

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE

CENTRO DE CIÊNCIAS E HUMANIDADES

RELATÓRIO FINAL

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS DE *Baccharis microdonta***

Profa. Dra. Paulete Romoff  
PESQUISADOR LÍDER

Profa. Dra. Daniela de Oliveira Toyama  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fátima Maria Motter Magri  
Prof Dr João Henrique Ghilardi Lago  
Prof. Dr. Marcelo J. Pena Ferreira  
Profa. Dra. Oriana A. Fávero  
PESQUISADORES-COLABORADORES

## SUMÁRIO

1. RESUMO DO PROJETO.....	3
2. INTRODUÇÃO.....	4
3. JUSTIFICATIVA.....	7
4. OBJETIVOS.....	8
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	9
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
7. CONCLUSÕES.....	44
8. FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS.....	45
9. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	46
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

## 1 RESUMO DO PROJETO

O gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae, é constituído por mais de 500 espécies distribuídas principalmente na América Latina. No Brasil estão descritas 120 espécies, localizadas na região sudeste. Essas plantas são normalmente de pequeno porte, como ervas e arbustos, muitas das quais utilizadas na medicina popular para o controle ou tratamento de várias doenças, como desordens hepáticas e renais, diabetes, processos inflamatórios, entre outros. Por outro lado, algumas espécies são reconhecidamente tóxicas, tendo sido relatados casos de morte de bovinos e ovinos ao se alimentarem com folhas de *Baccharis*.

A composição química deste gênero baseia-se principalmente na ocorrência de substâncias terpênicas e flavonóides. Além de estudos fitoquímicos, foram realizados alguns estudos de atividade biológica destacando-se os efeitos antimicrobianos, antiinflamatórios, citotóxicos e antiradicalares.

O objetivo desse projeto é realizar o estudo fitoquímico de *Baccharis microdonta*, ainda sem relatos na literatura, visando reconhecer as classes de metabólitos secundários acumulados, bem como, buscar o isolamento e determinação estrutural das substâncias que apresentam potencial atividade anti-radicalar, anticolinesterásica, antiinflamatória, antinociceptiva e antibacteriana.

## 2 INTRODUÇÃO

As substâncias orgânicas isoladas de plantas, principalmente aquelas oriundas do metabolismo secundário, podem ser empregadas para diferentes finalidades: modelos para síntese orgânica, estudos de biossíntese, quimiotaxonômicos e etnobotânicos, ensaios biológicos e/ou farmacológicos, usos econômicos, entre outros.

Atualmente, a busca de novas substâncias em plantas segue alguns caminhos comuns oriundos da pesquisa tradicional. A informação etnobotânica é valiosa, porém, ainda muito empírica. Por outro lado, a quimiotaxonomia é muito útil e apresenta bases científicas, porém, não existem muitos projetos direcionados neste sentido (GOTTLIEB et al., 2002). O trabalho sistemático e contínuo com espécies da mesma família tem sido uma constante, uma vez que nesse tipo de abordagem, o estudo por famílias, facilita o processo de elucidação estrutural, visto que uma mesma substância isolada de uma espécie pode ocorrer em outras espécies ou pode facilitar também a determinação de estruturas diferentes, porém, com esqueleto carbônico similar àquelas anteriormente isoladas.

A família Asteraceae é conhecida pela produção de mais de 7.000 substâncias químicas (ZDERO & BOHLMANN, 1990) onde todas as classes químicas têm no mínimo algumas centenas de metabólitos isolados (BOHM & STUESSY, 2001), sendo esse o principal motivo atribuído ao sucesso evolucionário dos seus indivíduos (ALMEIDA-CORTEZ et al., 1999).

### **Aspectos químicos e biológicos do gênero *Baccharis***

Entre os vários gêneros de Asteraceae, *Baccharis* L. é constituído por mais de 500 espécies distribuídas exclusivamente no continente americano, principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Bolívia, Chile e México. No Brasil estão descritas 120 espécies de *Baccharis* localizadas, principalmente, na região sudeste. As plantas do gênero são normalmente de pequeno porte, como ervas e arbustos, muitas das quais utilizadas na medicina popular para o controle ou tratamento de várias doenças, como desordens hepáticas e renais, diabetes, processos inflamatórios e outros (VERDI et al., 2005). Por outro lado, algumas espécies são reconhecidamente tóxicas,

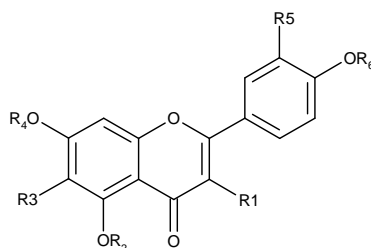
tendo sido relatados casos de morte por envenenamento de bovinos e ovinos através da ingestão de folhas de *Baccharis* (ROZZA et al., 2006).

A composição química deste gênero baseia-se principalmente na ocorrência de terpenos e flavonóides (ABAD & BERMEJO, 2007). Além de estudos fitoquímicos, foram realizados ensaios biológicos com o intuito de se verificar, principalmente, os efeitos antimicrobianos, citotóxicos e antiinflamatórios de extratos e substâncias isoladas a partir do respectivo gênero (Tabela 1).

**Tabela 1** – Atividades biológicas de extratos ou compostos isolados de espécies do gênero *Baccharis*

<b>Espécie</b>	<b>Compostos ou Extratos</b>	<b>Bioatividade</b>	<b>Referência</b>
<i>B. articulata</i>	Extrato	Antioxidante	OLIVEIRA et al., 2003
<i>B. coridifolia</i>	Extrato	Antioxidante	MONGELI et al., 1997
<i>B. crispa</i>	Flavonóides	Antimicrobiana	PALACIOS et al., 1983
	Extrato	Antioxidante	MONGELI et al., 1997
<i>B. gaudichaudiana</i>	Terpenos e flavonóides	Citotóxica	FULLAS et al., 1994
<i>B. linearis</i>	Flavonóides	Citotóxica	FAINI et al., 1999
<i>B. megapotamica</i>	Saponinas e flavonóides	Antiinflamatória e analgésica	RENÉ et al., 1996
<i>B. notoserigila</i>	Flavonóides e óleo essencial	Antimicrobiana	COBOS et al., 2001
<i>B. sarothroides</i>	Flavonóides	Citotóxica	VERDI et al., 2005
<i>B. trimera</i>	Flavonóides	Moluscicida	VERDI et al., 2005
<i>B. trinervis</i>	Extrato	Antiinflamatória e antioxidante	HERAS et al., 1998

Os flavonóides são substâncias de grande ocorrência no gênero *Baccharis*, sendo considerados bons marcadores quimiotaxonômicos para a família Asteraceae (EMERENCIANO et al., 2001). As substâncias que ocorrem neste gênero são principalmente flavonas e flavonóis (Figura 1), as quais apresentam diversas atividades biológicas.



<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>	<b>Substâncias</b>
H	H	H	CH <sub>3</sub>	H	H	Genkwanina
H	H	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	Cirsimaritina
H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	Hispidulina
H	H	H	H	H	H	Apigenina
OH	H	H	H	OH	H	Quercetina
H	H	H	H	OH	H	Luteolina
H	H	OCH <sub>3</sub>	H	OH	H	Nepetina

**Figura 1** – Estruturas de alguns flavonóides isolados de espécies de *Baccharis*

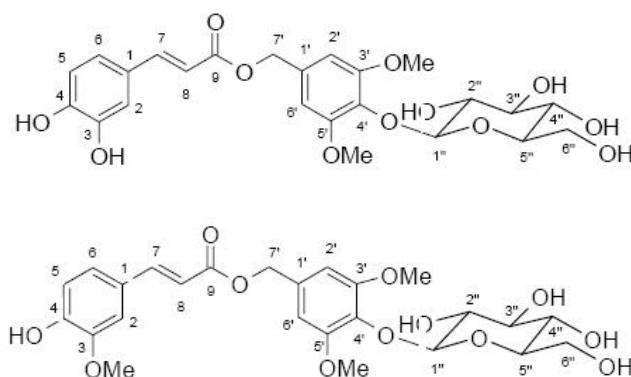
A espécie *B. trimeria*, conhecida popularmente como carqueja, é usada na medicina popular para o tratamento de doenças do fígado e reumatismo (RENÉ et al., 1996). Do extrato metanólico das folhas desta espécie, foram isolados quatro flavonóides, 5,4'-diidroxi-7-metoxiflavona (genkwanina), 5,4'-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina), 5,7,4'-triidroxi-6-metoxiflavona (hispidulina) e 5,7,4'-triidroxiflavona (apigenina), os quais apresentaram atividade antimutagênica. Do extrato em acetato de etila da mesma planta foram isolados outros três flavonóides, 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona (quercetina), 5,7,3',4'-tetraidroxiflavona (luteolina) e 5,7,3',4'-tetraidroxi-6-metoxiflavona (nepetina), os quais apresentaram atividade anti-hepatotóxica, utilizando ratos como modelo, justificando o uso desta planta na medicina popular.

A atividade antiinflamatória dos extratos das partes aéreas de *B. medullosa* e *B. rufescens* foi determinada a partir de edemas em ratos, induzidos por carragenina. Os extratos em hexano, acetona e clorofórmio inibiram a fase aguda da inflamação neste modelo (CIFUENTE et al., 2001).

Algumas espécies de *Baccharis* apresentam atividade antioxidante. Os extratos em etanol de quinze espécies medicinais do Equador foram avaliados quanto às atividades antiinflamatórias e antioxidante. Usando-se o modelo de peroxidação lipídica, foi observado que o extrato etanólico de *B.*

*trinervis* mostrou-se ativo em seqüestrar radicais peroxídicos e hidroxílicos. O extrato aquoso de *B. coridifolia* apresentou atividade antioxidante em diferentes bioensaios e, a partir do estudo fitoquímico, os autores pretendem isolar as substâncias responsáveis por tal observação (HERAS et al., 1998).

Recentemente, tem sido relatado na literatura o isolamento de derivados de ácido cinâmico (Figura 2), a partir de extratos e partições de alta polaridade de espécies de *Baccharis* (Eckert, 2007).



**Figura 2** – Estruturas de alguns derivados de ácido cinâmico isolados de espécies de *Baccharis*

Em recentes trabalhos de campo realizados na região da Colônia de férias do Mackenzie em Campos do Jordão, com o objetivo de catalogar algumas espécies vegetais de interesse para estudo fitoquímico e farmacológico, foi verificada a ocorrência de várias espécies do gênero *Baccharis*, entre as quais podemos citar *B. dracunculifolia*, *B. elaeagnóides*, *B. microdonta*, *B. regnelli*, *B. schultzi*, *B. trimera* e *B. uncinella*.

### 3 JUSTIFICATIVA

A elaboração e desenvolvimento desse projeto em fitoquímica, monitorado por testes de atividades biológicas, contribuirá para a busca racional de substâncias potencialmente ativas em plantas brasileiras bem como para o enriquecimento dos dados químicos das espécies brasileiras de

*Baccharis*, provenientes de uma região pouco estudada. Assim, torna-se importante o estudo químico e biológico de espécies pertencentes a esse gênero, principalmente para aquelas onde não existem relatos na literatura, como para *B. microdonta*, selecionada para esse estudo.

Os resultados provenientes da realização desse projeto de pesquisa serão submetidos à apresentação em congressos especializados e, após sua conclusão, à publicação em periódicos de ampla circulação.

#### **4 OBJETIVOS**

As espécies de *Baccharis* são reconhecidamente produtoras de óleos essenciais (AGOSTINI et al., 2005; LAGO et al., 2008) e de classes de substâncias com potencial atividade antibacteriana, anticolinesterásica, antiinflamatória, antinociceptiva e anti-radicalar. Sendo assim, em virtude da versatilidade de constituintes químicos e das atividades biológicas observadas para espécies de *Baccharis*, e também pela disponibilidade para coleta das mesmas em Campos do Jordão, o objetivo deste trabalho é realizar o estudo fitoquímico dos extratos das folhas de *Baccharis microdonta*.

Para tanto, os extratos e partições serão selecionados através de ensaios biológicos para detecção das seguintes atividades: antirradicalar, antibacteriana, anticolinesterásica, antinociceptiva e antiinflamatória. Ao término do fracionamento cromatográfico, as atividades biológicas serão avaliadas também para as substâncias isoladas.

