

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Departamento de Botânica

PAULO ROBERTO FERRARI ZAMPIERI

***Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae):**

**Substâncias fenólicas, influência do dioicismo e
atividades antirradicalar e citotóxica**

***Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae):**

**Phenolic compounds, dioecism influence and
antiradical and cytotoxic activities**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo J. Pena Ferreira

São Paulo

2019

A versão em questão trata-se do exemplar corrigido.
A versão original encontra-se na Biblioteca do Departamento de
Bióciências da Universidade de São Paulo.

Prof. Dr. Marcelo J. Pena Ferreira
Orientador(a)

PAULO ROBERTO FERRARI ZAMPIERI

***Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae):
Substâncias fenólicas, influência do dioicismo e
atividades antirradicalar e citotóxica**

***Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae):
Phenolic compounds, dioecism influence and
antiradical and cytotoxic activities**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Botânica.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo J. Pena
Ferreira

São Paulo

2019

Ficha Catalográfica

Zampieri, Paulo Roberto Ferrari
Baccharis oblongifolia (Ruiz & Pav.) Pers.
(Asteraceae) : Substâncias fenólicas, influência do
dioicismo e atividades antirradicalar e citotóxica /
Paulo Roberto Ferrari Zampieri ; orientador Marcelo José
Pena Ferreira. -- São Paulo, 2019.

143 f. + anexo

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica.

1. Baccharis. 2. Ácidos clorogênicos. 3. Flavonoides.
I. Ferreira, Marcelo José Pena, orient. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof. Dr. Marcelo J. Pena Ferreira
Orientador(a)

“Nenhuma atividade no bem é insignificante...
As mais altas árvores são oriundas de
minúsculas sementes”

Chico Xavier

Agradecimentos

À Deus por fazer morada em meu coração e iluminar meus caminhos sempre, sem ele não haveria esse momento.

Aos meus pais, meu eterno porto seguro, por me estimularem a querer buscar mais conhecimentos e poder semeá-los aos demais, sem eles não teria uma base de formação tão prestimosa.

À minha irmã Tetê, por ser minha alma gêmea nessa vida e por sempre me estimular com sua felicidade e seu positivismo inesgotável.

Ao meu companheiro Ricardo pela confiança, dedicação e apoio em todos os momentos, acreditando sempre em mim.

À memória de minha avó querida, que me ensinou como ser um homem de bem e que com amor e carinho conseguimos arrancar sorriso dos rostos mais fechados.

Em memória ao meu cachorro Kevin, por sempre me dar atenção nos treinos de apresentação e por sempre me acompanhar em meus estudos desde a minha primeira graduação, o primeiro cão agente nunca mais esquece.

Aos meus amigos da Fitoquímica: Pâmela, Leyde, Gislaine, Tamara, Carlos, Priscila, Andressa e Lucas meus agradecimentos por tornar a vida mais bela e marcar fortes laços de amizade que ficaram marcado para sempre em nossos corações.

Aos amigos e companheiros acadêmicos: Nizi, Juliana, Victor, Marcelo, Chris, Marcela e Luiza por estarem sempre dispostos e cheios de energia para dividir.

À aluna Karen Velasco pelos ensinamentos e auxílio das análises citotóxicas junto à professora Dra. Letícia Veras Costa Lotufo.

Em especial pela amiga Cinthia, pelos ensinamentos e por ser exemplo de pessoa que ama o que faz. De fato, sempre há o estímulo de tornarmos pessoas melhores quando estamos juntos.

À Gizely Cavalcante por trazer todas as energias radiantes do Rio Grande do Norte e deixar o laboratório repleto de boas vibrações.

As técnicas Aline e Mourisa por oferecer todo suporte e ser pessoas competentes e sempre dispostas a dividir suas experiências. Além disso pelas risadas inesquecíveis, sentirei falta das nossas conversas.

Aos professores: Dr. Antônio Salatino, Dra. Maria Luíza por serem transmissores de infinito conhecimento e por serem sempre amáveis e gentis. À professora Dra. Déborah pela honra em ter participado como presidente da minha banca de defesa da qualificação, oferecendo sugestões tão preciosas e à professora Dra. Cláudia por ser sempre exemplo de honestidade, além disso, por ter me apresentado ao meu orientador.

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo J. Pena Ferreira, por dividir seu conhecimento vasto, pela ajuda e apoio em todos os momentos ao longo dessa etapa da minha vida e por me ensinar lições valiosas de como ser um grande profissional como ele.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL	10
Capítulo 1. Constituintes fenólicos de <i>Baccharis oblongifolia</i> (Ruiz & Pav.) Pers. e análise da influência do dioicismo	19
ABSTRACT	19
RESUMO	20
1.1. INTRODUÇÃO	21
1.2. OBJETIVOS	26
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
1.3.1. Coleta do material vegetal	27
1.3.2. Instrumentação e Condições de análise	27
1.3.3. Materiais e Reagentes utilizados	28
1.3.4. Procedimentos experimentais	28
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
1.5. CONCLUSÃO	61
Referências Bibliográficas	62
Capítulo 2. <i>Baccharis oblongifolia</i>: Análise da atividade antirradicalar e citotóxica	67
ABSTRACT	67
RESUMO	68
2.1. Radicais Livres e Atividade Antirradicalar	69
2.2. Citotoxicidade	76
2.3. Objetivos	79
2.4. Materiais e Métodos	79
2.4.1. Coleta do material vegetal	79
2.4.2. Materiais e Reagentes utilizados	80
2.4.3. Preparo dos extratos e fases de partição de <i>Baccharis oblongifolia</i>	80
2.4.4. Grupos e substâncias avaliadas nos ensaios propostos	80
2.4.5. Ensaios para avaliação antirradicalar	81
2.4.6. Atividade citotóxica	83
2.5. Resultados e Discussão	84

2.5.1. Ensaio antirradicalares.....	84
2.5.2. Atividade Citotóxica	99
2.6. Conclusão	102
Referências Bibliográficas	104
Resumo (GERAL)	112
Abstract	113
Discussão Geral e Conclusões	114
Referências Bibliográficas	116
Anexos	119

INTRODUÇÃO GERAL

O despertar sobre culturas antigas e como elas utilizavam os produtos naturais ao seu favor fizeram estudiosos pesquisarem a origem de processos de mumificação, controle de pragas, pinturas, tingimentos, venenos, alívio e cura de doenças, geralmente associados ao uso de plantas (VIEGAS JR. et al., 2006).

O emprego dos produtos naturais teve início com o papiro de Ebers, encontrado na tumba mortuária de Ramsés II. Descoberto por George Ebers foi traduzido pela primeira vez por H. Joachin o qual descreveu cerca de cem doenças e um número considerável de drogas de origem vegetal e animal (PINTO et al., 2002).

Caminhando um pouco mais pela história; a vinda da corte de Portugal em 1808, após liberação dos portos brasileiros às nações amigas por Dom João VI, marcou o início de várias expedições científicas ao Brasil, dessa maneira, teve início a descrição da flora brasileira e, posteriormente, a fitoquímica nacional iniciou-se através dos trabalhos do botânico Carl Friederich von Martius, abrindo um campo de pesquisa da flora nacional (PINTO et al., 2002).

A história do Brasil é exemplo de como os produtos naturais foram e são até hoje comercializados em nosso país. Antigamente o corante vermelho extraído de espécies de *Caesalpinia echinata* Spreng. (Fabaceae), popularmente conhecida como pau-brasil, era cobiçado por portugueses com a finalidade de tingimento. Os constituintes responsáveis pela tonalidade avermelhada são a brasileína, oriunda da oxidação da brazilina (figura 1) (VIEGAS JR. et al., 2006).

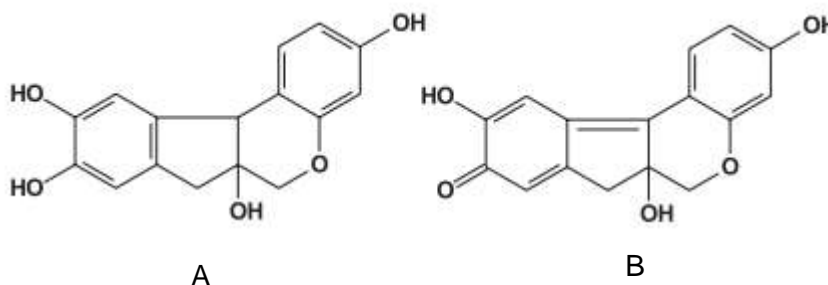


Figura 1. Estruturas químicas da brazilina (A), produto natural isolado de *C. echinata* e da brasileína (B), derivado oxidado de A e responsável pela cor vermelha do pau Brasil (VIEGAS JR. et al., 2006).

Dentre as várias utilizações dos metabólitos secundários, incontestavelmente a busca por novos fármacos é um dos ramos que mais se destaca na pesquisa de novas substâncias. A evolução científica no Brasil em relação a química de produtos naturais retrata a inclinação dos pesquisadores em verificar atividades biológicas, com enfoque nas atividades farmacológicas das plantas medicinais (PINTO et al., 2002).

O reino vegetal é um dos principais detentores de diversidade química, fornecendo um imenso arsenal de metabólitos secundários, que acompanha a humanidade desde a sua utilização em rituais sagrados até a idade contemporânea, com a descoberta de novas drogas pelas indústrias farmacêuticas. Dessa forma, essa diversidade química vem sendo cada vez mais explorada (VIEGAS JR. et al., 2006).

Uma das famílias botânicas que mais se destaca em relação ao número de espécies no mundo é Asteraceae, sendo um dos grupos sistemáticos de maior importância e expressividade entre as Eudicotiledôneas, detendo cerca de 10% da flora vascular mundial (ROQUE & BAUTISTA, 2008), 20% da flora das regiões dos Andes e do deserto da Patagônia e de 30 a 50% da diversidade no continente sul americano (CANCELLI et al., 2007).

A filogenia sugerida para Asterales por Winkworth e colaboradores (2008) citado na obra de Funk e colaboradores (2009), e apresentada na Figura 2, coloca Asteraceae como a família mais expressiva em relação ao número de espécies e com distribuição cosmopolita. Nessa figura, cada ramo apresenta coloração refletindo a predominância das famílias da Ordem dispostas em algumas regiões do mundo.

As asteráceas possuem uma possível origem geográfica no continente Gondwana de acordo com registros polínicos fósseis datados do cretáceo. Assim, durante o período Eoceno, marcado pela divisão dos continentes Americano e Africano, parte das asteráceas foram confinadas nas Américas (CANCELLI et al., 2007).

Um órgão internacional que monitora a ocorrência e cataloga espécies do mundo todo, a Global Biodiversity Information Facility (GBIF), revelou um aumento considerável na ocorrência em espécies de Asteraceae de 1600 até 1900 (Figura 3) e de 1900 até a atualidade (Figura 4) mostrando que a pesquisa e catalogação de espécies teve um aumento considerável (GBIF, 2018).

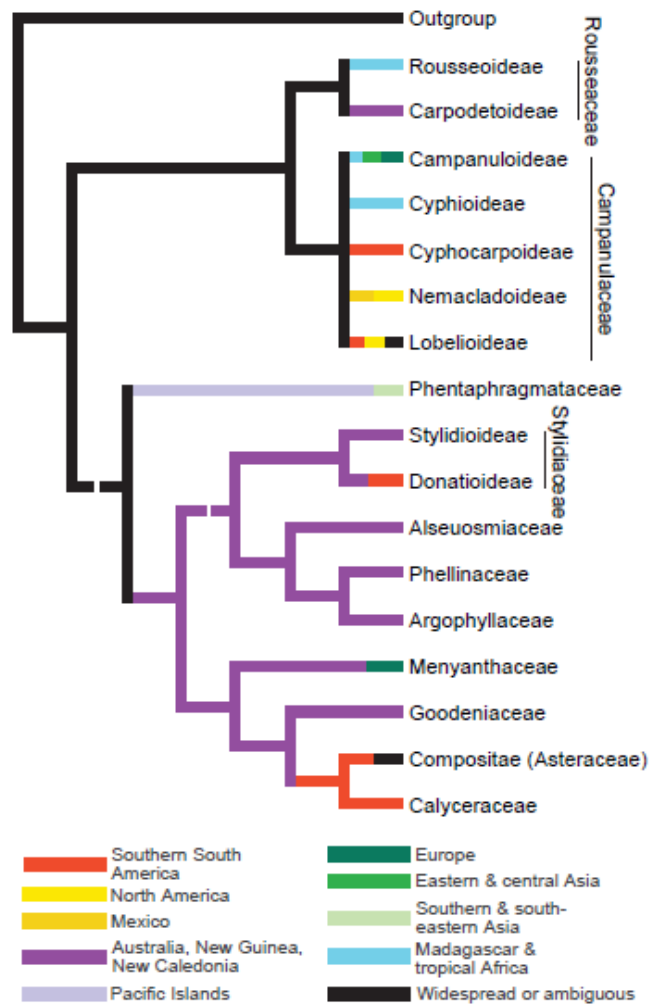


Figura 2. Filogenia de Asterales e sua distribuição mundial (Funk et al., 2009).

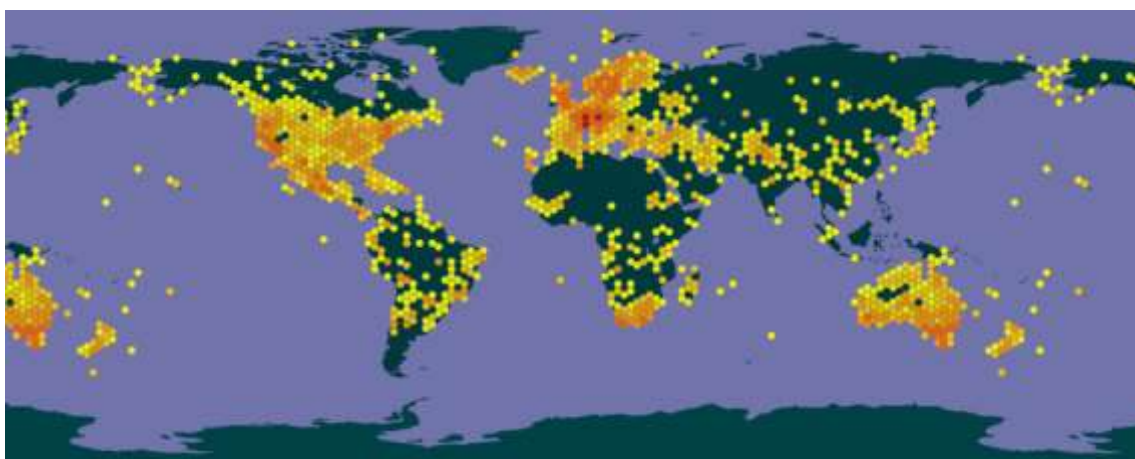


Figura 3. Ocorrência de espécies de Asteraceae catalogadas entre os anos 1600-1900 pelo GBIF (GBIF, 2018).

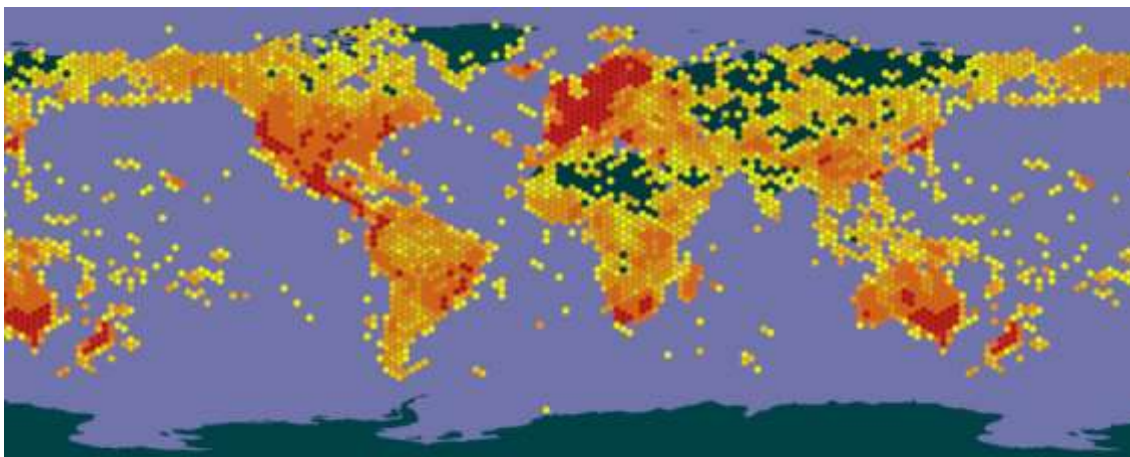


Figura 4. Ocorrência de espécies de Asteraceae catalogadas entre os anos de 1900-2018 pelo GBIF (GBIF, 2018).

Panero e Funk (2008) reconheceram, para Asteraceae, 12 subfamílias e 43 tribos através de marcadores moleculares usados para uma análise filogenética. Atualmente, a família tem cerca de 24 mil espécies descritas e ocorrência em todos continentes, com exceção da Antártida, como pode ser visualizado na Figura 4 (ROQUE et al., 2017). No Brasil, a família apresenta 290 gêneros e 2097 espécies descritas, dos quais 70 gêneros e 1325 espécies são endêmicos (FLORA DO BRASIL, 2018).

A família apresenta características bem diversas possuindo hábito de herbáceo até arbóreo, podendo ser lianas (VENABLE & LEVIN, 1983). As espécies possuem caules em geral subcilíndrico, alado ou não, e folhas simples ou alternas (HATTORI & NAKAJIMA, 2008).

As asteráceas possuem características monofiléticas, detentoras de variabilidade floral peculiar ao reconhecimento de tribos e gêneros. Porém a característica marcante, a qual suporta o monofiletismo da família é a presença de inflorescência dispostas em capítulos altamente modificados (Figura 5) circundada por brácteas com função de proteção ao pedúnculo floral (ROQUE & BAUTISTA, 2008). Os capítulos são em geral solitários, homógamos discoides com flores liguladas, bilabidas, tubulosas ou filiformes, as quais apresentam brácteas involucrais rodeando toda inflorescência.

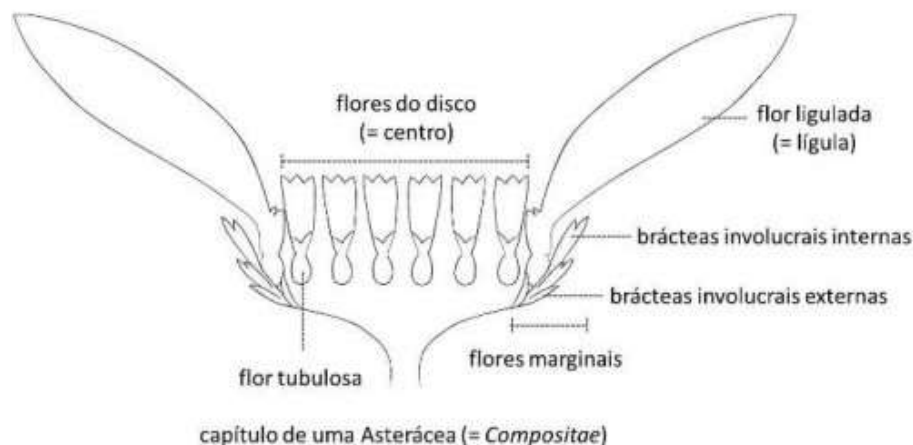


Figura 5. Morfologia externa de uma inflorescência de uma Asteraceae.

A dispersão das sementes ocorre por anemocoria favorecida pela presença de pappus (CANCELLI et al., 2007) o qual, possivelmente, é um dos fatores que sustenta o sucesso evolutivo da família (BORGES & FORZZA, 2008). Uma outra forma de propagação importante, característica de alguns membros da família, se dá por epizoocoria, onde o fruto apresenta adaptações que permite que se prendam no corpo de alguns mamíferos, como no caso da espécie *Bidens pilosa* L., conhecida popularmente por picão preto (GILBERT et al., 2013).

Outras adaptações que garantem o sucesso de Asteraceae é a localização diferenciada dos frutos, tanto no centro quanto na periferia do capítulo, que elevam as taxas de germinação das sementes, aliado ao heteromorfismo das mesmas, fator que ocorre em cerca de 63% das espécies presentes nessa família (LÖBLER, 2013).

Além disso, a elevada produção de variadas classes de metabólitos secundários complementa o círculo virtuoso de adaptação da família, refletido no elevado número de espécies e na alta plasticidade de ocupação dos mais diversos nichos ecológicos. Inúmeras espécies possuem canais resiníferos contendo metabólitos secundários voltados para defesa contra herbivoria. Asteraceae explora significadamente a produção de poliacetilenos, terpenoides como os sesquiterpenos, com destaque às lactonas sesquiterpênicas, óleos voláteis, látex e alguns tipos de alcaloides (principalmente alcaloides pirrolizidínicos nas tribos Senecioneae e Eupatorieae). Além das classes de componentes já citadas, na Figura 6 são apresentadas as principais classes de

metabólitos secundários produzidos em Asteraceae (BERRY, 2013; FUNK et al., 2009; WAGNER, 1991).

