

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**CÂMPUS DE ARARAQUARA**  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**ISABELA JACOB MORO**

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E TIPO DE MORTE EM  
LINHAGENS CELULARES HUMANAS TRATADAS COM DERIVADOS  
VEGETAIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Baccharis trimera*  
(Less.) DC.

**ARARAQUARA-SP**

**2016**

**ISABELA JACOB MORO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E TIPO DE MORTE EM  
LINHAGENS CELULARES HUMANAS TRATADAS COM  
DERIVADOS VEGETAIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE  
*Baccharis trimera* (Less.) DC.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos  
Coorientadora: Prof. Dra. Christiane Pienna Soares

ARARAQUARA-SP

2016

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**M867a** Moro, Isabela Jacob  
Avaliação da atividade citotóxica e tipo de morte em linhagens celulares humanas tratadas com derivados vegetais e metabólitos secundários de *Baccharis trimera* (Less.) DC. / Isabela Jacob Moro. – Araraquara, 2016.  
181 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: André Gonzaga dos Santos.  
Coorientador: Christiane Pienna Soares.

I. *Baccharis trimera*. 2. Fitoquímica. 3. Óleo essencial. 4. Eupatorina. 5. Carqueja. 6. Cancer. 7. Necrose. 8. Apoptose. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Soares, Christiane Pienna, coorient. III. Título.

**CAPES: 50700006**

## ERRATA

Na dissertação de Mestrado intitulada “Avaliação da atividade citotóxica e tipo de morte em linhagens celulares humanas tratadas com derivados vegetais e metabólitos secundários de *Baccharis trimera* (Less.) DC.” desenvolvida por mim, Isabela Jacob Moro, sob orientação do Prof.Dr. André Gonzaga dos Santos e sob coorientação da Prof.Dra. Christiane Pienna Soares, em “**Agradecimentos**”, onde se lê “À FAPESP pela bolsa concedida”, leia-se “À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (processo nº 2014/10552-3)”.

ISABELA JACOB MORO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E TIPO DE MORTE EM LINHAGENS  
CELULARES HUMANAS TRATADAS COM DERIVADOS VEGETAIS E  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Baccharis trimera* (Less.) DC.

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade Estadual Paulista – UNESP,  
Campus de Araraquara como requisito para a  
obtenção do título de Mestra em Ciências  
Farmacêuticas

Araraquara, 23 de junho de 2016.

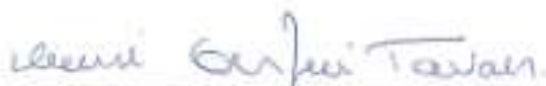
BANCA EXAMINADORA



ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS - Orientador



DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA



DENISE CRISPIM TAVARES

## *Dedicatória*

*A Deus, pelo dom da vida, pela família, pelos amigos, pela oportunidade dos estudos, pela esperança oferecida a cada amanhecer, pela oportunidade que me concede a cada dia para evoluir na condição humana, pelas dificuldades impostas que permitem valorizar o horizonte alcançado e contemplar o poder de Sua graça;*

*A minha família: meus pais que sempre ofertaram bons exemplos, confiança, apoio e esforço para que nada nos faltasse; ao meu irmão pelas parcerias inúmeras; ao meu sobrinho - afilhado pela forma mais pura de amor que recebo;*

*Ao meu melhor amigo para sempre, Binho.*

*À vocês meu amor e plena gratidão!*

## **Agradecimentos**

À Deus;

A minha família;

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos por me orientar, ser meu amigo, ter paciência e ser um de meus maiores exemplos na academia;

À Prof. Dra. Christianne Pienna Soares por seu carinho e orientação;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (processo nº 2014/10552-3);

Aos funcionários das áreas de limpeza, portaria, STI e administração pelo “bom dia”, sorrisos, conversas e ajudas;

Aos amigos dos laboratórios de Citologia e de Farmacognosia, e aos meus amigos do dia-a-dia. Todos vocês tornam a vida mais leve;

Aos técnicos Caio (Farmacognosia), Marcos (Bioequivalência), Angélica (Botânica), Marcos (Citologia) e Izabel (USP - departamento de física e química);

Aos Profs. Dr. Alberto José Cavalheiro e Dr. Norberto Peporine Lopes por terem colaborado com sua experiência e conhecimento, além de disponibilizarem os equipamentos de CG;

Ao Prof. Dr. Ílio Montanari Junior por nos ter fornecido a espécie vegetal alvo de nosso estudo.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Exemplar de <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. presente no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas – UNESP/Araraquara-SP .....	5
<b>Figura 2</b> - Correlação entre metabolismo primário e metabolismo secundário. ....	8
<b>Figura 3</b> - Resumo da biossíntese de metabólitos secundários.....	9
<b>Figura 4</b> - Exemplos de monoterpene, sesquiterpene, diterpene e fenilpropanoide.....	11
<b>Figura 5</b> - Biossíntese de terpenos: monoterpene e sesquiterpenos. ....	12
<b>Figura 6</b> - Núcleo fundamental difenilpropano .....	13
<b>Figura 7</b> – Esquema simplificado da biossíntese de flavonoides .....	14
<b>Figura 8:</b> Flavona eupatorina. ....	15
<b>Figura 9</b> - Obtenção de EAcBt, segundo Claudino (2013). ....	31
<b>Figura 10</b> - Obtenção de EFSBt3 e EFSBt4, segundo Claudino (2013).....	32
<b>Figura 11</b> - Etapas de fracionamento cromatográfico a partir de EFSBt3 e 4. ....	35
<b>Figura 12</b> - Recuperação do OE extraído por hidrodestilação. ....	40
<b>Figura 13</b> - Fracionamentos do OE por CC: pequena escala, maior escala e seleção de frações para análise em CG-EM. ....	41
<b>Figura 14:</b> Equação de Van Den Dool e Kratz.....	43
<b>Figura 15</b> - Placa de 96 poços após tempo de incubação com corante SRB .....	47
<b>Figura 16</b> - Diferentes frações obtidas por CC1. ....	55
<b>Figura 17</b> - Cromatoplas das subfrações da CC1.....	57
<b>Figura 18</b> - Cromatoplas com EAcBt, frações EFSBt4 e 4, OE do caule.....	58
<b>Figura 19</b> - Cromatoplas das frações da EFSN°2.....	59
<b>Figura 20</b> - Cromatoplas das frações da EFSN°3. ....	60
<b>Figura 21</b> - Cromatoplas das frações da EFSN°4. ....	61
<b>Figura 22</b> - Cromatoplas das frações da EFSN°5 e a amostra MeOH4. ....	62
<b>Figura 23</b> - Cromatoplas das frações da EFSN°6.....	63
<b>Figura 24</b> – Espectro de massas de eupatorina. MS <sup>2</sup> do íon precursor com m/z 345. ESI-MS/MS; modo positivo. ....	64
<b>Figura 25:</b> Estrutura das flavonas.....	66
<b>Figura 26:</b> Espectro no UV/Vis da substância purificada da fração MeOH3. ....	66
<b>Figura 27</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (10 mg/mL; CDCl <sub>3</sub> ) da substância isolada – eupatorina.....	68
<b>Figura 28</b> - Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (10 mg/mL; CDCl <sub>3</sub> ) da substância isolada – eupatorina.....	69
<b>Figura 29</b> - Estrutura de 3',5-diidroxí-4',6,7-trimetoxiflavona (eupatorina).....	71
<b>Figura 30:</b> Cromatoplas de comparação entre a eupatorina obtida e um padrão. ....	72
<b>Figura 31:</b> Cromatogramas da eupatorina (oriunda de MeOH <sub>3+4</sub> ) realizados em CLAE/DAD. ....	73
<b>Figura 32:</b> Cromatogramas da eupatorina obtida por CLAUDINO (2013) realizados em CLAE/DAD.....	74
<b>Figura 33</b> – Cromatograma do OE obtido por CG-DIC.....	75
<b>Figura 34</b> - Cromatoplas teste com o OE para definição de eluentes de CC do OE. ....	78



<b>Figura 35</b> - Cromatoplaça das frações de CC OE em pequena escala. ....	79
<b>Figura 36</b> - Cromatoplaça das frações de CC OE em maior escala. ....	82
<b>Figura 37</b> : Cromatoplaça de CCDprep2 com o OE: observação em câmara de luz UV (352 nm). ....	83
<b>Figura 38</b> - Cromatogramas das frações 3, 9, 17, 35 e 46 obtidos por CG-DIC.....	84
<b>Figura 39</b> : Estruturas de terpenos análogos utilizadas nos ensaios in vitro. ....	90
<b>Figura 40</b> : Ensaio de citotoxicidade em linhagem MCF-10A, a partir de 3 experimentos independentes (média ± erro padrão-ep). Tratamento realizado com OE, α-humuleno, <i>trans</i> -cariofileno, óxido de cariofileno e eupatorina. ....	91
<b>Figura 41</b> : Ensaio de citotoxicidade em linhagem HepG2, a partir de 3 experimentos independentes (média ± erro padrão-ep). Tratamento realizado com OE, α-humuleno, <i>trans</i> -cariofileno, óxido de cariofileno e eupatorina. ....	93
<b>Figura 42</b> : Ensaio de citotoxicidade em linhagem MCF7, a partir de 3 experimentos independentes (média ± erro padrão-ep). Tratamento realizado com OE, α-humuleno, <i>trans</i> -cariofileno, óxido de cariofileno e eupatorina. ....	94
<b>Figura 43</b> : Representação gráfica para comparação dos valores de CI <sub>50</sub> atingidos em diferentes linhagens com a eupatorina, o OE e seus padrões de sequiterpenos. ....	96
<b>Figura 44</b> : Ensaio de citotoxicidade em linhagem MCF10A, a partir de 3 experimentos independentes (média ± erro padrão-ep). Tratamento realizado com frações selecionadas recolhidas a partir da CC de OE: 6, 10, 17, 25, 27, 38, 40, 42 e 57. ....	98
<b>Figura 45</b> - Ensaio de citotoxicidade em linhagem HepG2, a partir de 3 experimentos independentes (média ± erro padrão-ep). Tratamento realizado com frações selecionadas a partir da CC de OE: 6, 10, 17, 25, 27, 38, 40, 42 e 57. ....	100
<b>Figura 46</b> - Ensaio de citotoxicidade em linhagem MCF7, a partir de 3 experimentos independentes (média ± erro padrão-ep). Tratamento realizado com frações selecionadas recolhidas obtidas a partir da coluna cromatográfica de óleo essencial: 6, 10, 17, 25, 27, 38, 40, 42 e 57.....	101
<b>Figura 47</b> - Representação gráfica para comparação dos valores de CI <sub>50</sub> atingidos em diferentes linhagens com as frações do OE.....	104
<b>Figura 48</b> - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com óleo essencial.....	108
<b>Figura 49</b> - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância α-humuleno nas diferentes linhagens. ....	110
<b>Figura 50</b> - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância <i>trans</i> -cariofileno nas diferentes linhagens. ....	111
<b>Figura 51</b> - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância óxido de cariofileno nas diferentes linhagens.....	113
<b>Figura 52</b> - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância eupatorina nas diferentes linhagens.....	115
<b>Figura 53</b> - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com o óleo essencial nas diferentes linhagens. Ensaio de exclusão por fluorocromos.....	117
<b>Figura 54</b> - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância α-humuleno nas diferentes linhagens. Ensaio de exclusão por fluorocromos.....	118

<b>Figura 55</b> - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância <i>trans</i> -cariofileno nas diferentes linhagens. Ensaio de exclusão por fluorocromos.....	120
<b>Figura 56</b> - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância óxido de cariofileno nas diferentes linhagens. Ensaio de exclusão por fluorocromos.....	122
<b>Figura 57</b> - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância eupatorina nas diferentes linhagens. Ensaio de exclusão por fluorocromos.....	123
<b>Figura 58</b> - Ensaio de atividade de caspase-3 para óleo essencial (A), $\alpha$ -humuleno (B) e <i>trans</i> -cariofileno (C). .....	125
<b>Figura 59</b> - Ensaio de atividade de caspase-3 para óxido de cariofileno (A) e eupatorina (B).....	127

## INDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Fracionamento cromatográfico de EFSBt3 (CC1): eluentes.....	33
<b>Tabela 2:</b> EFSn°2, EFSn°3, EFSn°4, EFSn°5 e EFSn°6: relação entre eluentes e frações coletadas. ....	34
<b>Tabela 3</b> - Eluentes utilizados no fracionamento do OE por CC (sílica gel). ....	42
<b>Tabela 4</b> - Concentrações de amostras e CP utilizados no ensaio de SRB. ....	47
<b>Tabela 5</b> - Concentrações de amostras e CP utilizados no ensaio de Anexina-V.....	49
<b>Tabela 6</b> - Concentrações de amostras e CP utilizados no ensaio de exclusão de fluorocromos com HO, IP e diacetato de fluoresceína. ....	51
<b>Tabela 7</b> - Concentrações das amostras utilizadas nos ensaios de atividade de caspase-3. ....	52
<b>Tabela 8</b> - Cromatografia em coluna 1: massas (mg) das subfrações reunidas.....	56
<b>Tabela 9</b> - EFSn2: massas (mg) das subfrações reunidas.....	59
<b>Tabela 10</b> - EFSn3: massas (mg) das subfrações reunidas.....	60
<b>Tabela 11</b> - EFSn4: massas (mg) das subfrações reunidas.....	61
<b>Tabela 12</b> - EFSn5: massas (mg) das subfrações reunidas.....	62
<b>Tabela 13</b> – EFSn°6: massas (mg) das subfrações reunidas. ....	63
<b>Tabela 14</b> - Fragmentos obtidos a partir do íon precursor $m/z$ 345 ( $MS^2$ ). ....	65
<b>Tabela 15</b> - Dados espectrométricos de RMN obtidos para a eupatorina a 300 MHz para $^1H$ e a 75 MHz para $^{13}C$ , em $CDCl_3$ .....	70
<b>Tabela 16</b> - Propostas de identificação de componentes do OE a partir de análises por CG-DIC e CG-EM.....	75
<b>Tabela 17</b> - Propostas de identificação de componentes OE obtido por Claudino (2013) a partir de análises por CG-DIC e CG-EM. ....	76
<b>Tabela 18</b> - Rendimento das frações de CC do OE em maior escala. ....	80
<b>Tabela 19:</b> Proposta de identificação dos constituintes de frações do OE avaliadas em ensaios <i>in vitro</i> . Análise por CG-EM .....	86
<b>Tabela 20</b> - Efeito citotóxico das amostras nas diferentes linhagens celulares. $CI_{50}$ expressa em $\mu g/mL \pm$ desvio padrão. ....	95
<b>Tabela 21:</b> Índice de seletividade do OE, $\alpha$ -humuleno, <i>trans</i> -cariofileno, óxido de cariofileno e eupatorina entre as linhagens MCF10A e HepG2 e nível de citotoxicidade das amostras.....	97
<b>Tabela 22:</b> Índice de seletividade do OE, $\alpha$ -humuleno, <i>trans</i> -cariofileno, óxido de cariofileno e eupatorina entre as linhagens MCF10A e MCF7. ....	97
<b>Tabela 23:</b> $CI_{50}$ para frações do OE expressa em $\mu g/mL \pm$ desvio padrão. ....	103
<b>Tabela 24:</b> Índice de seletividade das frações 6, 10, 17, 25, 27, 38, 40, 42 e 57 entre as linhagens MCF10A e HepG2 e MCF10A e MCF7.....	105

## RESUMO

Produtos derivados de fontes vegetais tem demonstrado seu potencial no combate a diversas doenças, inclusive o câncer, à exemplo dos alcaloides derivados de *Catharantus roseus* (L.)G. Don, vincristina e vimblastina. A diversidade estrutural das moléculas encontradas em espécies vegetais concebem perspectivas de uso *in natura* bem como servem de inspiração para o desenvolvimento de outras entidades químicas que serão destinadas ao combate de doenças. O material de estudo pertence a espécie *Baccharis trimera* (Less.) DC, popularmente conhecida como carqueja e com amplo uso tradicional, principalmente para o alívio de afecções digestivas. O estudo teve por objetivo o fracionamento cromatográfico de derivados vegetais de partes aéreas de *B. trimera* e a avaliação da citotoxicidade e estudo de morte em linhagens de células humanas normal e tumorais tratadas com o OE, suas frações e componentes, além da flavona eupatorina isolada do extrato acetato de etila. O potencial citotóxico foi avaliado através do método da sulforrodamina B e os estudos de morte através de ensaios de Anexina-V, Hoechst/iodeto de propídeo e ativação de caspase-3. As linhagens celulares humanas utilizadas foram de câncer de mama (MCF-7), hepatocarcinoma (HepG2) e a linhagem de mama normal (MCF-10). As amostras avaliadas foram o óleo essencial, suas frações e componentes ( $\alpha$ -humuleno, trans-cariofileno e óxido de cariofileno), além da eupatorina. Os constituintes majoritários do óleo essencial identificados por CG-EM foram: trans-cariofileno (18,9 %), biciclogermacreno (15,6 %), germacreno D (10,5 %) e  $\delta$ -cadineno (6,6 %);  $\alpha$ -humuleno (2,3 %) e óxido de cariofileno (2,9 %) também foram identificados. As frações do óleo essencial foram obtidas por cromatografia em coluna (sílica gel) e analisadas por CG-DIC e CG-EM, tendo apresentado composições químicas distintas. A flavona eupatorina (pureza em 250 nm de 96 % m/m) foi isolada a partir do extrato acetato de etila utilizando cromatografia em camada delgada preparativa (sílica gel) e identificada por técnicas espectrométricas (EM, UV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ). Verificou-se o maior potencial de redução de sobrevivência com o OE em HepG2 ( $\text{CI}_{50}$  = 10,40  $\mu\text{g/mL}$ ),  $\alpha$ -humuleno e trans-cariofileno em MCF7 ( $\text{CI}_{50}$  de 7,59 e 11,52  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) enquanto que a eupatorina mostrou-se mais citotóxica em MCF10A com valor de  $\text{CI}_{50}$  pouco distante do encontrado para MCF7 (5,08 e 6,73  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Grande parte das frações do OE foi citotóxica às linhagens e foram necessárias concentrações mais altas para atingir o  $\text{CI}_{50}$ . As amostras apresentaram morte mista em todas as linhagens ocorrendo tanto apoptose quanto necrose. Não houve significância estatística no ensaio de ativação da via de apoptose por caspase-3. Constatou-se a eficiência das técnicas cromatográficas no tocante à identificação e separação de constituintes químicos, das técnicas espectrométricas para a identificação e

determinação estrutural da substância eupatorina, bem como o potencial de morte celular, e até mesmo antitumoral, de amostras analisadas neste trabalho.

*Palavras-chave:* *Baccharis trimera*. Fitoquímica. Metabólitos secundários. Óleo essencial. Eupatorina. Carqueja. Câncer. Citotoxicidade. Apoptose. Necrose.

## ABSTRACT

Natural products diversity is an important source to find potential treatments against various diseases, including cancer. Vincristine and vinblastine, alkaloids derived from *Catharantus roseus* (L.) L. Don, are some of the examples. The structural diversity of molecules from plant species allow the *in natura* usage and also the development of other chemical entities that will be used to diseases control. *Baccharis trimera* (Less.) DC., popularly known as carqueja, has an extensive traditional use, especially for digestive disorders. The aims of this study were the chromatographic fractionation of aerial parts from carqueja, *in vitro* evaluation of the cytotoxic potential through sulforhodamine B assay and cellular death by Annexin-V assay, Hoechst/propidium iodide method and caspase-3 activation, in normal and tumor cell lines treated with essential oil, its fractions and components, and the flavone eupatorin isolated from ethyl acetate extract. The cell lines used were human breast cancer (MCF-7), hepatocellular carcinoma (HepG2) and normal breast line (MCF-10a). The evaluated samples were: essential oil, its fractions and components ( $\alpha$ -humulene,  $\beta$ -caryophyllene and caryophyllene oxide) and eupatorin. The major constituents of the essential oil identified by GC-MS were:  $\beta$ -caryophyllene (18.9%), bicyclogermacrene (15.6%), germacrene D (10.5%),  $\delta$ -cadinene (6.6%). Other components of the essential oil, such as  $\alpha$ -humulene (2.3%) and caryophyllene oxide (2.9%) were also identified. The essential oil fractions were obtained by column chromatography (silica gel) and analyzed by GC-FID and GC-MS, presenting different chemical compositions. The flavone eupatorin (96% purity in 250 nm; w/w) was isolated from ethyl acetate extract using preparative thin layer chromatography (silica gel) and identified by spectrometric methods (MS, UV,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR). The largest decrease in cell viability for HepG2 was observed with essential oil ( $\text{IC}_{50} = 10.40 \mu\text{g} / \text{mL}$ );  $\alpha$ -humulene and *trans*-caryophyllene for MCF7 cells ( $\text{IC}_{50}$  7.59 and 11.52  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectively) and eupatorin for MCF10A ( $\text{IC}_{50} = 5.08 \mu\text{g} / \text{mL}$ ).  $\text{IC}_{50}$  for eupatorin in MCF7 cells was 6.73  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Most of the essential oils fractions were cytotoxic to the cell lines and higher concentrations were required to achieve  $\text{IC}_{50}$ . There was not a cell death standard since apoptosis and necrosis occurred as well. Statistical significance was not found in caspase-3 assay. Chromatographic techniques were efficient for compounds identification and separation, and spectrometry techniques for structural determination of eupatorin. The results from this research shown therapeutic potential against cancer for the studied samples.

Keywords: *Baccharis trimera*. Phytochemical. Secondary metabolites. Essential oil. Eupatorin. Carqueja. Cancer. Cytotoxicity. Apoptosis. Necrosis.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AcOEt: acetato de etila

CCD: cromatografia em camada delgada

CC: cromatografia em coluna

CLAE: cromatografia em fase líquida de alta eficiência

CLAE-DAD: cromatógrafo em fase líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos

CG: cromatografia em fase gasosa

CG-DIC: cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização por chamas

CG-EM: cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas

Cl<sub>50</sub>: concentração suficiente para inviabilizar 50% das células

CPQBA: Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas

DV: droga vegetal

DMSO: dimetilssulfóxido

EFS: extração em fase sólida

EFSBt3: fração 3 referente à extração em fase sólida realizada por Claudino (2013)

HepG2: carcinoma hepatocelular humano (linhagem celular)

HO: Hoechst

IS: índice de seletividade

IP: iodeto de propídeo

IV: infra-vermelho

MCF-7: adenocarcinoma mamário humano (linhagem celular)

MCF-10a: mama normal humana (linhagem celular)

MeOH: metanol

OE: óleo essencial

RMN: ressonância magnética nuclear

SFB: soro fetal bovino

SRB: sulforrodamina B

UV: ultra-violeta

ÍNDICE DE FIGURAS .....	i
ÍNDICE DE TABELAS .....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Produtos Naturais e novos fármacos .....	2
1.2 <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. ....	4
1.3 Metabólitos secundários .....	7
1.3.1 Óleos essenciais.....	9
1.3.2 Flavonoides .....	13
1.4 Técnicas cromatográficas .....	15
1.5 Câncer .....	17
1.5.1 Plantas e o câncer .....	17
1.5.2 Biologia do câncer .....	18
1.5.3 Morte celular .....	20
1.5.4 Incidência.....	22
1.5.5 Fatores de risco .....	23
1.5.6 Terapias de combate ao câncer .....	23
1.5.7 Anexina-V .....	24
1.5.8 Ensaio de exclusão de fluorocromos com Hoechst, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína .....	24
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos .....	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1 Materiais, reagentes e solventes.....	28
3.2 Equipamentos.....	28
3.3 Material vegetal .....	29
3.4 Obtenção de EAcBt .....	30



3.5 Obtenção de EFSBt3 e EFSBt4 .....	31
3.6 Fracionamento de EFSBt3 e EFSBt4.....	32
3.7 Fracionamento das subfrações originadas de CC1 por EFS.....	33
3.7.1 EFSn°2 E EFSn°3.....	35
3.7.2 EFSn°4 .....	36
3.7.3 EFSn°5 .....	36
3.7.4 EFSn°6 .....	37
3.8 Análises por CCD .....	37
3.9 Purificação de eupatorina .....	37
3.10 Identificação de eupatorina .....	38
3.10.1 Cromatografia em camada delgada .....	38
3.10.2 Análises por CLAE .....	38
3.11 Determinação estrutural de eupatorina .....	39
3.11.1 Espectrofotometria no UV .....	39
3.11.2 Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	39
3.11.3 Espectrometria de massas.....	39
3.12 Óleo essencial .....	39
3.12.1 Extração do OE.....	39
3.12.2 Fracionamento do OE por CC.....	40
3.12.3 Análise do OE e suas frações por CCD .....	42
3.12.4 Cromatografia em fase gasosa .....	42
3.12.7.5 CCD preparativa com frações do OE .....	44
3.13 Avaliação do potencial citotóxico e da morte celular .....	45
3.13.1 Ensaios de citotoxicidade SRB .....	45
3.13.2 Ensaio de anexina-V .....	49
3.13.3 Ensaio de exclusão de fluorocromos com Hoechst, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína .....	50
3.13.4 Avaliação da atividade de caspase-3.....	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	55
4.1 Fracionamento das frações EFSBt3 E 4 por CC (CC1).....	55
4.2 Isolamento e purificação da eupatorina.....	58
4.2.1 EFSn°2 .....	58
4.2.2 EFSn°3 .....	60
4.2.3 EFSn°4 .....	61
4.2.4 EFSn°5 .....	62

4.2.5 EFSn°6 .....	63
4.2.6 Cromatografia em camada delgada preparativa para obtenção da eupatorina (CCDp1) .....	63
4.3 Determinação estrutural da eupatorina .....	64
4.4 Identificação de eupatorina .....	71
4.5 Análise do OE .....	75
4.5.1 Otimização de condições para CC com o OE (fracionamento em pequena escala) ..	78
4.5.2 Cromatografia em coluna em pequena escala .....	79
4.5.3 Cromatografia em coluna em maior escala .....	80
4.5.4 Cromatografia em coluna preparativa com subfrações do OE (CCDprep2) .....	83
4.5.5 Análises por CG-DIC E CG-EM .....	83
4.6 Citotoxicidade por SRB .....	90
4.6.1 Oleo essencial, padrões e eupatorina .....	90
4.6.2 FRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL.....	98
4.7 Anexina – V .....	107
4.8 Exclusão por fluorocromos (Hoechst/iodeto de propídeo) .....	116
4.9 Atividade de caspase-3.....	124
5 CONCLUSÕES.....	129
REFERÊNCIAS .....	133

Apêndice I: Sugestão de identificação dos componentes das frações do OE

Apêndice II: Cromatogramas das frações do OE obtidos por CG-DIC

# **INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Produtos Naturais e novos fármacos

Há tempos a domesticação e cultura de espécies vegetais com fins alimentares, bem como a observação e busca por suas virtudes terapêuticas, tem sido realizada pela civilização. Apesar dos grandes avanços na medicina, os produtos vegetais com potencial terapêutico tornam-se opção para quem objetiva recuperar, promover ou manter a saúde, tendo em vista a fácil obtenção, o baixo custo e a tradição do uso das plantas medicinais (VARANDA, 2006; BRANDÃO et al., 2010).

Substâncias de origem vegetal e seus derivados sintéticos integram grande parcela dos medicamentos utilizados na terapêutica, movimentando o mercado farmacêutico (LI; VEDERAS, 2009; NEWMAN, CRAGG, 2016). Paradoxalmente aos altos lucros obtidos pelas empresas, boa parte da população é privada do acesso aos produtos modernos e, como alternativa, faz uso tradicional das plantas medicinais (LIMA et al., 2008). Esta realidade evidencia a importância do estudo para avaliação do potencial terapêutico, segurança e composição química das espécies vegetais utilizadas com fins medicinais. Atualmente, significativa parcela dos medicamentos disponíveis é derivada, por exemplo, de vertebrados e invertebrados terrestres, micro-organismos e fontes vegetais, sendo que as substâncias de origem vegetal possuem grande diversidade estrutural, sagrando-se importante fonte para a busca de substâncias com potencial terapêutico, menor toxicidade e maior eficácia, sendo muitas vezes modelos para a obtenção de novos medicamentos (VARANDA, 2006; BRANDÃO et al., 2010).

Não raros são os registros históricos que referenciam o uso de plantas como terapias de prevenção ou combate a doenças ou promoção de bem estar gratuito. Um forte exemplo são os registros datados de 1500 a.C, no Papiro de Ebers (Egito), em que espécies vegetais são recomendadas sob preparações na forma de pós, gargarejos, infusões e outros, para restabelecimento de saúde, tratamentos estéticos e rituais. Com os avanços durante o século XIX nas áreas químicas e a averbação em compêndios farmacopeicos, os

fármacos, em sua maioria, foram obtidos de espécies vegetais. Mais recentemente, Newman e Cragg (2010) concluíram através de trabalhos de revisão bibliográfica que os produtos naturais são, pelo menos desde a década de 50, inspiração para o desenvolvimento de estruturas que embasaram e embasarão medicamentos. De acordo com os autores, de um total de 1355 novas moléculas aprovadas por entidades como o FDA (*Food and Drug Administration*), cerca de 299 são derivados naturais e 177 tem um grupo farmacofórico derivado de um produto natural.

A variedade de substâncias presentes nas plantas medicinais pode atuar de forma isolada ou sinérgica, de tal forma que os componentes individuais de extratos ou parte deles interagem no sentido de potencializar os efeitos observados. Atualmente, podem ser encontrados no comércio de fitoterápicos combinações de extratos que possibilitam um efeito farmacológico superior àquele observado com a administração dos derivados vegetais separadamente (EFFERTH, KOCH, 2011).

Algumas vertentes para o avanço da medicina tradicional são a procura de novos alvos terapêuticos a partir do estudo de ativos, a biodisponibilidade destes a partir da observação do comportamento das rotas metabólicas e farmacocinéticas e a otimização dos protótipos já existentes. Em consonância com estes conhecimentos e com os avanços já obtidos, os métodos analíticos atuais vão ao encontro de melhorias por permitirem que perfis químicos complexos sejam estabelecidos ou que componentes sejam isolados e identificados, através de técnicas cromatográficas e espectrométricas. Com a elucidação dos componentes presentes na amostra, é possível correlacionar, e até mesmo vislumbrar, atividades farmacológicas de extratos padronizados e otimizar seu processo de obtenção. Em complementação aos métodos instrumentais de análise, os ensaios *in vitro* propiciam a triagem das atividades biológicas que substâncias ou derivados vegetais podem apresentar, embasados no uso tradicional ou mesmo em relatos de literatura. A partir daí, mecanismos de ação podem ser investigados e medicamentos desenvolvidos (YUNES, FILHO 2014).

À exemplo do sucesso de produtos de origem vegetal na terapêutica, podemos citar os glicosídeos cardiotônicos digitoxina e digoxina, encontradas em certas espécies de

*Digitali*, e alcaloides como a morfina, derivada de *Papaver somniferun* L., a partir da qual foram desenvolvidos outros medicamentos como a codeína (antitussígeno). De *Cinchona calisaya* Weddel obteve-se o antiarrítmico quinidina e a quinina, destinada ao tratamento da malária e responsável pelo desenvolvimento de outros medicamentos contra esta doença, por exemplo cloroquina, mefloquina e primaquina. Há ainda copiosos exemplos acerca da obtenção de produtos terapêuticos obtidos a partir de plantas, como a escopolamina, isolado de *Datura stramonium* L. e de outras espécies de Solanaceae e que possui propriedade antiespasmódica, a atropina, isolada de *Atropa belladonna* L. que age como bloqueador colinérgico, a pilocarpina, alcaloide extraído de *Pilocarpus jaborandi* Holmes, utilizado no controle da pressão intraocular elevada, a reserpina, isolada de *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex. Kurz, que detém propriedade hipotensora, entre outras substâncias (BARREIRO, 1990).

O estudo das plantas destinadas à conservação e recuperação da saúde é importante não apenas no sentido de se encontrar novas terapias, mas também de esclarecer os riscos à população. Componentes potencialmente prejudiciais podem acarretar em hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, efeitos mutagênicos, proliferativos, dentre outros (VEIGA et al., 2005).

Estudos realizados por Claudino (2013) demonstraram a citotoxicidade dos seguintes derivados vegetais das partes aéreas da *B.trimera*: EAcBt, uma fração obtida por extração em fase sólida a partir dele (EFSBt3) e do OE, nas linhagens celulares HepG2 (hepatocarcinoma humano), SiHa (câncer cervical), C33A (câncer cervical infectado por HPV-16) e MRC-5 (fibroblastos normais de pulmão humano). O presente trabalho prossegue na investigação fitoquímica de *Baccharis trimera* (Less.) DC. e avalia a citotoxicidade de uma flavona obtida a partir de EFSBt3 (eupatorina), do OE e suas frações e componentes ( $\alpha$ -humuleno, trans-cariofileno, óxido de cariofileno), morte e ativação de via de apoptose causada pela eupatorina, pelo OE e seus componentes.

## **1.2 *Baccharis trimera* (Less.) DC.**

*Baccharis trimera* (Less.) DC. (Figura 1) é uma espécie vegetal de amplo uso tradicional e nativa do Brasil. O gênero *Baccharis* é um dos maiores em número de espécies na família Asteraceae, sendo representado por mais de 500 exclusivamente do continente americano, distribuídas desde o sul dos Estados Unidos da América até a Argentina e Chile (ABAD; BERMEJO, 2007; GIULIANO, 2001). *Baccharis trimera* (Less.) DC. é um subarbusto perene com caules alados (cladódios) com ramos verdes de expansões trialadas, com 50-80 cm de altura. É conhecida popularmente como carqueja, carqueja-amargosa, carqueja-do-mato, carquejinha, sendo nativa do sul e sudeste do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002).

**Figura 1-** Exemplar de *Baccharis trimera* (Less.) DC. presente no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas – UNESP/Araraquara-SP



Legenda: A- Subarbusto perene com ramos verdes de expansões trialadas; B- ramos floridos.

Fonte: Autora.

As indicações de uso popular descritas na literatura incluem: digestivo, tratamento de gastrites e úlceras, inflamações, reumatismo, diabetes, doenças renais, doenças hepáticas, doenças do intestino, depurativo do sangue, lepra e cicatrização de feridas; a forma de preparo mais citada é a infusão (AGRA et al., 2007; CORREA, 1931; DIAS et al., 2009; MACEDO et al., 2007; MORS et al., 2000; NUNES et al., 2003).

Estudos fitoquímicos das partes aéreas da planta resultaram no isolamento e/ou na identificação de diversos metabólitos secundários, incluindo: flavonoides (HERZ et al., 1977; SUTTISRI et al., 1994; SIMÕES-PIRES et al., 2005a; MENEZES et al., 2016); diterpenos, principalmente do tipo clerodânico (KUROYANAGI et al., 1985; GIANELLO et al., 2000; JANUÁRIO et al., 2004; GARCIA et al., 2014); derivados do ácido quínico (SIMÕES-PIRES et al., 2005b); saponinas (GENÉ et al., 1996); monoterpenos e sesquiterpenos componentes do óleo essencial das partes aéreas (LAGO et al., 2008a; LAGO et al., 2008b; SILVA et al., 2006;).

Atividades exibidas por extratos, frações ou substâncias isoladas das partes aéreas de *B. trimera* incluem: ações anti-inflamatória e analgésica (GENÉ et al., 1992); inibição dos efeitos de venenos de cobras (JANUÁRIO et al., 2004; LEITE et al., 2007); ação antimicrobiana em *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis* (AVANCINI et al., 2000; AVANCINI et al., 2008; BETONI et al., 2006); ação antiprotozoária em *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* (LUIZE et al., 2005); ação antioxidante; ação antiulcerogênica (DIAS et al., 2009; SIMÕES-PIRES et al., 2005b); e redução do nível sérico de glicose (OLIVEIRA et al., 2005).

*B. trimera* não mostrou atividade mutagênica quando foi investigado o produto de infusões de caules alados em células de medula óssea de ratos (PERON, 2008). Foi demonstrado que o produto da infusão (chá) das folhas de *B. trimera* possui efeito mutagênico dose-dependente em células vegetais e humanas. Quando em menor dose, causou aumento de anomalias no ciclo mitótico das células da raiz de *Allium cepa* L., e em dose 10 vezes mais concentrada inibiu a divisão celular, sendo que em ambas doses ocorreram anomalias na interfase. Além disto, em linfócitos humanos causou anomalias cromossômicas e não inibiu a divisão celular (PINHO, 2008).

Foi observado efeito antígenotóxico no sangue de ratas adultas submetidas a tratamento com o extrato aquoso de *B. trimera*, o que protegeu as células contra danos oxidativos de ácido nucleico induzidos por peróxido de hidrogênio, o que provavelmente decorre da ação antioxidante exibida pelo extrato. No mesmo experimento, pelo Ensaio



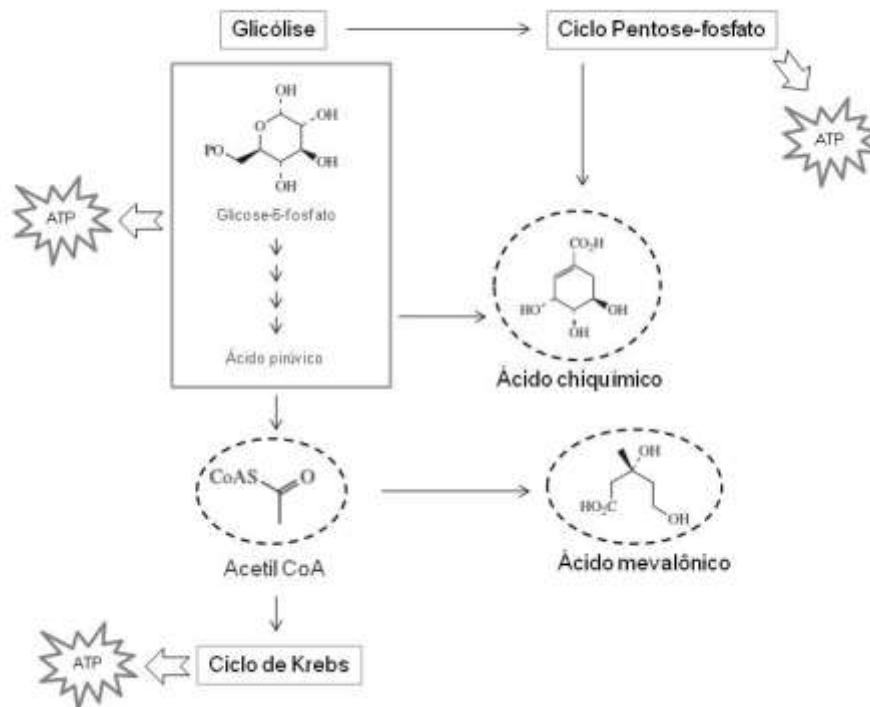
Cometa não foram demonstrados efeitos genotóxicos no sangue e amostras de fígado (RODRIGUES et al., 2009). O estudo de Nakasugi e Komai (1998) demonstrou a atividade antimutagênica do extrato metanólico das partes aéreas de *B. trimera*.

### **1.3 Metabólitos secundários**

Flavonoides, alcaloides, OE, taninos, antraquinonas, esteroides, carotenoides e outros. A diversidade dos metabólitos secundários produzidos pelas espécies vegetais acompanha um largo portfólio de estruturas químicas geralmente complexas que são alvos de estudo e fontes para o desenvolvimento de novos tratamentos de afecções e manutenção do bem estar físico como um todo.

O metabolismo secundário é construído a partir do metabolismo primário, tendo o fornecimento de energia e metabólitos intermediários para o seu desenvolvimento a partir dos processos de glicólise, ciclo de Krebs e ciclo das pentoses-fosfato, conforme exposto na Figura 2.

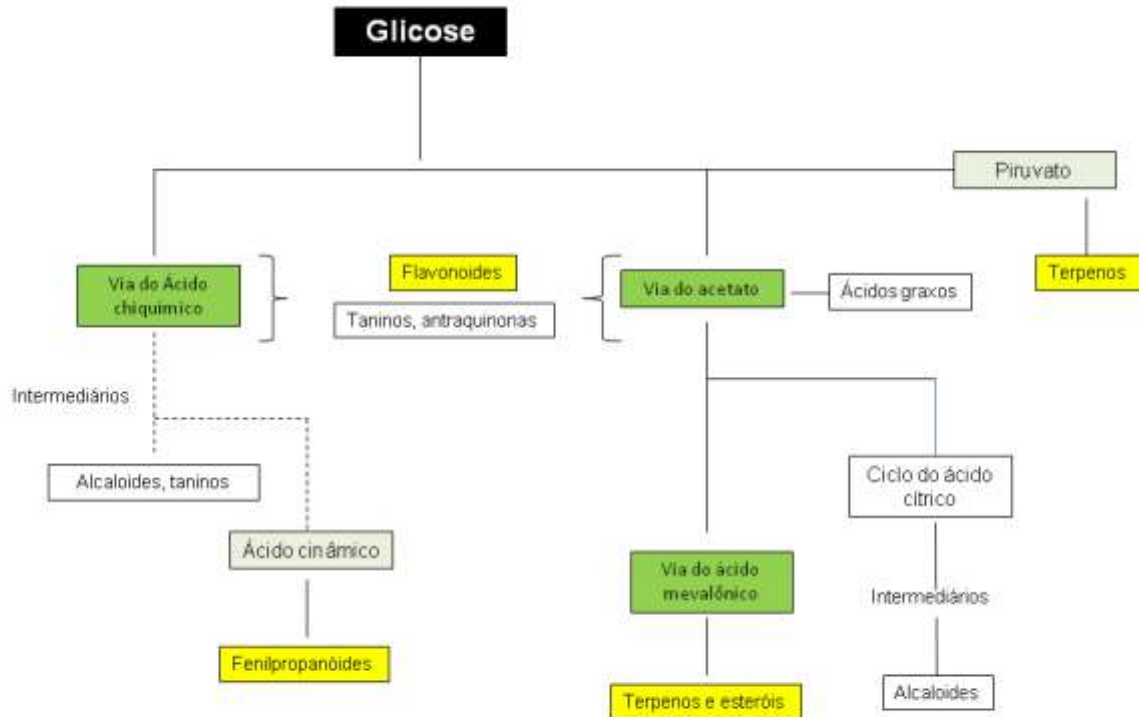
**Figura 2 - Correlação entre metabolismo primário e metabolismo secundário**



Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

O metabolismo secundário, diferentemente daquele dito primário cujas funções são produção energética e biossíntese de substâncias, diz respeito a micromoléculas produzidas em menor escala, com especificidade e funções adaptativas. Isto é bem embasado quando analisada a complexidade estrutural das moléculas e uma biossíntese programada por muitos pares de bases de DNA, dependendo alta taxa metabólica para perdurar frente à seleção natural (WILLIAMS et al., 1989). Suas principais vias de produção são as vias do ácido chiquímico, ácido mevalônico e do acetato, destacados pela cor verde na figura 3. Em destaque amarelo constam os flavonoides que são um grande grupo de metabólitos secundários no qual se encontra a flavona eupatorina, e os terpenos e fenilpropanoides, constituintes dos OE.

**Figura 3** - Resumo da biossíntese de metabólitos secundários



Fonte: Adaptado de SIMÕES et al., 2010.

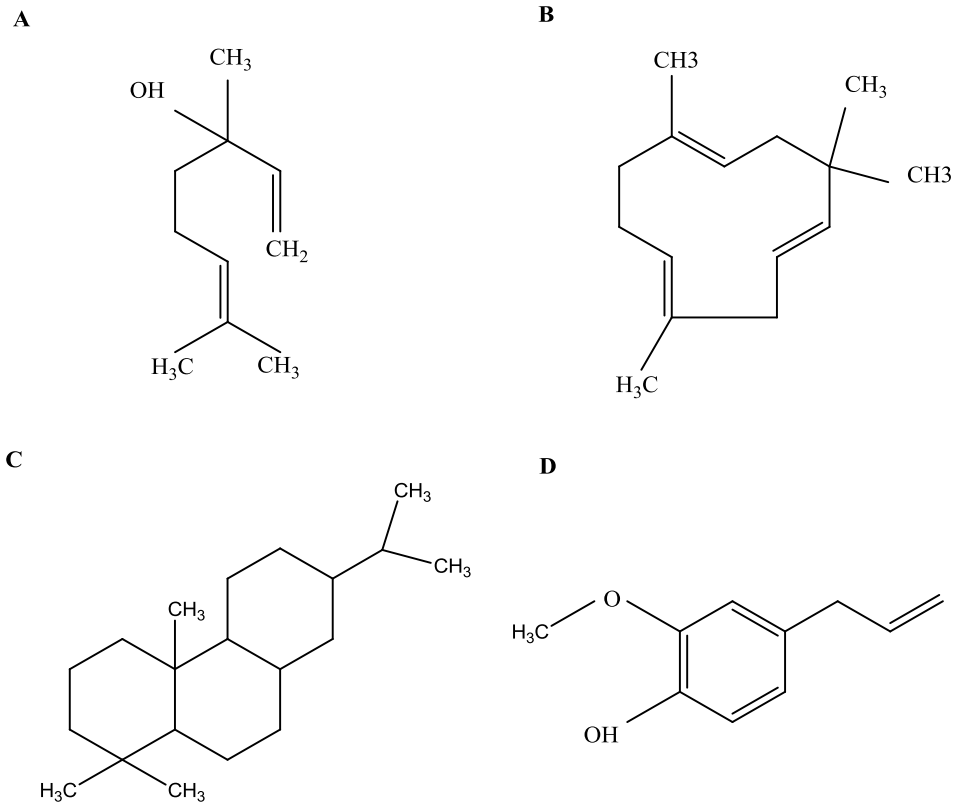
Metabólitos secundários podem ser produzidos por mais de um órgão da planta, podem ser translocados e geralmente são armazenados em vacúolos quando hidrofílicos, ou em glândulas ou associados a outros componentes mais hidrofóbicos (ex. membranas fosfolipídicas) quando possuem característica mais lipofílica. Sua produção sofre influência das exigências do ambiente e, portanto, seus perfis químicos podem variar de acordo com o ciclo circadiano, necessidades, características genéticas e nas diferentes partes do vegetal. Ao final, serão utilizados ou apenas degradados.

### 1.3.1 Óleos essenciais

No desenvolvimento de medicamentos e pesquisa por moléculas bioativas, algumas características são interessantes do ponto de vista da farmacocinética e farmacodinâmica no que diz respeito à relação estrutura-atividade. Dentre elas estão a polaridade, isomeria, características eletrônicas, complexidade de moléculas (número de grupos funcionais, esqueleto carbônico, massa molecular, estereoquímica) e possibilidade de modificação molecular. Os OE possuem caráter lipofílico, compatível com membranas biológicas, quiralidade que está diretamente relacionada à interação com os receptores celulares e amplo espectro de grupos funcionais passíveis de transformações químicas (SOUSA 2005).

Os OE caracterizam-se por serem misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, e que pode possuir uma variedade grande de constituintes tais como alcoóis simples e terpênicos, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, furanos, peróxidos e outros. A figura 3 exemplifica classes de constituintes principais dos óleos voláteis. Quimicamente são compostos por terpenos, dentre eles monoterpenos, sesquiterpenos e, às vezes, diterpenos de baixa massa molecular, e fenilpropanoides, tendo sua origem a partir dos ácidos mevalônico (ou via da triose-piruvato) e cinâmico, respectivamente (SIMÕES et al., 2010).

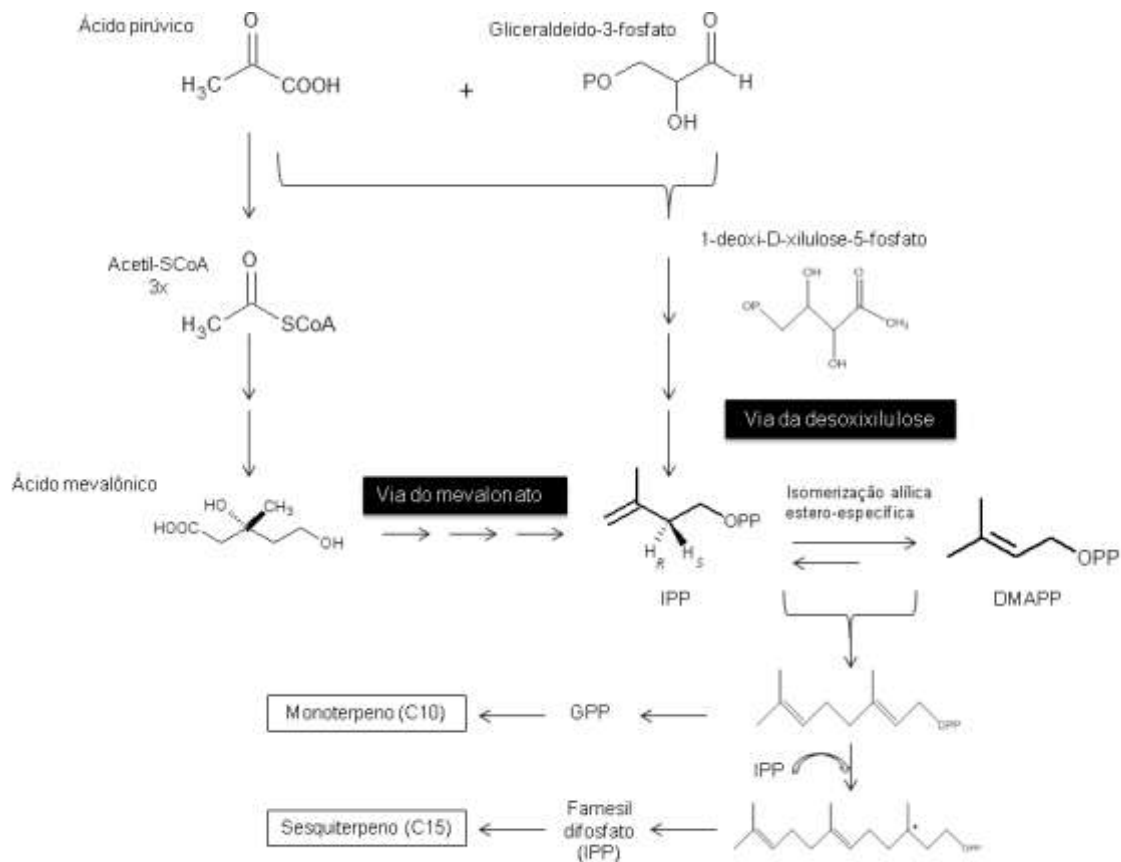
**Figura 4** - Exemplos de monoterpreno, sesquiterpreno, diterpreno e fenilpropanoide



Legenda: A- Linalol (monoterpreno); B-  $\alpha$ -humuleno (sesquiterpreno); C- diterpreno (abietano); D- fenilpropanoide (eugenol).

