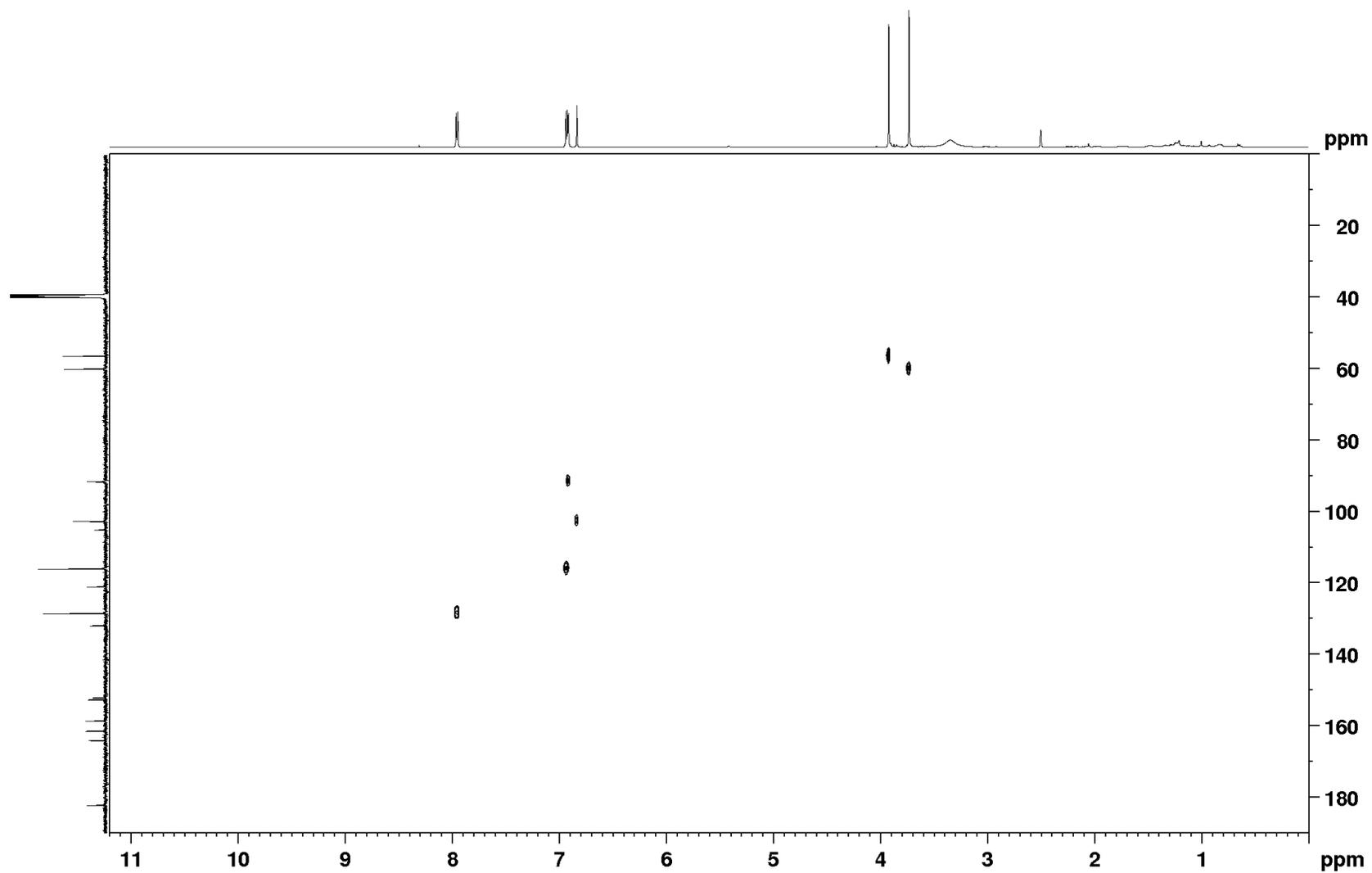
ZUCCOLOTTO, T. Identificação de constituintes químicos de *Baccharis organensis* Baker e avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações das partes aéreas de *Baccharis aracatubaensis* Malag. E *Baccharis organensis* Baker (Asteraceae). 2017. 189f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

APÊNDICE A: Espectro de RMN de ^1H de Flav3 em DMSO- d_6 obtido em 600 MHz.