Paralelamente, pretendia-se também com esse projeto realizar o estudo de variação sazonal do óleo essencial de *B. microdonta* buscando avaliar a influência de fatores microclimáticos e fenológicos na constituição química do óleo volátil da espécie. No entanto, quando da primeira coleta para extração dos óleos voláteis, a Profa. Dra. Oriana A. Fávero, responsável pela identificação da espécie, observou que o indivíduo estava senescente, além de estar caduco, ou seja, com queda excessiva de folhas. Assim, para poupar o indivíduo, pois seriam necessárias seis coletas, decidiu-se trocar a espécie vegetal da qual seriam extraídos os óleos essenciais. Desta forma, optou-se pela espécie *B. ligustrina*, pois esta já



havia sido identificada e os indivíduos masculino e feminino devidamente marcados em campo.

## **5 PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1 Materiais utilizados**

#### *5.1.1 Solventes*

Todos os solventes utilizados nas extrações, nas eluições das colunas e placas cromatográficas foram de grau P.A. das marcas Synth, CAAL e Nuclear. Para as análises realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram utilizados solventes grau HPLC, das marcas Neon e Vetec.

#### *5.1.2 Colunas e placas cromatográficas*

Para os ensaios com Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), foram utilizadas cromatofolhas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> sob suporte de alumínio da Merck. Para as revelações dos cromatogramas foram utilizadas irradiação no ultravioleta, UV, (254 e 356 nm), solução metanólica de DPPH (1mg/mL) e solução de sulfato cérico.

Para as colunas cromatográficas foram utilizadas, como fases estacionárias, sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) da Merck ou Sephadex LH-20 da Amersham Biosciences.

A cromatografia em coluna flash foi realizada em um sistema Flash Gradiente Flexível e Modular para separação em misturas binárias da Büchi, modelos C605 e C615. A fase estacionária utilizada foi a sílica de fase reversa C18, da Aldrich.

### **5.2 Instrumentos**

Para as análises de óleos voláteis foi utilizado um cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 – séries II (gás de arraste: hélio) equipado com detector FID, coluna capilar HP-5 (5% de difenil em 95% de dimetilpolisiloxano - comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,32 mm, espessura do filme: 0,25 µm). Programação de temperatura do forno: 60-

280°C com taxa de aquecimento de 3°C/min mantendo-se 10 minutos a 280°C. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220°C e 280°C, respectivamente. As concentrações dos componentes foram calculadas tendo como base às áreas dos picos no cromatograma, seguindo a ordem de eluição da coluna HP-5.

As análises por CG/EM foram realizadas em cromatógrafo Hewlett-Packard HP-6890 (coluna HP-5 - 5% de difenil em 95% de dimetilpolisiloxano - comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,32 mm, espessura do filme: 0,25 µm) acoplado a espectrômetro Hewlett-Packard HP-5973 (operando por impacto eletrônico - 70 ev), nas mesmas condições de programações de temperatura descritas acima. Tais análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em Cromatógrafo Dionex P680A equipado com detector por varredura de espectro no Ultravioleta por arranjo de fotodiodos, modelo UVD 340U, injetor manual Rheodyne 8125 com loop de 20 µL, e módulo de tratamento de dados CHROMELEON. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Acclaim® 120 de fase reversa C<sub>18</sub> (250 x 4,60 mm) e 5 µm de diâmetro de partícula.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo nos espectrômetros: Varian Advance, operando a 300 e a 75 MHz e Bruker AC-200 operando a 200 e a 50 MHz, para os núcleos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, respectivamente. Os espectros foram obtidos em deuteroclorofórmio (CDCl<sub>3</sub>) ou metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) da Tédia Brasil como solventes e padrões de referência interna.

### **5.3 Coleta de *B. microdonta* e preparação dos extratos**

O material vegetal foi coletado em junho de 2008, na região da Colônia de férias da Universidade Presbiteriana Mackenzie, no município de Campos do Jordão, São Paulo, e identificada Professoras Doutora Oriana Aparecida Fávero (CCBS-UPM) e Mestre Fátima O. Souza (IB, Universidade de Campinsa). A exsiccata do material vegetal coletado foi Herbário da

Prefeitura Municipal de São Paulo (Herbário PMSP - Divisão Técnica da Escola de Jardinagem e do Herbário Municipal / DEPAVE-4 - Departamento de Parques e Áreas Verdes Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente), voucher PMSP8980.

As folhas frescas e galhos de *B. microdonta* foram secados em estufa por seis dias. Após moagem, o material vegetal foi extraído exaustivamente com hexano e posteriormente com metanol até esgotamento. Após a reunião dos extratos brutos e evaporação sob pressão reduzida, foram obtidos os extratos hexânico e metanólico brutos, conforme indicado na tabela 2.

**Tabela 2.** Massas de material vegetal fresco, seco e de extratos obtidos para as folhas e galhos de *B. microdonta*.

Material vegetal	Seco (g)	Extrato (g)	
		Hexânico	Metanólico
Folhas	241,0	10,03	97,5
Galhos	147,2	1,75	20,60

O extrato metanólico das folhas foi ressuspenso em metanol:água 1:1 e então extraído com hexano (0,42 L), diclorometano (0,40 L), acetato de etila (0,40 L) e *n*-butanol (0,25 L). Após evaporação dos solventes, foram obtidas 6,55g da fase em hexano, 6,69g da fase em diclorometano, 11,83g da fase em acetato de etila e 18,87g da fase em *n*-butanol. As fases de partição foram analisadas por RMN de <sup>1</sup>H e por CCDC, e armazenadas à baixa temperatura.

### 5.3.1 Fracionamentos cromatográficos

As fases em hexano, em diclorometano e em acetato de etila do extrato metanólico das folhas foram submetidas a etapas de fracionamento cromatográfico, visando a identificação dos constituintes químicos das mesmas.

### 5.3.1.1 Fracionamento da fase em hexano

Parte da fase em hexano (5,90 g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna aberta utilizando como fase estacionária gel de sílica 60, e como fase móvel hexano; hexano/acetato de etila em várias proporções; acetato de etila; acetato de etila/metanol em várias proporções e metanol puro. Deste fracionamento foram obtidas 132 frações de aproximadamente 50 mL cada, as quais foram organizadas e reunidas em 32 grupos (HEX1 ao HEX32) com base no perfil cromatográfico obtido por CCDC (Tabela 3).

**Tabela 3.** Fracionamento cromatográfico da fase em hexano das folhas de *B. microdonta* – grupos, frações reunidas e massas obtidas.

Grupo	Frações reunidas	Massa (g)	Grupo	Frações reunidas	Massa (g)
HEX-1	1	0,7581	HEX-18	64-69	0,0353
HEX-2	2	0,0772	HEX-19	70-78	0,0321
HEX-3	3	0,0069	HEX-20	79-80	0,0043
HEX-4	4-14	0,0994	HEX-21	81-83	0,0056
HEX-5	15	0,0137	HEX-22	84-88	0,0184
HEX-6	16	1,6969	HEX-23	89-95	0,0248
HEX-7	17		HEX-24	96-99	0,0128
HEX-8	18		HEX-25	100-105	0,0291
HEX-9	20-21	0,5747	HEX-26	106-107	0,0141
HEX-10	22	0,2288	HEX-27	108-110	0,0348
HEX-11	23-25	0,2639	HEX-28	111-114	0,0394
HEX-12	26-31	0,1471	HEX-29	115-119	0,0331
HEX-13	32-35	0,0456	HEX-30	120-122	0,1574
HEX-14	36-45	0,0608	HEX-31	123-126	0,0503
HEX-15	46-57	0,0771	HEX-32	127	0,1932
HEX-16	58-61	0,0163	HEX-33	128-132	0,1689
HEX-17	62-63	0,0149			

Após a reunião das frações e evaporação do solvente, observou-se a formação de cristais nos grupos HEX-6, HEX-7 e HEX-8. Assim, o grupo HEX-8 foi submetido a análise por RMN  $^{13}\text{C}$ , o que permitiu a identificação do diterpeno ácido caurenóico (**1**).

### 5.3.1.2 Fracionamento da fase em diclorometano

Uma porção da fase em diclorometano (cerca de 3g) foi submetida à coluna de gel de sílica 60, usando como sistemas eluentes: (1) 0,4 L de diclorometano, (2) 1,2 L de diclorometano/acetato de etila 9:1; (3) 0,8 L de diclorometano/acetato de etila 85:15; (4) 0,3 L de diclorometano/acetato de etila 8:2; (5) 0,3 L de diclorometano/acetato de etila 7:3; (6) 0,6 L de diclorometano/acetato de etila 1:1; (7) 0,6 L de diclorometano/acetato de etila 3:7; (8) 0,4 L de diclorometano/acetato de etila 2:8; (9) 0,4 L de diclorometano/acetato de etila 1:9; (10) 0,3 L de acetato de etila; (11) 1,1 L de acetato de etila/metanol 9:1; (12) 0,4 L de acetato de etila/metanol 1:1, e (13) 0,4 L de metanol. Deste fracionamento foram obtidas 113 frações de 50 mL, as quais após evaporação dos solventes e análises por CCDC foram reunidas em 25 grupos (Tabela 4).

Os grupos foram submetidos a análises através de CCDC dos grupos obtidos deste fracionamento, e observou-se que o grupo DCM-7 apresentava uma única mancha por visualização sob luz ultravioleta. Após a revelação da placa cromatográfica com sulfato cérico, este grupo apresentou coloração característica de substâncias terpênicas. A análise via RMN de  $^{13}\text{C}$  deste grupo permitiu inferir que o mesmo estava puro, sendo os dados indicativos do diterpeno ácido 15-O-acetil-grandiflórico (**2**).

Os grupos DCM-15 e DCM-16 (93 mg) foram reunidos, e submetidos a fracionamento em coluna cromatográfica de gel de Sephadex LH-20, eluída com metanol puro. Tal procedimento resultou na obtenção de 14 frações de 15 mL, as quais foram reunidas em 7 grupos a partir dos perfis cromatográficos. O grupo DCM-15/16 (3/5) era constituído pelo diterpeno ácido grandiflórico (**3**), identificado após análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

**Tabela 4.** Fracionamento cromatográfico da fase em diclorometano das folhas de *B. microdonta* – grupos, frações reunidas e massas obtidas.

Grupo	Frações reunidas	Massa (g)	Grupo	Frações reunidas	Massa (g)
DCM-1	F(1-2)	0,0173	DCM-17	F(64)	0,0030
DCM-2	F(3-10)	0,0408	DCM-18	F(65-67)	0,0255
DCM-3	F(11)	0,0180	DCM-19	F(68-71)	0,0881
DCM-4	F(12)	0,02307	DCM-20	F(72-74)	0,0708
DCM-5	F(13)	0,1425	DCM-21	F(75-78)	0,1689
DCM-6	F(14-17)	0,1201	DCM-22	F(79-81)	0,0460
DCM-7	F(18)	0,0234	DCM-23	F(82-91)	0,0767
DCM-8	F(19-21)	0,0330	DCM-24	F(92-97)	0,1868
DCM-9	F(22-23)	0,0162	DCM-25	F(98-103)	0,0694
DCM-10	F(24-32)	0,0735	DCM-26	F(104-106)	0,0334
DCM-11	F(33-35)	0,0108	DCM-27	F(107)	0,0033
DCM-12	F(36-40)	0,0300	DCM-28	F(108-109)	0,3218
DCM-13	F(41-43)	0,0170	DCM-29	F(110-112)	0,1671
DCM-14	F(44-49)	0,0559	DCM-30	F(113)	0,0243
DCM-15	F(50-56)	0,0530			
DCM-16	F(57-63)	0,0421			

### 5.3.1.3 Fracionamento da fase em acetato de etila

Inicialmente a fase em acetato de etila foi solubilizada em metanol a quente, e após resfriamento obteve-se 6,11g de porção solúvel em metanol, e 1,70g de porção insolúvel em metanol.

A porção solúvel em metanol (0,5124g) foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna aberta utilizando como fase estacionária gel de Sephadex LH-20, usando-se metanol puro como fase móvel. Deste fracionamento foram obtidos dez grupos (ACE-1 – ACE-10)

após reunião das 16 frações iniciais (12 mL cada), baseado no perfil cromatográfico obtido por CCDC e CLAE, como mostrado na tabela 5.

**Tabela 5** – Fracionamento cromatográfico da porção solúvel em metanol da fase em acetato de etila das folhas de *B. microdonta* – grupos, frações reunidas e massas obtidas.

Grupo	Frações reunidas	Massa (g)
ACE(S)-1	F(0-1)	0,0110
ACE(S)-2	F(2-3)	0,0208
ACE(S)-3	F(4)	0,0066
ACE(S)-4	F(5)	0,0640
ACE(S)-5	F(6)	0,1088
ACE(S)-6	F(7)	0,0294
ACE(S)-7	F(8)	0,0125
ACE(S)-8	F(9-10)	0,0077
ACE(S)-9	F(11-13)	0,0049
ACE(S)-10	F(14-16)	0,0102

O grupo ACE(S)-5 foi analisado através de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , sendo possível caracterizar dois flavonóides glicosilados, quercitrina (**4**) e afzelina (**5**).

