

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Maria Beatriz de Oliveira Rabelo

**FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIVIRAL E EFEITO SOBRE CITOCINAS PRÓ-
INFLAMATÓRIAS DE PLANTAS DA FAMÍLIA ASTERACEAE VISANDO À
IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES ATIVOS CONTRA O SARS-COV-2**

Belo Horizonte

2025

Maria Beatriz de Oliveira Rabelo

**FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIVIRAL E EFEITO SOBRE CITOCINAS PRÓ-
INFLAMATÓRIAS DE PLANTAS DA FAMÍLIA ASTERACEAE VISANDO À
IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES ATIVOS CONTRA O SARS-COV-2**

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

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

Coorientador: Prof. Dr. Fernão Castro Braga, UFMG

Belo Horizonte

2025

R114f Rabelo, Maria Beatriz de Oliveira.
Fitoquímica, atividade antiviral e efeito sobre citocinas pró-inflamatórias de plantas da família Asteraceae visando à identificação de agentes ativos contra o SARS-CoV-2 [recurso eletrônico] / Maria Beatriz de Oliveira Rabelo. – 2025.
1 recurso eletrônico (229 f. : il.) : pdf

Orientador: Rodrigo Maia de Pádua.
Coorientador: Fernão Castro Braga.

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

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. SARS-CoV-2 – Teses. 2. COVID-19 – Teses. 3. Produtos biológicos – Teses. 4. Antivirais – Teses. 5. Anti-inflamatórios – Teses. 6. *Baccharis* – Teses. 7. Asteraceae – Teses. I. Pádua, Rodrigo Maia de. II. Braga, Fernão Castro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:614.4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

"FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIVIRAL E EFEITO SOBRE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS DE PLANTAS DA FAMÍLIA ASTERACEAE VISANDO À IDENTIFICAÇÃO DE AGENTES ATIVOS CONTRA O SARS-COV-2"

MARIA BEATRIZ DE OLIVEIRA RABELO

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

Dra. Betânia Barros Cota
Centro de Pesquisas René Rachou

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

Profa. Dra. Vivian Vasconcelos Costa
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Denise Coutinho Endringer
Universidade Vila Velha - UVV

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

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

Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Lirlandia Pires de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 17/02/2025, às 18:28, 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 **Denise Coutinho Endringer, Usuário Externo**, em 17/02/2025, às 18:30, 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, Chefe de departamento**, em 17/02/2025, às 18:30, 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 **Vivian Vasconcelos Costa Litwinski, Professora do Magistério Superior**, em 17/02/2025, às 18:33, 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 17/02/2025, às 18:33, 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 **Betania Barros Cota, Usuário Externo**, em 18/02/2025, às 17:18, 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 **3968122** e o código CRC **14155D86**.

AGRADECIMENTOS

Aos Laboratórios de Farmacognosia e Fitoquímica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Ao Prof. José Dias de Souza Filho pelo auxílio nas análises de RMN e ao Laremar (Laboratório de Ressonância Magnética).

Ao Prof. Mauro Teixeira e a Prof. Vivian Vasconcelos pela cepa de MHV-3 utilizada nos ensaios.

Ao Dr. Leonardo Camilo de Oliveira, pelos ensaios *in vitro* com o SARS-CoV-2.

À Dra. Kátia Freitas pela colaboração, principalmente com os ensaios biológicos.

Às agências de fomento Capes, CNPq e Fapemig.

*“Quando os ventos de mudança sopram, umas pessoas levantam barreiras,
outras constroem moinhos de vento.”*

Érico Veríssimo

RESUMO

A pandemia de COVID-19 impulsionou uma busca urgente por terapias eficazes contra o SARS-CoV-2 capazes de combater tanto a infecção viral quanto as respostas inflamatórias associadas. Apesar do uso das vacinas no controle da doença, a eficácia reduzida contra novas variantes destaca a necessidade de alternativas terapêuticas. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo isolar e identificar substâncias com atividade antiviral frente ao SARS-CoV-2 e com atividade sobre a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, a partir da triagem de espécies vegetais da família Asteraceae. Inicialmente, seis extratos etanólicos de espécies de *Baccharis* e *Campovassouria* e frações derivadas foram triados em células L929 infectadas com o β -coronavírus murino MHV-3 em concentrações não citotóxicas (10 e 30 $\mu\text{g/mL}$). O extrato de *Campovassouria cruciata*, bem como as frações hexânica (Hex) e diclorometânica (Dcm), foram os que mais reduziram a carga viral. Essas frações também foram testadas em células Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2, e a fração Dcm reduziu a carga viral em 1,3 log. Também, foi avaliado o potencial dos extratos e frações de *C. cruciata*, *Baccharis stylosa* e *Baccharis imbricata* na inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias em células A549 estimuladas com IFN- γ e TNF, sendo as frações diclorometânicas derivadas dos extratos as mais promissoras e, portanto, selecionadas para os estudos fitoquímicos. Após sucessivos fracionamentos, foram isoladas quatro substâncias da fração Dcm de *C. cruciata*, a umbeliferona, a 3-epi-leptocarpina, uma lactona sesquiterpênica inédita, além da leptocarpina e da arturina. Da fração Dcm de *B. stylosa*, foi isolado um flavonoide inédito (3-O-(2-metil-butanoato)-5,7-di-hidroxi-4'-metoxi-flavona), com um grupo metil-butírico como substituinte, além da descrição dos dados espectroscópicos dos dois diterpenos com esqueleto labdânicos ((*E*)-13-metil-12-(((9*R*,10*R*)-4,4,10-trimetil-8-metilenodecahidronaftaleno-9-il)metileno)-2(5*H*)diona e nicandrona) isolados anteriormente. E, da fração Dcm de *B. imbricata*, foi isolado o 12-epi-nicandrodiol, relatado pela primeira vez nessa espécie. Na sequência, todas as substâncias isoladas foram avaliadas quanto ao potencial de inibição da liberação das citocinas IL-6 e IL-8 em células A549 de adenocarcinoma pulmonar, estimuladas com IFN- γ e TNF, bem como a capacidade de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Todas inibiram, em maior ou menor proporção, os níveis de citocinas, de forma concentração dependente, enquanto os níveis de EROs foram aumentados pela

umbeliferona, pelo flavonoide inédito e pelos dois diterpenos, e reduzidos pelas lactonas sesquiterpênicas. Por fim, o potencial antiviral das substâncias isoladas de *C. cruciata* foi demonstrado através da redução da carga viral em células Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2 (1,7 a 2,0 log). Os resultados obtidos evidenciam o potencial promissor dos extratos de *C. cruciata*, *B. stylosa* e *B. imbricata* como fontes promissoras de moléculas com atividades antivirais e anti-inflamatórias.

Palavras-chaves: SARS-CoV-2; produtos naturais; antiviral; anti-inflamatório; *Baccharis*; *Campovassouria*

ABSTRACT

The COVID-19 pandemic has driven an urgent quest for effective therapies against SARS-CoV-2 capable of combating both viral infection and associated inflammatory responses. Despite the use of vaccines in disease control, their reduced efficacy against new variants underscores the need for therapeutic alternatives. In this context, this study aimed to isolate and identify substances with antiviral activity against SARS-CoV-2 and activity in inhibiting the release of pro-inflammatory cytokines, through screening of plant species from the Asteraceae family. Initially, six ethanolic extracts from *Baccharis* and *Campovassouria* species and derived fractions were screened in L929 cells infected with the murine β -coronavirus MHV-3 at non-cytotoxic concentrations (10 and 30 $\mu\text{g/mL}$). *Campovassouria cruciata* extract, along with hexane (Hex) and dichloromethane (Dcm) fractions, showed the greatest reduction in viral load. These fractions were also tested in Calu-3 cells infected with SARS-CoV-2, with the Dcm fraction reducing viral load by 1.3 log. Additionally, the potential of extracts and fractions from *C. cruciata*, *Baccharis stylosa*, and *Baccharis imbricata* in inhibiting the release of pro-inflammatory cytokines in IFN- γ and TNF-stimulated A549 cells was evaluated, with dichloromethane fractions from the extracts showing the most promise and thus selected for phytochemical studies. Following successive fractionations, four substances were isolated from *C. cruciata* Dcm fraction: umbelliferone, 3-epi-leptocarpin, a novel sesquiterpene lactone, in addition to leptocarpin and arturin. From *B. stylosa* Dcm fraction, a novel flavonoid (3-O-(2-methylbutyrate)-5,7-di-hydroxy-4'-methoxy-flavone) with a methyl-butyric group as substituent was isolated, alongside the spectral data description of two labdane-type diterpenes ((E)-13-methyl-12-(((9R,10R)-4,4,10-trimethyl-8-methylenedecahydronaphthalen-9-yl)methylene)-2(5H)dione and nicandrona) previously isolated. From *B. imbricata* Dcm fraction, 12-epi-nicandrodiol, reported for the first time in this species, was isolated. Subsequently, all isolated substances were evaluated for their potential to inhibit the release of IL-6 and IL-8 cytokines in IFN- γ and TNF-stimulated A549 lung adenocarcinoma cells, as well as their ability to inhibit reactive oxygen species (ROS) production. All showed concentration-dependent inhibition of cytokine levels, while umbelliferone, the novel flavonoid, and the two diterpenes increased ROS levels, and sesquiterpene lactones reduced them. Finally, the antiviral potential of substances isolated from *C. cruciata* was demonstrated by

reducing viral load in Calu-3 cells infected with SARS-CoV-2 (1.7 to 2.0 log). These findings highlight the promising potential of *C. cruciata*, *B. stylosa*, and *B. imbricata* extracts as valuable sources of molecules with antiviral and anti-inflammatory activities.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2; natural products; antiviral; anti-inflammatory; *Baccharis*; *Campovassouria*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de replicativo do SARS-CoV-2: estrutura, fusão de membranas, replicação, montagem e liberação viral	32
Figura 2 - Mecanismos imuno patológicos da COVID-19 e suas implicações clínicas	35
Figura 3 - Fluxograma do fracionamento dos extratos etanólicos por partição sequencial entre solventes imiscíveis	47
Figura 4 - Fluxograma do refracionamento da fração Dcm, oriunda de <i>B. stylosa</i>	50
Figura 5 - Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para os extratos etanólicos de <i>B. imbricata</i> (A), <i>B. bevilolia</i> (B), <i>C. cruciata</i> (C), <i>B. stylosa</i> (D), <i>B. calvescens</i> (E) e <i>B. oblongifolia</i> (F) (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	68
Figura 6 - Curvas de multiplicação de MHV-3 em fibroblastos murinos L929 (A) e viabilidade das células infectadas (B).	84
Figura 7 - Efeito dos extratos etanólicos nas cargas virais de fibroblastos L929 infectados com MHV-3	86
Figura 8 - Efeito das frações de <i>C. cruciata</i> e <i>B. stylosa</i> nas cargas virais de fibroblastos L929 infectados com MHV-3.....	88
Figura 9 - Efeito do extrato e frações de <i>C. cruciata</i> na carga viral de células Calu-3 infectados com SARS-CoV-2	90
Figura 10 - Redução da citocina pró-inflamatória IL-6 liberada por células A549 estimuladas por TNF e IFN- γ , e tratadas com extratos e frações de <i>C. cruciata</i> , <i>B. stylosa</i> e <i>B. imbricata</i>	92
Figura 11 - Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para os grupos de frações Fr. 166-191 (A), Fr. 220-247 (B) e Fr. 255-279 (C), oriundas da fração Dcm de <i>C. cruciata</i> (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	94
Figura 12 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD para PPT (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11).....	95
Figura 13 - Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC em escala preparativa para o fracionamento de Fr. 220-247 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8.2)	96
Figura 14 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD de F.63 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	97
Figura 15 - Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para os grupos de frações reunidas Fr. 173-189 (A) e Fr. 245-303 (B) (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	98
Figura 16 - Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC em escala preparativa para o fracionamento dos grupos de frações reunidas Fr. 173-189 (A) e Fr. 245-303 (B) (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.9.1)	99
Figura 17 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD para S2 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	100
Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para as frações A6 e B3 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	101

Figura 19 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD para o grupo de frações reunidas Fr.240-243 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11).....	102
Figura 20 - Fluxogramas dos fracionamentos de <i>C. cruciata</i> (A), <i>B. stylosa</i> (B) e <i>B. imbricata</i> (C)...	103
Figura 21 - Espectro no UV (A) e espectros de massas (ESI+ e ESI-) (B) obtidos para PPT (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	104
Figura 22 - Esqueletos carbônicos das classes de cumarinas	105
Figura 23 - Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel F ₂₅₄ para o sólido PPT (Condições cromatográficas: eluente diclorometano/acetato (8:2); detecção UV-365 nm).....	106
Figura 24 - Espectro de RMN de ¹³ C de PPT (Acetona-d ₆ ; 100 MHz).....	106
Figura 25 - Sub-espectro de DEPT-135 de PPT (Acetona-d ₆ ; 100 MHz).....	107
Figura 26 - Espectro de RMN de ¹ H de PPT (Acetona-d ₆ ; 400 Mhz).....	108
Figura 27 - Espectro no UV (A) e o espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de F.63 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	110
Figura 28 - Espectro de RMN de ¹³ C de F.63 (CDCl ₃ ; 150 MHz)	111
Figura 29 - Sub-espectro de DEPT-135 de F.63 (CDCl ₃ ; 150 MHz)	112
Figura 30 - Esqueletos de alguns tipos de lactonas sesquiterpênicas	113
Figura 31 - Espectro de RMN de ¹ H de F.63 (CDCl ₃ ; 600 Mhz).....	114
Figura 32 - Mapa de contornos HSQC de F.63 (CDCl ₃).....	115
Figura 33 - Espectro de RMN de ¹ H de F.63 (CDCl ₃ ; 600 Mhz).....	116
Figura 34 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de F.63 (CDCl ₃)	116
Figura 35 - Expansão do mapa de correlações homonucleares COSY de F.63 (CDCl ₃)	117
Figura 36 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC (A) e do mapa de contornos NOESY (B) de F.63 (CDCl ₃)	118
Figura 37 - Expansões do espectro de RMN de ¹ H (A) e do mapa de correlações heteronucleares HMBC (B e C) de F.63 (CDCl ₃).....	119
Figura 38 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de F.63 (CDCl ₃)	120
Figura 39 - Mapa de contornos NOESY de F.63 (CDCl ₃).....	121
Figura 40 - Espectro de absorção no UV (A) e o espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de ClITr27,5 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11).....	123
Figura 41 - Mapa de contornos NOESY de ClITr27,5 (CDCl ₃)	125
Figura 42 - Espectro de absorção no UV (A) e espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de ClITr33,2 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11).....	128
Figura 43 - Espectro de RMN de ¹³ C de ClITr33,2 (CDCl ₃ ; 150 MHz)	129
Figura 44 - Sub-espectro de DEPT-135 de ClITr33,2 (CDCl ₃ ; 150 MHz).....	130
Figura 45 - Espectro de RMN de ¹ H de ClITr33,2 (CDCl ₃ ; 600 MHz).....	131
Figura 46 - Mapa de contornos HSQC de ClIFr33,2 (CDCl ₃)	132
Figura 47 - Espectro de RMN de ¹ H de ClITr33,2 em CDCl ₃ (600 MHz).....	133
Figura 48 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de ClITr33,2 (CDCl ₃)	133
Figura 49 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de ClITr33,2 (CDCl ₃)	134
Figura 50 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de ClITr33,2 (CDCl ₃)	135

Figura 51 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de CIITr33,2 (CDCl ₃)	135
Figura 52 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de CIITr33,2 (CDCl ₃)	136
Figura 53 - Mapa de contornos NOESY de CIITr33,2 (CDCl ₃)	137
Figura 54 - Espectro de absorção no UV (A) e espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de S2 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	140
Figura 55 - Espectro de RMN de ¹ H de S2 (DMSO-d ₆ ; 600 MHz)	141
Figura 56 - Expansões do espectro de RMN de ¹ H de S2 (DMSO-d ₆ ; 600 MHz)	142
Figura 57 - Espectro de RMN de ¹³ C de S2 (DMSO-d ₆ ; 150 MHz)	143
Figura 58 - Sub-espectro DEPT-135 de S2 (DMSO-d ₆ ; 150 MHz)	143
Figura 59 - Mapa de contornos HSQC de S2 (DMSO-d ₆)	144
Figura 60 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de S2 (DMSO-d ₆)	145
Figura 61 - Expansão do mapa de correlações homonucleares COSY de S2 (DMSO-d ₆)	146
Figura 62 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de S2 (DMSO-d ₆)	146
Figura 63 - Espectro de absorção no UV (A) e espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de A6 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	150
Figura 64 - Espectro de RMN de ¹³ C de A6 (CDCl ₃ ; 100 MHz)	151
Figura 65 - Sub-espectro de DEPT-135 de A6 (CDCl ₃ ; 100 MHz)	151
Figura 66 - Mapa de contornos HSQC de A6 (CDCl ₃)	152
Figura 67 - Espectro de RMN de ¹ H de A6 (CDCl ₃ ; 400 MHz)	153
Figura 68 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de A6 (CDCl ₃)	154
Figura 69 - Mapa de correlações homonucleares COSY de A6 (CDCl ₃)	155
Figura 70 - Mapa de correlações heteronucleares HMBC de A6 (CDCl ₃)	156
Figura 71 - Expansões do espectro de RMN de ¹ H (A) e do mapa de correlações heteronucleares HMBC (B e C) de A6	157
Figura 72 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de A6 (CDCl ₃)	158
Figura 73 - Espectro no UV (A) e o espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de B3 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	161
Figura 74 - Espectro de RMN de ¹³ C de B3 (CDCl ₃ ; 100 MHz)	162
Figura 75 - Sub-espectro de DEPT-135 de B3 (CDCl ₃ ; 100 MHz)	163
Figura 76 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de B3 (CDCl ₃)	164
Figura 77 - Espectro de RMN de ¹ H de B3 (CDCl ₃ ; 400 MHz)	165
Figura 78 - Mapa de contornos HSQC de B3 (CDCl ₃)	165
Figura 79 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de B3 (CDCl ₃)	166
Figura 80 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de B3 (CDCl ₃)	167
Figura 81 - Expansão do mapa de correlações homonucleares COSY de B3 (CDCl ₃)	168
Figura 82 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de B3 (CDCl ₃)	169
Figura 83 - Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para o extrato etanólico e frações DCM1, A6 e B3 de <i>B. stylosa</i> (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	172
Figura 84 - Espectro no UV (A) e o espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de Fr.243 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)	173

Figura 85 - Espectro de RMN de ^{13}C de Fr.243 (CDCl_3 ; 600 MHz)	174
Figura 86 - Sub-espectro de DEPT-135 de Fr.243 em CDCl_3 (CDCl_3 ; 600 MHz)	174
Figura 87 - Espectro de RMN de ^1H de Fr.243 (CDCl_3 ; 600 MHz)	175
Figura 88 - Mapa de correlações homonucleares COSY de Fr.243 (CDCl_3)	176
Figura 89 - Expansão do mapa de correlações HMBC de Fr.243 (CDCl_3).....	177
Figura 90 - Expansão do mapa de contornos NOESY de Fr.243 (CDCl_3)	178
Figura 91 - Redução das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 liberadas por células A549 estimuladas por TNF e IFN- γ , e tratadas com as substâncias isoladas	182
Figura 92 - Efeito das substâncias isoladas sobre a produção intracelular de EROs em células A549 estimuladas por TNF e IFN- γ	186
Figura 93 - Efeito das substâncias isoladas de <i>C. cruciata</i> nas cargas virais de células Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2	189

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Baccharis</i> coletadas e os respectivos números das exsiccatas	45
Tabela 2 - Rendimento extrativo da percolação do material vegetal coletado	46
Tabela 3 - Rendimento das frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis	48
Tabela 4 - Rendimento das frações obtidas do extrato de <i>C. cruciata</i> , <i>B. stylosa</i> e <i>B. imbricata</i>	49
Tabela 5 - Rendimento extrativo de DCM 1 e DCM 2 a partir do refração da fração Dcm de <i>B. stylosa</i>	50
Tabela 6 - Série eluotrópica utilizada no fracionamento de Dcm de <i>C. cruciata</i> por cromatografia em coluna de sílica gel.....	51
Tabela 7 - Reunião das frações obtidas no refração de Dcm de <i>C. cruciata</i> por cromatografia em coluna de sílica gel e respectivos rendimentos.....	52
Tabela 8 - Gradiente de eluição empregado na análise por RP-HPLC em escala preparativa	54
Tabela 9 - Reunião das frações obtidas no fracionamento de Fr. 255-279 em coluna de sílica gel e respectivos rendimentos	54
Tabela 10 - Série eluotrópica utilizada no fracionamento de Dcm de <i>B. stylosa</i>	55
Tabela 11 - Reunião das frações obtidas no fracionamento de Dcm de <i>B. stylosa</i> por cromatografia em coluna de sílica gel e respectivos rendimentos.....	56
Tabela 12 - Gradiente de eluição empregado no fracionamento de Fr. 173-189 por RP-HPLC em escala preparativa.....	57
Tabela 13 - Gradiente de eluição empregado no fracionamento de Fr. 245-303 por de RP-HPLC em escala preparativa	57
Tabela 14 - Série eluotrópica utilizada no fracionamento de DCM 1 de <i>B. imbricata</i>	58
Tabela 15 - Reunião das frações obtidas no fracionamento de DCM 1 em coluna de sílica gel e respectivos rendimentos	59
Tabela 16 - Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS	61
Tabela 17 - Condições espectroscópicas definidas para as análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS	61
Tabela 18 - Identificação putativa dos constituintes dos extratos etanólicos de <i>B. imbricata</i> , <i>B. bevilfolia</i> , <i>C. cruciata</i> , <i>B. stylosa</i> , <i>B. calvescens</i> e <i>B. oblongifolia</i> a partir de análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11).....	71
Tabela 19 - Máximos de absorção no ultravioleta (UV) de polienos	81
Tabela 20 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C obtidos para PPT (δ em ppm, Acetona-d ₆ ; 400 MHz) e comparação com os dados da literatura para umbeliferona	109
Tabela 21 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C obtidos para F.63 e ClITr27,5 (CDCl ₃ ; 600 MHz) e dados da literatura relatados para a leptocarpina.....	126
Tabela 22 - Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C de ClITr33,2 (CDCl ₃ ; 600 MHz) e comparação com dados da literatura descritos para arturina	138
Tabela 23 - Dados de RMN de ¹ H e de ¹³ C obtidos para S2 (DMSO-d ₆ ; 600 MHz) comparação com dados da literatura descritos para canferídeo	147

Tabela 24 - Análise espectroscópica no ultravioleta de S2 (em metanol e após adição de NaOH e NaOAc).....	149
Tabela 25 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para A6 (CDCl_3 ; 400 MHz)	159
Tabela 26 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para B3 (δ em ppm, CDCl_3 ; 400 MHz) e comparação com os dados da literatura	170
Tabela 27 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para Fr.243 (δ em ppm, CDCl_3 ; 600 MHz) e comparação com os dados da literatura	179

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1 Produtos naturais como fontes de substâncias bioativas	21
3.2 Gênero <i>Baccharis</i>	22
3.3 Gênero <i>Campovassouria</i>	27
3.4 COVID-19	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Equipamentos	42
4.2 Solventes e reagentes	43
4.3 Vidrarias e materiais diversos	43
4.4 Reveladores para Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	44
4.5 Material Vegetal	44
4.6 Preparo dos extratos vegetais	45
4.7 Fracionamento dos extratos de <i>C. cruciata</i> , <i>B. stylosa</i> e <i>B. imbricata</i>	46
4.8 Fracionamento da Dcm de <i>C. cruciata</i> em coluna de sílica gel	51
4.9 Fracionamento da Dcm de <i>B. stylosa</i> em coluna de sílica gel	55
4.10 Fracionamento de DCM 1 de <i>B. imbricata</i> em coluna de sílica	58
4.11 Análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS	60
4.12 Elucidação estrutural das substâncias isoladas	61
4.13 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1 Análise dos extratos selecionados por UPLC-DAD-ESI-MS	68
5.2 Determinação dos Títulos Virais e da Multiplicidade de Infecção (MOI)	83
5.3 Triagem antiviral frente ao coronavírus murino MHV-3	85
5.4 Efeito do extrato e frações de <i>C. cruciata</i> frente ao SARS-CoV-2	89
5.5 Efeito dos extratos e frações na redução da liberação da citocina IL-6	91
5.6 Fracionamento das frações selecionadas	93

5.7 Elucidação estrutural das substâncias isoladas	103
5.8 Atividade dos compostos isolados sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias	180
5.9 Efeito dos compostos isolados sobre a produção de EROS em células A549..	185
5.10 Efeito dos compostos isolados de <i>C. cruciata</i> na replicação do vírus SARS-CoV-2	188
6 CONCLUSÕES	191
REFERÊNCIAS	192
APÊNDICES.....	217

1 INTRODUÇÃO

Em 2019, o coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), o sétimo coronavírus humano, foi descrito pela primeira vez em Wuhan, na China. Desde então o vírus se espalhou por todo o mundo e, em março de 2020, a COVID-19 foi declarada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (CIOTTI et al., 2020). Até o momento, já foram confirmados mais de 7 milhões de mortes em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024).

A rápida disseminação da doença resultou em uma busca urgente por estratégias terapêuticas eficazes contra o SARS-CoV-2. Muitos fármacos foram utilizados com base em sua atividade *in vitro* ou em experiência clínica anterior em outras doenças causadas por coronavírus (LUDWIG; ZARBOCK, 2020). Por exemplo, o remdesivir, ritonavir, lopinavir, ribavirina e dexametasona foram utilizados para reduzir os sintomas em pacientes com COVID-19. No entanto, todos eles apresentam vários efeitos adversos (SINGH et al., 2020). Embora as vacinas sejam a estratégia mais eficaz para controlar o SARS-CoV-2, há preocupações sobre sua eficácia contra novas variantes (TUEKPRAKHON et al., 2022).

Além disso, a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) causada por coronavírus como o SARS-CoV-2 surge da produção desregulada de citocinas – denominada “tempestade de citocinas” – contribuindo para a exacerbação dos sintomas clínicos e, em última análise, levando à morte (FAJGENBAUM; JUNE, 2020). Assim, existe um interesse significativo na identificação de novos agentes antivirais capazes de controlar simultaneamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Nesse contexto, os produtos naturais representam uma estratégia válida para identificar novos compostos antivirais (SHAQRA et al., 2022). Alguns exemplos de medicamentos antivirais que usaram produtos naturais como protótipos são oseltamivir, zanamivir e laninamivir, usados para tratar a gripe (NEWMAN; CRAGG, 2020). Produtos naturais de plantas, animais e organismos marinhos foram amplamente investigados em relação a seus efeitos contra o SARS-CoV-2. Algumas dessas substâncias não apenas reduzem a replicação viral, mas também regulam as respostas inflamatórias e modulam o sistema imunológico (VERMA et al., 2020). Exemplos incluem a tiloforina, alcaloide isolado de *Cynanchum komaroviil*, que demonstra efeitos inibitórios notáveis contra SARS-CoV-2 em células Vero,

juntamente com baicalina e baicaleína, presentes em *Scutellaria baicalensis*, que exibiram inibição da replicação do vírus no mesmo modelo (WANG et al., 2022).

O presente estudo se insere nessa busca por compostos bioativos contra o coronavírus, com a investigação fitoquímica de espécies da família Asteraceae, especificamente dos gêneros *Baccharis* e *Campovassouria*. Esses dois gêneros são encontrados exclusivamente nas Américas, particularmente prevalentes em regiões de alta altitude (HATTORI, 2013; VERDI et al., 2005).

Estudos anteriores sobre espécies de *Baccharis* revelaram a presença de polifenóis incomuns, que são potenciais inibidores do SARS-CoV-2 capazes de bloquear a entrada viral, a replicação e a síntese de proteínas. Exemplos disso são a herbacetina, pectolinarina, miricetina e retusina (KAUL et al., 2021). Já os principais compostos bioativos identificados nas espécies de *Campovassouria* são lactonas sesquiterpênicas. Algumas lactonas sesquiterpênicas estruturalmente semelhantes aos germacranolidos, guaianolídeos e heliangolidos identificados no gênero (BOHLMANN et al., 1983) foram investigadas por suas atividades biológicas. Por exemplo, descobriu-se que reynosina, artemisinina e tagitininas inibem proteínas do SARS-CoV-2, bem como mediadores pró-inflamatórios (ABE et al., 2015; BADRAOUI et al., 2022; MEJÍAS et al., 2022; WANG et al., 2018a).

Dessa forma, o trabalho realizado busca ampliar o conhecimento sobre o potencial bioativo de algumas espécies de *Baccharis* e da *Campovassouria cruciata*, explorando a capacidade de substâncias isoladas desses gêneros de atuar na inibição do SARS-CoV-2 e na liberação de citocinas inflamatórias, a fim de que essas novas moléculas bioativas possam complementar ou inspirar terapias mais seguras e eficazes contra a COVID-19 e futuras pandemias virais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e identificar substâncias com atividade antiviral frente ao SARS-CoV-2 e com atividade sobre a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, a partir da triagem de espécies vegetais da família Asteraceae.

2.2 Objetivos específicos

1. Obter drogas vegetais e produzir extratos de espécies selecionadas da família Asteraceae;
2. Realizar a desreplicação dos extratos obtidos utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas com ionização por *electrospray* (UPLC-DAD-ESI- MS/MS);
3. Realizar o fracionamento por partição entre solventes imiscíveis dos extratos obtidos, visando obter frações enriquecidas em diferentes classes de produtos naturais;
4. Avaliar a atividade antiviral *in vitro* dos extratos e frações em culturas de células L929 infectadas com coronavírus murino MHV-3;
5. Avaliar o efeito dos extratos e frações selecionados quanto a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo *in vitro* com células A549;
6. Isolar e elucidar as estruturas químicas dos constituintes das frações selecionadas, utilizando ferramentas espectroscópicas usuais;
7. Avaliar a atividade antiviral *in vitro* das substâncias isoladas em culturas de células Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2 e avaliar seu efeito sobre mediadores pró-inflamatórios em células A549.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produtos naturais como fontes de substâncias bioativas

Segundo Newman e Cragg (2020) a utilização de produtos naturais e/ou derivados sintéticos constitui uma importante estratégia na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos. Geralmente, essas substâncias apresentam um amplo espectro de atividades farmacológicas, sendo utilizados no tratamento ou prevenção de diversas doenças humanas de alta prevalência, incluindo doenças infecciosas, cânceres, doenças relacionadas aos sistemas gastrointestinal e cardiovascular, entre outras.

Mais da metade de todos os fármacos com massa molar inferior a 500 Da são baseados estruturalmente em algum produto natural e, esse percentual é ainda maior para certas indicações, como infecções bacterianas e câncer. Os produtos naturais fornecem substâncias capazes de se ligarem a proteínas e diversos outros alvos biológicos, uma vez que possuem estruturas tridimensionais com estereoquímica diversificada. Essas características são correlacionadas com o aumento da especificidade de ligação, diminuição da toxicidade, entre outras propriedades relevantes (STONE et al., 2022).

As novas entidades químicas podem ser descobertas, principalmente, a partir de quatro fontes naturais: plantas, animais marinhos, fungos e bactérias. Dentre essas, as substâncias de origem vegetal são de alta relevância (NAJMI et al., 2022). Normalmente, as substâncias isoladas de fontes naturais apresentam características estruturais únicas, incluindo maior número de átomos de oxigênio e de centros quirais, maior complexidade estérica, maior rigidez molecular e maior número de receptores e doadores de ligações de hidrogênio. Devido a essas características únicas, o desenvolvimento de análogos para melhorar a potência e propriedades farmacocinéticas ou reduzir a toxicidade, constitui uma tarefa difícil e complexa para a química medicinal (KOEHN; CARTER, 2005).

Considerando o número de espécies de plantas no planeta e as várias vias biossintéticas capazes de produzir uma extraordinária diversidade química, a biodiversidade em ambientes tropicais e equatoriais oferece um potencial particularmente rico em compostos biologicamente ativos. O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, possuindo mais de 15% de todas as espécies vivas

do planeta. Assim, devido a sua grande extensão territorial e aos diferentes habitats em que as plantas se encontram, sabe-se que a flora brasileira possui uma elevada variedade de classes de substâncias e tipos estruturais de metabólitos secundários, ainda pouco explorados (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

A família Asteraceae é uma das maiores famílias de plantas com flores, incluindo mais de 1600 gêneros e 25.000 espécies. Está amplamente distribuída em todo o mundo, com várias espécies medicinais (ACHIKA et al., 2014; ROLNIK; OLAS, 2021). Dentre os diversos gêneros pertencentes a essa família, destaca-se os gêneros *Baccharis* e *Campouvassouria*, que constituem fontes potenciais de novos compostos bioativos com atividades biológicas diversas, incluindo atividade antiviral e anti-inflamatória.

3.2 Gênero *Baccharis*

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae, uma das maiores e mais diversificadas famílias de angiospermas (VERDI et al., 2005). Estima-se que o gênero *Baccharis* seja constituído por cerca de 500 espécies, distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas. A origem do nome *Baccharis* (Bakkharis) vem do grego, antiga denominação para algumas plantas arbustivas, e chegou a ser empregado para designar espécimes diferentes das que hoje em dia recebem esse nome (BUDEL et al., 2005).

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

Espécies de *Baccharis* são consumidas tradicionalmente na forma de infusões, com indicações para tratar enfermidades do estômago e fígado, anemias, inflamações, diabetes, feridas e úlceras, febre, infecções bacterianas e fúngicas, sendo também descritas como eficazes para o processo de desintoxicação do organismo (ABAD; BERMEJO, 2007; VERDI et al., 2005). Exemplos incluem *Baccharis articulata* (carquejilla) e *Baccharis crispa* (carqueja), utilizadas como diuréticas e digestivas; *Baccharis illinita* (chá-ventura, erva milagrosa) por suas atividades anti-inflamatórias, cicatrizantes e anti-infecciosas, bem como por sua ação

protetora contra úlceras estomacais, além de *Baccharis trinervis* (chilca) no tratamento de febre alta, edemas, feridas e câibras musculares (ABAD; BERMEJO, 2007). *Baccharis genistelloides* é também muito utilizada no Brasil para tratar uma variedade de doenças, tais como desordens digestivas e do fígado, malária, úlceras, diabetes, anemia, diarreia, inflamações urinárias, amigdalite e verminoses, entre outras (MELO et al., 2001).

A fitoquímica do gênero *Baccharis* tem sido extensivamente estudada desde o início do século XX, resultando no isolamento de mais de 150 substâncias. Embora o gênero compreenda uma grande quantidade de espécies, apenas cerca de 120 foram estudadas quimicamente. Os compostos mais frequentemente relatados são flavonoides e terpenóides (KARAM et al., 2013). No que se refere às atividades biológicas, cerca de 30 espécies de *Baccharis* já foram estudadas, destacando-se os efeitos alelopático, antimicrobiano, citotóxico, anti-inflamatório, antifúngico, antioxidante, antiviral, gastroprotetor e hepatoprotetor. Entre as espécies mais pesquisadas quanto à composição química e atividades biológicas destacam-se *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (ABAD; BERMEJO, 2007; CAMPOS et al., 2016; VERDI et al., 2005).

Baccharis dracunculifolia, comumente conhecida como alecrim-do-campo e vassoura, é utilizada na medicina popular para o tratamento de inflamação, distúrbios hepáticos e úlceras estomacais (FIGUEIREDO-RINHEL et al., 2013). Estudos fitoquímicos realizados com essa espécie demonstraram a presença de vários constituintes, incluindo ácido cafeico (**1**), ácido felúrico (**2**), ácido p-cumárico (**3**), bacarina (**4**) e artepelina C (**5**) (LE MOS et al., 2007). No Brasil, as abelhas (*Apis mellifera*) utilizam néctares florais de *B. dracunculifolia* para produzir própolis verde, que apresenta diversas atividades biológicas descritas, incluindo o efeito hepatoprotetor (BÚFALO et al., 2010; SEO et al., 2003; VEIGA et al., 2017). Guimarães et al. (2012) relataram potente atividade antioxidante de *B. dracunculifolia* em ratos, capaz de proteger as mitocôndrias isoladas do fígado contra o dano oxidativo e tal ação contribui, provavelmente, para os efeitos antioxidante e hepatoprotetor da própolis verde. Além disso, o extrato diclorometânico de folhas da espécie apresentou atividade antifúngica e antibacteriana, principalmente contra *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans*, com valores de CI_{50} de 65 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (FILHO et al., 2008), bem como atividade *in vitro* contra

Leishmania donovani, com CI_{50} de 45 $\mu\text{g/mL}$ (FILHO et al., 2009). Costa et al. (2019) descreveram a atividade cicatricial do extrato hidroetanólico de partes aéreas de *B. dracunculifolia* em modelo de úlcera induzida por ácido acético, demonstrando a regeneração significativa do tecido lesado.

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

Genè et al. (1996) sugeriram que *B. trimera* apresenta propriedades anti-inflamatórias e analgésicas que parecem ser devidas, pelo menos em parte, à inibição da biossíntese das prostaglandinas. Por sua vez De Oliveira et al. (2012) avaliaram as atividades antioxidante e anti-inflamatória de seis extratos (diclorometânico, em acetato de etila, *n*-butanólico, aquoso, enriquecido em saponinas e fenólicos) de partes aéreas de *B. trimera*, verificando que o extrato fenólico apresentou o maior potencial antioxidante em relação aos demais extratos. Além disso, foi demonstrada a atividade gastroprotetora e curativa do extrato hidroetanólico, também das partes aéreas dessa mesma espécie, em modelos animais (LÍVERO et al., 2016), bem como o efeito cardioprotetor, já que o extrato etanólico foi capaz de reverter as alterações histopatológicas cardíacas e renais, além de reduzir a frequência cardíaca e a pressão arterial nos modelos experimentais utilizados (SOUZA et al., 2019).

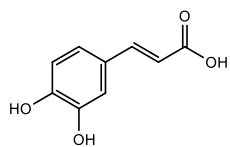
Extratos em *n*-hexano e diclorometano de partes aéreas de *Baccharis grisebachii* mostraram-se eficazes contra as espécies de fungos *Trichophyton rubrum* e *Cryptococcus neoformans*, além de exibir atividade contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA), com Concentração Inibitória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

As substâncias isoladas de *Baccharis pedunculata*, incluindo os flavonoides pectolinarigenina **(16)** e penduletina **(17)**, foram testadas para atividade antifúngica,

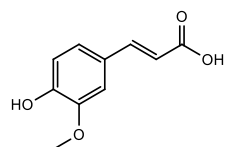
sendo eficazes contra alguns fungos patogênicos (RAHALISON et al., 1995). O extrato etanólico de partes aéreas de *Baccharis conferta* e de alguns compostos isolados, entre eles os flavonoides apigenina-4,7-dimetil éter (**18**), naringenina-4,7-dimetil éter (**19**), pectolinarigenina (**16**) e cirsimarina (**20**), apresentaram importante atividade antiespasmódica (WEIMANN et al., 2002).

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

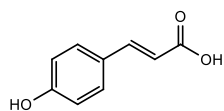
O óleo essencial, extraído das partes aéreas de *B. salicifolia*, demonstrou atividade aleloquímica em besouros adultos da espécie *Tribolium castaneum*, evidenciando um papel importante no controle de pragas. Os terpenos isolados do óleo que produziram maior atividade tóxica foram o β -pineno (**26**),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



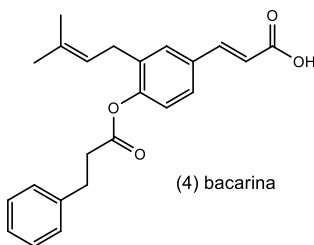
(1) ácido cafeico



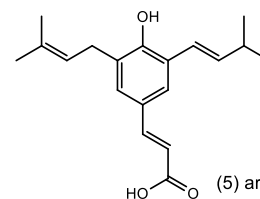
(2) ácido ferúlico



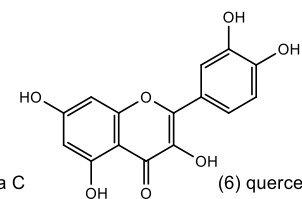
(3) ácido p-cumárico



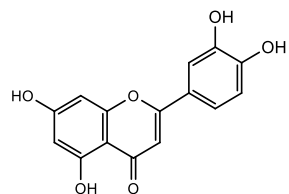
(4) bacarina



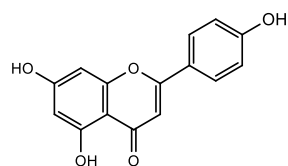
(5) artepelinina C



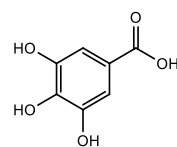
(6) quercetina



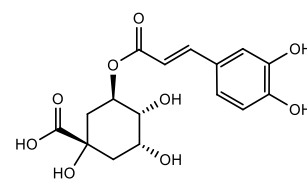
(7) luteolina



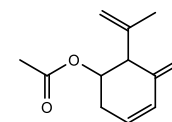
(8) apigenina



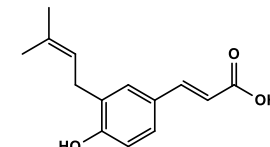
(9) ácido gálico



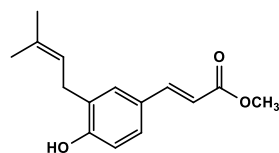
(10) ácido clorogênico



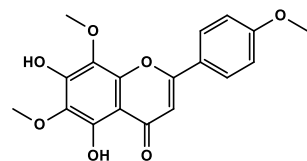
(11) acetato de carquejila



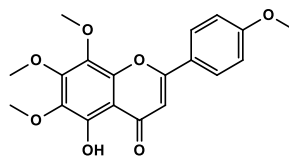
(12) drupanina



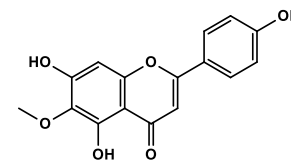
(13) plicatina B



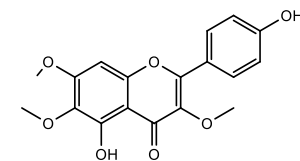
(14) nevadensina



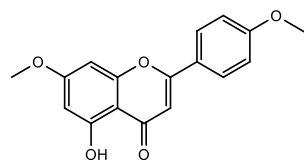
(15) gardenina B



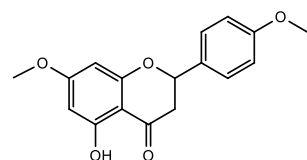
(16) pectolinarigenina



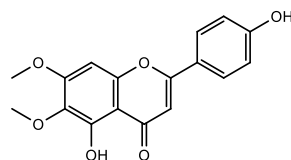
(17) penduletina



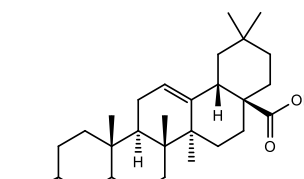
(18) apigenina-4,7-dimetil éter



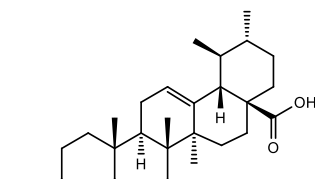
(19) naringenina-4,7-dimetil éter



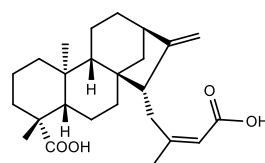
(20) circimaritina



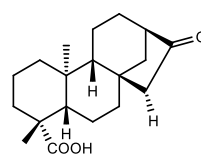
(21) ácido oleanólico



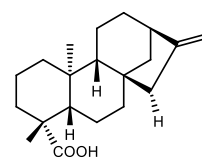
(22) ácido ursólico



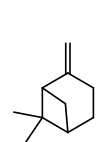
(23) ácido ent-15β-seneciil-oxi-kaur-18-en-19-óico



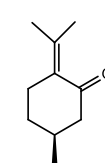
(24) ácido ent-kaur-18-en-19-óico



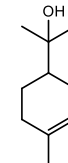
(25) ácido ent-16-oxi-17-nor-kauran-19-óico



(26) β-pireno



(27) pulegona



(28) α-terpineol

3.3 Gênero *Campovassouria*

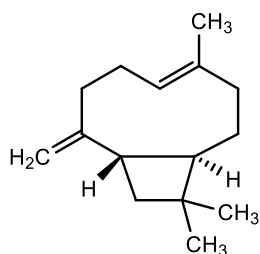
O gênero *Campovassouria*, que também pertence à família Asteraceae, ocorre exclusivamente a América do Sul, com distribuição na Bolívia (porção sul dos Andes), Paraguai, Argentina e Uruguai. No Brasil, ocorre desde o Nordeste (Bahia), passando pelo Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul) até a região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Apenas duas espécies do gênero ocorrem no Brasil, a *Campovassouria cruciata* (Vell.) R.M. King & H. Rob. (sinonímias: *C. bupleurifolia*, *Eupatorium bupleurifolium*) e a *Campovassouria barbosae* H. Rob. A terceira espécie proposta para o gênero, *Campovassouria brevipetiolata* (R.M. King & H. Rob.), ocorre apenas no Uruguai (HATTORI, 2013).

O gênero tem esse nome porque os botânicos se referiam a espécie *Eupatorium bupleurifolium* DC. como vassoura do campo (KING; ROBINSON, 1971). É importante ressaltar que esse gênero pertence a tribo Eupatorieae e a subtribo Disynaphiinae, amplamente estudadas entre as décadas de 1970 e 1990, com base na análise de microcaracterísticas florais, o que resultou em muitas mudanças taxonômicas. No Brasil, os autores continuaram a adotar o conceito tradicional, dificultando a compreensão dos táxons dessa tribo (NAKAJIMA et al., 2017). Um estudo filogenético feito por Rivera et al. (2016), com foco nas Eupatorieae brasileiras, demonstrou que existem muitos gêneros e subtribos polifiléticos, indicando que são necessárias mudanças taxonômicas que incluam os táxons em novas classificações.

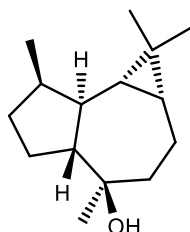
O teor de óleos voláteis das inflorescências e folhas de duas amostras de *C. cruciata* foi analisado, demonstrando a presença predominante de sesquiterpenos oxigenados, incluindo o óxido de cariofileno (**29**), o globulol (**30**), o epiglobulol (**31**) e o germacreno D (**32**) e de monoterpenos, como α -pineno (**33**), β -pineno (**26**), sabineno (**34**) e limoneno (**35**) (DE SOUZA et al., 2021). Bohlmann et al. (1983) isolaram, de frações polares das partes aéreas de *C. bupleurifolia* (sin. *C. cruciata*), os heliangolídeos 1 (**36**), 2 (**37**) e 3 (**38**), os germacrolídeos 4 (**39**), 5 (**40**) e 6 (**41**), o guaianolideo 7 (**42**) e uma outra β -lactona, o 8, β -tigloilguaiaiazololideo (**43**).

Semelhanças químicas são encontradas entre os gêneros *Campovassouria*, *Disynaphia* e *Grazielia*, que possuem em sua composição principalmente diterpenos cauranos, germacranolídeos, heliangolídeos e β -lactonas (DE GUTIERREZ et al., 2001). Os germacranolídeos, guaianolídeos e os heliangolídeos também foram

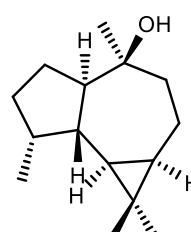
encontrados nas subtribos Eupatoriinae e Mikaniinae (DA COSTA; TERFLOTH; GASTEIGER, 2005).



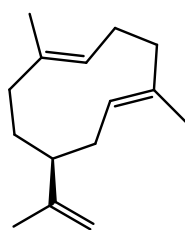
(29) óxido de cariofileno



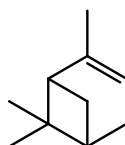
(30) globulol



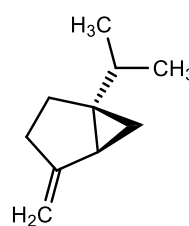
(31) epiglobulol



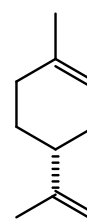
(32) germacreno D



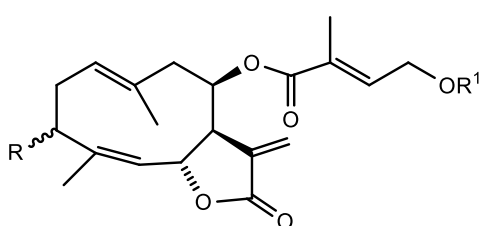
(33) α-pireno



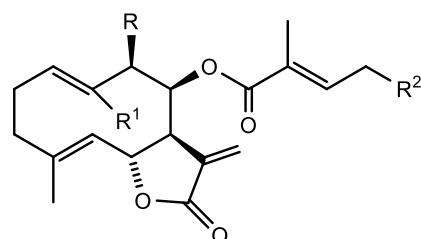
(34) sabineno



(35) limoneno



(36) heliangolideo 1 R = αOAc R¹ = H



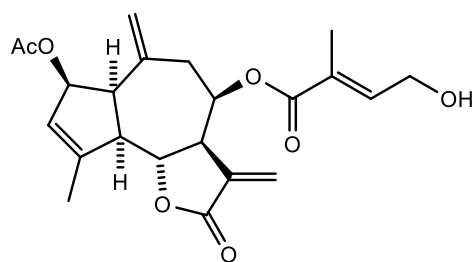
(39) germacrolideo 4 R = H R¹ = Me R² = OH

(37) heliangolideo 2 R = βOAc R¹ = H

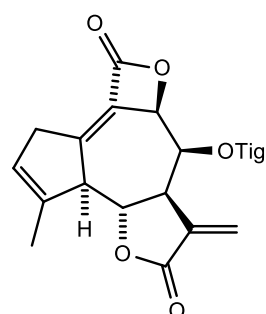
(40) germacrolideo 5 R = OH R¹ = Me R² = H

(38) heliangolideo 3 R = βOAc R¹ = Ac

(41) germacrolideo 6 R = H R¹ = CO₂H R² = H



(42) guananolideo 7



(43) 8,β-tigloilguaiaagrazielolideo

3.4 COVID-19

3.4.1 Características gerais

Desde o início do século XXI, três cepas de coronavírus foram identificadas por causar pneumonia mortal em humanos: o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), que surgiu na província de Guangdong (China), em 2002, e se espalhou para cinco continentes por meio de rotas aéreas (KSIAZEK et al., 2003; DROSTEN et al., 2003), o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), identificado em 2012 na Península Arábica, sendo camelos dromedários os hospedeiros do vírus (HAAGMANS et al., 2014; ZAKI et al., 2012) e, mais recentemente, o SARS-CoV-2, descoberto em dezembro de 2019 em Wuhan, na China (LI et al., 2020; ZHU et al., 2020). Em março de 2020 a COVID-19 foi declarada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Os últimos dados revelam mais de 700 milhões de casos confirmados e mais de 7 milhões de mortes, em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024).

Os coronavírus são vírus de RNA fita simples, envelopados, de sentido positivo, de aproximadamente 30 kb. São amplamente divididos em quatro gêneros: α , β , γ e δ , com base em sua estrutura genômica. Os coronavírus α e β infectam apenas mamíferos (RABI et al., 2020). Além dos tipos altamente patogênicos SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2, todos pertencentes ao gênero β -coronavírus, outros quatro, de baixa patogenicidade, são endêmicos em humanos: HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 e HCoV-229E (WALLS et al., 2020). Os diferentes tipos de coronavírus compartilham uma organização comum de seus genomas de RNA. Eles possuem duas fases de leitura aberta, ORF1a e ORF1b, que traduzem as poliproteínas pp1a e pp1ab, respectivamente. Assim, ORF1a codifica duas proteases, a tipo papaína (PL^{pro}) e a tipo 3C (3CL^{pro} ou M^{pro}), sendo a última essencial para a replicação viral, já que cliva a poliproteína em 11 locais distintos (NEEDLE; LOUNTOS; WAUGH, 2015).

O SARS-CoV-2 é responsável por causar a COVID-19, cujos principais sintomas clínicos são febre, tosse seca, dor de cabeça e dispneia. O vírus é transmitido por meio de gotículas respiratórias e aerossóis, e o período médio de incubação é de 4 a 5 dias antes do início dos sintomas. A doença pode evoluir para insuficiência respiratória progressiva, devido ao dano alveolar, pneumonia secundária e óbito (ZHENG, 2020). Embora o sistema respiratório seja o mais comumente

afetado, já foram relatadas manifestações multissistêmicas para a COVID-19. Os sistemas geralmente afetados incluem a orofaringe, com perda de paladar e dor de garganta; o cardiovascular, com dor no peito, palpitações e arritmias; o gastrointestinal, com diarreia, vômito e náuseas; o neurológico, com cefaleia e confusão mental; o renal, com proteinúria e lesão renal aguda; o cutâneo, com erupção cutânea e urticárias; entre outros (MEHTA et al., 2021).

A entrada do vírus nas células hospedeiras é mediada pela glicoproteína Spike (S), formada por homotrímeros que se projetam da superfície viral. Essa proteína compreende duas subunidades funcionais (S_1 e S_2), responsáveis pela ligação ao receptor da célula hospedeira e pela fusão das membranas virais e celulares (MILLET; WHITTAKER, 2015; TORTORICI et al., 2019). Foi demonstrado que a proteína S da superfície do SARS-CoV-2 se liga à enzima conversora de angiotensina 2 (ECA-2), do receptor de entrada nas células infectadas (LI et al., 2020). Além disso, Hoffmann et al. (2020) sugeriram que a entrada do vírus na célula dependia não apenas na ECA-2, mas também da serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2). Dessa forma, a ECA-2 permite a ligação do vírus às células, enquanto a TMPRSS2 cliva a proteína Spike, facilitando a fusão da membrana viral com a celular. Essa dupla interação é crucial para a infectividade do SARS-CoV-2 (SHIRBHATE et al., 2021).

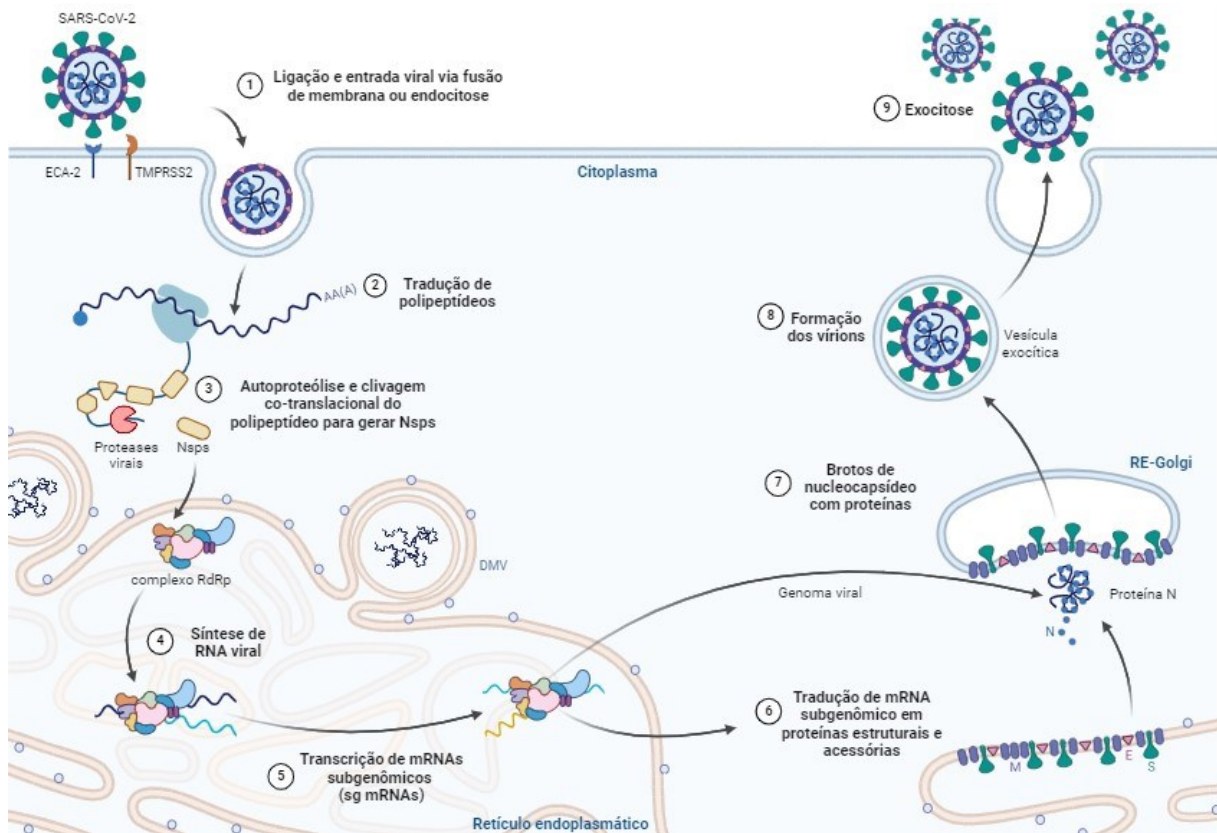
Subsequentemente, o RNA viral é liberado no citoplasma e traduzido em proteínas replicase, que sofrem clivagem para formar proteínas não estruturais individuais (Nsps), resultando na formação da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp). A protease do vírus (PL^{pro}) está estritamente ligada à formação desse complexo de replicase funcional e à promoção da disseminação viral (LU et al., 2020). O retículo endoplasmático (RE) é rearranjado pela replicase para formar vesículas de membrana dupla, que estão envolvidas na replicação do RNA genômico e na transcrição de mRNAs subgenômicos (sg mRNAs). A transcrição do sg mRNAs resulta na formação de proteínas estruturais e acessórias. Essas proteínas são movidas para o compartimento intermediário RE-Golgi para o brotamento viral. Por fim, o genoma envolto na proteína N se reúne para incorporar novos vírions, que são transportados na vesícula e secretados pela membrana por meio de exocitose (HARRISON; LIN; WANG, 2020). A **Figura 1** mostra a fusão de membrana do SARS-CoV-2, mediada pela proteína S e pela TMPRSS2, a replicação, a montagem e a liberação do vírus.

O vírus sofre replicação e propagação local, juntamente com a infecção de células ciliadas nas vias aéreas. Este estágio dura alguns dias e a resposta imune

gerada durante esta fase é limitada. Apesar de ter uma carga viral baixa neste momento, os indivíduos são altamente infecciosos. Em seguida, há migração do vírus do epitélio nasal para o trato respiratório superior através das vias aéreas condutoras. Ocorre uma maior resposta imune durante esta fase envolvendo a liberação do ligante da quimiocina de motivo C-X-C 10 (CXCL-10) e interferons (IFN- β e IFN- λ) das células infectadas pelo vírus. A maioria dos pacientes não progride além desta fase, pois a resposta imune é suficiente para conter a disseminação da infecção (PARASHER, 2021).

Cerca de um quinto dos pacientes infectados progridem para o estágio grave da doença, que começa aproximadamente uma semana após o início dos sintomas. Essa fase é caracterizada pela dispneia e hipoxemia, evoluindo para a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Na SDRA ocorre uma lesão pulmonar, devido a inflamação, o extravasamento vascular e consequente perda de tecido. Pacientes nessas condições apresentam evidências de hiper inflamação sistêmica, com liberação de interleucinas pró-inflamatórias e concentrações elevadas de alguns marcadores como D-dímero, ferritina e proteína C-reativa (PCR) (LAMERS; HAAGMANS, 2022).

Figura 1 - Ciclo de replicativo do SARS-CoV-2: estrutura, fusão de membranas, replicação, montagem e liberação viral



Adaptado de: V'KOVSKI et al., 2021; ZHOU et al., 2021

3.4.2 “Tempestade de citocinas”

O termo “tempestade de citocinas” historicamente é descrito como uma síndrome semelhante a sepse que ocorre após infecções sistêmicas e imunoterapias. Ele se tornou amplamente utilizado, tanto em publicações científicas quanto na mídia, para descrever uma exacerbada produção de citocinas na COVID-19 (NILE et al., 2020).

As infecções virais induzem as respostas imunes inatas e adaptativas. Essas respostas são iniciadas com a ativação do sistema imune inato, que reconhece vários padrões moleculares, como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados à morte (DAMPs). A resposta imune adaptativa é ativada com a indução de células T e a liberação de vários anticorpos específicos pelas células B. A ativação da resposta imune inata e adaptativa estimula a liberação de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, que promovem ainda mais o recrutamento de macrófagos e neutrófilos no local da infecção. Essas respostas

imunes adaptativas e inatas bem coordenadas geralmente eliminam a infecção viral. Porém, as vezes a infecção resulta na ativação de uma resposta inflamatória intensa, levando à destruição excessiva do tecido (SAPRA et al., 2021).

Dessa forma, pode-se dizer que as respostas imunes induzidas pelo SARS-CoV-2 têm duas fases principais. A primeira fase é baseada na proteção contra o vírus, por meio da produção de componentes antivirais e da inibição da progressão da doença, principalmente com a ativação das células dendríticas e macrófagos. A segunda fase é um estado inflamatório que pode levar à “tempestade de citocinas” e induzir danos ao hospedeiro (CHOWDHURY et al., 2020).

A produção de IFN do tipo I é a principal resposta de defesa imunológica natural contra infecções virais, promovendo a eliminação viral e regulando as respostas imunes inatas e adaptativas. Normalmente, esses IFNs do tipo I desempenham um papel antiviral nos estágios iniciais da infecção. No entanto, na COVID-19 grave há uma produção deficiente de IFNs do tipo I e um aumento na liberação tardia de IFN- γ , que amplifica a inflamação e leva a danos teciduais (HU; HUANG; YIN, 2021).

Na infecção por SARS-CoV-2 o vírus infecta o tecido epitelial respiratório e ativa células imunes inatas locais para liberar citocinas inflamatórias, como interleucinas (IL) 1, 6, 8 e 12, fator de necrose tumoral (TNF) e outras quimiocinas. Essas moléculas então recrutam mais células imunes inatas (monócitos, macrófagos, neutrófilos, e células natural killer - NK) e ativam células imunes adaptativas (células T CD4⁺ e CD8⁺) dos tecidos periféricos para produzir citocinas inflamatórias como IL-2, IFN- γ e TNF, que induzem mielopoiese e granulopoiese de emergência e agravam ainda mais os danos pulmonares e epiteliais (YANG et al., 2021).

Vias inflamatórias, incluindo a via de sinalização JAK/STAT, via de sinalização celular IFN e via do NF- κ B são ativadas na tempestade de citocinas associada à COVID-19. Além disso, os níveis de IL-1, IL-6, TNF, IFN- γ e proteína 10 induzida por IFN- γ (IP-10) são elevados em pacientes com COVID-19 e acredita-se que tenham papéis importantes no desenvolvimento do estado hiper inflamatório (ZHU et al., 2020). É importante observar que há uma correlação entre níveis de IL-6 elevados e a mortalidade. Pacientes que morreram de COVID-19 apresentaram níveis séricos de IL-6 significativamente mais altos, podendo este ser usado como um biomarcador prognóstico para detectar pacientes com maior suscetibilidade ao desenvolvimento de uma tempestade de citocinas e prever o desfecho da doença (CHEN et al., 2020).

A tempestade de citocinas está fortemente associada ao desenvolvimento e à progressão da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Os níveis séricos de citocinas, que estão significativamente elevados em pacientes com SDRA, é positivamente correlacionado com a taxa de mortalidade. Além disso, a tempestade de citocinas é um fator crucial na determinação do curso clínico da falência extrapulmonar de múltiplos órgãos. Isso explica parcialmente os sinais de falência de órgãos fora do pulmão (como elevações nas enzimas hepáticas e creatinina) observados em alguns pacientes com COVID-19 que não apresentam insuficiência respiratória, sugerindo que essa tempestade inflamatória de citocinas é responsável pelos danos aos tecidos e órgãos extrapulmonares (YE; WANG; MAO, 2020). Adicionalmente, essa superprodução de citocinas sistêmicas, especialmente IL-2, IFN- γ , GM-CSF e TNF, pode desencadear uma resposta imune desregulada em alguns pacientes, levando a complicações graves como a Síndrome de Ativação Macrofágica (MAS) e a Histiocitose Hemofagocítica (HLH) (ZANZA et al., 2022).

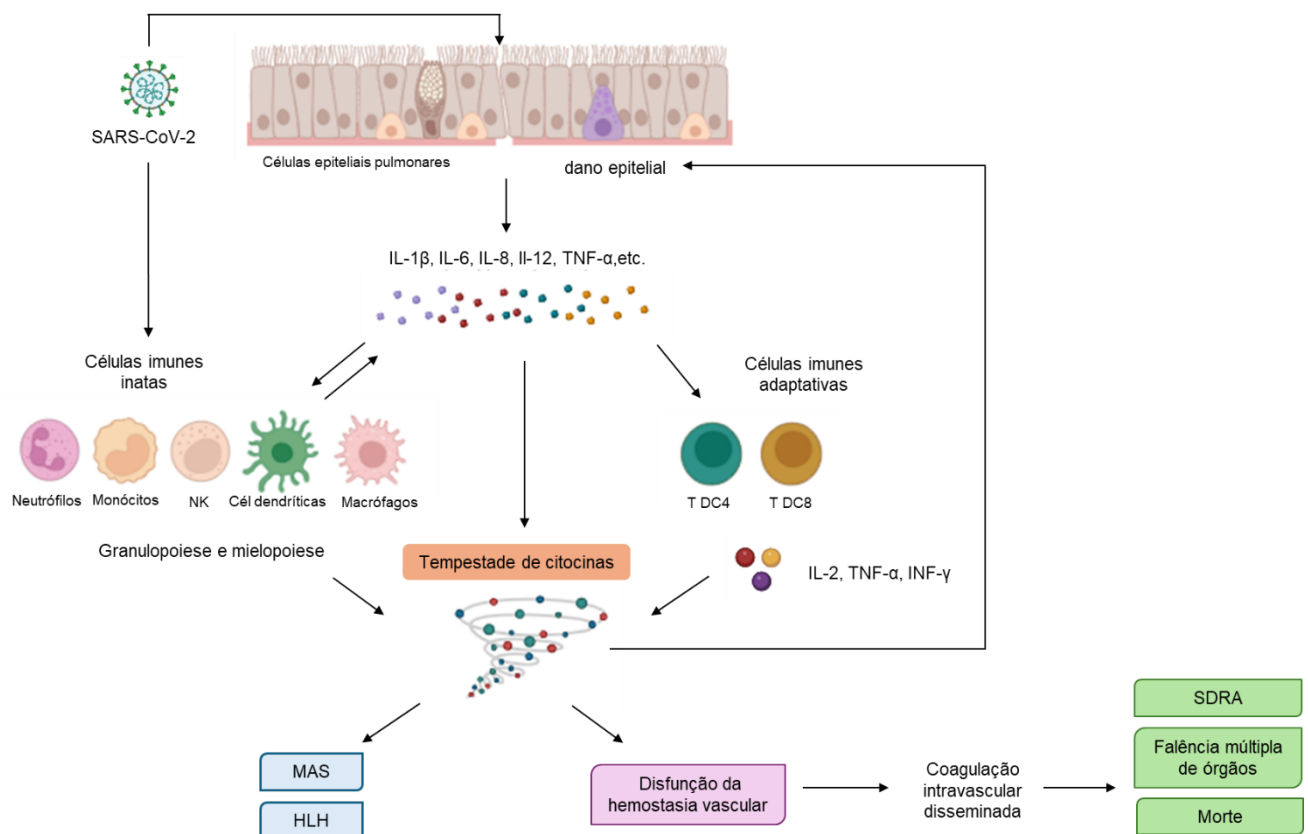
A **Figura 2** resume os mecanismos imuno-patológicos da COVID-19, ilustrando como a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias pode causar inflamação sistêmica, danos ao endotélio vascular e comprometimento da função de múltiplos órgãos, contribuindo para a gravidade da doença.

Além da tempestade de citocinas, a linfopenia é uma manifestação clínica crítica observada em pacientes com COVID-19. Linfopenia é a condição caracterizada por uma redução significativa na contagem de linfócitos, especialmente das células T CD4⁺ e CD8⁺, no sangue periférico. Notavelmente, um estudo relatou que a gravidade da linfopenia e a intensidade da tempestade de citocinas foram maiores em casos graves de COVID-19 em comparação com casos leves. Isso sugere que os níveis elevados de citocinas inflamatórias estão inversamente correlacionados com a população de células T, e esses parâmetros podem indicar a gravidade da doença (TAN et al., 2020).

Existe um ciclo de feedback entre estresse oxidativo e tempestade de citocinas, que é responsável por muitas consequências letais na infecção por COVID-19. O estresse oxidativo induzido pelo SARS-CoV-2 é devido principalmente à disfunção mitocondrial. Geralmente o vírus interrompe a homeostase mitocondrial por meio da perda do potencial da membrana e abertura do poro de transição de permeabilidade, seguido do aumento da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias adicionais, como IL-1 β e IL-6.

Concomitantemente, TNF, IL-6 e IFN- γ , que são as principais citocinas inflamatórias responsáveis pela tempestade de citocinas, previnem a fosforilação oxidativa mitocondrial e, conseqüentemente, diminuem a produção de ATP, resultando em maiores níveis de EROs (GRAZIOLI; PUGIN, 2018; SALEH et al., 2020; SHANG et al., 2022).

Figura 2 - Mecanismos imuno patológicos da COVID-19 e suas implicações clínicas



Adaptado de: YANG et al., 2021

MAS: Síndrome de Ativação Macrofágica; HLH: Histiocitose Hemofagocítica; SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo

3.4.3 SARS-CoV-2 e produtos naturais

Produtos naturais bioativos de origem vegetal, animal e de organismos marinhos têm sido amplamente investigados em estudos *in vitro* e *in vivo* e alguns chegando a ensaios clínicos, indicando um papel relevante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêutica para a COVID-19. Como fontes valiosas de compostos promissores, esses têm recebido atenção significativa no combate à

infecção pelo SARS-CoV-2, atuando na inibição de alvos essenciais como as proteases M^{pro} e PL^{pro}, a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e a glicoproteína Spike (SHAQRA et al., 2022). Alguns desses compostos não apenas reduzem a replicação viral, mas também regulam as respostas inflamatórias e modulam o sistema imunológico, o que é desejável considerando os danos causados pela tempestade de citocinas (VERMA et al., 2020)

Um exemplo é a tiloforina, um alcaloide isolado da planta medicinal *Cynanchum komarovii*. Wang et al. (2021) demonstraram que um racemato da tiloforina **(44)** exibiu atividade inibitória significativa contra SARS-CoV-2 em uma concentração de 0,030 µM em células Vero, com um excelente perfil de seletividade. Além disso, a substância também exibiu eficácia em modelo de infecção em hamster dourado, reduzindo significativamente a carga viral nos pulmões. Outros exemplos são as wallichinas C **(45)** e D **(46)** de *Dryopteris wallichiana*; a saponina A3 **(47)** e sua aglicona, o ácido glicirretínico **(48)**, de *Glycyrrhiza uralensis*, e a baicalina **(49)** e baicaleína **(50)**, que também inibiram a replicação viral em células Vero E6 (HOU et al., 2022; NGWE TUN et al., 2022; YI et al., 2022).

Outros trabalhos demonstram que o extrato de *Andrographis paniculata* e o seu principal compostos bioativo, o diterpeno labdânico andrografolídeo **(51)**, inibiram a produção vírions infecciosos de SARS-CoV-2 com CI₅₀ de 0,036 µg/mL e 0,034 µM, respectivamente, em ensaio de redução de placa de lise em células Calu-3 (SANGIAMSUNTORN et al., 2021). O galato de epigallocatequina **(52)** presente no chá verde, se liga diretamente a proteína S, impedindo a interação do vírus com o receptor ECA-2 e a subsequente entrada na célula (OHGITANI et al., 2021), enquanto o resveratrol **(53)** e pterostilbeno **(54)** inibiram a replicação do SARS-CoV-2 em células Vero, com CI₅₀ de 66 e 19 µM, respectivamente (TER ELLEN et al., 2021). Adicionalmente, o extrato de folhas de *Vitis vinifera*, rico em compostos fenólicos, foi capaz de inibir a replicação do SARS-CoV-2 nos estágios iniciais da infecção em células Vero, bloqueando diretamente as proteínas na superfície viral, em uma concentração de 10 µg/mL (ZANNELLA et al., 2021).

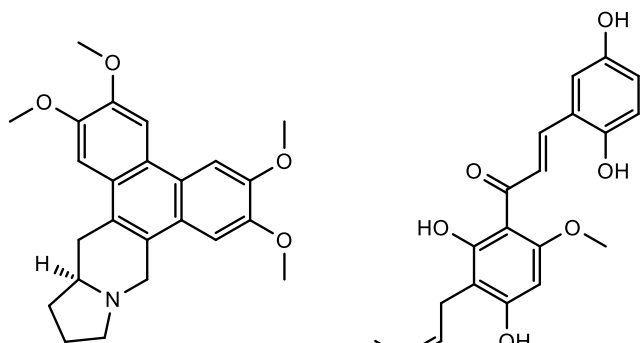
A atenuação da tempestade de citocinas e da infiltração excessiva de células imunes são consideradas etapas importantes para interromper a progressão para doença grave e reduzir a mortalidade. Embora o uso de corticosteroides em pacientes em estágio grave demonstrou ser benéfico na redução da mortalidade e na atenuação da inflamação excessiva, esses apresentam várias desvantagens, incluindo

imunossupressão, risco aumentado de infecções bacterianas secundárias e risco aumentado de desenvolver complicações sistêmicas (LOW et al., 2023).

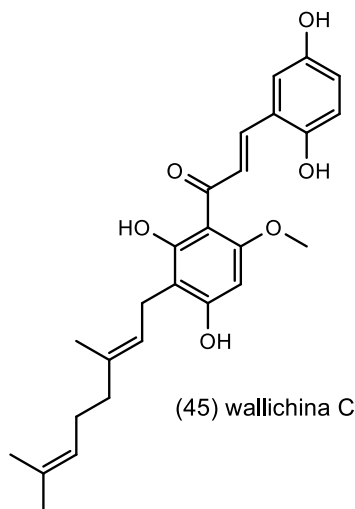
Assim, Roshdy et al. (2020) prepararam um extrato contendo raízes de *Curcuma longa* e sementes de *Piper nigrum*, que demonstrou propriedades imunomoduladoras e potente atividade antiviral contra o SARS-CoV-2. Esse extrato apresentou um efeito virucida *in vitro* contra o SARS-CoV-2 e atuou inibindo a translocação nuclear do NF- κ B p50, o que pode atenuar a tempestade de citocinas associada à infecção. Da mesma forma, algumas preparações utilizadas na medicina tradicional chinesa, como Lianhuaqingwen, Liu Shen e Chingguan Yihau, que possuem em sua composição diversas plantas, suprimiram a replicação do SARS-CoV-2 e a produção excessiva de citocinas *in vitro*, tais como IL-6, TNF e IL-1 β (MA et al., 2020; RUNFENG et al., 2020; TSAI et al., 2021).

Considerando o perfil fitoquímico dos dois gêneros supracitados, pode-se dizer que espécies de *Baccharis* possuem uma ampla gama de polifenóis, principalmente flavonoides com padrão de oxigenação menos frequente, enquanto o gênero *Campovassouria* é caracterizado pela presença de lactonas sesquiterpênicas. Já foi relatado que substâncias de ambas as classes são potenciais inibidores do SARS-CoV-2, seja impedindo a entrada do vírus na célula hospedeira ou interrompendo a replicação e a síntese de proteínas, conforme indicado por estudos *in silico* e *in vitro* (KAUL et al., 2021). É o caso da herbacetina (**55**) e da pectolinarina (**56**), capazes de inibir *in vitro* a principal protease viral 3CL^{pro} (JO et al., 2020), da miricetina (**57**), que demonstrou eficácia significativa como antagonista de RdRp (SINGH et al., 2021) e da retusina (**58**), que por sua vez, inibiu a replicação do SARS-CoV-2 em células Vero E6 e Calu-3 (LEAL et al., 2021). Ao empregar um ensaio de ligação competitiva *in vitro*, (ZHU et al., 2023) constatou que a luteolina (**59**) é capaz de bloquear significativamente a ligação da proteína S ao receptor ECA-2, enquanto a naringenina (**60**) foi identificada por (ABDALLAH et al., 2021) como um potente inibidor da M^{pro}.

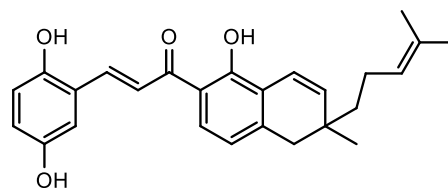
Algumas lactonas sesquiterpênicas estruturalmente semelhantes aos germacranolidos, guaianolídeos e heliangolidos identificados no gênero *Campovassouria* (BOHLMANN et al., 1983) foram investigadas por suas atividades biológicas. Por exemplo, um estudo *in silico* com a artemisinina (**61**) demonstrou que ela pode inibir a atividade da protease M^{pro}, enquanto derivados da reynosina (**62**) e da santamarina (**63**) são capazes de inibir não só a M^{pro}, como também a proteína Spike (BADRAOUI et al., 2022; MEJÍAS et al., 2022).



