

ISABELA JACOB MORO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE ESPÉCIES
VEGETAIS EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS**

Araraquara

2013

ISABELA JACOB MORO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE ESPÉCIES
VEGETAIS EM LINHAGENS CELULARES HUMANAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista –
UNESP para obtenção do grau de Farmacêutica-
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

Araraquara

2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Junior e Rosângela, que em qualquer situação permanecem ao meu lado com muito cuidado e amor.

Ao meu irmão Bruno pelo companheirismo e ao meu sobrinho e afilhado Enzo por me motivar e inspirar com sua inocência e alegria.

À minha avó Helena e ao meu avô Antonio por todo bom exemplo ensinado.

AGRADECIMENTOS

À Deus por seu imensurável amor do qual decorre todas as bênçãos que derrama sobre mim e sobre os meus.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos pela orientação, confiança, paciência, compreensão, estímulo e amizade dirigidos a mim desde o início.

À Prof. Dra. Christianne Pienna Soares pela dedicação, carinho e orientação.

Aos assistentes acadêmicos Marcos Dang, Eduardo Santos e Caio Perego, respectivamente do Laboratório de Citologia e Biologia Celular e do Laboratório de Farmacognosia desta Instituição, pela prontidão com que sempre me auxiliaram.

Aos amigos Gabrielle, Josiane, Juliana, Felipe, Mauro, Thaís, Luis, Leda, Elaíse, Ana Carolina, Flávio, Juhan e tantos outros do Laboratório de Farmacognosia, Citologia e grupo Lapdesf.

Aos funcionários dos diversos setores da Faculdade e à todos os professores que contribuíram com minha formação acadêmica.

A toda minha família.

Aos amigos de graduação e de caminhada, especialmente Marina, Vanessa, Karenn e Fernando.

À FAPESP e ao CNPq pelas bolsas concedidas, à CAPES, à FUNDUNESP e ao Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP pelo financiamento deste trabalho.

Sumário

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Produtos naturais e terapias farmacológicas	11
1.2 <i>Byrsonima pachyphylla</i> A. Juss.	14
1.3 <i>Baccharis trimera</i> (Less). DC.	16
1.4 Câncer	20
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos gerais	24
2.2 Objetivos específicos	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Materiais e equipamentos	25
3.2 Fitoquímica: obtenção de extratos, óleo essencial, frações e substâncias purificadas a partir das espécies vegetais	27
3.2.1 <i>Byrsonima pachyphylla</i> A. Juss.	27
A produção do extrato metanólico e seu fracionamento foram realizados pelos alunos Giordano Costa e Juliana Bertoldi, do curso de Farmácia-Bioquímica desta Faculdade, durante o desenvolvimento de seus Trabalhos de Conclusão de Curso. Detalhes sobre estes métodos podem ser encontrados em COSTA (2010) e BERTOLDI (2012).	27
3.2.1.1 Coleta e preparo do material vegetal	27
3.2.1.2 Obtenção do extrato	28
3.2.1.3 Fracionamento do extrato metanólico	28
3.2.2 <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	28
3.2.2.1 Coleta e preparo do material vegetal	29
3.2.2.2 Obtenção dos extratos	29
3.2.2.3 Fracionamento do extrato acetato de etila por extração em fase sólida (EFS)	30
3.2.2.4 Fracionamento de EFSBt3 e 4 por cromatografia em coluna (CC) e purificação de componentes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa	30
3.2.2.5 Obtenção e análise do óleo essencial	31
3.3 Ensaio de citotoxicidade	32

3.3.1 Ensaio de sulforrodamina B (SRB).....	32
3.3.2 Montagem das placas	34
3.3.3 Forma de análise dos resultados.....	36
4 RESULTADOS	38
4.1 Fitoquímica.....	38
4.1.1 <i>B. pachyphylla</i>	38
4.1.2 <i>B. trimera</i>	39
4.1.2.1 Análise do óleo essencial por CG-EM	44
4.2. Citotoxicidade.....	46
4.2.1 <i>B. pachyphylla</i>	46
4.2.2 <i>B. trimera</i>	51
5 CONCLUSÕES.....	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

RESUMO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABRVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

Ao longo dos anos muitos avanços quanto ao estudo do câncer e ao desenvolvimento de agentes para terapia foram alcançados. Porém, ainda há carência de antineoplásicos e a grande diversidade dos produtos naturais os tornam uma alternativa na busca por produtos eficazes contra esta doença. Amparados pela consciência da importância em expandir o conhecimento a cerca dos produtos vegetais para buscar possíveis agentes terapêuticos ou avaliar os riscos de aumentar a incidência da moléstia, foram estudadas, com relação à citotoxicidade duas espécies vegetais nativas do Brasil: *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. (Malpighiaceae) e *Baccharis trimera* (Less.) DC (Asteraceae). A primeira apresenta potencial químico e farmacológico pouco estudado, enquanto que a outra é uma espécie de amplo uso tradicional. Para *B. pachyphylla* foi avaliada a atividade citotóxica do extrato metanólico das folhas, bem como de suas frações aquosa, acetato de etila e n-butanólica, nas linhagens celulares HepG2 (hepatocarcinoma), SiHa (câncer cervical infectado por HPV-16), C33A (câncer cervical) e MRC-5 (fibroblasto humano). Para *B. trimera* foram realizados ensaios com os extratos etanólico 95% e acetato de etila das partes aéreas, e a fração EFSBt3 (obtida por extração em fase sólida) nas linhagens HepG2, SiHa, C33-A e MRC5. A fração 148 (oriunda de EFSBt3) e o óleo essencial foram avaliados em HepG2, SiHa, C33-A. As substâncias purificadas tiveram sua citotoxicidade avaliada com ensaios em HepG2 e MRC-5. Foi observada citotoxicidade com significância estatística nos ensaios com *B. pachyphylla* apenas com a fração aquosa, quando testada em C33A, no entanto, resultados com extrato metanólico em MRC5 e sua fração butanólica em MRC5 e SiHa sugeriram uma atividade proliferativa. Com relação aos ensaios envolvendo *B. trimera*, observou-se atividade citotóxica, à exceção dos testes com as substâncias purificadas, em todas as amostras e com diferentes intensidades.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: <i>Byrsonima pachyphylla</i> A. Juss	16
Figura 2: <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC	20
Figura 3: Desenho esquemático da placa I de 96 poços contendo a disposição dos controles, células e amostras teste.	35
Figura 4: Desenho esquemático da placa II de 96 poços contendo a disposição dos controles, células e amostras teste.	36
Figura 5: Cromatoplaça do extrato metanólico e das frações acetato de etila e n-butanólica.	38
Figura 6: Cromatoplaça das frações EFS do extrato acetato de etila de <i>B. trimera</i> .	40
Figura 7: Cromatoplaças das frações da CC2.	41
Figura 8: Cromatograma do extrato acetato de <i>Baccharis trimera</i> e espectro no UV do pico principal.	42
Figura 9: Cromatograma da fração 148 em 350 nm.	42
Figura 10: Cromatograma da fração 148 em 254 nm.	43
Figura 11: Cromatograma da fração 148 em 210 nm.	43
Figura 12: Cromatograma e estrutura química da substância purificada 3',5-diidrox-4',6,7-trimetoxiflavona (eupatorina).	44
Figura 13: Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de <i>B. trimera</i> (Less) DC. obtido em CG-EM	46
Figura 14: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HepG2, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o extrato bruto e frações de <i>Byrsonima pachyphylla</i> .	47
Figura 15: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem SiHa, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o extrato bruto e frações de <i>Byrsonima pachyphylla</i> .	48
Figura 16: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem C33A, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o extrato bruto e frações de <i>Byrsonima pachyphylla</i> .	49
Figura 17: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem MRC5, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o extrato bruto e frações de <i>Byrsonima pachyphylla</i> .	50
Figura 18: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HepG2, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com os extratos acetato de etila (EAcBt), etanólico 95% (EEtBt95) e fração EFSBt3 de <i>B. trimera</i> .	52
Figura 19: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem SiHa, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com os extratos acetato de etila (EAcBt), etanólico 95% (EEtBt95) e fração EFSBt3 de <i>B. trimera</i> .	53
Figura 20: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem MRC5, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com os	

extratos acetato de etila (EAcBt), etanólico 95% (EEtBt95) e fração EFSBt3 de <i>B. trimera</i>	54
Figura 21: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem C33A, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com os extratos acetato de etila (EAcBt), etanólico 95% (EEtBt95) e fração EFSBt3 de <i>B. trimera</i>	55
Figura 22: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HepG2, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o óleo essencial, fração 148 e eupatorina de <i>B. trimera</i>	57
Figura 23: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem SiHa, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o óleo essencial e a fração 148 de <i>B. trimera</i>	58
Figura 24: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem C33A, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o óleo essencial e a fração 148 de <i>B. trimera</i>	59
Figura 25: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem MRC5, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com a eupatorina.	60
Figura 26: Representação gráfica dos valores de CI_{20} atingidos em diferentes linhagens e as respectivas substâncias responsáveis	62
Figura 27: Representação gráfica dos valores de CI_{50} atingidos em diferentes linhagens e as respectivas substâncias responsáveis.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Extração em fase sólida do extrato acetato de etila de <i>B. trimera</i> : eluentes e massas (g) das frações	39
Tabela 2: Dados obtidos das análises por CG-EM do óleo essencial de <i>Baccharis trimera</i> (LESS) DC	45
Tabela 3: Efeito citotóxico das amostras testes de <i>Baccharis trimera</i> nas diferentes linhagens celulares. Concentração suficiente para inviabilizar 20% das células (CI ₂₀) expressa em µg/mL ± <i>erro padrão</i>	61
Tabela 4: Efeito citotóxico das amostras testes de <i>Baccharis trimera</i> nas diferentes linhagens celulares. Concentração suficiente para inviabilizar 50% das células (CI ₅₀) expressa em µg/mL ± <i>erro padrão</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD - cromatografia em camada delgada

CC - cromatografia em coluna

EFS – extração em fase sólida

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE – DAD - cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

CG - EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

PVDF - fluoreto polivinilideno

RMN – ressonância magnética nuclear

t_R – tempo de retenção

V_{eluyente} – volume de eluente

V_{inj} – volume de injeção

UV – ultravioleta

DX – doxorubicina

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

DM – dimetilssulfóxido

CN - controle negativo

SRB - sulforrodamina B

HepG2 – hepatocarcinoma humano

SiHa - carcinoma cervical humano infectado por HPV-16

C33A – carcinoma cervical humano

MRC-5 – fibroblastos normais de pulmão humano

1 INTRODUÇÃO

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.

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, 2007). 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.

O presente estudo avaliou as atividades citotóxicas de duas espécies vegetais nativas do Brasil: *B. pachyphylla*, que possui potencial químico e farmacológico pouco explorado, e *B. trimera*, cujo uso tradicional é deveras amplo.

1.1 Produtos naturais e terapias farmacológicas

Há muito tempo substâncias oriundas de produtos naturais são opções para o tratamento de diversas doenças. 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).

Com relação aos produtos de origem vegetal, grande parcela da população mundial residente nos países em desenvolvimento é bastante dependente deles para os cuidados primários de saúde. Nos países desenvolvidos, mais de 25% da população utiliza fármacos que foram diretamente extraídos das plantas (MANS et al., 2000).

Não obstante, estima-se que 42% dos novos fármacos lançados no mundo entre janeiro de 1981 e junho de 2006 eram produtos naturais (moléculas pequenas) e seus derivados ou, ainda, foram inspirados em produtos naturais como modelos. Portanto, grande parte do faturamento da indústria farmacêutica advém de medicamentos originados de plantas e outros organismos (NEWMAN, CRAGG, 2007). Paradoxalmente aos altos lucros obtidos pelo mercado, considerável parte da população é privada do acesso a estes produtos modernos e, como alternativa, faz uso tradicional das plantas medicinais (LIMA et al., 2008).

Como exemplo do sucesso de produtos de origem vegetal na terapêutica, podemos citar os glicosídeos cardiotônicos digitoxina e digoxina, encontradas em certas espécies de *Digitalis* e alcaloides como a morfina, derivada de *Papaver somniferum* L., a partir da qual foram desenvolvidos outros medicamentos como a codeína (antitussígeno), petidina (analgésico) e o haloperidol (antipsicótico). De *Cinchona calisaya* Weddell se obteve 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, e outros compostos (BARREIRO, 1990).

Alcaloides isolados da vinca, destinados ao tratamento de linfoma de Hodgkin, 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* e *P. emodii* utilizadas no tratamento de melanomas e outros (etoposídeo), demonstram o prestígio das espécies vegetais como fonte para a descoberta de compostos que tenham a habilidade de impedir, reverter ou prevenir o processo carcinogênico (SONG et al., 1999; SPORN et al., 2000; BRANDÃO et al., 2010).

A literatura científica traz dados experimentais envolvendo óleos essenciais de diversas espécies e o perfil citotóxico deles, o que pode ilustrar o potencial terapêutico de seus componentes. Como exemplo temos o óleo essencial de *Artemisia indica* Willd que, quando avaliada sua citotoxicidade em relação a linhagens de leucemia, câncer de pulmão, de fígado e colo, demonstrou inibição do crescimento celular dependente da concentração (RASHID, et. al.; 2013). O óleo essencial de *Xylopiia laevigata* (Mart.) R. E. Fries, usada popularmente no Nordeste do Brasil, mostrou-se citotóxico em linhagens tumorais no estudo *in vitro*, além de ter inibido cânceres malignos quando no estudo *in vivo*

(QUINTANS, et. al.; 2013). Quanto ao óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, um estudo recente mostrou um marcante efeito quimiopreventivo sobre metástase em pulmão quando injetadas células de melanoma (MANJAMALAI, et al.; 2013). Outros exemplos são o óleo essencial das folhas de *Annona sylvatica* que inibiu o crescimento de linhagens celulares tumorais (FORMAGIO, et al.; 2013), o óleo extraído das folhas de *Machilus mushaensis*, bem como o de *Beilschmiedia erythrophloia* que exibiram atividade contra células cancerígenas de fígado, boca, pulmão, colo, melanoma e leucemia (SU, et. al.; 2013a; SU, et. al.; 2013b) e o óleo essencial de *Cunninghamia lanceolata* var. Konishii que, por sua vez, foi citotóxico contra células de câncer de pulmão, boca e fígado (SU, et al. 2013c).

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 (JUNIOR et al., 2005).

1.2 *Byrsonima pachyphyla* A. Juss.

Byrsonima é um dos 71 gêneros pertencentes à família Malpighiaceae e inclui 150 das cerca de 1.250 espécies pertencentes à família. Aproximadamente metade das espécies de *Byrsonima* são encontradas no Brasil distribuídas em diversas regiões, sendo popularmente chamadas “muricis” e diferenciadas por suas áreas de ocorrência e cores de seus órgãos, recebendo, assim, denominações populares específicas e variadas. Há uma gama de diferentes usos de cada espécie, dentre os quais estão ornamentação e matéria-prima para construção civil (GUILHON-SIMPLICIO, PEREIRA, 2011). Existe um considerável

consumo sob a forma de alimentos como bebidas e doces (LIMA et al., 2008), além da apreciação dos frutos *in natura* de espécies como *Byrsonima crassifolia* e *Byrsonima verbascifolia* (VALLILO et al., 2007). Há diversos e variados usos etnofarmacológicos: tratamento de infecções na pele e febre (CASTILLO-AVILA et al., 2009), gastrites, úlceras gástricas e pépticas, antidiarreico (CARDOSO et al., 2006) e vários outros. Dentre muitas atividades farmacológicas avaliadas para espécies de *Byrsonima*, investigações comprovaram, por exemplo, ação antifúngica e antibacteriana (MICHELIN et al., 2008; MARTINEZ-VÁZQUEZ et al., 1999), antimicobacteriana (HIGUCHI et al., 2008), antiprotozoária para formas promastigotas de *Leishmania mexicana* (PERAZA-SÁNCHEZ et al., 2007), antioxidante (CASTILLO-AVILA et al., 2009), imunoestimuladora (BONACORSI et al., 2009), anti-hiperglicêmica e anti-hiperlipidêmica (PEREZ-GUTIERREZ et al., 2010), moluscicida, (GUILHON-SIMPLICIO, PEREIRA, 2011), anti-inflamatória (MALDINI et al., 2009), espasmogênica (MARTINEZ-VÁZQUEZ et al., 1999), anti-ulcerogênica e antidiarreica (LIMA et al., 2008), efeitos no sistema nervoso central (CIFLUENTES et al., 2001.), atividade antimutagênica (MENDANHA et al., 2010), antiproliferativa (GUILHON-SIMPLÍCIO, PEREIRA, 2011) e mutagênica (CARDOSO et al., 2006; SANNOMIYA, CARDOSO, 2007).