A porção insolúvel em metanol (0,800g) foi fracionada através de cromatografia em coluna de média pressão, recheada com sílica C18. Para a eluição da coluna foram usados os seguintes sistemas eluentes: (1) 0,1 L de MeOH/H<sub>2</sub>O 3:7; (2) 0,1 L de MeOH/H<sub>2</sub>O 45:55; (3) 0,3 L de MeOH/H<sub>2</sub>O 6:4; (4) 0,2 L de MeOH/H<sub>2</sub>O 8:4; (5) 0,1 L de MeOH. Após a evaporação dos solventes das sete frações obtidas, procedeu-se às análises cromatográficas das mesmas através de CLAE. As massas das frações obtidas constam da Tabela 6.



**Tabela 6** – Fracionamento cromatográfico da porção insolúvel em metanol da fase em acetato de etila das folhas de *B. microdonta* – grupos, frações reunidas e massas obtidas.

Grupo	Massa (g)
ACE(INS)-1	0,0439
ACE(INS)-2	0,1712
ACE(INS)-3	0,0647
ACE(INS)-4	0,1837
ACE(INS)-5	0,0347
ACE(INS)-6	0,0132
ACE(INS)-7	0,0105

### 5.3.2 Extração dos óleos essenciais

As coletas do material vegetal foram realizadas na Colônia do Mackenzie, em Campos do Jordão, SP, com acompanhamento da Dra Oriana Fávero, e uma amostra encontra-se depositada no Herbário D. Bento Pickel (Instituto Florestal, São Paulo) sob o número de exsicata SPSF 37589.

As folhas dos dois indivíduos de *B. ligustrina* foram coletadas em fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro de 2009, e as informações sobre os indivíduos estudados nos dias de coleta encontram-se na Tabela 6. O material vegetal fresco foi submetido à destilação em aparelho de Clevenger por 4h. Após extração com DCM, os óleos obtidos foram secados com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrados e o solvente removido à temperatura ambiente. Os mesmos foram analisados por CG e por CG-EM e a identificação estrutural obtida por comparação dos espectros de massas (NIST. 62 lib.) e índices de Kovats de cada componente (ADAMS, 2001). Os rendimentos de cada óleo essencial foram calculados tendo como base a massa das folhas frescas (Tabela 7).

**Tabela 7** – Descrição dos indivíduos nos dias das coletas.

Coleta	Horário	Indivíduo feminino	Indivíduo masculino
24/02/09	11h20-11h30	Estéril	Estéril
26/04/09	11h15-11h20	Estéril, queda de folhas	Estéril, bem verde
21/06/09	11h30-11h55	Florida, queda de folhas	Florido, com botões
15/08/09	14h05-14h10	Plena floração	Plena floração
24/10/09	14h40-15h03	Estéril, folhosa	Estéril, caduco na base
13/12/09	12h00-12h05	Estéril	Estéril

**Tabela 8** – Rendimentos de extração dos óleos essenciais.

Mês de coleta	Indivíduo	
	Feminino	Masculino
Fevereiro	0,08	0,04
Abril	0,16	0,05
Junho	0,19	0,003
Agosto	-	0,14
Outubro	0,26	0,19
Dezembro	0,19	0,01

É importante ressaltar neste momento que o óleo essencial extraído das folhas do indivíduo feminino coletadas em agosto foi extraviado.

## **5.4 Testes para avaliação das atividades biológicas**

Os extratos brutos, fases de partição e algumas frações cromatográficas foram submetidas à avaliação das atividades antibacteriana, antirradicalar e anticolinesterase. Os ensaios de verificação da atividade antiinflamatória foram realizados pela Profa. Dra. Daniela de O. Toyama, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da UPM.

### **5.4.1 Ensaios para avaliação da atividade antibacteriana**

Os ensaios realizados foram baseados no método de difusão do agente a ser analisado em disco, tendo sido conduzidos pela Profa. Dra. Fátima Maria Motter Magri, no Laboratório de Biociências, Universidade Presbiteriana Mackenzie. O princípio deste método baseia-se na inoculação em superfície de um Agar de solução padronizada de microrganismo específico. Sobre esse são colocados discos de papéis impregnados previamente com soluções das amostras que se deseja investigar a atividade antimicrobiana. As substâncias impregnadas nos discos de papel difundem-se no meio de cultura e, se a amostra em questão apresentar atividade inibitória sobre o microrganismo testado forma-se um halo de não-crescimento ao redor do disco impregnado. Após o período de incubações, respeitadas as condições específicas para cada microrganismo, as zonas de inibição do crescimento bacteriano foram medidas em volta de cada disco (ISENBERG, 1992).

Discos de papel filtro esterilizados (6 mm de diâmetro) foram impregnados com 10 µL de uma solução de 20 mg dos extratos obtidos dissolvidos em 200 µL de DMSO. Como controles negativo e positivo foram utilizados um disco com o solvente DMSO e um disco com gentamicina (240 µg/disco), respectivamente. Esses discos foram colocados sobre o meio de cultura Agar Mueller-Hinton, preparado em placas de Petri e inoculado com as suspensões bacterianas dos seguintes microrganismos: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 Lote 555), *Micrococcus luteus* (ATCC 25923 Lote 422), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538 Lote H532) e *Streptococcus gallolyticus* (ATCC 49619 Lote 543). As culturas microbianas foram padronizadas por comparação com tubo 0,5 da escala de MacFarland (KONEMAN et al., 1997).

Após esse procedimento, as placas foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  durante 24 horas, e após esse período, os halos de inibição foram medidos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **5.4.2 Ensaios para avaliação da atividade antirradicalar**

Os extratos e frações cromatográficas foram avaliados quanto a sua atividade antirradicalar através da reação com DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila), Sigma-Aldrich.

##### **5.4.2.1 Análise qualitativa da atividade antirradicalar**

Para a realização dos experimentos foram preparadas soluções das amostras a serem testadas em etanol ( $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A seguir,  $10 \mu\text{L}$  de cada solução, incluindo o controle positivo (quercetina), foram transferidos para as placas cromatográficas e então se adicionou  $10 \mu\text{L}$  da solução de DPPH  $0,3\text{mM}$  sobre cada ponto de aplicação das amostras nas placas não eluídas (Macari, 2006). O teste é considerado positivo quando a coloração violeta da solução de DPPH muda para amarelo.

##### **5.4.2.2 Determinação do limite da atividade antirradicalar**

A partir das soluções-estoque preparadas na concentração de  $1\text{mg/mL}$ , foram realizadas diluições para a obtenção de soluções com concentrações finais de 250, 125, 50 e  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Estas soluções foram então submetidas ao ensaio, conforme o procedimento descrito no item 5.4.2.1 (Macari, 2006).

#### **5.4.3 Ensaios para avaliação da atividade anticolinesterásica**

Amostras de extratos e fases de *B. microdonta* foram solubilizadas em MeOH na concentração de  $40\text{mg/mL}$ . Alíquotas de  $5\mu\text{L}$  dessas soluções foram aplicadas em placas de sílica gel, juntamente com  $2,5\mu\text{L}$  de fisostigmina ( $20\text{mg/mL}$ ), utilizado como padrão positivo. Após a eluição em  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  8:2 as placas foram pulverizadas com uma solução da enzima acetilcolinesterase (Sigma,  $2000\text{u/mL}$ ) dissolvida em tampão tris-HCl (Sigma) pH 7,8 e estabilizada em albumina *serum bovine* (0,1 %, Sigma). Após aquecimento, em ambiente úmido por 20 min. a  $37^{\circ}\text{C}$  em estufa, as

mesmas foram pulverizadas com solução aquosa 0,25% Fast Blue B salt (Sigma) e 0,25% de 1-naftil acetato (Sigma) em etanol. O aparecimento de manchas brancas indica a presença de substâncias com atividade anticolinesterásica. (Viegas Jr et al., 2004) Para a realização dos ensaios houve a colaboração da Dra. Luce Maria Brandão Torres, do Instituto de Botânica de São Paulo.

#### **5.4.3 Ensaio para avaliação da atividade antiinflamatória**

Estes ensaios foram realizados pela Profa. Dra. Daniela Oliveira Toyama, no Laboratório de Biociências, Universidade Presbiteriana Mackenzie. Para determinação da atividade antiinflamatória foi utilizado o método de indução de edema de pata em ratos. Para tanto, os animais foram tratados com agente antiinflamatório (carragenina) e com os extratos brutos segundo metodologia descrita na literatura (Lima et al., 2003). Na região intraplantar da pata direita foram administrados carragenina e igual volume de solução salina na pata esquerda. A redução do edema foi observada segundo método descrito na literatura.

Os animais ( $n = 5$ ), foram tratados intraperitonealmente (i.p.) com 50  $\mu\text{L}$  do material vegetal dissolvido em DMSO (1% em solução salina) a 10  $\text{mg.Kg}^{-1}$ , 60 min. antes da injeção de 20  $\mu\text{L}$  de carragenina a 1%. O grupo controle positivo recebeu 50  $\mu\text{L}$  de indometacina (10  $\text{mg.Kg}^{-1}$ ) i.p. e o grupo controle negativo recebeu 50  $\mu\text{L}$  de veículo (solução salina e 5% do volume de DMSO). \* $P < 0,05$  comparado ao grupo controle negativo (ANOVA).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme previsto no projeto de pesquisa, as fases de partição do extrato metanólico das folhas de *B. microdonta* foram fracionadas através de técnicas cromatográficas, visando a determinação estrutural dos constituintes químicos. Até o momento, foram identificados três diterpenos e dois flavonóides glicosilados.

### 6.1 Determinação estrutural dos metabólitos isolados

#### 6.1.1 Identificação dos diterpenos com esqueleto *ent*-caurano

A presença de substâncias terpênicas nos grupos HEX-8, DCM-7 e DCM-15/16(3/5), obtidos do fracionamento das fases em hexano e em DCM, foi indicada através das análises por CCD, pois as placas apresentaram coloração característica de tais substâncias após serem borrifadas com sulfato cérico. Por este motivo, optou-se pela técnica de RMN de  $^{13}\text{C}$  para a identificação estrutural das substâncias presentes nesses grupos, sendo que o primeiro grupo analisado foi o DCM-7, pois foi o primeiro a ser obtido na forma pura.

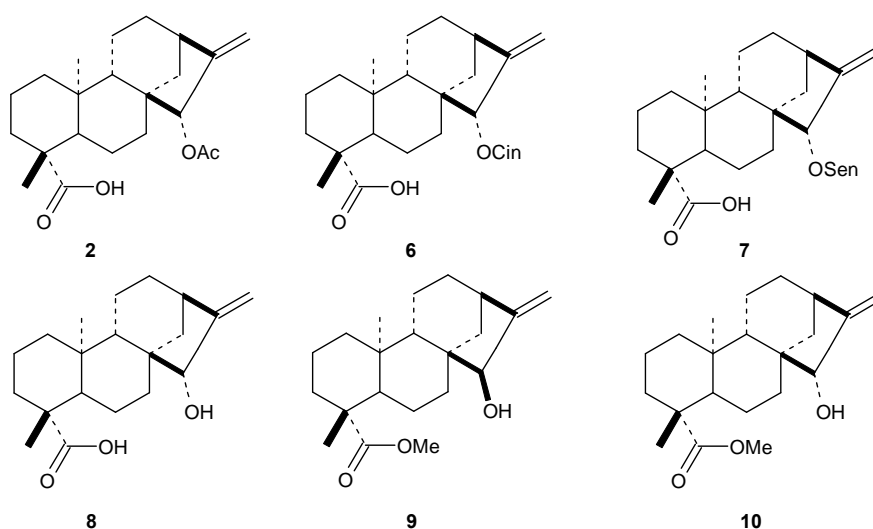
A partir do espectro obtido de DCM-7, pode-se verificar a presença de 22 sinais, entre os quais  $\delta$  171,2 e 21,4, os quais evidenciam a presença de um grupamento acetil. Sendo assim, restaram 20 sinais pertencentes ao esqueleto carbônico da substância, assegurando a presença de um diterpeno.