Os terpenos são formados por unidades isoprênicas (5C). O acetoacetyl-CoA se condensa com acetyl-CoA e, após hidrólise e redução, se forma o mevalonato. A partir do mevalonato são formadas as unidades isoprênicas ativas (isopentenilpirofosfato, IPP). O ácido pirúvico, vindo da glicólise, se une ao gliceraldeído-3-fosfato formando intermediário da via da desoxixilulose ou via da triose-piruvato, também levando à formação do IPP. Reações de isomerização alílica estereoespecíficas formam o dimetilalil fosfato (DMAPP), a partir do qual o acoplamento cabeça-cauda levará à formação do geranyl-difosfato (GPP). Reações de polimerização envolvendo o IPP formarão estruturas de cadeias crescentes em cinco átomos de carbono, tais como o farnesil-difosfato – FPP, resultando, por exemplo, em sesquiterpenos (C15) (figura 5).

**Figura 5** - Biossíntese de terpenos: monoterpenos e sesquiterpenos



Fonte: Adaptado de DEWICK et al., 2010.

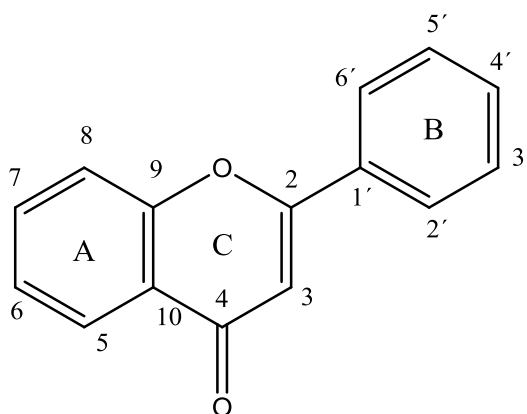
Muitos são os exemplos que podem ser citados para ilustrar a atividade de OE e seus componentes sobre as células, por exemplo, substâncias como o D-limoneno (monoterpeno) demonstraram atividade contra a carcinogênese mamária (CROWELL et al., 1992),  $\alpha$ -bisabolol (sesquiterpeno) demonstrou citotoxicidade em várias linhagens (por exemplo, MCF-7), e o óleo essencial de *Tagetes erecta* L. que afetou as células de carcinoma de cólon (HT29), MCF-7, glioblastoma humano (U343, U251, MO59J e outras) no trabalho de Oliveira e colaboradores (2005). O estudo de Legault (2003) demonstrou a atividade citotóxica frente à células tumorais (câncer de mama, adenocarcinoma prostático, carcinoma de língua, adenocarcinoma de cólon) superior às normais (fibroblastos), atribuindo parte desta ação ao  $\alpha$ -humuleno, embasados por trabalhos que tratam do  $\alpha$ -

humuleno em processos de apoptose e constataam altos níveis de espécies reativas de oxigênio e citocromo b (LEGAULT et al., 2003; SUZUKI et al., 1999). Ainda mais interessante e convergindo ao realizado neste presente trabalho, Sharma e sua equipe verificou a citotoxicidade do OE de *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) W. Watson em diversas linhagens celulares, inclusive HepG2, tendo encontrado resultados promissores e  $Cl_{50}$  entre 4 e 80  $\mu\text{g/mL}$  (DE SOUSA 2009). Os mecanismos de ação dos OE sobre células tumorais englobam a ativação de vias intrínsecas e extrínsecas da apoptose.

### 1.3.2 Flavonoides

São compostos fenólicos constituídos por núcleo fundamental difenilpropano (figura 4) e de origem biossintética mista (vias do chiquimato e acetato). Os flavonoides possuem grande diversidade estrutural e funções, a exemplo da proteção contra agressões do ambiente (luz, animais, fungos, vírus e bactérias), atração de polinizadores, atividade antioxidante, inibição de enzimas, controle hormonal e outros (SIMÕES et al., 2010).

**Figura 6** - Núcleo fundamental difenilpropano

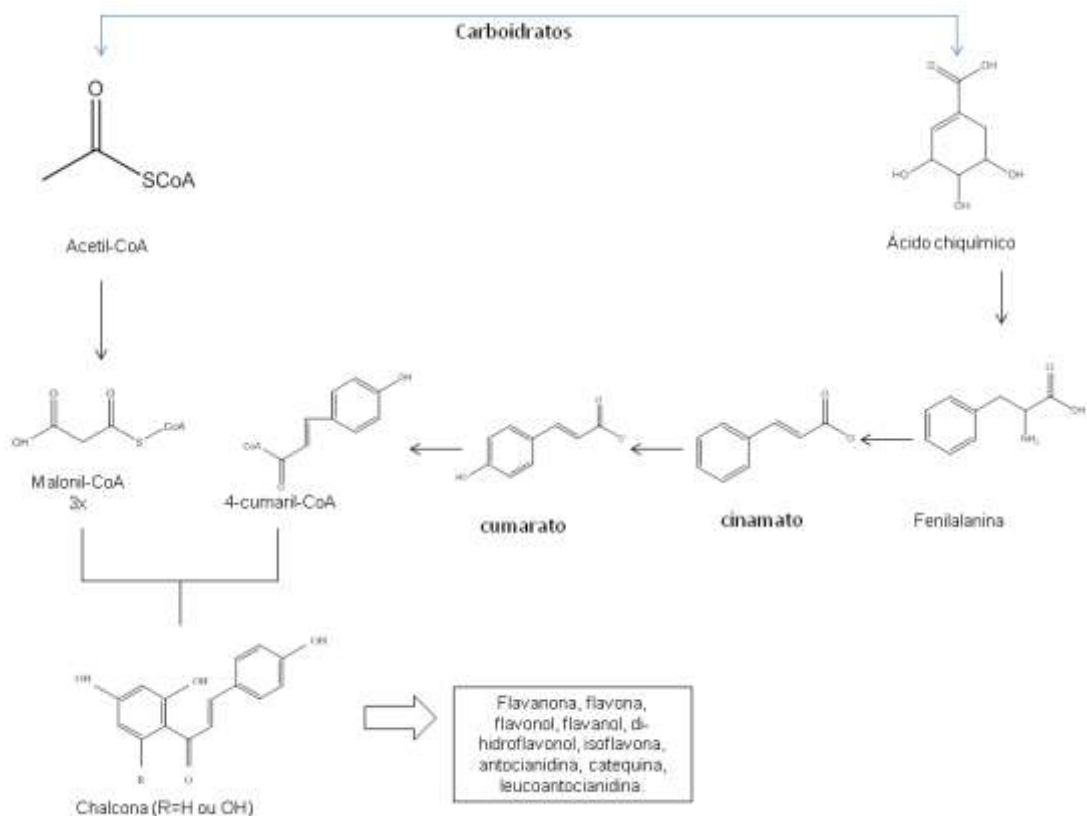


São constituídos por uma grande variedade de classes, dentre as quais estão os flavonóis, flavonas, flavononas e catequinas, e apresentam copiosas atividades biológicas

comprovadas e ilustradas pelo poder antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, anti-viral e hormonal.

Sua biossíntese decorre de via mista: ácido chiquímico e acetato (figura 7). A partir do ácido cinâmico, originado a partir da fenilalanina, forma-se o ácido cumárico, responsável pelo anel B e ponte de 3 carbonos (grupo cinamoil ou cumaroil), enquanto que a via do acetato é a responsável pela formação do anel A (grupo benzoil) do esqueleto dos flavonoides (SIMÕES et al., 2010).

**Figura 7** – Esquema simplificado da biossíntese de flavonoides



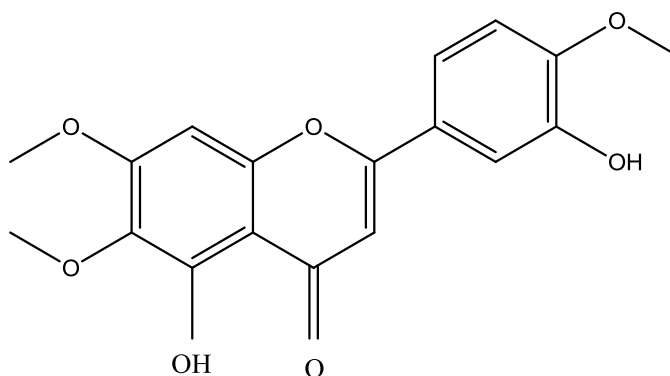
### 1.3.2.1 Eupatorina

A flavona eupatorina (figura 8) tem sido citada em trabalhos relacionados ao potencial de morte em células tumorais. Segundo Dolecková e colaboradores (2012), a flavona reduziu a viabilidade celular em linhagens de câncer de mama, mieloma múltiplo,



leucemia pró-mielocítica, adenocarcinoma cervical, e colaborou com a atividade antiproliferativa do extrato clorofórmio de *Orthosiphon stamineus* Benth. em células tumorais, induzindo morte por apoptose. Este tipo de morte também foi constatado no estudo de Estevéz e colaboradores (2014), que envolveu linhagens leucêmicas humanas mielóide e linfóide.

**Figura 8:** Flavona eupatorina.



Também em linhagens de adenocarcinoma humano, a eupatorina se comportou como um agente antimitótico, inibindo a quinase Aurora B, causando aneuploidia e citocinese anormal (SALMELA et al., 2012). Já na linhagem tumoral de mama MDA-MB-468 foi seletiva em comparação à célula normal provavelmente por ação no metabolismo de proteínas CYP1 super expressas em tumores (ANDROUTSOPOULOS et al., 2008).

Além disso, extratos contendo eupatorina apresentaram atividades como antioxidante (AKRAM et al., 2015), anti-inflamatória (SAIDAN et al., 2015) e antiangiogênica (DOLECKOVÁ et al., 2012).

#### 1.4 Técnicas cromatográficas

As técnicas cromatográficas tem sido relatadas desde meados de 1900 com as experiências do botânico russo Mikhael Semenovitch Tswett. Foram aprimoradas com o

correr dos anos e hoje podem ser utilizadas para a análise, separação e quantificação de componentes químicos (COLLINS et al., 2011). A cromatografia se pauta em técnicas físico-químicas que permitem a interação diferencial das espécies químicas através de duas fases, uma estacionária e outra móvel. No processo da cromatografia líquida podem ser utilizadas técnicas clássicas que envolvem colunas de vidro empacotadas com fases estacionárias sólidas que são percorridas por fases móveis, sendo o fluxo gerado por baixa pressão ou apenas pressão atmosférica, ou colunas de material mais resistente e inoxidável, empacotadas com partículas menores através da qual percorre o solvente sob alta pressão, designada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Se a fase estacionária está disposta sobre uma superfície plana e sólida, desenvolve-se a CCD (COLLINS et al., 2011).

Os modos de bombeamento em CLAE podem ser do tipo isocrático, quando mantém-se constantes as proporções de componentes da fase móvel, ou gradiente, quando necessita-se alterar a composição para alcançar melhor níveis de separação. Após a injeção, os analitos são separados conforme eluem pela coluna e interagem com a fase móvel e a estacionária. A seguir, o acoplamento de instrumentos analíticos independentes, tais como EM, UV e RMN, permitem a detecção dos componentes eluídos através destas técnicas hífenadas de cromatografia líquida (SNYDER et al., 2010). Fases móveis compostas por gás inerte constituem a CG (COLLINS et al., 2011). A técnica de CG é bastante indicada quando se necessita separar e analisar misturas voláteis com vários componentes. No entanto, ainda que os componentes sejam detectados, apenas o dado referente ao  $t_R$  (ou IR) de seus picos pode não ser suficiente ou ainda sugerir uma identificação equivocada (ARDREY, 2003). O  $t_R$  diz respeito ao tempo em que o analito se encontra no sistema cromatográfico, ou seja, antes de ser eluído. Quando as condições cromatográficas são mantidas constantes, os  $t_R$  também se mantêm. No entanto, pequenas alterações nos componentes do sistema ou condições cromatográficas podem levar a variações neste tempo. Em vista disto, podem ser injetados padrões de hidrocarbonetos que terão fixos os IR e o analito será incluído em um sistema com valores antes e após seus IR.

Os sistemas de IR podem ser, por exemplo, Kovats. Quando modificado para eluição com gradiente de temperatura, tem-se o Van Den Dool and Kratz (HUBSCHMANN, 2015).

Neste trabalho, o OE e suas frações foram submetidos à análises por CG-DIC e CG-EM. No CG-DIC, o gás de arraste passa através da chama de gás hidrogênio e compostos eluídos juntamente com a fase móvel serão queimados e, havendo ali compostos orgânicos, a chama os queimará resultando em uma corrente elétrica que servirá de base para a detecção e quantificação do produto eluído (LANÇAS, 1993). Para o CG-EM, a amostra é inserida e ocorre a ionização. Os íons formados são separados de acordo com a relação massa/carga, e esta técnica torna-se bastante útil e eficiente na identificação de compostos voláteis e com certa estabilidade térmica, envolvidos em uma mistura.

## **1.5 Câncer**

### **1.5.1 Plantas e o câncer**

Em linhas gerais, a terapêutica da doença neoplásica tem se traduzido ao longo das décadas na ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. A possibilidade de associação destes tratamentos por vezes aponta um melhor prognóstico, ainda que muitos tipos de tumores não sejam tão sensíveis.

Alcaloides isolados da vinca, destinados ao tratamento de linfoma de Hodgkin e sarcoma de Kaposi, bem como o isolamento de paclitaxel (diterpeno) a partir das cascas de *Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt, capaz de regredir cânceres de mama e ovário (MANS et al., 2000) e ainda substâncias extraídas de *Podophyllum peltatum* L. e *P. emodi* Wall. ex Hook.f. & Thomson utilizadas no tratamento de melanomas e outros (etoposídeo), demonstram o prestígio das espécies vegetais como fonte para a descoberta de substâncias que tenham a habilidade de impedir, reverter ou prevenir o processo carcinogênico (SONG et al., 1999; SPORN et al., 2000; BRANDÃO et al., 2010). Com relação ao desenvolvimento de fármacos para o câncer, o trabalho de Newman e Craag (2010) conclui que, desde 1940 até o ano de publicação do trabalho, de 175 estruturas desenvolvidas cerca de 75% tinham

uma origem diferente da sintética, sendo aproximadamente 49% destas semelhantes às moléculas de origem natural ou diretamente derivadas desta fonte.

Contemporaneamente, há uma nova tendência para o tratamento de tumores, baseada na destruição de células tumorais sem afetar fortemente células saudáveis. Para isto, buscam mecanismos que induzam processos apoptóticos, mecanismos de defesa, inibam angiogênese e outros e, uma vez mais, a gama de estruturas disponíveis nas espécies vegetais pode ser a fonte para a descoberta de novas terapias de combate ao câncer (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

### **1.5.2 Biologia do câncer**

O câncer, processo crônico no qual células anormais apresentam um crescimento desordenado e descontrolado invadindo tecidos e órgãos, é considerado a segunda maior causa de mortes no mundo e sua incidência tem aumentado anualmente (REDDY et al., 2003). Este aumento é atribuído a interação de fatores externos, como hábitos, costumes, estilo de vida e meio ambiente, e fatores internos como a pré-disposição genética principalmente nos genes supressores de tumor (FEUER et al., 2000).

O desequilíbrio entre a atividade de genes supressores de tumor e a formação de oncogenes a partir de proto-oncogenes pode acarretar em um desenvolvimento anormal das células, resultando na expressão de oncoproteínas que favorecem a proliferação celular incomum. A carcinogênese, processo de formação de câncer, se divide em 3 etapas, sendo: iniciação (células normais são expostas ao agente carcinogênico), promoção (células já expostas ao agente persistem e tem início a etapa pré-neoplásica), e progressão, fase na qual as células já possuem crescimento anormal (NERURKAR, RAY 2010).

Células neoplásicas distinguem-se de células normais pela proliferação descontrolada, dediferenciação e perda de função, invasividade e metástase. As alterações que levam ao aumento na quantidade das células tumorais decorrem da inativação de genes de supressão tumoral ou da transformação de proto-oncogenes em oncogenes, o que

é capaz de conferir autonomia de crescimento nestas células. Alterando sistemas como aqueles dos fatores de crescimento, transdutores do ciclo celular (ex. ciclinas e quinases dependentes de ciclinas), expressão de telomerase, formação de vasos sanguíneos e mecanismos apoptóticos, pode ocorrer a multiplicação celular descontrolada. Com relação à invasividade, células normais possuem relações espaciais umas com as outras devido a fatores de sobrevivência específicos. Por sua vez, células cancerosas perdem estas restrições e, não obstante, secretam enzimas capazes de desintegrarem a matriz extracelular permitindo que elas se movam (ALBERTS et al., 2010).

A diferenciação celular é um processo capaz de regular a expressão de genes relacionados a funções específicas dos tecidos, além de controlar a proliferação celular. No processo de carcinogênese, as alterações genéticas e epigenéticas resultam na perda da regulação sobre a diferenciação e a multiplicação celular, de forma que os clones não sofrem diferenciação terminal completa e mantém a imortalidade e a capacidade de resposta ao estímulo proliferativo (NAVES et al., 2000). Estas condições demandam novas exigências metabólicas, causando aumento na síntese de adenosina trifosfato (ATP) e na geração de macromoléculas tais como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. As alterações acarretam em um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio que podem desencadear danos oxidativos, fomentando alterações genéticas. Ainda que o organismo disponha de arsenal metabólico para o combate ao estresse oxidativo e ainda que moléculas antioxidantes possam ser obtidas de fontes externas (por exemplo, ácido ascórbico e compostos fenólicos), é possível que exista um desequilíbrio suscitando mutações que induzem a célula a processos de apoptose ou proliferação permanente (KLAUNIG et al., 2010; NOGUTI et al., 2013).

Metástases são tumores originados a partir de células liberadas do tumor inicial e que atingiram outros locais pelos vasos sanguíneos ou linfáticos. Este processo pode acontecer tanto no início quanto no decorrer da coexistência com o cancro através de prováveis micrometástases e a complexa relação entre processos de invasão, colonização e extravasamento das células para outros tecidos (DE SOUSA 2015). Células que

metastatizam carregam mudanças genéticas responsáveis por alterarem as respostas aos fatores reguladores de tecidos normais, e desta forma se estabelecem fora de seu local de origem.

### **1.5.3 Morte celular**

Diferentemente daquilo que se acreditava em épocas remotas, os mecanismos de morte celular não são desencadeados apenas em situações de agressão às células, como infecções e lesões, mas podem ser programados frente a estímulos intracelulares e extracelulares que possam ser prejudiciais. A morte celular também interessa na eliminação de células desnecessárias, formação embrionária ou em casos de mau funcionamento. Dentre os processos com maior destaque, e foco deste trabalho, estão apoptose e necrose, ainda que existam outros mecanismos descritos tais como a mitose catastrófica e autofagia (ALBERTS et al., 2010).

#### **1.5.3.1 Apoptose**

A apoptose é um tipo de morte celular programada com características morfológicas bastante particulares. Após processo de retração a célula perde aderência, o DNA se fragmenta e a membrana forma prolongamentos. Estes prolongamentos tendem a aumentar e se romper em estruturas que contém material, formando os corpos apoptóticos, que serão prontamente fagocitados por macrófagos impedindo o processo inflamatório. Muitos podem ser os marcadores para este processo, dentre os quais estão técnicas de reconhecimento de núcleos apoptóticos com nucleotídeos marcados, uso de marcadores carregados que se relacionarão com o potencial elétrico da membrana da célula frequentemente em apoptose e a fosfatidilserina, um fosfolípideo de membrana localizado internamente e deslocado para a membrana externa em células apoptóticas, capaz de inibir proteínas indutoras de citocinas inflamatórias e marcada por Anexina V em ensaios de tipo de morte (GRIVICICH et al., 2007; ALBERTS et al., 2010)

As caspases são enzimas sinalizadoras para a apoptose, sendo ativadas após a morte celular e clivando substratos com resíduos de aspartato, causando a fragmentação do núcleo. São sintetizadas como precursoras inativas (procaspases) e a ativação por clivagem proteolítica é dependente de caspases já ativas (GRIVICICH et al., 2007; ALBERTS et al., 2010).

Há 2 vias de ativação da apoptose: vias extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca se ativa a partir da ligação de fatores específicos aos receptores do fator de necrose tumoral (rTNF), receptor *Fas* e procaspases iniciadoras. A via intrínseca pode ser desencadeada pelos fatores estimulantes (hipóxia, danos genéticos) sob a mitocôndria. Neste caso, proteínas mitocondriais são liberadas no citosol podendo ativar caspases. A partir de então, altera-se o potencial da membrana mitocondrial interna ( $\Delta\psi$ ) e de sua permeabilidade, comprometendo a homeostasia celular e aumentando a liberação de espécies reativas de oxigênio. Esta alteração de permeabilidade é a responsável direta pelo rompimento da organela, que acumulou líquido em sua matriz, e foram liberadas proteínas estimulantes da apoptose (pró-apoptóticas) para o citoplasma. As espécies reativas oxidam macromoléculas e induzem caspases (GRIVICICH et al., 2007, ALBERTS et al., 2010). A apoptose relaciona aos processos tumorais pois os cancros possuem resistência a ele. Uma importante proteína liberada é o citocromo c, que se liga à proteína de ativação de procaspase (Apaf-1), formando o apoptossomo, que recrutará caspases ativadoras (GRIVICICH et al., 2007).

Em alguns casos, a via extrínseca recruta a via intrínseca para a ampliação do sinal de morte programada, o que ocorre através de proteínas *Bcl-2* (subfamílias *BH123* e *BH3-apenas*), que também podem desencadear respostas antiapoptóticas. É natural e saudável que exista equilíbrio entre a expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas. As proteínas *Bcl-2*, por exemplo, podem impedir a ativação da via intrínseca por reduzirem a liberação de citocromo c, enquanto que as proteínas das subfamílias *BH123* (*Bax* e *Bak*) são pro-apoptóticas, podendo liberar cálcio no citosol e ativar a via intrínseca, bem como estimular a liberação do citocromo c. Já as proteínas da subfamília *BH3-apenas* (*Bid*, *Bim*, *Puma*)

estimulam os desencadeadores proteicos da apoptose. A proteína supressora de tumor p53 aumenta sua expressão em situações de danos não reparados ao DNA e se ativa, a partir deste estímulo, genes relacionados à transcrição proteínas *BH3-aptenas* para que seja ativada a via intrínseca da apoptose e ocorra a eliminação do risco iminente da formação de cancro (ALBERTS et al., 2010).

### **1.5.3.2 Necrose**

A necrose é um processo caracterizado por extravazamento de conteúdo celular e que desencadeia uma resposta inflamatória, causando injúria tecidual. Entre suas etapas estão a agregação da cromatina, perda de integridade de membrana e ruptura celular. O processo inflamatório gerado atinge células do entorno e as lesões podem ser irreversíveis, comprometendo outros tecidos (GRIVICICH et al., 2007).

### **1.5.4 Incidência**

Segundo dados da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, 12,7 milhões de novos casos e 7,6 milhões de mortes em decorrência do câncer foram apontadas para o ano de 2008, sendo o câncer de pulmão o mais comum (FERLAY et al., 2010).

Caracterizado como um problema de saúde pública, o câncer atinge países desenvolvidos e países em desenvolvimento, indistintamente (BRASIL, 2003). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa para 2012, também válida para 2013, era de 385 mil novos casos, excluindo-se o câncer de pele não melanoma. Entre as mulheres, segundo a estimativa, o tipo de câncer mais recorrente foi o de mama enquanto que, entre os homens, o de próstata (INCA, 2011). A Organização Mundial de Saúde estima que em 2030 o número de mortes em decorrência do câncer chegará a 17 milhões, existindo 27 milhões de casos incidentes da doença (INCA, 2011).



### **1.5.5 Fatores de risco**

O câncer é uma doença que decorre da fusão de fatores internos e externos que podem ser, respectivamente, o ambiente (radiação, alimentos), os costumes, vícios (álcool, tabaco), e condições imunológicas, alterações genéticas hereditárias ou metabólicas, dentre outras (DE SOUSA, 2015). Analisando sob este ponto de vista, além das frentes de combate à doença podem ser empregados meios de prevenção dos fatores de risco no dia-a-dia, através de mudanças diversificadas nos hábitos de vida.

### **1.5.6 Terapias de combate ao câncer**

Três métodos principais embasam o tratamento das neoplasias: procedimentos cirúrgicos, radioterapia e quimioterapia, e estes podem ser utilizados com fins curativos, paliativos ou profiláticos, isoladamente ou associados (GREENE, HARRIS, 2012; RANG et al, 2012).

O procedimento cirúrgico é bastante particular entre cada paciente, uma vez que depende do tamanho, estadiamento, resposta do paciente para recuperação pós-procedimento. A radioterapia combate a doença através de radiação ionizante, o que depende das características do cancro e do paciente, sendo difícil o controle de danos a qualquer outra célula de tecido adjacente normal. Atualmente é comum o uso de quimioterápicos combinados a fim de aumentar o efeito desejado e afetar negativamente a toxicidade. As principais classes são: antimetabólitos (5-fluoraciolo e outros), alquilantes (ciclofosfamida e outros), epipodofilotoxina (etoposídeo por exemplo), citotóxicos (doxorrubicina e outros), alcaloides derivados da vinca (vinblastina e outros), comptotecinas (irinotecano e outros), análogos de platina (cisplatina e outros), hormônios (tamoxifen e outros), inibidores da quinase (erlotinib e outros) e anticorpos monoclonais (bevacizumab e outros), de acordo com DE SOUSA (2015).

### **1.5.7 Anexina-V**

O princípio deste método se baseia na ligação da proteína anexina V à fosfatidilserina, localizada na parte externa da membrana plasmática durante o processo de apoptose como sinalização aos fagócitos (DUARTE et al., 2010).

### **1.5.8 Ensaio de exclusão de fluorocromos com Hoechst, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína**

O corante HO emite fluorescência quando se liga ao DNA corando os núcleos e durante as fases iniciais da apoptose é absorvido pelas membranas celulares. Enquanto íntegras, as membranas plasmáticas se mantêm impermeáveis ao iodeto de propídeo e, à medida em que a permeabilidade celular aumenta pelo avanço do processo de morte celular, o iodeto entra nas células. O diacetato de fluoresceína demarca as membranas celulares intactas e delimita o citoplasma, permitindo que sejam observadas suas diferentes morfologias. Desta forma, fica possível a verificação de células viáveis (citoplasma verde e núcleo azul completo), células em apoptose precoce (núcleo azul condensado e fragmentado), apoptose tardia (núcleo vermelho condensado e fragmentado) e em necrose (núcleo intacto e vermelho) (HASHIMOTO et al., 2003).

# **OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O estudo teve por objetivo geral o fracionamento cromatográfico de derivados vegetais de partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. e a identificação de constituintes, a avaliação da citotoxicidade e estudo de morte em linhagens de células humanas normal (MCF-10) e tumorais (MCF-7 e HepG2) tratadas com o OE, suas frações e componentes, além da flavona eupatorina isolada de EAcBt.

### 2.2 Objetivos específicos

- Fracionamento cromatográfico das frações EFSBt3 e EFSBt4 do EAcBt de *B. trimera* para isolamento de eupatorina;
- Identificação de eupatorina por técnicas cromatográficas e espectrométrica;
- Fracionamento cromatográfico do OE e identificação de seus componentes e dos componentes de suas frações;
- Avaliação da atividade citotóxica do OE de *B. trimera*, suas frações e seus componentes, e da eupatorina;
- Avaliação quantitativa da apoptose e necrose celular causada pela eupatorina, óleo essencial e seus componentes;
- Verificação da ativação da apoptose via caspase-3 pela eupatorina, OE e seus componentes.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais, reagentes e solventes

**Anexina V, IP:** Kit apoptose celular, Life technologies® (ThermoFisher Scientific®)

**Aparelho tipo Clevenger para hidrodestilação.**

**Colunas cromatográficas de bancada:**

coluna de vidro com 7 cm de diâmetro interno com adaptador para entrada para ar comprimido;

coluna de vidro com 5 cm de diâmetro coluna de vidro com com adaptador para entrada para ar comprimido;

coluna de vidro com 3 cm de diâmetro interno com adaptador para entrada para ar comprimido;

coluna de vidro com 2 cm de diâmetro interno com adaptador para entrada para ar comprimido;

coluna de vidro com 1 cm de diâmetro interno com adaptador para entrada para ar comprimido;

**Coluna cromatográfica CLAE:** Hypersil Gold® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm).

**Coluna cromatográfica CG:** Supelco SPB-5 (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

**Coluna cromatográfica CG:** SGE Analytical Science® EN-5MS (30 m x 0,25 x 0,25 mm).

**Cartucho para *clean-up*:** Phenomenex® modelo Strata™ C18 - E (15 x 10 mm; 55 µm).

**Caspase-3:** Kit Sigma-Aldrich®.

**Cromatografia em camada delgada:** Sílica Gel 60G Merck®;

**Cromatografia em coluna:** Sílica 0,2-0,5 mm Vetec®; sílica 40-63 µm Fluka Analytical®; sílica 63-200 Aldrich Chemistry®.

**Fases estacionárias para cromatografia em coluna e extração em fase sólida:**

**Sílica gel:** 0,074-0,250 mm J. T. Baker®; 0,040-0,063 mm MERCK®;

**Sílica C18:** 0,040-0,060 mm LiChroprep®;

**Hoechst:** Invitrogen®, ThermoFisher Scientific®.

**Meio de cultura:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Low glucose, Sigma-Aldrich®

**Meio de cultura – Suplementação:** Soro fetal bovino (Fetal bovine Serum) - Sigma-Aldrich®

**Meio básico:** Tris-base, Invitrogen®

**Membranas:** 0,22 µm, Millipore®

**Solventes:**

**CCD, CC, EFS:** Qhemis® P.A;

**CLAE (incluindo pré-tratamento das amostras):** metanol grau cromatográfico J.T. Baker® e Sigma-Aldrich®.

**Água ultrapura:** obtida a partir de purificador Milli Q modelo Synergy®;

**Tripsina/EDA:** Inlab®

#### 3.2 Equipamentos

**Balança analítica:** MARTE® modelo AY220 (Max 220g; min 0,01; d=0,001).

**Balança analítica:** SARTORIUS® modelo TE2145 (Max 210g; min 0,01g)

**Balança semi-analítica:** GEHAKA® modelo BG 200 (máx 200g; min 0,025g; d = 0,001g).

**Bancada de fluxo laminar vertical:** PACHANE® nº 03505 modelo 050.

**Capela:** QUIMIS® modelo Q-216-11.

**Cromatógrafo em fase gasosa acoplado a EM:** Shimadzu® modelo QP2010 equipado com injetor automático AOC-5000 Shimadzu®, acoplado a espectrômetro de massas com analisador quadrupolo e ionização por elétrons.

**Cromatógrafo em fase gasosa acoplado a DIC:** Varian CP-3800, equipado com injetor automático Varian 8200 e detector de ionização em chamas (DIC).

**Cromatógrafo em fase líquida de Alta Eficiência (Perkin-Elmer® Flexar, modo analítico), constituído dos seguintes módulos:** sistema quaternário de bombeamento, injetor manual de 6 vias Rheodyne® com alça amostradora (*loop*) de 20 µL, detector PDA (190-700 nm), degaseificador, software Chromera® com microprocessador de dados.

**Espectrofotômetro UV-Vis:** modelo UV 1800 - Shimadzu®

**Espectrômetro de Massas:** modelo Micromass® Quattro Micro Tandem Quadrupole.

**Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:** Espectrômetro modelo Fourier Bruker® 7,0 T operando a 300 MHz para <sup>1</sup>H e a 75 MHz para <sup>13</sup>C.

**Estufa bacteriológica:** MARCONI® MA 032

**Estufa de secagem e esterilização:** FANEM® modelo 320-SE.

**Incubadora de CO<sub>2</sub>:** TECNAL® modelo TE-399.

**Microscópio óptico:** Olympus® modelo CKX41SF.

**Peagâmetro:** MARCONI® modelo MAPA200, série 081390709.

**Ultrassom:** UNIQUE®, modelo USC-2800; frequência: 40KHz .

### 3.3 Material vegetal

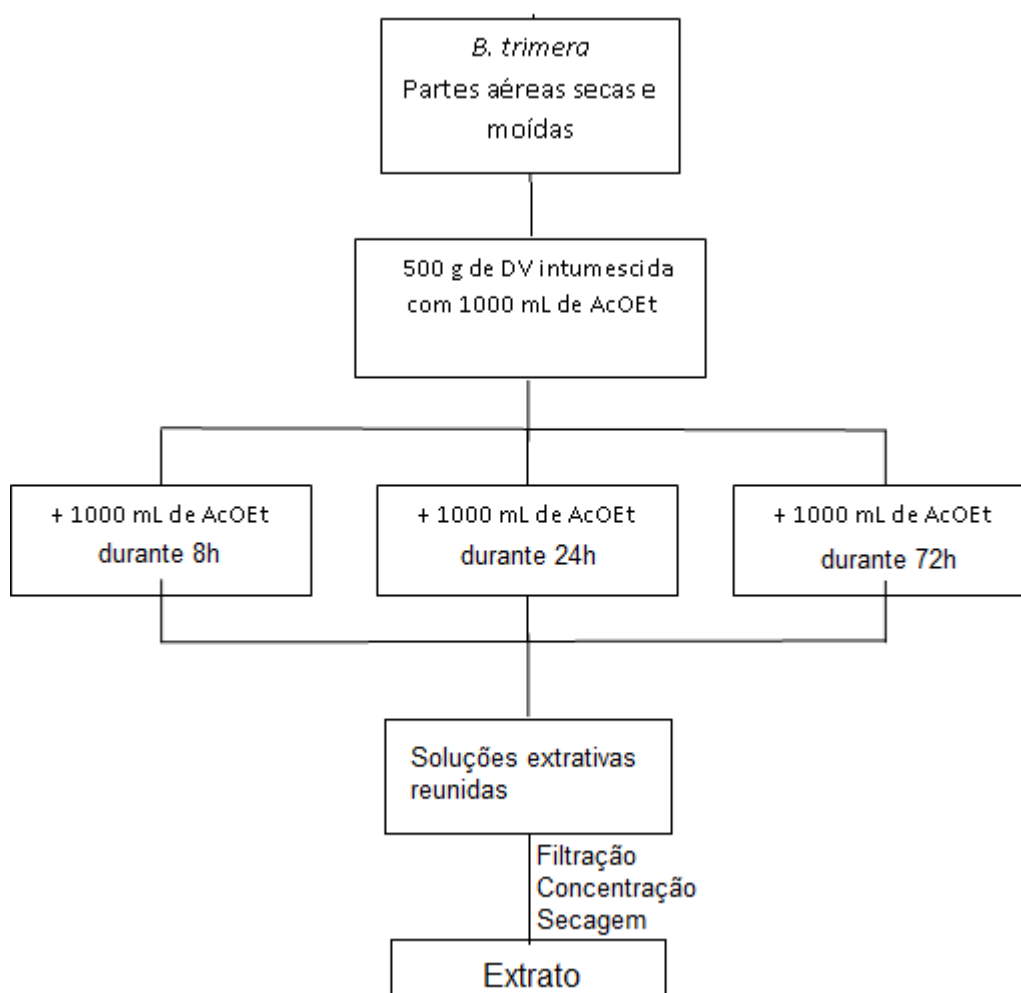
As partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. coletadas para a obtenção de EAcBt vieram do Horto de Plantas Medicinas e Tóxicas "Profa. Dra. Célia Cebrian de Araujo Reis" da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara (21°48'53,087"S 48°11'56,612"O). Os espécimes de *B. trimera* cultivados no Horto pertencem a uma variedade (cultivar) desenvolvida e fornecida pelo CPQBA-UNICAMP denominada "CPQBA-1" registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas tendo sido identificada pelo Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento do Laboratório de Farmacobotânica da FCF-UNESP. A exsicata de um espécimen está depositada no Herbário CPQBA sob número 1286. O OE utilizado neste trabalho teve origem de partes aéreas coletadas no CPQBA-UNICAMP (22°47'42,347"S 47°6'40,061"O), em 20 de outubro de 2014 pela manhã.

### **3.4 Obtenção de EAcBt**

A secagem do material se deu à 40° C em estufa com circulação de ar, sendo o material vegetal seco moído em moinho de facas. O método utilizado por Claudino (2013) está ilustrado pela figura 9. Foi utilizado o processo de maceração com aquecimento a 35° C, com agitação ocasional e renovação do líquido extrator. O procedimento foi realizado três vezes, utilizando um total de 1.500 g de DV. As soluções extrativas obtidas foram reunidas, filtradas em papel de filtro e concentradas em rota-evaporador sob pressão reduzida (230-540 mmHg) à 45° C. Finalmente, o extrato concentrado foi seco em capela sob fluxo de ar e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida. EAcBt seco foi armazenado em freezer.



**Figura 9** - Obtenção de EAcBt, segundo Claudino (2013)

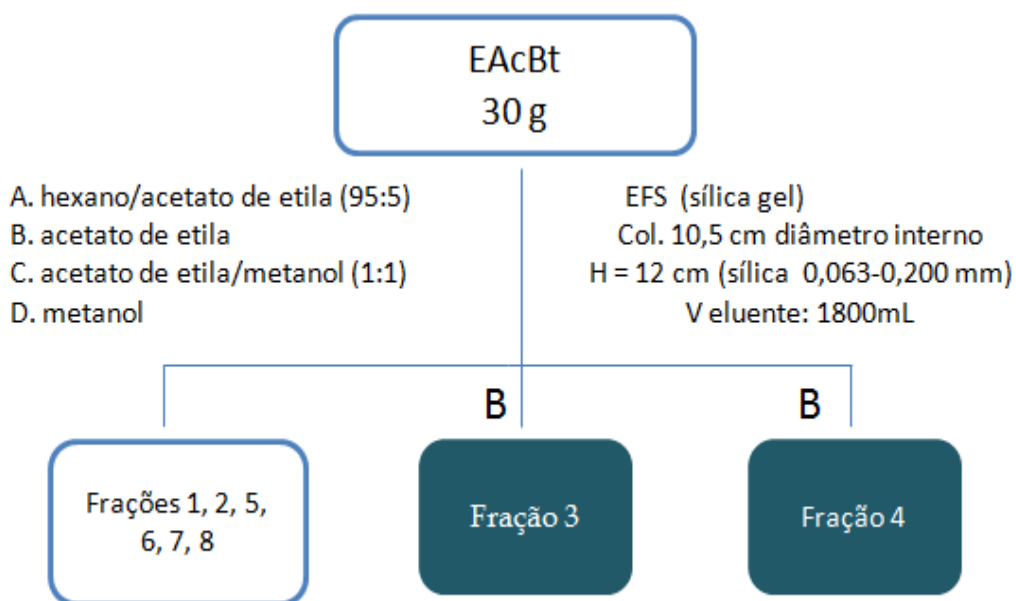


### 3.5 Obtenção de EFSBt3 e EFSBt4

O fracionamento do EAcBt de partes aéreas de *B. trimera* que resultou, dentre outras, nas subfrações EFSBt3 e 4, foi realizado por Claudino (2013), e tem suas etapas ilustradas na figura 10. As condições estabelecidas para a EFS que levaram à EFSBt3 e 4 foram: a) amostra - 30 g de extrato seco; b) fase estacionária - coluna de vidro de 10,5 cm de diâmetro, preenchida com 12 cm de sílica gel (63-200  $\mu\text{m}$ , Merck); c) fase móvel - 1. hexano/acetato de etila 95:5 (frações EFSBt1 e EFSBt2), 2. acetato de etila (frações EFSBt3

e EFSBt4), 3. acetato de etila/metanol (frações EFSBt5 e EFSBt6) e 4. metanol (frações EFSBt7 e EFSBt8); volume por eluente = 1.800 mL; volume coletado por fração = 900 mL.

**Figura 10** - Obtenção de EFSBt3 e EFSBt4, segundo Claudino (2013)



### 3.6 Fracionamento de EFSBt3 e EFSBt4

Inicialmente foi realizada uma cromatografia em coluna (CC1) utilizando 4,976g das frações EFSBt3 e EFSBt4, obtidas de acordo com CLAUDINO (2013). Utilizou-se uma coluna de vidro de 7 cm de diâmetro interno, preenchida com 20cm de sílica gel (0,040-0,063 mm). O empacotamento da coluna foi a seco e condicionou-se a sílica com 500,0 mL, correspondente ao volume morto, do primeiro eluente. A eluição ( $V_{\text{eluente}} = 1500,0$  mL) foi conforme consta na tabela 1:

**Tabela 1** – Fracionamento cromatográfico de EFSBt3 (CC1): eluentes

	<b>ELUENTE</b>	<b>PROPORÇÃO (% v/v)</b>
<b>1</b>	hexano : acetato de etila : isopropanol	90; 9,3; 0,7
<b>2</b>	hexano : acetato de etila : isopropanol	89; 10,2; 0,8
<b>3</b>	hexano : acetato de etila : isopropanol	87; 12,1; 0,9
<b>4</b>	hexano : acetato de etila : isopropanol	83; 15,8; 1,2
<b>5</b>	hexano : acetato de etila : isopropanol	75; 23,3; 1,7
<b>6</b>	hexano : acetato de etila : isopropanol	70; 28; 0,2
<b>7</b>	Acetato de etila	100
<b>8</b>	Metanol	100

Ao total foram coletadas 132 subfrações. As subfrações foram coletadas com volume de 100,0mL, à exceção das frações obtidas com MeOH, que foram coletadas em 4 frascos com volumes de 500,0mL (subfrações MeOH1, MeOH2, MeOH3 e MeOH4). As subfrações foram analisadas por CCD (Condição 1: Fase estacionária: Sílica gel; Fase móvel: hexano : acetato de etila 80:20 (v/v); revelador: Anisaldeído sulfúrico; Condição 2: Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

### **3.7 Fracionamento das subfrações originadas de CC1 por EFS**

As subfrações MeOH2, MeOH3 e MeOH4 (CC1) foram submetidas a CCD preparativa e/ou EFS (EFSn°2, EFSn°3, EFSn°4, EFSn°5, EFSn°6). A fase móvel utilizada em EFSn°2, EFSn°3, EFS n°4, EFSn° 5 e EFSn°6 é apresentada na Tabela 2.

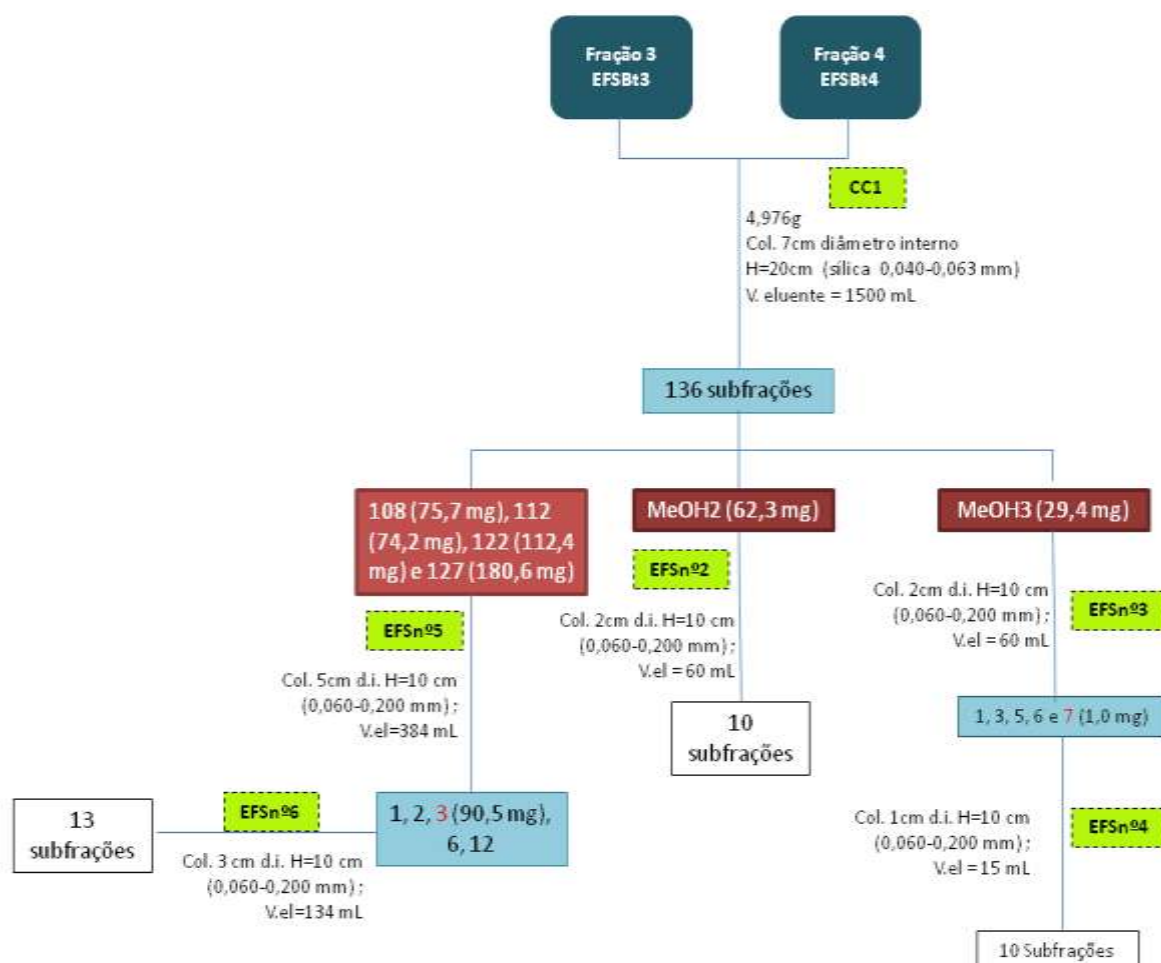
**Tabela 2** - EFSn°2, EFSn°3, EFSn°4, EFSn°5 e EFSn°6: relação entre eluentes e frações coletadas

	<b>ELUENTE</b>	<b>PROPORÇÃO</b>	<b>FRAÇÕES</b>
<b>1</b>	Hexano : acetato de etila	95:5	1
<b>2</b>	Acetato de etila	100	2 a 3
<b>3</b>	Acetato de etila : metanol	90:10	4 a 6
<b>4</b>	Acetato de etila : metanol	70:30	7 a 9
<b>5</b>	Metanol	100	10 (10 a 13 em EFSn°6)

A figura 11 condensa todas as etapas relativas ao fracionamento de EFSBt3 e 4, incluindo suas condições de eluentes, de suas subfrações e das subfrações obtidas pelos processos de EFS, cujos eluentes estão descritos na tabela acima (tabela 1). Nos quadros azuis da figura 11, a subfração em destaque na cor vermelha foi selecionada para outra etapa de EFS, enquanto que nos quadros grenás se encontram as subfrações selecionadas também para processos de EFS.

Também foi realizada CCD preparativa com as subfrações MeOH4 e massa remanescente de MeOH3 para a purificação de eupatorina.