Quimicamente, o gênero *Byrsonima* apresenta, entre outros metabólitos secundários, flavanonas, flavonois, catequinas, proantocianidinas, biflavonoides, triterpenos, ácido gálico e derivados de ácido quínico e ácido gálico (GUILHON-SIMPLÍCIO, PEREIRA, 2011; GEISS et al., 1994; MALDINI et al., 2011; GORDON et al., 2011; SANNOMIYA, CARDOSO, 2007; SANNOMIYA et al., 2004; VALLILO et al., 2007). Além disso, foram isoladas de algumas espécies substâncias pouco

comuns como triterpenos esterificados com ácidos graxos, e naftoquinonas e catequinas pouco conhecidas (AGUIAR et al., 2005).

Costa (2010) sugeriu a presença de derivados do ácido gálico, catequinas e flavonoides no extrato metanólico bruto das folhas de *B. pachyphylla*. Além disso, o trabalho demonstrou a atividade bacteriostática do extrato metanólico bruto e de sua fração acetato de etila em *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, da fração aquosa em *P. aeruginosa* e da fração butanólica em *P. aeruginosa* e *S. aureus*. As frações acetato de etila e butanólica apresentaram atividade bactericida, sendo a primeira em *B. subtilis* e *S. aureus* e a segunda apenas em *S. aureus*.



Figura 1: *Byrsonima pachyphylla* A. Juss

Disponível em: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=5013

1.3 *Baccharis trimera* (Less). DC

Baccharis trimera (Less.) DC. 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, dioicismo, 50-80 cm de altura e conhecida popularmente como carqueja, carqueja-amargosa, carqueja-do-mato, carquejinha, sendo nativa do sul e sudeste do Brasil (LORENZI; MATOS, 2002).

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; SIMÕES-PIRES et al., 2005a; SUTTISRI et al., 1994); diterpenos, principalmente do tipo clerodânico (GIANELLO et al., 2000; HERZ et al., 1977; JANUÁRIO et al., 2004; KUROYANAGI et al., 1985); 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).

Durante vários anos acreditou-se que os tricotecenos fossem metabólitos sintetizados somente por fungos. No entanto, pesquisas de Verdi e outros pesquisadores colaboradores (2005), demonstraram que algumas espécies do gênero *Baccharis* biossintetizavam este composto. Tricotecenos são epóxidos sesquiterpenoides com vasta atividade biológica e que possuem potencial importância no desenvolvimento de produtos contra o câncer (GROVEY, 2007).

B. trimera não mostrou atividade mutagênica quando foi investigado o produto de infusões de cladódios 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 dependente de dose em células vegetais e humanas. Quando em menor dose, causou aumento de anomalias no ciclo mitótico das células da raiz de *Allium cepa*, 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, 2010).

Foi observado efeito antigenotóxico 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 trabalho de

Nakasugi e Komai (1998) demonstrou a atividade antimutagênica do extrato metanólico das partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less.) DC.

Estudos mostram que o extrato metanólico de *B. trimera* agiu inibindo a lipase pancreática, que é responsável pela hidrólise dos triacilgliceróis da dieta culminando em sua absorção, de modo a reduzir o peso corpóreo e o colesterol sérico (UNIVERSIDADE FEDERAL LAVRAS, 2012), além de ter inibido α -glicosidase e β -glicosidase, que também fora inibida pelo produto de infusão da planta (SOUZA et al., 2011). Observou-se também que seus extratos apresentaram alto potencial antioxidante e atividade anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 2012a). Outro estudo mostra que o extrato aquoso, apesar do efeito citotóxico na concentração testada, provocou a inibição da proliferação de linfócitos T (PAUL et al., 2009). Já o extrato hidroetanólico foi capaz de inibir a liberação de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (PADUA et al., 2010) e, quando administrado a ratas grávidas, revelou-se tóxico para as células dos rins e fígado maternos, tendo sido revertidas tais alterações após cessar o tratamento (GRANCE et al., 2008). Pesquisas *in vivo* demonstraram que o extrato aquoso de *Baccharis trimera* possui constituintes capazes de inibirem a via histaminérgica reguladora da secreção de ácidos e da bomba de prótons gástrica, o que pode justificar o uso popular para o alívio das úlceras (BIONDO et al., 2011). Além disso, observou-se atividade relaxante do músculo vascular liso por ação de diterpenos clerodânicos (TORRES et al., 2000).

Com relação ao óleo essencial, a literatura relata que o mesmo mostrou atividade inibitória sobre a diferenciação de células neuronais *in vitro* e redução da sobrevivência destas células, além da diminuição na proliferação de células

gliais (LOSQUI et al., 2009). Foi observada também atividade esquistossomicida, tendo ocorrido diminuição da motilidade dos parasitos além de mortalidade dos mesmos (OLIVEIRA et al.; 2012b).



Figura 2: *Baccharis trimera* (Less.) DC

Disponível em:

<http://www.dbi.ufms.br/pos/baixar.php?arquivo=dissertacoes/Jaqueline%20Cabral%20Vilas%20Boas.pdf>

1.4 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). O aumento na incidência de cânceres é atribuído a interação de fatores externos, como hábitos, costumes, estilo de vida e meio ambiente, e fatores internos como a pré-disposição genética (FEUER et al., 2000).

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).

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 (BRASIL, 2003). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa para 2012, também válida para 2013, é 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 será o de mama enquanto que, entre os homens, será 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).

Células neoplásicas distinguem-se de células normais pela proliferação descontrolada, desdiferenciação 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. Metástases são tumores originados a partir de células liberadas do tumor inicial e que atingiram outros locais pelos vasos sanguíneos ou linfáticos. 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. 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).

Produtos derivados de plantas são capazes de exercerem efeitos citotóxicos, e atualmente há exemplos que integram o arsenal de fármacos de combate ao câncer. Os alcaloides da vinca, derivados de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, cujos principais membros são vincristina, vinblastina e vindesina, ligam-se à tubulina e inibem a polimerização em microtúbulos, impedindo a formação do fuso mitótico nas células em divisão, além de inibirem outras atividades relacionadas aos microtúbulos. Paclitaxel e docetaxel, taxanos derivados de substância de *Taxus spp*, estabilizam os microtúbulos no estado polimerizado. Irinotecano e topotecano (campotecinas), isolados de *Camptotheca acuminata*, ligam-se à topoisomerase I inibindo-a e interferindo no ciclo celular. A inibição da função mitocondrial e da síntese de DNA por ação da topoisomerase II

caracterizam a atividade do etoposídeo, derivado da raiz de *Podophyllum peltatum* L. (RANG, et al. 2011).

Ao longo dos anos muitos avanços quanto ao estudo do câncer e ao desenvolvimento de agentes para terapia contra o câncer foram alcançados. Porém, ainda há carência de antineoplásicos e a grande diversidade dos produtos naturais os tornam uma alternativa na busca por produtos eficazes contra esta doença (MANS et al., 2000). A notoriedade deste trabalho está evidenciada pela importância de investigar possíveis agentes de combate à incidente doença neoplásica, através do estudo de espécies vegetais pouco exploradas quanto a esta ação e nativas do Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a atividade citotóxica de derivados vegetais de folhas de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. e de partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less.) DC., bem como de suas frações ou substâncias purificadas em linhagens de células humanas tumorais e normal, utilizando a estratégia do *Fracionamento Biomonitorado*.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade citotóxica do extrato metanólico de folhas de *B. pachyphylla* e dos extratos etanólico 95% e acetato de etila de *B. trimera* nas linhagens tumorais HepG2 (hepatocarcinoma humano), SiHa (câncer cervical infectado com HPV16) e C33a (câncer cervical), além da linhagem de células normais MRC5 (fibroblastos normais de pulmão humano).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos

- Balança semi-analítica: GEHAKA[®] modelo BG 200 (máx 200g; min 0,025g; d = 0,001g).
- Balança analítica: MARTE[®] modelo AY220 (Max 220g; min 0,01; d=0,001).
- Aparelho tipo Clevenger para hidrodestilação.
- Colunas cromatográficas de bancada: coluna de vidro com 1,2 cm de diâmetro interno com adaptador para entrada para ar comprimido; coluna de vidro com 10,5 cm de diâmetro interno adaptado a sistema de sucção ("vácuo"); coluna de vidro com 3 cm de diâmetro interno com adaptador para entrada para ar comprimido; coluna de vidro com 5 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: DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).
- Cartucho para *clean-up*: Phenomenex[®] modelo Strata[™] C18 - E (15 x 10 mm; 55 µm).
- Cromatografia em camada delgada comparativa: Sílica Gel 60G aplicada em placas de vidro de 20 X 20 cm obtendo-se 0,25 mm de espessura. Após preparo, as placas foram ativadas por 1h em estufa a 110° C.
- Cromatografia em camada delgada preparativa: Sílica Gel 60G aplicada em placa de vidro de 20 X 20 cm obtendo-se 1 mm de espessura. Após preparo, as placas foram ativadas por 1h em estufa a 110° C.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu[®] Prominence[®], modo analítico), constituído dos seguintes módulos: bomba modelo LC-20AT, injetor automático modelo SIL-20, forno de coluna modelo CTO-20A,

detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A, módulo de comunicação modelo CBM-20A, desgaseificador modelo DGU-20A5. *Software* para controle do sistema e aquisição e tratamento de dados LCSolution[®].

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu[®], modo analítico), constituído dos seguintes módulos: bomba modelo LC-10AD, detector UV-VIS modelo SPD-10A, módulo de comunicação modelo SCL-10A, desgaseificador modelo DGU-14A. *Software* para controle do sistema e aquisição e tratamento de dados ClassVP[®].
- Cromatógrafo à Gás: Shimadzu[®] modelo QP2010.
- Estufa de secagem e esterilização: FANEM[®] modelo 320-SE.
- Lâmpada UV: MineraLight[®] modelo UVSL-25.
- UV/Vis: Beckman DV 530, Life Science.
- 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[®];
- Rota evaporador: IKA-DEST[®] modelo KV 05S3, com banho de aquecimento QUIMIS[®], banho ultratermostatizado (refrigeração) QUIMIS[®] modelo Q214M3;
- Solventes:
 CCD, CC, EFS: Qhemis[®] P.A;
 CLAE (incluindo pré-tratamento das amostras): Solventes grau cromatográfico J.T. Baker[®];
 Água ultrapura: obtida a partir de purificador Milli Q modelo Synergy[®];
- Ultrassom: UNIQUE[®], modelo USC-2800; frequência: 40KHz .

- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear: Espectrômetro Varian® INOVA 7,0 T operando a 300 MHz para ^1H e a 75 MHz para ^{13}C .
- Folin-ciocalteau – Reagente analítico IMBRALAB®.
- Peagâmetro: MARCONI® modelo MAPA200, série 081390709.
- Balança analítica: SARTORIUS® modelo TE2145 (Max 210g; min 0,01g)
- Capela: QUIMIS® modelo Q-216-11.
- Estufa bacteriológica: MARCONI® MA 032
- Solventes: grau PA Qhemis®.
- Microscópio óptico: Olympus® modelo CKX41SF.
- Bancada de fluxo laminar vertical: PACHANE® nº 03505 modelo 050.
- Incubadora de CO_2 : TECNAL® modelo TE-399.

3.2 Fitoquímica: obtenção de extratos, óleo essencial, frações e substâncias purificadas a partir das espécies vegetais

3.2.1 *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.

A produção do extrato metanólico e seu fracionamento foram realizados pelos alunos Giordano Costa e Juliana Bertoldi, do curso de Farmácia-Bioquímica desta Faculdade, durante o desenvolvimento de seus Trabalhos de Conclusão de Curso. Detalhes sobre estes métodos podem ser encontrados em COSTA (2010) e BERTOLDI (2012).

3.2.1.1 Coleta e preparo do material vegetal

O espécime vegetal utilizado neste experimento encontra-se no Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista. A exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica, SPF-IB/USP, sob o registro *B. pachyphylla*, Costa s.n., nº 195628. A secagem do material vegetal foi feita a 40°

C em estufa com circulação de ar por 5 dias. O material vegetal seco foi moído em moinho de facas.

3.2.1.2 Obtenção do extrato

A extração foi realizada por percolação com metanol por 24 h. A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo e, em seguida, seca sob fluxo de ar em capela e, finalmente, em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida, obtendo-se assim o extrato seco.

3.2.1.3 Fracionamento do extrato metanólico

O extrato metanólico seco de *B. pachyphylla* (10,006 g) foi solubilizado em uma mistura de 500 mL de água deionizada e 70 mL de metanol e transferido para um funil de separação. Neste foram adicionados 500 mL de acetato de etila. A fase acetato de etila foi recolhida em erlenmeyer e a fase aquosa foi extraída mais duas vezes com 300 mL de acetato de etila em cada etapa. A fase aquosa resultante das extrações anteriores foi extraída com 3 porções de n-butanol, sendo 2 porções de 300 mL cada e 1 porção de 220 mL.

As fases n-butanólica e aquosa foram secas em capela à temperatura ambiente em recipiente de grande superfície de contato. Já a fase acetato de etila foi concentrada em rotaevaporador a 45° C. As 3 frações foram ainda secas em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida e após armazenadas em geladeira.

3.2.2 *Baccharis trimera* (Less.) DC.

As etapas de obtenção do extrato de *B. trimera* e seu fracionamento foram realizadas pela então aluna de mestrado Josiane Clarice Claudino que desenvolveu o projeto intitulado “*Baccharis trimera* (Less) DC. estudo fitoquímico e avaliação da citotoxicidade com sulforrodamina B”, também sob orientação de

André Gonzaga dos Santos. A seguir são descritos de forma resumida os métodos relativos ao trabalho Fitoquímico realizado com *B. trimera*; informações detalhadas podem ser encontradas em CLAUDINO (2013).

3.2.2.1 Coleta e preparo do material vegetal

O material vegetal foi coletado no horto de Plantas Medicinais e Tóxicas “Profa. Dra. Célia Cebrian de Araújo Reais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP. A secagem do material se deu a 40° C em estufa com circulação de ar por 7 dias, sendo o material vegetal seco moído em moinho de facas.

3.2.2.2 Obtenção dos extratos

A extração com etanol 95% foi realizada através do método de maceração à temperatura ambiente e sob agitação ocasional, em 3 etapas de 72 h cada. A massa de droga vegetal utilizada foi de 100,0 g e o volume total de solvente (dividido nas 3 etapas de extração) foi de 1.500 mL. Após cada etapa, a solução extrativa sobrenadante foi separada do material vegetal por filtração simples (papel de filtro), concentrada em rota-evaporador sob pressão reduzida (530-540 atm) a 45° C e seca em capela sob fluxo de ar. Para a extração com acetato de etila foi realizada maceração com aquecimento a 35° C, agitação ocasional e renovação do líquido extrator. Inicialmente foram pesados aproximadamente 500 g de droga vegetal que foi intumescida com 1000 mL de acetato de etila. A seguir a mesma quantidade de acetato de etila foi adicionada e teve início o processo de extração. O procedimento foi repetido por três vezes (1000 mL por 24 h cada) e as soluções extrativas obtidas foram reunidas. Procedeu-se à filtração em papel de filtro e, posteriormente, a solução extrativa foi concentrada em rota-evaporador sob pressão reduzida.

