

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JAQUELINE BRESSAN

**CONSTITUINTES QUÍMICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DAS
PARTES AÉREAS DE *Baccharis burchellii* Baker (ASTERACEAE)**



CURITIBA

2014

JAQUELINE BRESSAN

**CONSTITUINTES QUÍMICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DAS
PARTES AÉREAS DE *Baccharis burchellii* Baker (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr^a Francinete Ramos Campos

CURITIBA

2014

TERMO DE APROVAÇÃO

JAQUELINE BRESSAN

**Título: "CONSTITUINTES QUÍMICOS, ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA DAS PARTES AÉREAS
DE *Baccharis burchellii* BAKER (ASTERACEAE)"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Profª. Drª. Francinete Ramos Campos
Orientadora


Profª. Drª. Maique Weber Biavatti
Universidade Federal de Santa Catarina


Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 28 de novembro de 2014.

Bressan, Jaqueline
Constituintes químicos, Atividade antioxidante e citotóxico das partes aéreas de
Baccharis burchellii (Asteraceae) / Jaqueline Bressan – Curitiba, 2014.
109 f. : il.(algumas color.) ; 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Francinete Ramos Campos
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2014.

Inclui bibliografia

1. *Baccharis*. 2. *Baccharis burchellii*. 3. Constituição química. 4. Atividade citotóxica.
I. Campos, Francinete Ramos. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.321

“Penso que só há um caminho para a ciência ou para a filosofia: encontrar um problema, ver a sua beleza e apaixonar-se por ele; casar e viver feliz com ele até que a morte vos separe – a não ser que encontrem outro problema ainda mais fascinante, ou, evidentemente, a não ser que obtenham uma solução. Mas, mesmo que obtenham uma solução, poderão então descobrir, para vosso deleite, a existência de toda uma família de problemas-filhos, encantadores ainda que talvez difíceis, para cujo bem-estar poderão trabalhar, com um sentido, até ao fim dos vossos dias.”

Karl Popper - *Em busca de um mundo melhor*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus que permitiu a realização deste trabalho, por sempre ter iluminado meu caminho e me dado forças para continuar e não desistir;

À minha orientadora Profa. Dra. Francinete Ramos Campos por toda a dedicação, paciência, confiança e, sobretudo, pela amizade;

Ao Centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR, ao Prof. Dr. Anderson Barrison pela ajuda na elucidação das estruturas e seus alunos Allan e Livia pelas muitas análises de RMN.

Ao Prof. Dr. Marcos Jose Salvador da IB-UNICAMP por ter aceitado a colaboração na realização das análises de CG-EM, ensaios antioxidantes e por ter nos acolhidos no seu laboratório.

*Aos especialistas no Gênero *Baccharis*, Dr. Gustavo Heiden e Dr. Angelo Schneider, e ao Museu Botânico Municipal de Curitiba (MBM) pelo auxílio na coleta e identificação da planta;*

A Daniel P. Bezerra do centro de pesquisas Gonçalo Moniz, Bahia-FIOCRUZ, por ter prontamente realizado os ensaios citotóxicos frente a linhagens celulares;

A todos os demais docentes do Departamento de Farmácia que contribuíram para minha formação;

Aos meus colegas de laboratório, especialmente Tatiana, Estevan, Luiz, Letícia Vanessa e Jane, pela agradável convivência, parceria, ajuda nas atividades e além de tudo, por serem meus amigos.

A Capes (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) pela bolsa concedida;

Minha família, principalmente meus pais, por terem me dado todo o suporte e apoiarem minhas decisões.

Ao, meu noivo, por toda paciência, carinho e incentivo. Pelo amor e dedicação, imprescindíveis para mim e para realização desse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Muito Obrigado!

Jaqueline Bressan

RESUMO

O gênero *Baccharis* é um dos mais diversificados da família Asteraceae, com ampla distribuição no continente americano. No Brasil são registradas cerca de 167 espécies, encontradas principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Dentro deste gênero, o grupo *Caulopterae* é representada por espécies conhecidas popularmente como “carquejas”. Este grupo apresenta importantes atividades biológicas que estão relacionadas com a sua grande diversidade química, como flavonoides, ácidos fenólicos e diterpenos. Por isso objetivou-se estudar a composição química e atividades biológicas das partes áreas de *Baccharis burchellii*. Para isso, o material botânico, cladódios femininos e masculinos foi submetido à extração hidroalcoólica fornecendo os extratos **Bb-F** e **Bb-M**, respectivamente. Através da análise de espectros de RMN de ^1H foi possível observar uma diversidade metabólica muito semelhante entre os extratos. Assim, o extrato **Bb-F** foi fracionado por partição líquido-líquido com os solventes em ordem crescente de polaridade (Hex, CH_2Cl_2 , AcOEt, MeOH). As frações resultantes foram purificadas por técnicas cromatográficas e analisadas por RMN uni e bidimensionais e EM. A partir destas análises foram identificadas as seguintes substâncias: escopoletina (**Bb-1**), cafeato de etila (**Bb-2**), ácido *trans* ferúlico (**Bb-3**), narigenina (**Bb-4**), 7-hidroxi-benzaldeído (**Bb-5**), β -sitosterol (**Bb-6**), estigmasterol (**Bb-7**), *p*-hidroxifenil-2''-*O-trans*-cafeoil- β -D-glucopiranosídeo (**Bb-8**) e 6-metoxi-cumarina-2''-*O-trans*-cafeoil- β -D-glucopiranosídeo (**Bb-9**). Destas substâncias, sete estão sendo relatadas pela primeira vez na seção *Caulopterae*, enquanto que **Bb-8** e **Bb-9** são produtos naturais inéditos. Ainda, os extratos **Bb-F** e **Bb-M** foram analisados por ESI-EM/EM, onde foram evidenciados os constituintes majoritários e identificados, como **Bb-1**, **Bb-8** e **Bb-9**. Foi realizado também a análise por CG-EM dos óleos essenciais das flores femininas (**BbO-F**) e flores masculinas (**BbO-M**). Do **BbO-F** e **BbO-M** foi possível identificar 28 e 26 compostos, respectivamente. Os constituintes majoritários (fêmea/macho) foram: (E)-cariofileno (11,85/6,94%), γ -gurjuneno (10,75/7,33%), biciclogermacreno (17,83/20,74%), italiceno éter (7,21/2,02%), tujopsan-2- α -ol (6,35/9,14%), acorenol (0,16/7,93), cubenol (8,22/0,61%), β -eudesmol (0,35/12,27%) e α -cadinol (9,26/0,57). Realizou-se a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante (redução do radical DPPH e ORAC_{FL}) e citotóxica dos extratos, frações e algumas substâncias isoladas, frente às linhagens celulares tumorais de melanoma murino (B16-F10), carcinoma hepatocelular humano (HepG2), leucemia mielocítica crônica humana (K562) e leucemia promielocítica humana (HL-60). Como resultado a mistura composta de **Bb-1**, **Bb-2**, **Bb-3** foi a mais antioxidante e citotóxica, principalmente sobre a linhagem celular HL-60 com IC₅₀ de 6,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sendo assim, os resultados confirmam o grande potencial desta espécie na busca de novos fármacos biologicamente ativos.

Palavras chave: *Baccharis*, *Baccharis burchellii*, constituição química, atividade citotóxica.

ABSTRACT

The *Baccharis* genus is one of the most diversified of the Asteraceae family and is widely distributed in the Americas. In Brazil are recorded about 167 species, mainly in South, Southeast and Midwest regions. In this genus, the *Caulopterae* DC. section is represented by species known as "carqueja". This group presents an important biological activity, related to their great diversity of chemical compounds, such as flavonoids, phenolic acids, and diterpenes. Therefore, this work aimed to study the chemical composition and biological activities of the aerial parties of *Baccharis burchellii*. For this, male and female cladodes were submitted to hydroalcoholic extraction, producing **Bb-M** and **Bb-F** extracts, respectively. Through the analysis of ¹H NMR spectra, was observed a very similar metabolic profile between this extracts. The **Bb-F** was fractionated by liquid-liquid partition with solvents in increasing polarity order (Hex, CH₂Cl₂, EtOAc, MeOH). The resulting fractions were purified by chromatographic techniques and analyzed by MS and NMR 1D and 2D. Were identified the following substances: Scopoletin (**Bb-1**), caffeoato ethyl (**Bb-2**), *trans* ferulic acid (**Bb-3**), narigenin (**Bb-4**), 7-hydroxy-benzaldehyde (**Bb-5**), β-sitosterol (**Bb-6**), stigmasterol (**Bb-7**), *p*-hydroxyphenyl-2''-O-*trans*-caffeoyl-β-D-glucopyranoside (**Bb-8**) and 6-methoxy-coumarin-2''-O-*trans*-caffeoyl-β-D-glucopyranoside (**Bb-9**). Seven of these substances are being reported for the first time in *Caulopterae* section, while **Bb-8** and **Bb-9** are new reported natural products. The major constituents identified by ESI-MS/MS were **Bb-1**, **Bb-8**, and **Bb-9**. GC-MS analysis of the essential oils of female flowers (**BbO-F**) and male flowers (**BbO-M**) was also performed. Were identified 28 compounds on **BbO-F** and 26 on the **BbO-M**. The major constituents (female / male) were: (E) -caryophyllene (11.85 / 6.94%), γ-gurjuneno (10.75 / 7.33%), biciclogermagreno (17.83 / 20.74%) italiceno ether (7.21 / 2.02%), α-tujopsan-2-ol (6.35 / 9.14%), acorenol (0.16 / 7.93), cubenol (8.22 / 0.61%), β-eudesmol (0.35 / 12.27%) and α-cadinol (9.26 / 0.57). Were also conducted the in vitro evaluation of antioxidant (DPPH and reducing ORACFL) and antiproliferative activity of extracts, fractions and isolated compounds against human tumor cell lines murine melanoma (B16-F10), human hepatocellular carcinoma (HepG2), human chronic myelogenous leukemia (K562) and human promyelocytic leukemia (HL-60). The mixture of the **Bb-1**, **Bb-2**, **Bb-3** was the most cytotoxic and antioxidant primarily on the cell line HL-60 (human promyelocytic leukemia) with IC₅₀ of 6.06 mg / mL. Therefore, this results confirm the great potential of this species in the search for new biologically active drugs.

keywords: *Baccharis*, *Baccharis burchellii*, chemical composition, citotoxy activity.

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 –	POSIÇÃO TAXONÔMICA DA SECÇÃO <i>CAULOPTERAE</i> NA FAMÍLIA.....	22
ESQUEMA 2 –	FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES E SEUS RESPECTIVOS RENDIMENTOS EXPRESSOS EM PORCENTAGEM.....	42
ESQUEMA 3 –	FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DE Bb-A.....	43
ESQUEMA 4 –	FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DE Bb-D.....	44
ESQUEMA 5 –	FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DE Bb-H.....	45
ESQUEMA 6 –	FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DE Bb-Aq.....	46

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DA SECÇÃO <i>CAULOPTÉRAE</i> , INSERIDAS NO GÊNERO <i>BACCHARIS</i>	23
FIGURA 2 –	A) INFLORESCÊNCIAS FEMININAS; B) INFLORESCÊNCIAS MASCULINAS.....	38
FIGURA 3 –	CROMATOGRAMAS DE BbO-M E BbO-F.....	90

LISTA DE ESPECTROS

E1 –	COMPARAÇÃO DE ESPECTROS DE RMN DE ^1H (600 MHz, CD_3OD) DE Bb-F E Bb-M.....	53
E2 –	COMPARAÇÃO DE ESPECTROS DE RMN DE ^1H (600 MHz, CD_3OD) DE Bb-F E Bb-M, AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE 8,0-6,1 ppm.....	54
E3 –	EXPERIMENTO DE VARREDURA NO MODO NEGATIVO DE Bb-F E Bb-F(METANOL).....	56
E4 –	ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, CDCl_3) SUBSTÂNCIA Bb-1.....	59
E5 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, CDCl_3) DAS SUBSTÂNCIAS Bb-1, Bb-2 E Bb-3.....	59
E6 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC (600 MHz, CDCl_3) DAS SUBSTÂNCIAS Bb-1, Bb-2 E Bb-3.....	60
E7 –	EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 193 (CE 32 V, EM METANOL) DE Bb-1.....	60
E8 –	ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA Bb-2, EM MISTURA.....	62
E9 –	EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 207 (CE 29 V, EM METANOL COM 1% DE FORMIATO DE AMÔNIA) DE Bb-2.....	63
E10 –	ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA Bb-3, EM MISTURA.....	65
E11 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, CDCl_3) DAS SUBSTÂNCIAS Bb-3, EM MISTURA.....	65
E12 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC (600 MHz, CDCl_3) DAS SUBSTÂNCIAS Bb-3, EM MISTURA.....	66
E13 –	EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 195 (CE 17 V, EM METANOL) DE Bb-3.....	66
E14 –	ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA Bb-4, EM MISTURA.....	69

E15 –	EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 271 (CE 23 V, EM METANOL 1% DE FORMIATO DE AMÔNIA) DE Bb-4.....	69
E16 –	ESPECTRO DE RMN DE 1H (600 MHz, DMSO- d_6) DA SUBSTÂNCIA Bb-5, EM MISTURA.....	71
E17 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) DAS SUBSTÂNCIAS Bb-5, EM MISTURA.....	72
E18 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) DAS SUBSTÂNCIAS Bb-5, EM MISTURA.....	72
E19 –	EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 121 (CE 35 V, EM METANOL 1% DE FORMIATO DE AMÔNIO) DE Bb-5.....	73
E20 –	ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (600 MHz, $CDCl_3$) DA MISTURA DAS SUBSTÂNCIAS Bb-6 E Bb-7, EM MISTURA.....	76
E21 –	EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 415 (CE 23 V, METANOL) DE Bb-6.....	76
E22 –	EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 413 (CE 25 V, METANOL) DE Bb-7.....	77
E23 –	ESPECTRO DE RMN DE 1H (600 MHz, DMSO- d_6) DA SUBSTÂNCIA Bb-8, EM MISTURA.....	79
E24 –	ESPECTRO DE RMN DE 1H (600 MHz, DMSO- d_6) DA SUBSTÂNCIA Bb-8, AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE AROMÁTICO (8,0-6,2 ppm).....	80
E25 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) DAS SUBSTÂNCIAS Bb-8, EM MISTURA.....	80
E26 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) DAS SUBSTÂNCIAS Bb-8, EM MISTURA.....	81
E27 –	EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 433 (CE 18 V, EM METANOL COM 1% DE FORMIATO DE AMÔNIO) DE Bb-8.....	81
E28 –	ESPECTRO DE RMN DE 1H (600 MHz, DMSO- d_6) DA SUBSTÂNCIA Bb-9.....	85
E29 –	ESPECTRO DE RMN DE 1H (600 MHz, DMSO- d_6) DA SUBSTÂNCIA Bb-9, AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE 8,0-6,1 ppm.....	85

E30 –	ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) DA SUBSTÂNCIA Bb-9, AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE 5,4-3,4 ppm.....	86
E31 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) DA SUBSTÂNCIA Bb-9.....	86
E32 –	MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC (600 MHz, DMSO- d_6) DAS SUBSTÂNCIAS Bb-9.....	87
E33 –	EXPERIMENTO DE VARREDURA DE Bb-7 (METANOI).....	87
E34 –	EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 515 (CE 18 V, METANOL) DE Bb-9.....	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E ÓLEOS ESSENCIAIS E AS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS ESPÉCIES PERTENCENTES À SEÇÃO <i>CAULOPTERAE</i>	28
TABELA 2 –	DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HMBC E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA Bb-1.....	58
TABELA 3 –	DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HMBC E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA Bb-2.....	62
TABELA 4 –	DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HMBC E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA Bb-3.....	64
TABELA 5 –	DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HMBC E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA Bb-4.....	68
TABELA 6 –	DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HMBC E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA Bb-5.....	71
TABELA 7 –	DADOS DE RMN DE ^{13}C E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA Bb-6 E Bb-7.....	75
TABELA 8 –	DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C E HMBC PARA Bb-8.....	79
TABELA 9 –	DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HMBC PARA Bb-9.....	84
TABELA 10 –	CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAS DE BbO-F E BbO-M.....	91
TABELA 11 –	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DETERMINADA PELOS ENSAIOS DPPH e ORACFL DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS DE <i>B. burchelli</i>	93
TABELA 12 –	VALORES DE IC_{50} PARA A ATIVIDADE CITOTÓXICA EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS VERSUS CÉLULAS NÃO TUMORAIS.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	- Deslocamento químico
φ	- Diâmetro da coluna
1D	- Uma dimensão
2D	- Duas dimensão
AcOEt	- Acetato de etila
Bb-F	- Extrato bruto feminino
Bb-M	- Extrato bruto masculino
Bb-Hex	- Fração hexânica
Bb-DCM	- Fração diclorometano
Bb-AE	- Fração acetato de etila
Bb-AQ	- Fração aquosa
BbO-F	- Óleo essencial feminino
BbO-M	- Óleo essencial masculino
CC	- Coluna cromatográfica clássica
CCDA	- Cromatografia de camada delgada analítica
CE	- <i>Collision energy</i>
CH ₂ Cl ₂	- Diclorometano
CH ₃ OH	- Metanol
<i>d</i>	- Dupleto
<i>dd</i>	- Duplo dupleto
<i>DIMS</i>	- <i>Direct Injection Mass Spectrometry</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
ESI	- <i>Eletrospray</i>
Hex	- Hexano
HMBC	- <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	- Hertz
<i>J</i>	- Constante de Acoplamento
IS	- <i>Ion Spray voltage</i>
LH-MS	- <i>Low resolution mass spectrum</i>
HR-MS	- <i>High resolution mass spectrum</i>
<i>m</i>	- Multiplete
<i>q</i>	- Quarteto
R _f s	- Fator de retenção
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de Carbono 13
<i>s</i>	- Simpleto

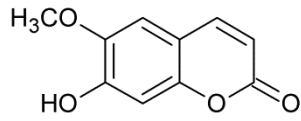
TMS - Tetrametilsilano
TOF - *Time of Fligth*
t - Tripleto

SÚMARIO

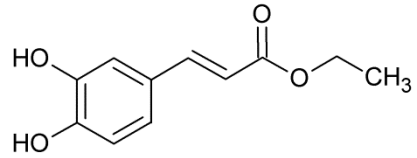
1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	FAMILIA ASTERACEAE.....	20
3.2	GÊNERO <i>BACCHARIS</i>	21
3.3	SECÇÃO <i>CAULOPTERAE</i>	22
3.4	CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DA SEÇÃO <i>CAULOPTERAE</i>	25
3.4.1	CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	25
3.4.2	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	26
3.5	<i>Baccharis burchellii</i> BAKER.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	PROCEDIMENTOS GERAIS.....	39
4.2	EQUIPAMENTOS.....	39
4.3	COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	40
4.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	41
4.5	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO.....	42
4.6	ANÁLISE DAS SUBSTÂNCIAS.....	47
4.7	EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAS.....	48
4.8	ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	49
4.8.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	49
4.8.2	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS <i>IN VITRO</i>	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	ANÁLISE DOS EXTRATOS DA ESPÉCIE MASCULINA (Bb-M) E FEMININA (Bb-F) POR RMN DE ¹ H.....	53
5.2	ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS Bb-M E Bb-F POR DIMS.....	55
5.3	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO Bb-F.....	57
5.3.1	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Bb-1.....	57
5.3.2	DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE Bb-2.....	61

5.3.3	DETERMINAÇÃO ESTRURAL DE Bb-3.....	63
5.3.4	DETERMINAÇÃO ESTRURAL DE Bb-4.....	67
5.3.5	DETERMINAÇÃO ESTRURAL DE Bb-5.....	70
5.3.6	DETERMINAÇÃO ESTRURAL DE Bb-6 E Bb-7.....	73
5.3.7	DETERMINAÇÃO ESTRURAL DE Bb-8.....	77
5.3.8	DETERMINAÇÃO ESTRURAL DE Bb-9.....	82
5.4	ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL.....	89
5.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	92
5.5.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	92
5.5.2	CITOTOXIDADE SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS.....	94
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
7	REFERÊNCIAS.....	98

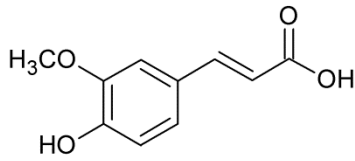
SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS



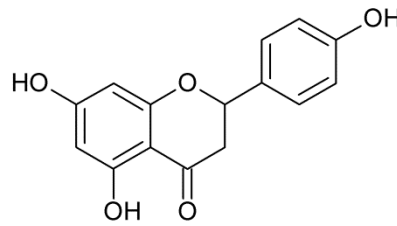
Bb-1: Escopoletina



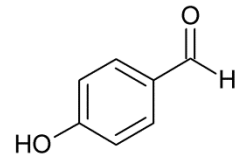
Bb-2: Cafeoato de Etila



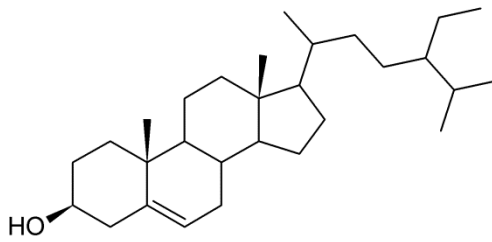
Bb-3: Ácido Ferúlico



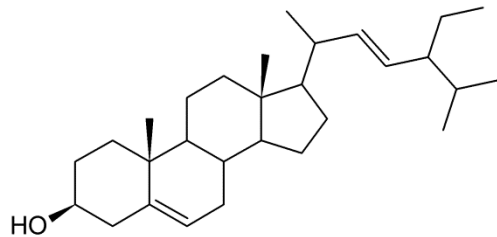
Bb-4: Naringenina



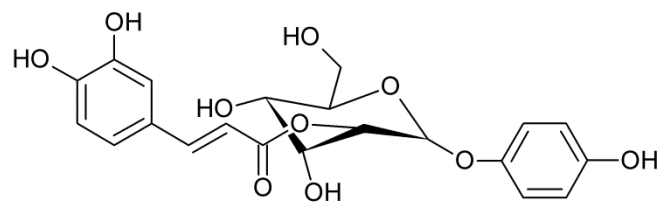
Bb-5: 7-hidroxi-benzaldeído



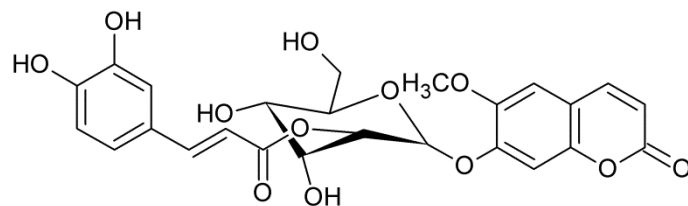
Bb-6: β-sitosterol



Bb-7: Estigmasterol



Bb-8: *p*-hidroxi-fenil-2''-*O*-*trans*-cafeoil-β-D-glucopiranosídeo



Bb-9: 6-metoxi-cumarina-2''-*O*-*trans*-cafeoil-β-D-glucopiranosídeo

1 INTRODUÇÃO

As fontes naturais oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico. O Brasil hospeda uma das maiores biodiversidades do planeta, porém, grande parte ainda permanece sem estudo. Desta forma, seus princípios ativos, suas atividades farmacológicas e os dados toxicológicos permanecem desconhecidos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Entre os biomas brasileiros, a mata atlântica é caracterizada pelo alto grau de biodiversidade, porém é um dos ecossistemas mais devastados e ameaçados de extinção. Assim muitas espécies nativas que não são conhecidas pela população correm o risco de desaparecer sem nenhum tipo de registro.

Os constituintes químicos dos vegetais são sintetizados e degradados através de uma série de transformações químicas que ocorrem no interior das células e constituem o metabolismo das plantas. Para as células vegetais, o metabolismo é dividido em primário e secundário.

O metabolismo secundário é responsável por produzir uma diversa variedade de compostos orgânicos, sendo que a grande maioria não participa diretamente no processo de crescimento e desenvolvimento da planta. O metabolismo secundário não está distribuído igualmente em todos os grupos taxonômicos, sendo exclusivos para certos vegetais. São compostos extremamente úteis para atração de polinizadores, como agentes alelopáticos, proteção contra raios UV e defesa contra herbívoros, insetos, infecção microbiana, entre outras (GARCEZ, 2013). São encontrados geralmente em diferentes concentrações e muito variáveis nos diferentes estágios de vida do vegetal.

Uma planta pode conter muitos metabólitos secundários, mas apenas os compostos que estão em maior concentração são geralmente isolados e estudados, porém muitas vezes os compostos minoritários apresentam os melhores efeitos biológicos. Por isso é indispensável analisar a potência dos extratos, frações e substâncias puras. A partir desta avaliação podemos prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado ou se esta ocorrendo um possível sinergismo entre as substâncias (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998; BRAZ-FILHO, 2010).

Embora existam diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma destas alternativas de sucesso (BARREIRO; BOLZANI, 2009). Assim adquirir a capacidade de identificar, de forma rápida e segura em matrizes complexas como extratos e frações semipurificadas é um grande diferencial para a descoberta e desenvolvimento de fitofármacos e também a padronização de extratos bioativos (BARISON; BIAVATTI, 2011). Esse ramo merece maior atenção por parte dos químicos, biólogos e farmacêuticos na busca de produtos naturais novos e com possíveis atividades biológicas.

Diante disso, encontra-se o Gênero *Baccharis* (Asteraceae) com grande relevância econômica e medicinal. Este grupo apresenta importantes atividades biológicas como antioxidante, gastroprotetora e anti-inflamatória, que estão relacionadas as substâncias presentes, como flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos (VERDI, *et al.*, 2005).

Apesar da importância deste gênero, são poucos os estudos, cerca de 30% de todas as espécies apresentam algum tipo de estudo químico ou biológico. Somando esse dado, a importância etnobotânica do gênero e a devastação dos biomas brasileiros, o estudo com *Baccharis burchellii* é de grande importância, uma vez que esta não possui estudos químicos e biológicos e está sendo relatada pela primeira vez no estado do Paraná.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudo químico, antioxidante e citotóxico das partes aéreas de *Baccharis burchellii* (Asteraceae)

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Coletar flores e cladódios de *Baccharis burchellii*;
- b) Investigar diferenças na constituição química nos espécimes femininos e masculinos;
- c) Obter óleos essenciais e extratos vegetais do material botânico;
- d) Fracionar e isolar os metabólitos dos extratos através de técnicas cromatográficas;
- e) Identificar os metabólitos secundários diretamente nos extratos, frações semi-purificadas e compostos isolados através das técnicas espectroscópicas de RMN uni e bidimensionais e EM.
- f) Realizar a caracterização química dos óleos essenciais, através de CG-EM;
- g) Realizar ensaios de atividade antioxidante e citotóxica frente às linhagens celulares tumorais de melanoma murino (B16-F10), carcinoma hepatocelular humano (HepG2), leucemia mielocítica crônica humana (K562) e leucemia promielocítica humana (HL-60).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FAMILIA ASTERACEAE

A família Asteraceae (nome antigo: Compositae) compreende 1.600 gêneros e 23.000 espécies distribuídas em todos os tipos de habitats, exceto a Antártida, sendo localizada principalmente em regiões tropicais da América do Sul (PANERO; FUNK, 2008). A família é representada principalmente por pequenos arbustos e inflorescências em forma de capítulos.

A mais recente proposta de classificação reconhece 12 subfamílias e 28 tribos, incluindo a tribo *Asterae* que ocorre amplamente em regiões temperadas e tropicais, compreendendo cerca de 205 gêneros e 3.080 espécies classificadas em 18 subtribos (NESOM, 2000). A subtribo *Baccharidinae* Less. é exclusivamente americana e inclui os gêneros *Archibaccharis* Heering e *Baccharis* Linnaeus, com 32 e 340 espécies, respectivamente (MÜLLER 2006).

A diversidade e a complexidade dos constituintes químicos nas plantas pertencentes à família Asteraceae são enormes. Segundo Cronquist (1988) o sucesso evolutivo da família Asteraceae pode ser atribuído em parte ao desenvolvimento de um sistema químico de defesa que inclui a produção combinada de compostos secundários muito derivados, do tipo poliacetilenos e lactonas sesquiterpênicas.

Inúmeras espécies de Asteraceae têm sido utilizadas na medicina popular, apresentando uma ampla quantidade de metabólitos secundários com atividades biológicas comprovadas, tais como *Matricaria recutita* (camomila) *Calendula officinalis* (calêndula), *Mikania glomerata* (guaco), *Arnica montana* (arnica), *Artemisia absinthium* (losna), *Baccharis trimera* (carqueja), entre outras. Em um estudo sobre plantas medicinais, Asteraceae destacou-se como a família mais usada na medicina popular (BRASILEIRO *et al.*, 2008). Esse sucesso foi correlacionado com a sua diversidade química, aliada à ampla distribuição geográfica e à facilidade de cultivo.

3.2 GÊNERO *BACCHARIS*

Baccharis compreende cerca de 340 espécies (MÜLLER 2006) originalmente distribuídas nas Américas, desde o sul do Canadá até o sul da América do Sul (GIULIANO, 2001). Neste continente é diversificado e ocupa uma variedade de ambientes onde constitui um importante elemento em numerosas formações vegetais (HEIDEN; BAUMGRATZ; ESTEVES, 2012).

No Brasil, são descritas atualmente 167 espécies de *Baccharis*, pertencentes a quatro subgêneros e 21 seções ou grupos. Cerca de 83 espécies já foram relatadas no estado do Paraná, que é um dos principais centros de diversidade do gênero *Baccharis* no país (HEIDEN; BAUMGRATZ; ESTEVES, 2012; HEIDEN; DE SOUZA LEONI; NAKAJIMA, 2014).

O gênero *Baccharis* é o mais diversificado da tribo *Asterae*. Este gênero é caracterizado pela comum ocorrência de plantas dióicas, que é considerado um diferencial em comparação com outros gêneros da família *Asteraceae* (MÜLLER 2006). Espécies vegetais dióicas são as que apresentam inflorescências masculinas e femininas separadamente ao longo de seu ciclo reprodutivo, sendo um aspecto positivo, pois facilita a variabilidade genética, uma vez que a reprodução ocorre entre indivíduos diferentes.

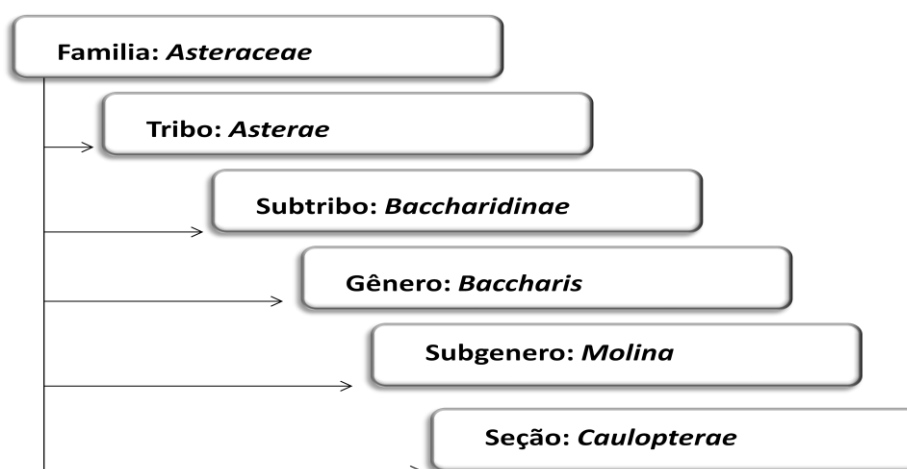
O gênero *Baccharis* é conhecido por propriedades terapêuticas e aromáticas, sendo amplamente utilizada na indústria de cosméticos e fitoterápicos. *B. dracunculifolia*, é uma das espécies mais representativas do gênero, conhecida como "alecrim-do-campo" ou "vassourinha", é a principal fonte vegetal da própolis verde do Brasil, muito utilizada pelos seus efeitos antibióticos, anti-inflamatórios e analgésicos (DOS SANTOS DIOGO *et al.*, 2010; FIGUEIREDO-RINHEL *et al.*, 2013), porém muitas vezes pode se tornar uma espécie invasora que coloniza ambientes com uma ampla gama de condições nutricionais (DE ALENCAR *et al.*, 2005; NEGREIROS *et al.*, 2014).

Do total das espécies do gênero, apenas 102 espécies aproximadamente apresentam algum tipo de estudo químico e ou atividade biológica conforme levantamento bibliográfico realizado e por Verdi ,Brighente, Pizzolatti (2005).

3.3 SECÇÃO CAULOPTERAE

Entre as 21 seções encontram-se a *Caulopterae* (FIGURA 1) que está representada por 32 espécies, sendo essas: *B. alpina* Kunth, *B. apicifolia* A.A.Schneid & Boldrine, *B. articulata* (Lam) Pers., *B. burchelli* Baker, *B. flexuosiramosa* A.A.Schneid & Boldrine, *B. genistelloides* subsp. *Crispa* (Spreng.) Joch Mull., *B. genistelloides* subsp. *lorentzii* Joch. Mull., *B. genistelloides* (Lam.) Pers. Subsp. *genistelloides*, *B. glaziovii* Baker, *B. heeringiana* Malag, *B. microcephala* (Less.) DC., *B. milleflora* (Less.) DC., *B. opuntioides* Mart., *B. organensis* Baker, *B. palustris* Heering, *B. paranensis* Heering & Dúsen, *B. penningtonii* Heering, *B. pentaptera* (Less.) DC., *B. phyteuma* Heering, *B. phyteumoides* (Less.) DC., *B. pseudovillosa* Malag. & J. E. Vidal, *B. ramboi* G. Heiden & L. Macias, *B. regnelli* Sch. Bip., *B. reticulata* Pers., *B. riograndensis* Malag. & J. E. Vidal, *B. sagittalis* (Less.) DC., *B. subalata* Wedd. var. *subalata*, *B. subalata* Wedd. var. *vargasii* Joch. Mull., *B. subbimera* Hieron., *B. triangularis* Hauman, *B. usterii* Todas as espécies desta seção são de ocorrência restrita a América do Sul e entre estas, 23 espécies são encontradas no Brasil (SCHNEIDER, 2009).

O número de espécies relacionadas por diferentes autores para a seção é variável devido às diferentes limitações adotadas. As principais classificações taxonômicas do gênero e da seção foram realizadas pelos seguintes autores: Barroso, (1976); Giuliano, (2001); Muller, (2006) e Schneider, (2009).



ESQUEMA 1: POSIÇÃO TAXONÔMICA DA SECÇÃO CAULOPTERAE NA FAMÍLIA.

Esta secção possui espécies com representação econômica expressiva, dentre as quais plantas úteis na medicina popular, na apicultura e com potencial para o paisagismo (HEIDEN, *et al.*, 2006).

Os principais centros de diversidade da seção são os Andes da Colômbia até a Argentina, as montanhas e planaltos das Regiões Sul e Sudeste do Brasil (FIGURA 2). Um centro secundário é representado por áreas de baixa altitude da Bacia do Rio da Prata, cujas espécies características ocorrem na Argentina, Paraguai, Uruguai e extremo-sul do Brasil (HEIDEN; IGANCI; MACIAS, 2009).



FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DA SECÇÃO CAULOPTERAE DO, INSERIDAS NO GÊNERO *BACCHARIS*.

FONTE: Heiden (2005).

Muitas das espécies desta seção possuem caule alado, conhecidos como cladódios, fazendo a função da folha, que esta ausente ou reduzida nestas plantas (BARROSO, 1976). Crescem aproximadamente até 1,5 metros de altura. Seu habitat geralmente é em ambientes campestres, bordas de florestas e ambientes alterados com altitude de até 2.500 metros acima do nível do mar. São conhecidas popularmente por “carquejas”. Esse nome foi dado primeiramente à espécie *B. genistifolia* DC, mas depois foi se estendendo às outras espécies de caule alados (BUDEL *et al.*, 2005).

Uma das principais espécies do gênero e da seção é *B. trimera*, que é facilmente encontrada na América do Sul. É popularmente conhecida como "carqueja" ou "carqueja-amarga", é utilizada na medicina popular como digestiva, diurética, hepatoprotetora, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, para desintoxicação e controle da obesidade (OLIVEIRA *et al.*, 2005; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; BORELLA *et al.*, 2006). Devido ao grande uso popular, esta espécie foi incluída na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira e no RENISUS (Lista Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), que lista as espécies vegetais com potencial de avançar na cadeia de abastecimento e gerar produtos de interesse (BRASIL, 2010; BRASIL, 2009).