**Figura 11** - Etapas de fracionamento cromatográfico a partir de EFSBt3 e 4.



### 3.7.1 EFSn°2 E EFSn°3

Utilizou-se 62,3mg da subfração MeOH2 obtida por CC1 para EFSn°2, e 29,4 mg de MeOH3 para EFSn°3. A coluna de vidro escolhida possuía 2 cm de diâmetro interno, preenchida com 10 cm de sílica gel (0,060-0,200 mm), tendo sido empacotada a seco e condicionada com 20,0 mL (volume morto) do eluente 1. O  $V_{\text{eluente}}$  correspondeu a 3 vezes o volume morto (60,0 mL). Foram recolhidas frações com 6 mL. Todas as subfrações obtidas por EFS ou CC foram secas em capela ou rotaevaporador e, em seguida, em dessecador com sílica gel sob vácuo. Após, foram armazenadas sob refrigeração em frascos fechados e analisadas por CCD para observação do perfil de separação alcançado. As condições de

análise foram: Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

### 3.7.2 EFSn°4

Para este procedimento foram utilizadas as subfrações 7, 8, 9 e 10 obtidas em EFSn°3. A cromatografia em coluna foi realizada com coluna de vidro de 1cm de diâmetro interno, preenchida com 10 cm de sílica gel 0,060-0,200 mm, sendo o  $V_{\text{eluyente}} = 15,0$  mL (3 vezes o volume morto) e tendo sido utilizados 5,0 mL (volume morto) do eluente 1 para o condicionamento da sílica utilizada no empacotamento a seco da coluna. Volume de coleta das frações = 5 mL. Todas as subfrações obtidas por EFS ou CC foram secas em capela ou rotaevaporador e, em seguida, em dessecador com sílica gel sob vácuo. Após, foram armazenadas sob refrigeração em frascos fechados e analisadas por CCD para observação do perfil de separação alcançado. As condições de análise foram: Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

### 3.7.3 EFSn°5

Este procedimento foi realizado utilizando-se as subfrações 108 (75,7mg), 112 (74,2 mg), 122 (112,4 mg) e 127 (180,6 mg), obtidas por CC1 e selecionadas a partir da avaliação dos perfis por cromatografia em camada delgada. Empregou-se uma coluna de vidro com 5cm de diâmetro interno, empacotada a seco, preenchida com 10 cm de sílica gel (0,060-0,200 mm). Para o condicionamento foram utilizados 128,0 mL (volume morto) do eluente 1 para o condicionamento.  $V_{\text{eluyente}} = 384$  mL (3 vezes o volume morto). Volume de coleta das frações = 128 mL. Todas as subfrações obtidas por EFS ou CC foram secas em capela ou rotaevaporador e, em seguida, em dessecador com sílica gel sob vácuo. Após, foram armazenadas sob refrigeração em frascos fechados e analisadas por CCD para observação do perfil de separação alcançado. As condições de análise foram: Fase estacionária: sílica

gel; Fase móvel: clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

#### **3.7.4 EFSn°6**

Nesta etapa foi utilizada a subfração 3 (junção das subfrações 3-5) obtida em EFSn°5. A cromatografia em coluna foi realizada utilizando coluna de vidro com 3 cm de diâmetro interno, preenchida com 10cm de sílica gel 0,060-0,200 mm e empacotada a seco. A coluna de sílica foi condicionada com 46,0 mL (volume morto) de eluente 1.  $V_{\text{eluente}} = 138,0$  mL (3 vezes o volume morto). Volume de coleta das frações = 46 mL. Todas as subfrações obtidas por EFS ou CC foram secas em capela ou rotaevaporador e, em seguida, em dessecador com sílica gel sob vácuo. Após, foram armazenadas sob refrigeração em frascos fechados e foram analisadas por CCD para observação do perfil de separação alcançado. As condições de análise foram: Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

#### **3.8 Análises por CCD**

As amostras foram solubilizadas em acetato de etila ou MeOH e submetidas à análise com diversas fases móveis, tendo como revelador o anisaldeído sulfúrico (seletivo para terpenos e esteroides). Para estas análises foram utilizadas placas de sílica Gel 60G (20 x 20 cm x 0,25 mm), ativadas a 110°C por 1 h. As demais condições de análise estão especificadas em cada figura referente às cromatoplasas (ver item 4: Resultados e discussões). Algumas amostras foram selecionadas para o processo de CCD preparativa.

#### **3.9 Purificação de eupatorina**

As placas utilizadas para o procedimento de CCD preparativa foram confeccionadas em placa de vidro de 20x20cm, com camada de sílica gel G de 1mm de espessura.

As amostras submetidas ao procedimento foram MeOH4 e MeOH3. A CCD preparativa (CCDprep1) utilizou como fase móvel Clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v), tendo a placa sido observada em câmara de luz UV (352nm e 254nm). A

massa total das subfrações metanólicas (85 mg e 30 mg, respectivamente) foi solubilizada em 2,5mL de metanol.

As soluções foram aplicadas sobre a sílica com o auxílio de uma microseringa de vidro.

### 3.10 Identificação de eupatorina

Para as análises por CLAE e CCD foi utilizada a eupatorina obtida a partir de MeOH<sub>3</sub> e MeOH<sub>4</sub> (MeOH<sub>3+4</sub>) por CCD preparativa, tendo sido comparados seus t<sub>R</sub> e R<sub>f</sub>, respectivamente.

#### 3.10.1 Cromatografia em camada delgada

As placas utilizadas para o procedimento de CCD analítica foram confeccionadas em placa de vidro de 20x20cm, com camada de sílica gel G de 0,25 mm de espessura. Foram comparados os R<sub>f</sub> (fatores de retenção) da eupatorina obtida e de seu padrão. As condições de análise foram: fase móvel composta por clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v), tendo a placa sido observada em câmara de luz UV (352nm e 254nm), e revelador anisaldeído sulfúrico. Concentração = 1mg/mL MeOH.

#### 3.10.2 Análises por CLAE

Foram realizadas análises por CLAE para obter o perfil cromatográfico das subfrações de EAcBt obtidas após a realização da CCD preparativa e após a análise dos perfis químicos observados por CCD.

O pré-tratamento (*clean up* ou eliminação de impurezas) das frações (10 mg) incluiu, filtração em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®), secagem e solubilização em MeOH (1,0 mg/mL).

Para análises por CLAE-DAD foi utilizado o cromatógrafo Perkin Elmer Flexar® com coluna de fase reversa C18 (Hypersil Gold® 250 x 4,6 mm; 5 µm), gradiente linear de 5-100% metanol: água (v/v) em 30 min, mais metanol por 7 min, com vazão de 1,0 mL/min,



$V_{inj} = 20 \mu\text{L}$ . A faixa de detecção foi de 190-400 nm. Como padrão foi utilizada a eupatorina obtida por Claudino (2013).

### **3.11 Determinação estrutural de eupatorina**

Para as análises espectrométricas foi utilizada a eupatorina obtida a partir de  $\text{MeOH}_3$  e  $\text{MeOH}_4$  (generalizadas por  $\text{MeOH}_{3+4}$ ) por CCD preparativa.

#### **3.11.1 Espectrofotometria no UV**

A concentração da amostra foi de 0,0025mg/mL MeOH. Faixa de leitura: 200 – 700 nm.

#### **3.11.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN unidimensionais foram obtidos a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e a 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ , para determinação estrutural de eupatorina. Utilizou-se  $\text{CDCl}_3$  como solvente e  $\text{CHCl}_3$  como padrão interno. A concentração da amostra foi de 10 mg/mL.

#### **3.11.3 Espectrometria de massas**

O modo  $\text{ESI}^+$  foi adquirido com voltagem capilar de 3,5 kV, temperatura da fonte fixa a  $120^\circ\text{C}$ , temperatura de dessolvatação de  $220^\circ\text{C}$ , tensão de cone de 25 V e fluxo da seringa de  $50 \mu\text{L}/\text{min}$ . O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation<sup>®</sup>).

### **3.12 Óleo essencial**

#### **3.12.1 Extração do OE**

O OE foi obtido através da técnica de hidrodestilação, utilizando um aparelho do tipo Clevenger. Foram utilizadas 100 g de droga vegetal em 500 mL de água deionizada e o tempo total de destilação foi de 4 h. Após a obtenção do OE, este foi retirado do Clevenger

com auxílio de uma pipeta de Pasteur e o aparelho foi lavado com éter etílico para remoção total do OE (figura 12). Posteriormente, a solução foi colocada em capela com fluxo de ar para a evaporação do éter etílico. A seguir, o frasco foi congelado e, com auxílio de pipeta, foi possível separar o OE da água residual. O produto obtido foi armazenado em frasco de vidro fechado sob refrigeração.

**Figura 12** - Recuperação do OE extraído por hidrodestilação



### 3.12.2 Fracionamento do OE por CC

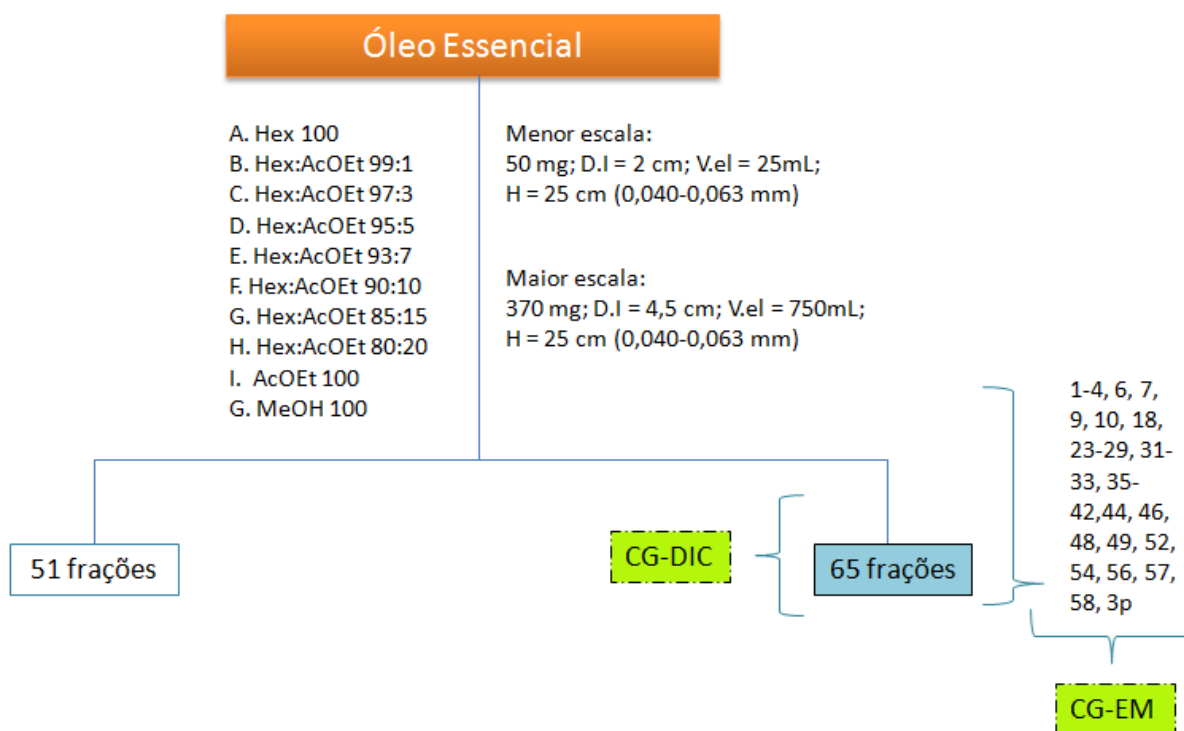
A escolha dos parâmetros para realização de CC do OE foi ajustada a partir dos resultados obtidos com uma CC teste. Para a seleção da fase móvel foram avaliadas diversas misturas de solventes orgânicos em várias proporções através de CCD para visualização do perfil e avaliação da força de eluição e da resolução cromatográfica: hexano, hexano:acetato de etila (80:20, 85:15, 88:12, 90:10, 95:5), benzeno:acetato de etila (95:5), hexano:diclorometano (70:30) e hexano:acetato de etila:isopropanol (90:6:4), sendo que as misturas de hexano e acetato de etila se mostraram mais adequadas apresentando perfis melhores de separação (força de eluição e seletividade).

Para a coluna teste (figura 13) foram utilizados 50mg de OE solubilizados em 3mL de hexano, coluna de vidro com 2 cm de diâmetro interno, preenchida com 25 cm de sílica gel (0,040-0,063 mm),  $V_{\text{eluyente}}=150,0$  mL, tendo sido obtidas 51 subfrações (volume de coleta =

25mL), posteriormente analisadas por CCD em placas de sílica gel. As condições de análise foram: Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: hexano: acetato de etila 95:5, 85:15, 82:18; 80:20; 65:35; 70:30; benzeno : acetato de etila 95:5, 90:10. Revelador: anisaldeído sulfúrico.

Uma nova CC (figura 13), realizada em maior escala, utilizou toda a massa de OE disponível (370mg) a fim de se obter frações com perfis variados e possibilidade de análise por técnicas hifenadas de CG e análise biológica *in vitro*, tendo sido obtidas 65 frações. Utilizou-se coluna de vidro com 4,50cm de diâmetro interno, preenchida com 25 cm de sílica gel (0,040-0,063 mm).  $V_{\text{eluyente}}=750,0$  mL. Volume de coleta das frações = 94 mL. A análise por CG-DIC permitiu evidenciar o perfil químico geral das frações e, a partir desta análise associada às análises por CCD, frações foram selecionadas para análise em CG-EM.

**Figura 13** - Fracionamentos do OE por CC: pequena escala, maior escala e seleção de frações para análise em CG-EM



As proporções de solventes utilizadas na composição dos eluentes, bem como as frações coletadas em cada um deles para os 2 fracionamentos (menor e maior escala), encontram-se listados na tabela 3.

**Tabela 3** - Eluentes utilizados no fracionamento do OE por CC (sílica gel)

Frações CC teste	Frações CC	Eluentes / proporção (%; v/v)	
1 a 6	1 a 7	Hexano	
7 a 12	8 a 15	Hexano:acetato de etila	99:1
13 a 18	16 a 23	Hexano:acetato de etila	97:3
19 a 25	24 a 31	Hexano:acetato de etila	95:5
26 a 31	32 a 39	Hexano:acetato de etila	93:7
32 a 37	40 a 47	Hexano:acetato de etila	90:10
48 a 55	48 a 55	Hexano:acetato de etila	85:15
44 a 49	56 a 63	Hexano:acetato de etila	80:20
50	64	Acetato de etila	
51	65	Metanol	

### 3.12.3 Análise do OE e suas frações por CCD

As amostras foram solubilizadas em éter etílico ou hexano e submetidas à análise com diversas fases móveis, tendo como revelador o anisaldeído sulfúrico. Para estas análises foram utilizadas placas de sílica Gel 60G (20 x 20 cm x 0,25 mm), ativadas a 110°C por 1 h. As demais condições de análise estão especificadas no item 4.4 (Resultados e discussões). Algumas amostras foram selecionadas para o processo de CCD preparativa.

### 3.12.4 Cromatografia em fase gasosa

Após a integração dos cromatogramas, os  $t_R$  e áreas dos picos foram tabulados. Para o cálculo do IR utilizou-se uma série homóloga de *n*-alcanos C8-C40 (Sigma-Aldrich®). Foi utilizada a equação de Van Den Dool e Kratz (figura 14) uma vez que houve rampa de aquecimento.

**Figura 14** - Equação de Van Den Dool e Kratz

$$IR = 100. n + 100. \left( \frac{t_{R_x} - t_{R_n}}{t_{R_{n+1}} - t_{R_n}} \right)$$

Legenda: n: número de carbonos do *n*-alcano anterior ao analito; tx:  $t_R$  do analito; tn:  $t_R$  do *n*-alcano eluído antes do analito; tn+1:  $t_R$  do *n*-alcano eluído após o analito.

Os IR foram comparados com o banco de dados do NIST (*National Institute of Standards and Technology*) e Adams (2007).

### 3.12.4.1 CG-DIC

Para as análises por CG-DIC utilizou-se um cromatógrafo em fase gasosa equipado com injetor automático e detector de ionização em chama (DIC). A coluna capilar utilizada foi Supelco SPB-5 (5% fenil polimetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m. A temperatura do forno foi assim programada:

$$60 \text{ } ^\circ\text{C} \xrightarrow{3 \text{ } ^\circ\text{C} / \text{min}} 240 \text{ } ^\circ\text{C}$$

Temperatura do injetor

Modo de injeção: *split* 1/60.

Temperatura do detector: 290  $^\circ$ C

Volume de amostra injetado: 1  $\mu$ L.

Vazão do gás de arraste (nitrogênio): 1,0 mL/min, gás de *make up* (nitrogênio): 29,0 mL/min, ar sintético: 10,0 mL/min e hidrogênio: 1,0 mL/min

Concentração das amostras: 1mg/mL (hexano HPLC).

O tratamento dos dados foi efetuado no *software* Galaxie Chromatography Data System® - Version 1.9.302.530.

### 3.12.4.2 CG-EM

Para as análises por CG-EM utilizou-se cromatógrafo em fase gasosa Shimadzu® QP-2010 equipado com injetor automático AOC-5000 Shimadzu® e interface com um

espectrômetro de massas. A coluna utilizada foi uma SGE Analytical Science EN-5MS (30 m x 0,25 x 0,25 mm).

A temperatura do forno foi assim programada:

60 °C  $\xrightarrow{3\text{ °C/min}}$  240 °C (5 min)

A temperatura do injetor foi 240 °C.

Modo de injeção: *split* 1/60.

Vazão do gás de arraste (Hélio) a um fluxo constante de 1,3 mL/min.

O volume de amostra injetado foi de 1 µL. Pressão: 79,7 kPa, Velocidade linear: 41.6 cm/s. Fluxo total: 17.3.

Concentração das amostras: 1mg/mL hexano HPLC.

Condições EM: temperatura da fonte de íons e interface de 250 °C, modo de ionização por elétrons a 70 eV, faixa da massas de aquisição de *m/z* 40-400 Daltons.

O tratamento dos dados foi efetuado no *software* GCMS solutions® Version 2.5.

### 3.12.7.5 CCD preparativa com frações do OE

As placas utilizadas para os procedimentos de CCD preparativa foram confeccionadas em placa de vidro de 20x20cm, com camada de sílica gel G de 1mm de espessura.

Para a separação das frações 43, 44 e 45 (reunidas) obtidas por CC de OE, foram realizados testes em CCD para a definição da melhor mistura de solventes para a fase móvel. A massa total das frações reunidas e aplicadas foi equivalente a 45mg, tendo como fase móvel hexano : diclorometano : metanol 45:54:1 (v/v). As amostras foram solubilizadas em éter etílico (10 mg/mL).

As soluções foram aplicadas sobre a sílica com o auxílio de uma microseringa de vidro.

### 3.13 Avaliação do potencial citotóxico e da morte celular

#### 3.13.1 Ensaios de citotoxicidade SRB

As células HepG2 (hepatocarcinoma humano, ATCC<sup>®</sup> HB-8065<sup>™</sup>), MCF-7 (câncer de mama humano, ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>) e MCF10AA (célula de mama humana e normal, ATCC<sup>®</sup> CRL-10317<sup>™</sup>) foram cultivadas em frascos estéreis na presença de meio de cultivo DMEN low-glucose suplementado com 10% de SFB comercial. As células foram mantidas a 37<sup>o</sup> C em estufa contendo CO<sub>2</sub>. Para os ensaios, as células foram removidas com solução de tripsina contendo PBS e tripsina/EDTA (Inlab<sup>®</sup>) com pH ajustado em 7,2 esterilizada por filtração com membrana de 0,4 µm de diâmetro (Millipore<sup>®</sup>). A suspensão obtida foi transferida para tubos cônicos contendo meio de cultura completo e procedeu-se à centrifugação a baixa rotação. Ao final deste processo, o meio e a tripsina foram desprezados e as células ressuspendidas em pequeno volume de meio completo para contagem em câmara de Neubauer. A concentração final utilizada foi equivalente a 4x10<sup>4</sup> células/mL para que em cada cavidade da placa de 96 poços fosse depositado um volume de 0,1 mL de meio com célula. As placas foram pré-incubadas por 24 h à 37<sup>o</sup> C. Os tratamentos tiveram o tempo de 24h, e ao final dele o meio foi aspirado seguindo o tratamento. As amostras foram solubilizadas em DMSO em uma concentração de 40 mg/mL (solução estoque) e partir desta solução foram preparadas as soluções em meio de cultura não suplementado na concentração desejada.

Para a determinação das concentrações a serem utilizadas foram realizados diversos experimentos teste SRB em várias concentrações, de modo que as concentrações escolhidas contemplassem o CI<sub>50</sub>, importante para os experimentos posteriores de análise de apoptose e necrose. Como controle positivo foi utilizado doxorrubicina (DOX) 20 µg/mL. O tempo de tratamento foi de 24h.

Após este período de tratamento, foram adicionados 0,050 mL de solução fixadora ácido tricloroacético 10%, 4<sup>o</sup> C (m/v) sobre o meio de cultura e a placa incubada por 1h a 4<sup>o</sup>c. A placa foi lavada com água e adicionaram-se 0,050 mL de uma solução contendo SRB

0,4% em ácido acético 1% por 20 min. O corante foi descartado e foi adicionada solução de lavagem (ácido acético 1%) adicionada diretamente nos poços da placa repetindo quatro vezes. A secagem das placas foi realizada à temperatura ambiente. O corante não ligado foi removido após a lavagem e o corante ligado à proteína foi solubilizado em meio básico Tris-base, 10 mM, pH 10,5, (INVITROGEN, CARLSBAD, CA, EUA), sob leve agitação por aproximadamente 5 min (SKEHAN et al, 1990). Em seguida houve a determinação da densidade óptica em leitor de placas a 570 nm.

Os cálculos das porcentagens de células vivas obtidas após os ensaios de citotoxicidade foram realizados calculando-se as médias das absorvâncias dos controles de branco (MABSCB, média da absorvância do controle branco) e veículo (MABSCV média da absorvância do controle de veículo) e as médias das absorvâncias em cada concentração das amostras testes (MABST média da absorvância do controle do teste) e controle positivo (MABSCP). a porcentagem de células vivas foi calculada através da divisão do valor obtido pela diferença entre MABST e MABSCB pelo valor da diferença entre MABSCV e MABSCB, conforme a equação.

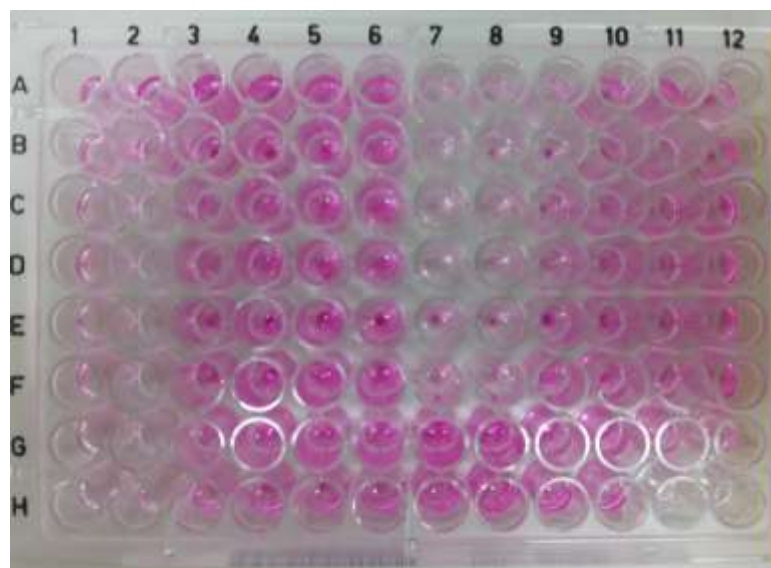
$$\% \text{ células vivas} = [(MABST - MABSCB)/(MABSCV - MABSCB)] \times 100$$

Os resultados foram comparados através da análise de variância (ANOVA), com teste de Tukey, por meio do qual podem ser avaliadas as magnitudes dos contrastes obtidos entre duas médias de tratamento dentro de um mesmo grupo. As análises foram feitas utilizando-se o software Graphpad Prism® version 5.01.

O ensaio se baseia na obtenção dos valores de absorvância resultantes da ligação do corante às proteínas celulares. A imagem abaixo (Figura 15) trata-se de uma foto tirada ao final de um dos experimentos. O aumento gradativo da intensidade de coloração rósea do poço 1 ao 6 e do poço 7 ao 12 se deve às menores concentrações avaliadas após a processo de diluição seriada, resultando, conforme descrito nas próximas linhas, em maior porcentagem de sobrevivência celular (resposta dependente de concentração).



**Figura 15** - Placa de 96 poços após tempo de incubação com corante SRB



As concentrações utilizadas neste ensaio encontram-se na tabela 4.

**Tabela 4** - Concentrações de amostras e CP utilizados no ensaio de SRB

Substância	Linhagem	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	[ $\mu\text{M}$ ]
$\alpha$ -humuleno	MCF-10	50,0; 25,0; 12,5; 6,25;	204,68; 102,34; 51,17;
		3,12; 1,56; 0,78	25,58; 12,79; 6,39; 3,19.
$\alpha$ -humuleno	MCF-7	100,0; 50,0; 25,0; 12,5;	409,36; 204,68; 102,34;
		6,25; 3,12; 1,56; 0,78	51,17; 25,58; 12,79; 6,40;
$\alpha$ -humuleno	HepG2	25,0; 12,5; 6,25; 3,12;	3,20.
		1,56; 0,78	102,34; 51,17; 25,58;
<i>trans</i> -cariofileno	MCF-10	25,0; 12,5; 6,25; 3,12;	12,79; 6,39; 3,19; 6,40;
		1,56; 0,78	3,20..
<i>trans</i> -cariofileno	MCF-7	100,0; 50,0; 25,0; 12,5,	409,36; 102,34; 51,17;
		6,25; 3,12; 1,56; 0,78	25,58; 12,79; 6,39.
<i>trans</i> -cariofileno	MCF-7	50,0; 25,0; 12,5; 6,25;	204,68; 102,34; 51,17;
		3,12; 1,56; 0,78	25,58; 12,79; 6,39; 3,20.
<i>trans</i> -cariofileno	HepG2	100,0; 50,0; 25,0; 12,5,	409,36; 102,34; 51,17;
		6,25; 3,12; 1,56; 0,78	25,58; 12,79; 6,39; 3,20;
			1,59.

<b>Óxido de cariofileno</b>	MCF-10	25,0; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78	113,45; 56,72; 28,36; 14,18; 7,09; 3,54.
<b>Óxido de cariofileno</b>	MCF-7	100,0; 50,0; 25,0; 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78	453,82; 226,91; 113,45; 56,72; 28,36; 14,18; 7,09; 3,55.
<b>Óxido de cariofileno</b>	HepG2	100,0; 50,0; 25,0; 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78	453,82; 226,91; 113,45; 56,72; 28,36; 14,18; 7,09; 3,55.
<b>Eupatorina</b>	MCF-10	25,0; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78	72,60; 36,30; 18,15; 9,07; 4,53; 2,26.
<b>Eupatorina</b>	MCF-7	100,0; 50,0; 25,0; 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78	290,42; 145,21; 72,60; 36,30; 18,15; 9,07; 4,53; 2,27.
<b>Eupatorina</b>	HepG2	100,0; 50,0; 25,0; 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78	290,42; 145,21; 72,60; 36,30; 18,15; 9,07; 4,53; 2,27..
<b>OE</b>	MCF-10	100,0; 50,0; 25,0; 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78	-
<b>OE</b>	MCF-7	50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78	-
<b>OE</b>	HepG2	25,0; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78	-
<b>Frações do OE</b>	Todas	150,0; 75,0; 37,5, 18,7, 9,37, 4,68	-
<b>Doxorrubicina</b>	Todas	20,0	36,79

Tabela 4 – (final)

A citotoxicidade para as linhagens celulares foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS), através da relação entre a  $CI_{50}$  de MCF10A e  $CI_{50}$  de cada linhagem tumoral (HepG2 e MCF7) para verificar a seletividade para linhagens tumorais.

### 3.13.2 Ensaio de anexina-V

O ensaio de anexina-V foi realizado segundo Duarte et al., 2010, com as adequações necessárias para utilização do equipamento In Cell Analyser 2000 (*GE Healthcare*®).

Foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células/poço em placas de 96 poços. Após o tempo de crescimento (24h), as células foram tratadas nas concentrações estabelecidas por meio do ensaio de citotoxicidade. Os tratamentos estiveram em contato com as células por 12 h. Em seguida, a placa foi centrifugada a 2.500 r.p.m., e os poços lavados com 0,200 mL de PBS. Após a lavagem, foram adicionados 0,1 mL/poço de tampão de ligação de anexina-V (Hepes® 10mm, NaCl 140mm e CaCl<sub>2</sub> 2,5mm), contendo 1,3µg/mL de anexina-V conjugada com FITC (*Life technologies*®), e 1,6µg/mL de HO (1mg/mL), sendo incubadas por 15 min. Após os 15 min, foram adicionados 0,0200 mL de iodeto de propídeo (1µg/mL) em tampão de ligação. As imagens foram adquiridas e analisadas utilizando o equipamento In Cell Analyser 2000 (*GE Healthcare*®), nas dependências do Laboratório de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP. Controle de veículo (DMSO). Dox: Controle positivo de necrose (doxorribicina 20 µg/mL). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53 µg/mL).

As concentrações utilizadas neste ensaio encontram-se na tabela 5:

**Tabela 5** - Concentrações de amostras e CP utilizados no ensaio de Anexina-V

Substância	Linhagem	[µg/mL]	[µM]
α-humuleno	MCF-10	20,0; 10,0; 5,0	97,87; 48,93; 24,46
α-humuleno	MCF-7	10,0; 5,0; 2,5	48,93; 24,46; 12,23
α-humuleno	HepG2	30,0; 15,0; 7,5	146,80; 73,40; 36,70

<i>trans</i> -cariofileno	MCF-10	30,0; 15,0; 7,5	146,80; 73,40; 36,70
<i>trans</i> -cariofileno	MCF-7	16,0; 8,0; 4,0	78,29; 39,14; 19,57
<i>trans</i> -cariofileno	HepG2	100,0; 50,0; 25,0	489,35; 244,67; 122,33
Óxido de cariofileno	MCF-10	150,0; 75,0; 37,5	680,73; 340,36; 170,18
Óxido de cariofileno	MCF-7	200, 100 e 50	907,64; 453,82; 226,91
Óxido de cariofileno	HepG2	50,0; 25,0; 12,5	226,91; 113,45; 56,72
Eupatorina	MCF-10	10,0; 5,0; 2,5	29,04; 14,52; 7,26
Eupatorina	MCF-7	100,0; 50,0; 25,0	290,42; 145,21; 72,60
Eupatorina	HepG2	50,0; 25,0; 12,5	145,21; 72,60; 36,30
OE	MCF-10	20,0; 10,0; 5,0	-
OE	MCF-7	15,0; 7,5; 3,75	-
OE	HepG2	30,0; 15,0; 7,5	-
Curcumina	Todas	53,0	143,87
Doxorrubicina	Todas	20,0	36,79

Tabela 5 – (Final)

### 3.13.3 Ensaio de exclusão de fluorocromos com Hoechst, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína

Ensaio de exclusão de fluorocromos com HO/IP foi realizado segundo HASHIMOTO et al., 2003, com as modificações necessárias para utilização do equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare®).

Foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços. Os tratamentos foram realizados por 12h, visto que nos tratamentos com 24h houve uma alta taxa de mortalidade celular. A distinção entre células apoptóticas e necróticas foi realizada a partir da coloração das células com uma solução contendo diacetato de fluoresceína 3,5  $\mu\text{g/mL}$  (DAF), IP 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , e HO 1,5  $\mu\text{g/mL}$  (HO) 33342 (Invitrogen®). Após o período de tratamento, a placa foi centrifugada a 2.500 r.p.m., e cada poço foi lavado e corado (0,100 mL/poço) com os

fluorocromos por 10 min ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as imagens foram adquiridas e analisadas utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000 (*GE Healthcare*®), nas dependências do laboratório de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP. Controle de veículo (DMSO). Dox: controle positivo de necrose (doxorribicina 20 µg/mL). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53 µg/mL).

As concentrações utilizadas encontram-se na tabela 6:

**Tabela 6** - Concentrações de amostras e CP utilizados no ensaio de exclusão de fluorocromos com HO, IP e diacetato de fluoresceína

Substância	Linhagem	[µg/mL]	[µM]
<b>α-humuleno</b>	MCF-10	20,0; 10,0; 5,0	97,87; 48,93; 24,46
<b>α-humuleno</b>	MCF-7	10,0; 5,0; 2,5	48,93; 24,46; 12,23
<b>α-humuleno</b>	HepG2	30,0; 15,0; 7,5	146,80; 73,40; 36,70
<b>trans-cariofileno</b>	MCF-10	30,0; 15,0; 7,5	146,80; 73,40; 36,70
<b>trans-cariofileno</b>	MCF-7	16,0; 8,0; 4,0	78,29; 39,14; 19,57
<b>trans-cariofileno</b>	HepG2	100,0; 50,0; 25,0	489,35; 244,67; 122,33
<b>Óxido de cariofileno</b>	MCF-10	150,0; 75,0; 37,5	680,73; 340,36; 170,18
<b>Óxido de cariofileno</b>	MCF-7	200, 100 e 50	907,64; 453,82; 226,91
<b>Óxido de cariofileno</b>	HepG2	50,0; 25,0; 12,5	226,91; 113,45; 56,72
<b>Eupatorina</b>	MCF-10	10,0; 5,0; 2,5	29,04; 14,52; 7,26
<b>Eupatorina</b>	MCF-7	100,0; 50,0; 25,0	290,42; 145,21; 72,60
<b>Eupatorina</b>	HepG2	50,0; 25,0; 12,5	145,21; 72,60; 36,30
<b>OE</b>	MCF-10	20,0; 10,0; 5,0	-
<b>OE</b>	MCF-7	15,0; 7,5; 3,75	-
<b>OE</b>	HepG2	30,0; 15,0; 7,5	-
<b>Curcumina</b>	Todas	53,0	143,87
<b>Doxorrubicina</b>	Todas	20,0	36,79

### 3.13.4 Avaliação da atividade de caspase-3

Para verificar o nível da ativação da caspase-3, as células foram plaqueadas ( $1 \times 10^4$  células/poço) em placas de 96 poços. Após o tratamento (12 h) a placa foi centrifugada a 2.500 r.p.m., cada poço foi lavado com 0,200 mL PBS. Após a lavagem, as células foram permeabilizadas com solução de saponina 0,5% (dissolvida em meio de cultura contendo ditiotreitol - DTT a 5mM e EDTA a 2mM) por 10 min. Após a etapa de permeabilização, foram adicionados 0,100 mL da solução de substrato fluorogênico (Ac-asp-met-gln-asp-AMC) específico para caspase-3 (20 $\mu$ M concentração final) - Sigma® e IP 2,5  $\mu$ g/mL para marcação nuclear. As imagens foram imediatamente adquiridas e analisadas utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare®), nas dependências do laboratório de Proteômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (EARNSHAW, 1999).

As concentrações utilizadas neste ensaio encontram-se na tabela 7:

**Tabela 7** - Concentrações das amostras utilizadas nos ensaios de atividade de caspase-3

Substância	Linhagem	[ $\mu$ g/mL]	[ $\mu$ M]
$\alpha$ -humuleno	MCF-10	5,0; 2,5; 1,25	24,46; 12,23; 6,11
$\alpha$ -humuleno	MCF-7	10,0; 5,0; 2,5	48,93; 24,46; 12,23
$\alpha$ -humuleno	HepG2	25,0; 12,5; 6,25	122,33; 61,16; 30,58
<i>trans</i> -cariofileno	MCF-10	30,0; 15,0; 7,5	146,80; 73,40; 36,70
<i>trans</i> -cariofileno	MCF-7	16,0; 8,0; 4,0	78,29; 39,14; 19,57
<i>trans</i> -cariofileno	HepG2	100,0; 50,0; 25,0	489,35; 244,67; 122,33
Óxido de cariofileno	MCF-10	150,0; 75,0; 37,5	680,73; 340,36; 170,18
Óxido de cariofileno	MCF-7	200,0; 100,0; 50,0	907,64; 453,82; 226,91
Óxido de cariofileno	HepG2	50,0; 25,0; 12,5	226,91; 113,45; 56,72
Eupatorina	MCF-10	10,0; 5,0; 2,5	29,04; 14,52; 7,26
Eupatorina	MCF-7	100,0; 50,0; 25,0	290,42; 145,21; 72,60

---

<b>Eupatorina</b>	HepG2	50,0; 25,0; 12,5	145,21; 72,60; 36,30
<b>OE</b>	MCF-10	20,0; 10,0; 5	-
<b>OE</b>	MCF-7	15,0; 7,5; 3,75	-
<b>OE</b>	HepG2	20,0; 10,0; 5	-
<b>Curcumina</b>	Todas	53,0	143,87
<b>Doxorrubicina</b>	Todas	20,0	36,79

---

**Tabela 7 - (final).**

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Fracionamento das frações EFSBt3 E 4 por CC (CC1)

Foram obtidas frações com perfis químicos diferentes. A figura abaixo (figura 16) ilustra diferentes tonalidades e reforçou a observação de diferentes perfis de constituintes químicos.

**Figura 16** - Diferentes frações obtidas por CC1



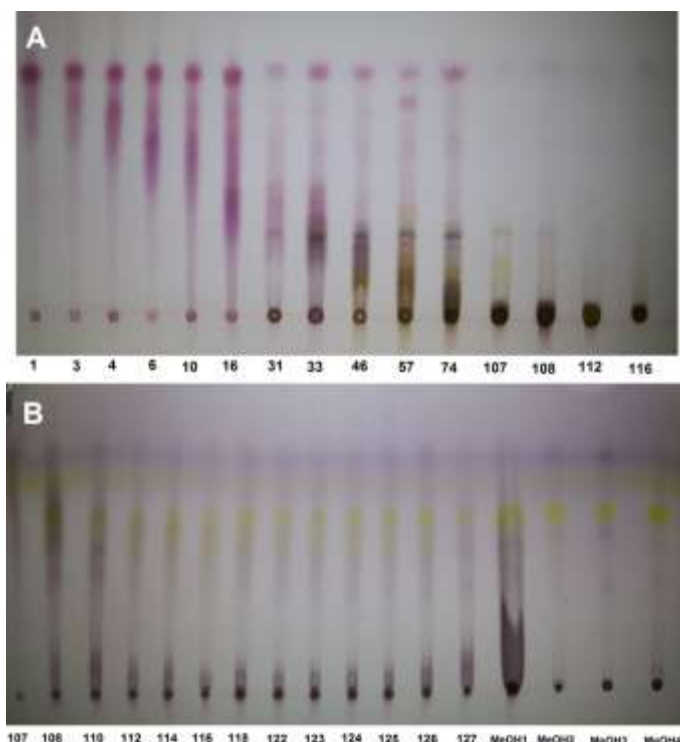
As subfrações de CC1 foram reunidas de acordo com os perfis cromatográficos obtidos por CCD (tabela 8).

**Tabela 8** - Cromatografia em coluna 1: massas (mg) das subfrações reunidas

<b>SUBFRAÇÕES</b>	<b>MASSA (mg)</b>
<b>1</b>	83,8
<b>3</b>	20,0
<b>4</b>	45,0
<b>6</b>	50,0
<b>10</b>	57,6
<b>16</b>	192,7
<b>31</b>	21,6
<b>33</b>	104,0
<b>46</b>	156,3
<b>57</b>	359,8
<b>74</b>	314,5
<b>107</b>	75,7
<b>112</b>	74,2
<b>122</b>	112,4
<b>127</b>	179,2
<b>MeOH1</b>	1401,10
<b>MeOH2</b>	62,3
<b>MeOH3</b>	59,4
<b>MeOH4</b>	93,8
<b>Rendimento</b>	65,58%

As análises por CCD também demonstram a obtenção de subfrações com diferentes composições químicas (figura 17, A). As subfrações 1, 3 e 4 apresentam perfis semelhantes, assim como 6 e 10. A partir da subfração 31 foi observada a presença de várias manchas. Estando muitas substâncias retidas na origem e não eluídas, a partir da subfração 108 as condições de fase móvel foram alteradas, sendo que até a fração final os perfis eram bastante similares (figura 17, B).

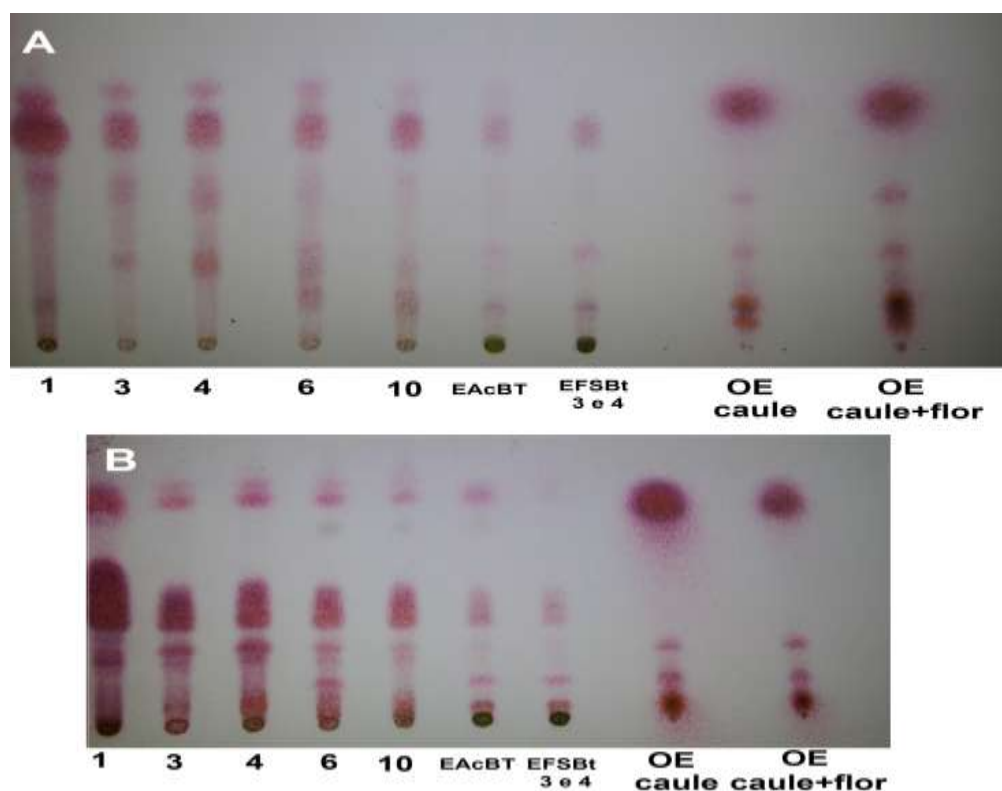
**Figura 17** - Cromatoplasas das subfrações da CC1



Fase estacionária A: Sílica gel; Fase móvel: hexano : acetato de etila 80:20 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico; Frações: 1 até 117. Fase estacionária B: sílica gel; Fase móvel: clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico; Frações: 108 até MeOH4.

A figura 18 apresenta cromatoplasas com os perfis obtidos por CCD das primeiras subfrações de CC1 já reunidas, do EAcBt, de EFSBt3 e EFSBt4, frações a partir das quais esta CC foi realizada, e do OE. Conforme esperado, componentes do OE foram observados no extrato EAcBt, nas suas frações EFSBt3 e 4 e respectivas subfrações iniciais (1-10). Cabe ressaltar que tanto o extrato, quanto as frações e subfrações citadas contém tais componentes do OE por terem sido obtidos com solventes de baixa a média polaridade.

**Figura 18** - Cromatoplasmas com EAcBt, frações EFSBt4 e 4, OE do caule

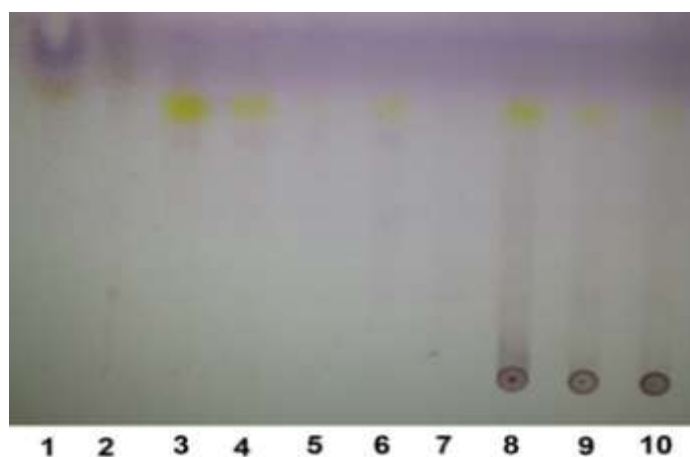


Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: Hexano : acetato de etila 98:2 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico. Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: hexano : acetato de etila 95:5 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

## 4.2 Isolamento e purificação da eupatorina

### 4.2.1 EFSn°2

Foram recolhidas 10 subfrações da subfração MeOH2 obtida por CC1, e posteriormente foram analisadas por CCD (figura 19), sendo reunidas de acordo com a semelhança dos perfis químicos (Tabela 9).

**Figura 19** - Cromatoplasmas das frações da EFSN<sup>o</sup>2

Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

Pela análise do resultado da CCD acima (figura 19), as subfrações 3 a 6 apresentaram-se purificadas.

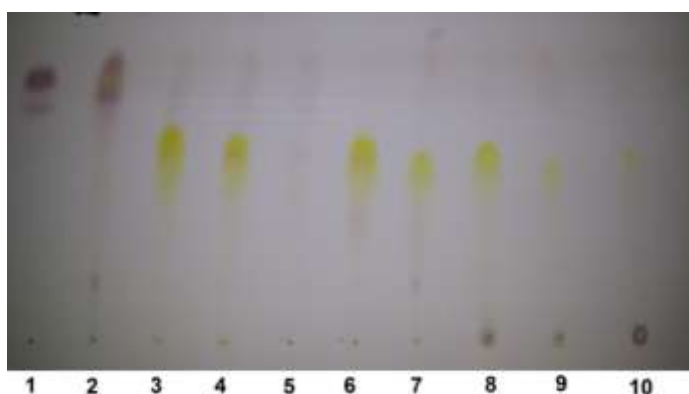
**Tabela 9** - EFSn2: massas (mg) das subfrações reunidas

SUBFRAÇÕES	MASSA (mg)
1	1,90
2	1,60
3	9,90
7	1,00
8	6,49
9	3,70
10	2,80
<b>Rendimento</b>	<b>71,41%</b>

#### 4.2.2 EFSn°3

A partir da análise dos perfis obtidos por CCD (Figura 20), foram reunidas as subfrações 1+2, 3+4, 8-10. A análise destas subfrações por CCD também mostra que 2,3,6 e 7 foram purificadas e que 8-10 foram semipurificadas.

**Figura 20** - Cromatoplas das frações da EFSn°3



Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

Os rendimentos encontram-se na Tabela 10.

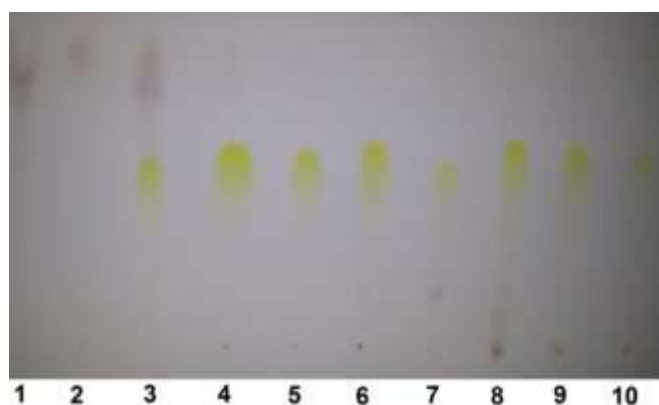
**Tabela 10** - EFSn3: massas (mg) das subfrações reunidas

SUBFRAÇÕES	MASSA (mg)
1	4,60
3	5,40
5	1,00
6	3,00
7	7,50
8	6,50
<b>Rendimento</b>	<b>93,5 %</b>

### 4.2.3 EFSn<sup>4</sup>

As massas das subfrações obtidas a partir das subfrações 7, 8, 9 e 10 obtidas em EFSn<sup>3</sup> são apresentadas na tabela 11 e os perfis cromatográficos (CCD) encontram-se na figura 21.

**Figura 21** - Cromatoplasmas das frações da EFSn<sup>4</sup>



Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

**Tabela 11** - EFSn<sup>4</sup>: massas (mg) das subfrações reunidas

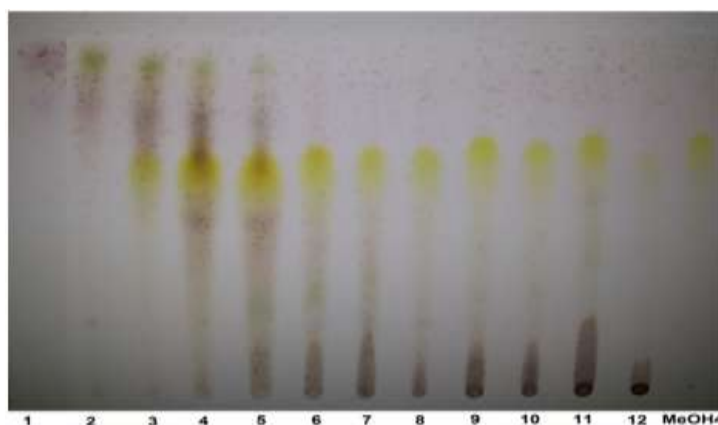
SUBFRAÇÕES	MASSA (mg)
1	2,10
2	1,30
3	1,70
7	1,00
8	4,00
<b>Rendimento</b>	<b>67,14%</b>

Mais uma vez, a análise da cromatoplasca acima mostrou a pureza de subfrações (4-6) obtidas por EFS.