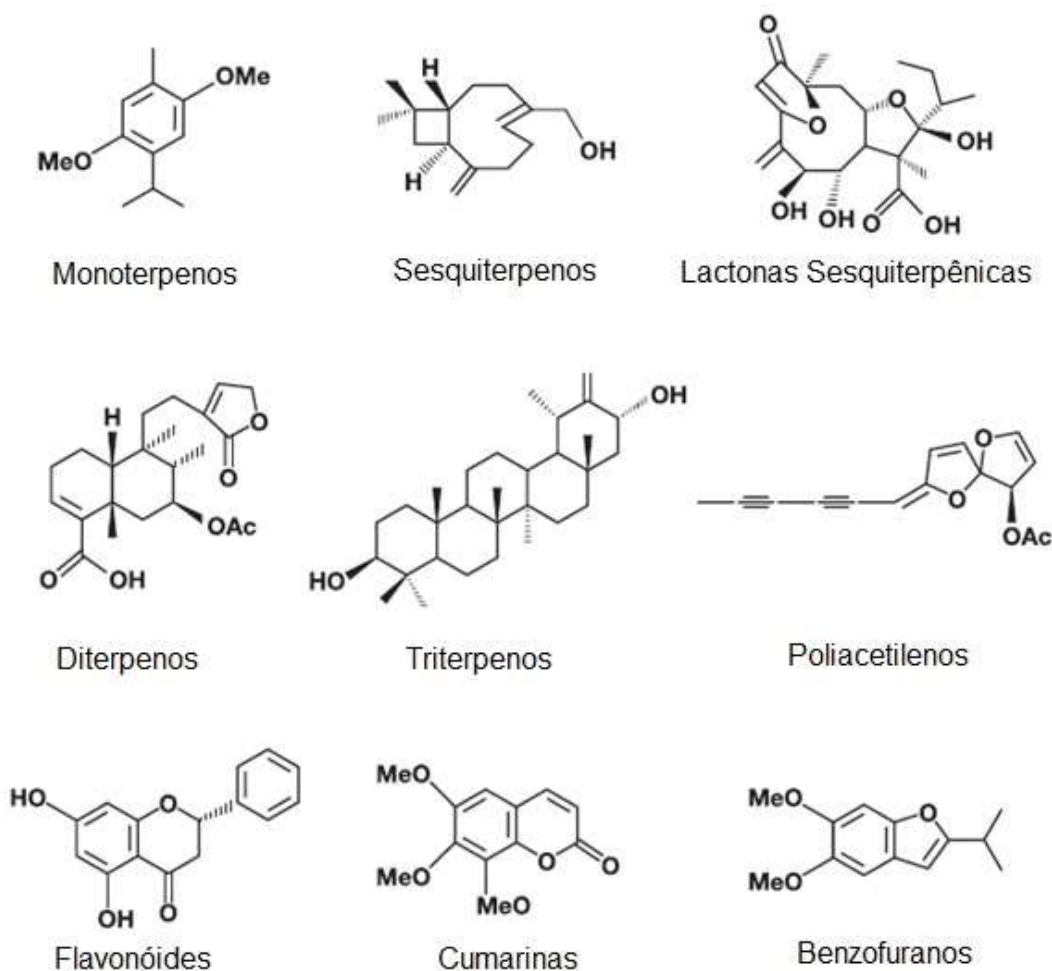


Figura 6. Estruturas químicas de classes majoritárias de metabólitos secundários encontrados em Asteraceae.

Indiscutivelmente, os poliacetilenos e as lactonas sesquiterpênicas estão entre as classes de metabólitos que conferem maior deterrência a herbívoros nas asteráceas. Além disso, esses metabólitos podem ser empregados como marcadores quimiotaxonômicos na filogenia de Asterales e Asteraceae. Os poliacetilenos encontrados em Asteraceae geralmente têm grupos terminais cíclicos, aromáticos ou heterocíclicos, em contraste com os poliacetilenos principalmente alifáticos de Campanulaceae (FUNK et al., 2009). Por outro lado, subfamílias basais como Barnadesioideae são menos especializadas na produção de metabólitos secundários e, aparentemente, não produzem lactonas sesquiterpênicas, que possuem sabor amargo e são metabólitos extremamente

tóxicos para uma ampla gama de herbívoros. Entretanto, esses clados basais carregam a característica plesiomórfica da Ordem, que é a reserva de inulina, um carboidrato de reserva observado em todas as asteráceas (BERRY, 2013; FUNK et al., 2009).

Centenas de estudos foram realizados com o objetivo de elucidar os metabólitos secundários oriundos de Asteraceae e, atualmente a diversidade química da família ultrapassa a identificação de 7.000 componentes químicos (BOHM & STUESSY, 2001; CALABRIA et al., 2007). Tal diversidade permite amplas aplicações e usos das asteráceas mundialmente.

Asteraceae não ocupa posição de destaque somente pelo número de espécies, conforme vem sendo comentado ao longo desse texto, mas também por estar presente no cotidiano das pessoas, como no caso da indústria de alimentos na forma de bebidas como o absinto (*Artemisia absinthium* L.), temperos no caso do estragão (*Artemisia dracunculus* L.), adoçantes amplamente comercializados como a estévia (*Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni), corantes como, por exemplo, o cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), entre outras (FUNK et al. 2009, PANERO & CROZIER, 2012). Para essa finalidade, as asteráceas apresentam ampla utilização pelo homem desde épocas da história antiga como no caso do uso da alface (*Lactuca sativa* L.), onde registros de pinturas dessa planta foram visualizados em tumbas egípcias datadas de 4.500 antes de Cristo (FUNK et al., 2009).

Membros de vários gêneros da família são bem conhecidos por seu valor horticultural e ornamental sendo cultivados em jardins por todo o mundo, tais como gérberas (*Gerbera* sp. L.), zinias (*Zinnia angustifolia* Kunth), dalias (*Dahlia coccínea* Cav.), margaridas (*Bellis perennis* L.), crisântemos (*Chrysanthemum* sp.) e girassol (*Helianthus annuus* L.) (DEMPEWOLF et al. 2008).

Algumas espécies da família são empregadas como fitoterápicos como, por exemplo, a pomada Kamillosan® (*Matricaria recutita* L.) e o Tenliv® (*Tanacetum parthenium* L.) empregados, respectivamente, para dermatite e enxaquecas, além do Antilerg® (*Petasites hybridus* (L.) Gaertn.) comercializado pelo laboratório Aché, para alergias respiratórias como rinite. Por outro lado, o estudo de algumas espécies forneceu fármacos empregados atualmente na terapêutica como a artemisinina, substância isolada de *Artemisia annua* L., e utilizada no tratamento de malária (FUNK et al., 2009). Essa substância rendeu

à pesquisadora que efetuou o isolamento desse componente na década de 70, o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2015, devido o amplo uso do metabólito em uma doença negligenciada como a malária.

Entre as espécies de Asteraceae, algumas são destaque na medicina popular tais como a arnica, *Arnica montana* L. e *A. chamissonis* Less., cujas flores secas são empregadas na preparação de tinturas para tratamento de inflamações e feridas, a calêndula, *Calendula officinalis* L., cujas infusões das partes aéreas são utilizadas em feridas externas e inflamações da boca e garganta, a camomila, *Matricaria recutita* L., cujo chá das partes aéreas é empregado para o tratamento de espasmos gastrointestinais, e os chás de carqueja, *Baccharis crispa* Spreng., que são empregados para facilitar a digestão e na redução do índice glicêmico (FUNK et al., 2009).

Para pessoas de baixo poder aquisitivo, há uma inclinação pelo uso de plantas medicinais sendo essa uma opção favorável, visto o elevado custo de medicamentos alelopáticos (PHILLIPSON, 2003). Este tipo de cultura aponta para a necessidade de estudos em áreas multidisciplinares como, por exemplo, a botânica, a farmacologia e a fitoquímica que, juntas, enriquecem o conhecimento sobre uma inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL et al. 2013).

Esse fato é especialmente verdadeiro no Brasil, que é o país de maior biodiversidade mundial e cuja parcela significativa da população ainda emprega plantas como um dos únicos recursos terapêuticos. Nesse sentido, no país foi instituído, em dezembro de 2008, o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, cujo objetivo central é de introduzir, por meio do Sistema Único de Saúde (SUS) e com segurança, eficácia e qualidade, plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia através do RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS). Na lista elaborada por esse programa e constituída de 71 espécies, podemos localizar treze espécies de Asteraceae (18,3% da lista), as quais são: *Achillea millefolium* L. usada como analgésico, antiespasmódico e antisséptico, *Artemisia absinthium* L. empregada como nematicida, *Bidens pilosa* L. e *Solidago microglossa* DC. utilizadas como anti-inflamatório, *Calendula officinalis* L. usado no combate de úlceras, feridas e micoses, *Matricaria recutita* L. (sinonímia de *Chamomila recutita* L.) utilizada no combate de dermatites e feridas, *Cynara scolymus* L. com objetivo de reduzir o

ácido úrico, *Mikania glomerata* Spreng e *Mikania laevigata* Sch. Bip. utilizadas como broncodilatador, *Tagetes minuta* L. empregada como anti-inflamatório e antimicrobiano, *Vernonia condensata* Backer com finalidade de tratamento de dores estomacais e dispepsia, *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less. empregada no tratamento da malária, bronquite e reumatismo. Adicionalmente, um representante do gênero selecionado para esse trabalho é também encontrado nessa lista, a *Baccharis trimera* Spreng., sinonimizada em *Baccharis crispa* Spreng. e popularmente conhecida como carqueja, amplamente empregada em preparações como infusões na forma de chás para o tratamento de problemas inflamatórios, hepáticos, reumáticos, de úlceras, entre outros (VERDI et al., 2005; MINISTERIO DA SAUDE, 2018).

Dada a importância das espécies de Asteraceae e do amplo conhecimento sobre a composição química da família, alguns gêneros são pouco amostrados sob o aspecto fitoquímico. Esse fato é especialmente verdade para gêneros megadiversos sul americanos como, por exemplo, *Baccharis*. Dessa forma, o objetivo geral desse trabalho é contribuir com o aumento da caracterização química e potenciais bioatividades presentes nos metabólitos produzidos pelo gênero *Baccharis*, investigando a espécie *B. oblongifolia* ainda não analisada sob esse aspecto. Assim, os objetivos específicos serão tratados em cada capítulo a seguir e são os seguintes:

1. Descrever a composição química de natureza fenólica produzida por *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. e avaliar a influência do dioicismo sobre a produção desses metabólitos;
2. Avaliar as atividades antirradicalar e citotóxica de extratos, fases de partição, grupos do fracionamento cromatográfico em acetato de etila e substâncias isoladas a partir de *B. oblongifolia*.

Capítulo 1. Constituintes fenólicos de *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. e análise da influência do dioicismo

ABSTRACT

Phenolic compounds are the polar metabolites more abundant produced by *Baccharis* species. The objective of this chapter was to carry out the first phytochemical study of *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae). From this study, fifteen compounds were identified through spectroscopic and spectrometric techniques and/or by co-injection of isolated or commercial standards. Among the components identified ten are chlorogenic acid derivatives, 5-caffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid and 3,4,5-tricaffeoylquinic acid, and their respective methyl esters, caffeic acid and four flavonoids, rutin (quercetin-3-O-rutinoside), nicotiflorin (caempferol-3-O-rutinoside, quercetin-3-O- β -[2''-(E)-caffeoyl]-rutinoside and caempferol-3-O- β -[2''-O-(E)-caffeoyl]-rutinoside. The last two components, pertaining to the group of acylated flavonols, are new compounds in the literature, named, as oblongifolioside A and B. Comparing the chemical composition of the female and male individuals, a qualitative variation of the metabolites was not observed. However, was suggested a quantitative differentiation between the individuals, with emphasis on the most abundant compound, the 3,5-dicaffeoylquinic acid, in the female specimen.

Keywords: *Baccharis oblongifolia*, Asteraceae, dioecism, chlorogenic acids, flavonoids, acylated flavonols.

RESUMO

Os compostos fenólicos compõem o grupo de substâncias polares mais abundantes produzidas pelas espécies de *Baccharis*. O objetivo desse capítulo foi realizar o primeiro estudo fitoquímico de *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae). Desse estudo foram identificadas, através de dados espectroscópicos, espectrométricos e/ou por co-injeção de padrões já isolados ou comerciais, quinze substâncias. Entre os componentes identificados estão dez derivados de ácidos clorogênicos, os ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico e 3,4,5-tricafeoilquínico, e seus respectivos ésteres metílicos, o ácido cafeico, e quatro flavonoides, rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), nicotiflorina (caempferol-3-O-rutinosídeo), quercetina-3-O- β -[2''-O-(*E*)-cafeoil]-rutinosídeo e caempferol-3-O- β -[2''-O-(*E*)-cafeoil]-rutinosídeo. Os dois últimos componentes, pertencentes ao grupo dos flavonóis acilados, são substâncias inéditas em literatura que foram designadas de oblongifoliosídeo A e B. Comparando a composição química dos indivíduos feminino e masculino não foi observado uma variação qualitativa dos metabólitos, embora seja sugerido que há uma diferenciação quantitativa entre os indivíduos, com destaque ao ácido 3,5-dicafeoilquínico mais abundante no indivíduo feminino.

Palavras-chave: *Baccharis oblongifolia*, Asteraceae, dioicismo, ácidos clorogênicos, flavonoides, flavonóis acilados.

1.1. INTRODUÇÃO

Astereae, segunda maior tribo dentre as 43 existentes em Asteraceae, possui maior distribuição de ocorrências em áreas montanhosas do continente americano e africano (ROQUE, FERREIRA & BERG, 2017; BORGES & FORZZA, 2008). Estimada em cerca de 222 gêneros e 3.100 espécies, essa tribo é dividida em 18 subtribos e possui predominância em regiões temperadas, estendendo de áreas abertas a regiões pantanosas e alagadiças como manguezais até áreas desérticas com destaque à região andina (FUNK et al., 2009).

Baccharis, do grego Bakkharis designado para categorizar plantas arbustivas, é o maior e um dos mais importantes gêneros pertencentes à Baccharidinae, uma das maiores subtribos de Astereae. O gênero compreende entre 354 e 400 espécies com predominância Neotropical e elevada dispersão na América do Sul, que abriga cerca de 90% das espécies (MÜLLER, 2013). Devido à grande concentração de espécies no Sul e Sudeste do Brasil e nos Andes (Figura 1) é sugerido que essas regiões formam o centro de diversidade do gênero.



Figura 1. Distribuição mundial de *Baccharis*. (Acesso em 12/03/2018; Fonte: <https://www.gbif.org/species/3129135>).

As plantas do gênero apresentam indivíduos de 20cm a 4m de altura, caracterizados pelo dioicismo, presença de flores femininas e masculinas em espécimes distintos, na ampla maioria das espécies. Estudos indicam que essa

característica ocorreu de forma independente em *Baccharis* e que a mesma, possivelmente, teve origem em linhagens sul-americanas. Assim, alguns autores sugerem que Baccharidinae deve ser restrita a *Baccharis* stricto sensu (Funk et al., 2009). O polimorfismo do gênero, geralmente atribuído ao dioicismo, além da maneira superficial a qual foram descritas as espécies, comprometeram a delimitação do grupo (OLIVEIRA et al., 2006).

Recentemente, o gênero sofreu uma profunda revisão taxonômica amparada por dados de filogenia molecular e foi subdividido em 7 subgêneros e 14 seções (HEIDEN & PIRANI, 2012 e 2016). No Brasil, atualmente, são aceitas 179 espécies de *Baccharis* das quais 115 são consideradas endêmicas. Essas espécies ocupam predominantemente o Sul e Sudeste do Brasil com preeminência, em relação ao domínio fitogeográfico, na Mata Atlântica seguida do Cerrado e Pampas (Flora do Brasil, 2018).

Várias espécies de *Baccharis* apresentam importância ecológica e econômica tais como a *B. pluralis* L. e *B. micrantha* (Hochst.) Baill. que promovem uma cobertura no solo evitando a erosão e podendo ser utilizada como cerca viva (BUDEL et al., 2005). *B. dracunculifolia* DC. é utilizada pelas abelhas na produção da própolis verde, conhecida pelas suas propriedades anti-inflamatória e atividade antimicrobiana, onde até hoje tem sido alvo de estudos e pesquisas (SFORCIN et al., 2012). Adicionalmente, espécies como *B. salicifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. e *B. pluralis* produzem néctar de excelente qualidade, resultando na produção de mel de alto padrão pelas abelhas. Por outro lado, *B. angustifolia* Michx., *B. glomeruliflora* Pers. e *B. neglecta* Britt. apresentam interesse comercial devido sua beleza como plantas ornamentais (VERDI et al., 2005).

Impactos econômicos também foram ocasionados por algumas espécies de *Baccharis* como, por exemplo, *B. coridifolia* DC. e *B. megapotamica* Spreng. espécies tóxicas para o rebanho bovino principalmente no sul e sudeste do Brasil (VERDI et al., 2005). Todas as partes de *B. coridifolia* DC. são tóxicas com destaque para flores e sementes onde os tricotecenos, macrocíclicos tóxicos conhecidos são roridinas A e, miotoxinas A-D e verrucarol, estão relacionados a inflamação com possível quadros hemorrágicos do sistema digestório dos ruminantes, levando-os à morte em baixa dosagem. Por décadas, acreditou-se que esses componentes eram produzidos por algumas espécies de *Baccharis*.

Investigações posteriores conseguiram determinar que esses tricotecenos são produzidos por fungos do gênero *Myrothecium* os quais crescem em simbiose com essas espécies de *Baccharis* (DESJARDINS et al., 1993; GARDA et al., 2004 e RISSI et al., 2005).

Sob o aspecto medicinal, algumas espécies de *Baccharis* são utilizadas na medicina tradicional. Entre os exemplos mais emblemáticos podemos citar a *B. crispa* DC. e *B. dracunculifolia* DC. empregadas na forma de chás para tratamento de distúrbios hepáticos e para amenizar problemas inflamatórios. Inúmeros extratos de espécies de *Baccharis* vem sendo testados na atualidade (CAMPOS et al. 2016). Entre esses, extratos aquosos de espécies de *B. obtusifolia* Kunth, *B. latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. e *B. subalata* Wedd., oriundos da Bolívia, foram biotestados em relação a ação anti-inflamatória e antirradicalar *in vitro*, e elucidado que essa atividade é devido à presença de ácidos fenólicos e cumarinas (ABAD & BERMEJO, 2007).

A composição química de *Baccharis* foi revista em literatura em dois trabalhos (VERDI et al., 2005; CAMPOS et al., 2016). Através da análise desses artigos é possível inferir que os principais constituintes químicos do gênero são terpenoides, especialmente diterpenos, e substâncias fenólicas, como flavonoides e derivados do ácido cinâmico.

Dentre os terpenoides os componentes presentes em óleos voláteis apresentam destaque no gênero. Essas substâncias são representadas por uma mistura de compostos voláteis incluindo, principalmente, álcoois monos- e sesquiterpênicos. Estudos com óleos voláteis em *Baccharis* sp. tem sido realizado, revelando uma gama de substâncias tais como sabineno, β -pineno, limoneno, mirceno, α - e β -eudesmol, entre outros (ABAD & BERMEJO, 2007; LAGO et al., 2008 & SAMPAIO et al., 2010). Os diterpenos são, também, produzidos em abundância no gênero. Com algumas centenas de esqueletos hidrocarbônicos já descritos em literatura para plantas, microrganismos e organismos marinhos, o gênero *Baccharis* parece ter se especializado na produção de três tipos principais: diterpenos dos esqueletos caurano, clerodano e labdano, que possuem dezenas de substâncias descritas em literatura (CAMPOS et al., 2016).

Entre os principais compostos fenólicos presentes em *Baccharis*, temos flavonoides como a quercetina, o caempferol, a apigenina e a naringenina, além

de representantes dos derivados do ácido cinâmico, como os ácidos cafeico, ferúlico e clorogênico (CAMPOS et al., 2016). A presença de cumarinas como aurapteno e Escopoletina também é reportada em várias espécies do gênero. Na Figura 2 são apresentados alguns metabólitos fenólicos frequentes em *Baccharis*. Até o momento não foi identificada a presença de metabólitos secundários da classe dos compostos nitrogenados em espécies de *Baccharis*.

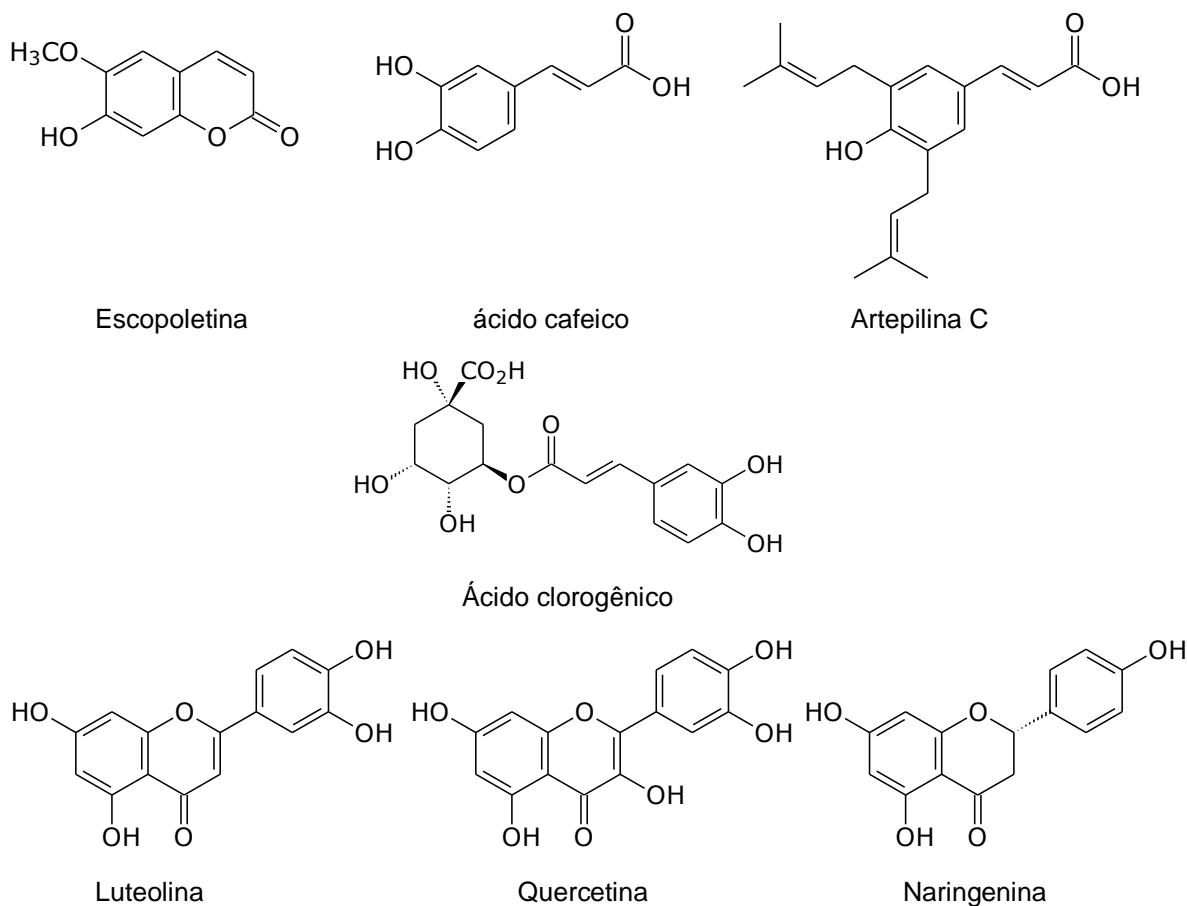


Figura 2. Exemplos de metabólitos fenólicos isolados de espécies de *Baccharis*

De grande versatilidade química e detentora de variadas atividades biológicas, espécies desse gênero mostram-se promissoras à estudos fitoquímicos. Visto a grande contribuição fitoquímica do gênero, somado à importância desses recursos vegetais no mercado brasileiro, o trabalho discorrerá sobre a espécie *B. oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. uma vez que não há estudos de constituição química, até o momento.