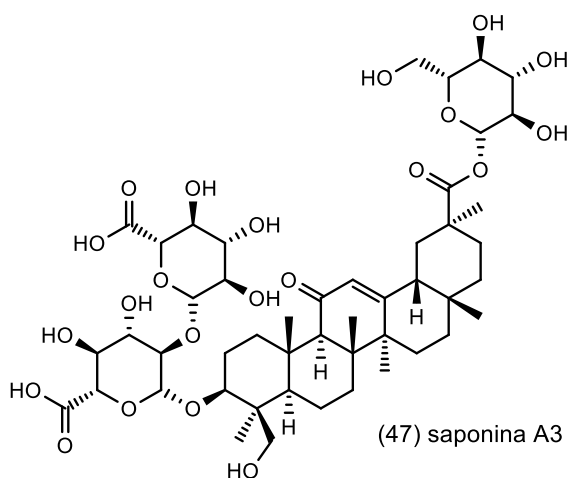
(44) tiloforina



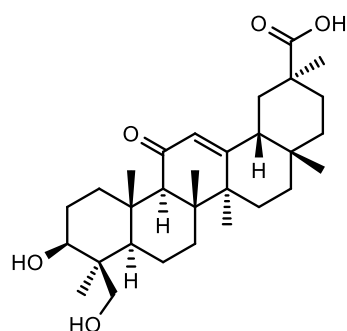
(45) wallichina C



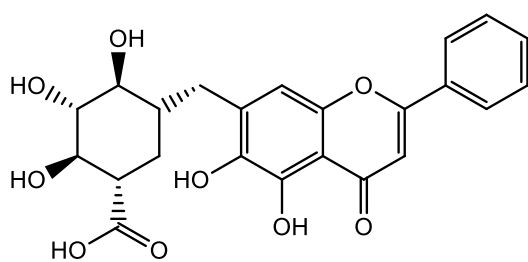
(46) wallichina D



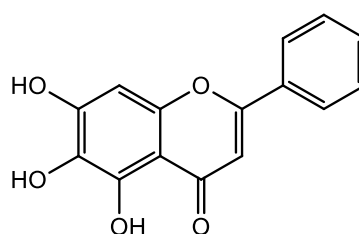
(47) saponina A3



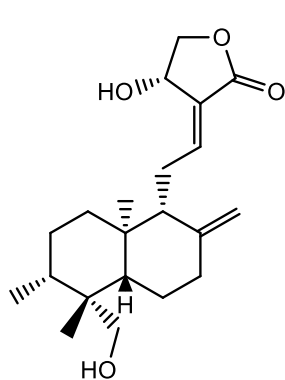
(48) ácido glicirretínico



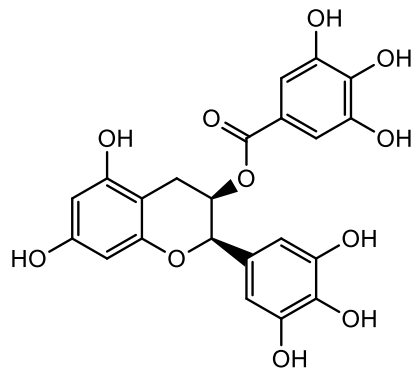
(49) baicalina



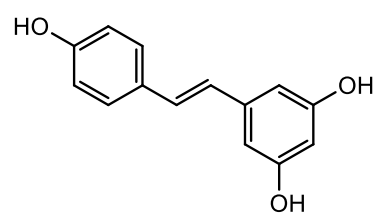
(50) baicaleína



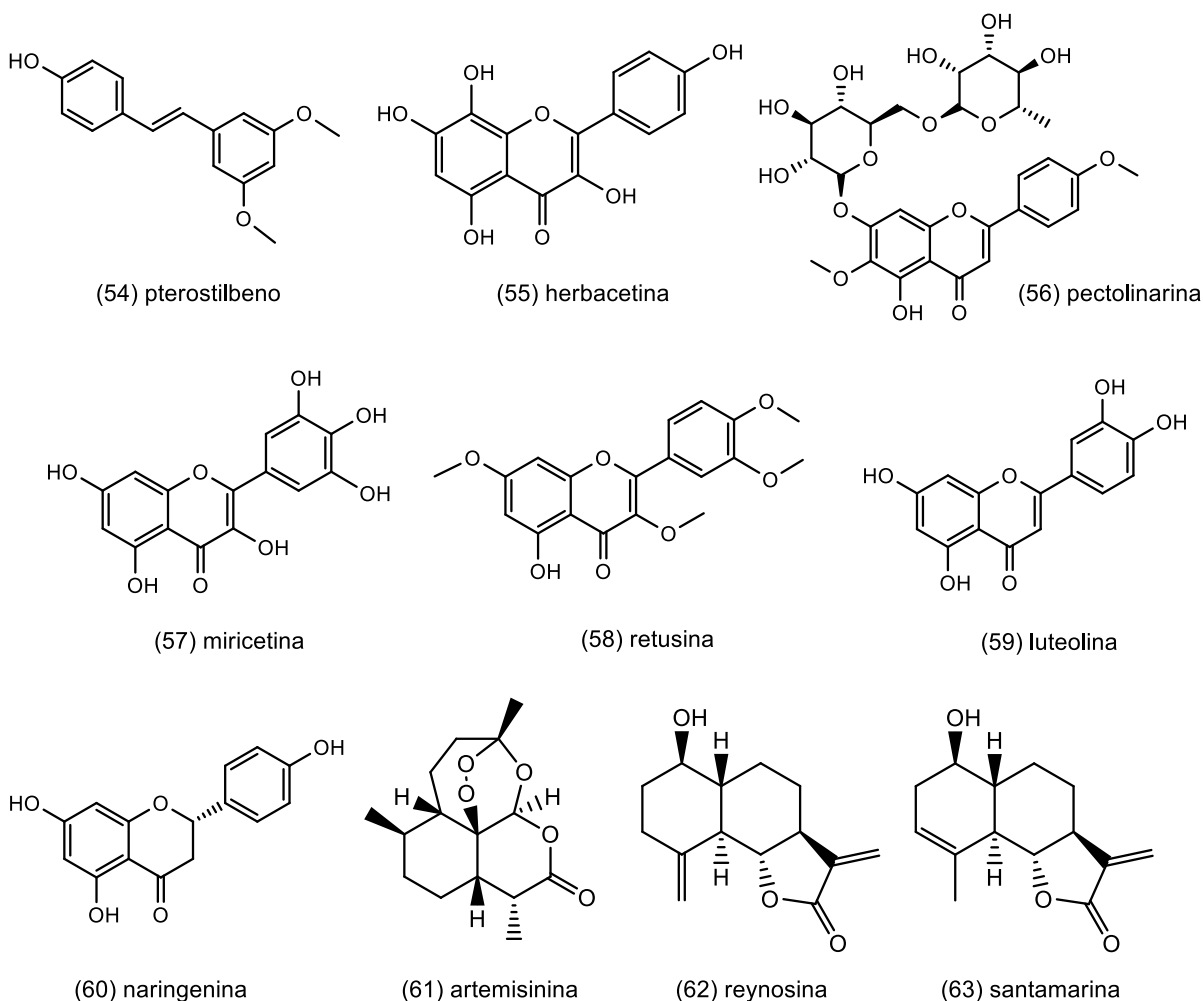
(51) androgafolideo



(52) galato de epigallocatequina



(53) resveratrol



3.4.4 Tratamentos

Muitas abordagens foram reveladas com base no progresso da pesquisa de SARS-CoV-2, incluindo a inibição da fusão/entrada do vírus na célula hospedeira, a interrupção da replicação viral, a supressão da resposta inflamatória excessiva, bem como a combinação da medicina tradicional chinesa e da medicina ocidental (LI et al., 2020).

O reposicionamento de fármacos também foi uma estratégia utilizada na pandemia, uma vez que envolve a identificação e utilização de medicamentos existentes para tratar a infecção causada pelo SARS-CoV-2. É uma abordagem com o objetivo de oferecer uma solução rápida e econômica, já que esses medicamentos possuem perfis de segurança conhecidos e foram aprovados para outras indicações. Alguns exemplos são o remdesivir, originalmente desenvolvido para o tratamento a infecção pelo vírus Ebola; a ribavirina, um antiviral de amplo espectro, aprovado para

tratar o vírus da hepatite C em combinação e o vírus sincicial respiratório e o lopinavir-ritonavir, um antirretroviral para o tratamento do HIV (SINGH et al., 2020).

Além disso, o tratamento da tempestade de citocinas na COVID-19 é crucial para reduzir a mortalidade e a morbidade associadas à doença. Intervenções terapêuticas incluem o uso de corticosteroides, que inibem a resposta inflamatória do hospedeiro e suprimem a resposta imune, ou de inibidores de citocinas específicas, como o tocilizumabe, que bloqueia a ação da IL-6, e a anakira, um antagonista do receptor de IL-1 que bloqueia a atividade da IL-1 α e IL-1 β (HU; HUANG; YIN, 2021).

Nos últimos anos, várias vacinas baseadas em diferentes tecnologias foram aprovadas para uso na prevenção da infecção por SARS-CoV-2, a fim de alcançar a imunidade de rebanho e reduzir os efeitos nocivos da doença. Diversas plataformas de vacinas foram desenvolvidas rapidamente e aprovadas para uso emergencial, incluindo vacinas de mRNA, como as da Pfizer-BioNTech e Moderna, vacinas de vetor viral, como a AstraZeneca e Johnson & Johnson, e vacinas inativadas, como a CoronaVac. As vacinas de mRNA utilizam um fragmento do código genético do vírus para induzir uma resposta imune, enquanto as vacinas de vetor viral utilizam um adenovírus modificado para entregar a proteína spike do SARS-CoV-2 às células do hospedeiro. As vacinas inativadas contêm o vírus morto, que não pode causar doença, mas ainda pode estimular uma resposta imunológica (FRANCIS et al., 2022; SALLAM; AL-SANAFI; SALLAM, 2022).

3.4.5 Modelos experimentais na pesquisa do SARS-CoV-2

Desde o início da pandemia, modelos *in vitro* e *in vivo* tem sido utilizados para entender a etiopatogenia da infecção por SARS-CoV-2. A utilização de linhagens de células imortalizadas *in vitro* são úteis no conhecimento dos receptores e mecanismos de infecção, devido a facilidade de manipulação, enquanto os modelos *in vivo* são capazes de demonstrar a replicação e a transmissão do patógeno (RIJSBERGEN et al., 2021).

Caldera-Crespo et al. (2022) revisaram os modelos animais mais bem sucedidos de infecção por SARS-CoV-2, incluindo estudos em primatas que foram considerados suscetíveis à infecção e transmitiram o vírus de forma semelhante aos humanos, como por exemplo macacos Rhesus, *Cynomolgus* e macacos verdes africanos; e modelos animais que não requeriam laboratórios com nível de

biossegurança 3 (BSL3), como é o caso dos modelos de vírus da hepatite de camundongo (MHV), modelo de furão e modelo de hamster sírio.

O uso de outros betacoronavírus, como o coronavírus murino, é uma estratégia para simular os principais aspectos da infecção por SARS-CoV-2. Entre os coronavírus murinos, o grupo conhecido como coronavírus da hepatite murina (MHV), é capaz de induzir doença grave e letal em camundongos, e algumas de suas variantes são o MHV-1, MHV-A59 e MHV-3. Uma vantagem importante de usar estes modelos de baixa de patogenicidade é a exigência de nível de biossegurança 2 (BSL2), o que torna o processo menos dispendioso e mais seguro para a triagem de compostos de interesse terapêutico (KÖRNER et al., 2020).

Considerando que existe um interesse significativo na identificação de novos agentes antivirais capazes de controlar simultaneamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias, os modelos que mimetizam a hiper inflamação na COVID-19 grave também são importantes.

Em cultivo *in vitro*, células epiteliais respiratórias (A549, epitélio brônquico transformado com células Ad12-SV40 2B [BEAS-2B] e Calu-3) ou células primárias exibem padrões de expressão semelhantes ao de moléculas associadas à entrada do SARS-CoV-2, conforme destacado por sequenciamento de RNA unicelular (scRNA-seq) ou imunocoloração (RYU; SHIN, 2021). Frequentemente, estudos sobre vírus respiratórios, como o vírus sincicial respiratório (RSV) e o vírus influenza, utilizam a linhagem celular epitelial A549 (RAMIREZ et al., 2021).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

- Balança analítica Metler, modelo AB 204.
- Balança analítica Sartorius, modelo BP 211D.
- Balança semi-analítica Núcleo, modelo PR 1000.
- Banho de ultrassom Unique, modelo USC 1400.
- Bombas de vácuo Fabbe (modelo 0320) e Edwards (modelo C 560786).
- Bomba peristáltica de bancada Watson Marlow, modelo 120S.
- Capela de fluxo laminar vertical Veco, modelo BioProtector 09.
- Centrífuga Hermle Z323K.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance DRX – 400 MHz.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker Avance DRX – 600 MHz.
- Estufa de CO₂ Forma Scientific, modelo 3158.
- Estufa de secagem com circulação de ar, Fanem.
- Evaporador rotatório Büchi, modelo B-480.
- Leitor de microplacas Tecan, modelo Infinite M200, com software i-control para processamento de dados.
- Liofilizador de bancada Liotop, modelo L101.
- Microcentrífuga Cientec, modelo CT-14000.
- Micropipetas HTL, vol. ajustável de 10 - 100 µL e 100 - 1000 µL.
- Microscópio Olympus, modelo CKX41.
- Phmetro Metrohm, modelo 827 pH lab.
- Pipetador automático Drummond, modelo Pipet Aid XP.
- Purificador de água Milli-Q Plus.
- Sistema de UPLC-MS/MS ACQUITY Ultra Performance LC™, Waters, composto por detector de arranjos de diodo (DAD) modelo PDA 2996 coplado a espectrômetro de massas ACQUITY TQ (Water), equipado com fonte de ionização por spray de elétrons Z-spray (ESI) e software Mass Lynx™ (versão 4.1, Waters).

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

4.2 Solventes e reagentes

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

4.3 Vidrarias e materiais diversos

- Borrifador de vidro.
- Câmara de Neubauer, Labor Optik.
- Capilar para aplicação em CCD.
- Coluna para UPLC Waters Acquity UPLC® BEH HILIC (150 x 2,1 mm, 1,7 µm).
- Coluna para HPLC-RF preparativo Agilent Prep-C18 (21,2 x 250 mm, 10 µm).
- Cromatoplasmas de vidro de 10 × 10 cm.
- Cubas cromatográficas de vidro Pirex.

- Frascos para cultura celular com tampa com filtro, não tratados, de 25 cm² e 75 cm², Corning.
- Kit de coloração de lâminas panóptico.
- Microplaca de 96 poços para cultivo celular, CellStar 655180, Greiner-Bio-One
- Microplaca de 96 poços para imunoenensaio, Nunc F, MaxiSorp, Invitrogen.
- Microtubo plástico de 2 mL e 1,5 mL do tipo *safe-lock*, Axygen.
- Pipetas sorológicas descartáveis, estéreis, de 5 mL e 10 mL, Sarstedt.
- Ponteiras plásticas, Corning.
- Pré-coluna Waters Acquity UPLC® BEH HILIC (5 x 2,1 mm, 1,7 µm).
- Seringas e agulhas de diferentes dimensões.
- Sistema de filtração esterilizante, descartável, membrana de 0,22 µm, capacidade para 500 mL e 1000 mL, Corning.
- Tubos plásticos do tipo Falcon com volumes de 15 e 50 mL, TPP.
- Tubo de plástico tipo *safe-lock* de 2 mL, MDI.
- Vials de vidro com tampa e septos de teflon para uso no injetor automático de sistema de HPLC e UPLC-MS.

4.4 Reveladores para Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

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

4.5 Material Vegetal

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

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

Tabela 1 - Espécies de *Baccharis* coletadas e os respectivos números das exsiccatas

Código	Identificação Botânica	Exsicata
Serra da Calçada (MG)		
B. sp1	<i>Baccharis brevifolia</i> DC.	ECT 6259
Parque Nacional do Caparaó (MG/ES)		
B. sp2	<i>Baccharis calvescens</i> DC.	ECT 5549
B. sp3	<i>Baccharis imbricata</i> Malag.	ECT 5912
B. sp4	<i>Campovassouria cruciata</i> (Vell.) R.M.King & H.Rob.	ECT 5985
Parque Nacional do Itatiaia (RJ)		
B. sp5	<i>Baccharis oblongifolia</i> (Ruiz & Pav.) Pers	ECT 5930
B. sp6	<i>Baccharis stylosa</i> Gardner	ECT 5950

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

4.6 Preparo dos extratos vegetais

Os materiais vegetais pulverizados foram submetidos à percolação exaustiva com etanol 96°GL. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 45°C. Posteriormente, os extratos foram liofilizados e armazenados em dessecador. O rendimento extrativo calculado de cada extrato está representado na **Tabela 2**.

Os extratos de *B. brevifolia*, *B. imbricata* e *C. cruciata* foram preparados pela autora do presente trabalho. O extrato de *B. calvescens* foi preparado pela Mestre

Alessandra Frade e os extratos de *B. oblongifolia* e *B. stylosa* foram preparados pelas alunas Larissa Leandro e Ana Clara Rabelo, respectivamente.

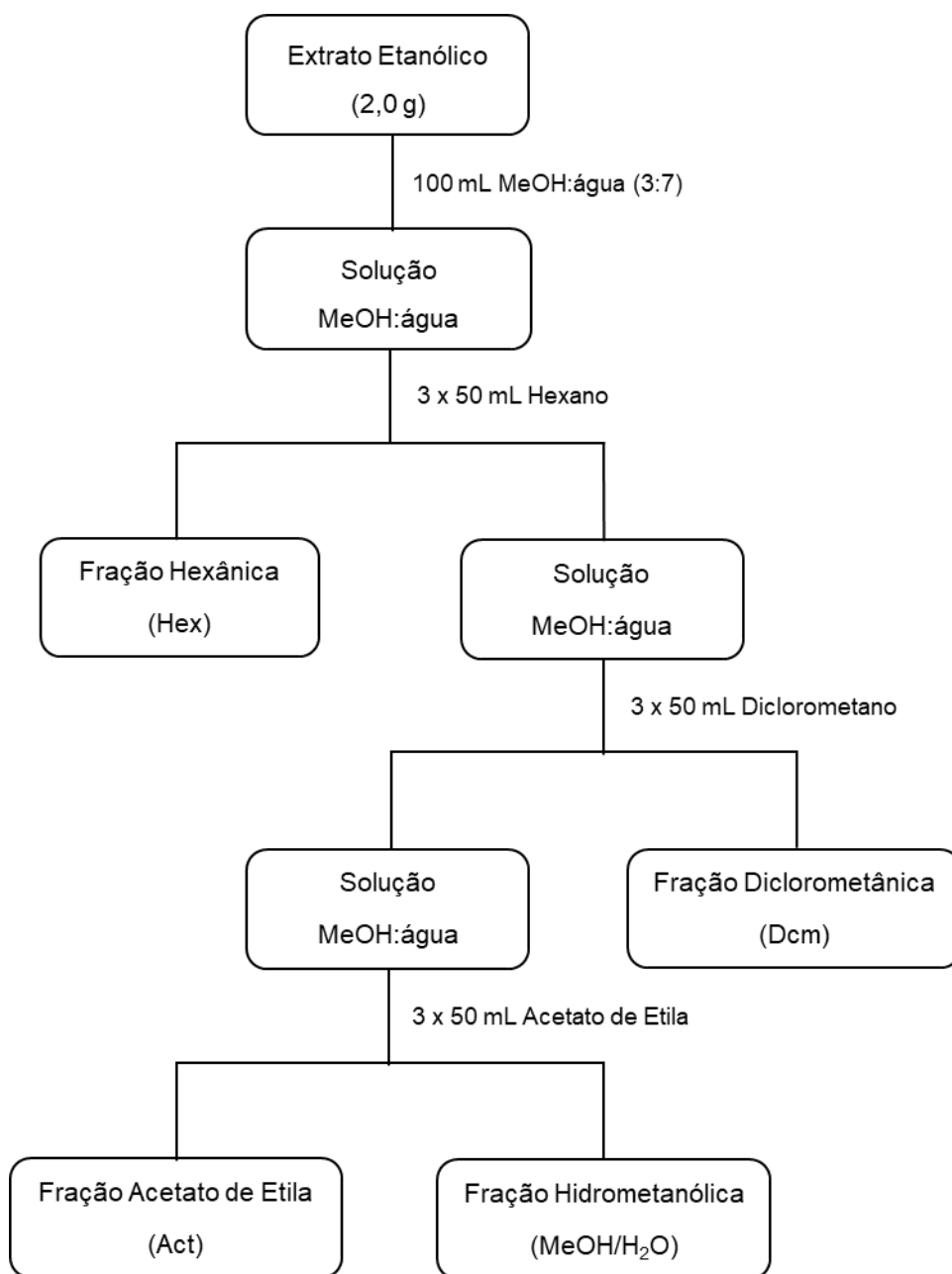
Tabela 2 - Rendimento extrativo da percolação do material vegetal coletado

Espécie	Parte da planta	Droga vegetal (g)	Extrato Etanólico (g)	Rendimento (% m/m)
Serra da Calçada (MG)				
<i>B. brevifolia</i>	Folhas	75,004	22,310	29,7
Parque Nacional do Caparaó (MG/ES)				
<i>B. calvescens</i>	Folhas	200,001	60,041	30,2
<i>B. imbricata</i>	Folhas	100,008	39,200	39,2
<i>C. cruciata</i>	Folhas	100,132	25,700	25,6
Parque Nacional do Itatiaia (RJ)				
<i>B. oblongifolia</i>	Folhas	200,000	26,376	13,2
<i>B. stylosa</i>	Folhas	200,004	45,228	22,6

4.7 Fracionamento dos extratos de *C. cruciata*, *B. stylosa* e *B. imbricata*

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

Figura 3 - Fluxograma do fracionamento dos extratos etanólicos por partição sequencial entre solventes imiscíveis



Após a remoção dos solventes em evaporador rotatório, à temperatura máxima de 45°C, foram obtidas as frações hexânica (Hex), diclorometânica (Dcm), acetato de etila (Act) e hidrometanólica (MeOH/H₂O). As frações foram liofilizadas e o rendimento de cada uma foi calculado (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Rendimento das frações obtidas por partição entre solventes imiscíveis

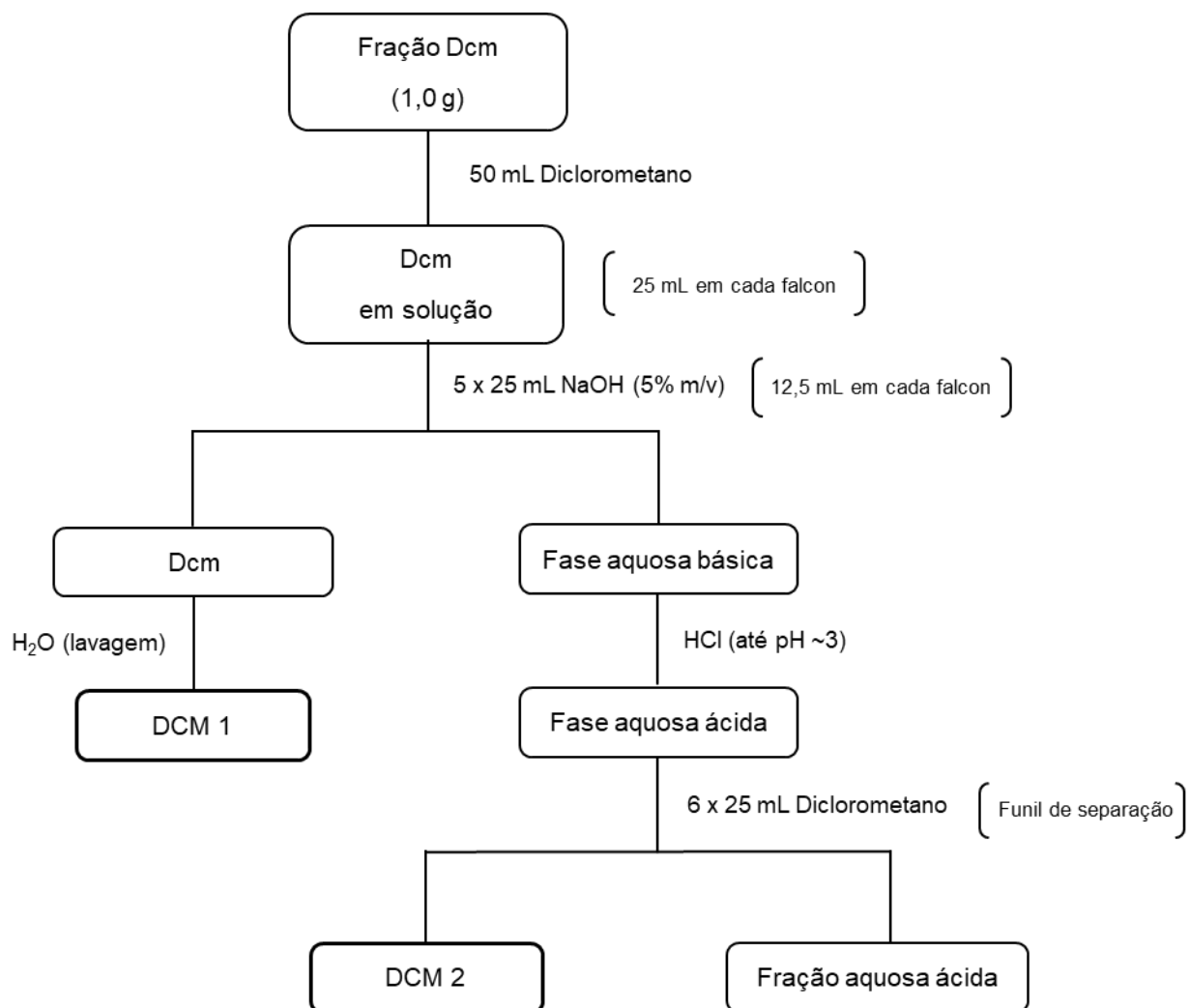
Extrato etanólico (g)	Fração	Massa (g)	Rendimento (% m/m)
<i>C. cruciata</i>			
2,024	Hex	0,481	23,8
	Dcm	0,281	13,9
	Act	0,438	21,6
	MeOH/H ₂ O	0,765	37,8
<i>B. stylosa</i>			
2,039	Hex	0,399	19,57
	Dcm	0,890	43,65
	Act	0,148	7,26
	MeOH/H ₂ O	0,522	25,60
<i>B. imbricata</i>			
2,074	Hex	0,180	8,7
	Dcm	0,539	25,9
	Act	0,128	6,2
	MeOH/H ₂ O	0,867	41,8

Posteriormente, o mesmo procedimento foi realizado em maior escala com ambos os extratos, visando a obtenção de uma maior quantidade da fração diclorometânica (Dcm). As frações foram liofilizadas e os rendimentos foram calculados (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Rendimento das frações obtidas do extrato de *C. cruciata*, *B. stylosa* e *B. imbricata*

Extrato Etanólico (g)	Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
<i>C. cruciata</i>			
16,040	Hex	4,021	25,1
	Dcm	3,066	19,1
	MeOH/H ₂ O	8,644	53,9
<i>B. stylosa</i>			
20,07	Hex	0,549	2,7
	Dcm	15,442	76,9
	MeOH/H ₂ O	2,036	10,1
<i>B. imbricata</i>			
24,070	Hex	0,920	3,8
	Dcm	10,558	43,9
	MeOH/H ₂ O	11,524	47,9

O refracionamento das frações diclorometânicas (Dcm), derivadas dos extratos de *B. stylosa* e *B. imbricata*, foi feito por partição com solução alcalina (**Figura 4**). A parte inicial desse procedimento foi realizada em tubos do tipo falcon (50 mL), sendo o volume inicial dividido em dois tubos. Cada extração com a solução básica (NaOH 5% m/v) era seguida de centrifugação (velocidade de rotação: 2.000 rpm // tempo: 3 minutos // temperatura: 25°C). Foram obtidas duas novas frações, denominadas DCM 1 e a DCM 2. Os rendimentos foram calculados e estão representados na **Tabela 5**.

Figura 4 - Fluxograma do refração da fração Dcm, oriunda de *B. stylosa***Tabela 5** - Rendimento extrativo de DCM 1 e DCM 2 a partir do refração da fração Dcm de *B. stylosa*

Dcm (g)	Fração	Massa (g)	Rendimento (% m/m)
<i>B. stylosa</i>			
10,0	DCM 1	8,216	82,2
	DCM 2	0,255	2,5
<i>B. imbricata</i>			
9,7	DCM 1	6,387	65,8
	DCM 2	1,098	11,3

4.8 Fracionamento da Dcm de *C. cruciata* em coluna de sílica gel

Uma porção da fração Dcm de *C. cruciata* obtida (2,012 g) foi solubilizada em 10 mL de diclorometano e mantida em banho de ultrassom, até a completa solubilização. Em seguida foi incorporada em 6,040 g de sílica gel (40-63 μm) e transferida para uma coluna de vidro (38 cm $\times$ 4,2 cm d.i), empacotada com sílica gel (210,0 g) com as mesmas especificações. Foi utilizada uma eluição em gradiente com uso de solventes de polaridade crescente (**Tabela 6**), em um fluxo de 7,4 mL/min. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel e UPLC-DAD, e o rendimento foi calculado (**Tabela 7**).

Tabela 6 - Série eluotrópica utilizada no fracionamento de Dcm de *C. cruciata* por cromatografia em coluna de sílica gel

Frações	Eluentes	Volume por Fração
1 – 23	<i>n</i> -Hexano:Diclorometano (4:6)	9 mL
24 – 46	<i>n</i> -Hexano:Diclorometano (2:8)	9 mL
47 – 73	Diclorometano	9 mL
74 – 124	Diclorometano:Acetato de Etila (95:5)	9 mL
125 – 171	Diclorometano:Acetato de Etila (9:1)	9 mL
172 – 194	Diclorometano:Acetato de Etila (85:15)	9 mL
195 – 218	Diclorometano:Acetato de Etila (8:2)	9 mL
219 – 241	Diclorometano:Acetato de Etila (7:3)	9 mL
242 – 301	Diclorometano:Acetato de Etila (6:4)	9 mL
302 – 321	Diclorometano:Acetato de Etila (1:1)	9 mL
322	Acetato de Etila	200 mL
323	Acetato de Etila:Metanol (7:3)	200 mL
324	Acetato de Etila:Metanol (1:1)	200 mL

Tabela 7 - Reunião das frações obtidas no refracionamento de Dcm de *C. cruciata* por cromatografia em coluna de sílica gel e respectivos rendimentos

Frações Reunidas	Massa (mg)	Rendimento (% m/m)
1 – 30	4,9	0,24
31 – 50	13,0	0,64
51 – 79	20,2	1,00
80 – 81	16,3	0,81
82 – 90	60,7	3,02
91 – 94	6,6	0,32
95 – 105	16,7	0,83
106 - 115	7,6	0,37
116 – 119	2,5	0,12
120 – 135	22,0	1,09
136 – 139	5,4	0,26
140 – 159	77,9	3,87
160 – 165	6,5	0,32
166 – 191	139,7	6,94
192 – 197	13,3	0,66
198 – 216	91,1	4,52
217 – 219	16,9	0,84
220 – 247	336,5	16,7
248 – 250	39,2	1,94
251 – 254	33,3	1,65
255 – 279	232,7	11,6
280 – 289	41,7	2,07
290 – 299	29,9	1,48
300 – 320	111,2	5,53
321	14,4	0,72
322	44,2	2,20

323	104,6	5,20
324	96,6	4,80
Massa recuperada:		1,60 g
Porcentagem de recuperação:		79,5%

Os grupos de frações reunidas Fr. 166-191, Fr. 220-247 e Fr. 255-279, que apresentaram maior massa, foram analisadas por UPLC-ESI-MS/MS e selecionadas para purificação e refracionamento.

4.8.1 Purificação de Fr. 166-191

O grupo de frações reunidas Fr. 166-191 (139,7 mg) foi purificado pela adição de 5 mL de diclorometano, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada, a 5.000 rpm por 10 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi retirado. O procedimento foi repetido por 5 vezes. Obteve-se assim 62,4 mg de um sólido branco, correspondente ao precipitado do tubo de ensaio.

4.8.2 Refracionamento de Fr. 220-247 por RP-HPLC em escala preparativa

O grupo de frações reunidas Fr. 220-247 foi refracionada por RP-HPLC em escala preparativa (Waters 1525 Binary HPLC Pump/ Waters 2489 UV-Visible Detector/ Waters 2707 Autosampler). Foi utilizada uma coluna de fase reversa (Agilent Prep-C18; 21,2 × 250 mm, 10 µm) e porções da amostra foram injetadas no sistema de HPLC na concentração de 30 mg/mL solubilizadas em ACN. Para a solubilização, a amostra foi mantida em banho de ultrassom por 10 minutos, filtrada e transferida para um *vial* adequadamente identificado e uma porção de 800 µL foi injetada no cromatógrafo. O fluxo de eluição foi de 14 mL/min e a detecção no ultravioleta (UV) foi realizada em dois comprimentos de onda, 225 e 254 nm. O eluente utilizado foi água (A) e acetonitrila (B), empregando-se o gradiente descrito na **Tabela 8**. A coleta das frações foi baseada nos picos detectados no cromatograma correspondentes a cada uma das substâncias. Foram realizadas 10 injeções por HPLC em escala no equipamento com porções da fração, totalizando 336,5 mg de massa injetada.

Tabela 8 - Gradiente de eluição empregado na análise por RP-HPLC em escala preparativa

Tempo (min)	% A	% B
0	90	10
40	22	78
41	5	95
45	5	95
46	10	90
55	10	90

A: água; B: acetonitrila

4.8.3 Refracionamento de Fr. 255-279 em coluna de sílica gel

O grupo de frações reunidas Fr. 255-279 foi solubilizada em diclorometano e mantida em banho de ultrassom, até a completa solubilização. Em seguida foi incorporada em sílica gel (40-63 μm) e transferida para uma coluna de vidro (70 $\times$ 1,5 cm d.i), empacotada com sílica gel com as mesmas especificações. Foi utilizada uma eluição em gradiente com uso de solventes de polaridade crescente (*n*-hexano, acetato de etila e metanol). As frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel e UPLC-DAD, e o rendimento foi calculado (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Reunião das frações obtidas no fracionamento de Fr. 255-279 em coluna de sílica gel e respectivos rendimentos

Frações Reunidas	Massa (mg)	Rendimento (% m/m)
1 – 37	6,8	2,92
38 – 59	15,0	6,45
60 – 62	43,1	18,5
63	15,8	6,79
64 - 69	26,3	11,3
70 – 94	16,8	7,22
95 – 102	107,9	46,4

Massa recuperada: 231,7 mg

Porcentagem de recuperação: 99,5%

4.9 Fracionamento da Dcm de *B. stylosa* em coluna de sílica gel

Uma porção da fração Dcm de *B. stylosa* obtida (2,005 g) foi solubilizada em 10 mL de diclorometano e mantida em banho de ultrassom, até a completa solubilização. Em seguida foi incorporada em 6,034 g de sílica gel (40-63 μm) e transferida para uma coluna de vidro (38,5 $\times$ 4,2 cm d.i), empacotada com sílica gel (170,0 g) com as mesmas especificações. Foi utilizada uma eluição em gradiente com uso de solventes de polaridade crescente (**Tabela 10**), em um fluxo de 9,0 mL/min. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel e UPLC-DAD, e o rendimento foi calculado (**Tabela 11**).

Tabela 10 - Série eluotrópica utilizada no fracionamento de Dcm de *B. stylosa*

Frações	Eluentes	Volume por Fração
1 – 12	Hexano:Diclorometano (2:8)	9 mL
13 – 22	Hexano:Diclorometano (1:9)	9 mL
23 – 42	Diclorometano	9 mL
43 – 74	Diclorometano:Acetato de Etila (95:5)	9 mL
75 – 105	Diclorometano:Acetato de Etila (9:1)	9 mL
106 – 137	Diclorometano:Acetato de Etila (85:15)	9 mL
138 – 168	Diclorometano:Acetato de Etila (8:2)	9 mL
169 – 199	Diclorometano:Acetato de Etila (75:25)	9 mL
200 – 220	Diclorometano:Acetato de Etila (7:3)	9 mL
221 – 241	Diclorometano:Acetato de Etila (65:35)	9 mL
242 – 262	Diclorometano:Acetato de Etila (6:4)	9 mL
263 – 283	Diclorometano:Acetato de Etila (1:1)	9 mL
284 – 299	Diclorometano:Acetato de Etila (4:6)	9 mL
300 – 301	Diclorometano:Acetato de Etila (3:7)	9 mL
302	Diclorometano:Acetato de Etila (1:9)	9 mL

303

Acetato de Etila

200 mL

Tabela 11 - Reunião das frações obtidas no fracionamento de Dcm de *B. stylosa* por cromatografia em coluna de sílica gel e respectivos rendimentos

Frações Reunidas	Massa (mg)	Rendimento (% m/m)
1 – 25	4,2	0,21
26 – 34	15,3	0,76
35 – 51	24,0	1,20
52 – 65	10,9	0,54
66 – 94	15,4	0,77
95 – 107	4,0	0,20
108 – 117	126,8	6,32
118 - 125	47,0	2,34
126 – 139	57,7	2,88
140 – 147	14,2	0,71
148 – 155	32,6	1,63
156 – 165	26,8	1,34
166 – 172	14,3	0,71
173 – 189	118,6	5,92
190 – 205	50,2	2,50
206 – 244	121,8	6,07
245 – 303	327,8	16,35
Massa recuperada:		1,01 g
Porcentagem de recuperação:		50,5%

Os grupos de frações reunidas Fr. 173-189 e Fr. 245-303 foram analisados por UPLC-ESI-MS/MS e selecionadas para purificação e refracionamento.

4.9.1 Refracionamento de Fr. 173-189 e Fr. 245-303 por RP-HPLC em escala preparativa

Os grupos de frações reunidas Fr. 173-189 e Fr. 245-303 foram refracionados por RP-HPLC em escala preparativa (Waters 1525 Binary HPLC Pump/ Waters 2489 UV-Visible Detector/ Waters 2707 Autosampler). Foi utilizada uma coluna de fase reversa (Agilent Prep-C18; 21,2 × 250 mm, 10 µm). As amostras foram solubilizadas em acetonitrila e mantidas em banho de ultrassom por 10 minutos. As soluções foram filtradas e transferidas para *vials*, sendo injetadas alíquotas de 800 µL no cromatógrafo. O fluxo de eluição foi de 14 mL/min e a detecção no ultravioleta (UV) foi realizada em dois comprimentos de onda, 225 e 254 nm. O eluente utilizado foi água (A) e acetonitrila (B), empregando-se os gradientes descritos nas **Tabelas 12 e 13**. A coleta das frações foi baseada nos picos detectados no cromatograma correspondentes a cada uma das substâncias.

Tabela 12 - Gradiente de eluição empregado no fracionamento de Fr. 173-189 por RP-HPLC em escala preparativa

Tempo (min)	% A	% B
0	90	10
40	22	78
41	5	95
45	5	95
46	10	90
55	10	90

A: água; B: acetonitrila

Tabela 13 - Gradiente de eluição empregado no fracionamento de Fr. 245-303 por de RP-HPLC em escala preparativa

Tempo (min)	% A	% B
0	65	35
47	30	70
49	5	95
54	5	95
55	35	65

65

35

65

A: água; B: acetonitrila

4.10 Fracionamento de DCM 1 de *B. imbricata* em coluna de sílica

Uma porção (1,005 g) da fração DCM 1 de *B. imbricata* obtida foi solubilizada em 10 mL de diclorometano e mantida em banho de ultrassom, até a completa solubilização. Em seguida, esta foi incorporada em 3,0 g de sílica gel (40-63 µm) e transferida para uma coluna de vidro (70 × 3,0 cm d.i), empacotada com sílica gel (130,0 g) com as mesmas especificações. Foi utilizada eluição em gradiente empregando a série eluotrópica listada na **Tabela 14**, com fluxo de 9,0 mL/min. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel e UPLC-DAD, e o rendimento foi calculado (**Tabela 15**).

Tabela 14 - Série eluotrópica utilizada no fracionamento de DCM 1 de *B. imbricata*

Frações	Eluentes	Volume por Fração
1 – 11	Diclorometano	9 mL
12 – 34	Diclorometano:Acetato de Etila (95:5)	9 mL
35 – 57	Diclorometano:Acetato de Etila (9:1)	9 mL
58 – 79	Diclorometano:Acetato de Etila (85:15)	9 mL
80 – 102	Diclorometano:Acetato de Etila (8:2)	9 mL
103 – 123	Diclorometano:Acetato de Etila (75:25)	9 mL
124 – 146	Diclorometano:Acetato de Etila (7:3)	9 mL
147 – 165	Diclorometano:Acetato de Etila (6:4)	9 mL
166 – 189	Diclorometano:Acetato de Etila (1:1)	9 mL
190 – 212	Diclorometano:Acetato de Etila (4:6)	9 mL
213 – 235	Diclorometano:Acetato de Etila (3:7)	9 mL
236 – 257	Diclorometano:Acetato de Etila (2:8)	9 mL
258 – 279	Diclorometano:Acetato de Etila (1:9)	9 mL
280 – 300	Diclorometano:Acetato de Etila (5:95)	9 mL
301 – 400	Acetato de Etila	9 mL

401 – 403	Acetato de Etila:Metanol (8:2)	9 mL
404 – 410	Acetato de Etila:Metanol (6:4)	9 mL

Tabela 15 - Reunião das frações obtidas no fracionamento de DCM 1 em coluna de sílica gel e respectivos rendimentos

Frações Reunidas	Massa (mg)	Rendimento (%)
1 – 24	17,8	1,77
25 – 51	23,6	2,35
52 – 55	64,6	6,43
56 – 71	24,9	2,48
72 – 93	28,4	2,83
94 – 102	44,4	4,42
103 – 110	10,4	1,03
111 - 124	21,4	2,13
125 – 136	16,6	1,65
137 – 150	15,3	1,52
151 – 169	26,8	2,67
170 – 193	39,6	3,94
194 – 202	18,9	1,88
203 – 211	28,2	2,81
212 – 229	8,4	0,84
230 – 239	10,4	1,03
240 – 243	19,2	1,91
244 – 249	12,9	1,28
250 – 270	18,7	1,86
271 – 288	14,9	1,48
289 – 314	19,3	1,92
315 – 350	26,9	2,68
351 – 378	25,4	2,53

379 – 403	16,6	1,65
404 – 405	67,0	6,67
406	116,0	11,54
407 – 408	20,9	2,08
409 – 410	15,6	1,55
Massa recuperada:		0,73 g
Porcentagem de recuperação:		77,0%

4.11 Análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS

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

Para a obtenção dos perfis cromatográficos, alíquotas de 4 μ L das soluções obtidas foram injetadas em um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) (Waters), com detector de arranjo de diodos (DAD), acoplada a espectrômetro de massas (MS) com ionização por electrospray (ESI) e analisador quadrupolo. Para tal, foi utilizada uma coluna de fase reversa (Acquity UPLC® BEH HILIC; 150 $\times$ 2,1 mm, 1,7 μ m, Waters), em combinação com uma pré-coluna (UPLC® BEH HILIC; 5 $\times$ 2,1 mm, 1,7 μ m, Waters) com eluição em gradiente de ACN:H₂O suplementados com 0,1% v/v de ácido fórmico (**Tabela 16**), em um fluxo de 0,300 mL/min e detecção no ultravioleta (UV) no intervalo de 205 a 500 nm.

As análises por ESI-MS foram realizadas em modo exploratório (*Scan*) e os íons monitorados no modo de ionização positivo e negativo, separadamente, no intervalo de relação massa/carga (m/z) de 20 a 2000 Da. Os parâmetros utilizados nas análises de espectrometria de massas estão representados na **Tabela 17**. Adicionalmente, os extratos obtidos por percolação e suas respectivas frações foram analisados em modo sequencial ou tandem (MS/MS) e os espectros de ESI-MS/MS foram registrados com energia de colisão com rampa de 15 até 70 eV na faixa de m/z 100 a 2000 Da.

Tabela 16 - Gradiente de eluição empregado nas análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS

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

A: água; B: acetonitrila

Tabela 17 - Condições espectroscópicas definidas para as análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS

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

4.12 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

Os espectros de RMN unidimensionais de hidrogênio (^1H) e de carbono (^{13}C), bem como o subespectro DEPT 135 e os mapas de contorno bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC e NOESY) foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance DRX600 e Bruker Avance DRX400, no Laboratório de Análises em Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química-UFMG, pelo Prof. José Dias de Sousa Filho. Como padrão interno utilizou-se o tetrametilsilano (TMS) e, para as análises, as amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), acetona deuterada (Acetona- d_6) ou dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-} \text{d}_6$).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hz.

4.13 Ensaios biológicos *in vitro*

4.13.1 Cultivo Celular

As células L929 (fibroblastos murinos, ATCC® CCL-1™), A549 (fibroblastos de carcinoma pulmonar humano - CCL-185™) e VERO E6 (células epiteliais renais de macaco verde africano, ATCC, CCL-81) foram mantidas e cultivadas em meio RPMI (Thermo Fisher Scientific™, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB, Gibco, Thermo Fisher, Itália). As células Calu-3 (adenocarcinoma de pulmão humano, ATCC HTB-55) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco com alto teor de glicose (DMEM, Thermo Fisher Scientific™) suplementado com 1% de L-Glutamina, 10% de SFB, 1% de aminoácidos não essenciais (AANE) e 1% de solução de piruvato de sódio. As células foram cultivadas em frascos de cultura estéreis de 75 cm², na temperatura de 37° C e em estufa de CO₂ (5%).

4.13.2 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio colorimétrico com sal brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT), conforme proposto por (MOSMANN, 1983).

Uma suspensão de células (L929, A549 e Calu-3) foi distribuída em placas de 96 cavidades (1×10⁴ células/cavidade) e incubadas por 24 h, à 37 °C, em estufa de CO₂. Posteriormente, o meio foi substituído por 100 µL de RPMI ou DMEM suplementado com 2% de SFB contendo diferentes concentrações das amostras. Após 24h de incubação, o sobrenadante foi descartado e, na sequência, adicionou-se 100 µL de uma solução de MTT (2 mg/mL) a cada cavidade e as placas foram novamente incubadas por 4h. A solução de MTT foi então removida e substituída por DMSO (100 µL/cavidade) para a solubilização dos cristais de formazana. A absorbância foi medida em espectrofotômetro em 570 nm.

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada amostra testada foram transformados em porcentagens de viabilidade (X%), em relação aos

controles celulares (CC), os quais foram considerados 100% viáveis. Para tal, foi utilizado a seguinte fórmula:

$$X\% = ((\text{absorbância amostra}) \times 100) / \text{Concentração}$$

4.13.3 Triagem da atividade antiviral frente ao coronavírus murino MHV-3

- Origem da cepa viral

O vírus empregado na triagem antiviral foi o Vírus da Hepatite Murina 3 (MHV-3), que possui uma sequência genômica de RNA e pertencente ao gênero Betacoronavírus. A cepa foi fornecida e sequenciada por Clarice Weis Arns e Ricardo Durães-Carvalho, da Universidade Estadual de Campinas (GenBank accession no. MW620427.1).

- Determinação dos títulos virais

Antes de realizar os ensaios de avaliação da atividade antiviral dos extratos e frações, foi determinada a infecciosidade dos inóculos virais obtidos, expressos como unidades formadora de placas (UFP). O título viral foi obtido através do método de contagem de placas de lise, descrito por (BURLESON; CHAMBERS; WIEDBRAUK, 1992).

Suspensões de células L929 foram distribuídas em placas de 24 cavidades (1×10^5 células/cavidade), cultivadas em meio DMEM, suplementado com 7% de SFB, e incubadas à 37 °C, em estufa de CO₂, até a confluência. Após um intervalo de 24h, o meio de cultura de cada cavidade foi retirado e a monocamada celular foi lavada com PBS. O estoque viral foi diluído (10^{-1} a 10^{-6}) e inoculado nas células. As placas foram então incubadas durante 1 hora, e agitadas cuidadosamente em intervalos de 10 min, para uma melhor distribuição da suspensão viral. Em seguida, foram adicionados a cada cavidade 500 µL de meio DMEM suplementado com 2% de SFB e contendo 0,8% m/v de carboximetilcelulose (CMC), e as placas foram incubadas por 48 horas. Após esse período, as células foram fixadas com uma solução de formol a 10% e coradas pela adição de solução de cristal violeta. Após a lavagem, para a retirada do excesso de corante, as placas foram secas em temperatura ambiente e realizou-se a contagem das placas de lise visíveis e bem delimitadas. O título viral foi

calculado através da seguinte fórmula e expresso em número de unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/mL):

$$\text{Título viral} = \text{média do número de placas de lise na menor diluição} \\ \times \text{recíproca da diluição}$$

- Determinação da Multiplicidade de Infecção (MOI)

Para determinar a Multiplicidade de Infecção (MOI) da amostra de MHV-3, isto é, a relação entre a quantidade de partículas infecciosas e a quantidade de células por poço, foi obtida uma curva de crescimento viral através da infecção de células L929 com diferentes concentrações virais (MOI's de 0,001; 0,01; 0,1 e 1).

Assim, células L929 foram semeadas em placas de 24 poços (10^5 células/poço) e cultivadas por 24h, até a confluência. Em seguida, foram infectadas com diferentes índices de multiplicação para MHV-3. Os sobrenadantes foram recolhidos em tempos pré-determinados (4, 8, 24 e 48 h após a infecção – h.p.i) e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT. O experimento foi conduzido com triplicatas biológicas.

Posteriormente, esses sobrenadantes foram utilizados nos ensaios de placa de lise, com as células L929, a fim de avaliar produção viral de cada intervalo de tempo.

- Ensaio de inibição da formação das placas de lise

A triagem inicial dos extratos etanólicos de *B. brevifolia*, *B. calvescens*, *B. imbricata*, *C. cruciata*, *B. oblongifolia* e *B. stylosa*, bem como das frações hexânicas e diclorometânicas de *C. cruciata* e *B. stylosa* foi realizada pelo ensaio de inibição da formação das placas de lise.

Para cada ensaio realizado, foram utilizados controles virais, nos quais as células foram apenas infectadas e não tratadas, bem como controles celulares, onde as células não foram infectadas nem tratadas.

Células L929 foram cultivadas em placas de 24 cavidades (1×10^5 células/cavidade) e incubadas à 37° C, em atmosfera com 5% de CO₂, por 24h. Na sequência, o meio foi cuidadosamente removido e adicionou-se 300 µL das soluções contendo os materiais-teste (extratos e frações solubilizados em 100 µL de DMSO + 400 µL de etanol – concentrações: 30, 10 e 5 µg/mL), sendo que os controles virais e

celulares receberam apenas meio completo, e as placas foram incubadas por 1h. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e foram feitas duas lavagens com PBS. Após as lavagens, as placas foram infectadas com suspensões de MHV-3 (120 µL/cavidade; MOI 0,01) e incubadas por mais 1h, sendo agitadas cuidadosamente em intervalos de 10 min, para uma melhor distribuição da suspensão viral. As placas foram novamente lavadas com PBS, tratadas com 300 µL de soluções contendo os materiais-teste e incubadas por um período de 16h. Após esse período, os sobrenadantes foram recolhidos, adicionou-se 300 µL de uma solução de MTT em cada cavidade, a fim de avaliar a viabilidade celular.

Para a titulação viral, placas de 24 cavidades contendo monocamadas de L929 (preparadas 24h antes) foram infectadas com 120 µL de suspensões dos sobrenadantes coletados, diluídas em série (10^{-1} a 10^{-6}), e incubadas por 1h, sendo agitadas em intervalos de 10 min. Em seguida, foi adicionado 500 µL da solução de meio DMEM suplementado com 2% de SFB contendo 0,8% m/v de CMC e as placas foram novamente incubadas por 48h. As células foram então fixadas com uma solução de formol a 10% e coradas pela adição de cristal violeta. Depois da lavagem, para a retirada do excesso de corante, as placas foram colocadas para secar a temperatura ambiente e realizou-se a contagem das placas de lise.

4.13.4 Ensaio de atividade antiviral frente ao SARS-CoV-2

Os ensaios com o coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2) foram realizados pelo Dr. Leonardo Camilo de Oliveira em ambiente NB-3 no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (Lanagro).

Para avaliação da atividade antiviral do extrato etanólico, frações e compostos isolados de *C. cruciata* também foi empregado o ensaio de inibição da formação de placas de lise, conforme descrito no item anterior. Os sobrenadantes das células Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2 (MOI 0,1) por 48h, foram titulados em células Vero CCL-81 com 0,8% m/v de CMC. As placas foram então mantidas à 37° C com 5% de CO₂ por 3 dias e, em seguida, fixadas com uma solução de formol a 10% e coradas pela adição de cristal violeta. Os títulos de vírus foram determinados como unidades formadoras de placas (PFU).

4.13.5 Ensaio de liberação de citocinas em células A549

Os extratos, frações e substâncias isoladas foram avaliados quanto a seu potencial na atividade anti-inflamatória em células pulmonares. Foi utilizado um modelo padronizado pela Dra. Kátia Freitas, adaptado de Chen et al. (2021), em que as células de adenocarcinoma pulmonar A549 quando estimuladas com 10 ng/mL de TNF e 10 ng/mL de IFN- γ apresentaram o melhor perfil inflamatório, avaliado principalmente pela exacerbação dos níveis de interleucina 6 (IL-6).

Dessa forma, as células A549 foram distribuídas em placas de 24 cavidades (1×10^5 células/cavidade), cultivadas em meio DMEM, suplementado com 7% de SFB, e incubadas à 37 °C, em estufa de CO₂, até a confluência. Em seguida, essas células foram tratadas com extratos, frações ou compostos isolados por 3h e então estimuladas com 10 ng/mL de TNF e 10 ng/mL de IFN- γ . Após 24h, os sobrenadantes celulares para a quantificação de citocinas por ELISA. Para cada ensaio realizado, foram utilizados controles, sendo eles células não-estimuladas e não-tratadas, células somente estimuladas e não-tratadas e células estimuladas e tratadas com dexametasona (controle positivo).

Os sobrenadantes foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min e quantificados os níveis de IL-6, IL-8 e TNF usando kits de ensaio imunoenzimático (ELISA) (DuoSet, R&D Systems) de acordo com as instruções do fabricante.

4.13.6 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelulares (EROs)

Os níveis intracelulares de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram avaliados usando o corante sensível à oxidação DCFH-DA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína).

As células A549 foram cultivadas em placas de 24 poços a uma densidade de 10^5 células/poço e incubadas por 24h à 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, as células foram pré-tratadas com as substâncias isoladas por 3h e então estimuladas com TNF e IFN- γ .

O protocolo descrito anteriormente por Aranda et al. (2013) foi seguido para conduzir esses experimentos. Para quantificar a geração de EROs, após a coleta de sobrenadantes, as células foram lavadas com PBS e subsequentemente coradas com DCFH-DA (10 μ M) por 20 min em temperatura ambiente, protegidas da luz. A fluorescência de DCF (com um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um

comprimento de onda de emissão de 535 nm) em PBS foi medida usando um citômetro de fluxo Fortessa™ (BD Biosciences Pharmingen, Califórnia, EUA) e os dados adquiridos foram analisados usando o software FlowJo.

4.13.8 Análises estatísticas

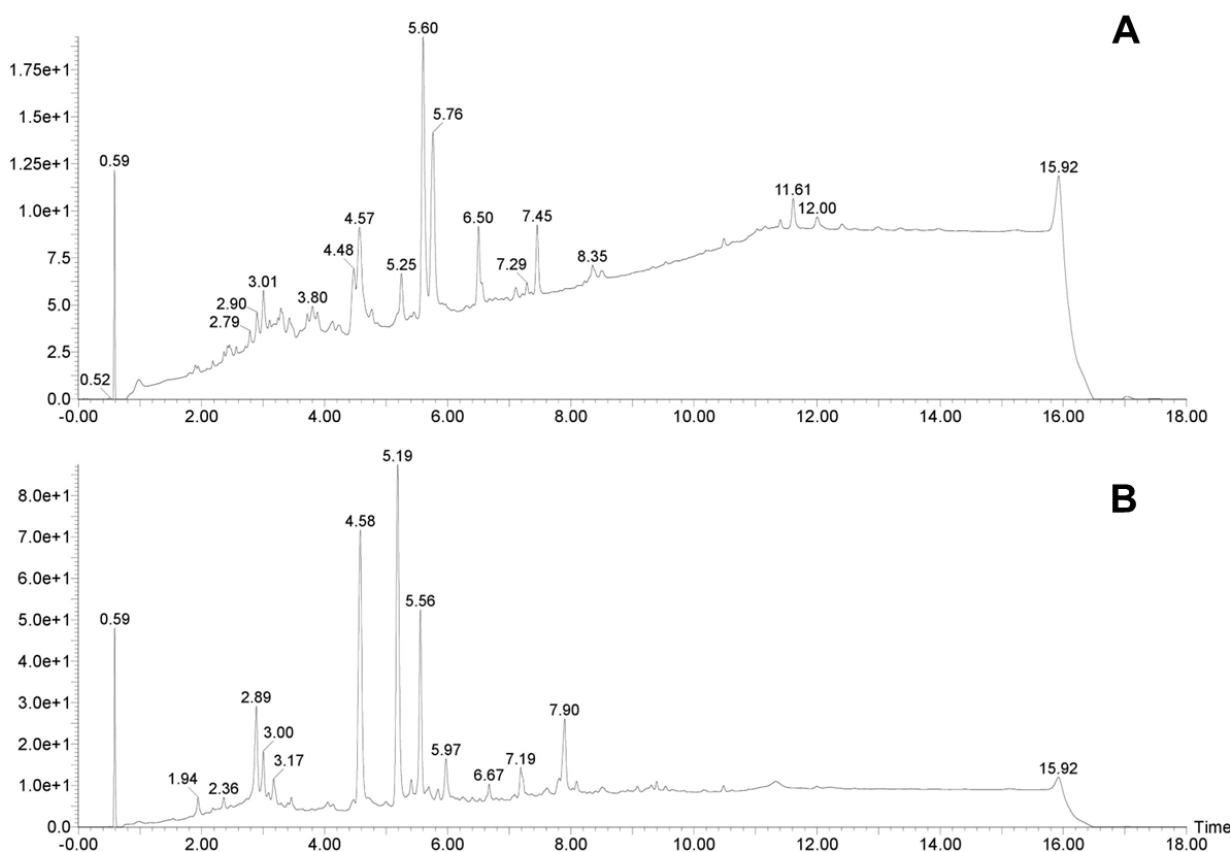
Os resultados dos ensaios *in vitro* realizados foram analisados empregando o software GraphPad Prism, versão 8.0 (GraphPad Software Inc., EUA) usando ANOVA one-way seguido, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão e considerados significativamente distintos quando $p < 0,05$.

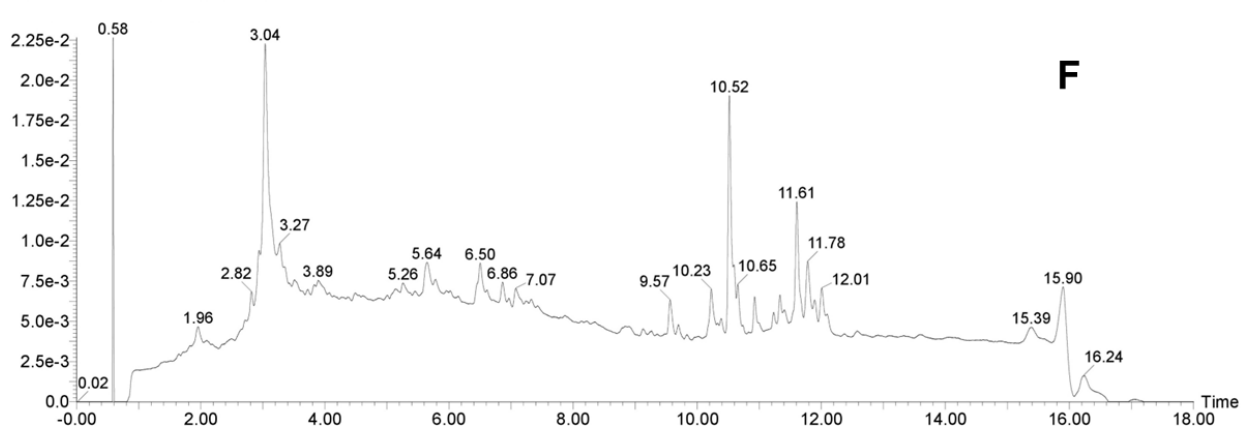
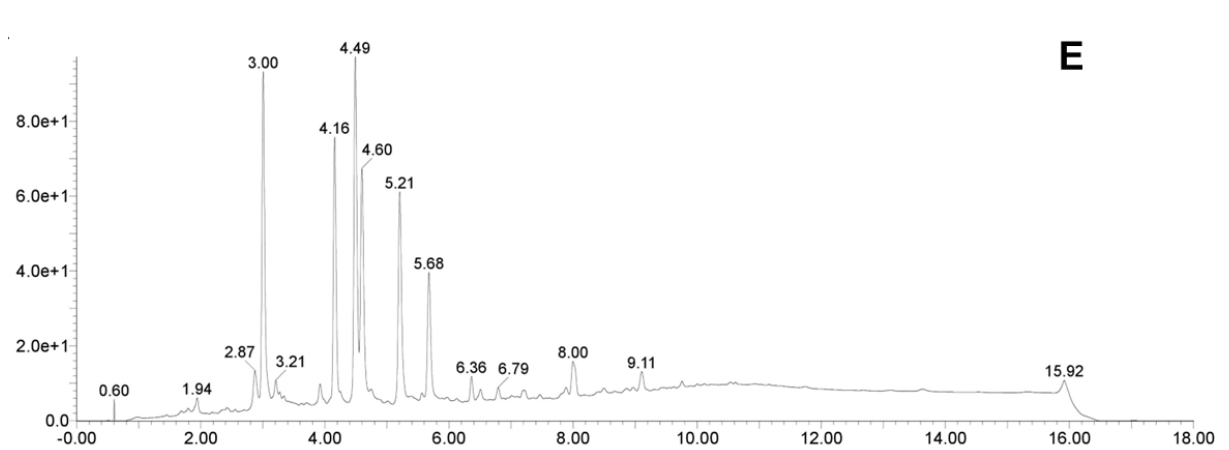
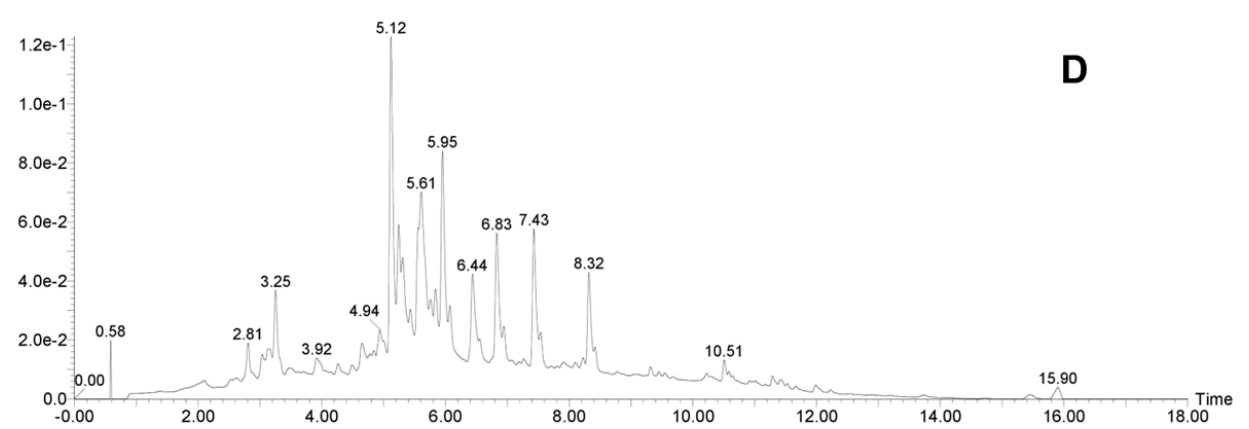
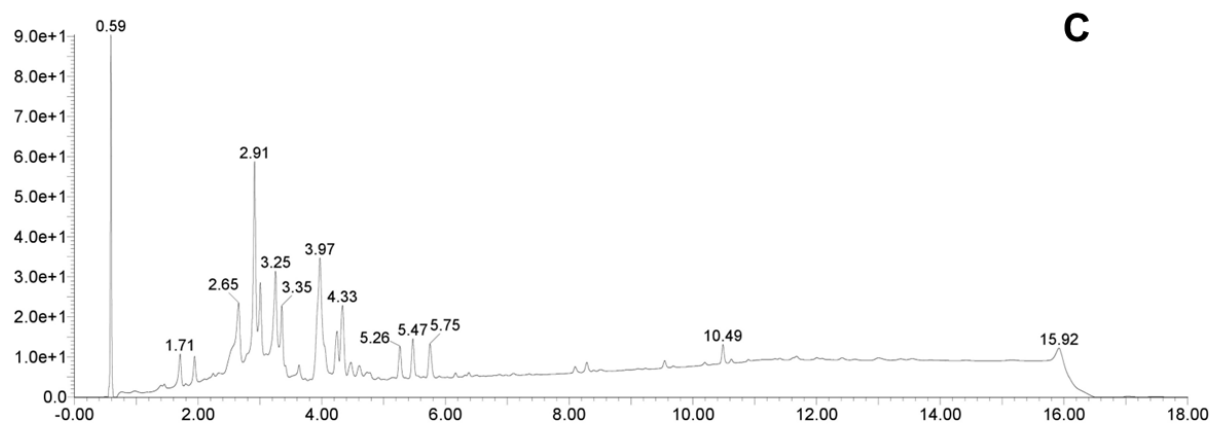
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise dos extratos selecionados por UPLC-DAD-ESI-MS

Os extratos de *B. brevifolia*, *B. calvescens*, *B. imbricata*, *C. cruciata*, *B. oblongifolia* e *B. stylosa* foram obtidos conforme descrito na seção 4.6. A percolação, embora demande um período prolongado de execução, é um método extrativo mais eficiente que a maceração, já que continuamente o solvente saturado é substituído, levando ao esgotamento do material vegetal (ZHANG; LIN; YE, 2018). Para avaliar previamente o perfil fitoquímico dessas espécies, a técnica de UPLC-ESI-MS foi adotada, com o objetivo de identificar putativamente os principais metabólitos especiais presentes nos extratos obtidos. A análise dos extratos foi feita conforme as condições descritas na seção 4.11 e os cromatogramas encontram-se representados na **Figura 5**.

Figura 5 - Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para os extratos etanólicos de *B. imbricata* (A), *B. brevifolia* (B), *C. cruciata* (C), *B. stylosa* (D), *B. calvescens* (E) e *B. oblongifolia* (F) (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)





Utilizou-se como estratégia a comparação dos dados espectrométricos e espectroscópicos das substâncias analisadas com aqueles já descritos na literatura para substâncias já identificadas em outras espécies desses mesmos gêneros. Os máximos de absorção no espectro de ultravioleta (UV) ($\lambda_{\text{máx.}}$), a relação massa/carga (m/z) de cada pico e os possíveis compostos correspondentes estão representados na **Tabela 18**.

Tabela 18 - Identificação putativa dos constituintes dos extratos etanólicos de *B. imbricata*, *B. bevifolia*, *C. cruciata*, *B. stylosa*, *B. calvescens* e *B. oblongifolia* a partir de análises por UPLC-DAD-ESI-MS/MS (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)

<i>Baccharis imbricata</i>								
Pico	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	$[M+H]^+$ (<i>m/z</i>)	Íons dos fragmentos (<i>m/z</i>)	$[M-H]^-$ (<i>m/z</i>)	Íons dos fragmentos (<i>m/z</i>)	Identificação	Substâncias com características semelhantes (isoladas desse gênero)
1	2.90	325 295	579	409, 405, 393, 361, 325	577	367	Derivado de ácido cafeoilquínico	
2	3.01	325 295	517	163	515	191, 179, 173	Ácido di-O- cafeoilquínico	3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA ¹
3	3.43	325 295	531	177, 151, 143, 133	529	193, 179, 175, 173	Ácido cafeoil- feruloilquínico	-
4	3.80	325 295	-	-	543	349, 349, 193, 193, 179, 173, 155	Ácido di-O- feruloilquínico	-
5	4.48	355 270	331	316, 301, 298	329	299, 271	Flavonol (dimetilado)	-
6	4.57	333 270	317	302, 257	315	300, 271, 255, 167	Flanova (metilada)	3-O-metilquercetina, eupafolina
7	5.25	325sh 288	287	161, 153	285	269, 243, 164	Flavanona ou diiidroflavonol	Isosakuranetina, sakuranetina, diidrooroxilina A
8	5.60	361/270	301	286, 269, 258, 177, 153, 139	299	284, 242, 150	Flavonol (metilado)	-

9	5.76	332/268	331	316, 301, 287	329	299, 271	Flavona (dimetilada)	Jaceosidina, dimetoxi-centaureidina, cirsiolol, 4',5, 7-triidroxi-6,8-dimetoxiflavona
10	6.50	223	401	317	399	315, 300	Não identificado	-
11	7.45	223	305	191	-	-	Não identificado	-
Baccharis brevifolia								
Pico	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	$[M+H]^+$ (m/z)	Íons dos fragmentos (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Íons dos fragmentos (m/z)	Identificação	Substâncias com características semelhantes (isoladas desse gênero)
1	0.59	383 230	355/325/282/ 247/229/163		353/309		Não identificado	-
2	1.94	325 295	355	176, 163	353	191, 179, 135	Ácido O-cafeoilquínico	Ácido clorogênico
3	2.36	325 288	374/305/ 247		465/425/311		Não identificado	-
4	2.89	330 260	465 427	303 247, 189, 163	463 425	301 245, 179, 135	Flavona glicosilada	Isoquercetina
5	3.00	325 295	517	163	515	191, 179	Ácido di-O-cafeoilquínico	3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA
6	3.17	330 260	449	303, 287, 147, 129	447	301, 255	Flavona glicosilada	-
7	4.05	345 275	317	302, 153, 147	315	300 151, 119	Flavona	3-O-metilquercetina, eupafolina

8	4.58	333 275	331/301	317, 298, 287, 286	329/299	314, 299, 285 284	Mistura de flavonas	Isocanferídeo, crisoeriol, hispidulina, jaceosidina, dimetoxi-centaureidin, cirsiol, 4', 5, 7-triidroxi-6,8- dimethoxiflavona
9	5.19	333 275	315	300, 282, 270, 254	313	298, 283, 269, 255	Flavona	Circimaritina, pectolinarigenina
10	5.56	312 300	595/573/ 469	327, 251, 217, 149, 147, 139	571/527/467	467, 439, 423, 375	Não identificado	-
11	5.97	312 300	593/467/ 449/363		583/569/525	465	Não identificado	-
12	6.67	312 300	579/453/ 289	289, 277, 147	555/511/451		Não identificado	-
13	7.19	312 300	621/555/ 495/449		553	493, 449, 187	Não identificado	-
14	7.90	312 300	589/469/ 449/425		889/517		Não identificado	-
15	8.09	312 300	589/470/ 449		995/625		Não identificado	-
Campovassouria cruciata								
Pico	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	[M+H] ⁺ (m/z)	Íons dos fragmentos (m/z)	[M-H] ⁻ (m/z)	Íons dos fragmentos (m/z)	Identificação	Substâncias com características semelhantes (isoladas desse gênero)
1	1.71	317 290	325	163	323/369	161	Glicosídeo de ácido cafeico	-
2	1.94	325 295	355/449	163	353/447	191, 179, 173, 135	Ácido O- cafeoilquínico	-
3	2.65	324	163	135, 119, 107	161	133, 117, 105	Cumarina	-

4	2.91	345 252	449	287	447	285	Flavona glicosilada	-
5	3.00	325 295	517	-	515	353, 191, 179, 161	Ácido di-O- cafeoilquínico	-
6	3.25	333 268	449	287	447	285, 175	Flavona glicosilada	-
7	3.35	333 268	449/463	287, 301, 286, 257	447/461	285, 175 299, 284, 163	Flavona glicosilada	-
8	3.63	333 270	491	287	489	285	Flavona	-
9	3.97	345 270	287	269, 179, 153	285	267, 257, 241, 175, 151, 132	Flavona	-
10	4.05	345 270	317	302, 274, 133, 109	315	300, 271, 213, 137	Flavona	-
11	4.25	215	363	263, 172	407	-	Lactona sesquiterpênica	-
12	4.33	215	363/345/ 263/245	245, 227, 201, 199 182, 177, 173, 157, 145, 119, 109	407	-	Lactona sesquiterpênica	-
13	4.47	333 270	271	243, 225, 189, 137	269	225, 201, 181, 151, 149	Flavona	-
14	4.61	345 270	301	285, 258, 143, 119	299	284, 256	Flavona	-

15	5.26	220	403/345/ 305	275, 163, 121, 199, 171, 173, 163, 147, 109	425	-	Lactona sesquiterpênica	-
16	5.47	220	405/347/ 247	199, 163, 145, 133 229, 201, 183, 173 201, 183, 157, 143, 131	391	-	Lactona sesquiterpênica	-
17	5.75	220	347/305/ 247	229, 201, 183, 173 287, 241, 197, 179 183, 168, 157, 131	303	136	Lactona sesquiterpênica	-
18	6.16	220	335/229	265, 193, 149 183, 168, 155, 143	333	315, 287	Não identificado	-
19	6.38	223	387/317/ 269	259, 253, 183, 161, 123	385 315	329	Não identificado	-
20	8.10	223	403/301	285, 215, 139	401	299	Não identificado	-
21	8.29	210	303	267, 241, 159, 145, 131, 119	301	-	Não identificado	-

Baccharis stylosa

Pico	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	[M+H]⁺ (m/z)	Íons dos fragmentos (m/z)	[M-H]⁻ (m/z)	Íons dos fragmentos (m/z)	Identificação	Substâncias com características semelhantes (isoladas desse gênero)
1	2.81	349 252	611/469	-	609/341	301	Flavona	Rutina
2	3.25	325 295	357	191, 177, 145	693	517, 447, 175	Ácido O-p- coumaroil-O- feruloilquínico	-

3	3.92	312/293/275	303	-	301	179, 151	Não identificado	-
4	4.65	367/245	317	302, 285, 274, 191, 153	315	300, 271, 163	Flavonol	3-O-metilquercetina
5	4.94	311/292/281/ 265/244	373	337, 329, 303, 289, 219, 207, 191, 189	371	301, 275, 265, 195	Acetileno	-
6	5.12	311/292/275/ 261/236	287/305	161, 153	285	241, 239, 151	Acetileno	-
7	5.24	311/292/ 276/236	287	161, 153	285	270, 243, 228, 217, 164, 151	Acetileno	-
8	5.31	345/315/291	387 287	-	385 285	-	Não identificado	-
9	5.55	345 290	387	329, 303	385	315, 300, 271, 205, 179, 151	Flavona	-
10	5.61	360 265	301	286, 272, 269, 258	299	284, 240, 228, 211	Flavonol	Isocanferídeo
11	5.95	345 263	401	317, 302, 285, 196	399	315, 300	Flavona	-
12	6.44	313/295/ 264/245	371	313, 287	369	285, 255	Acetileno	-

13	6.83	324	385	301, 286	383	299, 284	Estilbeno	-
14	7.43	239	319/305	191	317	273, 255, 231, 217, 111	Não identificado	-
15	8.32	275	371/301	-	339/299	-	Não identificado	-
16	10.51	408 323	621	191	815	-	Não identificado	-
<i>Baccharis calvenscens</i>								
Pico	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	$[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z)	Íons dos fragmentos (m/z)	$[\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z)	Íons dos fragmentos (m/z)	Identificação	Substâncias com características semelhantes (isoladas desse gênero)
1	1.94	325 295	355	297, 163	353	191, 179	Ácido O- cafeoilquínico	Ácido clorogênico
2	2.87	345 250	465/303	315, 303, 257	463	301, 207	Flavona glicosilada	Isoquercetina
3	3.00	325 295	517/499	163	515	353, 191, 179, 161	Ácido di-O- cafeoilquínico	3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5- diCQA
4	3.21	325 295	517/499	163	515	353, 191, 179, 161	Ácido di-O- cafeoilquínico	3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5- diCQA
5	3.92	330 260	359/303	281, 165	357/301	211, 199, 147, 133, 125	Flavona	Gardenina B, 3-hidroxi-3',4',5,7-tetra- metoxiflavona, retusina

6	4.16	325 288	273	153, 147	271	177, 151, 119	Flavanona	Naringenina
7	4.49	333 267	273	-	269	225, 281, 149	Flavona	Apigenina
8	4.60	333 272	301	286	299	-	Flavona	Isocanferídeo, crisoeriol, hispidulina
9	5.21	333 274	315	-	313	297, 283, 269, 255	Flavona	Circimaritina, pectolinarigenina
10	5.68	333 274	285	271	283	269	Flavona	Apigenina-5-metil-eter, 2- metoxiquercetina, genkwanina
11	6.36	278	453 305	305, 287, 269, 241, 159, 143, 119	555	-	Não identificado	-
12	6.51	284	315/301/285/27 7/245	235, 163, 159, 149, 135, 121	565/521/299/ 293	-	Não identificado	-
13	6.79	278	577/451/433/28 5/203	-	553/509	-	Não identificado	-
14	8.00	278	433/285	131	581/581	-	Não identificado	-
15	9.11	277	886/737/589/43 9/433/457	411, 249, 235, 203, 191	455	409, 253	Não identificado	-
<i>Baccharis oblongifolia</i>								
Pico	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	[M+H]⁺ (m/z)	Íons dos fragmentos (m/z)	[M-H]⁻ (m/z)	Íons dos fragmentos (m/z)	Identificação	Substâncias com características semelhantes (isoladas desse gênero)
1	1.96	310 242	387/409	243, 233, 177, 123	385/431	-	Não identificado	-
2	2.82	310 242	591/611	-	609	-	Não identificado	-

3	3.04	325 295	517	247, 163	515	191,173	Ácido di-O- cafeoilquínico	3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5- diCQA
4	3.27	325 295	345/267	271, 255, 243, 177, 163	551	-	Derivado do ácido cafeoilquínico	-
5	3.89	330 288	738	-	637	-	Não identificado	-
6	5.26	310 285	287/337	167, 147	307	237, 209, 173, 119	Flavanona	-
7	5.64	350 295	301	255, 205, 147	299	271, 165	Flavonol	-
8	6.50	243	557/579	295, 265, 255, 189, 163	555	361, 315, 239	Não identificado	-
9	6.86	243	279/335/ 385	-	295/311/ 325	277, 195, 183, 171	Não identificado	-
10	9.57	409/328/ 269/248	593	533, 505, 491, 487, 473, 461, 447, 433	591	473, 459, 417	Não identificado	-
11	10.23	434/328/278/2 49	637/635	469, 413, 393, 337	-	-	Não identificado	-
12	10.52	409/325/248	621	533, 505, 461, 433	815	-	Não identificado	-
13	11.61	457/308/250	338/105	-	311	-	Não identificado	-
14	11.78	474/445/332/2 50	338/105	-	-	-	Não identificado	-

¹ ácido di-cafeoilquínico

Referências: (CAMPOS et al., 2016; GRECCO et al., 2012; PIZZOLATTI et al., 2006; TAPIA et al., 2004; VERDI et al., 2005; ZAMPINI; ISLA; SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2009)

Com base nos espectros no UV, é possível inferir a presença de algumas substâncias com cromóforos característicos. Assim, observou-se a presença de compostos derivados do ácido clorogênico, que apresentam absorção no UV com $\lambda_{\text{máx}}$ em aproximadamente 325 nm e em 296 nm (ombro) (BELAY; GHOLAP, 2009), bem como flavonóis ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = 350-385 / banda II = 250-290), flavonas ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = 310-350 nm / banda II = 250-290) e flavanonas ($\lambda_{\text{máx}}$: banda I = ombro em 300-330 nm / banda II = 270-295) (TSIMOGIANNIS et al., 2007). A análise conjunta com os espectros de massas possibilitou deduzir algumas características estruturais, a partir da observação de íons resultantes da perda de água, de grupos metila ou de açúcares.