#### 4.2.4 EFSn°5

As massas das subfrações obtidas a partir das subfrações 108, 112, 122 e 127 da CC1 são apresentadas na tabela 8 e os perfis cromatográficos encontram-se na figura 22.

**Figura 22** - Cromatoplaça das frações da EFSN°5 e a amostra MeOH4



Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico.

Os rendimentos encontram-se na Tabela 12.

**Tabela 12** - EFSn5: massas (mg) das subfrações reunidas

SUBFRAÇÕES	MASSA (mg)
1	16,60
2	13,00
3	90,50
6	140,10
12	150,50
<b>Rendimento</b>	<b>92,73%</b>



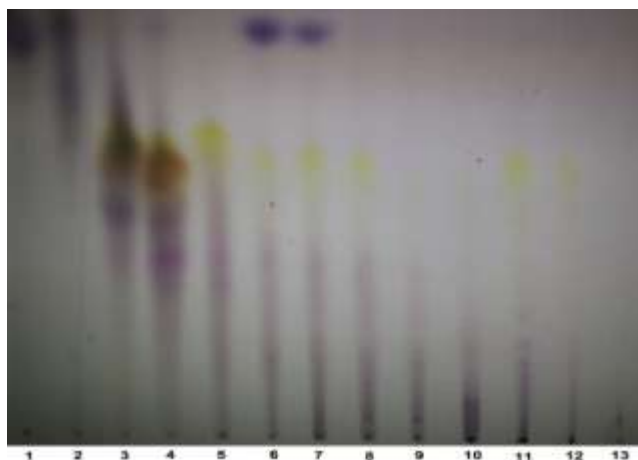
#### 4.2.5 EFSn°6

As massas das subfrações obtidas a partir das subfrações 3, 4 e 5 da EFSn°5 são apresentadas na tabela 13e os perfis cromatográficos encontram-se na figura 23.

**Tabela 13 – EFSn°6: massas (mg) das subfrações reunidas**

SUBFRAÇÕES	MASSA (mg)
1	1,30
3	2,50
4	2,70
8	10,30
<b>Rendimento</b>	<b>18,35%</b>

**Figura 23 - Cromatoplas das frações da EFSN°6**



Fase estacionária: sílica gel; Fase móvel: clorofórmio: acetato de etila: metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico

#### 4.2.6 Cromatografia em camada delgada preparativa para obtenção da eupatorina (CCDp1)

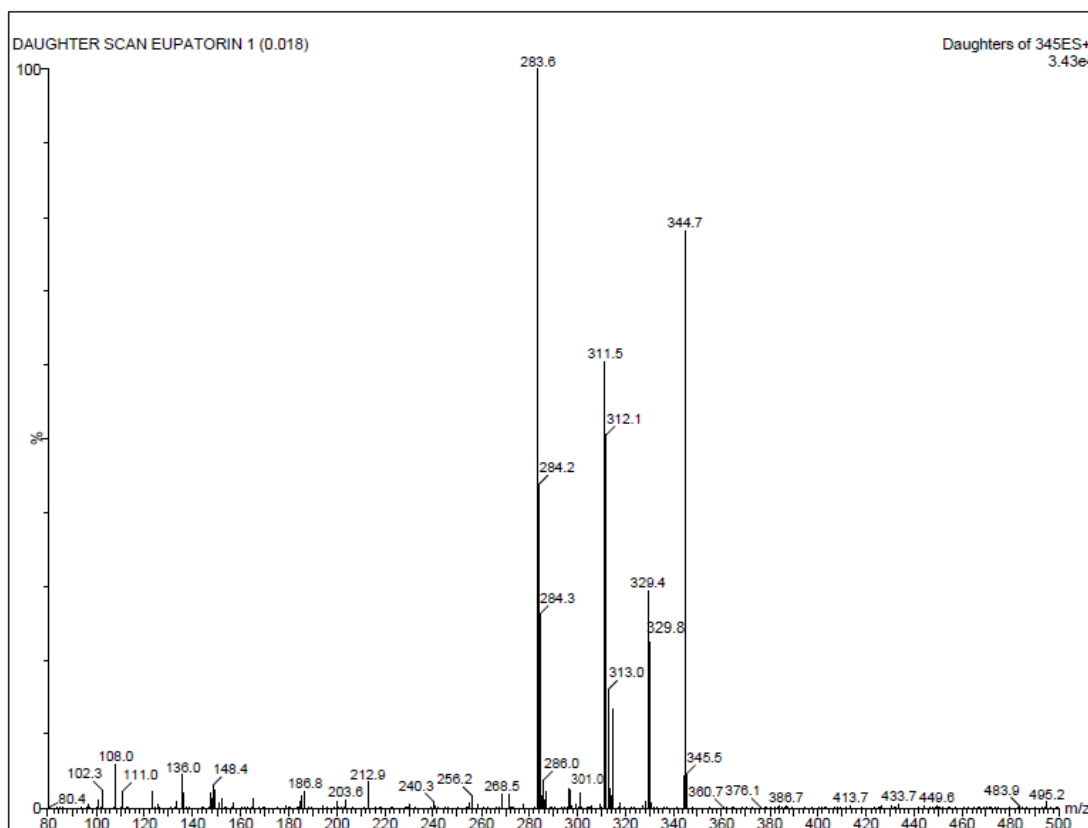
Ao término da eluição cromatográfica das subfrações MeOH3, a placa foi seca ao ar em capela e em seguida observada sob luz ambiente e em câmara com luz UV (254 e 352

nm). Para CCDp1 foram observadas em UV 5 bandas distintas. Todas as bandas observadas foram recolhidas separadamente, filtradas em funil de vidro sinterizado e membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ , solubilizadas em metanol ou éter e secas. A massa final de eupatorina recuperada foi equivalente a 3,4 mg.

### 4.3 Determinação estrutural da eupatorina

A eupatorina foi obtida como um pó de coloração levemente amarelada. Seu espectro de massas de baixa resolução (ESI-MS/MS) no modo positivo (figura 24) apresentou o pico relativo ao íon molecular  $[\text{M}+\text{H}]^+$  com valor de  $m/z$  de 345, que é consistente com o valor de massa molecular 344 Da, calculado com base na fórmula empírica  $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ .

**Figura 24** – Espectro de massas de eupatorina.  $\text{MS}^2$  do íon precursor com  $m/z$  345. ESI-MS/MS; modo positivo

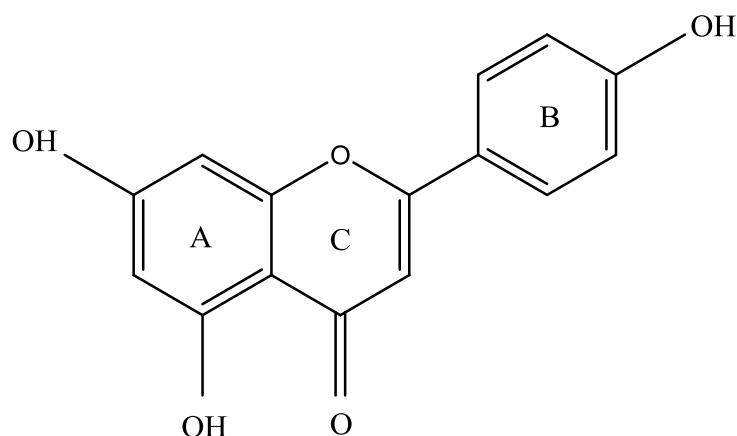


Wang e colaboradores (2009) realizaram um estudo de espectrometria de massas tandem (ESI-MS/MS) utilizando seis flavonas agliconas polimetoxiladas e determinaram o padrão de fragmentação deste tipo de flavona, além de propor os mecanismos envolvidos. Com base neste estudo, estão apresentados na tabela 14 fragmentos formados a partir do íon precursor com  $m/z$  345 ( $MS^2$ ) e suas respectivas perdas. Fundamentalmente, os fragmentos observados são coerentes com a estrutura de uma flavona polimetoxilada, conforme proposto pelos autores citados, incluindo perdas de  $CH_3\cdot$  ( $m/z$  330),  $2CH_3\cdot$  ( $m/z$  315),  $CH_4$  ( $m/z$  329).

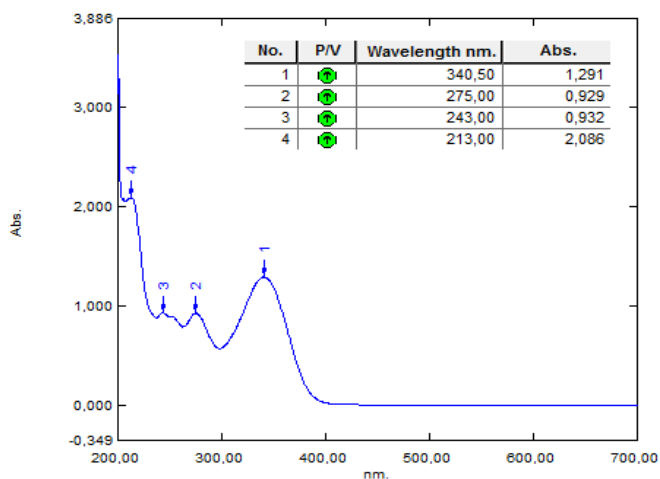
**Tabela 14** - Fragmentos obtidos a partir do íon precursor  $m/z$  345 ( $MS^2$ )

Fragmento	$m/z$	Perda
$[M+H-15]^+$	330	$CH_3\cdot$
$[M+H-16]^+$	329	$CH_4$
$[M+H-44]^+$	301	$H_2O+CH_3\cdot$ ou $CO_2$
$[M+H-61]$	284	$CO+H_2O+CH_3\cdot$

A análise do espectro no UV/Vis corrobora com a sugestão de uma flavona. Sabe-se que substâncias caracterizadas como flavonas possuem 2 bandas majoritárias de absorção no UV na região compreendida entre 240-400 nm. A faixa de 300-380 nm refere-se à banda I, associada à absorção do anel B ou sistema cinamoil (figura 25). Enquanto isto, a banda II (240-280 nm) envolve a absorção do anel A ou sistema benzoil (figura 28), de acordo com Mabry et al. (1970).

**Figura 25** - Estrutura das flavonas

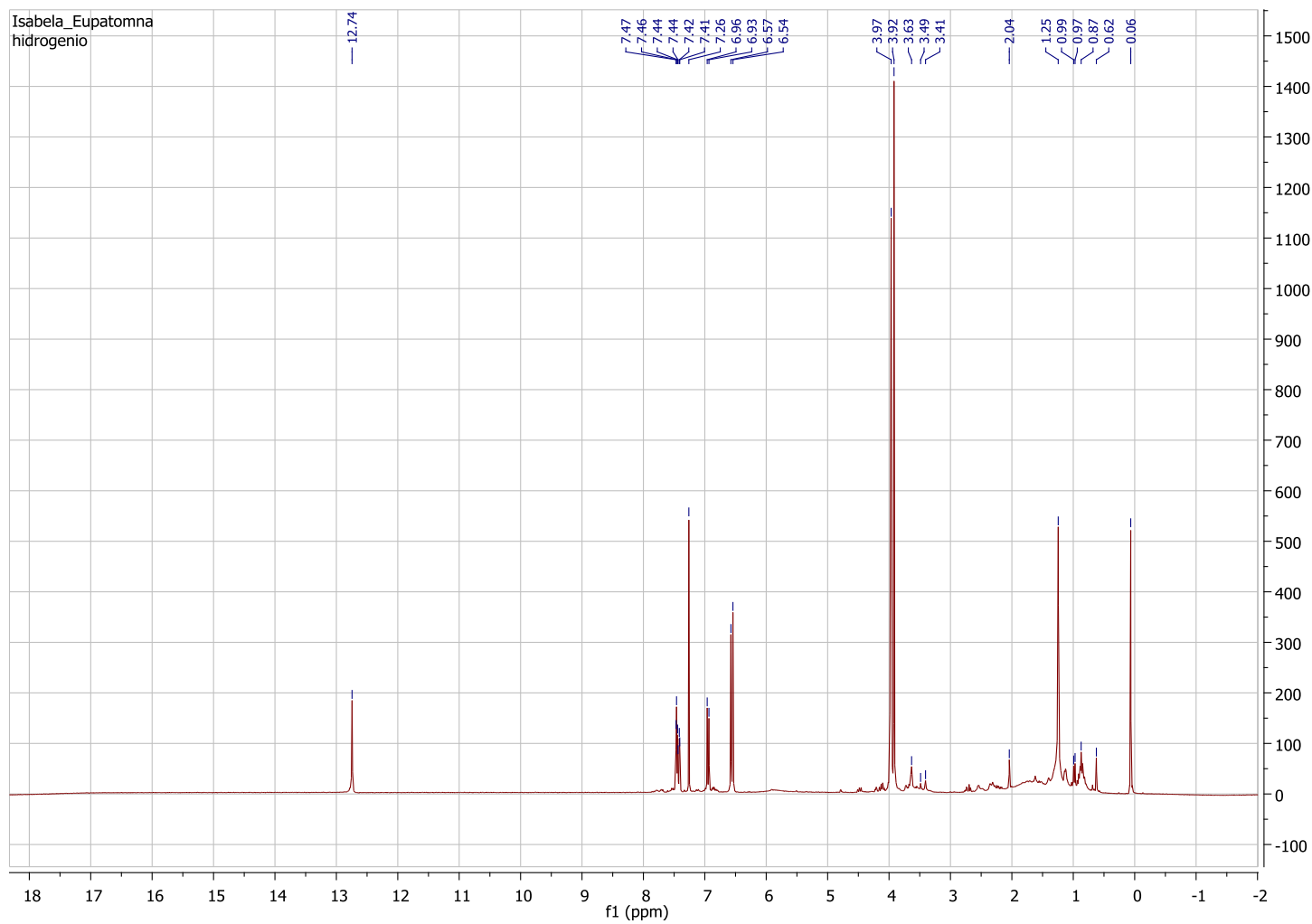
O espectro no UV/Vis da substância purificada (Figura 26) mostra os bandas compreendidas nas faixas de comprimentos de onda correspondentes às bandas I (anel B) e banda II (anel A) características de flavonas.

**Figura 26** - Espectro no UV/Vis da substância purificada da fração MeOH3

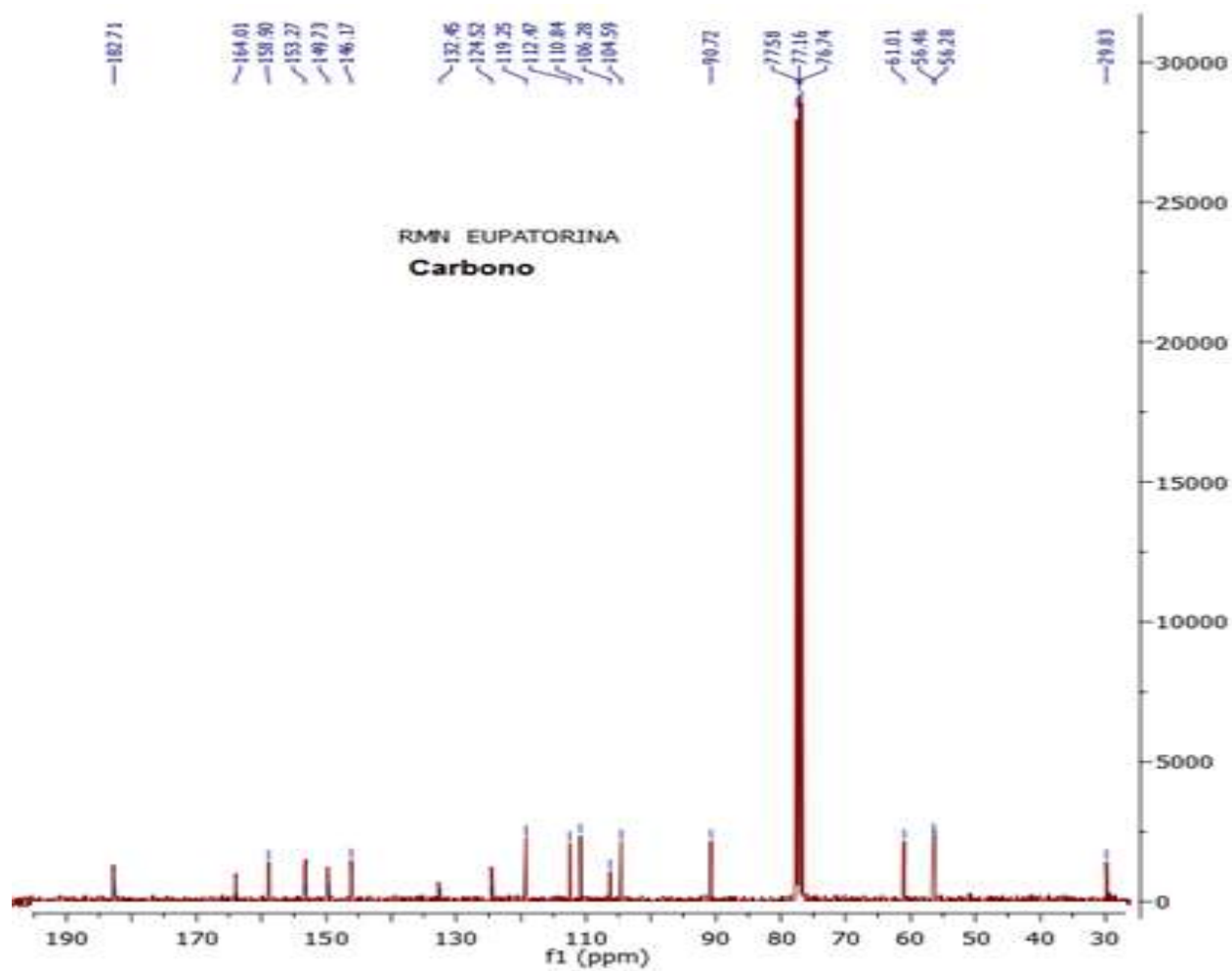
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (figura 28) mostrou 18 sinais, o que é coerente com um esqueleto de flavonoide do tipo aglicona trimetoxilado. Os sinais observados nos espectros de RMN em  $\delta$  56,3 *q*, 56,5 *q* e 62,0 *q* para  $^{13}\text{C}$  e 3,98 *s*, 3,97 *s* e 3,92 *s* para  $^1\text{H}$  (figura 27) evidenciaram a presença dos 3 grupos metoxilas. Os sinais químicos de carbonos aromáticos oxigenados em  $\delta$  153,1 *s* e 146,1 *s* no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  são referentes a

carbonos ligados a hidroxilas. As posições dos grupos substituintes (3 metoxilas e 2 hidroxilas) nos anéis aromáticos (A e B) foram atribuídas com base nos acoplamentos dos hidrogênios remanescentes nos anéis aromáticos, considerando-se as multiplicidades e constantes de acoplamento observadas no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Os deslocamentos químicos em  $\delta$  111,0 *d*, 112,5 *d* e 119,3 *d* no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e em  $\delta$  6,95 *d* (9Hz; 1H), 7,46 *d* (3Hz, 1H) e 7,43 *dd* (9 e 3Hz; 1H) no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foram atribuídos às posições 2', 5' e 6' do anel B. Os sinais em  $\delta$  6,54 *s* no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e em  $\delta$  91,0 *d* no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  correspondem ao carbono não substituído do anel A (C8) e seu respectivo hidrogênio (H8). O sinal com deslocamento químico em  $\delta$  182,8 *s* no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostra a presença da carbonila e os sinais em  $\delta$  104,6 *d* (C3), 164,0 *s* (C2) e 6,57 *s* (H3) são referentes à ligação dupla no anel C.

A tabela 15 traz dados espectrométricos obtidos para a eupatorina a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ .

**Figura 27** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (10 mg/mL;  $\text{CDCl}_3$ ) da substância isolada – eupatorina

**Figura 28** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (10 mg/mL;  $\text{CDCl}_3$ ) da substância isolada – eupatorina



**Tabela 15** - Dados espectrométricos de RMN obtidos para a eupatorina a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e a 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ , em  $\text{CDCl}_3$ 

C	$\delta^{13}\text{C}^1$	$\delta^{13}\text{C}^2$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H} (\text{JHz})^1$	$\delta^1\text{H} (\text{JHz})^2$	$\delta^1\text{H} (\text{JHz})$
2	163,8 s	163,6 s	164,0 s	-----	-----	-----
3	103,2 d	104,3 d	104,6 d	6,80 s 1H / 6,91 s 1H	6,57 s 1H / 6,55 s 1H	6,57 s 1H / 6,54 s 1H
4	182,1 s	182,8 s	182,8 s	-----	-----	-----
5	152,0 s	152,9 s	153,1 s	-----	-----	-----
6	131,9 s	132,7 s	132,7 s	-----	-----	-----
7	158,6 s	158,5 s	158,9 s	-----	-----	-----
8	91,5 d	90,5 d	91,0 d	6,91 s 1H / 6,80 s 1H	6,55 s 1H / 6,57 s 1H	6,54 s 1H / 6,57 s 1H
9	152,6 s	153,0 s	153,4 s	-----	-----	-----
10	105,1 s	106,2 s	106,3 s	-----	-----	-----
1'	122,9 s	124,5 s	124,6 s	-----	-----	-----
2'	113,1 d	112,2 d	112,5 d	7,47 d (2,0) 1H	7,49 d (3,0) 1H	7,46 d (2,1) 1H
3'	146,8 s	145,9 s	146,1 s	-----	-----	-----
4'	151,1 s	149,4 s	149,8 s	-----	-----	-----
5'	112,1 d	110,7 d	111,0 d	7,10 d (8,0) 1H	6,95 d (9,0) 1H	6,95 d (8,5)
6'	118,7 d	119,1 d	119,3 d	7,58 dd (2,0; 8,0) 1H	7,44 dd (3,0; 9,0) 1H	7,43 dd (2,1; 8,5)
OCH <sub>3</sub>	55,8 q	56,1 q	56,3 q	3,88 s	3,99 s 1H	3,98 s 1H
OCH <sub>3</sub>	56,4 q	56,3 q	56,5 q	3,94 s 1H	3,98 s 1H	3,97 s 1H
OCH <sub>3</sub>	59,9 q	60,8 q	62,0 q	3,74 s $^1\text{H}$	3,95 s 1H	3,92 s 1H
OH	-----	-----	-----	-----	-----	12,74 s 1H

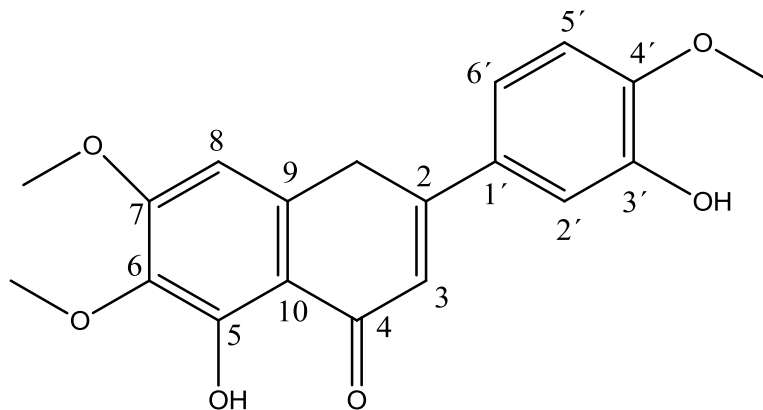
<sup>1</sup> Dados de RMN da 3',5-diidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona obtidos em solvente deuterado utilizado respectivamente para  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (NAGAO et al., 2002).

<sup>2</sup> Dados de RMN da 3',5-diidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona respectivamente para  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  (CLAUDINO, 2013).



Estas análises permitiram que fosse identificada a 3',5-diidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona ou eupatorina (figura 29).

**Figura 29** - Estrutura de 3',5-diidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona (eupatorina)



#### 4.4 Identificação de eupatorina

##### 4.4.1 Cromatografia em camada delgada

A fração referente à eupatorina foi submetida a CCD para comparação de seu perfil com o da eupatorina obtida por Claudino (2013). Os valores de  $R_f$  e as colorações das manchas foram idênticas (figura 30).

**Figura 30** - Cromatoplaça de comparação entre a eupatorina obtida e um padrão



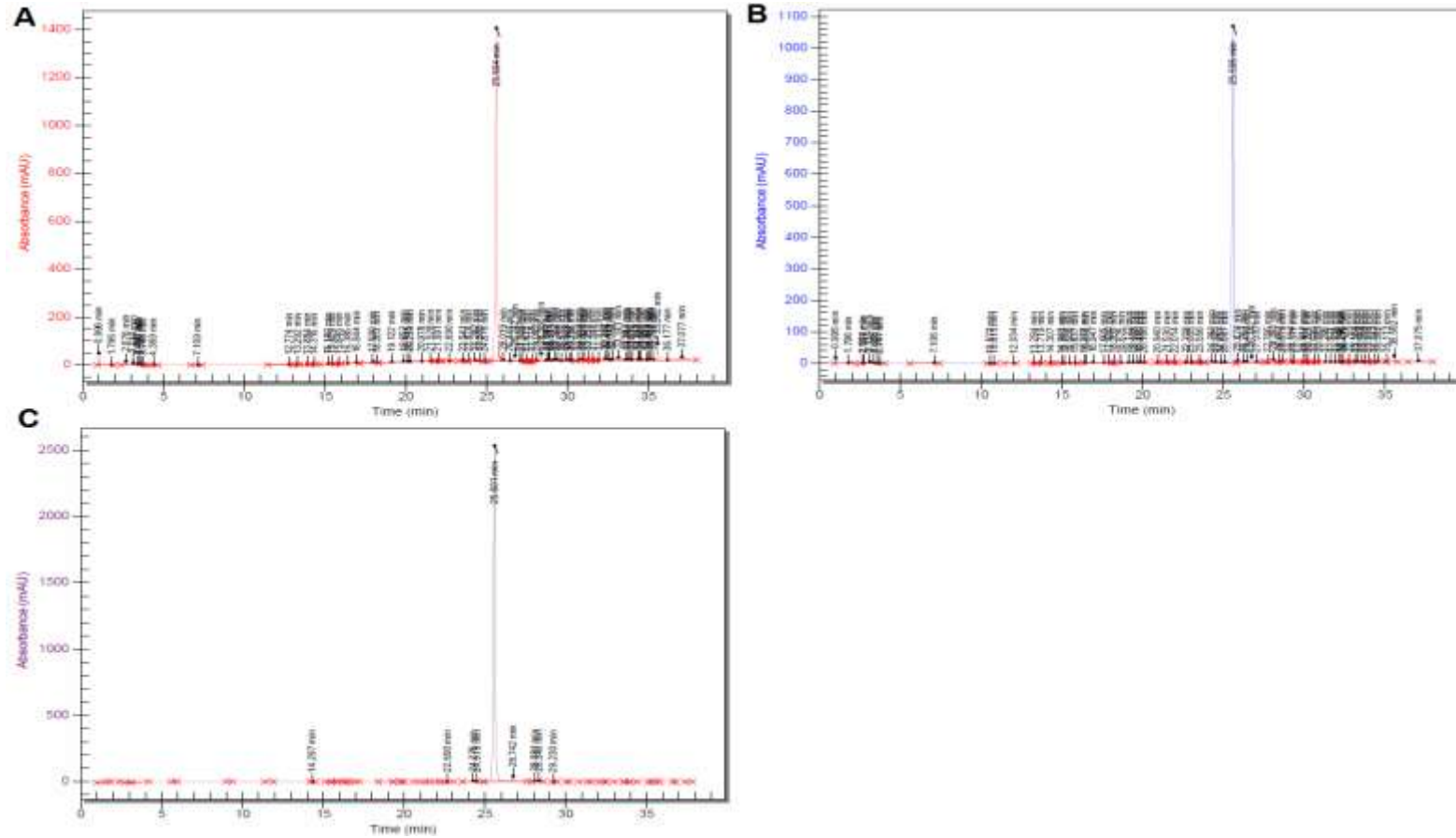
Legenda: Eup.: eupatorina obtida por Claudino (2013); Eup. CCDPrep 1: eupatorina obtida após o processo de CCD preparativa

Fase estacionária: Sílica Gel; Fase móvel: clorofórmio : acetato de etila : metanol 54,5:35,5:10 (v/v). Revelador: Anisaldeído sulfúrico

#### 4.4.2 Análise por CLAE-DAD

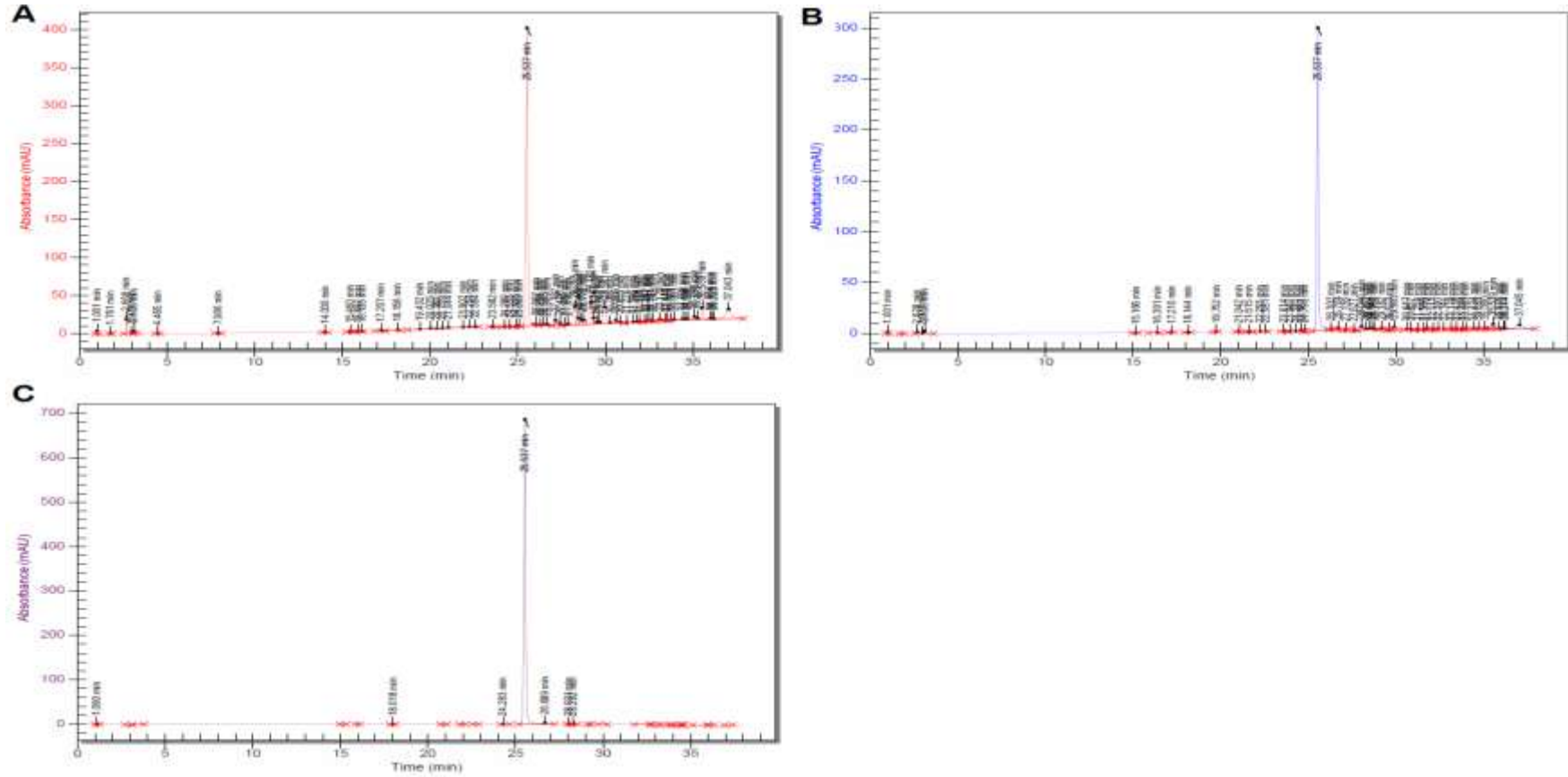
Foi preparada em MeOH grau HPLC uma solução 1,25mg/mL de eupatorina isolada a partir de MeOH<sub>3</sub> em para injeção em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). Nas análises por CLAE observou-se que a amostra analisada e o padrão eupatorina apresentaram o mesmo tempo de retenção (figuras 31 e 32). A pureza do pico esteve igual a 95,92% em 250 nm.

**Figura 31** - Cromatogramas da eupatorina (oriunda de MeOH<sub>3+4</sub>) realizados em CLAE/DAD



A: 230 nm; B:250 nm; C:300 nm. Gradiente linear de 5-100% metanol: água (v/v) em 30 min, mais metanol por 7 min, com vazão de 1,0 mL/min,  $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$

Figura 32 - Cromatogramas da eupatorina obtida por CLAUDINO (2013) realizados em CLAE/DAD

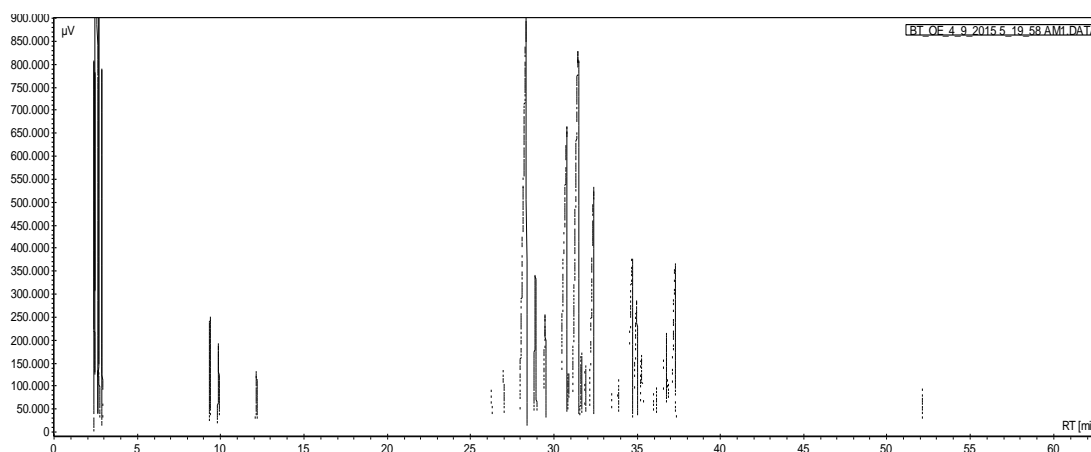


A: 230 nm; B:250 nm; C:300 nm. Condições de análise: gradiente linear de 5-100% metanol: água (v/v) em 30 min, mais metanol por 7 min, com vazão de 1,0 mL/min,  $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$ .

#### 4.5 Análise do OE

Foram obtidos 420 mg de OE a partir de 100g de partes aéreas secas de *B. trimera*. O OE foi submetido a análise por CG-DIC e CG-EM. O cromatograma obtido para o OE por CG-DIC encontra-se na figura 33.

**Figura 33** – Cromatograma do OE obtido por CG-DIC



A proposta de identificação de seus componentes encontra-se na tabela 16, e a tabela 17 mostra a proposta para o OE que foi objeto de estudo em Claudino (2013).

**Tabela 16** - Propostas de identificação de componentes do OE a partir de análises por CG-DIC e CG-EM

	CG-EM					Propostas de Identificação
	PICO	tR (min)	IR exp.	ÁREA	IR lit.	
OE	1	6,72	977	1,7	-	-
	2	6,72	977	1,7	-	$\beta$ -ocimeno
	3	6,99	987	1,2	-	-
	4	8,88	1043	1,1	-	linalol; terpinoleno
	5	22,55	1377	1,5	1377	$\alpha$ -copaeno
	6	23,14	1391	1,5	1390	$\beta$ -cubebeno
	7	24,52	1424	18,9	1420	<i>trans</i> -cariofileno
	8	25,07	1438	1,2	-	-
	9	25,2	1441	2,3	1448	$\alpha$ -humuleno
	10	25,81	1456	2,4	1455	aromadendreno
	11	26,99	1485	10,5	1485	germacreno D
	12	27,18	1489	0,7	-	-

13	27,63	1501	15,6	1500	biciclogermacreno
14	28,17	1514	1,1	-	$\alpha$ -gurjuneno
15	28,51	1523	6,6	1522	delta-cadineno
16	30,7	1579	2,9	1577;1579	espatulenol; óxido de cariofileno
17	30,79	1582	0,9	-	-
18	31,09	1589	5,5	1592	viridiflorol
19	31,37	1597	3,6	1594	viridiflorol
20	31,72	1606	1,7	1603	rosifoliol
21	32,57	1629	0,8	1623	cubenol
22	33,11	1643	1,6	-	calareno; delta-cadineno
23	33,21	1646	1,8	-	-
24	33,68	1659	3,9	1656	$\alpha$ -cadinol

**Tabela 16 – (final)**

Entre seus compostos majoritários pode ser observada a presença do *trans*-cariofileno (18,9%), germacreno D (10,5%) e biciclogermacreno (15,6%), consoante com a composição majoritária encontrada por Claudino (2013) e exposta na tabela 17.

**Tabela 17 - Propostas de identificação de componentes OE obtido por Claudino (2013) a partir de análises por CG-DIC e CG-EM**

PICO	tR (min)	IR exp.	CG-EM		Proposta de Identificação
			ÁREA	IR lit.	
1	21,16	-	1,5	-	-
2	22,67	1394	0,4	1374	$\alpha$ -copaeno
3	23,03	-	0,4	-	-
4	23,29	1411	3,0	1389	$\beta$ -elemeno
5	24,36	1439	14,1	1417	E-cariofileno
6	25,06	1458	1,4	1458	aromadendreno
7	25,62	1473	1,9	1452	$\alpha$ -humuleno
8	26,66	1501	17,5	1484	germacreno D
9	27,26	1517	24,5	1500	biciclogermacreno
20	27,55	-	0,7	-	-
11	28,2	1543	5,5	1522	delta cadineno
12	29,41	1576	0,7	1559	germacreno B
13	29,78	1587	1,2	1592	viridiflorol
14	30,16	1598	2,4	1577	espatulenol
15	30,38	-	7,7	-	-
16	30,66	-	3,8	-	-
17	31,92	1649	0,8	1646	torreiol

18	32,4	1662	2,4	1652	$\alpha$ -cadinol
19	32,83	-	4,7	-	-
20	33,65	-	0,8	-	-
21	34,1	-	3,4	-	-
22	47,21	-	1,1	-	-

**Tabela 17 – (final)**

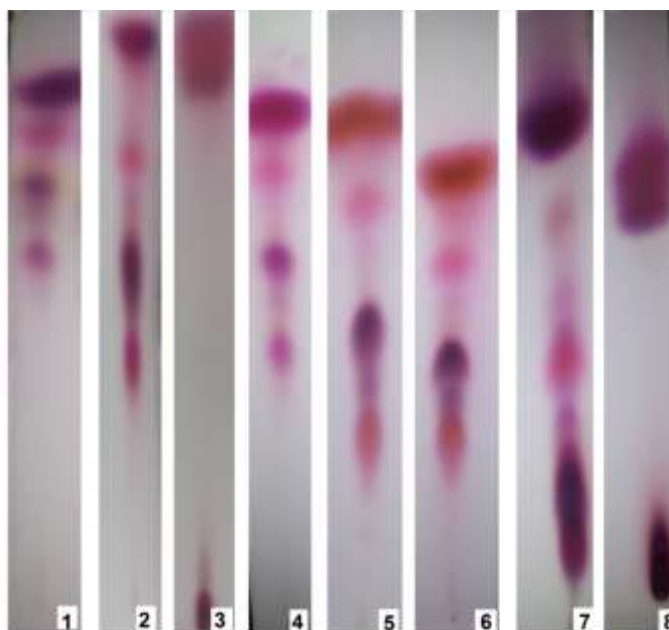
Quer sejam vegetais ou animais, todos os seres vivos produzem macromoléculas consideradas essenciais em processos bioquímicos, dentre as quais estão os carboidratos, lipídeos, proteínas e os ácidos nucleicos. Todavia, a capacidade metabólica que alguns organismos possuem de produzirem e armazenarem substâncias químicas especializadas se chama metabolismo secundário, e ele sofre influência das diferentes necessidades dos vegetais e possibilidades disponíveis para a manutenção do bem-estar das espécies frente às suas interações com o ambiente (SIMÕES et al., 2010). Em comparação ao OE obtido nos ensaios de Claudino (2013), observa-se composição distinta entre eles e que pode ser consequência do ciclo vegetativo, umidade, regime de ventos, exposição ao Sol, temperatura, hidratação do solo e micronutrientes, uma vez que as plantas foram coletadas em diferentes épocas do ano (janeiro/2011 e outubro/2014) e em diferentes locais (Araraquara-SP e Paulínia-SP).

Ambas análises por CG-EM foram realizadas em cromatógrafos correspondentes (*Shimadzu* QP-2010) e colunas com características de tamanho de partícula e polaridade que poderiam ser permutadas entre si (DB-5, EM-5MS). No entanto, a pequena diferença no diâmetro interno (0,26  $\mu\text{m}$  para 0,25  $\mu\text{m}$ ), na variação de temperatura máxima (de 60° a 246°C, de 60° a 240°C) e no fluxo do gás de arraste He (1,017 ml/min e 1,3 ml/min) podem ter colaborado com diferenças qualitativas entre as amostras. As variações de temperatura interferem na volatilização dos componentes do óleo, enquanto que o fluxo interfere no tempo de permanência do analito no interior da coluna repercutindo na eficiência da coluna, sendo que, se menor, aumenta o número de pratos teóricos durante o processo.

#### 4.5.1 Otimização de condições para CC com o OE (fracionamento em pequena escala)

Para otimizar as condições de CC para o OE, inicialmente foram testadas fases móveis em CCD (Figura 34) e foi preparada uma coluna em pequena escala para verificar quais solventes e proporções deles em misturas proporcionariam força de eluição que mantivesse as manchas com Rf entre 0,2-0,8 e resolução maior do que 0,1 para serem utilizados posteriormente na CC em maior escala. Optou-se por um gradiente de eluição composto por hexano e acetato de etila (hexano ; hexano : acetato de etila 99:1 até 80:20; acetato de etila). Esta escolha se baseou não apenas na melhor separação como também na menor toxicidade dos solventes.

**Figura 34** - Cromatoplasmas teste com o OE para definição de eluentes de CC do OE



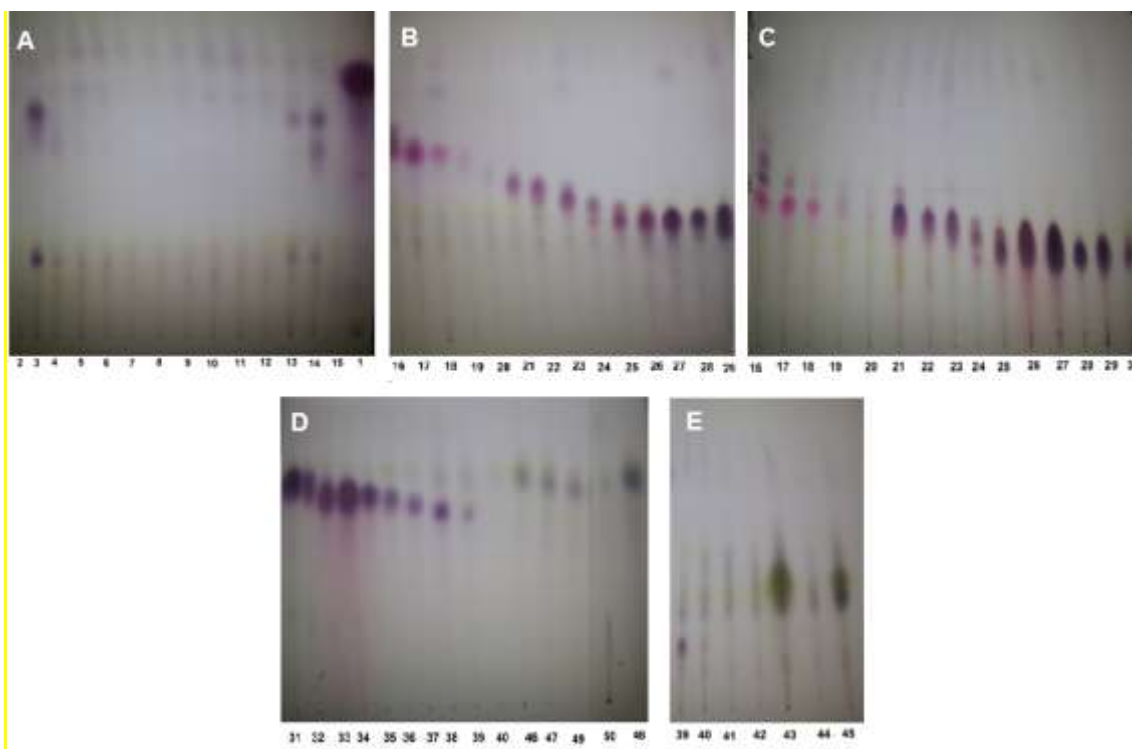
Fases móveis: 1: hexano : acetato de etila 80:20 (v/v); 2: benzeno : acetato de etila 95:5 (v/v); 3: hexano : diclorometano 70:30 (v/v); 4: hexano : acetato de etila 85:15 (v/v); 5: hexano : acetato de etila 88:12 (v/v); 6: hexano : acetato de etila 90:10 (v/v); 7: hexano : acetato de etila 95:5 (v/v); 8: Hexano. Fase estacionária: sílica gel. Revelador: Anisaldeído sulfúrico



#### 4.5.2 Cromatografia em coluna em pequena escala

Abaixo estão ilustrados os perfis de separação dos componentes do OE alcançados com diferentes solventes por CCD, bem como os perfis das subfrações da coluna teste (Figura 35). No caso das frações 16-24 a fase móvel benzeno: acetato de etila 95:5 proporcionou melhor separação do que hexano: acetato de etila 80:20 pois são observadas mais manchas.

**Figura 35** - Cromatoplaça das frações de CC OE em pequena escala



Fase estacionária: sílica gel; revelador: Anisaldeído sulfúrico. A: hexano : acetato de etila 85:15 (v/v); B: Fase móvel: hexano : acetato de etila 80:20 (v/v); C: Fase móvel: Benzeno: acetato de etila 95:5 (v/v); D: hexano : acetato de etila 65:35 (v/v); E: Fase móvel: Benzeno: acetato de etila 90:10 (v/v).

Os perfis químicos observados através destas análises por CCD demonstraram a separação dos componentes do OE em suas frações, sendo que algumas frações

apresentaram única mancha na cromatoplaça. Após a análise das cromatoplaças, foi realizada CC em maior escala com o OE.

#### 4.5.3 Cromatografia em coluna em maior escala

Os rendimentos das frações obtidas através do fracionamento cromatográfico em maior escala encontram-se na tabela 18.

**Tabela 18** - Rendimento das frações de CC do OE em maior escala

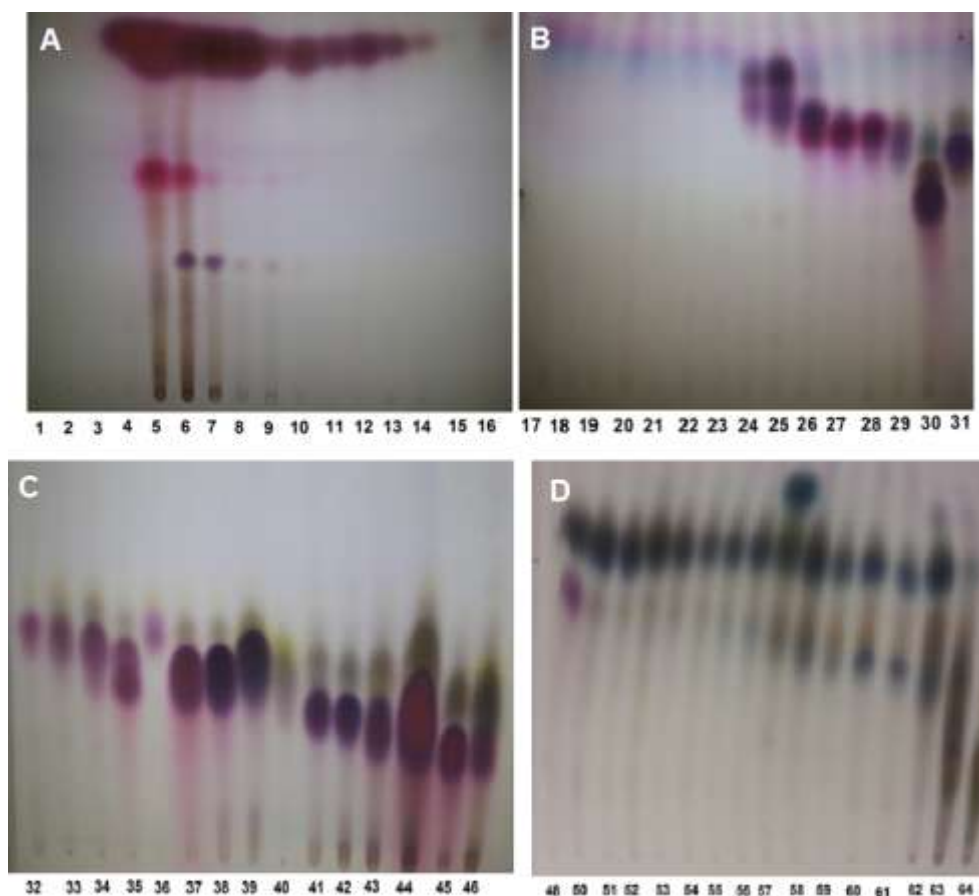
<b>Fração</b>	<b>massa (mg)</b>	<b>Fração</b>	<b>massa (mg)</b>
<b>1</b>	1,8	<b>2</b>	1,8
<b>3</b>	1,5	<b>4</b>	6,9
<b>5</b>	14,4	<b>6</b>	7,4
<b>7</b>	8,9	<b>8</b>	3,0
<b>9</b>	4,3	<b>10</b>	6,9
<b>11</b>	6,5	<b>12</b>	5,2
<b>13</b>	4,6	<b>14</b>	4,6
<b>15</b>	3,5	<b>16</b>	3,7
<b>17</b>	6,5	<b>18</b>	3,5
<b>19</b>	3,0	<b>20</b>	3,5
<b>21</b>	3,2	<b>22</b>	3,6
<b>23</b>	5,6	<b>24</b>	7,5
<b>25</b>	4,0	<b>26</b>	5,9
<b>27</b>	6,0	<b>28</b>	7,9
<b>29</b>	6,3	<b>30</b>	3,9
<b>31</b>	7,6	<b>32</b>	3,0
<b>33</b>	5,5	<b>34</b>	1,0
<b>35</b>	3,6	<b>36</b>	5,8
<b>37</b>	3,8	<b>38</b>	3,7

<b>39</b>	4,6	<b>40</b>	8,5
<b>41</b>	6,9	<b>42</b>	5,5
<b>43</b>	2,6	<b>44</b>	8,7
<b>45</b>	5,4	<b>46</b>	7,8
<b>47</b>	6,0	<b>48</b>	6,4
<b>49</b>	4,3	<b>50</b>	5,6
<b>51</b>	9,7	<b>52</b>	3,3
<b>53</b>	7,9	<b>54</b>	5,4
<b>55</b>	7,0	<b>56</b>	8,7
<b>57</b>	6,1	<b>58</b>	7,3
<b>59</b>	8,9	<b>60</b>	4,0
<b>61</b>	4,5	<b>62</b>	3,2
<b>63</b>	6,4	<b>64</b>	7,3
<b>Rendimento: 92,4%</b>			

**Tabela 18 - (final).**

A análise das cromatoplasmas referentes à CC com o OE mostram diferentes blocos com perfis de composição diferentes (Figura 36). A partir desta observação, as frações foram submetidas à análise por CG-DIC e CG-EM para verificação da composição química.