Previamente ao fracionamento e aos ensaios de citotoxicidade, os extratos acetato de etila e etanólico foram secos em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida por cerca de 48 h.

3.2.2.3 Fracionamento do extrato acetato de etila por extração em fase sólida (EFS)

As condições estabelecidas para a EFS 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 μm , 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.

3.2.2.4 Fracionamento de EFSBt3 e 4 por cromatografia em coluna (CC) e purificação de componentes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa

As frações EFSBt3 e 4 foram selecionadas para fracionamento devido aos resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade com EFSBt3. Utilizou-se uma coluna de vidro de 5 cm de diâmetro interno, preenchida com 20 cm de sílica gel (0,040-0,063 mm). Foram adicionados 1.061,2 mg de EFSBt3 e 2.079,4 mg de EFSBt4. A eluição (V_{eluente} : 1000 mL) foi realizada no modo gradiente com hexano/ acetato de etila/ isopropanol 98:02:00 a (EFSBt3)70:28:02, seguido de hexano/acetato de etila 50:50, acetato de etila e metanol. Todas as frações obtidas por 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. As frações obtidas foram solubilizadas em acetato de etila

(5 mg/mL) e submetidas à análise por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando uma série de eluentes e reveladores químicos. As condições cromatográficas gerais foram: sílica Gel 60G (20 x 20 cm x 0,25 mm); ativação: 110°C por 1 h.

Tanto o extrato quanto todas as frações foram analisados por CLAE-DAD para obter o perfil cromatográfico do extrato de *Baccharis trimera* e das suas respectivas frações. O pré-tratamento dos extratos e frações incluiu uma EFS com sílica de fase reversa C18 usando como eluente metanol/água (95:05 v/v, 5,0 mL), seguida de filtração em membrana (0,22 µm, PVDF), secagem e solubilização em metanol (1 mg/mL). Para análises por CLAE-DAD foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu Prominence com uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), gradiente linear de 40-100% metanol/água (v/v) em 40 min, mais metanol por 7 min, com vazão de 0,7 mL/min, $V_{inj} = 20 \mu\text{L}$ à 35° C e faixa de detecção entre 200-700 nm.

3.2.2.5 Obtenção e análise do óleo essencial

Para obtenção do óleo essencial, a coleta de *B. trimera* se deu no período da manhã. O óleo essencial foi obtido através da técnica por arraste a vapor de água com utilização de um aparelho do tipo Clevenger. Foram utilizadas 100 g de partes aéreas de *B. trimera* em 500 mL de água deionizada e o tempo de extração foi de 4 h. O óleo essencial foi retirado do aparelho do tipo Clevenger com hexano que posteriormente foi filtrado com Na₂SO₄ anidro para retirar a água residual. Após evaporação do solvente à temperatura ambiente, foi realizada a pesagem e calculado o rendimento do óleo essencial que foi armazenado sob refrigeração.

A identificação de substâncias no óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). As análises foram desenvolvidas no CG-EM Shimadzu® modelo QP2010 utilizando coluna DB-5 (30 m x 0,26 mm; 0,25 µm). A programação de temperatura foi de 60 a 246 °C/min. Como gás de arraste usou-se He a uma velocidade linear de 1,017 mL/min. O detector utilizado nas análises foi o espectrômetro de massas, com modo de ionização por impacto eletrônico, com energia de ionização de 70 eV. Os espectros de massa obtidos foram comparados com os espectros da biblioteca NIST e os índices de similaridade entre os espectros foram calculados pelo *software* LCSolution. Para identificação das substâncias do óleo essencial de *B. trimera* foi calculado o índice de Kovats, a partir dos tempos de retenção dos analitos e dos padrões de hidrocarbonetos (C9 a C20), que foram comparados com a literatura (ADAMS, 2007). Os padrões de hidrocarbonetos foram analisados sob as mesmas condições da amostra.

3.3 Ensaio de citotoxicidade

Um grande desafio tem sido elucidar os componentes ativos existentes nas espécies vegetais, bem como seus mecanismos de ação. Sistemas de ensaios simples, reprodutíveis e sensíveis para o estudo da atividade biológica de plantas devem ser selecionados. Estes podem envolver organismos inferiores, alvos moleculares e culturas de células animais ou humanas. Na avaliação da atividade antitumoral *in vitro*, a atividade citotóxica dos agentes em culturas de células pode ser estabelecida por métodos que avaliam as variações da morfologia, inibição do metabolismo e a medida da viabilidade celular, à exemplo do ensaio de sulforrodamina B (MACIEL et al, 2002).

3.3.1 Ensaio de sulforrodamina B (SRB)

O ensaio de sulforrodamina B é um método rápido, sensível e barato para medir o conteúdo de proteína celular de culturas aderentes ou em suspensão em placas de 96-poços. Para cada linhagem celular foram realizados três experimentos independentes, de três dias cada.

No primeiro dia (pré-incubação), após a retirada do meio de cultivo da garrafa, foi realizada lavagem com solução de Hanks e posteriormente as células foram tripsinizadas com solução de Trypsin-EDTA que desprende as células devido a sua atividade proteolítica sobre as proteínas intercelulares. O conteúdo foi transferido para um tubo Falcon e foi realizada neutralização da tripsina utilizando-se igual volume de meio suplementado com soro fetal. Todo o conteúdo do tubo foi centrifugado a 1.200 rpm durante 3 min. Posteriormente, o sobrenadante do tubo foi descartado e o pellet foi suspenso com meio suplementado com 10% de SFB. Foram colocados 10 µL da suspensão na câmara de Neubauer para a contagem da viabilidade celular através de microscópio invertido. Ocorreu a homogeneização da suspensão celular de modo a garantir a distribuição adequada de células nos poços. A concentração utilizada foi equivalente a $1,5 \times 10^4$ células/mL (meio enriquecido com soro fetal bovino, o qual complementa o meio de cultura fornecendo fatores de crescimento e nutrientes). As placas com as células (100 µL/poço) nas cinco primeiras linhas e com ausência de células nas últimas 3 linhas foram então pré-incubadas por 24 h à 37° C na estufa com 5% de CO₂.

No segundo dia, o meio metabolizado foi descartado e, em seguida, realizou-se o tratamento. Foram adicionados o meio com as amostras teste (extrato e frações solubilizadas em dimetilsulfóxido) e os controles.

No terceiro dia, em cada poço foram adicionados 50 µL de solução fixadora (ácido tricloroacético 50%, 4° C) sobre o meio de cultura e a placa foi incubada por 1 h a 4° C. Após esta etapa a placa foi lavada com água para remoção do ácido tricloroacético (TCA), proteínas do soro e metabólitos e então seca sob fluxo de ar. Posteriormente, 50 µL da solução de sulforrodamina B foram adicionados a cada poço da placa (ao abrigo da luz) e deixados em repouso à temperatura ambiente pelo tempo de 20 min. O corante foi descartado e a solução de lavagem (ácido acético 1%) adicionada diretamente nos poços da placa, tendo-se repetido este procedimento por 4 vezes. A secagem das placas foi realizada à temperatura ambiente. Em decorrência das condições levemente ácidas, SRB se ligou a resíduos de aminoácidos básicos em células fixadas com TCA. 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), sob leve agitação por aproximadamente 5 min. Em seguida houve a determinação da densidade óptica em leitor de placas a 570 nm.

3.3.2 Montagem das placas

A distribuição nas placas de controles e amostras testes seguiu os modelos abaixo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DX	DX	DX	DX	DX	DX	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	B	B	B
B	DM	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	B
C	DM	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	B
D	DM	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	B
E	DM	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	B
F	DM	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	B
G	DM	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	B
H	DM	B	B	B	B	B	DX	DX	DX	B	B	B

Legenda:

DX: Controle doxorrubicina (20 µg/mL); H₂O₂: Controle peróxido de hidrogênio (3 µL/mL); B: Controle do meio (DMEM e F10 enriquecidos com soro fetal bovino 10%); DM: Controle dimetilsulfóxido (0,5%); linha F até H: ausência de células. Coluna 2 a coluna 6, a partir da linha B até a linha G: amostra 1; Coluna 7 a coluna 11, a partir da linha B até a linha G: amostra 2. Concentrações utilizadas de amostras de *B. pachyphylla*: []_I: 200,00 µg/mL; []_{II}: 66,67 µg/mL; []_{III}: 22,2 µg/mL; []_{IV}: 7,4 µg/mL; []_V: 2,47 µg/mL. Concentrações utilizadas das amostras Fração 148, Óleo Essencial Substância 3 e Eupatorina, de *B. trimera*: []_I: 50,00 µg/mL; []_{II}: 16,60 µg/mL; []_{III}: 5,50 µg/mL; []_{IV}: 1,80 µg/mL; []_V: 0,61 µg/mL. Testes com: Extrato bruto, Fração aquosa, Fração n-butanólica e Fração acetato de etila, de *B. pachyphylla* em HepG2, SiHa, C33a; Fração 148 e Óleo Essencial (em HepG2, SiHa e C33a), Substância 3 e Eupatorina (em HepG2 e MRC-5), de *B. trimera*.

Figura 3: Desenho esquemático da placa I de 96 poços contendo a disposição dos controles, células e amostras teste.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	DM	DM
B	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	DM	DM
C	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	CN	CN
D	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	CN	CN
E	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	DX	DX	DX	DX	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂
F	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	DM	DM
G	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	DX	DX
H	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	[] _I	[] _{II}	[] _{III}	[] _{IV}	[] _V	B	B

Legenda: DX: Controle doxorrubicina (20 µg/mL); H₂O₂: Controle peróxido de hidrogênio (3 µL/mL); B: Controle do meio (DMEM e F10 enriquecidos com soro fetal bovino 10%); DM: Controle dimetilsulfóxido (0,5%); linha F até H: ausência de células. Coluna 2 a coluna 6, a partir da linha B até a linha G: amostra 1; Coluna 7 a coluna 11, a partir da linha B até a linha G: amostra 2. Concentrações utilizadas de amostras de *B. pachyphylla* e EAcBt, EFSBt3 e EEt95 de *B. trimera*: []_I: 200,00 µg/mL; []_{II}: 66,67 µg/mL; []_{III}: 22,2 µg/mL; []_{IV}: 7,4 µg/mL; []_V: 2,47 µg/mL. Testes para: Extrato bruto, Fração aquosa, Fração n-butanólica e Fração acetato de etila, de *B. pachyphylla* testadas em MRC-5; EAcBt, EFSBt3 e EEt95 de *B. trimera*, testadas em HepG2, SiHa, C33a e MRC-5

Figura 4: Desenho esquemático da placa II de 96 poços contendo a disposição dos controles, células e amostras teste.

3.3.3 Forma de análise dos resultados

Os cálculos das porcentagens de células vivas obtidas após os ensaios de citotoxicidade foram realizados calculando-se as médias das absorbâncias dos controles de branco (MAbsCB) e veículo (MAbsCN) e as médias das absorbâncias em cada concentração das amostras testes (MAbsT) 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 MAbsCN e MAbsCB, conforme a seguinte equação:

$$\% \text{ células vivas} = (\text{MAbsT} - \text{MAbsCB})/(\text{MAbsCN} - \text{MAbsCB})$$

Os resultados foram comparados através da análise de variância (ANOVA), que permite comparar três ou mais tratamentos, 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.

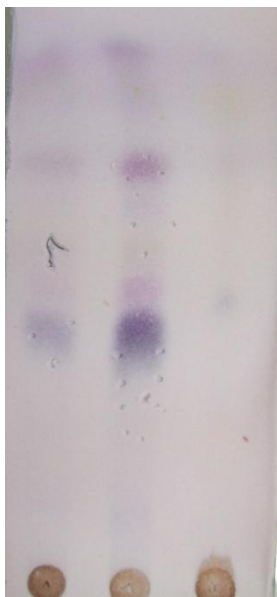
4 RESULTADOS

4.1 Fitoquímica

Os rendimentos (massa de extrato seco/massa de droga vegetal) dos extratos obtidos foram de 24% para o extrato metanólico de *B. pachyphylla*, 20% para o extrato etanólico 95 % de *B. trimera* e 35% para o extrato acetato de etila de *B. trimera*.

4.1.1 *B. pachyphylla*

O fracionamento do extrato metanólico de *B. pachyphylla* (10,0 g) por partição líquido-líquido resultou em 3 frações: acetato de etila – 3,31 g; butanólica 3,75 g; e aquosa 2,45 g. A análise por CCD das frações demonstrou que as mesmas possuem perfil químico distinto. Nas condições de análise apresentadas na Figura 5, a fração aquosa não eluiu.



Legenda: Amostras aplicadas nesta ordem da esquerda para a direita. Fase móvel: hexano: acetato de etila: isopropanol 70:28:2 (v/v). Revelação: anisaldeído sulfúrico.

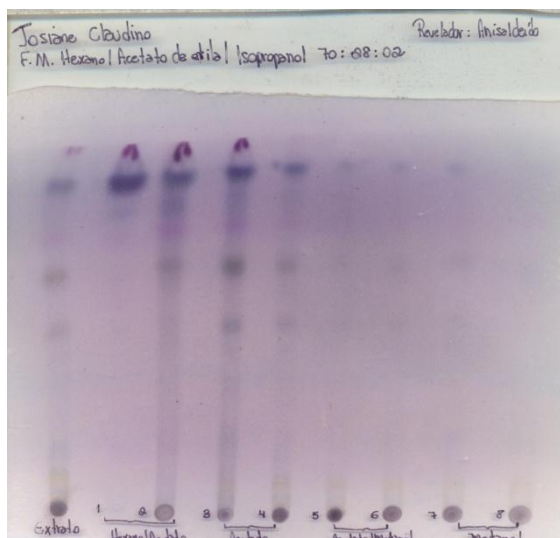
Figura 5: Cromatoplaça do extrato metanólico e das frações acetato de etila e n-butanólica.

4.1.2 *B. trimera*

Os resultados da EFS realizada com o extrato acetato de etila de *B. trimera* são apresentados na Tabela 1 e Figura 5. Observa-se na cromatoplaça que foram obtidas frações com composição química distinta, considerando-se cada eluente utilizado na EFS. Além da sugestão da presença de terpenos pelo uso de anisaldeído sulfúrico (Figura 5), a revelação com NP/PEG (365 nm) sugeriu a presença de flavonoides no ponto de aplicação das frações mais polares.

Tabela 1: Extração em fase sólida do extrato acetato de etila de *B. trimera*: eluentes e massas (g) das frações

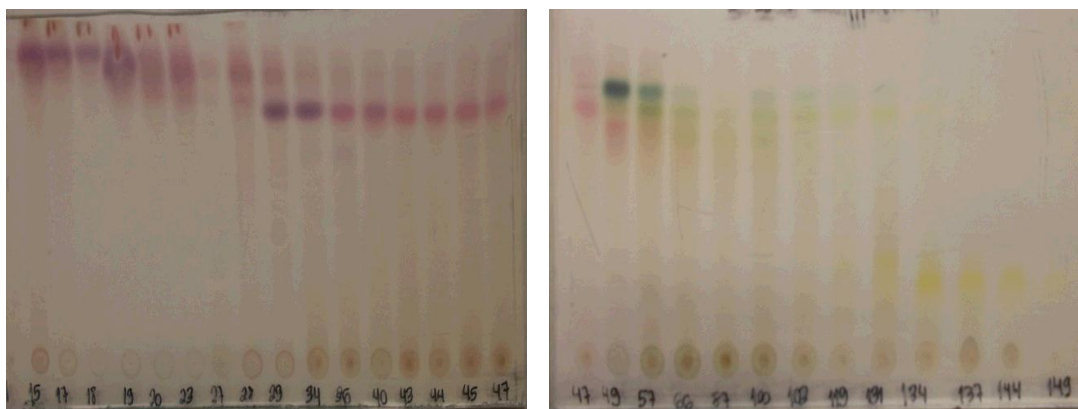
FRAÇÕES	ELUENTES	MASSA (g)
EFSBt1	Hex/AcOEt 95:05	0,0537
EFSBt2	Hex/AcOEt 95:05	0,1621
EFSBt3	AcOEt	1,7867
EFSBt4	AcOEt	7,4039
EFSBt5	AcOEt/MeOH 1:1	12,1335
EFSBt6	AcOEt/MeOH 1:1	2,2439
EFSBt7	MeOH	1,6473
EFSBt8	MeOH	3,1142
Total		28,5453



Fase móvel: hexano: acetato de etila: isopropanol 70:28:02 (v/v); revelador: anisaldeído sulfúrico; da esquerda para direita extrato acetato de etila, frações EFSBt1, EFSBt2, EFSBt3, EFSBt4, EFSBt5, EFSBt6, EFSBt7 e EFSBt8.