Baccharis oblongifolia é um arbusto dioico, ereto e ramificado que possui aproximadamente dois metros de altura e apresenta caule cilíndrico com folhas

alternadas do tipo oblonga (BORGES & FORZZA, 2008). As flores (Figura 3) apresentam brácteas involucrais com capítulos numerosos em receptáculo cônico lembrando formato de sinos (campanulados) com corola infundibuliforme (estreitando-se com um funil) (BORGES & FORZZA, 2008).



Figura 3. Fotos de *Baccharis oblongifolia*, indivíduos (A) feminino e (B) masculino.

Fonte: O. A. Fávero

A distribuição geográfica de *B. oblongifolia* é predominante na América Latina, com foco na área da cordilheira dos Andes e sudeste e sul do Brasil, com poucos integrantes na Amazônia (Figura 4; TULIG et al. 2017).



Figura 4. Distribuição geográfica mundial de *Baccharis oblongifolia*

Fonte: http://sweetgum.nybg.org/science/vh/specimen_details.php?irn=157758.

Acesso em 12 de março de 2018.

O único relato de composição química de *Baccharis oblongifolia* refere-se a um estudo de óleo volátil desenvolvido por Sampaio e colaboradores (2010). Nesse trabalho, os autores utilizaram folhas e capítulos imaturos da espécie para extração de óleo volátil por hidrodestilação obtendo monoterpenos e sesquiterpenos tais quais: β -pineno, α -pineno, germacreno D, entre outros.

1.2. OBJETIVOS

As espécies do gênero *Baccharis* já estudadas são reconhecidamente produtoras de classes de substâncias com variadas atividades biológicas. Sendo assim, em virtude da versatilidade de constituintes químicos e de atividades biológicas observadas para espécies de *Baccharis*, os objetivos desse capítulo são:

1. Identificar as substâncias fenólicas presentes nos extratos e fases de partição de maior polaridade de *B. oblongifolia*.
2. Analisar se os indivíduos dioicos de *B. oblongifolia* apresentam variação na composição fenólica.

1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1. Coleta do material vegetal

Baccharis oblongifolia (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae), indivíduos masculino e feminino em época de floração, foram coletadas em 22 de outubro de 2016, nos Campos de Altitude da Serra da Mantiqueira, próximo as coordenadas 22 45'47" S e 45 35'02" W, no município de Campos do Jordão, SP. A identificação da espécie foi realizada pela Prof^a. Dr. Oriana A. Fávero e as exsiccatas da coleta foram depositadas no herbário do IB-USP, sob o *voucher* Fávero et al., 535, e o acesso cadastrado no SisGen sob o número A47125D.

1.3.2. Instrumentação e Condições de análise

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica foram realizadas em cromatógrafo Agilent. O modelo utilizado foi a série 1260, constituído de um forno termostático G1316A, um injetor automático G1329B, um compartimento para amostras termostático G1330B, uma bomba G1311B, e uma célula de fluxo de 60 mm. O método empregado utilizou uma coluna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C18, nas dimensões de 4.6 x 150mm x 3.5 μ m com conector 0.17x90mm. A fase móvel foi constituída de A: água acidificada com ácido acético 0,1% e B: Acetonitrila. As eluições seguiram a programação: 0-6min 90%A; 6-7min 90-85%A; 7-22min 85%A; 22-23min 85-80%A; 23-33min 80%A; 33-34min 80-75%A; 34-44min 75%A; 44-54min 75-50%A; 54-60min 50-0%A. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL.min⁻¹, o volume injetado de amostra foi de 3 μ L e a temperatura do forno da coluna foi mantida em 45°C. As amostras foram monitoradas nos seguintes comprimentos de onda: 352, 325, 280 e 254 nm. O tempo de corrida foi de 60 minutos com pós-corrida de 5min.

Nas análises por CLAE semi-preparativo foi usado um cromatógrafo Agilent 1200 com desgaseificador G1322A, uma bomba G1311A, sistema de injeção automática G1329A, forno G1316A, um detector G1316A e um coletor de frações Agilent. As separações foram efetuadas em coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (9,6 x 250 mm, 5,0 μ m).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1 (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C) foram registrados em espectrômetro Bruker AIII 300 MHz e Bruker AIII 500 MHz, operando a 300 e 500MHz para RMN ¹H e 75

e 125 MHz para RMN ^{13}C , respectivamente. Os espectros de correlação HMBC e HSQC foram obtidos somente no espectrômetro Bruker Avance III 500 MHz, ambos na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As amostras foram solubilizadas em metanol deuterado da Tédia Brazil.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos na CA-IQ-USP no espectrômetro de massas q-ToF Maxis 3G, Bruker Daltonics, operando com fonte de elétron-spray nos modos positivo e negativo (ESI+/ESI-) e modo de aquisição de dados MS e MS/MS. As condições usadas foram: capilar a 4500V, nebulizador 2 Bar, temperatura de 200°C e fluxo do gás de secagem a 8L.min⁻¹.

1.3.3. Materiais e Reagentes utilizados

No preparo dos extratos vegetais e fases de partição foram empregados os solventes hexano, metanol, diclorometano, acetato de etila e n-butanol grau P.A. da marca Synth. Foi utilizado mesa agitadora shaker da marca Biothec. Nas análises por CLAE foi utilizado acetonitrila grau CLAE da marca T.J. Baker e as amostras foram filtradas em filtro de nylon 0,45 μM x 13mm da marca Allcron®.

Para o fracionamento em coluna cromatográfica foi utilizado como adsorvente Sephadex LH-20 da GE Healthcare e como fase móvel metanol. As frações foram reunidas em grupos através de cromatoplaças de sílica impregnadas em alumínio da Merck®.

Para a identificação por adição de padrão foram utilizados os padrões comerciais do ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina adquiridos da Sigma-Aldrich.

1.3.4. Procedimentos experimentais

O material vegetal recém-coletado foi submetido à secagem em estufa, sob ventilação a 50°C, visando eliminação total de água. Após triagem segregando folhas de caules, procedeu-se a moagem em moinho de facas e submissão à extração exaustiva com hexano. Posterior a essa etapa, os materiais vegetais foram extraídos com metanol até esgotamento. As amostras foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida obtendo-se, então, os extratos brutos.

Para obtenção dos extratos hexano e metanólico foram utilizados cerca de 373g de folhas e 478g de caules (Tabela 1). O extrato metanólico foi submetido à partição com solventes em escala crescente de polaridade, obtendo dessa maneira fases em hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol e hidroalcoólica (Fluxograma 1).

Fluxograma 1. Extração e partição do material vegetal.

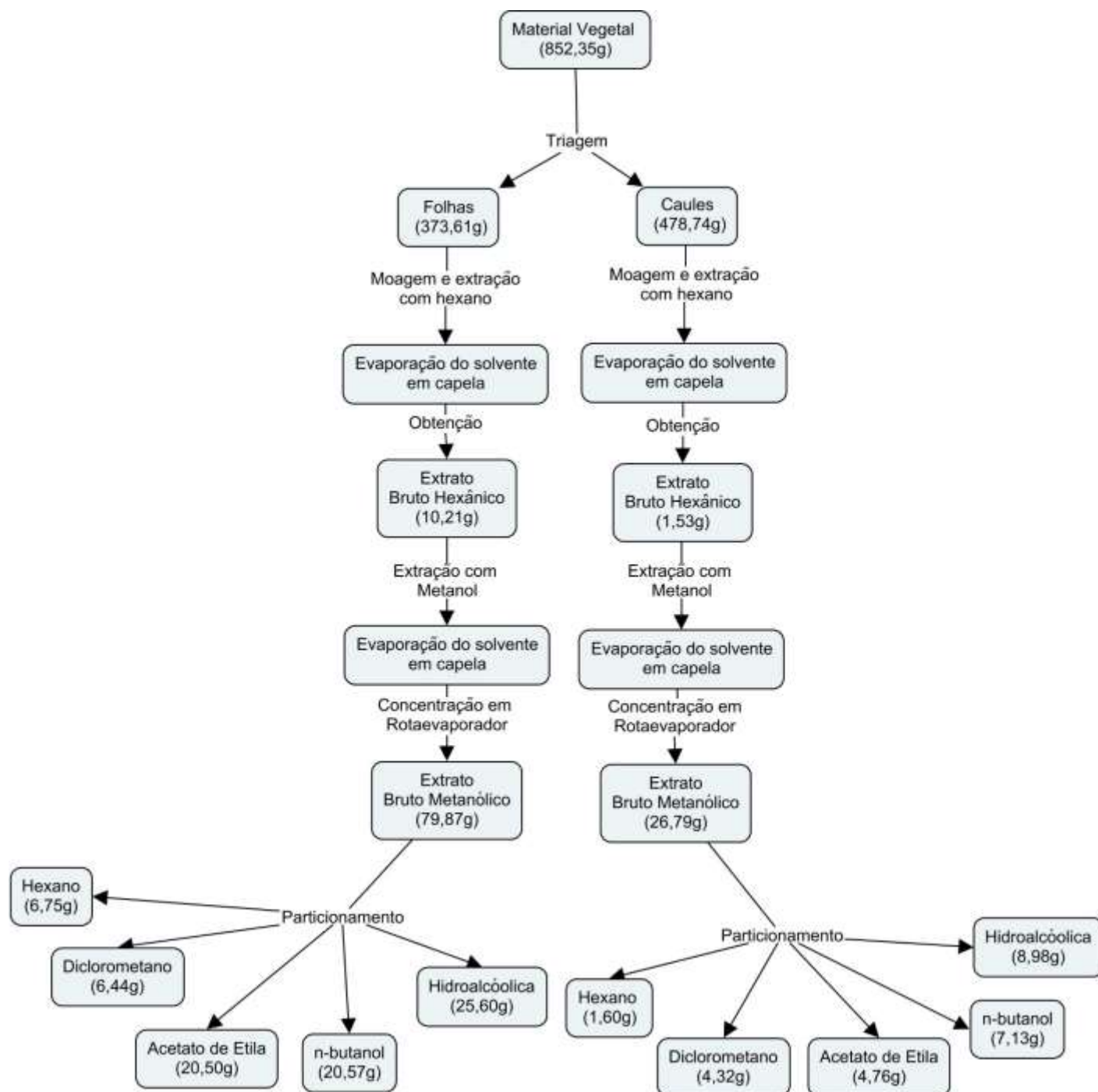


Tabela 1. Relação de massas e rendimento de folhas e caules de *Baccharis oblongifolia* calculados pela quantidade de material vegetal coletado.

Extratos e Fases de Partição	Folhas		Caule	
	Massa (g)	Rendimento %	Massa (g)	Rendimento %
Extrato bruto hexânico	10,21	2,68	1,53	0,32
Extrato bruto Metanólico	79,87	21,38	26,79	5,60
Fase Hexânica	6,75	1,81	1,60	0,33
Fase Diclorometano	6,44	1,72	4,32	0,90
Fase Acetato de etila	20,50	5,49	4,32	0,90
Fase n-butanólica	20,57	5,51	7,13	1,49
Fase hidroalcoólica	25,60	6,85	8,98	1,88

As fases de partição foram analisadas por CLAE-UV-DAD e tiveram seus perfis cromatográficos registrados para folhas (Figura 5) e caules (Figura 6). Das folhas, a fase em diclorometano apresentou baixa detecção no UV, indicativo da pequena incidência de componentes fenólicos. As fases em n-butanol e hidroalcoólica apresentaram constituintes químicos também detectados na fase em acetato de etila. Quando comparado os cromatogramas das folhas e caules o mesmo perfil pode ser observado. Assim, apenas a fase em acetato de etila das folhas foi submetida aos procedimentos de separação cromatográfica.

A fim de isolar e identificar as substâncias presentes na fase selecionada, 9,52g da fase de partição em acetato de etila das folhas, foram utilizadas para realização de uma coluna cromatográfica por exclusão molecular, utilizando como fase estacionária Sephadex LH-20 e metanol como eluente. Desse procedimento foi obtido 105 frações, de 2mL cada, as quais foram reunidas de acordo com as semelhanças observadas em CCD, utilizando como eluente acetato de etila / metanol (1:1), e obtendo-se sete grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Massas e rendimentos dos grupos obtidos após fracionamento cromatográfico da fase em acetato de etila das folhas de *B. oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.

Grupos	Massa (g)	Rendimento (%)
BOB-Ac1	1,002	10,52
BOB-Ac2	1,760	18,47
BOB-Ac3	2,233	23,45
BOB-Ac4	1,888	19,82
BOB-Ac5	2,183	22,92
BOB-Ac6	0,203	2,12
BOB-Ac7	0,130	1,36

O perfil cromatográfico de cada um dos sete grupos foi avaliado por CLAE-UV e então, iniciou-se o processo de isolamento por CLAE semi-preparativo das substâncias não identificadas através de padrões já isolados e/ou comerciais. Para as adições de padrão, 50µL da solução a 1mg.mL⁻¹ de cada padrão foi adicionada à 200 µL da solução da fase em acetato de etila preparada, também, na concentração de 1mg.mL⁻¹ e, posteriormente, analisadas por CLAE-UV.

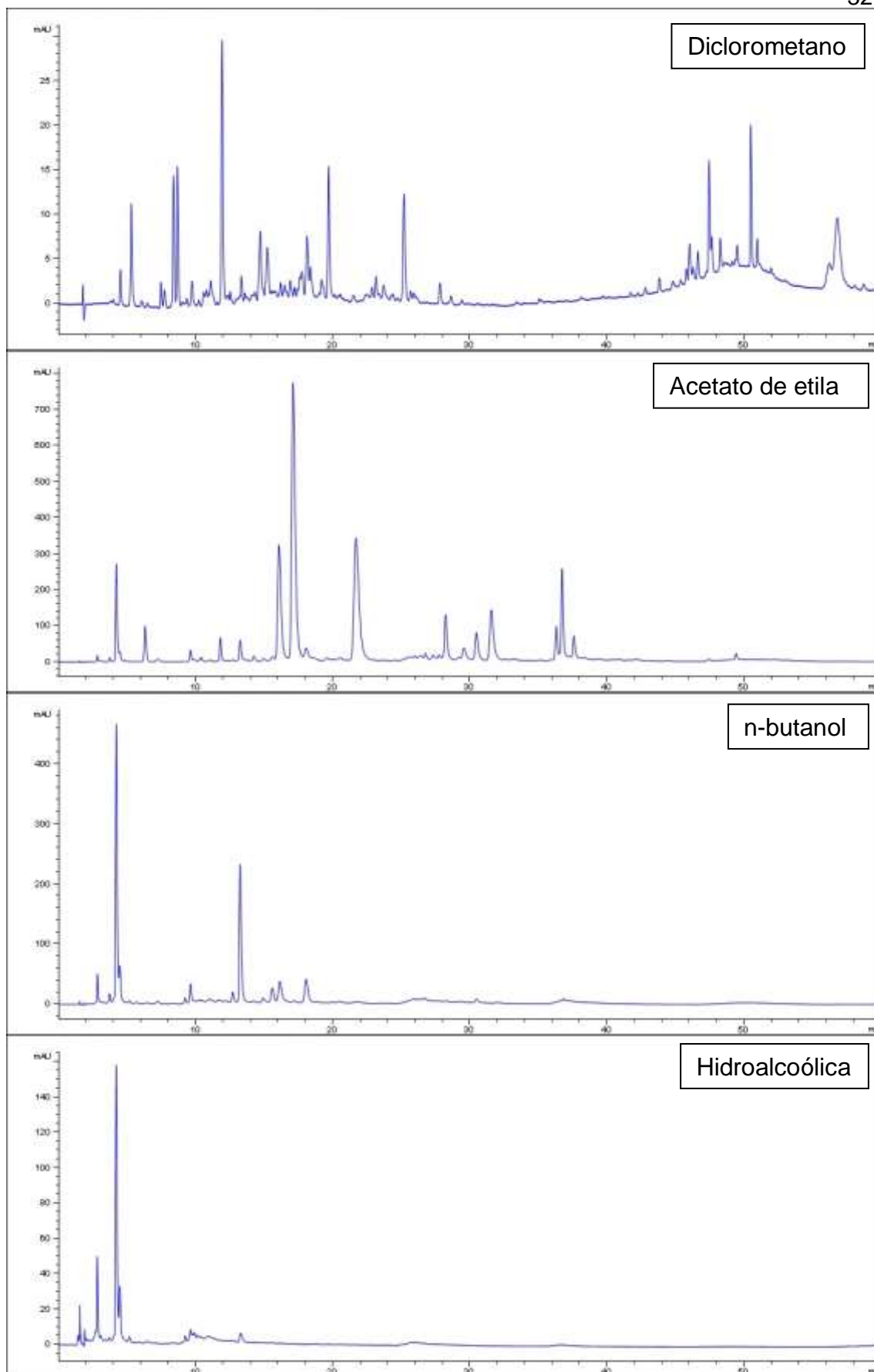


Figura 5. Cromatogramas, em λ 325nm, das fases de partição obtidas do extrato metanólico das folhas de *B. oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.

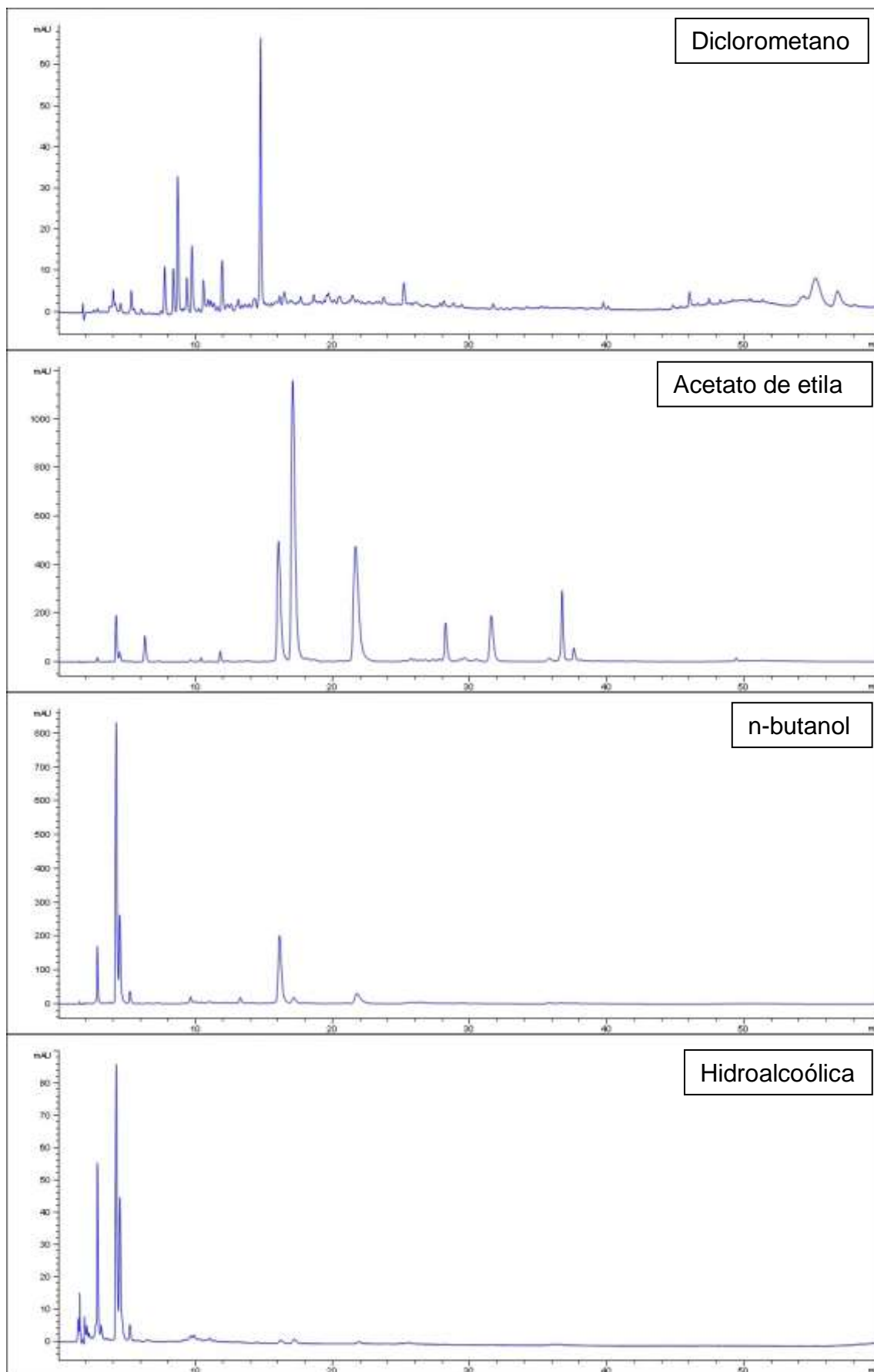


Figura 6. Cromatogramas, em λ 325nm, das fases de partição obtidas do extrato metanólico dos caules de *B. oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.

1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise dos cromatogramas das fases de partição elencadas no fluxograma 1 foi possível verificar a diversidade química da fase em acetato de etila das folhas (Figura 7) com todas as demais fases. Assim, essa fase foi submetida aos processos de identificação das substâncias, as quais são abaixo descritas.