Outra espécie bastante comum que geralmente é confundida com *B. trimera* é *B. articulata*, conhecida como "carquejinha-doce". Esta espécie possui como sinônimo *B. gaudichaniana* (SCHNEIDER, 2009). Tradicionalmente esta planta é empregada na medicina popular no sul do Brasil, Uruguai e Argentina como digestiva, diurética, tônica, antitérmica e no combate a anemia. A infusão das partes aéreas de *B. articulata* é usada como anti-diabética no Paraguai (ABAD; BERMEJO, 2007; FACHINETTO; TEDESCO, 2009).

O grupo das carquejas engloba a *B. trimera* e as espécies *B. crispa*, *B. cylindrica*, *B. jocheniana*, *B. myriocephala* que são muito semelhantes morfoanatomicamente. Em um estudo de MEV (microscopia eletrônica de varredura) realizada por Schneider, (2009), considerou que as espécies denominadas dentro do complexo das carquejas apresentam o mesmo padrão de microescultura. Também utilizando marcadores moleculares do tipo ISSR (sequências internas simples repetidas) revelou a existência de similaridade genética superior a 50% entre essas espécies. Assim esse autor sugere que as espécies deste complexo são apresentadas na sinonímia de *B. genistelloides* subsp. *crispa*.

Apesar das publicações sobre gênero *Baccharis*, ainda há controvérsia sobre a nomenclatura e os sinônimos corretos de algumas espécies desde gênero.

3.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DA SEÇÃO *CAULOPTERAE*

Foi realizado um levantamento bibliográfico das espécies pertencentes à seção *Caulopterae*, levando em consideração os constituintes químicos encontrados nos extratos, frações e óleos essenciais e as atividades biológicas (TABELA 01). Na sequência estão representadas as estruturas químicas dos constituintes químicos divididos pelas classes. Vale resaltar que das 32 espécies, apenas 10 espécies apresentaram algum tipo de estudo, sendo que *B. trimera* e *B. genistelloides* são as espécies mais estudadas da seção.

3.4.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS

Entre os constituintes químicos, 67 compostos foram isolados de extratos e frações. Em geral, os flavonóides e os diterpenos foram as maiores classes encontradas na seção, bem como para o gênero já relatado em revisões anteriores (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Os diterpenos são os compostos encontrados em maior quantidade no gênero *Baccharis* e são representados principalmente por neo e ent-clerodanos e, menos comum, ent-labdanos e kauranos (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Na seção *Caulopterae* foram relatados 29 tipos de diterpenos da forma clerodanos. Contudo, apesar do grande número de compostos identificados, são poucos os conhecimentos sobre suas propriedades farmacológicas.

Foram relatados 25 tipos de flavonoides, destacando-se as formas livres com diferentes tipos de oxigenação no anel. Estudos de Relação Estrutura Atividade (REA) tem sugerido que flavonoides na forma aglicona tem maior atividade antioxidante comparado com as formas glicosiladas que são comumente encontradas nas plantas (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Os ácidos fenólicos vem se destacando cada vez mais na composição das *Baccharis* seção *Caulopterae*. Nos últimos anos foram encontrados oito diferentes

tipos, destacando-se a classe cafeoil. Entre as espécies, *B. trimera* e *B. usterii* são as que apresentaram diferentes tipos e maiores concentrações de ácidos fenólicos.

Na investigação dos constituintes dos óleos essenciais majoritários acima de 10% de concentração, foram descritos 19 substâncias, sendo 13 sesquiterpenos e seis monoterpenos. A composição química dos óleos essenciais é bastante variável e depende de muitos fatores como a estação do ano, solo, altitude, período de colheita e a técnica de destilação usada. Essas variáveis são responsáveis pela ocorrência de alterações na constituição dos óleos essenciais encontradas por diferentes autores.

Os compostos sesquiterpênicos espatulenol e E-nerolidol são os mais encontrados nos óleos essenciais das espécies do gênero *Baccharis* (ABAD; BERMEJO, 2007). Um estudo realizado com óleo essencial de algumas espécies da seção *Caulopterae*, sugeriu a substância acetato de carquejol como um marcador para *B. trimera* (SIMOES-PIRES, *et al.*, 2005). Ressaltando a similaridade das carquejas, esse marcador serve para diferenciar *B. trimera* das demais espécies.

3.4.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Nos estudos de atividade biológica, foram relatados 24 tipos diferentes de ensaios com as espécies da seção *Caulopterae*. A maioria dos estudos utilizaram extratos e frações, sendo que *B. trimera* foi a espécie mais investigada biologicamente.

Experimentos com modelos animais com o extrato hidroalcoólico de *B. trimera*, demonstraram a redução de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos (PADUA, *et al.*, 2010). Alguns estudos comprovaram a capacidade de reduzir a inflamação, usando modelo de pleurisia induzida por carragenina, testando diferentes frações de *B. trimera* e destacando o extrato constituído basicamente por compostos fenólicos como o mais promissor (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Alguns estudos têm reportado efeitos gastroprotetores de *B. trimera* através da inibição da secreção do ácido gástrico e atuando principalmente na via reguladora colinérgica. Estes efeitos são atribuídos à alta concentração de

flavonóides e ácidos fenólicos (DE TOLEDO DIAS *et al.*, 2009; BIONDO *et al.*, 2011).

Em ratos diabéticos, a fração aquosa de *B. trimera* reduziu a hiperglicemia depois de sete dias de tratamento nos animais (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Também extratos metanólicos e aquosos da mesma planta inibiram as enzimas lípase e α - β -glicosidase, que estão relacionadas à perda de peso (DE SOUZA *et al.*, 2011).

Por outro lado, alguns autores relataram mutagenicidade, independente da dose e a apoptose em células mononucleares de sangue periférico humano utilizando extratos aquosos de *B. articulata* (CARIDDI, *et al.*, 2012). Para *B. trimera*, evidências de um efeito mutagénico do chá em células vegetais (*Allium cepa*) e em células humanas cultivadas foi mostrado de uma maneira dose-dependente (PINHO *et al.*, 2010).

Frações enriquecidas com fenólicos e terpenóides de *B. trimera* foram eficazes contra as células cancerosas cervicais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013). Já o óleo essencial de *B. trimera* foi testado numa cultura de células ganglionares da retina *in vitro* e demonstraram um efeito inibidor sobre a diferenciação de células neuronais, juntamente com uma redução da sobrevivência das células neuronais e diminuição da proliferação de células da glia (LOSQUI *et al.*, 2009).

Hemorragia e atividade proteolítica causada por venenos de cobra *Bothrops* demonstraram ser inibida na presença de um diterpenóide neo-clerodânico obtido a partir de *B. trimera* (JANUARIO *et al.*, 2004).

Para o extrato aquoso de *B. genistelloides*, foi relatado um efeito anti-artrítico *in vivo* utilizando um modelo de artrite induzida por colagénio (COELHO *et al.*, 2004).

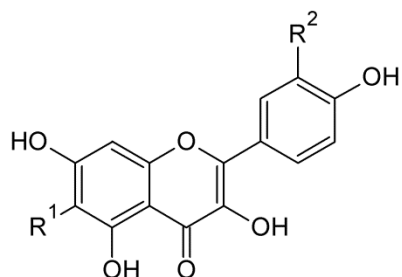
TABELA 1: CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E ÓLEOS ESSENCIAIS E AS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS ESPÉCIES PERTENCENTES À SEÇÃO CAULOPTERAE.

Espécie	Composição Química		Atividade Biológica	Referência
	Extratos e Frações	Óleo Essencial		
<i>B. articulata</i>	<p>Flavonoides: Quercetina (1), Acacetina (4), Gencuanina (5), Cirsimaritina (9), Salvigenina (10).</p> <p>Ácidos Fenólicos: 4'-O-β-D-glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzil cafeato (26), Ácido clorogênico (27).</p> <p>Diterpenos Clerodanos: 8β-Hidroxi-7-oxo-ent-cleroda-3-en-15,18-diácido-16,19 dilactona(35),7-oxo-16,19-dihidroxi-3,4-deidroclerodan 15,20-diacid-dilactona(36),15,16-Epoxi-7α-18-dihidroxi-15-metoxi-ent-clero-da-3-eno (37), Acetato de articulina (66).</p>	<p>β-Pineno (68), Espatuleno (74), trans-nerolidol (75), GermacrenoD (76), α-β-cariofileno (77), τ-gurjunene (78), α-candinol (87).</p>	<p>Antioxidante, Antimicrobiano, Antiviral, Antiproliferativo, Antimutagênico, Anti-inflamatória.</p>	<p>(GENE; MARIN; ADZET, 1992; ZUNINO <i>et al.</i>, 1997; ZUNINO <i>et al.</i>, 1998; DAI <i>et al.</i>, 1992; GIANELLO <i>et al.</i>, 2000; DE OLIVEIRA <i>et al.</i>, 2004; AGOSTINI, <i>et al.</i>, 2005; FACHINETTO; TEDESCO, 2009; VIVOT LUPI <i>et al.</i>, 2009; CARIDDI <i>et al.</i>, 2012; CIFUENTE <i>et al.</i>, 2010; RODRIGUEZ <i>et al.</i>, 2011; FLORAO <i>et al.</i>, 2012; VIVOT <i>et al.</i>, 2012).</p>
<i>B. crispa</i>	<p>Flavonoides: Apigenina (6), Pilloina (7), Gencuanina (5).</p> <p>Diterpenos Clerodanos: 15,16-epoxy-1α,7adihydroxyneocleroda3,13(16),14trien-18,19-olide(38),15,16-epoxi-7α-hidroxieocleroda 3,13(16),14-trien-18,19-olide(1-deoxibacrispina)(39),α,7α-dihroxineocleroda-3,13-dien-16,15:18,19-diolide (40),1α,7α,15-trihidroxineocleroda-3,13-dieno16,15:18,19-diolide (41), Ácido hawtriwaico (51), Lactona do ácido hawtriwaico (52), bacrispina (53), 1-desoxibacrispina (54).</p>	<p>α-pineno (69), trans-nerolidol (75), Germacreno D (76), α-β-cariofileno (77), β-cubeneno (79), γ-elemenno (80).</p>	<p>“Antifeedant”, Antimicrobiana, Antioxidante.</p>	<p>(CENAI <i>et al.</i>, 1997; ZUNINO <i>et al.</i>, 1997; GIANELLO <i>et al.</i>, 2000; SIMOES-PIRES, <i>et al.</i>, 2005; OLIVEIRA, <i>et al.</i>, 2014).</p>
<i>B.gaudichaniana</i>	<p>Flavonoides: Apigenina (6), Eupafolina (8), Hispidulina (11), Eupatorina (12), Jaceosidina (18), Desmetoxicentaureidina (19), Rutina (20), Quercetin-3-O-rhamnoside (21), 5-methoxy-7,4'-dihydroxiflavona (24), Isoschaftosideo (25).</p> <p>Ácidos Fenólicos: Ácido 3,5-O-[E]- dicafeoil-quinico (29).</p> <p>Diterpenos Clerodanos: 15,16-epoxi-7a,18-dihidroiy-15-metoxi-ent-clerod-3-eno</p>	<p>Espatuleno (74), τ-gurjuneno (78).</p>	<p>Anti-inflamatório, Antioxidante, Fator de crescimento neural.</p>	<p>(FULLAS <i>et al.</i>, 1991; FULLAS; SOEJARTO; KINGHORN, 1992; FULLAS <i>et al.</i>, 1994; AKAIKE <i>et al.</i>, 2003; HAYASHI <i>et al.</i>, 2005; Guo <i>et al.</i>, 2006; GUO <i>et al.</i>, 2007; FLORAO <i>et al.</i>, 2012).</p>

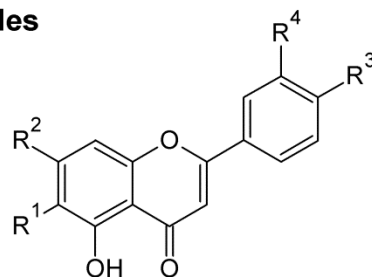
	(37), Bachariol (55), 15-hidroxi-16-acetoxi- <i>ent</i> -clerod-3-en-18-oic ácido (56) 13,14-dihidro-marrubiagenine (57), 15,16-epoxi-15 α -metoxi- <i>ent</i> -clerod-3-en-18-oic ácido (a) e 13- <i>epi</i> -15,16-epoxi-15 α -metoxi <i>ent</i> -clerod-3-en-18-oico ácido (b) (58), 7-oxo-16-hidroxi- <i>ent</i> -clerod-3-en-15-oico ácido metil ester-18,19-olide (59), Gaudichanolide A (60), Gaudichanolide B (61), Acetato de articulina (66).			
<i>B. genistelloides</i>	<p>Flavonoides: Quercetina (1), Canferol (2), Hispidulinol (3), Gencuanina (5), Apigenina (6), Cirsimaritina (9), Hispidulina (11), Eupatorina (12), Cirsiliol (13), 5-OH-6, 7,3', 4'-OMe flavona (15), 5-OH-3',4',6,7 trimetoxiflavona (16), Eriodictiol (22).</p> <p>Ácidos Fenólicos: (E)-icosil 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-acrilato (34).</p> <p>Triterpenos: Foliasalacin A₄ (63); Stigma-7,22-dien-3ol (64).</p> <p>Diterpenos Clerodanos: 15,16-epoxi-18-hidroxi-15-metoxi-<i>ent</i>-cleroda-3-eno (42) 15,16-epoxi-7α-18-dihidroxi-15-metoxi-<i>ent</i>-cleroda-3-eno (43) 15,16-epoxi-7α-18-dihidroxi-15-oxo-<i>ent</i>-cleroda-3-eno (44), 7α-15,18-trihidroxi-<i>ent</i>-cleroda-3-eno (45), 15,16-diacetoxi-7α-18-dihidroxi-<i>ent</i>-cleroda-3-eno (46);</p> <p>Outros: (E)-4-acetoxi-6-metileno-5-(prop-1-en-2)ciclohex-2-enyl 2-metilbut-2-enoato (67).</p>	Espatuleno (74), <i>trans</i> -nerolidol (75), Palustrol (81), Acetato de carquejol (70).	Antiviral, Gastroprotetora, Anti-artrite, Toxicological, Anti-inflamatória.	(BAUER <i>et al.</i> , 1978; DAILY <i>et al.</i> , 1984; SUTTISRI <i>et al.</i> , 1994; COELHO <i>et al.</i> , 2004; HENNIG <i>et al.</i> , 2011; FLORAO <i>et al.</i> , 2012).
<i>B. microcephala</i>	<p>Flavonoides: Luteolina (14).</p> <p>Triterpenos: Óxido de Baccharis (65).</p>	Espatuleno (74), Óxido de cariofileno (82).		(RETTA <i>et al.</i> , 2009; NURNBERG; FUJIWARA; MARSIALI, 1998).
<i>B. milleflora</i>		γ -gurgujeno (78).		(SIMOES-PIRES, <i>et al.</i> , 2005).
<i>B. regnelli</i>		δ -car-3-eno (72), β -Elemeno (73), Biciclogermacreno (83), α -Muuroleno (84).		(LAGO <i>et al.</i> , 2008).
<i>B. sagittalis</i>	<p>Diterpenos Clerodanos <i>cis</i>-cleroda-15,16-dihidroxi-3,13(Z)-dien-18-O β-D-galactopiranosil ester (47), <i>cis</i>-cleroda-3,13(14)-dien-</p>		"Antifeedant".	(CIFUENTE <i>et al.</i> , 2002).

	15,16-olide-18-O-[β-D-galactopiranosil]-peracetilester (48), Marrubiagenine (49).			
<i>B. trimera</i>	<p>Flavonoides: Quercetina (1), Gencuanina (5), Apigenina (6), Eupafolina (8), Cirsimaritina (9), Hispidulina (11), Eupatorina (12), Luteolina (14), Rutina (18), Nepetina (23), 5,6-diidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona (17), Quercetin-3-O-rhamnosideo (21).</p> <p>Ácidos Fenólicos: Ácido clorogênico (27) Ácido 3,4-O-[E]- dicafeoil-quínico (28), Ácido 3,5-O-[E]- dicafeoil-quínico (29), Ácido 4,5-O-[E]-dicafeoil-quínico (30), Ácido tricafeoil-quínico (32).</p> <p>Diterpenos Clerodanos; 7 α-hidroxi-3,13-clerodadieno-16,15:18,19- diolide (50), Ácido hawtriwaico (51), Lactona do ácido hawtriwaico (52), bacrispina (53), 1 desoxibacrispina (54).</p> <p>Saponinas: Ácido 3,16-di-hidroxi-olean-12-em-28-ólico (66).</p>	α-pineno (69), Acetato de carquejol (70), Mirceno (71), Germacreno D (76), β-cariofileno (77), β-cubeneno (79), γ-elemeno (80), Óxido de cariofileno (82); Biciclogermacreno (83), Ledol (86), α-Humuleno (85).	Vasorelaxante; Moluscicida; Antimutagenica; Hepatoprotetora; Mutagenica; Antimicrobiano; Alelopatica; Antiproteolítica; Antihemorrágica; Antidiabética; Antioxidante; Antiulcerogénica; Antiproliferativo; Anticancer; Anti-inflamatorio Imunomodulatório Schistosomicidal Antileishmanial.	(SOICKE; LENGPECHLOW, 1987; GENÈ <i>et al.</i> , 1996; GIANELLO <i>et al.</i> , 2000; DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2004; JANUARIO <i>et al.</i> , 2004; LUIZE <i>et al.</i> , 2005; OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2005; SIMOES-PIRES, <i>et al.</i> , 2005; BORELA <i>et al.</i> , 2006; BETONI <i>et al.</i> , 2006; MENDES; TABACH; CARLINI, 2007; SILVA <i>et al.</i> , 2007; GRANCE <i>et al.</i> , 2008; FACHINETTO; TEDESCO, 2009; DE TOLEDO DIAS <i>et al.</i> , 2009; DE MORAIS <i>et al.</i> , 2009; PAUL ELISIANE <i>et al.</i> , 2009; RODRIGUES <i>et al.</i> , 2009; PADUA BRUNO Da <i>et al.</i> , 2010; PINHO <i>et al.</i> , 2010; FABRI <i>et al.</i> , 2011; BIONDO <i>et al.</i> , 2011; NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2011; MORAIS; CASTANHA, 2011; SOUZA <i>et al.</i> , 2012; DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2012; XAVIER <i>et al.</i> , 2012; ABOY <i>et al.</i> , 2012; DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2013; PADÍN <i>et al.</i> , 2013; OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2014; ZIELINSKI <i>et al.</i> , 2014; PÁDUA <i>et al.</i> , 2014).
<i>B. usterii</i>	<p>Ácidos Fenólicos: Ácido clorogênico (27) Ácido 3,4-O-[E]- dicafeoil-quínico (28), Ácido 3,5-O-[E]- dicafeoil-quínico (29), Ácido 4,5-O-[E]-dicafeoil-quínico (30), Ácido 5-O-[E]- (31), Ácido tricafeoil-quínico (32), Ácido 4-O-[E]- cafeoil-1-metilquínico (33).</p>	Espatuleno (74).	Antioxidante.	(SIMOES-PIRES, <i>et al.</i> , 2005;

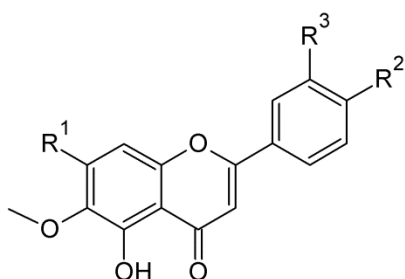
Flavonóides



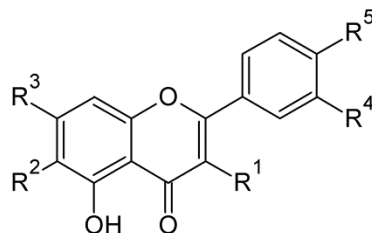
	R ¹	R ²
1	H	OH
2	H	H
3	OMe	H



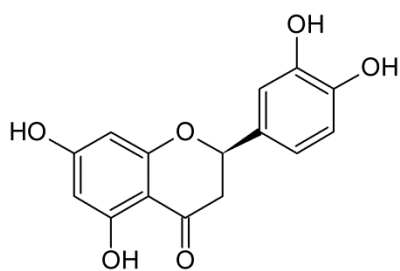
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
4	H	OH	OMe	H
5	H	OMe	OH	H
6	H	OH	OH	H
7	H	OMe	OMe	OH
8	H	OH	OH	OH



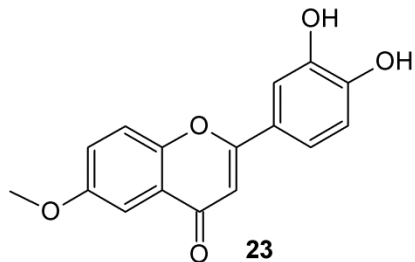
	R ¹	R ²	R ³
9	OMe	OH	H
10	OMe	OMe	H
11	OH	OH	H
12	OMe	OMe	OH



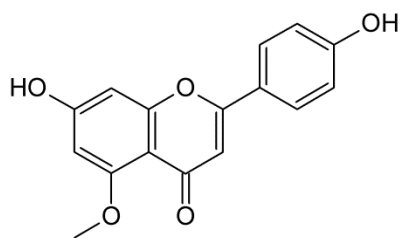
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
13	H	OMe	OMe	OH	OH
14	H	H	OH	OH	OH
15	H	OMe	OMe	OMe	OMe
16	H	OMe	OMe	OMe	H
17	H	OH	OMe	OMe	OMe
18	H	OMe	OH	OMe	OH
19	H	H	OH	OH	H
20	O-Gli	H	OH	OH	OH
21	O-Ram	H	OH	OH	OH



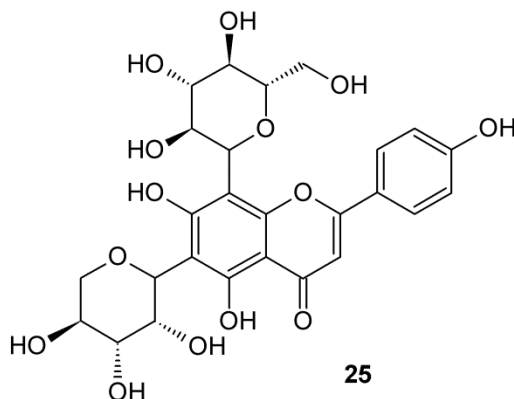
22



23

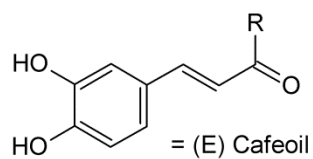
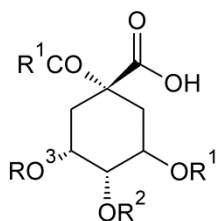
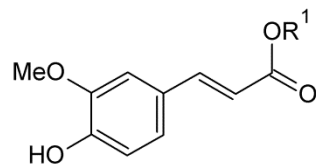
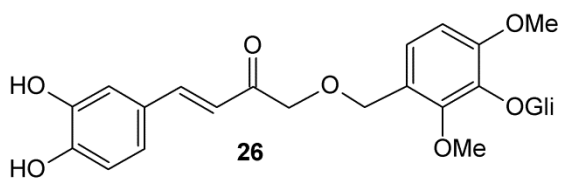


24



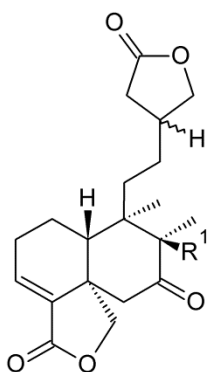
25

Ácidos Fenólicos

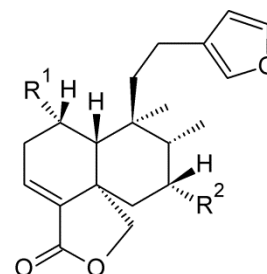
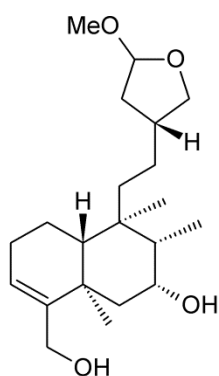


	R^1	R^3	R^4	R^5
27	OH	Caf	H	H
28	OH	Caf	Caf	H
29	OH	Caf	H	Caf
30	OH	H	Caf	Caf
31	OH	H	H	Caf
32	OH	Caf	Caf	Caf
33	OMe	H	Caf	H

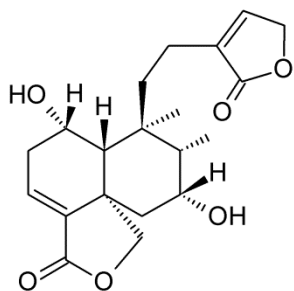
Diterpenos



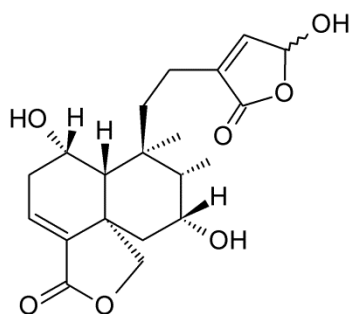
36 $R^2 = H$



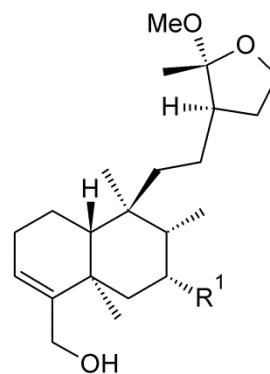
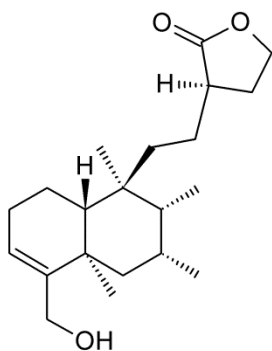
39 $R^1 = H$ $R^2 = OH$



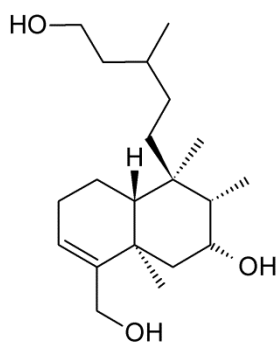
40



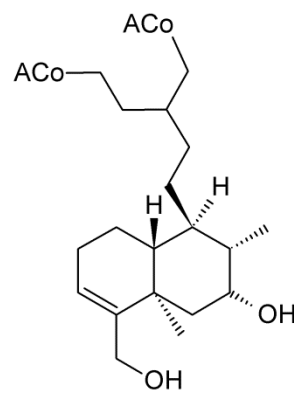
41

42 R¹=H43 R¹=OH

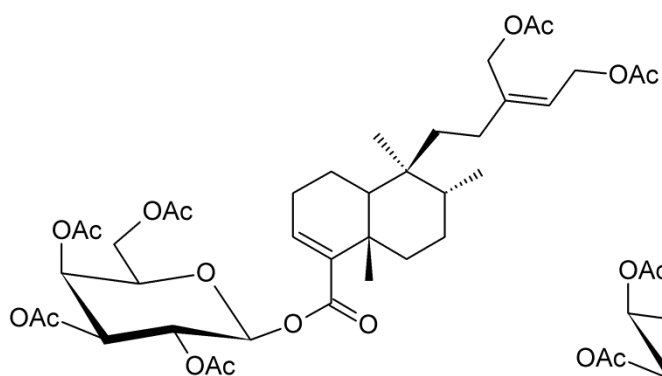
44



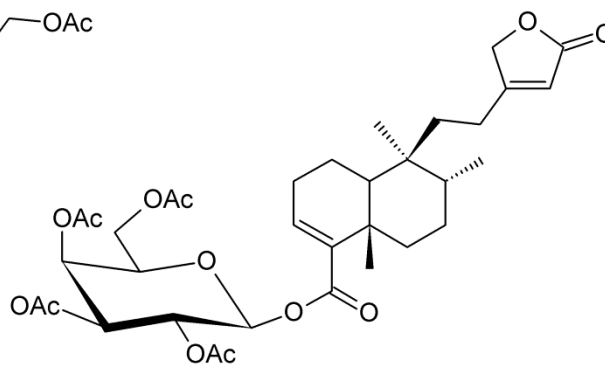
45



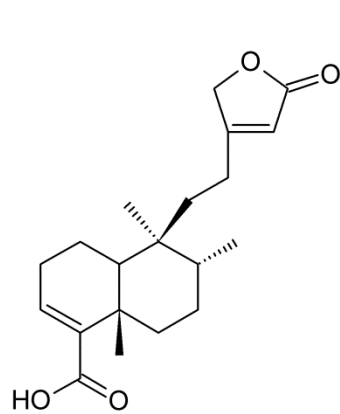
46



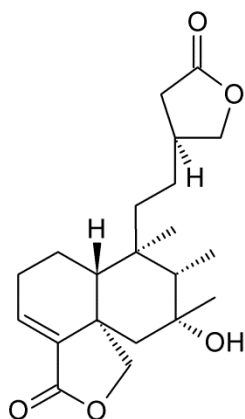
47



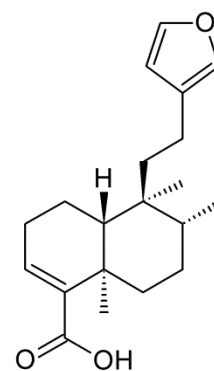
48



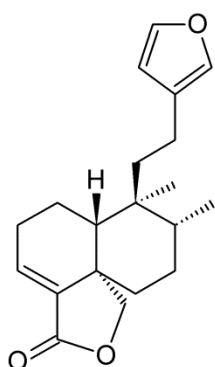
49



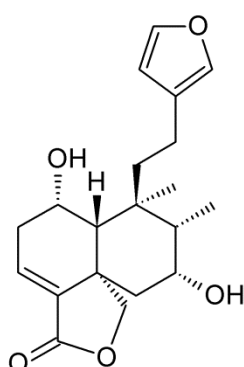
50



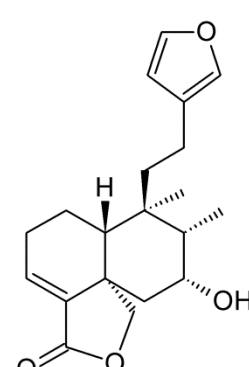
51



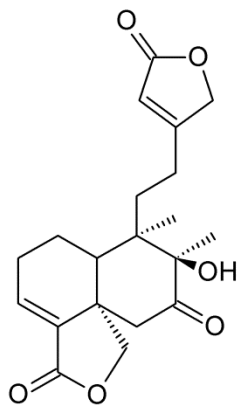
52



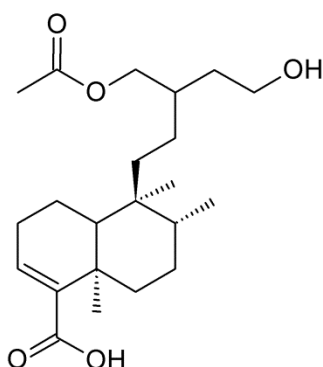
53



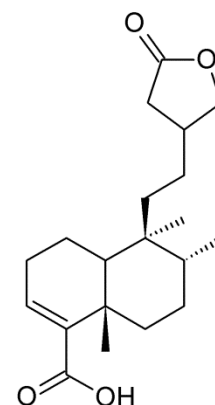
54



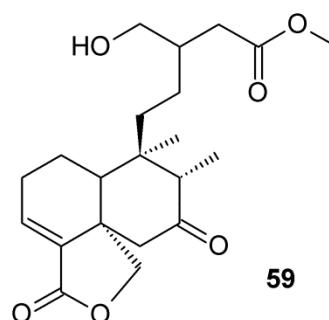
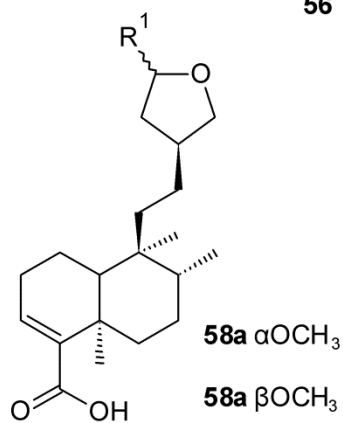
55

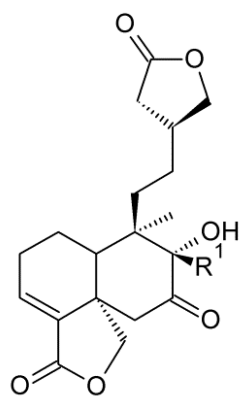
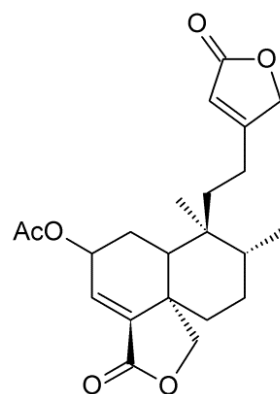


56



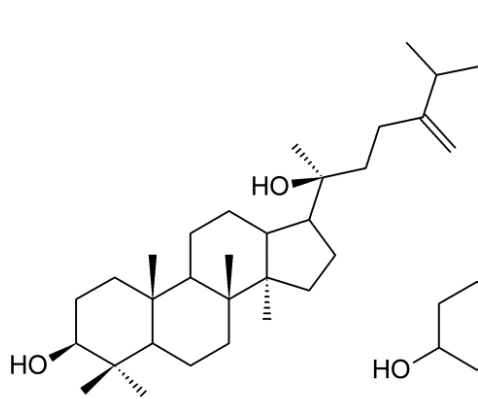
57



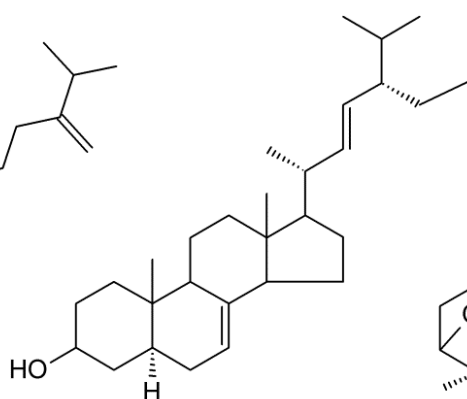
60 R¹=OH61 R¹=H

62

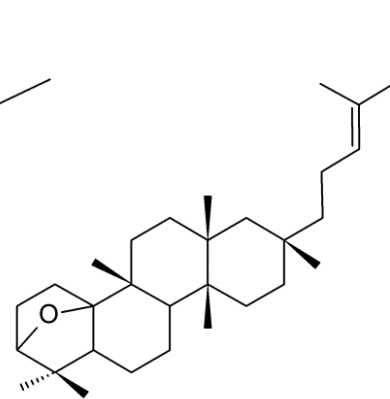
Triterpenos



63

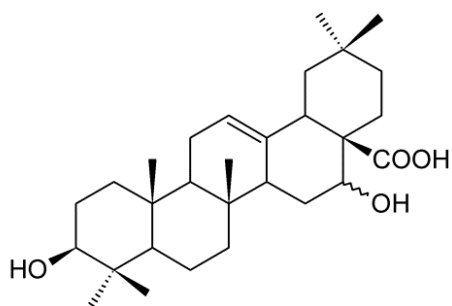


64



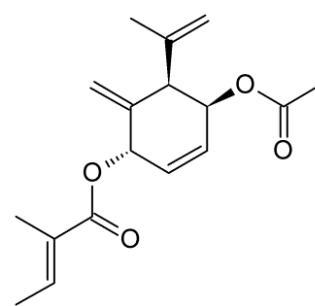
65

Saponinas

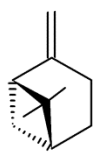


66

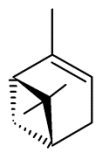
Outros



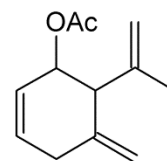
67

Monoterpenos

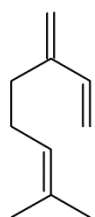
68



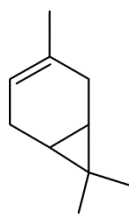
69



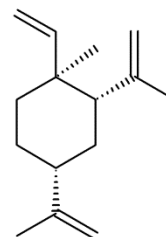
70



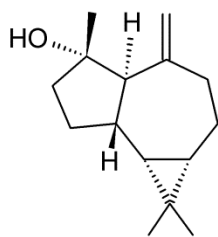
71



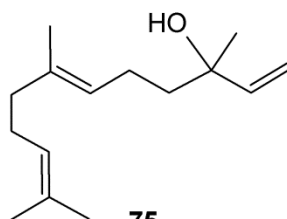
72



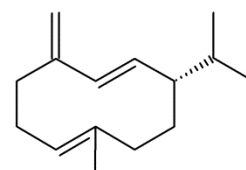
73

Sesquiterpenos

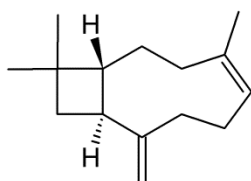
74



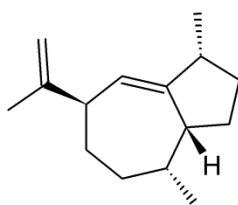
75



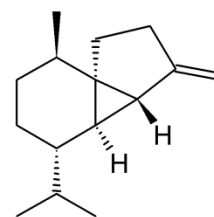
76



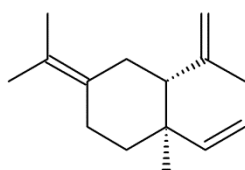
77



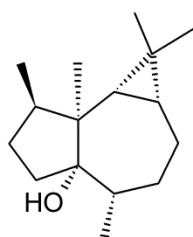
78



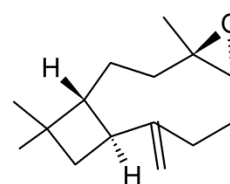
79



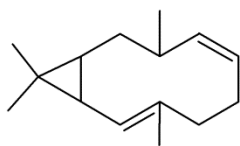
80



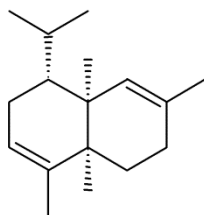
81



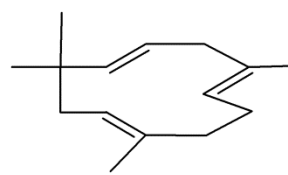
82



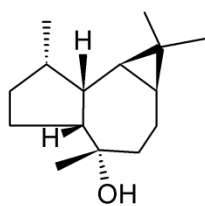
83



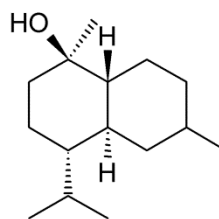
84



85



86



87

3.5 *Baccharis burchellii* Baker

Baccharis burchellii Baker apresenta distribuição exclusiva no Brasil, sendo endêmico da Região Sudeste (MG, RJ, SP), com ocorrência no Bioma Mata Atlântica. No estado do Rio de Janeiro cresce acima de 2000 m de altitude, restrita aos campos de altitude do maciço do Itatiaia, na Serra da Mantiqueira. Populações esparsas ocorrem em afloramentos rochosos e locais com solo raso sob sol pleno. Floresce e frutifica entre setembro e dezembro. É pouco conhecida popularmente pelo nome de Alecrim-carqueja (HEIDEN; IGANCI; MACIAS, 2009).