Figura 6: Cromatoplaça das frações EFS do extrato acetato de etila de *B. trimera*.

A partir da cromatografia em coluna realizada com as frações EFSBt3 e 4, foram obtidas 149 frações analisadas por CCD e reunidas em 31 frações. E essas 31 frações foram monitoradas por CCD para avaliar a separação e o perfil cromatográfico das amostras. Na cromatoplaça da figura 7 à direita, podemos observar que as frações 134 a 148 apresentam uma única mancha amarela, além de componentes retidos na origem, o que é menos pronunciado para a fração 148, indicando que está contém uma substância semipurificada (amostras aplicadas na mesma concentração e volume).



Fase estacionária: Sílica Gel; Fase móvel: Hex/AcOEt/ i-PrOH 60:35:05;
 Revelador: anisaldeído sulfúrico; Frações: 1 até 149.

Figura 7: Cromatoplaças das frações da CC2.

Os cromatogramas do extrato acetato de etila e da fração 148 (210, 254 e 350 nm) são apresentados nas figuras 8 a 11. A análise por CLAE também sugeriu que a fração 148 está semipurificada e que constitui-se da substância majoritária no extrato acetato de etila, considerando-se a análise de cromatogramas em diferentes comprimentos de onda (CLAE-DAD). Além disso, cabe ressaltar ainda que esta fração representa quase 30 % em massa do total aplicado de amostra na coluna.

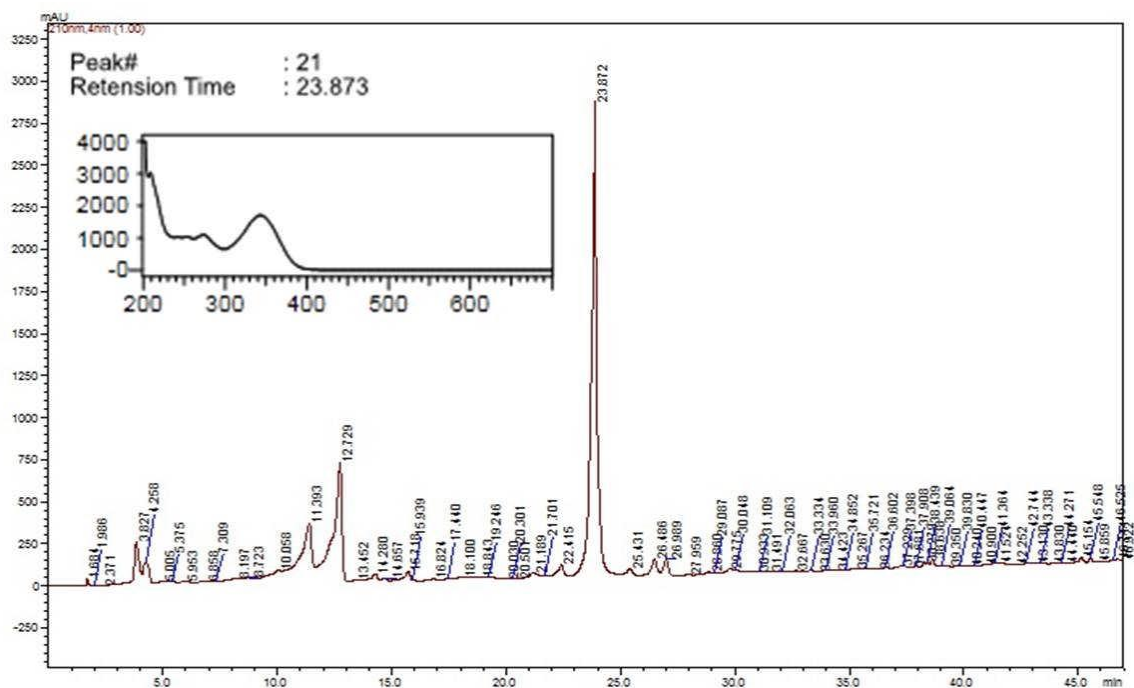


Figura 8: Cromatograma do extrato acetato de *Baccharis trimera* e espectro no UV do pico principal.

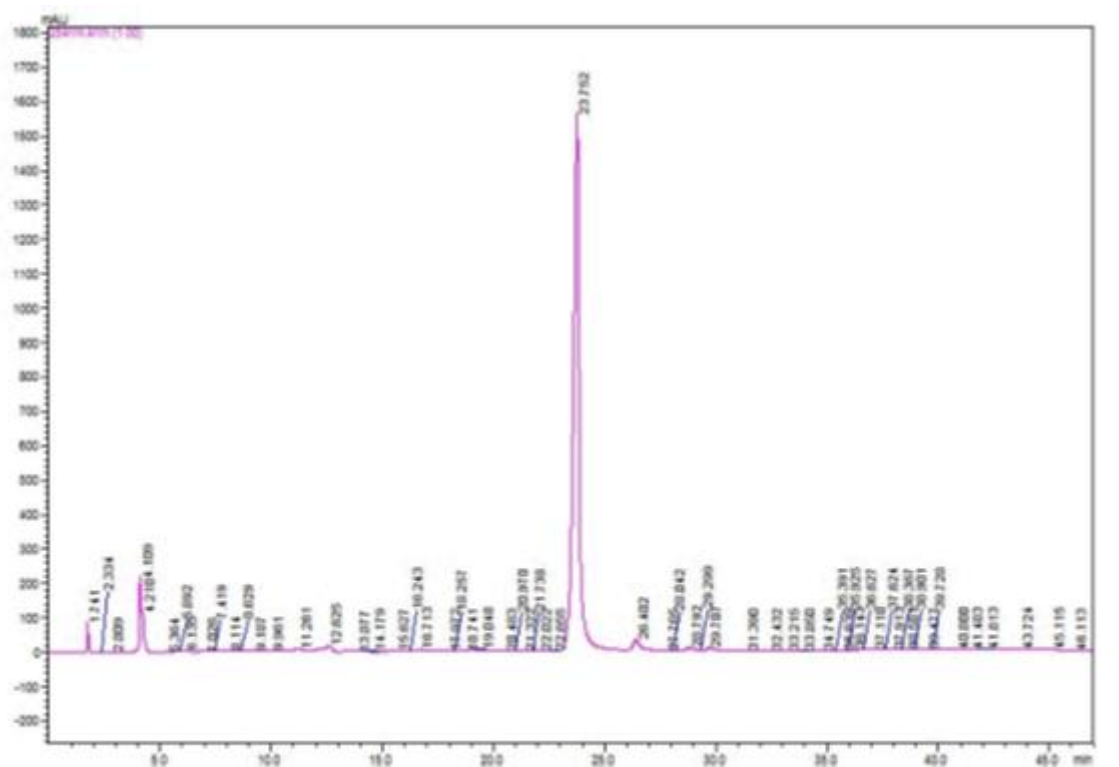


Figura 9: Cromatograma da fração 148 em 350 nm

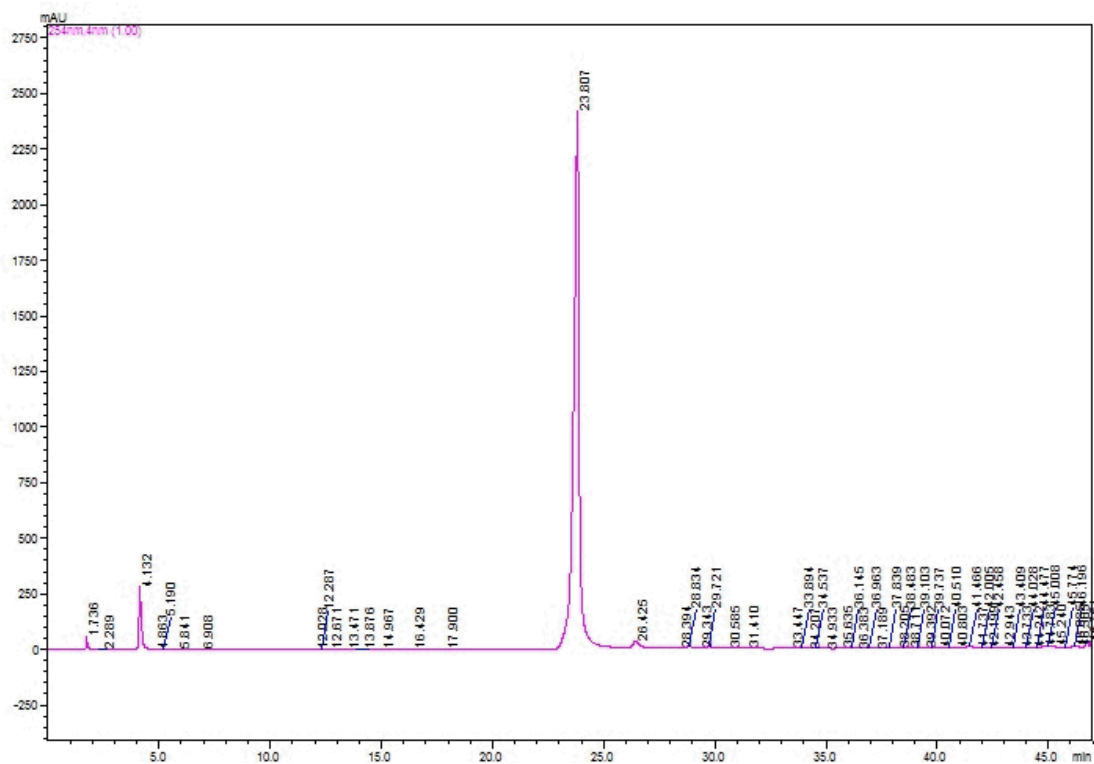


Figura 10: Cromatograma da fração 148 em 254 nm

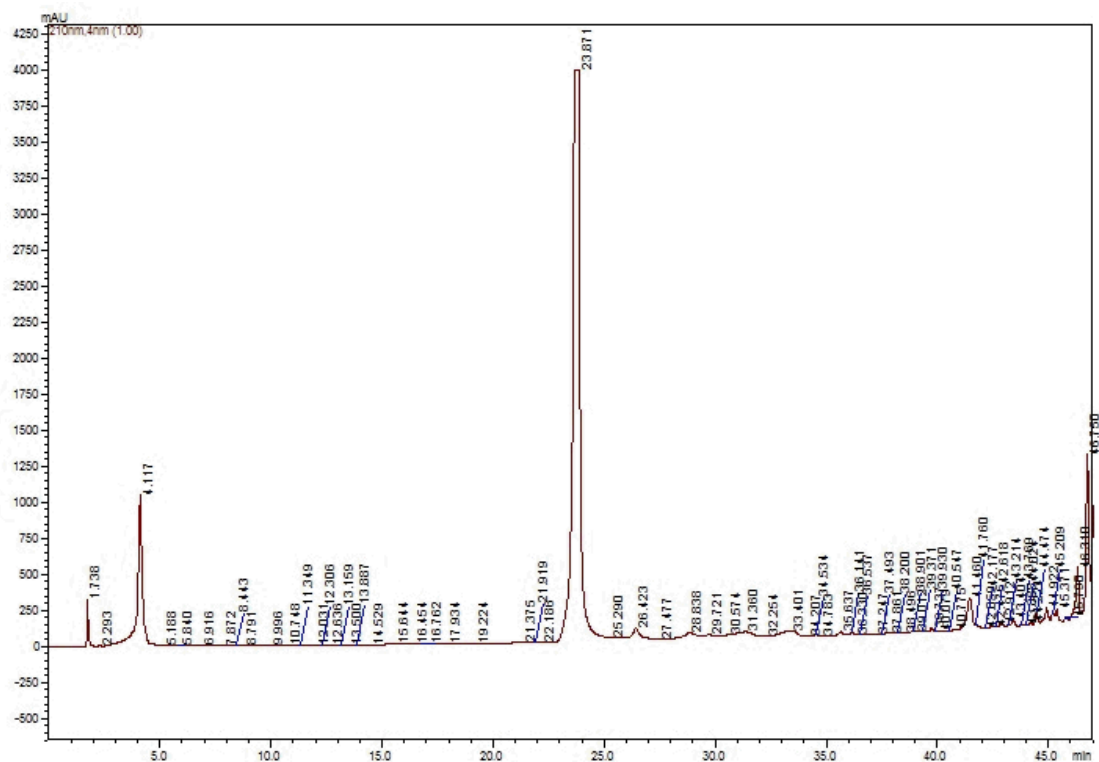


Figura 11: Cromatograma da fração 148 em 210 nm.

Ao ser analisado o cromatograma da subfração CC148 em 3 comprimentos de onda no UV (210, 254 e 350 nm), pode-se concluir que se trata de uma substância semipurificada. Esta subfração foi então submetida à purificação por CLAE utilizando cromatógrafo Shimadzu, utilizando uma coluna difenil (Varian® 250 x 4,6 mm; 5 µm), modo isocrático com metanol/água 64:36 (v/v) em 55 min com vazão de 0,4 mL/min, V_{inj} = 200 µL. A concentração da amostra injetada foi de 20 mg/mL.

O cromatograma da substância purificada encontra-se na Figura 12. Foram obtidos 14mg dessa substância que posteriormente foi identificada, por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , como eupatorina.

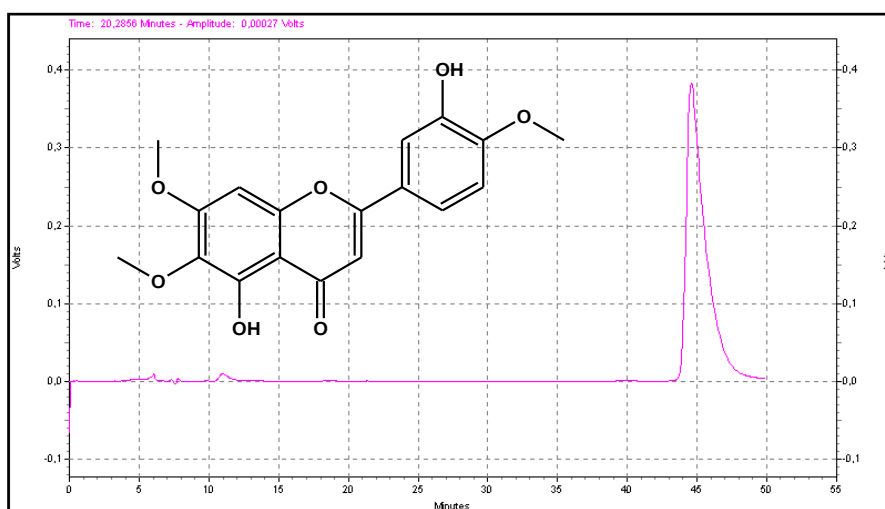


Figura 12: Cromatograma e estrutura química da substância purificada 3',5-diidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona (eupatorina).