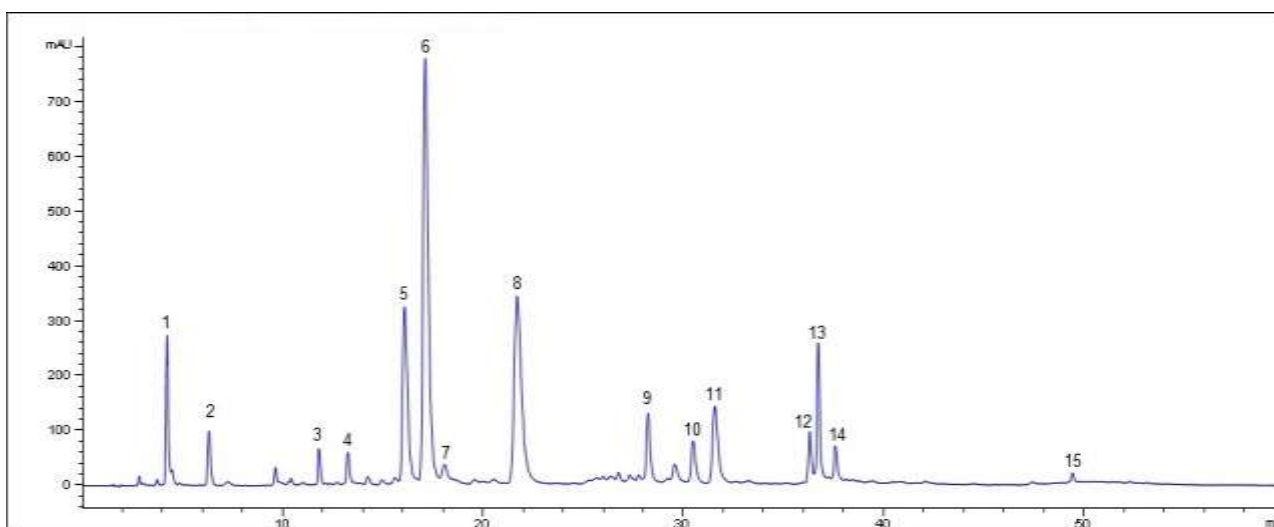


Figura 7. Cromatograma da fase de partição em acetato de etila a λ 325nm obtido a partir do extrato bruto metanólico das folhas de *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.

Os componentes químicos que originaram os picos 1 a 3, 5, 6, 8 a 15, designados na Figura 7, apresentam bandas de absorção em 298 e 325 nm (Figura 8) sugerindo a presença de derivados do ácido cinâmico (ácido cafeico ou ferúlico) e corroborando o fato das maiores abundâncias dos picos serem detectadas no comprimento de onda de 325nm (CONKERTON e CHAPITAL, 1983).

De modo análogo, as substâncias responsáveis pelos picos 4 e 7 (Figura 7) apresentaram duas bandas de absorção entre 330 – 360 nm e 250 – 280 nm (Figura 9) características das bandas I e II, respectivamente, de flavonóis (MARKHAM, 1982).

Os metabólitos presentes nos picos 1, 2, 4 a 8 e 15 apresentaram tempos de retenção compatíveis com padrões comerciais ou substâncias já isoladas e identificadas por RMN pelo grupo de pesquisas. Assim, para confirmação da

identidade desses componentes foi utilizada a técnica da adição de padrão de cada um desses possíveis componentes na fase em acetato de etila.

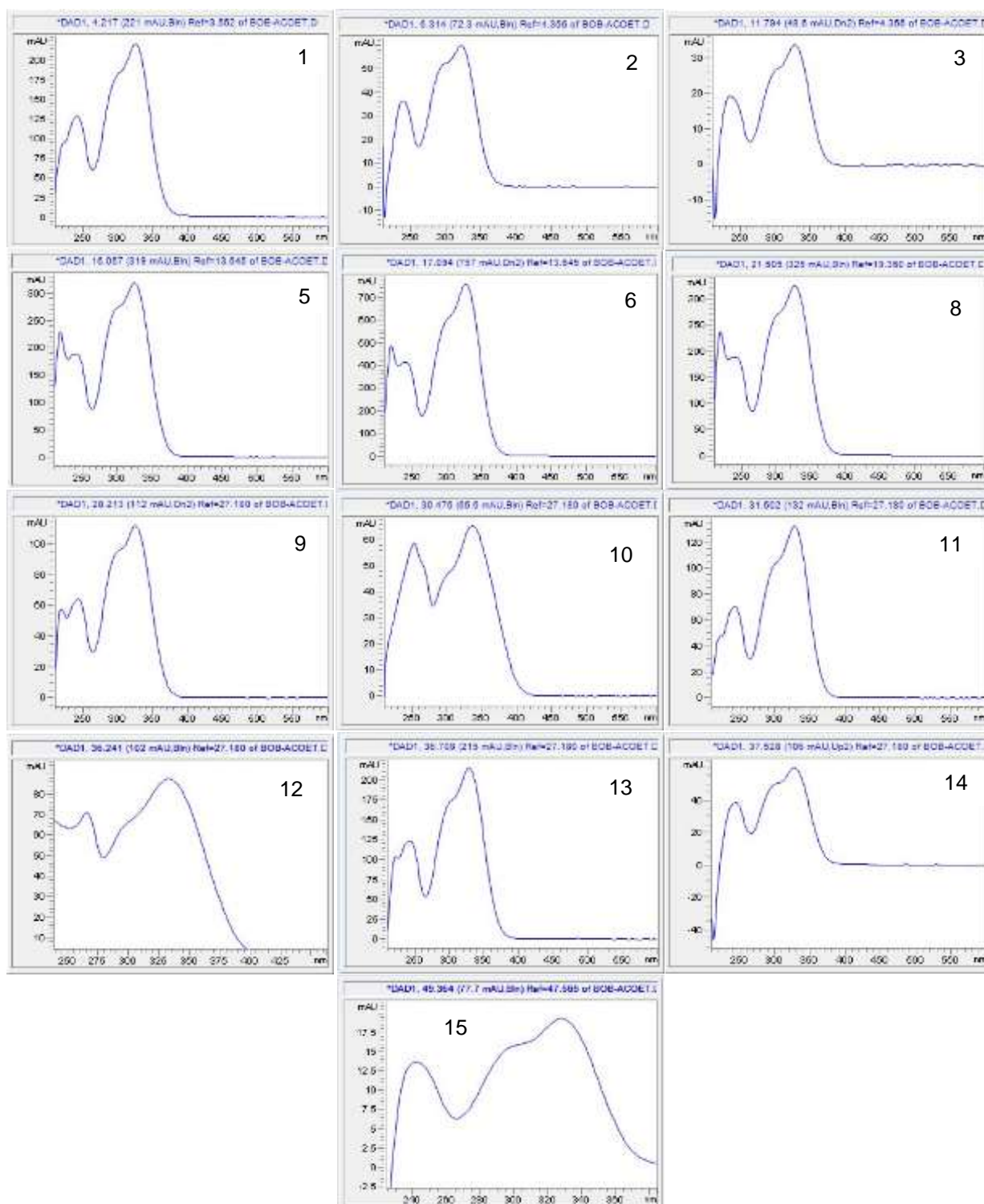


Figura 8. Espectros de UV em λ 325nm, dos componentes caracterizados como derivados do ácido cinâmico

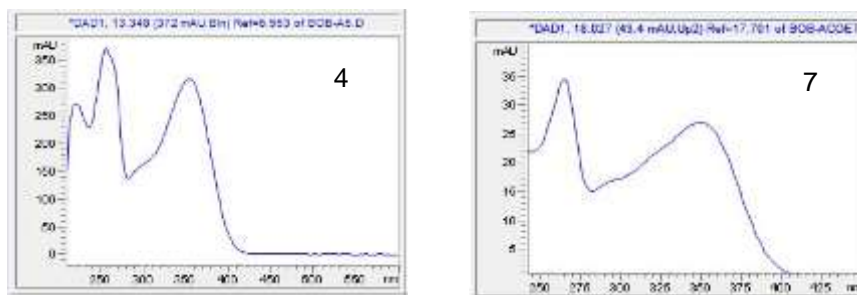


Figura 9. Espectros no UV dos componentes caracterizados como flavonoides.

Em todos os casos, foi possível verificar o aumento da abundância relativa do componente e o não surgimento de um pico adicional no cromatograma, referente a adição do padrão (Figura 10).

Dessa forma, as seguintes substâncias foram identificadas: **1.** ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido clorogênico), **2.** ácido cafeico, **4.** rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), **5.** ácido 4,5-dicafeoilquínico, **6.** ácido 3,5-dicafeoilquínico, **7.** nicotiflorina (caempferol-3-O-rutinosídeo), **8.** ácido 3,4-dicafeoilquínico e **15.** éster metílico do ácido 3,4,5-tricafeoilquínico. As estruturas das substâncias são apresentadas na Figura 11.

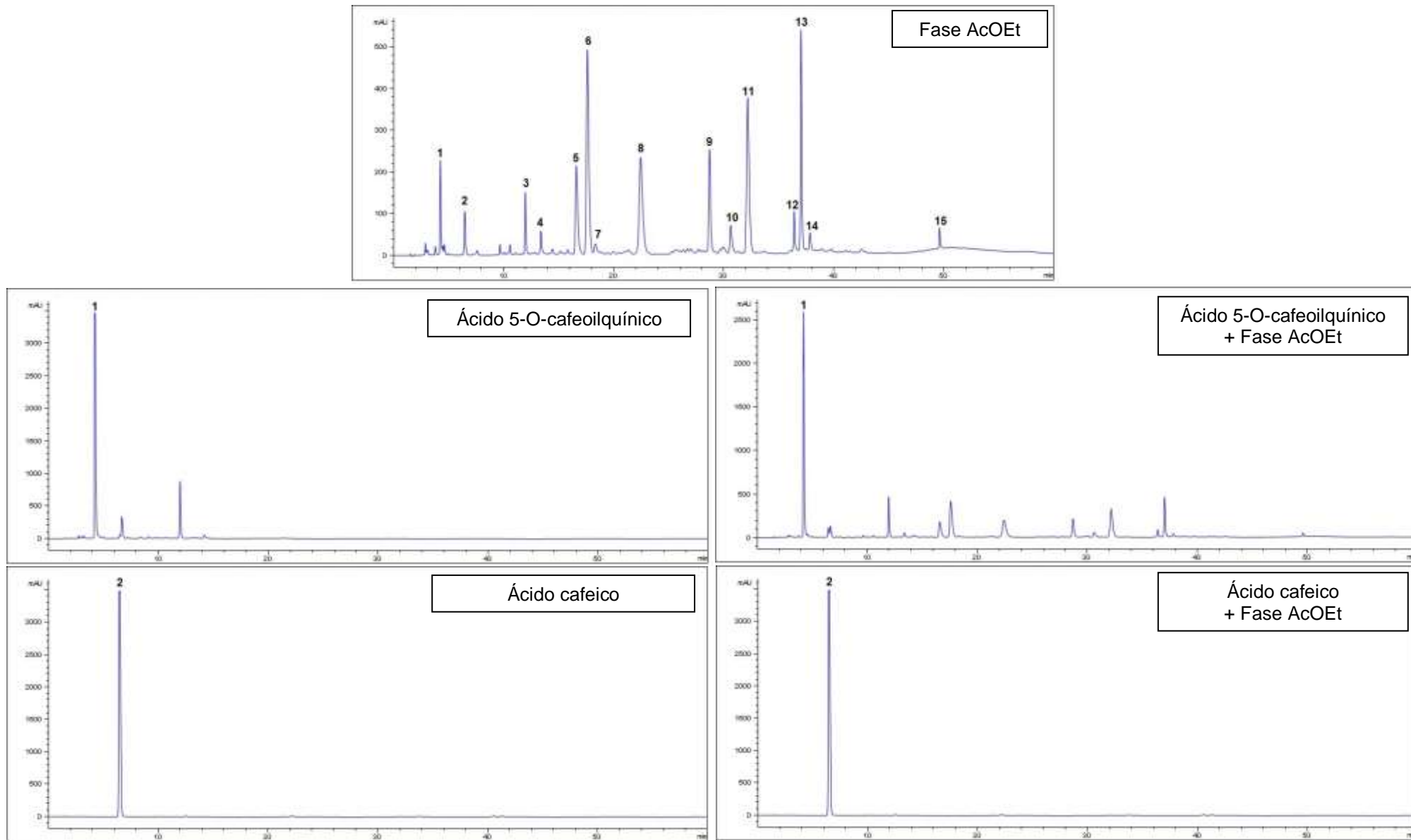


Figura 10. Cromatogramas dos padrões e da fase em acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *B. oblongifolia* antes e após a adição dos padrões em comprimento de onda $\lambda 325\text{nm}$.

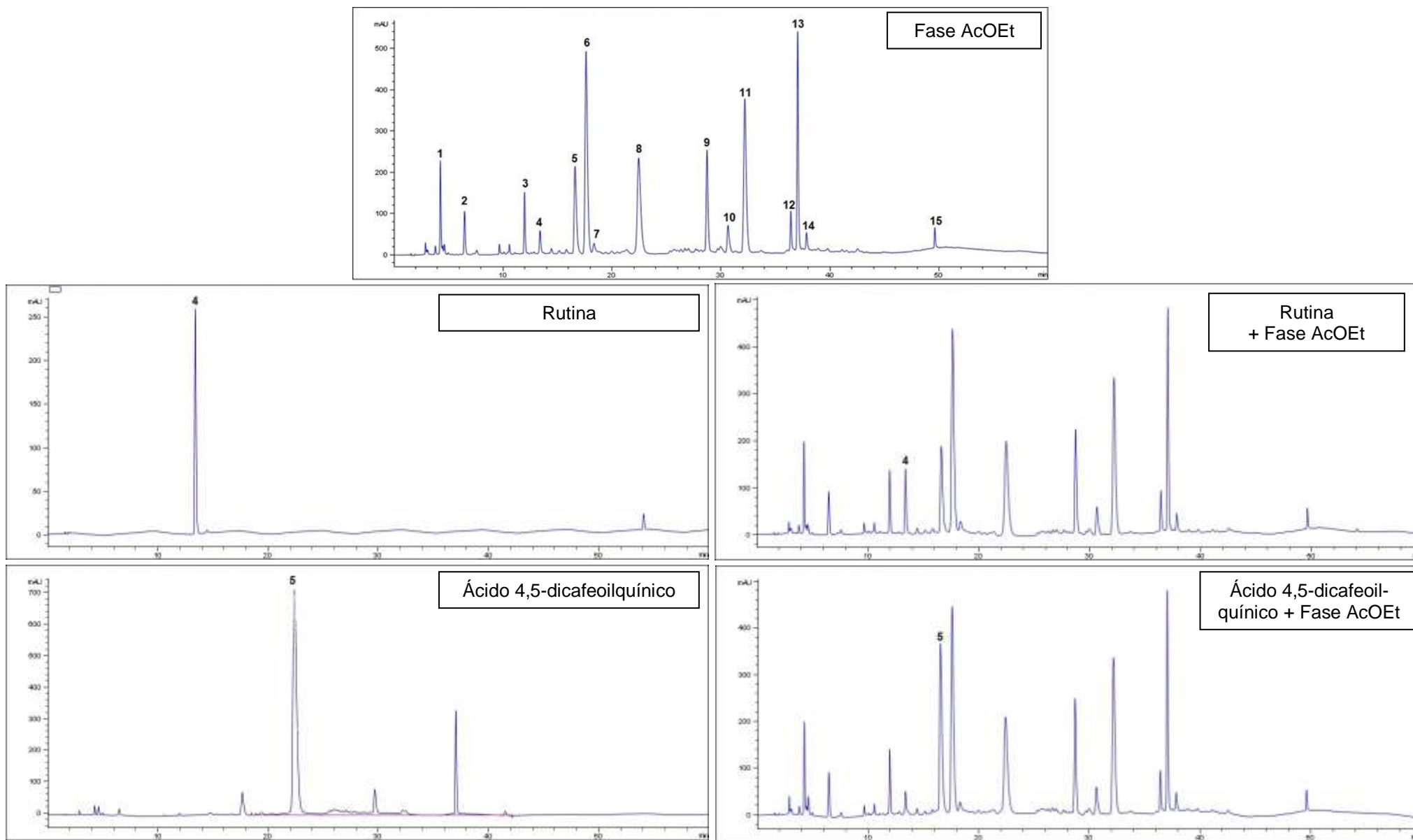


Figura 10. Continuação

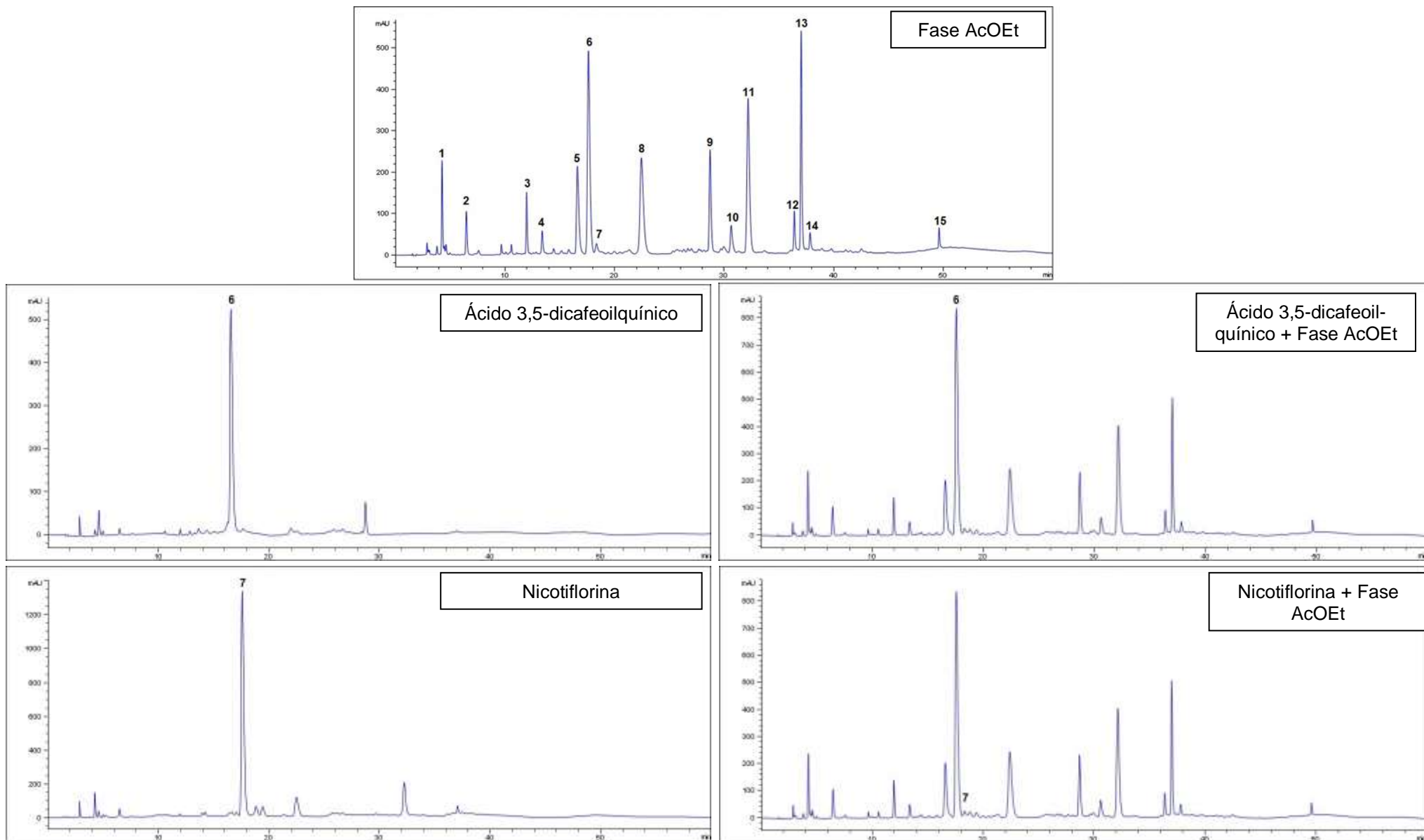


Figura 10. Continuação

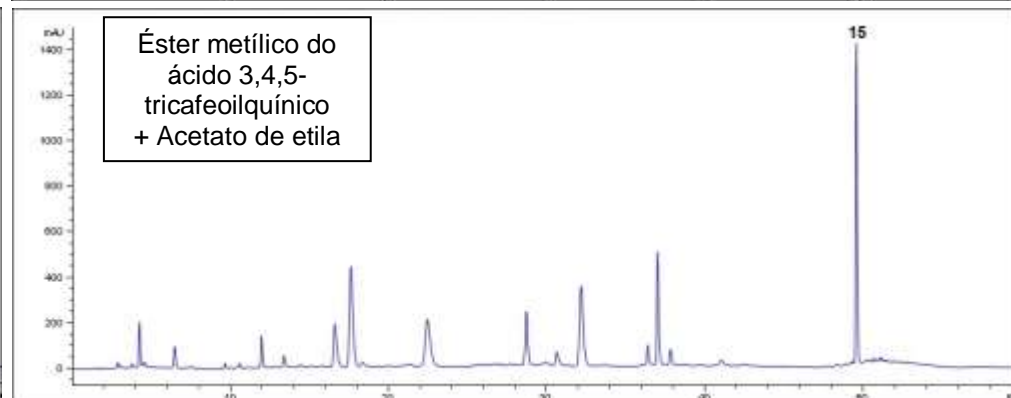
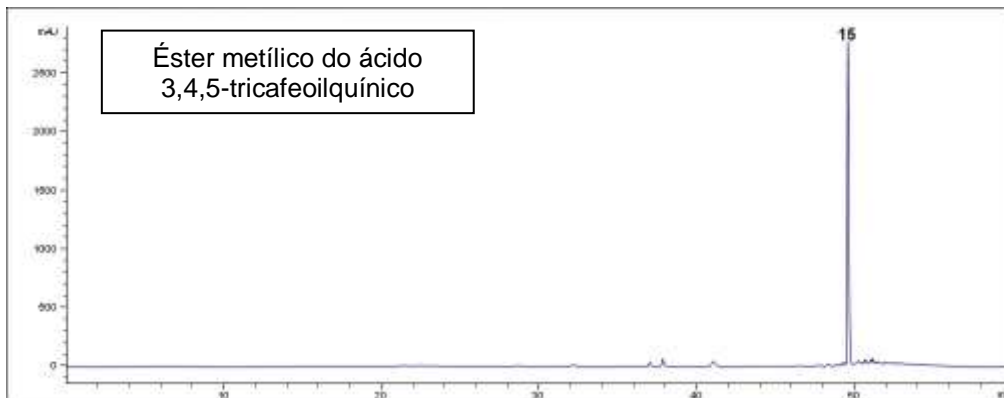
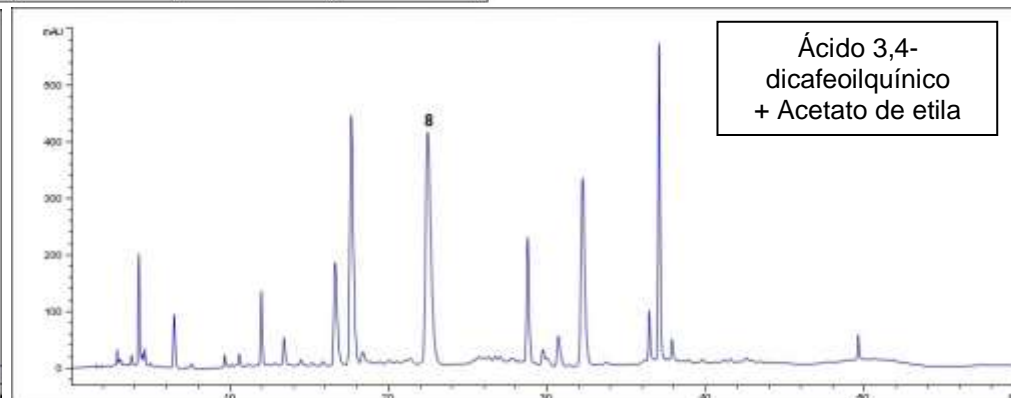
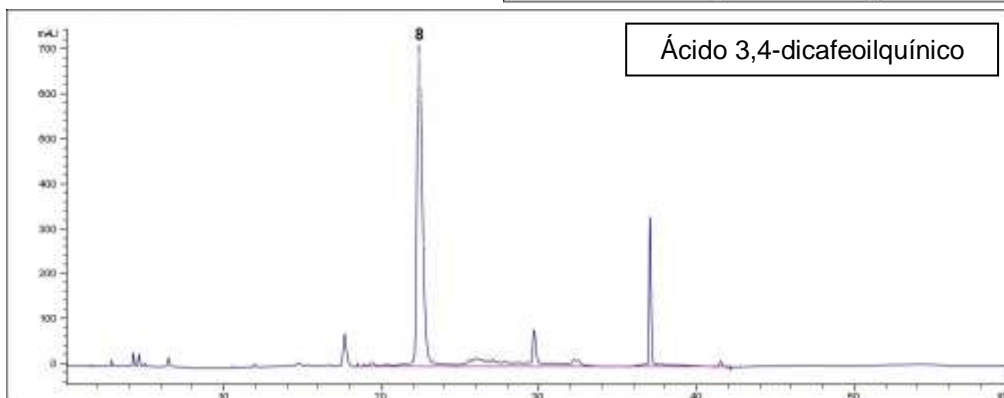
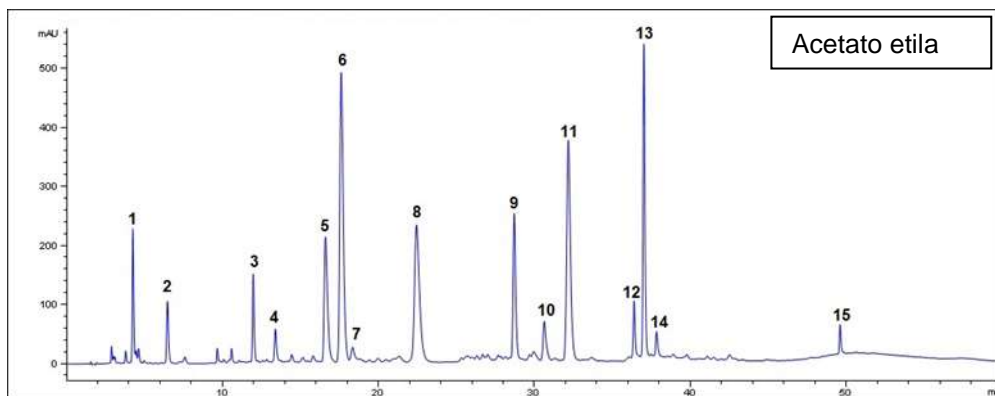