Baccharis burchellii é semelhante a *B. regnelli*, mas pode ser diferenciada pelo caule alado e folhas sésseis. A FIGURA 2 representa as inflorescências femininas e masculinas. Somente através da ampliação das flores é possível perceber a diferença entre a planta feminina e masculina.

Em uma busca pela literatura, *B. burchellii* apresenta apenas uma referencia sobre um estudo de atividade antioxidante, utilizando seu extrato hidroalcolico (OLIVEIRA, 2014). Também *B. burchellii* esta sendo descrita pela primeira vez no estado do Paraná.

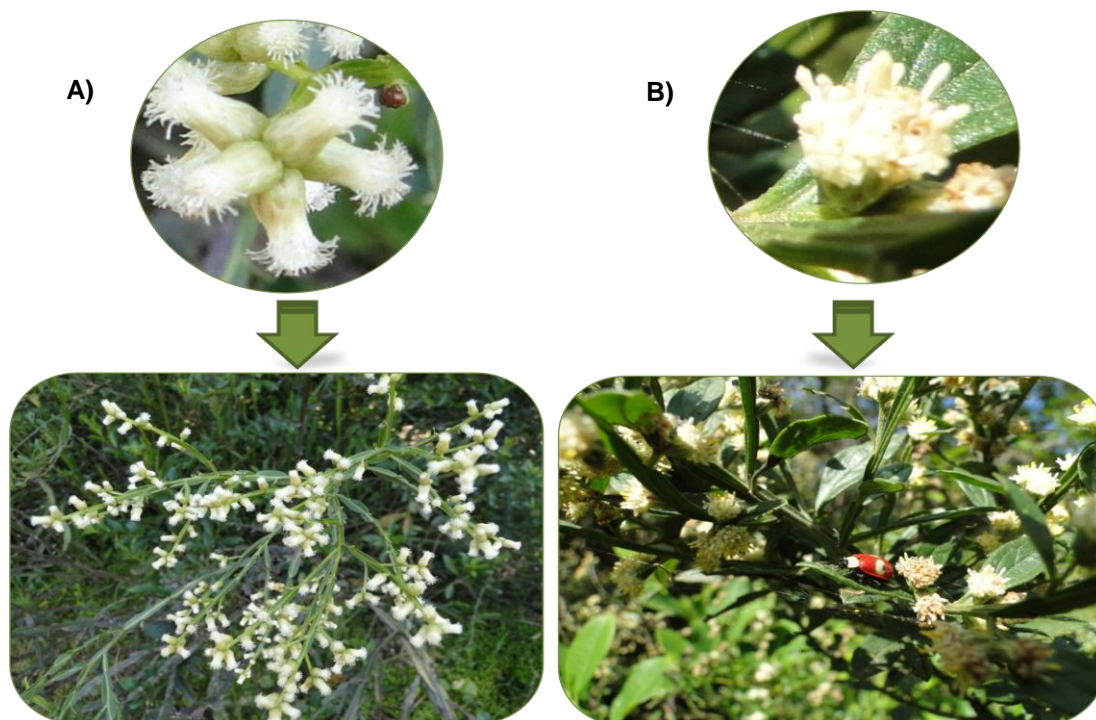


FIGURA 2: A) INFLORESCÊNCIAS FEMININAS; B) INFLORESCÊNCIAS MASCULINAS.

FONTE: Autora própria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTOS GERAIS

- **Cromatografia por adsorção em Coluna (CCA).** Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 com partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM) da Merck. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas. A proporção de sílica utilizada para empacotar a coluna foi de aproximadamente 20 vezes a massa da amostra a ser purificada.
- **Cromatografia por exclusão em coluna.** Foi realizada utilizando como suporte Sephadex LH-20, da GE Healthcare Bio-Sciences AB.
- **Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).** As análises em camada delgada analítica foram realizadas em cromatofolhas Merck, sílica gel 60, com indicador de fluorescência F_{254} , com suporte em alumínio e 0,2 mm de espessura.
- **Reveladores.** A revelação das placas foi feita sob luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda 254 e 366 nm e aspersão de solução de etanol/ácido sulfúrico 5-10% e anisaldeído sulfúrico seguidas de aquecimento.
- **Solventes:** Todos os solventes (P.A) utilizados nas preparações dos extratos e nos fracionamentos passaram pelo processo de destilação, para a retirada de impurezas.

4.2 EQUIPAMENTOS

- **Ressonância Magnética Nuclear (RMN):** Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais foram registrados no equipamento

Brucker 600 MHz, operando a 14,1 Tesla (T). Os experimentos foram realizados no centro de RMN da UFPR.

- **Cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM):** As análises foram realizadas num CGEMQP-2010 Plus Shimadzu interface com um *auto sampler* AOC-20s Shimadzu. Este experimento foi obtido no laboratório de HPLC do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia da UNICAMP em colaboração com o Prof. Dr. Marcos Jose Salvador.
- **Espectrometria de Massas (EM):** Os espectros de massas foram obtidos através de infusão direta nos seguintes equipamentos:
 - LH-MS, Thermo Scientific LTQ XL Ion Trap Mass Spectrometer, equipado com fonte de ionização do tipo ESI. Os experimentos foram realizados no laboratório de massas do departamento de química da UFPR.
 - HR-MS, Bruker ESI-Qq-TOF MicroTOF de alta resolução, equipado com fonte de ionização do tipo ESI. Os experimentos foram realizados no departamento de bioquímica da UFPR.

4.3 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

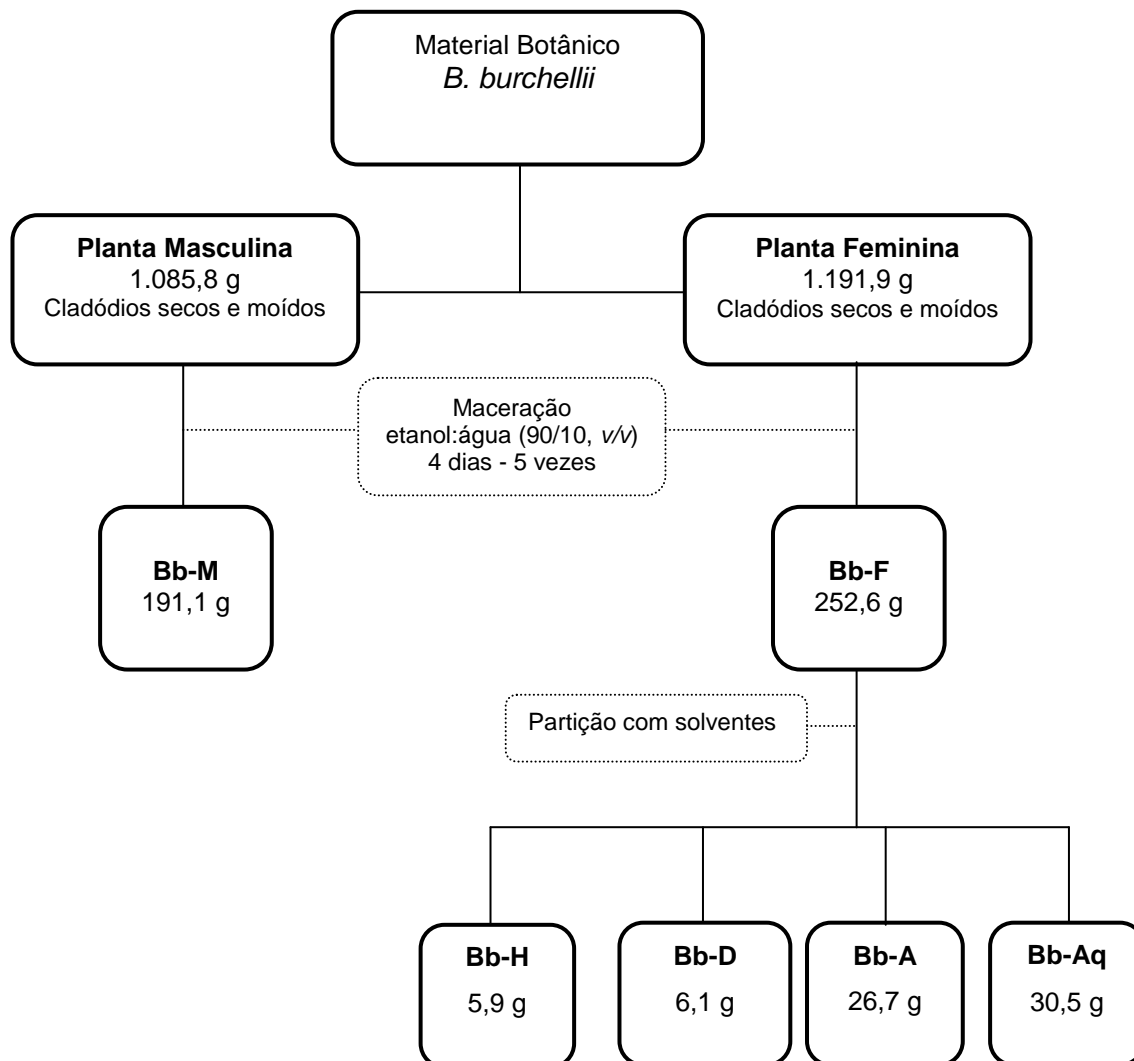
Baccharis burchellii foi coletada em 29 de outubro de 2013, no período da manhã, na estrada do morro do Canal, cidade de Piraquara, região metropolitana de Curitiba-PR (Coordenadas 25° 30' 52-39"S / 48° 59' 10-78" O elev. 1200 - 1300m). A identificação ocorreu no Museu Botânico de Curitiba (MBM) espécime feminino n° 386256 e espécime masculino n° 386257 pelo curador Osmar dos Santos Ribas. Posteriores identificações ocorrem pelos especialistas no Gênero *Baccharis* Dr. Gustavo Heiden (EMBRAPA-RS) e Dr. Angelo Schneider (UNIPAMPA-RS). Para poder realizar a pesquisa, foi submetido o projeto ao CGEN/CNPq (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético), ao qual foi obtida a autorização, n° 010304/2013-4 para o acesso ao patrimônio genético.

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Os cladódios de *B. burchellii* foram secos ao ar livre por três dias e depois reduzidos a pedaços menores, seguido de pulverização em moedor tipo industrial.

As partes secas das plantas (cladódios planta masculina e planta feminina) foram submetidas à maceração com uma mistura etanol:água (90/10, v/v) por quatro dias à temperatura ambiente, o macerado foi filtrado, recolhido e em seguida concentrado em aparelho rotaevaporator sob pressão reduzida. Repetiu-se esse procedimento por cinco vezes até o esgotamento total da extração. Após, realizou-se liofilização dos extratos. Os extratos brutos foram denominados de **Bb-F** para a planta feminina e **Bb-M** para a planta masculina.

O extrato **Bb-F** foi resuspendido com uma mistura etanol: água (1:2, v/v) e posteriormente particionados com solventes de polaridade crescente, obtendo-se as frações: Hexano (**Bb-H**), Diclorometano (**Bb-D**), Acetato de etila (**Bb-A**), sendo que o material restante foi denominado de fração aquosa (**Bb-Aq**). Após a partição, as frações foram rotaevaporadas e armazenadas em geladeira até o uso. O ESQUEMA 1 mostra um fluxograma de obtenção dos extratos e frações e seus respectivos pesos e rendimentos expressos em porcentagem.



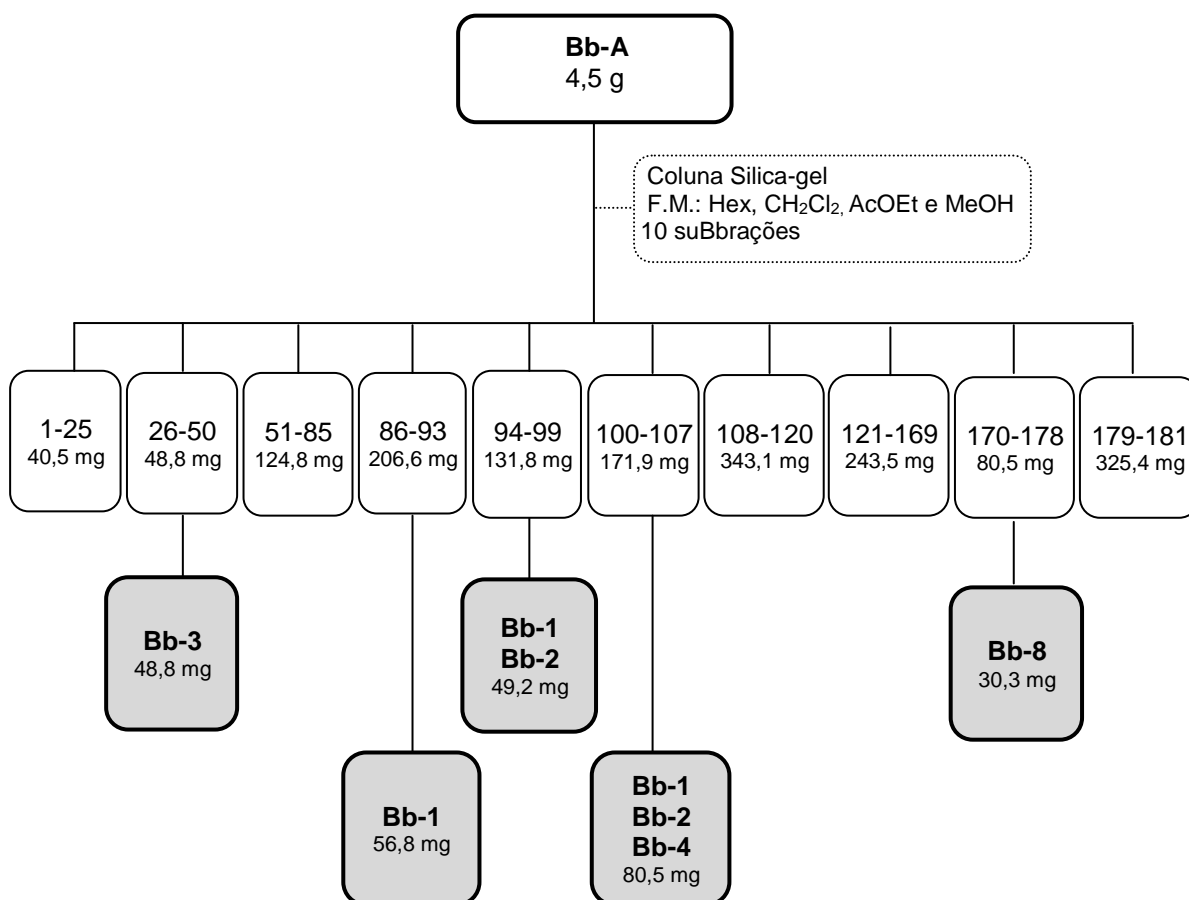
ESQUEMA 2: FLUXOGRAMA DE OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES E SEUS RESPECTIVOS RENDIMENTOS EXPRESSOS EM PORCENTAGEM.

4.5 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO

- **Bb-A**

A fração **Bb-A** (4,5 g) foi submetida ao fracionamento através de uma coluna cromatográfica (CC, altura x ϕ = 75 x 2,7 cm) utilizando como fase estacionária sílica gel (0,063-0,200 mm, 125,0 g) e fase móvel o sistema de solventes começando com Hex. 100% aumentando a concentração até 100% de CH_2Cl_2 e desta mesma forma

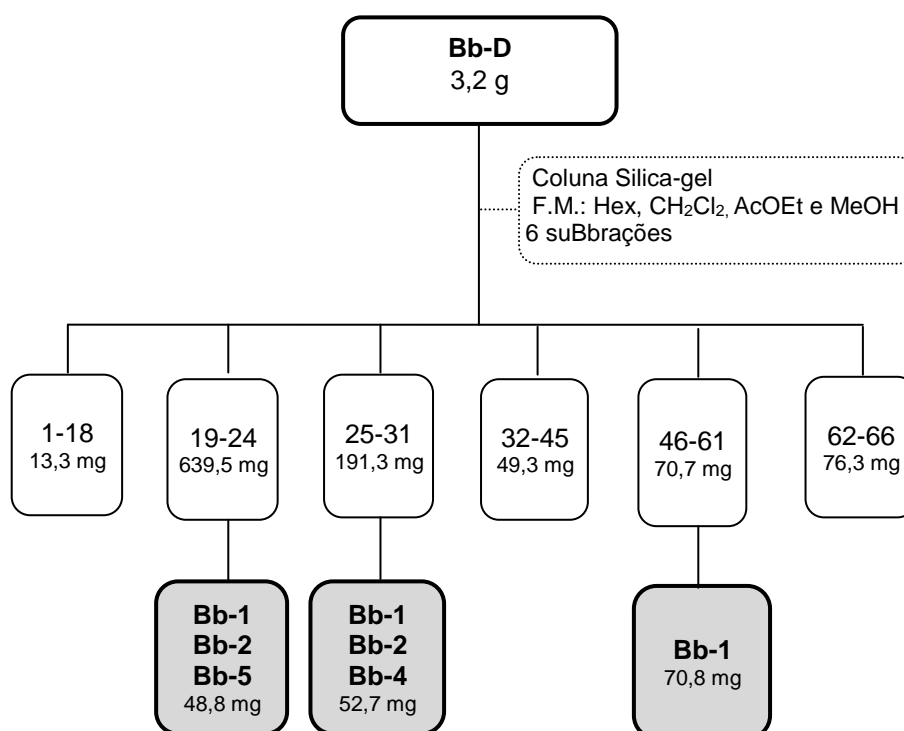
para AcOEt e MeOH. Obtiveram-se 181 frações de 30 mL cada, as quais foram analisadas por CCD. A partir disso reuniram-se as frações em 10 grupos de acordo com os seus respectivos Rfs. A partir das frações 26-50, 86-93, 94-99, 100-107 e 170-178, obteve-se as substâncias **Bb-1**, **Bb-2**, **Bb-3**, **Bb-4** e **Bb-8**. As outras frações ainda não permitiram a identificação de nenhuma substância. O ESQUEMA 3 representa as frações obtidas pela coluna cromatográfica de **Bb-AE** com suas respectivas massas e substâncias identificadas.



ESQUEMA 3: FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DE **Bb-A**.

▪ **Bb-D**

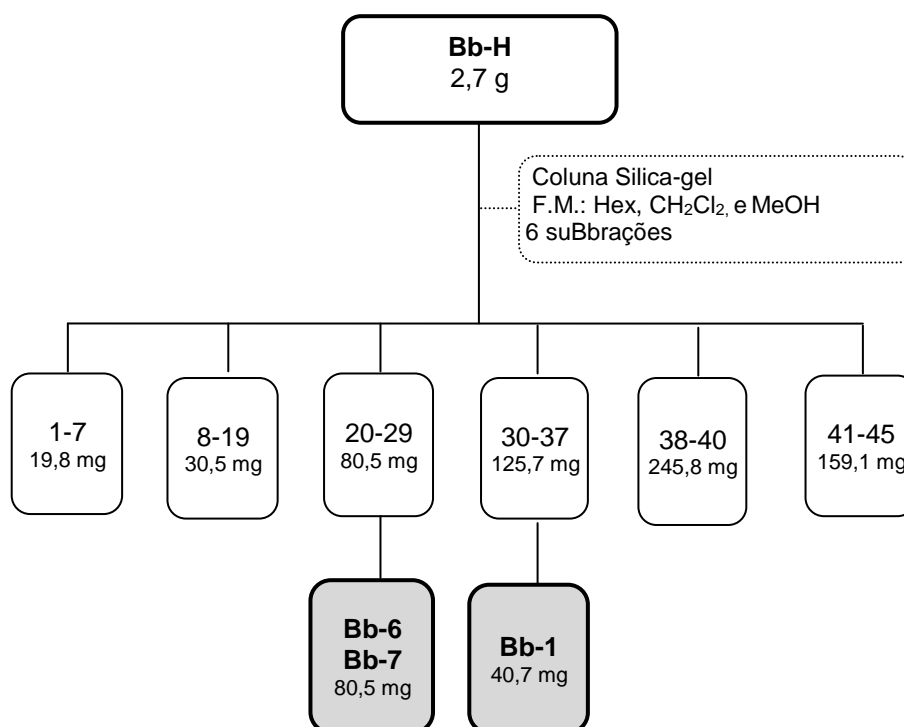
A fração **Bb-D** (3,2 g) foi submetida ao fracionamento através de uma coluna cromatográfica (CC, altura x ϕ = 75 x 2,7 cm) utilizando como fase estacionária sílica gel (0,063-0,200 mm, 100,0 g) e fase móvel o sistema de solventes começando com Hex. 100% aumentando a concentração até 100% de CH_2Cl_2 e desta mesma forma para AcOEt e MeOH. Obtiveram-se 66 frações de 30 mL cada, as quais foram analisadas por CCDA. A partir disso reuniram-se as frações em 6 grupos de acordo com os seus respectivos Rfs. A partir das frações 19-24, 25-31 e 46-61, obteve-se as substâncias **Bb-1**, **Bb-2**, **Bb-4** e **Bb-5**. As outras frações ainda não permitiram a identificação de nenhuma substância. O ESQUEMA 4 representa as frações obtidas pela coluna cromatográfica de **Bb-D** com suas respectivas massas e substâncias identificadas.



ESQUEMA 4: FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DE **Bb-D**.

- **Bb-H**

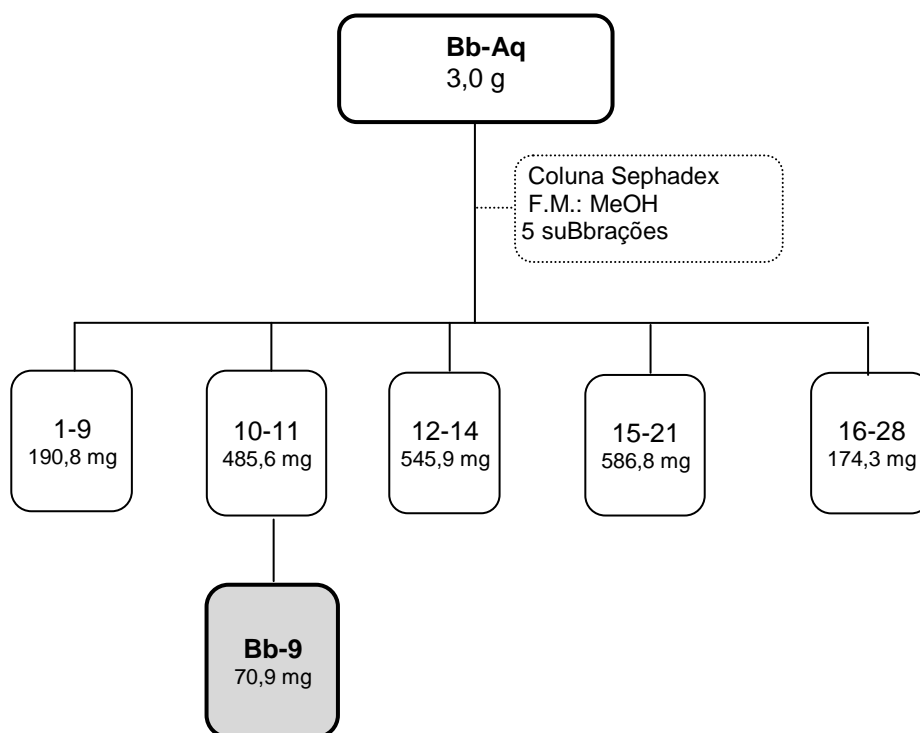
A fração **Bb-H** (2,7 g) foi submetida ao fracionamento através de cromatografia por adsorção, utilizando como fase estacionária sílica gel (0,063-0,200 mm, 50,0 g) e fase móvel o sistema de solventes começando com Hex. 100% aumentando a concentração até 100% de CH₂Cl₂ e desta mesma forma para MeOH. Obtiveram-se 45 frações de 30 mL cada, as quais foram analisadas por CCDA. A partir disso reuniram-se as frações em 6 grupos de acordo com os seus respectivos Rfs. A fração 20-29 foi submetida a análises de espectrometria, na qual resultaram na identificação das substâncias **Bb-6** e **Bb-7**. As outras frações ainda não permitiram a identificação de nenhuma substância. O ESQUEMA 5 representa as frações obtidas pela coluna cromatográfica de **Bb-H** com suas respectivas massas e substâncias identificadas.



ESQUEMA 5: FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DE **Bb-H**.

▪ Bb-Aq

A fração **Bb-Aq** (3,0 g) foi submetida ao fracionamento através de cromatografia por exclusão, utilizando fase estacionária Sephadex LH-20 (CC, altura $\times \varphi = 75 \times 2,7$ cm) e fase móvel MeOH. Obteve-se 31 frações de 30 mL cada, na qual foram analisadas por CCDA. A partir disso reuniram-se as frações em 5 grupos de acordo com os seus respectivos Rfs. A partir da fração 10-11, obteve-se a substância **Bb-9**. O ESQUEMA 6 representa as frações obtidas pela coluna cromatográfica de **Bb-Aq** com suas respectivas massas e substâncias identificadas.



ESQUEMA 6: FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DE **Bb-Aq**.

4.6 ANÁLISE DAS SUBSTÂNCIAS

As amostras foram identificadas por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM).

- RMN: Foram utilizados cerca de 15 a 20 mg das amostras solubilizadas em 600 μL de solventes como: clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (CD_3OD) e misturas destes, água deuterada (D_2O) e Dimetildufoxido (DMSO-d_6). A escolha do solvente deuterado dependeu da polaridade das substâncias. Utilizou-se o tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna ($\delta = 0$ ppm). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz). Os espectros foram manipulados no software Bruker *TopSpin 3.1*.[®] e o programa *FOMSC3_rmn*[®] foi utilizado para simular as multiplicidades dos acoplamentos.

- EM: Os espectros de massas foram adquiridos através de DIMS (infusão direta por espectrometria de massas) nos modos negativo e positivo, de acordo com a molécula. Utilizou-se como solvente de diluição o metanol, metanol e formiato de amônia para o modo negativo de ionização e metanol e ácido fórmico para o modo positivo de ionização. As concentrações das amostras variaram de 10-100 ng/mL para substância puras e frações enquanto que para extratos foram de 100-500 ng/mL. A otimização dos parâmetros composto-dependente na fonte do espectrômetro de massas foi realizada para alcançar a melhor ionização das substâncias:

- LH-MS: voltagem do capilar (IS, +/-): 5/-4,5 kV, temperatura: 250-280 °C, gás de nebulização: 8 psi, gás auxiliar: 2 psi e voltagens da lente: 70-110 V.

- HR-MS: voltagem do capilar (IS, -): -3 kV, temperatura: 250 °C, gás de nebulização: 20 psi e voltagens da lente: 100 V.

Os espectros foram manipulados no software *Thermo Xcalibur Qual Browser 2.1*[®] para LH-MS e para HR-MS *DataAnalysis Viewer 4.1*[®].

4.7 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAS

Os óleos essenciais foram obtidos através da técnica de hidrodestilação, utilizando-se um extrator do tipo Clevenger modificado. Foram utilizados 150g de flores frescas diluídos em 1 200 ml de água destilada, mantendo a temperatura à 100°C, por 4 horas. Os óleos foram extraídos da destilação com éter etílico e secos com anidrido sulfato de sódio (Na_2SO_4). O procedimento foi realizado em triplicata. Os óleos foram mantidos a 4 °C, selados em vial até o uso. Os óleos essenciais foram denominados de **BbO-F** para flores femininas e **BbO-M** para flores masculinas.

A análise dos óleos essenciais foi realizada em um equipamento CG-EM utilizando uma coluna ZB-5MS *Phenomenex Zebron* (30 m x 0,25 milímetros x 0,25 mm). As condições de injeção foram as seguintes: concentração da amostra 1 µL em CH_2Cl_2 ; volume de injeção de 1,0 mL; temperatura do injetor 240°C; A temperatura do forno foi programada de 40 °C / 4 min., a uma taxa de 4 °C / min. até 240 ° C, em seguida a 10 ° C / min. até 280 ° C, e temperatura de 280 ° C / 2 min.; 60 min. De corrida cromatográfica; *split* 1:30. O espectro de massas foi operado a 70 eV por impacto eletrônico. Índices de retenção foram obtidos com uma solução padrão de *n*-alcanos ($\text{C}_8\text{-C}_{18}$).

Os componentes dos óleos essenciais foram identificados por comparação do índice de retenção (IR) e espectro de massas (EM) com a literatura de Adams, (2007).

4.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.8.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.8.1.1 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH

DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) é um radical livre com faixa de absorção entre 515 a 528 nm. O radical perde sua absorção quando recebe um elétron, resultando na mudança de coloração de púrpura para amarelo. Este método é simples e rápido, possibilitando a análise de inúmeras amostras, sendo extensamente usado para análises preliminares de atividade antioxidante de compostos e de extratos de plantas. Para este ensaio foram utilizados 5,2 mg das amostras (**Bb-F, Bb-A, Bb-Aq, Bb-1+Bb-2**) que foram dissolvidas em etanol 1 mL, obtendo-se uma solução estoque, desta, realizaram-se várias diluições subsequentes (de 6,25 a 200 µg/mL). A placa de 96 poços foi preparada adicionando-se 10 µL da amostra, 100 µL de tampão acetato, 100 µL de etanol e 50 µL de solução de DPPH (10 mg/mL). Decorridos 30 min, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 517 nm e a porcentagem de atividade antirradical calculada. Para o controle positivo, utilizou-se o flavonóide quercetina (de 6,25 a 200 µg/mL) e para o controle negativo, o diluente. Os valores de absorbância em todas as concentrações testadas foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), através da seguinte equação:

$$\%AA = \frac{\{[Abs_{amostra} - (Abs_{controle} - Abs_{branco})] \times 100\}}{Abs_{controle}}$$

Onde: Abscontrole é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH e Absamostra é a absorbância da mistura reacional mais DPPH adicionado à amostra (Sousa *et al.*, 2007). Assim, a concentração capaz de reduzir o radical em 50% foi calculada, utilizando o programa Origin 8.0.

4.8.1.2 ENSAIO ORAC_{FL}

A capacidade antioxidante dos extratos, frações e substância isolada, foram mensuradas utilizando um segundo teste *in vitro*, conhecido como *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC_{FL}) com fluoresceína como fluorescente e 2,2'-Azobis (2-amidopropane) dihydrochloride (AAPH) como fonte de radical livre.

Os experimentos foram realizados em placas de microdiluição com 96 poços como descrito por Prior *et al* (2003) com modificações. Para tanto foram preparadas soluções estoques dos extratos e frações (50 mg/mL) em tampão fosfato/dimetil-sulfóxido (DMSO) e diluídas 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes com tampão fosfato. O Trolox (substância de referência (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid - análogo da vitamina E) foi utilizado como padrão e analisado nas concentrações de 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 µmol/mL). A leitura foi realizada utilizando-se filtro fluorescente (excitação a 485 nm e emissão a 528nm) em leitor de microplaca (Synergy-2) monitorando a cinética de reação a cada 2 min por um período de 70 min (T°C a 37 °C). Os resultados foram expressos como µmol de Trolox equivalente (TE) por grama de extrato ou fração em base seca (µmol de TE/g).

4.8.2 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS *IN VITRO*

Os ensaios de citotoxicidade em linhagens de células tumorais *in vitro* foram realizados em colaboração com a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), centro de pesquisas Gonçalo Muniz – Bahia, sob-responsabilidade do Pesquisador Dr. Daniel Pereira Bezerra.

4.8.2.1 PREPARO DAS AMOSTRAS

As substâncias foram diluídos em DMSO puro estéril na concentração de 5 mg/mL (para substâncias puras) e 10mg/mL (para extratos, frações e óleos essenciais). As substâncias foram testadas em concentrações que variaram de 0,19-

25µg/mL para substâncias puras e 0,39-50µg/mL para extratos, frações e óleos essenciais.

4.8.2.2 CÉLULAS

Foram utilizadas as seguintes células tumorais, B16-F10 (melanoma murino), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), K562 (leucemia mielocítica crônica humana), HL-60 (leucemia promielocítica humana) doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil. As células foram cultivadas em garrafas específicas (75 cm³, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C e o crescimento celular foi acompanhado com a utilização de microscópio de inversão.

Para avaliar a citotoxicidade das substâncias sobre a proliferação de células não tumorais, PBMC (*peripheral blood mononuclear cells* – linfócitos e monócitos periféricos) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis. As PBMC foram isoladas a partir de uma amostra de cerca de 3 mL de sangue, acrescida de 5 mL de salina. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 15 minutos de centrifugação a 1.500 rpm, e feita a aspiração dos PBMC, presentes na região intermediária entre as hemácias e o plasma. A suspensão de PBMC foi transferida para um outro tubo o qual foi acrescido com salina até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 5 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de PBMC foi ressuscitado em meio completo (RPMI 1640 acrescido de 20% de soro fetal bovino e 10 µg/mL de ConA) e contado em câmara de Neubauer para posterior diluição e plaqueamento.