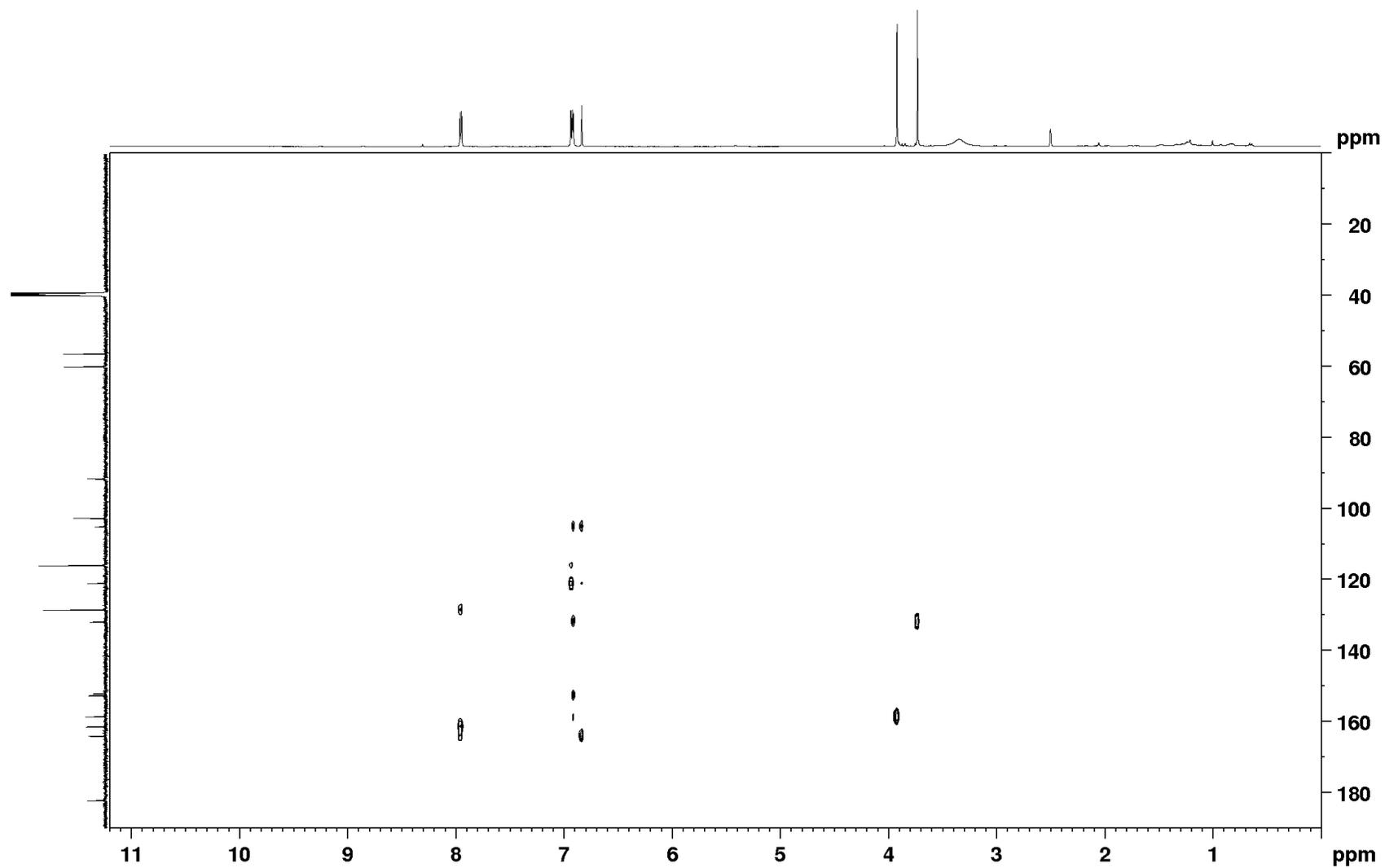
APÊNDICE B: Seção expandida do espectro de RMN de ^1H de Flav3 em DMSO- d_6 obtido em 600 MHz. Hidrogênios do anel *para*-substituído (A), hidrogênio δH 6,91 ppm do anel A (B) e dos hidrogênios metínicos δH 3,91 e 3,73 ppm (C).



APÊNDICE C: Mapa de contornos de HSQC obtidos para Flav3 em DMSO-d₆ em 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C.



APÊNDICE D: Mapa de contornos de HMBC obtidos para Flav3 em DMSO-d6 em 600 MHz para 1H e 150 MHz para 13C.



APÊNDICE E: Seção expandida da região de hidrogênios metínicos (δ_H 3,91 e 3,73 ppm) do mapa de contornos HMBC obtido para Flav3.