**Figura 36** - Cromatoplaça das frações de CC OE em maior escala



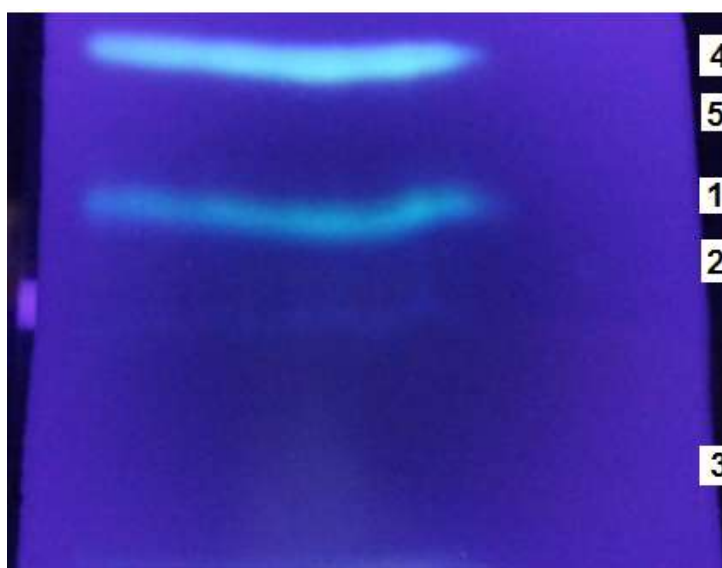
Fase estacionária: sílica gel; revelador: Anisaldeído sulfúrico. A: Fase móvel: hexano : acetato de etila 85:15 (v/v); B: Fase móvel: hexano : acetato de etila 82:18 (v/v); C: Fase móvel: hexano : acetato de etila 80:20 (v/v); D: Fase móvel: hexano : acetato de etila 70:30 (v/v); E:

A cromatoplaça da figura 18 sugere que, nas frações obtidas com o fracionamento do OE, estão contidas também substâncias presentes em EAcBt. Isto é possível uma vez que, no processo de obtenção do extrato, componentes do OE também podem ser extraídos pelo solvente utilizado, acetato de etila. Ainda que careça de estudos, este fato pode sugerir a hipótese de que a atividade citotóxica apresentada pelo extrato acetato de etila em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa (projeto FAPESP [2012/00745-3](#)) possa ser consequência também da presença destes componentes do OE.

#### 4.5.4 Cromatografia em coluna preparativa com subfrações do OE (CCDprep2)

Para as frações obtidas da coluna de OE, a separação das manchas foi observada em câmara de luz UV em 352 nm. As frações 43-45 foram solubilizadas em éter etílico e aplicadas em placa de sílica gel. A placa visualizada no UV encontra-se abaixo (Figura 37). Frações obtidas por este processo foram também analisadas por CG-DIC e CG-EM.

**Figura 37** - Cromatoplaça de CCDprep2 com o OE: observação em câmara de luz UV (352 nm)



Fase móvel: Hexano:DCM:MeOH 45:54:1 (v/v). Fase estacionária: sílica gel.

#### 4.5.5 Análises por CG-DIC E CG-EM

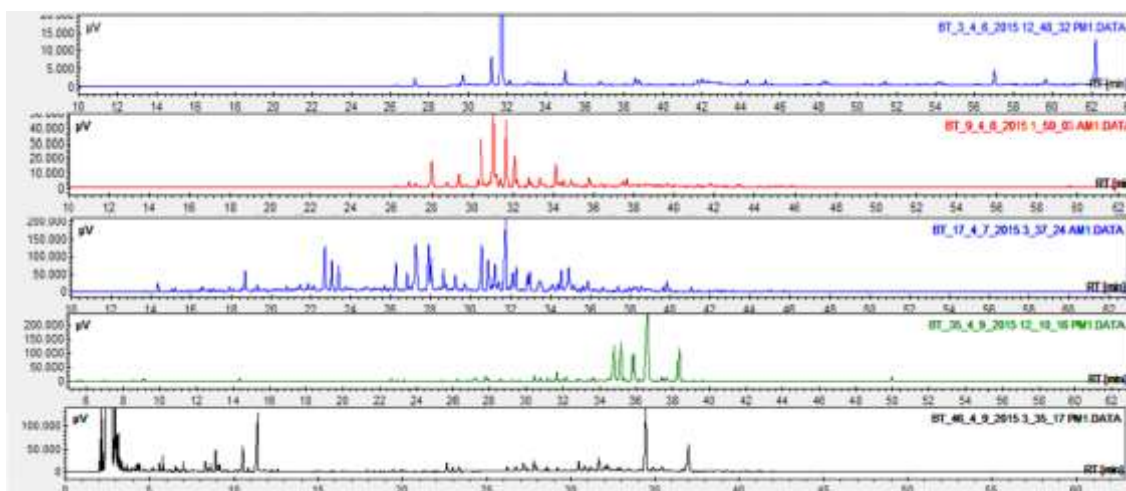
As frações obtidas no fracionamento em maior escala foram analisadas por CG-DIC posteriormente às análises por CCD.

Todos os cromatogramas obtidos através da análise por CG-DIC encontram-se no ANEXO II. Alguns estão na figura 38 e estampam a manifesta diferença química encontrada. As frações 1 a 7 possuem perfis químicos distintos (cromatogramas no ANEXO II). A observação do cromatograma da fração 3 condiz com o perfil observado na análise por CCD apresentando 2 picos majoritários (figura 36). As frações 8 a 14

(cromatogramas no ANEXO II) apresentam perfis mais complexos que os das frações anteriores, demonstrando a presença de 4 a 5 picos majoritários para as frações. A análise das frações 15 a 21 (cromatogramas no ANEXO II) indica composição ainda mais complexa que as anteriores, sendo que de 16 a 20 existe um pequeno grupo de 3 substâncias que demoram mais a eluir, o que pode ser consequência de suas interações com a coluna e menor volatilidade.

A partir da fração 31 até a 37 (cromatogramas no ANEXO II) novamente são observados perfis com até 5 picos majoritários. A comparação com CCD é possível pois notam-se frações com poucas manchas (figura 36). Entre as frações 46 e 52 (cromatogramas no ANEXO II) também são observados perfis com várias substâncias que eluem mais tardiamente.

**Figura 38** - Cromatogramas das frações 3, 9, 17, 35 e 46 obtidos por CG-DIC



Inicialmente, as frações (1-29, 31-33, 34-42, 43-64, 1p, 2p, 3p, 4.2p) foram analisadas por CG-DIC, tendo sido seus IR (Van Den Dool and Kratz) calculados (ADAMS, 2007). Os resultados demonstram que os cromatogramas das frações apresentam picos com tempos de retenção sugerindo composições distintas das mesmas. As frações foram posteriormente submetidas à análise por CG-EM. As sugestões de identificação para todas as frações selecionadas e analisadas por CG-

EM e CG-DIC encontram-se listadas no ANEXO I. Na tabela 19 estão as propostas de identificação dos constituintes das frações selecionadas para o ensaio de citotoxicidade, tendo sido considerados na comparação entre os IR experimentais e teóricos até 10 números para mais ou para menos, e similaridade de, no mínimo, 75% no espectro de massas.

**Tabela 19** - Proposta de identificação dos constituintes de frações do OE avaliadas em ensaios *in vitro*. Análise por CG-EM

Frações	.CG-EM					Propostas de Identificação	
	PICO	tR (min)	IR exp.	ÁREA	IR lit.		
6	4	23,15	1303	3,5	1350	$\alpha$ -ilangeno	
	<b>6</b>	<b>24,36</b>	<b>1333</b>	<b>28,4</b>	<b>1390</b>	<b><math>\beta</math>-cariofileno</b>	
	7	25,17	1352	1,2	-	aromadendreno; <i>trans</i> -cariofileno	
	8	25,78	1367	6,1	-	$\beta$ -selineno; $\alpha$ -humuleno	
	9	26,63	1387	2,3	-	$\alpha$ -amorfenol; germacreno-D; calareno	
	<b>10</b>	<b>26,86</b>	<b>1393</b>	<b>22,2</b>	<b>1390</b>	<b><math>\beta</math>-cubebeno</b>	
	11	27,14	1399	1,3	1394	$\beta$ -elemeno	
	12	27,36	1405	2,5	1417	isosativeno	
	13	27,46	1407	1,9	1430	gama-elemeno	
	14	27,61	1411	1,6	-	muuroleno; $\alpha$ -amorfenol	
	15	28,14	1425	1,5	1428	$\beta$ -gurjuneno (calareno)	
	16	28,41	1431	3,9	1439	aromadendreno	
	17	30,63	1487	3,9	-	espatulenol; (-)-espatulenol	
	18	30,76	1490	6,1	-	óxido de cariofileno; patchuleno; <i>trans</i> -cariofileno	
	19	32,94	1548	1,1	-	-	
	20	33,99	1575	5,1	1582	óxido de cariofileno	
	10	1	19,35	1301	1,4	1300	tridecano
		2	22,56	1377	1,2	-	-
		3	23,14	1391	1,8	1389	$\beta$ -elemeno
		4	23,59	1401	1,6	1400	tetradecano
5		24,22	1417	2,0	1416	1,6-dimetil-naftaleno	
<b>6</b>		<b>24,36</b>	1420	<b>20,5</b>	<b>1419</b>	<b><math>\beta</math>-cariofileno</b>	
7		25,78	1455	3,2	1452	$\alpha$ -humuleno	
8		26,63	1476	1,6	-	-	
<b>9</b>		<b>26,86</b>	1482	<b>19,5</b>	<b>1484</b>	<b>germacreno-D</b>	
<b>11</b>		<b>27,49</b>	1497	<b>30,8</b>	<b>1500</b>	<b>biciclogermacreno</b>	
12		27,62	1500	2,6	-	-	
13		27,88	1507	2,4	1508	germacreno-A	
14		28,15	1514	1,0	-	-	
15		28,41	1521	7,3	-	-	
16		29,89	1559	1,8	-	-	
18		1	19,35	1301	4,1	1300	tridecano
	2	22,56	1377	3,5	-	-	
	3	23,58	1401	6,1	1400	tetradecano	
	4	23,65	1403	2,4	1408	1,6-dimetil-naftaleno	
	5	23,73	1405	2,6	1408	1,6-dimetil-naftaleno	
	<b>6</b>	<b>24,21</b>	1416	<b>10,2</b>	<b>1409</b>	<b>2,6-dimetil-naftaleno</b>	
	7	24,38	1421	3,6	1424	1,4-dimetil-naftaleno	
	8	25,1	1438	4,7	-	-	
	9	25,62	1451	1,2	1443	1,4-dimetil-naftaleno	



	10	26,07	1462	1,7	-	-
	11	26,9	1483	9,1	-	-
	12	27,14	1488	1,3	-	-
	13	27,29	1492	4,4	-	-
	14	28,51	1523	5,0	-	-
	15	28,76	1530	6,1	-	-
	16	29,3	1543	3,4	-	-
	17	29,52	1549	3,6	-	-
	18	30,87	1584	2,1	-	-
	19	31,02	1588	4,4	-	-
	20	31,42	1598	6,1	-	-
	21	31,56	1602	2,7	-	-
	1	22,56	1377	3,7	1379	<i>trans</i> - $\beta$ -damascenona
	4	30,2	1567	2,0	-	-
	5	30,36	1571	5,2	1567	palustrol
	6	30,75	1581	3,8	-	isogeraniol; ledano
	7	31,05	1588	2,3	-	germacrono
	8	31,21	1593	4,6	-	$\delta$ -Guaieno
	9	31,63	1603	0,9	-	germacreno-B
25	10	32,27	1621	2,4	-	globulol; ledol
	11	<b>33,1</b>	1643	<b>14,6</b>	<b>1642</b>	<b>cubenol</b>
	12	34,02	1668	2,0	-	-
	13	34,61	1684	1,6	-	-
	14	40,12	1841	0,9	-	-
	15	43,31	1938	3,7	-	espatulenol; $\alpha$ - <i>trans</i> -bergamotol; 13-cedrenol
	16	46,29	2032	8,8	-	<i>trans</i> -cariofileno; $\alpha$ - <i>trans</i> - bergamotol; 13-cedrenol
	17	<b>48,88</b>	2117	<b>29,4</b>	-	<b><math>\alpha</math>-<i>trans</i>-bergamotol;<math>\beta</math>-sinensal</b>
	1	23,58	1401	1,3	1400	tetradecano
	2	24,23	1417	1,6	1410	2,3-dimetil-naftaleno
	3	26,89	1482	1,5	-	-
	4	28,52	1523	1,0	-	2,3,6-trimetil-naftaleno; 1,6,7- trimetil-naftaleno
	5	29,54	1550	3,7	-	óxido de cariofileno; patchuleno
27	6	29,78	1556	7,2	1561	ledol
	7	<b>30,77</b>	1581	<b>57,3</b>	<b>1582</b>	<b>óxido de cariofileno</b>
	8	30,99	1587	3,2	-	biciclogermacreno
	9	31,8	1608	4,8	-	-
	10	32,07	1615	2,6	1608	$\alpha$ -cedrol
	11	32,27	1621	3,5	-	iludol; epiglobulol; 1,6-dien-3-ol- humuleno
	1	27,45	1496	2,2	-	cedrandiol; espatulenol
	2	30,26	1568	6,5	1569	viridiflorol
38	3	<b>30,66</b>	<b>1578</b>	<b>53,9</b>	<b>1577</b>	<b>espatulenol</b>
	4	30,89	1584	2,9	1581	espatulenol
	5	<b>31,29</b>	<b>1595</b>	<b>14,4</b>	<b>1593</b>	<b>globulol</b>
	6	<b>31,69</b>	<b>1605</b>	<b>15,1</b>	<b>1603</b>	<b>rosifoliol</b>

Tabela 19 - (continuação)

	7	33,16	1645	5,2	1641	tau-muurolol
40	1	3,76	-	2,6	-	-
	2	4,47	-	3,4	-	-
	3	4,7	902	2,2	-	-
	4	4,88	909	3,9	-	-
	5	5,75	941	4,0	-	-
	6	5,84	944	2,9	-	-
	7	5,97	949	4,0	-	-
	8	6,26	960	1,6	-	pentanona; 3-metil-2-butanona
	9	6,46	968	2,7	-	-
	10	6,77	979	0,9	-	2,4-hexadien-1-ol; 2-hexin-1-ol
	<b>11</b>	<b>7,71</b>	<b>1011</b>	<b>13,3</b>	-	<b>2,4-hexadien-1-ol; 4-metil-2,3-hexadien-1-ol</b>
	12	7,83	1014	3,6	-	2-metil-2-penten-1-ol
	13	9,05	1048	1,3	-	3,5-hexadien-1-ol; 3-hexin-1-ol
	14	19,02	1293	1,5	1290	$\beta$ -metil-naftaleno
	15	19,36	1301	1,2	1301	tridecano
	16	22,55	1377	0,9	-	-
	17	23,6	1401	1,4	1401	tetradecano
	18	24,39	1421	0,9	1427	1,6-dimetil-naftaleno
	19	26,89	1482	1,5	-	-
	20	27,27	1492	1,0	-	-
	21	28,28	1517	3,8	-	espatulenol; epiglobulol
	22	30,28	1569	1,9	1567; 1569	viridiflorol; ledol
	23	30,72	1580	8,9	1578	espatulenol
	24	30,93	1585	2,9	1582	óxido de cariofileno
	25	31,43	1598	0,9	-	-
	26	31,72	1606	1,3	1600	rosifoliol
	27	33,64	1658	2,6	-	viridiflorol; ledol
	28	34,24	1674	2,6	-	óxido de cariofileno
42	1	3,89	-	0,9	-	4,4,5-trimetil-2-hexeno; 2,4-dimetil-2-penteno
	2	6,23	959	5,1	-	pentanona; 3-metil-2-butanona
	3	29,77	1556	0,9	1566	óxido de cariofileno
	4	30,48	1574	0,9	1567	palustrol
	5	32,29	1621	1,2	1623	cubenol
	<b>6</b>	<b>32,9</b>	<b>1638</b>	<b>10,8</b>	-	<b>espatulenol</b>
	7	33,27	1648	1,5	-	$\beta$ -guaienene; cedren-13-ol; espatulenol
	8	33,51	1654	1,3	1658	eudesmol
	<b>9</b>	<b>33,79</b>	<b>1662</b>	<b>47,4</b>	-	<b>viridiflorol</b>
	10	34,01	1668	2,9	-	óxido de ledeno; óxido de aromadendreno
	11	34,68	1686	4,8	-	globulol
	12	36,4	1734	4,0	-	-
	13	48,71	2111	4,8	2112	fitol
	14	51,07	2192	1,1	-	-
57	1	3,75	-	1,8	-	2,4-hexadien-1-ol; 1-ciclo-hexenol

Tabela 19 - (continuação)

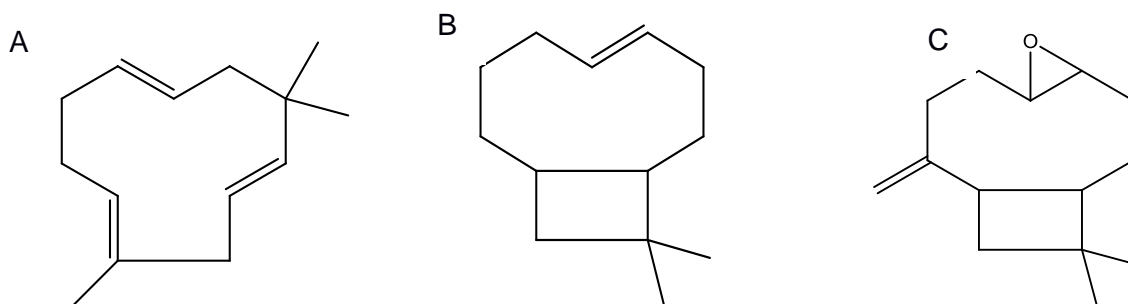
2	3,89	-	3,8	-	2,4-hexadien-1-ol; 1,3,5-hexatrieno
3	4,38	-	1,4	-	-
4	4,46	-	1,5	-	-
5	4,69	902	2,2	895	ciclohexanona
6	5,71	940	0,9	-	-
7	5,78	942	0,9	-	-
8	5,93	948	1,1	-	-
9	6,11	955	3,9	-	3-metil-2-ciclopenten-1-ona; 2-metil-2-ciclopenten-1-ona
10	6,2	958	4,5	-	2-pentanona; 3-metil-2-butanona
11	6,43	966	1,4	-	4-metil-4-penten-2-ona; 3-hexeno-2,5-diol
12	7,36	1001	2,7	-	-
13	7,55	1006	5,1	-	3,4-heptadieno; 2,4-hexadien-1-ol
14	8,19	1024	9,9	-	2,4-hexadien-1-ol; 1,2-ciclononadieno
15	16,73	1240	1,4	-	-
16	18,99	1292	2,8	-	2,3-dimetil-1,4-pentadieno; 5-metil-1,4-hexadieno
17	19,61	1307	6,1	-	-
18	20,89	1337	1,4	-	-
19	23,88	1408	4,9	-	-
20	24,18	1416	4,2	1416	1,3-dimetil-naftaleno
21	24,34	1420	2,5	1422	1,3-dimetil-naftaleno
22	28,47	1522	2,9	-	4,6,8-trimetil-naftaleno; 2,3,6-trimetil-naftaleno
23	28,72	1529	2,0	-	4,6,8-trimetil-azuleno; 2,3,6-trimetil-naftaleno
24	29,27	1543	1,7	-	-
25	29,46	1548	2,5	-	2,4,6-trimetil-azuleno; 1,6,7-trimetil-naftaleno
26	30,84	1583	0,9	-	-

Tabela 19 - (final)

#### 4.6 Citotoxicidade por SRB

Foram avaliadas as atividades citotóxicas do OE, eupatorina e padrões de terpenos com estruturas análogas (figura 39).

**Figura 39** - Estruturas de terpenos análogas utilizadas nos ensaios in vitro



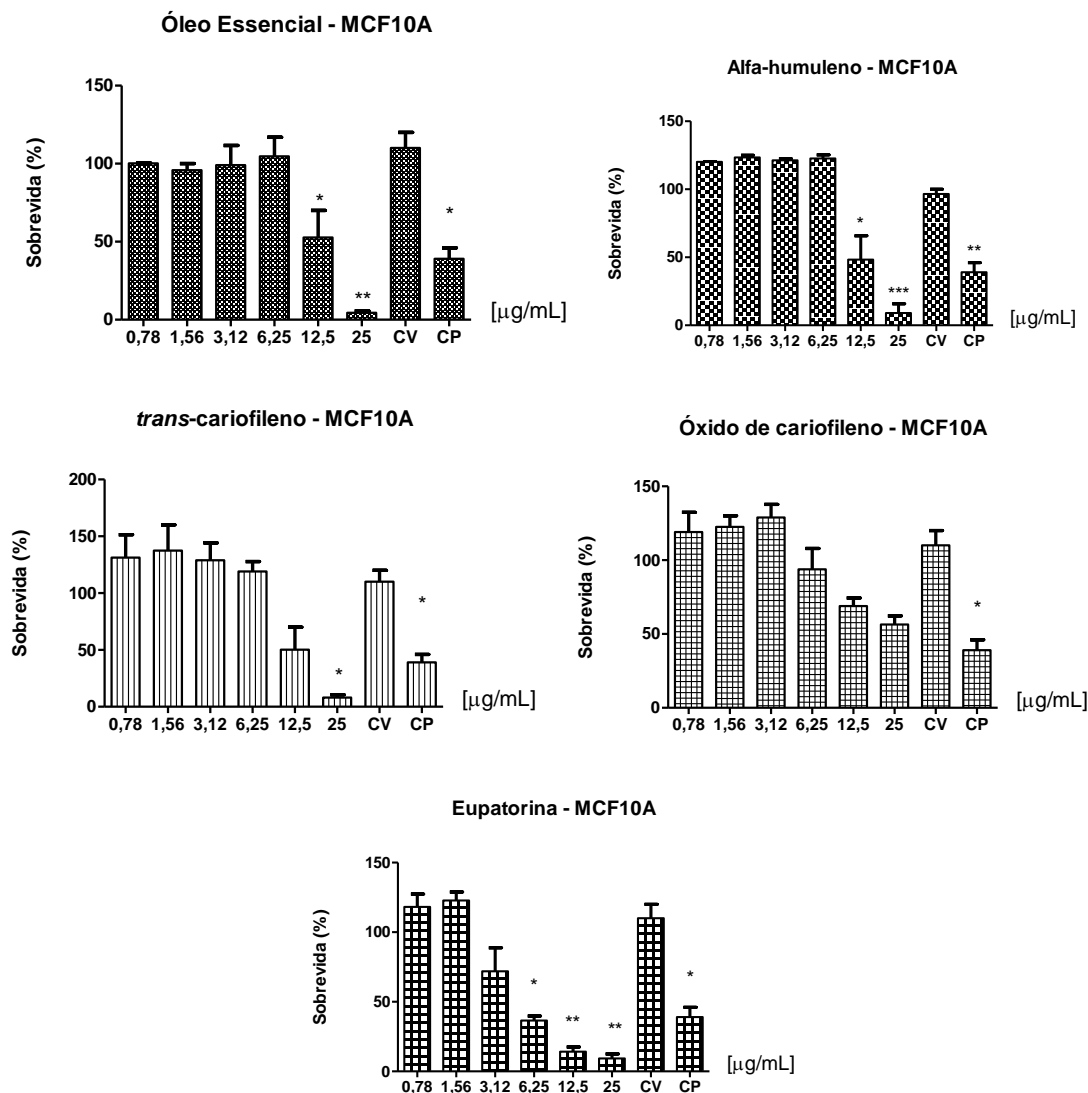
Legenda: A:  $\alpha$ -humuleno; B: *trans*-cariofileno; C: óxido de cariofileno

##### 4.6.1 Oleo essencial, padrões e eupatorina

Os resultados obtidos a partir dos experimentos com os padrões, eupatorina e OE mostram que houve morte celular com significância estatística em todas as linhagens avaliadas.

De maneira geral, os resultados, em todas as linhagens avaliadas, apresentam uma tendência de perfil concentração-resposta. A linhagem normal MCF10A mostrou-se sensível aos componentes do OE e a ele próprio (figura 40), sendo que em pelo menos 3 das menores concentrações avaliadas (100, 50 e 25  $\mu\text{g/mL}$  para o OE e *trans* cariofileno, 50, 25 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$  para o  $\alpha$ -humuleno e eupatorina) o valor de  $\text{CI}_{50}$  (tabela 20, figura 43) foi atingido, à exceção do óxido de cariofileno, cuja citotoxicidade foi inferior à dos demais compostos estudados.

**Figura 40** - Ensaio de citotoxicidade em linhagem MCF-10A, a partir de 3 experimentos independentes (média  $\pm$  erro padrão-ep). Tratamento realizado com OE,  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cariofileno, óxido de cariofileno e eupatorina.

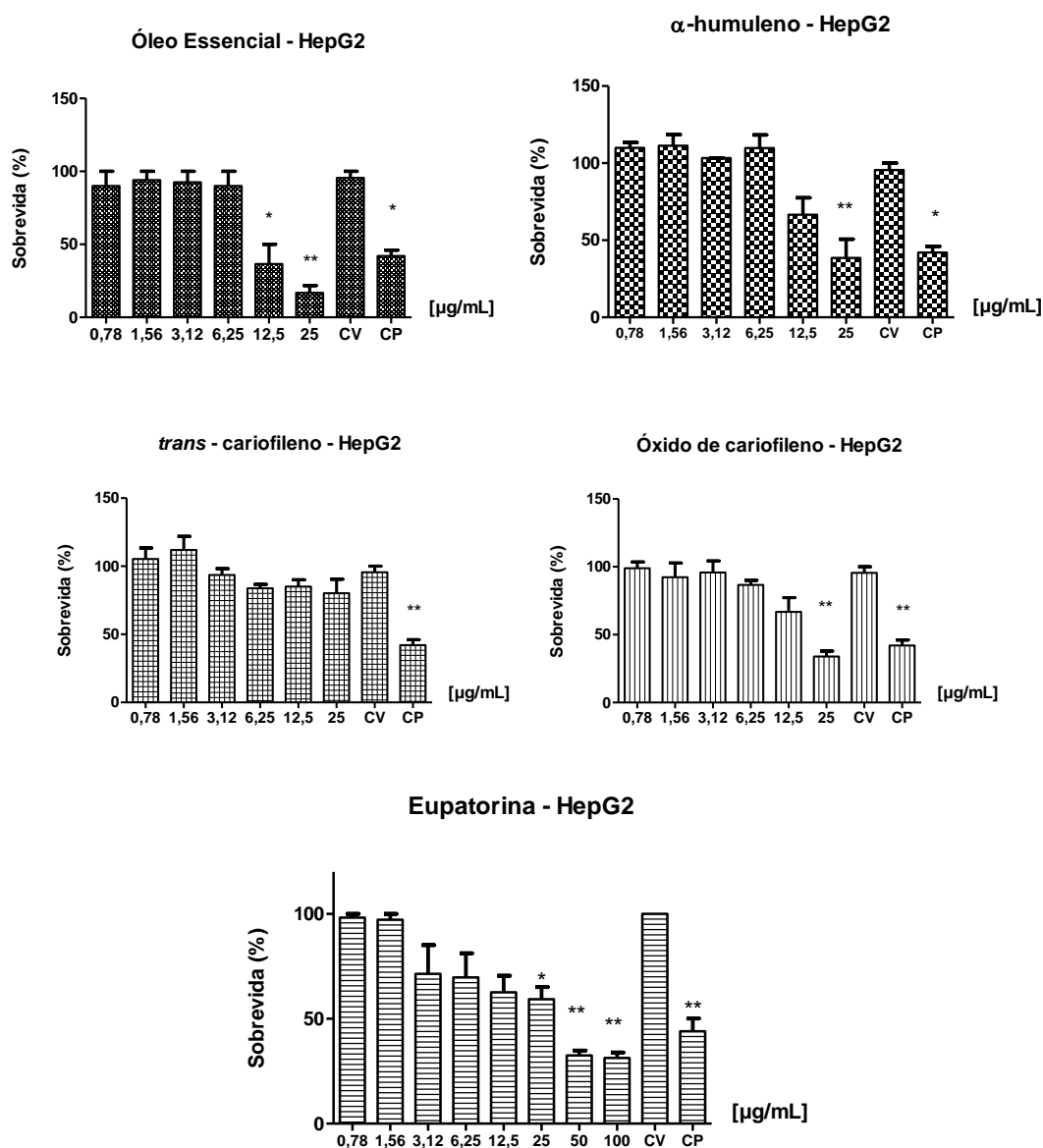


**Figura 40** – (final)

CV: Controle de veículo (DMSO 1%). CP: Controle positivo (doxorrubicina 20 $\mu\text{g/mL}$ ). Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste Tukey. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*)  $p < 0,05$ , com relação ao CV.

Com relação às linhagens tumorais (figuras 41 e 42), o óxido de cariofileno foi capaz de reduzir a sobrevivência apenas das células de hepatocarcinoma (HepG2). Enquanto isto, o *trans*-cariofileno se mostrou mais citotóxico às células tumorais de mama (MCF-7). Em HepG2, destaca-se a atividade citotóxica exibida por todos os compostos avaliados, tendo sido obtidos resultados com significância estatística. A flavona eupatorina forneceu uma diminuição de sobrevivência considerável estatisticamente em todas as linhagens, atingindo valores de  $CI_{50}$  (5,0, 6,7 e 29  $\mu\text{g/mL}$  para MCF10A, MCF-7 e HepG2, respectivamente).

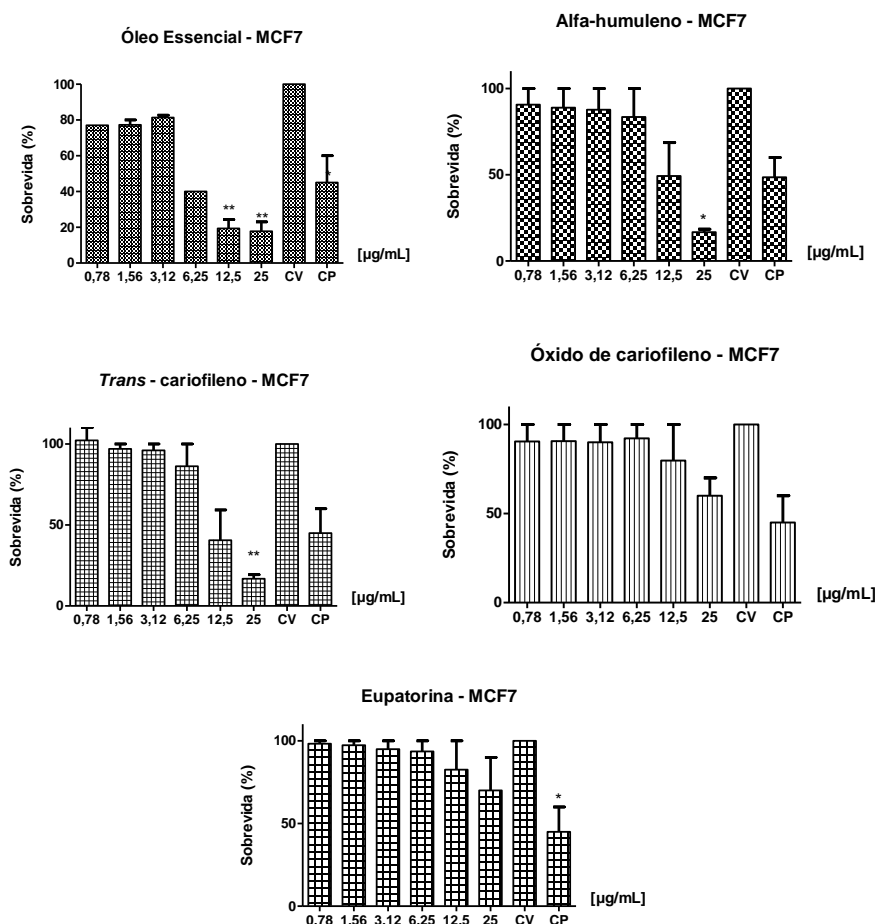
**Figura 41** - Ensaio de citotoxicidade em linhagem HepG2, a partir de 3 experimentos independentes (média  $\pm$  erro padrão-ep). Tratamento realizado com OE,  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cariofileno, óxido de cariofileno e eupatorina



CV: Controle de veículo (DMSO 1%). CP: Controle positivo (doxorubicina 20 $\mu\text{g/mL}$ ). Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste Tukey. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*)  $p < 0,05$ , com relação ao CV.

As substâncias com maior atividade citotóxica em MCF7 (figura 42) foram eupatorina, *trans*-cariofileno e  $\alpha$ -humuleno. Os dados para as amostras citadas corroboram no que diz respeito à ação de morte celular observada com o OE, que foi expressiva em grande parte das concentrações utilizadas.

**Figura 42** - Ensaio de citotoxicidade em linhagem MCF7, a partir de 3 experimentos independentes (média  $\pm$  erro padrão-ep). Tratamento realizado com OE,  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cariofileno, óxido de cariofileno e eupatorina



CV: Controle de veículo (DMSO 1%). CP: Controle positivo (doxorrubicina 20 $\mu\text{g/mL}$ ). Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste Tukey. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*)  $p < 0,05$  com relação ao CV.

Em comparação aos resultados apresentados pelo trabalho de Claudino (2013) e que foram utilizados como preliminares para a execução deste, houve potencial citotóxico do OE na linhagem HepG2, com significância estatística na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ . O OE avaliado no presente trabalho demonstrou ser citotóxico com significância estatística na concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , apresentando maior atividade na redução da sobrevivida e sugerindo que as distintas composições do OE podem ser a causa das respostas diferentes.



O OE utilizado por Claudino (2013) possuía como componentes majoritários em sua constituição sesquiterpenos como *trans*-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e biciclogermacreno, enquanto que o material utilizado neste trabalho também traz em sua constituição variedade de constituição em proporções diferentes, estando entre seus majoritários o *trans*-cariofileno e biciclogermacreno. Esta composição ampla pode ter atuado em sinergismo para extrapolar o efeito citotóxico.

#### 4.6.1.1 Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>)

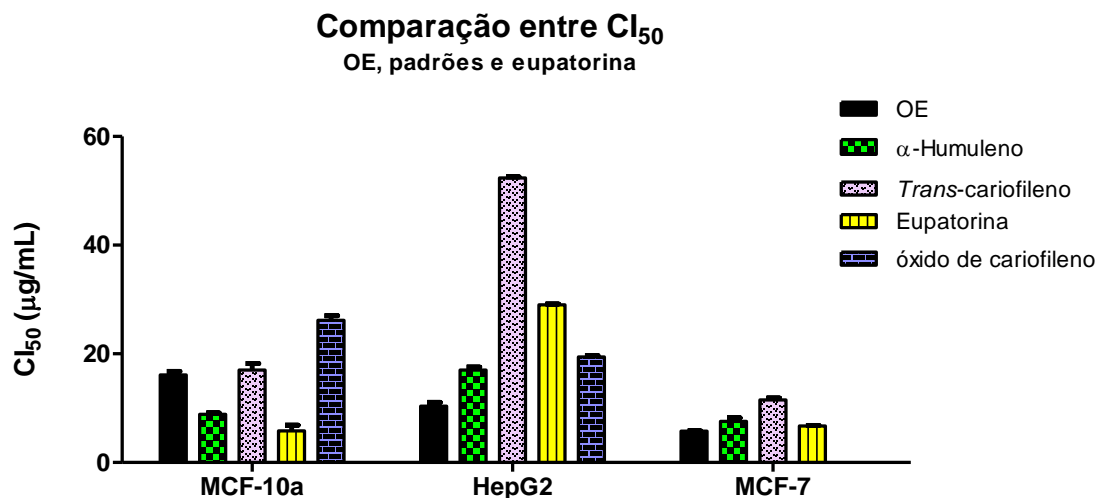
A observação tanto da Tabela 20 quanto da Figura 43 esclarecem que eupatorina e  $\alpha$ -humuleno necessitaram menores concentrações para atingirem o CI<sub>50</sub> em MCF10A, OE e  $\alpha$ -humuleno em HepG2 e  $\alpha$ -humuleno e eupatorina em MCF-7.

**Tabela 20** - Efeito citotóxico das amostras nas diferentes linhagens celulares. CI<sub>50</sub> expressa em  $\mu\text{g/mL} \pm$  desvio padrão

	MCF-10	MCF-7	Hep-G2
OE	16,15 $\pm$ 0,62	5,77 $\pm$ 0,05	10,40 $\pm$ 0,68
$\alpha$ -humuleno	8,86 $\pm$ 0,29	7,59 $\pm$ 0,63	17,05 $\pm$ 0,52
<i>trans</i> -cariofileno	17,05 $\pm$ 1,20	11,52 $\pm$ 0,40	52,38 $\pm$ 0,20
Óxido de cariofileno	26,18 $\pm$ 0,82	➤ 100	19,43 $\pm$ 0,25
Eupatorina	5,08 $\pm$ 1,04	6,73 $\pm$ 0,11	29,02 $\pm$ 0,16

O composto óxido de cariofileno não atingiu o valor de CI<sub>50</sub> nas concentrações avaliadas em MCF-7. *trans*-cariofileno necessitou maior concentração para inibir 50% da sobrevida em HepG2 (52,38  $\mu\text{g/mL}$ ), óxido de cariofileno em MCF-10a (26,18  $\mu\text{g/mL}$ ) e OE em MCF-7(16,15  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Figura 43** - Representação gráfica para comparação dos valores de  $CI_{50}$  atingidos em diferentes linhagens com a eupatorina, o OE e seus padrões de sesquiterpenos



Dentre o OE e as substâncias o óxido de cariofileno foi o mais citotóxico para HepG2, excetuando-se ao seu comportamento em MCF10A e MCF7 quando precisou de concentrações mais elevadas que as demais amostras para atingir o valor de  $CI_{50}$ . Por HepG2 ser uma linhagem metabolizadora é provável que o efeito observado seja consequência de metabólitos mais ativos que a própria substância. Prosseguindo na observação acerca do  $CI_{50}$ , o OE necessitou de menor concentração em HepG2 e MCF7 para atingir seu valor (10,40  $\mu\text{g/mL}$  e 5,77  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) quando comparado às substâncias. A partir da observação do índice de seletividade (tabela 21), observa-se a não existência de seletividade das substâncias para a linhagem HepG2 comparado a MCF10A (IS >3) (PRAYONG et al., 2008). O OE apresentou  $CI_{50}$  inferior a 30  $\mu\text{g/mL}$  e, tal como os extratos brutos vegetais, é um derivado vegetal. Sendo assim, inferimos que o resultado com o OE nas linhagens foi promissor, segundo o protocolo do NCI (*American Cancer Institute*) citado por Geran et al., 1992, que estabelece que valores de  $CI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$  são considerados significantes para extratos.

**Tabela 21** - Índice de seletividade do OE,  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cariofileno, óxido de cariofileno e eupatorina entre as linhagens MCF10A e HepG2 e nível de citotoxicidade das amostras

	<b>Citotoxicidade</b>	<b>Seletividade</b>
OE	Alta (CI <sub>50</sub> < 30µg/mL)	1,55 (Baixa; IS < 3)
$\alpha$ -humuleno	Alta (CI <sub>50</sub> < 30µg/mL)	0,94 (Baixa; IS < 3)
<i>trans</i> -cariofileno	Alta (CI <sub>50</sub> < 30µg/mL)	0,32 (Baixa; IS < 3)
Óxido de cariofileno	Alta (CI <sub>50</sub> < 30µg/mL)	1,34 (Baixa; IS < 3)
Eupatorina	Alta (CI <sub>50</sub> < 30µg/mL)	0,17 (Baixa; IS < 3)

Comparando-se o índice de seletividade entre MCF10A e MCF7 (tabela 22), a seletividade do OE para a linhagem MCF7 (IS=2,80) é a mais próxima daquela sugerida como alta (IS > 3) por Prayong (2008) dentre as demais.

**Tabela 22** - Índice de seletividade do OE,  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cariofileno, óxido de cariofileno e eupatorina entre as linhagens MCF10A e MCF7

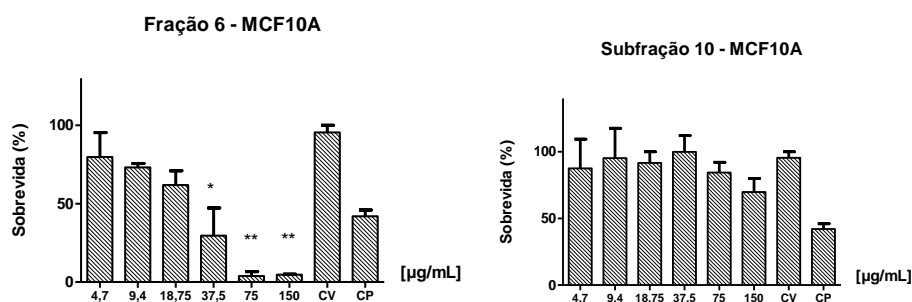
	<b>Seletividade</b>
OE	2,80 (Baixa; IS < 3)
$\alpha$ -humuleno	0,52 (Baixa; IS < 3)
<i>trans</i> -cariofileno	1,48 (Baixa; IS < 3)
Óxido de cariofileno	Baixa; IS < 3
Eupatorina	0,75 (Baixa; IS < 3)

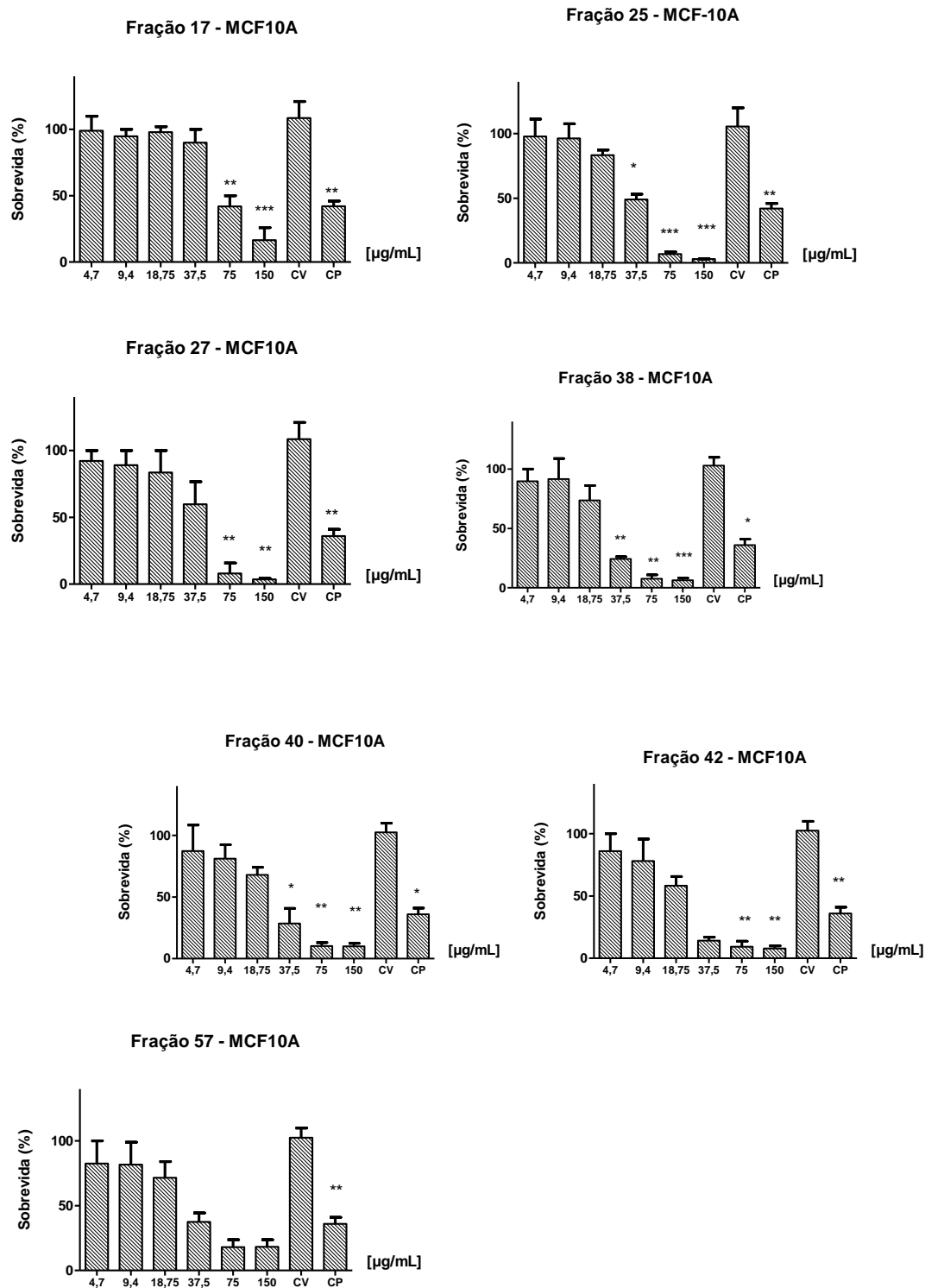
A comparação entre a seletividade para as linhagens tumorais mostrou a seletividade alta do óxido de cariofileno para HepG2 (IS>3), do *trans*-cariofileno para MCF7 (IS=4,51) e da eupatorina para MCF7 (IS=4,31).

#### 4.6.2 FRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL

À exceção da fração 10, as demais apresentaram morte na linhagem normal com significância estatística (figura 44) especialmente nas 2 maiores concentrações testadas (150 e 75  $\mu\text{g/mL}$ ). A desvantagem deste resultado é a existência da possibilidade dos compostos também agredirem células saudáveis, no entanto, modificações moleculares para o direcionamento a alvos e concentrações inferiores em que os constituintes das frações atuem potencializando os efeitos de outra substância podem ser estudados, uma vez que existiu redução da sobrevivência também em linhagens tumorais conforme observado abaixo (figuras 46 e 46).