Considerando a elevada ocorrência de diterpenos com esqueletos labdano, caurano e clerodano neste gênero (VERDI et al., 2005), a análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi direcionada no sentido de caracterizar um dos três esqueletos. Os sinais em  $\delta$  155,6 e 110,1 são atribuídos a uma ligação dupla exocíclica, confirmada a partir do espectro DEPT  $135^\circ$  que indicou que estes sinais são referentes a átomos de carbono quaternário e metilênico insaturados, respectivamente. Assim, estes deslocamentos químicos sugerem a presença de uma substância com esqueleto caurano. Este esqueleto foi confirmado a partir da análise do espectro DEPT, que permitiu inferir a presença de 3 átomos de carbono quaternários alifáticos

( $\delta$  43,8, 47,7 e 40,1). Para os outros dois esqueletos seriam encontrados apenas dois átomos de carbono quaternário no espectro DEPT.

Adicionalmente, os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT apresentam sinais em  $\delta$  182,9 (s), atribuído a um grupamento carboxila, em  $\delta$  29,0 e em 16,0, referentes a dois grupamentos metílicos, em  $\delta$  40,7, 19,2, 37,9, 21,0, 37,4, 18,6, 32,8 e 34,9, os quais indicam a presença de oito átomos de carbono metilênicos. Os espectros apresentaram ainda três sinais referentes a átomos de carbono metínicos ( $\delta$  56,8, 53,1, 42,7) e um sinal em  $\delta$  83,2 atribuído a um carbono oxi-metínico, ao qual encontra-se ligado o grupamento acetil. Comparando-se os deslocamentos químicos obtidos com os dados da literatura (Tabela 7, Figura 3), confirmou-se a presença do ácido 15-O-acetil-grandiflórico no grupo DCM-7 (**2**, figura 3).

Esta substância já havia sido identificada em espécies dos seguintes gêneros de Asteraceae: *Arctotis*, *Coespeletia*, *Espeletia*, *Espeletiopsis*, *Gynoxys*, *Helianthus*, *Helichrysum*, *Libanothamnus*, *Mikania* e *Wedelia*, e, também, em espécies de Annonaceae (*Xylopia*), Chrysobalanaceae (*Licania*) e Rutaceae (*Phebalium*). Dentre as espécies de *Baccharis*, o ácido 15-O-acetil-grandiflórico foi isolado apenas de *B. truncata* (BOHLMANN et al, 1981a).



**Figura 3** – Estruturas dos diterpenos **2** e 6-10.

**Tabela 9** - Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **2** e dados da literatura (50 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ).

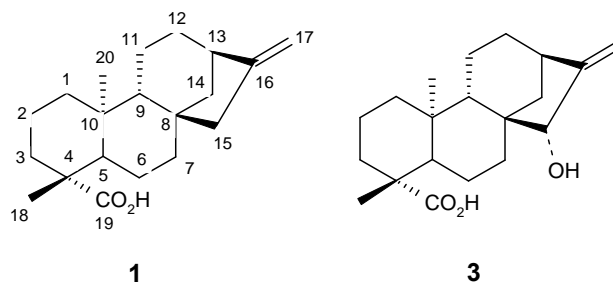
<b>C</b>	<b>2</b>	<b>2<sup>a</sup></b>	<b>6<sup>b</sup></b>	<b>7<sup>c</sup></b>	<b>8<sup>d,*</sup></b>	<b>9<sup>e</sup></b>	<b>10<sup>e</sup></b>
1	40,7 t	40,8 t	40,7 t	40,3 t	38,7 t	40,7 t	40,9 t
2	19,2 t	19,1 t	18,5 t	19,8 t	19,8 t	19,2 t	19,2 t
3	37,9 t	38,9 t	37,8 t	37,6 t	36,4 t	38,1 t	38,1 t
4	43,8 s	43,7 s	43,8 s	43,9 s	43,9 s	43,9 s	43,9 s
5	56,8 d	47,0 d	56,7 d	57,1 d	57,2 d	56,4 d	57,1 d
6	21,0 t	21,4 t	20,9 t	21,6 t	22,0 t	21,6 t	21,1 t
7	37,4 t	37,7 t	34,9 t	41,2 t	41,2 t	36,3 t	36,3 t
8	47,7 s	46,0 s	47,7 s	48,0 s	48,4 s	45,7 s	47,8 s
9	53,1 d	56,5 d	53,1 d	53,7 d	54,0 d	45,5 d	53,5 d
10	40,1 s	39,4 s	40,0 s	38,7 s	40,2 s	39,1 s	39,7 s
11	18,6 t	18,0 t	19,1 t	18,7 t	18,7 t	18,3 t	18,3 t
12	32,8 t	33,3 t	32,7 t	33,0 t	33,1 t	33,1 t	32,6 t
13	42,7 d	40,6 d	42,7 d	43,1 d	42,9 d	40,1 d	42,3 d
14	34,9 t	36,4 t	37,4 t	35,5 t	36,7 t	38,9 t	35,3 t
15	83,2 d	81,6 d	83,2 d	82,3 d	83,7 d	82,5 d	82,7 d
16	155,6 s	153,7 s	155,4 s	155,4 s	161,3 s	158,4 s	160,3 s
17	110,1 t	106,1 t	110,1 t	109,7 t	107,8 t	104,7 t	108,2 t
18	29,0 q	28,9 q	28,9 q	29,2 q	29,3 q	28,7 q	28,8 q
19	182,9 s	184,6 s	184,2 s	179,7 s	180,3 s	178,0 s	178,0 s
20	16,0 q	15,9 q	15,94 q	16,2 q	16,3 q	15,5 q	15,7 q

<sup>a</sup> HANSON et al., 1976; <sup>b</sup> NASCIMENTO e OLIVEIRA, 2001; <sup>c</sup> AMARO-LUIS, 1993; <sup>d</sup> OHNO e MABRY, 1980; <sup>e</sup> YAMASAKI et al., 1976; \*piridina- $\text{d}_5$

Nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  das frações HEX-8 e de DCM 15/16 (3/5) foi possível verificar a presença de 20 sinais pertencentes ao esqueleto carbônico da substância, assegurando a presença de diterpenos com o mesmo esqueleto atribuído para a substância **2**. A comparação dos dados espectroscópicos obtidos para HEX-8 com os dados da literatura permitiu identificar **1** como sendo o ácido caurenóico, assim como **3** foi identificado como o ácido grandiflórico (Tabela 10).



**Tabela 10** - Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **1** e **2** e dados da literatura (50 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ).



<b>C</b>	<b>1</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>3</b>	<b>3<sup>b</sup></b>
1	40,7	40,7	37,8	38,7
2	19,1	19,1	18,9	19,8
3	37,8	37,8	35,1	36,4
4	43,7	43,7	43,4	43,9
5	57,1	57,1	56,7	57,2
6	21,8	21,8	20,8	22,0
7	41,3	41,3	40,6	41,2
8	44,2	44,2	47,5	48,4
9	55,1	55,1	53,2	54,0
10	39,7	39,7	39,6	40,2
11	18,4	18,4	18,1	18,7
12	33,1	33,1	32,4	33,1
13	43,8	43,8	42,1	42,9
14	39,7	39,7	36,0	36,7
15	48,9	48,9	82,4	83,7
16	155,9	155,9	159,45	161,3
17	103,0	102,9	108,1	107,8
18	28,9	28,9	29,5	29,3
19	184,6	184,3	180,7	180,3
20	15,6	15,6	15,6	16,3

<sup>a</sup>VIEIRA et al., 2002; <sup>b</sup>OHNO and MABRY, 1980

Segundo a literatura, o ácido caurenóico apresenta uma grande variedade de atividades biológicas, tais como antiinflamatória, antibacteriana, antifúngica e moluscicida, sendo bem distribuído em espécies dos gêneros *Baccharis* e *Wedelia* (Asteraceae) e *Xylopia* e *Annona* (Annonaceae) (BRESCIANI et al, 2004). Por outro lado, o ácido grandiflórico já foi identificado em espécies dos seguintes gêneros de Asteraceae: *Aspilia*, *Austroeupatorium*, *Coespeletia*, *Disynaphia*, *Espeletia*, *Eupatorium*, *Grazielia*, *Gnaphalium*, *Gynoxys*, *Helianthus*, *Helichrysum*, *Ichthyothere*, *Lostephane*, *Mikania*, *Montanoa*, *Robinsonia*, *Siegesbeckia*, *Solidago*, *Viguiera*, *Tithonia*, *Wedelia*, e, também, em espécies de Araliaceae (*Aralia*)

e Chrysobalanaceae (*Licania*). Dentre as espécies de *Baccharis*, o ácido grandiflorico foi isolado apenas de *B. intermixta* e *B. polyphylla* (BOHLMANN et al, 1981b).

### 6.1.2 Identificação estrutural dos flavonóides glicosilados

Os glicosídeos quercetina-3-O-ramnosídeo (quercitrina, **4**) e kaempferol-3-O-ramnosídeo (afzelina, **5**) foram identificados em mistura, através de análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do grupo ACE(S)-5, e por comparação com os dados da literatura.

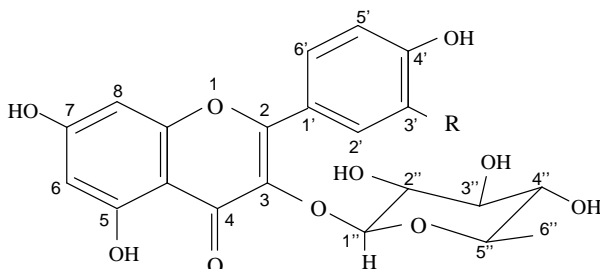
As unidades aglicônicas dos flavonóis foram caracterizadas como 3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona (quercetina) e 3,5,7,4'-tetraidroxiflavona (kaempferol) através da análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , reconhecendo-se os sinais de sistemas AB, correspondentes a dois átomos de hidrogênio que mantêm entre si relação meta e atribuídos aos hidrogênios H-6/H-8 ( $\delta$  6,37/6,38, d,  $J=1,8$  Hz, e 6,19, d,  $J=2,1$  Hz). O anel B da quercetina apresenta dois dubletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,34 ( $J=2,1$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  6,94 ( $J=8,7$  Hz), referentes aos átomos de hidrogênio H-2' e H-5', além de um duplo-dublete em  $\delta_{\text{H}}$  7,30 ( $J=8,4$  e 2,1 Hz) referente a H-6'. Por outro lado, o anel B do kaempferol por ser dissubstituído, apresenta dois dubletos: um em  $\delta_{\text{H}}$  7,76 ( $J=8,7$  Hz) correspondente a H-2' e H-6', e outro em  $\delta_{\text{H}}$  6,92 ( $J=8,4$  Hz), atribuído a H-3' e H-5'. Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  são apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Na região de açúcares no espectro de hidrogênio pode-se identificar a presença de hidrogênios anoméricos pelos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  5,34 e 5,37, d,  $J=1,5$  Hz. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  observa-se o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  103,6, referente aos átomos de carbono anoméricos, além de quatro absorções em torno de  $\delta \sim 70$  correspondentes aos outros átomos de carbono do açúcar. Os grupos metílicos de uma unidade de ramnose são caracterizados pelos sinais em  $\delta_{\text{H}}$  0,94 e 0,92 (d,  $J=6,0$  e 5,4 Hz) e  $\delta_{\text{C}}$  17,7.

Vale salientar que a quercitrina foi isolada anteriormente de *Baccharis pseudotenuifolia* e *B. gaudichaudiana*. No entanto, este é o primeiro registro da ocorrência de afzelina neste gênero, corroborando registros da literatura que mostram que não é muito comum o isolamento de flavonóides

glicosilados em espécies de *Baccharis*, uma vez que tais substâncias são predominantemente metiladas.

**Tabela 10** - Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  das substâncias **4** e **5** em 300MHz e dados da literatura em 200MHz (multiplicidade, *J* em Hz).



**4** - Quercitrina, R=OH; **5** - Afzelina, R= H

Posição	<b>4</b>	<b>4<sup>a</sup></b>	<b>5</b>	<b>5<sup>b,*</sup></b>
6	6,37 (d, 1,8)	6,20 (d, 2,1)	6,36 (d, 1,8)	6,36 (d, 1,9)
8	6,19 (d, 2,1)	6,36 (d, 2,1)	6,19 (d, 2,1)	6,16 (d, 1,9)
2'	7,34 (d, 2,1)	7,33 (d, 2,1)	7,76 (d, 8,7)	7,73 (d, 8,7)
3'	-	-	6,92 (d, 8,4)	6,89 (d, 8,7)
5'	6,94 (d, 8,7)	6,93 (d, 8,3)	6,92 (d, 8,4)	6,89 (d, 8,7)
6'	7,30 (dd, 8,4; 2,1)	7,30 (dd, 2,1)	7,76 (d, 8,7)	7,73 (d, 8,7)
Ramnose				
1''	5,34 (d, 1,5)	5,35 (d, 1,8)	5,37 (d, 1,5)	5,27 (s)
2''	4,23 (dd, 3,0; 1,8)	3,20-3,82 (m)	4,23 (dd, 3,0; 1,8)	3,0 – 3,2 (m)
3''	3,75 (dd, 9,0; 3,3)	3,20-3,82 (m)	3,75 (dd, 9,0; 3,3)	3,0 – 3,2 (m)
4''	3,32 (dd, 9,3; 3,3)	3,20-3,82 (m)	3,32 (dd, 9,3; 3,3)	3,0 – 3,2 (m)
5''	3,41 (d, 6,0)	3,20-3,82 (m)	3,41 (d, 6,0)	3,0 – 3,2 (m)
6''	0,94 (d, 6,0)	0,95 (d, 6,2)	0,92 (d, 5,4)	0,77 (d, 5,4)

Dados obtidos em  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; \*Dados obtidos em  $\text{DMSO-d}_6$ ; <sup>a</sup>MENDES et. al., 1995;

<sup>b</sup>Silva, 1997.