De acordo com os dados da literatura, dentre os principais constituintes do gênero *Baccharis* estão os compostos fenólicos e os terpenóides. De maneira geral, os flavonoides e os diterpenos são as classes de maior ocorrência (CAMPOS et al., 2016). Já para o gênero *Campovassouria* estão descritos diversos sesquiterpenos oxigenados, incluindo o óxido de cariofileno, globulol, epiglobulol e germacreno D, bem como monoterpenos, como α -pineno, β -pineno, sabineno e limoneno (DE SOUZA et al., 2021). Esses dados da literatura vão de encontro aos resultados da análise feita no presente trabalho, na qual foram identificados putativamente derivados do ácido cafeoilquínico e flavonoides metilados ou glicosilados, além de alguns terpenos.

É interessante ressaltar que no extrato de *C. cruciata* alguns picos apresentaram absorção no UV entre 215-220 nm e íons com algumas fragmentações específicas, como é o caso dos picos com Tr 4,33; 5,26 e 5,47 min. Considerando que já foram isoladas heliangolídeos, germacrolídeos e guaianolídeos dessa espécie (BOHLMANN et al., 1983) e que essa classe de metabólitos é bastante comum também em gêneros da mesma tribo, foi possível inferir a presença de lactonas sesquiterpênicas no extrato. Assim, o íon em m/z 363 $[M+H]^+$ e os íons em m/z 345 $[M-H_2O]^+$, 263 $[M-C_5O_2H_7]^+$ e 245 $[M-C_5O_2H_7-H_2O]^+$, obtidos a partir da fragmentação dos picos 11 e 12 (Tr = 4,25 e 4,33 min) indicam, respectivamente, o íon molecular protonado e as sucessivas perdas de água e de um grupo éster contendo 5 átomos de carbono. Já o pico 16 (Tr = 5,47 min) apresenta íons em m/z 347 $[M+H]^+$ e 247 $[M-C_5O_2H_7]^+$, correspondentes ao íon molecular protonado e a perda de um grupo éster idêntico ao observado para os picos 11 e 12.

Além disso, no extrato de *B. stylosa* os picos 5 e 6 (Tr = 4,94 e 5,12 min) apresentaram máximos de absorção no UV em 312, 293, 281, 265 nm e 311, 292,

260, 276, 237 nm, respectivamente, e os picos 7 e 12 ($T_r = 5,24$ e $6,44$ min) apresentaram $\lambda_{m\acute{a}x.}$ de 311, 292, 276, 236 nm e 313, 295, 264, 245 nm, respectivamente. Esses cromóforos são característicos de acetilenos, cujas estruturas possuem duas ou mais ligações triplas e são relativamente instáveis, principalmente na exposição à luz UV, ao pH e a outros fatores (KONOVALOV, 2014). Os métodos espectroscópicos são os mais utilizados para a elucidação dessas substâncias, uma vez que apresentam espectros no UV altamente característicos. Geralmente observa-se dois conjuntos de bandas, com comprimentos de onda mais longos de menor intensidade e com comprimentos de onda mais curtas com intensidade muito alta. Todas as combinações de ligações triplas e duplas conjugadas fornecem tipos especiais de espectros UV (BOHLMANN; BURKHARDT; ZDERO, 1973).

Dessa forma, foi possível comparar os espectros no UV obtidos com os dados relatados por (BOHLMANN; BURKHARDT; ZDERO, 1973) para fazer algumas inferências sobre as estruturas identificadas (**Tabela 19**). Por exemplo, a substância eluída no pico 6 apresenta espectro no UV muito semelhante ao de um acetileno com sistema de conjugação $CH=CH - [C\equiv C]_2 - CH=CH$, enquanto aquele correspondente ao pico 7 possui máximos de absorção no UV compatíveis com um sistema $[C\equiv C]_2 - [CH=CH]_2$. Alguns C_{17} -acetilenos já foram isolados de *B. trinervis*, enquanto C_{10} -acetilenos foram isolados de *B. pedunculata* (JAKUPOVIC; SCHUSTER; WASSHAUSEN, 1991). Mais recentemente, Minteguaiga et al. (2022) identificaram C_9 -poliacetilenos em óleo essencial de *B. palustris*.

Tabela 19 – Máximos de absorção no ultravioleta (UV) de polienos

$R - [CH = CH]_n - [C\equiv C]_{n'} - [CH=CH]_{n''} - R$									
n	n'	n''	comprimentos de onda mais longos nm ($\epsilon \times 10^{-3}$)			comprimentos de onda mais curtos nm ($\epsilon \times 10^{-3}$)			
2	1	1	306(28)	290(31)					
2	1	2	338(55)	316(52)					
-	2	-	255(0.2)	240(0.4)	230(0.3)				
1	2	-	280(15)	264(18)	251(13)	238(6)	210(42)		
1	2	1	311(17)	292(20)	276(14)	261(8)	244(23)	235(30)	230(31)

2	2	-	309(28)	294(33)			236(40)	226(24)	
2	2	1	335(26)	313(36)	294(26)	277(14)	264(24)	249(29)	
3	2	-	332(63)	315(61)			250(22)	242(12)	
3	2	1	356(40)	330(51)	313(35)		274(24)	263(28)	
-	3	-	307(0.1)	268(0.2)	269(0.2)	255(0.2)	210(150)		
1	3	-	328(14)	307(0.2)	285(11)	271(8)	242(10)	231(70)	
1	3	1	353(18)	328(25)	308(19)	289(10)	267(57)	254(70)	245 (65)
2	3	-	347(33)	325(41)	305(26)	288(14)	269(115)	259(58)	
2	3	1	369(29)	342(39)	320(30)		(289(81)	273(96)	242(66)
3	3	-	356(47)	333(56)	312(31)		283(92)	271(47)	
-	4	-	355(0.1)	330(0.2)	308(0.2)	287(0.2)	233(275)	223(200)	211(90)
1	4	-	375(7)	348(11)	324(9)	303(6)	272(155)	258(108)	239(81)
1	4	1	391(9)	362(15)	337(12)	315(8)	287(86)	271(106)	258(81)
2	4	-	382	356	331	311	290	273	
-	5	-	392(0.1)	362(0.2)	338(0.2)	312(0.2)	262(350)	249(250)	236(110)
1	5	-	410	378	349	327	285	265	

Fonte: (BOHLMANN; BURKHARDT; ZDERO, 1973)

Com base nessas análises, pode-se dizer que os extratos selecionados constituem uma promissora fonte de compostos bioativos, com potencial atividade antiviral e anti-inflamatória. Estudos anteriores sobre espécies de *Baccharis* revelaram a presença de polifenóis com padrão de oxigenação pouco usual que são potenciais inibidores do SARS-CoV-2. Esses compostos demonstraram a capacidade de impedir a entrada do vírus na célula hospedeira, impedir a replicação ou interromper a síntese proteica, conforme indicado por estudos *in silico* (KAUL et al., 2021). Alguns exemplos são a herbacetina e a pectolarina, que inibiram *in vitro* a principal protease viral 3CLpro (JO et al., 2020), enquanto a miricetina mostrou eficácia significativa como antagonista de RdRp (SINGH et al., 2021). A retusina, por sua vez, inibiu a replicação do SARS-CoV-2 em células Vero E6 e Calu-3 (LEAL et al., 2021). Por outro lado, os polifenóis podem desempenhar também um papel benéfico no processo inflamatório (GIOVINAZZO et al., 2020). Exemplos são a baccharina e o artepelin C, isolados de

B. dracunculifolia, que afetam diretamente a inflamação ao modular a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (FERREIRA et al., 2021; SHAHINOZZAMAN et al., 2020). Os poliacetilenos, que estão presentes em espécies da família Asteraceae, também apresentam efeitos anti-inflamatórios descritos na literatura, relacionados à modulação do catabolismo das prostaglandinas e ao bloqueio do fator nuclear kappa B (NF-κB), como é o caso do falcarinol e do falcarindiol (CHRISTENSEN; BRANDT, 2006; NEGRI, 2015).

Já os principais compostos bioativos identificados no gênero *Campouvassouria* são lactonas sesquiterpênicas. Algumas delas, estruturalmente semelhantes aos germacranolídeos, guaianolídeos e heliangolídeos foram investigadas por suas atividades biológicas. Por exemplo, a reinosina, a artemisinina, as tagitinininas e os eupanolídeos inibem as proteínas SARS-CoV-2, bem como as citocinas pró-inflamatórias (ABE et al., 2015; BADRAOUI et al., 2022; MEJÍAS et al., 2022; WANG et al., 2018a).

5.2 Determinação dos Títulos Virais e da Multiplicidade de Infecção (MOI)

O título viral calculado, conforme descrito na seção 4.13.3, foi de $8,16 \times 10^6$ PFU/mL.

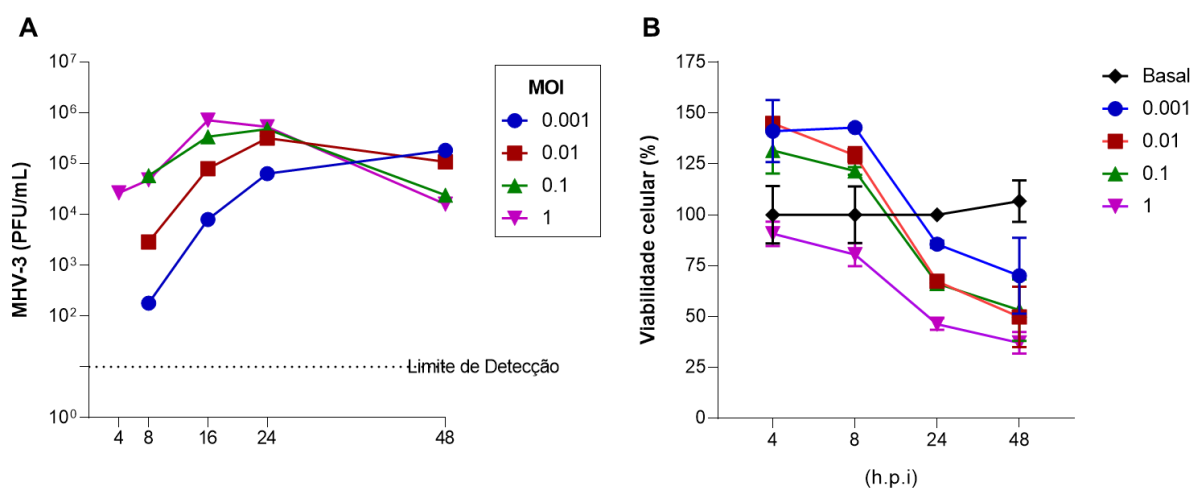
A determinação do título viral consiste em um ensaio cujo objetivo é determinar as concentrações virais apropriadas a serem utilizadas em testes, como neutralização de anticorpos, descoberta terapêutica antiviral, efeito citopático (CPE), entre outros. Embora existam vários métodos para medir a quantidade de vírus na amostra, tais como PCR-RT, Western Blot, ELISA e citometria de fluxo, esses normalmente baseiam-se na quantidade de DNA, RNA ou proteínas para quantificação e, assim, não medem a atividade biológica do vírus. Dessa forma, a fim de investigar a infectividade de um vírus, são necessários ensaios *in vitro* para avaliar a capacidade neutralizante de candidatos a anticorpos, bem como a eficácia de drogas antivirais (LABARRE; LOWY, 2001).

A infectividade viral é determinada pela capacidade do vírus de infectar e replicar nas células hospedeiras. Para determinar a infectividade viral, existem duas categorias de ensaios que podem ser realizados, os quantitativos, que incluem ensaios de formação de placa (PFA) e ensaios de formação de foco (FFA), e a que contém ensaios de diluição de ponto final, que incluem dose infecciosa de cultura de

tecidos de 50% (TCID₅₀), dose letal (LD₅₀) e dose infecciosa de ovo (EID₅₀) (BAER; KEHN-HALL, 2014).

Diante disso, foi determinado a multiplicidade de infecção (MOI) para o MHV-3 através da relação entre a quantidade de vírus infecciosos e a quantidade de células utilizadas por poço. Foram usadas diferentes concentrações de vírus para infectar as células L929, e a curva de multiplicação do MHV-3 encontra-se representada na **Figura 6**.

Figura 6 - Curvas de multiplicação de MHV-3 em fibroblastos murinos L929 (A) e viabilidade das células infectadas (B).



Em tempos pré-determinados (4, 8, 24 e 48 h após a infecção – h.p.i) foram determinadas a A) produção viral e a B) viabilidade celular. O experimento foi conduzido com triplicatas biológicas.

É possível observar uma acentuada redução do número de células viáveis após 8h de infecção (**Figura 6B**), acompanhada pelo aumento de partículas virais (**Figura 6A**), estas avaliadas pela contagem do número de placas de lise e cálculo das Unidades Formadoras de Placa (PFU/mL). Diante disso, foi escolhida a maior diluição que promoveu aproximadamente 60% da viabilidade celular e o menor tempo em que se observou um aumento considerável de PFU e dano reversível. Como demonstrado na figura, estipulou-se o MOI de 0,01 para o MHV-3 em células L929 e o intervalo de 16h pós-infecção (h.p.i) para os ensaios da triagem antiviral.

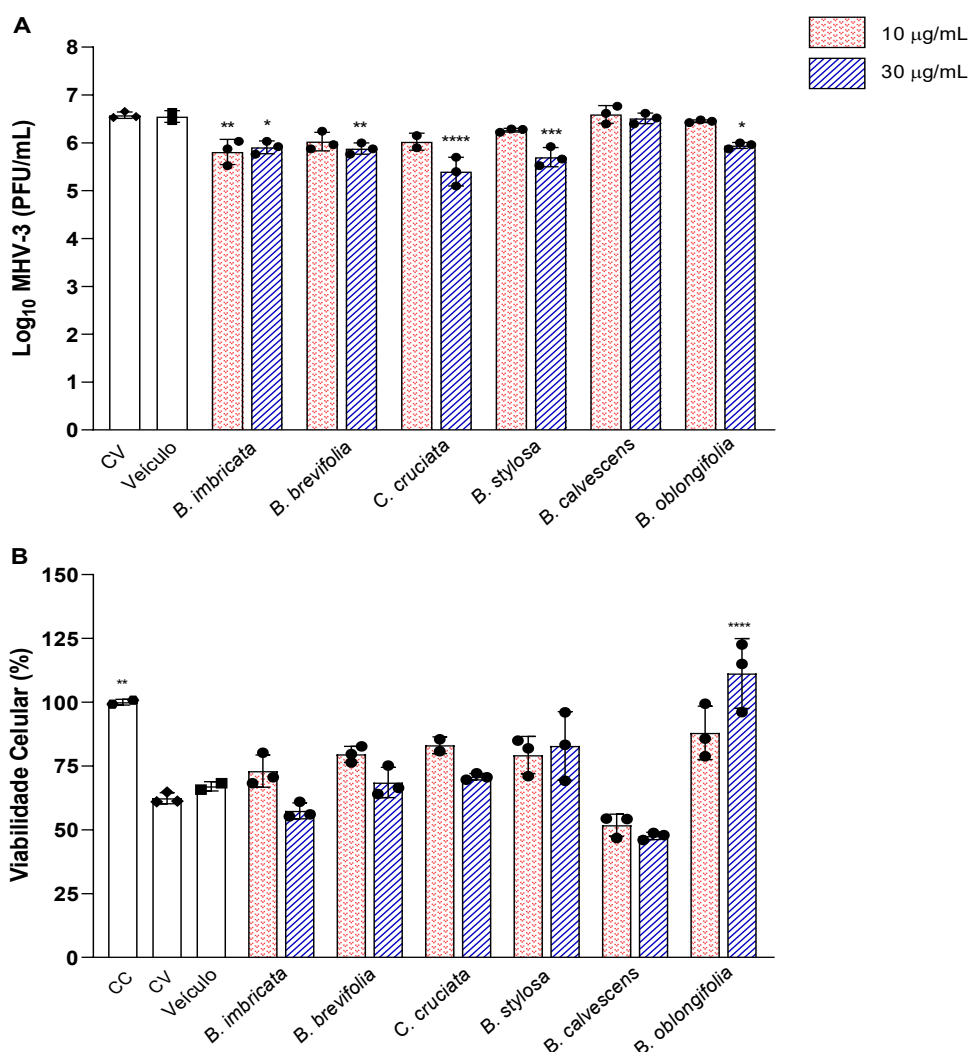
5.3 Triagem antiviral frente ao coronavírus murino MHV-3

Previamente a avaliação da potencial atividade antiviral de qualquer amostra, é necessário avaliar sua citotoxicidade frente às linhagens de células utilizadas. Assim, avaliou-se *in vitro* a citotoxicidade das amostras frente a linhagem de fibroblastos murinos (L929 ATCC CCL-1™) utilizada no ensaio de atividade antiviral, conforme descrito na seção 4.13.2. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT, que se baseia na capacidade das células viáveis incorporarem o sal de tetrazólio e reduzi-lo, a partir das desidrogenases das mitocôndrias. Assim, é formado um composto formazana, insolúvel e de coloração azul-escuro. Dessa forma, é possível medir quantitativamente a viabilidade através da quantidade de cristal formado, uma vez que o valor de absorbância é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

As amostras foram testadas nas concentrações de 10 a 90 µg/mL. Os resultados estão representados em anexo (APÊNDICE A, pág. 217). Foi observada citotoxicidade (valores inferiores a 80% de viabilidade celular) para os extratos de *B. imbricata*, *B. stylosa*, *B. oblongifolia* e *C. cruciata* avaliados na concentração de 90 µg/mL, enquanto os demais extratos (*B. brevifolia* e *B. calvescens*) não apresentaram redução da viabilidade ($p < 0,001$, ANOVA com pós teste Tukey).

Para a triagem antiviral dos extratos foi utilizado um modelo experimental *in vitro* com o β-coronavírus murino MHV-3, conforme descrito na seção 4.13.3 da parte experimental. É importante ressaltar que as células foram tratadas com os extratos antes e depois da infecção viral, nas concentrações de 10 e 30 µg/mL. Concomitantemente, a viabilidade celular foi avaliada com o ensaio do MTT. Os resultados estão representados na **Figura 7**.

Figura 7 - Efeito dos extratos etanólicos nas cargas virais de fibroblastos L929 infectados com MHV-3



Os ensaios de placas foram realizados com sobrenadantes de células L929 (10^5 células/poço) infectadas com MHV-3 (MOI 0,01) durante 16h e tituladas em células L929. **A)** Efeito dos extratos a 10 e 30 µg/mL, na infecção pelo MHV-3; **B)** viabilidade celular após 16h pós-tratamento com os extratos. Os dados obtidos foram expressos em unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL) e % de viabilidade celular, em comparação com o grupo Veículo (DMSO + Etanol) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ - ANOVA com pós-teste Tukey). CC: controle não infectado; CV: controle viral.

Todos os extratos testados, com exceção da *B. calvencens*, provocaram uma diminuição no título viral, com destaque para o de *C. cruciata*, que a 30 µg/mL apresentou redução de 1 log em comparação ao veículo. Além disso, a viabilidade celular após o tratamento com este extrato foi comparável ao controle infectado ($p >$

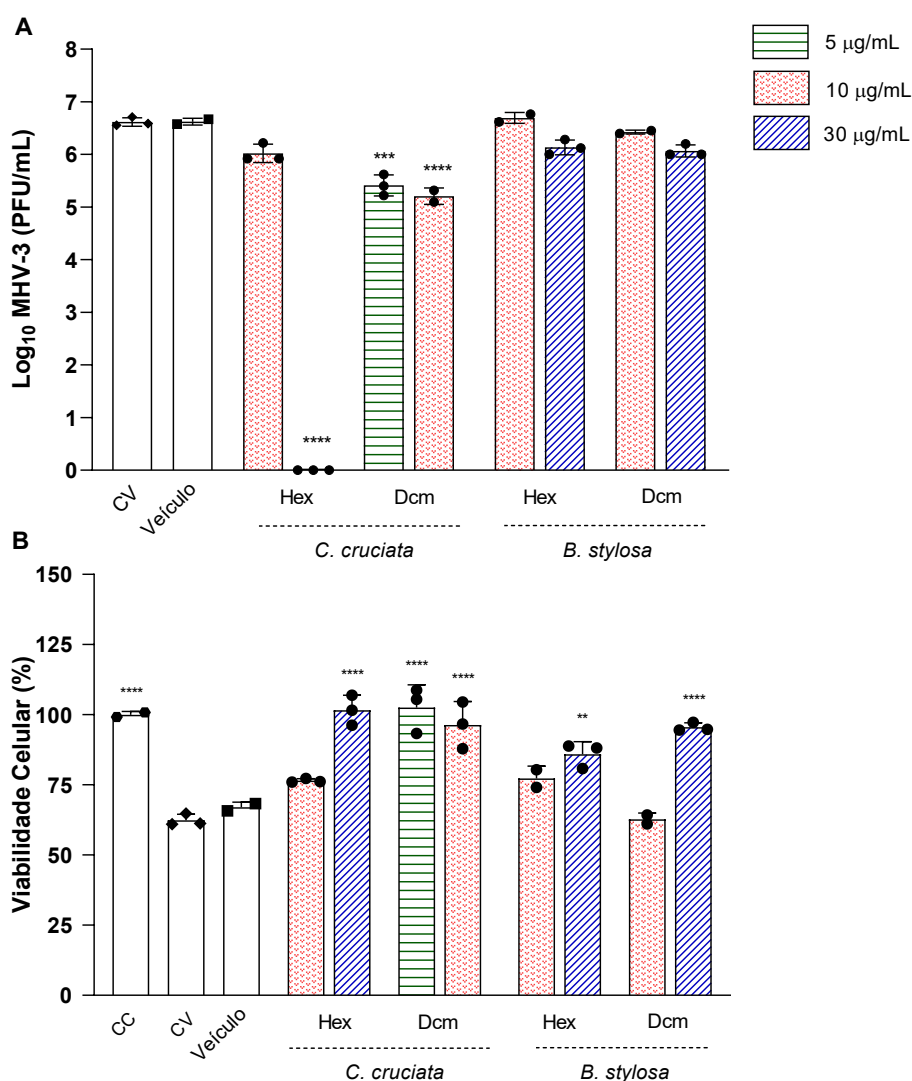
0,05), sugerindo que o extrato não era tóxico para as células infectadas (**Figura 7B**). Ademais, o extrato de *B. stylosa* foi o segundo mais promissor, na concentração de 30 µg/mL.

Com base nesses resultados, os extratos de *C. cruciata* e *B. stylosa* foram ressuspensos em solução hidrometanólica e submetidos a fracionamento por partição entre solventes imiscíveis (*n*-hexano, diclorometano e acetato de etila), conforme descrito na seção 4.7, obtendo-se assim as frações *n*-hexânica (Hex), diclorometânica (Dcm), em acetato de etila (Act) e hidrometanólica (MeOH/H₂O). O fracionamento de extratos vegetais, com o procedimento clássico de partição entre solventes imiscíveis, tem por objetivo separar as substâncias considerando sua solubilidade e seu coeficiente de partição em diferentes solventes (REGINATTO, 2017). Essas frações foram analisadas por UPLC-DAD-ESI-MS e os cromatogramas foram comparados com os extratos de origem (APÊNDICE B, pág. 221).

Ao comparar os perfis cromatográficos dos extratos e frações, pode-se observar que a partição entre solventes imiscíveis foi eficiente, sendo possível verificar picos com maior tempo de retenção nas frações *n*-hexânica e diclorometânica, sugerindo a presença de substâncias de baixa e média polaridade e picos com menor tempo de retenção na fração em acetato de etila, indicando a presença de substâncias de maior polaridade. Considerando a análise detalhada dos extratos e as principais substâncias de interesse, as frações acetato de etila e hidrometanólica não foram testadas no ensaio antiviral.

Assim, as frações Hex e Dcm de *C. cruciata* e *B. stylosa* foram avaliadas quanto à atividade antiviral contra o MHV-3 (**Figura 8**). É importante ressaltar que a fração Dcm da *C. cruciata* foi testada em concentrações mais baixas (5 e 10 µg/mL) devido a viabilidade celular observada abaixo de 80% a 30 µg/mL (APÊNDICE A, pág. 217).

Figura 8 - Efeito das frações de *C. cruciata* e *B. stylosa* nas cargas virais de fibroblastos L929 infectados com MHV-3



Os ensaios de placas foram realizados com sobrenadantes de células L929 (10^5 células/poço) infectadas com MHV-3 (MOI 0,01) durante 16h e tituladas em células L929. **A)** Efeito das frações hexânica (Hex) e diclorometânica (Dcm) de *C. cruciata* e *B. stylosa*, na infecção pelo MHV-3; **B)** viabilidade celular após 16h pós-tratamento com as frações. Os dados obtidos foram expressos em unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL) e % de viabilidade celular, em comparação com o grupo Veículo (DMSO + Etanol) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ - ANOVA com pós-teste Tukey). CC: controle não infectado; CV: controle viral.

Ambas as frações Hex e Dcm de *C. cruciata* promoveram redução significativa da carga viral de MHV-3 e restauraram a viabilidade celular de forma semelhante ao controle não infectado. Embora a fração Hex tenha demonstrado uma redução total da carga viral na concentração de 30 µg/mL, a fração Dcm mostrou-se mais ativa em

concentração seis vezes menor (5 µg/mL), sugerindo assim uma maior potência dessa fração em relação a primeira. Nenhuma das frações de *B. stylosa* apresentou redução significativa da carga viral.

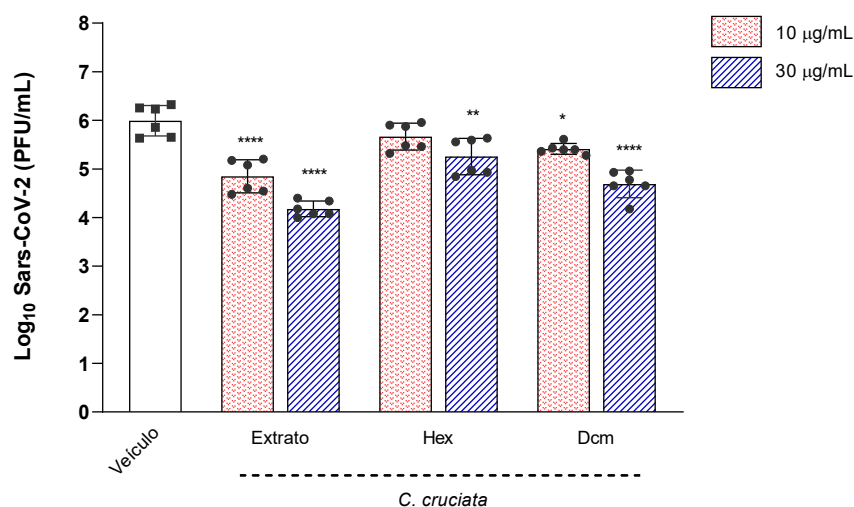
Não há relatos na literatura sobre a atividade antiviral de nenhum dos extratos testados. Entretanto, já foi relatada a atividade antiviral de várias espécies de *Baccharis*, como por exemplo o extrato orgânico (diclorometano:metanol) de *B. gaudicaudiana* que apresentou atividade frente ao poliovírus tipo 2 (PV-2) (JAIME et al., 2013), o extrato aquoso de *B. ariculata*, com atividade virucida contra o herpes vírus simples tipo 1 (HSV-1) (TORRES et al., 2011) e o extrato aquoso de *B. trinevis*, que inibiu significativamente a replicação do HSV-1 (ABAD et al., 1999). Também para espécies da tribo Eupatorieae, que abrange o gênero *Campovassouria*, tais como *Eupatorium perfolatum*, cujo extrato hidroalcólico exibiu significativo efeito antiviral frente a cepas do vírus da Influenza A (DERKSEN et al., 2016) e *Eupatorium fortunei*, cujo pré-tratamento com o extrato aquoso também reduziu a replicação desse mesmo vírus (CHOI et al., 2017).

5.4 Efeito do extrato e frações de *C. cruciata* frente ao SARS-CoV-2

Levando em consideração o potencial antiviral do extrato e das frações Hex e Dcm de *C. cruciata*, estas foram também avaliados em células Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2 (conforme descrito na seção 4.13.4). O ensaio foi realizado pelo Dr. Leonardo Camilo de Oliveira.

Antes dos ensaios, as amostras foram submetidas a testes de citotoxicidade pelo ensaio do MTT, não demonstrando toxicidade nas concentrações testadas (valores superiores a 80% de viabilidade celular) (APÊNDICE A, pág. 217). A atividade antiviral foi avaliada pelo ensaio de placas e os resultados estão representados na **Figura 9**. O extrato apresentou redução na carga viral de aproximadamente 2,0 log na concentração de 30 µg/mL, enquanto a fração Dcm reduziu em 1,3 log, nessa mesma concentração.

Figura 9 - Efeito do extrato e frações de *C. cruciata* na carga viral de células Calu-3 infectados com SARS-CoV-2



Os ensaios de placas foram realizados com sobrenadantes de células Calu-3 (10^5 células/poço) infectadas com SARS-CoV-2 (MOI 0,1) durante 48h e titulados em células Vero CCL81 sobrepostas com 0,8% de carboximetilcelulose. As células Calu-3 foram pré-tratadas 1 hora antes da infecção viral. O tratamento das monocamadas infectadas foi mantido até 48 h.p.i, quando o sobrenadante foi coletado e analisado quanto à infectividade utilizando ensaio de placa. Os dados obtidos foram expressos em unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL) comparados com Veículo (DMSO + Etanol) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ - ANOVA com pós-teste Tukey).

Não há registros na literatura acerca da atividade frente ao SARS-CoV-2 desta espécie, sendo então a primeira vez documentada no presente trabalho. No entanto, algumas plantas, conhecidas por suas propriedades medicinais, já foram investigadas por seu efeito antiviral. Exemplos disso são os extratos aquosos e etanólicos de *Artemisia annua* e *Artemisia afra*, que apresentaram inibição do SARS-CoV-2 em células Vero E6 em concentrações de 225 µg/mL. *A. annua* é utilizada na medicina tradicional chinesa como antimalárico, sendo esse efeito atribuído a artemisinina, uma lactona sesquiterpênica (NIE et al., 2021). O extrato aquoso de *Glycyrrhiza glabra*, conhecida como alcaçuz, também reduziu a carga viral em células Vero E6, infectadas com o coronavírus, na concentração de 2 mg/mL (VAN DE SAND et al., 2021).

5.5 Efeito dos extratos e frações na redução da liberação da citocina IL-6

O modelo *in vitro* padronizado envolveu a estimulação de células A549 simultaneamente com IFN- γ e TNF. Esses mediadores pró-inflamatórios foram escolhidos devido ao seu papel significativo na progressão e exacerbação da COVID-19. O IFN- γ foi previamente identificado como um novo mediador de inflamação e coagulação na SARS (DRASLER et al., 2020), e níveis elevados de interleucina-6 (IL-6) servem como marcador para prever o curso desfavorável da COVID-19 (GONG et al., 2020). A exacerbação da liberação de citocinas foi avaliada pela quantificação dos níveis de IL-6 e TNF. Após estimulação com IFN- γ e TNF, as células A549 exibiram um aumento de 3,75 vezes nos níveis de IL-6 ($300,3 \pm 5,3$ vs $81,43 \pm 0,9$ pg/mL no grupo basal, $p < 0,0001$) e um aumento de 33 vezes nos níveis de TNF ($535,3 \pm 15,9$ vs $16,14 \pm 1,0$ pg/mL no grupo basal, $p < 0,0001$) ao longo do período de ensaio (24 h) (dados não mostrados).

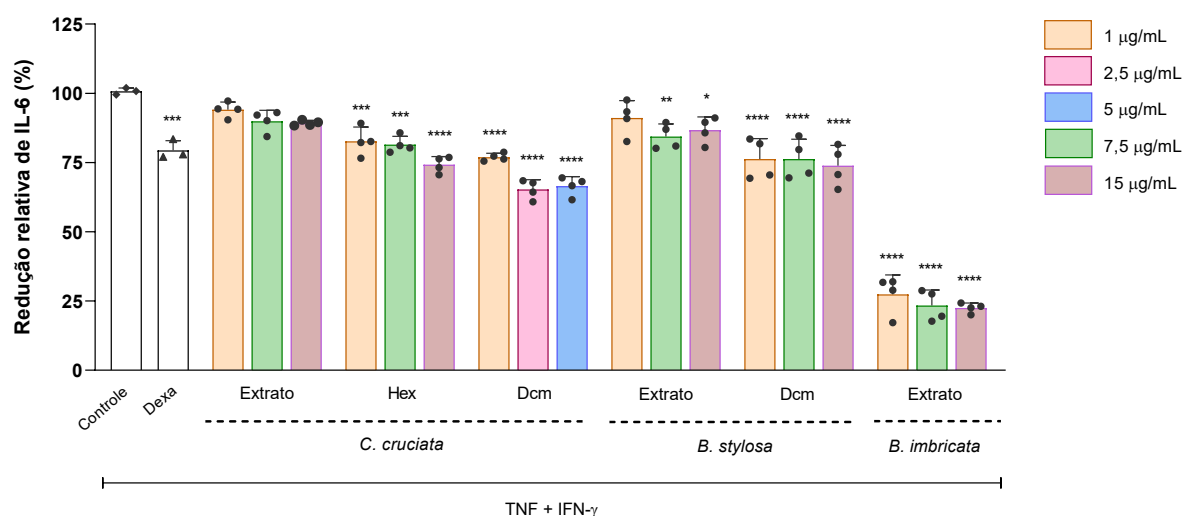
Considerando os resultados frente ao MHV-3, foram selecionados para esse ensaio os extratos de *C. cruciata* e *B. stylosa*, bem como as frações Hex e Dcm de *C. cruciata* e a fração Dcm de *B. stylosa*. Embora essa última não tenha apresentado redução significativa da carga viral de MHV-3, trabalhos anteriores com essa fração, realizados pelo nosso grupo de pesquisa, resultaram no isolamento de dois diterpenos (que serão descritos posteriormente). Já foi demonstrado que alguns terpenos podem diminuir os sintomas associados à inflamação, reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (DEVI et al., 2024). O extrato de *B. imbricata* também foi incluído nesse ensaio, pois apresentou uma discreta redução da carga viral nas células L929 infectadas com MHV-3 e já foi utilizado em trabalhos anteriores.

A citotoxicidade dos extratos e frações foi avaliada previamente em células A549, pelo ensaio do MTT, e os valores de CC_{50} foram calculados. Todos apresentaram-se maiores que 20 $\mu\text{g/mL}$, com exceção da fração Dcm de *C. cruciata*, que apresentou CC_{50} de $8,5 \pm 3,8$ $\mu\text{g/mL}$ (APÊNDICE A, pág. 217). Optou-se por utilizar concentrações entre 1 e 15 $\mu\text{g/mL}$.

As frações Hex e Dcm derivadas de *C. cruciata* demonstraram uma redução significativa da liberação de IL-6 pelas células A549. A fração Dcm, em particular, exibiu uma diminuição de aproximadamente 20% na menor concentração testada (1 $\mu\text{g/mL}$) em comparação ao grupo controle (células + citocinas). Além disso, a fração Dcm de *B. stylosa* também apresentou uma redução significativa, de aproximadamente 27%,

nos níveis da citocina. Por outro lado, o extrato de *B. imbricata* destacou-se ao reduzir os níveis de IL-6 em 78% em comparação com o controle, além de reduzir cerca de 57% mais do que a dexametasona, um anti-inflamatório usado como controle positivo (Figura 10).

Figura 10 - Redução da citocina pró-inflamatória IL-6 liberada por células A549 estimuladas por TNF e IFN- γ , e tratadas com extratos e frações de *C. cruciata*, *B. stylosa* e *B. imbricata*



As citocinas foram medidas de acordo com o protocolo do kit de imunoenensaio do sistema R&D. Os resultados são apresentados como % dos níveis de citocina $\pm$ desvio padrão, em comparação com o grupo controle (células + citocinas) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ - ANOVA com pós-teste Tukey).

Diversos metabólitos secundários possuem propriedades imunomoduladoras, facilitando a regulação positiva da expressão de citocinas anti-inflamatórias, ao mesmo tempo que regulam negativamente a expressão de citocinas inflamatórias, incluindo IL-6, IL-17 e TNF (SAPRA et al., 2021). Vários extratos e compostos isolados de plantas exibem propriedades anti-inflamatórias, incluindo espécies da tribo Eupatorieae, que abrange o gênero *Campovassouria*. Por exemplo, *Eupatorium perfoliatum* inibiu a liberação de NO em células RAW 264.7 estimuladas por LPS e a atividade foi atribuída à eupafolina, uma lactona sesquiterpênica (MAAS; DETERS; HENSEL, 2011). Da mesma forma, foi demonstrado que uma fração de sesquiterpenos derivados de *Eupatorium lindleyanum* regula negativamente os níveis

de TNF, IL-6 e IL-1 β em um modelo murino de lesão pulmonar aguda induzida por LPS (CHU et al., 2016). Por sua vez, várias espécies do gênero *Baccharis* possuem atividade anti-inflamatória descrita, como é o caso da *B. notorsegila*, cujo extrato metanólico e as frações hexânica e acetato de etila reduziram os mediadores pró-inflamatórios IL-6 e MCP-1 em células THP1 estimuladas com LPS (BURGOS et al., 2023). Os extratos metanólicos de *B. punctulata* e *B. trimera* também reduziram a expressão de IL-6, MCP-1 e IL-1 β nesse mesmo modelo citado (BURGOS et al., 2024), enquanto a *Baccharis dracunculifolia* inibiu a produção de IL-6 e IL-10 em macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS (BACHIEGA et al., 2013).

5.6 Fracionamento das frações selecionadas

Com base nos resultados obtidos nos testes biológicos, foi selecionada a fração diclorometânica (Dcm) de *C. cruciata* para dar prosseguimento ao estudo, visando isolar constituintes ativos. A fração Dcm de *B. stylosa*, embora não tenha demonstrado atividade contra o MHV-3, apresentou uma leve redução nos níveis de IL-6. Por outro lado, o extrato de *B. imbricata* mostrou uma atividade discreta contra o coronavírus murino e uma redução significativa nos níveis desta citocina. É importante destacar que a fração Dcm do extrato de *B. imbricata* foi utilizada pela autora em seu trabalho de mestrado.

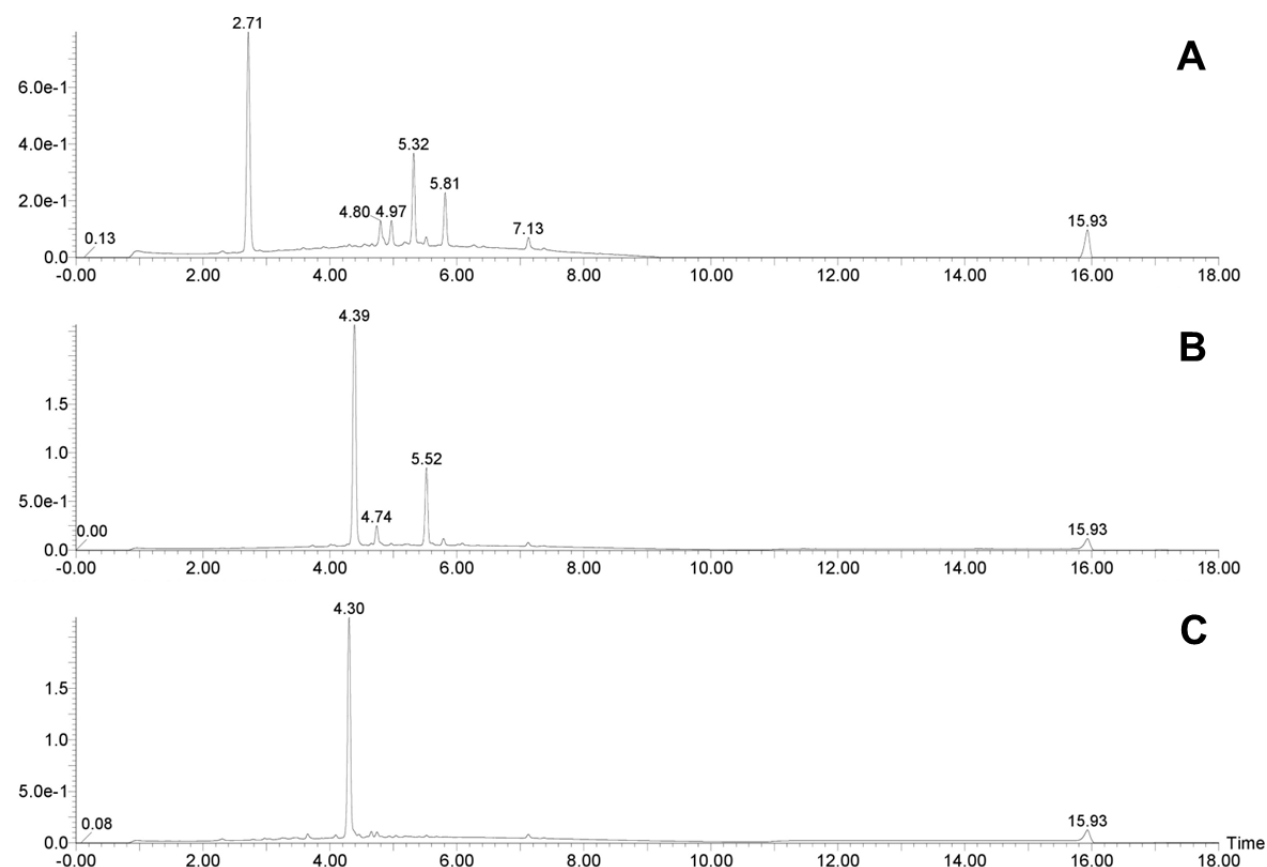
Portanto, além do fracionamento da Dcm de *C. cruciata*, serão descritos também os fracionamentos para as demais frações supracitadas (Dcm de *B. stylosa* e Dcm de *B. imbricata*), considerando que essas já foram previamente utilizadas pelo nosso grupo de pesquisa.

5.6.1 Fracionamento da fração Dcm de *C. cruciata* em coluna de sílica gel

O fracionamento da fração diclorometânica (Dcm) de *C. cruciata*, foi realizado em coluna aberta de sílica gel, conforme descrito na seção 4.8 da parte experimental.

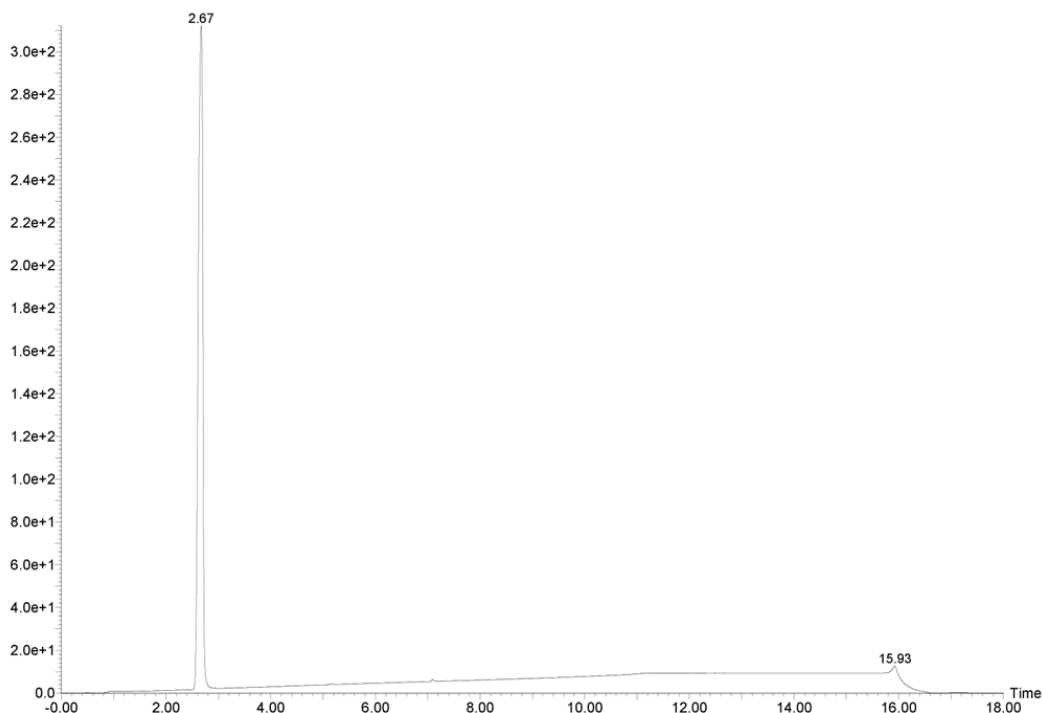
As frações foram reunidas de acordo com a semelhança do perfil cromatográfico em cromatografia de camada delgada (CCD). Três grupos de frações reunidas, Fr. 166-191, Fr. 220-247 e Fr. 255-279, que apresentaram massa considerável, foram selecionadas para um subsequente refracionamento e os perfis cromatográficos estão representados na **Figura 11**.

Figura 11 - Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para os grupos de frações Fr. 166-191 (A), Fr. 220-247 (B) e Fr. 255-279 (C), oriundas da fração Dcm de *C. cruciata* (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



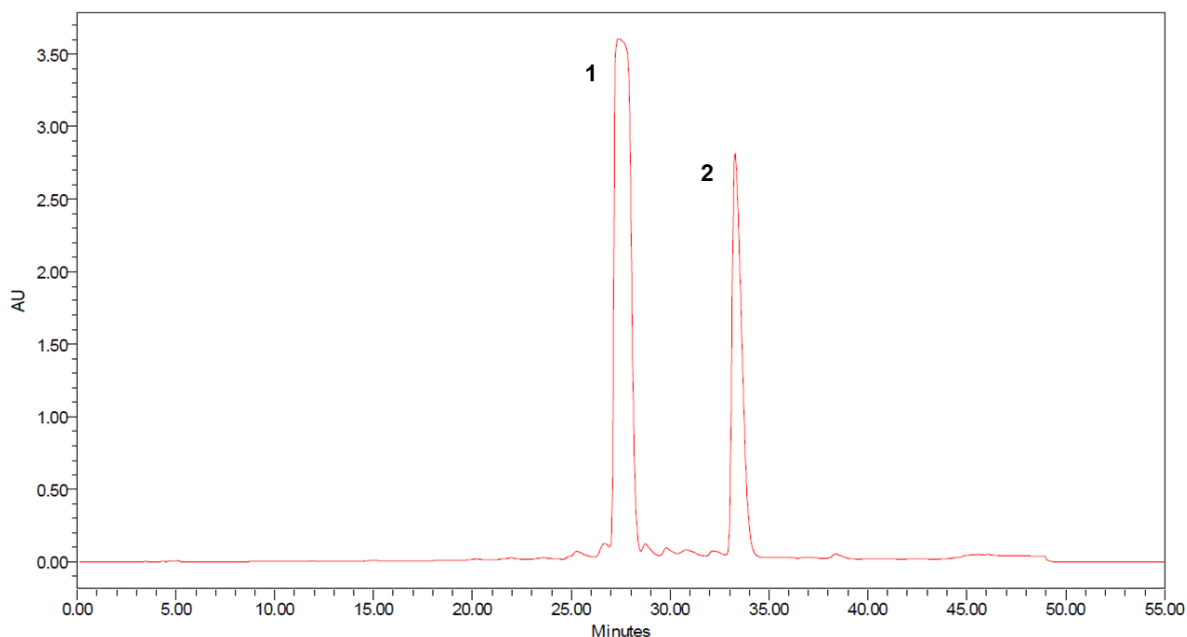
A fração Fr. 166-191 apresentou um pico majoritário com tempo de retenção de 2,71 minutos, e por isso foi purificada conforme descrito na seção 4.8.1, utilizando uma estratégia de solubilização diferencial em diclorometano, onde a substância de interesse apresentou baixa solubilidade no solvente empregado, em relação as impurezas mais lipofílicas. O perfil cromatográfico obtido para a substância isolada, ilustrado na **Figura 12**, permite afirmar que o processo de purificação foi eficiente, resultando na obtenção de um sólido branco, denominado PPT.

Figura 12 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD para PPT (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



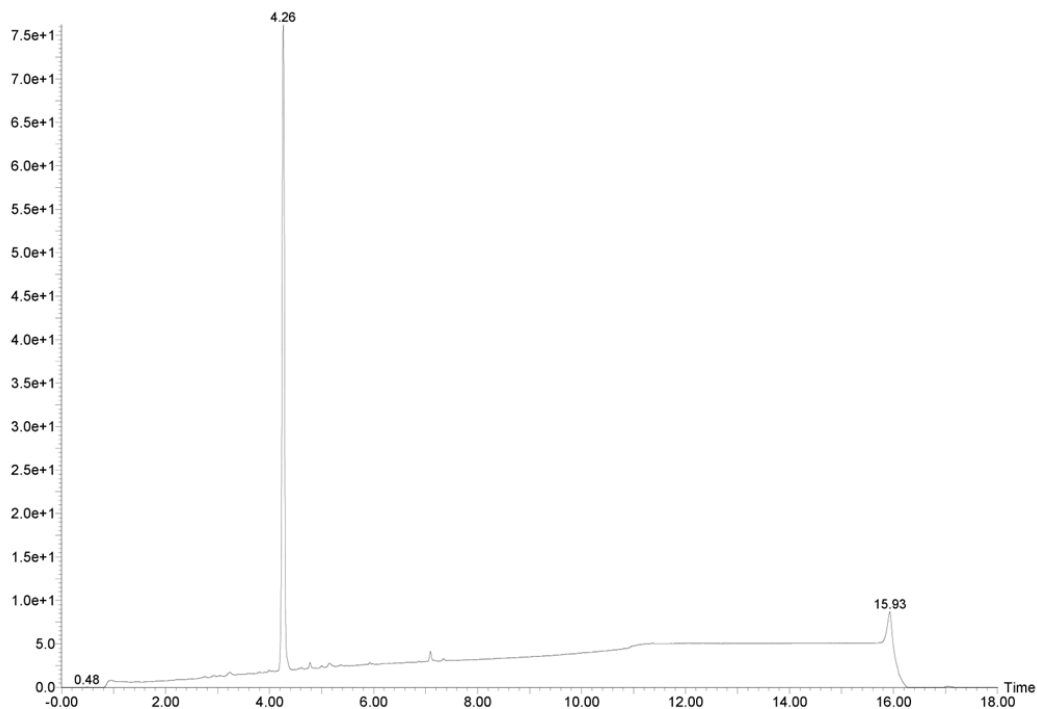
Para a Fr. 220-247, optou-se em realizar uma separação por RP-HPLC em escala preparativa. As condições cromatográficas foram otimizadas visando a separação de cada pico e para monitorar o processo de purificação foi utilizada detecção no UV em dois comprimentos de onda distintos, 225 e 254 nm. O cromatograma obtido está representado na **Figura 13**. Após as injeções, as frações foram coletadas, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório e a água residual foi eliminada em liofilizador. Foram obtidas duas frações principais denominadas ClITr27,5 (pico 1; 94,6 mg; 47,6% m/m) e ClITr33,2 (pico 2; 17,3 mg; 8,7% m/m).

Figura 13 - Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC em escala preparativa para o fracionamento de Fr. 220-247 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.8.2)



Por sua vez, o grupo de frações Fr. 255-279 foi purificado em coluna de sílica gel, conforme descrito na seção 4.8.3. As frações obtidas também foram reunidas por semelhança de perfis cromatográficos em CCD. A fração denominada F.63 foi analisada por UPLC-DAD-ESI-MS e apresentou um perfil cromatográfico com um pico majoritário em 4,25 minutos, conforme a **Figura 14**.

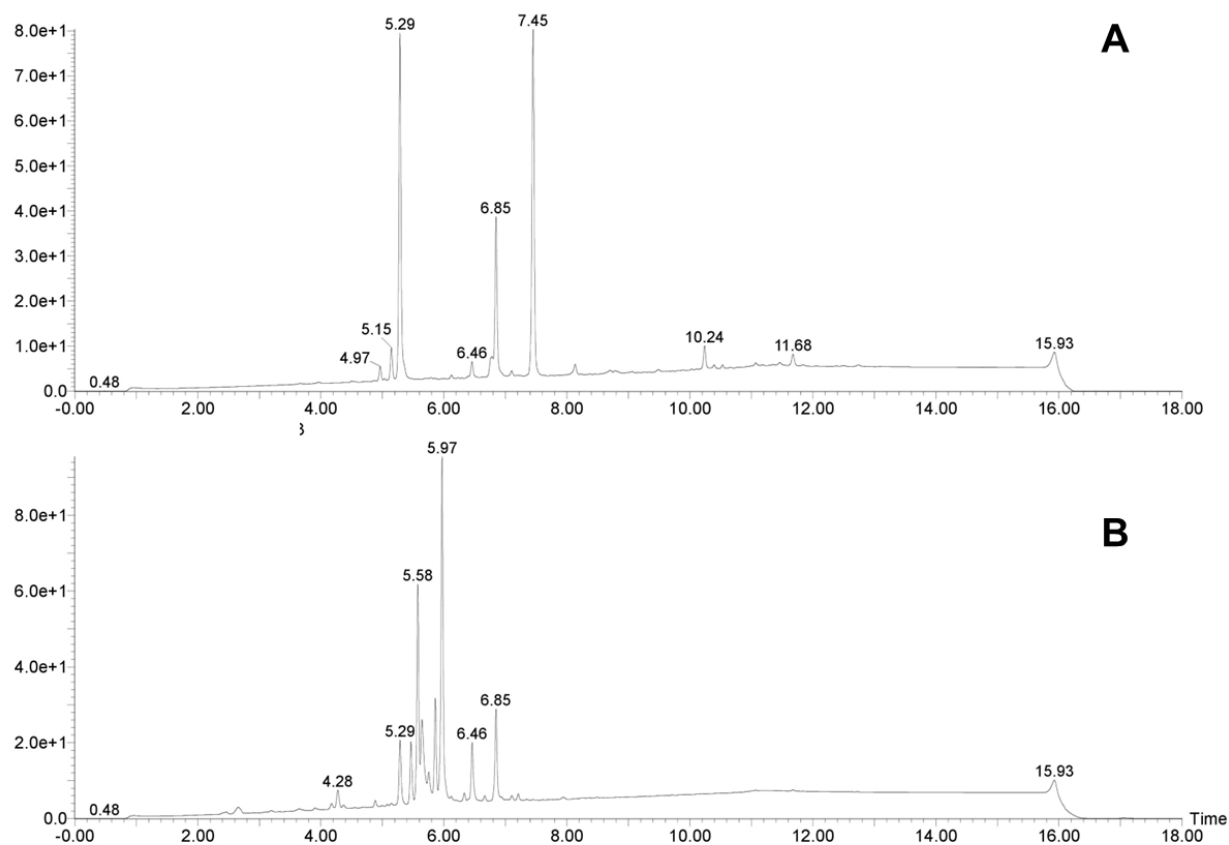
Figura 14 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD de F.63 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



5.6.2 Fracionamento da fração Dcm de *B. stylosa*

O fracionamento da fração diclorometânica (Dcm) de *B. stylosa* foi realizado em coluna de sílica gel, conforme descrito na seção 4.9 da parte experimental. A reunião das frações foi feita com base na semelhança do perfil cromatográfico em CCD de sílica gel. Dois grupos de frações principais, Fr. 173-189 e Fr. 245 -303, foram selecionados para um subsequente fracionamento e os perfis cromatográficos estão representados na **Figura 15**. Para a seleção, foi considerada não só a massa (mg), mas também a complexidade da composição das frações, analisadas em UPLC-DAD-ESI-MS.

Figura 15 - Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para os grupos de frações reunidas Fr. 173-189 (A) e Fr. 245-303 (B) (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



Posteriormente, essas frações foram purificadas por RP-HPLC em escala preparativa. Os cromatogramas obtidos estão representados na **Figura 16**. Após as injeções, as frações foram coletadas, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório e a água residual foi eliminada em liofilizador. Foram obtidas as seguintes frações: S1 (Tr 32,7 min; 5,9 mg), S2 (Tr 39,4 min; 2,6 mg), S3 (Tr 42,3 min; 3,9 mg) e S4 (Tr 47,0 min; 10,7 mg), derivadas de Fr. 173-189; e Y1 (Tr 25,7 min; 2,6 mg), Y2 (Tr 27,6 min; 3,9 mg), Y3 (Tr 31,4 min; 8,2 mg), Y4 (Tr 39,7 min; 1,8 mg) e Y5 (Tr 45,8 min; 4,1 mg), derivadas de Fr. 245-303. Em seguida, essas foram analisadas em UPLC-DAD-ESI-MS e verificou-se que algumas possuíam mais de uma substância, normalmente de características semelhantes. A fração S2 apresentou um pico majoritário em 6,78 minutos e, por isso, foi selecionada para a elucidação estrutural (**Figura 17**).

Figura 16 - Perfil cromatográfico obtido por RP-HPLC em escala preparativa para o fracionamento dos grupos de frações reunidas Fr. 173-189 (A) e Fr. 245-303 (B) (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.9.1)

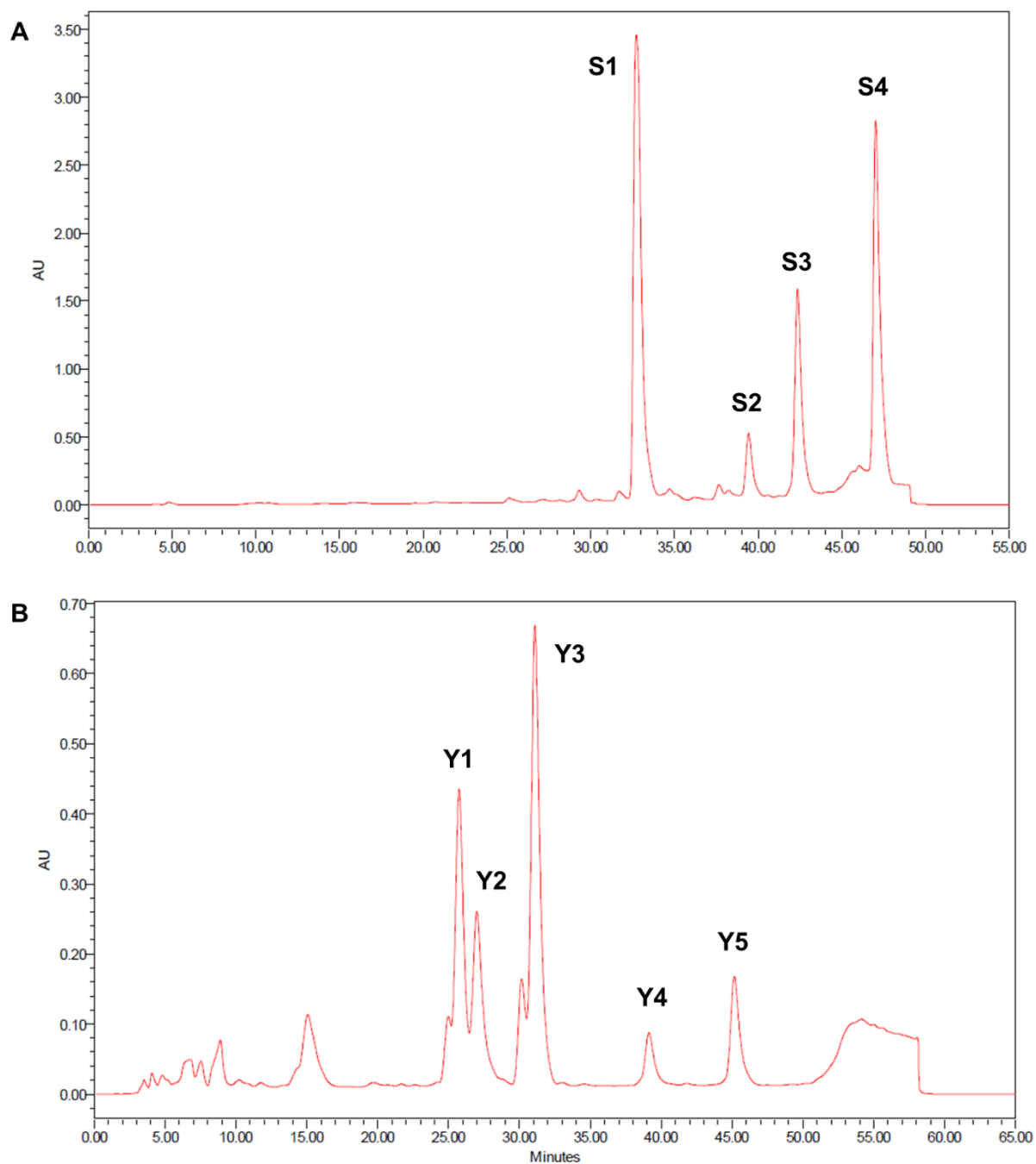
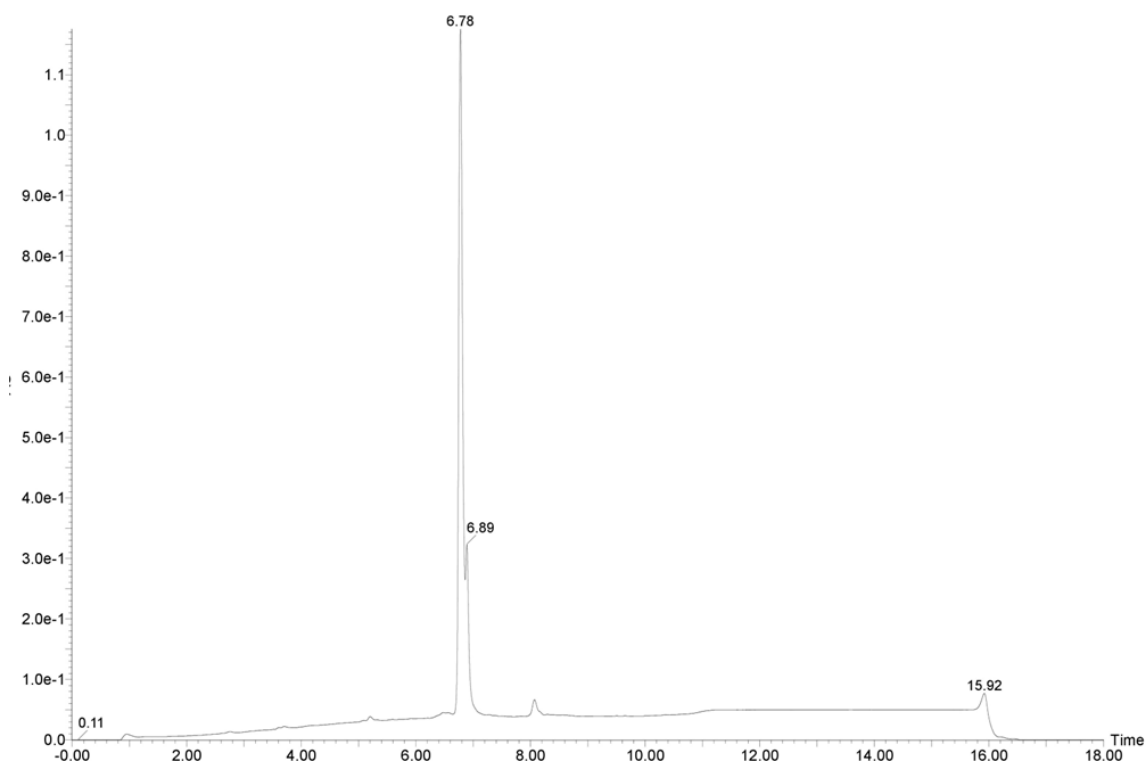


Figura 17 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD para S2 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



5.6.3 Fracionamento da fração DCM1 de *B. stylosa*

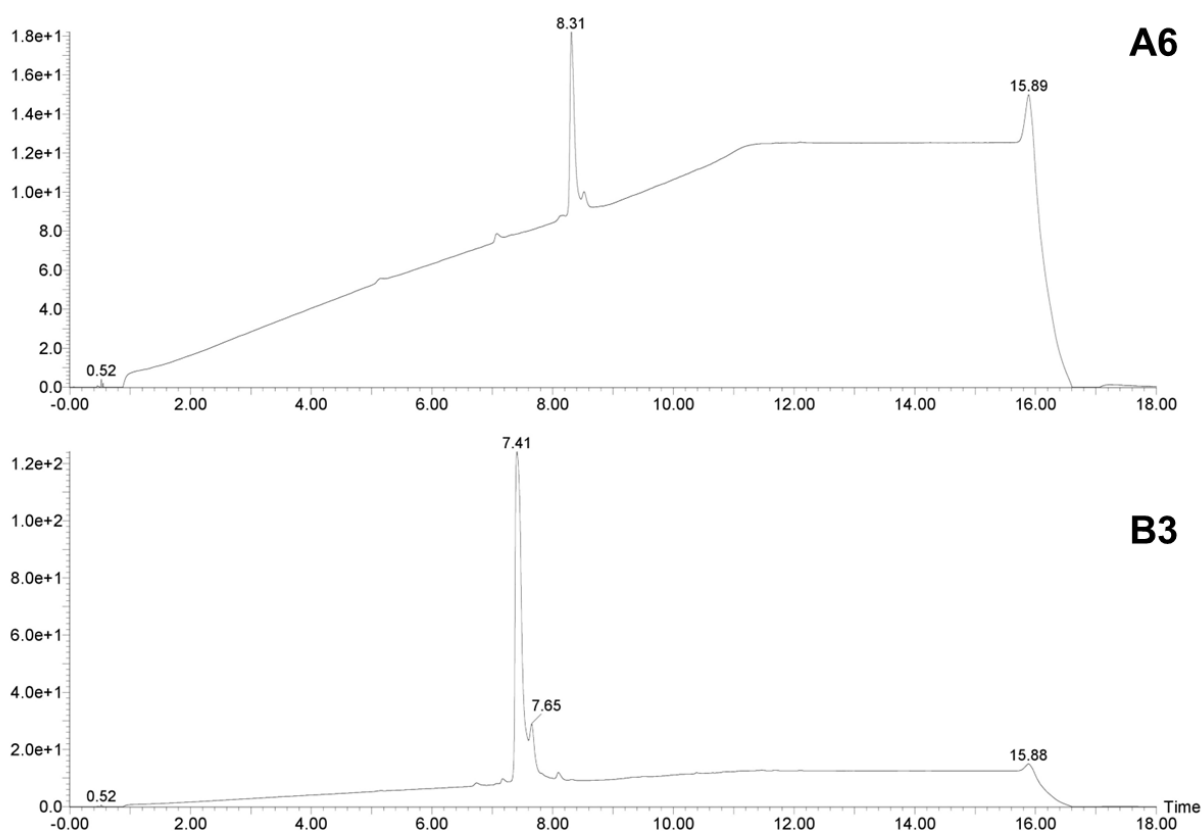
É importante ressaltar ainda que, anteriormente, a aluna de iniciação científica Ana Clara Rabelo, na elaboração do seu Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), havia realizado um subsequente fracionamento da fração Dcm de *B. stylosa*, com extração por solução alcalina, a fim de separar compostos com caráter ácido, principalmente fenólicos, dos demais compostos presentes (seção 4.7, Parte Experimental).

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

posterior acidificação, as agliconas voltam a sua forma não-ionizada e podem ser extraídas com solvente lipofílicos imiscíveis em água.

Assim, duas frações foram obtidas, a DCM 1, que corresponde aos compostos que não se desprotonaram em meio básico, e a DCM 2, enriquecida em compostos fenólicos, no caso, principalmente os flavonoides. Em seguida, foi realizado um fracionamento da DCM 1 através de uma filtração em funil sinterizado e posterior purificação por RP-HPLC das frações selecionadas, obtendo-se assim duas frações, denominadas A6 e B3 (**Figura 18**).

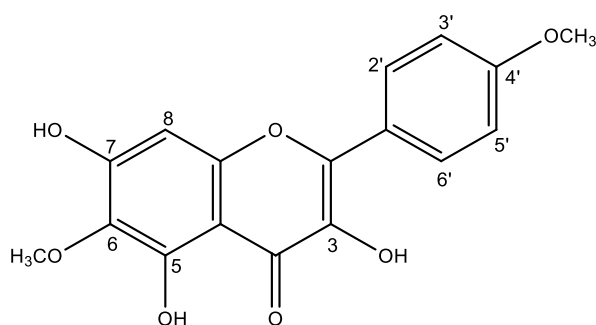
Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para as frações A6 e B3
(Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



5.6.4 Fracionamento da fração Dcm de *B. imbricata*

O fracionamento por extração em meio alcalino foi realizado pela autora, durante o seu mestrado, com a fração diclorometânica (Dcm) de *B. imbricata*. Dessa forma, foram também obtidas as frações DCM1 e DCM2 (seção 4.7, Parte

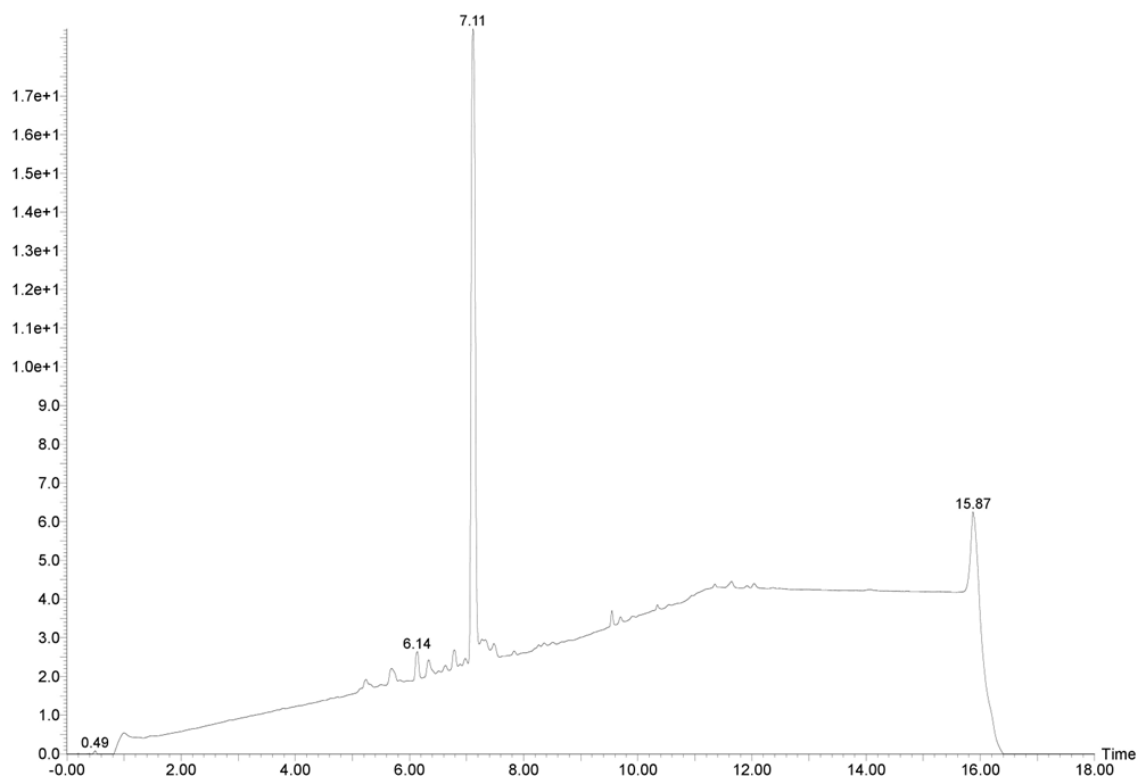
Experimental). Do fracionamento de DCM2 por RP-HPLC em escala preparativa obteve-se o betuletol (**64**), um flavonol dimetilado (RABELO, 2020).



(64) betuletol

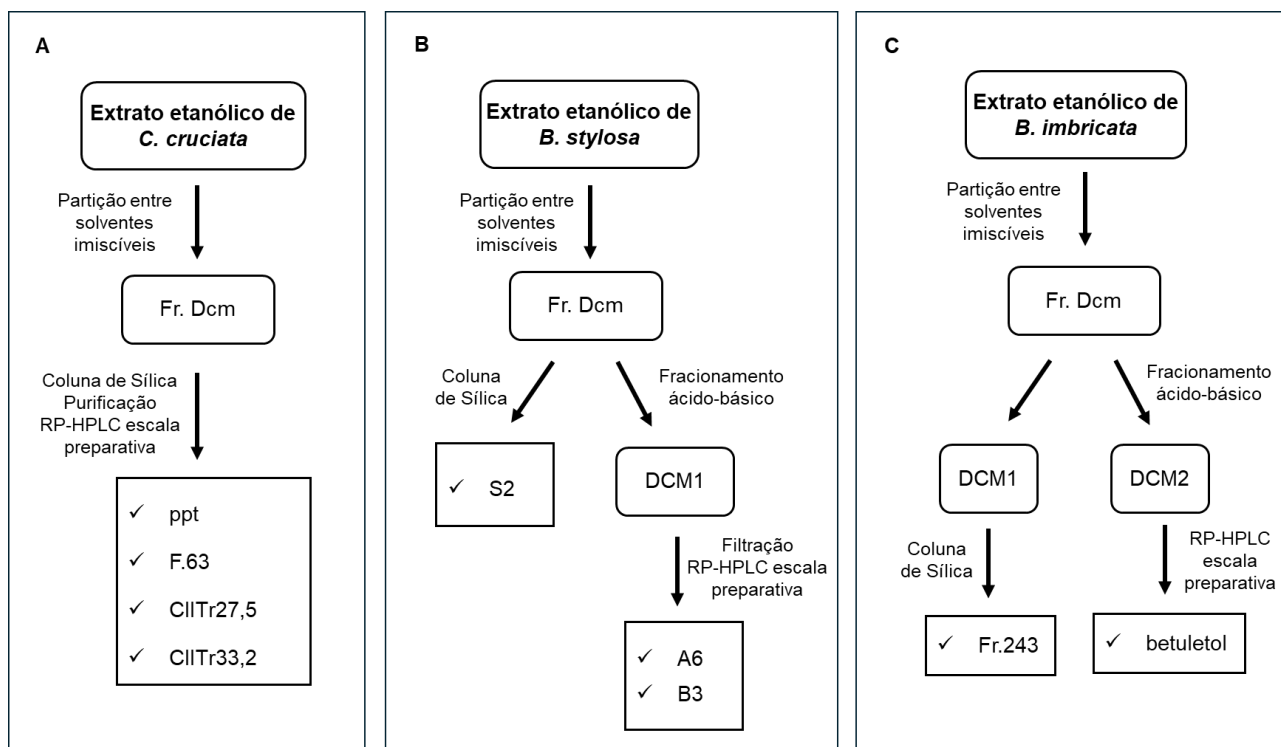
Posteriormente, a fração DCM 1 foi submetida a fracionamento em coluna de sílica gel, conforme descrito na seção 4.10 da Parte Experimental. A análise por UPLC-ESI-MS demonstrou que o grupo de frações reunidas Fr.240-243 apresentou perfil cromatográfico com um pico majoritário em 7,12 minutos (**Figura 19**).

Figura 19 - Perfil cromatográfico obtido por UPLC-DAD para o grupo de frações reunidas Fr.240-243 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



A **Figura 20** mostra três fluxogramas, resumindo dos fracionamentos realizados com cada espécie.