Figura 10. Continuação

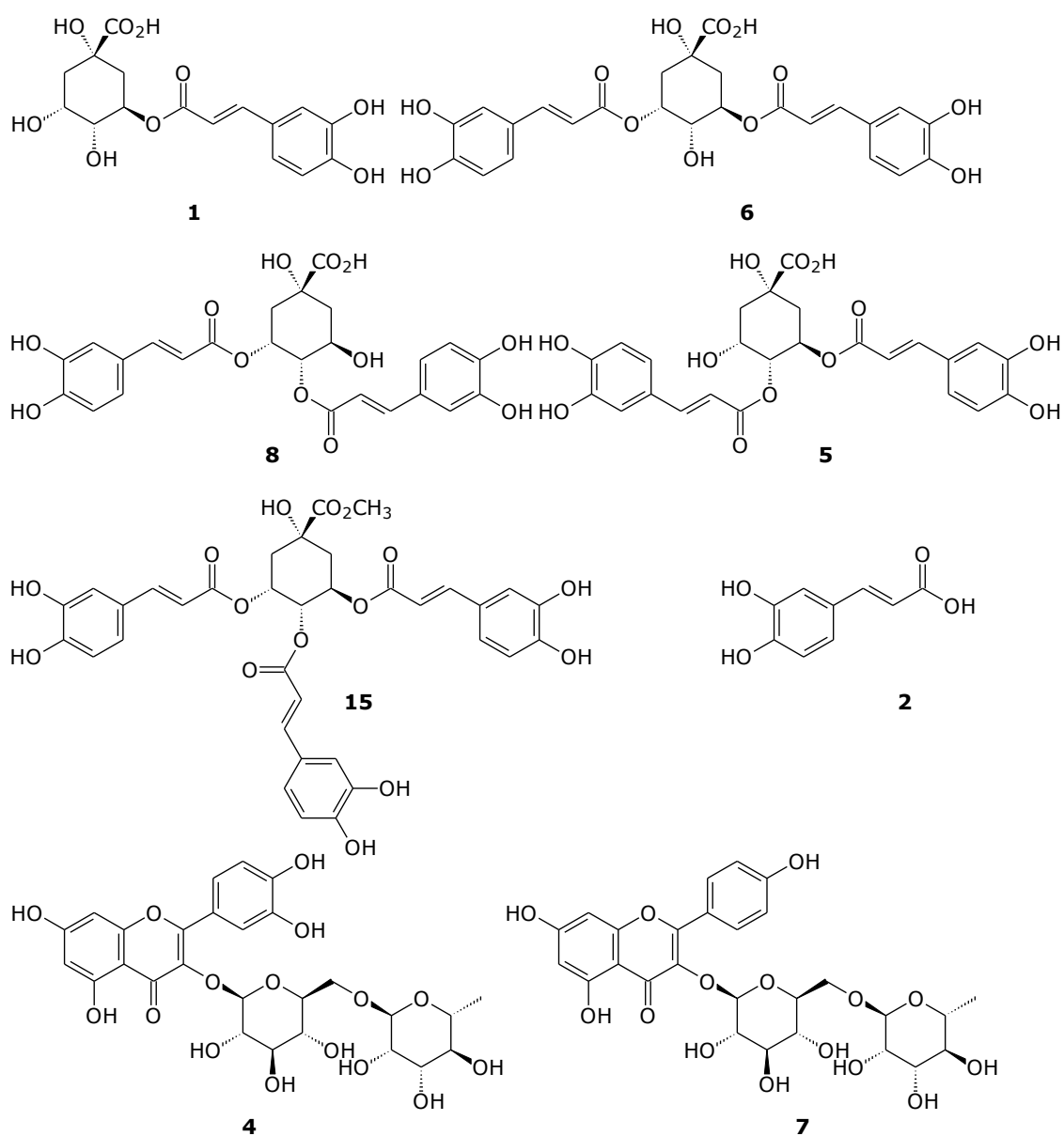


Figura 11. Substâncias presentes na fase em acetato de etila do extrato metanólico das folhas de *B. oblongifolia* e identificadas por adição de padrões.

Identificação do Componente 3

O componente 3 (27,5 mg) que possui tempo de retenção de 11,8 minutos (Figura 7) e espectro de absorção no UV característico da presença de um derivado de ácido cinâmico (Figura 8) foi obtido a partir do grupo 3 da fase AcOEt, através de purificação por CLAE semi-preparativo. Na análise do espectro de RMN ^1H pode-se observar a presença de um sistema ABX formado por dois dupletos em δ 6,80 (1H, $J=8,1$ Hz) e δ 7,06 (1H, $J=2,1$ Hz) e um duplo duplete em δ 6,97 (1H, $J=2,1$ e 8,1 Hz) sugerindo a presença de um anel aromático trissubstituído em C1', C3' e C4'. Adicionalmente, foram observados mais dois dupletos em δ 7,54 (1H, $J=15,9$ Hz) e δ 6,23 (1H, $J=15,9$ Hz) referentes a um acoplamento *trans* entre hidrogênios olefínicos, os quais foram atribuídos aos hidrogênios em C-7 e C-8 e sugeriram a presença de um sistema carboxílico α,β -insaturado com estereoquímica *trans*. Um simpleto em δ 3,71 foi observado integrando para três hidrogênios indicando a presença de uma metoxila. Através da análise do espectro bidimensional HMBC pode-se notar que os hidrogênios da metoxila correlacionam com o carbono carboxílico, indicando que a metoxila não está ligada ao anel aromático. Isso nos permitiu inferir presença de um éster metílico na estrutura e, conseqüentemente, de um grupamento cafeoíla. No espectro ainda são visualizados dois sinais alargados na região entre δ 2,00 – 2,30 integrando para 4 hidrogênios, dois duplos-dupletos em δ 3,75 (*dd*, 1H, $J=2,4$ Hz e $J=7,3$ Hz) e em δ 4,15 (*dd*, 1H, $J=3,3$ Hz e $J=6,7$ Hz) e um multiplete em δ 5,29. Assim, a partir desses dados, pode-se inferir a presença do éster metílico do ácido quínico.

A análise dos dados de RMN ^{13}C da porção alifática da substância 3 nos permitiu a identificação de dois sinais em δ 38,2, 37,9 correspondentes aos carbonos metilênicos do ácido quínico, de três sinais de carbonos carbinólicos em δ 72,6, 72,3, 70,4 e de um sinal de carbono quaternário oxigenado em δ 75,9. Tais sinais pertencentes ao núcleo do ácido quínico presente no componente 3 são compatíveis aos dados de literatura pertencentes ao éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico (Figura 12). As Tabelas 3 e 4 apresentam respectivamente, os deslocamentos químicos atribuídos de RMN ^1H e ^{13}C da substância e as

comparações com os dados de literatura obtidos para os três outros isômeros constitucionais (LUO et al., 2005).

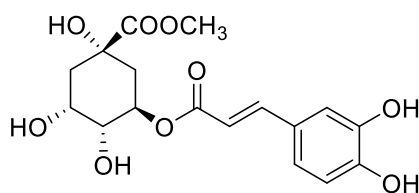


Figura 12. Estrutura química do éster metílico do ácido 5-cafeoilquinico.

Tabela 3. Dados de RMN ^1H do éster metílico do ácido 5-cafeoilquinico e dados de literatura (CD_3OD).

	Experimental	Me- 3-CQA	Me- 4-CQA	Me- 5-CQA
2	1,91 m	2,02 m (Hax)	2,05 m (Hax)	2,02 m (Hax)
	2,08 m	2,09 m (Heq)	2,24 m (Heq)	2,04 m (Heq)
3	5,18 m	4,11 ddd ($J= 3,5$ Hz)	4,27 ddd ($J= 3,5$ Hz)	5,29 dd ($J= 3,5$ Hz)
4	3,63 dd ($J=7,4; 3,1$ Hz)	3,68 dd ($J= 7,6; 3,5$ Hz)	4,84 dd ($J= 8,6; 3,5$ Hz)	3,74 dd ($J= 7,6; 3,5$ Hz)
5	4,04 dd ($J= 6,7; 3,3$ Hz)	5,34 ddd ($J= 3,5$ Hz)	4,29 ddd ($J= 3,5$ Hz)	4,15 ddd ($J= 3,5$ Hz)
6	1,91 m	2,01 m (Hax)	2,04 m (Hax)	2,03 m (Hax)
	2,08 m	2,22 m (Heq)	2,20 m (Heq)	2,24 m (Heq)
2'	7,06 d ($J= 1,9$ Hz)	7,03 d ($J= 2,02$ Hz)	7,06 d ($J= 1,6$ Hz)	7,08 d ($J= 1,6$ Hz)
5'	6,80 d ($J= 8,2$ Hz)	6,76 d ($J= 8,2$ Hz)	6,80 d ($J= 8,2$ Hz)	6,80 d ($J= 8,1$ Hz)
6'	6,97 dd ($J= 8,2; 1,9$ Hz)	6,94 dd ($J= 8,2; 2,02$ Hz)	6,99 dd ($J= 8,2; 1,6$ Hz)	6,99 dd ($J= 8,1; 1,6$ Hz)
7'	7,55 d ($J= 15,9$ Hz)	7,58 d ($J= 15,9$ Hz)	7,65 d ($J= 15,9$ Hz)	7,54 d ($J= 15,9$ Hz)
8'	6,24 d ($J= 15,9$ Hz)	6,29 d ($J= 15,9$ Hz)	6,38 d ($J= 15,9$ Hz)	6,23 d ($J= 15,9$ Hz)
OMe	3,60 s	3,73 s	3,73 s	3,73 s

d=dupleto; dd=duplo-dupleto; ddd= duplo-duplo-dupleto; m=multipleto

Tabela 4. Dados de RMN ^{13}C do éster metílico do ácido 5-cafeoil-quinico e dados de literatura dos três derivados do éster metílico do ácido cafeoil-quinico (CD_3OD).

	Experimental	Me- 3-CQA	Me- 4-CQA	Me- 5-CQA
1	75,9	75,3	76,4	75,8
2	37,9	40,8	42,1	37,9
3	72,3	68,6	65,6	72,0
4	72,6	73,8	78,5	72,4
5	70,4	72,6	69,0	70,2
6	38,2	36,3	37,7	38,3
7	175,6	176,4	175,6	175,4
1'	127,8	127,9	127,5	127,8
2'	115,2	115,1	115,2	115,2
3'	147,0	146,7	146,8	146,7
4'	149,9	147,4	149,6	149,5
5'	116,7	116,4	116,6	116,6
6'	123,0	122,9	122,9	122,9
7'	147,4	146,8	147,1	147,1
8'	115,3	115,7	115,2	115,1
9'	168,4	168,9	168,9	168,2
OMe	53,1	52,8	52,9	52,9

Identificação dos componentes 9, 11 e 13

Os componentes **9** (24,8 mg), **11** (28,8 mg) e **13** (41,8 mg) possuem, respectivamente, tempos de retenção de 28,6 min., 31,6 min. e 37,0 min. (Figura 7), espectros de absorção no UV característicos da presença de derivados de ácido cinâmico (Figura 8) e foram obtidos a partir do grupo 6 da fase AcOEt, através de purificação por CLAE semi-preparativo.

Em cada espectro de RMN ^1H pode-se observar a presença de quatro dupletos. Para o componente **9** em δ 7,58 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$), δ 7,57 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$), δ 6,29 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$) e δ 6,29 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$), para o **11** em δ 7,63 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$), δ 7,55 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$), δ 6,35 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$) e δ 6,23 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$) e para o **13** em δ 7,62 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$), δ 7,52 (H, $J= 15,9\text{Hz}$), δ 6,32 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$) e δ 6,19 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$) sugerindo a presença de dois sistemas carboxílicos α,β -insaturados com estereoquímica *trans*, nos três componentes.

Esses dados corroboram com o espectro de absorção confirmando a presença de um derivado de ácido cinâmico. Ainda pode-se observar no espectro de RMN ^1H da substância **9** quatro dupletos em δ 7,05 (1H, $J=2,3\text{Hz}$), δ 7,05 (1H, $J=2,2\text{Hz}$), δ 6,78 (2H, $J=8,3\text{Hz}$) e δ 6,76 (1H, $J=8,3\text{Hz}$) e dois duplos dupletos em δ 6,93 (1H, $J=1,8$; $8,4\text{Hz}$) e δ 6,91 (1H, $J=1,8$; $8,8\text{Hz}$), no componente **11** um simpleto alargado integrando para dois hidrogênios em δ 7,07 (2H), um duplo duplete em δ 6,97 (2H, $J=2,4$; $8,2\text{Hz}$) e dois dupletos em δ 6,80 (1H, $J=8,2\text{Hz}$) e δ 6,78 (1H, $J=8,2\text{Hz}$) e no componente **13** três dupletos em δ 7,05 (1H, $J=2,1\text{Hz}$), δ 7,03 (1H, $J=2,1\text{Hz}$) e δ 6,78 (2H, $J=8,2\text{Hz}$) e dois duplos dupletos sobrepostos em δ 6,94 (2H, $J=2,1$; $8,2\text{Hz}$) sugerindo a presença de dois grupamentos cafeoila nas três estruturas.

Os simpletos em δ 3,78, δ 3,70 e δ 3,74, integrando para três hidrogênios, foram observados nos espectros dos componentes **9**, **11** e **13**, respectivamente, indicando a presença de uma metoxila em cada estrutura. Através da análise dos espectros bidimensionais HMBC pode-se notar que os hidrogênios das metoxilas correlacionam com carboxilas, indicando que essas não estão ligadas aos anéis aromáticos. Dessa forma, foi possível inferir a presença de um éster metílico em cada estrutura.

No espectro de **9** ainda são visualizados um sinal alargado em δ 2,12, um duplete alargado em δ 2,17 (d, 1H, $J=9,0\text{Hz}$) e três duplos-dupletos em δ 5,64 (dd, 1H, $J=3,7\text{Hz}$ e $J=5,2\text{Hz}$), δ 5,06 (dd, 1H, $J=3,4\text{Hz}$ e $J=8,3\text{Hz}$) e δ 2,37 (dd, 1H, $J=3,8\text{Hz}$ e $J=14,4\text{Hz}$). No espectro de **11** são observados quatro multipletos em δ 5,41 (1H), δ 5,32 (1H), δ 2,32 (2H) e δ 2,18 (2H), e um duplo-duplete em δ 3,99 (dd, 1H, $J=3,2\text{Hz}$ e $J=6,6\text{Hz}$). No espectro de **13** são observados três multipletos em δ 5,56 (1H), δ 4,37 (1H) e δ 2,27 (2H), três duplos-dupletos em δ 5,14 (dd, 1H, $J=3,1\text{Hz}$ e $J=8,1\text{Hz}$), δ 2,34 (dd, 1H, $J=14,0\text{Hz}$ e $J=3,5\text{Hz}$) e δ 2,11 (dd, 1H, $J=13,9\text{Hz}$ e $J=6,4\text{Hz}$). Assim, a partir desses conjuntos de dados, os componentes **9**, **11** e **13** foram inferidos como ésteres metílicos do ácido dicafeoilquínico.

Os ésteres metílicos do ácido dicafeoilquínico podem ser 3,4-, 3,5- ou 4,5-disubstituídos. Na Tabela 5 são apresentadas as atribuições dos sinais das substâncias **9**, **11** e **13** e a comparação com os dados de literatura dos três derivados.

Tabela 5. Dados de RMN ¹H das substâncias **9**, **11** e **13** e dados de literatura de três isômeros do éster metílico do ácido dicafeoilquínico (CD₃OD).

	Componente 13	Éster metílico do ácido 3,4-dicafeoilquínico ^a	Éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico ^b	Componente 11	Éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico ^c	Componente 9
2	2,27 m	2,24 dd (<i>J</i> = 12,5; 8,6 Hz)	2,13 m / 2,35 m	2,18 m / 2,32 m	2,15 dl (<i>J</i> = 8,5 Hz)	2,17 dl (<i>J</i> = 9,0Hz)
3	5,56 m	5,54 dd (<i>J</i> = 6,5; 3,3 Hz)	5,31 m	5,32 m	4,35 m	4,35 m
4	5,14 dd (<i>J</i> = 8,1; 3,1 Hz)	5,11 dd (<i>J</i> = 8,1; 3,1 Hz)	3,98 sl	3,99 dd (<i>J</i> = 6,6; 3,2 Hz)	5,04 dd (<i>J</i> = 8,5; 3,5 Hz)	5,06 dd (<i>J</i> = 8,3; 3,4 Hz)
5	4,37 dt (<i>J</i> = 6,6; 3,3 Hz)	4,35 dt (<i>J</i> = 6,5; 3,3 Hz)	5,40 m	5,41 m	5,62 dt (<i>J</i> = 3,0; 5,0 Hz)	5,64 dt (<i>J</i> = 5,2; 3,7 Hz)
6	2,11 dd (<i>J</i> = 14,0; 6,4 Hz)	2,09 dd (<i>J</i> = 13,9; 6,3 Hz)	2,13 m	2,18 m	2,35 dd (<i>J</i> = 15; 4,0 Hz)	2,37 dd (<i>J</i> = 14,4; 3,8 Hz)
	2,34 dd (<i>J</i> = 14,0; 3,5 Hz)	2,33 dd (<i>J</i> = 13,9; 3,4 Hz)	2,35 m	2,32 m	2,12 dt (<i>J</i> = 15; 3,5 Hz)	2,12 m
2',2''	7,03 d (<i>J</i> =2,1 Hz)	7,01 d (<i>J</i> = 2 Hz)	7,07 sl	7,07 sl	7,02 d (<i>J</i> = 1,8 Hz)	7,05 d (<i>J</i> =2,3 Hz)
	7,05 d (<i>J</i> =2,1 Hz)	7,03 d (<i>J</i> = 2 Hz)	7,07 sl	7,07 sl	7,03 d (<i>J</i> = 2,0 Hz)	7,05 d (<i>J</i> =2,2 Hz)
5',5''	6,78 d (<i>J</i> = 8,2 Hz)	6,76 d (<i>J</i> = 8 Hz)	6,78 d (<i>J</i> = 8,0 Hz)	6,79 d (<i>J</i> = 8,2 Hz)	6,73 d (<i>J</i> = 8,0 Hz)	6,76 d (<i>J</i> = 8,3 Hz)
	6,78 d (<i>J</i> = 8,2 Hz)	6,76 d (<i>J</i> = 8 Hz)	6,79 d (<i>J</i> = 8,0 Hz)	6,80 d (<i>J</i> = 8,2 Hz)	6,76 d (<i>J</i> = 8,0 Hz)	6,78 d (<i>J</i> = 8,3 Hz)
6',6''	6,94 dd (<i>J</i> = 8,2; 2,1 Hz)	6,92 dd (<i>J</i> = 8,1; 2,0 Hz)	6,97 dl (<i>J</i> = 8,0 Hz)	6,97 dd (<i>J</i> = 8,2; 2,4 Hz)	6,88 dd (<i>J</i> = 8,0; 2,0 Hz)	6,91 dd (<i>J</i> = 8,8; 1,8 Hz)
	6,94 dd (<i>J</i> = 8,2; 2,1 Hz)	6,92 dd (<i>J</i> = 8,1; 2,0 Hz)	6,97 dl (<i>J</i> = 8,0 Hz)	6,97 dd (<i>J</i> = 8,2; 2,4 Hz)	6,91 dd (<i>J</i> = 8,0; 2,0 Hz)	6,93 dd (<i>J</i> = 8,4; 1,8 Hz)
7',7''	7,52 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)	7,51 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)	7,55 d (<i>J</i> =15,8 Hz)	7,55 d (<i>J</i> =15,9 Hz)	7,54 d (<i>J</i> =16,0 Hz)	7,57 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)
	7,62 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)	7,60 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)	7,62 d (<i>J</i> =16,0 Hz)	7,63 d (<i>J</i> =15,9 Hz)	7,56 d (<i>J</i> =16,0 Hz)	7,58 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)
8',8''	6,32 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)	6,30 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)	6,34 d (<i>J</i> =16,0 Hz)	6,35 d (<i>J</i> =15,9 Hz)	6,26 d (<i>J</i> =16,0 Hz)	6,29 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)
	6,19 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)	6,17 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)	6,22 d (<i>J</i> =15,8 Hz)	6,23 d (<i>J</i> =15,9 Hz)	6,26 d (<i>J</i> =16,0 Hz)	6,29 d (<i>J</i> = 15,9 Hz)
OCH ₃	3,74 s	3,71s	3,70 s	3,70 s	3,76 s	3,78 s

d= dupleteo; dd= duplo-dupleteo; dl= dupleteo largo; m= multipleteo; sl= simpleto largo; ^aPING *et al.* 2014; ^bMOON *et al.*, 2011; ^cKADOTA *et al.*, 1996

Os dados de RMN ^1H não nos permitiram assegurar, sem equívocos, qual dos derivados está presente em cada amostra. Assim, para a determinação da posição de substituição dos grupos cafeoila no éster metílico do ácido quínico, as amostras foram submetidas à análise por RMN ^{13}C .