**Tabela 11** - Deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  das substâncias **4** e **5** (75 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e dados da literatura.

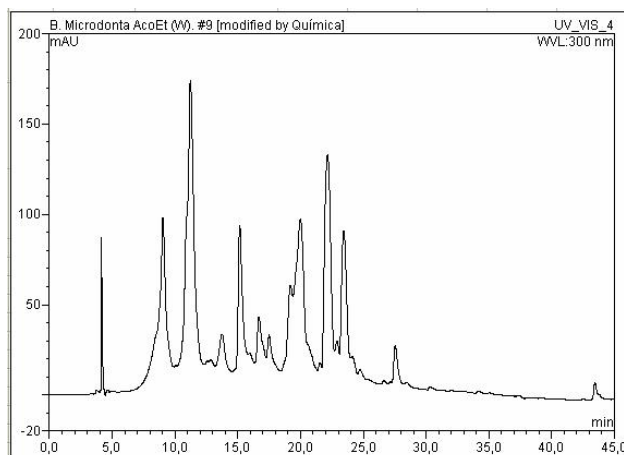
Posição	<b>4</b>	<b>4<sup>a</sup></b> (50 MHz)	<b>5</b>	<b>5<sup>b</sup></b> (DMSO)
2	159,4	158,5	159,4	158,8
3	136,3	132,7	136,3	135,9
4	179,7	179,8	179,7	179,3
5	163,3	163,7	163,3	163,3
6	99,9	99,5	99,9	99,6
7	165,9	165,4	165,9	165,0
8	94,9	94,5	94,8	94,6
9	158,6	158,5	158,6	158,1
10	106,1	102,7	106,1	105,9
1'	123,0	123,3	122,7	122,7
2'	117,1	116,1	132,0	131,7
3'	146,5	145,8	116,6	116,4
4'	149,9	149,0	161,7	160,4
5'	116,5	116,7	116,6	116,4
6'	123,1	122,6	132,0	131,7
Ramnose				
1''	103,6	102,7	103,6	102,5
2''	72,1	71,4	72,1	71,6
3''	72,1	72,1	72,1	72,3
4''	73,3 <sup>c</sup>	72,9	73,4 <sup>c</sup>	73,2
5''	72,0	71,3	72,3	71,4
6''	17,77	17,3	17,77	17,8

<sup>a</sup>MENDES et. al., 1995; <sup>b</sup>AGRAWAL, 1989; <sup>c</sup> os sinais podem ser intercambiáveis

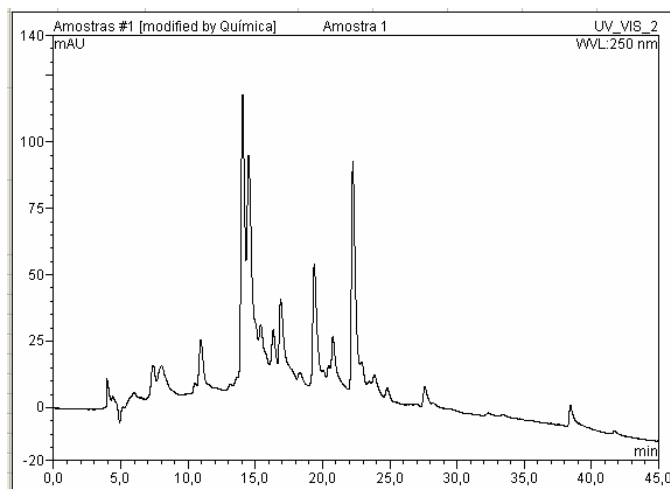
## 6.2 Análises por CLAE das frações da porção insolúvel em MeOH da fase em acetato de etila

A porção insolúvel em MeOH da fase em acetato de etila, assim como as frações resultantes do seu fracionamento [ACE(INS)1-7] foram analisadas através de CLAE (Figuras 4 a 11). Tais análises indicaram que as

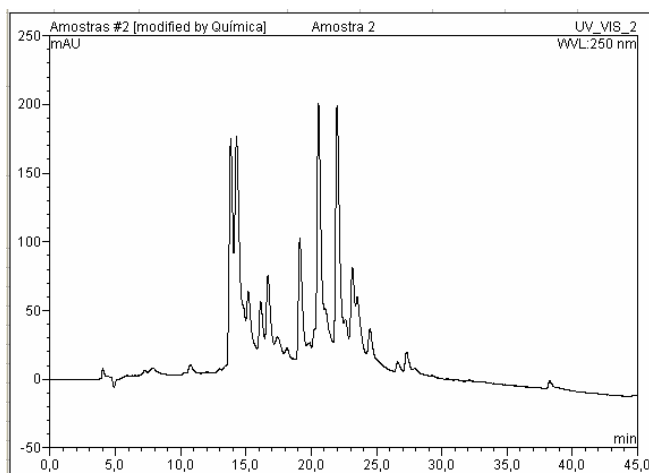
frações cromatográficas obtidas ainda eram constituídas por misturas de substâncias, sendo algumas de menor complexidade em relação ao material original. No entanto, apesar da complexidade de algumas frações foi possível obter informações interessantes sobre as mesmas.



**Figura 4** – Cromatograma da porção insolúvel em MeOH da fase em acetato de etila.

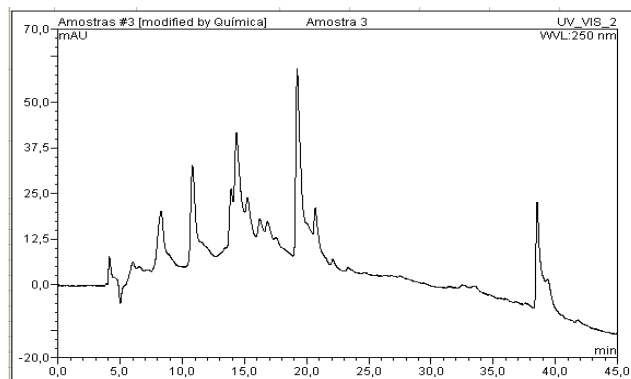


**Figura 5** – Cromatograma de ACE(INS)-1.

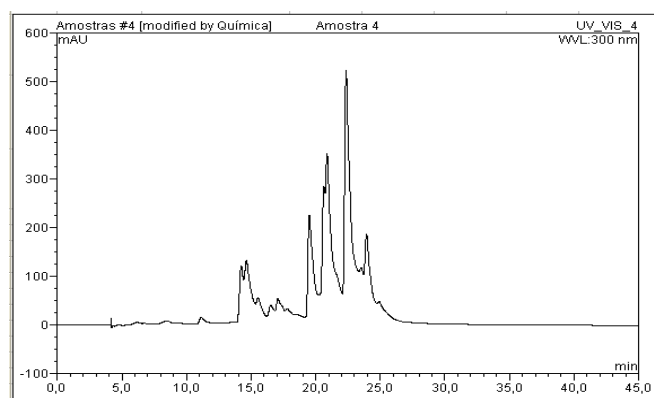


**Figura 6** – Cromatograma de ACE(INS)-2.

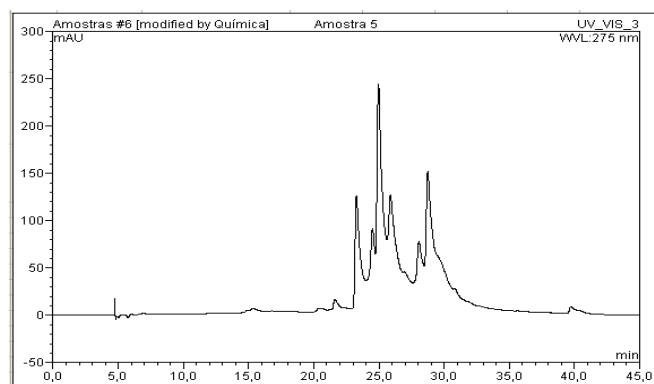
Nos cromatogramas das frações ACE(INS)-1 e ACE(INS)-2, apresentados nas figuras 5 e 6 respectivamente, ressalta-se a presença de um sinal próximo a 15 minutos, que se desdobra em dois picos, cujos espectros apresentam bandas de absorção em 300/325 e 327/294 nm. Tais absorções são características de derivados de ácido cinâmico, os quais já foram identificados em folhas de *B. regnelli* coletadas na mesma região (ECKERT et al., 2007). Estas frações serão submetidas a etapas de fracionamento cromatográfico visando a identificação molecular destes componentes. Os espectros de absorção e os tempos de retenção relativos a outros picos majoritários sugerem a presença de substâncias flavonoídicas, dentre as quais afzelina e quercitrina, as quais já foram identificadas na porção solúvel em metanol. As figuras 7 a 11 apresentam os cromatogramas das frações restantes, e a partir dos espectros de absorção sugere-se que devam ser constituídas basicamente por flavonóides. As frações constituídas por substâncias ainda não identificadas serão fracionadas posteriormente.



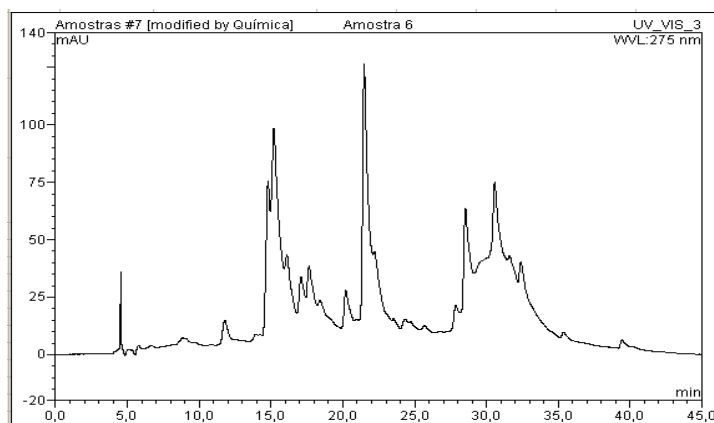
**Figura 7** – Cromatograma de ACE(INS)-3.



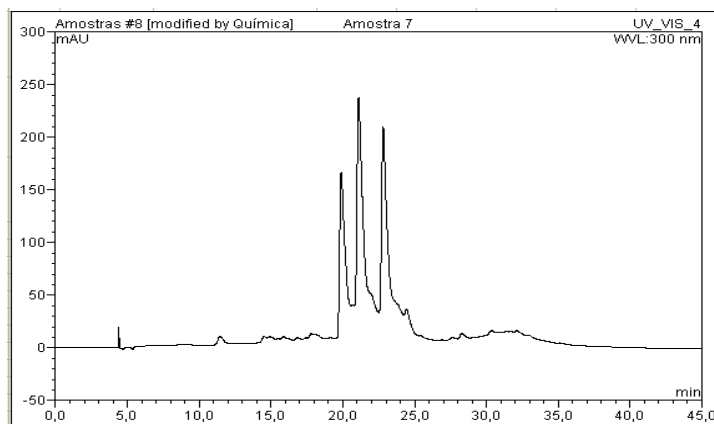
**Figura 8** – Cromatograma de ACE(INS)-4.



**Figura 9** – Cromatograma de ACE(INS)-5.



**Figura 10** – Cromatograma de ACE(INS)-6.



**Figura 11** – Cromatograma de ACE(INS)-7.

### 6.3 Análises dos óleos essenciais

Os óleos essenciais extraídos das folhas de *B. ligustrina* foram obtidos através de hidrodestilação e analisados através de cromatografia a gás (CG) e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). Foram realizadas seis coletas ao longo de 2009, e os resultados destas análises estão apresentados na tabela 11.