4.8.2.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para avaliar a citotoxicidade das substâncias, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com as substâncias teste. O alamar blue, identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não

fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do alamar blue reflete a proliferação celular.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (100 µL/poço de uma solução de $0,3 \times 10^6$ células/mL para células em suspensão e $0,7 \times 10^5$ células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, as substâncias testes dissolvidas em DMSO foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas (vinte e quatro horas para o PBMC) antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (AHMED *et al.*, 1994). A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ proliferação} = A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$$

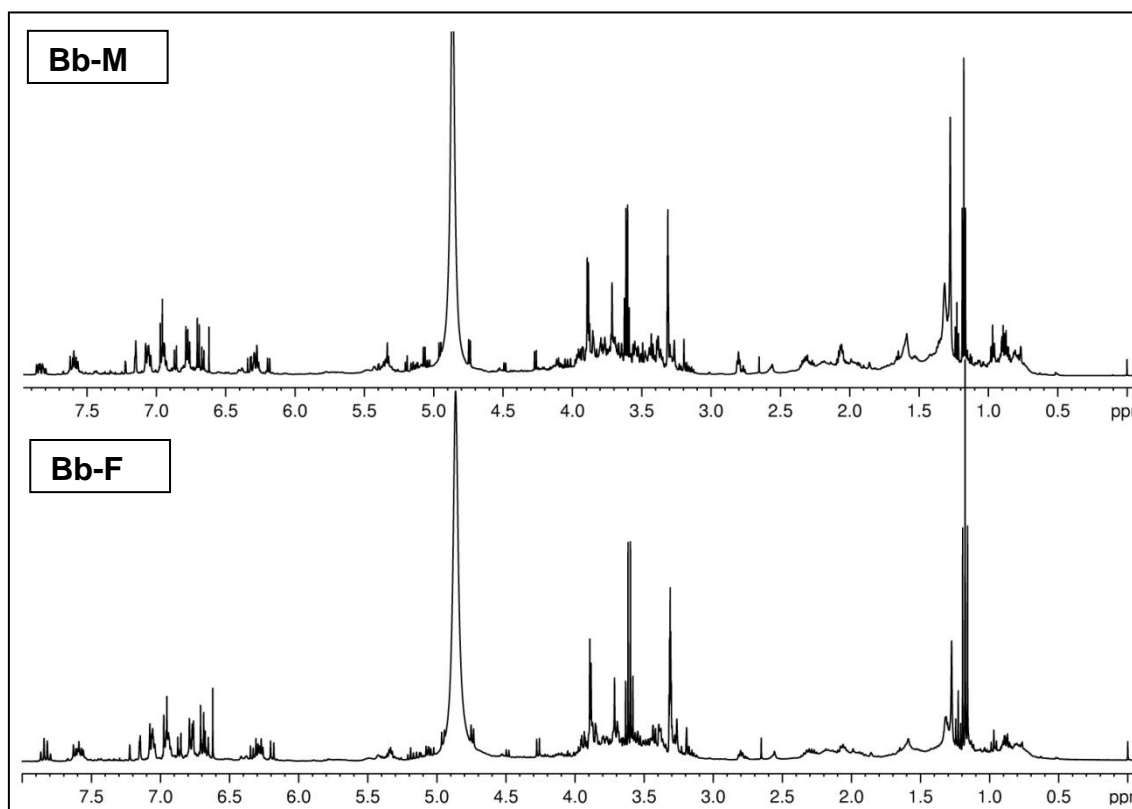
Onde, A_{LW} e A_{HW} são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $R_0 = AO_{LW} / AO_{HW}$. Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. A substância foi testada em diluição seriada, em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas IC_{50} realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

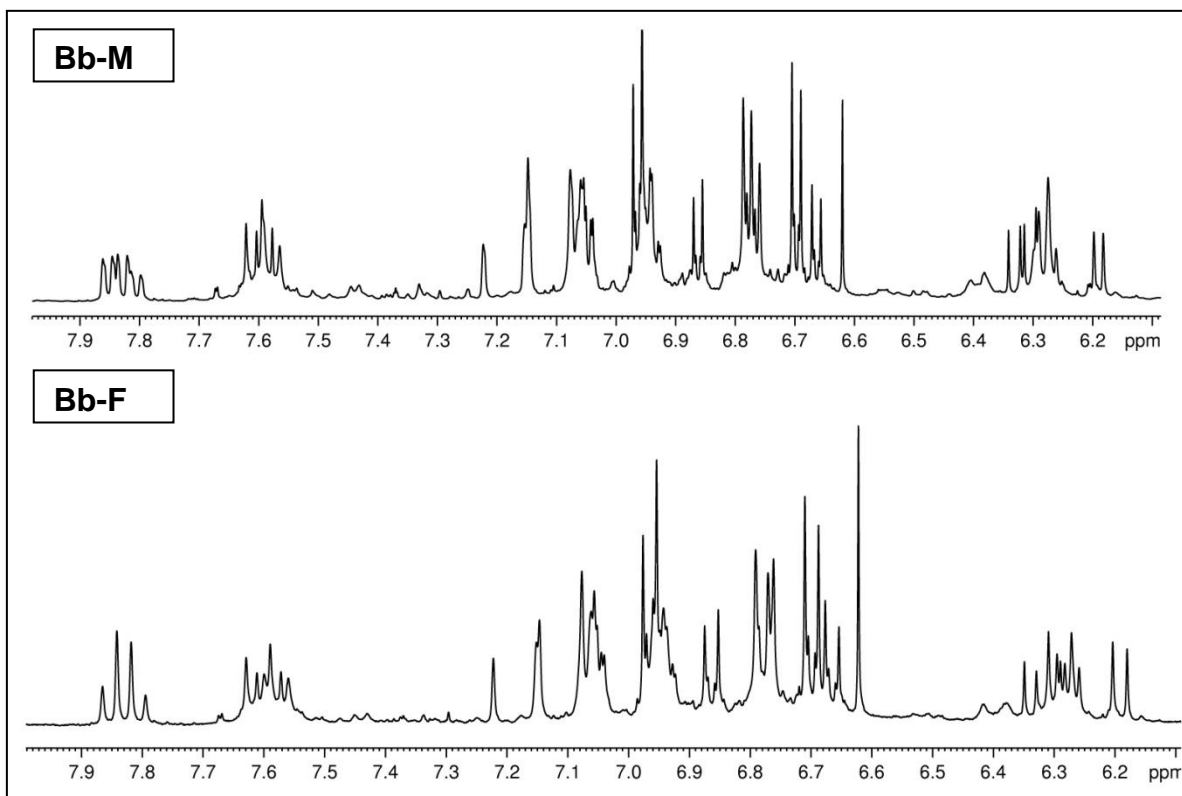
5.1 ANÁLISE DOS EXTRATOS DA ESPÉCIE MASCULINA (Bb-M) E FEMININA (Bb-F) POR RMN DE ^1H

Foram realizados experimentos de RMN de ^1H (E1; E2), dos extratos **Bb-F** e **Bb-M**, para comparação da semelhança química entre os espécimens. Os experimentos foram realizados com 20 mg de cada amostra. Através da análise dos espectros e ampliações de regiões específicas, como a região do aromático (8,0-6,0 ppm) foi possível observar uma diversidade metabólica muito semelhante entre o espécime masculino e feminino de *B. burchelli*.

Pelo fato do extrato da planta feminina (**Bb-F**) ter apresentado um maior rendimento e pelos sinais mais definidos no espectro, optou-se por dar continuidade aos trabalhos com esse material.



E1: COMPARAÇÃO DE ESPECTROS DE RMN DE ^1H (600 MHz, CD_3OD) DE **Bb-F** E **Bb-M**.



E2: COMPARAÇÃO DE ESPECTROS DE RMN DE ¹H (600 MHz, CD₃OD) de **Bb-F** e **Bb-M**, AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE 8,0-6,1 ppm.

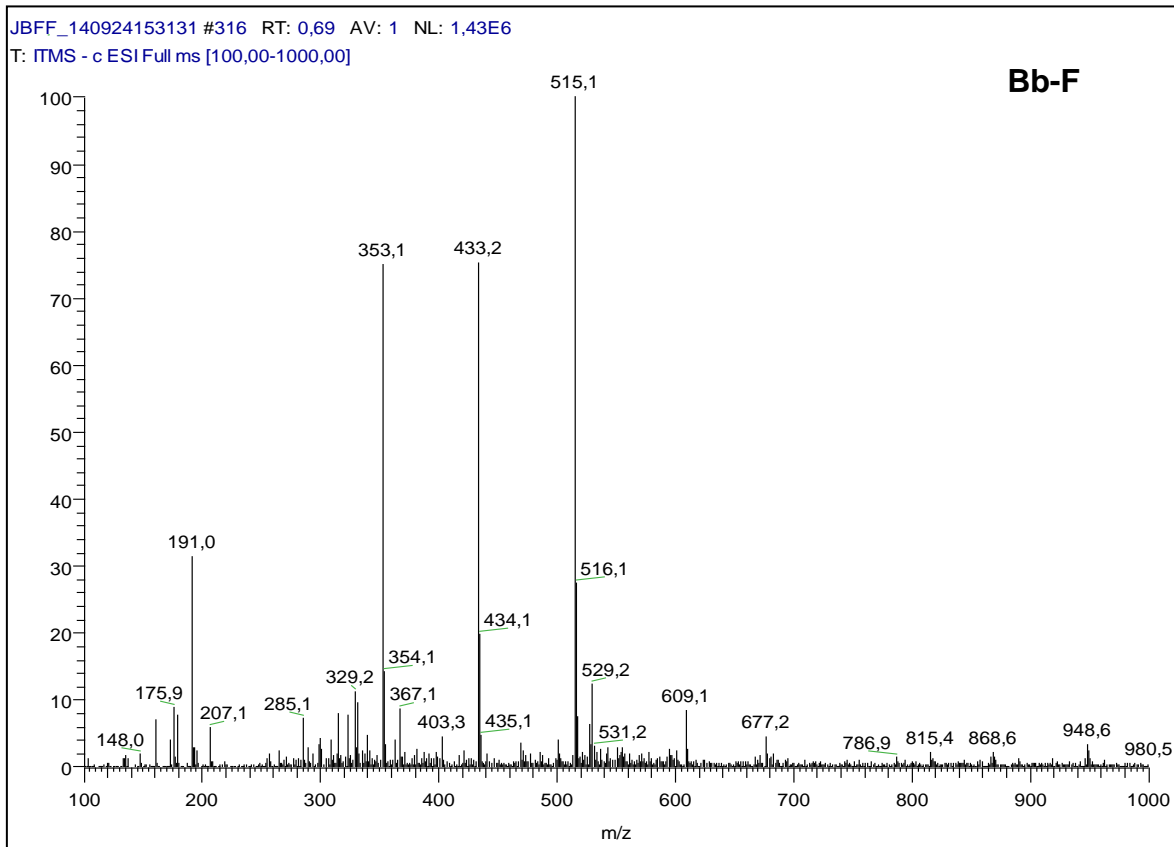
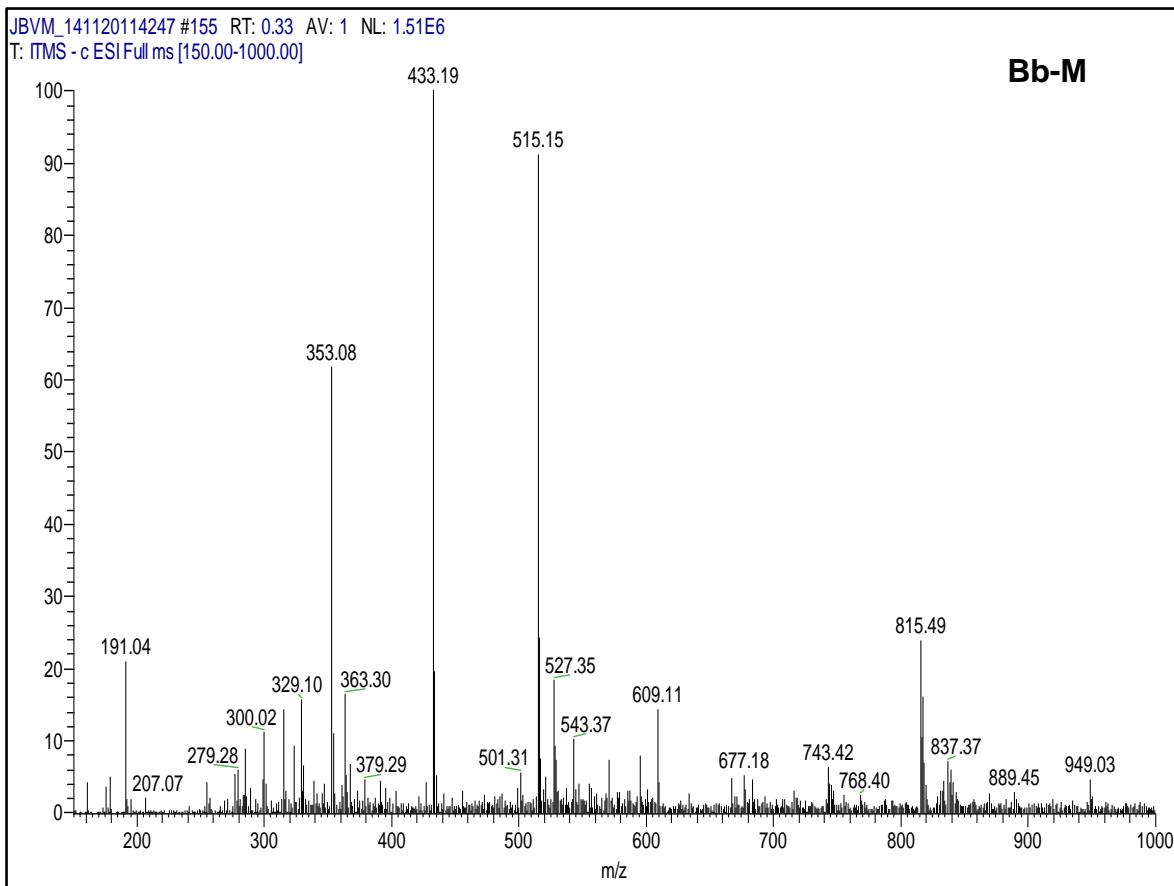
Nos vegetais, as plantas que são consideradas femininas investem mais recursos e nutrientes em reprodução do que em crescimento, produzem mais metabólitos secundários defensivos e, conseqüentemente, são menos atacadas do que plantas masculinas (ARAÚJO, CARNEIRO E FERNANDES, 2003). Porém estudos realizados com espécies de *B. dracunculifolia* e *B. genistelloides subsp. Crispa* não identificou diferenças na concentração de taninos e no teor de flavonóides totais, expresso em quercetina, nestas plantas dióicas (SOUSA *et al.*, 2014; ESPÍRITO-SANTO *et al.*, 1999). Ainda trabalhos com fungos endofíticos entre as espécies masculinas e femininas de *B. dracunculifolia* concluiu que a diversidade de fungos é a mesma para esta planta dióica (OKI, *et al.*, 2009).

5.2 ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICOS DO EXTRATO **Bb-F** POR DIMS

A análise de *fingerprinting* por espectrometria de massas utilizando como fonte de ionização a *electrospray* (ESI-MS) é conhecida por analisar matrizes de diversas complexidades, tais como extratos de origem natural (Funari *et al.*, 2013). Em geral, as moléculas de baixo peso molecular (<1.000 Da), contendo sítios ácidos ou básicos, têm espectros de massa simples produzidos por ESI, onde um único íon correspondente desprotonado (M-H)⁻ ou protonado (M + H)⁺ é detectado. Uma análise estrutural mais detalhada da composição química dos extratos pode ser obtida por comparação de amostras autênticas ou por espectrometria de massa MS/MS (MOLLER, CATHARINO E EBERLIN, 2007).

Os extrato **Bb-M** e **Bb-F** foram analisados por ESI/EM, modo negativo de ionização (E3), onde foram evidenciadas as massas dos constituintes dos extratos e a semelhança química entre eles.

A partir do fracionamento do extrato, foi possível caracterizar e identificar por técnica de RMN de ¹H, uni e bidimensionais os componentes majoritários, sendo **Bb-1** (escopoletina), **Bb-8** (*p*-hidroxifenil-2'-*O*-*trans*-cafeoil-β-D-glicopiranosideo) e **Bb-9** (6-metoxi-cumarina-2'-*O*-*trans*-cafeoil-β-D-glicopiranosideo) os espectros de MS² destas substâncias estão demonstrados nos espectros E7, E27 e E34, respectivamente. Somente o íon molecular referente à *m/z* 353 ainda não foi identificado.



E3: EXPERIMENTO DE VARREDURA NO MODO NEGATIVO DE **Bf-M** E **Bb-F**(METANOL).

5.3 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO **Bb-F**

O fracionamento cromatográfico resultou na identificação de nove substâncias, denominadas **Bb-1**, **Bb-2**, **Bb-3**, **Bb-4**, **Bb-5**, **Bb-6**, **Bb-7**, **Bb-8** e **Bb-9**. As sete primeiras substâncias já são conhecidas, enquanto que a **Bb-8** e **Bb-9** estão sendo relatadas pela primeira vez. As substâncias foram identificadas através de análise de espectros de RMN uni e bidimensionais e EM, juntamente com a comparação com dados da literatura.

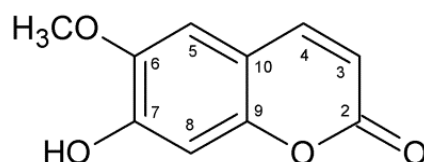
5.3.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE **Bb-1**

A fração **Bb-A** (ESQUEMA 3) forneceu o composto **Bb-1**, o qual foi isolado na forma de cristais pontiagudos transparentes. A análise do espectro de RMN de ^1H (E4) indicou tratar-se de uma cumarina, devido apresentar os sinais característicos da dupla ligação endocíclica em δ 7,58 (*d*, $J = 9,4$ Hz) e 6,26 (*d*, $J = 9,4$ Hz), relacionados aos átomos de hidrogênios ligados respectivamente aos carbonos C-4 e C-3, além dos sinais em δ 6,84 e 6,91, ambos simpletos, relacionados aos hidrogênios ligados aos carbonos C-8 e C-5, respectivamente. Foi observado também um sinal em δ 3,95 (*s*) referente a um grupo metoxila. As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC (E5; E6) de uma mistura contendo as substâncias **Bb-2** e **Bb-4**. A TABELA 3 mostra os deslocamentos de RMN de ^1H , ^{13}C , correlações de HMBC e comparação com a literatura.

A fórmula molecular $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$ foi deduzida com base nos dados obtidos do espectro de massas ESI/EM modo positivo de ionização (E7), o qual apresentou o íon molecular de m/z 193 $[\text{M}+\text{H}]^+$, o pico base de m/z 175, referente a perda de uma molécula de água e a presença do íon diagnóstico da cumarina de m/z 133.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e nos dados da literatura a substância **Bb-1** foi identificada como a 6-hidroxi-7-metoxicumarina, conhecida como escopoletina. Esta substância está sendo relatada pela primeira vez na seção *Caulopterae*.

No gênero *Baccharis*, há poucos relatos sobre a presença de cumarinas. A escopoletina foi relatada somente em *B. tola* (MARTIN; ROVIROSA; CASTILLO, 1983), *B. tricuneata* (WAGNER *et al.*, 1978), *B. megapotamica* (JARVIS *et al.*, 1986) e *B. salicifolia* (DEL CORRAL *et al.*, 2012). Existem relatos de outras cumarinas, como anisocoumarina H, 7-geraniloxicoumarina e diversinina, que foram encontradas em *B. darwinii*, nas quais apresentaram alta atividade antifúngica (KURDELAS *et al.*, 2010). Em *B. magellanica* e *B. tricuneata* (CORDERO *et al.*, 2004) foi identificada a esculina.



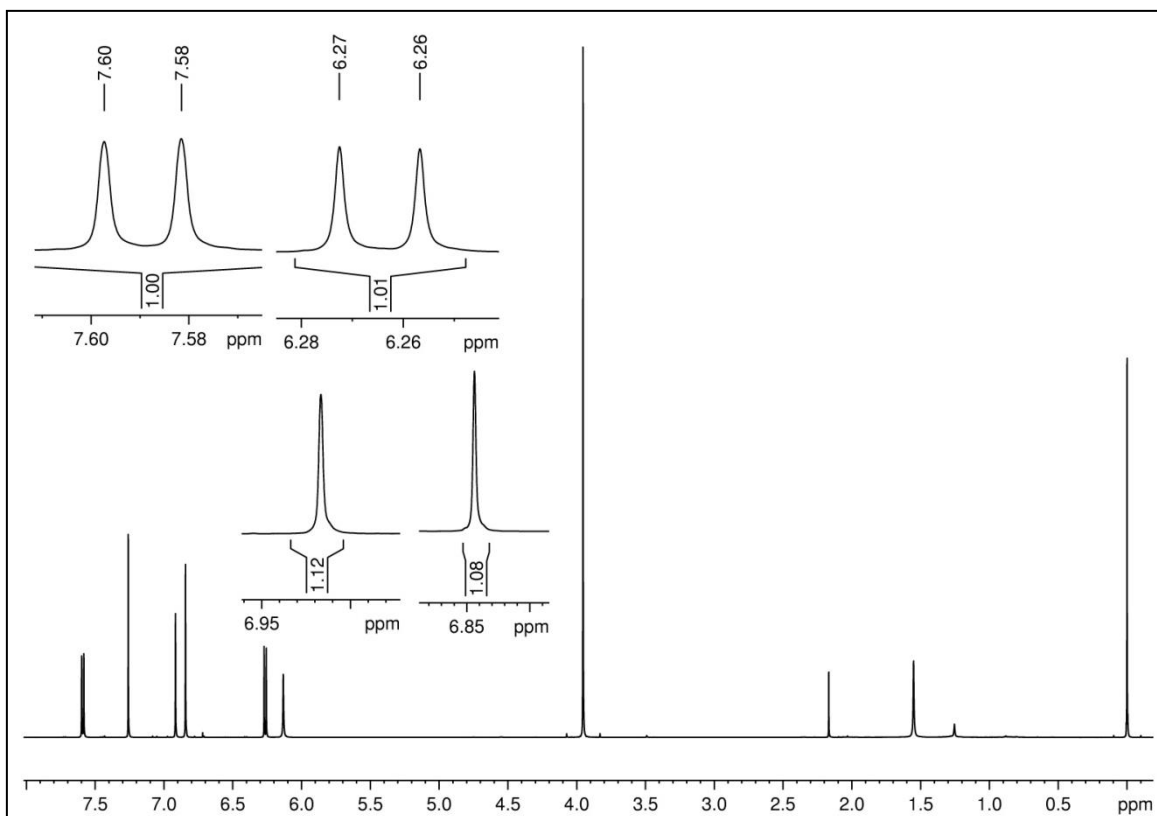
Escopoletina (**Bb-1**)

TABELA 2: DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HMBC E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA **Bb-1**.

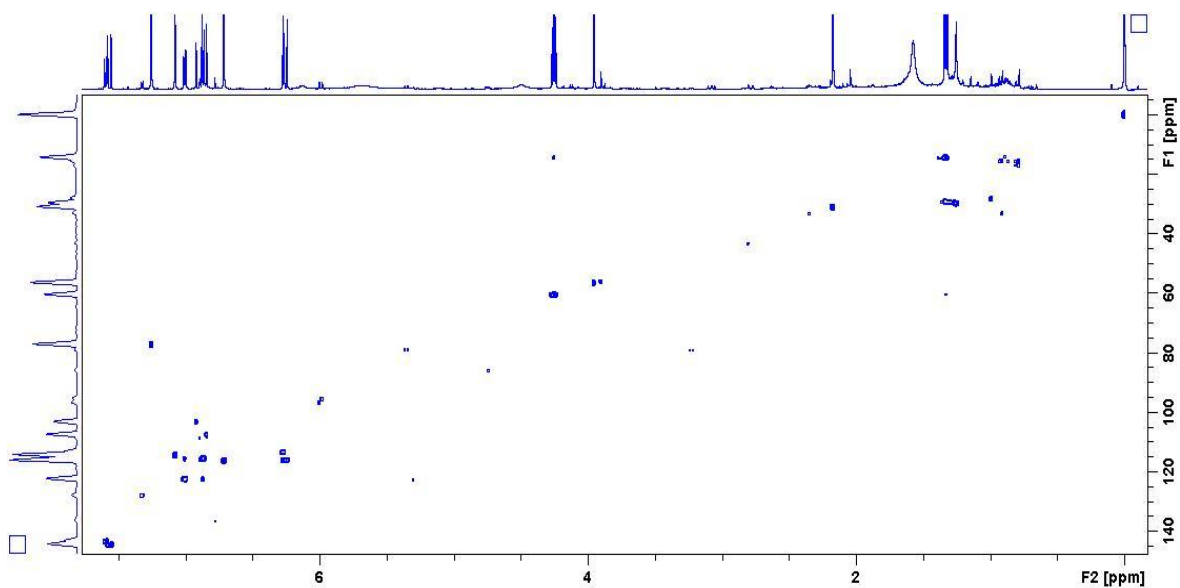
Posição	Bb-1 ^a			Escopoletina ^b	
	δ^{H} (mult., J em Hz)	δ^{C} (^{13}C)	HMBC	δ^{H} (mult., J em Hz)	δ^{C} (^{13}C)
1	-	-	-	-	-
2	-	161,2	-	-	161,4
3	6,26 (1H, d, 9,4)	113,6	2, 10	6,27 (d, 9,4)	113,4
4	7,58 (1H, d, 9,4)	143,2	2, 5, 9	7,60 (d, 9,4)	143,3
5	6,84 (1H, s)	107,8	4, 6, 7	6,85 (s)	107,5
6	-	143,7	-	-	144,6
7	-	150,3	-	-	150,0
8	6,91 (1H, s)	104,2	6, 7, 10	6,92 (s)	103,8
9	-	150,0	-	-	149,7
10	-	111,7	-	-	111,5
OCH ₃	3,95 (3H, s)	56,4	6	3,95 (s)	56,4

^a: Experimento de RMN de ^1H , HSQC e HMBC (600 MHz, CDCl_3), utilizando TMS como referência interna. As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC.

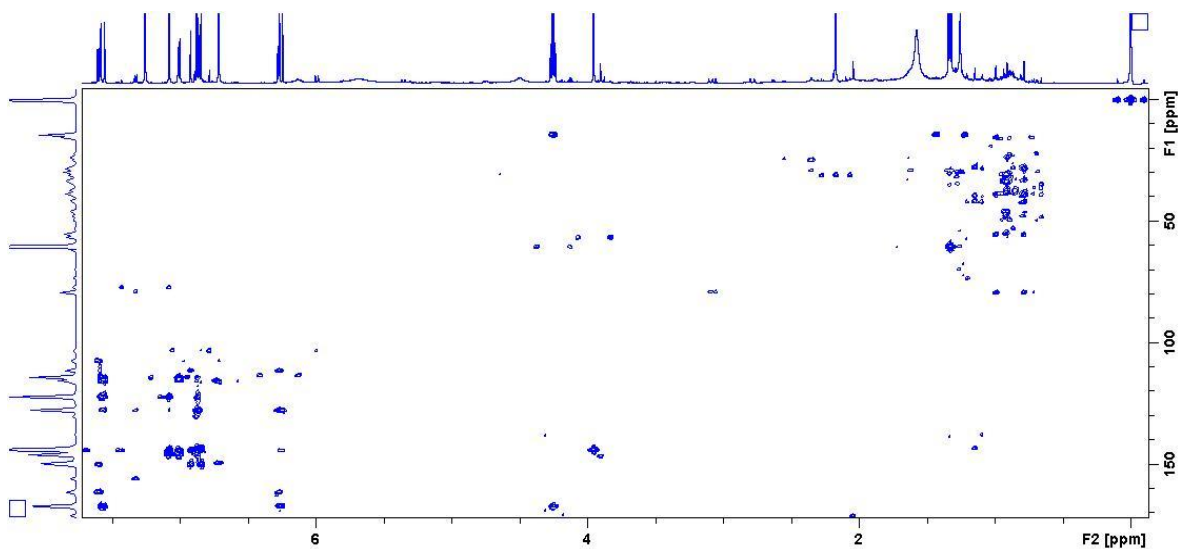
^b: Dados da literatura de acordo com Mogana, Teng-Jin e Wiart, (2013) e Terra *et al.*, (2013).



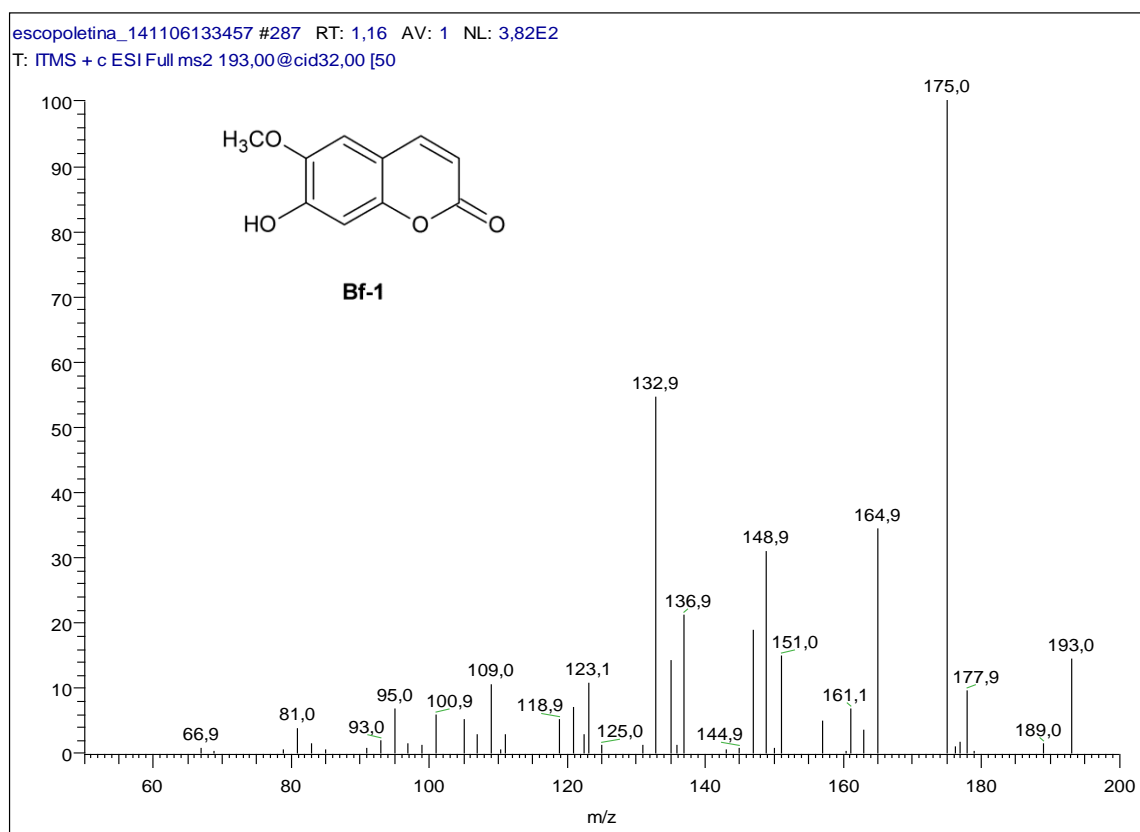
E4: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA **Bb-1**.



E5: MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, CDCl_3) DAS SUBSTÂNCIAS **Bb-1**, **Bb-2** E **Bb-3**.



E6: MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC (600 MHz, CDCl_3) DAS SUBSTÂNCIAS **Bb-1**, **Bb-2** E **Bb-3**.



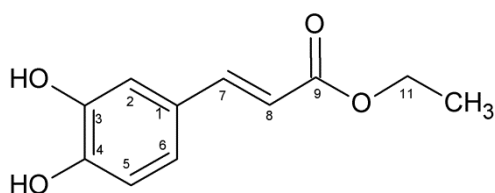
E7: EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 193 (CE 32 V, EM METANOL) DE **Bb-1**.

5.3.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE **Bb-2**

A fração **Bb-A** (ESQUEMA 3) forneceu o composto **Bb-2** que foi identificado em mistura com **Bb-1** e **Bb-4**. O conjunto de dados obtidos mediante os espectros de RMN de ^1H (E8) revelou sinais característicos de uma porção fenilpropanoídica com hidrogênios olefínicos em configuração *trans*, referentes aos dois sinais em δ 7,56 (*d*, $J = 15,9$ Hz) e 6,25 (*d*, $J = 15,9$ Hz), diretamente ligados aos C-7 e C-8, conforme observado no experimento de HSQC. Foi observado ainda os sinais de hidrogênios característicos de anel benzênico 3,4-dissubstituído em δ 6,87 (*d*, $J = 2,1$), δ 7,00 (*dd*, $J = 2,1$ e 8,1 Hz) e δ 7,07 (*d*, $J = 8,1$) diretamente ligados em C-2, C-5 e C-6. Ainda, o sinal em δ 1,33 (*t*, $J = 7,1$) referente a uma metila, acoplando com os hidrogênios do sinal em δ 4,25 (*q*, $J = 7,1$) caracterizando a esterificação do ácido caféico. As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC (E5; E6), para otimizar os experimentos bidimensionais, as atribuições foram realizadas em uma mistura com substâncias **Bb-1** e **Bb-4**. A TABELA 4 mostra os deslocamentos de RMN de ^1H , ^{13}C , correlações de HMBC e comparação com dados da literatura.

A fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas ESI/EM modo negativo de ionização (E9), o qual apresentou o íon molecular de m/z 207 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e o pico base de m/z 179 referente a perda do grupamento etila da molécula ($-\text{CH}_2\text{CH}_3$).

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e com dados da literatura a substância **Bb-2** foi identificada como ester etílico do ácido 3,4-dihidroxicinâmico, conhecida como cafeato de etila. Esta substância esta sendo relatada pela primeira vez no gênero *Baccharis*.



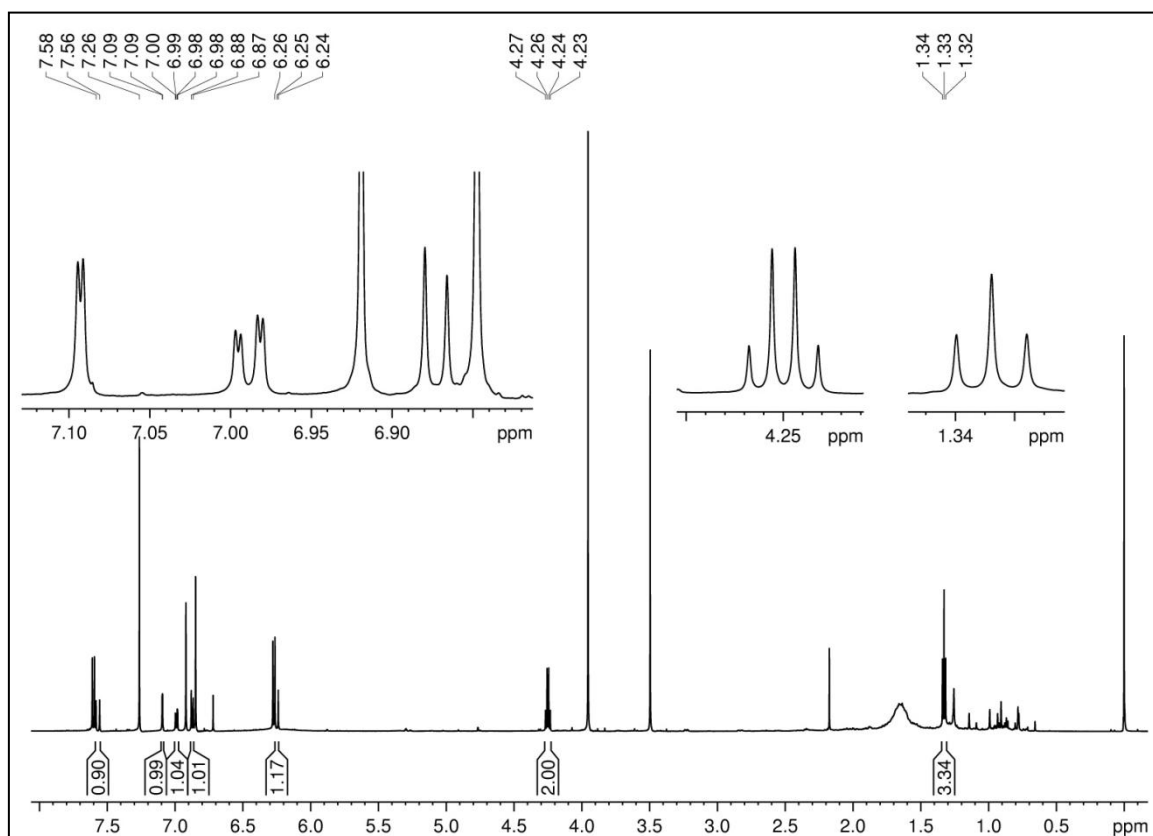
Cafeato de etila (**Bb-2**)

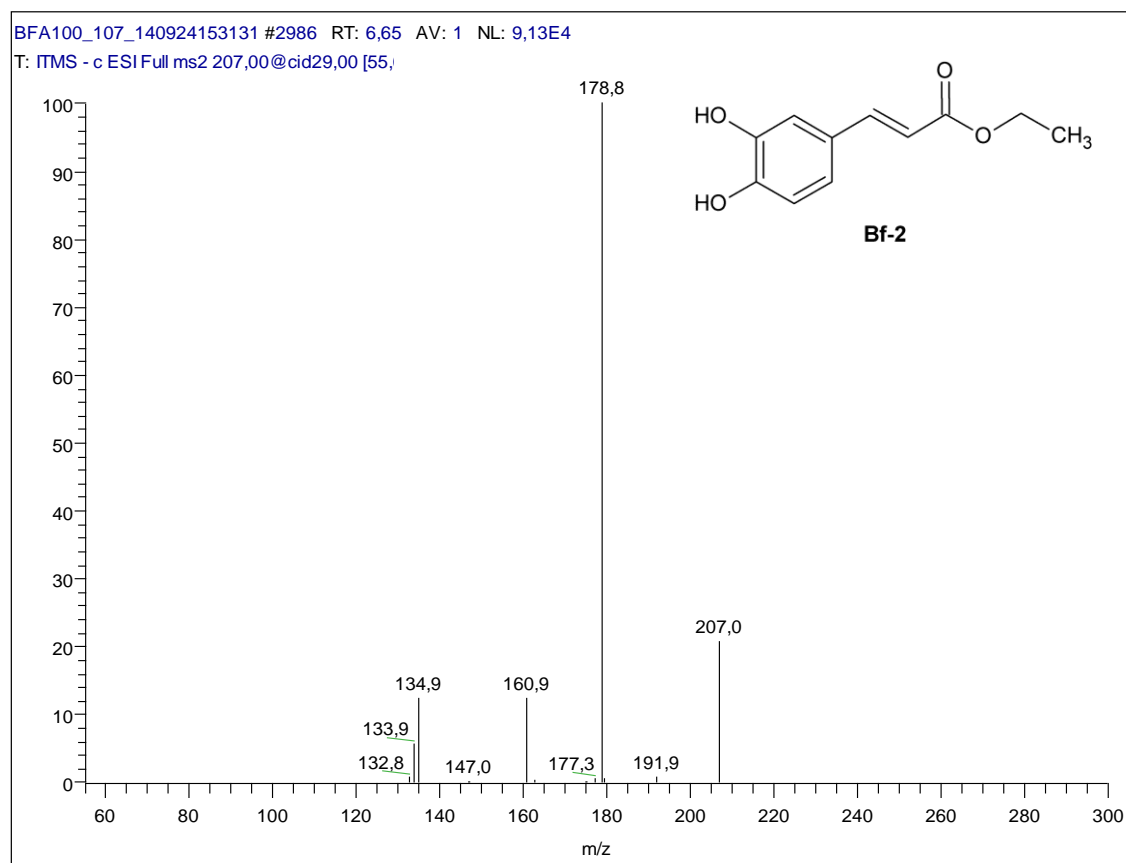
TABELA 3: DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HMBC E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA **Bb-2**.