**Figura 44** - Ensaio de citotoxicidade em linhagem MCF10A, a partir de 3 experimentos independentes (média  $\pm$  erro padrão-ep). Tratamento realizado com frações selecionadas recolhidas a partir da CC de OE: 6, 10, 17, 25, 27, 38, 40, 42 e 57



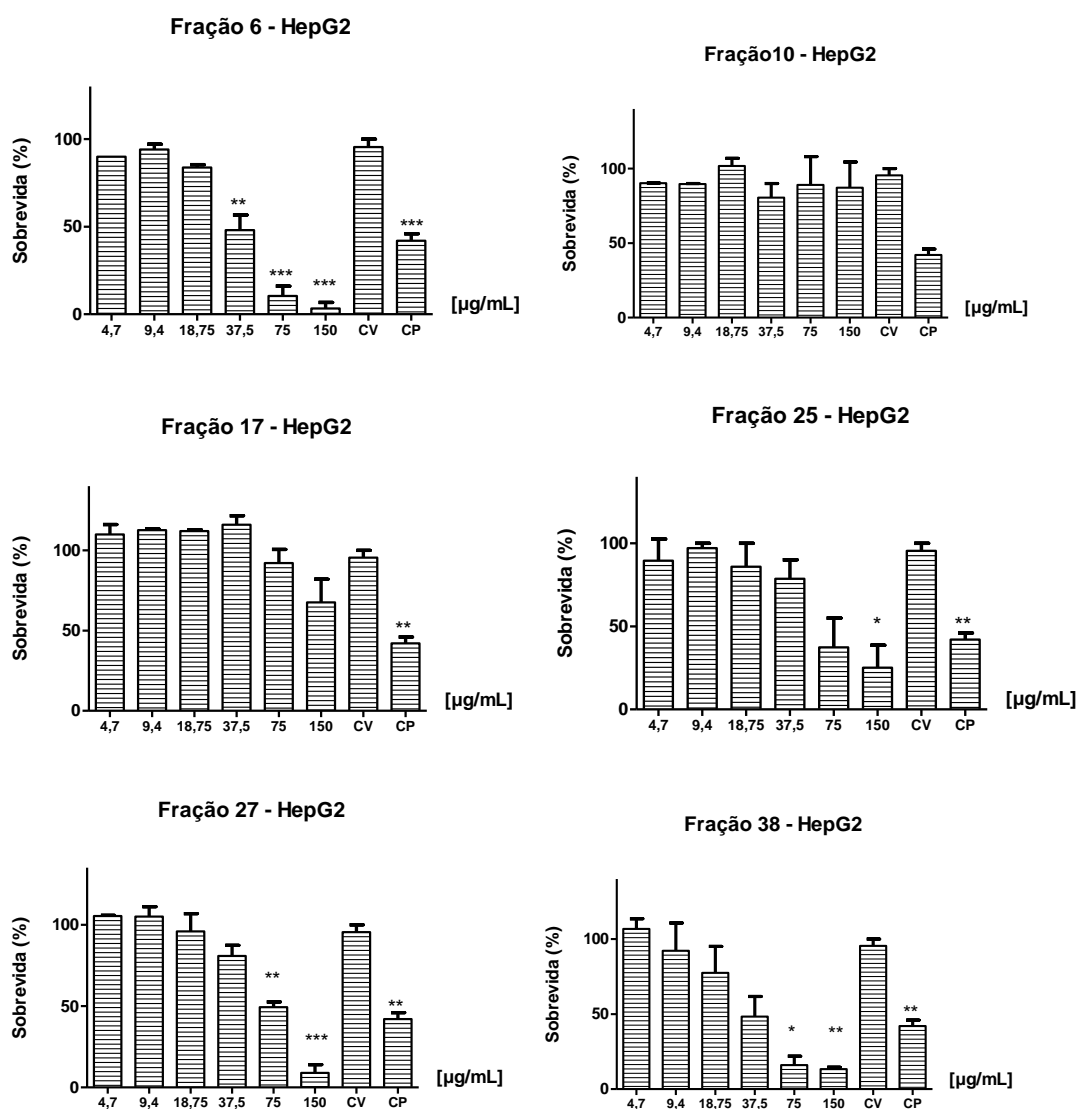


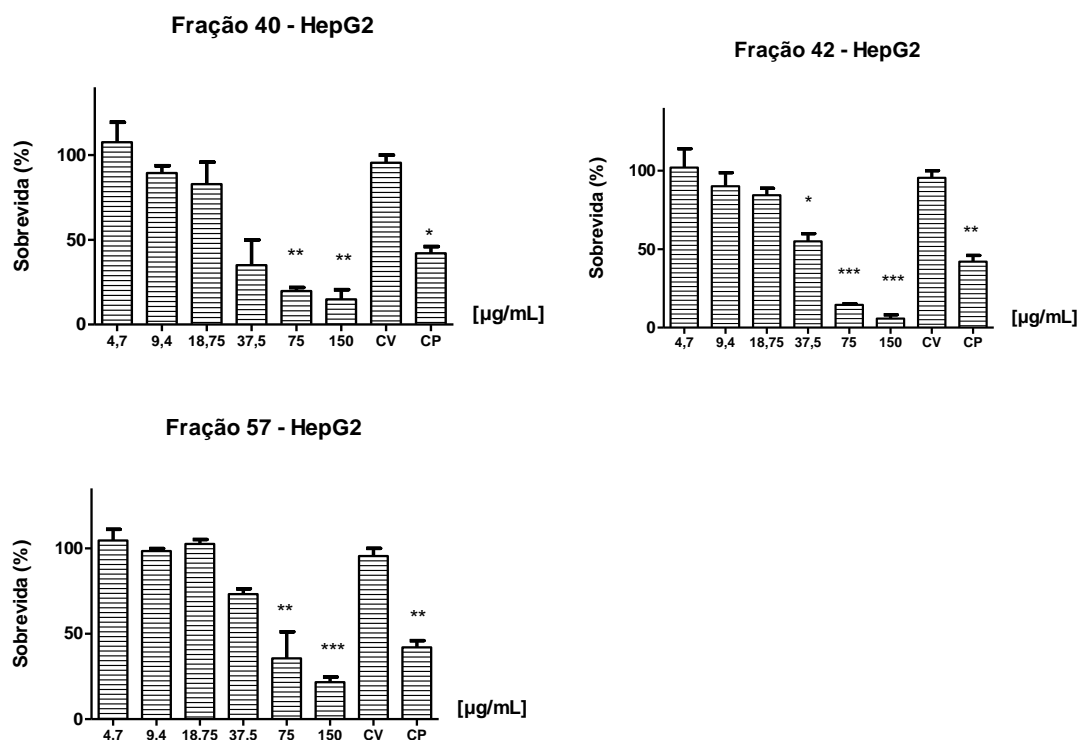
**Figura 44 – (final).**

Legenda: CV: Controle de veículo (DMSO 1%). CP: Controle positivo (doxorubicina 20µg/mL). Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste Tukey. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*)  $p < 0,05$ , com relação ao CV.

Em HepG2, observa-se novamente que as frações 10 e 17 não apresentaram resultados significativos (figura 45). Ainda neste caso, a fração 25 demonstrou redução de sobrevivência inferior às demais amostras (significância estatística apenas em 150  $\mu\text{g/mL}$ ) que, de maneira geral, exibiram consideráveis reduções de viabilidade celular, principalmente em 150 e 75  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 45** - Ensaio de citotoxicidade em linhagem HepG2, a partir de 3 experimentos independentes (média  $\pm$  erro padrão-ep). Tratamento realizado com frações selecionadas a partir da CC de OE: 6, 10, 17, 25, 27, 38, 40, 42 e 57





**Figura 45 – (final).**

Legenda: CV: Controle de veículo (DMSO 1%). CP: Controle positivo (doxorubicina 20µg/mL). Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste Tukey. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*)  $p < 0,05$ , com relação ao CV.

Os resultados para a linhagem MCF-7 (figura 46) apontam que apenas a fração 10 não desencadeou resposta de morte celular, mantendo a tendência observada nos casos anteriores. A fração 25, no entanto, suscitou maior resposta que na linhagem HepG2, tendo existido diferença estatística nas duas maiores concentrações avaliadas (150 e 75 µg/mL) e a fração 17, que anteriormente não se mostrara citotóxica para outras linhagens, reduziu consideravelmente a viabilidade celular sugerindo alguma seletividade para atividade de morte em MCF-7.

**Figura 46 -** Ensaio de citotoxicidade em linhagem MCF7, a partir de 3 experimentos independentes (média  $\pm$  erro padrão-ep). Tratamento realizado com frações selecionadas recolhidas obtidas a partir da coluna cromatográfica de óleo essencial: 6, 10, 17, 25, 27, 38, 40, 42 e 57

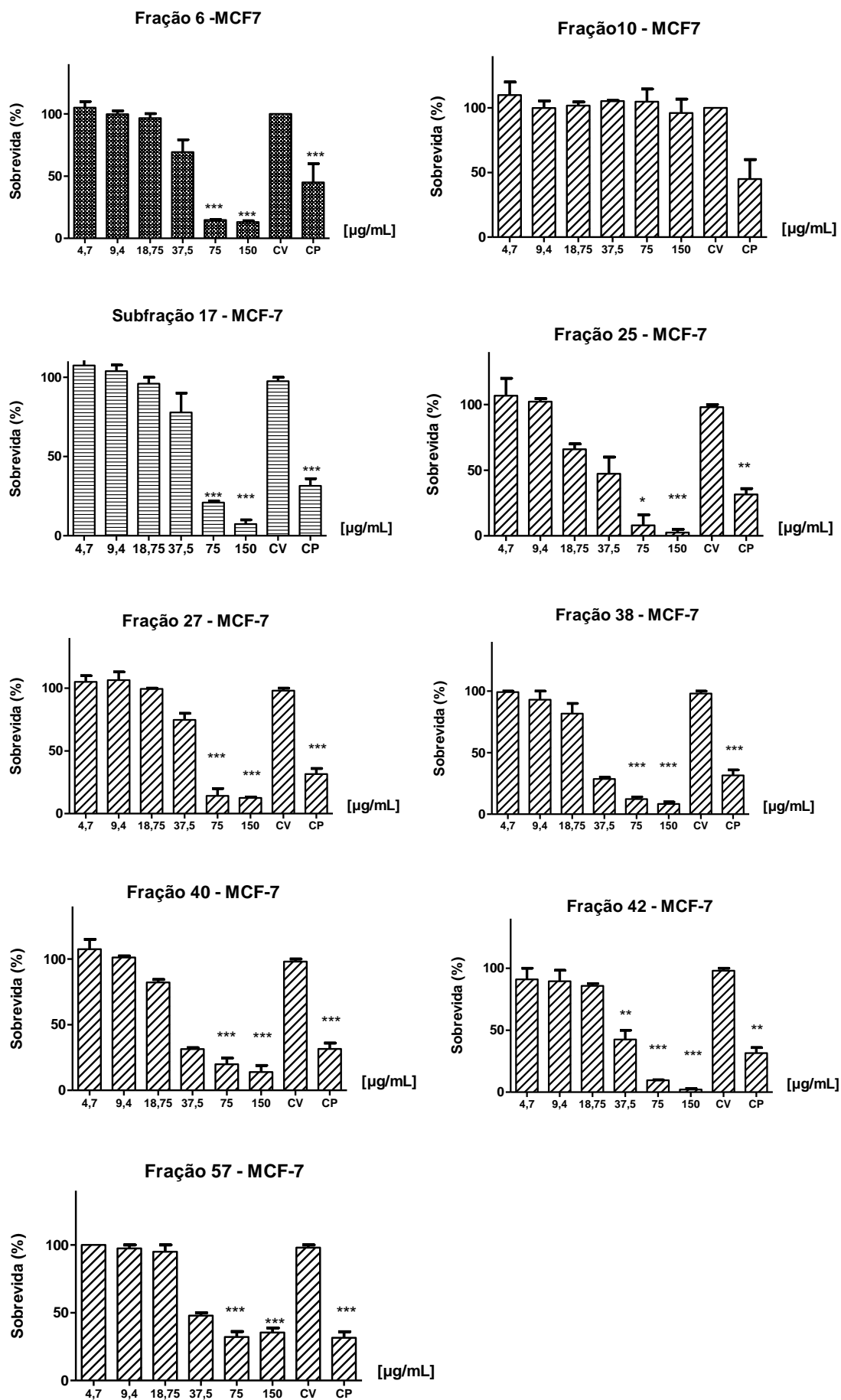


Figura 46 – (final)



Legenda: CV: Controle de veículo (DMSO 1%). CP: Controle positivo (doxorrubicina 20µg/mL). Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste Tukey. (\*\*\*)  $p < 0,001$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*)  $p < 0,05$  com relação ao CV.

#### 4.6.2.1 Concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>)

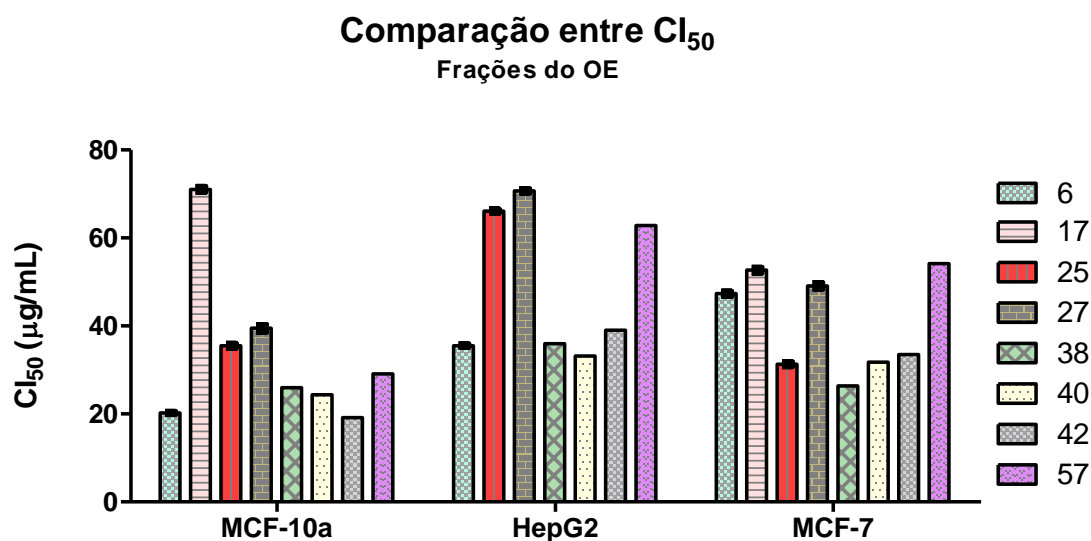
As análises da figura 47 e da tabela 23 denotam que existiu atividade citotóxica mais intensa das frações 6 e 42 em MCF-10a, 6 e 40 em HepG2 e 25 e 38 em MCF-7.

**Tabela 23** - CI<sub>50</sub> para frações do OE expressa em µg/mL ± desvio padrão

	MCF-10	MCF-7	Hep-G2
fração 6	20,25 ± 0,32	47,34 ± 0,60	35,52 ± 0,36
fração 10	>150	>150	>150
fração 17	71,04 ± 0,63	52,68 ± 0,63	185 ± 3,56
fração 25	35,51 ± 0,53	31,30 ± 0,52	66,10 ± 0,46
fração 27	39,47 ± 0,81	49,13 ± 0,72	70,71 ± 0,46
fração 38	25,98 ± 0,63	26,38 ± 0,27	35,99 ± 0,51
fração 40	24,38 ± 0,38	31,80 ± 0,50	33,16 ± 0,50
fração 42	19,18 ± 0,40	33,47 ± 0,45	39,03 ± 0,37
fração 57	29,09 ± 0,30	54,17 ± 0,30	62,86 ± 0,43

**Tabela 23** – (final)

**Figura 47** - Representação gráfica para comparação dos valores de  $CI_{50}$  atingidos em diferentes linhagens com as frações do OE



A fração 6 demonstrou potencial de redução de sobrevivência em todas as linhagens celulares avaliadas. A partir das análises por CG-EM, foi sugerido que esta fração possui como componente majoritário o sesquiterpeno *trans*-cariofileno (28%). Nos ensaios de citotoxicidade com esta substância, observou-se forte atividade contra células de câncer de mama (MCF7), superior a atividade em hepatocarcinoma (HepG2). No entanto, nos estudos com a fração 6 a maior citotoxicidade se deu contra células HepG2. De fato nota-se que o *trans*-cariofileno é agressivo frente às células tumorais, no entanto, quando concentrado exibiu mais atividade contra células MCF7, comparando-se valores de  $CI_{50}$ . Segundo Legault e Pichette (2007), este componente, em concentração não tóxica (10µg/mL), incrementou efeito citotóxico ao exibido inicialmente por  $\alpha$  e iso-cariofileno em linhagens tumorais (carcinoma de cólon humano, câncer de mama humano e fibroblastos de camundongo), além de ter colaborado positivamente também para a atividade do paclitaxel.

A seletividade das frações para a linhagem HepG2 (tabela 24) e para a linhagem MCF7 (tabela 25) foi baixa quando comparada a MCF10 ( $IS < 3$ ) (PRAYON et al., 2008). Além disso, a fração 17 mostrou alta seletividade para MCF7 comparado a

HepG2 (IS=3,51). De maneira geral, as frações se mostraram menos citotóxicas que as substâncias e o OE para as linhagens.

**Tabela 24** - Índice de seletividade das frações 6, 10, 17, 25, 27, 38, 40, 42 e 57 entre as linhagens MCF10A e HepG2 e MCF10A e MCF7

Fração	Seletividade entre MCF10A e HepG2	Seletividade entre MCF10A e MCF7
6	0,57 (Baixa; IS<3)	0,42 (Baixa; IS<3)
10	ND	ND
17	0,38 (Baixa; IS<3)	1,34 (Baixa; IS<3)
25	0,53 (Baixa; IS<3)	1,13 (Baixa; IS<3)
27	0,56 (Baixa; IS<3)	0,80 (Baixa; IS<3)
38	0,72 (Baixa; IS<3)	0,98 (Baixa; IS<3)
40	0,73 (Baixa; IS<3)	0,77 (Baixa; IS<3)
42	0,49 (Baixa; IS<3)	0,57 (Baixa; IS<3)
57	0,46 (Baixa; IS<3)	0,53 (Baixa; IS<3)

ND: não determinado

O OE de *Casearia sylvestris* SW apresentando, entre outros, biciclogermacreno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, espatulenol e germacreno B como majoritários, e os padrões  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno, reduziram a viabilidade celular de células de carcinoma humano de língua (A-549), carcinoma cervical humano (HeLa) e adenocarcinoma humano de cólon (HT-29) (SILVA et al., 2008). A fração 10, majoritária em biciclogermacreno, não demonstrou citotoxicidade nas linhagens avaliadas, o que pode ser consequência das características de hidrofobicidade da

amostra, uma vez que a mistura de substâncias pode alterar a capacidade dos constituintes da fração em atravessarem as membranas celulares (STONE et al., 2013). Hadri e seus colaboradores (2010) também verificaram a atividade do OE de *Salvia officinalis* e constituintes majoritários na redução de sobrevivência celular inclusive de MCF-7. De acordo com a pesquisa, o valor de  $CI_{50}$  com o OE foi superior ao valor de  $CI_{50}$  com fração rica em  $\alpha$ -humuleno e *trans*-cariofileno.

O OE de *Salvia verticillata* L. possuía em sua composição majoritariamente *trans*-cariofileno,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ -humuleno, biciclogermacreno, espatulenol e  $\beta$ -pineno (DEHAGHI et al., 2014) e também foi citotóxico em linhagens tumorais, principalmente Caco-2 (adenocarcinoma colo-retal). A fração 38 teve citotoxicidade especialmente em MCF-7 e é rica em espatuleno, sendo que este constituinte ainda consta da lista de majoritários do OE de carqueja utilizada neste estudo. A fração 27, majoritária em óxido de cariofileno, apresentou  $CI_{50}$  de aproximadamente 70  $\mu\text{g/mL}$  em HepG2, enquanto que, isolado, alcançou-se  $CI_{50}$  de aproximadamente 19  $\mu\text{g/mL}$  na mesma linhagem, sugerindo que a composição mais complexa da fração interfere nos resultados de citotoxicidade, o que pode ser consequência de alterações de lipofilicidade, interferência em receptores tais como saturação ou impedimento ou outras. No entanto, quando isolado e avaliado em MCF-7, o óxido de cariofileno não alcançou valor de  $CI_{50}$ , enquanto que em fração foi mais citotóxico ( $CI_{50}$  próximo a 49  $\mu\text{g/mL}$ ). De acordo com a literatura (JUN et al., 2011) o óxido de cariofileno em HepG2 teve valor aproximado de  $CI_{50}$  equivalente a 3,95  $\mu\text{m}$  e, de acordo com os autores, este valor é contraditório comparando-se a outros trabalhos que encontram baixa ou nenhuma citotoxicidade com esta substância. Além disto, o óxido de cariofileno foi capaz de reduzir a viabilidade da linhagem CaCo-2 e de implementar aumento de eficácia da atividade de doxorubicina (AMBROZ et al., 2015).

#### 4.7 Anexina – V

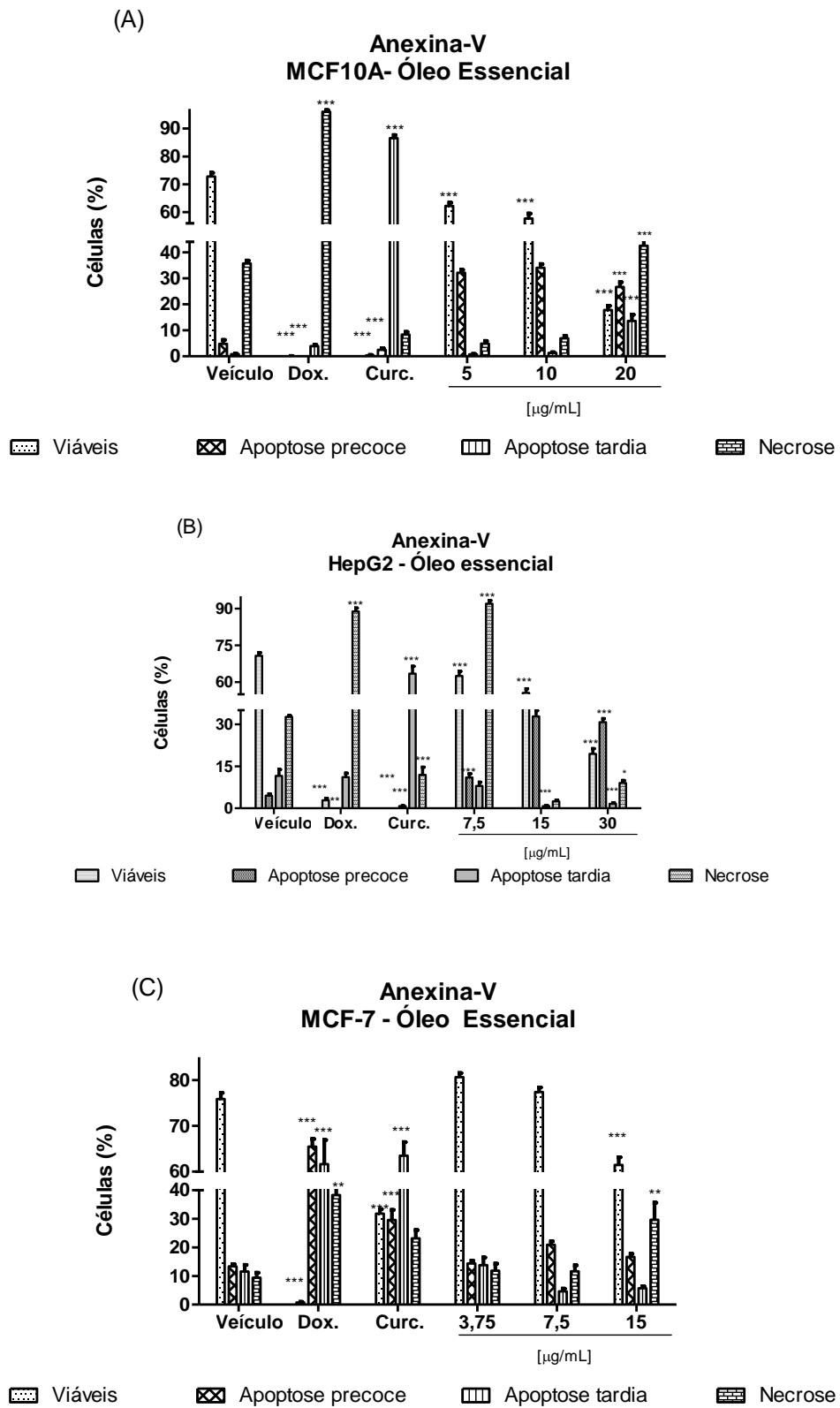
As figuras a seguir (48, 49, 50, 51, 52) ilustram os resultados obtidos com o ensaio de anexina-V para os diferentes tratamentos (OE, padrões e eupatorina) nas diferentes linhagens.

Observa-se que, para todos os experimentos, os controles de veículo e positivos funcionaram adequadamente, tendo a maior parte de morte via necrose após tratamento com doxorrubicina e apoptose tardia após tratamento com curcumina.

Em MCF-10a, após o tratamento com o OE (figura 48 - A) houve uma tendência de diminuição da morte via necrose dependente da redução de concentração (quantidade de células em necrose:  $20 < 10 < 5 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto que se mantiveram próximos os valores de células em apoptose precoce. Na maior concentração (20  $\mu\text{g/mL}$ ) existiu resultado com significância estatística em todos os parâmetros analisados (células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose) quando comparados ao controle de veículo. Em HepG2 (figura 48– B), observa-se um comportamento distinto do anterior, no qual o OE tende a reduzir a ocorrência de morte por apoptose precoce à medida em que as concentrações se reduzem (quantidade de células em apoptose precoce:  $7 > 15 \mu\text{g/mL}$ ), havendo aumento da morte via necrose.

Por fim, quando avaliado em MCF-7 (figura 48 - C), a maior porcentagem de células em necrose ocorre na maior concentração avaliada, ocorrendo morte por apoptose precoce estatisticamente significativa em 7,5  $\mu\text{g/mL}$  e por necrose em 15  $\mu\text{g/mL}$ .

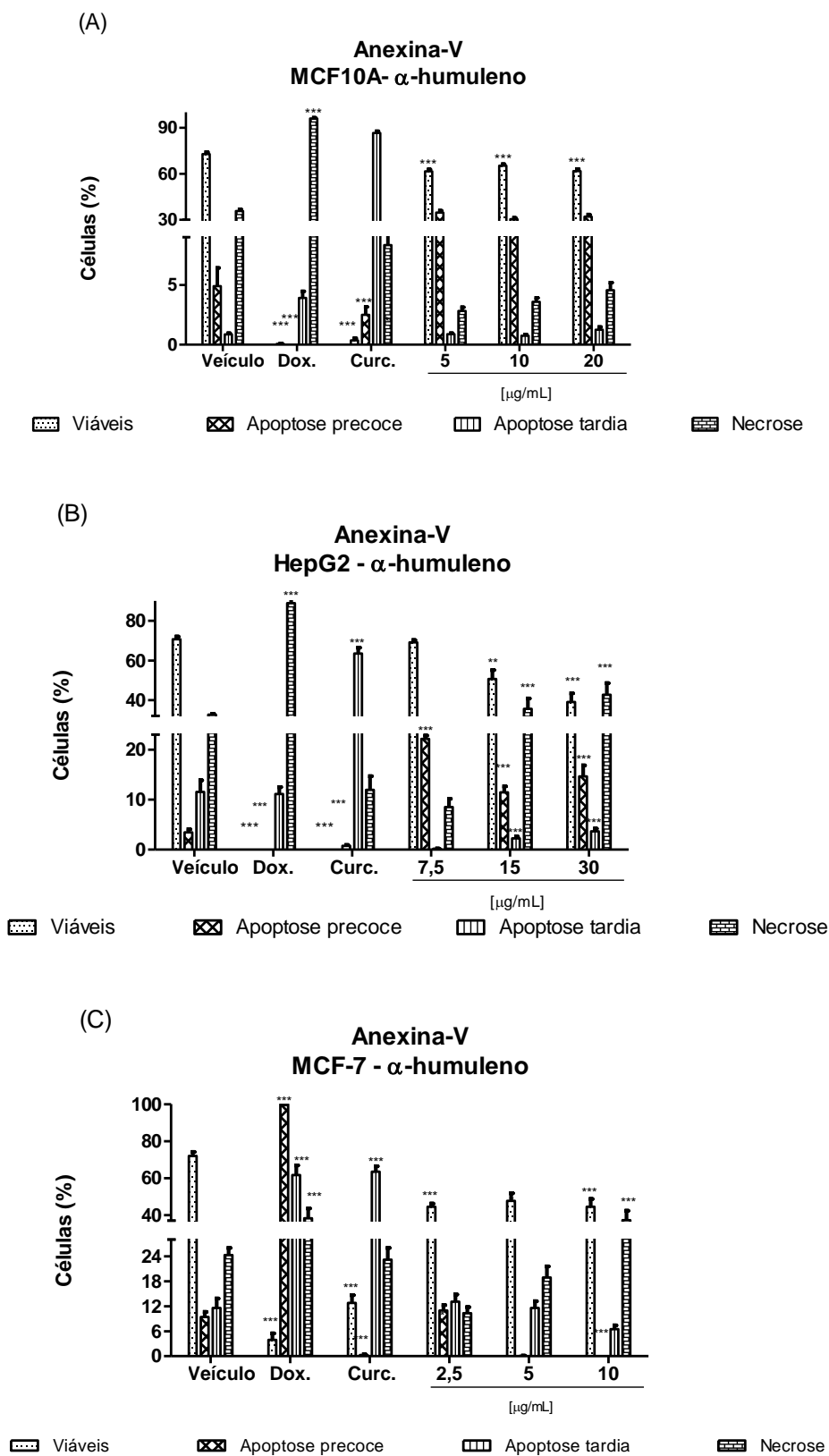
**Figura 48** - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com óleo essencial



Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $m \pm ep$ ), analisados por *one-way* anova com pós-teste de tukey ( \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ), comparado ao CV. Controle de veículo (DMSO 1%). Dox: Controle positivo de necrose (doxorubicina 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53  $\mu\text{g/mL}$ ).

De maneira geral, em MCF-10a a substância  $\alpha$ -humuleno (figura 49 - A) não apresentou resultados estatisticamente diferentes entre os exibidos pelo controle de veículo, e não apresentou um padrão de resposta dependente de concentração. Enquanto isto, em HepG2 (figura 49 – B) e MCF-7 (figura 48 – C), ocorreu uma diminuição da morte por necrose conforme as concentrações eram menores e pouca variação na quantidade de células em apoptose precoce nas diferentes concentrações (15 e 7,5, e 5 e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  para HepG2 e MCF-7, respectivamente) . Observa-se, de maneira geral e no decorrer das diferentes concentrações, que em HepG2 e MCF-7 existiu predomínio de necrose, enquanto que em MCF-10 houve predomínio de apoptose precoce para o  $\alpha$ -humuleno nas diferentes concentrações.  $\alpha$ -humuleno induziu depleção de glutathiona e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e, em associação ao *trans*-cariofileno, que demonstrou ser capaz de aumentar a permeabilidade da membrana, tornou-se ainda mais citotóxico em linhagens tais como MCF-7 (LEGAULT et al., 2007). Em nosso estudo, observa-se que em HepG2 o *trans*-cariofileno (figura 50 – B) necessitou de uma concentração inicial cerca de 3 vezes superior para ainda assim ter uma viabilidade maior de células que HepG2 após o tratamento com, e em MCF-7 (figura 50 – C) também apresentou maior viabilidade celular em concentração superior à avaliada em  $\alpha$ -humuleno.

**Figura 49** - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância  $\alpha$ -humuleno nas diferentes linhagens

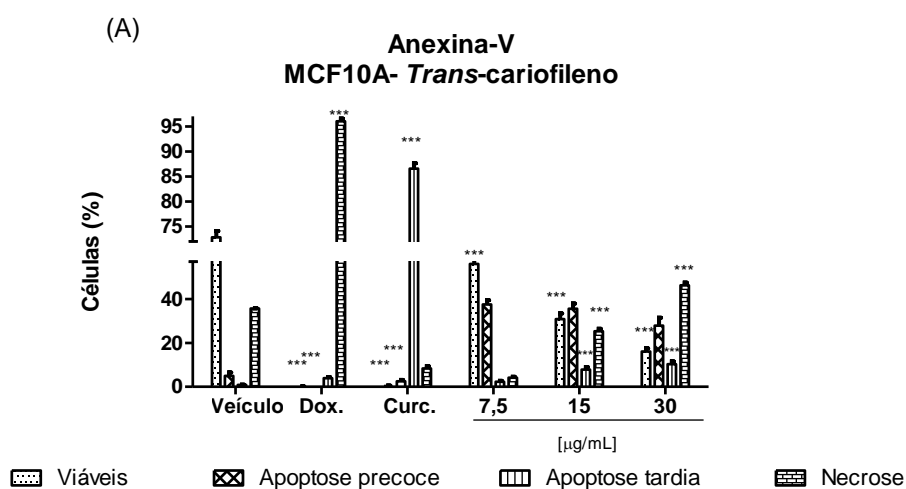


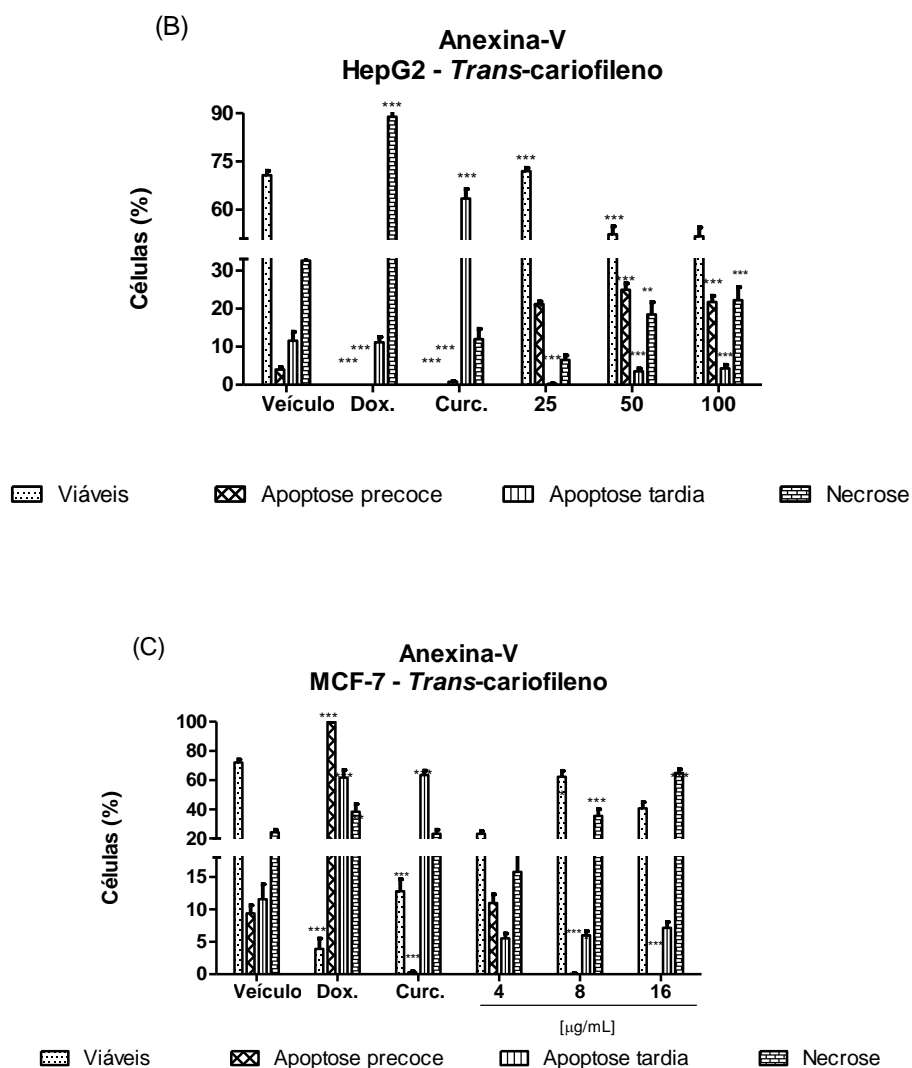


Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $m \pm ep$ ), analisados por *one-way* anova com pós-teste de tukey ( \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ), comparado ao CV. Controle de veículo (DMSO 1%). Dox: Controle positivo de necrose (doxorubicina 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

O *trans*-cariofileno (figura 50) reduziu o número de células em necrose na medida em que as concentrações avaliadas foram menores, enquanto que apenas em MCF-7 a concentração parece ter influenciado na morte via apoptose precoce, visto que neste caso existiu aumento de células neste processo de morte nas 2 últimas concentrações (8 e 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) com relação à maior (16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

**Figura 50** - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância *trans*-cariofileno nas diferentes linhagens





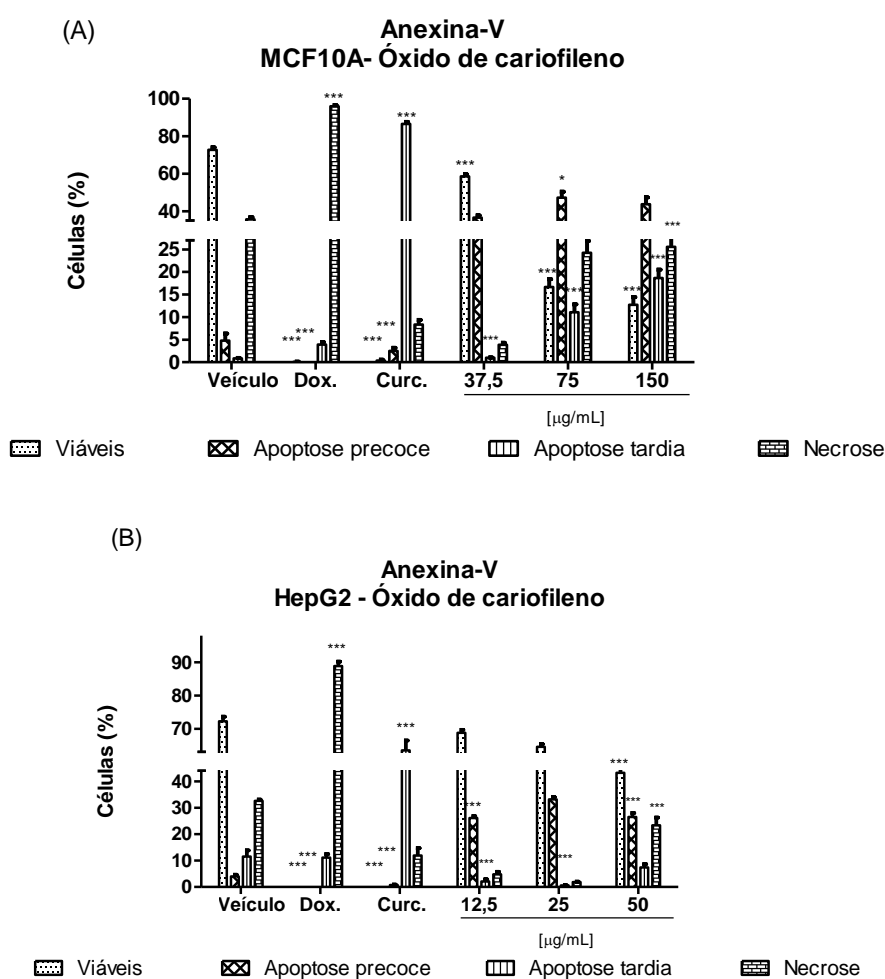
**Figura 50 – (final)**

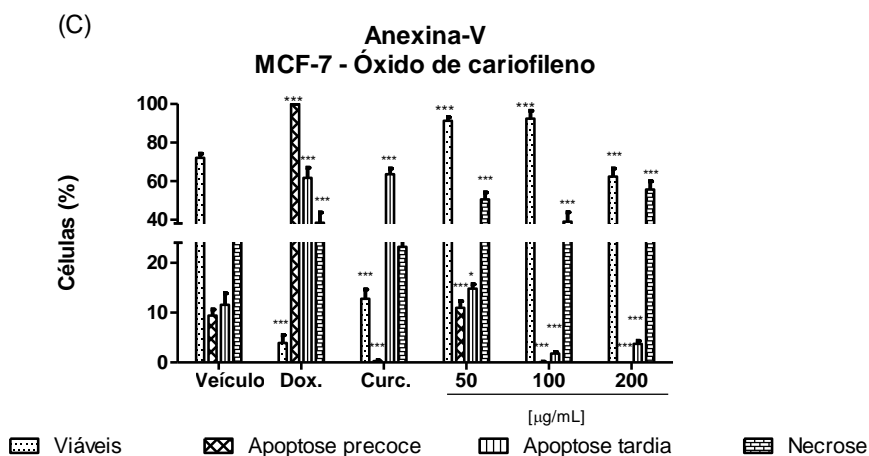
Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $m \pm ep$ ), analisados por *one-way* anova com pós-teste de tukey ( \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ), comparado ao CV. Controle de veículo (DMSO 1%). Dox: Controle positivo de necrose (doxorubicina 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53  $\mu\text{g/mL}$ ).

O óxido de cariofileno, um sesquiterpeno oxigenado análogo ao *trans*-cariofileno, tem sido reportado por atividades antiangiogênicas, se relacionando com aumento de apoptose por inibição da angiogênese através da via PI3k, e inibição de p65 de  $\text{nf-}\kappa\beta$ , desencadeando respostas anti-angiogênicas e pró-apoptóticas (SOUSA, 2015). Em MCF-10, o óxido de cariofileno (figura 51 - A) desencadeou

respostas predominantes de apoptose precoce nas 3 concentrações, existindo significância estatística em 75  $\mu\text{g/mL}$ . Em HepG2 (figura 51 – B) também há predomínio de apoptose precoce existindo diferença estatística, comparado ao controle de veículo, em 75 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$ . Em MCF-7, diferente do que é observado em MCF-10 e HepG2, foram necessárias concentrações maiores da substância (200, 100 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e existiu um predomínio de células em necrose. Outra diferença foi a existência de apoptose tardia com significância estatística e superior à precoce em todos os ensaios.

**Figura 51** - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância óxido de cariofileno nas diferentes linhagens





**Figura 51 – (final)**

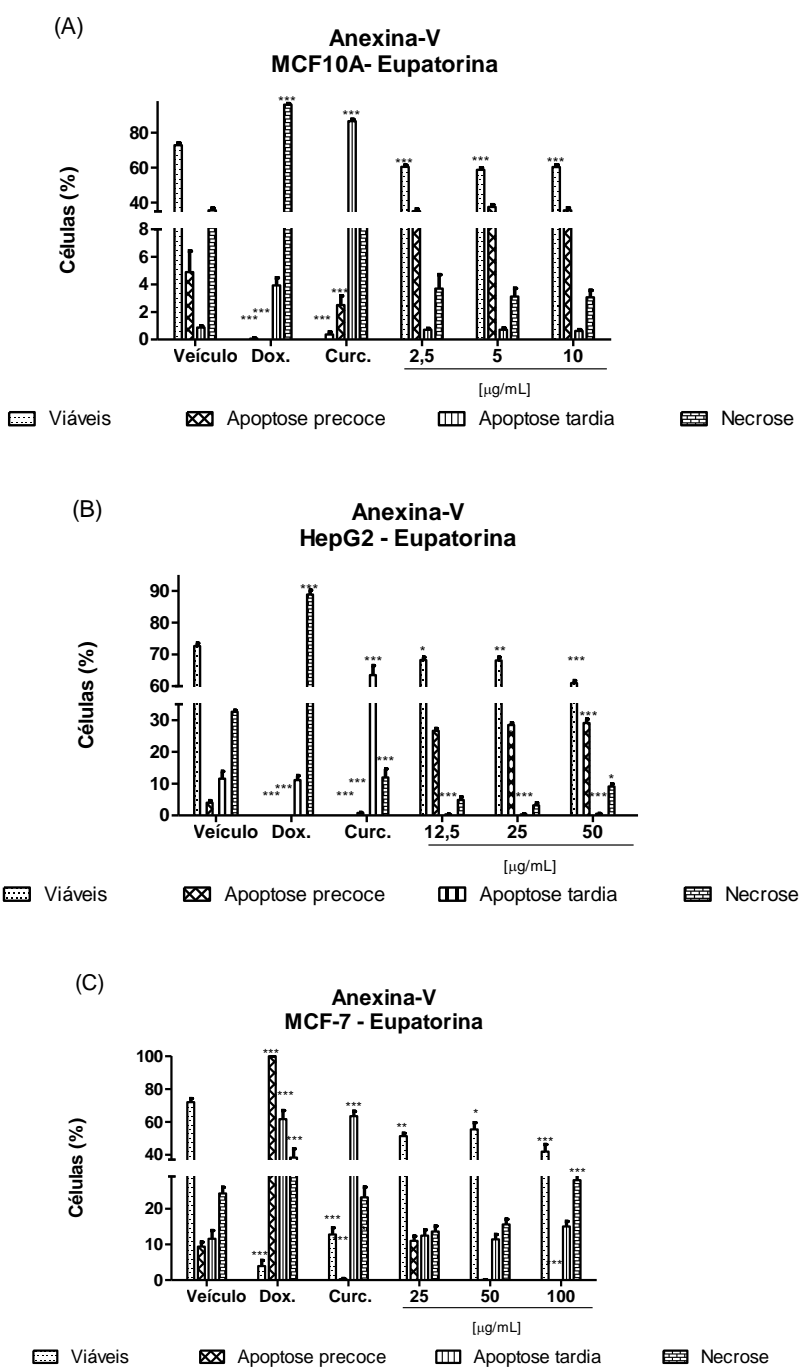
Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $m \pm ep$ ), analisados por *one-way* anova com pós-teste de tukey ( \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ), comparado ao CV. Controle de veículo (DMSO 1%). Dox: Controle positivo de necrose (doxorubicina 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53  $\mu\text{g/mL}$ ).

Para MCF-10a, a substância eupatorina (figura 52 - A) desencadeou resposta preferencial apoptose precoce e não por necrose, o que se torna interessante visto que esta é uma linhagem normal. Em HepG2 (figura 52 - B) também se pode observar um maior número de células em apoptose precoce. Perfil diferente destes é o apresentado em MCF-7 (figura 52- C), no qual temos morte por necrose com significância estatística na maior concentração (100 $\mu\text{g/mL}$ ), sendo que este resultado vai ao encontro daqueles para OE,  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cariofileno e óxido de cariofileno nos quais também existiu maior quantidade de células em necrose para a linhagem MCF-7.

A constatação de morte via apoptose precoce corrobora com dados da literatura científica em que a eupatorina é descrita por atividades de interrupção de ciclo celular, inibição de angiogênese e indução de mitose catastrófica, quando eventos do tipo ativação de caspase, liberação de proteínas pró-apoptóticas,

degradação de DNA e fator indutor de apoptose podem estar envolvidos (DOLECKOVA et al., 2012).

**Figura 52** - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância eupatorina nas diferentes linhagens



Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $m \pm ep$ ), analisados por *one-way* anova com pós-teste de tukey ( \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ), comparado ao CV. Controle de veículo (DMSO 1%). Dox: Controle positivo de necrose (doxorubicina 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### **4.8 Exclusão por fluorocromos (Hoechst/iodeto de propídeo)**

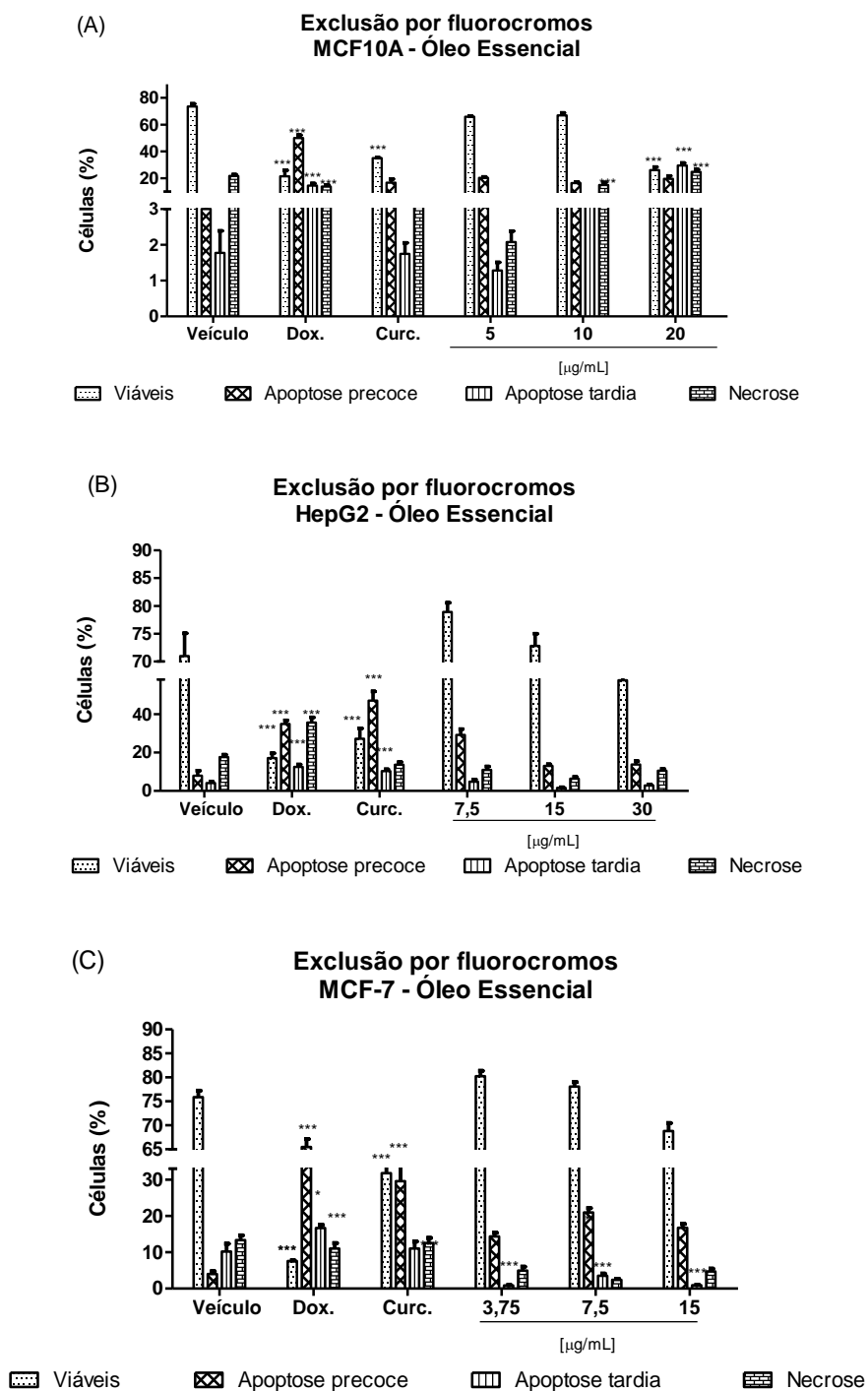
As figuras a seguir (53, 54, 55, 56 e 57) ilustram os resultados obtidos com o ensaio de hoechst/iodeto de propídeo para os diferentes tratamentos (OE e padrões) nas diferentes linhagens.