4.1.2.1 Análise do óleo essencial por CG-EM

A análise por CG-EM (figura 13 e tabela 2) indicou predominância de sesquiterpenos no óleo essencial. Ao todo foram identificados 13 sesquiterpenos, dos quais 12 já foram identificados no óleo essencial do gênero *Baccharis* e das partes aéreas de *Baccharis trimera* (LAGOa, et al 2008; AGOSTINI, et al 2005;

SILVA, et al 2007). O **biciclogermacreno** apresentou 24,47% de teor relativo, seguido do **germacreno D** que apresentou 17,53% e o **E-cariofileno** que apresentou 14,08%.

Tabela 2: Dados obtidos das análises por CG-EM do óleo essencial de *Baccharis trimera* (LESS) DC

Substância identificada	t _r (min)	Índice de Kovats calculado	Índice de Kovats literatura ¹	Similaridade EM (%)	Teor relativo (%)
não identificado	21,16	-----	-----	-----	1,58
α -copaeno	22,67	1394	1374	90	0,38
não identificado	23,03	-----	-----	-----	0,38
β -elemeno	23,29	1411	1389	97	3,04
E-cariofileno	24,36	1439	1417	97	14,08
aromadendreno	25,06	1458	1458	95	1,43
α -humuleno	25,62	1473	1452	97	1,98
germacreno D	26,66	1501	1484	97	17,53
biciclogermacreno	27,26	1517	1500	94	24,47
não identificado	27,55	-----	-----	-----	0,70
delta cadineno	28,20	1543	1522	96	5,49
germacreno B	29,41	1576	1559	93	0,68
viridiflorol	29,78	1587	1592	86	1,24
espatulenol	30,16	1598	1577	86	2,38
não identificado	30,38	-----	-----	-----	7,72
não identificado	30,66	-----	-----	-----	3,80
torreiol	31,92	1649	1646	82	0,81
α -cadinol	32,40	1662	1652	85	2,41
não identificado	32,83	-----	-----	-----	4,67
não identificado	33,65	-----	-----	-----	0,82
não identificado	34,10	-----	-----	-----	3,35
não identificado	47,21	-----	-----	-----	1,07

¹valores obtidos de Adams (2007).

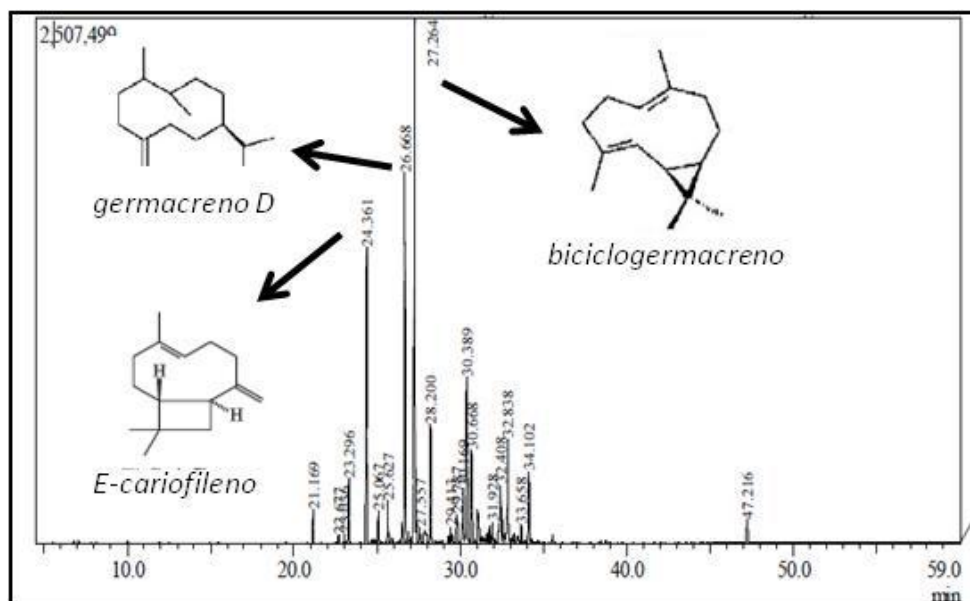


Figura 13: Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de *B. trimera* (Less) DC. obtido em CG-EM

4.2 Citotoxicidade

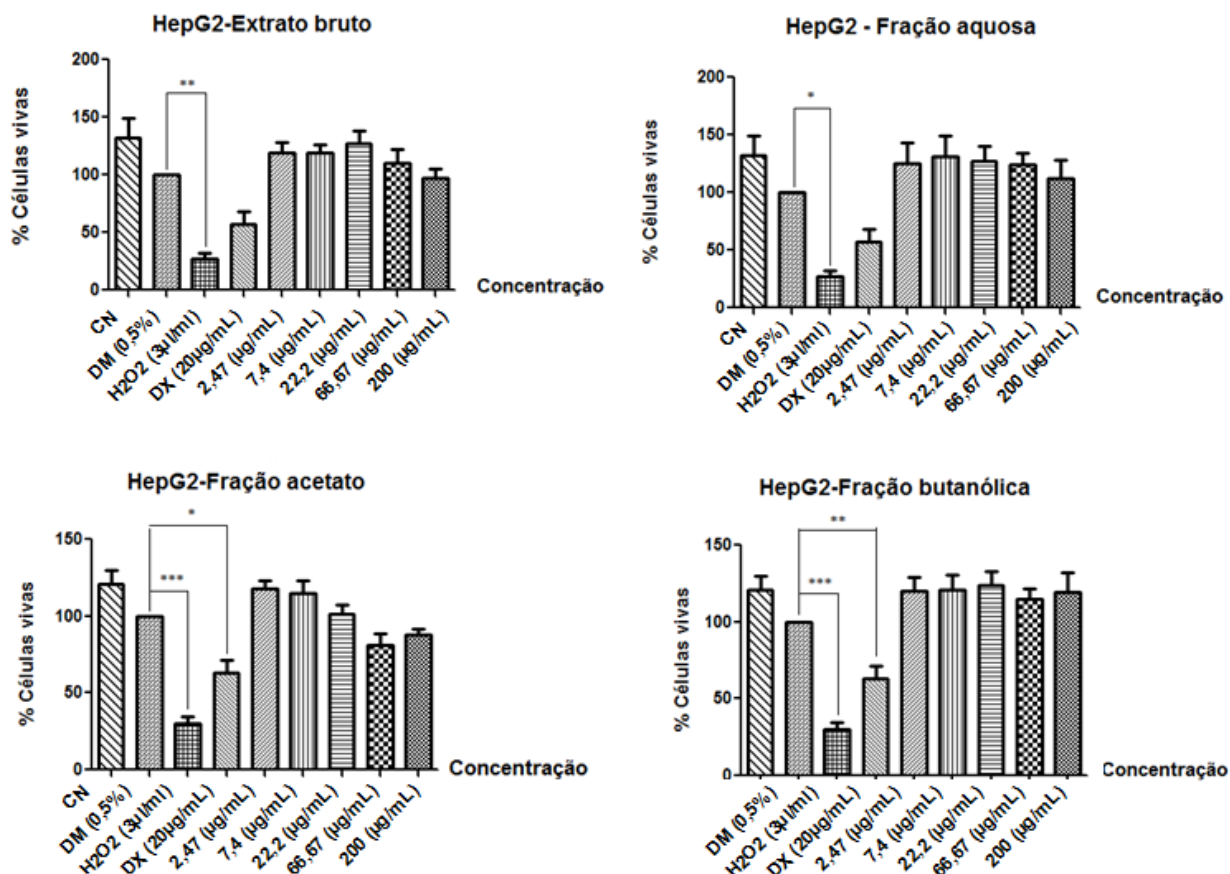
4.2.1 *B. pachyphylla*

O extrato metanólico de *B. pachyphylla* e suas frações foram testados nas concentrações de 200,00, 66,67, 22,2, 7,4 e 2,47 µg/mL. As concentrações dos controles positivos foram 20 µg/mL para doxorrubicina e 3 µL/mL para o peróxido de hidrogênio. A concentração do controle de veículo era 0,5% e para o controle do meio utilizou-se DMEM e F10 enriquecidos com soro fetal bovino 10%.

O ensaio de citotoxicidade foi baseado na coloração por SRB, estando o resultado expresso em porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de veículo (dimetilssulfóxido – DMSO). As amostras de *B. pachyphylla* não demonstraram atividade citotóxica considerável em nenhuma das concentrações testadas.

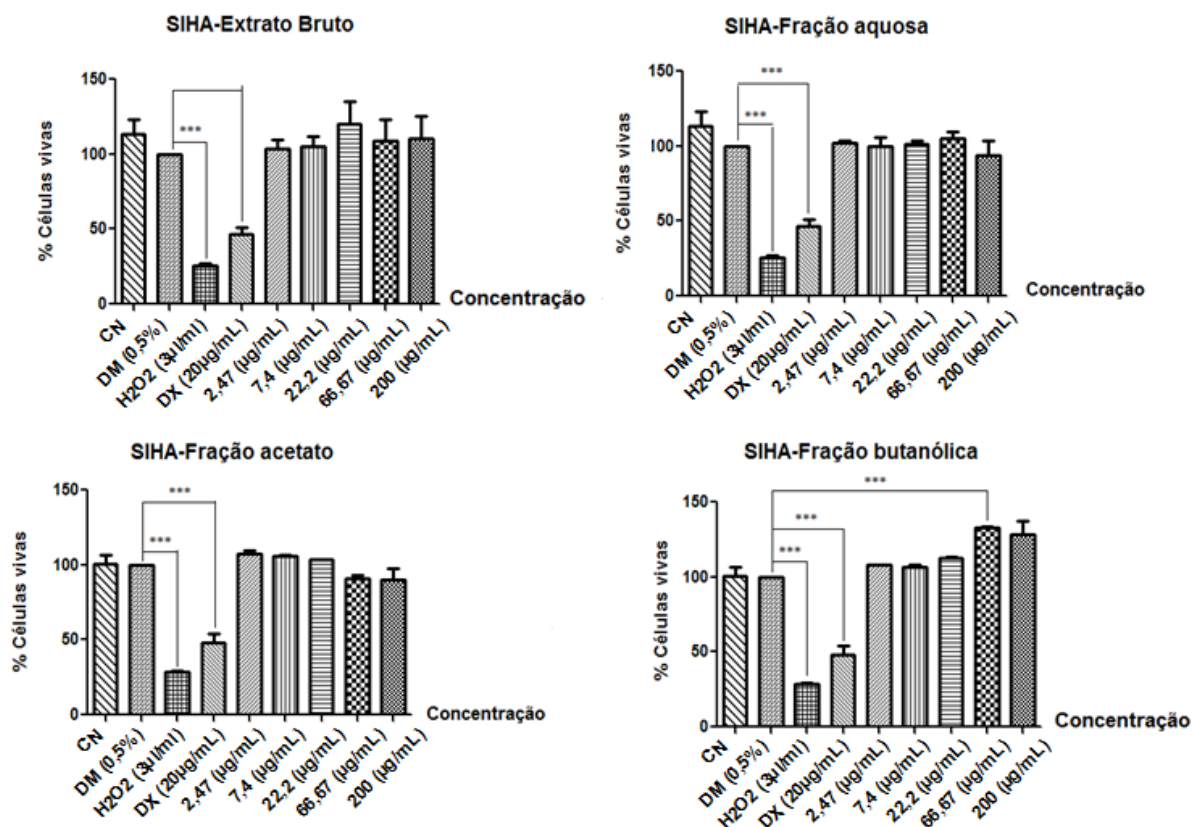
As Figuras 14, 15, 16 e 17 apresentam os gráficos da determinação da viabilidade celular (%) das amostras nas linhagens celulares testadas. O extrato

bruto e as frações apresentaram viabilidade celular abaixo do Cl_{20} , mostrando a baixa citotoxicidade dessas amostras.



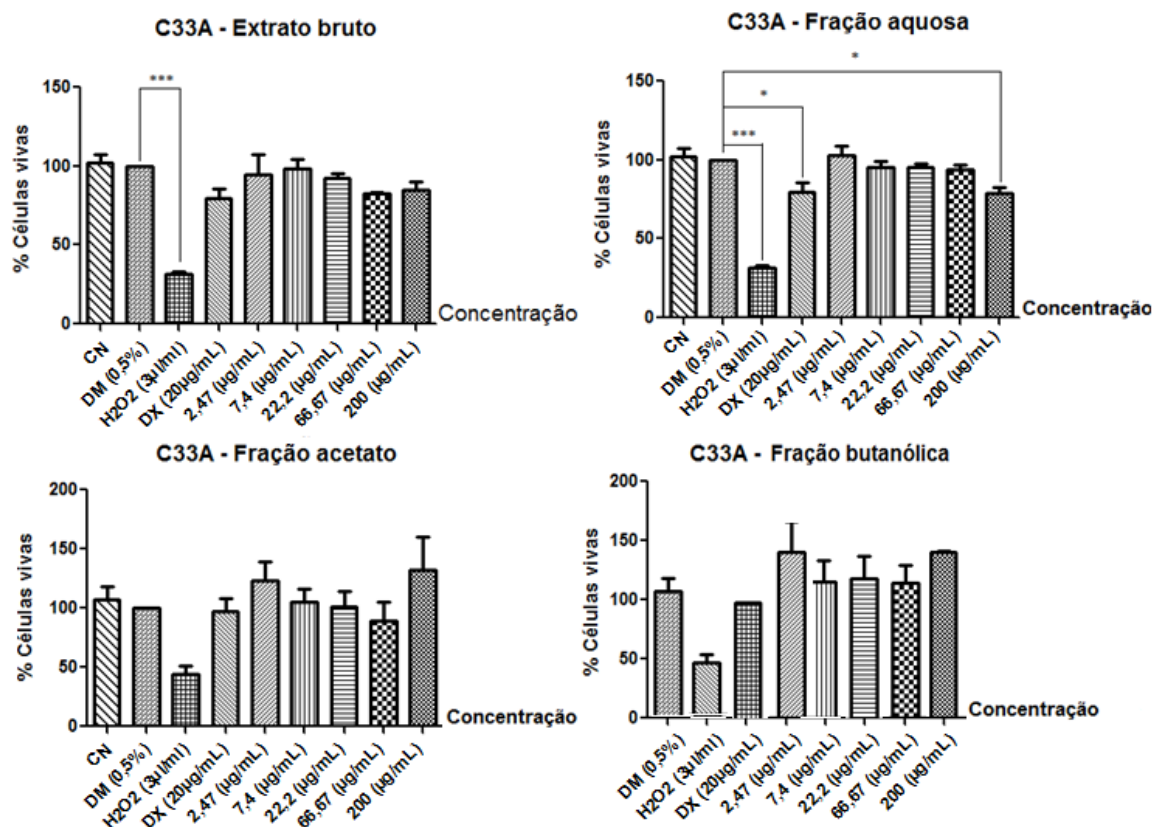
DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Figura 14: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HepG2, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o extrato bruto e frações de *Byrsonima pachyphylla*.