Figura 20 - Fluxogramas dos fracionamentos de *C. cruciata* (A), *B. stylosa* (B) e *B. imbricata* (C)



5.7 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

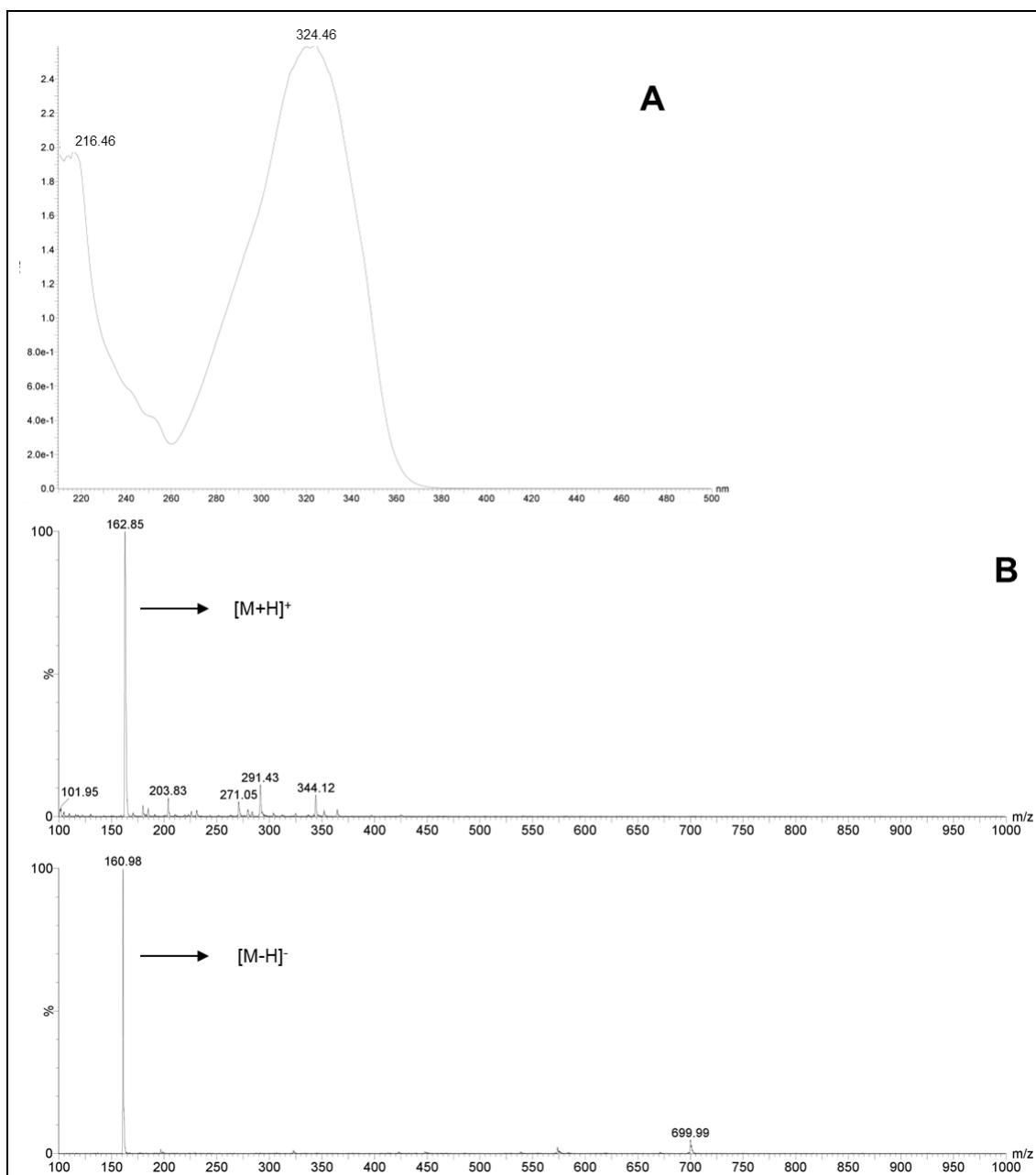
Foram obtidas quatro substâncias de *C. cruciata* (PPT, F.63, CIITr27,5 e CIITr32,2), três substâncias de *B. stylosa* (S2, A6 e B3) e uma substância de *B. imbricata* (Fr. 243). Essas substâncias foram analisadas por UPLC-DAD-ESI-MS, e foram obtidos os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , assim como os mapas de contorno bidimensionais COSY, HSQC, HMBC e NOESY. A elucidação estrutural será descrita a seguir.

5.7.1 Elucidação estrutural de PPT isolado de *C. cruciata*

Foi obtido um sólido branco e o espectro de absorção no UV registrado para PPT indicou $\lambda_{\text{máx}}$ em 219 e 323 nm, sugerindo se tratar de uma substância aromática. Os espectros de massas apresentaram um íon em m/z 163 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e em m/z 161 $[\text{M}-$

H⁻. Os espectros de massas e de absorção no UV da substância purificada estão representados na **Figura 21**.

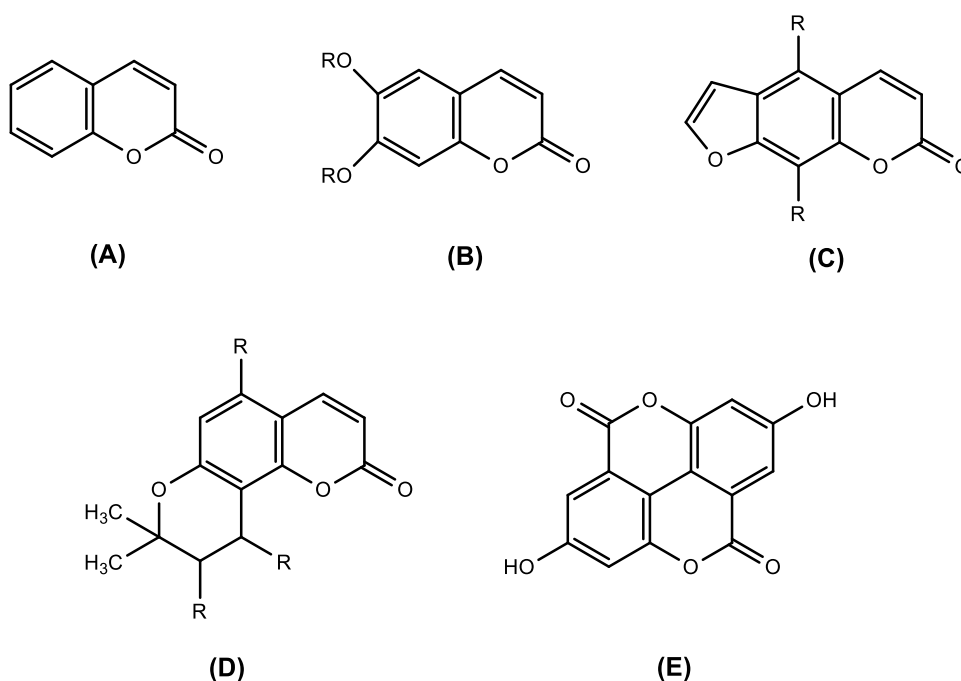
Figura 21 - Espectro no UV (A) e espectros de massas (ESI⁺ e ESI⁻) (B) obtidos para PPT
(Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



A comparação com dados da literatura, permitiu inferir que a substância pertence a classe das cumarinas, que podem ser classificadas em não substituídas; hidroxi-, metoxi (alcoxi)- e metileno-di-hidroxi-cumarinas e seus glicosídeos;

furanocumarinas, piranocumarinas e 3,4-benzocumarinas (LOZHKIN; SAKANYAN, 2006). Os esqueletos das estruturas dos tipos de cumarinas estão representados na **Figura 22**.

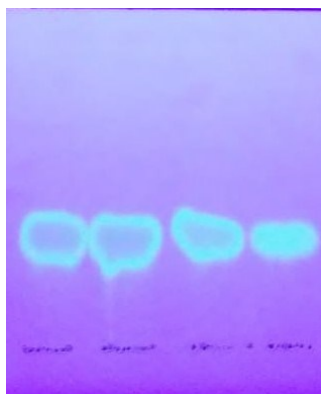
Figura 22 - Esqueletos carbônicos das classes de cumarinas



Cumarinas não substituídas (A); hidroxi- ou metoxi-cumarinas (B); furanocumarinas (C); piranocumarinas (D) e 3,4-benzocumarinas (E)

Os dados do espectro de massas sugerem que PPT é uma hidroxi-cumarina, uma vez que a massa molar obtida é de 162 Da. Além disso, foi feita uma análise por CCD em sílica gel 60 F₂₅₄, e a detecção no comprimento de onda de 365 nm demonstrou uma mancha de fluorescência azul (**Figura 23**). Segundo (WAGNER; BLADT, 1996), cumarinas simples apresentam fluorescência azul ou azul esverdeada intensa em 365 nm, enquanto as furano e piranocumarinas apresentam fluorescência amarela, marrom, azul ou azul esverdeada nesse mesmo comprimento de onda. Considerando a massa molar, pode-se inferir que se trata de uma cumarina simples.

Figura 23 - Perfil cromatográfico obtido por CCD de sílica gel F₂₅₄ para o sólido PPT (Condições cromatográficas: eluente diclorometano/acetato (8:2); detecção UV-365 nm)



O espectro de RMN de ^{13}C indicou sinais de ressonância de 9 carbonos e, a partir do sub-espectro DEPT 135, foi possível determinar um sinal em δC 162,0 ppm, característico de carbonila, três carbonos quaternários (δC 161,0; 156,9 e 112,8 ppm) e cinco grupos metínicos (δC 144,6; 130,4; 113,7; 112,7 e 103,2 ppm) (**Figuras 24 e 25**).

Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C de PPT (Acetona- d_6 ; 100 MHz)

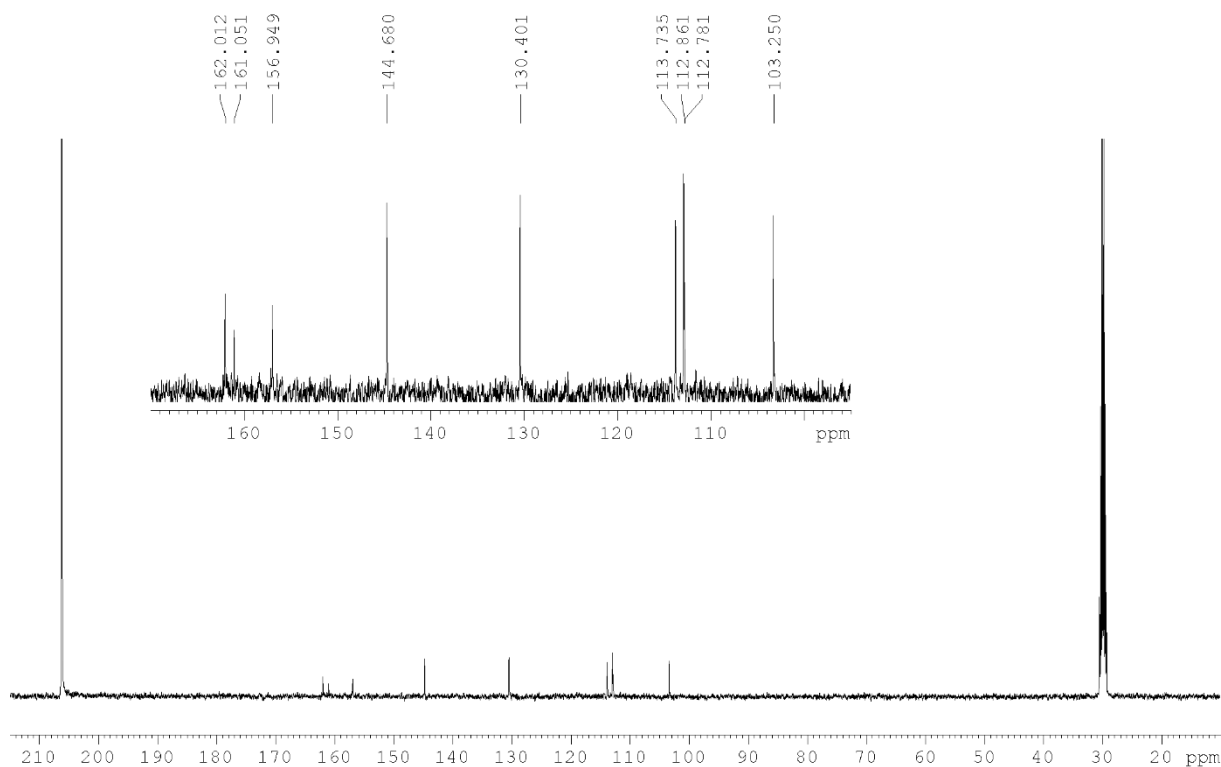
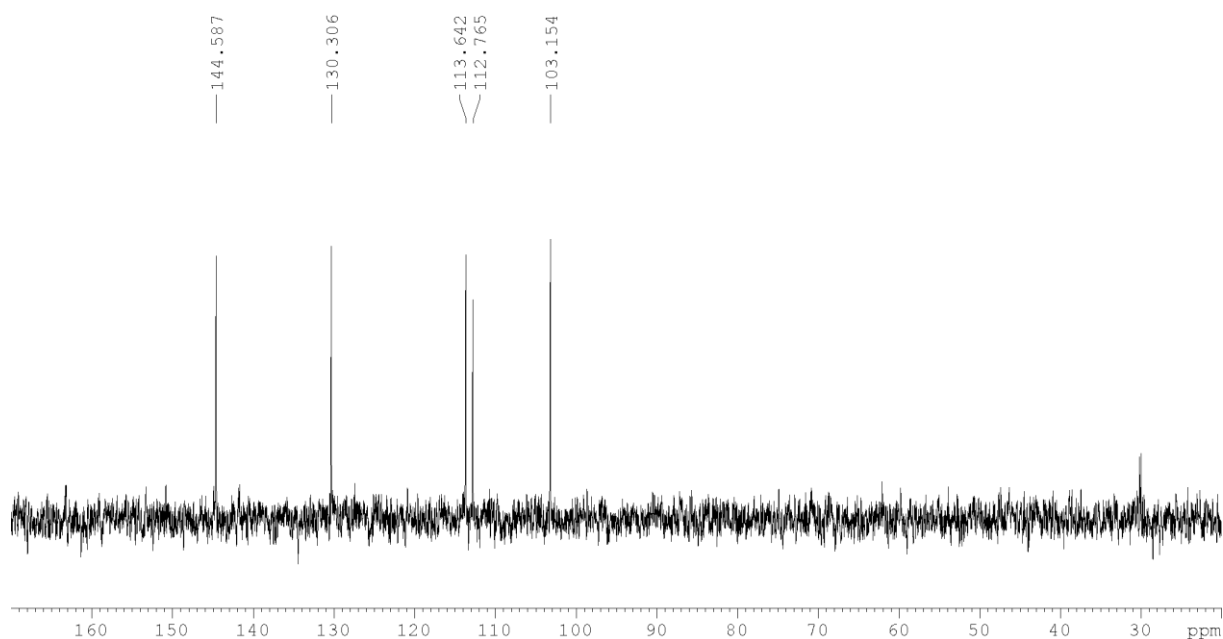
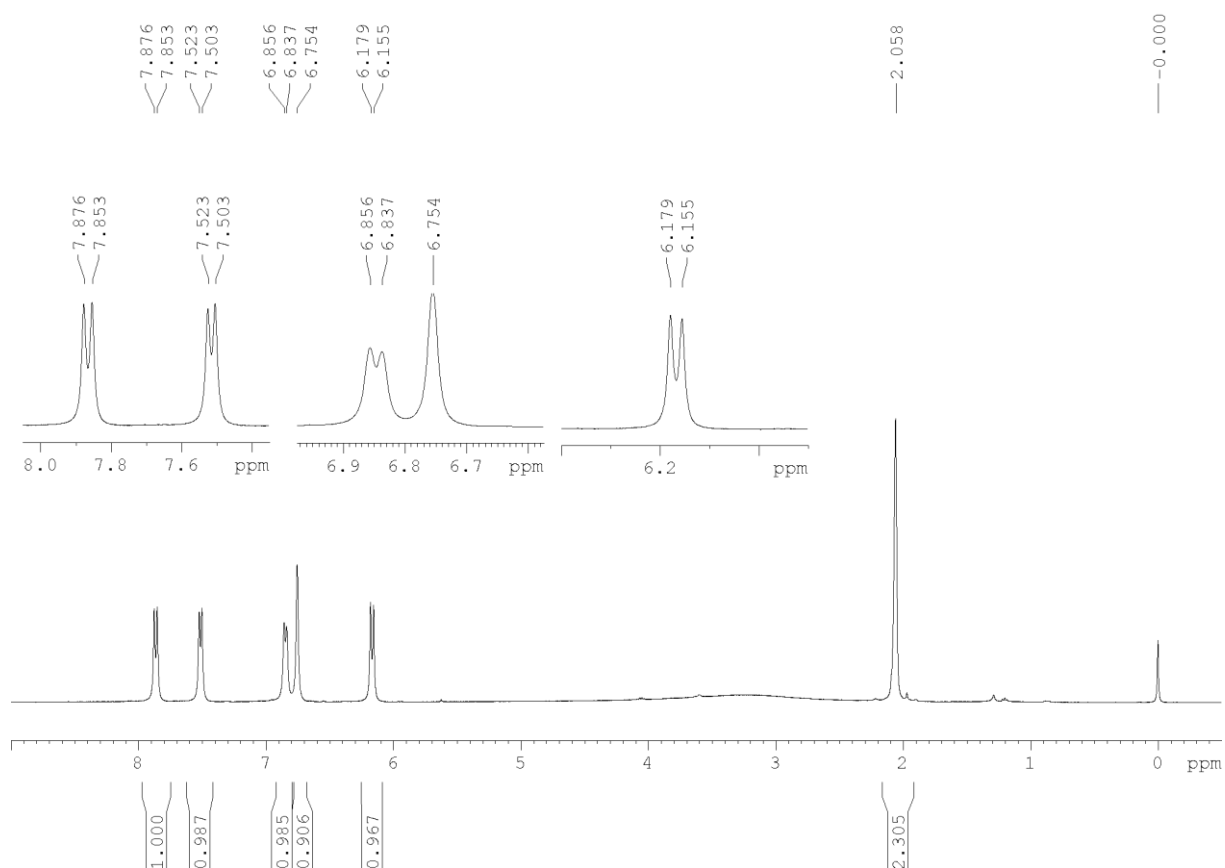


Figura 25 - Sub-espectro de DEPT-135 de PPT (Acetona-d₆; 100 MHz)



Correlacionando esses dados com os obtidos pelo espectro de massas, pode-se dizer que a massa molar é compatível com a fórmula molecular $C_9H_6O_3$.

No espectro de RMN de 1H (**Figura 26**), foi possível observar cinco sinais, sendo quatro dupletos (δH 7,86; 7,51; 6,84 e 6,17 ppm) e um simpleto (δH 6,75 ppm), correspondentes a um hidrogênio cada. Dessa forma, pode-se inferir que a hidroxila está na posição 6 ou 7 do núcleo cumarínico.

Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H de PPT (Acetona- d_6 ; 400 Mhz)

Não foram obtidos os experimentos bidimensionais COSY, HSQC e HMBC, por se tratar de uma substância já descrita na literatura. Através da comparação entre os dados apresentados por (OMI; FUKAI; FURUMOTO, 2020), PPT foi identificado com a 7-hidroxycumarina **(65)**, também denominada de umbeliferona. Os valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C estão dispostos na **Tabela 20**.

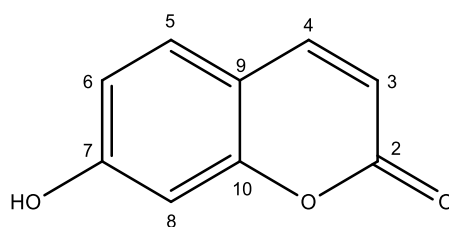
**(65)** umbeliferona

Tabela 20 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para PPT (δ em ppm, Acetona- d_6 ; 400 MHz) e comparação com os dados da literatura para umbeliferona

PPT			Umbeliferona*	
Posição	δH (J em Hz)	δC	δH (J em Hz)	δC
2	-	162,0	-	161,0
3	6,17; d (9,4)	112,7	6,15; d (9,6)	112,9
4	7,86; d (9,4)	144,6	7,85; d (9,6)	144,7
5	7,51; d (8,2)	130,4	7,50; d (8,4)	130,4
6	6,84; d (8,2)	113,7	6,83; dd (8,4, 2,4)	113,7
7	-	161,0	-	162,0
8	6,75; s	103,2	6,74; d (2,4)	103,3
9	-	112,8	-	112,8
10	-	156,9	-	157,0
7-OH	-	-	9,51	-

d: duplete; dd: duplete duplo; s: simpleto

*Omi, Fukai e Furumoto (2020). RMNde ^1H – 600 MHz, Acetona- d_6 , RMN de ^{13}C 150 MHz, Acetona- d_6)

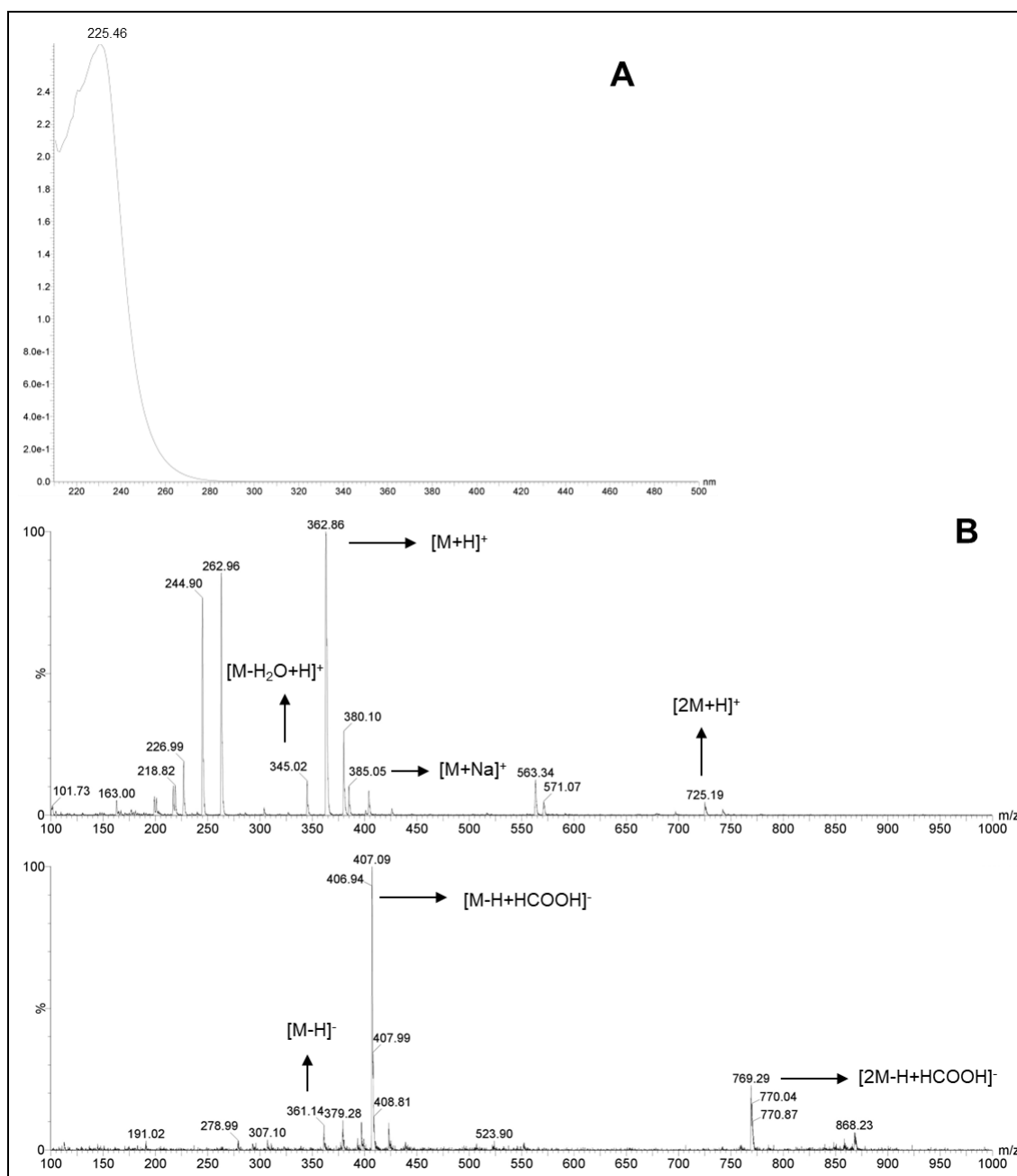
A umbeliferona é comumente encontrada em diversas espécies das famílias Apiaceae (Umbelliferae), Asteraceae e Rutaceae (MAZIMBA, 2017), mas esta é a primeira descrição de sua ocorrência em *C. cruciata*. Diversas propriedades farmacológicas já foram relatadas para essa substância, dentre elas as atividades antioxidante, anti-hiperglicêmica, antitumoral, anti-inflamatória, anti-hiperlipidêmica e imunomoduladora (CRUZ et al., 2020).

5.7.2 Elucidação estrutural de F.63 isolado de *C. cruciata*

Foi obtido um sólido branco cristalino. O espectro de absorção no UV de F.63 apresentou $\lambda_{\text{máx}}$ de 225 nm e os espectros de massas apresentaram íons em m/z 725

$[2M+H]^+$, 385 $[M+Na]^+$, 363 $[M+H]^+$, 345 $[M-H_2O+H]^+$ e em m/z 769 $[2M+HCOOH-H]^-$, 407 $[M+HCOOH-H]^-$ e 361 $[M-H]^-$ e, conforme demonstrado na **Figura 27**, sugerindo a massa molar de 362 Da para a substância.

Figura 27 - Espectro no UV (A) e o espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de F.63 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



Observando o máximo de absorção no UV e a massa molecular da substância, pode-se inferir que pertence a classe dos terpenos.

O espectro de RMN de ^{13}C indicou sinais de ressonância de 20 carbonos e, a partir do sub-espectro DEPT 135 e do mapa de contornos HSQC, foi possível determinar dois sinais de carbonila (δC 169,2 e 166,3 ppm), quatro carbonos quaternários (δC 141,0; 137,0; 126,6 e 57,1 ppm) e três grupos metilênicos (δC 125,3; 43, 1 e 34,4 ppm) (**Figura 28 e 29**). Os sinais na região entre 60 e 80 ppm indicam a presença de carbonos ligados à átomos de oxigênio, enquanto os sinais na região de 100 a 150 ppm são característicos de carbonos com hibridização sp^2 .

Figura 28 - Espectro de RMN de ^{13}C de F.63 (CDCl_3 ; 150 MHz)

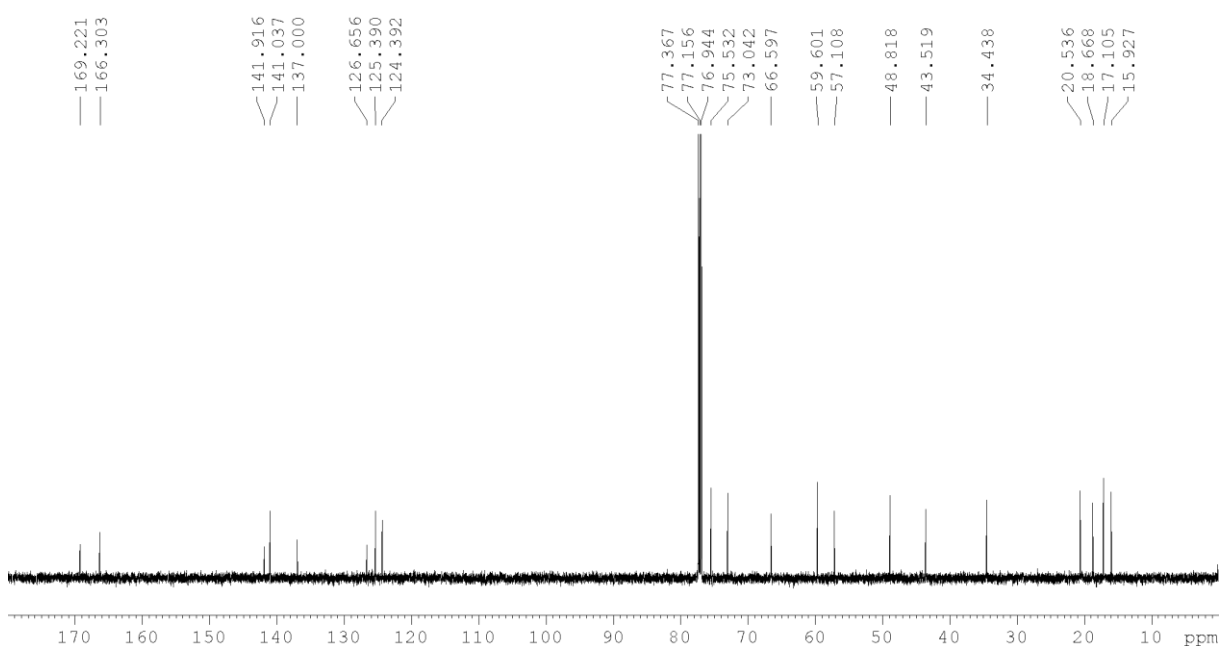
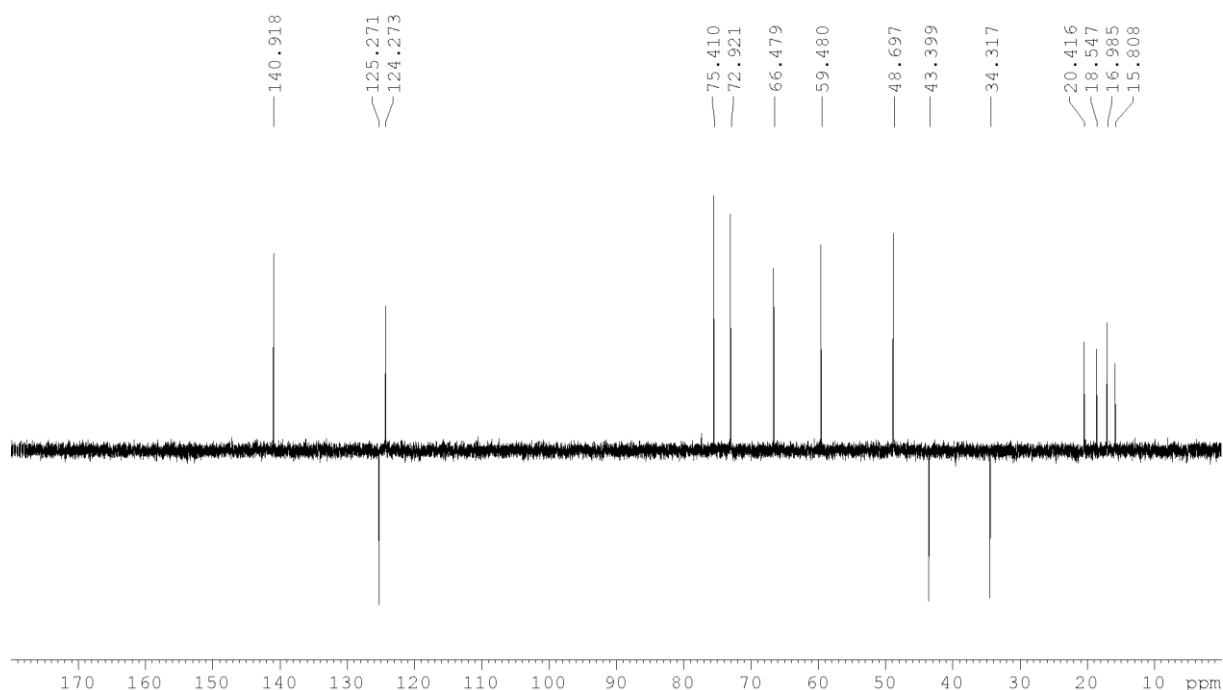
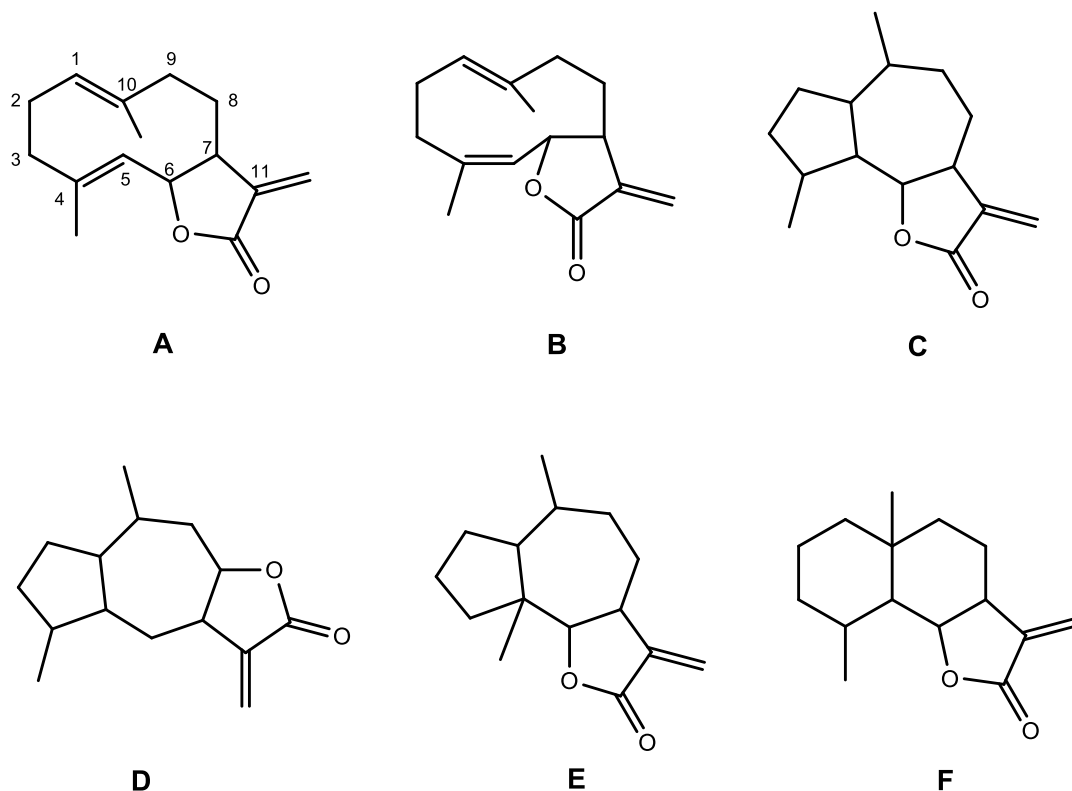


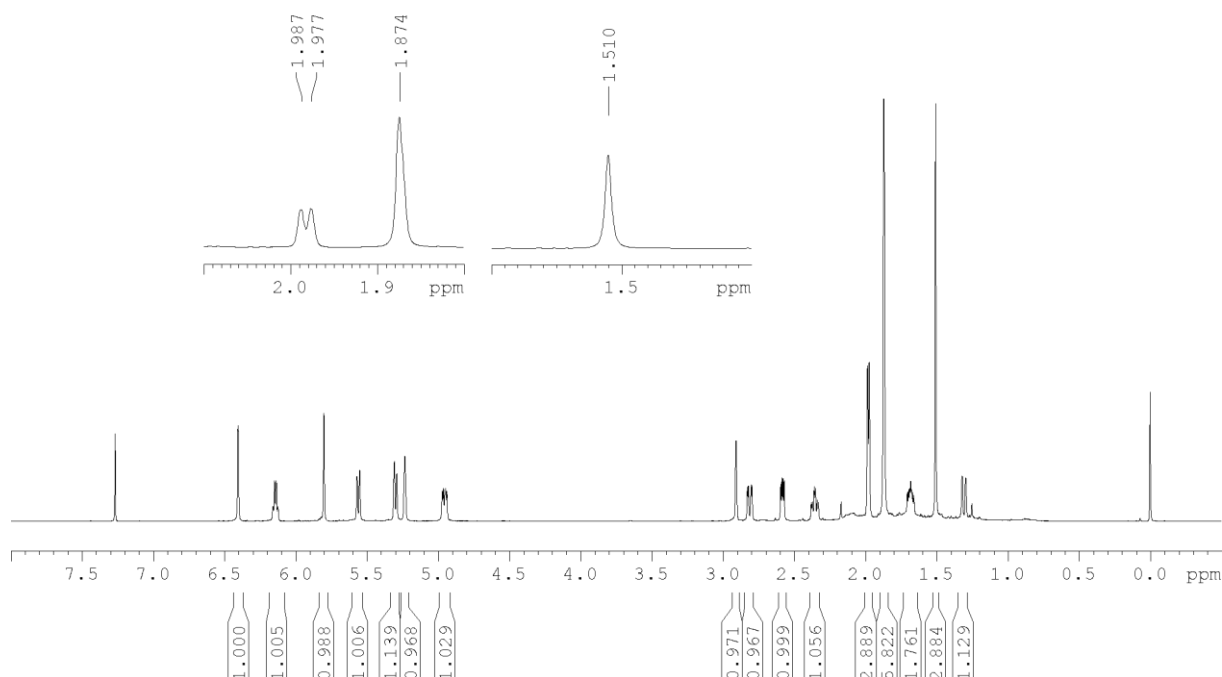
Figura 29 - Sub-espectro de DEPT-135 de F.63 (CDCl₃; 150 MHz)

Esses dados espectrais são compatíveis com um diterpeno ou uma lactona sesquiterpênica prenilada. Verificando os dados da literatura sobre a composição fitoquímica da tribo Eupatorieae e da subtribo Disynaphiinae, na qual está incluído o gênero *Campovassouria*, observou-se que os sesquiterpenos são a classe de constituintes predominante (DA COSTA; TERFLOTH; GASTEIGER, 2005; DE SOUZA et al., 2021; ZHANG et al., 2008). Além disso, conforme citado anteriormente, (BOHLMANN et al., 1983) isolaram, das partes aéreas de *C. cruciata*, heliangolídeos, germacrolídeos e guaianolídeos, que são tipos de lactonas sesquiterpênicas. Lactonas sesquiterpênicas são metabólitos secundários, provenientes da via do mevalonato, que sofrem ciclizações e subseqüentes modificações oxidativas, resultando em uma série de esqueletos carbocíclicos conhecidos como germacrolídeos, heliangolídeos, guaianolídeos e eudesmanolídeos, entre outros (RODRIGUEZ; TOWERS; MFTCHEU, 1976). A **Figura 30** representa os esqueletos de alguns desses tipos de estruturas.

Figura 30 - Esqueletos de alguns tipos de lactonas sesquiterpênicas

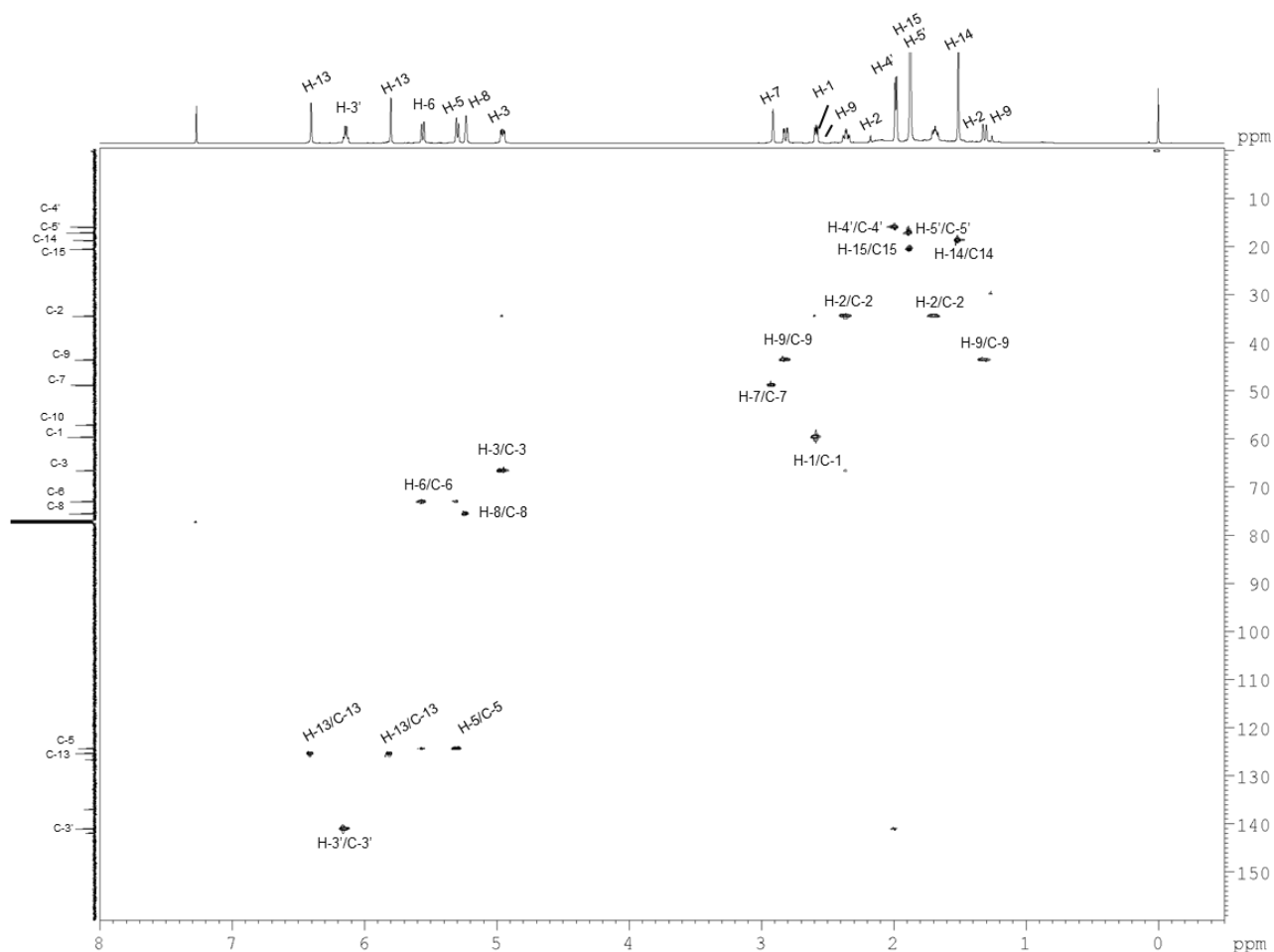
Germacranolídeos (**A**); heliangolídeos (**B**); guaianolídeos (**C** e **D**); pseudoguaianolídeos (**E**); eudesmanolídeos (**F**)

A análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 31**) revelou a presença de um simpleto (δH 1,51 ppm) e de um duplete (δH 1,98 ppm), correspondentes a três hidrogênios cada, bem como de um simpleto (δH 1,87 ppm), correspondente a seis hidrogênios, demonstrando assim a presença de quatro grupos metílicos. Esses achados estão em consonância com o observado no espectro de RMN de ^{13}C e no subespectro DEPT-135.

Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H de F.63 (CDCl_3 ; 600 Mhz)

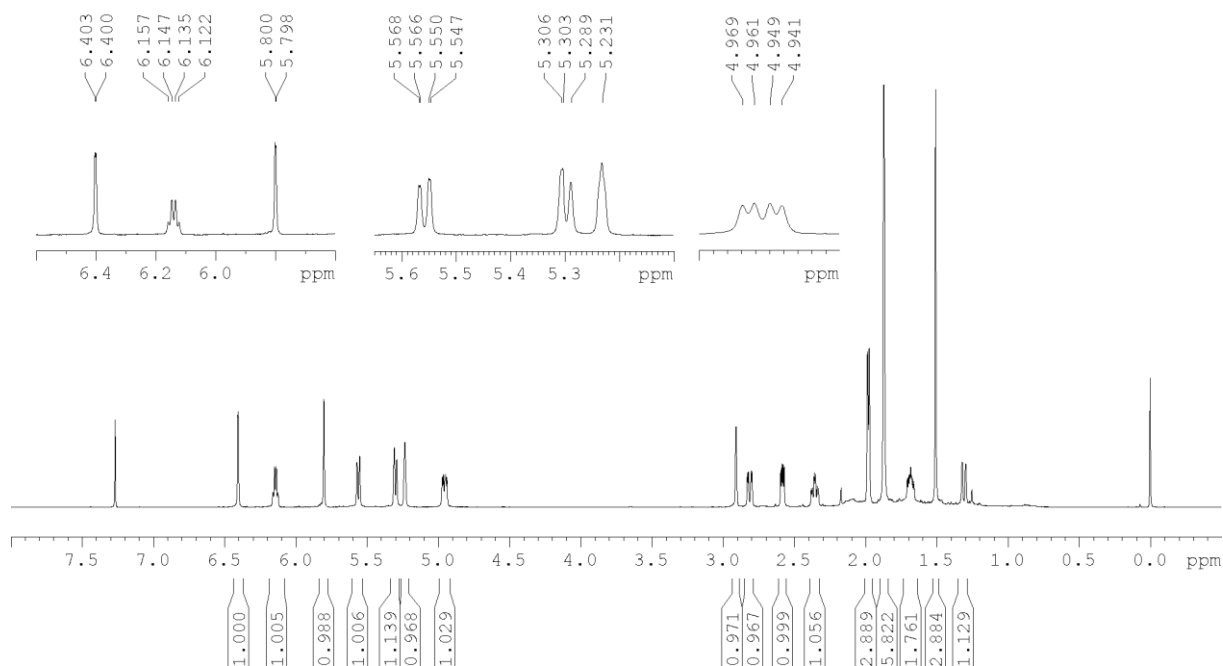
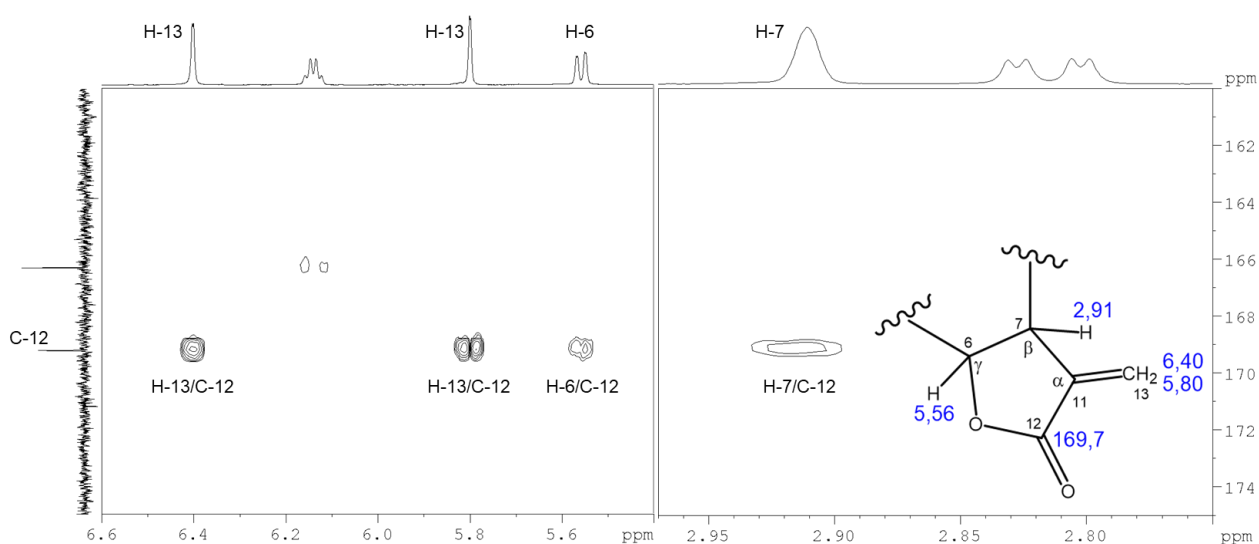
Com base nas informações descritas anteriormente, é possível afirmar que a molécula é composta por sete grupos metínicos (δH 6,14; 5,56; 5,30; 5,23; 4,95; 2,91 e 2,58 ppm). Correlacionando esses dados com os obtidos no espectro de massas, pode-se dizer que a massa molar de 362 Da é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$.

A análise do mapa de contornos HSQC (**Figura 32**) indicou a correlação dos sinais dos hidrogênios metilênicos em δH 5,80 e 6,40 ppm com o sinal do carbono em δC 125,3 ppm (C-13), enquanto os sinais dos hidrogênios metínicos δH 6,14 e 5,30 ppm apresentaram correlação com as ressonâncias dos carbonos em δC 141,0 (C-3') e 124,3 (C-5) ppm, respectivamente. Para o sinal do hidrogênio em δH 4,95 ppm observou-se uma correlação com o sinal do carbono em δC 66,5 ppm (C-3), deslocamento característico de ligação C-O, assim como os hidrogênios metínicos em δH 2,58 e 5,56 ppm, que apresentaram correlação com os sinais dos carbonos em δC 59,6 (C-1) e 73,0 (C-6) ppm, respectivamente. As demais correlações observadas estão descritas na **Figura 32**.

Figura 32 - Mapa de contornos HSQC de F.63 (CDCl₃)

As estruturas dos esqueletos das lactonas sesquiterpênicas representadas na **Figura 30** (pág. 113) apresentam uma dupla ligação adjacente à carbonila, ou seja, um grupo α -metileno- γ -lactona.

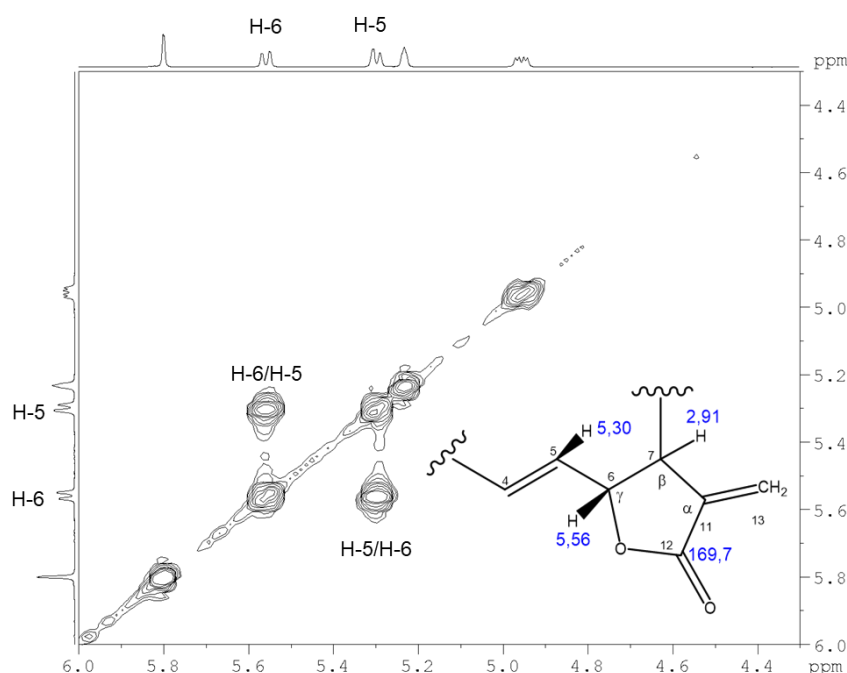
No espectro de RMN de ^1H de F.63 (**Figura 33**) observa-se dois dupletos centrados em δH 5,80 e 6,40 ppm (H-13), com constantes de acoplamento de 2,0 Hz, indicativos da presença dos hidrogênios metilênicos de uma ligação dupla terminal. Adicionalmente, a análise do mapa de contornos HMBC (**Figura 34**) indicou correlações entre o sinal do carbono em δC 169,2 ppm (C-12) com esses hidrogênios metilênicos, confirmando a presença do grupo α -metileno- γ -lactona. Além disso, no HMBC verifica-se também a correlação entre o sinal da carbonila da lactona δC 169,7 ppm com os sinais dos prótons em δH 5,56 (H-6) e 2,91 (H-7) ppm, indicando que esses correspondem aos grupos metínicos, nas posições γ e β , respectivamente.

Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H de F.63 (CDCl_3 ; 600 Mhz)**Figura 34** - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de F.63 (CDCl_3)

Os esqueletos de sesquiterpenos (**Figura 30**, pág. 113) dos tipos germacrolídeos (A) e heliangolídeos (B) apresentam uma dupla ligação entre os carbonos C-4 e C-5, que não estão presentes nos gaianolídeos (C e D), nos pseudoguaianolídeos (E) e nos eudesmanolídeos (F). No espectro de RMN de ^1H , o sinal em δH 5,30 ppm (H-5) possui deslocamento químico característico de hidrogênio

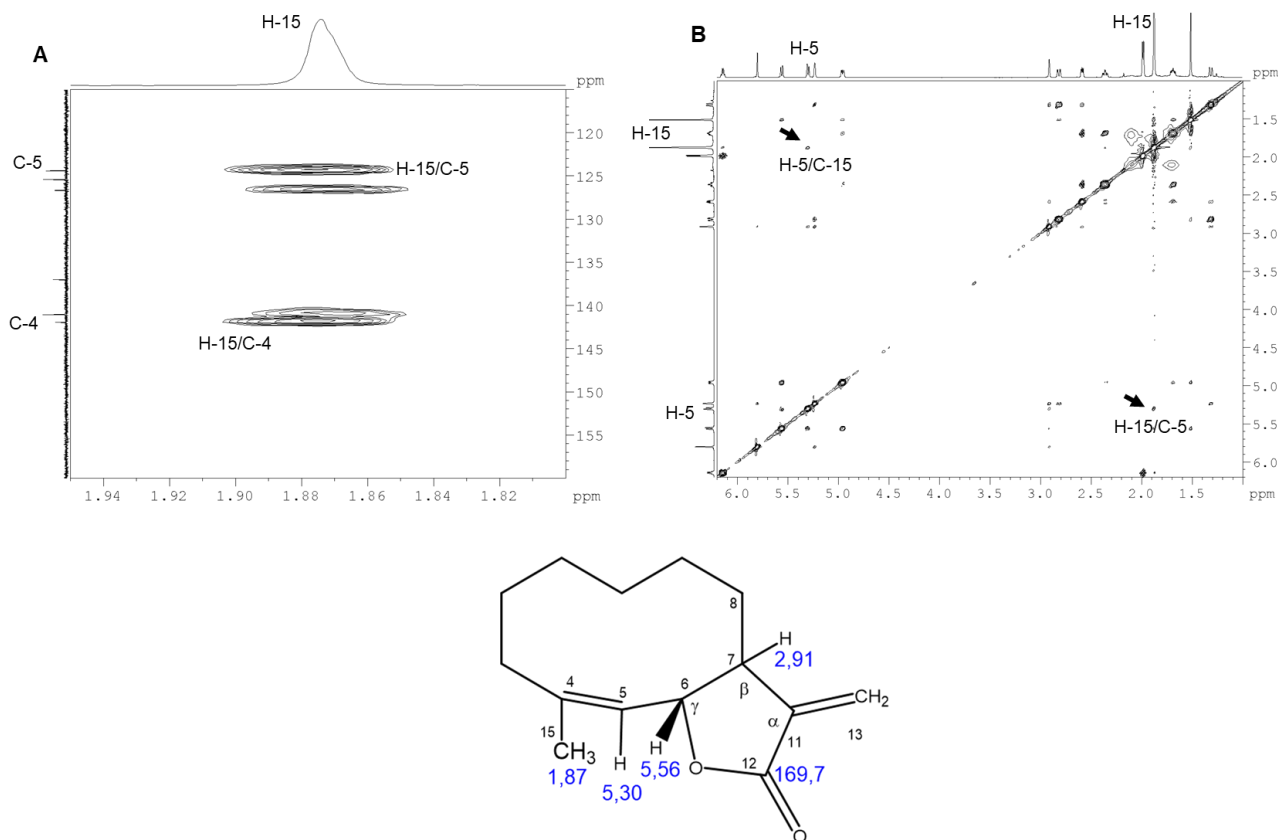
ligado a carbono sp^2 . É possível observar, no mapa de contornos COSY (**Figura 35**), a correlação entre esse próton e o duplo duplete em δH 5,56 ppm (H-6), demonstrando que esse último é um hidrogênio alílico à dupla ligação. Adicionalmente, a constante de acoplamento escalar entre esses sinais (H-5 e H-6) é de 11,0 Hz, sugerindo que esses dois hidrogênios se encontram *cis* posicionados. A presença de uma ligação dupla entre C-4 e C-5 descarta a possibilidade de que F.63 seja um guaianolídeo, pseudoguaianolídeo ou um eudesmanolídeo.

Figura 35 - Expansão do mapa de correlações homonucleares COSY de F.63 ($CDCl_3$)



O mapa de contornos HMBC (**Figura 36A**) indica manchas de correlação entre os sinais dos carbonos δC 141,9 e 124,3 ppm, atribuídos a C-4 e C-5, respectivamente, e o sinal dos hidrogênios em δH 1,87 ppm (H-15), indicando a presença desse grupo metílico na posição 4. Além da magnitude da constante de acoplamento $J_{5,6}$ (11,0 Hz), a correlação NOESY entre H-5/H-15 (**Figura 36B**) permitiu a atribuição de uma geometria Z à ligação dupla C-4/C-5, confirmando a estrutura de um heliangolídeo.

Figura 36 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC (A) e do mapa de contornos NOESY (B) de F.63 (CDCl₃)

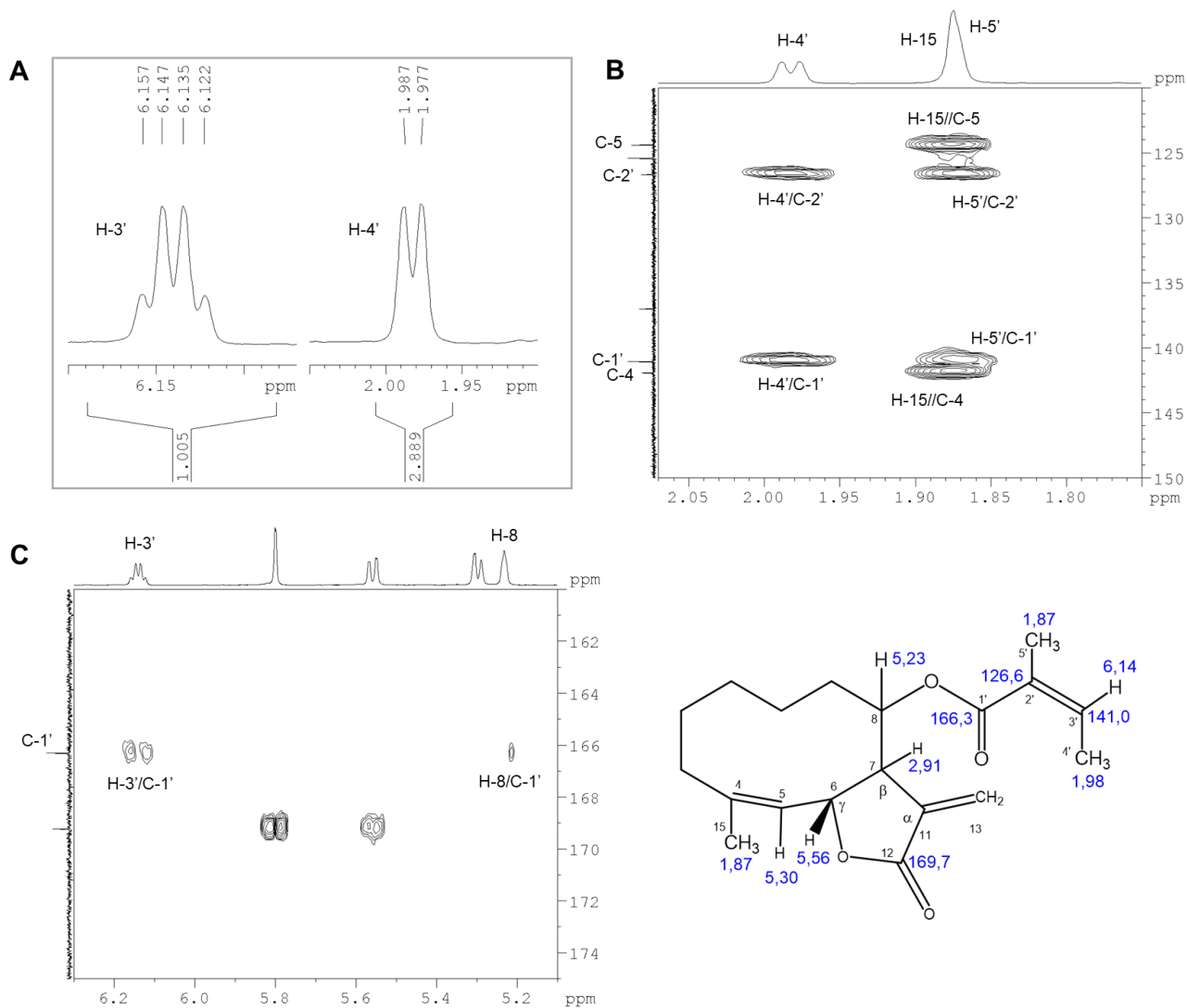


O quarteto referente ao sinal do hidrogênio em δ H 6,14 ppm (H-3') possui um constante de acoplamento escalar de 7,0 Hz. O deslocamento químico e a constante de acoplamento sugerem tratar-se de um próton em posição geminal a um grupo metílico, pertencentes a uma dupla ligação. O duplete referente aos hidrogênios metílicos em δ H 1,98 ppm (H-4'), corrobora a posição geminal desse grupo (**Figura 37A**). O sinal do próton olefínico (H-3') em torno de 6,10 ppm é característico de angelatos (MARTINEZ et al., 1979).

As correlações observadas no mapa de contornos HMBC entre os carbonos δ C 126,6 e 141,0 ppm, atribuídos a C-2' e C-3' respectivamente, e o sinal dos hidrogênios em δ H 1,87 (H-5') e 1,98 (H-4') ppm, confirmam a presença dessas duas metilas na insaturação (**Figura 37B**). É importante ressaltar que os sinais de H-15 e H-5' estão sobrepostos. Além disso, há um sinal de correlação entre o carbono δ C 166,3 ppm (C-1'), referente a uma carbonila, e o sinal do próton em δ H 6,14 ppm (H-3'), indicando a presença do grupo éster adjacente à ligação dupla C-2'/C-3'. Por fim, foi possível fixar a ligação desse grupo esterificado na posição 8, uma vez que o sinal da carbonila em

δC 166,3 ppm (C-1') apresenta correlação com o sinal de H-8 (δH 5,23 ppm) (**Figura 37C**).

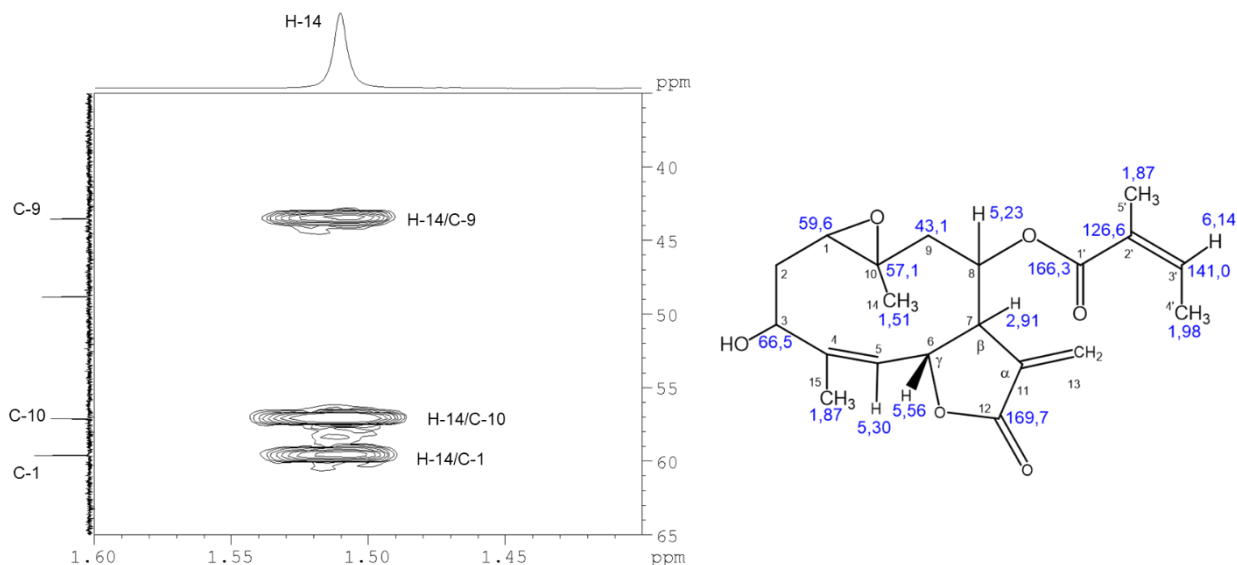
Figura 37 - Expansões do espectro de RMN de ^1H (A) e do mapa de correlações heteronucleares HMBC (B e C) de F.63 (CDCl_3)



Os sinais de carbonos em δC 59,6 e 57,1 ppm, atribuídos a C-1 e C-10 respectivamente, apresentam ressonâncias na região entre 60 e 80 ppm, características de carbonos de ligação C-O, o que justifica a presença de um grupo oxirano entre esses átomos. As correlações no HMBC, entre os sinais dos hidrogênios em 1,51 ppm e os sinais dos carbonos atribuídos a C-1 (59,6 ppm), C-9 (43,1 ppm) e C-10 (57,1 ppm) permitiram definir a localização desse grupo metílico na posição 10

(Figura 38). Por sua vez, a ressonância do carbono carbinólico em 66,5 ppm foi atribuída ao C-3, apontando a localização de uma hidroxila nesta posição.

Figura 38 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de F.63 (CDCl₃)

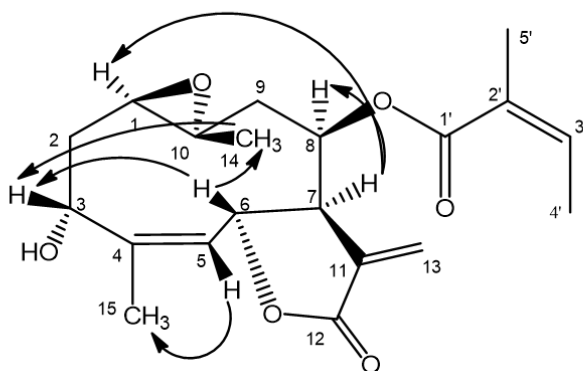
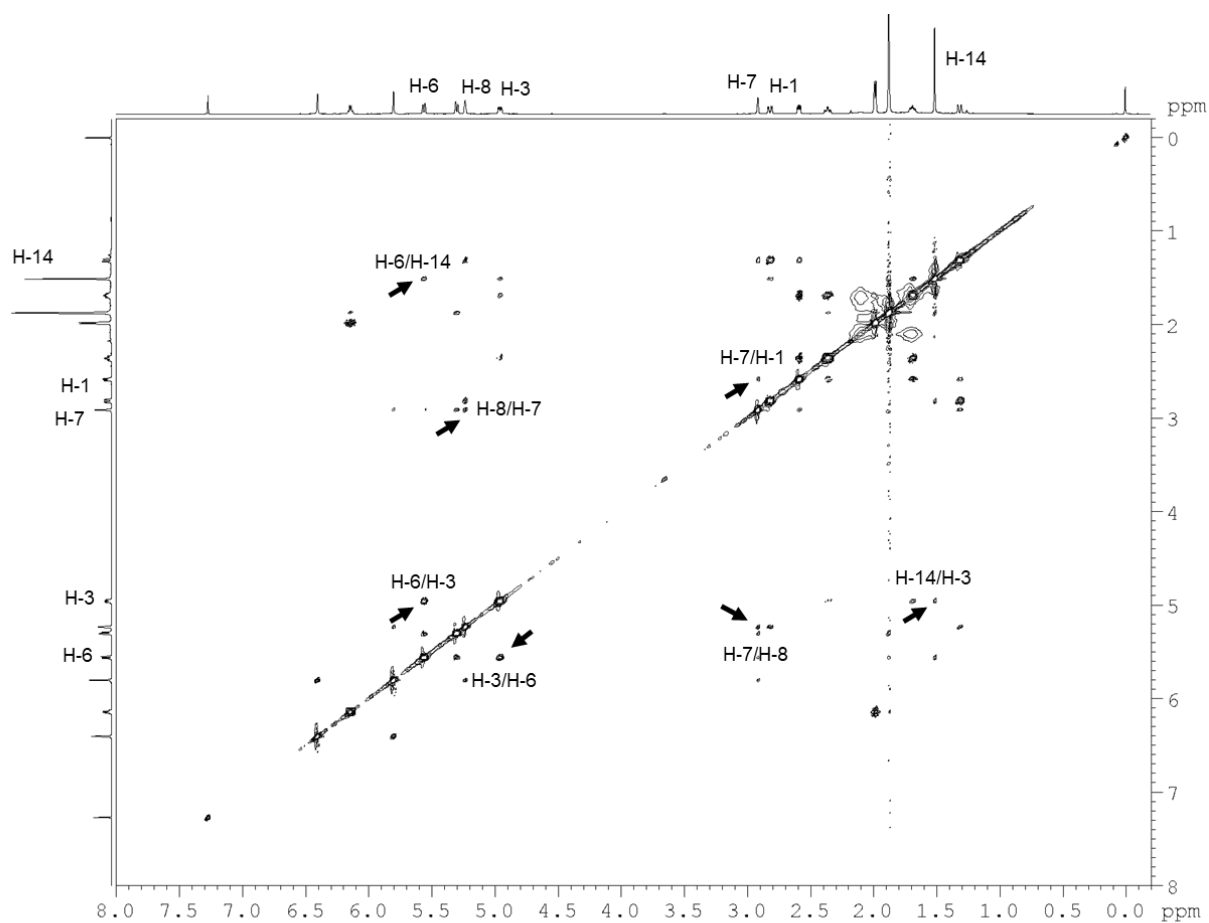


Sabe-se que as lactonas sesquiterpênicas são formadas a partir da condensação de três unidades de isopreno, subsequente ciclização e transformação oxidativa para produzir uma lactona *cis* ou *trans*-fundida (CHATURVEDI, 2011). Todos os heliangolídeos, germacrólidos e guaianolídeos previamente isolados de *C. cruciata* exibem um anel de lactona transfundido, onde H-7 tem orientação α , sem exceção.

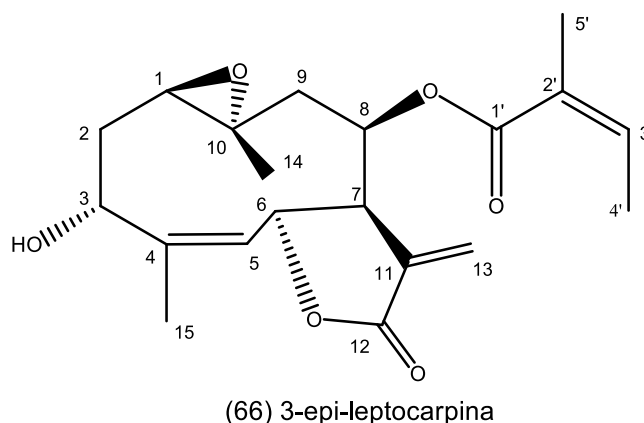
As correlações observadas entre os sinais H-7/H-1 e H-7/H-8 no mapa de contornos NOESY (Figura 39) permitiram a determinação da orientação α de H-1 e H-8. Embora existam correlações NOESY entre H-6 e H-7, porque estão a 90° um do outro, é importante destacar que eles estão em um arranjo *anti*, com H-6 em orientação β . Ademais, as correlações entre H-6/H-14 e H-6/H-3 sugerem a orientação β tanto do grupo 14-metil quanto do H-3.

Dessa forma, a estereoquímica relativa da substância foi estabelecida pelas correlações NOESY entre H-7/H-1 e H-6/H-14, demonstrando a transfusão do anel oxirano, e entre H-7/H-8, indicando a orientação β para o grupo angeloiloxi. A correlação entre H-6/H-3 e H-14/H-3 possibilitou atribuir a orientação α ao grupo hidroxila em C-3.

Figura 39 - Mapa de contornos NOESY de F.63 (CDCl₃)



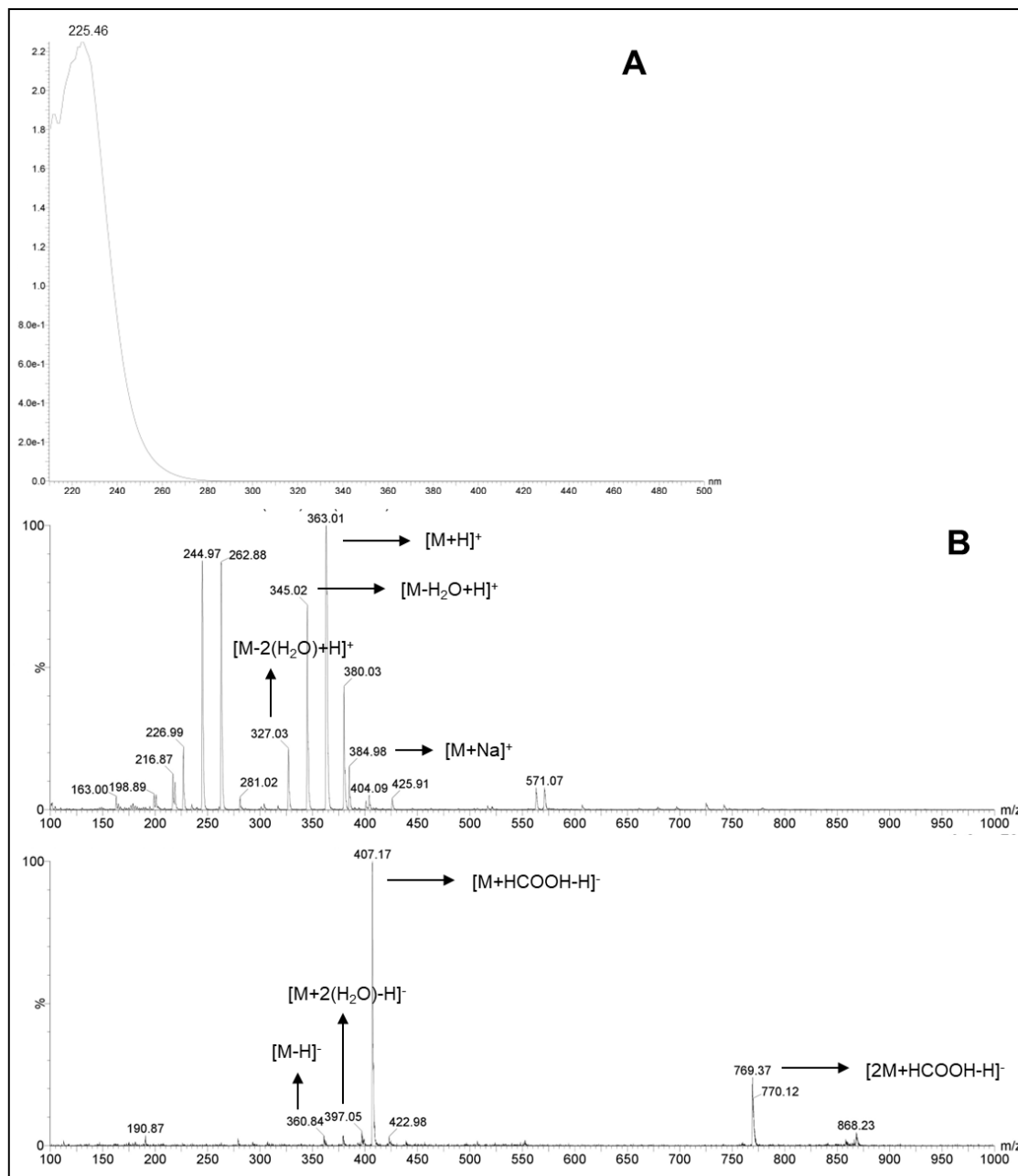
Portanto, a estrutura de F.63 foi elucidada como sendo 8 β -angeloiloxi-3 α -hidroxi-1 α ,10-epoxi-6 β H,7 α H-helianga-4Z,11(13)-dien-6,12-olida ou 3-epileptocarpina (**66**) que é aqui descrita pela primeira vez. Os mapas de contornos bidimensionais COSY e HMBC completos encontram-se em anexo (APÊNDICES C, pág. 218).



5.7.3 Elucidação estrutural de ClITr27,5 isolada de *C. cruciata*

Foi obtido um sólido branco cristalino. O espectro de absorção no UV de ClITr27,5 apresentou $\lambda_{\text{máx}}$ de 225 nm e o espectro de massas revelou íons em m/z 385 $[M+Na]^+$, 363 $[M+H]^+$, 345 $[M-H_2O+H]^+$, 327 $[M-2(H_2O)+H]^+$ e em m/z 769 $[2M+HCOOH-H]^-$, 407 $[M+HCOOH-H]^-$, 397 $[M+2(H_2O)-H]^-$ e 361 $[M-H]^-$, conforme demonstrado na **Figura 40**, indicando que a massa molecular da substância é provavelmente 362 Da.