Componente	IK	Proporção relativa (%)								
		Fevereiro		Abril		Junho		Agosto	Outubro	
		F	M	F	M	F	M	M	F	M
Espatuleno	1576	35,9	2,2	-	-	-	-	33,3	-	23,1
Oxido de cariofileno	1581	1,3	-	38,0	-	27,8	-	-	34,0	-
$\alpha$ -Cadinol	1640	7,4	24,7	6,9	3,3	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Bisabolol		-	-	-	-	-	-	-	1,9	-
$\tau$ -Muurolol	1641	7,3	9,9	-	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Z-Epoxibisaboleno	1504	-	-	-	-	-	36,3	-	-	-
Hidrocarbonetos monoterpênicos		0,6	-	4,1	0,5	50,8	31,0	10,3	3,4	-
Monoterpenos oxigenados		0,8	-	9,5	-	5,2	5,7	-	-	-
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		5,3	-	8,7	71,3	-	-	-	-	
Sesquiterpenos oxigenados		51,9	41,3	44,9	5,9	27,8	36,3	34,5	35,9	23,3
Total		58,6	41,3	67,2	77,7	83,8	73,0	55,1	39,3	23,3

Como pode ser observado na tabela 13 foram identificados 21 constituintes químicos nos óleos essenciais, que correspondem a 23,3-83,8%. Como foi dito anteriormente, o óleo essencial extraído das folhas do indivíduo feminino coletadas em agosto foi extraviado. Além disso, a porcentagem de identificação dos óleos do indivíduo masculino (fevereiro e outubro) e do indivíduo feminino (outubro) foi abaixo de 50%. Assim, decidiu-se pela continuidade deste estudo, e serão extraídos e analisados os óleos essenciais coletados das folhas nos mesmos meses e dos mesmos indivíduos em 2010.

De maneira geral, os derivados sesquiterpênicos predominam sobre os monoterpênicos na maioria dos óleos analisados, exceto nos de junho, e principalmente para o indivíduo feminino. Nos óleos extraídos das folhas coletadas em junho dos indivíduos feminino e masculino, o teor de monoterpenos observado foi de 53,0 e 36,7%, respectivamente, sendo  $\beta$ -pineno o constituinte que mais contribui para este resultado. Com relação à presença de sesquiterpenos, verifica-se uma diminuição do teor desses derivados no óleo do indivíduo feminino em relação aos teores observados nos óleos de fevereiro e abril. No entanto, para o indivíduo masculino, o óleo extraído das folhas coletada em abril, o teor de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (71,3%) foi superior ao dos derivados C15 oxigenados (5,9%). É importante ressaltar que no mês de junho os indivíduos estavam floridos.

No mês de agosto ambos os indivíduos estavam em plena floração, e o teor de monoterpenos diminuiu no indivíduo masculino (10,3%), também observado no óleo extraído do indivíduo feminino em outubro (3,4%). É interessante apontar que no mês de outubro foram obtidos os maiores rendimentos de extração dos óleos, tanto para o indivíduo feminino como para o masculino, sendo 0,26% e 0,19% respectivamente, conforme os dados apresentados na tabela 8.

Os constituintes majoritários identificados nos óleos extraídos do indivíduo feminino foram:  $\beta$ -pineno (50,8%, em fevereiro), óxido de cariofileno (38,0%, em abril) e espatulenol (35,9%, em fevereiro). Considerando-se o indivíduo masculino, os componentes identificados como majoritários foram: germacreno D (37,5% em abril), *trans*-Z-

epoxibisaboleno (36,3% em junho), espatulenol (33,3% em agosto) e  $\beta$ -pineno (31,0% em junho).

As análises dos óleos extraídos em dezembro não foram satisfatórias, pois na confrontação dos espectros de massas obtidos com os das bibliotecas não houve semelhança acima de 90%, motivo pelo qual os dados não foram incluídos na tabela 13. Estas amostras serão submetidas a novas análises por CG e CG/EM visando a identificação dos componentes.

Em estudo realizado com seis espécies de *Baccharis* de Campos do Jordão (*B. dracunculifolia*, *B. microdonta*, *B. regnelli*, *B. schultzii*, *B. trimera* e *B. uncinella*) foi verificada a predominância de sesquiterpenos nos óleos essenciais extraídos das seis espécies (Lago et al., 2008a). Essa mesma tendência foi observada nos óleos extraídos de um indivíduo feminino e de um masculino de *B. trimera* em época de floração da mesma região (Lago et al., 2008b). No entanto, de indivíduos masculino e feminino floridos de *Baccharis pentziifolia* foram extraídos óleos com alto teor de monoterpenos (Ferreira et al., 2009), assim como foi observado para *B. ligustrina* em época de floração neste trabalho.

#### **6.4 Avaliação das atividades biológicas**

Os extratos brutos, fases de partição a algumas frações cromatográficas foram submetidas à avaliação das atividades antibacteriana, antirradicalar, anticolinesterase e antiinflamatória.

##### **6.4.1 Avaliação da atividade antibacteriana**

Após a obtenção do extrato metanólico das folhas, e das fases em hexano, DCM e em AcOEt, os mesmos foram submetidos à avaliação da atividade antimicrobiana frente aos microrganismos: *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus gallolyticus*, e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 14. Não foi observada a formação de halos de inibição frente às bactérias *E. faecalis* e *S. gallolyticus*, o que indica que estas bactérias são resistentes frente a estes extratos.

**Tabela 14.** Resultados dos testes de avaliação da atividade antimicrobiana.

Amostra	Diâmetros dos halos de Inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i>
1	7	6,5
2	7,5	7
3	6,5	6,5
4	6,5	6,5
Gentamicina	22,7	23,7

( - ) não apresentou halo inibição.

1: extrato metanólico bruto de folhas; 2: fase em hexano das folhas; 3 fase em AcOEt das folhas 4: fase em DCM das folhas.

Todas as amostras testadas mostraram-se fracamente ativas frente a *S. aureus* e a *M. luteus*, por comparação com o antibiótico padrão, gentamicina. O solvente DMSO utilizado como controle negativo não apresentou nenhuma atividade antibacteriana frente aos organismos testados.

#### **6.4.2 Avaliação da atividade antirradicalar**

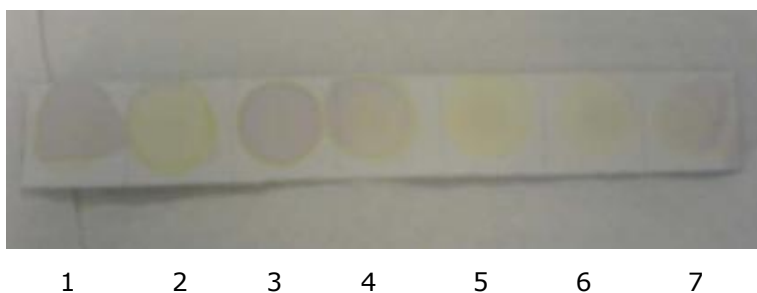
O ensaio frente ao DPPH foi realizado com os extratos hexânico e metanólico brutos de folhas, com o extrato metanólico bruto de galhos, e com as fases de partição do extrato metanólico das folhas: fase em hexano, em DCM e em AcOEt. Para a realização dos experimentos adotou-se um procedimento simples, no qual as amostras são aplicadas em uma placa cromatográfica de sílica, e sobre as mesmas aplica-se a solução de DPPH (Macari, 2006). O teste é considerado positivo quando a coloração violeta da solução de DPPH muda para amarelo, e utilizou-se quercetina como controle positivo.

##### **6.4.2.1 Análise qualitativa da atividade antirradicalar**

Após a aplicação das soluções na placa cromatográfica (Figura 12), foi possível observar que as soluções do extrato hexânico bruto e da fase em hexano (HEX) das folhas apresentaram baixa atividade antirradicalar. A

fase em DCM apresentou atividade antirradicalar moderada em relação ao controle positivo, e o extrato metanólico dos galhos, a fase em acetato de etila (AcOEt) e o extrato metanólico de folhas *B. microdonta* apresentaram maior atividade antirradicalar, pois a mudança de coloração se deu assim que a solução de DPPH foi aplicada.

Devido a baixa atividade antirradicalar, o extrato hexânico e a fase em hexano foram descartados, e os demais extratos foram então submetidos ao ensaio para determinação do limite de atividade.

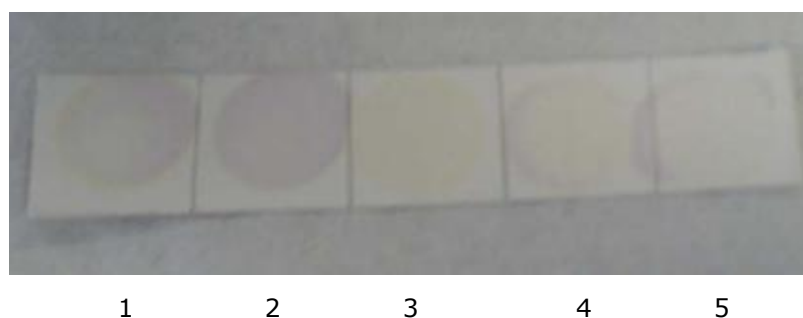


**Figura 12** – Placa cromatográfica após revelação com DPPH.

1- Extrato em hexano bruto de folhas; 2- Extrato MeOH de folhas; 3- Fase em hexano; 4- Fase em DCM; 5- Fase em AcOEt; 6- Extrato MeOH de galhos; 7- Quercetina

#### **6.4.2.2 Determinação do limite da atividade antirradicalar**

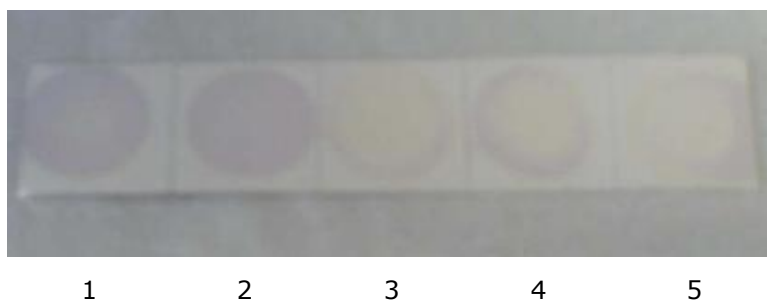
A partir das soluções-estoque ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) foram realizadas diluições para a obtenção de soluções com concentrações finais de 250, 125, 50 e  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , as quais foram submetidas para avaliação da atividade antirradicalar pelo mesmo procedimento. Este procedimento tem como objetivo verificar as concentrações mínimas das amostras que apresentam atividade antirradicalar frente ao DPPH e os resultados obtidos são apresentados nas figuras 13 a 16.



**Figura 13** – Placa cromatográfica após revelação com DPPH ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

1 - Extrato MeOH de folhas; 2 - Fase em DCM; 3 - Fase em AcOEt; 4 - Extrato MeOH dos galhos; 5 - quercetina

Os resultados do procedimento apresentado na figura 13 indicam que o extrato MeOH das folhas e a fase em DCM não apresentaram mudança de coloração significativa, portanto apresentam baixa atividade antirradicalar nesta concentração. Já com a fase em AcOEt e o extrato MeOH dos galhos, a mudança de coloração foi imediata e estes apresentaram maior atividade antirradicalar em relação ao controle positivo (Quercetina).



**Figura 14** – Placa cromatográfica após revelação com DPPH ( $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

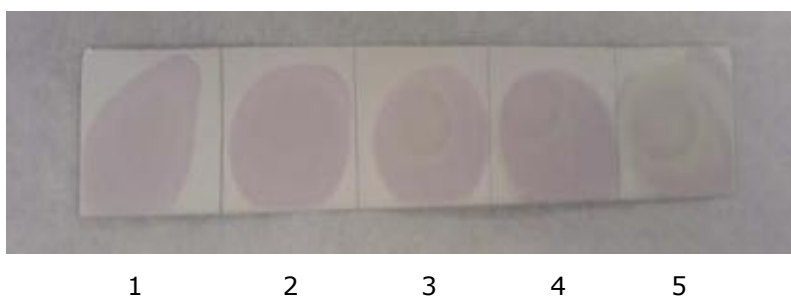
1 - Extrato MeOH de folhas; 2 - Fase em DCM; 3 - Fase em AcOEt; 4 - Extrato MeOH dos galhos; 5 - quercetina

Quando foram testadas soluções das amostras com concentração  $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ , o extrato MeOH das folhas e a fase em DCM apresentaram atividade antirradicalar muito baixa e a fase em AcOEt e o extrato MeOH dos galhos apresentaram-se mais ativos.