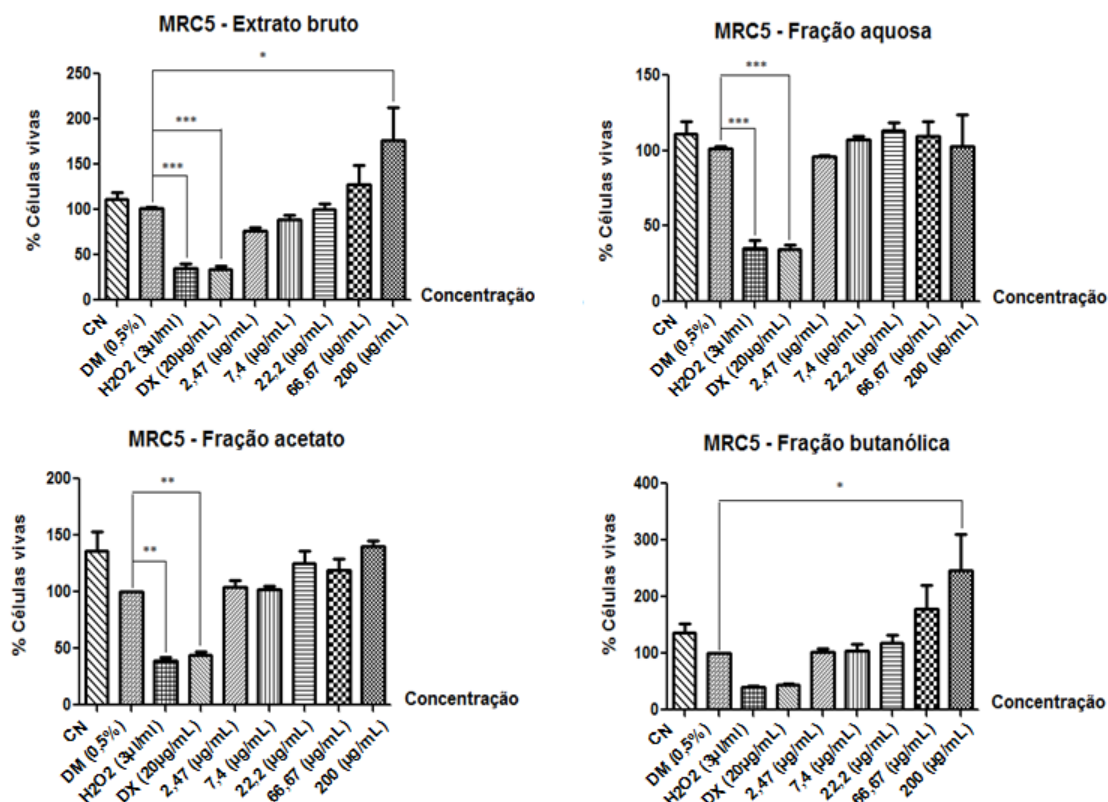
DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Figura 15: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem SiHa, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o extrato bruto e frações de *Byrsonima pachyphylla*.



DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Figura 16: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem C33A, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o extrato bruto e frações de *Byrsonima pachyphylla*.



DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) p<0,001; (**) p<0,01; (*) p<0,05.

Figura 17: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem MRC5, a partir de 3 experimentos independentes (média ± erro padrão-ep). Tratamento realizado com o extrato bruto e frações de *Byrsonima pachyphylla*.

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade com SRB obtidos para a linhagem MRC5 (fibroblastos normais de pulmão humano) demonstraram aumento considerável nas porcentagens de células vivas tratadas com o extrato bruto e a fração butanólica, na concentração de 200 μg/mL (Figura 17), sugerindo atividade proliferativa celular. O mesmo ocorreu quando foi realizado o tratamento com a fração butanólica na linhagem SIHA (figura 15).

Em C33A a fração aquosa de *B. pachyphylla* demonstrou citotoxicidade com significância estatística apenas na maior concentração testada.

4.2.2 *B. trimera*

A seguir são apresentados os resultados de citotoxicidade para *B. trimera*. O extratos EAcBt, EEtBt95 e a fração EFSBt3 foram testados nas concentrações de 200,00, 66,67, 22,2, 7,4 e 2,47 µg/mL. A fração 148, o óleo essencial e a eupatorina foram testadas nas concentrações de 50 µg/mL, 16,6 µg/mL, 5,5 µg/mL, 1,8 µg/mL e 0,61 µg/mL. Os controles positivos apresentavam as concentrações de 20 µg/mL para doxorrubicina e 3 µL/mL para o peróxido de hidrogênio. A concentração do controle de veículo era 0,5% e para o controle do meio utilizou-se DMEM e F10 enriquecidos com soro fetal bovino 10%.

DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) p<0,001; (**) p<0,01; (*) p<0,05.

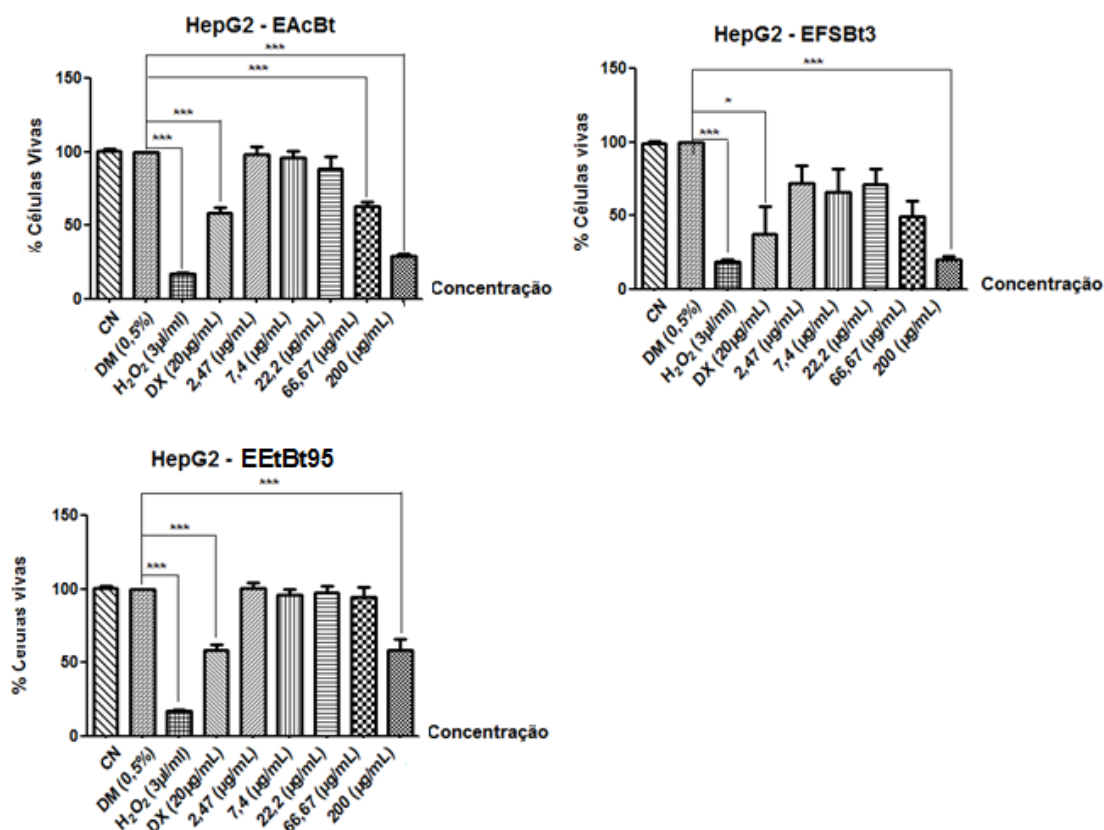
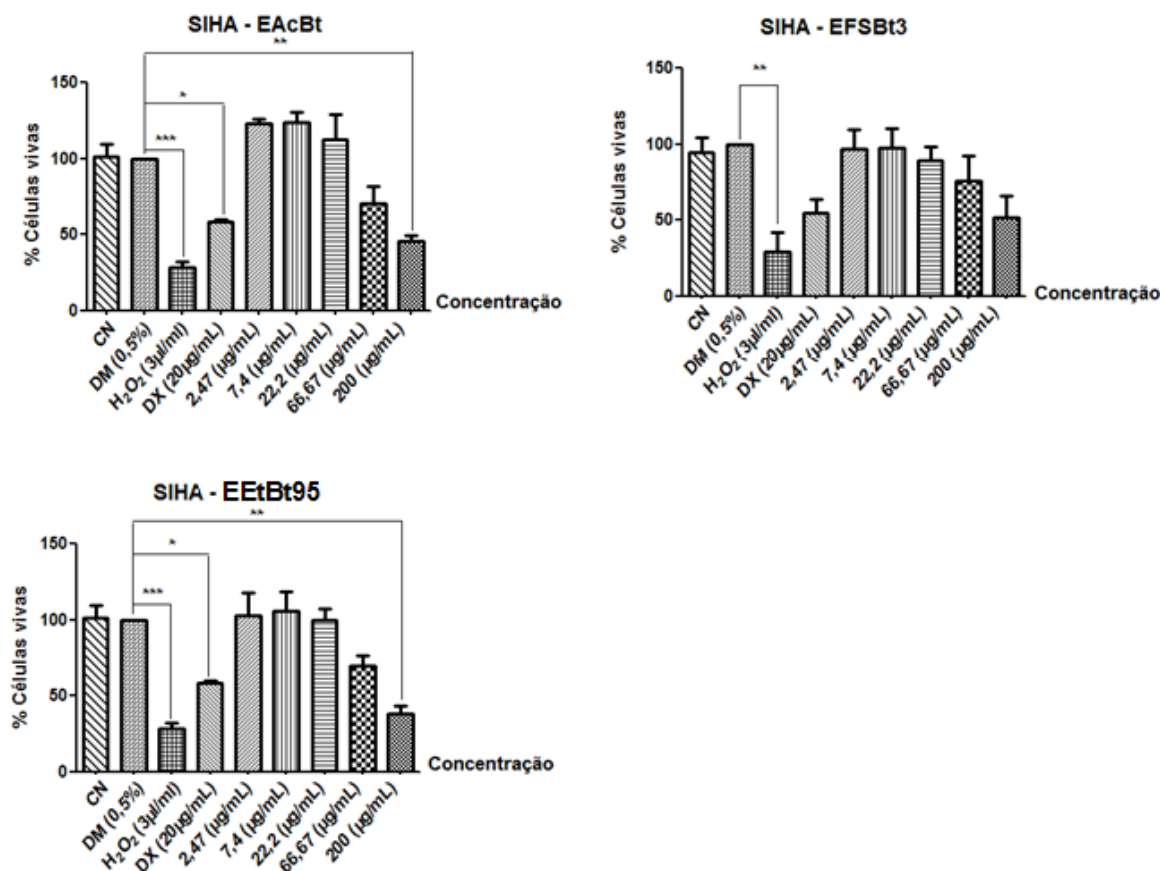
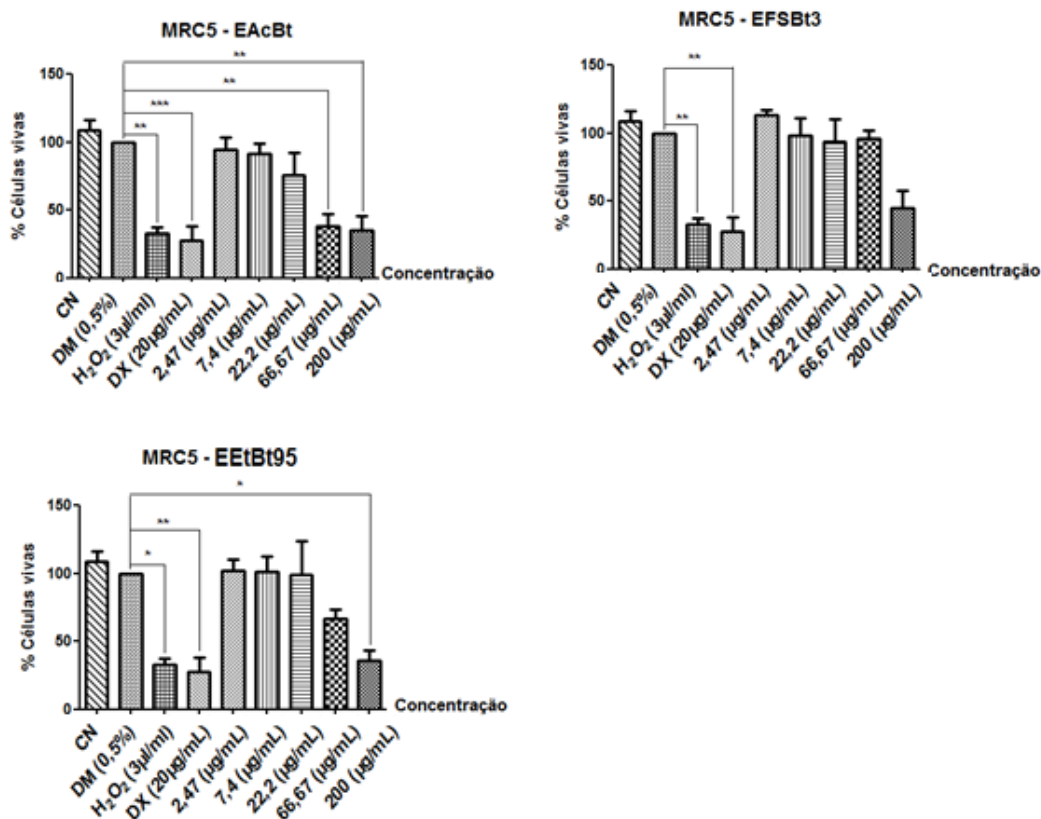


Figura 18: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HepG2, a partir de 3 experimentos independentes (média ± erro padrão-ep). Tratamento realizado com os extratos acetato de etila (EAcBt), etanólico 95% (EEtBt95) e fração EFSBt3 de *B. trimera*.



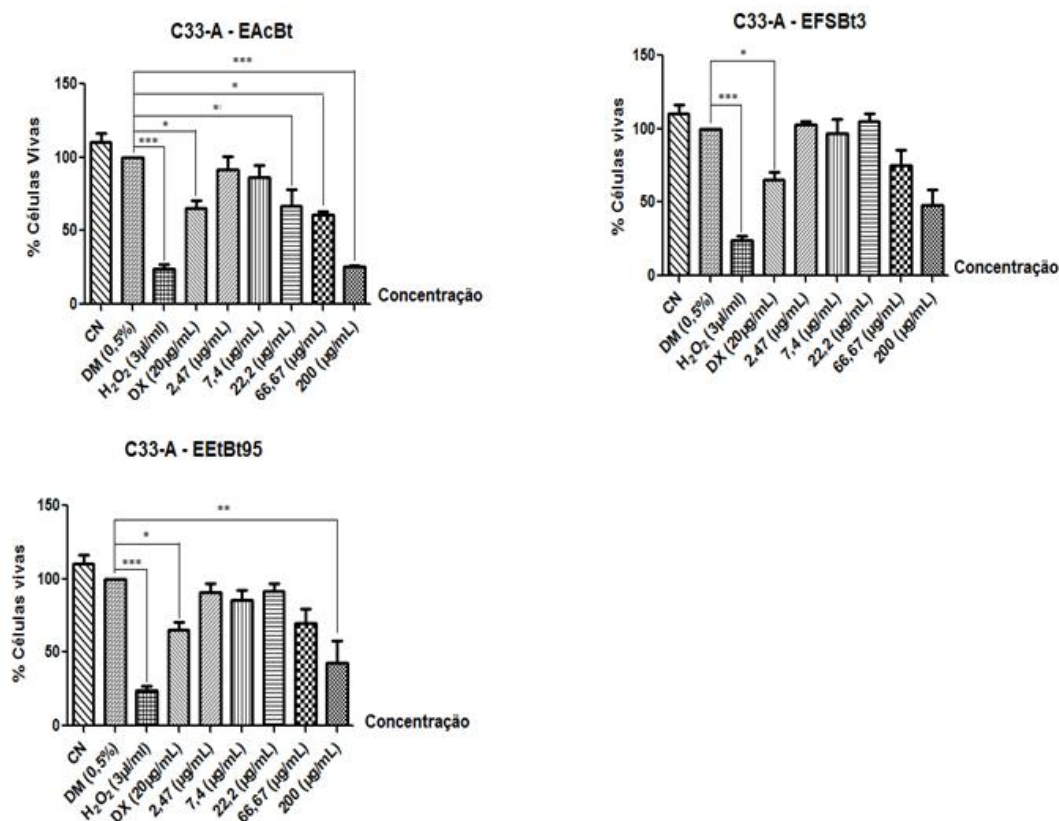
DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Figura 19: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem SiHa, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com os extratos acetato de etila (EAcBt), etanólico 95% (EEtBt95) e fração EFSBt3 de *B. trimera*.



DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Figura 20: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem MRC5, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com os extratos acetato de etila (EAcBt), etanólico 95% (EEtBt95) e fração EFSBt3 de *B. trimera*.



DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

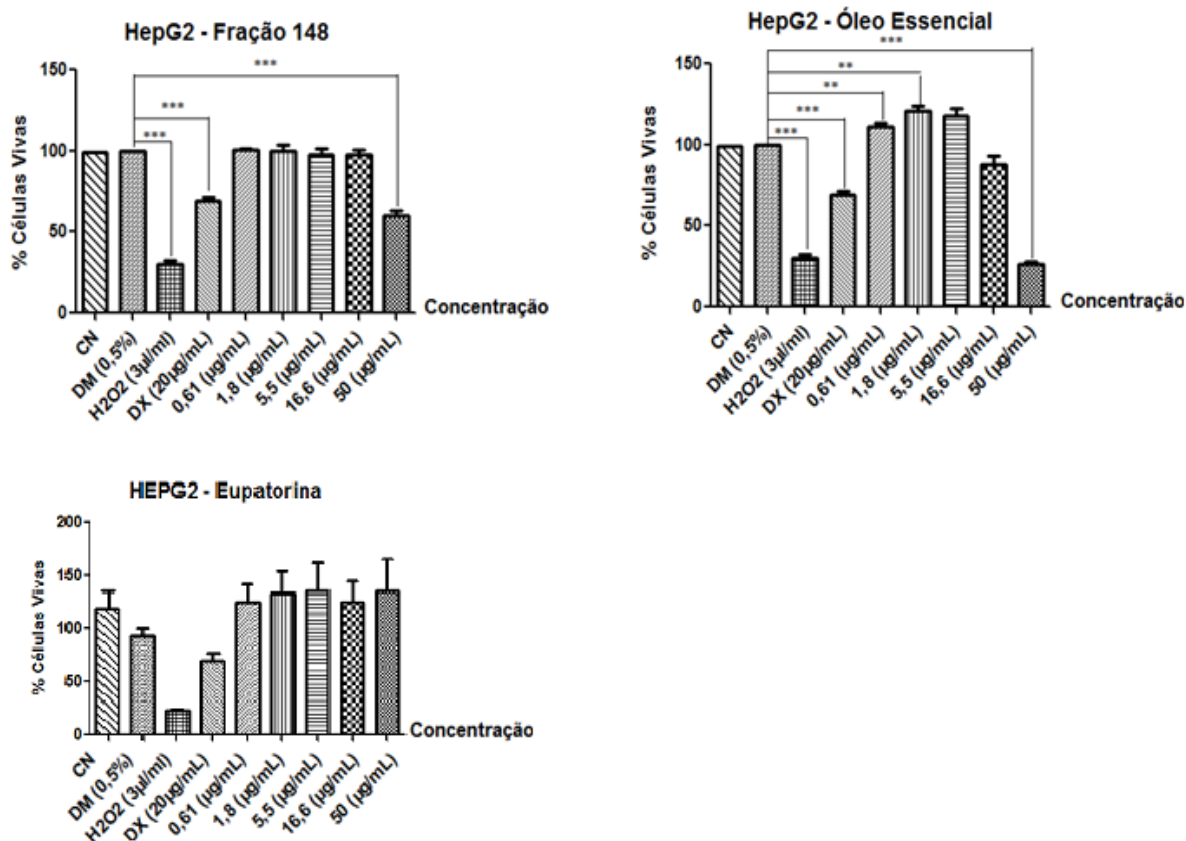
Figura 21: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem C33A, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com os extratos acetato de etila (EAcBt), etanólico 95% (EEtBt95) e fração EFSBt3 de *B. trimera*.

Os resultados obtidos para a linhagem HepG2 demonstram atividade citotóxica com relevância estatística na concentração de 200,00 $\mu\text{g/mL}$ para EAcBt, EFSBt3 e EEtBt95, sendo que para o extrato acetato de etila esta observação também é notada na concentração de 66,67 $\mu\text{g/mL}$. Para a linhagem SiHa, os extratos demonstraram citotoxicidade com significância estatística nas concentrações de 200,00 e 66,67 $\mu\text{g/mL}$. Com relação à linhagem de células

normais MRC5, observou-se citotoxicidade com EAcBt nas 2 maiores concentrações testadas, e com EFSBt3 para a concentração 200,00 µg/mL. Em C33-A, a significância estatística para citotoxicidade foi encontrada com a maior concentração de EEtBt95, e as três maiores concentrações avaliadas de EAcBt.

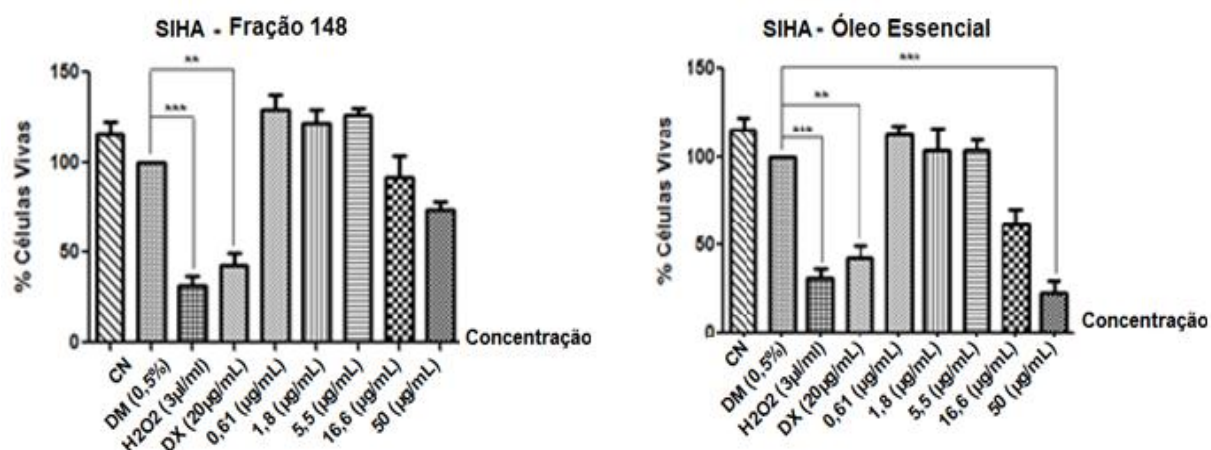
Tanto o óleo essencial quanto a fração 148 de *B. trimera* foram testados com concentração inicial 4 vezes inferior à concentração inicial testada para o extrato acetato de etila, extrato etanólico 95% e fração EFSBt3 (figuras 22, 23 e 24). Para a fração 148 foram obtidos resultados significantes nas linhagens C33A e HepG2 ($p < 0,001$), na concentração de 50,00 µg/mL. A partir dos testes utilizando o óleo essencial foram observados, em todas as linhagens testadas (HepG2, SiHa, C33-A), resultados com significância estatística. Para HepG2 houve morte celular na concentração de 50,00 µg/mL ($p < 0,001$), 1,80 e 0,61 µg/mL ($p < 0,01$). Em SiHa, houve pequena sobrevivência celular quando testado o óleo essencial na concentração de 50,00 µg/mL ($p < 0,001$), enquanto que para a linhagem C33A ocorreu morte celular com significância estatística nas concentrações de 50,00 e 16,60 µg/mL, com $p < 0,001$.

Tendo sido a eupatorina obtida da fração 148, advinda de EAcBt, foi verificada a atividade citotóxica desta substância purificada em HEPG2 e em MRC-5 (figuras 22 e 25), linhagens em que EAcBt e a fração 148, respectivamente, foram mais citotóxicas.



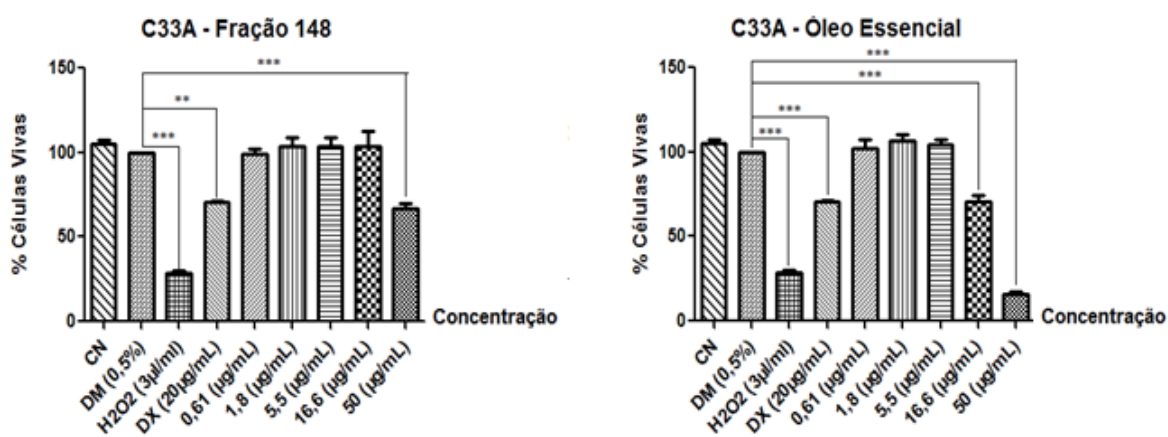
DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Figura 22: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem HepG2, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o óleo essencial, fração 148 e eupatorina de *B. trimera*



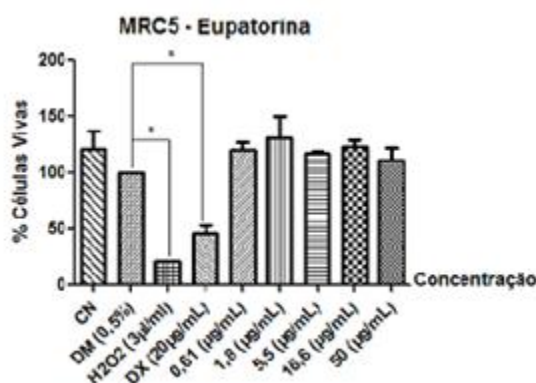
DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Figura 23: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem SiHa, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o óleo essencial e a fração 148 de *B. trimera*.



DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Figura 24: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem C33A, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com o óleo essencial e a fração 148 de *B. trimera*.



DX: controle positivo (doxorrubicina). H₂O₂: controle positivo (peróxido de hidrogênio). DM: controle de veículo (DMSO). CN: controle negativo. Análise de variância One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) $p < 0,001$; (**) $p < 0,01$; (*) $p < 0,05$.

Figura 25: Viabilidade celular (em porcentagem) em linhagem MRC5, a partir de 3 experimentos independentes (média $\pm$ erro padrão-ep). Tratamento realizado com a eupatorina.

Entre o extrato acetato de etila, extrato etanólico 95% e o produto da extração em fase sólida, apenas EEtBt95, quando avaliado em HepG2, não foi capaz de inviabilizar 50% das células (CI₅₀). Os valores de concentrações necessárias para inviabilizarem tanto 20% (CI₂₀) quanto 50% (CI₅₀) das células foram alcançados com o óleo essencial. Para a fração 148 apenas o CI₂₀ foi atingido, em todas as linhagens testadas.

Tabela 3: Efeito citotóxico das amostras testes de *Baccharis trimera* nas diferentes linhagens celulares. Concentração suficiente para inviabilizar 20% das células (CI_{20}) expressa em $\mu\text{g/mL} \pm \text{erro padrão}$.

(NA): CI_{20} não atingida. (NT): amostra não testada na respectiva linhagem.

Amostra	CI_{20} ($\mu\text{g/mL}$)			
	HEPG2	SIHA	C33A	MRC-5
EAcBt	$37,28 \pm 4,5$	$56,72 \pm 4,4$	$12,28 \pm 3,5$	$18,43 \pm 8,0$
EEtBt95	$121,84 \pm 5,0$	$51,27 \pm 6,2$	$45,76 \pm 5,8$	$48,58 \pm 6,6$
EFSBt3	(NA)	$53,64 \pm 6,5$	$59,36 \pm 3,4$	$108,68 \pm 4,8$
Fração 148	$32,12 \pm 3,0$	$38,27 \pm 3,6$	$38,00 \pm 3,57$	(NT)
Óleo Essencial	$20,88 \pm 3,3$	$11,69 \pm 5,8$	$13,52 \pm 3,48$	(NT)
Eupatorina	(NT)	(NT)	(NT)	(NA)

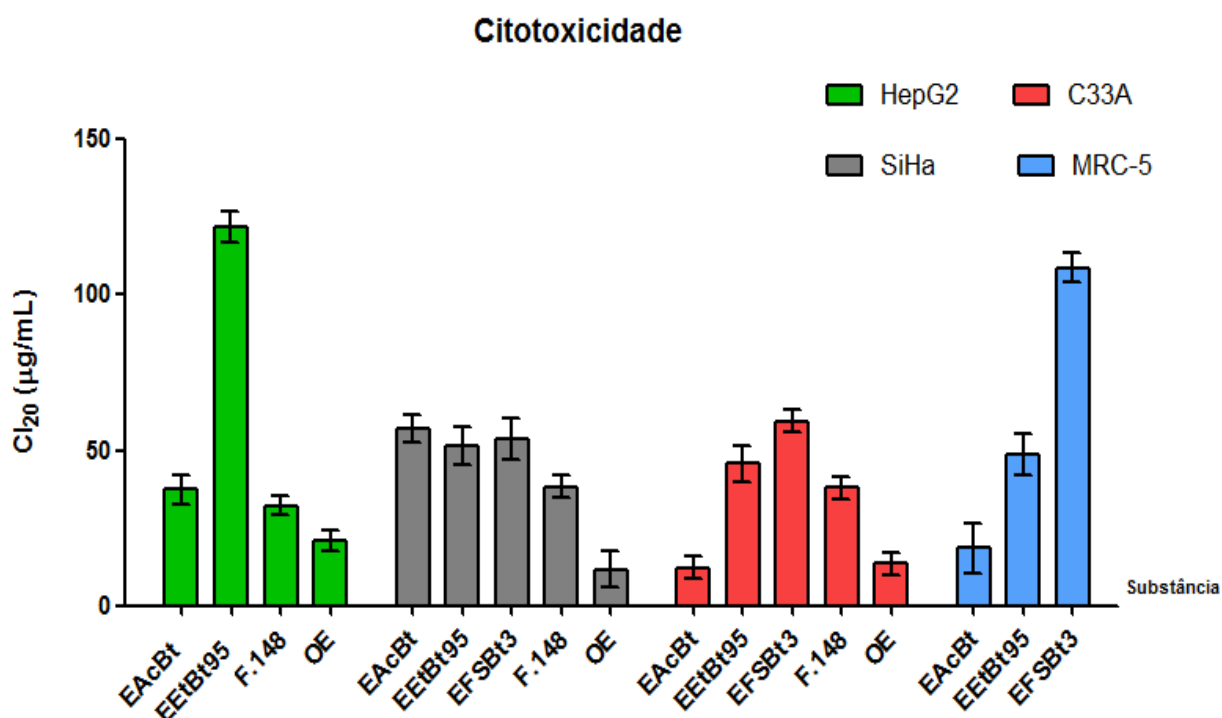


Figura 26: Representação gráfica dos valores de Cl_{20} atingidos em diferentes linhagens e as respectivas substâncias responsáveis

Tabela 4: Efeito citotóxico das amostras testes de *Baccharis trimera* nas diferentes linhagens celulares. Concentração suficiente para inviabilizar 50% das células (Cl_{50}) expressa em $\mu\text{g/mL} \pm \text{erro padrão}$.

(NA): Cl_{50} não atingida. (NT): amostra não testada na respectiva linhagem.