A análise dos dados de RMN ^{13}C , especialmente da porção alifática das substâncias (Tabela 6), nos permitiu a identificação de dois carbonos metilênicos do ácido quínico cujos sinais em **9** foram detectados em δ 41,4 e δ 36,8, no componente **11** em δ 36,7 e δ 35,6, e para **13** em δ 38,4, e de três sinais de carbonos carbinólicos em δ 75,2, δ 69,9 e δ 66,1 para **9**, em δ 72,2, δ 72,0 e δ 69,7 para **11** enquanto para **13** em δ 74,9, δ 69,1 e δ 68,6. Adicionalmente, um sinal de carbono quaternário oxigenado foi observado em δ 75,4, δ 74,6 e δ 75,8 para os componentes **9**, **11** e **13**, respectivamente. Tais sinais pertencentes ao núcleo do ácido quínico das substâncias **9**, **11** e **13** são compatíveis, respectivamente, aos dados de literatura pertencentes ao éster metílico do ácido 4,5-dicafeoil-quínico, ao éster metílico do ácido 3,5-dicafeoil-quínico e ao éster metílico do ácido 3,4-dicafeoil-quínico, apresentados na Figura 13. A Tabela 6 apresenta os deslocamentos químicos atribuídos de RMN ^{13}C das substâncias e a comparação com os dados de literatura dos três derivados.

Tabela 6. Dados de RMN ^{13}C das substâncias **9**, **11** e **13** e dados de literatura dos três derivados do éster metílico do ácido dicafeoilquínico (CD_3OD).

	Componente 13	Me-3,4-diCQA ^a	Me-3,5-diCQA ^b	Componente 11	Me-4,5-diCQA ^c	Componente 9
1	75,8	75,9	74,6	74,6	76,3	75,4
2	38,4	38,6	35,6	35,6	42,1	41,4
3	69,1	69,2	72,0	72,0	66,8	66,1
4	74,9	74,8	69,8	69,7	70,6	69,9
5	68,6	68,7	72,1	72,2	75,9	75,2
6	38,4	38,5	36,7	36,7	37,57	36,8
7	175,2	175,3	175,6	175,1	176,9	176,2
1', 1''	127,5; 127,7	127,8; 127,8	127,8; 127,8	127,9; 127,6	128,5; 128,5	127,8; 127,7
2', 2''	115,1; 115,1	115,3; 115,3	115,1; 115,1	115,2; 115,2	115,9; 115,9	115,1; 114,9
3', 3''	146,7; 146,8	147,0; 147,0	146,7; 146,8	146,8; 146,7	147,6; 147,6	146,7; 146,6
4', 4''	149,7; 149,7	149,9; 149,9	149,5; 149,7	149,5; 149,7	150,4; 150,4	149,7; 149,7
5', 5''	116,5; 116,5	116,7; 116,7	116,4; 116,5	116,6; 116,5	117,3; 117,3	116,5; 116,5
6', 6''	123,1; 123,1	123,1; 123,1	123,0; 123,1	123,1; 123,0	124,0; 123,9	123,3; 123,2
7', 7''	147,7; 146,7	147,9; 147,9	147,1; 147,4	147,2; 147,4	148,2; 148,2	147,4; 146,8
8', 8''	114,5; 114,7	114,8; 114,8	114,8; 115,4	114,8; 115,4	115,8; 115,6	115,2; 115,1
9', 9''	167,9; 168,5	168,1; 168,6	168,0; 168,7	168,0; 168,8	169,2; 169,3	168,6; 168,5
OCH ₃	53,1	53,2	53,0	53,0	53,8	53,0

^aPING *et al.* 2014; ^bKANG *et al.*, 2011; ^cKADOTA *et al.*, 1996.

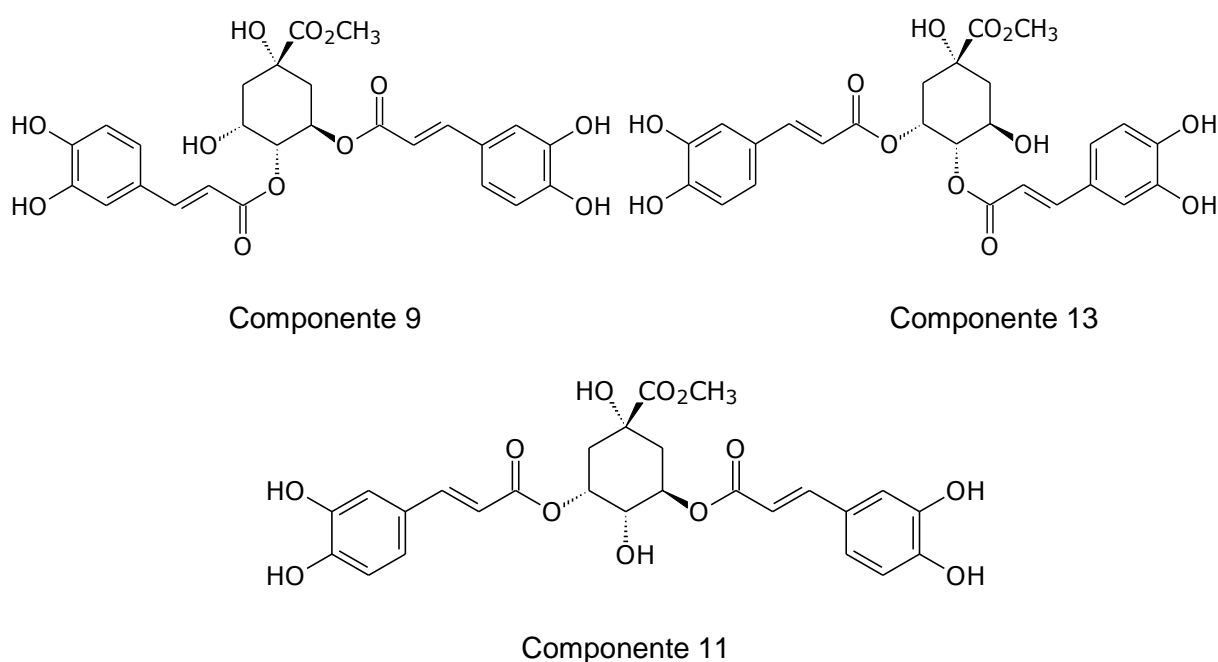


Figura 13. Estruturas químicas dos ésteres metílicos dos ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico.

Tabela 7. Dados de RMN ^{13}C não atribuídos referentes à porção alifática das substâncias 9, 11 e 13 e de três isômeros do éster metílico do ácido dicafeoilquínico obtidos da literatura (CD_3OD).

Componente 13	Me-3,4-diCQA ^a	Me-3,5-diCQA ^b	Componente 11	Me-4,5-diCQA ^c	Componente 9
75,8	75,9	74,6	74,6	76,3	75,4
74,9	74,8	72,1	72,2	75,9	75,2
69,1	69,2	72,0	72,0	70,6	69,9
68,6	68,7	69,8	69,7	66,8	66,1
38,4	38,6	36,1	36,7	42,1	41,4
38,4	38,5	35,6	35,6	37,6	36,8

^aPING et al., 2014; ^bKANG et al., 2011; ^cKADOTA et al., 1996

Identificação dos componentes 10 e 12

Os componentes **10** (27,8 mg) e **12** (16,8 mg) possuem tempos de retenção de 30,5 min. e 36,2 min., respectivamente (Figura 7), e foram obtidos a partir do grupo 6 da fase AcOEt, através de purificação por CLAE semi-preparativo. Os espectros de absorção no UV são característicos da presença de derivados de ácido cinâmico (Figura 8), embora a banda de maior intensidade de absorção esteja deslocada para 345 nm em **10** e para 335 nm em **12**.

Através dos dados de RMN ^1H pode-se notar na região aromática dos espectros, de ambos componentes, dois dupletos em δ 7,62 (1H, $J=15,8$ Hz) e δ 6,33 (1H, $J=15,8$ Hz) referentes a um acoplamento *trans* entre hidrogênios olefínicos, os quais foram atribuídos aos hidrogênios em C-7'''' e C-8'''' sugerindo a presença de um sistema carboxílico α,β -insaturado com estereoquímica *trans*. Nos espectros ainda são observados dois dupletos em δ 7,06 (1H, $J= 2,0\text{Hz}$) e δ 6,78 – 6,79 (1H, $J= 8,2\text{Hz}$) e um duplo duplete em δ 6,95 – 6,94 (1H, $J=2,0$; 8,2Hz) sugerindo a presença do grupamento cafeoíla nas estruturas.

Ainda na região aromática foram observados em **10** sinais com o padrão de substituição característico do flavonol quercetina, com dois dupletos em δ 6,29 (1H, $J= 2,0\text{Hz}$) e δ 6,13 (1H, $J= 2,0\text{Hz}$) referentes ao acoplamento em *meta* dos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, dois dupletos em δ 7,57 (1H, $J= 2,1\text{Hz}$) e δ 6,86 (1H, $J= 8,1\text{Hz}$) e um duplo duplete em δ 7,56 (1H, $J= 2,1\text{Hz}$ e 8,1Hz), respectivamente atribuídos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' do anel B. Em **12**, foram observados sinais com o padrão de substituição característico do flavonol caempferol, com dois dupletos em δ 7,99 (2H, $J= 8,4\text{Hz}$) e δ 6,90 (2H, $J= 8,4\text{Hz}$)

referentes ao acoplamento em *orto* dos hidrogênios do anel B *para*-substituído, e dois simpletos alargados em δ 6,35 (1H) e δ 6,17 (1H), atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8 do anel A, que deveriam aparecer como dois dupletos referentes ao acoplamento *meta* entre os mesmos. As estruturas dos flavonóis e das cafeóilas foram confirmadas através dos dados de RMN ^{13}C e correlações bidimensionais dos espectros HSQC e HMBC.

Adicionalmente, no espectro de RMN ^1H de **10** pode-se observar a presença de um duplete em δ 5,48 (1H, $J = 8,0\text{Hz}$) e um simpleto largo a δ 4,55 (1H) enquanto em **12** dois dupletos foram detectados em δ 5,55 (1H, $J = 8,0\text{Hz}$) e δ 4,54 (1H, $J = 1,4\text{Hz}$). Em ambos os casos, tais sinais são característicos de hidrogênios ligados a carbonos anoméricos de açúcares e com acoplamento *trans*-di axial e equatorial-equatorial, respectivamente. A presença de três dupletos em δ 3,87 (1H, $J = 9,5\text{Hz}$), δ 3,27 (1H, $J = 9,5\text{Hz}$) e δ 1,13 (3H, $J = 6,2\text{Hz}$) em **10**, e em δ 3,87 (1H, $J = 9,2\text{Hz}$), δ 3,43 (1H, $J = 9,2\text{Hz}$) e δ 1,13 (3H, $J = 6,2\text{Hz}$) em **12** permitiram inferir a presença de uma glicose substituída em C-6'' e de uma rhamnose em cada estrutura. Um duplo duplete em δ 5,04 (1H, $J = 8,0\text{Hz}$ e $9,6\text{Hz}$) e δ 5,01 (1H, $J = 8,0\text{Hz}$ e $9,6\text{Hz}$) para **10** e **12** permitiu inferir que a hidroxila de C-2'' da glicose encontra-se substituída. Os demais sinais na região entre δ 3,64 – 3,27 juntamente com 12 sinais no espectro de RMN ^{13}C confirmaram a presença das duas unidades de açúcar.

Através das correlações dos espectros bidimensionais HSQC e HMBC pode-se estabelecer as conectividades entre os grupamentos nas estruturas. No componente **10** o sinal em δ 5,48, atribuído ao hidrogênio H-1'' pertencente a unidade glicosídica, correlacionou com o sinal em δ 133,3 atribuído ao carbono C-3 do flavonoide, permitindo confirmar que a glicose está ligada na posição C-3 da quercetina. Adicionalmente, o sinal em δ 5,04, atribuído ao hidrogênio H-2'' da glicose, correlacionou com os sinais em δ 167,2, δ 100,2 e δ 74,9 atribuídos, respectivamente, a carboxila do grupamento cafeóila e aos carbonos C-1'' e C-3'' da glicose. Tais correlações confirmaram a presença do grupo cafeóila esterificado na hidroxila da posição C-2 da glicose.

Para o componente **12**, o sinal em δ 7,99, atribuído aos hidrogênios H2' e H6' pertencentes ao anel B do flavonoide, correlacionou com os sinais em δ 160,0, δ 157,5, δ 130,8 e δ 114,8 atribuídos, respectivamente, aos carbonos C4',

C2, C2'/C6' e C3'/C5'. Tais correlações confirmaram a presença do flavonoide caempferol. De modo análogo ao relatado anteriormente, o sinal em δ 5,55 atribuído ao hidrogênio H-1'' pertencente a unidade glicosídica, correlacionou com os sinais em δ 133,3 e δ 76,0 atribuídos, respectivamente, aos carbonos C-3 do flavonoide e C-5'' da glicose. A observação dessas correlações permitiu confirmar que a unidade de glicose está ligada na posição C-3 do caempferol. Por fim, o sinal em δ 5,01, atribuído ao hidrogênio H-2'' da glicose, correlacionou com os sinais em δ 167,1, δ 99,4 e δ 74,8 atribuídos, respectivamente, a carboxila do grupamento cafeoila e aos carbonos C-1'' e C-3'' da glicose, confirmando a presença do grupo cafeoila esterificado na hidroxila da posição C-2 da glicose. As principais correlações observadas nos espectros HMBC das substâncias são apresentadas na Figura 14.

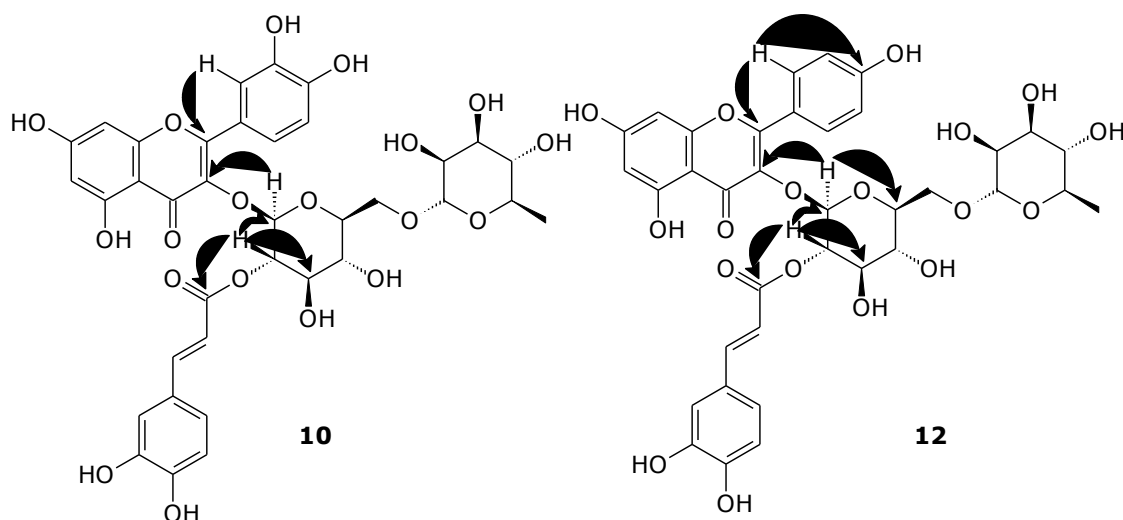


Figura 14. Principais correlações observadas nos espectros HMBC dos componentes **10** e **12**.

Dessa forma, as estruturas dos componentes 10 e 12 (Figura 15) foram elucidadas como sendo, respectivamente, a quercetina-3-O-β-[2''-O-(*E*)-cafeoil]-rutinosídeo e o caempferol-3-O-β-[2''-O-(*E*)-cafeoil]-rutinosídeo, dois flavonoides inéditos em literatura, descritos pela primeira vez nesse trabalho e designados como oblongifoliosídeo A e B. Os dados espectrais dos componentes são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

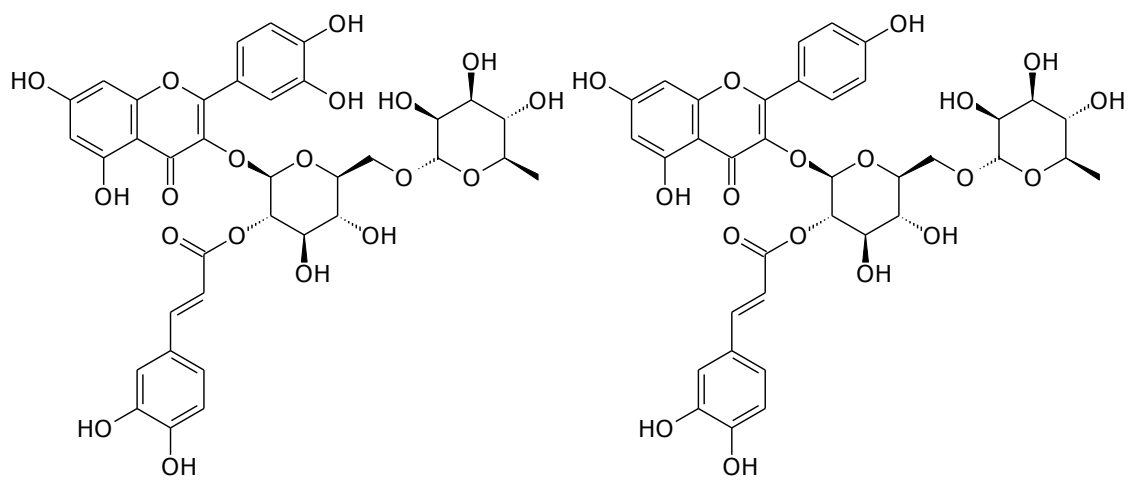


Figura 15. Estruturas químicas dos oblongifoliosídeos A e B.

Tabela 8. Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e gHMBC do oblongifoliosídeo A [quercetina-3-O- β -(2''-O-E-cafeoil)-rutinosídeo] (CD_3OD ; 500MHz).

Posição	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C	gHMBC
2	----	157,4	----
3	----	133,4	----
4	----	177,6	----
5	----	161,7*	----
6	6,13 d ($J= 2,0$ Hz)	99,5	C ₅ ; C ₇ ; C ₈ ; C ₁₀
7	----	165,2*	----
8	6,29 d ($J= 2,0$ Hz)	93,8*	C ₆
9	----	157,0	----
10	----	103,4	----
1'	----	121,5	----
2'	7,57 d ($J= 2,1$ Hz)	122,1	C ₂ ; C ₆ '; C ₄ '
3'	----	144,5	----
4'	----	148,4	----
5'	6,86 d ($J= 8,2$ Hz)	114,8	C ₁ '; C ₃ '; C ₄ '
6'	7,56 dd ($J= 2,1$; 8,2 Hz)	115,9	C ₄ '; C ₅ '
1''	5,48 d ($J= 8,0$ Hz)	99,5	C ₃
2''	5,04 dd ($J= 8,0$; 9,6 Hz)	74,3	C ₁ ''; C ₃ ''; C ₉ '''
3''	3,60 d ($J= 9,6$ Hz)	74,9	C ₂ ''; C ₄ ''
4''	3,43 d ($J= 4,7$ Hz)	70,7	C ₅ ''; C ₆ ''
5''	3,38 d ($J= 8,5$ Hz)	75,8	C ₄ ''; C ₆ ''
6''	3,87 d ($J= 9,5$ Hz) 3,55 d ($J= 9,5$ Hz)	66,9	C ₅ ''; C ₁ '''
1'''	4,55 sl	100,9	C ₃ '''; C ₅ '''
2'''	3,49 d ($J= 3,1$ Hz)	70,7	
3'''	3,66 dd ($J= 3,3$; 1,7 Hz)	70,9	C ₄ '''
4'''	3,27 d ($J= 9,5$ Hz)	72,5	C ₃ '''; C ₅ '''; C ₆ '''
5'''	3,46 d ($J= 6,4$ Hz)	68,4	C ₄ '''
6'''	1,13 d ($J= 6,2$ Hz)	16,5	C ₄ '''; C ₅ '''
1''''	----	126,5	----
2''''	7,06 d ($J= 2,1$ Hz)	113,8	C ₃ ''''; C ₄ ''''; C ₆ ''''
3''''	----	145,4	----
4''''	----	148,2	----
5''''	6,78 d ($J= 8,2$ Hz)	115,1	C ₁ ''''; C ₃ ''''; C ₄ ''''; C ₆ ''''
6''''	6,94 dd ($J= 2,1$; 8,2 Hz)	121,7	C ₄ ''''; C ₇ ''''; C ₈ ''''
7''''	7,62 d ($J= 15,8$ Hz)	146,0	C ₁ ''''; C ₂ ''''; C ₆ ''''; C ₉ ''''
8''''	6,33 d ($J= 15,8$ Hz)	113,4	C ₁ ''''; C ₉ ''''
9''''	----	167,2	----

d= dupleteo; dd= duplo-dupleteo; sl= simpleto largo; *dados obtidos através dos espectros HSQC e HMBC.