Os sesquiterpenos dos OE tem a capacidade de induzirem apoptose em vários tipos de tumores através da indução de apoptose por diversas vias que estão hiperativadas no cancer (SOUSA, 2015). Os OE podem atuar de 2 formas: inibindo a proliferação de células ao ingerir em etapas do ciclo ou em mecanismos de reparo do material genético, ou comprometendo o processo de proliferação (metástase), intervindo na angiogênese ou resistência a drogas (GAUTAM et al., 2014).

Nos ensaios de exclusão por fluorocromos, o OE atuou de maneira semelhante àquela observada em Anexina V na linhagem MCF-10 (figura 53 - A), reduzindo a ocorrência de necrose em concentrações mais baixas (porcentagens de célula em necrose: 20>10> 5  $\mu\text{g/mL}$ ).

Em HepG2 (figura 53 – B), não foram obtidos resultados com diferenças estatísticas, mas observa-se predomínio de células em apoptose precoce em 7,5  $\mu\text{g/mL}$ , não tendo sido expressivo o aumento de apoptose precoce em menores concentrações (7,5 e 15  $\mu\text{g/mL}$ ) conforme observado no ensaio de anexina V. Em MCF-7 (figura 53 – C), existiu predomínio de apoptose precoce nas diferentes concentrações com diferença estatisticamente significativa em 7,5  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 53** - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com o óleo essencial nas diferentes linhagens. Ensaio de exclusão por fluorocromos

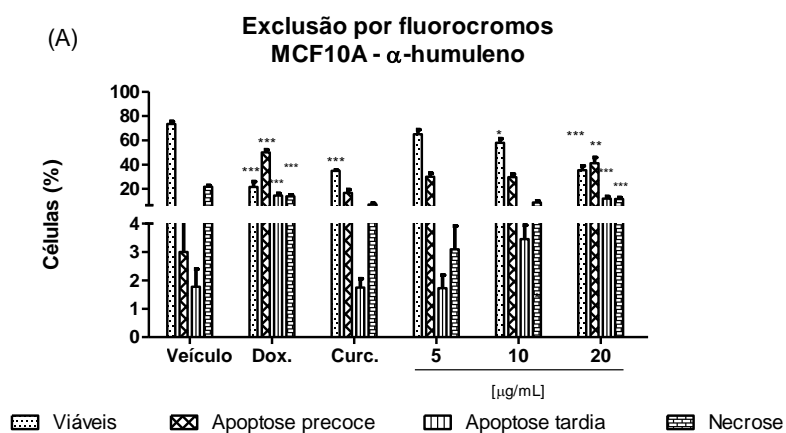


Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $m \pm ep$ ), analisados por *one-way* anova com pós-teste de

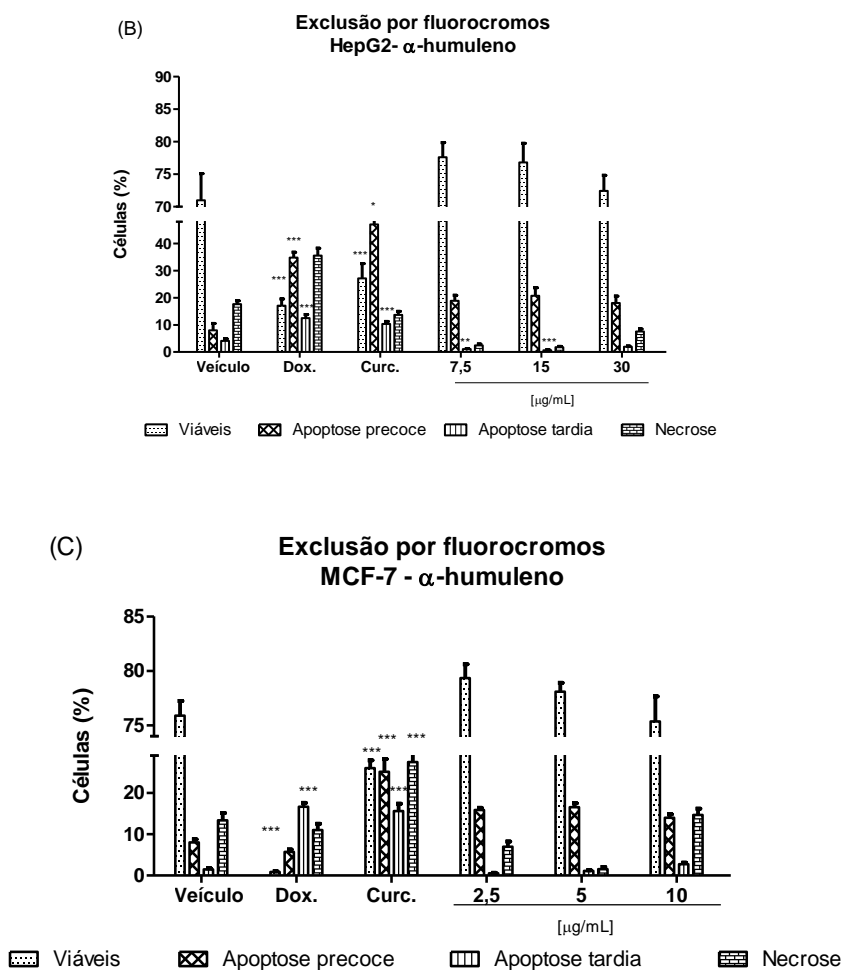
tukey ( \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ), comparado ao CV. Controle de veículo (DMSO 1%). Dox: Controle positivo de necrose (doxorubicina 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53  $\mu\text{g/mL}$ ).

Os perfis também se assemelham aos resultados obtidos em Anexina V para o composto  $\alpha$ -humuleno. Pode ser observada a redução do número de células em necrose na medida em que as concentrações diminuem, além de existir predomínio e pouca variação no número de células em apoptose precoce nas concentrações em MCF-10a (figura 54 - A), HepG2 (figura 54 - B) e MCF-7 (figura 54 - C). As diferenças estatísticas com relação ao veículo foram encontradas em 12,5 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$  em HepG2 para a apoptose tardia. Em MCF-10a, existiu diferença em 5  $\mu\text{g/mL}$  e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  para necrose, e em 5  $\mu\text{g/mL}$  para apoptose precoce e tardia.

**Figura 54** - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância  $\alpha$ -humuleno nas diferentes linhagens. Ensaio de exclusão por fluorocromos





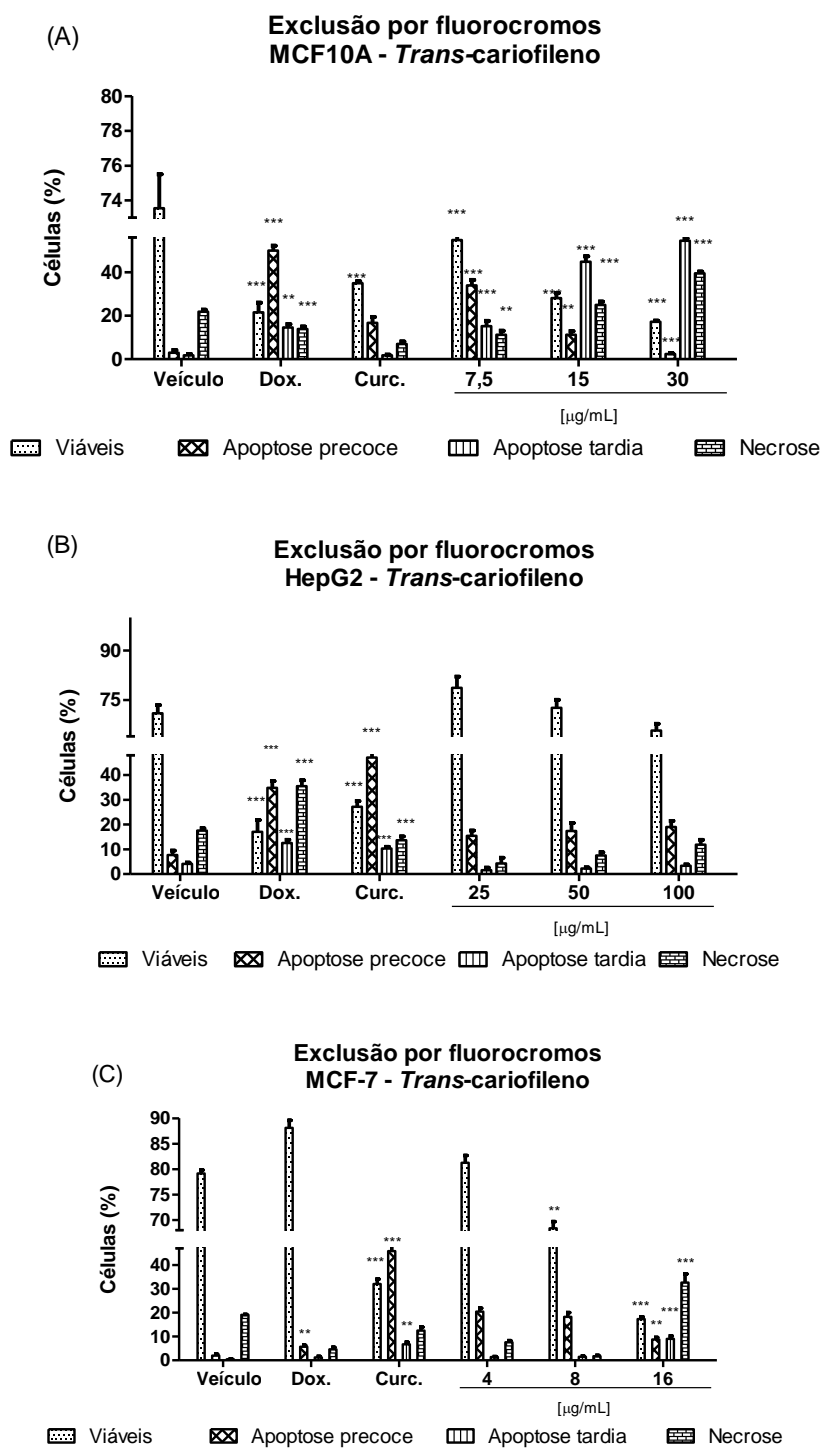


**Figura 54 – (final).**

Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $m \pm ep$ ), analisados por *one-way* anova com pós-teste de tukey ( \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ), comparado ao CV. Controle de veículo (DMSO 1%). Dox: Controle positivo de necrose (doxorubicina 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53  $\mu\text{g/mL}$ ).

Para o *trans*-cariofileno (figura 55), predominaram células em apoptose tardia ao longo das concentrações (30, 15 e 7,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e apoptose precoce em MCF-7 (figura 55 – C) e HepG2 (16, 8 e 4  $\mu\text{g/mL}$ ), figura 55 - B. Com destaque para MCF-10 (figura 55 – A), ocorreu diminuição da porcentagem de células em necrose dependente de concentração (20>10>5  $\mu\text{g/mL}$ ), aumentando a porcentagem de células em apoptose precoce.

**Figura 55** - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância *trans*-cariofileno nas diferentes linhagens. Ensaio de exclusão por fluorocromos

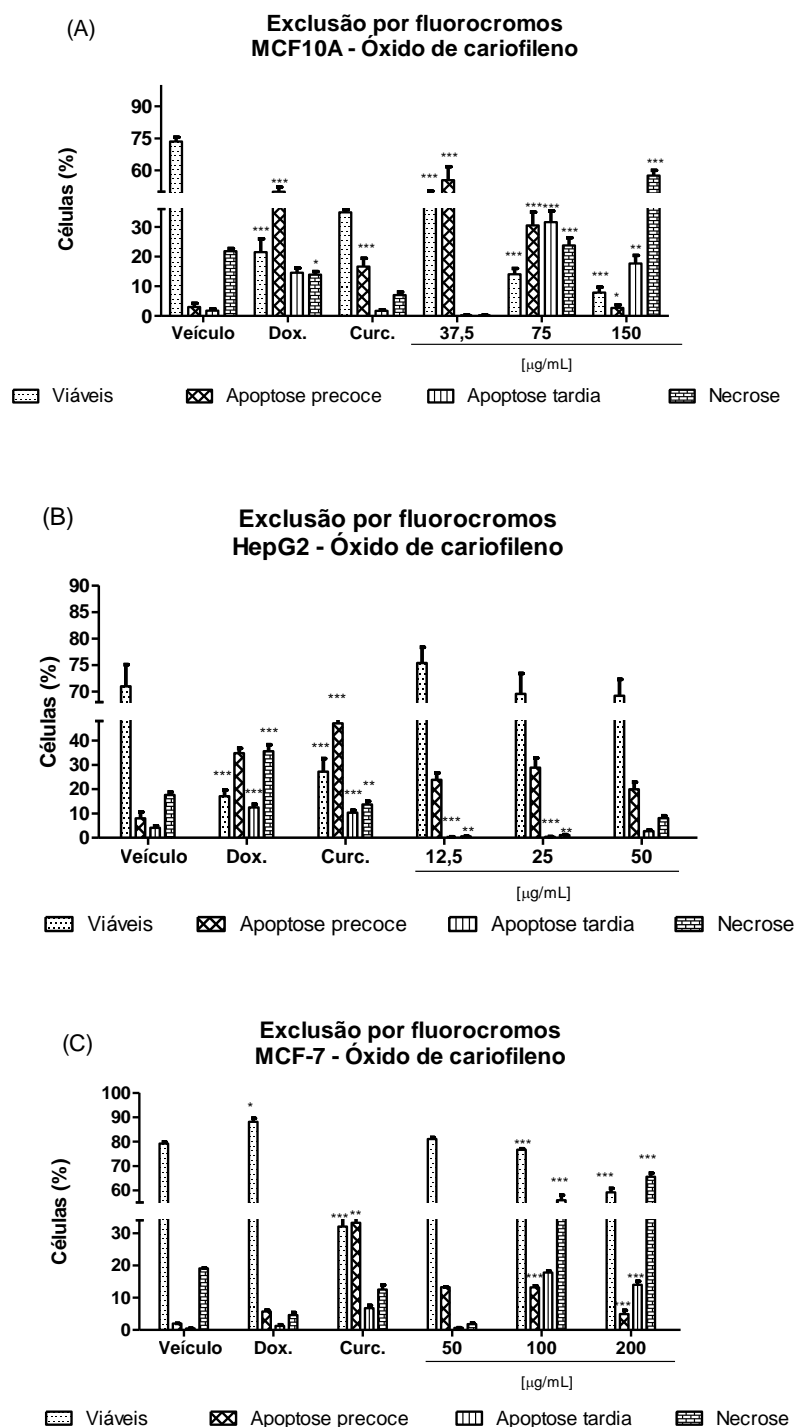


Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $m \pm ep$ ), analisados por *one-way* anova com pós-teste de

tukey ( \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ), comparado ao CV. Controle de veículo (DMSO 1%). Dox: Controle positivo de necrose (doxorubicina 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53  $\mu\text{g/mL}$ ).

Na avaliação do óxido de cariofileno (figura 56), os dados corroboram àqueles encontrados para Anexina V, nos quais nota-se menor porcentagem de células em necrose em concentrações menores do tratamento (quantidade de células em necrose: 150>75>37,5  $\mu\text{g/mL}$  em MCF-10 (figura 56 – A), 100>50>50  $\mu\text{g/mL}$  em HepG2 (figura 56 - B). O comprometimento da angiogênese é uma das fortes estratégias no abatimento dos cânceres uma vez que compromete a velocidade de progressão da doença. O óxido de cariofileno causa inibição constitutiva de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) ou seja, inibe proteínas relacionadas diretamente com processos do tipo proliferativos e cânceres (JOHNSON, LAPADAT, 2002), além de induzir também a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) na mitocôndria, o que é associado a indução de apoptose. Não obstante, outros registros na literatura científica dizem respeito ao aumento da expressão de p53, perda do potencial de membrana mitocondrial, aumento de citocromo c, além da ativação de caspase-3 (PARK et al., 2011) em linhagens celulares tratadas com o óxido de cariofileno, dentre elas MCF-7. O óxido de cariofileno foi capaz de suprimir a expressão de genes relacionados a anti-apoptose, proliferação, invasão e angiogênese (KIM et al., 2014). Outrossim, relacionou-se com a inibição de nf-kb, indução de TNF-a e supressão de invasão (KIM et al., 2014).

**Figura 56** - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância óxido de cariofileno nas diferentes linhagens. Ensaio de exclusão por fluorocromos

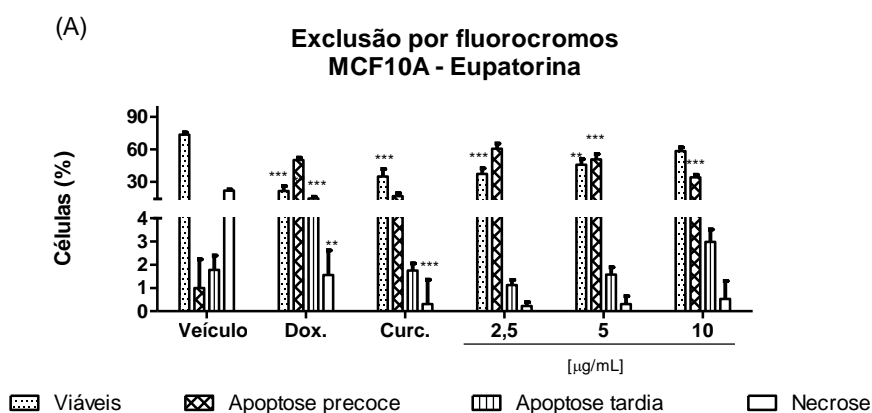


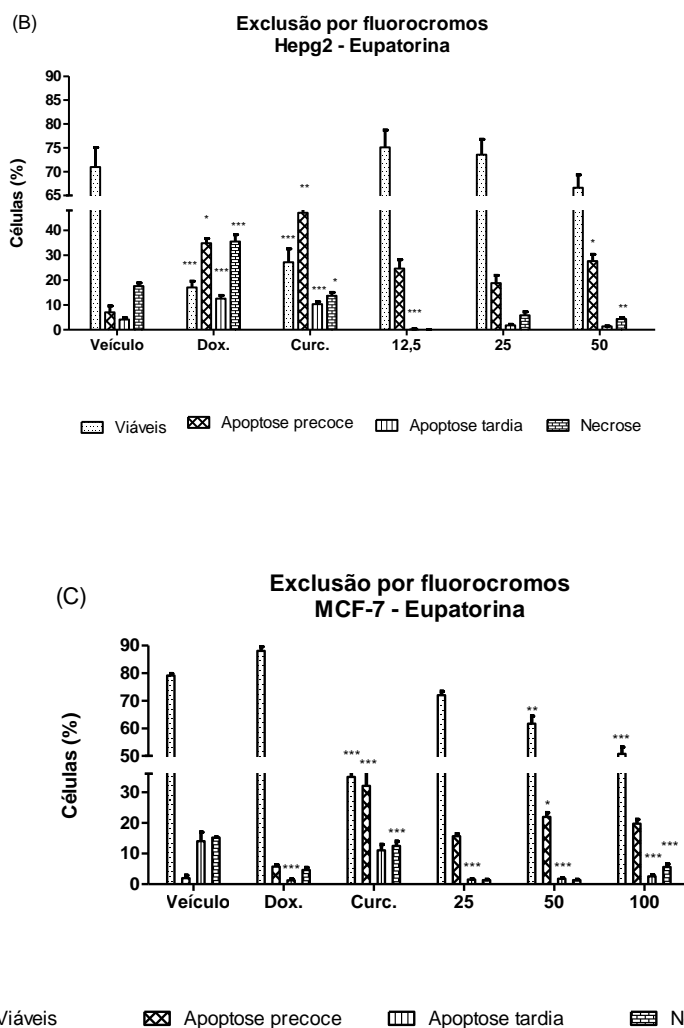
Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $m \pm ep$ ), analisados por *one-way* anova com pós-teste de

tukey ( \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ), comparado ao CV. Controle de veículo (DMSO 1%). Dox: Controle positivo de necrose (doxorubicina 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53  $\mu\text{g/mL}$ ).

Na figura 56, os resultados obtidos para a substancia eupatorina demonstram o predomínio da morte por apoptose precoce em MCF10A (figura 57 – A), HepG2 (figura 57 – B) e MCF7 (figura 57 – C). Eupatorina foi capaz de induzir apoptose por mecanismos de ativação de caspases e liberação de citocromo c em células de leucemia. A morte celular foi induzida por vias extrínsecas e intrínsecas da apoptose, sendo os mecanismos dependentes de espécies reativas de oxigênio (ESTÉVEZ et al., 2014). De fato nota-se que em MCF10A (figura 57 – A), HepG2 (figura 57 – B) e MCF7 (figura 57 – C) existiu predomínio de apoptose do tipo precoce em detrimento de apoptose tardia e necrose. O trabalho de Salmela e colaboradores (2011) se refere à eupatorina como um anti-mitótico capaz de interfeirir no ponto de controle de formação dos fusos, importantes para a distribuição cromossômica durante o processo de divisão celular, além de a flavona induzir fortemente a apoptose em cancros.

**Figura 57** - Relação entre células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose após tratamento com a substância eupatorina nas diferentes linhagens. Ensaio de exclusão por fluorocromos





**Figura 57 – (final).**

Os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $m \pm ep$ ), analisados por *one-way* anova com pós-teste de tukey ( \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ), comparado ao CV. Controle de veículo (DMSO 1%). Dox: Controle positivo de necrose (doxorubicina 20  $\mu\text{g/mL}$ ). Curc.: controle positivo de apoptose (curcumina 53  $\mu\text{g/mL}$ ).

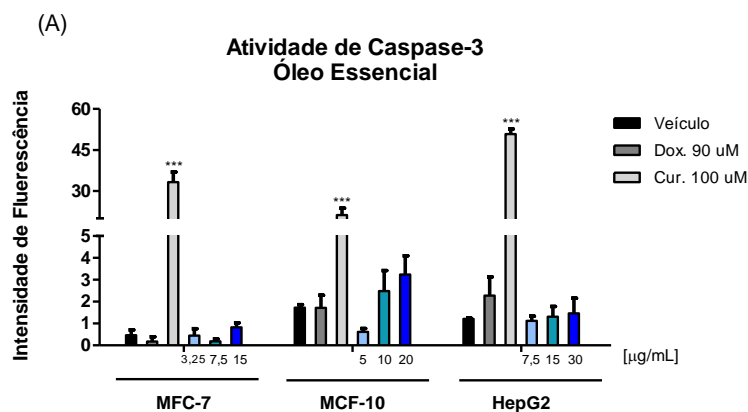
#### 4.9 Atividade de caspase-3

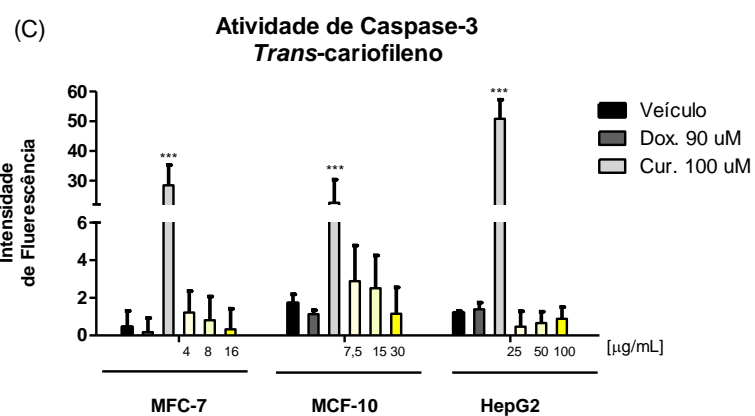
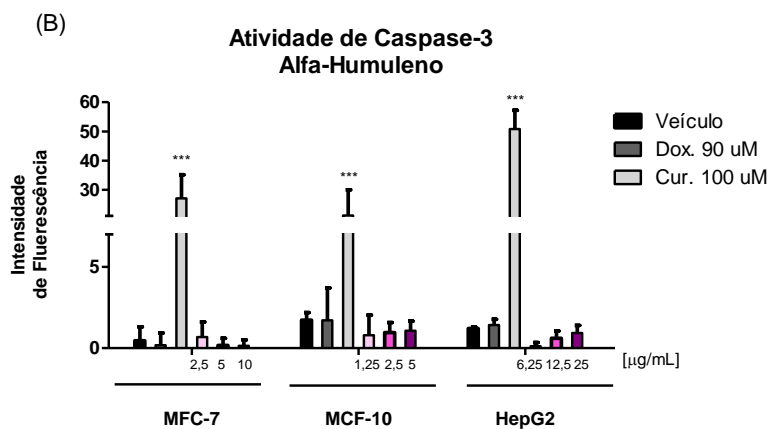
As figuras 58 e 59 mostram os resultados obtidos para os ensaios de atividade de caspase-3. Comparando-se as atividades encontradas entre as 3 linhagens para o

OE, nota-se que existiu diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) apenas nas concentrações intermediárias para MCF7 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) e MCF10A (7,5  $\mu\text{g/mL}$ ). Para  $\alpha$ -humuleno, a diferença estatística ( $p \leq 0,05$ ) entre as células foi encontrada entre a concentração equivalente a 2,5  $\mu\text{g/mL}$  para MCF10A e 6,25  $\mu\text{g/mL}$  para HepG2. Já para *trans*-cariofileno, houve resultado estatisticamente significativo entre a concentração de 7,5  $\mu\text{g/mL}$  para MCF10 comparado a 4  $\mu\text{g/mL}$ , 8  $\mu\text{g/mL}$  e 16 em MCF7 ( $p < 0,001$ ), entre a concentração de 16  $\mu\text{g/mL}$  em MCF10A comparado a 4  $\mu\text{g/mL}$  em MCF7 ( $p < 0,01$ ) e comparado a 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$  em HepG2 ( $p < 0,001$ ). A diferença estatística na intensidade de fluorescência entre as linhagens celulares tratadas com o óxido de cariofileno existiu entre sua concentração de 75  $\mu\text{g/mL}$  em MCF10A e 200  $\mu\text{g/mL}$  em MCF7, e 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , 25,0  $\mu\text{g/mL}$  e 50,0  $\mu\text{g/mL}$  em HepG2 ( $p < 0,001$ ). Ainda para óxido de cariofileno, a concentração equivalente a 150  $\mu\text{g/mL}$  em MCF10A foi diferente de todas as concentrações em HepG2 e MCF7 ( $p < 0,001$ ).

Para eupatorina, a diferença estatística entre a intensidade de fluorescência existiu entre a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  em MCF10A e 25,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ), 50,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,001$ ) e 100  $\mu\text{g/mL}$  em MCF7, e 50,0  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,01$ ) em HepG2. Entre MCF7 e HepG2 existiu diferença entre 50,0  $\mu\text{g/mL}$  em MCF7 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$  em HepG2 ( $p < 0,05$ ).

**Figura 58** - Ensaio de atividade de caspase-3 para óleo essencial (A),  $\alpha$ -humuleno (B) e *trans*-cariofileno (C)



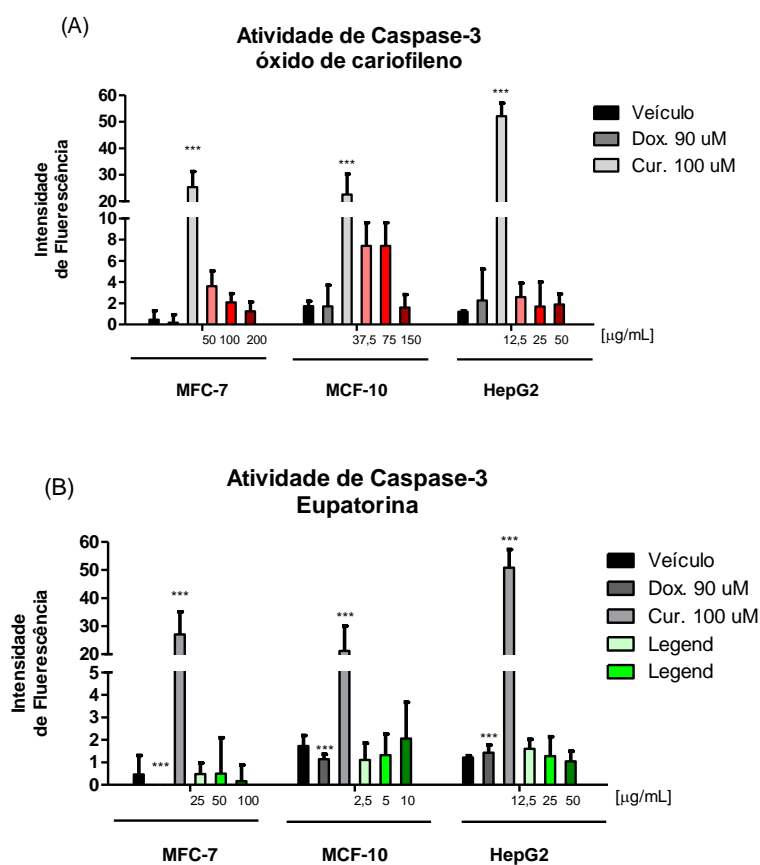


**Figura 58 – (final).**

Resultados expressos como média da intensidade de fluorescência celular de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $M \pm EP$ ), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .



**Figura 59** - Ensaio de atividade de caspase-3 para óxido de cariofileno (A) e eupatorina (B)



Os resultados são expressos como média da intensidade de fluorescência celular de três experimentos independentes  $\pm$  erro padrão ( $M \pm EP$ ), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

Os resultados de ativação de caspase-3, que se relaciona à morte via apoptose, não apresentaram significância estatística apesar de os ensaios de Exclusão por Fluorocromos e Anexina V terem demonstrado a existência de apoptose em todas as linhagens tratadas com os diversos padrões e óleo essencial. No entanto, observa-se, em alguns casos, a tendência de ativação desta via, por exemplo, eupatorina em HepG2 e óxido de cariofileno em MCF-7.

# CONCLUSÕES

## 5 CONCLUSÕES

O fracionamento cromatográfico de EFSBt3 e EFSBt4 de EAcBt produziu mais de 100 subfrações que foram reunidas em 31 com perfis químicos distintos em CCD. A partir de subfrações metanólicas foi isolada a flavona eupatorina com pureza de, aproximadamente, 96% (250nm) cuja estrutura química pode ser determinada através de técnicas espectrométricas.

O fracionamento cromatográfico do OE forneceu 32 frações de perfis díspares em CCD e CG-DIC, e a sugestão de composição de frações foi lograda a partir das análises por CG-EM. Os componentes majoritários foram distintos para diversas frações, o que permitiu sugerir a relação destes com a atividade citotóxica e comparar com os resultados obtidos com os padrões.

No que concerne à avaliação do potencial citotóxico, o OE,  $\alpha$ -humuleno, *trans*-cariofileno, óxido de cariofileno e eupatorina demonstraram atividade em MCF10A, HepG2 e MCF7, sobressaindo-se a maior citotoxicidade do OE em HepG2 ( $CI_{50} = 10,40 \mu\text{g/mL} \pm 0,68$ ),  $\alpha$ -humuleno ( $CI_{50} = 7,59 \mu\text{g/mL} \pm 0,63$ ) e *trans*-cariofileno ( $CI_{50} = 11,52 \mu\text{g/mL} \pm 0,40$ ) em MCF7, óxido de cariofileno em HepG2 ( $CI_{50} = 19,43 \mu\text{g/mL} \pm 0,25$ ) e eupatorina em MCF10A ( $CI_{50} = 5,08 \mu\text{g/mL} \pm 1,04$ ) e, dentre as tumorais, em MCF-7 ( $CI_{50} = 6,73 \mu\text{g/mL} \pm 0,11$ ). Também existiu potencial de redução de sobrevivência das frações 6, 17, 25, 27, 38, 40, 42 e 57 em MCF10A, HepG2 e MCF7, sendo mais vultuosas as atividades das frações 6, 17 e 25 em MCF-7, frações 27 a 57 em MCF7; dentre as tumorais, frações 27 a 57 em MCF7;

Com relação ao estudo da morte celular, conclui-se para cada amostra:

- OE: anexina – MCF10A e MCF-7: predomínio de necrose em 20  $\mu\text{g/mL}$  e apoptose precoce em 10 e 5  $\mu\text{g/mL}$ , HepG2: predomínio de necrose em 7,5  $\mu\text{g/mL}$  e apoptose precoce em 15 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ; exclusão por fluorocromos - MCF10A: predomínio de apoptose precoce em 5  $\mu\text{g/mL}$ ,

HepG2: predomínio de apoptose precoce em 7,5 µg/mL; MCF-7: predomínio de apoptose precoce;

- α-humuleno: anexina – HepG2 e MCF-7: predomínio de necrose (30 e 15 µg/mL ; 10 e 5 µg/mL, respectivamente); MCF10A: predomínio de apoptose precoce; exclusão por fluorocromos: MCF10A e HePG2: predomínio de apoptose precoce, MCF-7: predomínio de apoptose precoce em 5 e 2,5 µg/mL;

- *trans*-cariofileno: anexina - MCF10A e HepG2: predomínio de necrose em 30 µg/mL e apoptose precoce em 15 e 7,5 µg/mL; MCF-7: predomínio de necrose em todas as concentrações; exclusão por fluorocromos: MCF10A: predomínio de tardia em 30 e 15 µg/mL; HepG2: predomínio de apoptose precoce; MCF-7: predomínio de necrose em 16 µg/mL e apoptose precoce nas demais concentrações;

- óxido de cariofileno: anexina – MCF10A: predomínio de necrose em 2 maiores concentrações, MCF-7: predomínio necrose, HepG2: predomínio de apoptose precoce; exclusão por fluorocromos: MCF10A: predomínio de necrose em 150 µg/mL e apoptose precoce em 37,5 µg/mL, HepG2: predomínio de apoptose precoce, MCF-7: predomínio de necrose em 100 e 200 µg/mL;

- eupatorina: anexina - MCF10A e HepG2: predomínio de apoptose precoce, MCF-7: predomínio de apoptose precoce principalmente em 100 µg/mL; exclusão por fluorocromos: predomínio de apoptose precoce em todas as linhagens celulares.

Os resultados para o ensaio de ativação de caspase-3 não foram estatisticamente diferentes, sugerindo que a via de ativação da apoptose seja distinta desta.

Foi observada via de morte mista, ocorrendo apoptose e necrose em todas as linhagens. Os valores de  $CI_{50}$  do OE em MCF7 (5,77 µg/mL ± 0,05) e HepG2 (10,40 µg/mL ± 0,68) foram menores que o encontrado para MCF10A (16,15 µg/mL ± 0,62),

roborando a possibilidade de desenvolvimento de medicamentos. Ainda que o óxido de cariofileno não tenha sido tão citotóxico quanto às demais substâncias, apresentou maior margem de segurança para a linhagem normal MCF10A, apresentando  $CI_{50}$  igual a  $26,18 \mu\text{g/mL} \pm 0,82$ , desenhando-se como potencial para desenvolvimento de antitumoral cujo foco esteja em HepG2. Eupatorina reduziu consideravelmente a viabilidade celular na linhagem normal, no entanto apresentou os menores valores para  $CI_{50}$  dentre as substâncias avaliadas em MCF7 ( $CI_{50} = 6,73 \mu\text{g/mL} \pm 0,11$ ), expondo a possibilidade de ser utilizada terapêuticamente no combate ao câncer tendo em vista a possibilidade de modificação molecular desejando maior seletividade.

Uma opção ao desenvolvimento medicamentos a partir do OE é o uso de frações que dispõem de uma menor variedade de constituintes que o OE. Ao traçar um paralelo com o trabalho de Cos e colaboradores (2006) que considera extratos citotóxicos para microrganismos em concentrações inferiores a  $100 \mu\text{g/mL}$ , podemos concluir que apenas a fração 10 nas 3 linhagens e a fração 17 em HepG2 não detém esta característica. As demais frações, comparando-as com o OE, aumentaram seus limites para inibição de 50% da viabilidade celular, no entanto ainda devem ser observadas com cuidado com relação à atividade em MCF10A.

# REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **ARKIVOC**: vii, p. 76-96, 2007.

ADAMS, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4<sup>th</sup>.ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007, 804p.

AGRA, M. F.; FRANÇA, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p.114-140, 2007.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Biologia molecular da célula*. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre/SC: Artmed, 2010.

AKRAM, M.; SYED, A. S.; KIM, K. A.; LEE, J. S.; CHANG, S. Y.; KIM, C. Y.; BAE, O.N. Heme oxygenase 1-mediated novel anti-inflammatory of *Salvia plebeian* and its active components. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 322-330, 2015.

AMBROZ, M.; BOUSOVA, I.; SKARKA, A.; HANUSOVA, V.; KRALOVA, V.; MATOUSKOVA, P.; SZOTAKOVA, B.; SKALOVA, L. The influence of sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. **Molecules**, n.20, 2015.

ANDROUTSOPOULOS, V.; ARROO, R. R. J.; HALL, J. F.; SURICHAN, S.; POTTER, G. A. Antiproliferative and cytostatic effects of the natural product eupatorina on MDA-MB-468 human breast cancer cells due to CYO1-mediated metabolism. **Breast cancer research**, v. 10, n.3, 2014.

ARDREY, R. E. *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*. London: John Wiley & Sons, 2003.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D.C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 3, p. 230-234, 2000.

AVANCINI, C.; WIEST, J. M.; DALL'AGNOL, R.; HAAS, J. S.; von POSER, G. L. Antimicrobial Activity of Plants Used in the Prevention and Control of Bovine Mastitis in Southern Brazil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 894-9, 2008.

BARREIRO, E. J. Produtos Naturais Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Fármacos. **Química Nova**, v.30, n.1, 1990.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; FERNANDES JUNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006.

BORELLA, J. C.; DUARTE, D. P.; NOVARETTI, A. A. G.; MENEZES JUNIOR, A.; FRANÇA, S. C.; RUFATO, C. B.; SANTOS, P. A. S.; VENEZIANI, R. C. S.; LOPES, N. P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC

(carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 557-561, 2006.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, vol. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer no Brasil: Dados dos registros de base populacional**, v.3. Rio de Janeiro: INCA, 2003  
CLAUDINO, C. C. **Baccharis trimera (Less) DC. estudo fitoquímico e avaliação da citotoxicidade com sulforrodamina B**. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 4ª reimpressão. Campinas: UNICAMP. 2011.

CORREA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura: IBDF, 1931. p. 74.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, n.106, p. 290-302, 2006.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALEVS, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, n.2, p. 47-58, 2010.

CROWELL, P. L, KENNAN, W. S, HAAG, J. D, AHMAD, S; VEDEJS, E; GOULD, M. N Chemoprevention of mammary carcinogenesis by hydroxylated derivatives of d-limonene. **Carcinogenesis**, n. 13, p. 1261–1264, 1992.

DEHAGI, N. K.; OSTAD, S. N.; MAAFI, N.; PEDRAM, S.; AJANI, Y.; HADJIAKHOOMDI, A.; KHANAVI, M. Cytotoxic activity of the essential oil of *Salvia verticillata* L. **Research journal of Pharmacognosy**, v.1, n.3, 2014.

DE OLIVEIRA, P. F.; ALVES, J. M.; DAMASCENO, J. L.; OLIVEIRA, R. A. M.; DIAS, H. J.; CROTTI, A. E. M.; TAVARES, D. C. Citotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Revista brasileira de Farmacognosia**, 2015.

DE SOUSA, D.P. *Bioactive Essential Oils and Cancer*, 1st ed.; Springer International Publishing, New York, USA, 2015; p. 292.

DIAS, L. F. T.; MELO, E. S.; HERNANDES, L. S.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 309-314, 2009.

DEWICK; P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 3ª ed. John Wiley & Sons LTD, 2009.

DOLECKOVÁ, I.; RÁROVÁ, L.; GRÚZ, J.; VONDRUSOVÁ, M.; STRNAD, M.; KRYSTOF, V. Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavones eupatorina, an



active constituent of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves. **Fitoterapia**, v.83, p. 1000-10007, 2012.

DUARTE, R.A.; MELLO, E.R.; ARAKI, C.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S. REGASINI, L.O.; SILVA, T.G.A.; MORAIS, M.C.C.; XIMENES, V.F.; SOARES, C.P. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. **Tumor Biology**. v.31, P.513-522, 2010.

EARNSHAW, W.C.; MARTINS, L.M.; KAUFMANN, S.H. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annual Review of Biochemistry**. V. 68, p.383-424, 1999.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex interactions between Phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. **Current Drug Targets**, v. 12, n.1, p. 122-132, 2011.

ESTÉVEZ, S.; MARRERO, M. T.; QUINTANA, J.; ESTÉVEZ, F. Eupatorin-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspases and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. **Plos one**, v. 9, n.11, 2014.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. V. 455, p. 81-95, 2000.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, v. 127, p. 2893-2917, 2010.

FEUER, E. J.; WUN, L.; BORING, C. C.; FLAUNDERS, W. D.; TIMMEL, M. J.; TONG, T. The life time risk of developing breast cancer. **The Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, p. 892-97, 1993.

GARCIA, F. A. D.; TANAE, M. M.; TORRES, L. M. B.; LAPA, A. J.; DE LIMA-LANDMAN, M. T. R.; SOUCCAR, C. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. On the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. **Phytomedicine**, v. 21, p.1021-1025, 2014.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

GENÉ, R. M.; MARIN, E.; ADZET, T. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. **Planta Medica**, v. 58, p. 565-566, 1992.

GENÉ, R. M.; CARTAÑA, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*. Identification of its active constituents. **Planta Medica**, v.62, n. 3, p.232-235, 1996.

GERAN, R.I.; GREENBERG, N. H.; MACDONALD, M. M.; SCHUMACHER, A. M.; ABBOTT, B. J. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Report** **3**, p.1-103, 1972.

GIANELLO, J. C.; CEÑAL, J. P.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E.; PETENATTI, M. E.; PETENATTI, E. M.; DEL VITTO, L. A. Medicamentos herbários em el centro-oeste argentino. II. "Carquejas": control de calidad de las drogas oficiales y sustituyentes. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 2, p. 99-103, 2000.

- GIULIANO, D. A. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). **Darwiniana**, v. 39, n. 1-2, p. 131-154, 2001.
- GREENE, R.; HARRIS, N. Patologia e terapêuticas para farmacêuticos: bases para a prática da farmácia clínica. 3ªed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- GRIVICICH, I.; DA ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, n.53, p.335-343, 2007.
- HADRI, A.; DEL RÍO, A. G.; SANZ, J.; COLOMA, A. G.; IDAOMAR, M.; OZONAS, B. R.; GONZÁLEZ, J. B.; REUS, M. I. S. Cytotoxic activity of  $\alpha$ -humulene and *trans*caryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. **Anales de la real academia nacional de farmacia journal**, v.76, n.3, 2010.
- HASHIMOTO, Y.; SHIMADA, Y.; ITAMI, A. et al. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**. V.39 (15), p. 2239-2246, 2003.
- HERZ, W.; PILOTTI, A-M; SÖDERHOLM, A-C; SHUHAMA, I. K.; VICHNEWSKI, W. New ent- clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 3913-3917, 1977.
- HUBSCHMANN, H-J. Handbook of GC-MS: Fundamentals and applications, 3ªed, 880p, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2015.
- INCA; MINISTÉRIO DA SAÚDE; COORDENAÇÃO GERAL DE AÇÕES ESTRATÉGICAS. **Estimativa 2012-incidência de câncer no Brasil**, 2011.
- JANUÁRIO, A. H.; SANTOS, S. L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M. V.; PIETRO, R. C. L. R.; SATO, D. N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S. V.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, p. 243-251, 2004.
- JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, v.298, n.5600, 2002.
- JUN, N. J.; MOSADDIK, A.; MOON, J. Y.; JANG, K.; LEE, D.; AHN, K. S.; CHO, S. K. **Records of natural products**, v.5, n.3, 2011.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Plantas Medicinais: Cura Segura?. **Química Nova**, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.
- KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; HOCEVAR, B.A. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**. V.38, p.96-109, 2010.
- KIM, C.; CHO, S. K.; KIM, K.; NAM, D.; CHUNG, W.; JANG, H.; LEE, S.; SHIM, B. S.; SATHI, G.; AHN, K. S.  $\beta$ -caryophyllene oxide potentiates tnf  $\alpha$ -induced apoptosis and inhibits invasion through down-modulation of nf- $\kappa$  $\beta$ -regulated gene products. **Apoptosis**, v.19, n.4, 2014.
- KUROYANAGI, M.; FUJITA, K.; KAZAOKA, M.; MATSUMOTO, S.; UENO, A.; FUKUSHIMA, S.; KATSUOKA, M. Studies in the constituents of *Baccharis genistelloides*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 11, p. 5.075-5.078, 1985.

LAGO J. H. G. A.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; SOUZA, F. O.; SOARES, M. G.; BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 737–740, 2008a.

LAGO, J. H. G.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; SOARES, M. G.; BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G.; SOUZA, F. O. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de “campos de altitude” da mata atlântica paulista. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p.727-730, 2008b.

LANCAS, F. M. *Cromatografia em fase gasosa*. Sao Carlos: Acta, 1993.

LEITE, C. E.; LUNARDELLI, A.; CASTAMAN, T. A.; PAUL, E. L.; OLIVEIRA, J. R. Aqueous extract of *Baccharis trimera* (Asteraceae) decreases inflammation and cellular damage in pleurisy induced by *Dirphia* sp. (Saturniidae) venom. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n.1, p. 29-32, 2007.

LEGAULT, J.; DAHL, W.; DEBITON, E.; PICHETTE, A.; MADELMONT, J.C. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. **Planta Medica**, v.69,p. 402–407,2003.

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of b-caryophyllene on anticancer activity of a-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v.59, n.12, p.1643-1647, 2007.

LI, J. W.; VEDERAS, J. C. Drug Discovery and natural products: end of an era or an endless frontier: **Science**, v. 325, 2009.

LIMA, Z. P.;SANTOS, R. C.; TORRES, T. U.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M. SANTOS, L. C.; PELLIZZON, C. H.; ROCHA, L. R.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R.; CARDOSO, C. R.; VARANDA, E. A.; MORAES, H. P.; BAUAB, T. M.; CARLI, C.; CARLOS, I. Z.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p. 149-160, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 142-143, 2002.

LUIZE, P. S.; TIUMAN,T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MELLO, J. C. P.; NAKAMURA, C. V. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 89-94, 2005.

MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B. *The systematic identification of flavonoids*. Springer-verlag, New York, p-41,1970.

MACEDO, A. F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C. F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p.123-128, 2007.

MANS, D. R. A.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **The Oncologist**, v.5, p. 185-198, 2000.

MENEZES, A. P. S.; DA SILVA, J.; FISHER, C.; DA SILVA, F. R.; REYES, J. M.; PICADA, J. N.; FERRAZ, A. G.; CORRÊA, D. S.; PREMIOLI, S. M.; DIAS, J. F.; DE SOUZA, C. T.; FERRAZ, A. B. F Chemical and toxicological effects of medicinal *Baccharis trimera* extract from coal burning área. **Chemosphere**, v. 146, p. 396-404, 2016.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. *Medicinal plants of Brazil*. Michigan: Reference Publications, 2000.

NAGAO, T; ABE, F; KINJO, J; OKABE, H. Antiproliferative constituents in plants 10. flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* briq and Consideration of structure-activity relationship. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, ed. 7, p. 875-879, 2002.

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

NAVES, M. M. V.; MORENO, F. S. Diferenciação celular: Importancia na Hepatocarcinogêneses e Papel Modulador do B-caroteno. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.48, n.4, p.389-399, 2000.

NERURKAR, P.; RAY, R. B. Bitter melon: antagonist to cancer. **Pharmaceutical Research**, v.27, n.6, p.1049-1053, 2010.

NEWMAN, M. B.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of natural products**, v.70, n.3, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, M. B.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v.79, p. 629-661, 2016.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **NIST livro de química na web**: base de dados de referência padrão do NIST número 69. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 21 dez. 2014.