Posição	Bb-2 ^a			Cafeato de etila ^b	
	δ^{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ^{C} (^{13}C)	HMBC	δ^{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ^{C} (^{13}C)
1	-	127,4	-	-	127,6
2	6,87 1H, <i>d</i> , (2,1)	115,6	1,3,4,6	6,88 1H, <i>d</i> , (1,8)	115,2
3	-	146,3	-	-	148,6
4	-	144,9	-	-	146,2
5	7,07 1H, <i>d</i> , (8,1)	114,6	3,4,6	7,11 1H, <i>d</i> , (8,4)	115,7
6	7,00 1H, <i>dd</i> (2,1; 8,1)	122,4	3,4,5	7,30 1H, <i>dd</i> (1,8; 8,4)	122,5
7	7,56 1H, <i>d</i> , (15,9)	116,2	6,2,9	7,56 1H, <i>d</i> , (16,2)	116,3
8	6,25 1H, <i>d</i> , (15,9)	144,4	1,9	6,28 1H, <i>d</i> , (16,2)	145,5
9	-	167,4	-	-	167,4
11	1,33 3H, <i>t</i> , (7,1)	60,7	9,12	1,37 3H, <i>t</i> , (7,2)	60,5
12	4,25 2H, <i>q</i> , (7,1)	14,1	11	4,30 2H, <i>t</i> , (7,2)	14,6

^a: Experimento realizado a 600 MHz para ^1H , HSQC e HMBC em CDCl_3 , utilizando TMS como referência interna. As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC.

^b: Dados da literatura de acordo com Wu *et al.*, (2007) e Uwai *et al.*, (2008).

E8: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA **Bb-2**, EM MISTURA.



E9: EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 207 (CE 29 V, EM METANOL COM 1% DE FORMIATO DE AMÔNIA) DE **Bb-2**.

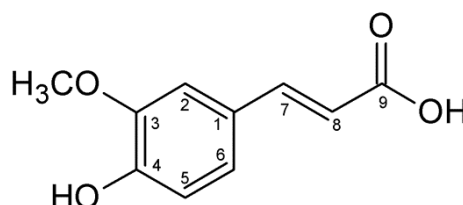
5.3.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE **Bb-3**

O composto **Bb-3** (ESQUEMA 3) foi identificado em mistura com um possível diterpeno, na fração **Bb-A**. Pela análise do espectro de RMN 1H (E10) foi possível observar sinais característicos de uma porção fenilpropanoídica com hidrogênios olefínicos em configuração *trans*, com sinais em δ 7,60 (*d*, $J = 15,9$ Hz) e 6,28 (*d*, $J = 15,9$ Hz), diretamente ligados aos C-7 e C-8. Foi observado ainda os sinais de hidrogênios característicos de anel benzênico 3,4-dissubstituído em δ 7,03 (*d*, $J = 1,9$), δ 7,07 (*dd*, $J = 1,9$ e 8,2 Hz) e δ 6,91 (*d*, $J = 8,2$), diretamente ligados em C-2, C-5 e C-6. Ainda o sinal em 3,92 (*s*) relacionado à metoxila ligada no C-3. As atribuições de δ^C foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC (E11; E12). A TABELA 5 mostra os deslocamentos de RMN de 1H , ^{13}C , correlações de HMBC e comparação com a literatura.

A fórmula molecular $C_{10}H_{10}O_4$ foi deduzida com base nos dados obtidos pelo espectro de massas ESI/EM modo positivo de ionização (E13), o qual apresentou o íon molecular de m/z 195 $[M+H]^+$ e o pico base de m/z 177 referente a perda de uma molécula de água.

Baseando-se nos dados espectrais obtidos e nos dados da literatura a substância **Bb-4** foi identificada como sendo ácido *trans* ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxi-*trans*-cinâmico). Esta substância esta sendo relatada pela primeira vez na seção *Caulopterae*.

No gênero *Bacchais* está substância foi relatada nas espécies de *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. uncinella* (FERESIN *et al.*, 2003; DE SILVA FILHO *et al.*, 2004; LEMOS *et al.*, 2007; BUFALO *et al.*, 2009; GRECCO *et al.*, 2010; ZALEWSKI *et al.*, 2011).



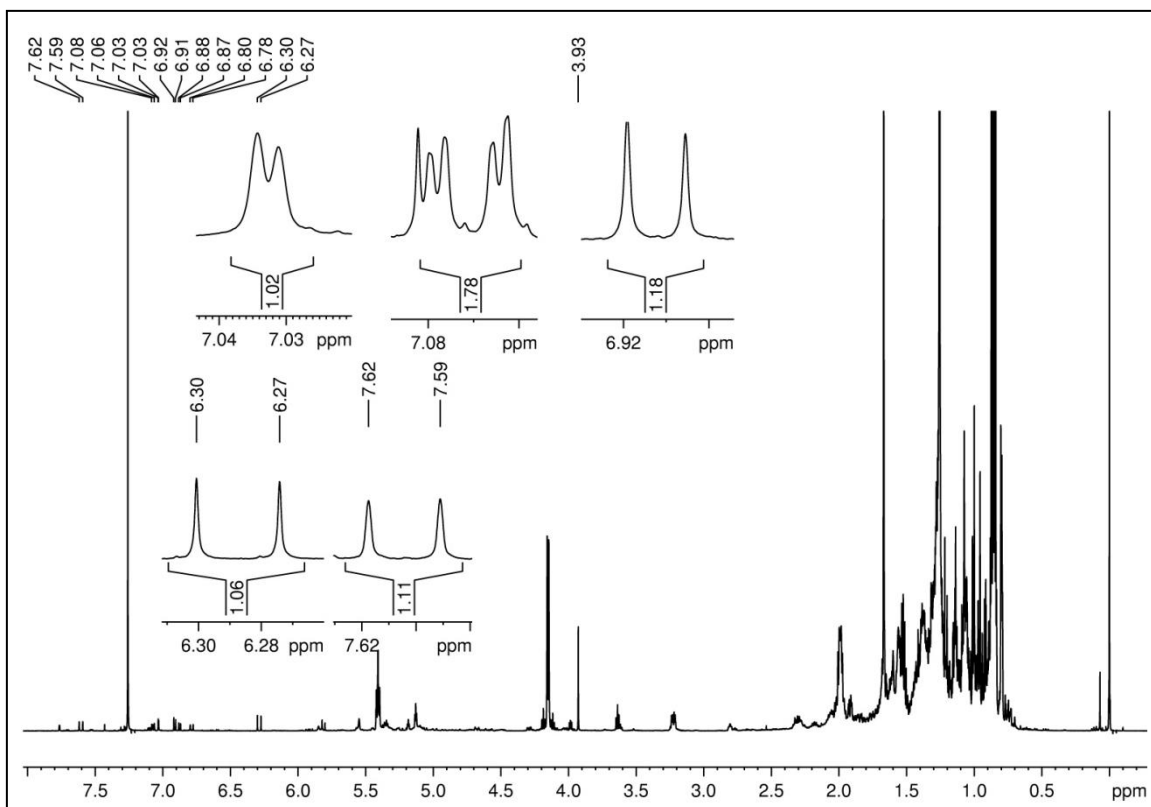
Ácido *trans* ferúlico (**Bb-3**)

TABELA 4: DADOS DE RMN DE 1H , ^{13}C , HMBC E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA **Bb-3**.

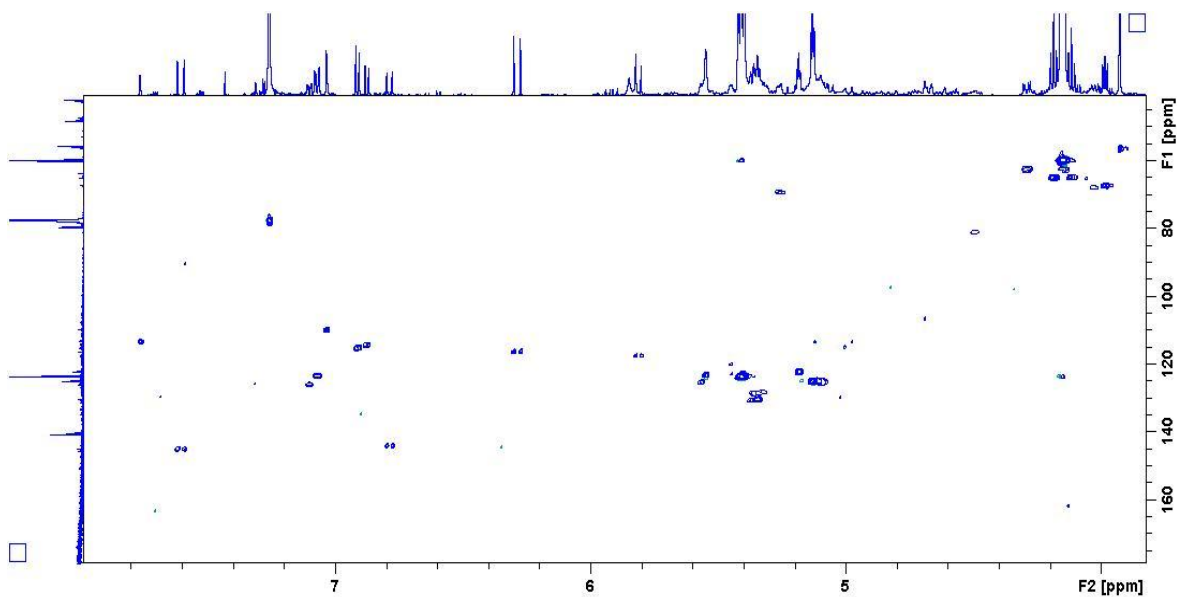
Posição	Bb-3 ^a			Ácido <i>trans</i> ferúlico ^b	
	δ^H (mult., <i>J</i> em Hz)	δ^C (^{13}C)	HMBC	δ^H (mult., <i>J</i> em Hz)	δ^C (^{13}C)
1	-	127,4	-	-	127,7
2	7,03 1H, <i>d</i> , (1,9)	109,1	3,4,6,7	7,18 1H, <i>d</i> , (1,9)	111,6
3	-	148,9	-	-	151,1
4	-	146,7	-	-	149,9
5	6,91 1H, <i>d</i> , (8,2)	114,7	1,3	6,82 1H, <i>d</i> , (8,3)	116,4
6	7,07 1H, <i>dd</i> (1,9;8,2)	123,0	2,4	7,07 1H, <i>dd</i> (1,9;8,3)	123,9
7	7,60 1H, <i>d</i> , (15,9)	144,6	2,6,9	7,59 1H, <i>d</i> , (15,8)	115,8
8	6,28 1H, <i>d</i> , (15,9)	115,8	1,9	6,31 1H, <i>d</i> , (15,8)	146,9
9	-	167,1	-	-	171,1
OCH ₃	3,92 3H, <i>s</i>	56,2	3	3,89 3H, <i>s</i>	56,4

^a: Experimento realizado de RMN de 1H , HSQC e HMBC (600 MHz, $CDCl_3$), utilizando TMS como referência interna. As atribuições de δ^C foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC.

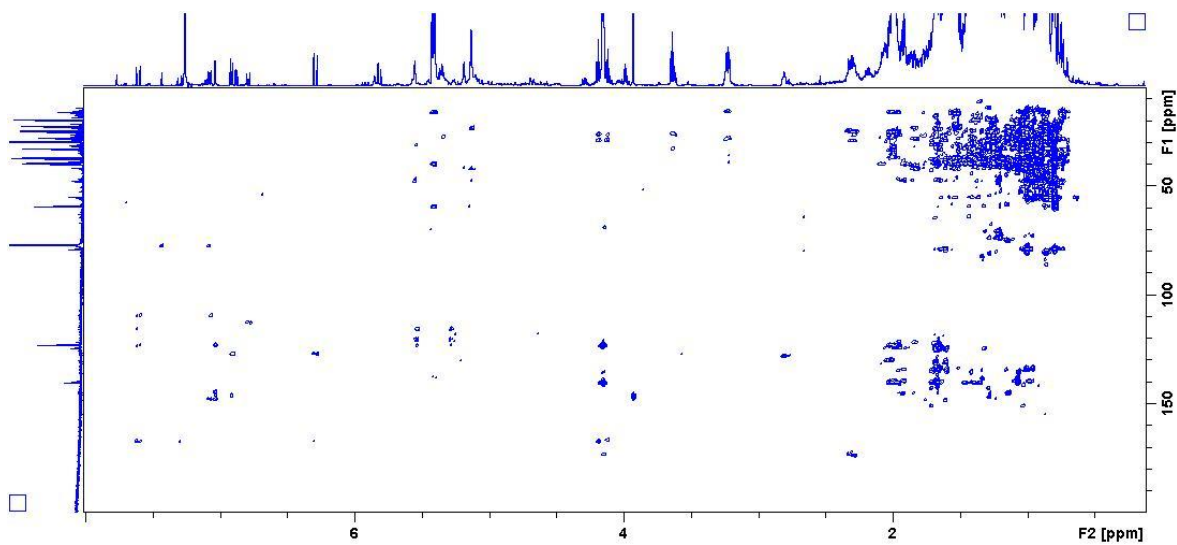
^b: Dados da literatura de acordo com Prachayasittikul *et al.*, (2009).



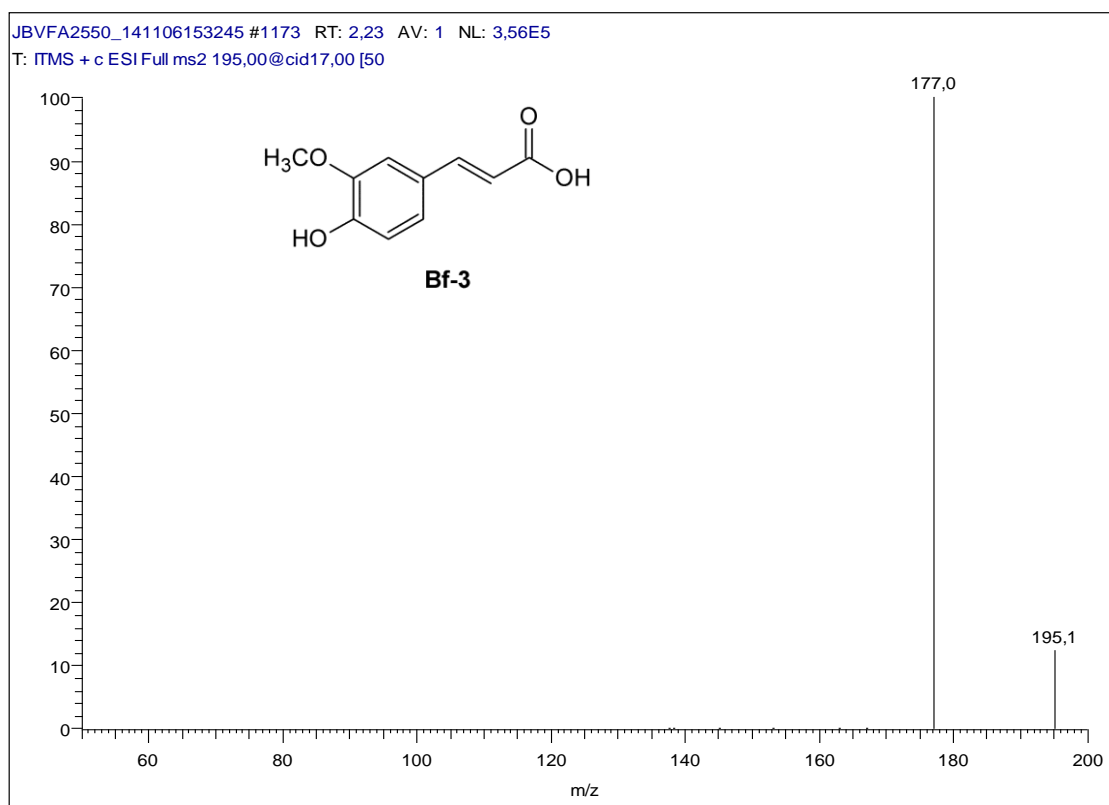
E10: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA **Bb-3**, EM MISTURA.



E11: MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, CDCl_3) DAS SUBSTÂNCIAS **Bb-3**, EM MISTURA.



E12: MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC (600 MHz, CDCl_3) DAS SUBSTÂNCIAS **Bb-3**, EM MISTURA.



E13: EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 195 (CE 17 V, EM METANOL) DE **Bb-3**.

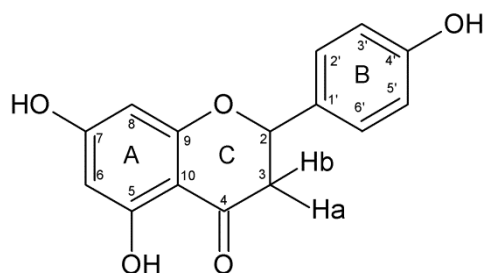
5.3.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE **Bb-4**

A fração **Bb-A** (ESQUEMA 3) forneceu o composto **Bb-4** que foi identificado em mistura com **Bb-1** e **Bb-2**. Pela análise do espectro de RMN ^1H (E14) indicou-se tratar-se de um flavonoide pelo sinal em δ 12,03 (s) referente ao hidrogênio quelado ligado ao C-5, os sinais em δ 7,32 (*d*, $J = 8,54$ Hz, H-2' e H6') e em δ 6,88 (*d*, $J = 8,54$ Hz, H-3' e H5') referentes a um sistema de acoplamento de segunda ordem do anel *para*-substituído (anel B do flavonóide). Dois sinais em δ 6,00 (*d*, $J = 2,1$ Hz) e δ 5,98 (*d*, $J = 2,1$ Hz), característicos de um sistema de acoplamento entre dois hidrogênios na posição *meta*, relacionados aos C-6 e C-8. Ainda o sinal em δ 5,35 (*dd*, $J = 13,1$ e $3,0$ Hz) referente ao hidrogênio ligado no C-2, acoplando com os H-3a, na conformação especial na posição axial, enquanto que o H-3b na posição equatorial, os δ 3,08 (*dd*, $J = 13,1; 17,2$ Hz) e δ 2,72 (*dd*, $J = 17,1; 3,1$ Hz), respectivamente, ligados ao C-3 do anel C do flavonóide. As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC (E5; E6), para otimizar os experimentos bidimensionais, as atribuições foram realizadas em uma mistura com substâncias **Bb-1** e **Bb-2**. A TABELA 6 mostra os deslocamentos de RMN de ^1H , ^{13}C , correlações de HMBC e comparação com a literatura.

A análise do espectro de massas ESI/EM, no modo de ionização negativo (E15), revelou o íon molecular de m/z 271 $[\text{M-H}]^-$, confirmando a fórmula molecular de $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$. Os íons fragmentos de m/z 177 referente à perda do hidroxifenil e o íon de m/z 150 referente à abertura do anel tetrahidropiranona com consequente perda da unidade de $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$, confirmaram o esqueleto do flavonóide.

Baseando-se nos resultados espectrais obtidos e nos dados relatados pela literatura, foi proposta a estrutura da substância 4',5,7-trihidroxiflavanona, conhecido como naringenina. Esta substância está sendo relatada pela primeira vez na seção *Caulopterae*.

Este flavonóide já foi relatado nas espécies de *B. dracunculifolia*, *B. illinita*, *B. pseudotenuifolia*, *B. retusa* e *B. salzmännii* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2003; VERDI *et al.*, 2004; GRECCO *et al.*, 2012; FUKUDA *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2013).

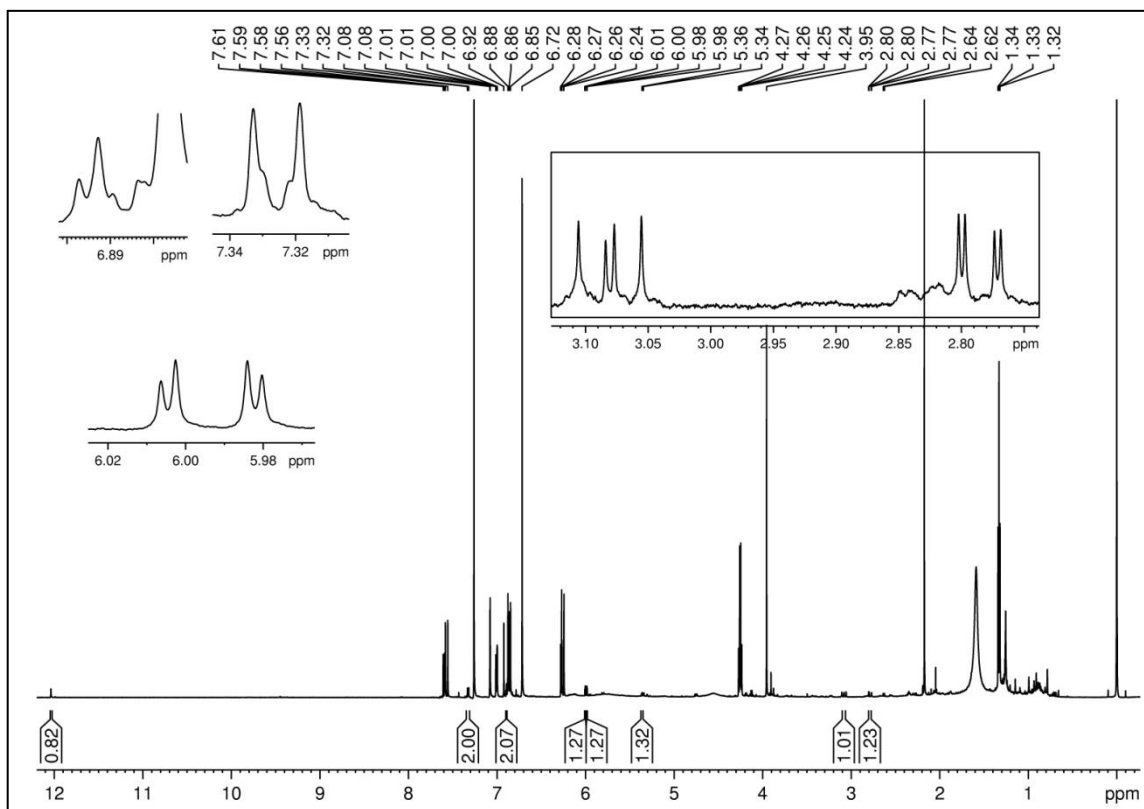
Narigenina (**Bb-4**)TABELA 5: DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HMBC E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA **Bb-4**.

Posição	Bb-3^a			Narigenina^b	
	δ^{H} (multiplicidade; <i>J</i> em Hz)	δ^{C} (^{13}C)	HMBC	δ^{H} (multiplicidade; <i>J</i> em Hz)	δ^{C} (^{13}C)
2	5,35 1H, <i>dd</i> , (13,1; 3,0)	79,0	-	5,45 1H, <i>dd</i> , (12,9; 3,1)	79,9
3a	3,08 1H, <i>dd</i> , (13,1; 17,2)	43,4	2,4	3,18 1H, <i>dd</i> , (12,9; 17,1)	43,4
3b	2,78 1H, <i>dd</i> , (3,0; 17,2)	43,4	4	2,72 1H, <i>dd</i> , (3,1; 17,1)	43,4
4	-	196,0			197,3
5	12,03 s	163,8	5,6,7	12,1 1H, s	165,2
6	5,98 1H, <i>d</i> , (2,1)	95,4	5,8	5,96 2H, s	96,7
7	-	*			167,3
8	6,00 1H, <i>d</i> , (2,1)	96,9	9		95,8
9	-	103,4			103,1
10	-	179,8			164,3
1'	-	*			130,7
2'	7,32 2H, <i>d</i> , (8,5)	127,9	2, 4',6'	7,41 2H, <i>d</i> , (8,3)	128,9
3'	6,88 2H, <i>d</i> , (8,5)	115,1		6,92 2H, <i>d</i> , (8,3)	116,1
4'	-	156,0			158,6
5'	6,88 2H, <i>d</i> , (8,5)	115,1		6,92 2H, <i>d</i> , (8,3)	116,1
6'	7,32 2H, <i>d</i> , (8,5)	127,9	2, 2',4'	7,41 2H, <i>d</i> , (8,3)	128,9

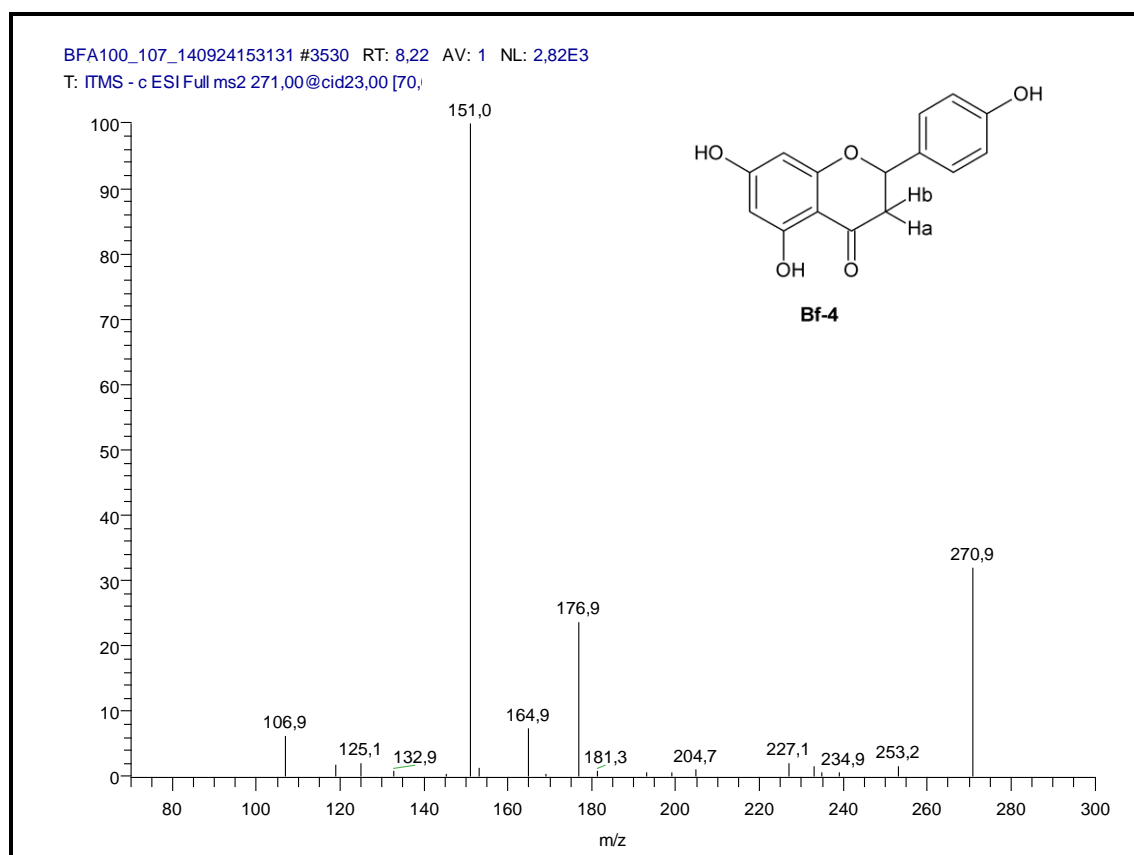
^a: Experimento realizado de RMN de ^1H , HSQC e HMBC (600 MHz, CDCl_3), utilizando TMS como referência interna. As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC.

^b: Dados da literatura de acordo com a literatura Frontana-Urbe *et al.*, (2011) e Faustino *et al.*, (2010).

*: Valores não definidos.



E14: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, CDCl_3) DA SUBSTÂNCIA **Bb-4**, EM MISTURA.



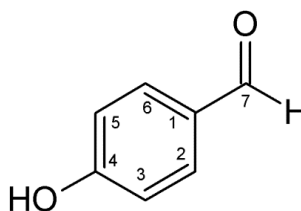
E15: EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 271 (CE 23 V, EM METANOL 1% DE FORMIATO DE AMÔNIA) DE **Bb-4**.

5.3.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE **Bb-5**

A fração **Bb-D** (ESQUEMA 4) forneceu o composto **Bb-5** que foi identificado em mistura com **Bb-1** e **Bb-2**. Pela análise do espectro de RMN de ^1H (E16) foi observado a presença de um sinal em δ 9,76 (*simpleto* largo) característico de um grupamento aldeído, ainda os sinais em δ 7,76 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-2' e H6') e δ 6,93 (*d*, $J = 8,5$ Hz, H-3' e H5') referentes a um sistema de acoplamento de segunda ordem do anel benzênico *para*-substituído. As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC (E17; E18). A TABELA 7 mostra os deslocamentos de RMN de ^1H , ^{13}C , correlações de HMBC e comparação com a literatura.

A análise do espectro de massas ESI/EM, no modo negativo de ionização revelou o íon molecular de m/z 121 $[\text{M}-\text{H}]^-$, confirmando a fórmula molecular de $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$. No experimento de MS^2 foram observados os íons fragmentos de m/z 106, referente à perda de uma molécula de água, ainda os íons de m/z 93 e 77, referentes às perdas dos grupos aldeído e aldeído mais água, respectivamente.

Baseando-se nos resultados espectrais obtidos e nos dados relatados pela literatura, foi proposta a estrutura da substância 7-hidroxi-benzaldeído. Esta substância está sendo relatada pela primeira vez no gênero *Baccharis*. Esta já foi descrita na composição química da própolis verde, indicativo que pode estar na constituição de *B. dracunculifolia*, uma vez que seu exsudato é utilizado pelas abelhas para gerar a própolis verde brasileiro.



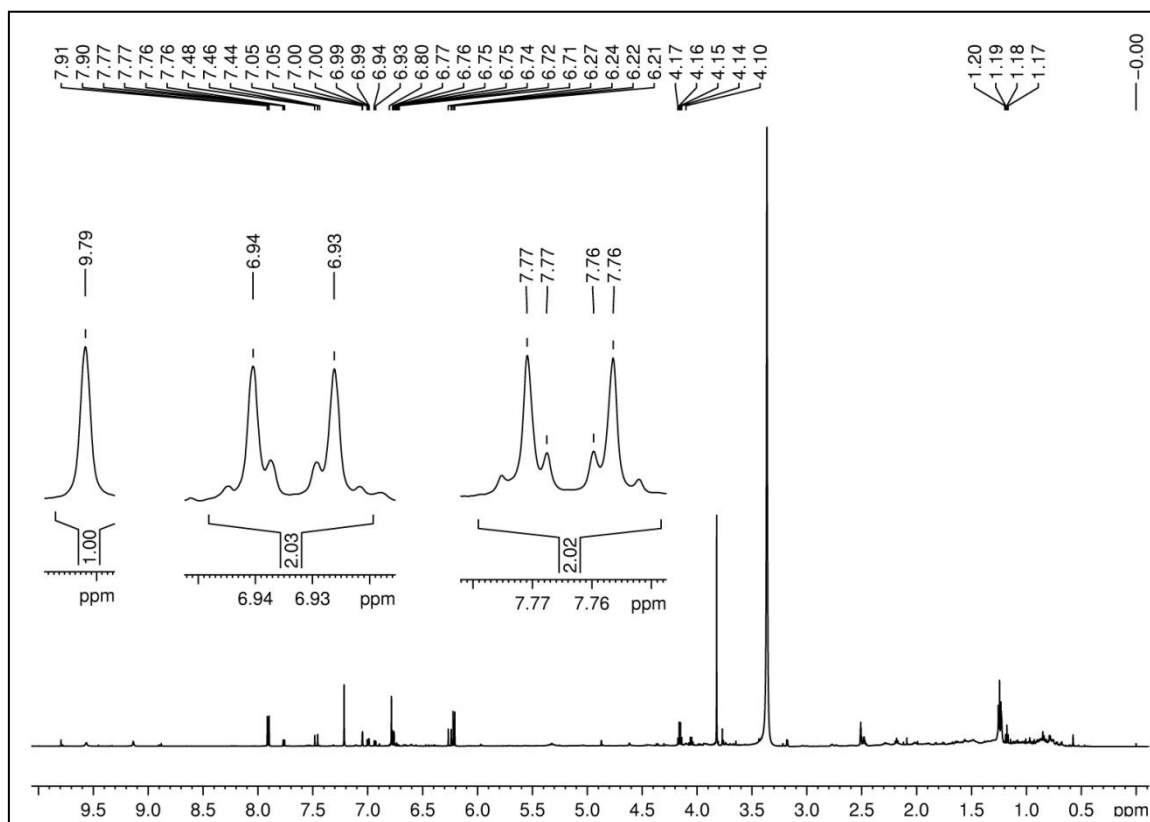
7-hidroxi-benzaldeído (**Bb-5**)

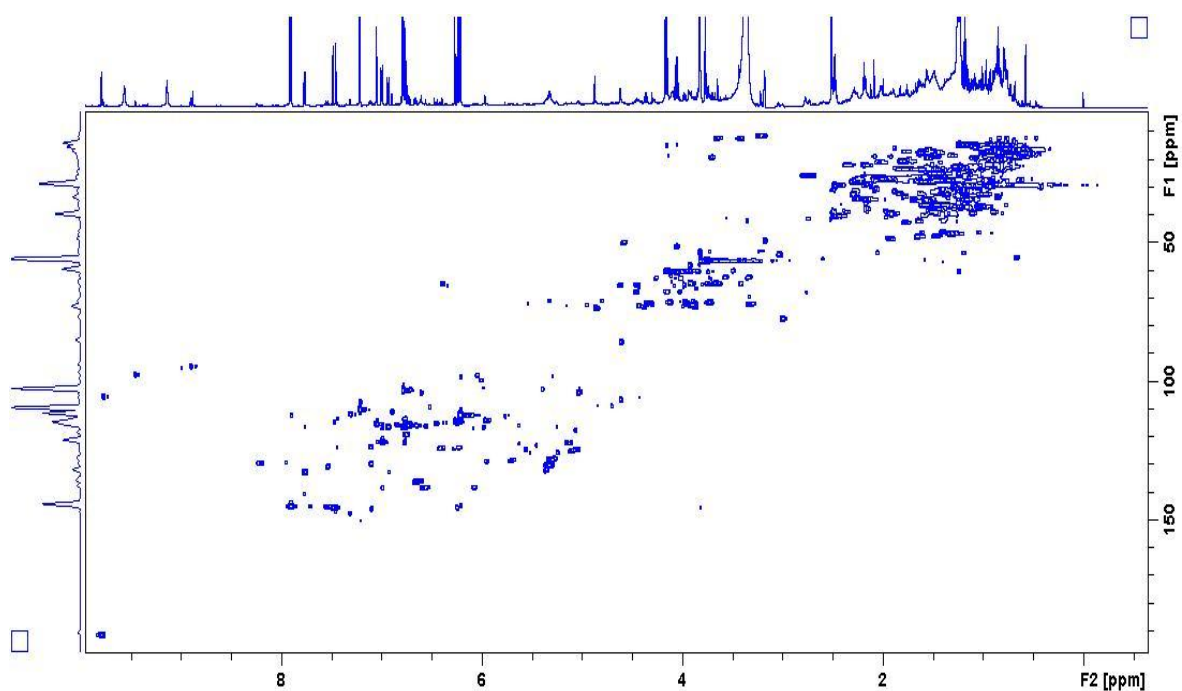
TABELA 6: DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HMBC E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA **Bb-5**.