Tabela 9. Dados de RMN ^1H , RMN ^{13}C e gHMBC do oblongifoliosídeo B [caempferol 3-O- β -(2''-O-E-cafeoil)-rutinosídeo] (CD_3OD ; 500MHz)

Posição	δ RMN ^1H	δ RMN ^{13}C	gHMBC
2	----	157,5	----
3	----	133,3	----
4	----	177,7	----
5	----	161,7	----
6	6,17 sl	98,5	C ₅ ; C ₇ ; C ₈ ; C ₁₀
7	----	164,5	----
8	6,35 sl	93,5	C ₆ ; C _{1''''} ; C _{9''''}
9	----	157,0	----
10	----	104,4	----
1'	----	121,5	----
2',6'	7,99 d ($J= 8,4$ Hz)	130,8	C ₂ ; C _{2'/6'} ; C _{3'/5'} ; C _{4'}
3',5'	6,90 d ($J= 8,4$ Hz)	114,8	C _{1'} ; C _{3'/5'} ; C _{4'}
4'	----	160,0	----
1''	5,55 d ($J= 8,0$ Hz)	99,4	C ₃ ; C _{5''}
2''	5,01 dd ($J= 8,0$; 9,6 Hz)	74,3	C _{1''} ; C _{3''} ; C _{9''''}
3''	3,61 d ($J= 9,6$ Hz)	74,8	C _{2''} ; C _{4''}
4''	3,35 d ($J= 2,4$ Hz)	70,4	C _{5''} ; C _{6''}
5''	3,43 d ($J= 9,3$ Hz)	76,0	C _{4''} ; C _{6''}
6''	3,87 d ($J= 9,3$ Hz)	66,9	C _{4''} ; C _{1''''}
	3,43 d ($J= 9,3$ Hz)		
1'''	4,54 d ($J= 1,4$ Hz)	100,9	C _{3'''} ; C _{5'''}
2'''	3,64 d ($J= 3,3$ Hz)	70,7	
3'''	3,53 dd ($J= 3,3$; 9,5 Hz)	70,9	C _{4'''}
4'''	3,27 d ($J= 9,5$ Hz)	72,5	C _{3'''} ; C _{5'''} ; C _{6'''}
5'''	3,47 dd ($J= 6,2$; 9,5 Hz)	68,4	C _{4'''}
6'''	1,13 d ($J= 6,2$ Hz)	16,5	C _{4'''} ; C _{5'''}
1''''	----	126,5	----
2''''	7,06 d ($J= 2,0$ Hz)	113,8	C _{3''''} ; C _{4''''} ; C _{6''''}
3''''	----	145,5	----
4''''	----	148,2	----
5''''	6,79 d ($J= 8,2$ Hz)	115,1	C _{1''''} ; C _{3''''} ; C _{4''''} ; C _{6''''}
6''''	6,95 dd ($J= 2,0$; 8,2 Hz)	121,7	C _{4''''} ; C _{7''''} ; C _{8''''}
7''''	7,62 d ($J= 15,8$ Hz)	146,0	C _{1''''} ; C _{2''''} ; C _{6''''} ; C _{9''''}
8''''	6,32 d ($J= 15,8$ Hz)	113,8	C _{1''''} ; C _{9''''}
9''''	----	167,1	----

d= duplete; dd= duplo-duplete; sl= simpleto largo;

Para ambos os componentes foram requisitados dados de massas de alta resolução para complementação da descrição dos novos componentes. Até o momento, apenas os dados do caempferol 3-*O*- β -(2''-*O*-*E*-cafeoil)-rutinosídeo foram disponibilizados. Na Figura 16 pode-se visualizar os dados de massas de alta resolução obtidos em modo positivo e negativo.

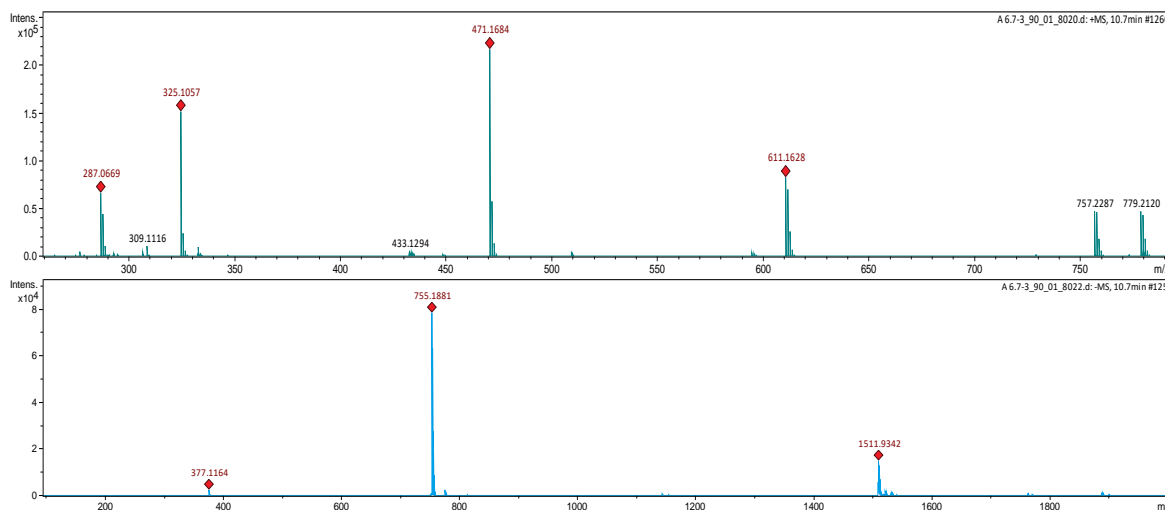


Figura 16. Espectros de massas de alta resolução obtidos em modo positivo (acima) e negativo (abaixo) para o componente 12 [caempferol 3-*O*- β -(2''-*O*-*E*-cafeoil)-rutinosídeo].

No espectro obtido em modo positivo, observa-se dois picos de massas 757,2287 e 779,2120 referentes, respectivamente, aos adutos $[M+H]^+$ e $[M+Na]^+$ os quais confirmam a massa molecular do caempferol 3-*O*- β -(2''-*O*-*E*-cafeoil)-rutinosídeo. Posteriormente, o fragmento de massa 611,1628 pode ser atribuído ao íon $[M+H-Rha]^+$ evidenciando a perda de 146u e, conseqüentemente, a saída da unidade de rhamnose. Os fragmentos de massas 471,1684 e 325,1057 podem ser atribuídos, respectivamente, as perdas do flavonoide caempferol e da rhamnose+caempferol, permitindo inferir a presença dos íons $[M+H-Caempferol]^+$ e $[M+H-Rha-Caempferol]^+$. Por fim, o fragmento de massa 287,0669 é atribuído a estrutura do caempferol protonado, originado da perda das duas unidades de açúcar e do grupamento cafeoila $[M+H-Rha-Glc-Caf]^+$.

Por outro lado, no espectro de massas obtido em modo negativo, observa-se dois picos de massas em 755,1881 e 1511,9342 referentes, respectivamente, aos adutos $[M-H]^-$ e $[2M-H]^-$ os quais confirmam a fórmula molecular $C_{36}H_{36}O_{18}$ e, conseqüentemente, a estrutura do caempferol 3-*O*- β -(2''-*O*-*E*-cafeoil)-rutinosídeo.

Identificação do componente **14**

O componente **14** (5,0 mg) possui tempo de retenção de 37,6 min. (Figura 7), espectro de absorção no UV característico de derivado de ácido cinâmico (Figura 8) e foi obtido a partir do grupo 8 da fase AcOEt, através de purificação por CLAE semi-preparativo.

No espectro de RMN ^1H pode-se observar a presença de cinco dupletos em δ 7,62 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$), δ 7,53 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$), δ 7,49 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$), δ 6,21 (1H, $J= 15,9\text{Hz}$) e δ 6,17 (2H, $J= 15,9\text{Hz}$) sugerindo a presença de três sistemas carboxílicos α,β -insaturados com estereoquímica *trans*. Tais dados corroboram com o espectro de absorção no UV confirmando a presença de um derivado de ácido cinâmico. Ainda pode-se observar no espectro de RMN ^1H da substância seis dupletos em δ 7,08 (1H, $J= 2,0\text{Hz}$), δ 7,01 (1H, $J= 2,1\text{Hz}$), δ 6,96 (2H, $J= 2,0\text{Hz}$), δ 6,78 (1H, $J=8,2\text{Hz}$) δ 6,74 (1H, $J=8,2\text{Hz}$) e δ 6,68 (1H, $J=8,2\text{Hz}$) e três duplos dupletos em δ 6,96 (1H, $J=2,1; 8,2\text{Hz}$), δ 6,90 (1H, $J=2,0; 8,2\text{Hz}$) e δ 6,81 (1H, $J=2,0; 8,2\text{Hz}$) sugerindo a presença de três grupamentos cafeoíla.

No espectro do componente **14** ainda são visualizados dois multipletos em δ 2,28 (1H) e δ 5,68 (2H) e quatro duplos-dupletos em δ 5,30 (dd, 1H, $J= 3,5\text{Hz}$ e $J= 10,0\text{Hz}$), δ 2,46 (dd, 1H, $J= 3,7\text{Hz}$ e $J= 14,5\text{Hz}$), δ 2,35 (dd, 1H, $J= 13,5\text{Hz}$ e $J= 9,2\text{Hz}$) e δ 2,17 (dd, 1H, $J= 5,9\text{Hz}$ e $J= 14,4\text{Hz}$), que permitiram inferir a presença da unidade de ácido quínico na estrutura. Assim, a estrutura do componente **14** foi determinada como sendo o ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (Figura 17), o qual foi confirmado através dos dados de RMN ^{13}C , apresentados em conjunto com dados de literatura (MIYAMAE et al., 2011) na Tabela 10.

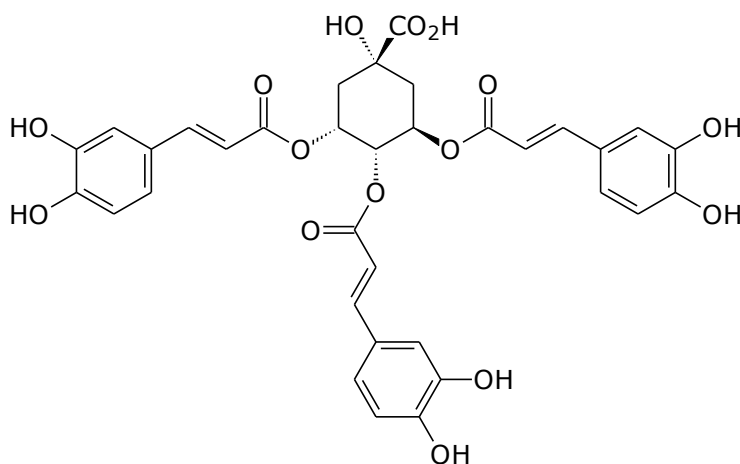


Figura 17. Estrutura química do ácido 3,4,5-tricafeoil-quínico

Tabela 10. Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C do ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (componente 14) e comparação com dados de literatura (CD_3OD ; 500MHz).

Posição	RMN ^1H (J= Hz)		RMN ^{13}C	
	Exp.	Lit.	Exp.	Lit.
1	---	---	74,9	73,6
2	2,35 dd (13,5; 9,2) 2,28 m	2,34- 2,49 m	36,5	37,5
3	5,68 m	5,71 m	69,7	70,8
4	5,30 dd (10,0; 3,5)	5,36 dd (8,2; 3,0)	72,0	73,5
5	5,68 m	5,71 m	69,3	70,0
6	2,46 dd (14,5; 3,7) 2,17 dd (14,4; 5,9)	2,34- 2,49 m	38,0	39,5
7	---	---	175,7	178,1
1', 1'', 1'''	---	---	127,8;127,6; 127,6	128,6;128,5; 128,4
2', 2'', 2'''	7,08 d (2,0) 7,01 d (2,1) 6,96 d (2,0)	7,10 m 7,03 m 6,99 m	115,3 115,2 115,2	116,6 116,0 115,9
3', 3'', 3'''	---	---	146,9	147,6;147,5; 147,2
4', 4'', 4'''	---	---	149,9;149,9; 149,8	150,5;150,4; 150,4
5', 5'', 5'''	6,78 d (8,2) 6,74 d (8,2) 6,68 d (8,2)	6,81 d (8,3) 6,79 d (8,3) 6,75 d (8,3)	116,5	117,3 117,2 117,1
6', 6'', 6'''	6,96 dd (8,1; 2,1) 6,90 dd (8,2; 2,1) 6,81 dd (8,3; 2,1)	7,06 m 6,98 m 6,81 m	123,6 123,3 123,3	124,1 124,1 124,3
7', 7'', 7'''	7,62 d (15,9) 7,53 d (15,9) 7,49 d (15,9)	7,64 d (15,7) 7,58 d (15,7) 7,56 d (15,7)	148,2 148,0 147,7	148,7 148,5 148,4
8', 8'', 8'''	6,17 d (15,9) 6,21 d (15,9) 6,17 d (15,9)	6,36 d (15,8) 6,27 d (15,8) 6,24 d (15,8)	115,1 114,5 114,4	115,8 115,4 115,1
9', 9'', 9'''	---	---	168,5;168,1 167,9	169,3; 169,1 168,9

Entre os quinze componentes identificados em *B. oblongifolia*, quatro são pertencentes a classe dos flavonóis glicosilados, dez derivados de ácido clorogênico e o ácido cafeico. Os derivados de ácido clorogênico apresentam ampla distribuição em espécies vegetais. Entretanto, quando a ocorrência em espécies de *Baccharis* é analisada, pode-se verificar que o ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogênico – componente 1) foi identificado apenas nas espécies *B. chica*, *B. trimera* e *B. grisebachii*. Por outro lado, os ácidos dicafeoilquínicos (5, 6 e 8) foram previamente identificados em *B. dracunculifolia*, *B. genistelloides*, *B. incarum*, *B. retusa*, *B. thesioides*, *B. trimera* e *B. usterii*. Adicionalmente, em *B. gaudichaudiana* foram identificados os ácidos 3,4- e 3,5-dicafeoilquínico e em *B. chico* apenas o ácido 3,5-dicafeoilquínico. Para o ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (14) apenas há relato de sua caracterização em *B. trimera*. Por outro lado, esse é o primeiro relato da ocorrência no gênero dos ésteres metílicos dos ácidos 5-cafeoilquínico (3), 4,5-dicafeoilquínico (9), 3,5-dicafeoilquínico (11), 3,4-dicafeoilquínico (13) e 3,4,5-tricafeoilquínico (15) (GRECCO et al., 2012; CAMPOS et al., 2016).

O ácido cafeico (2) é raramente encontrado em espécies de *Baccharis*. Em literatura, há relatos do componente em *B. dentata*, *B. dracunculifolia*, *B. genistelloides*, *B. maritima* e *B. uncinella* (GRECCO et al., 2010; CAMPOS et al., 2016).

Flavonóis glicosilados são raros em *Baccharis* (VERDI et al., 2005; CAMPOS et al., 2016). Entre os flavonóis identificados em *B. oblongifolia*, a rutina (4) já foi descrita em *B. dentata*, *B. gaudichaudiana*, *B. thesioides* e *B. trimera*, sendo esse o primeiro relato do caempferol-3-O-rutinosídeo (7) no gênero (CAMPOS et al., 2016). Por outro lado, flavonóis acilados ainda não haviam sido identificados em *Baccharis*. Assim, esse é o primeiro relato em literatura e, conseqüentemente no gênero, dos oblongifoliosídeos A e B [quercetina-(2''-O-cafeoil)-rutinosídeo (10) e caempferol-(2''-O-cafeoil)-rutinosídeo (12)].

Na recente classificação infragenérica de *Baccharis* (HEIDEN & PIRANI, 2016), *B. oblongifolia* foi posicionada no subgênero *Oblongifoliae*, que contém uma seção e 17 espécies. Até o momento, nenhuma espécie desse subgênero havia sido estudada sob o aspecto fitoquímico. Dessa forma, sugerimos que a

presença de flavonóis acilados pode ser uma sinapomorfia química do grupo. Outras espécies devem ser investigadas para confirmar essa hipótese.

Análise da influência do dioicismo na composição fenólica dos indivíduos de Baccharis oblongifolia.

Para essa análise, volumes iguais de soluções de mesma concentração ($1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) das fases de partição em AcOEt obtidas dos indivíduos feminino e masculino de *B. oblongifolia*, coletados na mesma época do ano durante a fase de floração tiveram seus extratos realizados respeitando a metodologia empregada e dessa maneira foram injetados no CLAE-UV-DAD. Na Figura 18 pode-se observar os cromatogramas obtidos para ambos indivíduos dioicos.

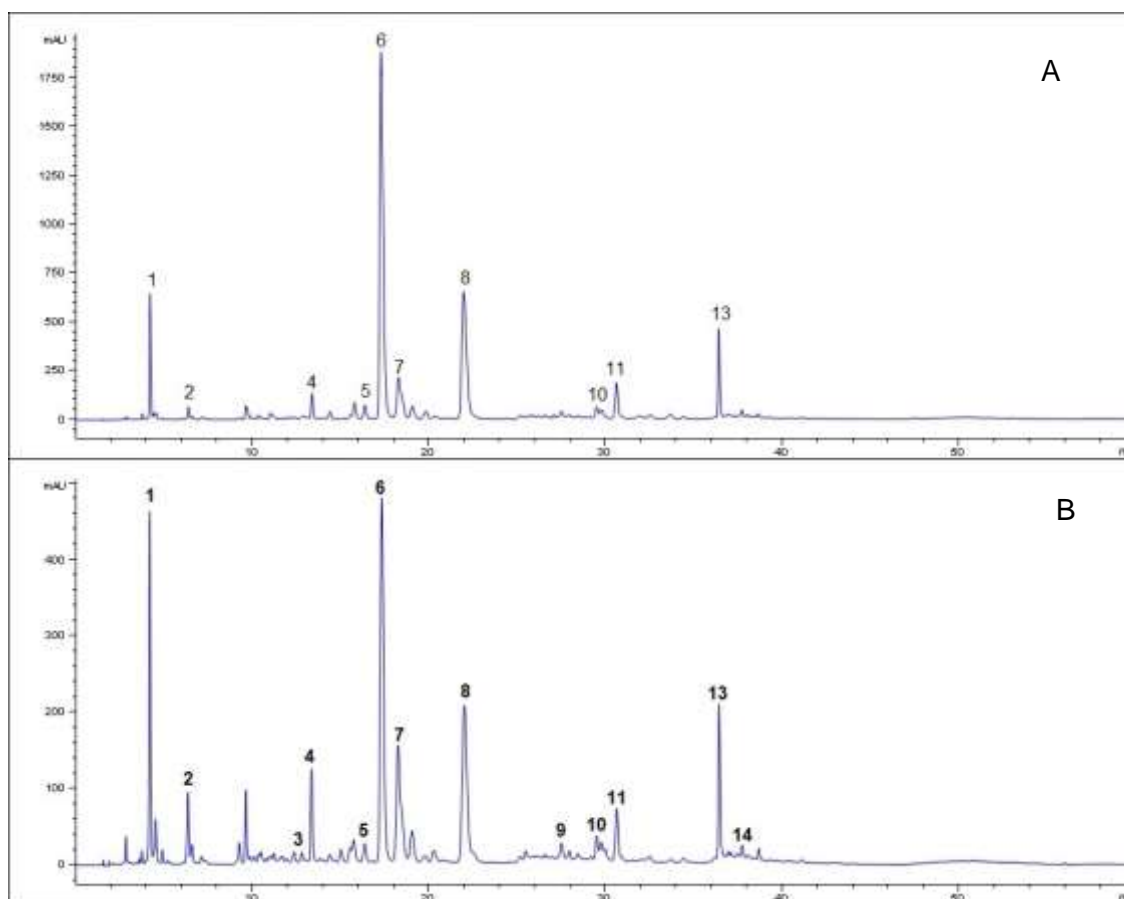


Figura 18. Cromatogramas das fases de partição em acetato de etila obtidas a partir do extrato bruto metanólico das folhas de *Baccharis oblongifolia*. A- Indivíduo feminino e B- masculino.

Em uma análise rápida da Figura 18 pode-se notar uma elevada similaridade no perfil metabólico dos indivíduos de *B. oblongifolia*, não havendo diferenças qualitativas entre os cromatogramas. Entretanto, a abundância relativa dos componentes no indivíduo feminino é comparativamente superior ao observado no indivíduo masculino, especialmente para o ácido 3,5-dicafeoilquínico (componente com tempo de retenção de ~18,0 min.). Uma análise quantitativa dos componentes em cada amostra é necessária para pontuarmos diferenças significativas entre os indivíduos.

Em literatura, a diferenciação metabólica entre indivíduos dioicos de *Baccharis* tem sido investigada, principalmente, para óleos voláteis. Sob esse aspecto, foram analisadas as espécies *B. articulata* (ZUNINO et al., 2004; MINTEGUIAGA et al., 2015), *B. caprariaefolia* (BESTEN et al., 2012; FERRACINI et al., 1995), *B. coridifolia* (BESTEN et al., 2012), *B. dracunculifolia* (BESTEN et al., 2012; FERRACINI et al., 1995), *B. erioclada* (FERRACINI et al., 1995), *B. milleflora* (BESTEN et al., 2014), *B. pentaptera* e *B. semiserrata* var. *elaegnoides* (BESTEN et al., 2012), *B. semiserrata* (MENDES et al., 2008) e *B. trimera* (LAGO et al., 2008; BESTEN et al., 2013) que apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas entre os indivíduos.