NOGUTI, J.; ANDERSEN, M.L.; CIRELLI, C.; RIBEIRO, D.A. Oxidative stress, cancer, and sleep deprivation: is there a logical link in this association? **Sleep Breath**. 2013.

NUNES, G.P.; SILVA, M.F.; RESENDE, U.M.; SIQUEIRA, J.M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 83-92, 2003.

OLIVEIRA, A. C. P.; ENDRINGER, D. C.; AMORIM, L. A. S., BRANDÃO, M. G. L.; COELHO, M. M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 465-469, 2005.

PARK, K.; NAM, D.; YUN, H.; LEE, S.; JANG, H.; SETHI, G.; CHO, S. K.; AHN, K. S.  $\beta$ -caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. **Cancer letters**, n.312, p.178-188, 2011.

PERON, A. P.; FELIPES, J.; MATTGE, G. I.; CANTAGALLI, L. B.; MARIUCCI, R. G.; VICENTINI, V. E. P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera*

Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 2, p. 127-130, 2008.

PINHO, D. S.; STURBELLE, R. T.; ROTH, M. G. M.; GARCIAS, G. L. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.2, p.165-170, 2010.

PRAYONG, P.; BARUSRUX, S.; WEERAPREEYAKUL, N. Cytotoxic activity screening of some indigenous Thai plants. *Fitoterapia*, 79, p. 598-601, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. *Rang & Dale – Farmacologia*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n.1, p.1-13, 2003.

RODRIGUES, C. R. F.; DIAS, J. H.; MELLO, R. N.; RICHTER, M. F.; PICADA, J. N.; FERRAZ, A. B.F. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 97–101, 2009.

SALMELA, A.; POUWELS, J.; KUKKUONEN-MACCHI, A.; WARIS, S.; TOIVONEN, P.; JAAKKOLA, K.; MAKI-JOUPPILA, J.; KALLIO, L.; KALLIO, M. J. The flavonoid eupatorina inactivates the mitotic checkpoint leading to polyploidy and apoptosis. **Experimental cell research**, v.318, p. 578-592, 2012.

SAIDAN, N. H.; HAMIL, M. S. R.; MEMON, A. H.; ABDELBARI, M. M.; HAMDAN, M. R.; MOHD, K. S.; MAJID, A. M. S. A.; ISMAIL, Z. Selected metabolites profiling of *Orthosiphon stamineus* Benth leaves extracts combined with chemometrics analysis and correlation with biological activities. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, 2015.

SHARMA, P. R.; MONDHE, D. M.; MUTHIAH, S.; PAL, H. C.; SHAHI, A. K.; SAXENA, A. K.; WAZI, G. N. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological interactions**, v. 179, p. 160-160, 2009.

SILVA, F. G.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; NASCIMENTO, E. A.; NELSON, D. L.; SALES, J. F.; MOL, D. J. S. Influence of radiation level on plant growth, yield and quality of essential oil in carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 1, p. 52-57, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2010.

SIMÕES-PIRES, C. A.; DEBENEDETTI, S.; SPEGAZZINI, E.; MENTZ, L. A.; MATZENBACHER, N. I.; LIMBERGER, R. P.; HENRIQUES, A. T. 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, p. 23-32, 2005a.

SIMÕES-PIRES, C. A.; QUEIROZ, E. F.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line identification of anti-oxidant compounds from three *Baccharis*

species by HPLC-UV-MS-MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 307-314, 2005b.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of Natural Cancer Institut**, v. 82, p. 1107 - 1112, 1990.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. *Introduction to modern liquid chromatography*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.

SONG, L.L.; KOSMEDER II, J.W.; LEE, S.K.; GERHÄUSER, C.; LANTVIT, D.; MOON, R.C.; MORIARTY, R.M.; PEZZUTO J.M. Cancer Chemopreventive Activity Mediated by 4'-Bromoflavone, a Potent Inducer of Phase II Detoxification Enzymes. **Cancer Research**, v. 59, p.578-585, 1999.

SPORN, M. B.; SUH, N. Chemoprevention of cancer. **Carcinogenesis**, v.21, n.3, p. 525-530, 2000.

STONE, S. C.; VASCONCELLOS, F. A.; LENARDÃO, E. J.; DO AMARAL, R. C.; JACOB, R. G.; LEIVAS LEITE, F. P. Evaluation of potential use of *Cymbopogon* SP. Essential oils, (*R*)-citronellal and *N*-citronellylamine in cancer chemotherapy. **International Journal of Applied in Natural Products**, v. 6, n.4, p.11-15, 2013.

SUTTISRI, R.; KINGHORN, A. D.; WRIGHT, A. D.; STICHER, O. Neo-clerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. **Phytochemistry**, v. 35, p.443, 1994.

SUZUKI, S.; HIGUCHI, M.; PROSKE, R.J.; ORIDATE, N.; HONG, W. K.; LOTAN, R. Implication of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome C and caspase-3 in N-(4-hydroxyphenyl) retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. **Oncogene**, v.18, p.6380–6387, 1999.

WHO, *International agency for research on câncer*. Global cancer: facts & figures, 3<sup>a</sup> ed. Geneva: WHO, 2015.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

WILLIAMS, D. H.; STONE, M. J.; HAUCK, P. R.; RAHMAN, S. K. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? **Journal of natural products**, v. 52, n.6, p. 1189-1208, 1989.

YUNES, R. A.; FILHO, V. C. *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna Farmacognosia*. 4<sup>a</sup> ed. Itajaí/SC: Editora da Universidade do Vale do Itajaí, 2014.

## APÊNDICE I - Sugestão de identificação dos componentes das frações do OE

FRAÇÃO	CG-EM					Propostas de Identificação
	PICO	tR (min)	IR exp.	ÁREA	IR lit.	
1	1	22,58	1.290	8,21	-	-
	2	<b>23,61</b>	<b>1.315</b>	<b>30,88</b>	-	<b>3-metil-undecano</b>
	3	<b>26,08</b>	<b>1.374</b>	<b>60,91</b>	-	<b>3-etil-5-metil-heptano; 2,6-dimetil-decano</b>
2	1	22,09	1366	2,07	-	-
	2	22,55	1377	4,78	-	2-propil-1-decanol; 3-metil-decano
	3	<b>23,59</b>	1401	<b>23,17</b>	<b>1401</b>	<b>tetradecano</b>
	4	24,34	1420	2,59	-	óxido de cariofileno; $\alpha$ -farneseno
	5	25,53	1449	5,1	-	5-metil-1-hexeno; 4-metil-1-hexeno
	6	<b>26,07</b>	1462	<b>10,22</b>	-	<b>norfitano</b>
	7	28,4	1520	3,31	1522	$\beta$ -cadineno
	8	29,65	1552	3,51	-	-
	9	30,17	1566	2,68	1500	pentadecano
	10	31,57	1602	6,71	-	n-hundecano; n-tetradecano
	11	33,35	1650	3,91	-	1,1-difluoro-dodecano; 3-metil-heptano
	12	35,4	1705	6,17	-	n-pentadecano; 1,1-difluoro-dodecano
3	1	6,2	958	1,27	-	2-pentanona
	2	<b>31,08</b>	<b>1589</b>	<b>42,17</b>	<b>1582</b>	<b>globulol</b>
	3	32,88	1637	1,88	-	longipineno epóxido
	4	<b>33,26</b>	<b>1648</b>	<b>10,99</b>	<b>1643</b>	<b>tau-muurolol</b>
	5	<b>33,68</b>	<b>1659</b>	<b>40,1</b>	<b>1653</b>	<b><math>\alpha</math>-cadinol</b>
	6	34,19	1672	1,45	-	7-metanoazuleno
	7	34,81	1689	0,74	-	levobulonol
	8	35,5	1708	0,88	-	-
4	1	21,37	1349	0,93	1348	$\alpha$ -cubebeno
	2	22,32	1371	1,11	1372	$\alpha$ -ilangeno
	3	22,38	1373	1,07	1373	(-)-isoleveno
	4	22,56	1377	9,07	1377	$\alpha$ -copaeno
	5	23,9	1409	0,97	1410	ciclopropeazuleno
	6	24,01	1412	1,13	1410	$\alpha$ -gurjuneno
	7	24,33	1419	2,62	1420	$\beta$ -cariofileno
	8	24,65	1427	1,04	1453	alo-aromadendreno
	9	24,78	1430	1,81	1390	$\beta$ -cubebeno
	10	<b>25,04</b>	<b>1437</b>	<b>10,22</b>	<b>1439</b>	<b><math>\alpha</math>-guaieno (azuleno)</b>
	11	<b>25,17</b>	<b>1440</b>	<b>16,39</b>	<b>1439</b>	<b>aromadendreno</b>
12	25,37	1445	1,2	1439	azuleno	
13	25,55	1449	1,61	1351	$\alpha$ -cubebeno	

	14	26,03	1461	3,31	1462	alo-aromadendreno
	15	26,5	1473	2,84	1515	delta-cadineno
	16	26,62	1476	5,72	1481	naftaleno
	17	27,21	1490	1,46	1503	azuleno
	<b>18</b>	<b>27,36</b>	<b>1494</b>	<b>12,04</b>	<b>1495</b>	<b>(+)-Ledeno</b>
	19	27,61	1500	4,4	1499	naftaleno ( $\alpha$ -muroleno)
	20	28,15	1514	0,55	1521	gama-cadineno
	21	28,4	1520	7,73	1524	delta-cadineno
	22	40,02	1838	8,73	2105	fitol
	23	63,33	2598	1,36	-	-
	1	23,15	1.303	3,53	1350	$\alpha$ -ilangeno
	<b>2</b>	<b>24,36</b>	<b>1.333</b>	<b>28,34</b>	<b>1390</b>	<b><math>\beta</math>-cariofileno</b>
	3	25,17	1.352	1,15	-	aromadendreno; <i>trans</i> -cariofileno
	4	25,78	1.367	6,12	-	$\beta$ -selineno; $\alpha$ -humuleno
	5	26,63	1.387	2,3	-	$\alpha$ -amorfenol; germacreno-D; calareno
	<b>6</b>	<b>26,86</b>	<b>1.393</b>	<b>22,16</b>	<b>1390</b>	<b><math>\beta</math>-cubebeno</b>
	7	27,14	1.399	1,29	1394	$\beta$ -elemeno
<b>6</b>	8	27,36	1.405	2,48	1417	isosativeno
	9	27,46	1.407	1,87	1430	gama-elemeno
	10	27,61	1.411	1,55	-	muuroleno; $\alpha$ -amorfenol
	11	28,14	1.425	1,48	1428	$\beta$ -gurjuneno (calareno)
	12	28,41	1.431	3,95	1439	aromadendreno
	13	30,63	1.487	3,99	-	espatulenol; (-)-espatulenol
	14	30,76	1.490	6,13	-	óxido de cariofileno; patchuleno; <i>trans</i> -cariofileno
	15	32,94	1.548	1,14	-	-
	16	33,99	1.575	5,09	1582	óxido de cariofileno
	1	20,75	1334	0,2	1336	bicicloelemeno
	2	22,56	1377	0,28	1377	$\alpha$ -copaeno
	3	23,14	1391	1,48	1392	$\beta$ -elemeno
	4	24,35	1420	9,34	1420	$\beta$ -cariofileno
	5	24,35	1420	9,09	1413	$\alpha$ -guaiano
	6	25,17	1440	0,71	1456	humuleno
	7	25,79	1455	6,04	-	-
<b>7</b>	8	26,63	1476	0,77	1481	germacreno D
	<b>9</b>	<b>26,86</b>	<b>1482</b>	<b>10,04</b>	<b>1485</b>	<b>biciclogermacreno</b>
	<b>10</b>	<b>27,52</b>	<b>1498</b>	<b>48,28</b>	<b>1503</b>	<b>germacreno A</b>
	11	27,88	1507	2,53	-	-
	12	28,41	1520	3,45	1513	$\alpha$ -calacoreno
	13	29,89	1559	2,9	-	-
	14	30,63	1578	2,09	-	-
	1	23,59	1.314	1.68	-	pentadecano
<b>9</b>	2	24,34	1.332	6.50	-	$\beta$ -cariofileno; isso-cariofileno; aromadendreno
	3	25,77	1.367	3.93	-	-
	4	26,62	1.387	1.60	1380	$\alpha$ -copaeno



	<b>5</b>	<b>26,83</b>	<b>1.392</b>	<b>16.73</b>	<b>1390</b>	<b><math>\beta</math>-cubebeno</b>
	6	27,35	1.405	4.02	1404	$\beta$ -cariofileno
	<b>7</b>	<b>27,44</b>	<b>1.407</b>	<b>24.51</b>	<b>1410</b>	<b>gama-elemeno</b>
	8	27,62	1.411	2.38	1405	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamoteno
	9	27,86	1.417	1.60	1408	$\alpha$ -humuleno
	10	28,14	1.430	1.31	1483	$\alpha$ -amorfenno; germacreno-D
	11	28,39	1.431	9.14	1420	$\alpha$ -copaeno
	12	29,2	1.451	1.13	1430	2,7-dimetil-quinolina
	13	29,89	1.469	2.35	1462	$\alpha$ -farneseno
	14	30,62	1.487	7.93	-	(-)-espatulenol; $\alpha$ - <i>trans</i> -bergamotenol
	15	32,15	1.527	1.96	1524	$\alpha$ -calacoreno
	16	33,25	1.556	1.85	-	-
	17	33,99	1.575	3.15	-	patchuleno; $\alpha$ -linalol
	18	34,23	1.582	1.08	-	guajazuleno
	19	35,92	1.628	2.07	-	globulol; ledol; veridiflorol
	1	19,35	1301	1,4	1300	tridecano
	2	22,56	1377	1,19	-	-
	3	23,14	1391	1,84	1389	$\beta$ -elemeno
	4	23,59	1401	1,58	1400	tetradecano
	5	24,22	1417	2	1416	1,6-dimetil-naftaleno
	<b>6</b>	<b>24,36</b>	1420	<b>20,54</b>	<b>1419</b>	<b><math>\beta</math>-cariofileno</b>
	7	25,78	1455	3,15	1452	$\alpha$ -humuleno
<b>10</b>	8	26,63	1476	1,55	-	-
	<b>9</b>	<b>26,86</b>	1482	<b>19,5</b>	<b>1484</b>	<b>germacreno-D</b>
	<b>10</b>	<b>27,49</b>	1497	<b>30,75</b>	<b>1500</b>	<b>biciclogermacreno</b>
	11	27,62	1500	2,59	-	-
	12	27,88	1507	2,38	1508	germacreno-A
	13	28,15	1514	1,03	-	-
	14	28,41	1521	7,33	-	-
	15	29,89	1559	1,8	-	-
	1	19,35	1301	4,13	1300	tridecano
	2	22,56	1377	3,5	-	-
	3	23,58	1401	6,13	1400	tetradecano
	4	23,65	1403	2,42	1408	1,6-dimetil-naftaleno
	5	23,73	1405	2,57	1408	1,6-dimetil-naftaleno
	<b>6</b>	<b>24,21</b>	1416	<b>10,23</b>	<b>1409</b>	<b>2,6-dimetil-naftaleno</b>
	7	24,38	1421	3,63	1424	1,4-dimetil-naftaleno
<b>18</b>	8	25,1	1438	4,72	-	-
	9	25,62	1451	1,24	1443	1,4-dimetil-naftaleno
	10	26,07	1462	1,65	-	-
	11	26,9	1483	9,07	-	-
	12	27,14	1488	1,3	-	-
	13	27,29	1492	4,44	-	-
	14	28,51	1523	5,04	-	-
	15	28,76	1530	6,07	-	-

16	29,3	1543	3,44	-	-	
17	29,52	1549	3,58	-	-	
18	30,87	1584	2,14	-	-	
19	31,02	1588	4,39	-	-	
20	31,42	1598	6,13	-	-	
21	31,56	1602	2,7	-	-	
<hr/>						
	1	15,06	1201	1,18	1200	dodecano
	2	19,01	1293	4,03	1297	1-metil-naftaleno
	3	19,35	1301	3	1300	tridecano
	4	19,66	1308	2,94	1312	2-metil-naftaleno
	5	23,58	1401	8,79	1400	tetradecano
	6	23,7	1404	3	1405	1,3-dimetil-naftaleno
	7	24,2	1416	8,08	1416	1,3-dimetil-naftaleno
	8	24,37	1420	3,73	1419	1,6-dimetil-naftaleno
	9	25,04	1437	4,94	1436	1,4-dimetil-naftaleno
	10	25,6	1451	2,32	1452	1,2-dimetil-naftaleno
	11	26,87	1482	8,92	-	-
	12	27,26	1491	5,15	-	-
	13	28,5	1523	5,85	-	-
<b>23</b>	14	28,74	1529	4,78	-	1,4,5-trimetil-naftaleno; 1,4,6-trimetil-naftaleno
	15	29,29	1543	3,42	-	1,4,5-trimetil-naftaleno; 1,4,6-trimetil-naftaleno
	16	29,49	1548	3,99	-	1,4,5-trimetil-naftaleno; 1,4,6-trimetil-naftaleno
	17	30,85	1583	2,17	-	-
	18	31,01	1587	3,82	-	-
	19	31,41	1598	7,61	-	-
	20	31,54	1601	1,37	-	2-metil-dodecano; tetradecano
	21	31,74	1606	1,32	-	-
	22	32,41	1625	2,26	-	-
	23	34,05	1669	0,83	-	1,4-dimetil-7-etil-azuleno; 1,2,3,4-tetrametil-azuleno
	24	34,59	1683	1,04	-	1,4-dimetil-7-etil-azuleno; 1,2,3,4-tetrametil-azuleno
<hr/>						
	1	19,02	1293	0,91	1290	2-metil-naftaleno
	2	19,67	1308	0,54	1306	1-metil-naftaleno
	3	22,55	1377	3,62	1376	$\beta$ -damascenona
	4	24,21	1416	2,93	-	-
	5	25,04	1437	1,75	1436	1,4,-dimetil-naftaleno
	6	25,61	1451	0,82	1452	1,2-dimetil-naftaleno
<b>24</b>	7	26,87	1482	4,2	1483	-
	8	27,26	1491	2,4	1494	-
	9	28,49	1523	3,17	-	-
	10	28,75	1529	2,54	-	-
	11	30,2	1567	1,66	1562	óxido de cariofileno
	12	30,36	1571	2,33	1567	Palustrol
	13	30,74	1580	2,61	-	-

	14	30,86	1584	1,87	-	-
	15	31,02	1588	4,59	-	-
	16	31,2	1592	3,18	1592	viridiflorol
	17	31,41	1598	3,46	-	-
	18	32,16	1618	1,04	-	-
	19	32,38	1624	4,64	-	-
	20	33,11	1643	8,01	1642	cubenol
	21	34,6	1684	1,39	-	-
	22	43,31	1938	2,15	-	-
	23	46,29	2032	4,67	-	-
	<b>24</b>	<b>48,89</b>	2117	<b>14,86</b>	-	<b>8-cedren-13-ol</b>
	1	22,56	1377	3,65	1379	<i>trans</i> - $\beta$ -damascenona
	2	30,2	1567	2	-	-
	3	30,36	1571	5,15	1567	palustrol
	4	30,75	1581	3,81	-	isogeraniol; ledano
	5	31,05	1588	2,27	-	germacrono
	6	31,21	1593	4,56	-	$\delta$ -Guaieno
	7	31,63	1603	0,99	-	germacreno-B
	8	32,27	1621	2,37	-	globulol; ledol
<b>25</b>	<b>9</b>	<b>33,1</b>	1643	<b>14,55</b>	<b>1642</b>	<b>cubenol</b>
	10	34,02	1668	2,03	-	-
	11	34,61	1684	1,64	-	-
	12	40,12	1841	0,98	-	-
	13	43,31	1938	3,74	-	espatulenol; $\alpha$ - <i>trans</i> -bergamotol; 13-cedrenol
	14	46,29	2032	8,8	-	<i>trans</i> -cariofileno; $\alpha$ - <i>trans</i> - bergamotol; 13-cedrenol
	<b>15</b>	<b>48,88</b>	2117	<b>29,42</b>	-	<b><math>\alpha</math>-<i>trans</i>-bergamotol; <math>\beta</math>-sinensal</b>
	1	19,35	1301	1,33	1300	tridecano
	2	22,56	1377	1,9	1380	<i>trans</i> - $\beta$ -damascenona
	3	23,57	1401	2,97	1400	tetradecano
	4	24,21	1416	2,4	1409	2,6-dimetil-naftaleno
	5	24,38	1421	0,99	1418	1,7-dimetil-naftaleno
	6	25,06	1437	1,16	1439	1,2-dimetil-naftaleno
	7	28,51	1523	1,85	-	1,4,5-trimetil-naftaleno; 1,4,6- trimetil-naftaleno
	8	28,75	1529	1,41	-	4,6,8-trimetil-azuleno; 1,4,6- trimetil-naftaleno
<b>26</b>	9	29,32	1544	1,13	-	1,4,5-trimetil-naftaleno; 1,4,6- trimetil-naftaleno
	10	29,57	1550	3,8	-	$\beta$ -cariofileno
	11	30,05	1563	1,14	-	-
	<b>12</b>	<b>30,37</b>	1571	<b>17,46</b>	<b>1567</b>	<b>ledol</b>
	<b>13</b>	<b>30,75</b>	1581	<b>15,48</b>	<b>1582</b>	<b>óxido de cariofileno</b>
	14	31,79	1608	3,81	1608	epóxido de humuleno
	<b>15</b>	<b>32,28</b>	1621	<b>21,03</b>	-	<b>globulol; epiglobulol</b>
	16	33,09	1643	1,56	1645	cubenol
	17	36,34	1732	1,97	-	aromadendreno; $\alpha$ -selineno

	18	48,89	2117	1,52	-	cis-lanceol; <i>trans</i> -cariofileno
<b>27</b>	1	23,58	1401	1,28	1400	tetradecano
	2	24,23	1417	1,58	1410	2,3-dimetil-naftaleno
	3	26,89	1482	1,47	-	-
	4	28,52	1523	1,04	-	2,3,6-trimetil-naftaleno; 1,6,7-trimetil-naftaleno
	5	29,54	1550	3,69	-	óxido de cariofileno; patchuleno
	6	29,78	1556	7,15	1561	ledol
	7	<b>30,77</b>	1581	<b>57,26</b>	<b>1582</b>	<b>óxido de cariofileno</b>
	8	30,99	1587	3,2	-	biciclogermacreno
	9	31,8	1608	4,75	-	-
	10	32,07	1615	2,55	1608	$\alpha$ -cedrol
	11	32,27	1621	3,5	-	iludol; epiglobulol; 1,6-dien-3-ol-humuleno
<b>28</b>	1	29,79	1556	5,09	-	-
	2	<b>30,75</b>	1581	<b>88,41</b>	<b>1581</b>	<b>óxido de cariofileno</b>
<b>29</b>	1	19,35	1301	2,8	1301	tridecano
	2	22,54	1376	1,74	-	pentadecano; tetradecano
	3	23,58	1401	5,15	1400	tetradecano
	4	24,22	1417	4,76	1409	2,6-dimetil-naftaleno
	5	26,06	1462	2,12	-	tridecano; 2,3,3-trimetil-octano
	6	26,73	1478	4,58	1477	<i>trans</i> - $\beta$ -ionona
	7	28,51	1523	2,45	-	1,6,7-trimetil-naftaleno; 2,3,6-trimetil-naftaleno; 1,4,6-trimetil-naftaleno
	8	28,75	1529	2,45	-	2,3,6-trimetil-naftaleno; 4,6,8-trimetil-azuleno; 1,6,7-trimetil-naftaleno
	9	29,32	1544	2,52	-	-
	10	29,51	1549	2,1	-	2,3,6-trimetil-naftaleno; 1,6,7-trimetil-naftaleno; 4,6,8-trimetil-azuleno
	11	29,77	1556	4,19	1564	ledol
	12	30,59	1577	2,78	1577	espatulenol
	13	30,98	1587	9,75	-	biciclo-germacreno
	14	32,07	1615	26,3	1619	cubenol
	15	32,89	1637	2,04	-	óxido <i>trans</i> -limoneno; nerolidol
	16	33,79	1662	5,71	-	-
	17	60,24	2530	1,64	-	-
<b>31</b>	1	19,35	1301	1,58	1301	tridecano
	2	23,58	1401	1,81	1401	tetradecano
	3	24,22	1417	1,69	-	2,3-dimetil-naftaleno; 1,8-dimetil-naftaleno
	4	26,05	1462	0,67	-	-
	5	28,4	1520	3,1	-	-
	6	30,04	1562	13,1	1570	globulol
	7	31,66	1604	1,59	-	patchuleno
	8	<b>32,1</b>	<b>1616</b>	<b>10,41</b>	-	<b>veridiflorol</b>
	9	<b>32,55</b>	<b>1628</b>	<b>55,21</b>	<b>1623</b>	<b>cubenol</b>

	10	33,61	1657	1,05	-	óxido de cariofileno, cis-mirtanol
	11	34,29	1675	1,62	-	-
	1	28,42	1521	1,2	-	-
	2	<b>30,04</b>	<b>1562</b>	<b>17,62</b>	<b>1567</b>	<b>ledol</b>
	3	31,65	1604	1,83	-	patchuleno; ledano
	4	32,1	1616	2,25	-	germacreno-D-4-ol; $\alpha$ -bisabolol; globulol
<b>32</b>	5	<b>32,54</b>	<b>1628</b>	<b>24,23</b>	<b>1623</b>	<b>cubenol</b>
	6	33,4	1651	2,64	-	$\alpha$ -farneseno; tau-cadinol
	7	<b>34,26</b>	<b>1674</b>	<b>32,19</b>	-	<b>espatulenol</b>
	8	34,8	1689	4,8	-	$\alpha$ -copaeno; iso-espatulenol
	9	40,58	1855	9,59	-	-
	10	60,23	2530	1,2	-	-
	1	15,05	1200	1,2	1200	dodecano
	2	19,02	1293	1,38	1290	2-metil-naftaleno
	3	19,34	1301	1,79	1301	tridecano
	4	21,52	1352	1,56	1356	eugenol
	5	22,54	1376	1,03	-	-
	6	23,57	1401	2,72	1401	tetradecano
	7	23,7	1404	0,94	1407	2,6-dimetil-naftaleno
	8	24,2	1416	2,32	1418	1,7-dimetil-naftaleno
	9	24,38	1421	1,11	1428	1,5-dimetil-naftaleno
	10	26,88	1482	1,62	-	-
<b>33</b>	11	28,74	1529	0,85	-	2,3,6-trimetil-naftaleno; 1,4,6- trimetil-naftaleno
	12	29,95	1560	2	1561	nerolidol
	13	30,04	1562	6,34	1562	ledol
	14	31,43	1598	0,94	-	-
	15	31,82	1609	2,08	-	palustrol; isoverbanol
	16	33,06	1642	3,1	1642	tau-cadinol
	17	33,27	1648	1,12	-	-
	18	33,4	1651	2,58	-	-
	19	<b>34,27</b>	<b>1675</b>	<b>15,71</b>	<b>1676</b>	<b>ocidenol</b>
	20	<b>34,81</b>	<b>1689</b>	<b>36,96</b>	-	<b><math>\beta</math>-copaen-4-<math>\alpha</math>-ol; occidentalol</b> trans- $\beta$ -nerolidol; nerolidol; trans.trans-farnesil acetato; farnesol
	21	46,01	2023	2,16	-	-
	1	29,96	1560	1,1	1561	nerolidol
	2	<b>31,36</b>	<b>1596</b>	<b>12,35</b>	-	<b><math>\beta</math>-eudesmol; edicariol; eulemol</b>
	3	31,67	1605	7,08	1609	veridiflorol
<b>35</b>	4	31,82	1609	8,07	1609	veridiflorol
	5	32,37	1623	9,38	-	edicariol
	6	<b>33,07</b>	<b>1642</b>	<b>45,29</b>	<b>1640</b>	<b><math>\alpha</math>-muurolol</b>
	7	34,13	1671	1,9	1672	bulnesol
	8	34,8	1689	9,25	-	$\beta$ -copaen4- $\alpha$ -ol; espatulenol
<b>36</b>	1	23,59	1401	1,63	1401	tetradecano
	2	30,59	1577	2,82	1574	4-germacrenol

	3	31,43	1598	4,33	-	-
	4	<b>32,09</b>	<b>1616</b>	<b>15,46</b>	<b>1609</b>	<b>viridiflorol</b>
	5	<b>32,55</b>	<b>1628</b>	<b>63,76</b>	<b>1623</b>	<b>cubenol</b>
	6	33,64	1658	2,75	-	-
	7	33,72	1660	1,46	-	-
<b>37</b>	1	30,26	1568	1,57	1573	espatulenol
	2	<b>30,62</b>	<b>1577</b>	<b>13,98</b>	<b>1583</b>	<b>espatulenol; óxido de cariofileno;</b>
	3	<b>31,3</b>	<b>1595</b>	<b>43,34</b>	<b>1590</b>	<b>viridiflorol</b>
	4	31,68	1605	8,02	1600	rosifoliol
	5	31,84	1609	1,09	-	-
	6	32,38	1624	2,1	-	elemol
	7	32,76	1634	1,15	-	palustrol; cubenol; aromadendreno
	8	<b>33,16</b>	<b>1645</b>	<b>27,46</b>	<b>1643</b>	<b>tau-muurolol</b>
<b>38</b>	1	27,45	1496	2,17	-	cedrandiol; espatulenol
	2	30,26	1568	6,47	1569	viridiflorol
	3	<b>30,66</b>	<b>1578</b>	<b>53,94</b>	<b>1577</b>	<b>espatulenol</b>
	4	30,89	1584	2,85	1581	espatulenol
	5	<b>31,29</b>	<b>1595</b>	<b>14,37</b>	<b>1593</b>	<b>globulol</b>
	6	<b>31,69</b>	<b>1605</b>	<b>15,05</b>	<b>1603</b>	<b>rosifoliol</b>
	7	33,16	1645	5,15	1641	tau-muurolol
<b>39</b>	1	4,69	902	1,24	-	-
	2	6,21	958	1,08	-	-
	3	7,56	1006	3,09	-	-
	4	27,45	1496	1,18	-	espatulenol; cedrandiol
	5	30,27	1568	9,55	1569	viridiflorol
	6	<b>30,68</b>	<b>1579</b>	<b>60,98</b>	<b>1578</b>	<b>óxido de cariofileno</b>
	7	30,9	1585	6,69	1581	espatulenol
	8	31,29	1595	1,96	1592	epiglobulol; ledol; veridiflorol
	9	31,69	1605	6,42	1603	rosifoliol
<b>40</b>	1	3,76	-	2,56	-	-
	2	4,47	-	3,38	-	-
	3	4,7	902	2,19	-	-
	4	4,88	909	3,98	-	-
	5	5,75	941	4,03	-	-
	6	5,84	944	2,96	-	-
	7	5,97	949	4,01	-	-
	8	6,26	960	1,62	-	pentanona; 3-metil-2-butanona
	9	6,46	968	2,71	-	-
	10	6,77	979	0,88	-	2,4-hexadien-1-ol; 2-hexin-1-ol
	11	<b>7,71</b>			-	<b>2,4-hexadien-1-ol; 4-metil-2,3-hexadien-1-ol</b>
12	7,83	1014	3,56	-	2-metil-2-penten-1-ol	
13	9,05	1048	1,25	-	3,5-hexadien-1-ol; 3-hexin-1-ol	
14	19,02	1293	1,45	1290	$\beta$ -metil-naftaleno	

15	19,36	1301	1,15	1301	tridecano
16	22,55	1377	0,95	-	-
17	23,6	1401	1,44	1401	tetradecano
18	24,39	1421	0,86	1427	1,6-dimetil-naftaleno
19	26,89	1482	1,54	-	-
20	27,27	1492	1,01	-	-
21	28,28	1517	3,78	-	espatulenol; epiglobulol
22	30,28	1569	1,95	1567; 1569	viridiflorol; ledol
23	30,72	1580	8,9	1578	espatulenol
24	30,93	1585	2,97	1582	óxido de cariofileno
25	31,43	1598	0,86	-	-
26	31,72	1606	1,3	1600	rosifoliol
27	33,64	1658	2,55	-	viridiflorol; ledol
28	34,24	1674	2,64	-	óxido de cariofileno
<hr/>					
1	6,21	958	5,79	-	pentanona; 3-metil-2-butanona
2	24,21	1416	0,88	1409	2,6-dimetil-naftaleno
3	26,87	1482	1,7	-	-
4	27,26	1491	1,08	-	-
5	<b>28,26</b>	<b>1517</b>	<b>10,45</b>	-	<b>ledol; <math>\alpha</math>-muurolol</b>
6	28,51	1523	1,21	-	2,3,5-trimetil-naftaleno; 1,4,5-trimetil-naftaleno
7	29,49	1548	1,08	-	2,3,6-trimetil-naftaleno; 1,4,5-trimetil-naftaleno
8	30,63	1578	3,01	1577	espatulenol
9	30,88	1584	1,24	-	-
10	31,01	1587	2,03	-	-
11	31,41	1598	1,45	-	-
12	32,85	1636	4,87	1624	espatulenol
13	33,25	1647	3,54	-	espatulenol; $\beta$ -espatulenol
14	33,49	1654	1,21	-	elemol; globulol; eudesmol
15	<b>33,67</b>	<b>1659</b>	<b>22,13</b>	-	<b>ledol</b>
16	33,96	1666	3,12	-	óxido de cariofileno
17	<b>34,27</b>	<b>1675</b>	<b>16,37</b>	-	-
18	34,45	1680	1,31	-	-
19	34,62	1684	2,46	-	-
20	35,21	1700	2,22	-	-
21	35,47	1707	1,68	-	-
22	37,48	1764	0,88	-	-
23	48,71	2111	6,52	-	-
<hr/>					
1	3,89	-	0,97	-	4,4,5-trimetil-2-hexeno; 2,4-dimetil-2-penteno
2	6,23	959	5,12	-	pentanona; 3-metil-2-butanona
3	29,77	1556	0,95	1566	óxido de cariofileno
4	30,48	1574	0,92	1567	palustrol
5	32,29	1621	1,2	1623	cubenol
6	<b>32,9</b>	<b>1638</b>	<b>10,78</b>	-	<b>espatulenol</b>
7	33,27	1648	1,53	-	$\beta$ -guaienene; cedren-13-ol;

						espatulenol
	8	33,51	1654	1,28	1658	eudesmol
	<b>9</b>	<b>33,79</b>	<b>1662</b>	<b>47,4</b>	-	<b>viridiflorol</b>
	10	34,01	1668	2,88	-	óxido de ledeno; óxido de aromadendreno
	11	34,68	1686	4,82	-	globulol
	12	36,4	1734	4,02	-	-
	13	48,71	2111	4,81	2112	fitol
	14	51,07	2192	1,09	-	-
	<b>1</b>	<b>30,96</b>	<b>1586</b>	<b>25,55</b>	<b>1590</b>	<b>viridiflorol</b>
	2	33,23	1647	5,66	1642	tau-cadinol
<b>44</b>	<b>3</b>	<b>33,57</b>	<b>1656</b>	<b>46,66</b>	<b>1648</b>	<b>tau-cadinol</b>
	4	56,77	2398	10,66	-	3,3-dimetil-hexano; 3,7-dimetil-decano
	5	63,23	2598	11,47	-	-
	1	3,89	-	1,88	-	-
	2	4,69	902	1,23	-	-
	3	6,11	955	2,53	-	-
	4	6,21	958	2,22	-	-
	5	7,55	1006	0,92	-	2,4-hexadien-1-ol; 2-hexin-1-ol
	6	8,19	1024	8,16	-	3-metil-2,3-pentadien-1-ol; 2,4-hexadien-1-ol
	7	19,01	1293	1,33	1296	2-metil-naftaleno
	8	19,34	1301	0,93	1301	tridecano
	9	19,66	1308	0,92	1306	1-metil-naftaleno
	10	22,54	1376	1,23	-	-
<b>46</b>	11	22,89	1385	1,15	-	$\alpha$ -trans-bergamotol; espatulenol
	12	23,57	1401	1,56	-	-
	13	24,2	1416	2,7	1409	2,6-dimetil-naftaleno
	14	28,5	1523	1,56	-	1,4,5-trimetil-naftaleno; 2,3,6-trimetil-naftaleno
	15	28,74	1529	1,23	-	1,4,5-trimetil-naftaleno; 2,3,6-trimetil-naftaleno
	<b>16</b>	<b>30,98</b>	<b>1587</b>	<b>39,96</b>	<b>1585</b>	<b>globulol</b>
	17	31,41	1598	1,21	-	-
	18	32,04	1615	1,31	-	-
	19	33,23	1647	1,15	1638	epi- $\alpha$ -cadinol
	<b>20</b>	<b>33,57</b>	<b>1656</b>	<b>19,34</b>	-	<b>viridiflorol</b>
	1	3,76	-	5,88	-	-
	2	3,89	-	1,4	-	-
	3	4,11	-	1,35	-	-
	4	4,38	-	1,3	-	-
	5	4,69	902	4,44	-	-
<b>48</b>	6	5,56	934	1,12	-	-
	7	6,21	958	7,83	-	2-pentanona; 3-metil-2-butanona
	8	26,87	1482	1,66	-	-
	<b>9</b>	<b>28,67</b>	<b>1527</b>	<b>41,08</b>	-	<b><math>\alpha</math>-cedrol; widdrol</b>
	10	30,4	1572	1,13	-	-



	11	31	1587	6,23	1585	globulol
	12	31,69	1605	3,84	1601	espatulenol
	13	32,06	1615	3,25	1624	espatulenol
	14	33,24	1647	5,41	-	-
	15	33,47	1653	2,73	-	aloaromadendreno; $\alpha$ -selineno; gama-gurjuneno
	16	33,59	1656	3,26	1654	tau-muurolol
	17	35,81	1717	1,92	1722	<i>trans</i> -farnesol
49	1	3,75	-	3,26	-	2,4-hexadien-1-ol; 2-metileno- ciclopentanol
	2	3,89	-	4,83	-	4,4,5-trimetil-2-hexeno; 2,4- dimetil-2-penteno
	3	4,39	-	2,68	-	-
	4	4,69	902	3,13	-	-
	5	6,12	955	3,94	-	2-ciclopenten-1-ona; 2-metil-2- ciclopenten-1-ona
	6	6,2	958	9,68	-	2-pentanona; 3-metil-2- butanona
	7	26,01	1461	3,18	-	-
	8	26,88	1482	3,57	-	-
	9	28,2	1515	2,23	-	-
	10	28,27	1517	1,61	-	2,2-dimetil-3,4-pentadien-1-ol; 3,4-dimetil-3-penten-2-ona
	11	<b>28,59</b>	<b>1525</b>	<b>31,68</b>	-	<b>widdrol; <math>\alpha</math>-cedrol</b>
	12	30,98	1587	4,67	1590	viridiflorol
	13	31,41	1598	2,03	-	-
	14	31,66	1604	4,69	1594	espatulenol
	15	<b>33,2</b>	<b>1646</b>	<b>10,44</b>	-	<b>óxido de ledeno; óxido de cariofileno</b>
	16	33,44	1652	3,17	-	aloaromadendreno; aromadendreno
52	1	3,76	-	2,52	-	2-metileno ciclopentanol; 2,3- dimetil-2-penteno; 3,4-dimetil-2- penteno
	2	3,89	-	4,66	-	4,4,5-trimetil-2-hexeno; 2,4- dimetil-2-penteno
	3	4,39	-	1,53	-	-
	4	4,69	902	3,73	-	-
	5	6,11	955	6,5	-	-
	6	6,2	958	4,98	-	2-pentanona; 3-metil-2- butanona
	7	7,55	1006	2,86	-	2,4-hexadien-1-ol; 2-hexin-1-ol
	8	8,19	1024	8,21	-	2,2-dimetil-3,4-pentadien-1-ol; 3- etil-2,4-pentadien-1-ol
	9	19,01	1293	2,45	1290	2-metil-naftaleno
	10	19,34	1301	1,23	1301	tridecano
	11	19,65	1308	1,85	1306	1-metil-naftaleno
	12	23,58	1401	3,93	1400	tetradecano
	13	24,2	1416	6,4	1409	2,6-dimetil-naftaleno
	14	24,37	1420	2,43	1419	1,6-dimetil-naftaleno
	15	25,04	1437	2,54	-	-
	16	25,61	1451	2,58	1452	2,3-dimetil-naftaleno; 1,4-

						dimetil-naftaleno
	17	26,06	1462	6,89	-	-
	18	26,87	1482	5,95	-	-
	19	28,5	1523	3,64	-	1,4,5-trimetil-naftaleno; 2,3,6-trimetil-naftaleno
	20	28,75	1529	2,5	-	1,4,5-trimetil-naftaleno; 2,3,6-trimetil-naftaleno
	21	29,31	1544	2,06	-	$\beta$ -isopropilnaftaleno
	22	29,49	1548	4,43	-	2,3,6-trimetil-naftaleno; 1,4,5-trimetil-naftaleno; 1,6,7-trimetil-naftaleno
	23	31,01	1587	1,86	-	-
	24	31,4	1597	3,03	-	-
	25	31,55	1601	1,5	-	-
	1	3,75	-	2,17	-	2-metileno ciclopentanol; 2,4-hexadien-1-ol
	2	3,89	-	4,06	-	-
	3	4,58	-	1,17	-	-
	4	4,69	902	2,89	-	-
	5	6,11	955	2,63	-	2-pentanona; 3-metil-2-butanona
	6	6,19	957	7,59	-	2-pentanona; 3-metil-2-butanona
	7	24,18	1416	2,65	1416	1,3-dimetil-naftaleno
	8	24,35	1420	1,53	1428	1,5-dimetil-naftaleno
	9	25,03	1437	1,78	1427	1,3-dimetil-naftaleno
<b>54</b>	10	25,58	1450	1,78	1439	1,2-dimetil-naftaleno
	11	28,47	1522	4,48	-	2,3,6-trimetil-naftaleno; 1,6,7-trimetil-naftaleno
	12	28,71	1528	2,94	-	2,3,6-trimetil-naftaleno; 1,6,7-trimetil-naftaleno
	13	29,27	1543	2,35	-	2,3,6-trimetil-naftaleno; 1,6,7-trimetil-naftaleno
	14	29,46	1548	4,03	-	1,4,6-trimetil-naftaleno; 2,3,6-trimetil-naftaleno
	15	30,83	1583	1,99	1573	1,6,7-trimetil-naftaleno
	16	34	1667	0,94	-	-
	17	34,73	1687	1,32	-	-
	18	36,27	1730	1,39	-	-
	1	3,75	-	7,04	-	2,4-hexadien-1-ol; 2-metileno-ciclopentanol
	<b>2</b>	<b>3,9</b>	-	<b>16,25</b>	-	<b>1,3,5-hexatrieno; 2,4-hexadien-1-ol</b>
	3	4,38	-	3,21	-	-
	4	4,59	-	4,95	-	5-metil-3-hexen-2-ona; 3-metil-4-hexen-2-ona
<b>56</b>	<b>5</b>	<b>4,7</b>	902	<b>12,05</b>	<b>907</b>	<b>2-metil-2-ciclopeten-1-ona</b>
	6	6,12	955	8,51	-	2-metil-2-ciclopeten-1-ona; 3-heptino
	<b>7</b>	<b>6,2</b>	958	<b>25,75</b>	-	<b>2-pentanona; 3-metil-2-butanona</b>
	8	25,99	1460	4,17	-	2,4-hexadien-1-ol; 2,2-dimetil-3,4-pentadien-1-ol
	9	27,25	1491	3,64	-	5-metil-2-hexino; 2,4-hexadien-

						1-ol
	10	29,46	1548	9,87	-	4-metil-2,3-hexadien-1-ol; 2,4-hexadien-1-ol
	11	31,4	1597	4,56	-	-
57	1	3,75	-	1,78	-	2,4-hexadien-1-ol; 1-ciclohexenol
	2	3,89	-	3,83	-	2,4-hexadien-1-ol; 1,3,5-hexatrieno
	3	4,38	-	1,44	-	-
	4	4,46	-	1,47	-	-
	5	4,69	902	2,24	895	ciclohexanona
	6	5,71	940	0,99	-	-
	7	5,78	942	0,96	-	-
	8	5,93	948	1,08	-	-
	9	6,11	955	3,93	-	3-metil-2-ciclopenten-1-ona; 2-metil-2-ciclopenten-1-ona
	10	6,2	958	4,5	-	2-pentanona; 3-metil-2-butanona
	11	6,43	966	1,4	-	4-metil-4-penten-2-ona; 3-hexeno-2,5-diol
	12	7,36	1001	2,68	-	-
	13	7,55	1006	5,13	-	3,4-heptadieno; 2,4-hexadien-1-ol
	14	8,19	1024	9,97	-	2,4-hexadien-1-ol; 1,2-ciclononadieno
	15	16,73	1240	1,41	-	-
	16	18,99	1292	2,83	-	2,3-dimetil-1,4-pentadieno; 5-metil-1,4-hexadieno
	17	19,61	1307	6,09	-	-
	18	20,89	1337	1,43	-	-
	19	23,88	1408	4,85	-	-
	20	24,18	1416	4,2	1416	1,3-dimetil-naftaleno
	21	24,34	1420	2,47	1422	1,3-dimetil-naftaleno
	22	28,47	1522	2,92	-	4,6,8-trimetil-naftaleno; 2,3,6-trimetil-naftaleno
	23	28,72	1529	2	-	4,6,8-trimetil-azuleno; 2,3,6-trimetil-naftaleno
	24	29,27	1543	1,68	-	-
	25	29,46	1548	2,48	-	2,4,6-trimetil-azuleno; 1,6,7-trimetil-naftaleno
	26	30,84	1583	0,95	-	-
58	1	3,76	-	2,58	-	2,5,-dimetil-2,5-diidro-furano; 1-ciclohexenol; 2,3-dimetil-2-penteno
	2	3,9	-	4,4	-	2,4-hexadien-1-ol; 1,3-ciclohexadieno
	3	4,7	902	4,95	-	2-metil-ciclopenten-1-ona; 2,4-dimetil-furano
	4	6,21	958	9,31	-	3-metil-2-butanona; 5-metil-2-hexanona
	5	24,19	1416	6,84	-	2,3-dimetil-naftaleno; 1,5-dimetil-naftaleno
	6	24,37	1420	3,22	1428	1,5-dimetil-naftaleno
	7	26,85	1481	12,06	-	-

	8	27,24	1491	7,65	-	-
	9	28,48	1522	6,37	-	1,6,7-trimetil-naftaleno; 2,4,6-trimetil-azuleno
	10	28,72	1529	4,31	-	1,6,7-trimetil-naftaleno; 2,3,6-trimetil-naftaleno
	11	29,28	1543	3,93	-	1,4,6-trimetil-naftaleno; 2,3,5-trimetil-naftaleno
	12	29,47	1548	6,22	-	1,6,7-trimetil-naftaleno; 2,3,5-trimetil-naftaleno
	13	31,38	1597	8,38	-	-
	14	31,52	1601	2,89	-	7,9-dimetil-hexadecano; 10-metil-eicosano; 2-metil-dodecano
	15	32,33	1622	2,52	-	-
	16	32,38	1624	2,7	-	-
<b>3p</b>	<b>1</b>	<b>31,08</b>	<b>1589</b>	<b>45,25</b>	<b>1585</b>	<b>globulol</b>
	2	32,88	1637	1,5	-	farnesol; <i>trans</i> -cariofileno
	<b>3</b>	<b>33,26</b>	<b>1647</b>	<b>10,43</b>	<b>1643</b>	<b>tau-muurolol</b>
	<b>4</b>	<b>33,68</b>	<b>1659</b>	<b>41,82</b>	<b>1657</b>	<b><math>\alpha</math>-bisabolol</b>
	5	34,19	1673	1	-	óxido de cariofileno
<b>OE</b>	1	6,72	977	1,71	-	-
	2	6,72	977	1,7	-	$\beta$ -ocimeno
	3	6,99	987	1,27	-	-
	4	8,88	1043	1,09	-	linalol; terpinoleno
	5	22,55	1377	1,51	1377	$\alpha$ -copaeno
	6	23,14	1391	1,52	1390	$\beta$ -cubebeno
	7	24,52	1424	18,9	1420	$\beta$ -cariofileno
	8	25,07	1438	1,23	-	-
	9	25,2	1441	2,34	1448	$\alpha$ -humuleno
	10	25,81	1456	2,42	1455	aromadendreno
	11	26,99	1485	10,47	1485	germacreno D
	12	27,18	1489	0,72	-	-
	13	27,63	1501	15,56	1500	biciclogermacreno
	14	28,17	1514	1,06	-	$\alpha$ -gurjuneno
	15	28,51	1523	6,57	1522	delta-cadineno
	16	30,7	1579	2,86	1577;1579	espatulenol; óxido de cariofileno
	17	30,79	1582	0,94	-	-
	18	31,09	1589	5,5	1592	viridiflorol
	19	31,37	1597	3,55	1594	viridiflorol
	20	31,72	1606	1,65	1603	rosifoliol
	21	32,57	1629	0,79	1623	cubenol
	22	33,11	1643	1,62	-	calareno; delta-cadineno
	23	33,21	1646	1,78	-	-
	24	33,68	1659	3,91	1656	$\alpha$ -cadinol

## APÊNDICE II - Cromatogramas das frações do OE obtidos por CG-DIC