**Figura 15** – Placa cromatográfica após revelação com DPPH ( $50 \mu\text{gmL}^{-1}$ ).  
 1 - Extrato MeOH de folhas; 2 - Fase em DCM; 3 - Fase em AcOEt; 4 - Extrato MeOH dos galhos; 5 - quercetina

Os resultados obtidos quando se utilizou solução com concentração  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  indicam que nesta concentração, o extrato MeOH das folhas apresentou uma leve descoloração e a fase em DCM não descoloriu. Por outro lado, a fase em AcOEt e o extrato MeOH dos galhos, apresentaram mudança de coloração após alguns segundos, sugerindo baixa atividade antirradicalar.



**Figura 16** – Placa cromatográfica após revelação com DPPH ( $25 \mu\text{gmL}^{-1}$ ).  
 1 - Extrato MeOH de folhas; 2 - Fase em DCM; 3 - Fase em AcOEt; 4 - Extrato MeOH galhos; 5 - quercetina

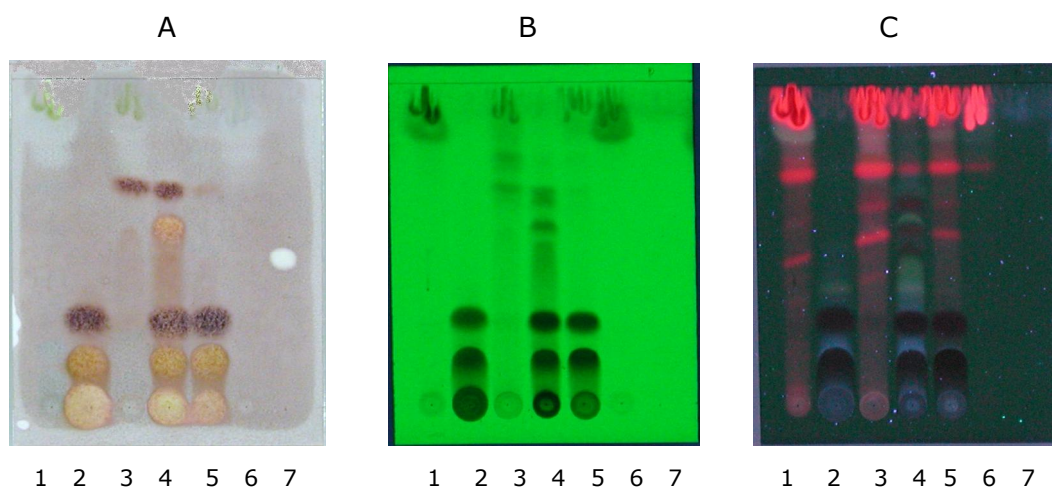
Tanto a fase em AcOEt como o extrato MeOH dos galhos apresentaram atividade antirradicalar muito baixa em relação ao controle positivo, pois praticamente não foi observada alteração do DPPH.

#### 6.4.3 Avaliação da atividade anticolinesterásica

Para a avaliação da atividade anticolinesterásica, amostras de extratos e fases da espécie *B. microdonta* foram solubilizadas em MeOH na



concentração de  $40\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e alíquotas de  $5\mu\text{L}$  foram aplicadas em placa de sílica gel, juntamente com  $2,5\mu\text{L}$  de fisostigmina ( $20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), utilizado como padrão positivo. Após a eluição em  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  8:2 a placa foi submetida ao ensaio biológico para detecção de atividade anticolinesterásica e fotografada sob luz branca (VIS), conforme a figura 17(A). A placa foi fotografada sob irradiação de luz ultravioleta 254 nm (17 B) e 366 nm (17 C) antes de ser revelada.



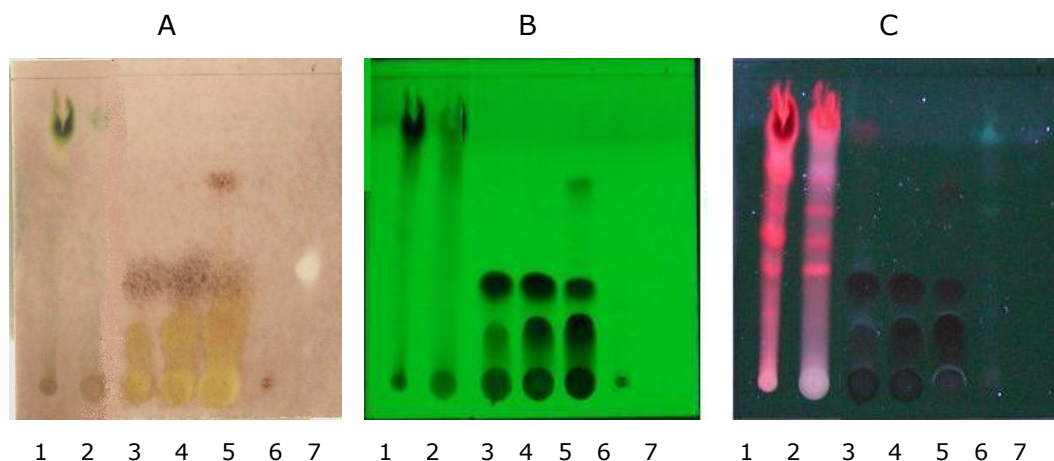
**Figura 17** - Cromatograma contendo amostras de *B. microdonta* em luz branca após revelação com acetilcolinesterase (A), em UV 254 nm (B) e em 366nm (C); 1 - Fase em hexano; 2 - Fase em *n*-butanol; 3 - Fase DCM; 4 - Fase AcOEt; 5- Extrato MeOH; 6- Extrato bruto em hexano; 7- Fisostigmina

O teste qualitativo caracteriza como possíveis inibidores de acetilcolinesterase os compostos que apresentarem halos brancos em uma ou várias regiões de seu deslocamento pela placa de sílica, conforme o observado para o padrão fisostigmina (7). As fases em hexano (1) e DCM (3) e o extrato bruto em hexano (6) apresentaram halos de fraca intensidade na parte superior da placa, portanto não demonstraram capacidade significativa de inibição frente a enzima AChE.

Por outro lado, as fases em *n*-butanol (2) e em AcOEt (4), e o extrato MeOH (5) apresentaram halos esbranquiçados com tonalidade amarelada em  $R_f$ : 0,0, e esbranquiçados com coloração mais fortemente amarelada em  $R_f$ : (0,14) e  $R_f$ : (0,55) (amostra 4), denotando um possível, mas ainda

inconclusivo potencial de atividade anticolinesterásica destas amostras, devido a diferença de tonalidade apresentada em comparação ao padrão fisostigmina.

A fase em AcOEt e algumas de suas frações cromatográficas foram submetidas a CCDC nas mesmas concentrações e mesmo sistema eluente da análise anterior, conforme a figura 18. Os outros pontos de aplicações na placa cromatográfica correspondem a amostras testadas de outra espécie de *Baccharis*.



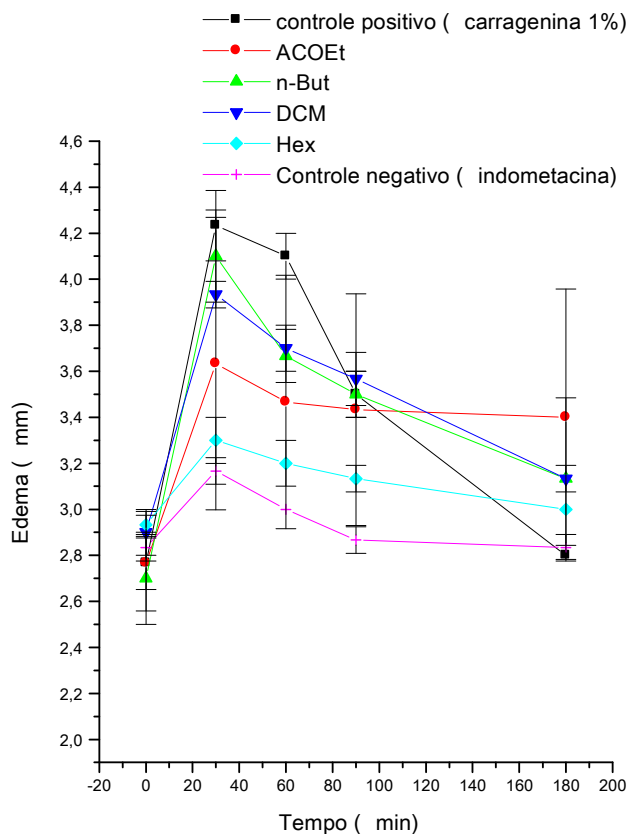
**Figura 18** - Cromatograma contendo amostras de *B. microdonta* em luz branca após revelação com acetilcolinesterase (A), em UV 254 nm (B) e em 366nm (C); 3 -ACE(S)-4; 4-ACE(S)-5; 5- ACE(S)-6; 6- ACE(S)-10; 7- Fisostigmina

As amostras ACE(S)-4 (3), ACE(S)-5 (4) e ACE(S)-6 (5) oriundas do fracionamento da fase em AcOEt de *B. microdonta* apresentaram halos esbranquiçados na base e no Rf: (0,0) e em Rf (0,16), semelhante ao observado para a fase AcOEt (fig. 17A). No entanto, devido à coloração observada, tais resultados ainda são inconclusivos para avaliação positiva de atividade anticolinesterásica. Assim, é necessária a realização de testes mais aprofundados para que se possa comprovar esta atividade para as substâncias que constituem tais frações cromatográficas.

Os glicosídeos quercetina-3-O-ramnosídeo (quercitrina, **4**) e kaempferol-3-O-ramnosídeo (afzelina, **5**) foram identificados em mistura, através de análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do grupo ACE(S)-5, e senso os constituintes majoritários das fases ACE(S)-4 e ACE(S)-6.

#### 6.4.4 Avaliação da atividade antiinflamatória

O efeito inflamatório foi induzido através da injeção de solução de carragenina a 1%, a qual produziu um edema na pata após 30 minutos da aplicação ( $C=4,2 \pm 0,15$  mm;  $n=5$ ), como mostrado na figura 19. A administração prévia (60 minutos) de indometacina resultou em um edema menor ( $C = 3,0 \pm 0$  mm) em relação ao controle positivo. As fases de partição do extrato metanólico de *B. microdonta* (em hexano, em DCM, em AcOEt e em n-BuOH) foram testadas na dose de  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , e a que se mostrou mais efetiva na redução do edema foi a fase em hexano, uma vez que o efeito é próximo do encontrado para o controle negativo (figura 19).



**Figura 19** - Efeito das fases de partição do extrato MeOH de *B. microdonta* (HEX, DCM, n-But e AcOEt) no desenvolvimento do edema induzido pela injeção intraplantar de carragenina 1% em ratos.

As análises das frações cromatográficas da fase em hexano indicaram que o constituinte majoritário desta fase é o ácido caurenóico (5.3.1 e

6.1.1), o qual, segundo a literatura, apresenta atividades biológicas interessantes, tais como antimicrobiana, citotóxica e antiinflamatória (VIEIRA et al, 2002). Portanto, é possível que o resultado obtido para a fase em hexano seja devido a presença desta substância em quantidade significativa. Novos testes com o ácido caurenóico serão realizados a fim de comprovar a atividade observada.

Os edemas medidos nas patas dos animais que receberam tratamento prévio com as fases AcOEt, DCM e n-BuOH ( $3,6 \pm 0,63$  mm,  $3,9 \pm 0,05$  mm e  $4,1 \pm 0,2$  mm respectivamente) apresentaram resultados menos significativos que a fase em hexano.

## 7 CONCLUSÕES

O estudo químico realizado com o extrato metanólico das folhas de *Baccharis microdonta* resultou no isolamento e determinação estrutural de três diterpenos com esqueleto *ent*-caurano, o ácido caurenóico, o ácido grandiflórico e o ácido 15-O-acetil-grandiflórico, além de dois flavonóides glicosilados, quercitrina e afzelina. Além disso, foram extraídos e analisados os óleos essenciais de folhas de um indivíduo feminino e de um masculino de *Baccharis ligustrina*, a partir de folhas coletadas ao longo de 2009, totalizando seis coletas. Foram identificados 21 constituintes, com predomínio de componentes terpênicos.

Extratos, fases de partição e algumas frações cromatográficas foram submetidos à avaliação de algumas atividades biológicas. Verificou-se que as amostras testadas apresentaram fraca atividade antibacteriana frente a *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*. Com relação à atividade antirradicalar frente ao DPPH, observou-se que os extratos metanólicos das folhas e dos galhos mostraram-se ativos, tendo como referência a atividade exibida por quercetina. No entanto, após a partição do extrato metanólico das folhas, a fase em acetato de etila apresentou maior atividade em relação às demais fases de partição.