Posição	Bb-5^a			7-hidroxi-benzaldeído^b	
	δ^{H} (mult., J em Hz)	δ^{C} (^{13}C)	HMBC	δ^{H} (mult., J em Hz)	δ^{C} (^{13}C)
1	-	128,3	-	-129,5	129,5
2	7,76 2H, <i>d</i> , (8,5)	132,0	4,6,7	7,94 2H, <i>d</i> , (8,5)	132,6
3	6,93 2H, <i>d</i> , (8,5)	115,8	1,5	7,19 2H, <i>d</i> , (8,5)	116,8
4	-	163,2	-	-	165,0
5	6,93 2H, <i>d</i> , (8,5)	115,8	4,6,7	7,19 2H, <i>d</i> , (8,5)	116,6
6	7,76 2H, <i>d</i> , (8,5)	132,0	1,5	7,94 2H, <i>d</i> , (8,5)	132,6
7	9,76 s	191,0	-	9,99 s	190,6

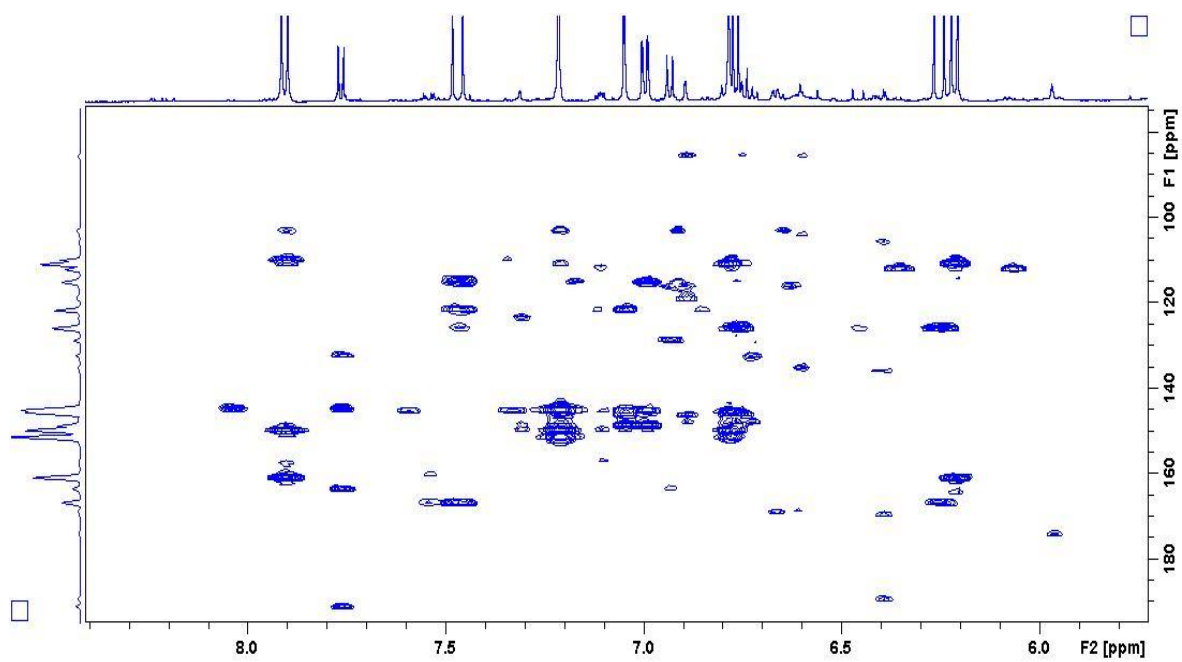
^a: Experimento realizado de RMN de ^1H , HSQC e HMBC (600 MHz, DMSO-d_6), utilizando TMS como referência interna. As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC.

^b: Dados da literatura de acordo com Wang, Huang e Yang, (2011).

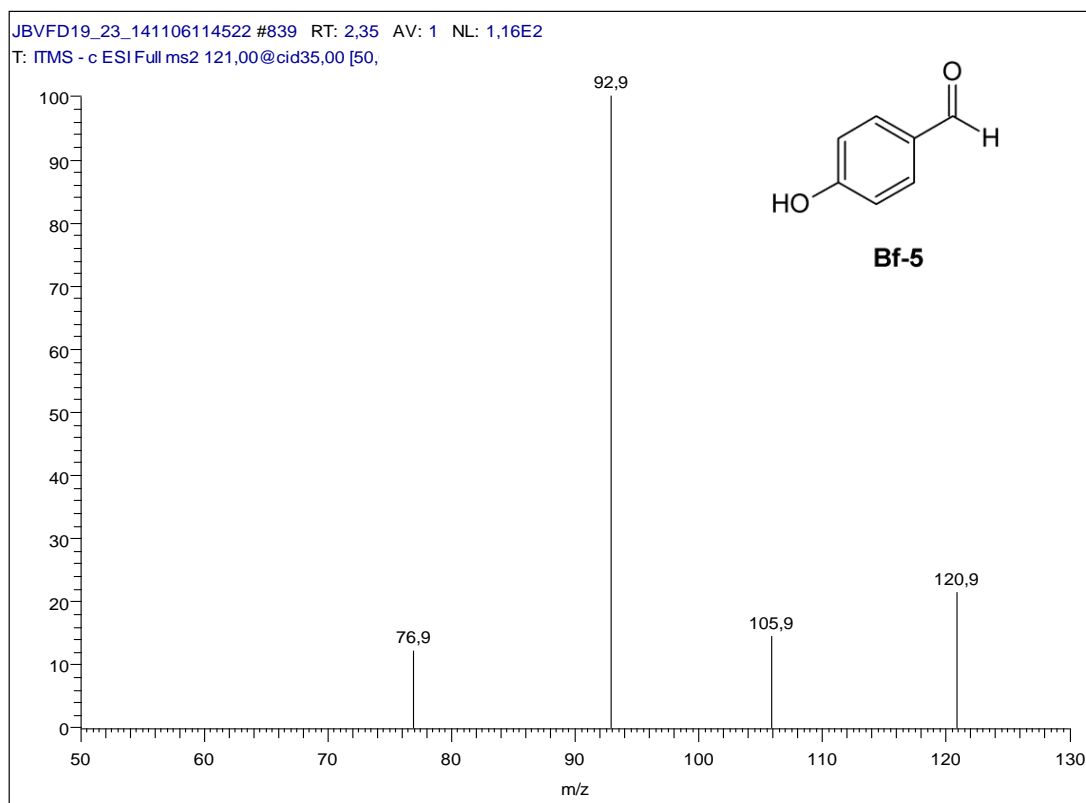
E16: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) DA SUBSTÂNCIA **Bb-5**, EM MISTURA.



E17: MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, DMSO-d₆) DAS SUBSTÂNCIAS **Bb-5**, EM MISTURA.



E18: MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC (600 MHz, DMSO-d₆) DAS SUBSTÂNCIAS **Bb-5**, EM MISTURA.



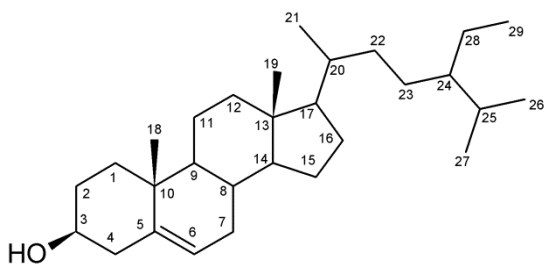
E19: EXPERIMENTO DE MASSAS (MS²) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 121 (CE 35 V, EM METANOL 1% DE FORMIATO DE AMÔNIO) DE **Bb-5**.

5.3.6 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE **Bb-6** E **Bb-7**

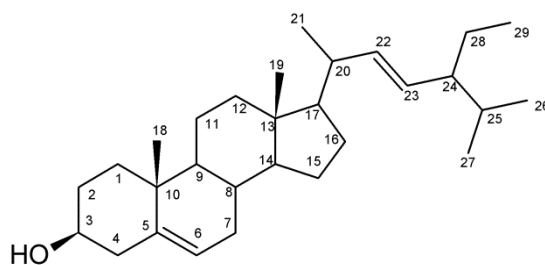
A fração **Bb-H** (ESQUEMA 5) forneceu as substâncias **Bb-6** e **Bb-7**, que foram identificados em mistura. Pela análise do espectro de RMN de ¹³C (E20) foi observada a presença de sinais característicos de anéis esteroidais, provavelmente em mistura, contendo no mínimo dois esteróides. Foram observados os sinais em comuns dos carbonos sp² C-22 e C-23 em δ 138,2 e δ 128,8, bem como os sinais dos carbonos sp³ C-22 e C-23 em δ 33,9 e δ 26,0. Observou-se também os sinais em δ 25,3 e δ 23,1 referidos como sendo dos carbonos metilênicos C-28, assim como os sinais em δ 139,8 e δ 121,7 característicos dos carbonos olefínicos C-5 e C-6, e o sinal em δ 73,3 típicos de carbono carbinólico atribuído a C-3. A partir da análise destes sinais pode-se atribuí-los aos compostos β -sitosterol (**Bb-6**) e

estigmasterol (**Bb-7**), que apresentam praticamente os mesmos sinais, diferenciando-se apenas nos C-22 e C-23 devido a dupla ligação do estigmasterol. A TABELA 8 mostra os deslocamentos de RMN de ^{13}C e comparação com a literatura.

Ainda foram realizados experimentos de massas ESI/EM, no modo positivo de ionização (E21; E22), que revelou os íons fragmentos a partir dos seus respectivos íons moleculares de m/z 415 $[\text{M}+\text{H}]^+$ e m/z 413 $[\text{M}+\text{H}]^+$ confirmando assim suas estruturas. Estes fitoesteróides são de ampla ocorrência nos vegetais, sendo relatado em várias espécies de *Baccharis*.



Bb-6: β -sitosterol ()



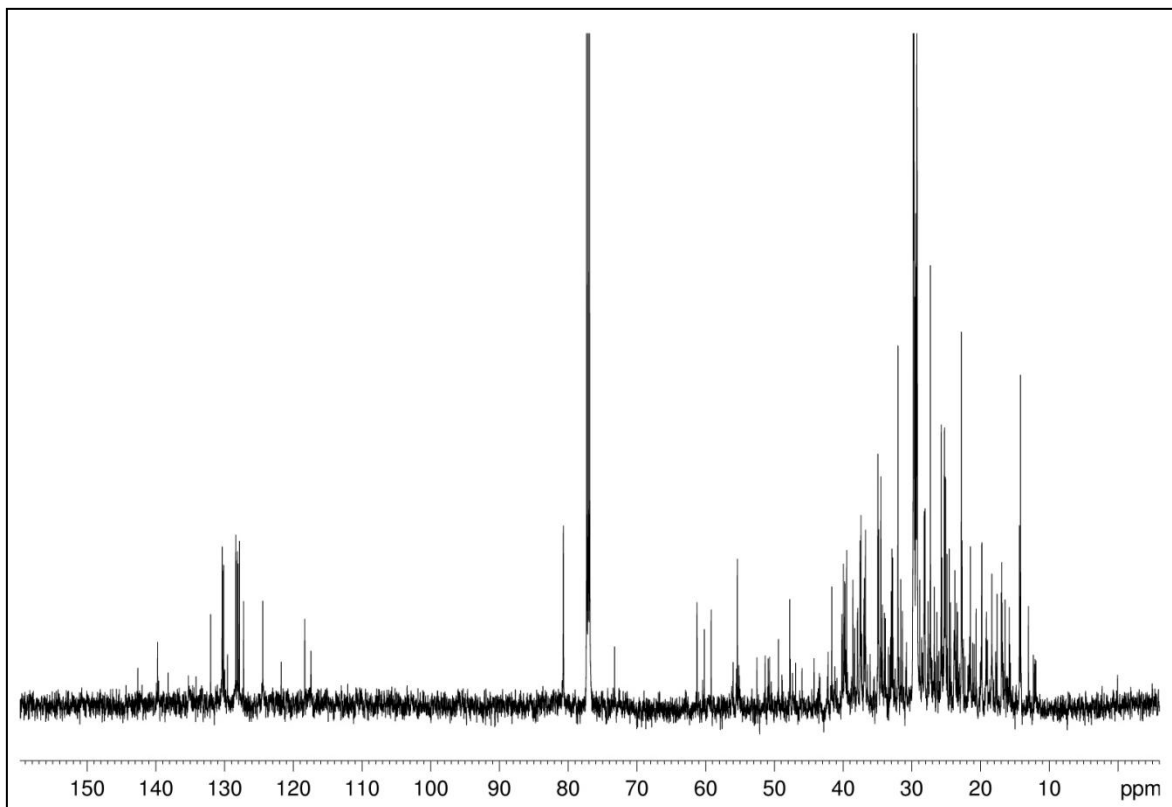
Estigmasterol (Bb-7)

TABELA 7: DADOS DE RMN DE ^{13}C E COMPARAÇÃO COM LITERATURA PARA **Bb-6** E **Bb-7**.

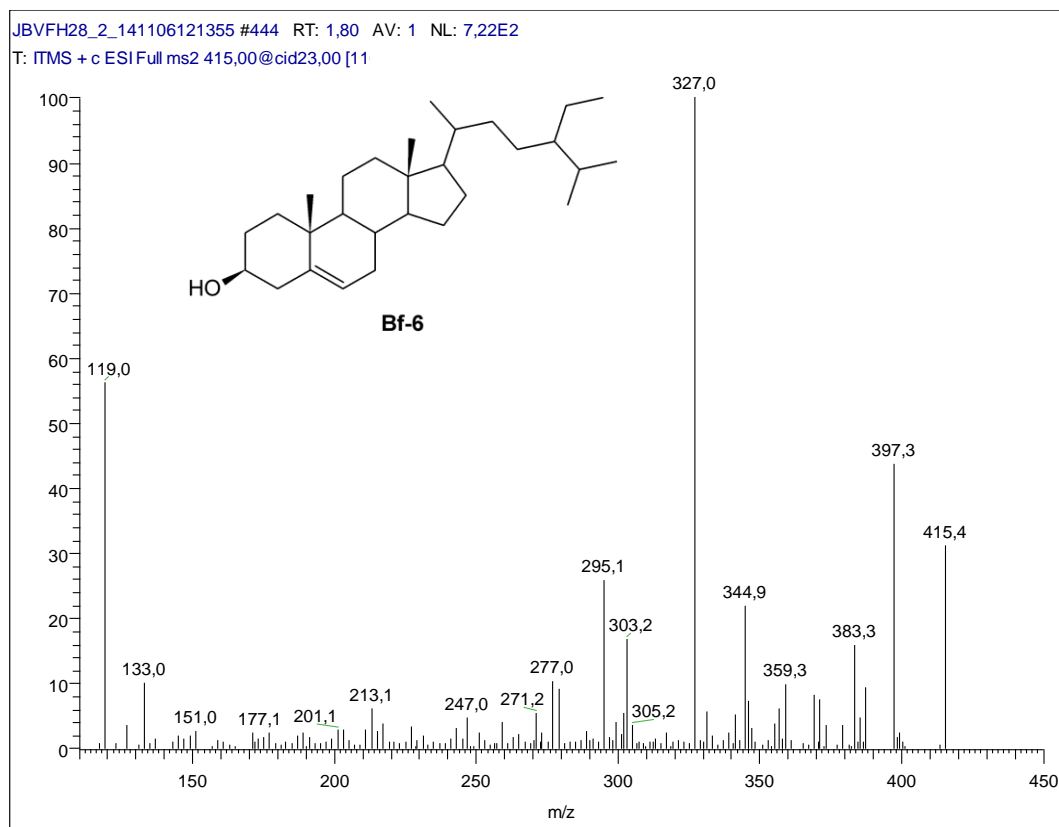
	Bb-1^a	β-sitosterol^b	Bb-2^a	Estigmasterol^b
Posição	δ^c (^{13}C)	δ^c (^{13}C)	δ^c (^{13}C)	δ^c (^{13}C)
1	37,3	37,2	37,3	37,2
2	31,6	31,6	31,6	31,6
3	73,2	71,7	73,2	71,7
4	42,2	42,2	42,2	42,2
5	139,8	140,7	139,8	140,7
6	121,6	121,6	121,7	121,6
7	32,0	31,8	32,0	31,8
8	32,0	31,8	32,0	31,8
9	50,1	50,1	50,1	50,1
10	36,7	36,4	36,7	36,4
11	21,0	21,0	21,0	21,0
12	39,7	39,6	39,7	39,6
13	41,9	42,2	41,9	42,2
14	56,0	56,7	56,0	56,7
15	24,3	24,2	24,3	24,2
16	28,2	28,2	29,2	29,1
17	56,0	56	56,0	56
18	11,9	11,8	12,0	12,0
19	19,2	19,3	19,2	19,3
20	36,1	36,1	40,1	40,4
21	18,6	18,7	20,9	21,0
22	33,9	33,9	138,2	138,3
23	26,0	26,0	128,8	129,2
24	45,9	45,8	51,2	51,2
25	29,2	29,1	31,6	31,8
26	19,8	19,8	21,1	21,2
27	19,2	19,3	18,9	18,9
28	23,1	23,0	25,3	25,3
29	12,2	12,2	12,1	12,2

^a: Experimento realizado de RMN de ^{13}C (600 MHz, CDCl_3), utilizando TMS como referência interna.

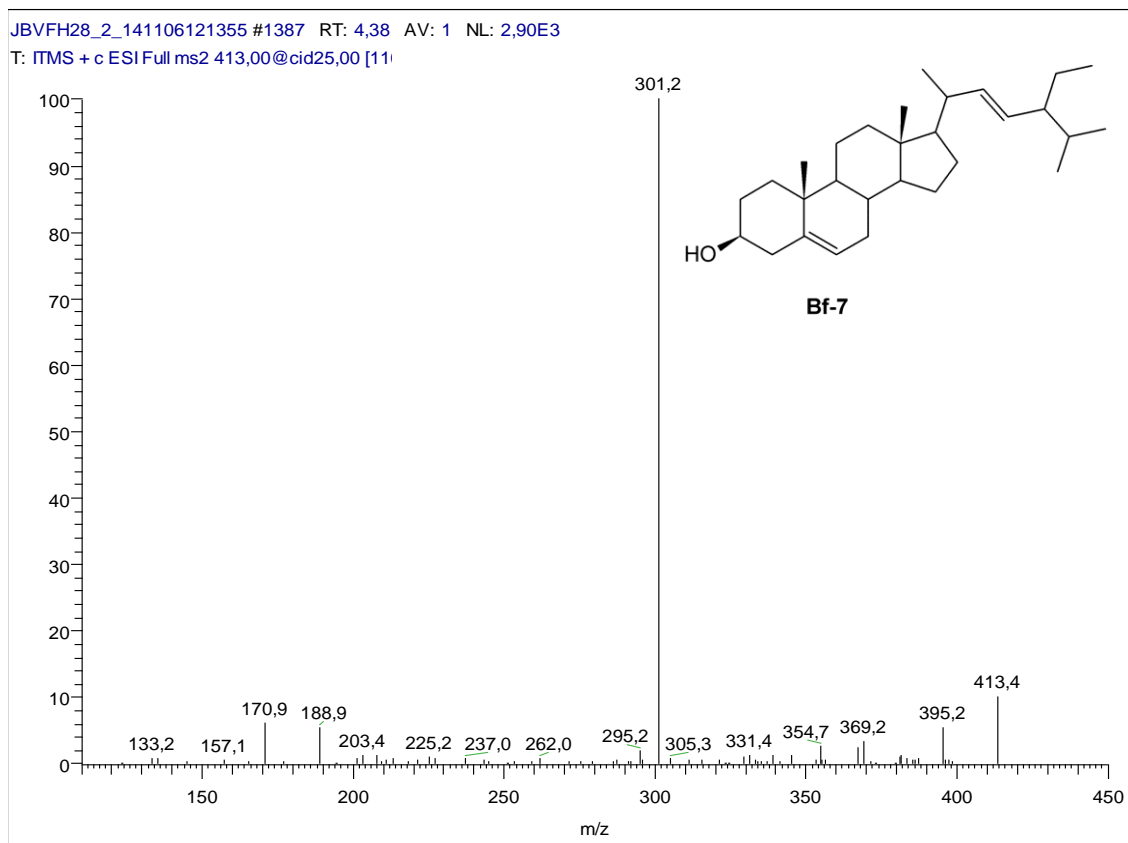
^b: Dados da literatura de acordo com Costa, (2009).



E20 ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (600 MHz, CDCl_3) DA MISTURA DAS SUBSTÂNCIAS **Bb-6** E **Bb-7**, EM MISTURA.



E21: EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 415 (CE 23 V, METANOL) DE **Bb-6**.



E 22: EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 413 (CE 25 V, METANOL) DE **Bb-7**.

5.3.7 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE **Bb-8**

A fração **Bb-A** (ESQUEMA 3) forneceu o composto **Bb-8** que foi identificado em mistura. A análise do seu espectro de RMN de 1H (E23, E24) revelou a presença de uma β -glicose ligada entre um ácido fenólico e um anel p -substituído.

A presença dos sinais em δ 4,97 (d , $J = 8,1$ Hz) e δ 4,89 (dd , $J = 8,1$; 9,6 Hz), juntamente com os sinais de hidrogênio carbinólicos entre δ 3,74 – 3,27 forneceram as características de uma glicose com seus hidrogênios na configuração espacial na posição axial, devido apresentar um $J = 8,1$ Hz, caracterizando assim uma β -glicose. Através da observação da correlação do sinal δ 4,97 a três ligações com o C-1 (δ 150,0) foi possível confirmar a junção da unidade de β -glicose com o anel *para*-

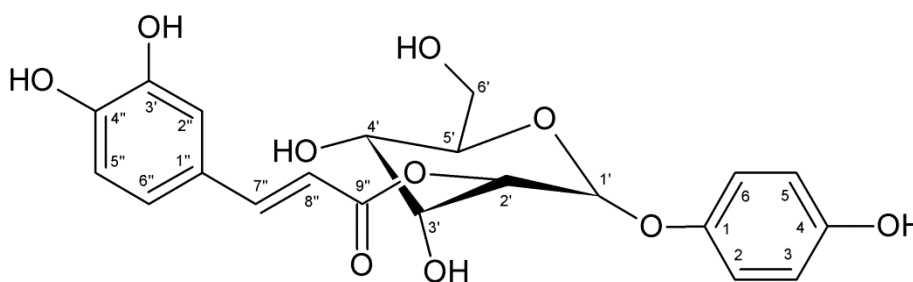
substituído. Os sinais característicos em δ 6,81 (*d*, $J = 9,0$ Hz, H-2' e H6') e em δ 6,66 (*d*, $J = 9,0$ Hz, H-3' e H5') são referentes a um sistema de acoplamento de segunda ordem do anel *para*-substituído.

Ainda foi observado que o sinal com δ 4,97 da β -glicose se correlaciona com o C-9'' (δ 165,9) referente à carbonila da porção fenilpropanoídica com hidrogênios olefínicos em configuração *trans*. Foi observado os sinais em δ 7,53 (*d*, $J = 16,0$ Hz) e 6,31 (*d*, $J = 16,0$ Hz), diretamente ligados aos C-7'' e C-8'', ainda os sinais de hidrogênios característicos de anel benzênico 3,4-dissubstituído em δ 7,01 (*d*, $J = 2,1$ Hz), δ 7,09 (*dd*, $J = 2,1$ e 8,1 Hz) e δ 6,79 (*d*, $J = 8,1$ Hz) ligados em C-2'', C-5'' e C-6''.

As atribuições de δ^C foram obtidas através da análise de mapas de correlação de HSQC e HMBC (E25; E26). A TABELA 9 mostra os deslocamentos de RMN de ^1H , ^{13}C , correlações de HMBC.

A estrutura foi confirmada com base nos dados de espectros de massas de HR-MS Q-TOF, no modo negativo (E27), o qual apresentou o íon molecular de m/z 433,11347 $[\text{M-H}]^-$ confirmando a fórmula molecular de $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$. No experimento de MS^2 foi observado o pico base de m/z 323,0798, referente à perda neutra de 110 Da referente ao anel *para*-substituído.

Baseando-se nos resultados espectrais obtidos, é a primeira vez que esta substância está sendo descrita na literatura. O composto **Bb-8** foi definido como *p*-hidroxifenil,2'-*O*-*trans*-cafeoil- β -D-glicopiranosídeo.

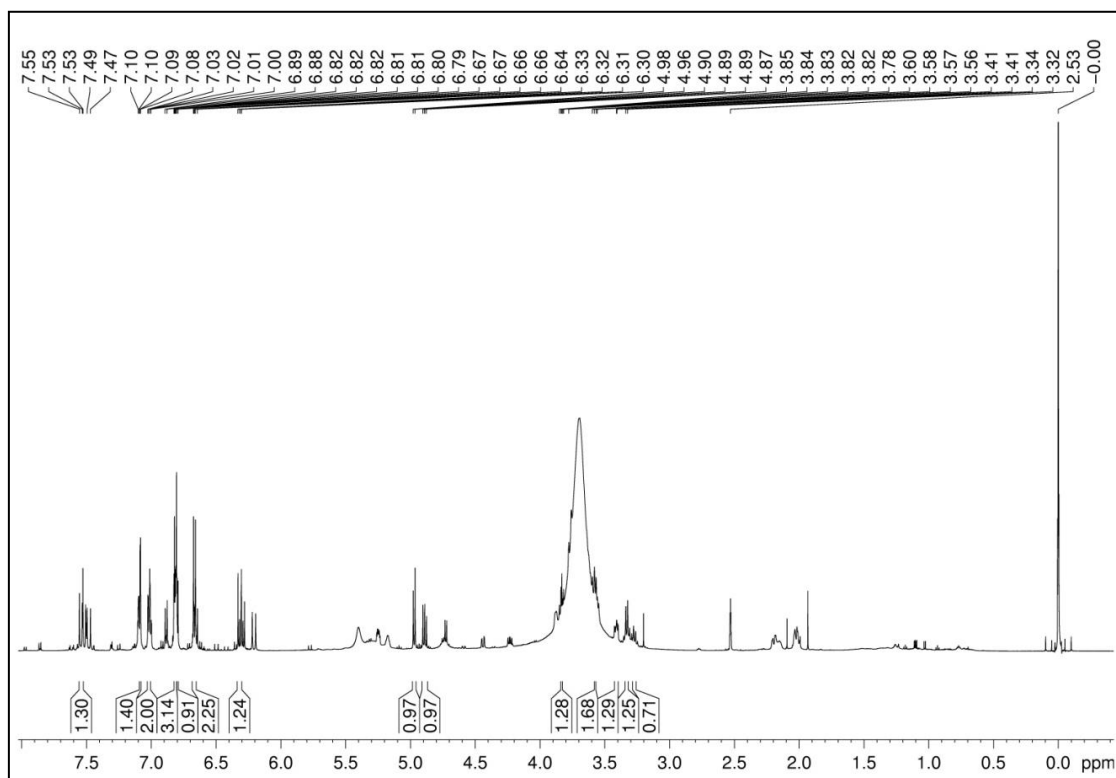


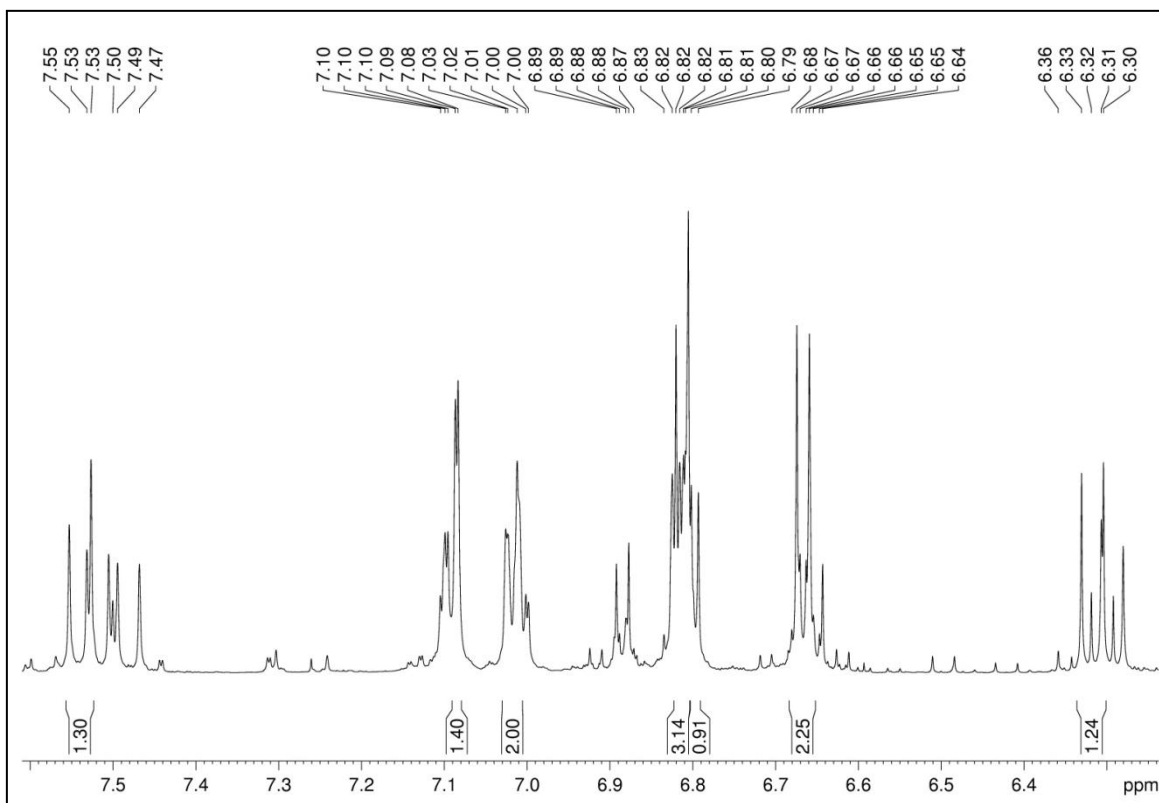
p-hidroxifenil,2'-*O*-*trans*-cafeoil- β -D-glicopiranosídeo (**Bb-8**)

TABELA 8: DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C E HMBC PARA **Bb-8**.

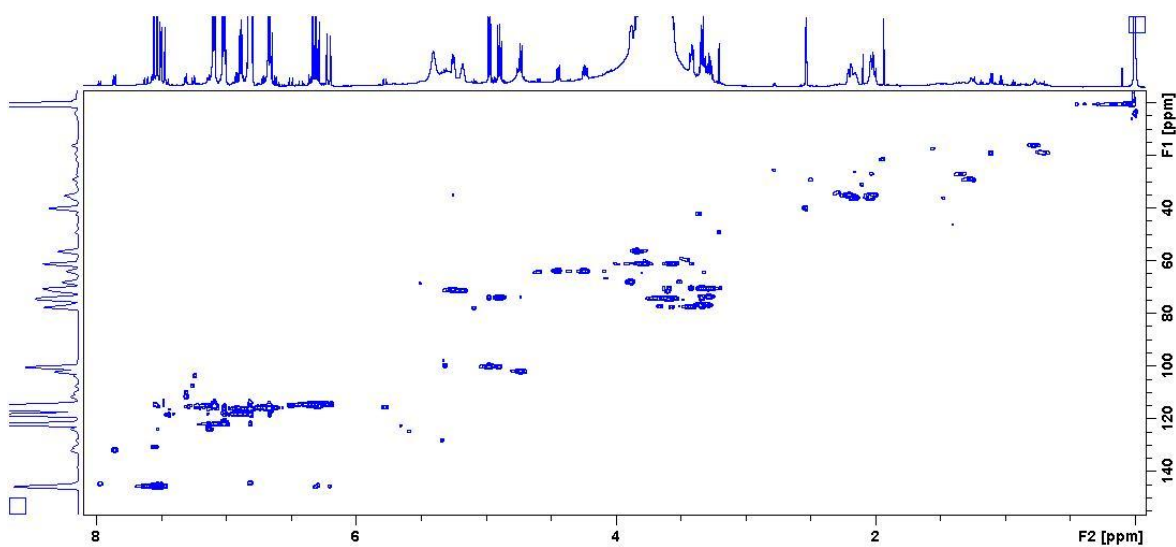
Posição	Bb-6 ^a		
	δ^{H} (mult., <i>J</i> em Hz)	δ^{C} (^{13}C)	HMBC
1	-	150,0	-
2	6,81 2H, <i>d</i> , (8,5)	115,6	1,3,4,6
3	6,66 2H, <i>d</i> , (8,5)	117,9	1,2,4,5
4	-	152,7	-
5	6,81 2H, <i>d</i> , (8,5)	117,9	1,3,4,6
6	6,66 2H, <i>d</i> , (8,5)	115,6	1,2,4,5
1'	4,97 <i>d</i> , (8,1)	100,4	1,2',5'
2'	4,89 <i>d</i> , (8,1; 9,5)	74,2	1'
3'	3,41 <i>m</i>	77,8	1',4'
4'	3,33 <i>m</i>	70,5	5',6'
5'	3,27 <i>m</i>	73,9	1'
6'a	3,74 <i>m</i>	61,2	4'
6'b	3,54 <i>m</i>	-	-
1''	-	121,4	3'',4''
2''	7,01 1H, <i>d</i> , (2,1)	122,1	-
3''	-	145,20	-
4''	-	148,2	-
5''	6,79 1H, <i>d</i> , (8,1)	114,7	-
6''	7,09 1H, <i>d</i> , (8,1; 2,1)	115,1	1'',3'',4''
7''	7,53 1H, <i>d</i> , (16,0)	145,7	1'', 8''
8''	6,31 1H, <i>d</i> , (16,0)	114,6	1'', 7'', 9''
9''	-	165,9	-

^a: Experimento realizado de RMN de ^1H , HSQC e HMBC (600 MHz, DMSO-d_6), utilizando TMS como referência interna. As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC.

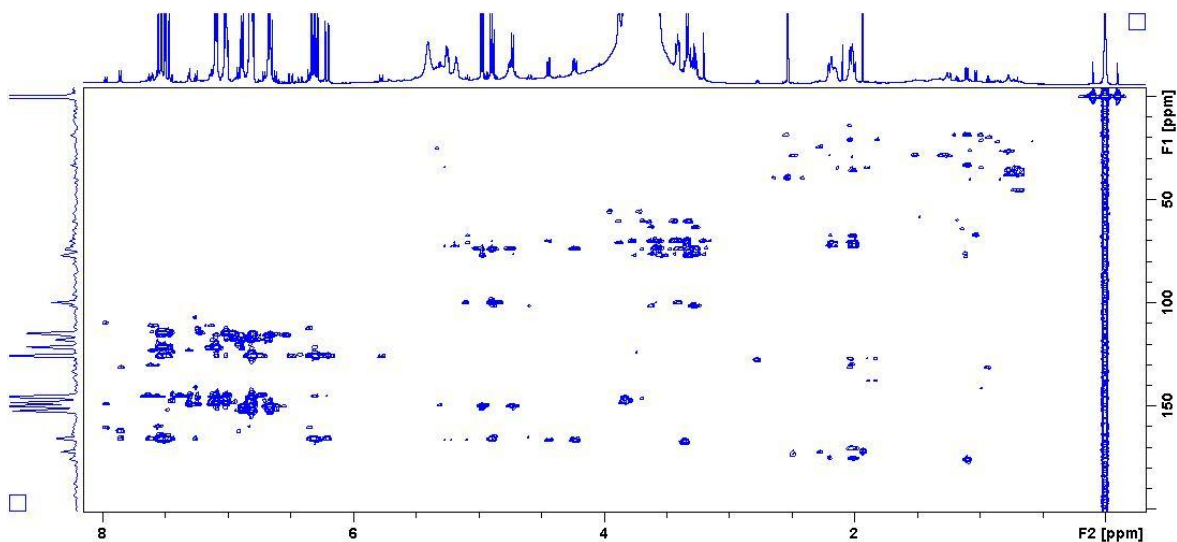
E23: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) DA SUBSTÂNCIA **Bb-8**, EM MISTURA.