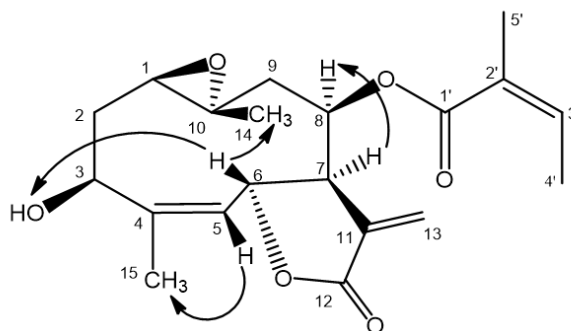
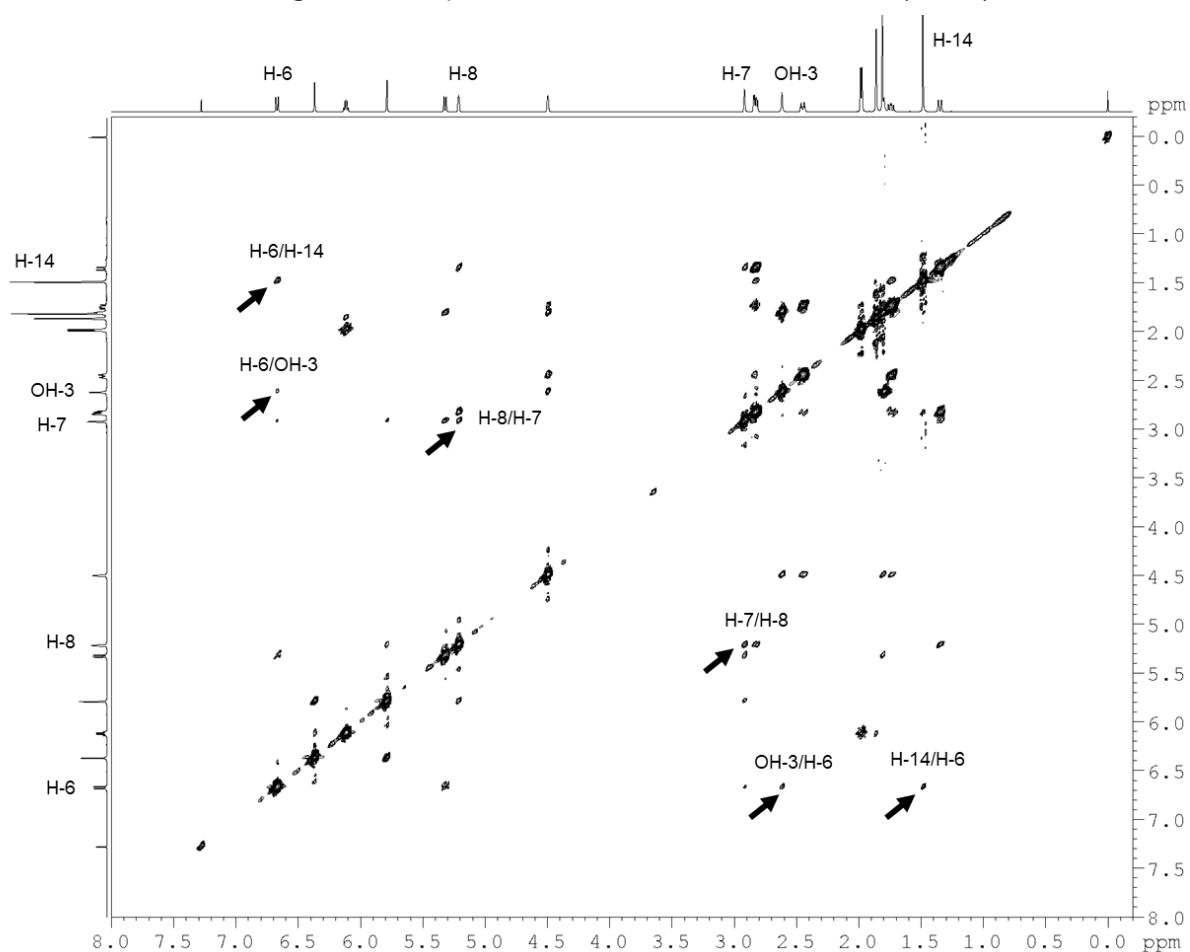
Figura 40 - Espectro de absorção no UV (A) e o espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de ClITr27,5 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



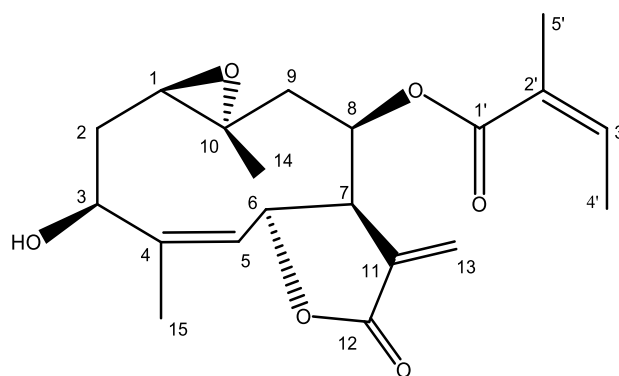
A análise dos dados espectroscópicos obtidos para ClITr27,5 indicou semelhanças estruturais com a lactona sesquiterpênica descrita no item 5.7.2, incluindo a presença de lactona α,β -insaturada, a estereoquímica *Z* da ligação dupla C-4/C-5, bem como a presença de anel 1,10-oxirano e de grupo 8 β -angeliloxi.

Entretanto, algumas diferenças foram detectadas nos dados de RMN nos sinais atribuídos a C-3 e C-15, que apresentaram deslocamentos químicos de 66,5 e 17,1 ppm em F.63, enquanto para ClITr27,5 foram observados valores de δ_C 72,3 e 23,1

ppm. Além disso, a ressonância de H-3 mostrou uma significativa diferença no valor de deslocamento químico (δ H 4,49 ppm em ClITr27,5 e 4,95 pp em F.63) e uma mudança na multiplicidade do sinal, sendo observado como um duplo duplete em ClITr27,5 e como um simpleto largo m em F.63. Por sua vez, o próton H-6 está foi atribuído ao sinal em δ H 5,56 ppm no composto F.63 e em δ H 6,66 ppm em ClITr27,5. Essa diferença de valores de deslocamento químico de H-6 também é observada em isômeros que possuem grupo hidroxila posicionado em α ou β . Por exemplo, a heliangina, cujo grupo hidroxila em C-3 ocupa a posição β , apresenta ressonância de H-6 em 6,67 ppm, enquanto na 3-*epi*-heliangina, com OH-3 na posição α , o sinal de H-6 é observado em 5,59 ppm (SHEN et al., 2005). Segundo Holub e Samek (1977) esta mudança no deslocamento químico, que também ocorre na nobilina (β OH-3) e na 3-*epi*-nobilina (α OH-3), indica o efeito de repulsão de van der Waals dos elétrons da hidroxila em C-3 no próton H-6, o que só é possível considerando a estereoquímica Z da ligação dupla entre C-4 e C-5. Os dados do mapa de contornos NOESY confirmam a orientação β para o grupo angeloiloxi e 14-metil, pelas correlações entre H-7/H-8 e H-6/H-14, respectivamente. Além disso, a correlação entre H-6/OH-3 confirma a orientação β do grupo hidroxila em C-3 (**Figura 41**).

Figura 41 - Mapa de contornos NOESY de ClITr27,5 (CDCl₃)

Observados em conjunto, os dados espectroscópicos obtidos indicam que a substância ClITr27,5 é a leptocarpina (**67**), que foi anteriormente isolada de *Leptocarpa rivularis* exibindo a estereoquímica característica dos heliangolídeos. A estrutura molecular da leptocarpina e do acetato de leptocarpina já foi estabelecida por difração de raios X (MARTINEZ et al., 1979, 1995; OBER; FRONCZEK; FISCHER, 1985).



(67) leptocarpina

Os dados de RMN obtidos neste estudo permitiram reavaliar certos sinais que foram previamente atribuídos por Ober, Fronczek e Fischer (1985). Especificamente, C-11 e C-2' foram inicialmente atribuídos aos sinais de ressonância em 126,9 e 137,4 ppm, respectivamente. No entanto, nossos dados sugerem uma correção dessas atribuições, com C-11 em δ_C 137,5 ppm e C-2' em δ_C 126,9 ppm. Estas foram corroboradas pelas manchas de correlações observadas no mapa de contornos HMBC entre C-11 e H-13a/H-13b, bem como entre C-2' e H-4'/H-5'. Confirmação semelhante foi observada para os carbonos 14 e 15, relatados anteriormente com valores de deslocamentos químicos de 22,9 e 20,3 ppm, respectivamente, enquanto nosso estudo revelou que C-14 tem deslocamento químico de δ_C 19,8 ppm e C-15 de δ_C 23,1 ppm. Estas atribuições foram ainda confirmadas por manchas de correlação no mapa de contornos HMBC, nomeadamente entre H-14 e C-1/C-9/C-10, e entre H-15 e C-3/C-4/C-5 (APÊNDICE E, pág. 227). Os espectros de RMN de 1H e de ^{13}C , bem como dos mapas de contornos bidimensionais COSY, HSQC e HMBC encontram-se em anexo (APÊNDICES D, pág. 219).

A **Tabela 21** apresenta a atribuição dos dados espectroscópicos de RMN de 1H e ^{13}C obtidos para F.63 e ClITr27,5 e dados da literatura descritos para a leptocarpina.

Tabela 21 - Dados de RMN de 1H e ^{13}C obtidos para F.63 e ClITr27,5 ($CDCl_3$; 600 MHz) e dados da literatura relatados para a leptocarpina

	F.63		ClITr27,5		Leptocarpina*	
Posição	δ_H (J em Hz)	δ_C	δ_H (J em Hz)	δ_C	δ_H (J em Hz)	δ_C
1	2,8; m	59,6	2,83; m	60,8	2,80; dd (5,9)	60,68

2	1,68; m 2,36; td (5,0; 13,0)	34,4	1,73; m (2,4; 10,3; 15,0) 2,44; dt (4,3; 14,8)	32,6	1,75; m (2,0; 9,0; 15,0) 2,45; td (5,5; 15,0)	32,53
3	4,95; dd (5,0; 11,0)	66,5	4,49; s	72,3	4,50; dd (2,0; 5,0)	72,22
4		141,9		141,5		141,65
5	5,30; d (10,5)	124,3	5,32; d (10,8)	126,5	5,31; dd (2,0; 11,0)	126,39
6	5,56; dd (2,5; 11,0)	73,0	6,66; dd (2,0; 10,8)	74,3	6,70; dd (2,0; 11,0)	74,17
7	2,91; s	48,8	2,9; s	48,5	3,00; m	48,44
8	5,23; s	75,5	5,20; s	75,9	5,25; m	75,82
9	1,30; dd (2,0; 13,5) 2,81; dd (4,2; 15,0)	43,1	1,34; dd (2,0; 15,0) 2,82; m	43,7	- ^a	43,63
10		57,1		58,8		58,70
11		137,0		137,5		126,93
12		169,2		169,7		169,58
13	5,80; d (1,5) 6,40; d (1,5)	125,3	5,78; d (2,0) 6,36; d (2,0)	124,9	5,70; d (2,0) 6,30; d (2,0)	124,74
14	1,51; s	18,6	1,48; s	19,8	1,50; s	22,94
15	1,87; s	17,1	1,80; s	23,1	1,80; s	20,33
1'		166,3		166,5		166,42
2'		126,9		126,9		137,42
3'	6,14; q (7,2)	140,5	6,11; q (7,2)	140,5	6,08; m	-
4'	1,98; d (7,2)	15,9	1,98; dd (1,0; 7,2)	15,8	2,00; m	19,67
5'	1,87; s	20,5	1,86; s	20,5	1,93; m	15,70

d: duplete; dd: duplo duplete; td: triplo duplete; m: multiplete; q: quarteto; s: simpleto

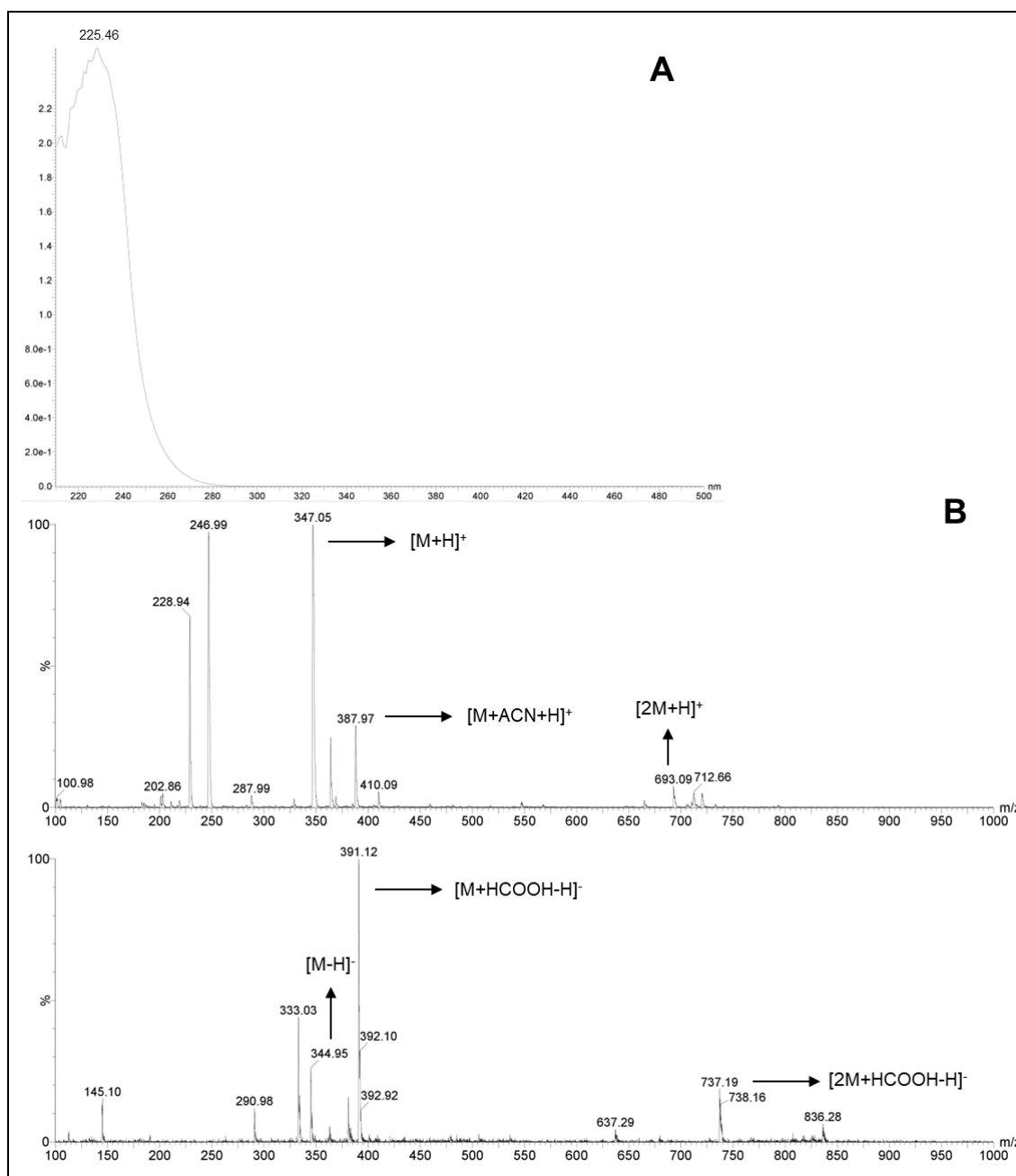
^a não foi relatado

* Martinez et al. (1979) – ¹H RMN, CDCl₃; Ober, Fronczek e Fischer (1985) - ¹³C RMN 50,32 MHz, CDCl₃.

5.7.4 Elucidação estrutural de ClITr33,2 isolado de *C. cruciata*

Foi obtido um sólido branco cristalino. A substância ClITr33,2 apresentou $\lambda_{\text{máx}}$ de 225 nm e sua análise por espectrometria de massas produziu íons em m/z 693 $[2M+H]^+$, 387 $[M+ACN+H]^+$ e 347 $[M+H]^+$, bem como em m/z 737 $[2M+HCOOH-H]^-$, 391 $[M+HCOOH-H]^-$ e 345 $[M-H]^-$, como representado na **Figura 42**.

Figura 42 - Espectro de absorção no UV (A) e espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de ClITr33,2 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



O espectro de RMN de ^{13}C indicou sinais de ressonância de 20 carbonos. A multiplicidade dos sinais foi estabelecida com base na análise do sub-espectro DEPT 135 e do mapa de contornos HSQC, observando-se dois sinais de carbonila (δC 169,7 e 166,5 ppm), quatro carbonos quaternários (δC 141,9; 134,6; 127,2 e 42,8 ppm), cinco sinais de carbonos metilênicos (δC 119,7; 110,9; 40,4; 33,4 e 30,9 ppm), seis sinais de carbonos metínicos (δC 139,6; 78,6; 75,3; 65,6; 53,5 e 52,1 ppm) e três sinais de carbonos metílicos (δC 20,7; 16,0 e 13,5 ppm) (**Figuras 43 e 44**).

Figura 43 - Espectro de RMN de ^{13}C de ClITr33,2 (CDCl_3 ; 150 MHz)

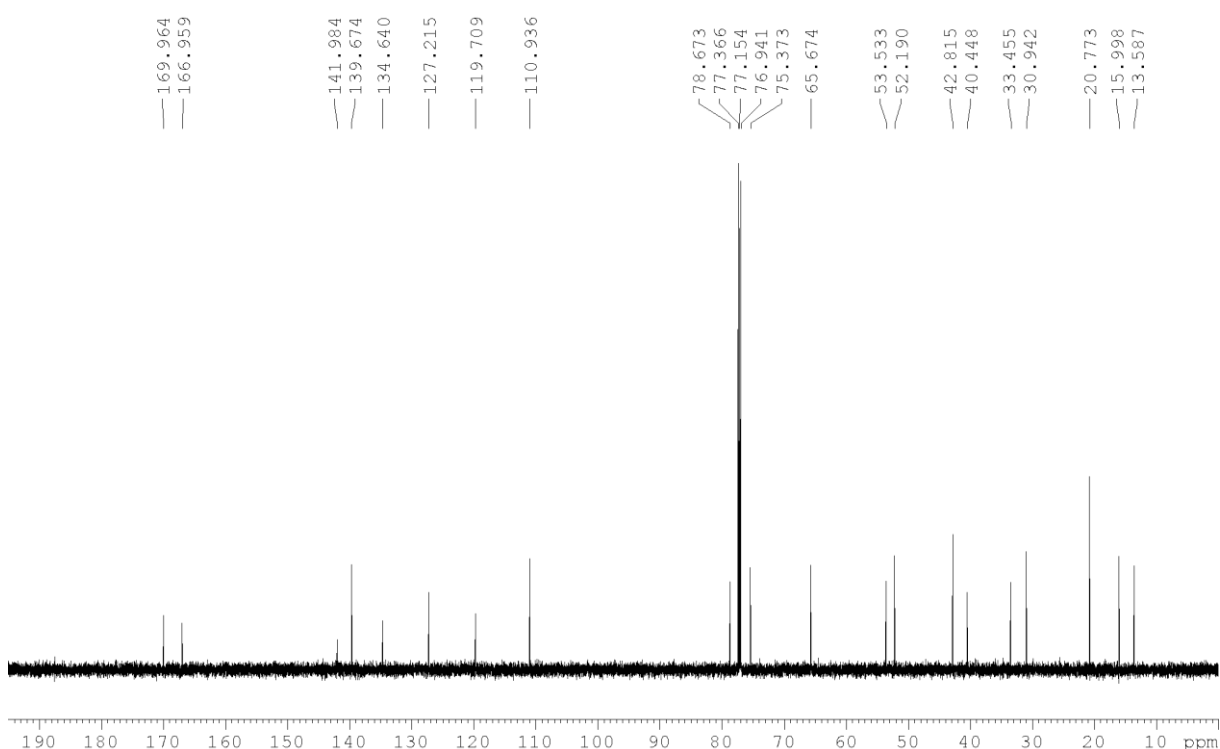
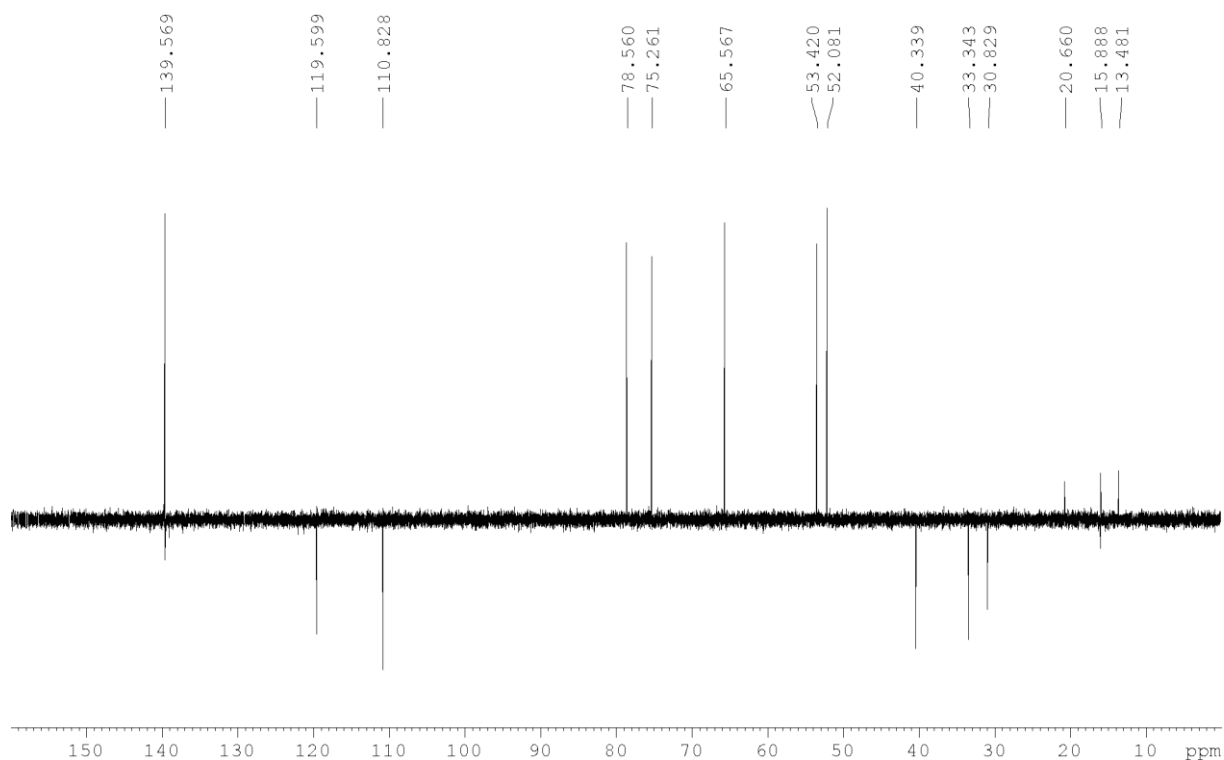
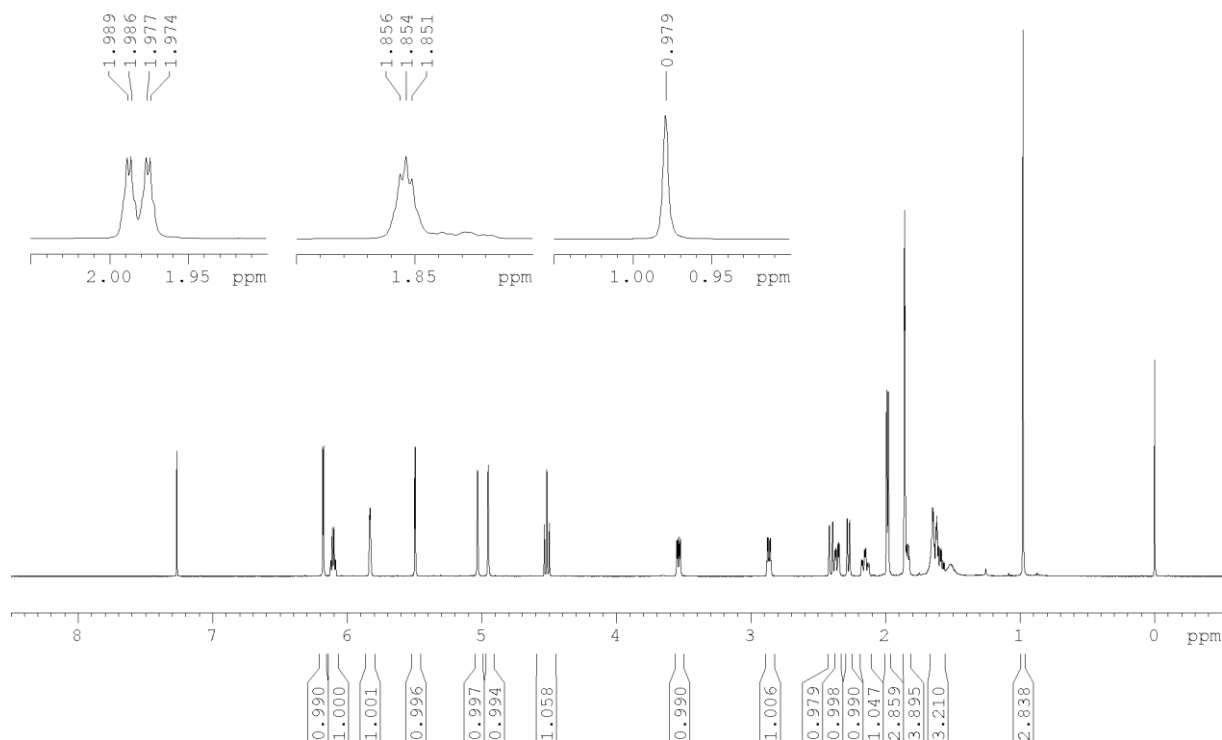


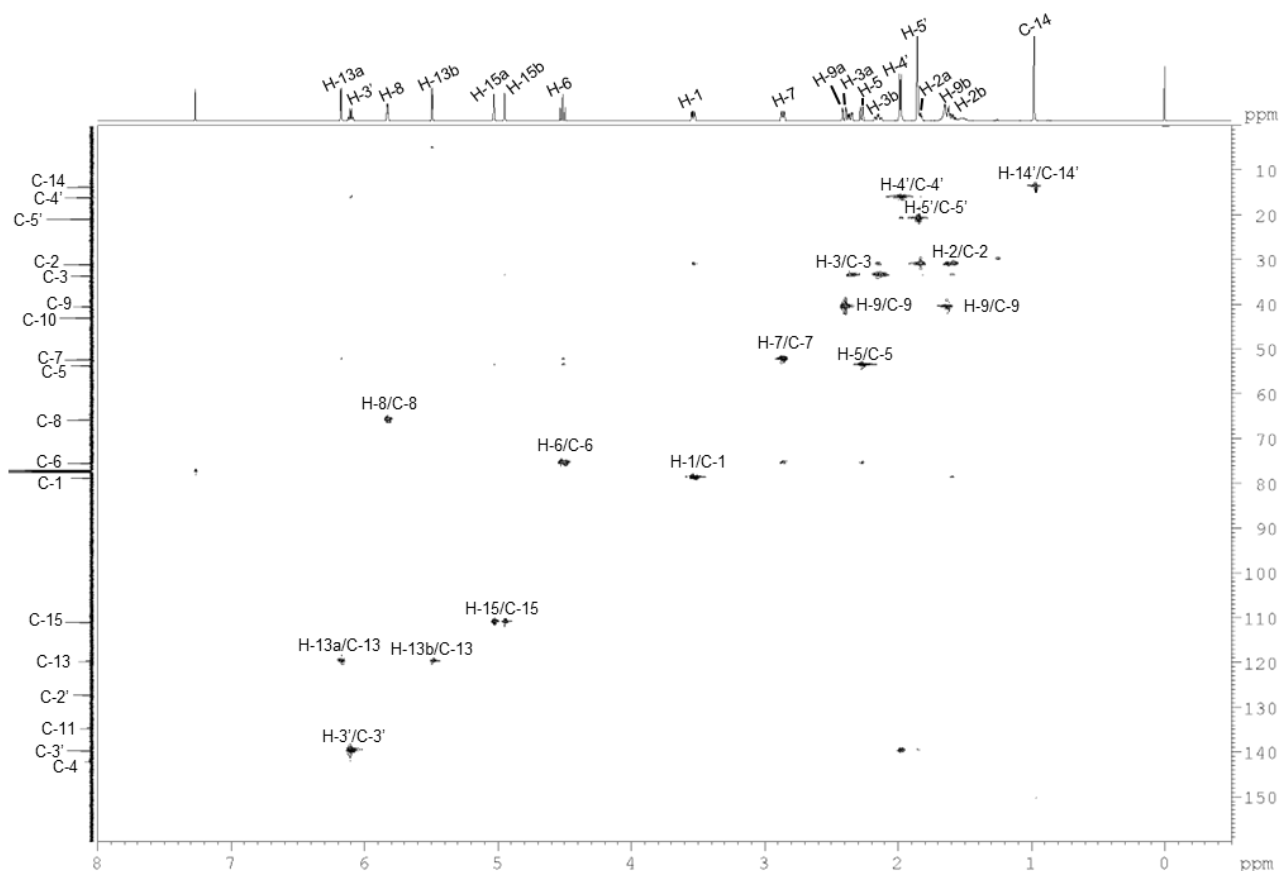
Figura 44 - Sub-espectro de DEPT-135 de ClITr33,2 (CDCl₃; 150 MHz)

A presença dos grupos metílicos foi confirmada pela análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 45**), que apresentou três sinais (δH 0,97; 1,85 e 1,98 ppm) correspondentes à três hidrogênios cada, o que está de acordo com o observado pela análise do espectro de ^{13}C e o sub-espectro DEPT135.

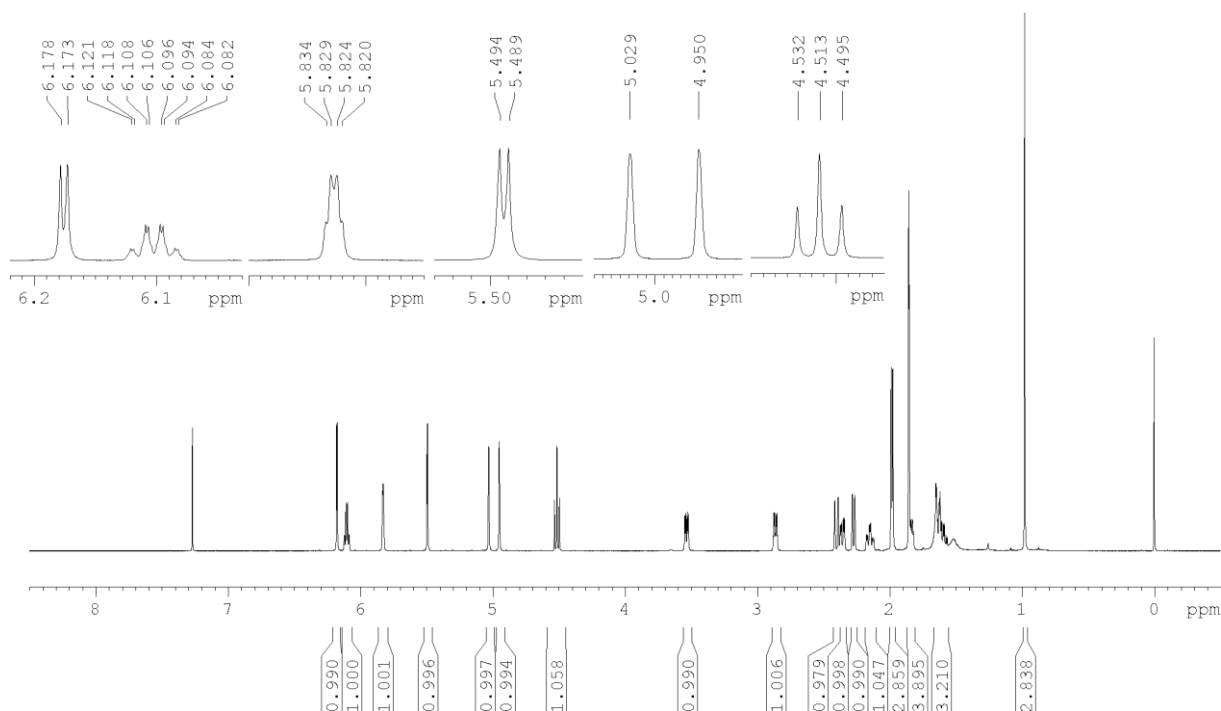
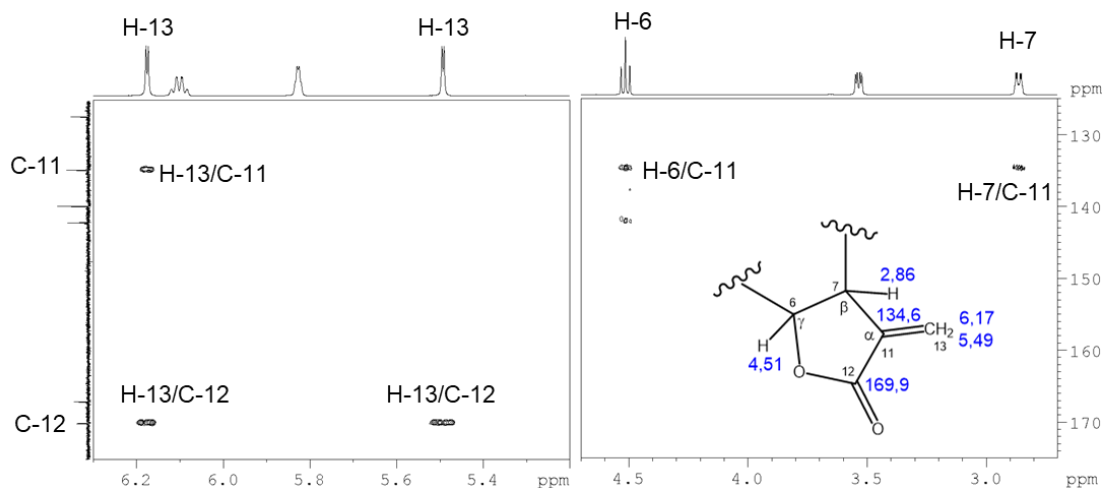
Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H de ClITr33,2 (CDCl_3 ; 600 MHz)

Correlacionando esses dados com os obtidos pelo espectro de massas, pode-se dizer que a massa molar é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_5$. Assim, a primeira diferença entre ClITr33,2 e as demais substâncias descritas anteriormente, é a ausência de um átomo de oxigênio na estrutura.

A análise do mapa de contornos HSQC (**Figura 46**) indicou a correlação dos sinais dos hidrogênios metilênicos em δH 5,49 e 6,17 ppm com o sinal do carbono em δC 119,7 (C-13); e em δH 4,95 e 5,02 ppm com o sinal do carbono em δC 110,9 ppm (C-15). Já o hidrogênio metínico δH 6,10 ppm apresentou mancha de correlação com a ressonância do carbono em δC 139,6 ppm (C-3'). Para o hidrogênio em δH 3,53 ppm, observou-se uma mancha de correlação com o sinal do carbono em δC 78,6 ppm (C-1), deslocamento característico de carbono carbinólico, assim como entre o hidrogênio metínico em δH 4,51 ppm e o sinal do carbono em δC 75,3 ppm (C-6). As demais correlações estão apresentadas na **Figura 46**.

Figura 46 - Mapa de contornos HSQC de ClIFr33,2 (CDCl₃)

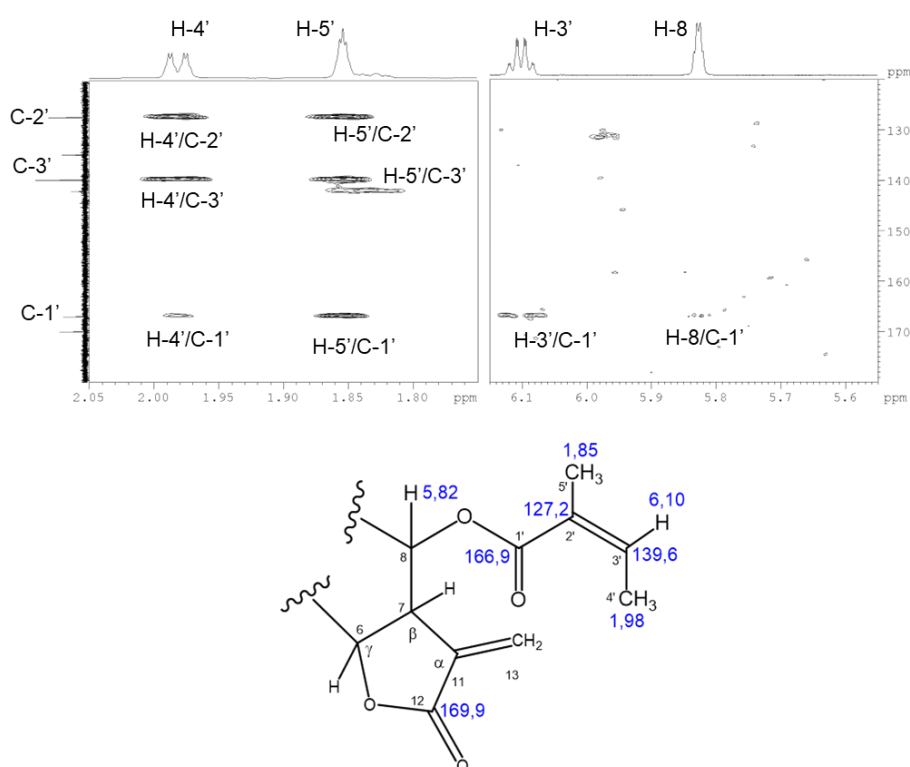
A análise do espectro de RMN de ¹H (**Figura 47**) revelou a presença de dois dupletos centrados em δH 5,49 e 6,17 ppm (H-13a e H-13b), com constantes de acoplamento de 3,0 Hz, atribuídos aos dois prótons metilênicos de uma ligação dupla terminal. O mapa de contornos HMBC apresentou correlações entre o carbono em δC 169,9 ppm (C-12) e esses hidrogênios metilênicos, confirmando a presença do grupo α-metileno-γ-lactona. A correlação entre C-11 (δC 134,6 ppm) e os sinais em δH 4,51 e 2,86 ppm, permitiu atribuí-los a H-6 e H-7, respectivamente (**Figura 48**).

Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H de ClITr33,2 em CDCl_3 (600 MHz)**Figura 48** - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de ClITr33,2 (CDCl_3)

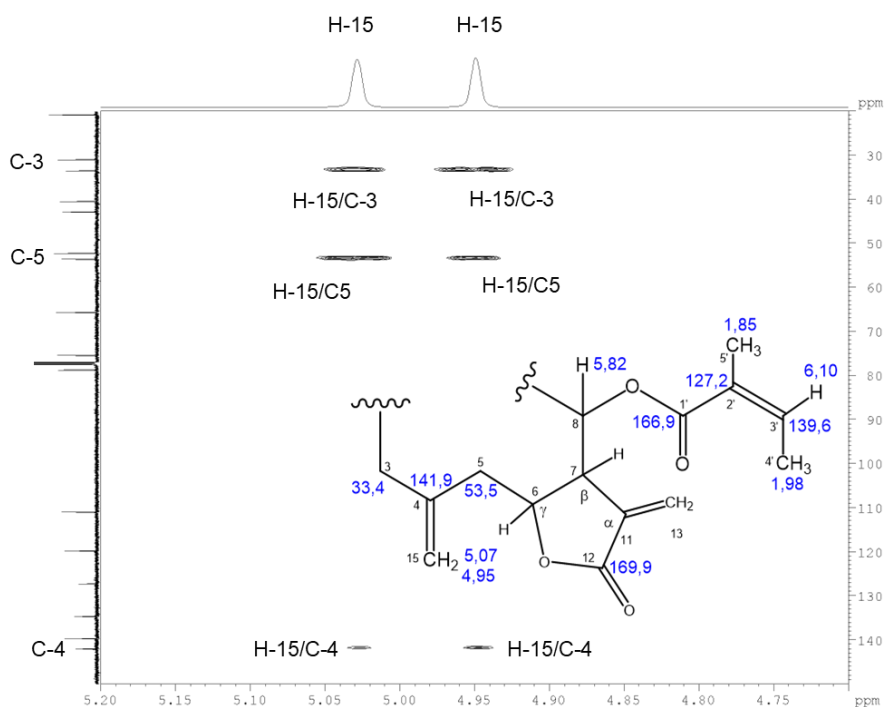
Uma segunda semelhança com as substâncias descritas nas sessões anteriores é a presença de um grupo angeloiloxi na estrutura. Assim, o sinal referente ao hidrogênio em δH 6,10 (H-3') e a constante de acoplamento $J_{3'4'}$ 7,2 Hz corroboram a posição geminal do grupo metílico (δH 1,98 ppm). As correlações observadas no mapa de contornos HMBC (**Figura 49**) entre os sinais dos carbonos em δC 139,6 e 127,2 ppm, atribuídos a C-3' e C-2' respectivamente, e o sinal dos hidrogênios em δH

1,85 (H-5') e 1,98 (H-4') ppm, confirmam a presença de dois grupos metila como substituintes da insaturação. Além disso, os sinais de correlação entre o carbono δC 166,9 ppm (C-1'), referente a uma carbonila, e os sinais dos prótons H-5', H-4' e H-3', confirmam a presença do grupo éster adjacente à ligação dupla C-2'/C-3'. A correlação observada entre C-1' e o hidrogênio em δH 5,32 ppm (H-8) possibilita identificar a posição de ligação do grupo angeloiloxi em C-8.

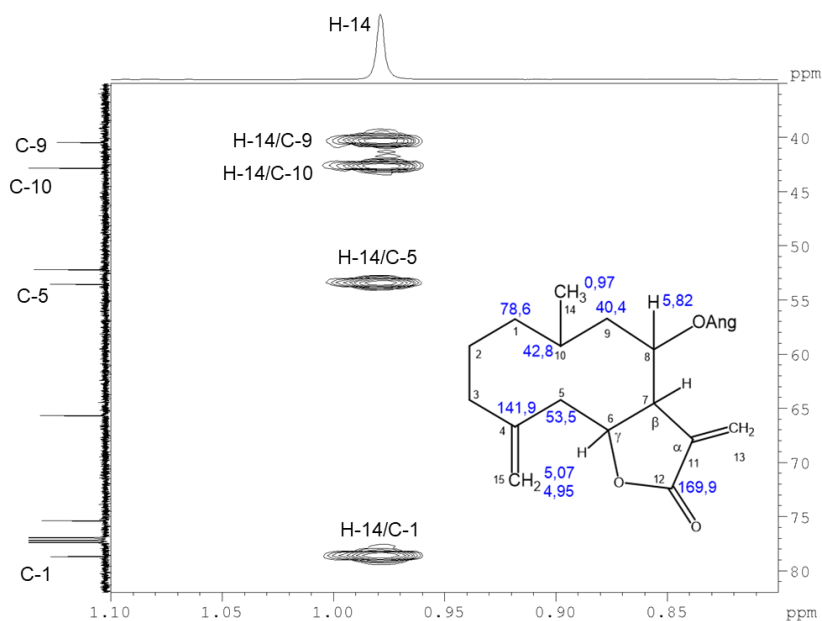
Figura 49 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de ClITr33,2 (CDCl₃)



No espectro de RMN de 1H foi possível observar, ainda, dois simpletos em δH 5,03 e 4,95 ppm, correspondentes a um hidrogênio cada, característicos de prótons de uma ligação dupla terminal. Por sua vez, a análise do mapa de contornos HMBC (**Figura 50**) evidencia manchas de correlação desses hidrogênios com o carbono quaternário em δC 141,9 ppm (C-4), o carbono em δC 53,5 ppm (C-5) e com o carbono em δC 33,4 ppm (C-3). Dessa forma, foi possível fixar a dupla terminal na posição 4.

Figura 50 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de ClITr33,2 (CDCl₃)

Adicionalmente, verificou-se correlação entre o sinal dos hidrogênios metílicos em δ H 0,97 ppm (H-14) com o carbono quaternário em δ C 42,8 ppm (C-10) e com os carbonos em δ C 40,4; 53,5 e 78,6 ppm, atribuídos a C-9, C-5 e C-1 respectivamente, indicando a presença de um grupo metila ligado em C-10 (**Figura 51**).

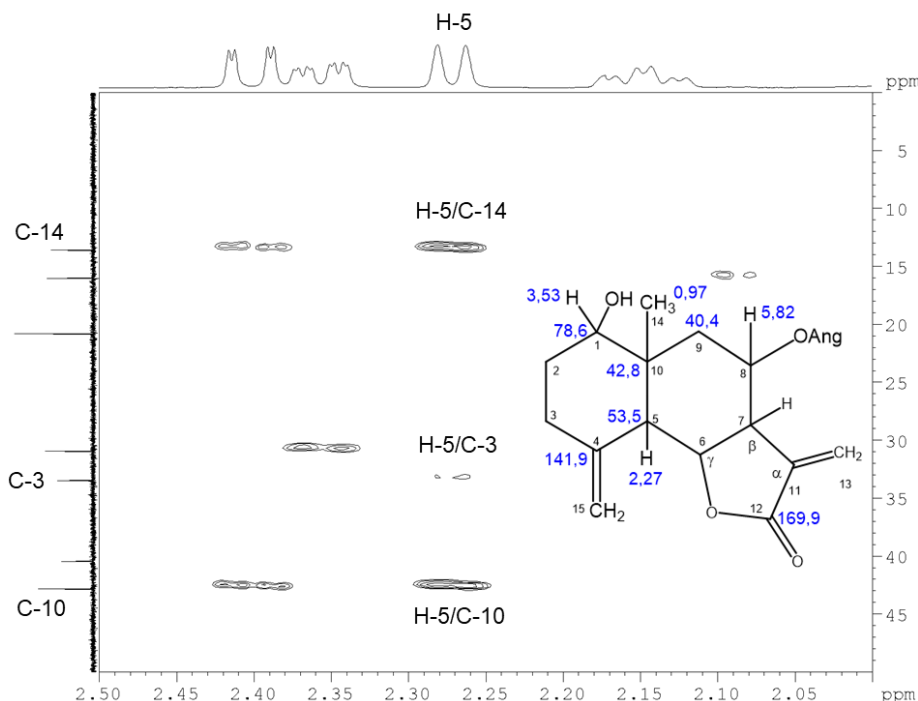
Figura 51 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de ClITr33,2 (CDCl₃)

Uma vez que não se verifica sinais de ressonância compatíveis com a presença de uma insaturação entre C-4 e C-5, pode-se descartar a possibilidade de que a substância tenha um esqueleto de germacrolídeo ou heliangolídeo. A presença de um grupo metilênico em C-4 e de um grupo metílico em C-10 sugere tratar-se de um guaianolídeo ou de um eudesmanolídeo (**Figura 30**, pág. 113).

As correlações no mapa de contornos HMBC (**Figura 52**) do sinal do hidrogênio em δ H 2,27 ppm (H-5) com os sinais do carbono quaternário em δ C 42,8 (C-10), do carbono em δ C 13,5 ppm (C-14) e do carbono em δ C 33,4 ppm (C-3), referente ao grupo metílico, demonstram que a substância possui um esqueleto eudesmanolídeo.

Por fim, o carbono em δ C 78,6 ppm, atribuído a C-1, apresenta ressonância na região entre 60 e 80 ppm, característica de carbonos de ligação C-O, enquanto o hidrogênio correspondente, em δ H 3,53 ppm (H-1), apresenta ressonância na região entre 3,4 e 4 ppm, característica de prótons de carbinois. Isso justifica a presença de um grupo hidroxila nessa posição.

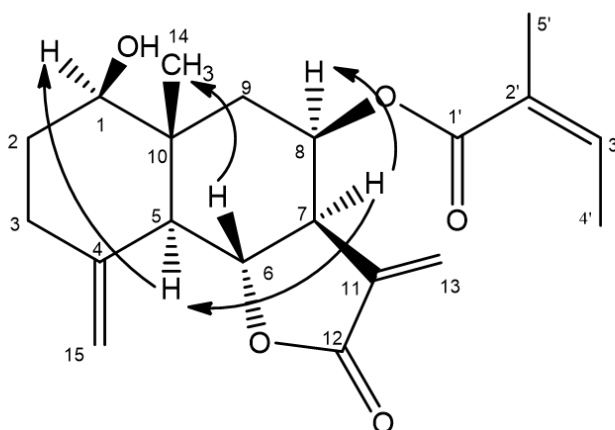
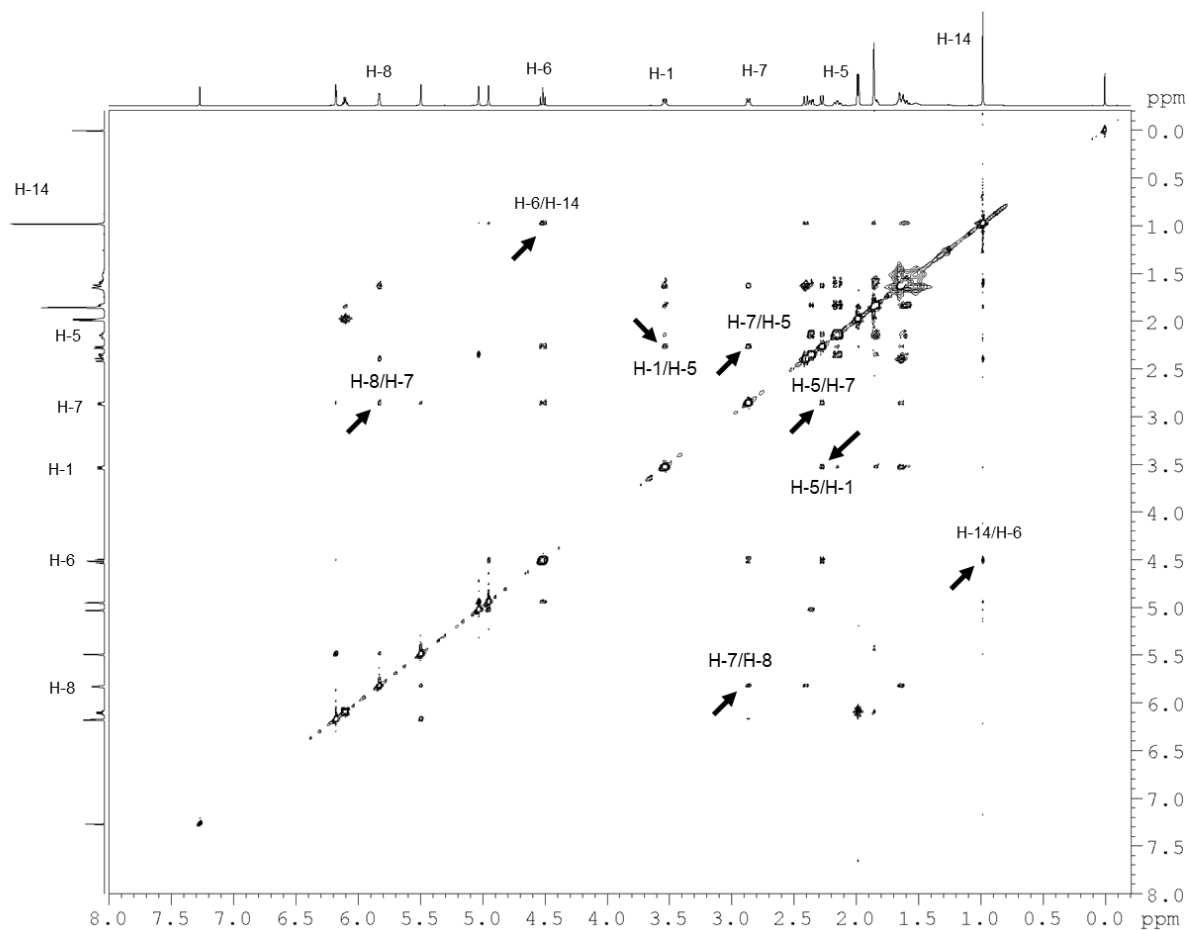
Figura 52 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de ClITr33,2 (CDCl₃)



Com a análise do mapa de contornos NOESY (**Figura 53**) foi possível observar correlações entre H-7/H-8 e H-7/H-5, confirmando a orientação β do grupo angeloiloxi

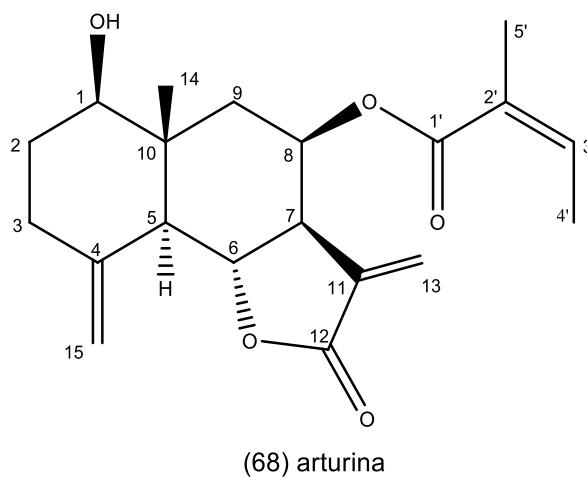
e a orientação α de H-5. As correlações ente H-6/H-14 e H-5/H-1 corroboram a orientação β do grupo metila na posição 14 e da hidroxila em C-1.

Figura 53 - Mapa de contornos NOESY de ClITr33,2 (CDCl₃)



A comparação com dados da literatura indicou que ClITr33,2 trata-se da arturina (**68**), previamente isolada de *Podanthus mitiqui* (CESPEDES et al., 2001; HOENEISEN; SICVA; BOHLMANN, 1980). Todos os sinais no espectro de RMN de

^1H foram atribuídos e são consistentes com aqueles relatados anteriormente por Hoeneisen; Sicva; Bohlmann (1980). É importante ressaltar que o isolamento dessas três lactonas sesquiterpênicas *C. cruciata* é descrito pela primeira vez no presente trabalho.



A **Tabela 22** apresenta os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para ClITr33,2 e comparação com os dados da literatura para a arturina.

Tabela 22 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C de ClITr33,2 (CDCl_3 ; 600 MHz) e comparação com dados da literatura descritos para arturina

ClITr33,2			Arturina*
Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
1	3,53; dd (4,6; 11,3)	78,6	3,54; dd (4,5; 11,0)
2	1,59; m	30,9	1,64; m (6,0; 13,0)
	1,82; m		1,93; m (1,55; 6,0)
3	2,14; d (5,0; 12,5)	33,4	2,15; td (6,0; 13,0)
	2,35; m (5,0; 14,0)		2,37; td (1,5; 3,0; 13,0)
4		141,9	
5	2,27; d (11,0)	53,5	2,28; d (11,0)
6	4,51; t (11,0)	75,3	4,52; dd (11,0)
7	2,86; m (11,0)	52,1	2,87; m (2,5; 3,0; 11,0)

8	5,82; m (3,0)	65,6	5,84; td (2,5)
9	1,63; m	40,4	1,64; m (2,5; 15,0)
	2,40; dd (2,0; 15,0)		2,41; td (2,1; 5,1; 13;7)
10		42,8	
11		134,6	
12		169,9	
13	5,49; d (3,0)	119,7	5,50; d (3,0)
	6,17; d (3,0)		6,18; d (3,2)
14	0,97; s	13,5	0,98 s
15	4,95; s	110,9	4,96; d (0,9)
	5,02; s		5,04; d (0,9)
1'		166,9	
2'		127,2	
3'	6,10; m (1,5; 7,2)	139,6	6,11; m (1,5; 7,0)
4'	1,98; dd (1,4; 7,2)	16,0	1,93; dd (1,5; 7,0)
5'	1,85; s	20,7	1,86; s

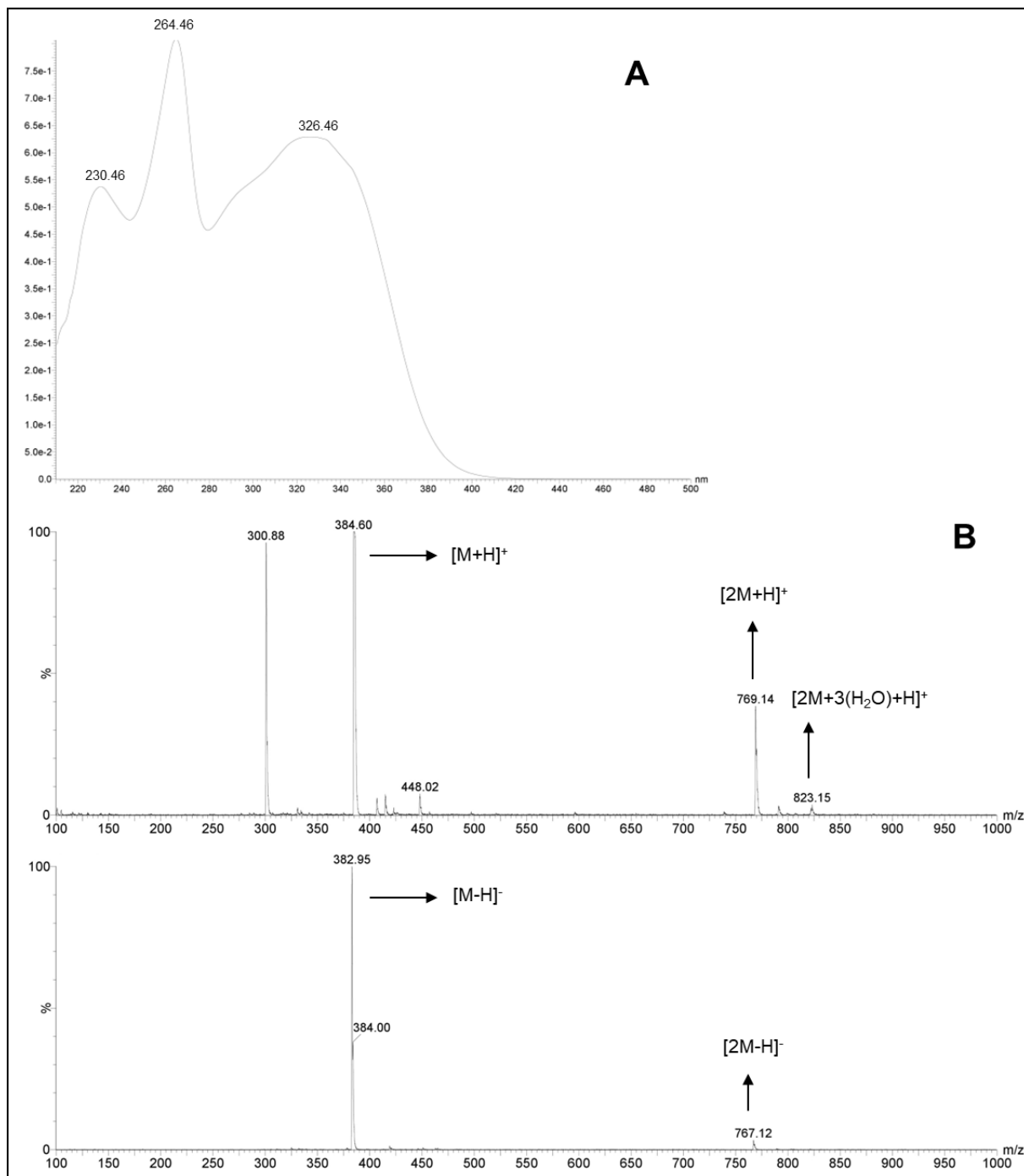
d: duplete; dd: duplete duplo; td: triplo duplete; m: multiplete; q: quarteto; s: simpleto; t: tripleto

* Hoewsen, Sicva e Bohlmann (1980) – ^1H RMN – 270 MHz, CDCl_3 .

5.7.5 Elucidação estrutural de S2 isolado de *B. stylosa*

Foi obtido um sólido amarelado. A fração S2 foi analisada por UPLC-ESI-MS e o pico em 6,78 minutos apresentou máximos de absorção no UV em 264 e 326 nm e sua análise por ESI-MS no modo positivo de ionização produziu íons em m/z 823 $[2\text{M}+3(\text{H}_2\text{O})+\text{H}]^+$, 769 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ e 385 $[\text{M}+\text{H}]^+$, enquanto no modo negativo de ionização foram observados íons em m/z 767 $[2\text{M}-\text{H}]^-$ e 383 $[\text{M}-\text{H}]^-$, conforme demonstrado na **Figura 54**, sugerindo tratar-se de uma flavona com massa molecular de 384 Da.

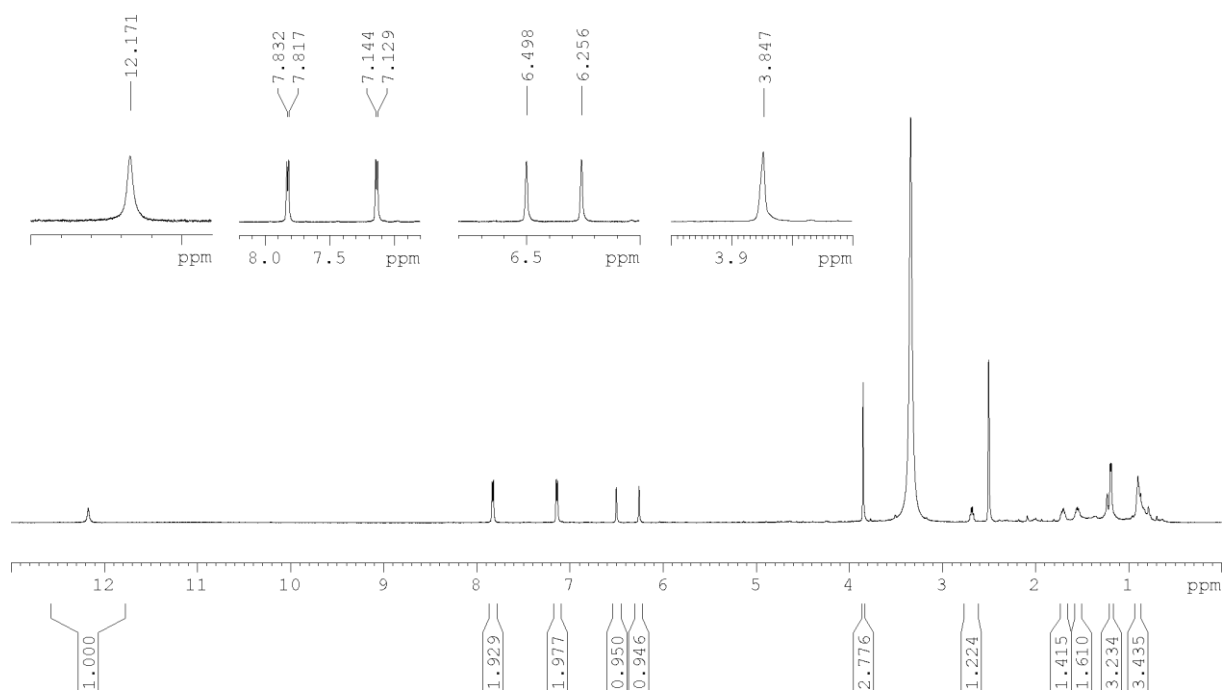
Figura 54 - Espectro de absorção no UV (A) e espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de S2
(Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



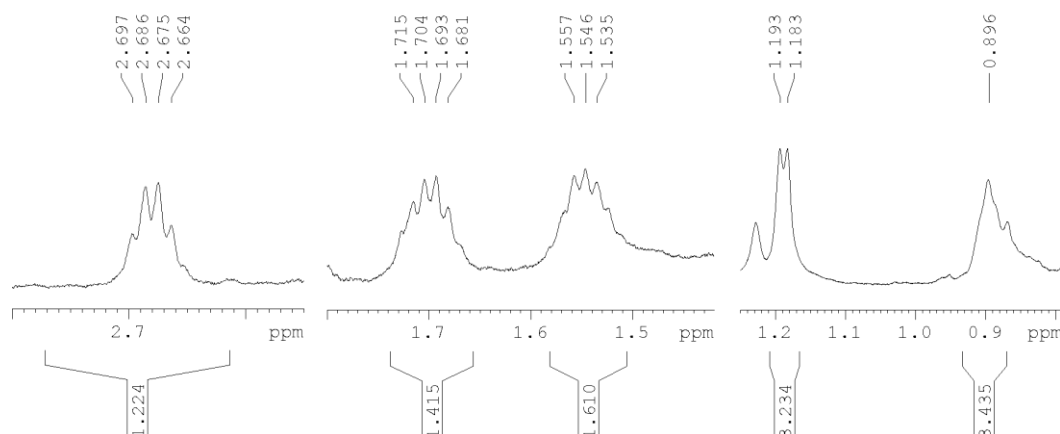
A análise do espectro de RMN de 1H (**Figura 55**) evidenciou sinais de ressonância referentes a seis prótons aromáticos, compreendendo dois dupletos centrados em δH 7,13 e 7,82, com constante de acoplamento escalar de 8,6 Hz, correspondentes a 2 hidrogênios cada, e dois singletos em δH 6,25 e 6,49,

correspondentes a um hidrogênio cada. Esses dados são compatíveis com a presença de um anel aromático *p*-dissubstituído (anel B) e de um anel aromático tetrasubstituído (anel A). Além disso, um simpleto foi observado em δ H 3,84, correspondente à três hidrogênios, sugerindo a presença de um grupo metoxila. O sinal relativo à ressonância de um próton em δ H 12,17, é característico de uma hidroxila quelatogênica na posição 5 (**Figura 55**).

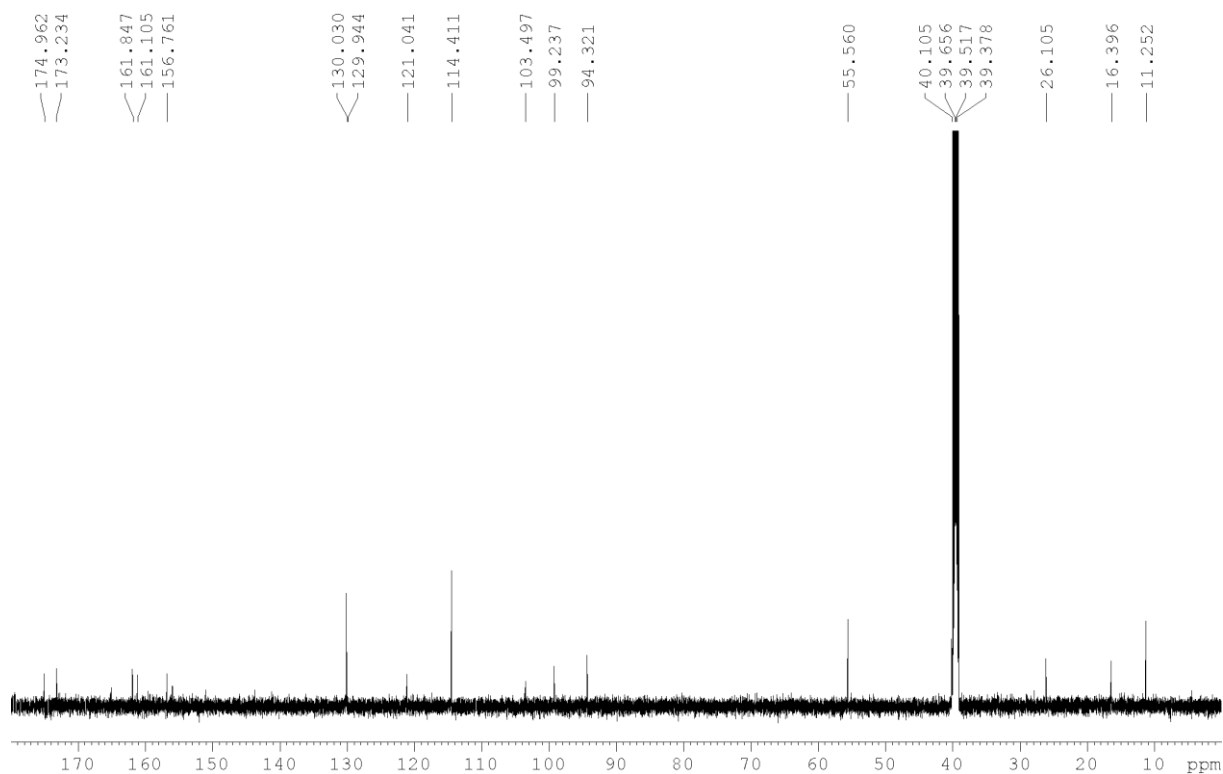
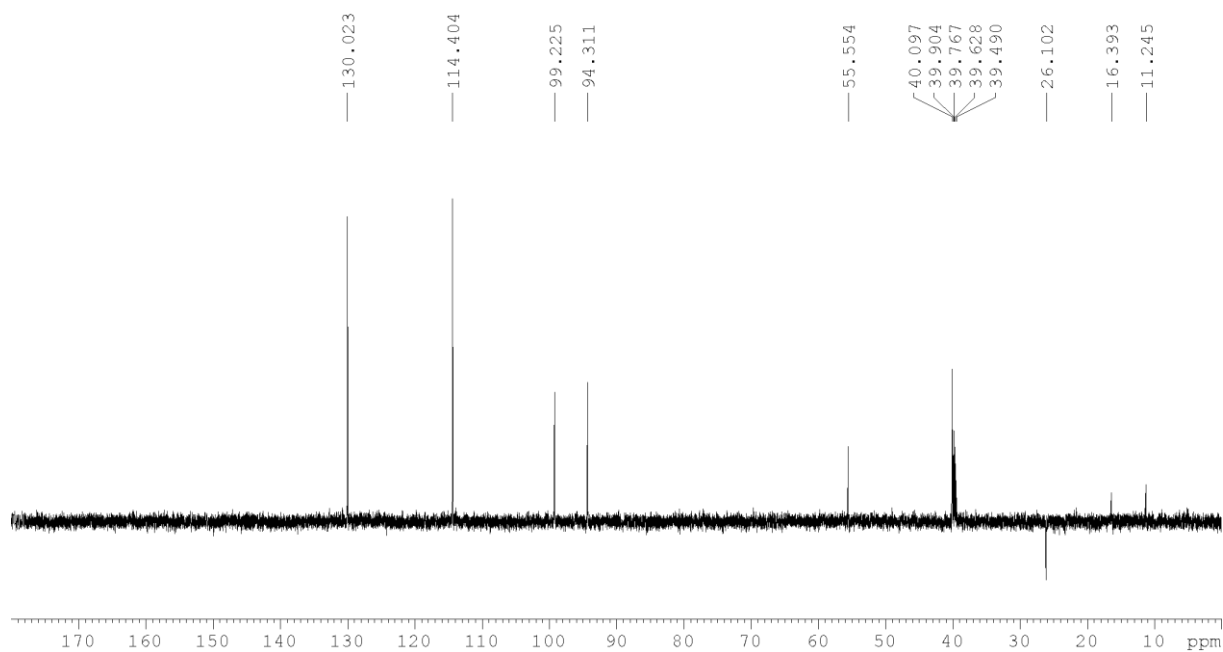
Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H de S2 (DMSO- d_6 ; 600 MHz)



Foi possível observar ainda sinais em δ H 2,67; 1,70 e 1,54 ppm, referentes a um hidrogênio cada e em δ H 1,18 e 0,89, referentes a três hidrogênios cada (**Figura 56**).

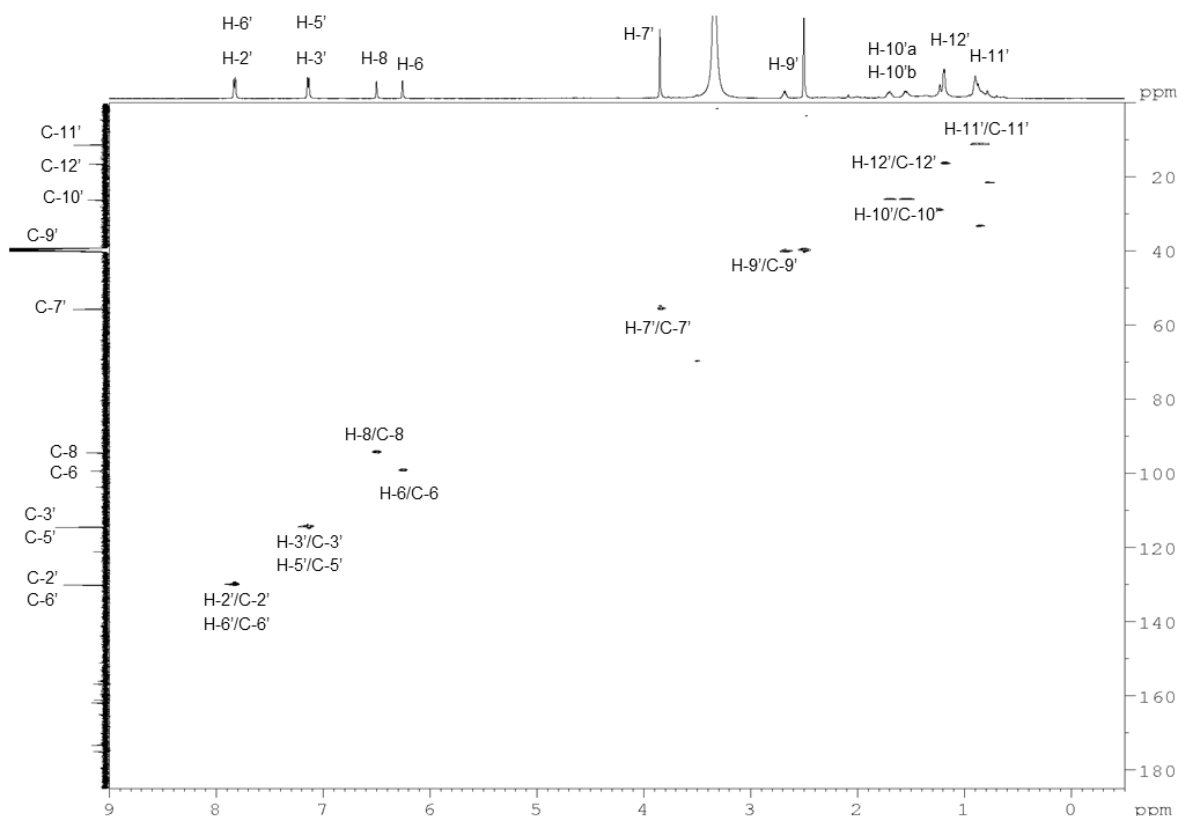
Figura 56 - Expansões do espectro de RMN de ^1H de S2 (DMSO- d_6 ; 600 MHz)

O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 57**) apresentou ressonância de 21 carbonos, destacando dois sinais, em δC 174,9 e 173,2, com deslocamentos químicos característicos de grupos carbonílicos. A análise do sub-espectro DEPT-135 (**Figura 58**) possibilitou confirmar a presença dos três grupos metila (δC 55,5; 16,3 e 11,2) e de sete grupos metínicos (δC 130,0; 114,4; 99,2; 94,3 e 40,1), além de evidenciar a presença de um grupo metilênico (δC 26,1). Correlacionando esses dados com os obtidos pelo espectro de massas, pode-se dizer que a massa molar de 384 Da é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_7$.

Figura 57 - Espectro de RMN de ^{13}C de S2 (DMSO- d_6 ; 150 MHz)**Figura 58** - Sub-espectro DEPT-135 de S2 (DMSO- d_6 ; 150 MHz)

A análise do mapa de contornos HSQC (**Figura 59**) indicou a correlação dos sinais de hidrogênio do anel aromático *p*-dissubstituído (δH 7,14 e 7,82 ppm), com as ressonâncias dos carbonos em δC 114,4 ppm (C3' e C5') e 130,0 ppm (C2' e C6'), respectivamente, enquanto os sinais em δH 6,25 e 6,49 ppm apresentaram correlações com os sinais de carbono em δC 99,2 e 94,3 ppm, respectivamente. Já para o grupo metoxila (δH 3,84 ppm), observou-se a correlação com a ressonância do carbono em δC 55,5 ppm. As demais correlações observadas estão descritas na **Figura 59**.