Após a realização dos ensaios de avaliação da atividade anticolinesterásica, verificou-se que a fase em acetato de etila e frações cromatográficas apresentaram halos esbranquiçados após a revelação dos cromatogramas. Tal resultado foi considerado inconclusivo, e novos ensaios devem ser realizados para comprovar essa atividade. Finalmente, o método de indução de edema de pata em ratos por administração de carragenina, utilizado para o estudo da atividade antiinflamatória, sugeriu a fase em hexano como a mais ativa.

## **8 FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS**

### **8.1 Alunos de Iniciação Científica**

8.1.1 Evelyn Moraes Baptista

Curso – Química, 5º semestre.

Agencia de Fomento para bolsa de estudo: MACKPESQUISA.

8.1.2 Gustavo José Vasco Pereira

Curso – Farmácia, 6º semestre.

Agencia de Fomento para bolsa de estudo: MACKPESQUISA.

8.1.3 Michael Jefferson Amorim de Oliveira

Curso – Farmácia, 6º semestre.

Agencia de Fomento para bolsa de estudo: PIBIC/CNPq.

8.1.4 Wesley Ribeiro Richard

Curso – Química, 6º semestre.

Agencia de Fomento para bolsa de estudo: PIBIC/MACKPESQUISA.

8.1.5 Eduardo Yamada

Curso – Farmácia, 5º semestre.

Agência de Fomento para bolsa de estudo: PIVIC/MACKPESQUISA.

## **9 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA**

### **9.1 Comunicações em Congressos Científicos**

9.1.1 *Ent*-kaurane diterpene and glycosidic flavonoids from *Baccharis microdonta* (ASTERACEAE).

Autores: Michael J. A. de Oliveira, Wesley R. Richard, Marcelo J. P. Ferreira<sup>1</sup>, Oriana A. Fávero, Fátima O. Souza Buturi, João Henrique G. Lago e Paulete Romoff.

Evento: 2<sup>ND</sup> Brazilian Conference on Natural products (BCNP)

Local: São Pedro, S.P.

Data: 9 a 12 de novembro de 2009.

9.1.2 Variação sazonal da constituição química dos óleos essenciais de indivíduos masculino e feminino de *Baccharis ligustrina* DC.

Autores: Alyne W. de Oliveira, Paulete Romoff, Marcelo J. Pena Ferreira, Oriana A. Fávero, João Henrique G. Lago e Fátima O. Souza Buturi.

Evento: 33<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Local: Águas de Lindóia, S.P.

Data: 28 a 31 de maio de 2010.

Observação: o trabalho submetido encontra-se em análise.

9.1.3 Diterpenos ent-caurânicos isolados das folhas de *Baccharis microdonta* DC. (Asteraceae).

Autores: Michael J. A. de Oliveira, Thais Forghieri, Paulete Romoff, Marcelo J. P. Ferreira, Oriana A. Fávero, João H. G. Lago, Fátima O. S. Buturi.

Evento: 33<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Local: Águas de Lindóia, S.P.

Data: 28 a 31 de maio de 2010.

Observação: o trabalho submetido encontra-se em análise.

## 9.2 Trabalhos de Monografia

### 9.2.1 Alyne Wanseele de Oliveira

Título: Análise e comparação da composição química dos óleos essenciais de indivíduos masculinos e femininos de *Baccharis ligustrina* D.C..

Monografia apresentada no Centro de Ciências e Humanidades, Universidade Presbiteriana Mackenzie, em novembro de 2009.

### 9.2.2 Carla Albuquerque Garcia

Título: Avaliação do potencial antibacteriano de *Baccharis microdonta* D.C..

Monografia apresentada no Centro de Ciências e Humanidades, Universidade Presbiteriana Mackenzie, em novembro de 2009.

### 9.2.3 Eliane Cristina de Freitas

Título: Avaliação da atividade anticolinesterásica em espécies vegetais do gênero *Baccharis*.

Monografia apresentada no Centro de Ciências e Humanidades, Universidade Presbiteriana Mackenzie, em novembro de 2009.

### 9.2.4 Josy Rodrigues de Sousa

Título: Avaliação do potencial antirradicalar de espécies de *Baccharis microdonta*.

Monografia apresentada no Centro de Ciências e Humanidades, Universidade Presbiteriana Mackenzie, em novembro de 2009.

### 9.2.5 Thais Forghieri

Título: Isolamento e identificação de ácido caurenóico em *Baccharis microdonta*.

Monografia apresentada no Centro de Ciências e Humanidades, Universidade Presbiteriana Mackenzie, em novembro de 2009.



## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ADAMS, R.P. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography /mass spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream.

AGOSTINI, F.; SANTOS, A.C.A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M.R.; ZATTERA, F.; WASUM, R.; SERAFINI, L.A. (2005). Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) so sul do Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* **15**, 215-220.

AGRAWAL, P.K. and BANSAL, M. C. (1989). Flavonoid glycosides. In Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier, Amsterdam, 283-354.

ALMEIDA-CORTEZ, J.S.; SHIPLEY, B.; ARNASON, J.T. (1999). Do plant species with high relative growth rates have poorer chemical defences? *Funct. Ecol.* **13**, 819-827.

AMARO-LUIS, J.M. (1993). An ent-kaurenolide from *Stevia lucida*. *Phytochemistry* **32**, 1611-1613.

BOHLMANN, F.; KRAMP, W.; GRENZ, M.; ROBINSON, H.; KING, R.M. (1981a). Diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry*, **20**, 1907-1913.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; GRENZ, M.; DHAR, A.K.; ROBINSON, H.; KING, R.M. (1981b). Five diterpenes and other constituents from nine *Baccharis* species. *Phytochemistry*, **20**, 281-286.

BOHM, B.A.; STUESSY, T.F. (2001). Flavonoids of the sunflower family. SpringerWien, New York.

CIFUENTE, D.A.; SIMIRGIOTIS, M.J.; FAVIER, L.S.; ROTELLI, A.E.; PELZER, L.E. (2001). Antiinflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sophiifolia* in mice. *Phytother. Res.* **15**, 529-531.

COBOS, M.I.; RODRIGUEZ, J.L.; OLIVA, M.L.; DEMO, M.; FAILLACI, S.M.; ZYGADLO, J.A. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserghila*. *Planta Med.* **67**, 84-86.

ECKERT, C.R.; OLIVEIRA, HY.M.R.; RAMOS, R.C.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G.; ROMOFF, P.; BAADER, J.W. (2007). Isolation and antiradical

evaluation of cinnamic acid derivatives from *Baccharis regnellii* (Asteraceae). Trabalho apresentado no 1<sup>st</sup> Brazilian Conference on Natural Products, 4 a 7 de novembro, São Pedro, São Paulo, Brasil.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D., JR., V.A.; FEATHERSTONE, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95.

EMERENCIANO, V.P.; MILITÃO, J.S.L.T.; CAMPOS, C.C.; ROMOFF, P.; KAPLAN, M.A.C.; ZAMBON, M.; BRANDT, A.J.C. (2001). Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **29**, 947-957.

FAINI, F.; LABBE, C.; COLL, J. (1999). Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. *Biochem. Syst. Ecol.* **27**, 673-679.

FERREIRA, M. J. P.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; BUTURI, F. O. S.; LAGO, J. H. G.; APEL, M. A. & HENRIQUES, A. T. (2009). Chemical composition of essential oil from *Baccharis pentziifolia*. Trabalho apresentado no 2<sup>ND</sup> Brazilian Conference on Natural products (BCNP), 9 a 12 de novembro, São Pedro, S.P.

FULLAS, F.; HUSSAIN, R.A.; CHAI, H-B.; PEZZUTO, J.M. (1994). Cytotoxic Constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. *J. Nat. Prod.* **57**, 801-807.

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.M.B.; BRITO, N.R. (2002). Integration of ethnobotany and phytochemistry: dream or reality? *Phytochemistry* **60**, 145-152.

HANSON, J.R.; SIVERNS, M.; PIOZZI, F.; SAVONA, G. (1976). The <sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance spectra of kauranoid diterpenes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**, 114-114.

HERAS, B.D.L.; SLOWING, K.; BENEDÍ, J.; CARRETERO, E.; ORTEGA, T.; TOLEDO, C.; BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M.J.; GÓMEZ-SERRANILLOS, P.; LISO, P.A.; VILLAR, A.; CHIRIBOGA, X. (1998). Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J. Ethnopharm.* **61**, 161-166.

HSIAO, G.; SHEN, M.-Y.; LIN, K.-H.; LAN, M.-H.; WU, L. Y.; CHOU, D.-S., LIN, C.-H.; SU, C.-H. & SHEU, J.-R. (2003). Antioxidative and

hepatoprotective effects of *Antrrodia camphorata* extract. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3302-3308.

ISENBERG, H. D. (1992). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, American Society for Microbiology, v.1.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.N.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. (1997). Antimicrobial susceptibility testing. In: *Colors Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology*. 5<sup>a</sup>ed., New York: Lippincott.

LAGO, J.H.G.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; SOARES, M.G.; BARALDI, P.T.; CORRÊA, A.G.; SOUZA, F.O. (2008a). Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de "Campos de Altitude" da mata atlântica paulista. *Quim. Nova* **31**, 727-730.

LAGO, J.H.G.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; SOUZA, F.O.; SOARES, M.G.; BARALDI, P.T.; CORRÊA, A.G. (2008b). Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. *Biochem. Syst. Ecol.* **36**, 737-740.

LIMA, C., CLISSA, B. P., PIRAN-SOARES, A. A., TANJONI, I., SILVA, A. M. M., FERREIRA, M. L. (2003). Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mice model of tissue injury. *Toxicon*, 42, 499-507.

MACARI, P.A.T.; PORTELA, C.N.; POHLIT, A.M. (2006) Antioxidant, cytotoxic and UVB-absorbing activity of *Maytenus guyanensis* Klotzch. (Celastraceae) bark extracts. *Acta Amazonica* **36**, 513-518.

MENDEZ, J., BILIA, A. R. e MORELLI, I. (1995) Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania pittieri*. *Pharm. Acta Helv.* **70**, 223-226.

McLAFFERTY, F.W.; STAUFFER, D. (1989). *The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data*. John Wiley Sons, New York.

MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; TALOU, J.R.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. (1997). In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. *J. Ethnopharm.* **58**, 157-163.

NASCIMENTO, A. M.; OLIVEIRA, D.C.R. (2001). Kaurene diterpenes and other chemical constituents from *Mikania stipulacea* (M. Vahl) Willd. *J. Braz. Chem. Soc.* **12**, 552-555.

OHNO, N.; MABRY, T.J. (1980). Sesquiterpene lactones and diterpene carboxylic acids in *Helianthus niveus* subspecies *canescens*. *Phytochemistry*, **19**, 609-614.

OLIVEIRA, S.Q.; DAL-PIZZOL, F.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; MOREIRA, J.C.F.; SCHENKEL, E.P. (2003). Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: Isolation of a new compound with antioxidant activity. *Free Radical Res.* **37**, 555-559.

PALACIOS, P.; GUTKIND, G.; RONDINA, R.V.D.; TORRES, R.; COUSSIO, J.D. (1983). Genus *Baccharis*. *Planta Med.* **49**, 128-128.

RENÉ, R.M.; CARTAÑA, C.; ADZET, T.; MARÍN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. (1996) Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of its active constituents. *Planta Med.* **62**, 232-235.

RHEE, I.K.; MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. (1991). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J. Chromat. A*, **915**, 217-223.

ROZZA, D.B.; RAYMUNDO, D.L.; CORRÊA, A.M.R.; LEAL, J.; SEITZ, A.L.; DRIEMEIER, D.; COLODEL, E.M. (2006). Intoxicação espontânea por *Baccharis coridifolia* em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* **26**, 21-25.

SILVA, D.H.S. (1997). "Constituintes químicos de *Iryanthera sagotiana* e *Iryanthera lancifolia*". Tese de Doutorado. IQ-USP.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. (2005). Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim. Nova* **28**, 85-94.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. (2004). Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento de Alzheimer. *Quim. Nova* **27**, 655-660.

VIEIRA, H.S.; TAKAHASHI, J.A.; OLIVEIRA, A.B.; CHIARI, E.; BOAVENTURA, M.A.D. (2002). Novel derivatives of kaurenoid acid: preparation and evaluation of their trypanocidal activity. *J. Braz. Chem. Soc.* **13**, 151-157.

YAMASAKI, K.; KOHDA, H.; KOBAYASHI, T.; KASAAI, R.; TANAKA, O. (1976). Structures of Stevia diterpene-glucosides: Application of  $^{13}\text{C}$  NMR. *Tetrahedron Lett.* **17**, 1005-1008.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F. (1990). Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. *Plant. Syst. Evol.* **171**, 1-14.