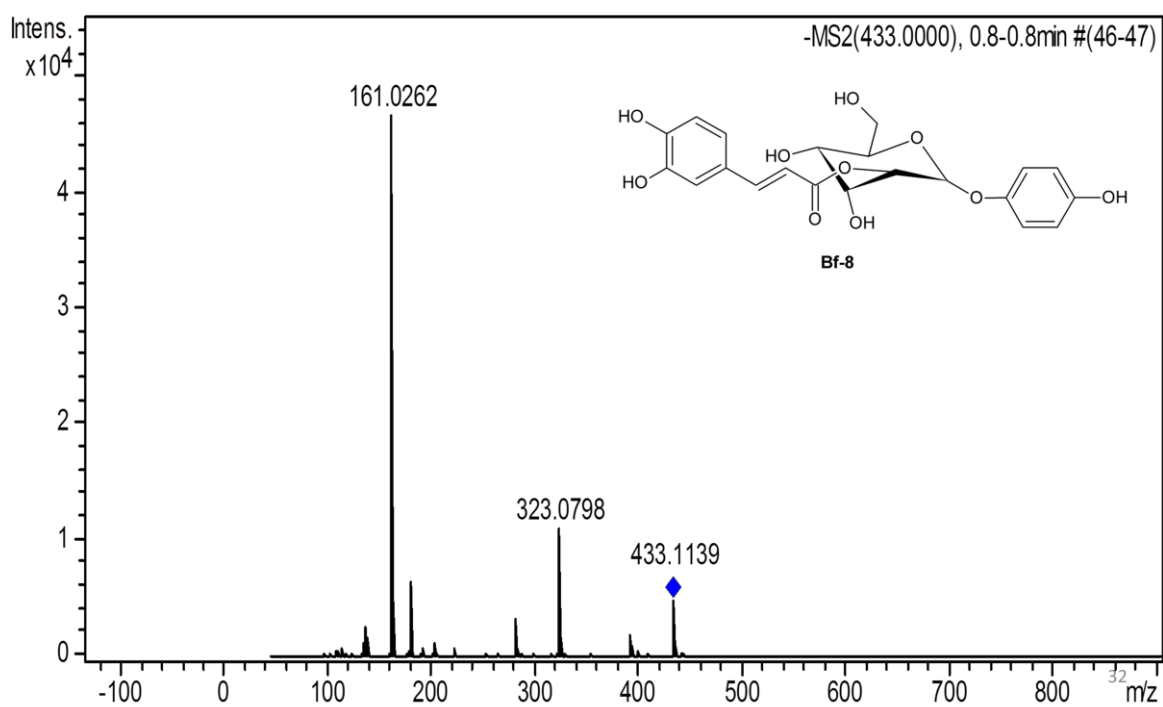
E24: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) DA SUBSTÂNCIA **Bb-8**, AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE AROMÁTICO (8,0-6,2 ppm).



E25: MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, DMSO-d_6) DA SUBSTÂNCIA **Bb-8**, EM MISTURA.



E26: MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, DMSO- d_6) DAS SUBSTÂNCIAS **Bb-8**, EM MISTURA.



E27: EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 433 (CE 18 V, EM METANOL COM 1% DE FORMIATO DE AMÔNIO) DE **Bb-8**.

5.3.8 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE **Bb-9**

A fração **Bb-Aq** (ESQUEMA 6) forneceu o composto **Bb-9** que foi identificado com aspecto de pó branco amorfo. A análise do seu espectro de RMN de ^1H (E28, E29 e E30) revelou a presença de uma β -glicose ligada entre um ácido fenólico e uma cumarina.

A presença dos sinais em δ 5,29 (*d*, $J=8,1$ Hz) e δ 4,95 (*dd*, $J=8,1; 9,6$ Hz), juntamente com os sinais de hidrogênio carbinólicos entre δ 3,76 – 3,30 forneceu a ideia de uma glicose com seus hidrogênios na configuração espacial na posição axial com um acoplamento em 8,1 Hz, caracterizando assim uma β -glicose.

Através da observação da correlação do sinal δ 5,29 a três ligações com o C-7 (δ 149,6) foi possível confirmar a junção da unidade de β -glicose com a cumarina. Os sinais característicos da dupla ligação endocíclica em δ 7,93 (*d*, $J=9,5$ Hz) e 6,34 (*d*, $J=9,5$ Hz), relacionados aos átomos de hidrogênios ligados respectivamente aos carbonos C-4 e C-3, além dos sinais em δ 7,24 e 7,25, ambos simpletos, relacionados aos hidrogênios ligados aos carbonos C-8 e C-5 respectivamente, e a presença de um sinal em 3,67 (s) referente ao grupo metoxila ligado no C-6, caracterizam a estrutura da cumarina.

Ainda foi observado que o sinal com δ 4,95 da β -glicose se correlaciona com o C-9'' (δ 165,6) referente à carbonila da porção fenilpropanoídica com hidrogênios olefínicos em configuração *trans*. Foi observado os sinais em δ 7,49 (*d*, $J=15,8$ Hz) e 6,25 (*d*, $J=15,8$ Hz), diretamente ligados aos C-7'' e C-8'', ainda os sinais de hidrogênios característicos de anel benzênico 3,4-dissubstituído em δ 7,03 (*d*, $J=2,0$ Hz), δ 7,00 (*dd*, $J=2,0$ e 8,3 Hz) e δ 6,75 (*d*, $J=8,3$ Hz) ligados em C-2'', C-5'' e C-6''.

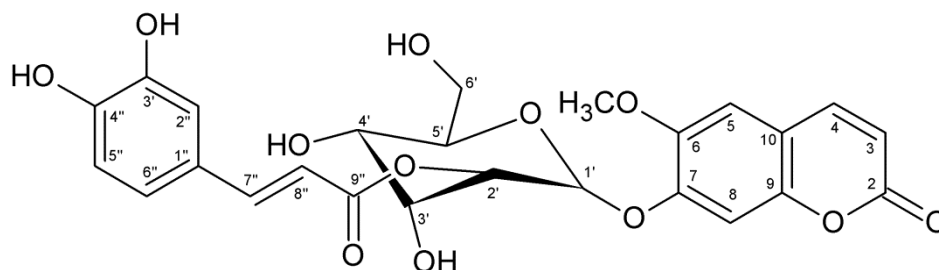
As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de mapas de correlação de HSQC e HMBC (E31; E32). A TABELA 10 mostra os deslocamentos de RMN de ^1H , ^{13}C e correlações de HMBC.

A estrutura foi confirmada com base nos dados de espectros de massas de HR-MS Q-TOF, no modo negativo (E33), o qual apresentou o íon molecular de m/z 515,1217 [M-H] $^-$ confirmando a fórmula molecular de $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$. O experimento de

MS² apresentou o íon do pico base de m/z 191,0372, indicativo da perda neutra de 324,9845 Da, referente ao ácido fenólico ligado ao glicosídeo.

Está é a primeira vez que este composto está sendo descrito na literatura. O composto **Bb-7** foi definido como 6-metoxi-cumarina,2''-O-*trans*-cafeoil-β-D-glucopiranosídeo.

Uma substância semelhante denominada de iwayomin isolada por Ding *et al.*, (2010), de *Artemisia iwayomogi* foi utilizada para comparação. A diferença se encontra na ligação β-glicosídica em posições diferentes. Este composto mostrou um alto potencial para estimular a formação osteoblástica podendo ser útil para a prevenção e/ou tratamento de osteoporose (DING *et al.*, 2010).

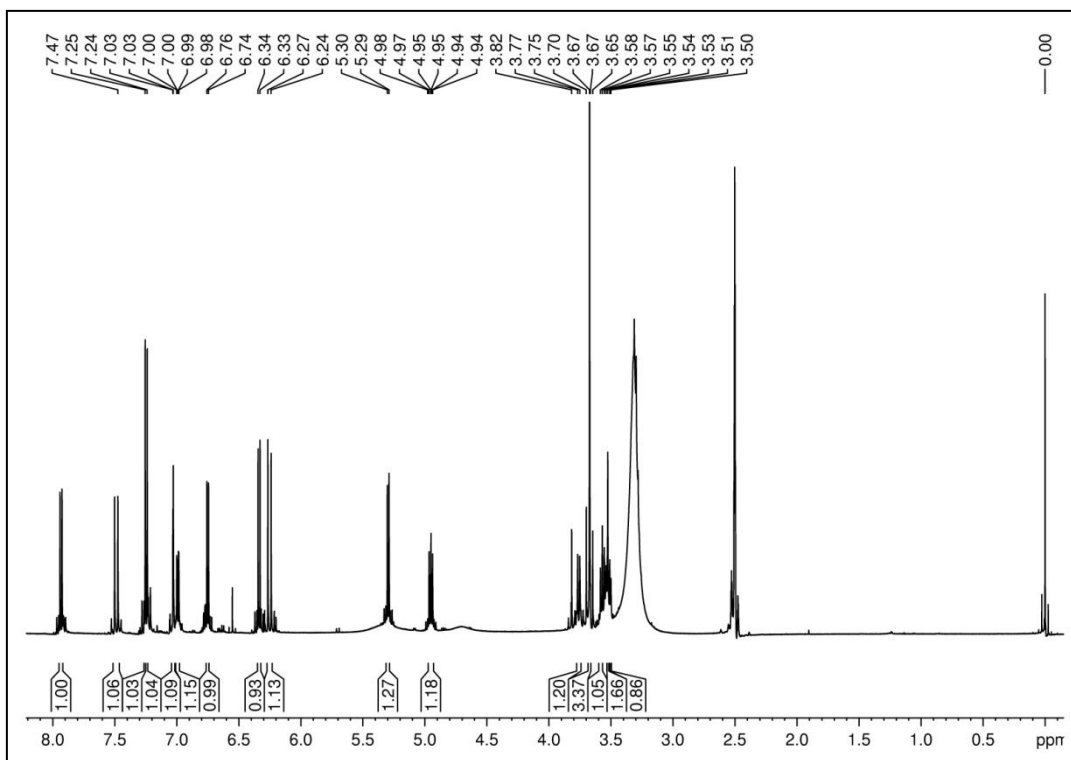


6-metoxi-cumarina,2''-O-*trans*-cafeoil-β-D-glucopiranosídeo (**Bb-9**)

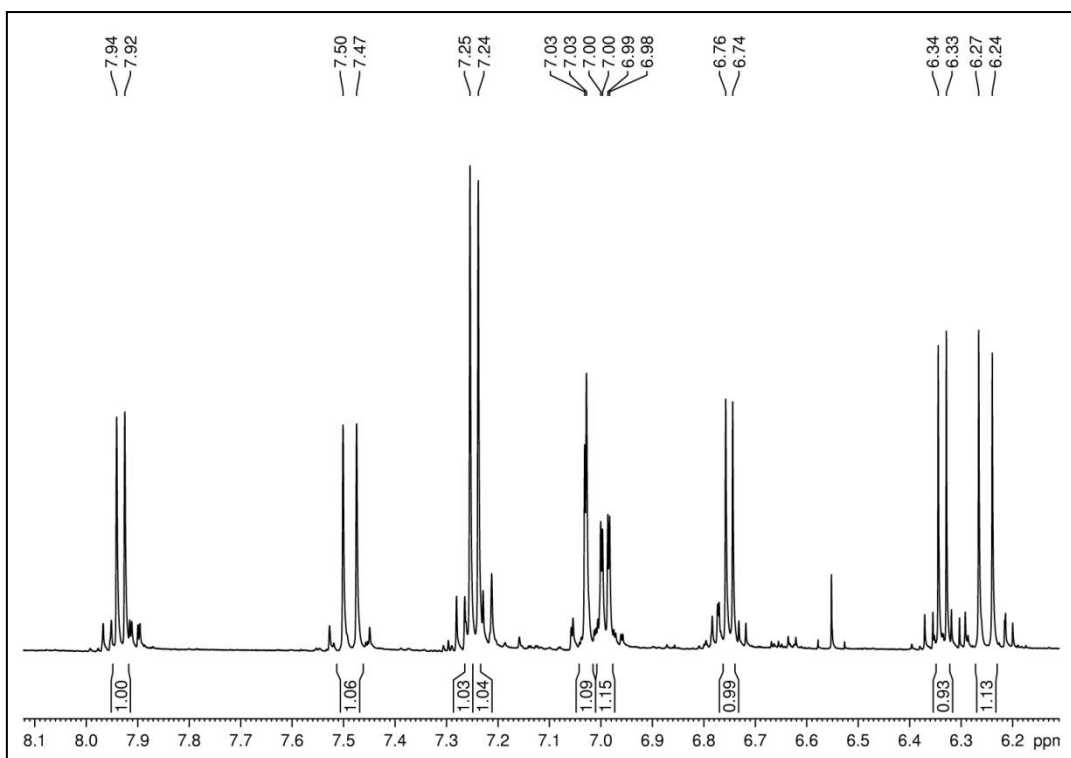
TABELA 9: DADOS DE RMN DE ^1H , ^{13}C , HMBC PARA **Bb-9**.

Posição	Bb-9		HMBC
	δ^{H} (multipli.; J em Hz)	δ^{C} (^{13}C)	
1	-	-	-
2	-	163,8	-
3	6,34 1H, <i>d</i> , (9,5)	113,7	2, 10
4	7,93 1H, <i>d</i> , (9,5)	144,0	2, 5, 9
5	7,25 1H, (<i>s</i>)	110,6	4, 7, 9
6	-	146,5	-
7	-	149,6	-
8	7,24 1H, (<i>s</i>)	104,5	6, 7, 10
9	-	148,7	-
10	-	113,2	-
OCH ₃	3,67 3H, (<i>s</i>)	56,3	6
1'	5,29 1H, <i>d</i> , (8,1)	98,8	7, 3', 5'
2'	4,95 1H, <i>dd</i> , (9,6; 8,1)	73,0	1', 3', 1''
3'	3,57 1H, <i>dd</i> , (9,6; 9,2)	73,8	2', 4'
4'	3,30 1H, <i>dd</i> , (9,6; 9,2)	69,8	3', 5' 6'
5'	3,53 1H, (<i>m</i>)	77,3	1'
6'	3,76 1H, (<i>m</i>)	60,5	5'
	3,52 1H, (<i>m</i>)	60,5	-
1''	-	125,5	-
2''	7,03 (1H, <i>d</i> , 2,0)	114,8	5'', 7''
3''	-	145,8	-
4''	-	148,4	-
5''	6,75 1H, <i>d</i> , (8,3)	115,7	4'', 7'', 8''
6''	7,00 1H, <i>dd</i> , (8,3; 2,0)	121,1	7'', 8'', 9''
7''	7,49 1H, <i>d</i> , (15,8)	145,0	2'', 5''
8''	6,25 1H, <i>d</i> , (15,8)	114,0	1'', 4''
9''	-	165,6	-

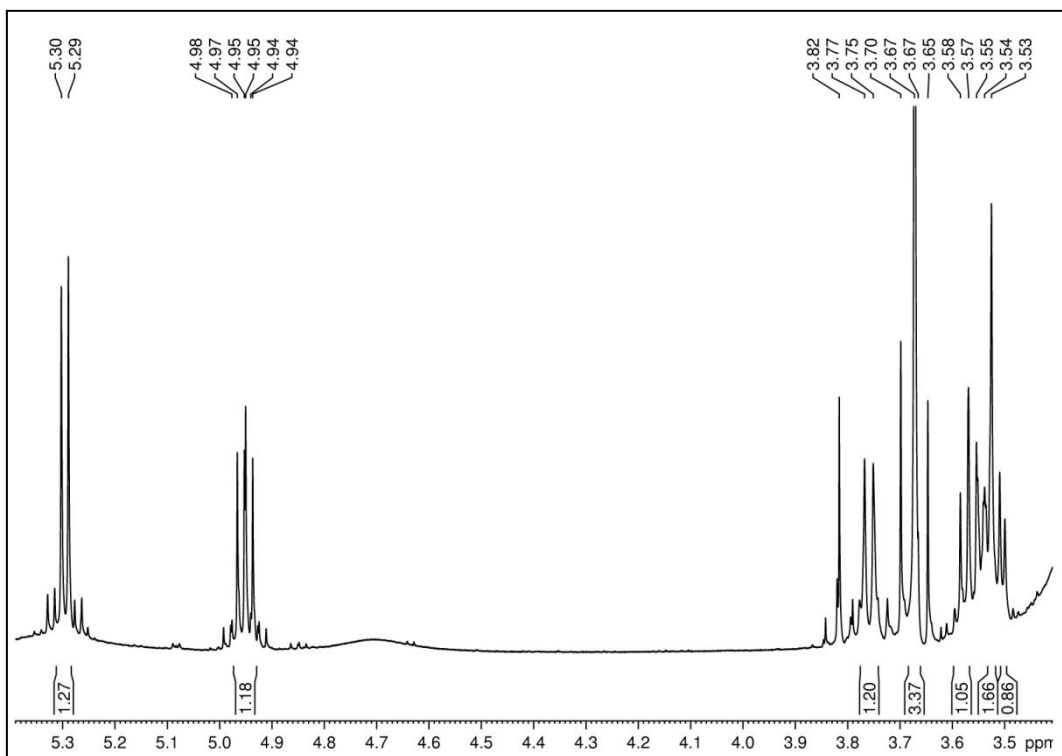
^a: Experimento realizado de RMN de ^1H , HSQC e HMBC (600 MHz, DMSO- d_6), utilizando TMS como referência interna. As atribuições de δ^{C} foram obtidas através da análise de espectros de HSQC e HMBC.



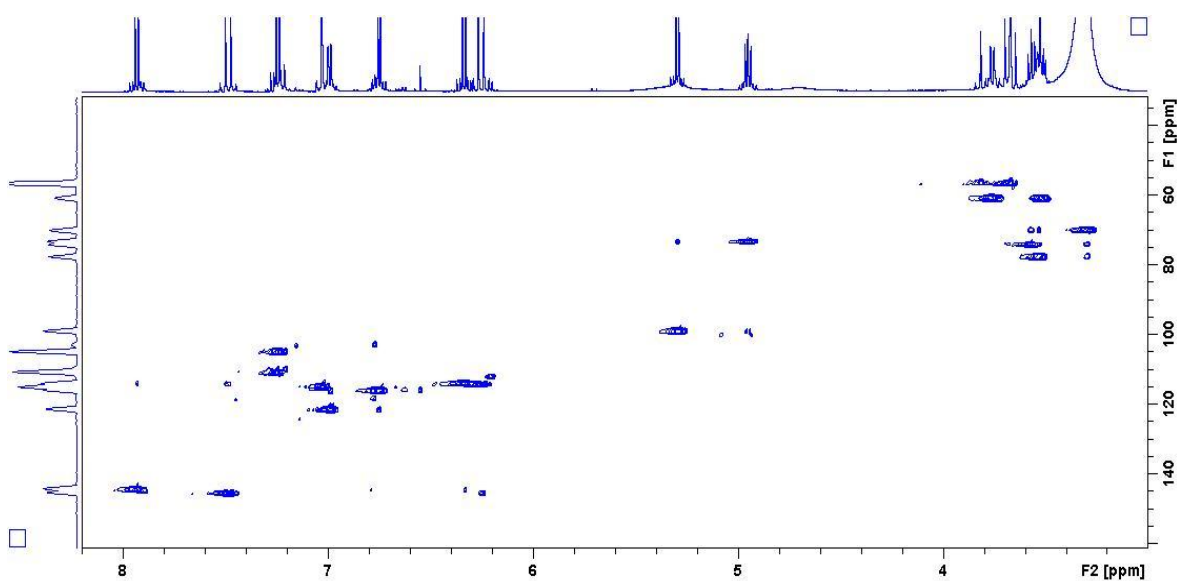
E28: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) DA SUBSTÂNCIA **Bb-9**.



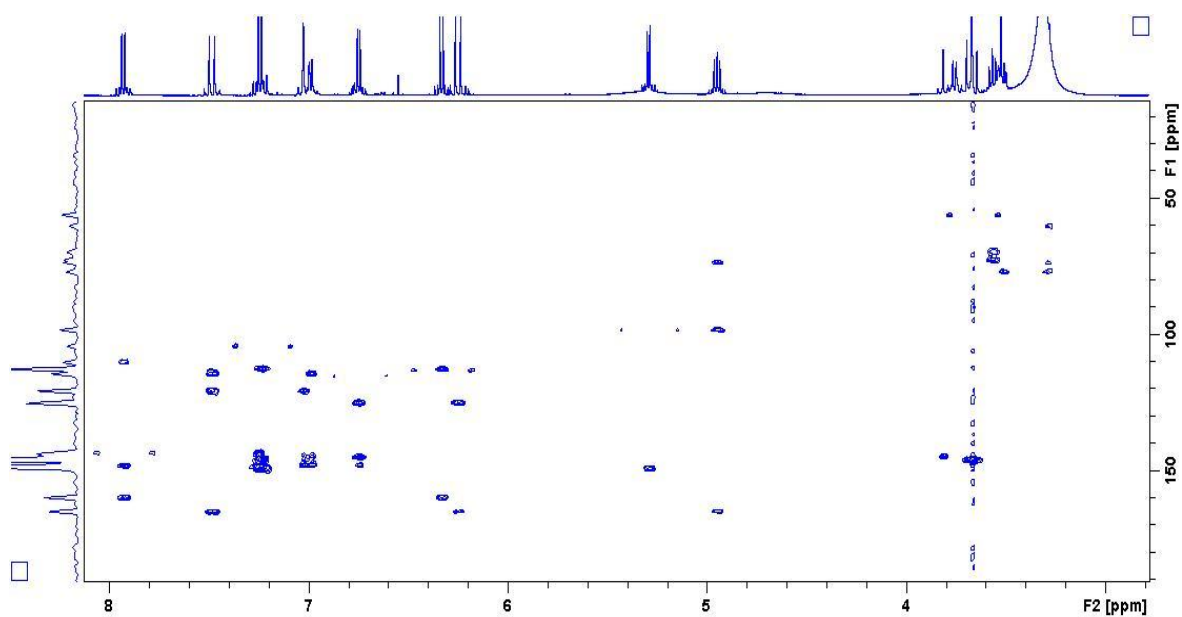
E29: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) DA SUBSTÂNCIA **Bb-9**, AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE 8,0-6,1 ppm.



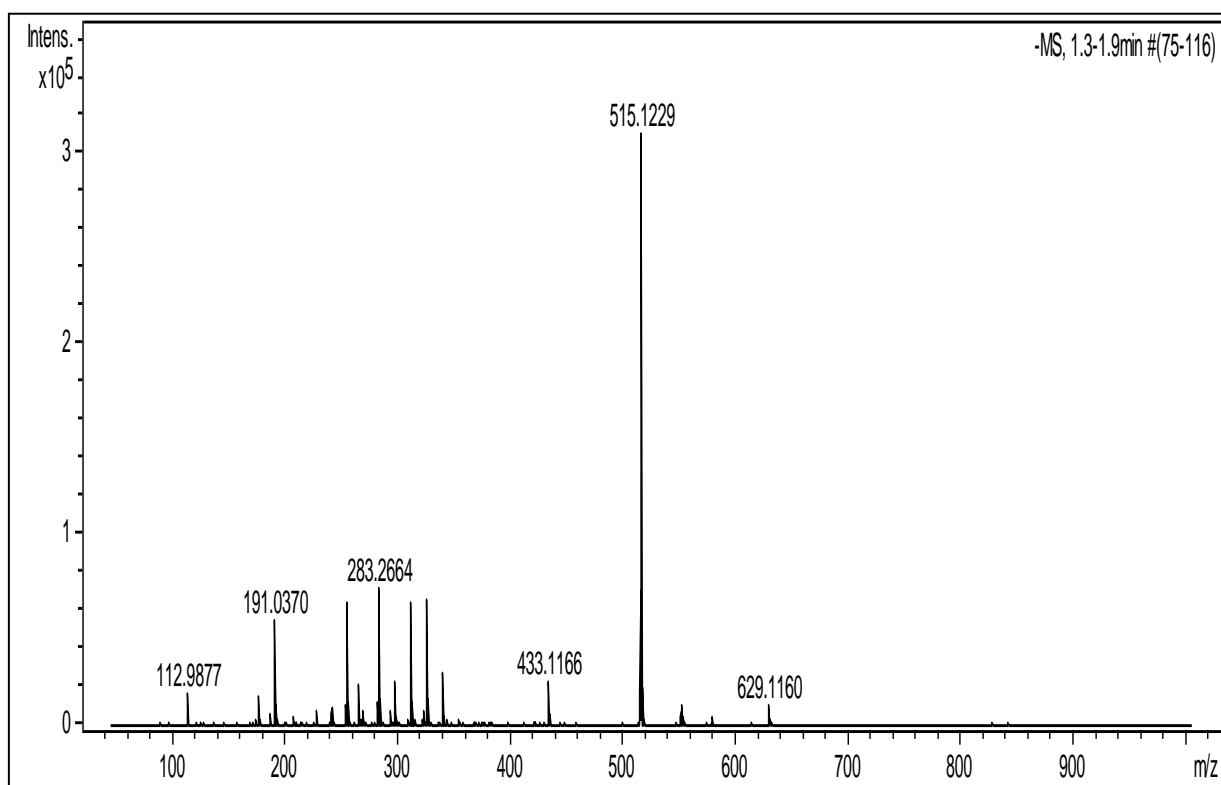
E30: ESPECTRO DE RMN DE ^1H (600 MHz, DMSO-d_6) DA SUBSTÂNCIA **Bb-9**, AMPLIAÇÃO DA REGIÃO DE 5,4-3,4 ppm.



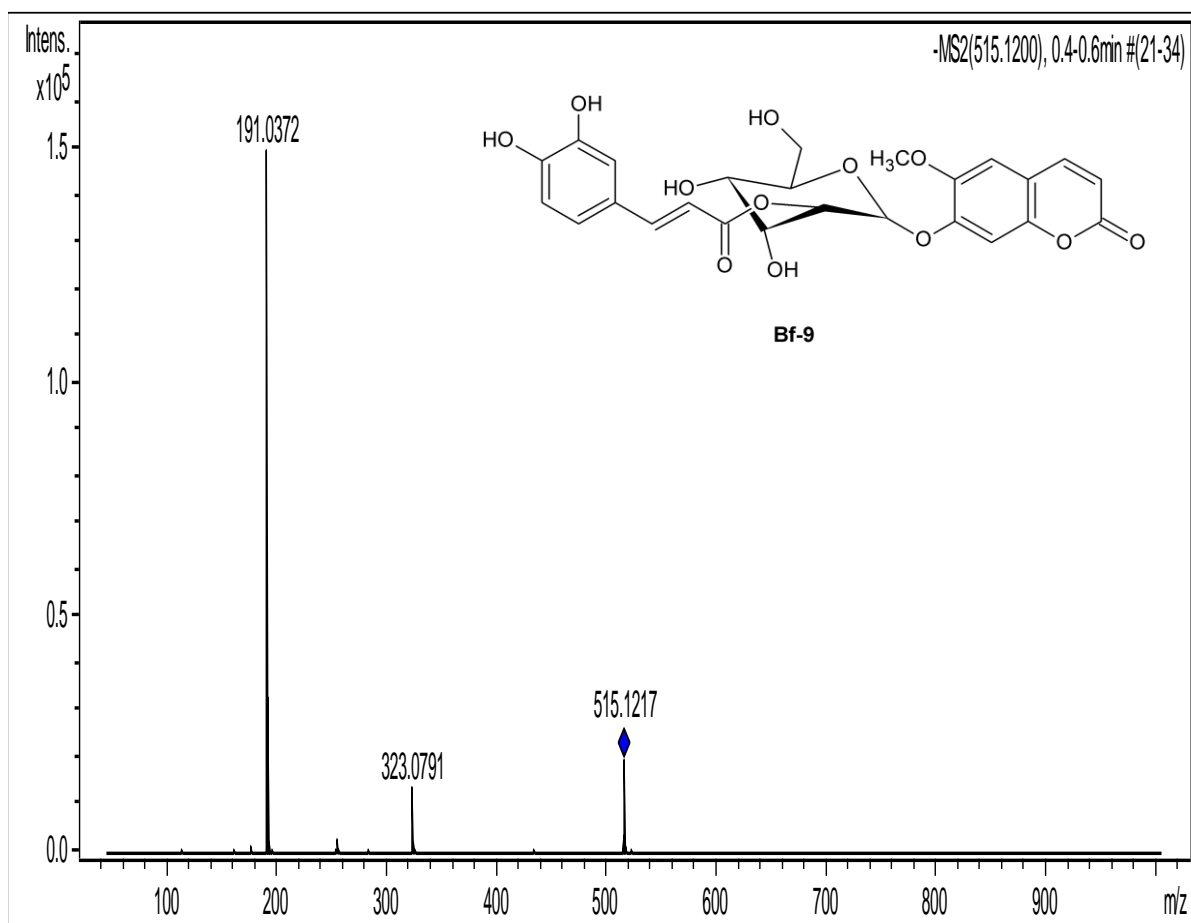
E31: MAPA DE CORRELAÇÃO DE HSQC (600 MHz, DMSO-d_6) DA SUBSTÂNCIA **Bb-9**.



E32: MAPA DE CORRELAÇÃO DE HMBC (600 MHz, DMSO-d₆) DAS SUBSTÂNCIAS **Bb-9**.



E33: EXPERIMENTO DE VARREDURA DE **Bb-7** (METANOI).



E34: EXPERIMENTO DE MASSAS (MS^2) DO ÍON MOLECULAR DE m/z 515 (CE 18 V, METANOL) DE **Bb-9**.

5.4 ANÁLISE ÓLEO ESSENCIAL

O rendimento da extração do óleo essencial de *B. burchellii* foi de 0,69% para **BbO-M** e **BbO-F** com aspecto de óleo amarelo claro.

A caracterização dos óleos essenciais foi baseada pela comparação do espectro de massas da substância (EM) e do índice de retenção (I.R.) com dados reportados na literatura (ADAMS, 2007) e também pela NIST (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia) que é um sistema de banco de dados de espectros de massas. Os Cromatogramas de **BbO-M** e **BbO-F** com seus respectivos picos estão demonstrados na FIGURA 3.

Foi possível identificar 28 compostos no **BbO-F** e 26 compostos no **BbO-M** (TABELA 11). Todos os constituintes são sesquiterpenos e 42% são oxigenados para ambas as espécimes. Os componentes majoritários do óleo essencial de *B. burchelli* (fêmea/macho) foram: (E)-cariofileno (11,85/6,94%), γ -gurjuneno (10,75/7,33%), biciclogermacreno (17,83/20,74%), italiceno éter (7,21/2,02%), thujopsan-2- α -ol (6,35/9,14%), acorenol (0,16/7,93), cubenol (8,22/0,61%), β -eudesmol (0,35/12,27%) e α -cadinol (9,26/0,57). O composto selineno foi encontrado apenas no espécime masculino com 5,55%, enquanto que o α -humuleno com 4,65% somente no espécime feminino.

Em uma comparação entre os espécimes feminino e masculino, o composto biciclogermacreno foi majoritário em ambos. Porém ficou evidente a diferença entre as outras substâncias.

Os compostos voláteis emitidos pelas flores são um sinal químico para atrair polinizadores e repelir predadores. A composição e variação química observadas no óleo das flores *B. burchelli* deve estar relacionada à sua estratégia reprodutiva. Considerando que os polinizadores podem variar durante os meses de floração, a variabilidade química observada pode ser explicada como uma adaptação da planta para atração de diferentes insetos (STEFANELLO *et al.*, 2006).

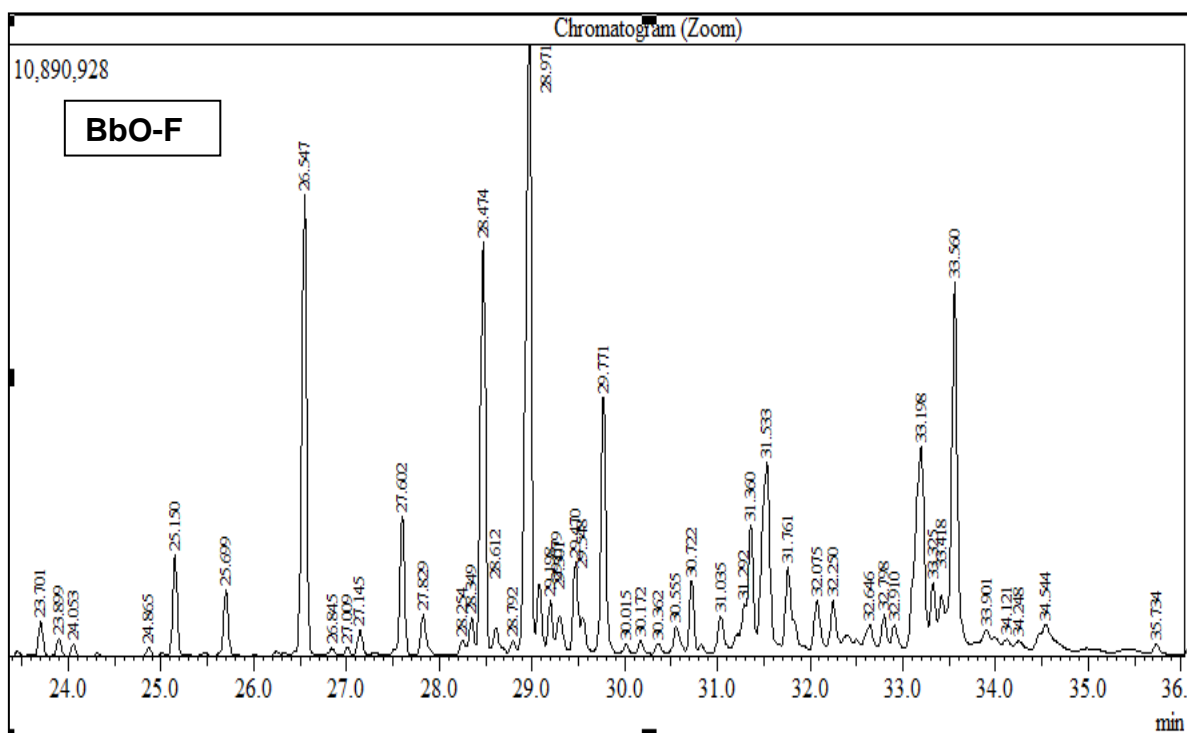
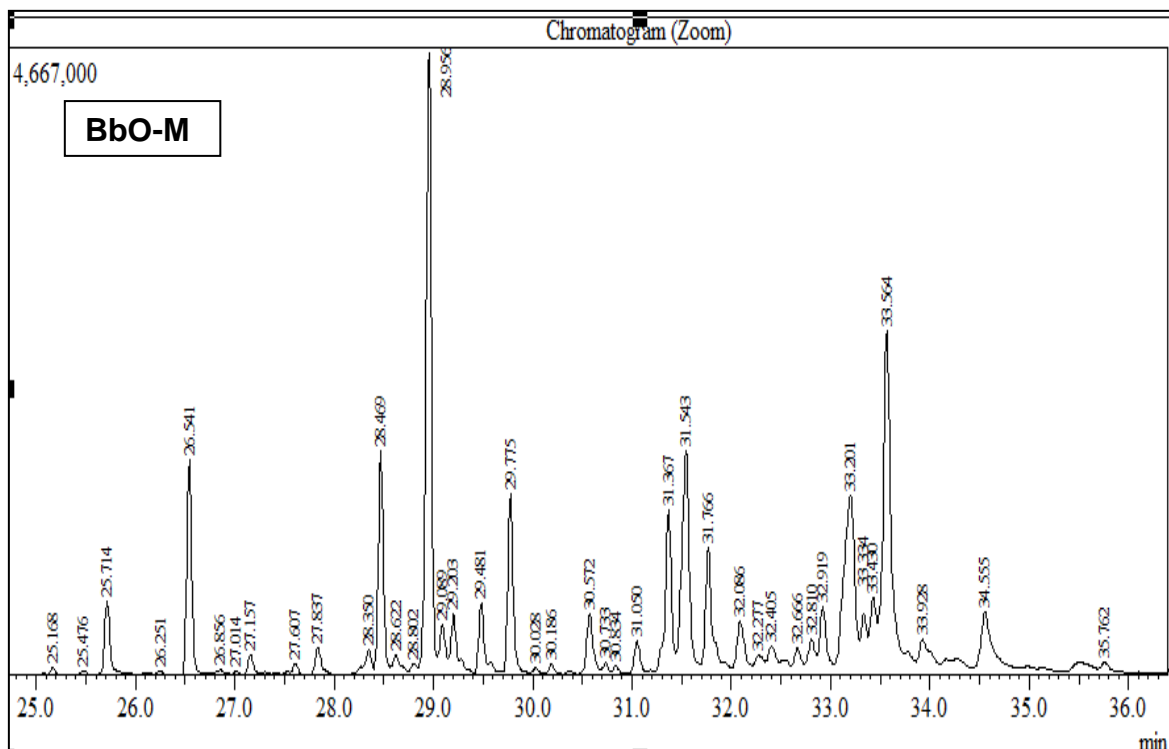


FIGURA 3: CROMATOGRAMAS DE **BbO-M** E **BbO-F**.