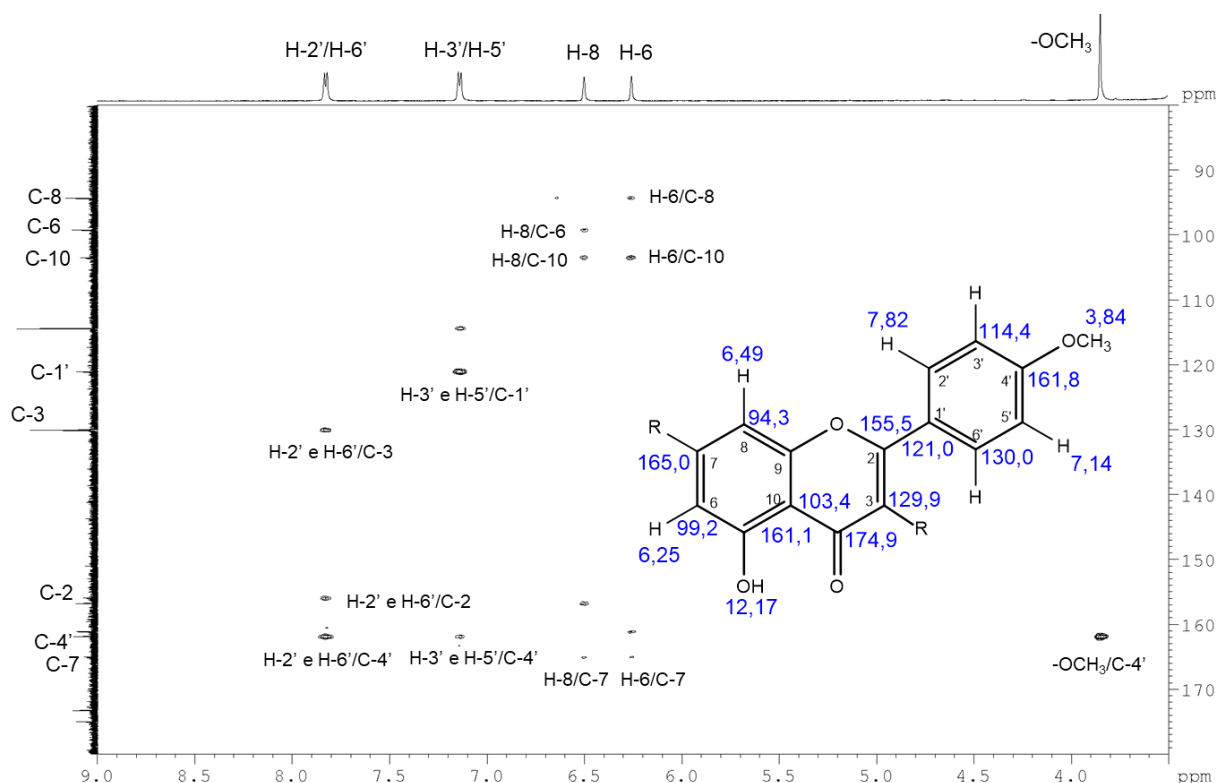
Figura 59 - Mapa de contornos HSQC de S2 (DMSO- d_6)



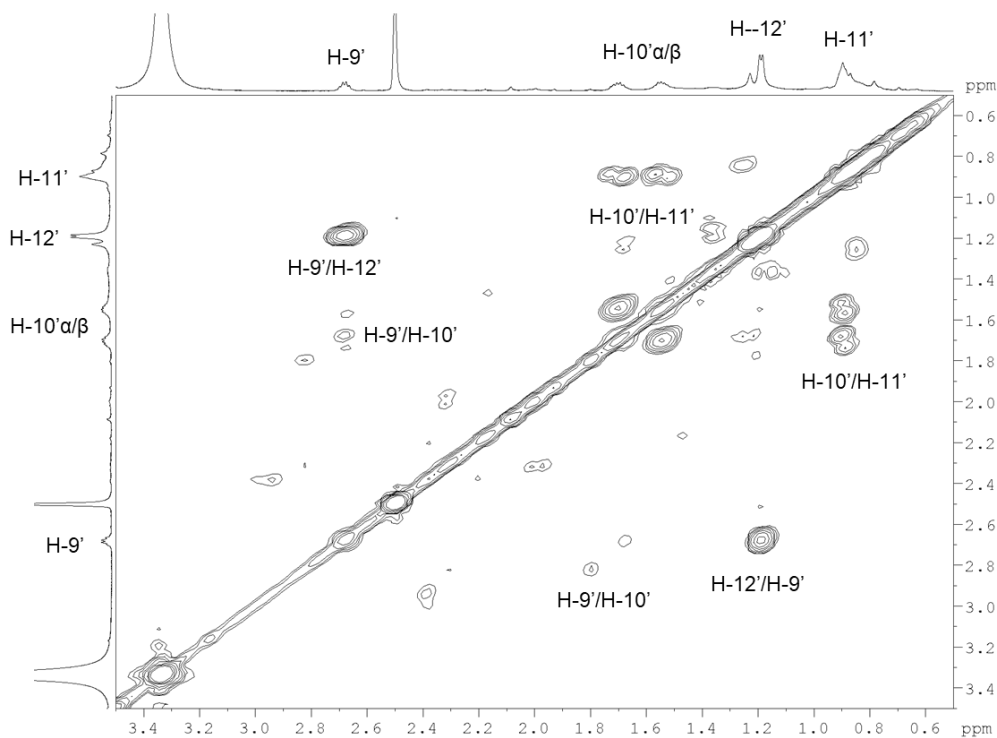
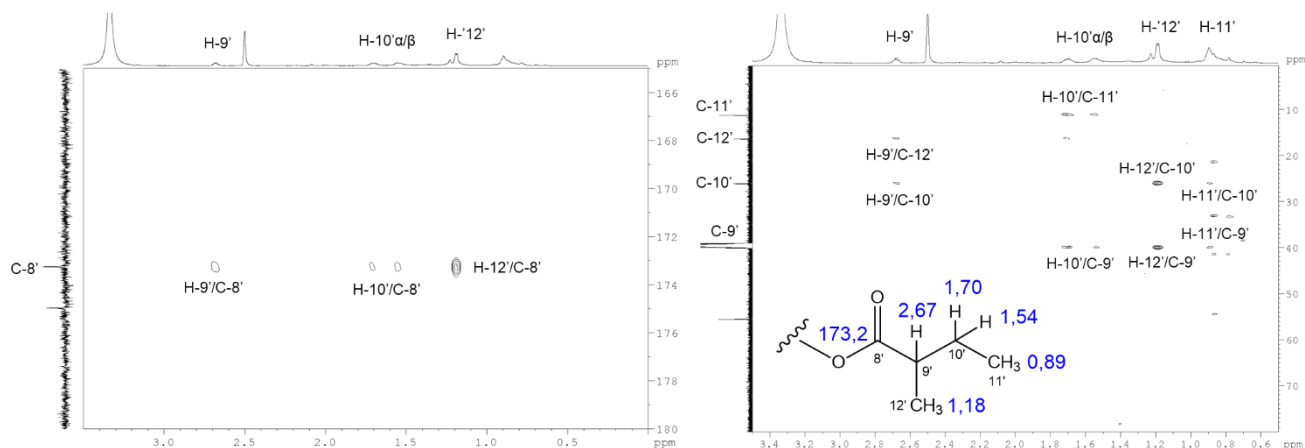
O mapa de contornos HMBC apresentou manchas de correlação entre os sinais atribuídos a H-3' e H-5' (δH 7,14 ppm) e os sinais dos carbonos em δC 161,8 e 121,0 ppm, atribuídos respectivamente a C-4' e C-1'. Adicionalmente, pode-se observar as correlações dos sinais de H-2' e H-6' (δH 7,82 ppm) com os sinais do carbono C-4' e os sinais em δC 155,8 e 129,9 ppm, atribuídos a C-2 e C-3, respectivamente. O sinal referente ao simpleto do grupo metila (δH 3,84 ppm) apresentou correlação com o sinal do carbono C-4', possibilitando definir a localização do grupo metoxila nessa posição. As correlações entre H-6 e H-8 (δH 6,25 e 6,49 ppm) e o carbono em δC

103,4 ppm (C-10), podem indicar a posição meta desses grupos, o que é corroborado pelas manchas de correlação entre H-6 e C-8 (δC 94,3 ppm) e H-8 e C-6 (δH 99,2 ppm). É possível observar ainda sinais da correlação de H-6 e H-8 com o carbono em δC 165,0 ppm, atribuindo-o à posição 7 (**Figura 60**).

Figura 60 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de S2 (DMSO- d_6)



A partir do mapa de correlações homonucleares COSY (**Figura 61**), foi possível determinar a presença de um grupo sec-butila, através das manchas de correlação entre H-9' (δH 2,67 ppm), H-10' α/β (δH 1,54 e 1,70 ppm), H-11' (δH 0,89 ppm) e H-12' (δH 1,18 ppm). No mapa de contornos HMBC (**Figura 62**) observou-se correlações entre H-9', H-10' α/β e H-11' com o sinal da carbonila em δC 173,2 ppm (C-7'), sugerindo se tratar de um éster sec-butílico. Também foi possível verificar correlações entre H-9'/C-10' e H-9'/C-12'; entre H-10'/C-9' e H-10'/C-11', além de H-11' e H-12' com C-9' e C-10'.

Figura 61 - Expansão do mapa de correlações homonucleares COSY de S2 (DMSO-d6)**Figura 62** - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de S2 (DMSO-d6)

Considerando a massa molar, além desse grupo éster, a estrutura possui ainda uma hidroxila. As duas possibilidades de ligação desses seriam nas posições 3 e 7. Considerando o espectro no UV, o máximo de absorção da banda I (sistema cinamoila) é 326 nm, característico de uma flavona. Sendo assim, embora não haja no mapa de contornos HMBC qualquer correlação entre o sinal de C-3 e H-9', pode-se inferir que o ácido 2-metilbutírico se encontra na posição 3, fixando assim a

hidroxila na posição 7. A presença desse grupo éster ligado ao C-3 explica o máximo de absorção no UV da banda cinamoíla abaixo de 350 nm, já que os elétrons do oxigênio estão em ressonância com a carbonila. Não foi encontrado na literatura nenhuma substância com essa estrutura, tratando-se assim de uma flavona inédita **(69)**. A **Tabela 23** apresenta os dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para S2 (3-O-(2-metil-butanoato)-5,7-di-hidroxi-4'-metoxi-flavona), em comparação com o flavonol obtido da hidrólise do éster, o kaempferide. Flavonas C-glicosídicas aciladas com o ácido 2-metil-butírico foram isoladas de *Trollius ledebouri*, *Trollius chinensis* e *Hemistepta lyrata*, porém com esse grupo éster ligado ao glicosídeo (DONG et al., 2010; LI et al., 2009; ZOU; YANG; ZHOU, 2004).

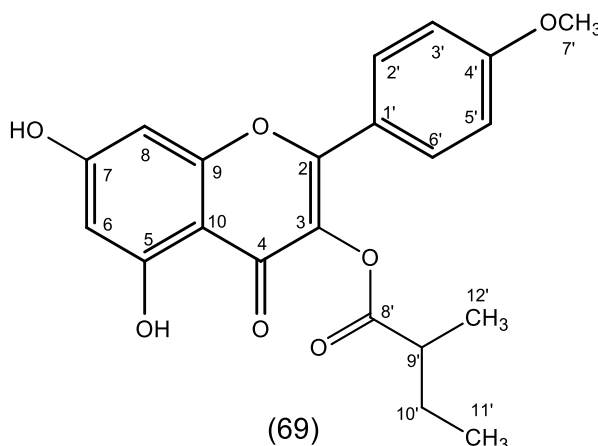


Tabela 23 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para S2 (DMSO- d_6 ; 600 MHz) comparação com dados da literatura descritos para canferídeo

Posição	S2		Kaempferide*	
	δH (J em Hz)	δC	δH (J em Hz)	δC
1	-	-		
2		155,8		146,9
3		129,9	9,47; s	136,7
4		174,9		176,6
5	12,17; s	161,1	12,43; s	156,8

6	6,25; s	99,2	6,24; s	99,1
7		165,0	10,83; s	164,8
8	6,49; s	94,3	6,42; s	94,0
9		156,7		161,3
10		103,4		103,8
1'		121,0		124,1
2'	7,82; d (8,5)	130,0	8,12; d (7,8)	129,8
3'	7,14; d (8,5)	114,4	7,18; d (7,8)	114,7
4'		161,8		160,1
5'	7,14; d (8,5)	114,4	7,18; d (7,8)	114,7
6'	7,82; d (8,5)	130,0	8,12; d (7,8)	129,8
7'	3,84; s	55,5	3,85; s	-
8'		173,2		
9'	2,67; m	40,1		
10'	1,70; m 1,54; m	26,1		
11'	0,89; m	11,2		
12'	1,18; d (6,5)	16,3		

d: duplete; dd: duplete duplo; td: triplo duplete; m: multiplete; q: quarteto; s: simpleto; t: tripleto

* (FANG et al., 2018) - ^1H RMN e ^{13}C RMN– 600 MHz; DMSO-d₆

Para confirmar a presença de uma hidroxila na posição 7 e do ácido 2-metilbutírico na posição 3, foi realizada uma análise espectrofotométrica no ultravioleta. A substância foi avaliada em metanol e na presença de hidróxido de sódio (NaOH) e acetato de sódio (NaOAc), com o objetivo de determinar os máximos de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$). Os resultados estão apresentados na **Tabela 24**. O espectro no UV da substância em metanol confirma sua classificação como flavona, evidenciada pela

banda I com $\lambda_{\text{máx}}$ em 326 nm. A adição de NaOH promoveu um efeito batocrômico, alterando o $\lambda_{\text{máx}}$ para 273 nm na banda II e para 360 nm na banda I. De forma similar, a adição de NaOAc provocou deslocamentos comparáveis (banda I: $\lambda_{\text{máx}}$, = 357nm e banda II: $\lambda_{\text{máx}}$ = 274nm) corroborando a presença de uma hidroxila de caráter ácido no anel A. Finalmente, ao adicionar ácido à solução, os espectros retornaram às condições iniciais.

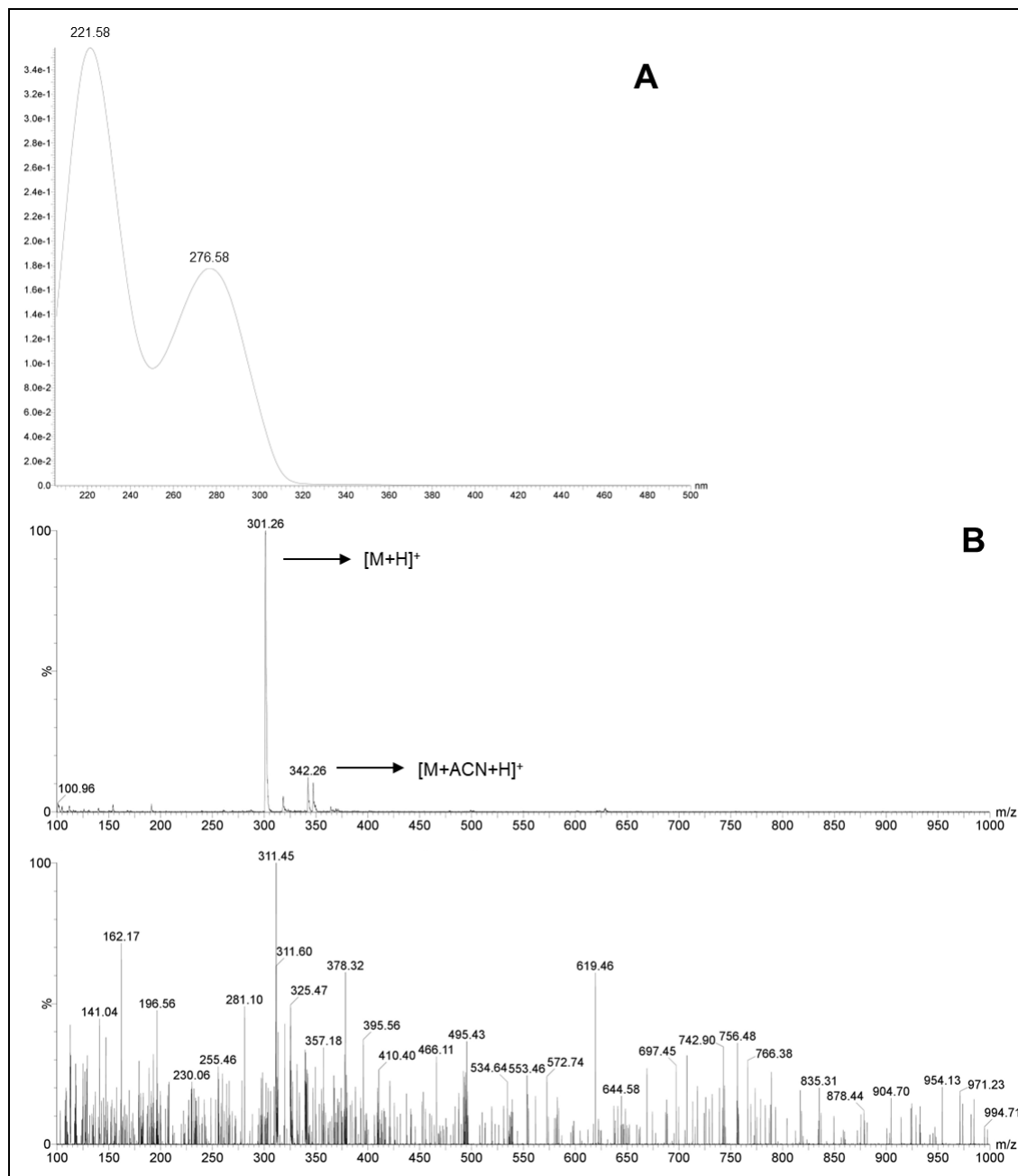
Tabela 24 - Análise espectroscópica no ultravioleta de S2 (em metanol e após adição de NaOH e NaOAc)

	Banda II (benzoíla) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Banda I (cinamoíla) $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
MeOH	264	326
MeOH + NaOH	273	360
MeOH + NaOAc	274	357
Adição de ácido	264	319

5.7.6 Elucidação estrutural de A6 isolado de *B. stylosa*

Foi obtido um sólido branco. A substância A6 foi analisada por UPLC-ESI-MS e o pico em 8,31 minutos apresentou máximos de absorção no UV em 221 e 276 nm e íons em m/z 301 $[M+H]^+$ e 342 $[M+ACN+H]^+$, conforme demonstrado na **Figura 63**. Observando o máximo de absorção no UV e a massa molecular da substância, pode-se inferir que pertence a classe dos terpenos. No modo de ionização negativo, não foi possível obter nenhum íon característico da substância, o que é comum para essa classe de produtos naturais.

Figura 63 - Espectro de absorção no UV (A) e espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de A6
(Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



O espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 64**) indicou sinais de ressonância de 20 átomos de carbono e, a partir da análise do sub-espectro DEPT 135 e do mapa de contornos HSQC, foram identificados sinais de seis carbonos quaternários (δC 169,7; 154,3; 151,6; 148,4; 39,9 e 33,6 ppm) e seis carbonos metilênicos (δC 108,0; 42,1; 40,1; 36,6; 23,4 e 19,1 ppm) (**Figuras 65 e 66**). Os demais sinais na região de 100 a 150 ppm são característicos de carbonos com hibridização sp^2 , enquanto o sinal em

δC 169,7 sugere a presença de uma carbonila. Diante disso, é possível pressupor que se trata de um diterpeno.

Figura 64 - Espectro de RMN de ^{13}C de A6 (CDCl_3 ; 100 MHz)

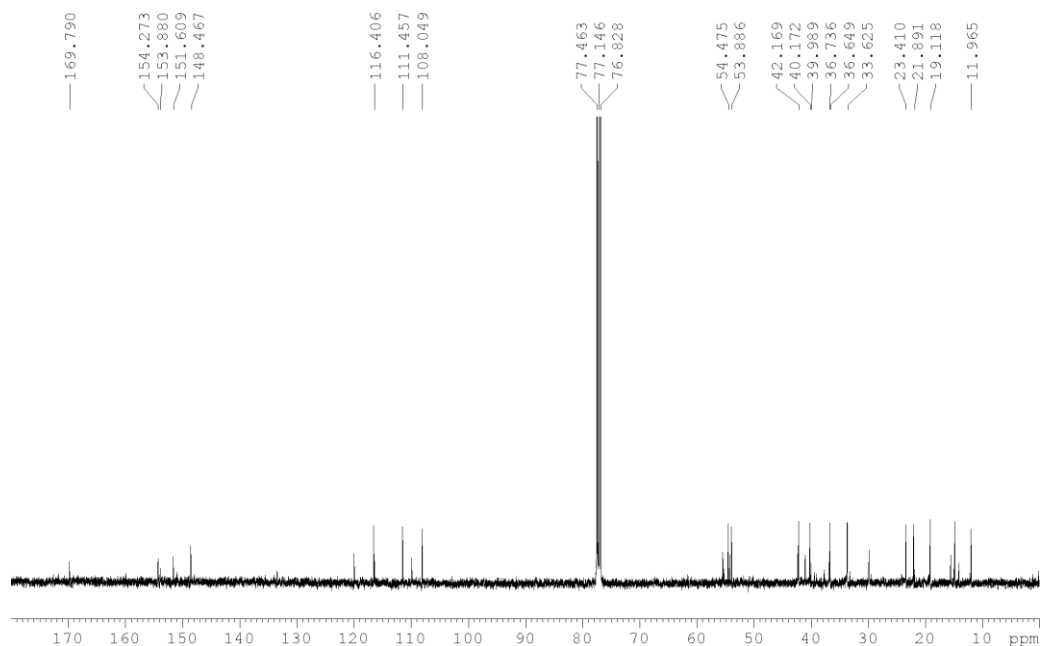


Figura 65 - Sub-espectro de DEPT-135 de A6 (CDCl_3 ; 100 MHz)

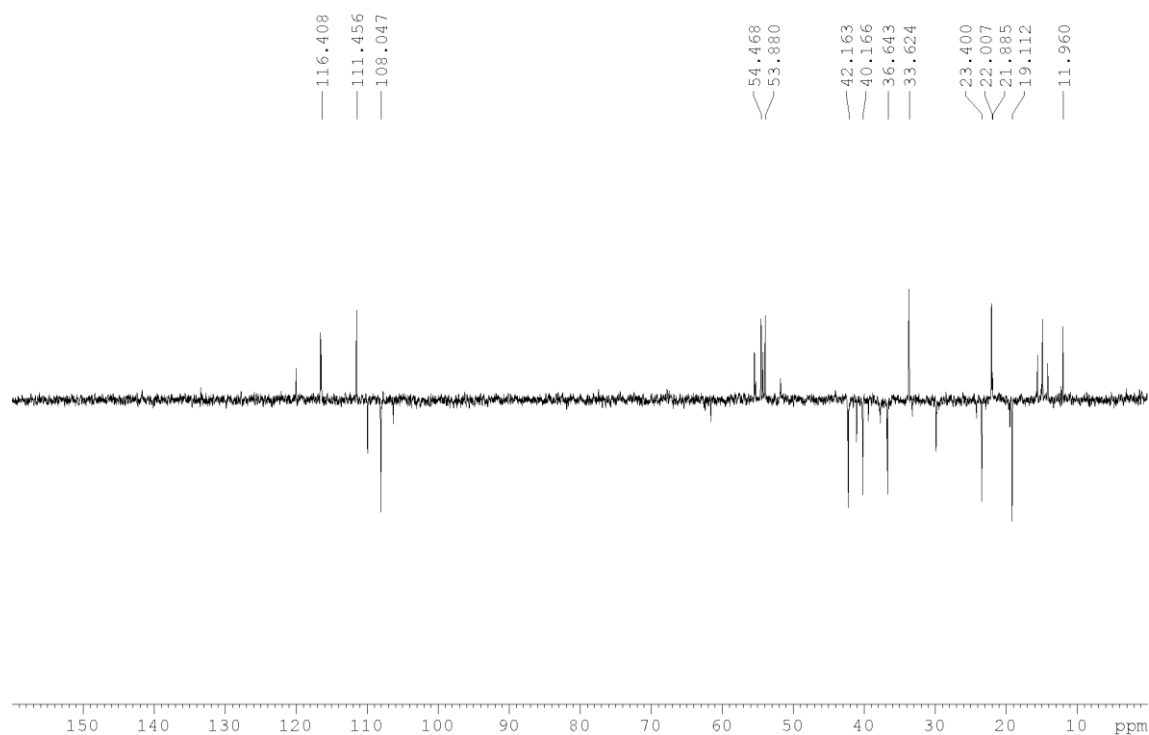
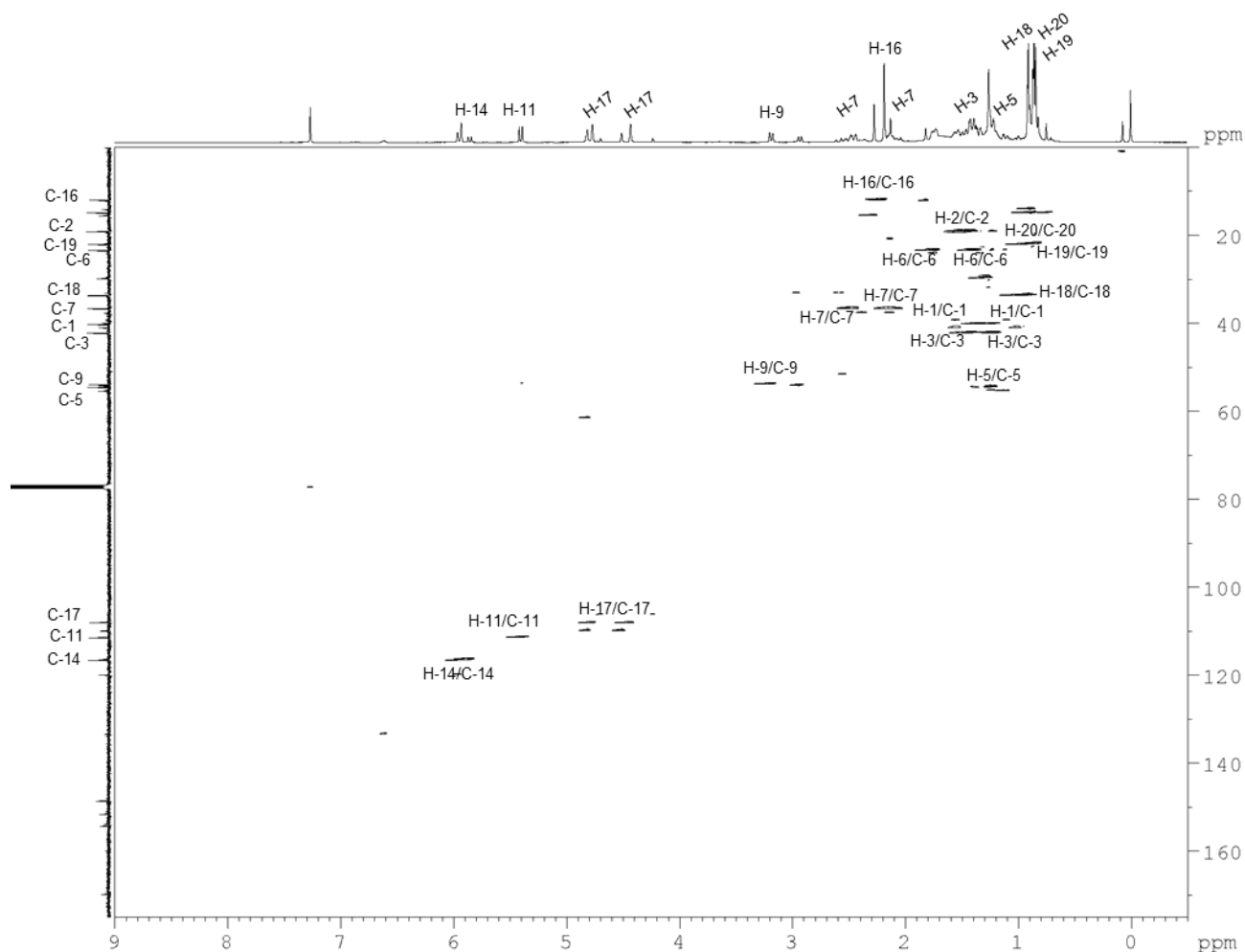
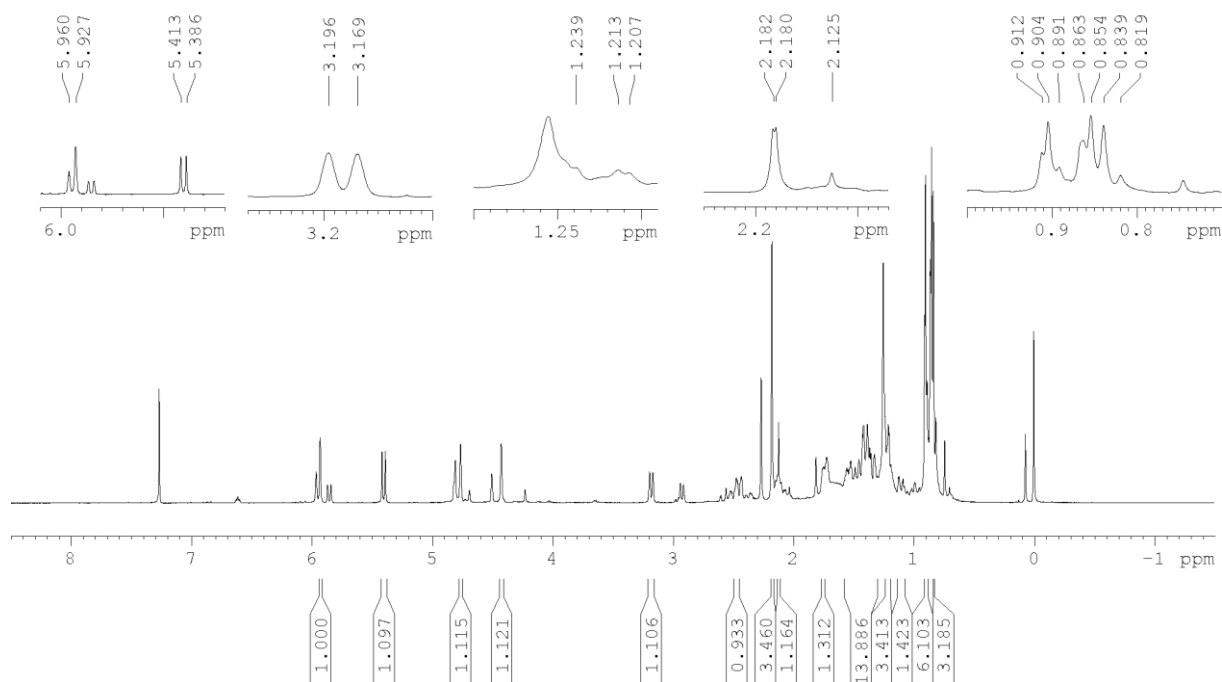
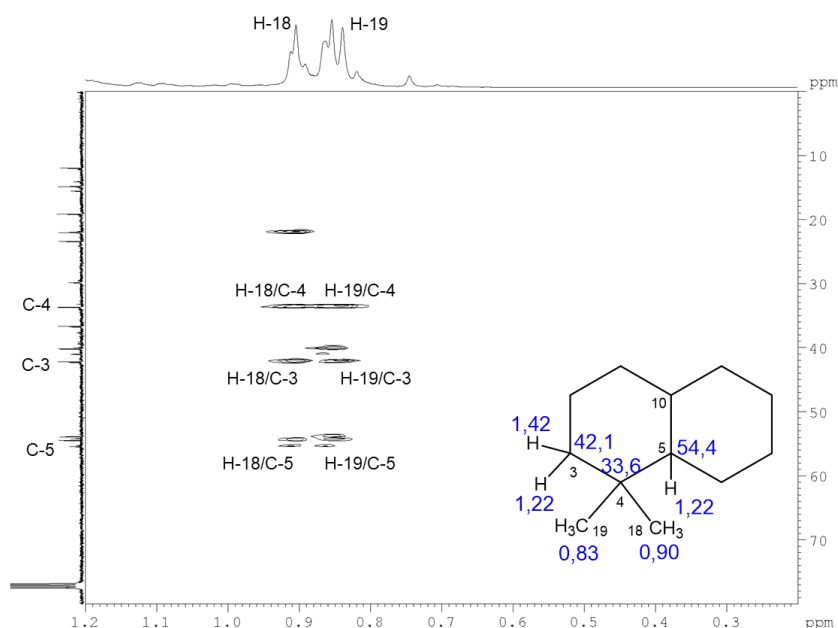


Figura 66 - Mapa de contornos HSQC de A6 (CDCl₃)

A análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 67**) revelou quatro sinais (δH 2,18; 0,90; 0,85 e 0,83 ppm) correspondentes à três hidrogênios cada, demonstrando assim a presença de quatro grupos metila, o que está de acordo com o observado pela análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subespectro DEPT-135. Dessa forma, é possível afirmar que a molécula é composta por quatro grupos metínicos (δH 5,92; 5,40; 3,18 e 1,24 ppm). Correlacionando esses dados com os obtidos pelo espectro de massas, pode-se dizer que a massa molar de 300 Da é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$.

Figura 67 - Espectro de RMN de ^1H de A6 (CDCl_3 ; 400 MHz)

O esqueleto de um diterpeno é formado a partir de ciclizações e rearranjos do precursor geranilgeranil difosfato (GGPP), seguida de uma série de modificações (ASHOUR; WINK; GERSHENZON, 2010). As manchas de correlação observadas no mapa de contornos HMBC entre o carbono quaternário em δC 33,6 ppm (C-4) e os sinais em δH 0,83 e 0,90 ppm, atribuídos a duas metilas, indicam a substituição nesta posição 4, evidenciando a estrutura de um diterpeno (**Figura 68**). Também no HMBC, é possível observar correlações entre os sinais desses mesmos hidrogênios metílicos (CH_3 18 e CH_3 19) e os carbonos em δH 54,4 e 42,1 ppm, possibilitando atribuir estes sinais aos carbonos C-5 e C-3, respectivamente.

Figura 68 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de A6 (CDCl₃)

A partir da análise do mapa de correlações homonucleares COSY (**Figura 69**) e do mapa de contornos HMBC (**Figura 70**), foi possível atribuir os demais sinais de ressonância do núcleo terpênico. No COSY, observa-se correlações entre os sinais em δH 1,22 ppm (H-5) e 1,74 ppm (H-6), entre H-6 e os sinais em δH 2,45 e 2,12 ppm (H-7) e entre o grupo metínico em δH 5,40 ppm (H-11) e o sinal em δH 3,18 ppm, atribuído a H-9. Já no HMBC, verifica-se correlações entre H-5 e os sinais em δC 40,1 e 53,8 ppm (C-1 e C-9, respectivamente) e entre H-9 e os sinais em δC 40,1 e 39,9 ppm (C-1 e C-10, respectivamente). Também é possível observar correlação entre os sinais em δH 0,90 ppm (H-18) e em δC 19,1 ppm (C-2).

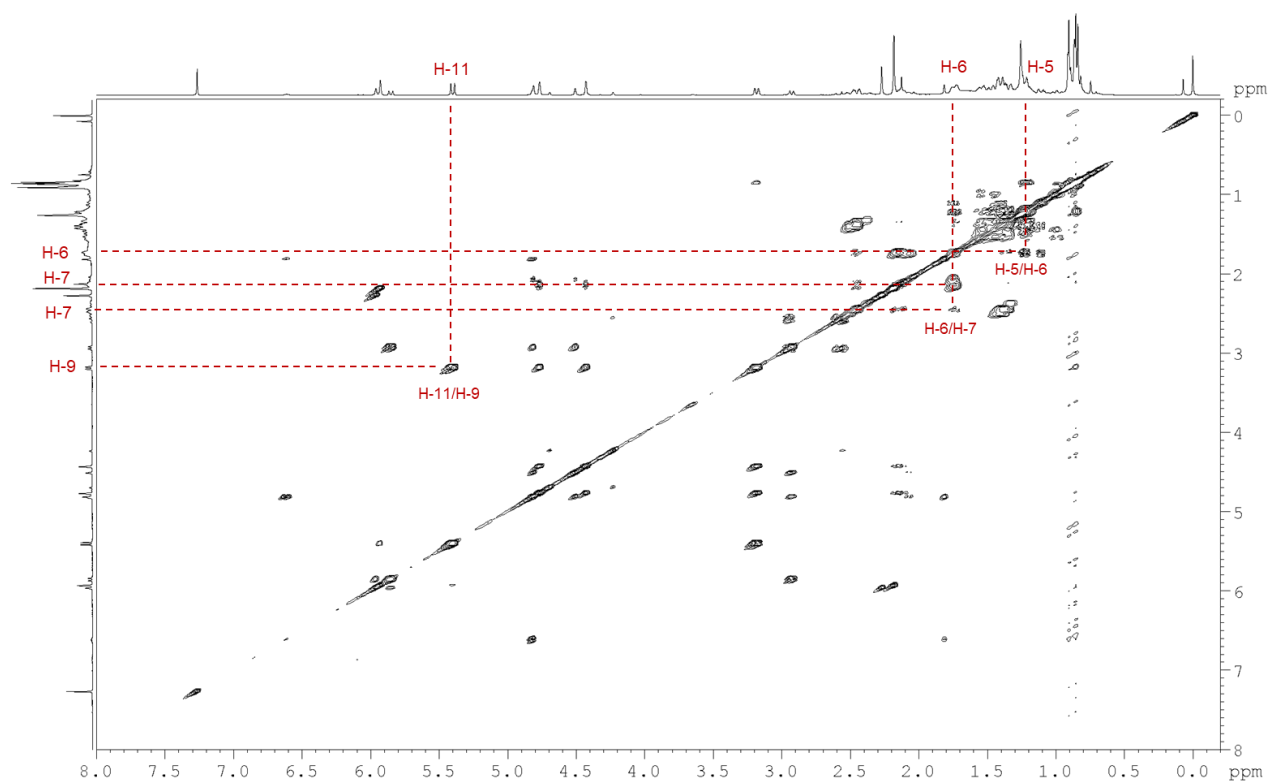
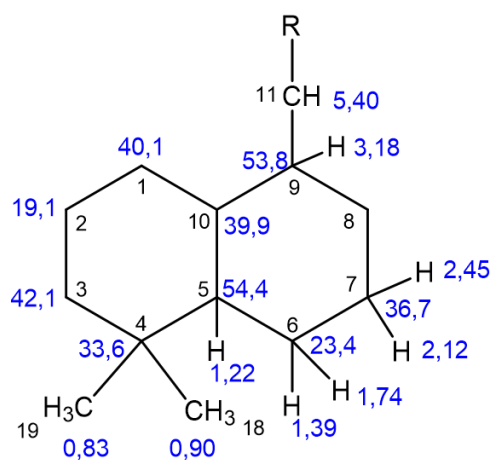
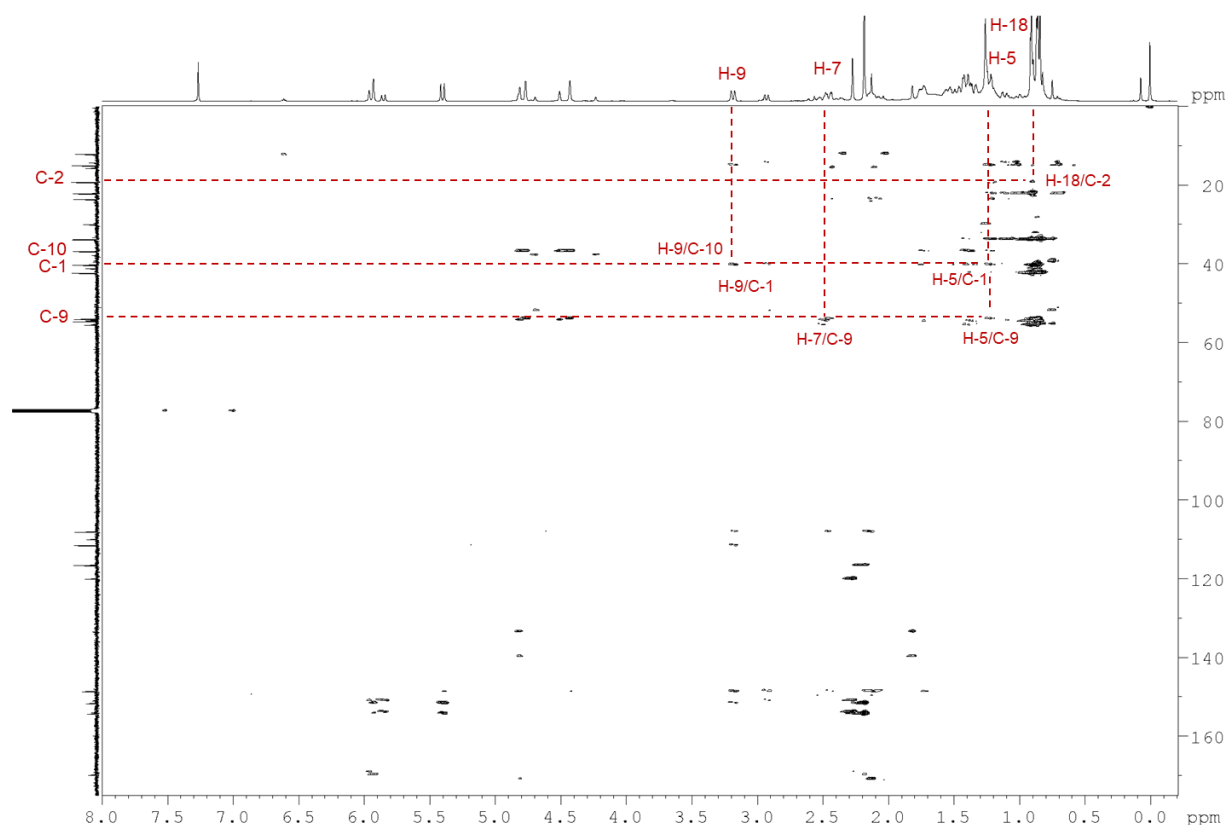
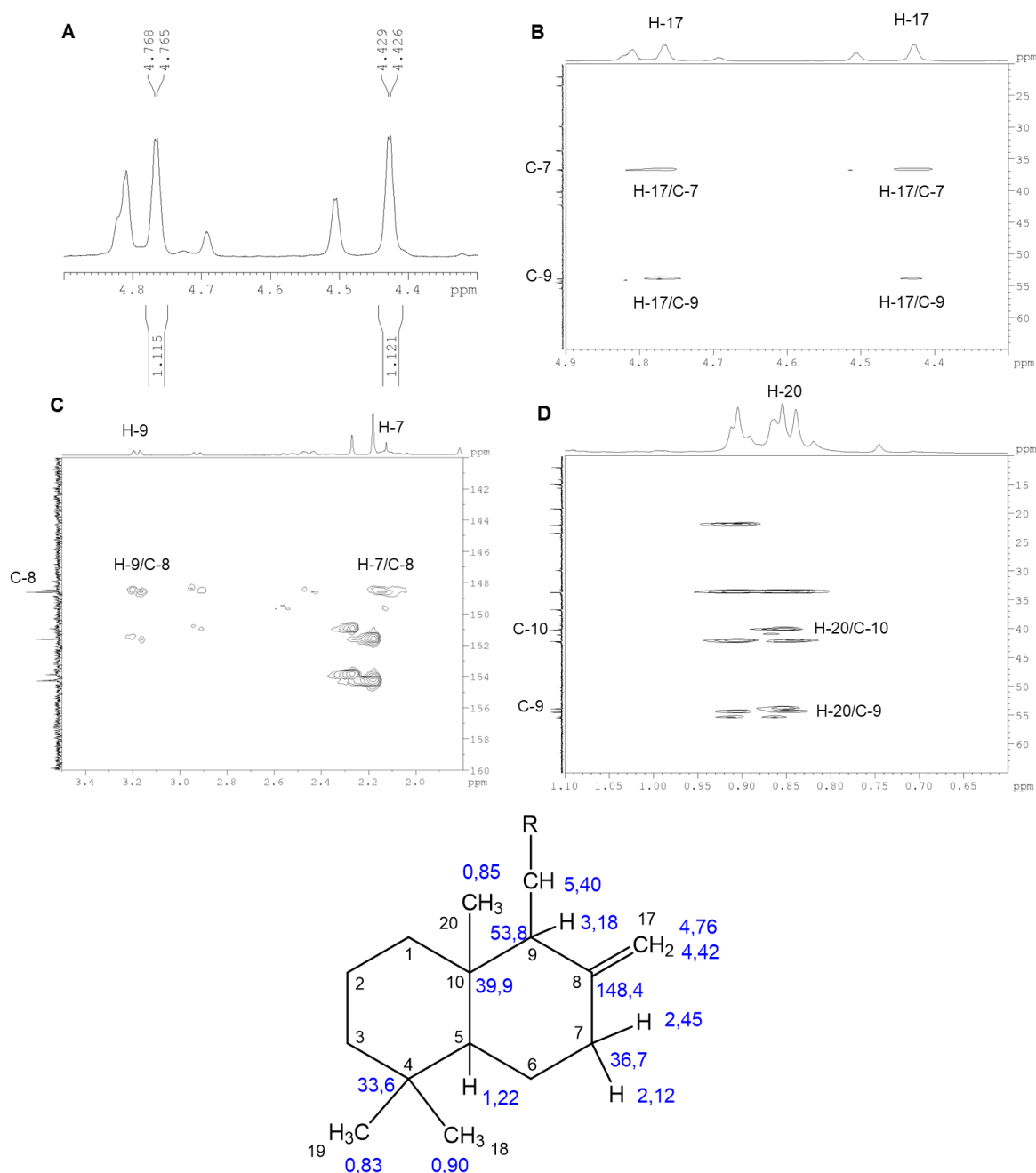
Figura 69 - Mapa de correlações homonucleares COSY de A6 (CDCl₃)

Figura 70 - Mapa de correlações heteronucleares HMBC de A6 (CDCl₃)

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 71A**) foi possível observar, ainda, dois dupletos centrados em δH 4,76 e 4,42 ppm (J 1,3 Hz), correspondentes a um hidrogênio cada, característicos de prótons de ligação dupla terminal. No mapa de contornos HMBC (**Figura 71B**) observa-se correlações desses hidrogênios com os sinais dos carbonos em δC 53,8 ppm (C-9) e δC 36,7 ppm (C-7), possibilitando definir a posição da dupla terminal em C-8. Adicionalmente, foram observadas manchas de correlação entre H-9 e H-7 (δH 2,12 ppm) e o carbono quaternário em δC 148,4 ppm

(**Figura 71C**). A correlação entre o grupo metílico em δH 0,85 ppm e os carbonos em δC 53,7 e 54,3 ppm, atribuídos a C-9 e C-5 respectivamente, observadas no mapa de contornos HMBC (**Figura 71D**), permitiram determinar a ligação deste grupo em C-10.

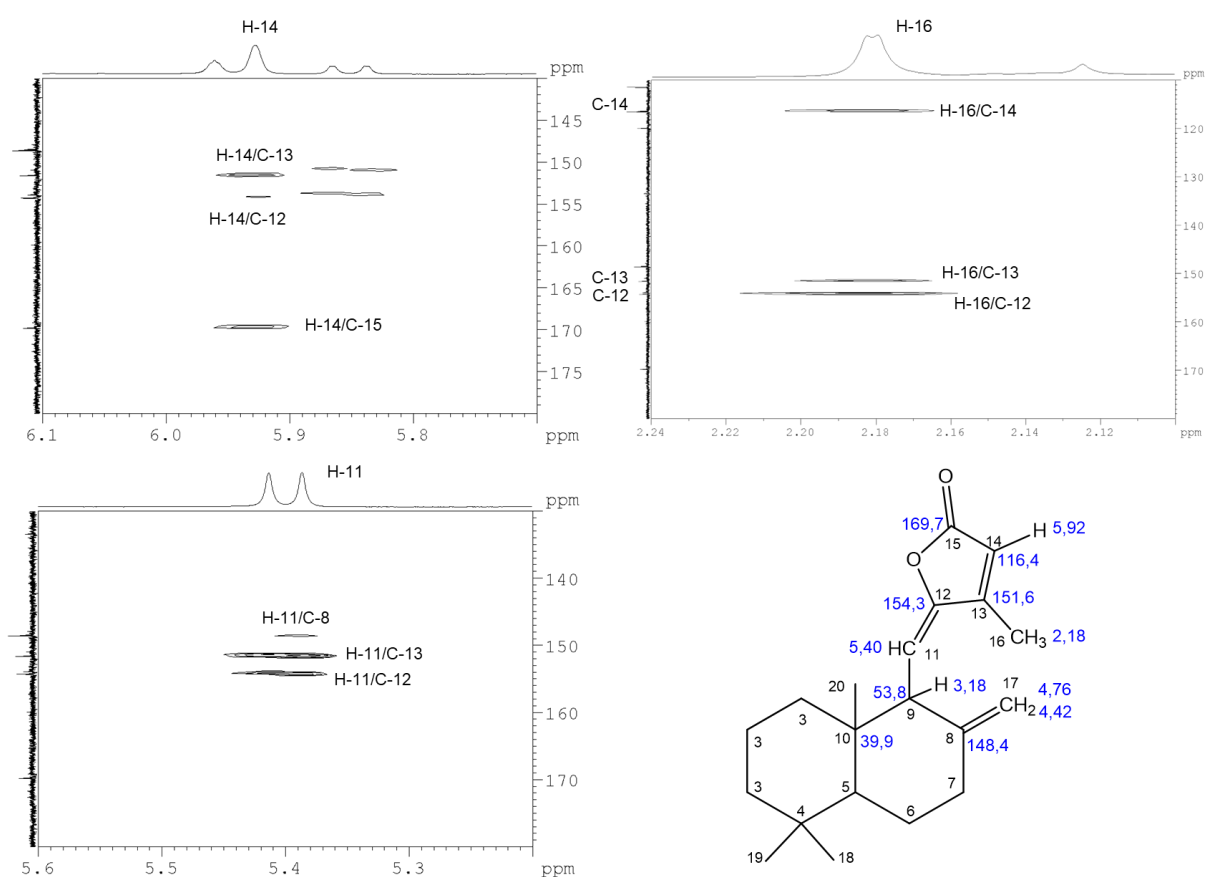
Figura 71 - Expansões do espectro de RMN de 1H (A) e do mapa de correlações heteronucleares HMBC (B e C) de A6



Ainda no HMBC, observou-se uma mancha de correlação entre o sinal da carbonila em δC 169,7 ppm e o hidrogênio em δH 5,92 ppm (H-14), bem como deste

hidrogênio com os sinais dos carbonos em δC 154,3 e 151,6 ppm, sugerindo a presença de uma lactona α,β insaturada. A correlação entre os sinais dos prótons em δH 2,18 ppm e o carbono em δC 116,4 (C-14), indica a localização do grupo metila na insaturação. O duplete referente ao sinal do hidrogênio em δH 5,40 ppm, atribuído a H-11, apresenta constante de acoplamento escalar de 11 Hz, indicando sua localização adjacente a hidrogênio metínico na posição 9. As correlações entre os carbonos em δC 154,3 e 151,6 ppm e o sinal do próton em δH 5,40 ppm indicam a ligação dessa insaturação à lactona (**Figura 72**).

Figura 72 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de A6 (CDCl₃)



Dessa forma, pode-se caracterizar a substância A6 como um diterpeno com esqueleto labdânico denominado (*E*)-13-metil-12-(((9*R*,10*R*)-4,4,10-trimetil-8-metilenodecahidronaftaleno-9-il)metileno)-2(5*H*)diona (**70**). A **Tabela 25** apresenta os dados espectroscópicos de RMN de ¹H e ¹³C obtidos para A6.



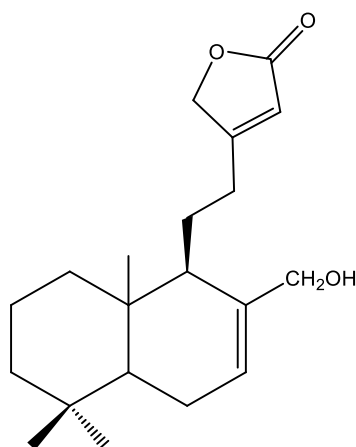
Tabela 25 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C obtidos para A6 (CDCl_3 ; 400 MHz)

Posição	δH (J em Hz)	δC
1	1,23; m 1,35; m	40,1
2	1,46; m 1,46; m	19,1
3	1,23; m 1,44; m	42,1
4		33,6
5	1,22; m	54,4
6	1,39; m 1,74; m	23,4
7	2,12; m 2,46; m	36,7
8		148,4
9	3,18; d (10,5)	53,8
10		39,9
11	5,40; d (10,5)	111,4

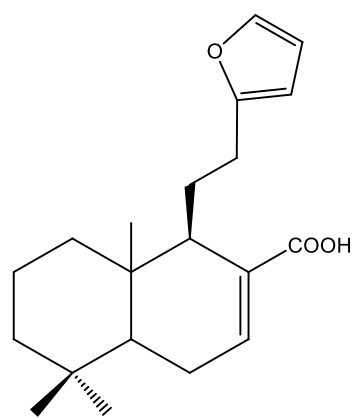
12		154,3
13		151,6
14	5,92; s	116,4
15		169,7
16	2,18; s	11,8
17	4,42; d (1,4) 4,76; d (1,4)	108,0
18	0,90; m	33,5
19	0,83; m	21,9
20	0,85; m	21,8

d: duplete; dd: duplete duplo; td: triplo duplete; m: multiplete; q: quarteto; s: simpleto; t: tripleto

Não foi encontrada na literatura nenhuma substância com essa estrutura, sendo a primeira vez descrita no presente trabalho. Entretanto, já foram isolados em outras espécies de *Baccharis* diterpenos com estruturas semelhantes, como 17-hidroxi-labdan-7,13-dien-15-ácido-16-lactona **(71)** e o ácido furolabd-7-en-17-óico **(72)**, isolados das partes aéreas de *B. eggesi* e *B. pingraea*, respectivamente (BOHLMANN et al., 1985; WÄCHTER; MONTENEGRO; TIMMERMANN, 1999).



(71) 17-hidroxi-labdan-7,13-dien-15-ácido-16-lactona

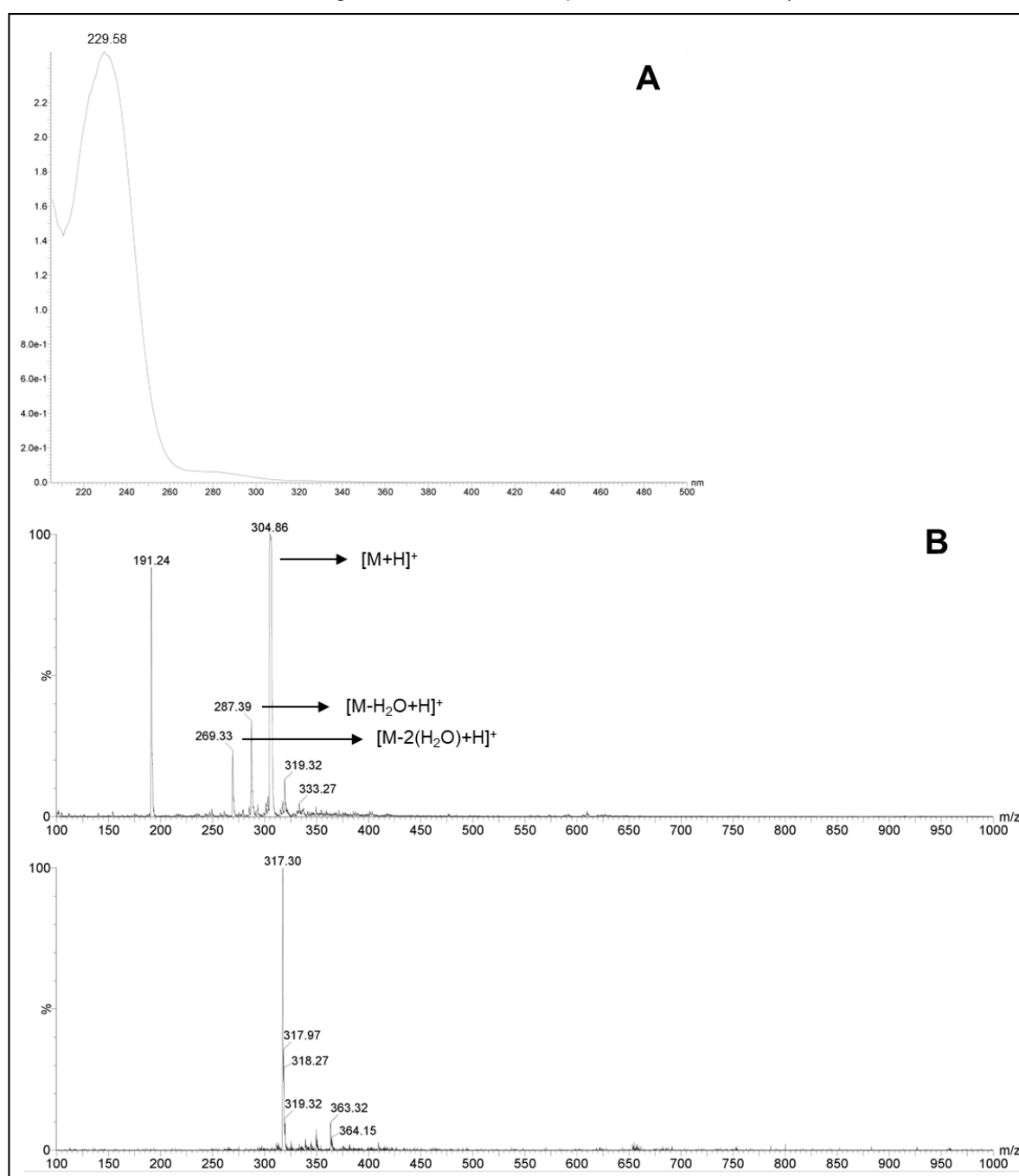


(72) ácido furolabd-7-en-17-óico

5.7.7 Elucidação estrutural de B3 isolado de *B. stylosa*

A fração B3 foi analisada por UPLC-ESI-MS e o pico majoritário com $T_r = 7,41$ minutos apresentou máximos de absorção no UV em 229 nm e íons em m/z 305 $[M+H]^+$, 287 $[M-H_2O+H]^+$ e 269 $[M-2(H_2O)+H]^+$, conforme demonstrado na **Figura 73**. Observando o máximo de absorção no UV e a massa molecular de B3, pode-se inferir que pertence a classe dos terpenos, com duas funções oxigenadas na molécula.

Figura 73 - Espectro no UV (A) e o espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de B3 (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



Analisando os dados espectroscópicos obtidos para B3, foram observadas semelhanças estruturais com o diterpeno descrito na seção 5.7.6. Porém, o espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 74**) indicou sinais de ressonância de 29 carbonos e, a partir das análises subsequentes do subespectro DEPT 135 (**Figura 75**), pôde-se inferir que se tratava de uma mistura de dois diterpenos relacionados estruturalmente.

Figura 74 - Espectro de RMN de ^{13}C de B3 (CDCl_3 ; 100 MHz)

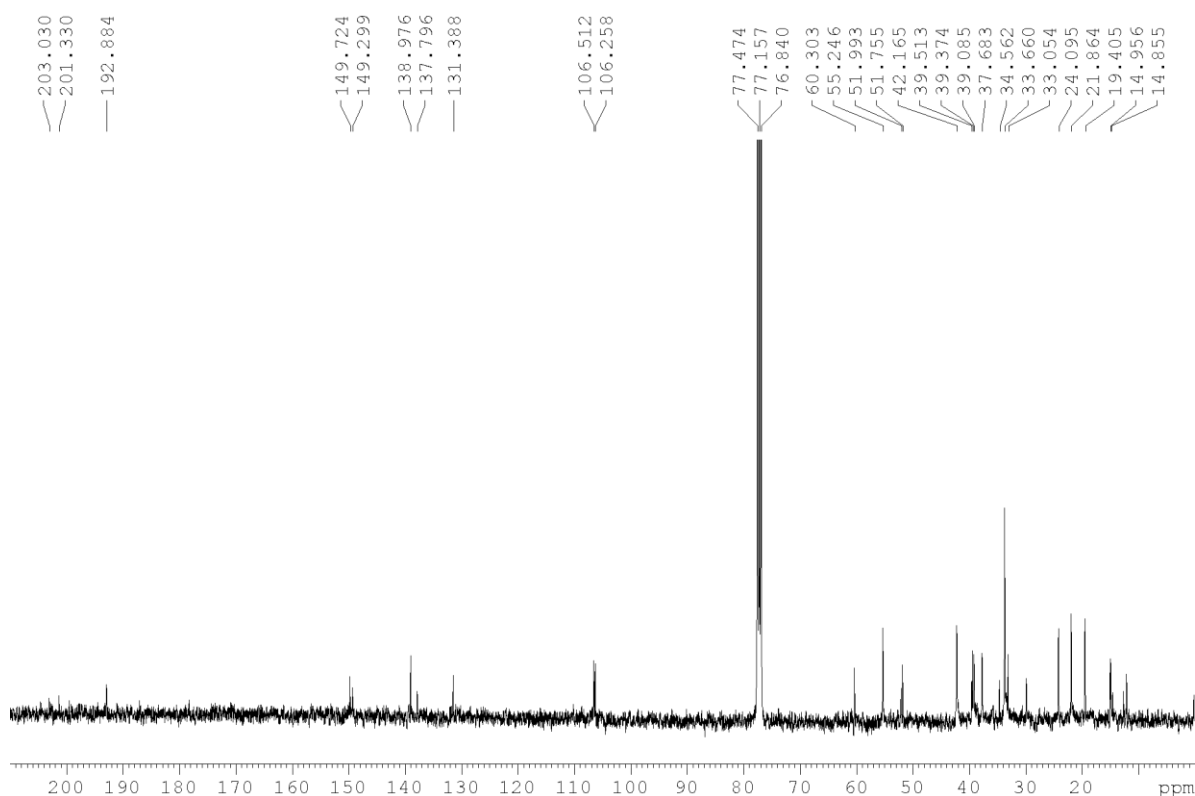
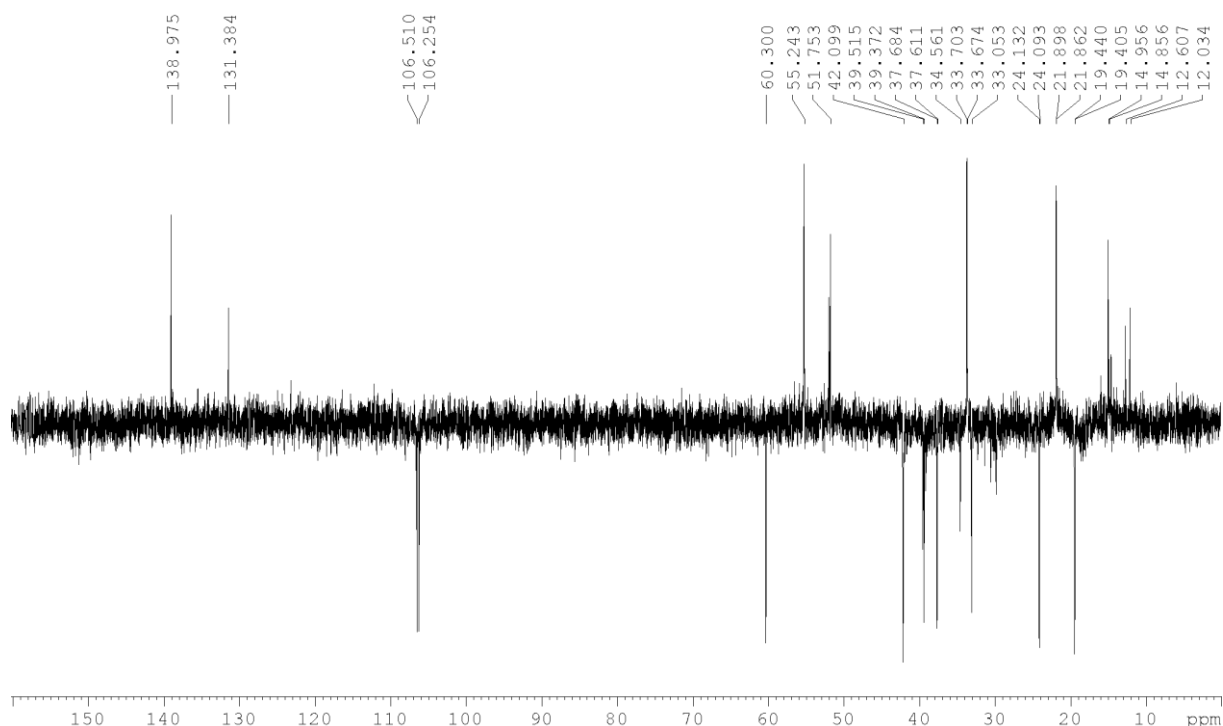
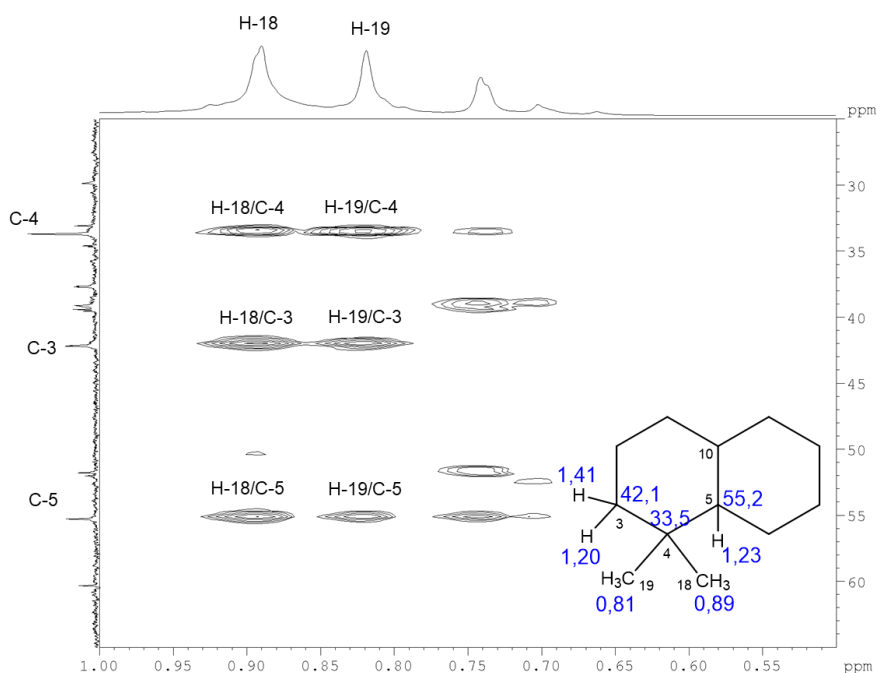
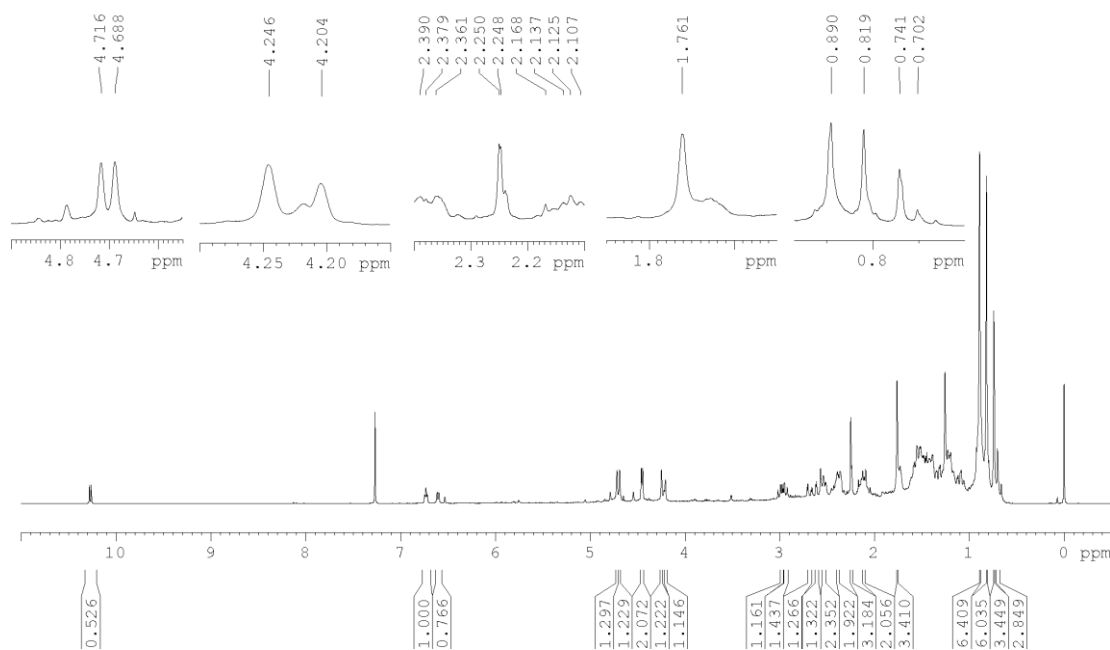
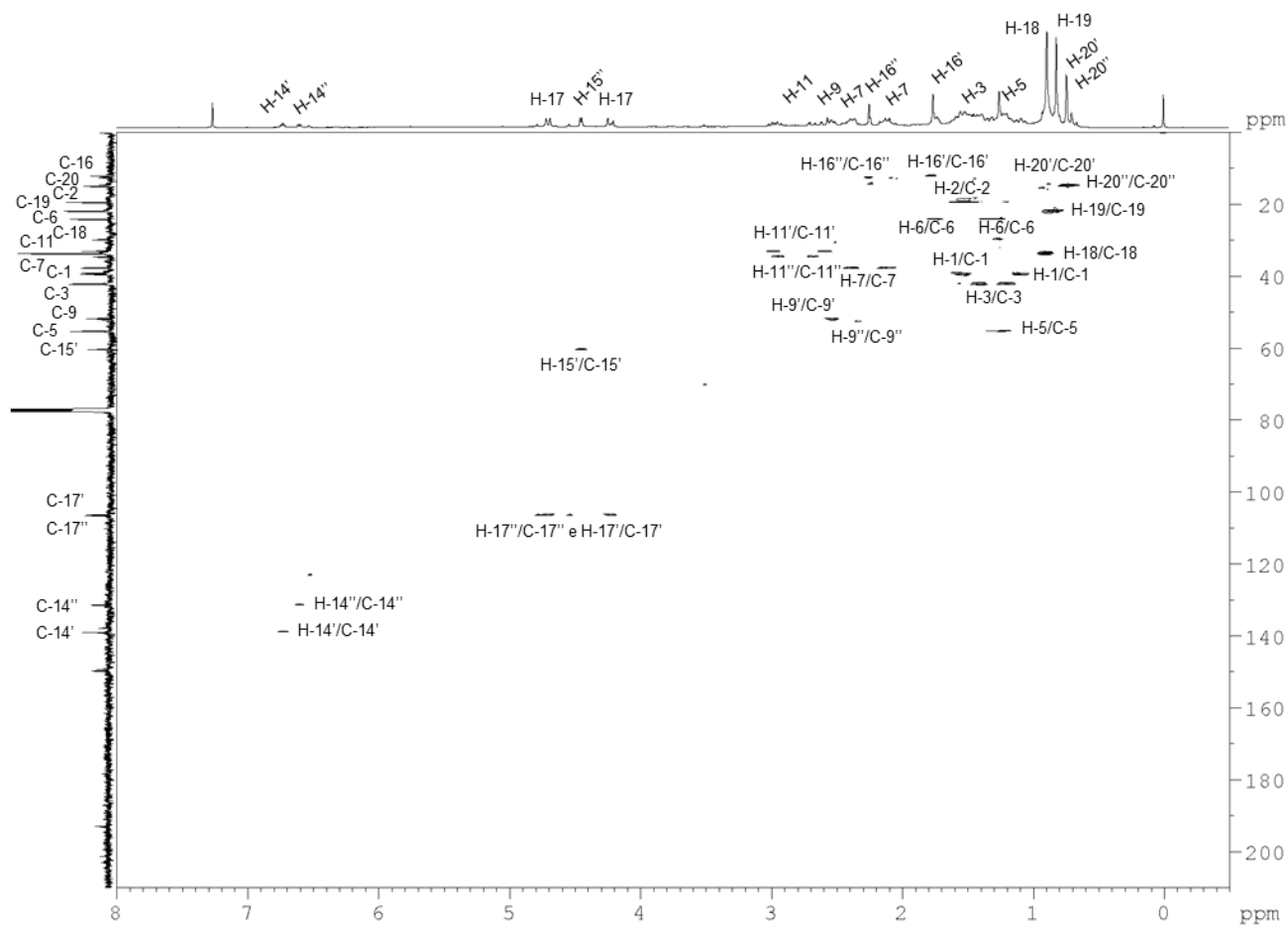


Figura 75 - Sub-espectro de DEPT-135 de B3 (CDCl₃; 100 MHz)

Semelhantemente ao diterpeno descrito na seção 5.7.6, foram observados sinais de correlação no mapa de contornos HMBC entre o carbono quaternário em δC 33,5 ppm (C-4) e os sinais em δH 0,82 e 0,89 ppm, correspondentes à duas metilas, indicando a localização das mesmas na posição 4, sugerindo a estrutura de um diterpeno. A correlação entre esses hidrogênios metílicos e os carbonos em δC 42,1 e 55,2 ppm, possibilitou atribuí-los respectivamente a C-3 e C-5 (**Figura 76**).

Figura 76 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de B3 (CDCl₃)

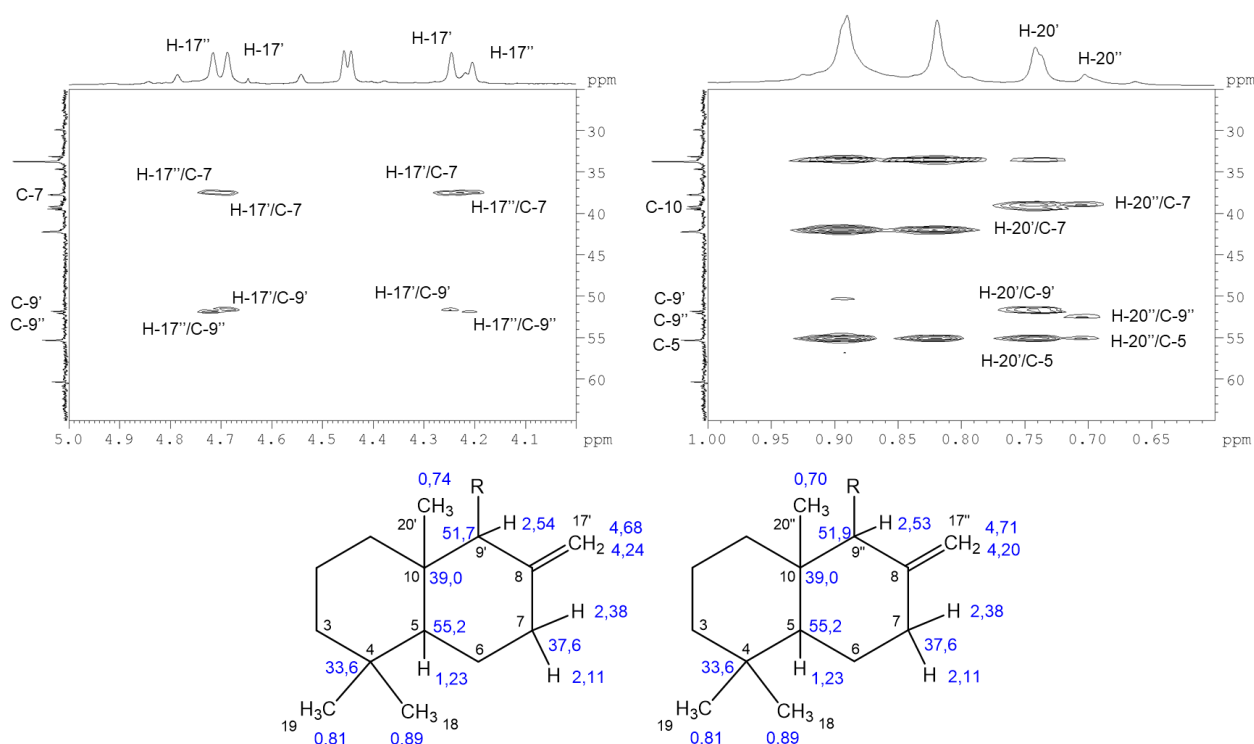
No espectro de RMN de ^1H (**Figura 77**) foi possível observar quatro sinais em δH 4,71 e 4,20 e em δH 4,68 e 4,24 ppm, correspondentes a um hidrogênio cada, característicos de prótons de ligações duplas terminais. A análise do mapa de contornos HSQC (**Figura 78**) indica correlações desses hidrogênios com os carbonos metilênicos em δC 106,5 ppm e δC 106,2 ppm, sugerindo que B3 é uma mistura de dois diterpenos estruturalmente relacionados.

Figura 77 - Espectro de RMN de ^1H de B3 (CDCl_3 ; 400 MHz)**Figura 78 - Mapa de contornos HSQC de B3 (CDCl_3)**

A análise dos mapas de correlação homonucleares COSY e heteronucleares HMBC possibilitou atribuir os demais sinais de ressonância do núcleo terpênico. No COSY observa-se correlações entre o sinal em δ H 1,74 ppm (H-6) e os sinais em δ H 2,38 e 2,11 ppm, correspondentes ao grupo metilênico na posição 7 e também entre os sinais de H-11' e H-11'' (δ H 2,98 e 2,95 ppm) e H-9' e H-9'' (δ H 2,54 e 2,53 ppm). Já no HMBC, verifica-se correlações entre H-5 (δ H 1,23 ppm) e os sinais em δ C 24,0 e 37,6 ppm (C-6 e C-7, respectivamente) e entre H-9 e os sinais em δ C 39,3 e 39,0 ppm (C-1 e C-10, respectivamente). Também é possível observar correlação entre os sinais em δ H 0,89 ppm (H-19) e em δ C 19,4 ppm (C-2) (APÊNDICE F, pág. 228).

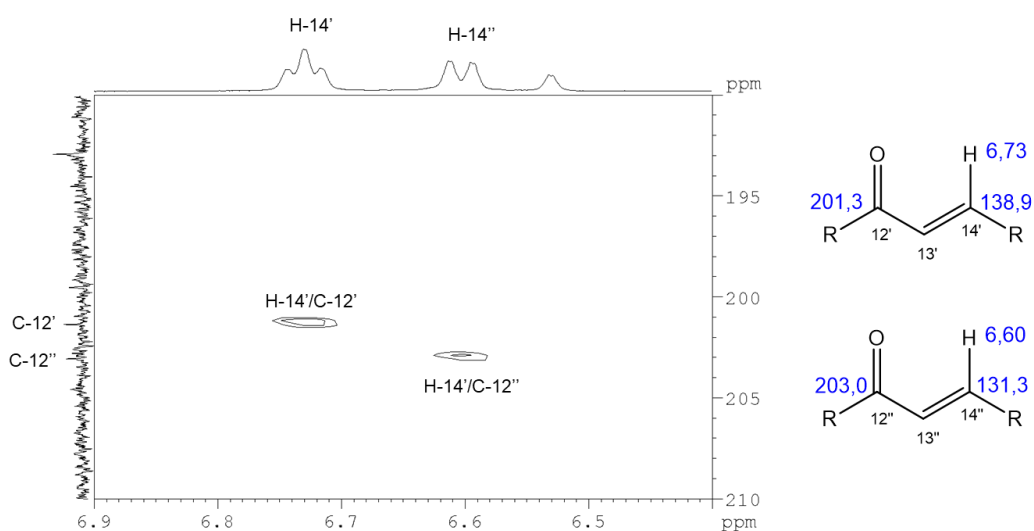
As manchas de correlação no HMBC (**Figura 79**) entre os hidrogênios em δ H 4,71 e 4,20 e os carbonos em δ C 51,9 ppm (C-9) e δ C 37,6 ppm (C-7), bem como entre δ H 4,68 e 4,24 ppm e os carbonos em δ C 51,7 ppm (C-9) e δ C 37,6 ppm (C-7), mostram que as duplas terminais, assim como em A6, encontram-se na posição 8. Além disso, é possível observar, também, a correlação dos dois grupos metila (δ H 0,74 e 0,70 ppm) com os sinais dos carbonos em δ C 55,2 e 39,0 ppm, atribuídos a C-5 e C-10 respectivamente, bem como com o C-9, evidenciando a localização de grupo metila na posição 10, em ambos os constituintes da mistura.