Amostra	Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	HEPG2	SIHA	C33A	MRC-5
EAcBt	$118,08 \pm 4,5$	$177,79 \pm 4,4$	$107,71 \pm 3,5$	$52,85 \pm 8,0$
EEtBt95	(NA)	$149,58 \pm 6,2$	$164,94 \pm 5,8$	$139,03 \pm 6,6$
EFSBt3	$66,50 \pm 9,0$	(NA)	$189,84 \pm 3,4$	$188,06 \pm 4,8$
Fração 148	(NA)	(NA)	(NA)	(NT)
Óleo Essencial	$37,17 \pm 3,3$	$26,88 \pm 5,8$	$29,18 \pm 3,48$	(NT)
Eupatorina	(NT)	(NT)	(NT)	(NA)

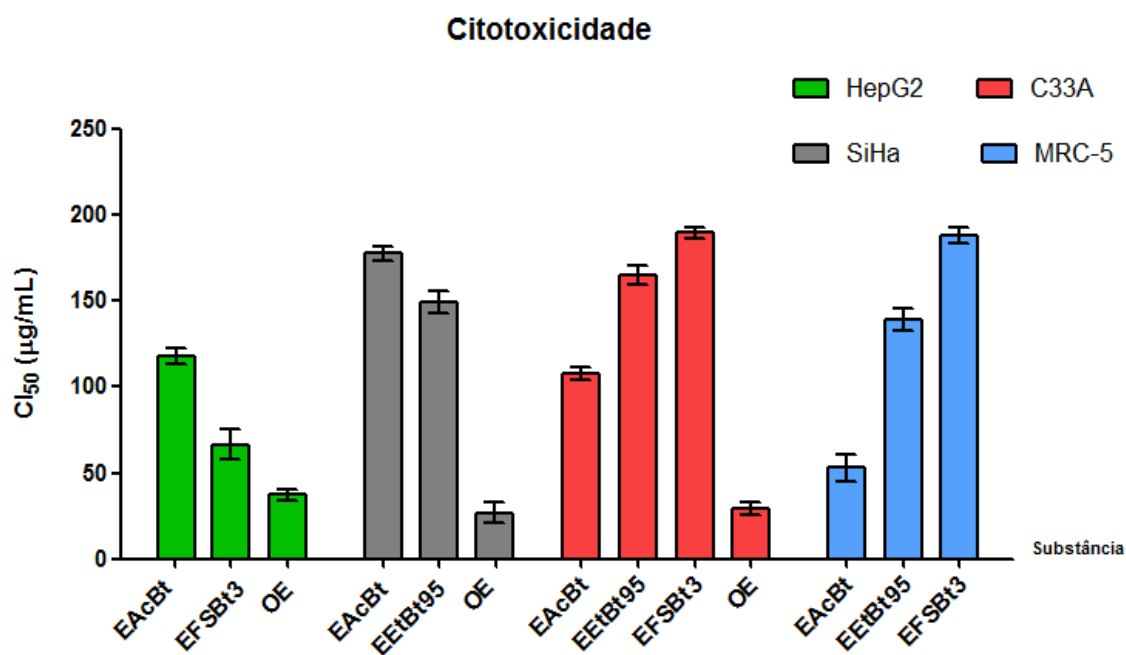


Figura 27: Representação gráfica dos valores de Cl_{50} atingidos em diferentes linhagens e as respectivas substâncias responsáveis.

5. CONCLUSÕES

As amostras de ambas as espécies foram fracionadas obtendo-se frações de composição química distinta e, portanto, adequadas para a metodologia de *Fracionamento Biomonitorado*.

A fração aquosa de *B. pachyphylla* mostrou atividade citotóxica, na maior concentração analisada, quando avaliada na linhagem C33A. As demais amostras não apresentaram citotoxicidade. No entanto, os resultados dos ensaios de citotoxicidade com SRB obtidos com a fração butanólica na linhagem SiHa, e com o extrato bruto e a fração butanólica em MRC-5, na concentração de 200,00 µg/mL, demonstraram aumento considerável nas porcentagens de células vivas tratadas, sugerindo uma possível atividade proliferativa celular destas amostras.

De maneira geral todas as amostras obtidas de *B. trimera* demonstraram algum potencial citotóxico. O óleo essencial foi capaz de inviabilizar tanto 20 quanto 50% das células (CI_{20} e CI_{50}) com as menores concentrações. O extrato EAcBt atingiu o valor de CI_{50} em todas as linhagens testadas. A fração EFSBt3 também mostrou-se citotóxica nas linhagens e, com exceção do ensaio em HepG2, necessitou maior concentração que seu extrato de origem (EAcBt) para atingir valores de CI_{50} . Por sua vez, a fração 148, advinda de EFSBt3, dentre as linhagens com as quais foi testada, também obteve maior atividade citotóxica em HEPG2. No entanto, a substância purificada a partir da fração 148 (eupatorina) não demonstrou citotoxicidade com relevância estatística.

Os resultados obtidos com *B. trimera* e a até então ausência de trabalhos científicos publicados sobre o tema, ostentam a importância de se aprofundar no estudo desta espécie vegetal, através de ensaios mais apurados e no isolamento de novas frações e substâncias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADAMS, R. P: **Identification of Essencial Oil components by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry**. 4^a ed. USA: Allured, 2007.

AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M.R.; ZATTERA, F.; WASUM, R.; SERAFI, L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p. 215-220, 2005.

AGUIAR, R. M.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 19, p. 2388–2392, 2005.

- 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.
- 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.
- BERTOLDI, J. G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Byrsonima Pachyphylla* a. juss. 2012. 75 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.
- 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.
- BIONDO, T. M. A.; TANAE, M. M.; DELLA COLETTA, E.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: analysis of underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n.2, p.368-373, 2011.
- BONACORSI, C.; RADDI, M. S. G.; CARLOS, I. Z.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, C. Anti-*Helicobacter pylori* activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.9. p. 1-7, 2009.
- 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.
- CARDOSO, C. R.; SYLLOS CÓLUS, I. M.; BERNARDI, C. C.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, p. 55-63, 2006.

CASTILLO-AVILA, G. M.; GARCÍA-SOSA, K.; PEÑA-RODRIGUES, L. M. Antioxidants from the Leaf Extract of *Byrsonima bucidaefolia*. **Natural product communications**, v.4, n.1, p. 83-84, 2009.

CIFLUENTES, C. M.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M. P.; IGLESIAS, I.; VILLAR DEL FRESNO, A. M.; MORALES, C.; PAREDES, M. E.; CÁCERES, A. Neuropharmacological profile of ethnomedicinal plants of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 223-228, 2001.

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.

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

COSTA, G. T. **Caracterização do potencial antibacteriano de extratos de folhas de *Byrsonima pachyphylla* Griseb.** 2010. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

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.

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.

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.

FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M. D.; SANTOS, L. A. C.; CARDOSO, C. A. L.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; ANDRADE-SILVA, M.; KASSUYA, C. A. L. Composition and evaluation of the anti-inflammatory and anticancer activities of the essential oil from *Annina sylvatica* A. St-Hil. **Journal of medicinal food**, v.16, n.1, p. 20-25, 2013.

GEISS, F.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D.; RIMPLER, H. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. **Phytochemistry**, v. 39, n. 3, p. 635-643, 1994.

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.

- 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.
- GORDON, A.; JUNGFER, E.; SILVA, B. A.; MAIA, J. G.; MARX, F. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, p. 7688-7699, 2011.
- GUILHON-SIMPLÍCIO, F.; PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Química nova**, v.34, n.6, p. 1032-1041, 2011.
- GRAHAM, J.G.; QUINN, M.L.; FABRICANT, D.S; FARNSWORTH, N.R.; Plants used against cancer-an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacol**, v.73, p. 347-377, 2000.
- GRANCE, S. R.; TEIXEIRA, M. A.; LEITE, R. S.; GUIMARAES, E. B.; SIQUEIRA, J. M.; OLIVEIRA FILIU, W. F.; SOUZA-VASCONCELOS, S. B.; CARVO VIEIRA, M. *Baccharis trimera*: effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, n.1, p.28-33, 2008.
- GROVEY, J.F.; The Trichothecenes and Their Biosynthesis. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v.88, p. 63-130, 2007.
- 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.
- HIGUCHI, C. T.; PAVAN, F. R., LEITE, C. Q. F.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; LEITE, S. R. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SATO, D. N.. Triterpenes and antitubercular activity of *Byrsonima crassa*. **Química nova**, v. 31, n.7, p. 1719-1721, 2008.
- 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. Neo-clerodane 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.
- 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.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Plantas Medicinais: Cura Segura?. *Química Nova*, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.

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, 2008 a.

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, 2008b.

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.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*, v. 325, p. 161-165, 2009.

LIMA, Z. P.; DOS SANTOS, R. C.; TORRES, T. U.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; DOS 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.; CALOS, 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.

LOSQUI, Y. R.; ROZETE, F. S. S.; ALMEIDA, M. B.; BITTENCOURT, A. H. C.; PEREIRA, S. P. F. Activity of *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae on culture of retinal ganglion cells in vitro. *Revista brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.4, p.931-936, 2009.

LUIZE, P. S.; 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*, vol. 41, n. 1, p. 89-94, 2005.

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.

MACIEL, M .A. M.; PINTO, A. C.; JUNIOR, V. F. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALDINI, M.; SOSA, S.; MONTORO, P.; GIANGASPERO, A.; BALICK, M. J.; PIZZA, C.; DELLA LOGGIA, R. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 430-433, 2009.

MALDINI, M.; MONTORO, P.; PIZZA, C. Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 1-6, 2011.

MANJAMALAI, A.; GRACE, V. M. B. The chemotjrapeutic effect of essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour) on lung metastasis developed by B16F-10 cell line in c57BL/6 mice. **Cancer investigation**, v.31, n.1, p.79-87, 2013.

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.

MARTINEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; CAZARES, L. L.; MORENO, M. N. G.; GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 79-82, 1999.

MENDANHA, D. M.; FERREIRA, H. D.; FELICIO, L. P.; SILVA, E. M.; PEREIRA, D. G.; NUNES, W. B.; CARVALHO, S. Modulatory effect of *Byrsonima verbascifolia* (Malpighiaceae) against damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p. 69-77, 2010.

MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M. E.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 690-695, 2008.

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

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.
- 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.
- OLIVEIRA, J. R.; GOSMANN, G. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. **Molecules**, v.17, n.1, p. 1113- 1123, 2012a.
- OLIVEIRA, R. N.; SANTOS-OLIVEIRA, A. S.; JÚNIOR, I. M.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L.; JERALDO, L.; LINHARES, A. X.; ALLEGRETTU, S. M. Schistosoma mansoni: in vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (Less.) DC. **Experimental Parasitology**, v.132, n.2, p.135-143, 2012b.
- PADUA, B. D.; SILVA, L. D.; ROSSONI, J. V.; HUMBERTO, J. L.; CHAVES, M. M.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; COSTA, D. C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129,n. 3, p.381-386, 2010.
- PAUL, E. L.; LUNARDELLI, A.; CABERLON, E.; OLIVEIRA, C. B.; SANTOS, R. C. V.; BIOLCHI, V.; BASTOS, C. M. A.; MOREIRA, K. B.; NUNES, F. B.; GOSMANN, G.; OLIVEIRA, J. R. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. **Inflammation**, v. 32, n.6, p. 419-425, 2009.
- PERAZA-SÁNCHEZ, S.R.; CEN-PACHECO, F.; NOH-CHIMAL, A.; MAY-PAT, F.; SIMÁ-POLANCO, P.; DUMONTEIL, E.; GARCÍA-MISS, M.R.; MUT-MARTÍN, M. . Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan península. **Fitoterapia**, v. 78, p. 315-318, 2007.
- PEREZ-GUTIERREZ, R. M.; MUÑOZ-RAMÍREZ, A.; GOMEZ, Y, G.; RAMÍREZ, E.B. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiglycation effects of *Byrsonima crassifolia* fruit and seed in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Plant Foods Human Nutrition**, v. 65, p. 350-357, 2010.
- 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.

PORTAL BRASIL. Flora, 2012. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/meio-ambiente/2012/04/flora-brasileira>>. Acesso em: 31/07/2013.

QUINTANS, J. D. S.; SOARES, B. M.; FERRAZ, R. P. C.; OLIVEIRA, A. C. A.; SILVA, T. B.; MENEZES, L. R. A.; SAMPAIO, M. F. C.; PRATA, A. P. D.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ANTONIOLLI, A. R.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Chemical Constituents and anticancer effects of the essential oil from leaves of *Xylopia laevigata*. **Planta Médica**, v.79, n.2, p. 123-130, 2013.

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

RASHID, S.; RATHER, M.A.; SHAH, W. A.; BHAT, B. A. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. **Food chemistry**, v.138, n.1, p.693-700, 2013.

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.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; COELHO, R. G.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R.; VILEGAS, W. . Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography A**, v. 1035, p. 47-51, 2004.

SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C. R. P.; Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, p.319-326, 2007.

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.

SILVA, F. G.; OLIVEIRA, C. B. A.; PINTO, J. E. B. P.; NASCIMENTO, V. E.; SANTOS, S. C.; SERAPHIND, J. C.; FERRI, P. H. Seasonal variability in the essential oils of wild and

cultivated *Baccharis trimera*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 990-997, 2007.

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.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 6 ed, Porto Alegre, Editora da UFSC, 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.

SOUZA, S. P. de.; PEREIRA, L. L. S.; SOUZA, A. A.; SANTOS, C. D. Inhibition of pancreatic lipase by extracts of *Baccharis trimera*: evaluation of antinutrients and effect on glycosidases. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.3, p.450-455, 2011.

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

SU, Y. C.; HO, C. L. Composition, in-vitro anticancer, and antimicrobial activities of the leaf essential oil of *Machilus muthaensis* from Taiwan. **Natural product communications**, v. 8, n. 2, p.273-275, 2013a.

SU, Y. C.; HO, C. L. Composition and in-vitro cytotoxic activities of the leaf essential oil of *Beilschmiedia erythrophloia* from Taiwan. **Natural product communications**, v. 8, n. 2, p.143-144, 2013b.

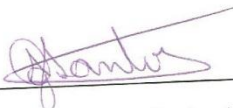
SU, Y. C.; HO, C. L. Composition, anticancer, and antimicrobial activities in vitro of the Heartwood essential oil of *Cunninghamia lanceolata* var. *Konishii* from Taiwan. **Natural product communications**, v. 7, n.9, p.1245-1247, 2012c.

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.

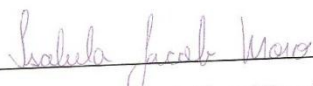
TORRES, L. M. B.; GAMBERINI, M. T.; ROQUE, N. F.; LIMA-LANDMAN, M. T.;

- SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p. 617-619, 2000.
- UNIVERSIDADE FEDERAL LAVRAS. DE SOUZA, S. P.; DONIZETE, S. C. Plant extracts used for inhibiting pancreatic lipase for reducing weight and serum cholesterol, comprise methanolic extracts of *Echinodorus grandiflorus*, *Costus spicatus*, *Cymbopogon citratus* and *Baccharis trimera*. BR200914283-A2. 2012.
- VALLILO, M. I.; PASTORE, J. A.; PASTORE, J. A.; ESTON, M. R.; GARBELOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E. Caracterização química e valor nutricional dos frutos de *Byrsonima myricifolia* Griseb (malpighiaceae) - alimento de aves silvestres. **Revista Instituto Florestal**, v. 19, n. 1, p. 39-45, 2007
- VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n.1, p.1-7, 2006.
- VERDI, L. G.; BRIGHENTE, M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v.28, n.1, p. 85-94, 2005.

De acordo.



André Gonzaga dos Santos (Orientador)



Isabela Jacob Moro (Aluna)

Araraquara, 10 de janeiro de 2014.