TABELA 10: CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAS DE BbO-F E BbO-M.

Composto	T. R. ^a	T.R. ^a	I.R. ^b	I.R. ^c	Área (%)	Área (%)
	BBOF	BBOM			BbO-F	BbO-M
1 Silpiperfol-5-ene	23,701	-	1325	1328	0,72	n.d.
2 α -longipineno	24,865	-	1361	1352	0,23	n.d.
3 α -isoleveno	25,150	25,168	1370	1375	2,31	0,21
4 β -panasinseno	25,699	25,714	1387	1382	1,47	2,35
5 (E)-cariofileno	26,547	26,541	1414	1417	11,85	6,94
6 β -copaeno	27,009	27,014	1429	1432	0,15	0,08
7 Aromadendreno	27,145	27,157	1434	1441	0,57	0,64
8 α -Humuleno	27,602	-	1449	1454	4,65	n.d.
9 γ-gurjuneno	28,474	28,469	1477	1477	10,75	7,33
10 γ -Himachaleno	28,612	28,622	1482	1482	0,44	0,28
11 Biciclogermacreno	28,971	28,956	1494	1493	17,83	20,74
12 Viridifloreo	29,079	29,089	1497	1496	1,15	0,82
13 β-bisaboleno	29,470	29,481	1510	1516	7,26	2,02
14 Selineno	-	29,481	1521	1522	n.d.	5,55
15 (E) bisaboleno	30,015	30,028	1529	1529	0,22	0,14
16 Elemol	30,555	30,572	1548	1549	0,79	2,29
17 B-germacreno	30,722	30,733	1554	1557	1,54	0,18
18 Epatulenol	31,360	31,367	1576	1577	1,97	4,27
19 Tujopsan-2-α-ol	31,533	31,543	1581	1587	6,35	9,14
20 Ledol	31,761	31,766	1590	1590	1,29	2,91
21 Eudesmol	32,075	32,086	1600	1607	1,36	1,74
22 Humulene epoxido	32,250	32,277	1607	1608	0,85	0,33
23 Eremoligenol	32,798	32,919	1627	1631	0,67	1,72
24 Acorenol	32,910	33,201	1631	1633	0,16	7,93
25 Cubenol	33,198	33,334	1641	1646	8,22	0,61
26 α -muurolol	33,325	33,430	1646	1646	0,78	0,85
27 β-eudesmol	33,418	33,564	1649	1650	0,35	12,27
28 α-cadinol	33,560	33,928	1654	1654	9,26	0,57
29 Farnesol	34,544	34,555	1690	1698	0,36	1,63
Compostos Identificados					93,43	93,54

^a: T.R.:Tempo de retenção; ^b:I.R. Índice de retenção experimental; ^c:I.R. Índice de retenção da literatura Adams, (2007); n.d.: não detectado.

Poucos são os estudos que caracterizam os óleos essenciais de espécimes masculinos e femininos de *Baccharis* separadamente. Porém, alguns estudos têm mostrado diferenças na composição de óleos entre macho e fêmea. Ferracini *et al.*, (1995) analisou diferentes óleos essenciais de espécies de *Baccharis*, na qual observou diferenças na composição de óleos de espécies masculinas e feminina. Em *B. dracunculifolia* (fêmea-macho): (E)-nerolidol (20.80%-12.02%) e em *B. erioclada* (fêmea-macho): β -pineno (21.44%-1.16%), limoneno (15.16%-2.68%), cariofileno (4.21%-10.70%) e espatulenol (6.61%-12.57%). Outros estudos semelhantes foram realizados com espécies de *B. articulata*, *B. semiserrata*, *B. caprariaefolia*, *B. coridifolia* e *B. pentaptera* (ZUNINO *et al.*, 2004; LAGO *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2008; BESTEN *et al.*, 2012). Isto sugere que os estudos de plantas

diólicas requerem mais atenção, onde os fatores genéticos e ecológicos são os principais responsáveis pela variação química.

A maioria dos compostos majoritários identificados nesta espécie já foi relatado, anteriormente, em outras espécies do gênero *Baccharis* e apresentam promissoras atividades biológicas como antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, antifúngica e inseticida (AGOSTINI, *et al.*, 2005; MASSIGNANI *et al.*, 2009; ASCARI *et al.*, 2012; FLORAO *et al.*, 2012). Dentre os compostos majoritários identificados, o biciclogermacreno apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (SANTOS *et al.*, 2013).

5.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.5.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As atividades antioxidantes do extrato bruto, frações, substâncias isoladas e óleos essenciais foram determinadas pelos métodos de sequestro de radicais livres por DPPH e por ORAC_{FL}. A TABELA 12 lista os resultados obtidos nos ensaios antioxidantes das amostras.

Pelo método ORAC_{FL}, foram testadas as amostras, **Bb-F** (extrato bruto feminino), **Bb-H** (fração hexânica), **Bb-D** (fração diclorometano), **Bb-A** (fração acetato de etila), **Bb-Aq** (fração aquosa), **Bb-1** (escopoletina), **Bb-9** (6-metoxi-cumarina,2'-*O-trans*-cafeoil- β -D-glicopiranosideo), **BbO-F** (óleos feminino), **BbO-M** (óleo masculino) e as misturas de **Bb-1+Bb-2** (escopoletina e cafeato de etila) e **Bb-1+Bb-2+Bb-3** (escopoletina, cafeato de etila e narigenina), de *B. burchelli*.

Os resultados obtidos variam de 8148,2 a 576,71 μ mol Trolox equivalentes/g de massa seca dos extratos, frações e substâncias isoladas. A fração da mistura das substâncias **Bb-1**, **Bb-2** e **Bb-3** apresentou o melhor efeito antioxidante, com resultado de 8148,2 Trolox μ mol equivalentes/g de massa seca. Dentre as amostras

testadas, os óleos essenciais e a fração hexânica apresentaram menor poder antioxidante.

Já pelo método de DPPH a concentração que inibiu 50% do radical (IC_{50}) foi de 23,23 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto (**Bb-F**) e 4,24 $\mu\text{g/mL}$ para mistura das substâncias **Bb-1**, **Bb-2** e **Bb-3**. Portanto esta fração em mistura, foi a mais promissora testada nos dois ensaios antioxidantes.

TABELA 11: CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DETERMINADA PELOS ENSAIOS DPPH e $ORAC_{FL}$ DO EXTRATO BRUTO, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS DE *B. burchelli*.

Padrão/Amostra	$ORAC_{FL}$ ($\mu\text{mol TE/g}$)	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Bb-F	6861,0 \pm 0,79	23,23 \pm 1,79
Bb-H	745,92 \pm 2,90	-
Bb-D	7336,2 \pm 0,69	-
Bb-A	7538,0 \pm 0,52	6,92 \pm 1,93
Bb-Aq	6745,4 \pm 0,37	35,87 \pm 3,02
Bb-1	7473,4 \pm 1,08	-
Bb-1+Bb-2	8083 \pm 0,46	-
Bb-1+Bb-2+Bb-3	8148,2 \pm 0,49	4,24 \pm 1,99
Bb-9	6745,0 \pm 0,37	-
BbO-F	626,05 \pm 1,88	-
BbO-M	576,71 \pm 2,38	-
Quercetina*	-	13,1 \pm 1,8
Trolox *	-	2,2 \pm 1,2

-: não avaliado; *:Controles positivos

IC_{50} : concentração que inibe 50% do radical DPPH em micrograma por mililitro ($\mu\text{g/mL}$).

$\mu\text{mol TE/g}$: micromol de Trolox equivalentes por grama de extrato ou fração em base seca.

Os resultados são expressos como média seguido da % coeficiente de variação (CV) dos ensaios em triplicata.

Os compostos fenólicos estão atraindo cada vez mais atenção por causa de suas atividades antioxidantes e o gênero *Baccharis* se destaca pela grande produção desses compostos. A ação sobre a presença desta atividade tem sido profundamente avaliada por vários autores com ensaio *in vitro*, tais como DPPH (ZIELINSKI *et al.*, 2014; ARGOTI *et al.*, 2013; SARTOR *et al.*, 2013; FABRI *et al.*, 2011; MORAIS *et al.*, 2009; DE TOLEDO-DIAS, *et al.*, 2009; SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005; AKAIKE *et al.*, 2003), reação enzima xantina oxidase (BORGIO *et al.*, 2010), TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2004), TRAP (Total radical trapping Power) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2004) and FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) (ZIELINSKI *et al.*, 2014). Além disso, em experimentos *in vivo* com modelos animais, o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* mostrou uma redução na liberação de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos (PADUA *et al.* 2010).

Em contrapartida, são poucos os estudos sobre a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Baccharis*. Somente os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e *B. uncinella* mostraram inibição na formação de espécies reativas de oxigênio (FERRONATO *et al.*, 2006).

5.5.2 CITOTOXICIDADE EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

Foi testada a atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais de algumas amostras de *B. burchelli*. As seguintes linhagens celulares utilizadas foram: B16-F10 (melanoma murino), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), K562 (leucemia mielocítica crônica humana), HL-60 (leucemia promielocítica humana) e PBMC (*peripheral blood mononuclear cell* ativados com ConA – células não tumorais). A TABELA 13 apresenta os dados de IC₅₀ obtidos dos extratos, frações, substâncias e controle doxorrubicina em cultura de células tumorais humanas *versus* células não tumorais.

Segunda a literatura, extratos que apresentam valores de IC₅₀ < 30 µg/mL e compostos isolados com valores de IC₅₀ < 4 µg/mL são considerados promissores (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990; BOIK, 2001).

Deste modo, dentre as amostras testadas, as frações **Bb-A** (fração acetato de etila), **Bb-D** (fração diclorometano) e a **BbO-M** (óleo essencial masculino), apresentaram atividade citotóxica significativa, enquanto que a mistura de **Bb-1+Bb-2+Bb-3** (escopoletina, cafeato de etila e narigenina) apresentaram o melhor resultado citotóxico, principalmente sobre a linhagem celular HL-60 (leucemia promielocítica humana) com IC₅₀ de 6,06 µg/mL.

TABELA 12: VALORES DE IC₅₀ PARA A ATIVIDADE CITOTÓXICA EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS *VERSUS* CÉLULAS NÃO TUMORAIS.

Compostos	IC ₅₀ (µg/mL)				
	PBMC	HepG2	K562	HL-60	B16-F10
Bb-F	>50	>50	>50	>50	>50
Bb-H	>50	>50	>50	>50	>50
Bb-D	>50	>50	>50	16,29	45,47
Bb-A	>50	>50	>50	11,93 – 22,22	37,10 – 55,73
Bb-Aq	>50	>50	>50	35,18	>50
BbO-F	>50	>50	>50	20,72 – 59,76	>50
BbO-M	>50	43,99	40,56	42,92	49,25
		38,64 – 50,08	37,36 – 44,03	37,42 – 49,22	37,50 – 64,68
Bb-1	>25	>25	>25	29,04 – 38,72	29,84 – 39,65
Bb-1+Bb-2	>25	>25	>25	>25	>25
Bb-1+Bb-2+Bb-3	8,94	14,49	14,09	6,06	11,93
	5,20 – 12,34	11,01 – 19,07	12,20 – 16,27	4,94 – 7,43	9,41 – 15,14
Bb-7	>25	>25	>25	>25	>25
Doxorrubicina*	0,40	0,16	0,40	0,10	0,13
	0,32 – 0,49	0,13 – 0,21	0,34 – 0,46	0,09 – 0,11	0,11 – 0,16

IC₅₀ (concentração inibitória média) com intervalos de confiança de 95% obtidos a partir de três experimentos ;

*controle positivo.

Os quimioterápicos geralmente não são seletivos para as células, isto é, atacam tanto células cancerosas quanto células normais, principalmente as que se dividem rapidamente, produzindo efeitos colaterais agressivos ou tóxicos. Assim, a busca de novas substâncias com atividade antiproliferativa, é muito importante, principalmente para obter compostos menos tóxicos para células saudáveis.

Os compostos fenólicos são responsáveis por propriedades quimiopreventivas como, efeitos antioxidantes, antimutagênico e anti-inflamatórios e também por contribuir na regulação do metabolismo carcinogênico e expressão oncogênica, inibindo adesão celular, migração, proliferação, diferenciação e bloqueio de vias de sinalização das células cancerígenas (HUANG; CAI; ZHANG, 2010).

Ésteres de ácido cafeico apresentam uma variedade de efeitos biológicos tais como antitumoral, antioxidante e atividades anti-inflamatórias (UWAI, et al., 2008). Já um estudo de modificação estrutural na escopoletina conseguiu aumentar significativamente sua atividade antitumoral (LIU, 2012).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comparação dos extratos **Bb-M** e **Bb-F** por RMN de ^1H revela uma similaridade muito grande *B. burchelli*. Apesar de estudos relatarem diferenças na composição química entre plantas dióicas, não foi observado diferenças consideráveis, utilizando a técnica de RMN.

O estudo químico de **Bb-F** possibilitou a identificação das seguintes substâncias: escopoletina (**Bb-1**), cafeato de etila (**Bb-2**), ácido *trans* ferúlico (**Bb-3**), narigenina (**Bb-4**), 7-hidroxi-benzaldeído (**Bb-5**), β -sitosterol (**Bb-6**), estigmasterol (**Bb-7**), *p*-hidroxifenil,2''-*O-trans*-cafeoil- β -D-glicopiranosideo (**Bb-8**) e 6-metoxi-cumarina,2''-*O-trans*-cafeoil- β -D-glicopiranosideo (**Bb-9**). Destas substâncias sete estão sendo relatadas pela primeira vez na seção *Caulopetare*, enquanto que **Bb-8** e **Bb-9** são produtos naturais inéditos. Ainda quando investigou-se este extrato bruto por ESI-EM foi possível identificar as substâncias **Bb-1**, **Bb-8** e **Bb-9**. Vale ressaltar que o uso das técnicas de RMN e EM para análise direta de extratos e frações possibilitou a identificação da maioria destas substâncias, mesmo em mistura complexas.

Do estudo dos óleos essenciais foi possível identificar 28 compostos no **BbO-F** e 26 compostos no **BbO-M** todos sesquiterpênicos. Os componentes majoritários em *B. burchelli* (fêmea/macho) foram: (E)-cariofileno (11,85/6,94%), γ -gurjuneno (10,75/7,33%), biciclogermagreno (17,83/20,74%), italiceno éter (7,21/2,02%), tujopsan-2- α -ol (6,35/9,14%), acorenol (0,16/7,93), cubenol (8,22/0,61%), β -eudesmol (0,35/12,27%) e α -cadinol (9,26/0,57). O composto selineno foi encontrado apenas no espécime masculino com 5,55%, enquanto que o α -humuleno com 4,65% somente no espécime feminino. Apesar do composto majoritário ser igual para ambas, ficou evidente a diferença entre as outras substâncias.

Realizou-se a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante e antiproliferativa de extratos, frações e substâncias isoladas, frente a linhagens de células tumorais. Dentre estas, a mistura composta de **Bb-1**, **Bb-2**, **Bb-3** foi a mais ativa antioxidante e citotóxica, principalmente sobre a linhagem celular HL-60 (leucemia promielocítica humana) com IC_{50} de 6,06 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, os resultados obtidos indicam que as atividades antioxidantes e antiproliferativa de *B. burchelli* podem estar relacionadas com a grande a diversidade de compostos fenólicos acumulados no vegetal.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que a espécie estudada *B. burchellii* é típica do gênero *Baccharis*, uma vez que seus principais constituintes

químicos são encontrados em outras espécies deste gênero, como compostos fenólicos. Os resultados também confirmam o grande potencial dessa espécie, uma vez que foram identificados compostos novos, na qual necessitam de maiores investigações biológicas.

6 REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): A review update. **Arkivoc**, n. 7, p. 76-96, 2007.
- ABOY, A. *et al.* Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1219, p. 147-153, 2012.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4^{ed.} Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007, p. 804.
- AGOSTINI, F. *et al.* Studies on the essential oils from several *Baccharis* (Asteraceae) from Southern Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 3, p. 215-219, 2005.
- AKAIKE, S. *et al.* A new ent-clerodane diterpene from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 51, n. 2, p. 197-199, 2003.
- AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v.170, p.211 - 224, 1994.
- ARGOTI, J.C. *et al.* On-Line Activity Screening for Radical Scavengers from *Baccharis chilco*. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, p.190-196, 2013.
- ARAÚJO, A. P. A.; CARNEIRO, M. A. A.; FERNANDES, G. W. Efeitos do sexo, do vigor e do tamanho da planta hospedeira sobre a distribuição de insetos indutores de galhas em *Baccharis pseudomyriocephala* Teodoro (Asteraceae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, n. 4, p. 483-490, 2003.
- ASCARI, J. *et al.* Sedative effects of essential oils obtained from *Baccharis uncinella*. **Pharm. Biol.**, v. 50, n. 1, p. 113-119, 2012.
- BARREIRO, J. E.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARISON, A.; BIAVATTI, M. W. Aplicação de técnicas bidimensionais de RMN na investigação de produtos naturais. In: SOUZA, G. H. B.; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. (Org.). **Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais**. Ouro Preto: UFOP, 2012, p. 255-288.
- BARROSO, G. M. Subtribo *Baccharidinae* Hoffman. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. *Separata da Revista "Rodriguésia"*, n.40, 1976.
- BAUER, L. *et al.*, Os óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* e *Baccharis genistelloides* Pers. do Rio Grande do Sul. **Revista do centro de Ciências da saúde**, v.6, p. 7-12, 1978.

BESTEN, M. A. *et al.* Chemical composition similarity between the essential oils isolated from male and female specimens of each five *Baccharis* species. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 6, p. 1041-1047, 2012.

BETONI, J. E. *et al.* Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 387-90, 2006.

BIONDO, T. M. A. *et al.* Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. **J. Ethnopharmacol.**, v. 136, n. 2, p. 368-373, 2011.

BOIK, J. **Natural compounds in cancer therapy**. Oregon Medical Press, Minnesota, USA, p. 25, 2001.

BORELLA, J. C. *et al.* Seasonal variability in the content of saponins from *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) and isolation of flavone. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, n. 4, p. 557-561, 2006

BORGO, F. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 20, v.1, p.12-17, 2010.

BRASIL, **Farmacopeia Brasileira** 5 ed., Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ed. Atheneu, São Paulo, SP., 2010.

BRASIL, **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS** (RENISUS). 2009 [acesso em 30 jul. 2014]. Disponíveis em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>.

BRASILEIRO, B. G. *et al.* Medicinal plants used by the population assisted by the "Programa de Saude da Familia" (Family Health Program) in Governador Valadares County - MG, Brazil. **Revista Brasileira De Ciencias Farmaceuticas**, v. 44, n. 4, p. 629-636, 2008.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química. Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BUDEL, J. M. *et al.* O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I-Estudos botânicos. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, p. 268-271, 2005.

BUFALO, M. C. *et al.* Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. **J. Appl. Microbiol.**, v. 107, n. 5, p. 1669-1680, 2009.

CARIDDI, L. *et al.* Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.155–161, 2013.

CENAL, J. P. *et al.* Neoclerodane diterpenes from *Baccharis crispa* or *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. **J. Nat. Prod.**, v. 60, n. 5, p. 490-492, 1997.

CECHINEL- FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, 1998.

CIFUENTE, D. A. *et al.* Clerodane diterpenes from *Baccharis sagittalis*: insect antifeedant activity. **Phytochemistry**, v. 61, n. 8, p. 899-905, 2002.

CIFUENTE, D. A. *et al.* Choloretic Activity of Five Species of *Baccharis* ("Carquejas") Used as Phytotherapies in Argentinean Traditional Medicine. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 6, p. 1053-1056, 2010.

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

CORDERO, C. P. *et al.* Cytotoxic activity of five compounds isolated from Colombian plants. **Fitoterapia**, v. 75, n. 2, p. 225-227, 2004.

COSTA, E. V. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Gutteriopsis blepharophylla*, *Gutteriopsis friesiana* e *Gutteriopsis hispida* (Annonaceae).** Curitiba, 330 p. Tese (Doutorado em Química) – Pós Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2009.

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

DAILY, A.; WAGNER, H; SELIGMANN, O. Hispidulin and stigmasta-7,22-dien-3-ol from *Baccharis genistelloides*. **Fitoterapia**, v. 55, n. 4, p. 236-238, 1984.

DE ALENCAR, S. *et al.* Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of Sao Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Cienc. Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.

DE MORAIS, S. M. *et al.* Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1, p. 315-320, 2009.

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

DE OLIVEIRA, C. B. *et al.* The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in SiHa cells: differences in their activity and mechanism of action. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 11022-11032, 2013.

- DE OLIVEIRA, S. Q. *et al.* Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: Isolation of a new compound with antioxidant activity. **Free Radical Res.**, v. 37, n. 5, p. 555-559, 2003.
- DE OLIVEIRA, S. Q. *et al.* Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p. 365-368, 2004.
- DE SILVA FILHO, A. A. *et al.* In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 56, n. 9, p. 1195-1199, 2004.
- DE SOUZA, S. P. *et al.* Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera*: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 21, n. 3, p. 450-455, 2011.
- DE TOLEDO DIAS, L. F. *et al.* Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1, p. 309-314, 2009.
- DEL CORRAL, S. *et al.* Phytotoxic halimanes isolated from *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pad.) Pers. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 2, p. 280-283, 2012.
- DING, Y. *et al.* Phenolic Compounds from *Artemisia iwayomogi* and Their Effects on Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 8, p. 1448-1453, 2010.
- DOS SANTOS DIOGO, A. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **J Ethnopharmacol**, v. 127, n. 2, p. 543-50, 2010.
- ESPIRITO-SANTO, M. M. *et al.* Tannins in *baccharis dracunculifolia* (asteraceae): effects of Seasonality, water availability and plant sex. **Acta bot. bras.** v.13, n.2, p.167-174, 1999.
- FABRI, R. *et al.* Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Rev. Bras. Plantas Med**, v. 13, p. 183-189, 2011.
- FACHINETTO, J.; TEDESCO, S. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) AP de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.(Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 360-367, 2009.
- FAUSTINO, H. *et al.* Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds Extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9308-9322, 2010.
- FERRACINI, V. L. Essential Oils os seven Brazilian *Baccharis* Species. **J. Essent. Oil Res.**, v.7, p.355-357, 1995.
- FERESIN, G. E. *et al.* Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 89, n. 1, p. 73-80, 2003.

FERRONATTO, R., *et al.* Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* d.c. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae), **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 10, p. 67, 2006.

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. **J. Ethnopharmacol.**, v. 150, n. 2, p. 655-664, 2013.

FLORAO, A. *et al.* Essential oils from *Baccharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. **J. Essent. Oil Res.**, v. 24, n. 6, p. 561-570, 2012.

FRONTANA-URIBE, B. A. *et al.* A New Languidulane Diterpenoid from *Salvia mexicana* var. *mexicana*. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8866-8873, 2011.

FUKUDA, M. *et al.* Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 54, n. 10, p. 1465-1468, 2006.

FULLAS, F. *et al.* Gaudichaudiosides-a-e, 5 novel diterpene glycoside constituents from the sweet-tasting plant, *baccharis-gaudichaudiana*. **Tetrahedron**, v. 47, n. 40, p. 8515-8522, 1991.

FULLAS, F. *et al.* Cytotoxic constituents of *baccharis-gaudichaudiana*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 6, p. 801-807, 1994.

FULLAS, F.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D. A., Bitter-tasting trihomolabdane arabinoside from *baccharis-gaudichaudiana*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 2543-2545, 1992.

FUNARI, C. S. *et al.* Metabolomics, an optimized approach for the rational exploitation of brazilian biodiversity: state of the art, new scenarios, and challenges. **Quimica Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

GARCEZ, W. S. *et al.* Substâncias de Origem Vegetal com Atividade Larvicida Contra *Aedes aegypti*. **Rev. Virtual Quim.**, v. 5, n.3, p. 363-393, 2013.

GENE, R. M.; MARIN, E.; ADZET, T. Antiinflammatory effect of aqueous extracts of 3 species of the genus *baccharis*. **Planta Medica**, v. 58, n. 6, p. 565-566, 1992.

GIANELLO, J. C. *et al.* Medicamentos herbários em el centro-oeste argentino II. "Carquejas". control de calidad de las drogas oficiales e sustituyentes. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, p. 99-103, 2000.

GIULIANO, D. A. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). **Darwiniana nueva serie**, v. 39, n. 1-2, p. 131-154, 2001.

- GRANCE SIMONE RESCHKE, M. *et al.* *Baccharis trimera*: effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. **J Ethnopharmacol**, v. 117, n. 1, p. 28-33, 2008.
- GRECCO, S. *et al.* Phenolic derivatives from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 42, p. 21-24, 2012.
- GRECCO, S. *et al.* Triterpenoids and phenolic derivatives from *Baccharis uncinella* C.DC. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, n. 6, p. 1234-1237, 2010.
- GUO, Y. *et al.* Clerodane diterpenoids and flavonoids with NGF-potentiating activity from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 55, n. 10, p. 1532-1534, 2007.
- GUO, Y. *et al.* Bioactive ent-clerodane diterpenoids from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. **J Nat Prod**, v. 69, n. 2, p. 274-6, 2006.
- HAYASHI, K.-I. *et al.* Gaudichanolides A and B, Clerodane Diterpenes from *Baccharis gaudichaudiana*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 7, p. 1121-1124, 2005.
- HEIDEN, G. **O gênero *Baccharis* L. seção *Caulopterae* DC. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul**. Pelotas, 238 p. Monografia (Monografia em Botânica)-Graduação em Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2005
- HEIDEN, H.; IGANCI, J. R. V. STEIN, V. **Pesquisas, botânica.**, n. 57, p.121-136, 2006
- HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; MACIAS, L. *Baccharis* sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 943-983, 2009.
- HEIDEN, G.; BAUMGRATZ, J. F. A.; ESTEVES, R. L. *Baccharis* subgen. *Molina* (Asteraceae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 63, n. 3, 2012.
- HEIDEN, G.; DE SOUZA LEONI, L.; NAKAJIMA, J. N. *Baccharis magnifica* (Asteraceae, Astereae): a striking new species endemic to the summits of Serra do Caparaó, southeastern Brazil. **Phytotaxa**, v. 162, n. 4, p. 211–216, 2014.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.
- HENNIG, L. *et al.* New constituents of *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. **Arkivoc**, p. 74-81, 2011.
- HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; ZHANG, Y. B. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. **Nutrition and Cancer-an International Journal**, v. 62, n. 1, p. 1-20, 2010.

JANUARIO, A. H. *et al.* Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chem.-Biol. Interact.**, v. 150, n. 3, p. 243-251, 2004.

JARVIS, B. B. *et al.* Non-trichothecenes from baccharis-megapotamica. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 533-535, 1986.

KURDELAS, R. *et al.* Antifungal Activity of Extracts and Prenylated Coumarins Isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn. (Asteraceae). **Molecules**, v. 15, n. 7, p. 4898-4907, 2010.

LAGO, J. H. G. *et al.* Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 36, n. 9, p. 737-740, 2008.

LEMOS, M. *et al.* *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 59, n. 4, p. 603-608, 2007.

LIU, W. *et al.* Synthesis and in vitro antitumor activity of novel scopoletin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.22, p. 5008–5012, 2012.

LOSQUI, Y. R. *et al.* Activity of *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae on culture of retinal ganglion cells in vitro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 931-936, 2009.

LUIZE, P. S. *et al.* Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) amazonensis and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

MARTIN, A. S.; ROVIROSA, J.; CASTILLO, M. Diterpenoids from baccharis-tola. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 1461-1463, 1983.

MASSIGNANI, J. J. *et al.* Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 10, p. 1355-1360, 2009.

MENDES, F. R.; TABACH, R.; CARLINI, E. A. Evaluation of *Baccharis trimera* and *Davilla rugosa* in tests for adaptogen activity. **Phytother. Res.**, v. 21, n. 6, p. 517-522, 2007.

MENDES, S. *et al.* Essential oil of *Baccharis semiserrata*, a source of spathuleno. **UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**, v. 14, n. 3, p. 241-245, 2008.

MOGANA, R.; TENG-JIN, K.; WIART, C. Anti-Inflammatory, Anticholinesterase, and Antioxidant Potential of Scopoletin Isolated from *Canarium patentinervium* Miq. (Burseraceae Kunth). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

MOLLER, J. K. S.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of essential oils: Spices from the Labiatae family. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1283-1288, 2007.

MORAIS, L. A. S.; CASTANHA, R. F. Chemical composition of essential oil from two samples of carqueja (*Baccharis* sp.) collected in Paty do Alferes - Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 13, n. Sepc. Issue, p. 628-632, 2011.

MOREIRA, F. D. P. M. et al. Flavonoids and triterpenes from *Baccharis pseudotenuifolia* - Bioactivity on *Artemia salina*. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.

MÜLLER, J. **Systematics of *Baccharis* (Compositae-Astereae) in Bolivia, including an overview of the genus**. Systematic Botany Monographs v. 76, 2006, p.1-341.

NESOM, G. L. Generic conspectus of the tribe Astereae (Asteraceae) in North America and Central America, the Antilles, and Hawaii. **BRIT Press**, 2000.

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

NEGREIROS, D. et al. Growth-survival tradeoff in the widespread tropical shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) in response to nutrient gradient. **Tropical ecology**, v.55, n.2, p.167-176, 2014.

NURNBERG, V.; FUJIWARA, F. Y.; MARSAIOLI, A. J. Total NMR chemical shift assignments of baccharis oxide via 2D-INADEQUATE. **Magn. Reson. Chem.**, v. 36, n. 10, p. 766-768, 1998.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v.267, p.5421-5426, 2000.

OKI, Y. et al. Influência dos fungos endofíticos sobre os herbívoros de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Neotropical Biology and Conservation**, v. 4, n. 2, p. 83-88, 2009.

OLIVEIRA, A. C., P. et al. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **J Ethnopharmacol**, v. 102, n. 3, p. 465-9, 2005.

OLIVEIRA, S. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, p.497-503, 2014

PADUA BRUNO DA, C. et al. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **J Ethnopharmacol**, v. 129, n. 3, p. 381-6, 2010.

- PADÍN, S. B. *et al.* Toxicity and repellency of nine medicinal plants against *Tribolium castaneum* in stored wheat. **Bulletin of Insectology**, v. 66, n. 1, p. 45-49, 2013.
- PANERO, J. L.; FUNK, V. A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, n. 2, p. 757-782, 2008.
- PAUL ELISIANE, L. *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. **Inflammation**, v. 32, n. 6, p. 419-25, 2009.
- PINHO, D. S. D. *et al.* Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Rev Bras Farmacogn**, v. 20, n. 2, p. 165-70, 2010.
- PRACHAYASITTIKUL, S. *et al.* Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v. 14, n. 2, p. 850-867, 2009.
- PRIOR, R.L. *et al.* Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.3273-3279, 2003.
- RETTA, D. *et al.* Volatile constituents of five *Baccharis* species from northeastern Argentina. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 7, p. 1379-1384, 2009.
- RIBEIRO, P. R. V. *et al.* Clerodane and patchoulene terpenes as new constituents from *Baccharis salzmännii* DC. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 101-105, 2013.
- RODRIGUES CARMEM, R. F. *et al.* Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 125, n. 1, p. 97-101, 2009.
- RODRIGUEZ, M. D. *et al.* The antimutagenic capacity of the aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 93, n. 2, p. 251-260, 2011.
- SANTOS, T. G. *et al.* Chemical Characterization of Essential Oils from *Drimys angustifolia* Miers (Winteraceae) and Antibacterial Activity of their Major Compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 164-286, 2013.
- SARTOR, T. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. **Industrial Crops and Products**, v.51, p. 355– 359, 2013.
- SILVA, F. G. *et al.* Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 18, n. 5, p. 990-997, 2007.

SIMOES-PIRES, C. A. *et al.* Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, n. 1-4, p. 23-32, 2005.

SIMOES-PIRES, C. A. *et al.* Isolation and On-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochem. Anal.**, v. 16, n. 5, p. 307-314, 2005.

SCHNNEIDER, A. A. **Estudo Taxonomico de Baccharis L. Sect. Caulopterae DC. (Asteraceae) no Brasil.** Porto Alegre, 203 p. Tese (Doutorado em Botânica)- Programa de Pós Graduação em Bôtanica, Univesidade Federal ddo Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

SCHNEIDER, A. A.; BOLDRINI, I. L. Two new species of *bacc haris* sect caulopterae (asteraceae : astereae) from so uthern brazil. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v.2, n.1, p. 45-51, 2008.

SOICKE, H.; LENGPESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from baccharis-trimera and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, n. 1, p. 37-39, 1987.
SOUSA, C.M.M. *et al.* Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais. **Química Nova**, 30,.p. 351-355, 2007.

SOUSA, L. A. *et al.* Plasticidade fenotípica de *Baccharis genistelloides* subsp. *crispa* (Spreng.) Joch. Müll. (2006) – Asteraceae – sob manejo orgânico. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.16, n.2, p.231-236, 2014.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K. Editor. **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity.** London: Academic Press; p.71-133, 1990.

SUTTISTRI, R. *et al.*, Neo-Clerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. **Phytochemistry**, v.3, p. 443 - 446, 1994.

STEFANELLO, M. E. A. *et al.* Essential oil of *Gochnatia polymorpha* (LESS) CABR. ssp *floccosa* CABR. **Quimica Nova**, v. 29, n. 5, p. 999 -1002, 2006.

TERRA, W. D. *et al.* Lepidotrichilins A and B, New Protolimonoids with Cytotoxic Activity from *Trichilia Lepidota* (Meliaceae). **Molecules**, v. 18, n. 10, p. 12180 -12191, 2013.

UWAI, K. *et al.* Inhibitory effect of the alkyl side chain of caffeic acid analogues on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 16, p. 7795-7803, 2008.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. The *Baccharis* genus (Asteraceae): Chemical, economical and biological aspects. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 85 - 94, 2005.

VERDI, L. G. *et al.* Kaurene diterpenes and flavonoids from *Baccharis illinita* flowers. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, n. 9, p. 837-840, 2004.

VIVOT, E. P. *et al.* Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). **Ciencia, docencia y tecnología**, n. 45, p. 131-146, 2012.

VIVOT LUPI, E. P. *et al.* Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 43, n. 4, p. 74 - 84, 2009.

WAGNER, H. *et al.* New furanoid ent-clerodanes from *baccharis-tricuneata*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 17, p. 3339-3345, 1978.

WANG, Y. S.; HUANG, R.; YANG, J. H. CHEMICAL CONSTITUENTS OF *Litsea szemaonis*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 1, p. 122-123, 2011.

WU, H. K. *et al.* Components of *Cichorium glandulosum* seeds. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, n. 4, p. 472-473, 2007.

XAVIER, M. V. A. *et al.* The *Baccharis trimera* (Less.) DC essential oil effects on the physiological potential of cowpea bean seeds. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 14, n. Sepc. Issue, p. 214-217, 2012.

ZALEWSKI, C. A. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory activity of derivatives from aerial parts of *Baccharis uncinella*. **Pharm. Biol. (London, U. K.)**, v. 49, n. 6, p. 602-607, 2011.

ZIELINSKI, A. A. F. *et al.* A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Res. Int.**, v. 60, p. 246-254, 2014.

ZUNINO, M. P. *et al.* Essential oil composition of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 1, p. 29-30, 2004.

ZUNINO, M. P. *et al.* Essential oils of three *Baccharis* species. **Planta Medica**, v. 64, n. 1, p. 86-87, 1998.

ZUNINO, M. P. *et al.* Composition of the essential oil of *Baccharis crispa* Spreng. and *Baccharis salicifolia* Pers. grown in Cordoba (Argentina). **Flavour Fragrance J.**, v. 12, n. 6, p. 405-407, 1997.