Figura 79 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de B3 (CDCl₃)

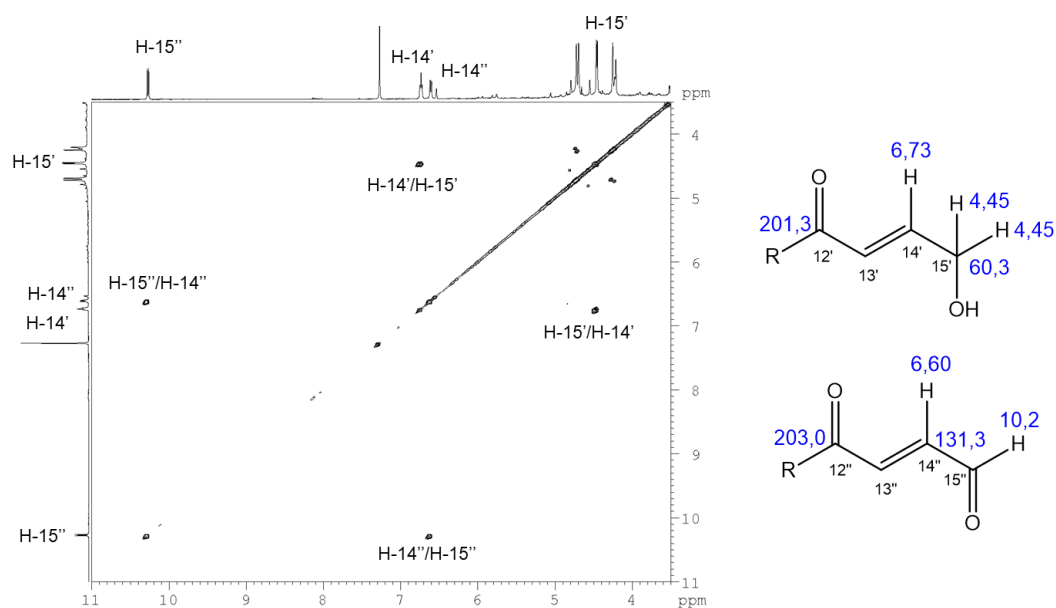


Os sinais em δC 203,0 e 201,3 ppm, observados no espectro de RMN de ^{13}C , sugerem a presença de duas carbonilas. A correlação no mapa de contornos HMBC entre os sinais em δC 201,3 ppm e δH 6,73 ppm indica a presença de uma carbonila adjacente a uma insaturação, na qual está inserido este hidrogênio metínico. A mesma característica estrutural foi evidenciada no outro constituinte da mistura, observando-se uma correlação entre o sinal em δC 203,0 ppm e do próton em δH 6,60 ppm (**Figura 80**), correspondente à carbonila α,β -insaturada.

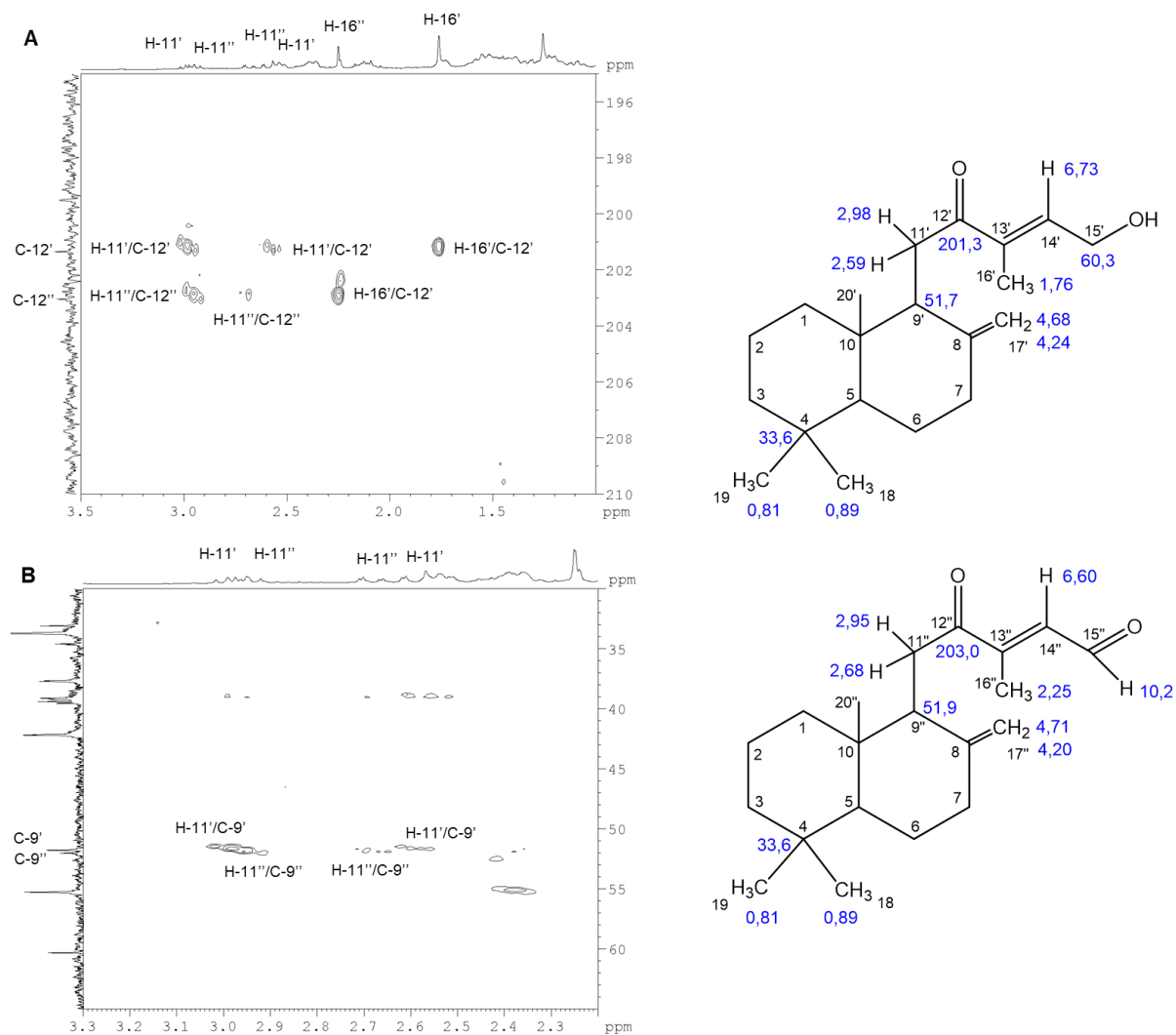
Figura 80 - Expansão do mapa de correlações heteronucleares HMBC de B3 ($CDCl_3$)



No mapa de contornos COSY é possível observar correlações entre o tripleto centrado em δH 6,73 ppm, referente ao próton da carbonila α,β -insaturada, e um duplete centrado em δH 4,45 ppm, referente a dois hidrogênios, com valores de deslocamento químico característicos de oximetilenos, evidenciando, assim, a presença de uma hidroxila na posição 15. Em contrapartida, o sinal em δH 6,60 ppm apresenta correlações com o duplete centrado em δH 10,2 ppm, característico de aldeído, indicando, portanto, a presença dessa função no segundo derivado (**Figura 81**).

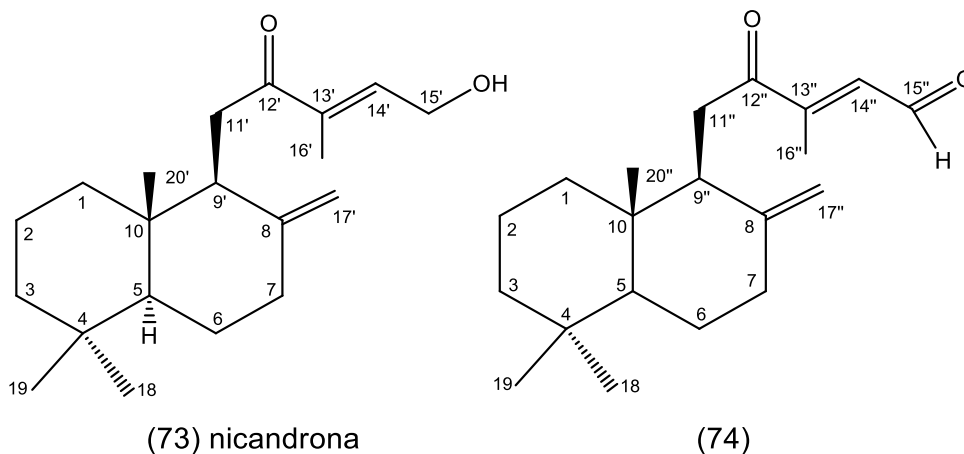
Figura 81 - Expansão do mapa de correlações homonucleares COSY de B3 (CDCl₃)

É possível observar, ainda, no mapa de contornos HMBC, correlações entre o sinal da carbonila em δ_C 201,3 (C-12') e os hidrogênios metilênicos em δ_H 2,98 e 2,59 ppm (H-11'), além da correlação com o grupo metílico em δ_H 1,76 ppm (H-16'). O mesmo é visto no derivado com grupo aldeído, cujo sinal da carbonila em δ_C 203,0 ppm (C-12''), apresenta correlações com os hidrogênios metilênicos em δ_H 2,95 e 2,68 ppm (H-11'') e o grupo metílico em δ_H 2,25 ppm (H-16'') (**Figura 82A**). Além disso, as correlações entre os sinais de hidrogênio em δ_H 2,98 ppm (H-11') e o C-9' (δ_C 51,7 ppm) e entre o δ_H 2,95 ppm (H-11'') e o sinal de C-9'' (δ_C 51,9 ppm), permite localizar esse grupo na posição 9, em ambas as substâncias (**Figura 82B**). O sinal em δ_C 192,8 ppm é característico de carbonila de aldeído. É importante ressaltar a diferença nos valores de deslocamento químico dos sinais dos carbonos metílicos C-16' e C-16'', devido ao efeito anisotrópico da carbonila.

Figura 82 - Expansões do mapa de correlações heteronucleares HMBC de B3 (CDCl₃)

Os deslocamentos de C-13' (δ_C 137,7 ppm) e C-13'' (δ_C 153,0 ppm) foram atribuídos com base nas correlações observadas no HMBC, sendo também possível notar o efeito anisotrópico da carbonila aldeídica sobre o carbono 13'.

Dessa forma, pode-se caracterizar as substâncias presentes em B3 como dois diterpenos com esqueleto labdânico (**73**) e (**74**).



O derivado com o grupo álcool (53) já foi isolado de *Physalis nicandroides* (TORRES et al., 2019) e é chamado nicandrona ((*E*)-15-hidroxilabda-8(17),13-dien-12-ona). A comparação entre os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C obtidos, com os descritos na literatura estão representados na **Tabela 26**.

Tabela 26 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para B3 (δ em ppm, CDCl_3 ; 400 MHz) e comparação com os dados da literatura

osição	B3 (53)		B3 (54)		Nicandrona*	
	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	1,54; m 1,09; m	39,3	1,54; m 1,09; m	39,5	1,54; m 1,09; td (13,0; 13,0; 3,5)	39,2
2	1,55; m 1,47; m	19,4	1,55; m 1,47; m	19,9	1,46; m 1,58; m	19,3
3	1,41; m 1,20; m	42,1	1,41; m 1,20; m	42,1	1,40; dddd (13,0; 3,5; 3,5; 1,50) 1,20; td (13,0; 13,0; 4,5)	42,0
4		33,5		33,5		33,5
5	1,23; m	55,2	1,23; m	55,2	1,24; dd (13,0; 2,5)	55,1
6	1,74; m 1,32; m	24,0	1,74; m 1,32; m	24,0	1,73; m 1,32; dddd (13,0; 13,0; 13,0; 4,0)	24,0

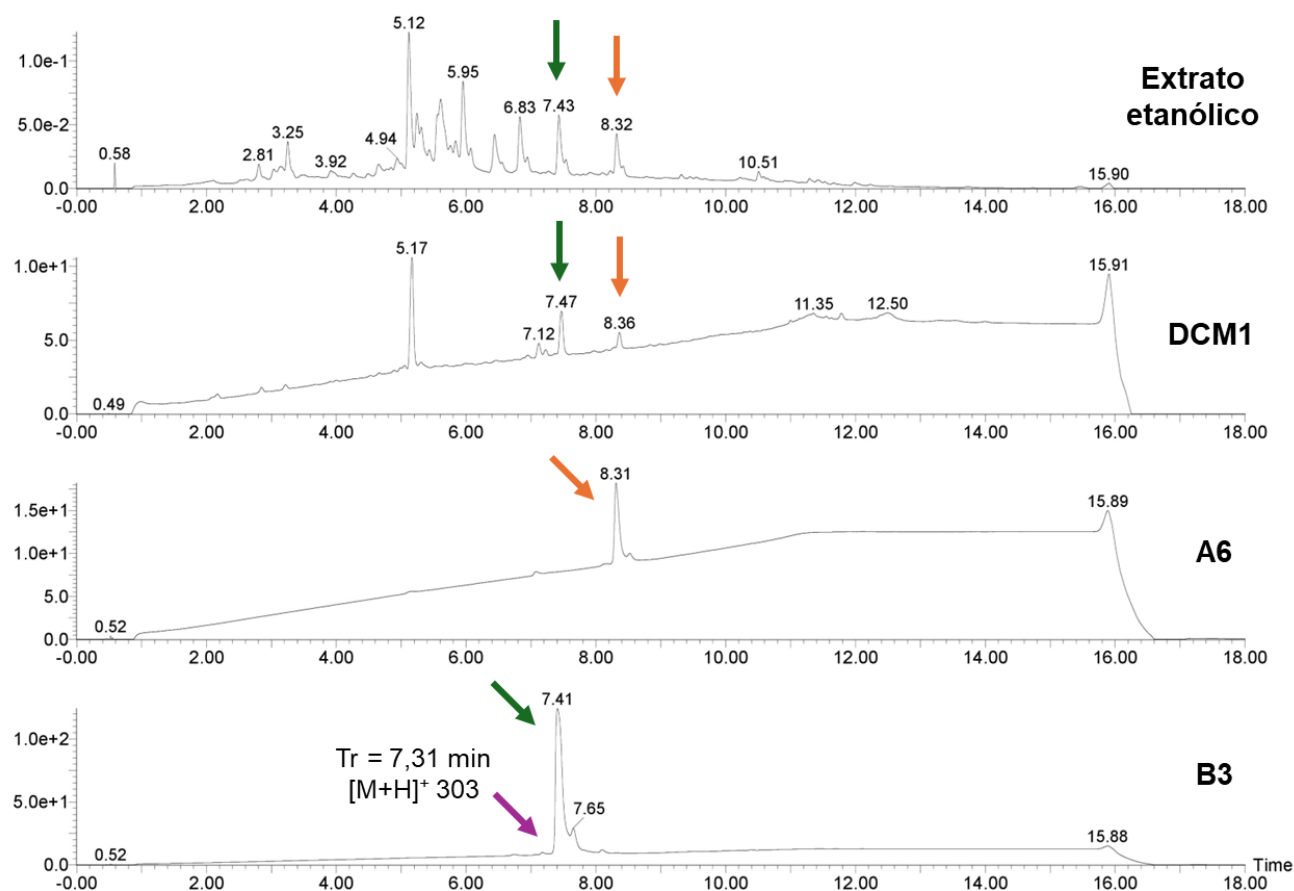
7	2,38; m 2,11; m	37,6	2,38; m 2,11; m	37,6	2,37; td (13,0; 4,0; 2,5) 2,13; td (13,0; 13,0; 5,0)	38,3
8		149,7		149,2		149,6
9	2,54; m	51,7	2,53; m	51,9	2,55; d (10,0)	51,6
10		39,0		39,0		39,0
11	2,98; m 2,59; m	33,0	2,95; m 2,68; m	34,5	2,98; dd (17,0; 10,0) 2,59; dd (17,0; 3,5)	32,9
12		201,3		203,0		201,1
13		137,7		153,0		137,7
14	6,73; t (5,5; 5,5)	138,9	6,60; dd (7,5; 1,2)	131,3	6,73 tq (5,5; 1,5)	138,8
15	4,45; d (5,5)	60,3	10,2; d (7,5)	192,8	4,45 dt (5,5; 1,0)	60,2
16	1,76; s	12,0	2,25; d (1,2)	12,6	1,76; dt (1,5; 1,0)	11,9
17	4,68; m 4,24; s	106,2	4,71; m 4,20; s	106,5	4,69; dd (3,0; 1,5) 4,24; dd (3,0; 1,5)	106,1
18	0,89; s	33,6	0,89; s	33,6	0,89; s	33,6
19	0,81; s	21,8	0,81; s	21,8	0,82; s	21,8
20	0,74; s	14,9	0,70; s	14,8	0,74; s	14,8

d: duplete; dd: duplo duplete; td: triplo duplete; m: multiplete; dq: duplo quarteto; s: simpleto

* Referência: Torres et al. (2019) – ^1H RMN - 500 MHz, CDCl_3 ; ^{13}C RMN 125 MHz, CDCl_3 .

Ao comparar os cromatogramas do extrato etanólico de *B. stylosa*, da fração DCM1 e das frações A6 e B3 (**Figura 83**), verifica-se que o derivado com a lactona ($T_r = 8,31$ min) pode ser observado no extrato e na fração DCM1, e o mesmo acontece com o derivado com a hidroxila alcoólica ($T_r = 7,41$ min). No entanto, o derivado com grupo aldeído ($T_r = 7,31$ min) só pode ser observado na fração B3, sendo factível supor que ele resulte da oxidação da nicandrona, uma vez que foram utilizadas condições extremas de pH.

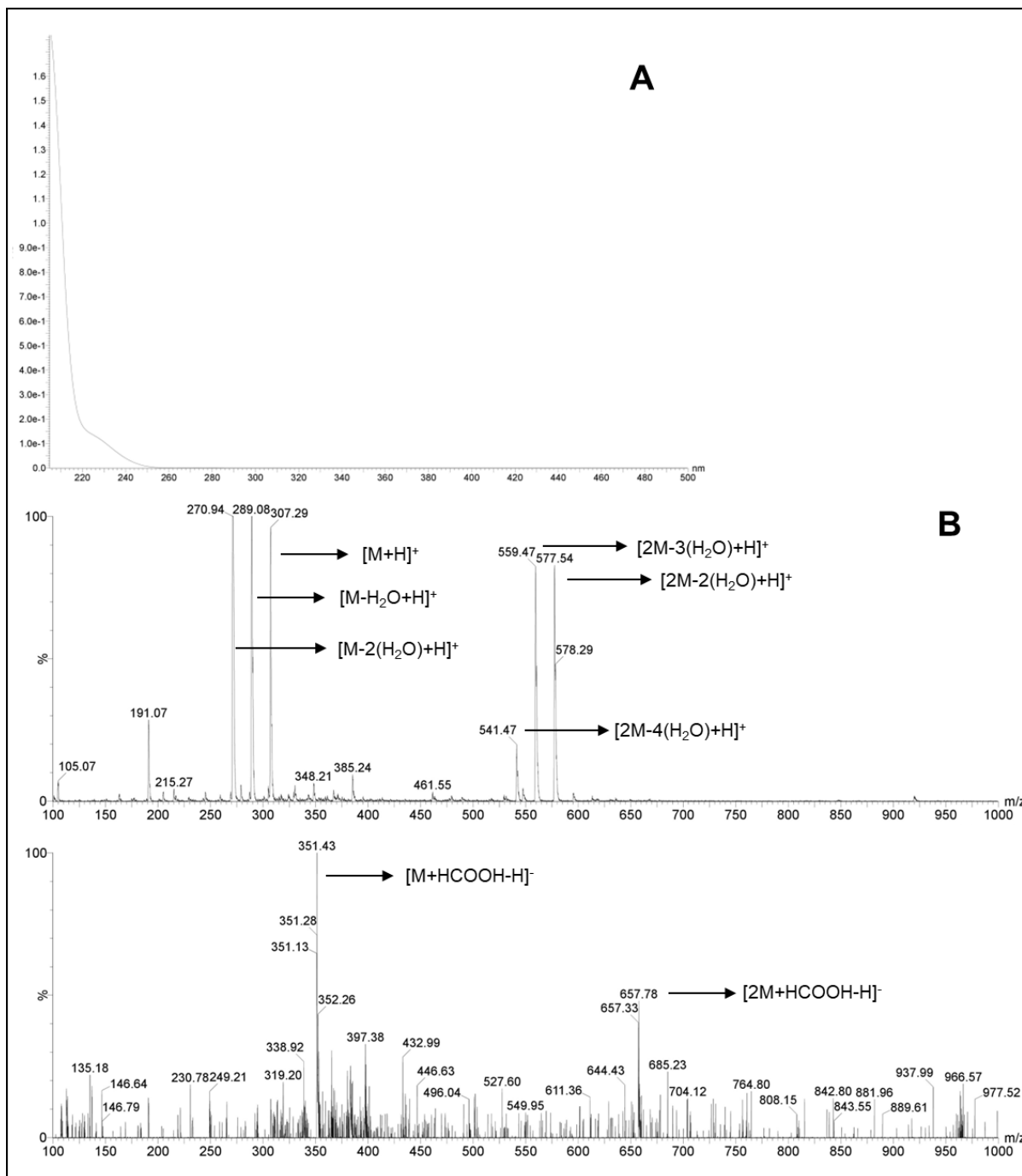
Figura 83 - Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para o extrato etanólico e frações DCM1, A6 e B3 de *B. stylosa* (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



5.7.8 Elucidação estrutural de Fr.243 isolado de *B. imbricata*

Foi obtido um sólido branco cristalino. A substância em Fr.243 foi analisada por UPLC-ESI-MS e o pico em Tr = 7,11 minutos apresentou máximos de absorção no UV em 210 nm e íons em m/z 577 $[2M-2(H_2O)+H]^+$, 559 $[2M-3(H_2O)+H]^+$, 541 $[2M-4(H_2O)+H]^+$, 307 $[M+H]^+$, 289 $[M-H_2O+H]^+$ e 271 $[M-2(H_2O)+H]^+$ e em m/z 657 $[2M+HCOOH-H]^-$ e 351 $[M+HCOOH-H]^-$, conforme demonstrado na **Figura 84**. Observando o máximo de absorção no UV e a massa molecular da substância, pode-se inferir que ela pertence a classe dos terpenos.

Figura 84 - Espectro no UV (A) e o espectro de massas (ESI+ e ESI-) (B) de Fr.243
(Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



O espectro de RMN de ^{13}C indicou sinais de ressonância de 20 carbonos e, a partir do sub-espectro DEPT 135 e do mapa de contornos HSQC, foram identificados sinais de quatro carbonos quaternários (δC 149,2; 140,2; 39,6 e 33,7 ppm) e oito carbonos metilênicos (δC 106,8; 59,2; 42,2; 39,1; 38,4; 28,6; 24,5 e 19,5 ppm) (**Figuras 85 e 86**). Os sinais na região entre 60 e 80 ppm indicam a presença de

carbonos ligados à átomos de oxigênio, enquanto os sinais na região de 100 a 150 ppm são característicos de carbonos com hibridização sp^2 . Diante disso, é possível pressupor que também se trata de um diterpeno.

Figura 85 - Espectro de RMN de ^{13}C de Fr.243 ($CDCl_3$; 600 MHz)

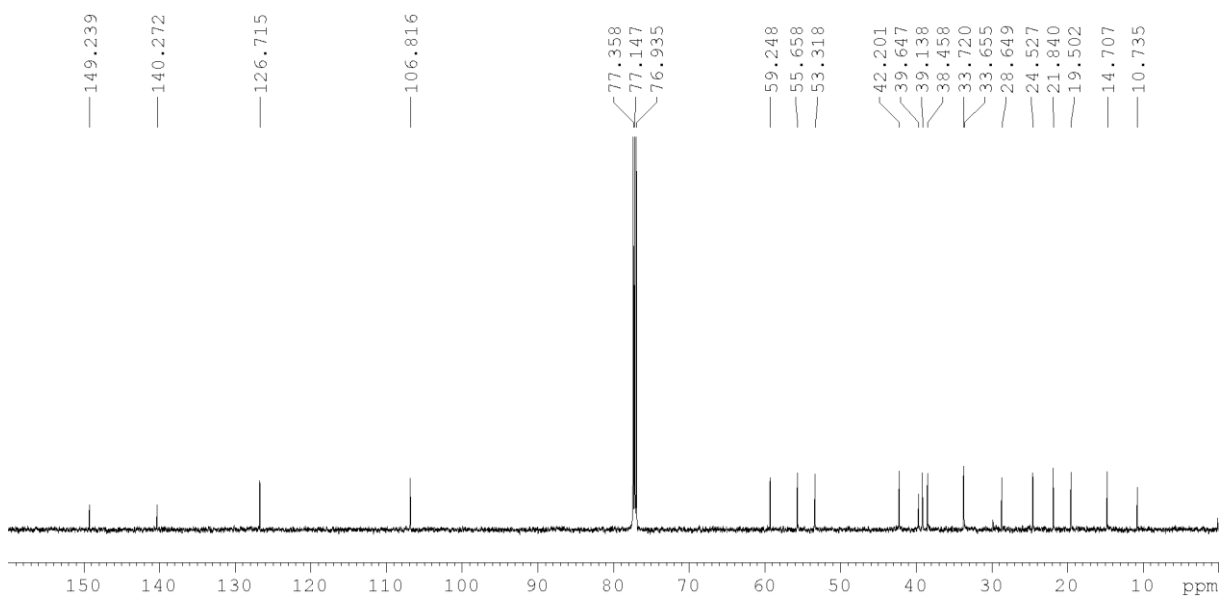
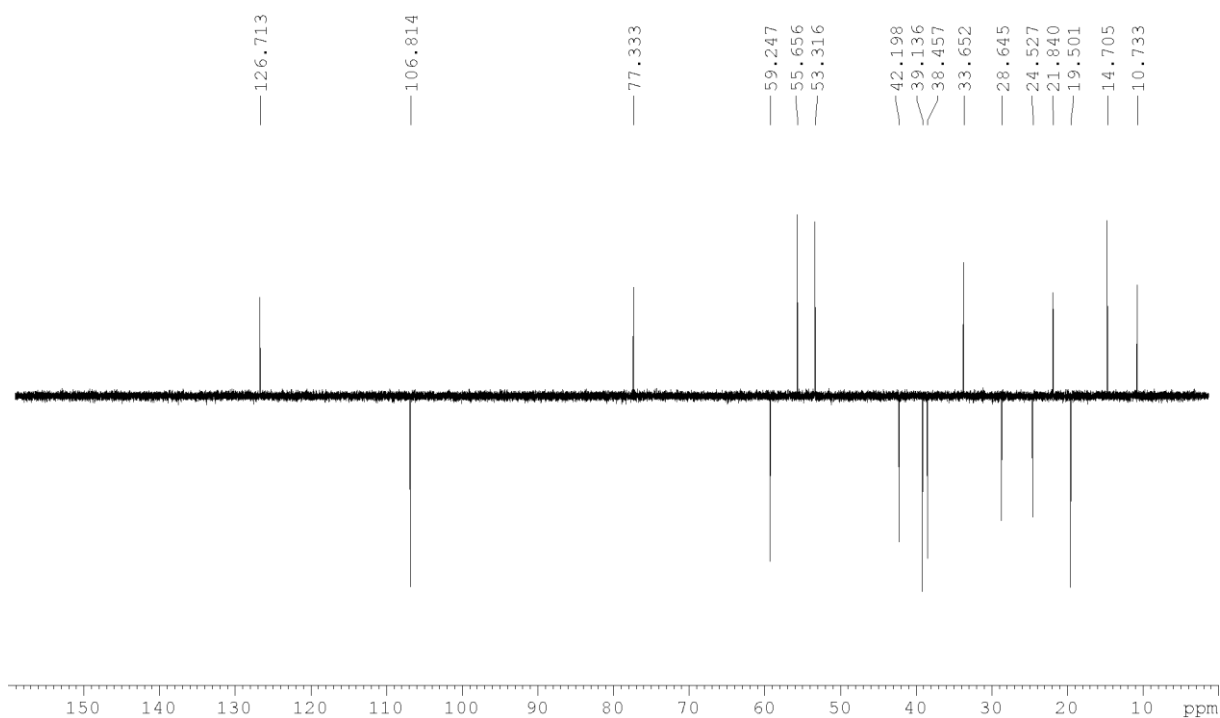
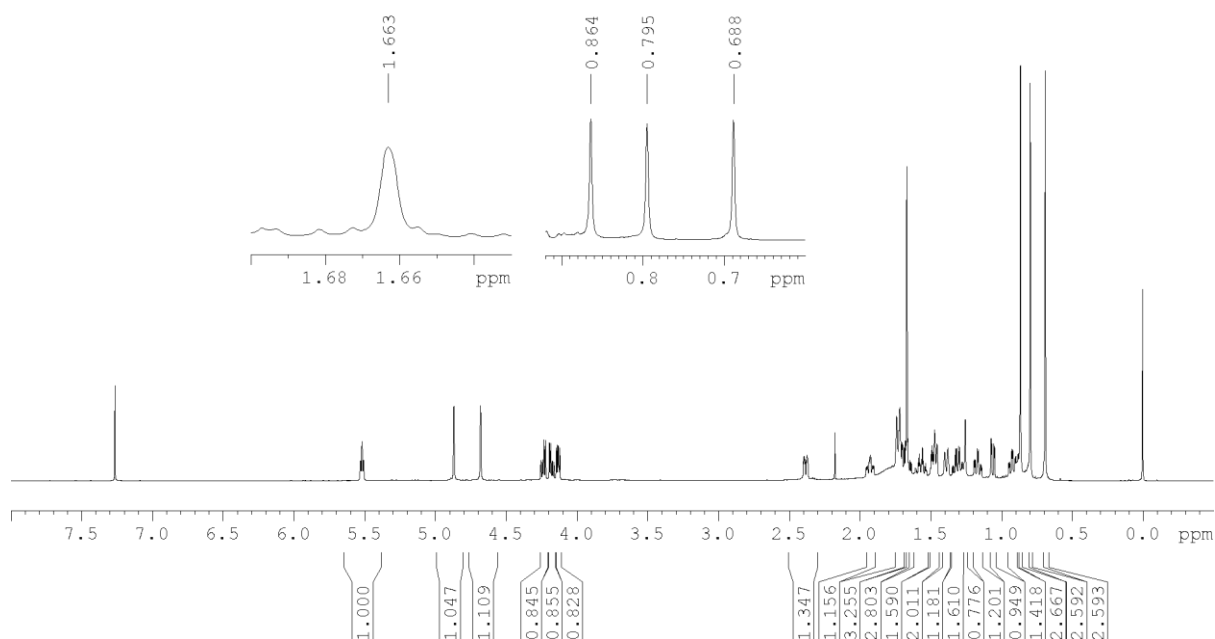


Figura 86 - Sub-espectro de DEPT-135 de Fr.243 em $CDCl_3$ ($CDCl_3$; 600 MHz)



A análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 87**) indica quatro simpletos (δH 1,66; 0,86; 0,79 e 0,68 ppm) correspondentes à três hidrogênios cada, demonstrando, assim, a presença de quatro grupos metila. Adicionalmente, observa-se sinais referentes a quatro hidrogênios metínicos (δH 5,51; 4,12; 1,46 e 1,05 ppm). Correlacionando esses dados com os obtidos pelo espectro de massas, pode-se dizer que a massa molar de 306 Da é compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$.

Figura 87 - Espectro de RMN de ^1H de Fr.243 (CDCl_3 ; 600 MHz)



Analisando os dados espectroscópicos obtidos para Fr.243, foram observadas semelhanças estruturais com os diterpenos labdânicos descritos na seção 5.7.7, em relação a estrutura labdadieno e a dupla ligação terminal em C-8.

Os deslocamentos do núcleo terpênico também foram atribuídos com base no mapa de correlações homonucleares COSY e no mapa de contornos HMBC. Os sinais de correlação no HMBC entre o carbono quaternário em δC 33,6 ppm (C-4) e os sinais em δH 0,79 e 0,86 ppm, correspondentes a duas metilas, indicam sua localização na posição 4. Também no HMBC, é possível observar correlações entre os sinais desses hidrogênios metílicos (18 e 19) e os carbonos em δH 55,7 e 42,0 ppm, possibilitando atribuí-los a C-5 e C-3, respectivamente. No COSY, observa-se correlações entre o sinal em δH 1,05 ppm (H-5) e os sinais em δH 1,72 e 1,30 ppm, correspondentes aos hidrogênios metilênicos da posição 6 e entre estes e os prótons em δH 2,37 e 1,92

ppm, atribuídos a H-7. Além disso, observa-se também correlações entre os sinais da dupla terminal em δ H 4,86 e 4,67 ppm (H-17) com os sinais de H-7 (δ H 1,92 ppm) e H-9 (δ H 1,46 ppm). Já no HMBC, verifica-se correlações entre H-5 (δ H 1,05 ppm) e os sinais em δ C 53,3 e 39,5 ppm (C-9 e C-10, respectivamente) e entre H-9 e os sinais em δ C 39,3 e 39,0 ppm (C-1 e C-10, respectivamente) (APÊNDICE F, pág. 228).

Assim como na nicandrona, essa substância possui uma hidroxila terminal em C-15. Isso é observado pelo mapa de contornos COSY (**Figura 88**), em que o sinal referente ao tripleto em δ H 5,51 ppm apresenta correlação com os sinais em δ H 4,23 e 4,17 ppm, característicos de hidrogênios geminais à hidroxila. A correlação entre o sinal do próton metínico H-14 e o sinal em δ H 1,66 ppm (H-16) confirma a presença dessa metila na dupla ligação. A principal diferença está na presença de uma hidroxila em C-12, enquanto os derivados da fração B3 possuem uma carbonila nessa posição. O hidrogênio em δ H 4,12 (H-12) possui valor de deslocamento químico característico de próton geminal à hidroxila. No mapa de contornos HMBC, este apresentou correlação com os carbonos em δ C 53,3 (C-9), 28,6 (C-11), 140,2 (C13), 126,7 (C-14) e 10,7 (C-16), indicando sua localização na posição 12 (**Figura 89**).

Figura 88 - Mapa de correlações homonucleares COSY de Fr.243 (CDCl₃)

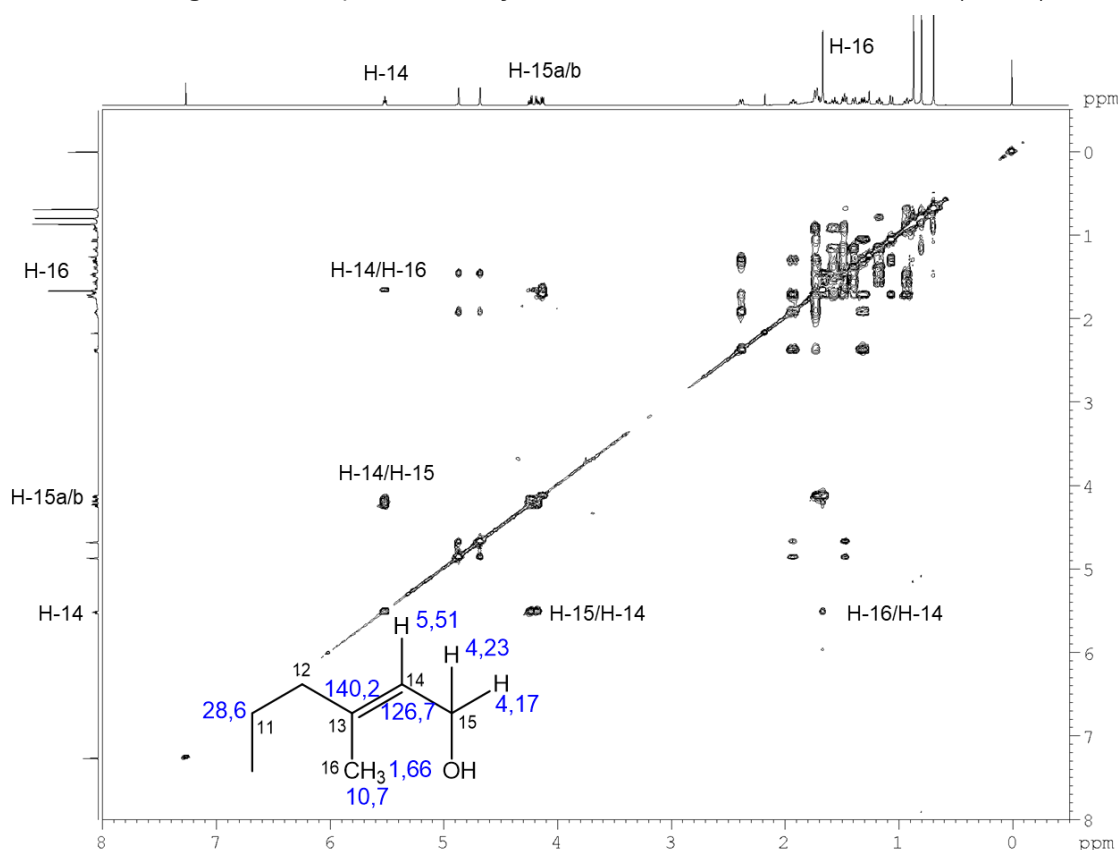
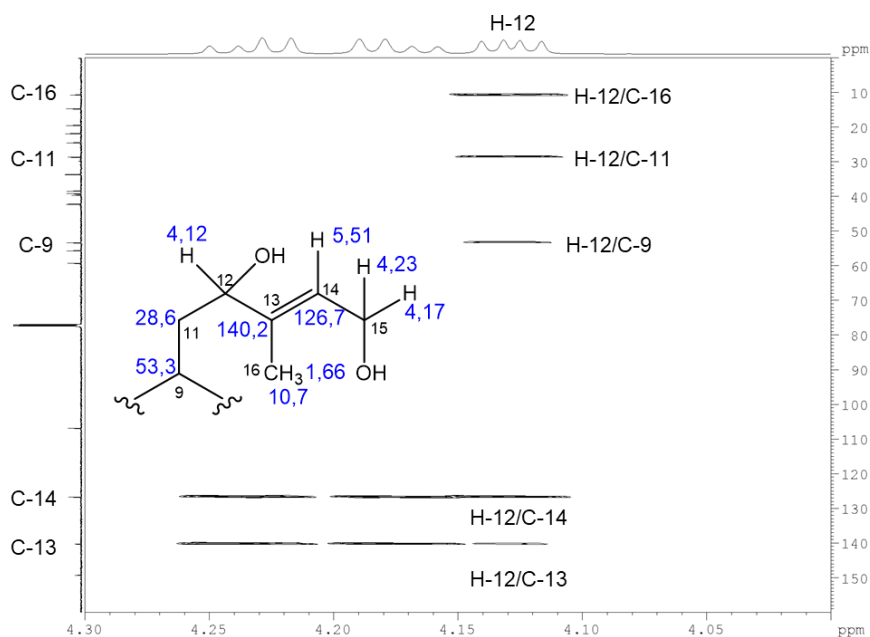
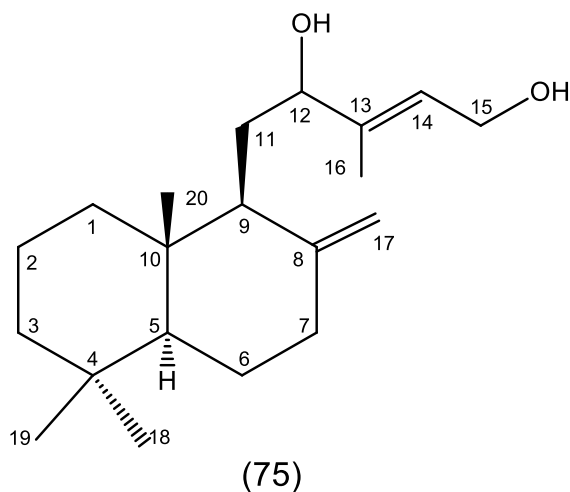
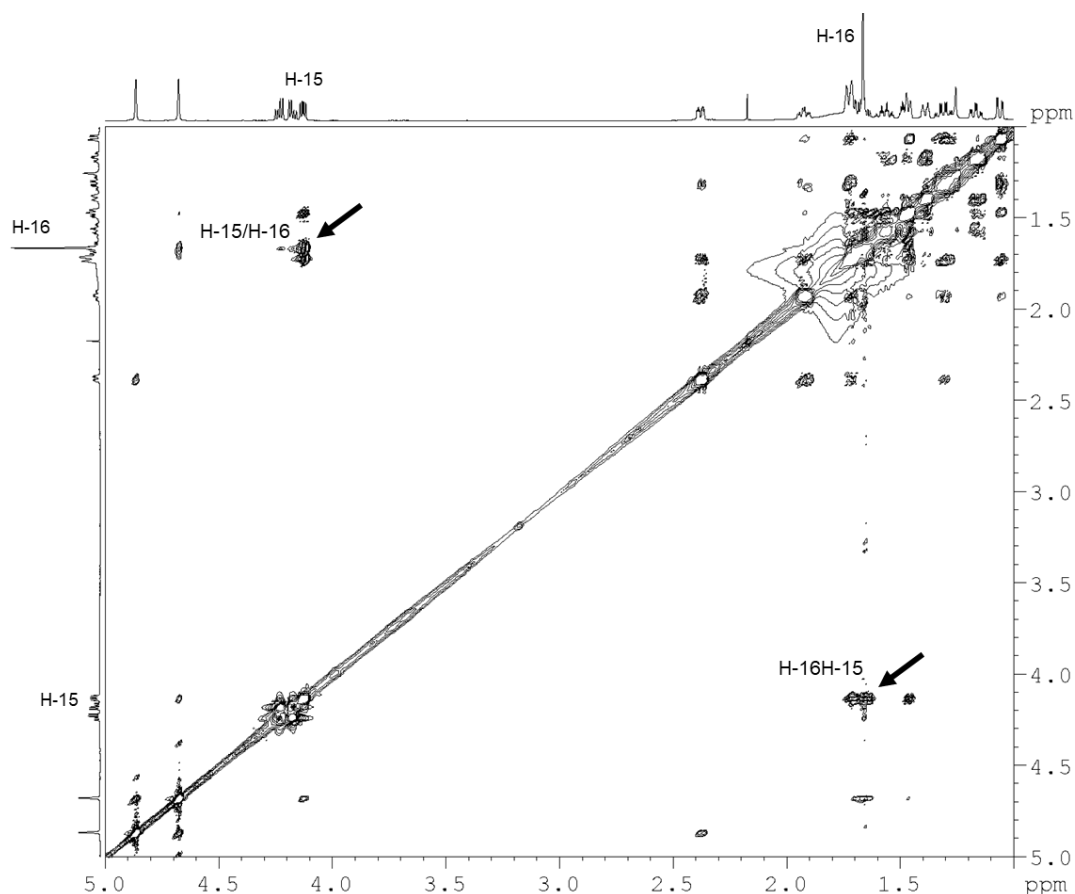


Figura 89 - Expansão do mapa de correlações HMBC de Fr.243 (CDCl₃)

Dessa forma, pode-se identificar a substância presente em Fr.243 como um diterpeno com esqueleto labdânico (**75**):



A estereoquímica da ligação dupla C-13/C-14 foi estabelecida como *E* a partir da correlação entre o hidrogênio metilênico H-15 (δ H 4,23) e o grupo metílico na posição 16 (δ H 1,66), no mapa de contornos NOESY (**Figura 91**).

Figura 90 - Expansão do mapa de contornos NOESY de Fr.243 (CDCl₃)

Torres et al. (2019) descrevem o isolamento de dois epímeros do nicandrodiol (**76**), 12*R* e 12*S*, sendo a configuração determinada por uma análise de difração de raios X. A comparação entre os deslocamentos da substância isolada de *B. imbricata* e dos dois epímeros (**Tabela 27**) permitiu afirmar que a substância presente em Fr.243 é o 12-*epi*-nicandrodiol (**77**). As diferenças foram observadas entre os sinais de H-9, C-11, C-12, C-13, C-14 e C-16 que no isômero 12*R* aparecem em δ H 2,01, δ C 30,1, 75,0, 142,3, 123,3 e 12,2, respectivamente, enquanto no 12*S* os sinais aparecem em δ H 1,47, δ C 28,6, 77,2, 140,2, 126,6 e 10,6, respectivamente. Os mapas de contornos bidimensionais HSQC e HMBC completos encontram-se em anexo (APÊNDICE G, pág. 229).

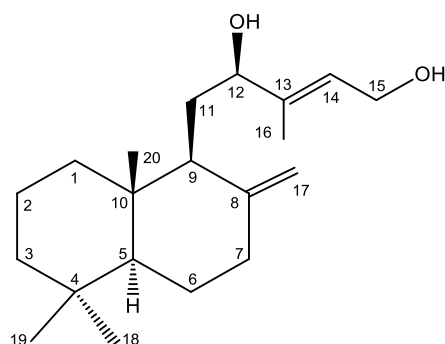
Tabela 27 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para Fr.243 (δ em ppm, CDCl_3 ; 600 MHz) e comparação com os dados da literatura

	Fr.243		Nicandrodiol* (55)		12- <i>epi</i> -nicandrodiol* (56)	
Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}
1	1,72; m 0,92; td (13,0; 13,0; 4,0)	39,1	1,72; m 1,09; td (12,5; 12,5; 2,5)	39,0	1,73; m 0,92; td (12,5; 12,5; 4,0)	39,0
2	1,55; m 1,47; m	19,5	1,56; m 1,51; m	19,3	1,57; m 1,49; m	19,4
3	1,38; m 1,16; td (13,5; 13,5; 4,0)	42,2	1,39; dddd (13,0; 3,0; 3,0; 1,5) 1,2; td (13,0; 13,0; 4,5)	42,1	1,39; dddd (13,0; 3,5; 3,5; 1,0) 1,17; td (13,0; 13,0; 4,0)	42,1
4		33,7		33,6		33,6
5	1,05; dd (12,6; 2,8)	55,6	1,18; dd (12,5; 2,5)	55,5	1,06; dd (12,5; 3,0)	55,6
6	1,72; m 1,30; dddd (13,0; 13,0; 13,0; 4,0)	24,5	1,75; m 1,34 dddd (13,0; 13,0; 13,0; 4,0)	24,4	1,73; m 1,31; dddd (13,0; 13,0; 13,0; 4,0)	24,4
7	2,37; dq (13,0; 13,0; 5,0) 1,92; td (13,0; 13,0; 5,0)	38,4	2,41 td (12,5; 4,0; 2,5) 2,04; td (12,5; 12,5; 5,0)	38,3	2,38; td (12,5; 4,0; 2,5) 1,93; td (12,5; 12,5; 5,0)	38,3
8		149,2		149,1		149,1
9	1,46; m	53,3	2,01; m	52,5	1,47; dd (10,0; 3,0)	53,2
10		39,6		39,3		39,5
11	1,69; m 1,68; m	28,6	1,58; m 1,58; m	30,1	1,70; m 1,67; m	28,6
12	4,12; dd (9,0; 4,0)	77,3	4,05; dd (8,5; 3,0)	75,0	4,13; dd (9,0; 6,0)	77,2
13		140,2		142,3		140,2
14	5,51; t (6,3)	126,7	5,63; tdq (6,5; 1,5; 1,0)	123,3	5,52; t (7,0)	126,6

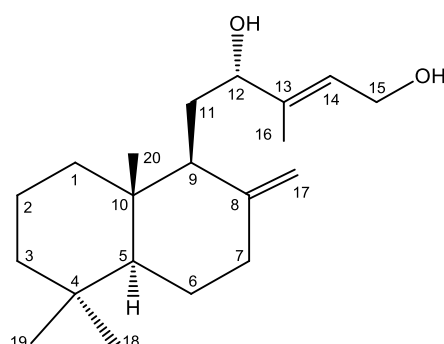
15	4,23; dd (13,0; 7,0)	59,2	4,2; dd (13,5; 6,5)	59,1	4,24; dd (12,5; 7,0)	59,2
	4,17; dd (13,0; 7,0)		4,19; dd (13,5; 6,5)		4,19; dd (12,5; 6,5)	
16	1,66; m	10,7	1,70; dt (1,5; 1,0)	12,2	1,67; s	10,6
17	4,86; d (1,2)	106,8	4,85 m	106,5	4,87; m	106,7
	4,67; m		4,47; d (1,5)		4,68; d (1,5)	
18	0,86; s	33,6	0,88; s	33,6	0,87; s	33,5
19	0,79; s	21,8	0,81; s	21,7	0,80; s	21,7
20	0,68; s	14,7	0,67; s	14,6	0,69; s	14,6

d: duplete; dd: duplo duplete; td: triplo duplete; m: multiplete; dq: duplo quarteto; s: simpleto

* Referência: Torres et al. (2019) – ^1H RMN - 500 MHz, CDCl_3 ; ^{13}C RMN 125 MHz, CDCl_3 .



(76) nicandrodiol



(77) 12-epi-nicandrodiol

5.8 Atividade dos compostos isolados sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias

Com o objetivo de investigar o potencial efeito anti-inflamatório das substâncias isoladas, estas foram avaliadas no modelo *in vitro* de células A549 previamente estimuladas com TNF e IFN- γ , conforme descrito na seção 4.13.5.

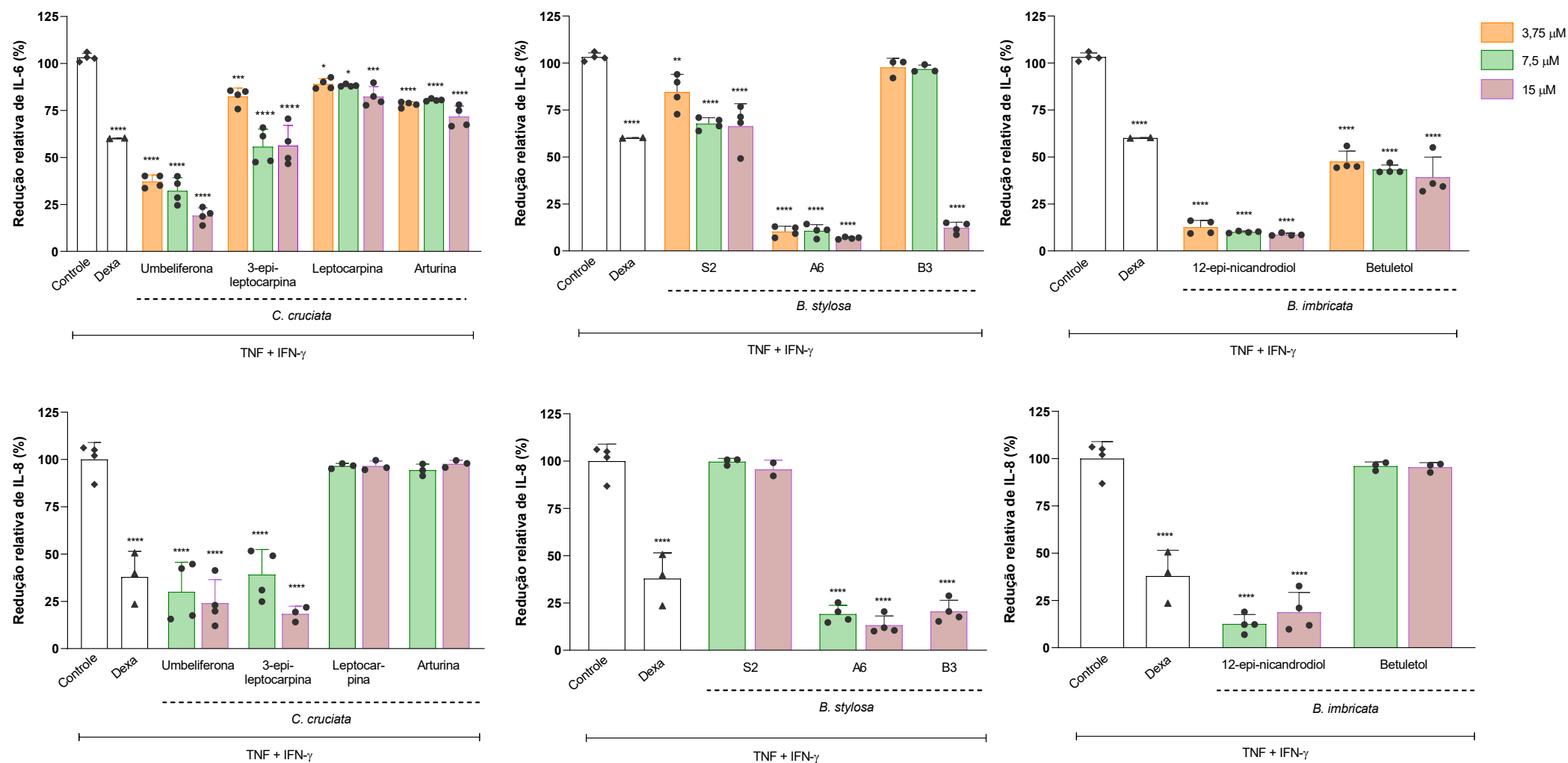
Inicialmente, foram obtidos os valores de CC_{50} desses compostos nas células A549, com o objetivo de determinar as concentrações a serem testadas. Foi utilizado o método do MTT, descrito na seção 4.13.2, e a faixa de concentração estabelecida no ensaio foi de 1 a 200 μM (APÊNDICE A, pág. 217). Todas as substâncias avaliadas apresentaram valores de CC_{50} maiores que 30 μM e os ensaios nas células A549 foram realizadas com concentrações variando de 3,75 a 15 μM . Na **Figura 92** estão

representados os gráficos com os níveis de IL-6 e IL-8 após o tratamento com as diferentes substâncias isoladas, comparadas com o grupo controle. Como a IL-8 foi identificada em pacientes com síndromes leves, ela também é considerada um possível marcador para o prognóstico da doença (LI et al., 2021).

Todos os compostos testados promoveram uma redução significativa na liberação de IL-6 no modelo utilizado, principalmente nas maiores concentrações. Também houve uma redução notável nos níveis de IL-8, sendo que as substâncias foram testadas apenas nas maiores concentrações.

Das substâncias isoladas de *C. crucita*, a umbeliferona apresentou uma inibição da liberação da citocina dependente da concentração, com uma redução de $80,0 \pm 4,1\%$ dos níveis de IL-6 e IL-8 quando ensaiadas a 15 μM , enquanto a 3-epi-leptocarpina exibiu uma redução de aproximadamente $40,0 \pm 10,7\%$ de IL-6 e $82,0 \pm 12,4\%$ de IL-8. Em relação aos constituintes isolados de *B. stylosa* e *B. imbricata* destacam-se os dois diterpenos, A6 e 12-epi-nicandrodiol, que exibiram redução dos níveis de IL-6 e IL-8 de 85 a 90% em todas as concentrações testadas. Os diterpenos presentes em B3 também reduziram a liberação de IL-6 e IL-8 na maior concentração testada (15 μM). Já os flavonoides, S2 e betuletol, apresentaram redução de IL-6 a 15 μM (~30 e 60%, respectivamente), porém não reduziram significativamente IL-8.

Figura 91 - Redução das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 liberadas por células A549 estimuladas por TNF e IFN- γ , e tratadas com as substâncias isoladas



As citocinas foram medidas de acordo com o protocolo do kit de imunoenensaio do sistema R&D. Os resultados são apresentados como % dos níveis de citocina $\pm$ desvio padrão, em comparação com o grupo controle (células + citocinas) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ - ANOVA com pós-teste Tukey).

A umbeliferona possui propriedades antioxidante e anti-inflamatória demonstrada em vários modelos, incluindo estudos em animais (HASSANEIN et al., 2020). Essa substância mostrou efeitos protetores contra a lesão pulmonar aguda induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos, promovendo a redução da infiltração de células inflamatórias e diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como MCP-1, IL-6, IL-1 β e TNF (WANG et al., 2019). Também atenuou a secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias em células HaCat expostas ao TNF- α /IFN- γ (LIM et al., 2019). No entanto, até onde sabemos, não há relato anterior sobre o efeito da umbeliferona em células A549 sob essas condições estimulatórias. Embora os efeitos da leptocarpina e da arturina nas citocinas inflamatórias nunca tenham sido relatados anteriormente, o potencial anti-inflamatório e os efeitos imunorreguladores das lactonas sesquiterpênicas foram previamente descritos (PAÇO et al., 2022). Um exemplo são as tagitinas C, F e A, isoladas de *Tithonia diversifolia*, que reduziram a produção de IL-6, IL-8 e TNF em culturas de neutrófilos humanos estimulados com LPS (ABE et al., 2015). Quando ensaiados em macrófagos RAW264 estimulados por LPS, os eupalinolídeos L e M, isolados de *Eupatorium lindleyanum*, promoveram redução nos níveis de TNF e IL-6 (WANG et al., 2018a), enquanto um eudesmanolídeo de *Sonchus brachyotus* suprimiu a produção de TNF, IL-6 e IL-10 nas concentrações avaliadas (LEE et al., 2023).

Ainda que a nicandrona e o nicandodiol tenham sido avaliados anteriormente frente a atividade inibitória da acetilcolinesterase (TORRES et al., 2019), não há relatos do potencial anti-inflamatório desses compostos. Entretanto, diterpenos com esqueleto labdano apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo atividade anti-inflamatória (PAL et al., 2016). Exemplos são os hedycoronenos A e B, isolados de *Hedychium coronarium*, que apresentaram potente atividade inibitória de IL-6 em células dendríticas derivadas da medula óssea estimuladas por LPS, em concentrações inferiores a 10 μ M (VAN KIEM et al., 2012). Um novo diterpeno labdânico (ácido 15-nor-14-oxolabda-8(17),13(16)-dien-19-óico), isolado de *Thuja orientalis*, inibiu significativamente a produção de óxido nítrico (NO) e também a expressão de TNF, IL-1 β e IL-6 em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS, assim com o diterpeno 15,16-epoxi-3 α -hidroxilabda-8,13(16),14-trien-7-ona, isolado de *Leonurus japonicus*, que nesse mesmo modelo, suprimiu a ativação de NF- κ B e a produção de TNF (KHAN et al., 2012; KIM et al., 2013). O andropanilídeo D, isolado de *Andrographis paniculata*, também apresentou resultados semelhantes, com a

redução da secreção de TNF, IL-6 e IL-1 β , além de regular a expressão proteica de COX-2 e iNOS em macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS, em concentrações de 5 a 10 μ M (YU et al., 2024).

Diversos flavonoides possuem atividade anti-inflamatória demonstrada em modelos *in vitro* e *in vivo* (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). A apigenina reduziu significativamente a secreção de IL-6 em células A549 estimuladas por phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA), quando avaliada a 40 μ M (PATIL et al., 2015). Por sua vez, o (-)-5,3',4',5'-tetraidroxiflavan-7-galato, isolado de *Pithecellobium clypearia*, inibiu a secreção de IL-6 induzida pelo vírus influenza H1N1 em células A549 (KANG et al., 2014). De maneira semelhante, biochanina A e baicaleína inibiram a secreção de IL-6 e IL-8 em células A549 infectadas com o vírus influenza H5N1 (SITHISARN et al., 2013). Em um modelo de células A549 estimuladas com TNF, a mirecetina reduziu a expressão de IL-6 e IL-8, em concentrações variando de 20 a 60 μ M (CHEN et al., 2021). Em relação ao potencial anti-inflamatório do betuletol, foi relatado uma supressão do gene IL-33, quando avaliado em concentrações superiores a 50 μ g/mL em células de fibroblasto murino (Swiss 3T3) estimuladas com PMA. Além disso, esse flavonol suprimiu significativamente a expressão da proteína ERK, da via de sinalização PKC δ /MEK/ERK, envolvida na indução de respostas inflamatórias (SHAHA et al., 2022). No entanto, não foi encontrado nenhum relato sobre essa substância em modelos com liberações de citocinas inflamatórias.

Diante disso, pode-se observar o potencial das lactonas sesquiterpênicas, dos polifenóis e dos diterpenos na modulação de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, TNF e IL-8, diretamente envolvidos nos processos inflamatórios causados por coronavírus, especialmente o SARS-CoV-2. A regulação desses mediadores pode auxiliar na proteção dos tecidos pulmonares e na redução de danos associados à resposta imune exacerbada. Além disso, o potencial sinérgico de tais substâncias em combinação com antivirais convencionais pode representar uma estratégia promissora para o tratamento de infecções virais graves e resistentes, destacando o papel dos produtos naturais no desenvolvimento de terapias inovadoras.

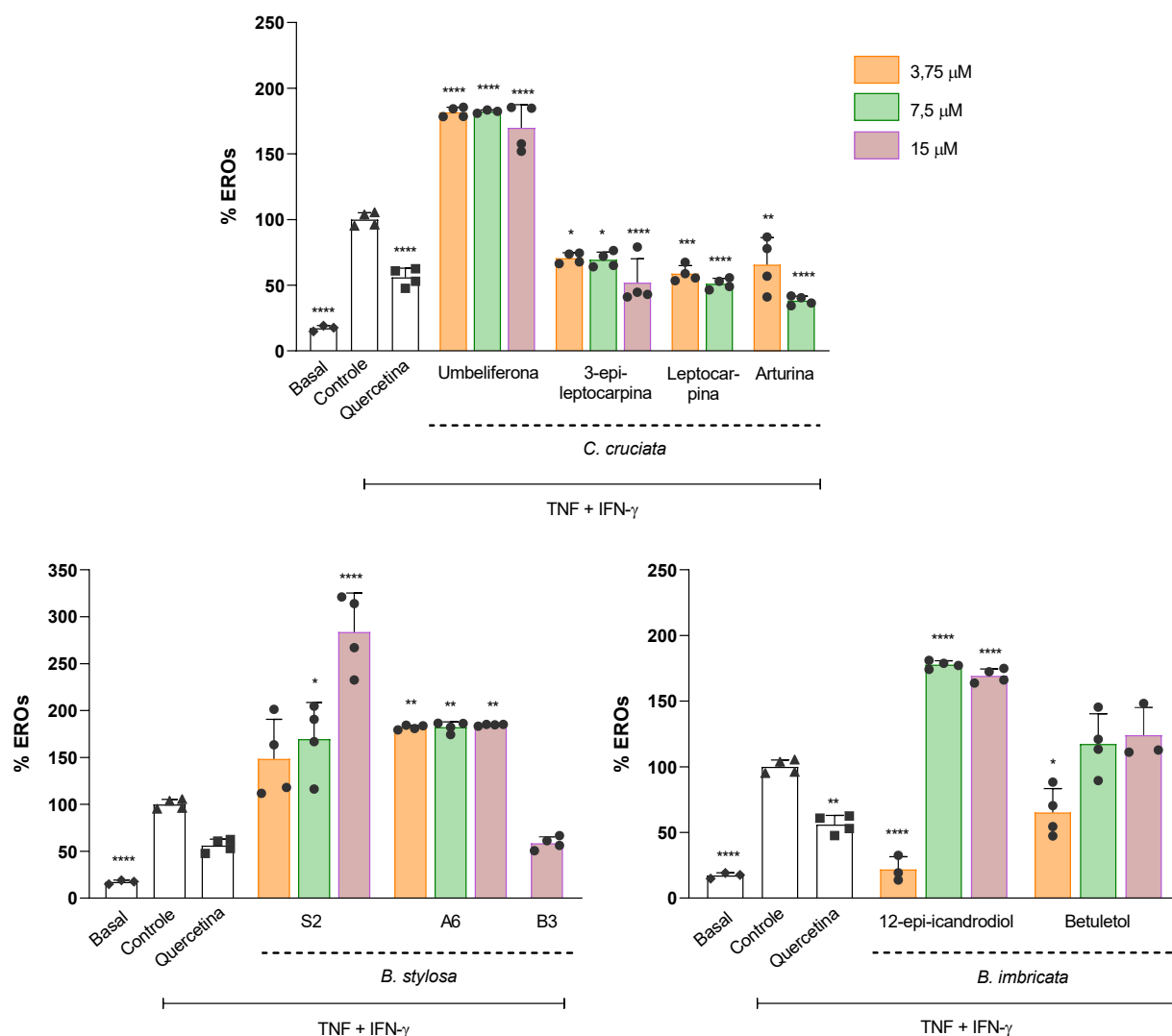
5.9 Efeito dos compostos isolados sobre a produção de EROs em células A549

Foi demonstrado que as proteases virais possuem a capacidade de desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) através das vias de sinalização TNF e NF- κ B. Esta interação complexa dentro do ambiente oxidativo desempenha vários papéis dependendo dos níveis de superóxido dismutase e seus derivados. Este desequilíbrio tem o potencial de levar a lesões pulmonares, semelhantes às observadas em casos de infecção pelo vírus Influenza (FERNANDES et al., 2020). Além disso, foi observada uma correlação entre mediadores inflamatórios e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com COVID-19 grave, particularmente entre os níveis IL-6 e o índice de estresse oxidativo (PETRUSHEVSKA et al., 2021).

Assim, o efeito dos compostos isolados na produção de EROs foi também examinado em células A549. A estimulação de células A549 com TNF e IFN- γ resultou em aumento significativo nos níveis intracelulares de EROs, conforme avaliado por citometria de fluxo usando DCFH-DA (**Figura 93**).

Quando comparado ao grupo controle (células+citocinas), a umbeliferona promoveu um aumento de 70-80% ($p<0,0001$) dos níveis de EROs, em todas as concentrações avaliadas. Já as lactonas sesquiterpênicas apresentaram uma redução desses níveis, com destaque para a artutina, que na concentração de 7,5 μ M, reduziu a produção de EROs em 61% ($p<0,0001$). Por sua vez, o flavonoide S2, isolado de *B. stylosa*, exibiu valores quase 3 vezes superiores ($p<0,0001$) ao grupo controle, na maior concentração ensaiada (15 μ M), indicando um impacto notável na produção EROs, enquanto o betuletol demonstrou uma leve redução desses níveis (~35%) na menor concentração (3,75 μ M). Curiosamente, os diterpenos exibiram resultados distintos, pois, enquanto o A6 produziu o aumento dos níveis de EROs em 80% ($p<0,01$), o 12-epi-nicandrodiol reduziu os níveis na menor concentração (1 μ M) e promoveu um aumento de EROs nas maiores concentrações. Já B3, que é a nicandrona e seu produto de oxidação, apresentou uma redução, porém não estatisticamente significativa em relação ao controle.

Figura 92 - Efeito das substâncias isoladas sobre a produção intracelular de EROs em células A549 estimuladas por TNF e IFN- γ



Células A549 (10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e estimuladas com TNF e INF- γ , por 20 h e marcadas com a sonda DCFH-DA. A produção de EROs foi medida pela intensidade de DCF (excitação - 485 nm; emissão - 535 nm) em citômetro de fluxo. Os dados foram analisados em software FlowJo e apresentados como % dos níveis de EROs $\pm$ desvio padrão comparados com o grupo controle (células estimuladas com TNF e INF- γ) (controle positivo: quercetina 50 μ M) (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 e **** p <0,0001 - ANOVA com pós-teste Tukey).

As cumarinas são reconhecidas como uma classe de compostos antioxidantes, associadas a ações quelantes e de eliminação de radicais (TODOROV; SASO; KOSTOVA, 2023). As propriedades antioxidantes da umbeliferona são atribuídas à sua capacidade de eliminar radicais livres, à quelação de metais e à inibição da

peroxidação lipídica (MAZIMBA, 2017). No entanto, foi relatado que a umbeliferona também pode aumentar os níveis intracelulares de EROs, induzindo assim a apoptose nas células cancerígenas. Por exemplo, em linhagens celulares de carcinoma gástrico (MKN-45) e de carcinoma pancreático (MIA PaCa-2), essa substância promoveu elevação nos níveis intracelulares de EROs em 14% e 41%, respectivamente (ASLANTÜRK; AŞKIN ÇELİK, 2023). Da mesma forma, células KB (carcinoma oral humano) tratadas com umbeliferona a 50, 100 e 150 µM exibiram um aumento moderado nos níveis de EROs (40%, 41% e 42%, respectivamente) em comparação com células não tratadas (VIJAYALAKSHMI; SINDHU, 2017). Além disso, estudos envolvendo arilcumarinas 7,8-diacetiladas, derivados de 3-arilcumarina e 7,8-diidroxi-4-metilcumarina também demonstraram um aumento nos níveis intracelulares de EROs em linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão humano (GOEL et al., 2007; MUSA et al., 2015; MUSA; KOLAWOLE, 2023).

Foi demonstrado que algumas lactonas sesquiterpênicas elevam a produção intracelular de EROs, com um mecanismo atribuído à indução de apoptose em células tumorais (CHATURVEDI, 2011). Em contrapartida, descobriu-se que as lactonas sesquiterpênicas de *Artemisia austroyunnanensis* diminuem os níveis de EROs de uma maneira dependente da concentração em células RAW264.7 estimulados por LPS, enquanto quatro lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Schkuhria pinnata* exibiram inibição moderada de EROs nesse mesmo modelo (KUDUMELA; MAZIMBA; MASOKO, 2019; LIU et al., 2020). Esses resultados são consistentes com os dados obtidos no presente trabalho, nos quais as lactonas sesquiterpênicas de *C. cruciata* também apresentaram redução dos níveis de EROs de maneira concentração-dependente.

Assim como as cumarinas, os flavonoides possuem dupla ação em relação à homeostase de EROs, atuando como antioxidantes em condições normais ou como pró-oxidantes em células cancerígenas, desencadeando as vias apoptóticas e regulando negativamente as vias de sinalização pró-inflamatórias (KOPUSTINSKIENE et al., 2020).

Alguns exemplos são a baicaleína, uma flavona tri-hidroxilada, a isoorientina, uma flavona glicosilada e a sotetsuflavona, uma biflavona isolada de *Cycas revoluta*, que aumentaram consideravelmente os níveis de EROs em células A549 (KIM et al., 2016; WANG et al., 2018b; XU et al., 2020). Em contraste, foi demonstrado que a quercetina inibiu a apoptose celular e reduziu a geração de EROs em células A549

estimuladas com LPS, ao passo que o pré-tratamento com o galato de epigallocatequina foi capaz de atenuar o estresse oxidativo nessa mesma linhagem estimulada com TNF (LEE et al., 2013; LV et al., 2024). Já o betuletol 3-metil-éter, isolado de *Allagopappus dichotomus*, induziu a produção de EROs em células de leucemia humana (HL-60) na concentração de 10 µM (RUBIO et al., 2010). Esse efeito dual dos flavonoides sobre a produção de EROs também foi observado no presente trabalho, uma vez que o betuletol apresentou uma ligeira redução de EROs na menor concentração (3,75 µM). Entretanto, o flavonoide S2 aumentou drasticamente os níveis a 15 µM, ressaltando que os efeitos na regulação de EROs podem variar dependendo do composto específico e do contexto celular.

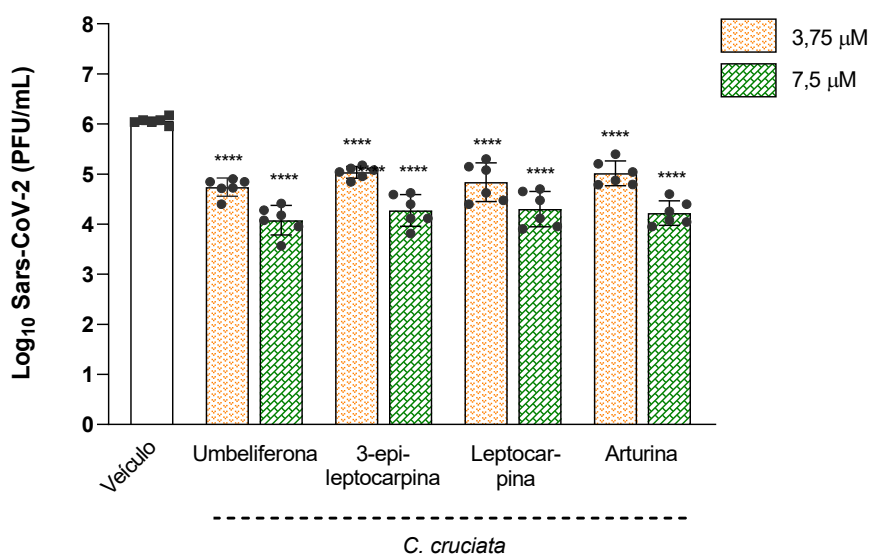
O aumento de EROs intracelular como um dos mecanismos envolvidos na ativação da apoptose também já foi relatado para alguns diterpenos com esqueleto labdânico. Este é o caso do andrografolídeo, que aumentou significativamente a produção de EROs em células de osteosarcoma e da coronarina D, que apresentou o mesmo efeito em células de carcinoma nasofaríngeo (CHEN et al., 2017; WANG et al., 2020). Na revisão da literatura realizada não foram encontrados relatos de diterpenos sobre a modulação de EROs em modelo semelhante ao descrito neste estudo. Porém, Sitarek et al. (2022) relataram o aumento dos níveis de EROS em células A549 quando tratadas com três diterpenos isolados de *Plectranthus ornatos*. Esses achados são semelhantes aos resultados obtidos, já que o diterpeno A6 e o 12-*epi*-nicandrodiol também promoveram um aumento dos níveis de EROs no modelo de A549 aqui utilizado. No entanto, pode-se considerar que no 12-*epi*-nicandrodiol esse efeito é dependente da concentração, já que a 1 µM houve uma redução dos níveis de EROs.

5.10 Efeito dos compostos isolados de *C. cruciata* na replicação do vírus SARS-CoV-2

Visando explorar o potencial antiviral da umbeliferona e das lactonas sesquiterpênicas isoladas de *C. cruciata*, estas foram avaliados em células Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2. Previamente aos ensaios, a viabilidade celular das substâncias foi avaliada, não demonstrando toxicidade nas concentrações testadas (APÊNDICE A, pág. 217). A atividade antiviral foi determinada utilizando ensaio de placas e os resultados são apresentados na **Figura 94**. A titulação da carga viral

recuperada após tratamento com os diferentes compostos foi realizada em células Vero CCL81. Todas as substâncias exibiram atividade anti-SARS-CoV-2 em ambas as concentrações ensaiadas, com uma redução na carga viral de aproximadamente 1,7 a 2,0 log na concentração de 7,5 μ M.

Figura 93 - Efeito das substâncias isoladas de *C. cruciata* nas cargas virais de células Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2



Os ensaios de placas foram realizados com sobrenadantes de células Calu-3 (10^5 células/poço) infectadas com Sars-CoV-2 (MOI 0,1) durante 48h e titulados em células Vero CCL81 sobrepostas com 0,8% de carboximetilcelulose. As células Calu-3 foram pré-tratadas 1h antes da infecção com SARS-CoV-2. O tratamento das monocamadas infectadas foi mantido até 48 h.p.i, quando o sobrenadante foi coletado e analisado quanto à infectividade utilizando ensaio de placa. Os dados obtidos foram expressos em unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL) $\pm$ desvio padrão e comparados com Veículo (DMSO + Etanol) (**p<0,001 e ****p<0,0001 - ANOVA com Tukey pós-teste).

Foi relatado anteriormente que a umbeliferona inibe a TMPRSS2 (protease serina transmembranar 2) e a ECA-2 (enzima conversora de angiotensina II), que são essenciais para a entrada do SARS-CoV-2 nas células. Esta inibição foi demonstrada através de ensaios enzimáticos baseados em FRET (Transferência de energia de ressonância por fluorescência) e análise de docking molecular (CHENG et al., 2023). Até onde sabemos, o presente trabalho demonstra pela primeira vez a inibição do SARS-CoV-2 pela umbeliferona em células infectadas com Calu-3. Este resultado demonstra o potencial da umbeliferona como agente antiviral e justifica a necessidade

de estudos adicionais visando explorar sua potencial aplicação terapêutica no manejo de infecções pelo SARS-CoV-2.

Este estudo também apresenta o primeiro relato da atividade anti-SARS-CoV-2 da leptocarpina e da arturina. Investigações *in silico* anteriores apontaram os potenciais efeitos antivirais das lactonas sesquiterpênicas contra as proteínas SARS-CoV-2. Assim, a reinosina e a 4-fluoro-santamarin exibiram atividade potencial contra a protease Mpro, RNA replicase e proteína Spike em análises de acoplamento molecular (MEJÍAS et al., 2022). Além disso, o composto antimalárico artemisinina e seus derivados demonstraram a capacidade de se ligar ao sítio ativo do Mpro, principalmente no resíduo Cys145, inibindo assim o processo proteolítico crucial para a replicação do vírus (BADRAOUI et al., 2022). Ávila-Gálvez et al. (2022) relataram a potencial atividade inibitória do extrato de chicória contra a Mpro e contra uma protease semelhante à papaína (PLpro) do SARS-CoV-2. Posteriormente, as quatro lactonas sesquiterpênicas mais abundantes (lactucina, lactucopicrina, 11 β -13-diidrolactucina e 11 β -13-diidrolactucopicrina) identificadas neste extrato demonstraram ser responsáveis pela inibição dessas proteases, ligando-se efetivamente aos seus sítios ativos. Portanto, as lactonas sesquiterpênicas exibem atividade anti-SARS-CoV-2 promissora, conforme demonstrado por dados da literatura e também por nossos resultados em células infectadas com Calu-3.

6 CONCLUSÕES

A investigação fitoquímica de *C. cruciata* resultou no isolamento de quatro compostos descritos pela primeira vez na espécie, a umbeliferona, a nova lactona sesquiterpênica 3-epi-leptocarpina, a leptocarpina e a arturina. Todos os sinais de ressonância destes compostos foram atribuídos inequivocamente através de extensa análise de dados de RMN mono e bidimensional de ^1H e ^{13}C . Adicionalmente, do extrato etanólico de *B. stylosa* foi isolado um flavonoide inédito, com um grupo metil-butírico como substituinte, além da descrição dos dados espectroscópicos dos dois diterpenos labdânicos isolados anteriormente. O isolamento do nicandrodiol de *B. imbricata* também foi relatado pela primeira vez desta espécie.

Todas as substâncias isoladas apresentam potencial efeito na modulação de algumas citocinas pró-inflamatórias, demonstrado pela redução significativa da liberação de IL-6 em células A549 previamente estimuladas com IFN- γ e TNF e tratadas com as substâncias. Alguns dos constituintes isolados também reduziram a produção intracelular de EROs no modelo de células A549 previamente estimuladas com IFN- γ e TNF, enquanto outras substâncias aumentaram a produção. Todos os quatro compostos isolados de *C. cruciata* inibiram a replicação do SARS-CoV-2 em células Calu-3.

Coletivamente, essas descobertas destacam *C. cruciata*, *B. stylosa* e *B. imbricata* como fontes promissoras de moléculas bioativas, com potencial atividade anti-inflamatória e antiviral.

REFERÊNCIAS

ABAD, M. J. et al. Antiviral activity of some South American medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 2, p. 142–146, mar. 1999.

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

ABDALLAH, H. M. et al. Repurposing of some natural product isolates as SARS-CoV-2 main protease inhibitors via in vitro cell free and cell-based antiviral assessments and molecular modeling approaches. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 3, p. 1–18, mar. 2021.

ABE, A. E. et al. Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* trigger different effects on human neutrophils. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 1, p. 111–116, mar. 2015.

ACHIKA, J. I. et al. A Review on the Phytoconstituents and Related Medicinal Properties of Plants in the Asteraceae Family. **IOSR Journal of Applied Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 1–8, ago. 2014.

ARANDA, A. et al. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 2, p. 954–963, mar. 2013.

ASHOUR, M.; WINK, M.; GERSHENZON, J. Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes. Em: MICHAEL WINK (Ed.). **Biochemistry of Plant Secondary Metabolism: Second Editions**. 2. ed. New Jersey: Wiley Blackwell, 2010. v. 40p. 258–303.

ASLANTÜRK, Ö. S.; AŞKIN ÇELİK, T. Anticancer effect of umbelliferone on MKN-45 and MIA PaCa-2 cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 93, p. 1–10, set. 2023.

ÁVILA-GÁLVEZ, M. Á. et al. Targeting proteases involved in the viral replication of SARS-CoV-2 by sesquiterpene lactones from chicory (*Cichorium intybus* L.). **Food Function**, v. 13, p. 8977–8988, jul. 2022.

BACHIEGA, T. F. et al. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1646–1650, out. 2013.

BADRAOUI, R. et al. Antiviral Effects of Artemisinin and Its Derivatives against SARS-CoV-2 Main Protease: Computational Evidences and Interactions with ACE2 Allelic Variants. **Pharmaceuticals**, v. 2022, p. 129, 2022.

BAER, A.; KEHN-HALL, K. Viral concentration determination through plaque assays: Using traditional and novel overlay systems. **Journal of Visualized Experiments**, n. 93, p. 1–10, 2014.

BELAY, A.; GHOLAP, A. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 3, n. 11, p. 234–240, 2009.

BOHLMANN, F. et al. 8*B*-Tigloylguaiaagrazielolide from *Campovassouria bupleurifolia*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 12, p. 2860–2862, maio 1983.

BOHLMANN, F. et al. Clerodane and labdane diterpenoids from *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 24, n. 3, p. 511–515, 1985.

BOHLMANN, F.; BURKHARDT, T.; ZDERO, C. **Naturally occurring acetylenes**. London : Academic Press Inc., 1973. v. ix

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

BÚFALO, M. C. et al. In vitro cytotoxic activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis against HEP-2 cells. **Natural Product Research**, v. 24, n. 18, p. 1710–1718, 2010.

BURGOS, C. et al. Anti-inflammatory activity of *Baccharis notoserigila* against lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and identification of active fractions and their chemical constituents. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 57, 2023.

BURGOS, C. et al. Suppression of inflammation by *Baccharis punctulata* and *Baccharis trimera* through modulation of innate and adaptive immune responses. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, n. 00, p. 1–7, 2024.

BURLESON, F. G.; CHAMBERS, T. M.; WIEDBRAUK, D. L. **Virology : a laboratory manual**. San Diego, California: Academic Press, INC, 1992.

CALDERA-CRESPO, L. A. et al. Experimental Models of COVID-19. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 1–23, 5 jan. 2022.

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

CESPEDES, C. L. et al. Comparative study of ovatifolin antioxidant and growth inhibition activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4243–4251, 2001.

CHATURVEDI, D. 10. Sesquiterpene lactones: Structural diversity and their biological activities. Em: **Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry**. Kerala, India: Research Signpost, 2011. v. 37p. 313–334.

CHEN, J.-C. et al. Coronarin D induces reactive oxygen species-mediated cell death in human nasopharyngeal cancer cells through inhibition of p38 MAPK and activation of JNK. **Oncotarget**, v. 8, n. 64, p. 108006–108019, nov. 2017.

CHEN, M. et al. Myricetin inhibits TNF- α -induced inflammation in A549 cells via the SIRT1/NF- κ B pathway. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 65, p. 1–8, fev. 2021.

CHEN, X. et al. Detectable Serum Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Viral Load (RNAemia) Is Closely Correlated with Drastically Elevated Interleukin 6 Level in Critically Ill Patients with Coronavirus Disease 2019. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 8, p. 1937–1942, 15 out. 2020.

CHENG, F.-J. et al. Umbelliferone and eriodictyol suppress the cellular entry of SARS-CoV-2. **Cell & Bioscience**, v. 13, n. 1, 28 jun. 2023.

CHOI, J. G. et al. *Eupatorium fortunei* and its components increase antiviral immune responses against RNA viruses. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1–12, ago. 2017.

CHOWDHURY, M. A. et al. Immune response in COVID-19: A review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, p. 1619–1629, nov. 2020.

CHRISTENSEN, L. P.; BRANDT, K. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 3, p. 683–693, mar. 2006.

CHU, C. et al. *Eupatorium lindleyanum* DC. sesquiterpenes fraction attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 263–271, mar. 2016.

CIOTTI, M. et al. The COVID-19 pandemic. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 57, n. 6, p. 365–388, 2020.

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

CRUZ, L. F. et al. Umbelliferone (7-hydroxycoumarin): A non-toxic antidiarrheal and antiulcerogenic coumarin. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 129, p. 1–8, set. 2020.

DA COSTA, F. B.; TERFLOTH, L.; GASTEIGER, J. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: A study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. **Phytochemistry**, v. 66, n. 3, p. 345–353, fev. 2005.

DE GUTIERREZ, A. N. et al. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Disynaphia multicrenulata* from Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 6, p. 633–647, 2001.

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

DE SOUZA, T. J. T. et al. Volatile constituents of Eupatorieae (Asteraceae). Compositional multivariate analysis of volatile oils from Southern Brazilian species in the subtribe Disynaphiinae. **Phytochemistry**, v. 186, p. 1–23, mar. 2021.

DERKSEN, A. et al. Antiviral activity of hydroalcoholic extract from *Eupatorium perfoliatum* L. against the attachment of influenza A virus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 188, p. 144–152, maio 2016.

DEVI, M. et al. Insights on the emerging therapeutic potential of terpenoids as anti-inflammatory agents: a scoping review. **Journal of Bio-X Research**, v. 7, p. 1–36, jun. 2024.

DONG, F. Y. et al. Acylated flavone C-glycosides from *Hemistepta lyrata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 12, n. 9, p. 776–780, set. 2010.

DRASLER, B. et al. An Inflamed Human Alveolar Model for Testing the Efficiency of Anti-inflammatory Drugs *in vitro*. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 1–21, ago. 2020.

DROSTEN, C. et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 20, p. 1967–1976, 2003.

FAJGENBAUM, D. C.; JUNE, C. H. Cytokine Storm. **The New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 23, p. 2255–2273, dez. 2020.

FANG, L. et al. Rapid Screening and Preparative Isolation of Antioxidants from *Alpinia officinarum* Hance Using HSCCC Coupled with DPPH-HPLC Assay and Evaluation of Their Antioxidant Activities. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2018, p. 1–6, 31 jan. 2018.

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

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

FERNANDES, I. G. et al. SARS-CoV-2 and Other Respiratory Viruses: What Does Oxidative Stress Have to Do with It? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–13, dez. 2020.

FERREIRA, J. C. et al. Baccharin and p-coumaric acid from green propolis mitigate inflammation by modulating the production of cytokines and eicosanoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 278, p. 1–8, maio 2021.

FIGUEIREDO-RINHEL, A. S. G. et al. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by

seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 655–664, 2013.

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

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

FRANCIS, A. I. et al. Review of COVID-19 vaccine subtypes, efficacy and geographical distributions. **Postgraduate Medical Journal**, v. 98, p. 389–394, out. 2022.

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

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

GIOVINAZZO, G. et al. Can Natural Polyphenols Help in Reducing Cytokine Storm in COVID-19 Patients? **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 1–14, dez. 2020.

GOEL, A. et al. 7,8-Dihydroxy-4-methylcoumarin induces apoptosis of human lung adenocarcinoma cells by ROS-independent mitochondrial pathway through partial inhibition of ERK/MAPK signaling. **FEBS Letters**, v. 581, n. 13, p. 2447–2454, abr. 2007.

GONG, J. et al. Correlation analysis between disease severity and inflammation-related parameters in patients with COVID-19: a retrospective study. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–7, 2020.

GRAZIOLI, S.; PUGIN, J. Mitochondrial damage-associated molecular patterns: From inflammatory signaling to human diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1–17, maio 2018.

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

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

HAAGMANS, B. L. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation. **Lancet Infect**, v. 14, n. 1, p. 140–145, dez. 2014.

HARRISON, A. G.; LIN, T.; WANG, P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology**, v. 41, n. 12, p. 1100–1115, dez. 2020.

HASSANEIN, E. H. M. et al. Coumarins as Modulators of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–25, abr. 2020.

HATTORI, E. K. O. **Filogenia molecular da subtribo Disynaphiinae (Eupatorieae: Asteraceae), tratamento taxonômico e sinopse de *Symphyopappus*, e anatomia floral do clado *Grazielia/Symphyopappus***. Doctoral thesis—Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

HOENEISEN, M.; SICVA, M.; BOHLMANN, F. Sesquiterpenes lactones of *Podanthus mitiqui*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2765–2766, abr. 1980.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280, 2020.

HOLUB, M.; SAMEK, Z. Isolation and structure of 3-Epinobilin, 1-10-Epoxynobilin and 3-Dehydronobilin - Other sesquiterpenic lactones from the flowers of *Anthemis nobilis* L. Revision of the structure of Nobilin and Eucannabinolide. **Collection Czechoslov. Chem. Commun.**, v. 42, p. 1053–1064, 1977.

HOU, B. et al. Target-Based Virtual Screening and LC/MS-Guided Isolation Procedure for Identifying Phloroglucinol-Terpenoid Inhibitors of SARS-CoV-2. **Journal of Natural Products**, v. 85, n. 2, p. 327–336, jan. 2022.

HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 1, p. 250–256, 2021.

JAIME, M. F. V. et al. *In vitro* antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. **Virology Journal**, v. 10, n. 245, p. 1–10, 2013.

JAKUPOVIC, J.; SCHUSTER, A.; WASSHAUSEN, D. C. Acetylenes and labdanes from *Baccharis pedunculata*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2785–2787, 1991.

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

JO, S. et al. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 145–151, out. 2020.

KANG, J. et al. Studies on the bioactive flavonoids isolated from *pithecellobium clypearia* benth. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 4479–4490, 2014.

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

KAUL, R. et al. Promising Antiviral Activities of Natural Flavonoids against Sars-CoV-2 targets: Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 1–50, out. 2021.

KHAN, S. et al. Anti-inflammatory mechanism of 15,16-epoxy-3 α -hydroxylabda-8,13(16), 14-trien-7-one via inhibition of lps-induced multicellular signaling pathways. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 1, p. 67–71, jan. 2012.

KIM, H. J. et al. Baicalein Induces Caspase-dependent Apoptosis Associated with the Generation of ROS and the Activation of AMPK in Human Lung Carcinoma A549 Cells. **Drug Development Research**, v. 77, n. 2, p. 73–86, fev. 2016.

KIM, T. H. et al. A new labdane diterpenoid with anti-inflammatory activity from *Thuja orientalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 146, n. 3, p. 760–767, fev. 2013.

KING, R. M.; ROBINSON, H. Studies in the Eupatorieae (Asteraceae). LVI. A new genus, Campovassouria. **Phytologia**, v. 22, p. 121–122, 1971.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. **The evolving role of natural products in drug discovery**. **Nature Reviews Drug Discovery**, mar. 2005.

KONOVALOV, D. A. Polyacetylene Compounds of Plants of the Asteraceae Family (Review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 9, p. 613–631, 1 dez. 2014.

KOPUSTINSKIENE, D. M. et al. Flavonoids as anticancer agents. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 1–25, fev. 2020.

KÖRNER, R. W. et al. Of mice and men: The coronavirus MHV and mouse models as a translational approach to understand Sars-CoV-2. **Viruses**, v. 12, n. 880, p. 1–26, ago. 2020.

KSIAZEK, T. G. et al. A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 20, p. 1953–1966, 2003.

KUDUMELA, R. G.; MAZIMBA, O.; MASOKO, P. Isolation and characterisation of sesquiterpene lactones from *Schkuhria pinnata* and their antibacterial and anti-inflammatory activities. **South African Journal of Botany**, v. 126, p. 340–344, maio 2019.

LABARRE, D. D.; LOWY, R. J. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID₅₀ and plaque assays. **Journal of Virological Methods**, v. 96, p. 107–126, mar. 2001.

LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. **SARS-CoV-2 pathogenesis**. **Nature Reviews Microbiology** Nature Research, , 1 maio 2022.

LEAL, C. M. et al. Flavonoids from *Siparuna cristata* as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Replication. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 658–666, jul. 2021.

LEE, I. T. et al. Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against TNF- α -induced lung inflammation via ROS-dependent ICAM-1 inhibition. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 124–136, 2013.

LEE, Y. K. et al. Sesquiterpene Lactones with Anti-Inflammatory Activity from the Halophyte *Sonchus brachyotus* DC. **Molecules**, v. 28, n. 4, p. 1–11, fev. 2023.

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

LI, H. et al. Updated Approaches against SARS-CoV-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1–7, jun. 2020.

LI, L. et al. Interleukin-8 as a Biomarker for Disease Prognosis of Coronavirus Disease-2019 Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1–10, jan. 2021.

LI, Z. L. et al. Three new acylated flavone c-glycosides from the flowers of *Trollius chinensis*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 5, p. 426–432, maio 2009.

LIM, J. YE et al. Umbelliferone reduces the expression of inflammatory chemokines in HaCaT cells and DNCB/DFE-induced atopic dermatitis symptoms in mice. **International Immunopharmacology**, v. 75, p. 1–9, out. 2019.

LIU, L. et al. Sesquiterpene lactones from *Artemisia austroyunnanensis* suppresses ROS production and reduces cytokines, iNOS and COX-2 levels via NF-KB pathway *in vitro*. **Natural Product Research**, v. 34, n. 11, p. 1563–1566, jun. 2020.

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

LOW, Z. et al. COVID-19 Therapeutic Potential of Natural Products. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 1–34, maio 2023.

LOZHKIN, A. V; SAKANYAN, E. I. Natural Coumarins: methods and isolation and analysis. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, n. 6, p. 47–56, jun. 2006.

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, fev. 2020.

LUDWIG, S.; ZARBOCK, A. Coronaviruses and SARS-CoV-2: A Brief Overview. **Anesthesia and analgesia**, v. 131, n. 1, p. 93–96, 2020.

LV, P. et al. Quercetin attenuates inflammation in LPS-induced lung epithelial cells via the Nrf2 signaling pathway. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 12, n. 2, p. 1–8, fev. 2024.

MA, Q. et al. Liu Shen capsule shows antiviral and anti-inflammatory abilities against novel coronavirus SARS-CoV-2 via suppression of NF- κ B signaling pathway. **Pharmacological Research**, v. 158, p. 1–8, ago. 2020.

MAAS, M.; DETERS, A. M.; HENSEL, A. Anti-inflammatory activity of *Eupatorium perfoliatum* L. extracts, eupafolin, and dimeric guaianolide via iNOS inhibitory activity and modulation of inflammation-related cytokines and chemokines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 371–381, set. 2011.

MARTINEZ, R. et al. Leptocarpin and 17,18-Dihydroleptocarpin, two new TWO NEW HELIANGOLIDES FROM heliangolides from *Leptocarpha rivularis*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1527–1528, 1979.

MARTINEZ, R. et al. Conformational Analysis and Biological Activity of Leptocarpin and Leptocarpin Acetate. **Planta Medica**, v. 61, n. 8, p. 188–189, 1995.

MAZIMBA, O. Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review. **Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University**, v. 55, n. 2, p. 223–232, dez. 2017.

MEHTA, O. P. et al. Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive Review of Clinical Presentation. **Frontiers in Public Health**, v. 8, p. 1–9, jan. 2021.

MEJÍAS, F. J. R. et al. In Silico Evaluation of Sesquiterpenes and Benzoxazinoids Phytotoxins against Mpro, RNA Replicase and Spike Protein of SARS-CoV-2 by Molecular Dynamics. Inspired by Nature. **Toxins**, v. 14, n. 599, p. 1–18, ago. 2022.

MELO, S. DE F. et al. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in

Escherichia coli. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 496, p. 33–38, 2001.

MILLET, J.; WHITTAKER, G. R. Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. **Virus Research**, v. 202, n. 1, p. 120–134, 2015.

MINTEGUIAGA, M. et al. New C9-polyacetylenes from the essential oil of the highly endangered species *Baccharis palustris* Heering (Asteraceae). **Phytochemistry Letters**, v. 48, p. 106–113, abr. 2022.

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

MUSA, M. A. et al. In Vitro Evaluation of 3-Arylcoumarin Derivatives in A549 Cell Line. **Anticancer Research**, v. 35, n. 2, p. 653–659, fev. 2015.

MUSA, M. A.; KOLAWOLE, Q. 7,8-Diacetoxy-3-(4-methylsulfonylphenyl)-4-phenylcoumarin Induces ROS-dependent Cell Death in the A549 Human Lung Cancer Cell Line. **Anticancer Research**, v. 43, n. 3, p. 1001–1007, mar. 2023.

NAJMI, A. et al. Modern Approaches in the Discovery and Development of Plant-Based Natural Products and Their Analogues as Potential Therapeutic Agents. **Molecules**, v. 27, n. 349, p. 1–26, 2022.

NAKAJIMA, J. N. et al. Tribo Eupatorieae Cass. Em: **A família Asteraceae no Brasil: classificação e diversidade**. Salvador: EDUFBA, 2017. p. 209–230.

NEEDLE, D.; LOUNTOS, G. T.; WAUGH, D. S. Structures of the Middle East respiratory syndrome coronavirus 3C-like protease reveal insights into substrate specificity. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 71, p. 1102–1111, 2015.

NEGRI, R. Polyacetylenes from terrestrial plants and fungi: Recent phytochemical and biological advances. **Fitoterapia**, v. 106, p. 92–109, out. 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020.

NGWE TUN, M. M. et al. The discovery of herbal drugs and natural compounds as inhibitors of SARS-CoV-2 infection in vitro. **Journal of Natural Medicines**, v. 76, n. 2, p. 402–409, mar. 2022.

NIE, C. et al. In vitro efficacy of Artemisia extracts against SARS-CoV-2. **Virology Journal**, v. 18, n. 182, p. 1–7, dez. 2021.

NILE, S. H. et al. COVID-19: Pathogenesis, cytokine storm and therapeutic potential of interferons. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 53, p. 66–70, jun. 2020.

OBER, A. G.; FRONCZEK, F. R.; FISCHER, N. H. Sesquiterpenes lactones of *Calea divaricata* and the molecular structure of Leptocarpin acetate. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 2, p. 302–306, mar. 1985.

OHGITANI, E. et al. Significant inactivation of sars-cov-2 in vitro by a green tea catechin, a catechin-derivative, and black tea galloylated theaflavins. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 1–12, jun. 2021.

OMI, Y.; FUKAI, C.; FURUMOTO, T. Plant growth inhibitors from roots and root exudates of water spinach (*Ipomoea aquatica*) . 香川大学農学部学術報告, v. 72, p. 33–38, 2020.

PAÇO, A. et al. Anti-Inflammatory and Immunoregulatory Action of Sesquiterpene Lactones. **Molecules**, v. 27, n. 1142, p. 1–22, fev. 2022.

PAL, M. et al. Medicinal plants: Biological evaluation of terrestrial and marine plant originated labdane diterpenes (a review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 50, n. 8, p. 558–567, nov. 2016.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: An overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. 15, jan. 2016.

PARASHER, A. **COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment**. **Postgraduate Medical Journal** BMJ Publishing Group, , 1 maio 2021.

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

PATIL, R. H. et al. Apigenin inhibits PMA-induced expression of pro-inflammatory cytokines and AP-1 factors in A549 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 403, p. 95–106, maio 2015.

PETRUSHEVSKA, M. et al. Presentation of cytokine profile in relation to oxidative stress parameters in patients with severe COVID-19: an observational pilot study. **F1000Research**, v. 10, p. 1–14, ago. 2021.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Anticoagulant effect and Constituents of *Baccharis illinita*. **Natural Product Communications**, v. 1, p. 37–42, jan. 2006.

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

RABELO, M. B. DE O. **ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Baccharis***. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2020.

RABI, F. A. et al. SARS-CoV-2 and coronavirus disease 2019: What we know so far. **Pathogens**, v. 9, n. 3, p. 1–14, mar. 2020.

RAHALISON, L. et al. Antifungal Principles of *Baccharis pedunculata*. **Planta Medica**, v. 61, n. 04, p. 360–362, 4 ago. 1995.

RAMIREZ, S. et al. Overcoming Culture Restriction for SARS-CoV-2 in Human Cells Facilitates the Screening of Compounds Inhibiting Viral Replication. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 7, p. 1–20, jul. 2021.

REGINATTO, F. H. Introdução à Análise Fitoquímica. Em: **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2017. p. 174.

RIJSBERGEN, L. C. et al. In Vitro Modelling of Respiratory Virus Infections in Human Airway Epithelial Cells – A Systematic Review. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1–18, 18 ago. 2021.

RIVERA, V. L. et al. Origins and recent radiation of Brazilian Eupatorieae (Asteraceae) in the eastern Cerrado and Atlantic Forest. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 97, p. 90–100, 1 abr. 2016.

RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G. H. N.; MFTCHEU, J. C. Biological activities of Sesquiterpene Lactones. **Phytochemistry**, v. 15, p. 1573–1580, 1976.

ROLNIK, A.; OLAS, B. Molecular Sciences The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. **International Journal of Molecules Sciences**, v. 22, p. 1–10, mar. 2021.

ROSHDY, W. H. et al. EGYVIR: An immunomodulatory herbal extract with potent antiviral activity against SARS-CoV-2. **PLoS ONE**, v. 15, n. 11, p. 1–19, nov. 2020.

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

RUNFENG, L. et al. Lianhuaqingwen exerts anti-viral and anti-inflammatory activity against novel coronavirus (SARS-CoV-2). **Pharmacological Research**, v. 156, p. 1–6, jun. 2020.

RYU, G.; SHIN, H. W. Sars-CoV-2 infection of airway epithelial cells. **Immune Network**, v. 21, n. 1, p. 1–16, fev. 2021.

SALEH, J. et al. Mitochondria and microbiota dysfunction in COVID-19 pathogenesis. **Mitochondrion**, v. 54, p. 1–7, jun. 2020.

SALLAM, M.; AL-SANAFI, M.; SALLAM, M. A Global Map of COVID-19 Vaccine Acceptance Rates per Country: An Updated Concise Narrative Review. **Journal of Multidisciplinary Healthcare**, v. 15, p. 21–45, jan. 2022.

SA-NGIAMSUNTORN, K. et al. Anti-SARS-CoV-2 Activity of *Andrographis paniculata* Extract and Its Major Component Andrographolide in Human Lung Epithelial Cells and Cytotoxicity Evaluation in Major Organ Cell Representatives. **Journal of Natural Products**, v. 84, n. 4, p. 1261–1270, abr. 2021.

SAPRA, L. et al. Phytotherapy for treatment of cytokine storm in COVID-19. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 26, n. 5, p. 51–75, abr. 2021.

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

SHAHA, A. et al. Betuletol, a Propolis Component, Suppresses IL-33 Gene Expression and Effective against Eosinophilia. **Molecules**, v. 27, n. 5459, p. 1–10, ago. 2022.

SHAHINOZZAMAN, M. et al. Artepillin C: A comprehensive review of its chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. **Fitoterapia**, v. 147, p. 1–52, nov. 2020.

SHANG, C. et al. SARS-CoV-2 Causes Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy Impairment. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1–13, jan. 2022.

SHAQRA, A. M. et al. Defining the substrate envelope of SARS-CoV-2 main protease to predict and avoid drug resistance. **Nature Communications**, v. 13, n. 3556, p. 1–11, dez. 2022.

SHEN, Y. C. et al. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Eupatorium kiirunense*, a coastal plant of Taiwan. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 5, p. 745–750, maio 2005.

SHIRBHATE, E. et al. Understanding the role of ACE-2 receptor in pathogenesis of COVID-19 disease: a potential approach for therapeutic intervention. **Pharmacological Reports**, v. 73, n. 6, p. 1539–1550, 27 jun. 2021.

SINGH, S. et al. Plant-derived natural polyphenols as potential antiviral drugs against SARS-CoV-2 via RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibition: an in-silico analysis. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 16, p. 6249–6264, jul. 2021.

SINGH, T. U. et al. Drug repurposing approach to fight COVID-19. **Pharmacological Reports**, v. 72, n. 6, p. 1479–1508, dez. 2020.

SITAREK, P. et al. An Evaluation of the Novel Biological Properties of Diterpenes Isolated from *Plectranthus ornatus* Codd. In Vitro and In Silico. **Cells**, v. 11, n. 20, p. 1–23, out. 2022.

SITHISARN, P. et al. Differential antiviral and anti-inflammatory mechanisms of the flavonoids biochanin A and baicalein in H5N1 influenza A virus-infected cells. **Antiviral Research**, v. 97, n. 1, p. 41–48, jan. 2013.

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

STONE, S. et al. Cheminformatic analysis of natural product-based drugs and chemical probes. **Natural Product Reports**, v. 39, p. 20–32, jun. 2022.

TAN, L. et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 33, p. 1–3, mar. 2020.

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

TER ELLEN, B. M. et al. Resveratrol and pterostilbene inhibit SARS-CoV-2 replication in air–liquid interface cultured human primary bronchial epithelial cells. **Viruses**, v. 13, n. 1335, p. 1–17, jul. 2021.

TODOROV, L.; SASO, L.; KOSTOVA, I. Antioxidant Activity of Coumarins and Their Metal Complexes. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 5, p. 1–26, abr. 2023.

TOMAZONI, E. Z. et al. Inhibition of Alternaria stem canker on tomato by essential oils from *Baccharis* species. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 54, n. 9, p. 781–790, jul. 2019.

TORRES, C. V. et al. Study of Antiviral and Virucidal Activities of Aqueous Extract of *Baccharis articulata* against *Herpes suis* virus. **Natural Product communications**, v. 6, n. 7, p. 993–994, mar. 2011.

TORRES, F. R. et al. Labdanes, Withanolides, and Other Constituents from *Physalis nicandroides*. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 9, p. 2489–2500, set. 2019.

TORTORICI, M. A. et al. Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 26, n. 6, p. 481–489, jun. 2019.

TSAI, K. C. et al. A traditional Chinese medicine formula NRICM101 to target COVID-19 through multiple pathways: A bedside-to-bench study. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 133, p. 1–10, jan. 2021.

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

TUEKPRAKHON, A. et al. Antibody escape of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 from vaccine and BA.1 serum. **Cell**, v. 185, n. 14, p. 2422–2433, jul. 2022.

UENO, A. K. et al. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 125, p. 55–58, mar. 2018.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. DA S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 763–778, 2018.

VAN DE SAND, L. et al. Glycyrrhizin effectively inhibits sars-cov-2 replication by inhibiting the viral main protease. **Viruses**, v. 13, n. 609, p. 1–10, abr. 2021.

VAN KIEM, P. et al. Labdane-Type Diterpenoids from the Rhizomes of *Hedychium coronarium* Inhibit Lipopolysaccharide-Stimulated Production of Pro-inflammatory Cytokines in Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. **Chem. Pharm. Bull**, v. 60, n. 2, p. 246–250, 2012.

VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911–920, jan. 2017.

VERDI, L. G. et al. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85–94, 2005.

VERMA, S. et al. Anti-SARS-CoV Natural Products With the Potential to Inhibit SARS-CoV-2 (COVID-19). **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1–20, set. 2020.

VIJAYALAKSHMI, A.; SINDHU, G. Umbelliferone arrest cell cycle at G0/G1 phase and induces apoptosis in human oral carcinoma (KB) cells possibly via oxidative DNA damage. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 92, p. 661–671, ago. 2017.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, mar. 2021.

WÄCHTER, G. A.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMANN, B. N. Diterpenoids from *Baccharis pingraea*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 2, p. 307–308, fev. 1999.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlim: Springer, 1996.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 180, n. 2, p. 281–292, 2020.

WANG, D. et al. Umbelliferone Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Acute Lung Injury by Down-Regulating TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling. **Inflammation**, v. 42, n. 2, p. 440–448, abr. 2019.

WANG, F. et al. Potential Anti-inflammatory Sesquiterpene Lactones from *Eupatorium lindleyanum*. **Planta Medica**, v. 84, n. 2, p. 123–128, jan. 2018a.

WANG, S. et al. Sotetsuflavone inhibits proliferation and induces apoptosis of A549 cells through ROS-mediated mitochondrial-dependent pathway. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 235, p. 1–11, ago. 2018b.

WANG, S. et al. Andrographolide induces apoptosis in human osteosarcoma cells via the ROS/JNK pathway. **International Journal of Oncology**, v. 56, n. 6, p. 1417–1428, 2020.

WANG, Z. et al. Discovery and Nanosized Preparations of (S, R)-Tylophorine Malate as Novel anti-SARS-CoV-2 Agents. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 1840–1846, out. 2021.

WANG, Z. et al. Bioactive natural products in COVID-19 therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 1–14, ago. 2022.

WEIMANN, C. et al. Spasmolytic effects of *Baccharis conferta* and some of its constituents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, n. 1, p. 99–104, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **COVID-19 Weekly Epidemiological Update**. Geneva, Swiss: [s.n.].

XU, W. T. et al. Isoorientin induces the apoptosis and cell cycle arrest of A549 human lung cancer cells via the ROS-regulated MAPK, STAT3 and NF- κ B signaling pathways. **International Journal of Oncology**, v. 57, n. 2, p. 550–561, ago. 2020.

YANG, L. et al. The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 255, p. 1–20, jul. 2021.

YE, Q.; WANG, B.; MAO, J. The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19’. **Journal of Infection**, v. 80, n. 6, p. 607–613, 2020.

YI, Y. et al. Natural triterpenoids from licorice potently inhibit SARS-CoV-2 infection. **Journal of Advanced Research**, v. 36, p. 201–210, fev. 2022.

YU, Y. et al. Discovery of ent-labdane derivatives from *Andrographis paniculata* and their anti-inflammatory activity. **Phytochemistry**, v. 219, p. 1–9, mar. 2024.

ZAKI, A. M. et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. **The New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 19, p. 1814–1820, out. 2012.

ZAMPINI, I. C.; ISLA, M. I.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Antimicrobial and antioxidant compounds from the infusion and methanolic extract of *Baccharis incarum* (Wedd.) Perkins. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 54, n. 4, p. 477–481, set. 2009.

ZANNELLA, C. et al. Antiviral activity of *Vitis vinifera* leaf extract against SARS-CoV-2 and HSV-1. **Viruses**, v. 13, n. 1263, p. 1–18, jun. 2021.

ZANZA, C. et al. Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy. **Medicina**, v. 58, n. 144, p. 1–14, jan. 2022.

ZHANG, M.-L. et al. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Eupatorium*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, p. 40–55, 2008.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. **Chinese Medicine**, v. 13, n. 20, p. 1–26, 2018.

ZHENG, J. SARS-coV-2: An emerging coronavirus that causes a global threat. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 10, p. 1678–1685, 2020.

ZHOU, Y. W. et al. Therapeutic targets and interventional strategies in COVID-19: mechanisms and clinical studies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 317, p. 1–25, ago. 2021.

ZHU, J. et al. Luteolin inhibits spike protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) binding to angiotensin-converting enzyme 2. **Phytotherapy research**, v. 37, n. 8, p. 3508–3521, ago. 2023.

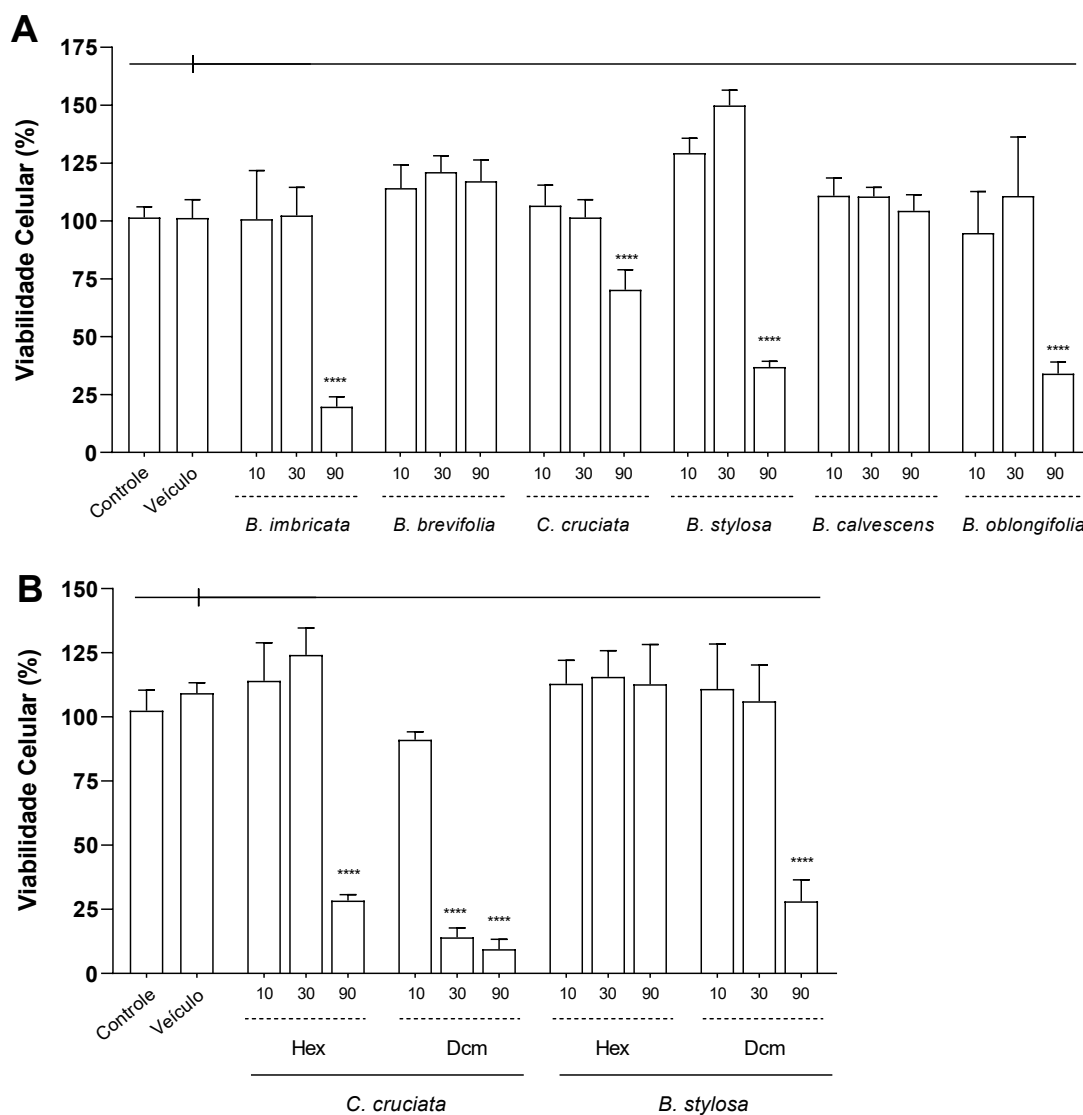
ZHU, Z. et al. Clinical value of immune-inflammatory parameters to assess the severity of coronavirus disease 2019. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 95, p. 332–339, jun. 2020.

ZOU, J. H.; YANG, J. S.; ZHOU, L. Acylated Flavone C-Glycosides from *Trollius ledebouri*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 664–667, fev. 2004.

ZUANAZZI, J. Â. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. Em: **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2017. p. 420.

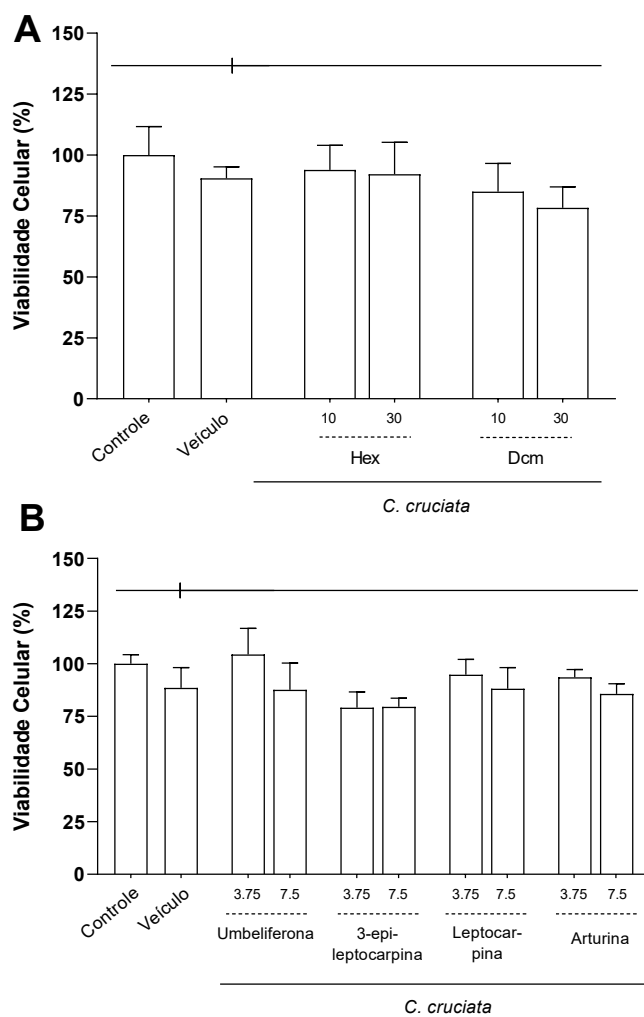
APÊNDICE A

Figura A1 - Viabilidade das células L929 após tratamento com extratos vegetais (A) e frações de *C. cruciata* e *B. stylosa* (B), nas concentrações de 10, 30 e 90 µg/mL



Os dados obtidos foram expressos em % de viabilidade celular, comparado ao Veículo (DMSO + Etanol) (**** $p < 0,0001$ - ANOVA com pós-teste de Tukey).

Figura A2 - Viabilidade de células Calu-3 após tratamento com as frações Hex e Dcm (nas concentrações de 10 e 30 µg/mL) (A) e dos compostos isolados (nas concentrações de 3,75 e 7,5 µM) (B) de *C. cruciata*



Os dados obtidos foram expressos em % de viabilidade celular, comparado ao Veículo (DMSO + Etanol) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

Tabela A1 - Valores de CC₅₀ dos extratos de *C. cruciata*, *B. stylosa* e *B. imbricata* e das respectivas frações

<i>C. cruciata</i>	CC₅₀ (± desvio padrão)
Extrato	22,3 ± 8,1
Hex	31,2 ± 12,7
Dcm	8,5 ± 3,8
<i>B. stylosa</i>	
Extrato	40,9 ± 16,4
Dcm	25,1 ± 8,1
<i>B. imbricata</i>	
Extrato	42,2 ± 8,7

CC₅₀: 50% concentração citotóxica; os valores representam a média de três experimentos independentes; faixa de concentração 0,8 – 100 µg/mL

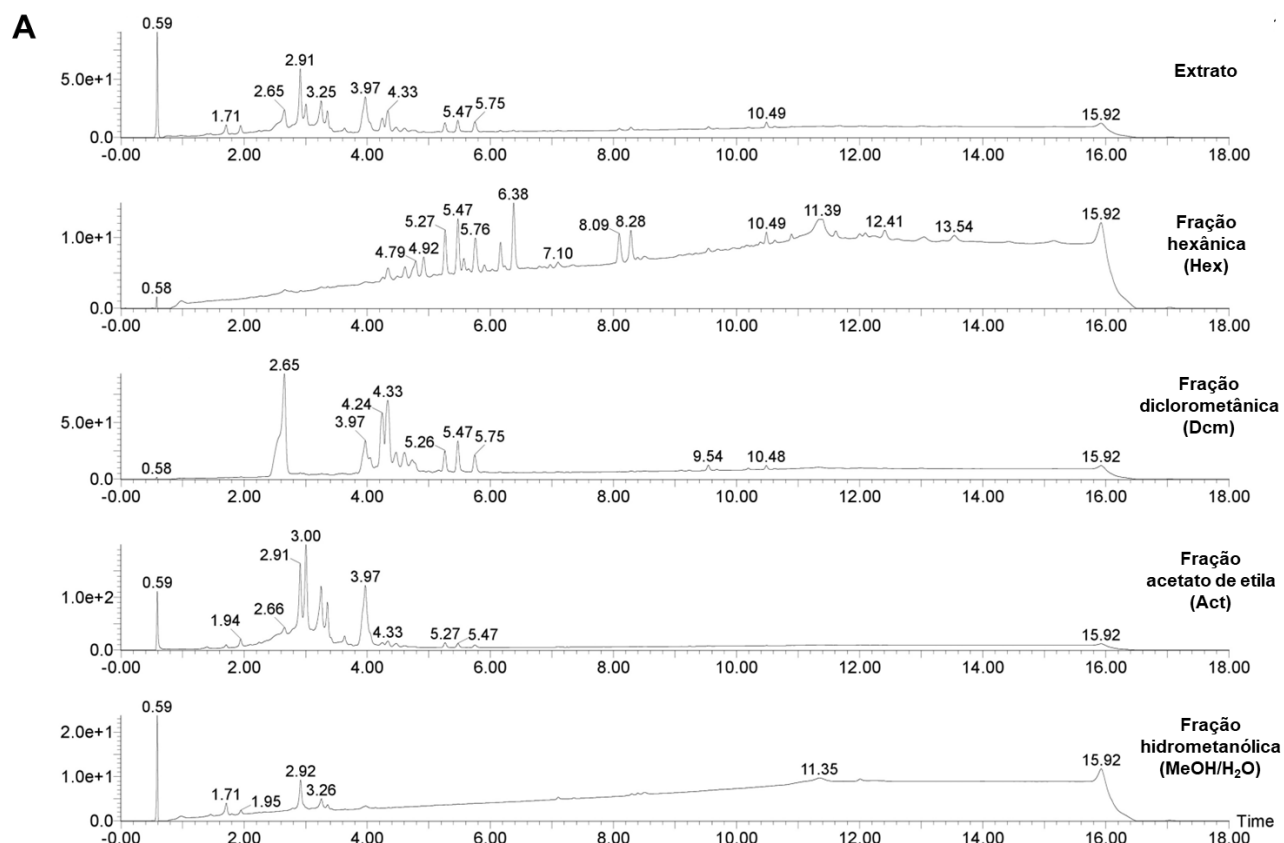
Tabela A2 - Valores de CC₅₀ Valores de CC₅₀ das substâncias isoladas de *C. cruciata*, *B. stylosa* e *B. imbricata*

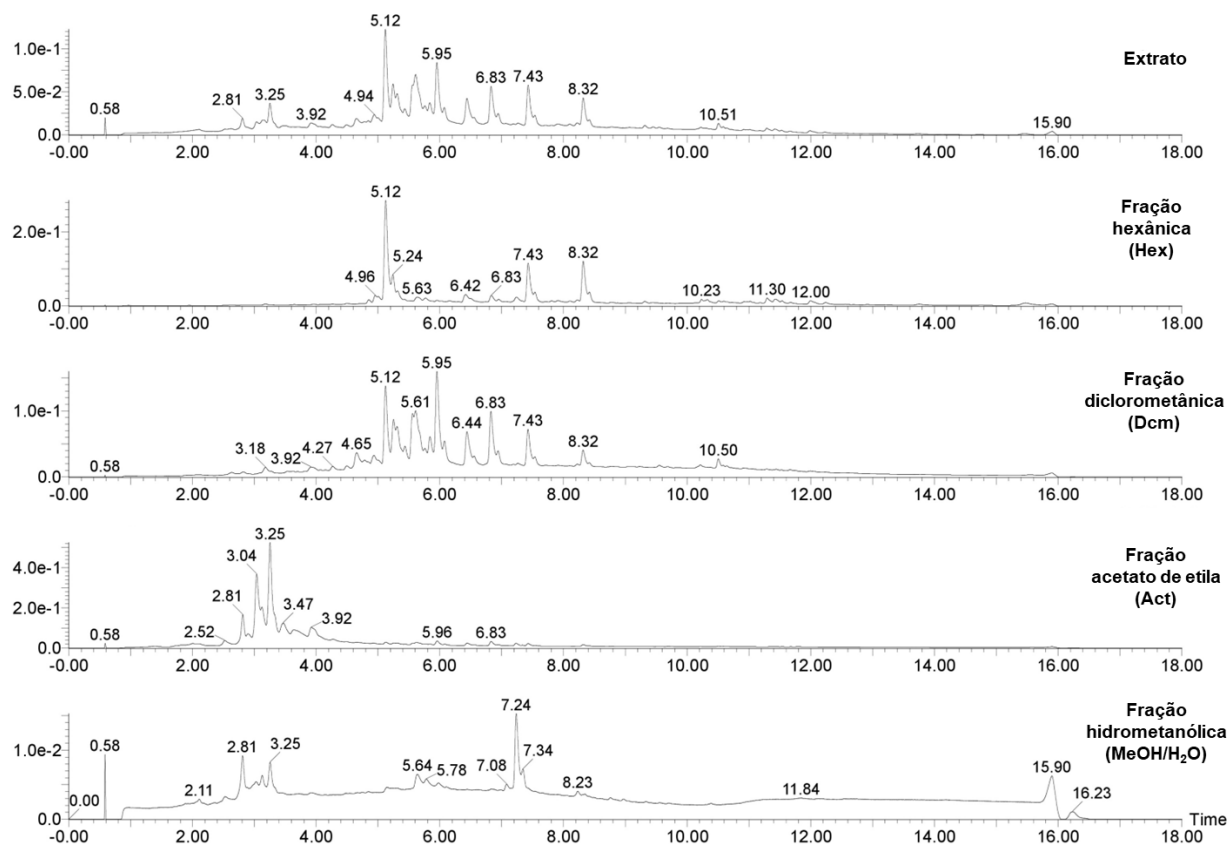
<i>C. cruciata</i>	CC ₅₀ (± desvio padrão)
umbeliferona	>200
3-epi-leptocarpina	105,2 ± 31,7
leptocarpina	66,2 ± 30,7
arturina	56,5 ± 40,0
<i>B. stylosa</i>	
S2	64,8 ± 9,2
A6	>200
B3	>200
<i>B. imbricata</i>	
12-epi-nicandrodiol	82,2 ± 18,0
betuletol	>100

CC₅₀: 50% concentração citotóxica; os valores representam a média de três experimentos independentes; faixa de concentração 1,5 – 200 µM.

APÊNDICE B

Figura B1 - Perfis cromatográficos obtidos por UPLC-DAD para o extrato etanólico e respectivas frações de *C. cruciata* (A) e *B. stylosa* (B). (Condições cromatográficas: vide Parte Experimental - item 4.11)



B

APÊNDICE C

Figura C1 - Mapa de correlações homonucleares COSY de F.63 (CDCl_3)

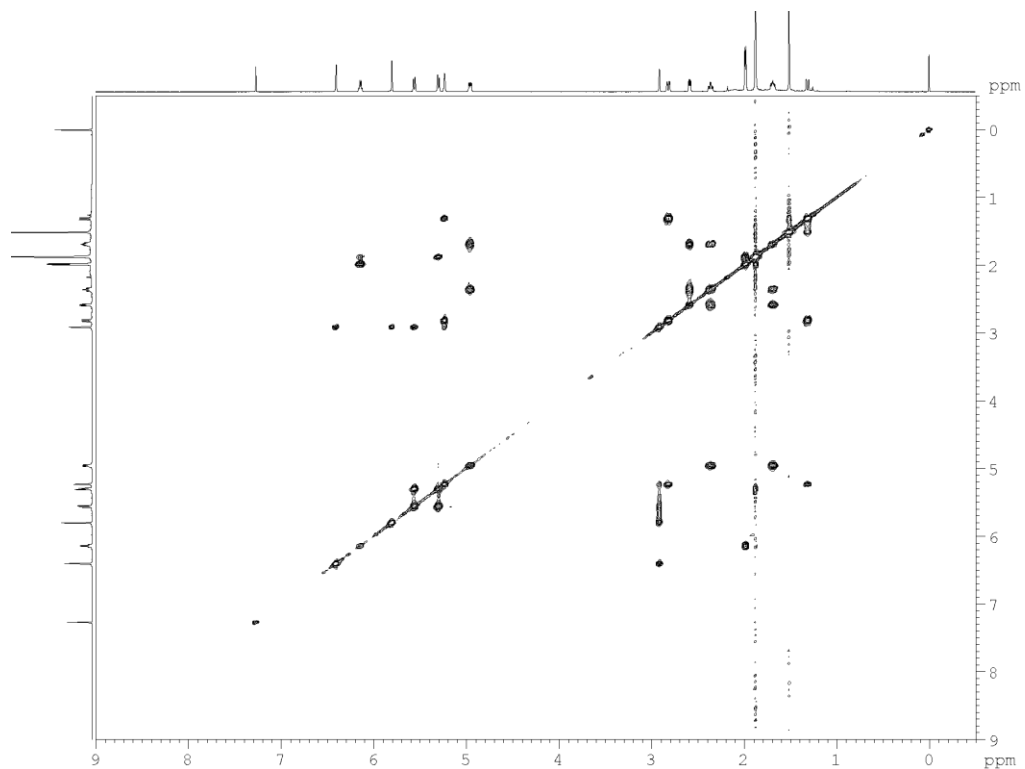
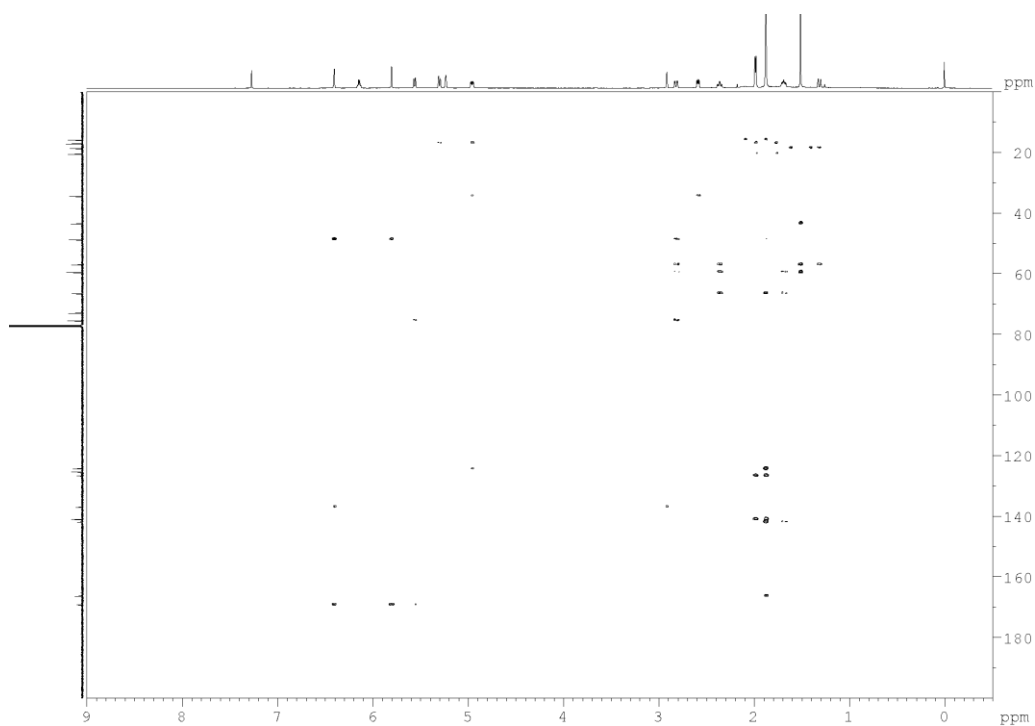


Figura C2 - Mapa de correlações heteronucleares HMBC de F.63 (CDCl_3)



APÊNDICE D

Figura D1 - Espectro de RMN de ^1H de ClITr27,5 (CDCl_3 ; 600 MHz)

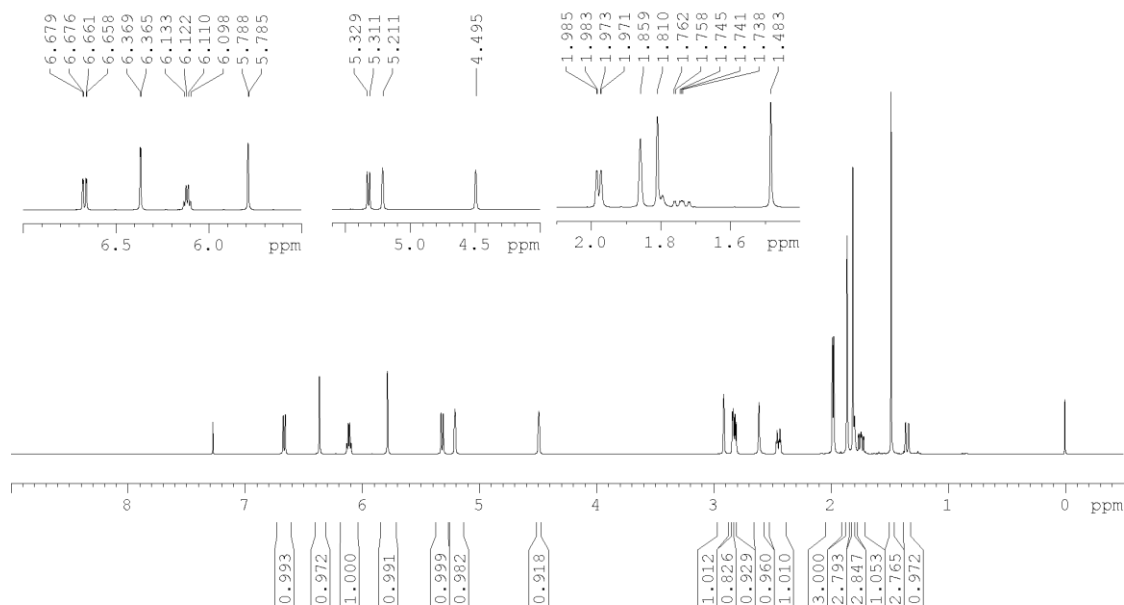


Figura D2 - Espectro de RMN de ^{13}C de ClITr27,5 (CDCl_3 ; 150 MHz)

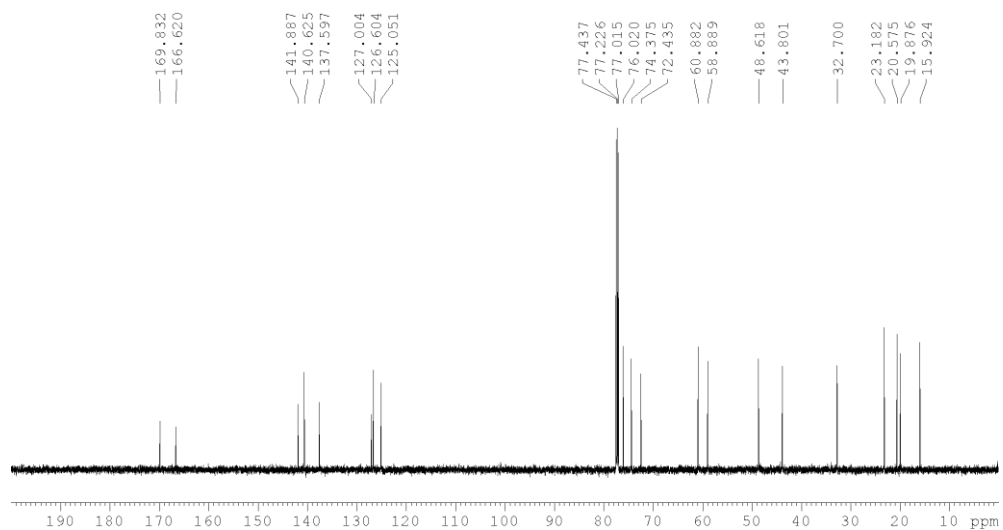


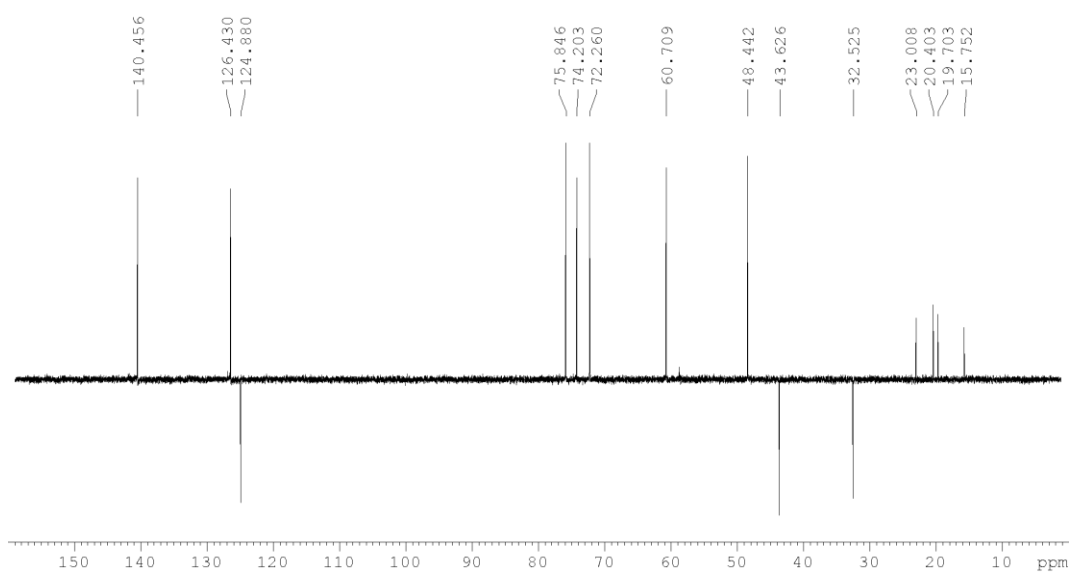
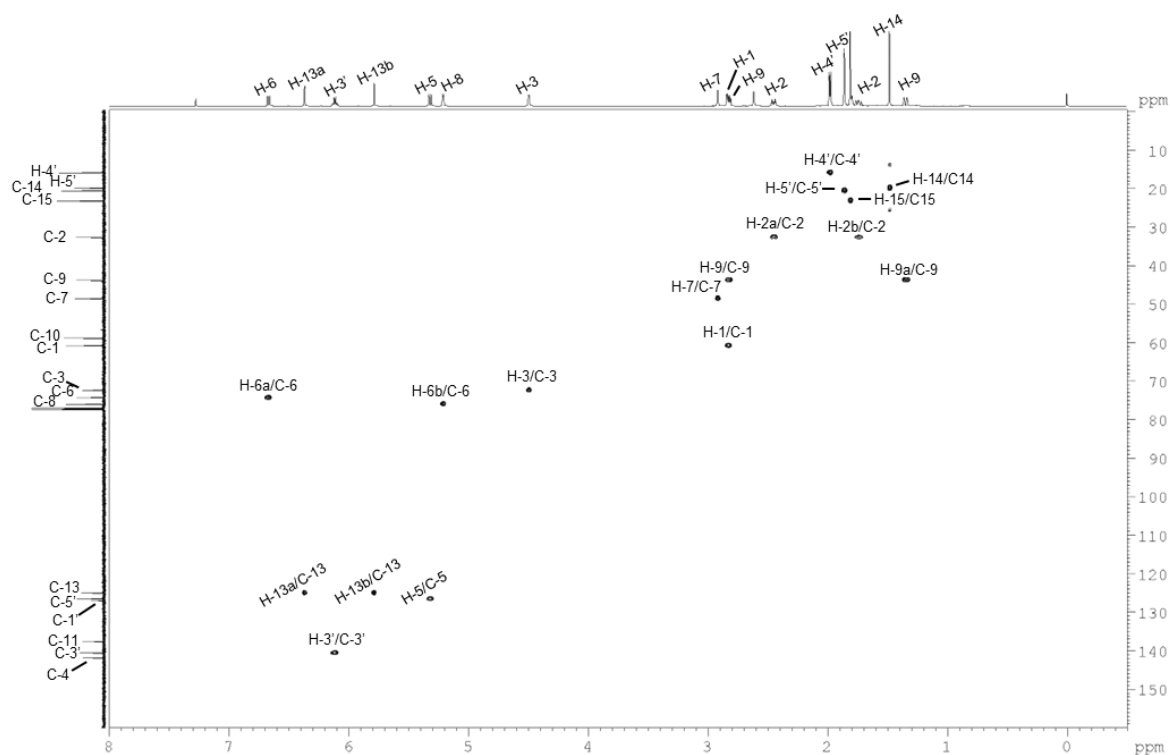
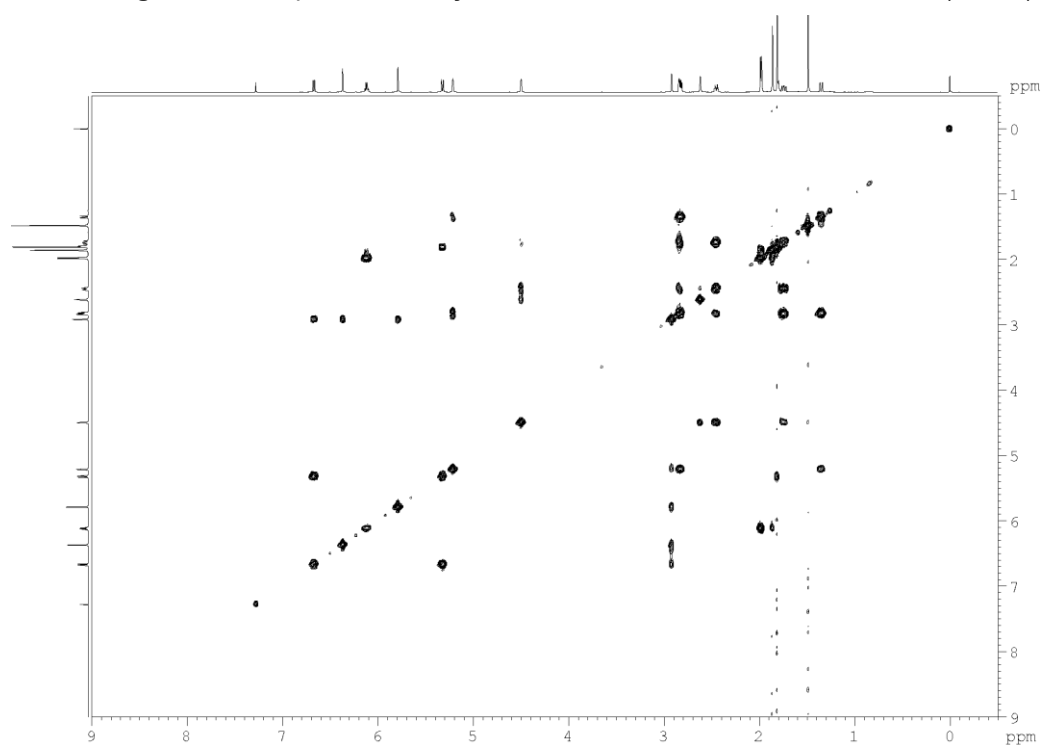
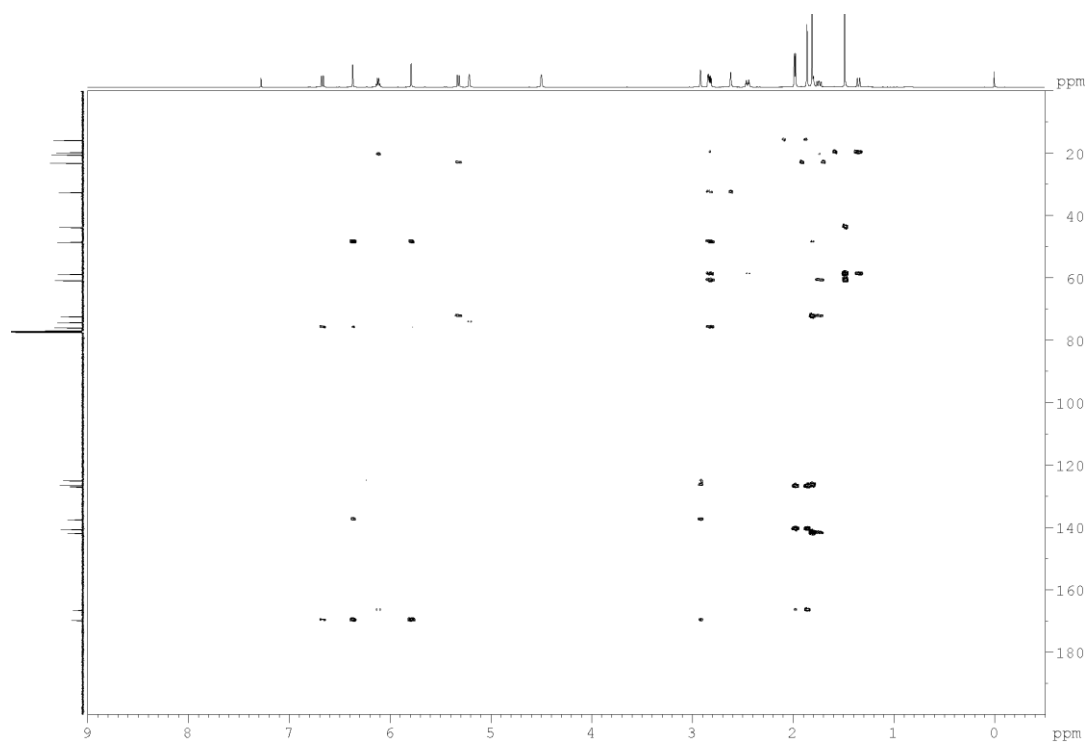
Figura D3 - Sub-espectro de DEPT-135 de ClITr27,5 (CDCl₃; 150 MHz)**Figura D4** - Mapa de contornos HSQC de ClITr27,5 (CDCl₃)

Figura D5 - Mapa de correlações homonucleares COSY de ClITr27,5 (CDCl₃)**Figura D6** - Mapa de correlações heteronucleares HMBC de ClITr27,5 (CDCl₃)

APÊNDICE E

Tabela E1 - Correlações de ^1H – ^1H (NOESY) e correlações de ^{13}C – ^1H (HMBC) de 3-epi-leptocarpina, leptocarpina e arturina obtidas em solução de CDCl_3

	3-epi-leptocarpina		Leptocarpina		Arturina	
Posição	NOESY, ^1H	HMBC, ^{13}C	NOESY, ^1H	HMBC, ^{13}C	NOESY, ^1H	HMBC, ^{13}C
1	2 α , 7, 9 α	2	2 α , 9 α	2, 8, 10, 14	2 α , 3 α ou 9 β , 3 β , 5, 9 α , 14	9, 14
2	α : 1, 2 β β : 2 α , 3, 14	1, 3, 4, 10 1, 3, 4	α : 2 β , 3 β : 2 α , 3, 14	1, 10 1, 3, 14, 15	α : 1, 3 α β : 14	1, 3, 4, 10 1, 3
3	2 β , 6, 14	2, 5, 15	2 α , 2 β , 15, 3-OH	1, 2, 4, 5, 15	α : 1, 3 β , 14, 15 α β : 1	1, 2, 4, 5, 15 2, 4, 15
4	-	-	-	-	-	-
5	7, 15	3, 15	6, 7, 15	3, 7, 15	9	1, 4, 6, 7, 10, 14, 15
6	3, 7, 14, 15	4, 7, 8, 12	5, 7, 14, 3- OH	4, 5, 7, 8, 12	14, 15 β	4, 7, 8, 10, 11
7	1, 5, 6, 8, 9 α , 13 α	5, 11, 12, 13	5, 6, 8, 9 α , 13 α	5, 6, 9, 11, 12, 13	5, 8, 9 α , 13 α	6, 11
8	7, 9 α , 9 β , 13 α	1', 6, 9, 10, 11	7, 9 α , 9 β , 13	1', 6, 9, 10, 11	7, 14	1', 6, 10
9	α : 1, 7, 8, 9 β β : 8, 9 α , 14	1, 10, 14 1, 7, 8, 10, 14	α : 1, 7, 8, 9 β β : 8, 9 α , 14	1, 10, 14 1, 2, 7, 8, 10, 14	α : 1, 7, 8 β : 8, 14	1, 10, 14 5, 7, 8, 10, 11, 14
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	α : 7, 8, 13 β β : 13 α	7, 8, 11, 12 7, 8, 11, 12	α : 8, 13 β β : 13 α	7, 8, 11, 12 7, 8, 11, 12	α : 7, 8, 13 β β : 7, 13 α	7, 12 7, 11, 12
14	3, 6, 9 β	1, 9, 10	1 ou 9 β , 6	1, 9, 10	2 β , 5', 6, 9 β	1, 5, 9, 10
15	5	3, 4, 5, 7	3, 5	3, 4, 5, 7	α : 3 α β : 6, 14	3, 4, 5 3, 4, 5
1'	-	-	-	-	-	-
2'	-	-	-	-	-	-
3'	4', 5'	1', 5'	5'	1', 4', 5'	5'	1', 4', 5'
4'		1', 2', 3', 5'		1', 2', 3', 5'		1', 2', 3', 5'
5'	3'	1', 2', 3', 4'	3'	1', 2', 3', 4'	3', 14	1', 2', 3'

APÊNDICE F

Figura F1 - Mapa de correlações homonucleares COSY de B3 (CDCl₃)

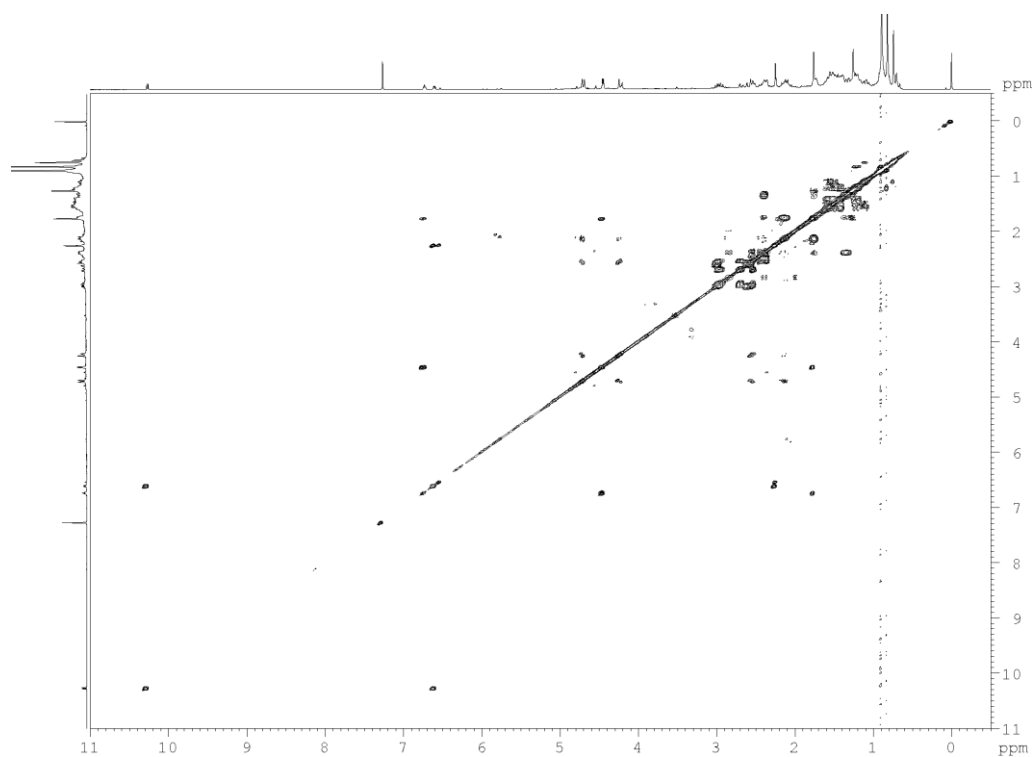
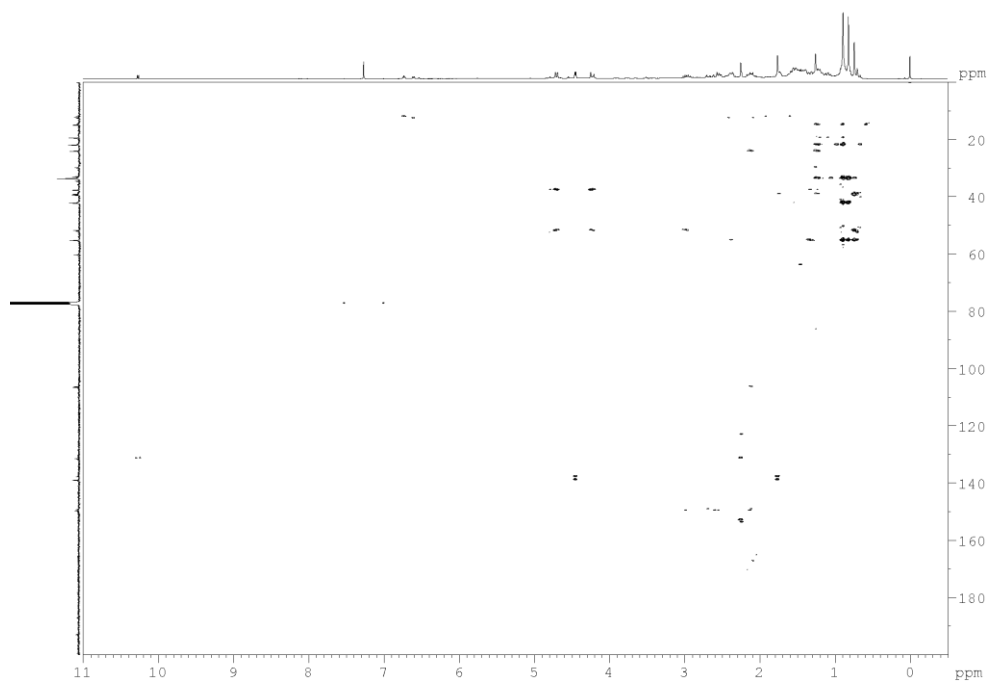


Figura F2 - Mapa de correlações heteronucleares HMBC de B3 (CDCl₃)



APÊNDICE G

Figura G1 - Mapa de contornos HSQC de Fr.243 (CDCl₃)

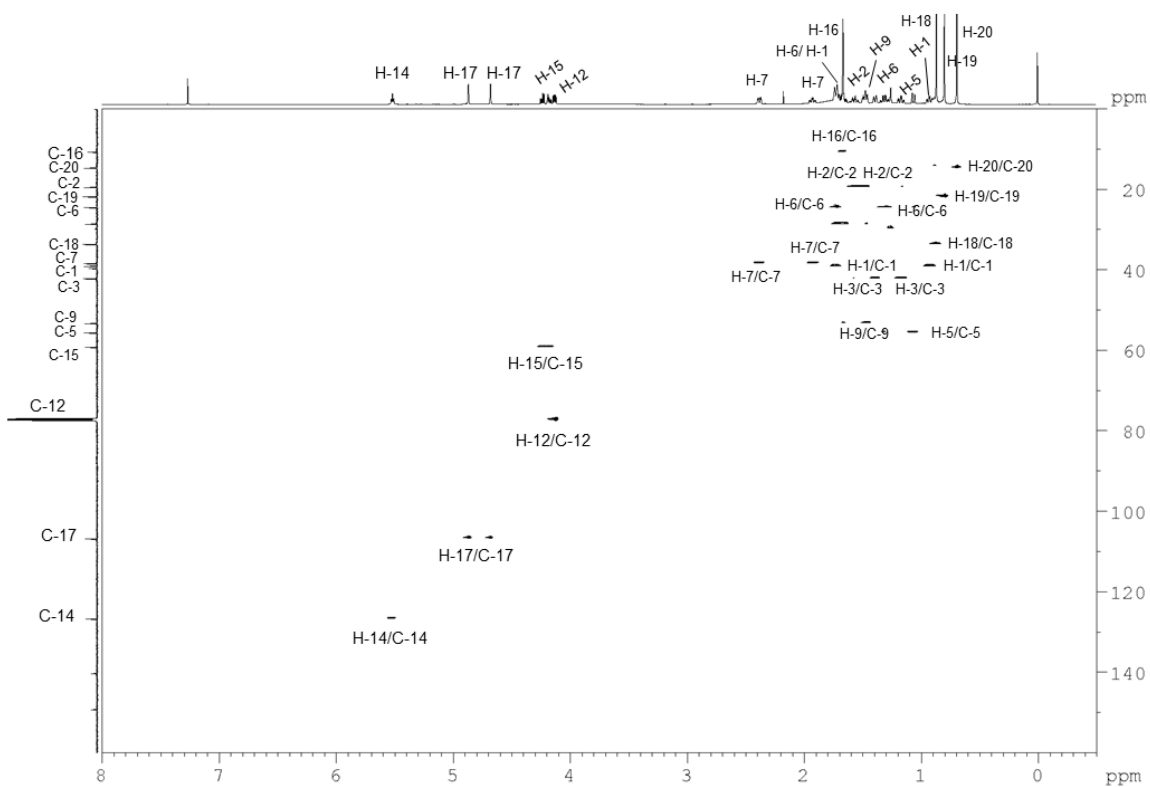


Figura G2 - Mapa de correlações heteronucleares HMBC de Fr.243 (CDCl₃)