Estudos que consideram metabólitos não-voláteis na diferenciação dioica de *Baccharis* são inexistentes, até o momento. A presença de dioicismo em algumas espécies tem sido sugerido como responsável por desempenhar papel importante na natureza e na extensão das interações bióticas estabelecidas na espécie, sendo considerado um fator chave na determinação da vulnerabilidade a inimigos naturais. Em plantas dioicas de região temperada é bem documentado que o sexo pode afetar a qualidade nutricional da planta. Assim, plantas femininas apresentam um maior gasto de energia e nutrientes com a maturação de estruturas reprodutivas, aumentando nas partes vegetativas a razão carbono/nutrientes. Esse excesso de carbono seria utilizado na produção de defesas químicas e, embora plantas femininas cresçam menos, seriam mais resistentes a herbivoria que plantas masculinas, fato constatado na espécie *Baccharis halimifolia* L. (CAÑO et al., 2013). Fato similar parece ocorrer na espécie em estudo, uma vez que o indivíduo feminino de *B. oblongifolia* tende a exibir maior produção de certos metabólitos.

Por outro lado, estudos com espécies brasileiras de *Baccharis* (*B. concinna* G.M. Barroso, *B. dracunculifolia* DC., *B. ramosissima* Gardner e *B. pseudomyriocephala* Malag.) não mostraram diferenciação de recursos na alocação reprodutiva e exibiram taxas de crescimento e padrões similares de abundância e diversidade de insetos galhadores entre os sexos da planta, embora a diversidade metabólica não tenha sido avaliada (ARAÚJO et al., 2003; ESPÍRITO-SANTO et al., 2012). Entretanto, com base nesses dados, os autores postularam que nessas espécies o dioicismo não tem efeito sobre o investimento da planta em crescimento e reprodução e, conseqüentemente, sobre o ataque de insetos herbívoros.

Conseqüentemente, mais estudos empregando metabólitos não-voláteis em espécies dioicas de *Baccharis* precisam ser desenvolvidos para que, futuramente, possa ser esboçado um panorama sobre a influência do dioicismo na composição química do gênero.

1.5. CONCLUSÃO

O trabalho analisou a composição química das partes aéreas de *Baccharis oblongifolia* permitindo a identificação de quinze metabólitos e a descrição da composição química polar da espécie.

Entre os componentes identificados estão dez derivados de ácidos clorogênicos, o ácido cafeico e quatro flavonóis glicosilados. Entre os derivados de ácido clorogênico, os cinco ésteres metílicos são descritos pela primeira vez no gênero. No grupo dos flavonoides, três componentes são relatados, também, pela primeira vez em *Baccharis*. Nesse grupo, dois flavonóis acilados, inéditos em literatura, são sugeridos como possíveis sinapomorfias químicas da seção *Oblongifoliae*.

Comparando o perfil cromatográfico entre os indivíduos dioicos de *B. oblongifolia* foi verificada elevada similaridade metabólica, em especial sob o aspecto qualitativo. Entretanto, há necessidade de mais estudos comparativos dos metabólitos produzidos em indivíduos dioicos, tendo em vista, a escassez de trabalhos que abordem essa proposta.

Referências Bibliográficas

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

ARAÚJO, A.P.A.; CARNEIRO, M.A.A.; FERNANDES, G.W. **Efeitos do sexo, do vigor e do tamanho da planta hospedeira sobre a distribuição de insetos indutores de galhas em *Baccharis pseudomyriocephala* Teodoro (Asteraceae)**. *Rev. Bras. Entomol.* v.47, p. 483-490. 2003

Asteraceae in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB55>. Acesso em: 18 Jul. 2018.

BESTEN, M. A.; JASINSKI, V. C. G.; COSTA, A. G. L.; NUNES, D. S.; SENS, S. L., WISNIEWSKI, A.; SIMIONATTO, E. L.; RIVA, D., DALMARCO, J. B.; GRANATO, D. **Chemical Composition Similarity between the Essential Oils Isolated from Male and Female Specimens of Each Five *Baccharis* Species**. *J. Braz. Chem. Soc.* v. 23, 1041–1047. 2012.

BESTEN, M.A., NUNES, D.S., WISNIEWSKI JR, A., SENS, S.L., GRANATO, D., SIMIONATTO, E.L., RIVA, D., DALMARCO, J.B. AND MATZENBACHER, N.I. **Chemical composition of volatiles from male and female specimens of *Baccharis trimera* collected in two distant regions of southern Brazil: a comparative study using chemometrics**. *Quim. Nova.* v. 36: 1096-1100. 2013.

BESTEN, M. A.; NUNES, D. S.; GRANATO, D., SENS, S. L.; WISNIEWSKI, A.; SIMIONATTO; E. L., RIVA, D. J. **Chemical Composition of Essential Oils from Cladodes and Inflorescences from Male and Female Specimens of *Baccharis milleflora***. *Essent. Oil Bear. Plants.* v.17, 899–905. 2014.

BORGES, R.A.X.; FORZZA, R.C. **A tribo Astereae (Asteraceae) no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil.** Bol. Bot. Univ. São Paulo, 26: 131-154. 2008.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M.; FARAGO, P.V. e MATZENBACHER, N.I. **O progresso da pesquisa sobre o gênero Baccharis, Asteraceae: I - Estudos botânicos.** Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 15, n. 3, p. 268-271, 2005.

CAMPOS, F.R.; BRESSAN, J.; JASINSKI, V.C.G.; ZUCCOLOTTO, T.; SILVA, L.E.; CERQUEIRA, L.B. **Baccharis (Asteraceae): Chemical constituents and biological activities.** Chem. Biodivers. v.13, p. 1-17, 2016.

CAÑO, L.; GARCÍA-MAGRO, D.; HERRERA, M. **Phenology of the dioecious shrub *Baccharis halimifolia* along a salinity gradient: Consequences for the invasion of Atlantic subhalophilous communities.** *Plant Biosyst.* **147**: 1128-1138. 2013.

CONKERTON, E. J.; CHAPITAL, D. C. **High-performance liquid chromatography separation of the cis-trans isomers of cinnamic acid derivatives: Ultraviolet and electrochemical detection.** Journal of Chromatography. v. 281. p. 326-329. 1983.

DESJARDINS, A. E.; HOHN, T.M. e MCCORMICK, S.P. **Trichothecene Biosynthesis in Fusarium Species: Chemistry, Genetics, and Significance.** Microbiological Reviews, v. 57, n. 3, p. 595-604. 1993.

ESPÍRITO-SANTO, M.M.; NEVES, F.S.; FERNANDES, G.W.; SILVA, J.O. **Plant phenology and absence of sex-biased gall attack on three species of *Baccharis*.** *PLOS One* **7**: e46896. 2012.

FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L. C.; LEITÃO-FILHO, H. F.; DA SILVA, A. G.; NASCIMENTO, L. R.; MARSALOLI, A. J.; *J. Essent. Oil Res.* v. 7, p. 355. 1995.

FUNK, V.A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T.F.; BAYER, R.J. **Systematics, Evolution and Biogeography of Asteraceae**. IAPT, Vienna, Austria, 965 p. 2009.

GARDA, J.; MACEDO, R.M. e FURLONG, E.B. **DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS EM CERVEJA E AVALIAÇÃO DE INCIDÊNCIA NO PRODUTO COMERCIALIZADO NO RIO GRANDE DO SUL**. Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas. v. 24, n. 4, p. 657-663. 2004.

GBIF, **Global Biodiversity Information Facility**. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/3065>. Acesso em 22 jul. 2018.

GRECCO, S.S.; FERREIRA, M.J.P.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O.A.; LAGO, J.H.G. **Phenolic derivatives from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae)**. *Biochem. Syst. Ecol.* v.42, p. 21-24. 2012.

HEIDEN, G. e PIRANI, J.R. **Novelties towards a phylogenetic infrageneric classification of *Baccharis* (Asteraceae, Astereae)**. *Phytotaxa*. v. 289, n. 3, p. 285–290, 2016.

KADOTA, S.; BASNET, P.; MATSUSHIDE, K.; HASE, K.; NAMBA, T. **Four Di-O-caffeoyl Quinic Acid Derivatives from Propolis. Potent Hepatoprotective Activity in Experimental Liver Injury Models**. *Biol. Pharm. Bull.* v.19 (11): 1479-1484. 1996.

LAGO, J.H.G.; ROMOFF, P. e FÁVERO, O.A. **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.

LAGO, J. H. G.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; SOUZA, F. O.; SOARES, M. G.; BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G. *Biochem. Syst. Ecol.* v. 36, 737. 2008.

LUO, S.; ZHU, X.; DONG, X.; WANG, Y.; JU, P. **Phenolic compounds from *Viburnum cylindricum*. *Helvetica Chimica Acta*. 88: 339- 342, 2005.**

MARKHAM, K.R. **Techniques of Flavonoid Identification**. 1. ed. London: Academic Press Inc.LTD., 113p., 1982

MENDES, S.; NUNES, D. S.; MARQUES, M. B.; TARDIVO, R. C.; CECHINEL-FILHO, V.; SIMIONATTO, E. L.; WISNIEWSKI JR., A.; *Publicatio UEPG - Ciências Exatas e da Terra, Agrárias e Engenharias*. v.14, p.241, 2008.

MINTEGUIAGA, M., UMPIÉRREZ, N., FARIÑA, L., FALCÃO, M.A., XAVIER, V.B., CASSEL, E., DELLACASSA, E. **Impact of gas chromatography and mass spectrometry combined with gas chromatography and olfactometry for the sex differentiation of *Baccharis articulata* by the analysis of volatile compounds. *J. Sep. Sci*. v. 38, 3038-3046. 2015.**

MIYAMAE, Y.; KURISU, M.; HAN, J.; ISODA, H.; SHIGEMORI, H. **Structure-activity relationship of caffeoylquinic acids on the accelerating activity on ATP production. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. v.59, n.4, p. 502-7. 2011.**

MOON, J. H.; KIM, J. Y.; CHO, J. Y.; MA, Y. K.; PARK, K. Y.; LEE, S. H.; HAM, K. S.; LEE, H. J.; PARK, K. H. **Dicaffeoylquinic Acid Derivatives and Flavonoid Glucosides from Glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and their Antioxidative Activity. *Food Chemistry*. v.125. p. 55-62. 2011.**

MÜLLER, J. **World checklist of *Baccharis* L. (Compositae–Astereae)**. Version 2013-09-03. Available from: <http://www.spezbot.uni-jena.de/wp-content/uploads/2013/09/World-checklist-of-Baccharis-L.pdf>. 2013.

OLIVEIRA, A.S., DEBLE, L.P., SCHNEIDER, A.A. e MARCHIORI, J.N.C. **Checklist do Gênero *Baccharis* L. para o Brasil (Asteraceae-Astereae)**. *Balduinia*. Vol. 30, n. 9, p. 17-27. 2006.

PING, L.; YELING, W.; ZHIYOUNG, G.; WU, SHIBIAO, W.; KENNELLY, E. J.; JIANJUN, W.; LI, T.; CHUNLIN, L. **Separation of Three Bioactive Isomers from *Bidens pilosa* by Countercurrent Chromatography.** Journal of Liquid Chromatography. v. 37. p. 2598-2609. 2014.

RISSI, D. R.; RECH, R.R.; FIGHERA, R.A.; CAGNINI, D.Q.; KOMMERS, G.D. e BARROS, C.L. **Intoxicação espontânea por *Baccharis coridifolia* em bovinos.** Pesq. Vet. Bras. v. 25, n. 2, p. 111-114. 2005.

ROQUE, N.; FERREIRA, S.C.; BERG, C.V.D. **Lapidia, a new monotypic genus of Asteraceae (Eupatorieae) from Brazil, and its phylogenetic placement.** Phytotaxa 291: 001-016. 2017.

SAMPAIO, T. M.; ROMOFF, P.; FERREIRA, M.J.P.; FAVERO, O.A.; LAGO, J.H.G.; APEL, M.A. e HENRIQUES, A.T. **Análise comparativa da composição química dos Óleos voláteis de folhas e capítulos imaturos de *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.** Sociedade Brasileira de Química (SBQ). v.1. 2010.

SFORCIN, J.M., SOUSA, J.P.B., FILHO, A.A.S., BASTOS, J.K., BÚFALO, M.C., e TONUCCI, L.R.S. ***Baccharis dracunculifolia*: Uma das principais fontes vegetais da Própolis brasileira.** UNESP, Rio de Janeiro, 103 p. 2012.

TULIG M.; RAMIREZ J.; WATSON K. The New York Botanical Garden Herbarium (NY). **The New York Botanical Garden. Nova York, 2017.** Disponível em: <https://doi.org/10.15468/6e8nje> accessed via GBIF.org on 2018-03-12. 10.15468/6e8nje. 2017.

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

ZUNINO, M. P.; LOPEZ, M. L.; ZYGADLO, J. A.; LOPEZ, A. G.; ***J. Essent. Oil Res.* v. 16, n. 29. 2004. 2004.**

Capítulo 2. *Baccharis oblongifolia*: Análise da atividade antirradicalar e citotóxica

ABSTRACT

A wide range of phenolic compounds evaluated by *in vitro* assays shows antiradical and cytotoxic activities. The objective of this chapter was to evaluate the antiradical and cytotoxic activities of the crude methanol extract, partition phases (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, n-butanol and hydroalcoholic), and isolated compounds from *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae). Both assays used colorimetric methods to measure the activities. The antiradical activity was measured by reduction of the DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical and compared to the standard compound Trolox® (6-Hydroxyl-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-oic acid). The cytotoxic activity used the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and the human colon adenocarcinoma tumor line (HCT-116). Samples were evaluated using concentrations of 5 and 50 µg.mL⁻¹ in duplicate. The ethyl acetate phase had a higher antiradical capacity compared to the other phases (44.4 ± 8.4%). Among the isolated compounds, the methyl ester of 3,5-dicaffeoylquinic acid showed the highest antiradical activity, approximately six times greater than the Trolox standard (Trolox% = 637.72 ± 49.14) and the lowest inhibitory concentration value at 50% (IC₅₀= 1.8 ± 0.7 µmol.L⁻¹). On the other hand, in the cytotoxic evaluation, isolated compounds from *B. oblongifolia* did not showed cytotoxicity.

Keywords: *Baccharis oblongifolia*, Asteraceae, antiradical activity, cytotoxic activity, chlorogenic acids.

RESUMO

Uma ampla gama de componentes fenólicos apresenta atividade antirradicalar e citotóxica quando avaliada em ensaios in vitro. O objetivo desse capítulo foi avaliar as atividades antirradicalar e citotóxica do extrato bruto metanólico, fases de partição (hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol e hidroalcoólica), e substâncias isoladas de *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae). Para tanto, ambas avaliações empregaram métodos colorimétricos. A atividade antirradicalar foi mensurada mediante redução do radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e comparadas com o padrão Trolox® (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-óico). A atividade citotóxica utilizou o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e a linhagem tumoral de adenocarcinoma de cólon humano (HCT-116). As amostras foram avaliadas utilizando concentrações de 5 e 50 µg.mL⁻¹ em duplicata. A fase em acetato de etila apresentou maior capacidade antirradicalar em relação às outras fases (44,4 ± 8,4%). Das substâncias isoladas, o éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico apresentou a maior atividade antirradicalar, sendo seis vezes maior que o padrão Trolox (%Trolox= 637,72 ± 49,14) e com o menor valor de concentração inibitória a 50% (CI₅₀= 1,8 ± 0,7 µmol. L⁻¹). Por outro lado, na avaliação citotóxica as substâncias isoladas de *B. oblongifolia* não apresentaram citotoxicidade.

Palavras-chave: *Baccharis oblongifolia*, Asteraceae, atividade antirradicalar, atividade citotóxica, ácidos clorogênicos.

2.1. Radicais Livres e Atividade Antirradicalar

Radical livres são quaisquer espécies químicas contendo um ou mais elétrons não pareados capaz de existir independentemente, de natureza altamente instável e com meia vida curta sendo formados por adição ou perda de um ou mais elétrons em um composto não radicalar (OGA et al., 2008).

Os elétrons não pareados podem estar associados à átomos de oxigênio e nitrogênio formando EROS (espécies reativas de oxigênio) e ERN (espécies reativas de nitrogênio), respectivamente. As EROS podem ser agrupadas em radicalares: hidroxila ($\text{OH}\cdot$) superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$) e não radicalares como oxigênio singlete (O_2), ozônio (O_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO). Dentre as ERN destacamos: óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-) (BARREIROS et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

O radical livre hidroxila é considerado uns dos mais deletérios ao organismo, uma vez que apresenta meia vida extremamente curta e pode ser gerado quando a pele é exposta à radiação ultravioleta, raios gama e raios X, por exemplo, a ocorrência de mutações irreversíveis ao DNA depende do tempo e intensidade de exposição (OGA et al., 2008).

Fisiologicamente os organismos vivos produzem radicais livres como subproduto de uma reação fisiológica natural (fontes endógenas), como visto em células fagocitárias ou na formação de complexos enzimáticos como catalases entre outros (VASCONCELOS et al., 2007).

Uma das maiores preocupações com a formação de espécies reativas de oxigênio é a peroxidação lipídica, o qual pode comprometer a membrana plasmática. Além disso, o emprego de substâncias antioxidantes vem sendo utilizadas para diversas finalidades, como por exemplo: garantir estabilidade de alimentos aumentando sua vida útil de prateleira (SOARES, 2002).

O estado pró-oxidante é considerado um desbalanço entre a quantidade de radicais livres, formados nos processos fisiológicos. A diminuição de antioxidantes endógenos pode gerar lesões oxidativas em macromoléculas e até mesmo em estruturas celulares (OGA et al., 2008) podendo resultar em doenças

como artrite, doenças de coração, câncer, entre outras (BARREIROS et al., 2006).

O organismo é dotado de sistemas enzimáticos e não enzimáticos que auxiliam na estabilização dos radicais livres mediante eliminação do radical ou sua biotransformação em produtos menos tóxicos. As enzimas glutathiona-peroxidase, metionina-redutase e superóxido dismutase fazem parte dos antirradicais endógenos. Essas enzimas, dependentes de metais como selênio, zinco, cobre, manganês etc, atuam na estabilização do peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete, radical hidroxila, óxido nítrico e nitroso entre outros (KUSS, 2005).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável por catalisar a conversão do ânion reativo superóxido ($O_2^{\bullet-}$) convertendo-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular, as catalases auxiliam na remoção do peróxido de hidrogênio convertendo-o em oxigênio molecular e água. Glutathiona peroxidase (GPx) é responsável pela catálise de peróxidos lipídicos (ROOH) assim como o peróxido de hidrogênio oxidando a forma reduzida da glutathiona (BARATA et al., 2005).

Fontes exógenas obtidas geralmente pela ingestão de alimentos e oligoelementos, contendo altos teores de compostos antirradicalares e sais minerais, podem contribuir de forma preventiva ou na estabilização dos radicais livres, sendo assim, vitaminas hidrossolúveis como a vitamina C e as vitaminas do complexo B, vitaminas lipossolúveis como a vitaminas A e, além de compostos fenólicos oriundos de plantas, perfazem o grupo de substâncias exógenas conhecidas como antioxidantes exógenos (KUSS, 2005).

Fatores externos como poluição, presença de resíduo de pesticidas nas culturas alimentícias, aditivos utilizados na alimentação humana como hormônios, por exemplo, além do estilo de vida individual associado com estresse, estão associados no aumento das moléculas de radicais livres (VASCONCELOS et al., 2014).

O risco de doenças crônicas não transmissíveis aumenta em decorrência da falta de ingestão de compostos bioativos específicos para cada patogenia. De forma seletiva, esses compostos, em alvos fisiológicos, modulam a defesa antioxidante como observado em processos inflamatórios e mutagênicos (OLIVEIRA & BASTOS, 2011).

Doenças como câncer, diabetes, patologias da articulação ocasionadas pelo avanço da idade como artrites, mazelas do sistema nervoso como Parkinson e Alzheimer podem estar associadas aos radicais livres. Alimentação enriquecida em compostos antioxidantes como carotenoides, ácido ascórbico (Vit. C) e alfa tocoferol (Vit. E) tem se mostrado promissor no combate dos radicais livres (MORAIS, 2013).

Compostos fenólicos são antioxidantes que funcionam como sequestradores de radicais livres, atuam sobre as etapas de propagação do processo oxidativo e, assim, geram produtos intermediários capazes de garantir a estabilidade, mediante a ressonância propiciada pelo anel aromático (SOARES, 2002).

A atividade antioxidante é propiciada pela quebra da reação em cadeia gerada pelo radical livre. Um bom antioxidante é marcado por duas características específicas: 1. quando presente em baixas concentrações deverá atrasar ou impedir de maneira significativa a oxidação do substrato, desde que, o mesmo seja susceptível à oxidação; 2. quando gerado a partir de um polifenol, deverá ser estável impedindo a propagação de reações de oxidação geradas pelo radical livre (CROFT, 1998).

Os compostos fenólicos, vem ganhando destaque devido à sua atividade antioxidante aliado à busca por produtos naturais, dado a queda da credibilidade dos antioxidantes sintéticos, refletindo assim o aumento da sua procura no mercado econômico (SOARES, 2002).

A distribuição dos compostos fenólicos nas plantas depende de alguns fatores tais quais: acesso a intensidade luminosa principalmente UVB (responsável pela síntese de flavonoides), dessa maneira, plantas cultivadas em locais com carência de iluminação tendem a produzir menos flavonoides (AHERN & O'BRIEN 2002).

Em plantas a síntese de metabólitos especiais com propriedades antioxidantes, absorvem na faixa de 300 a 400nm, na qual há aumento dessa produção, quando a mesma é exposta por radiação ultravioleta (U.V) (MORAIS et al., 2013).

As funções dos compostos fenólicos em plantas estão associadas à diversos aspectos como defesa contra herbivoria e patógenos, suporte

mecânico, atração de agentes polinizadores, alelopatia e proteção contra radiação UV (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Substâncias fenólicas apresentam um grupamento hidroxílico ligado a um anel aromático e são subdivididas em três grupos principais: os ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico (C_6-C_1), com ocorrência na forma livre ou na forma de ésteres ou glicosídeos. Os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (C_6-C_3) como o ácido ferúlico, (SKERGET, 2005) e por fim os derivados do ácido clorogênico resultado da esterificação de um ácido hidroxicinâmico (ácido cafeico) com um ácido quínico, sendo o ácido 5-cafeoilquínico, o mais comum entre esses polifenóis (GARAMBONE & ROSA, 2007).

Ácido clorogênico (ACG), um composto fenólico ácido, introduzido provavelmente por Payen em 1846, teve sua estrutura química estabelecida por Fisher como ácido 3-cafeoilquínico, hoje conhecido como ácido 5-cafeoilquínico. ACG é a nomenclatura adotada para definir a esterificação de um ou mais derivados do ácido *trans*-cinâmico. (MARIA & MOREIRA, 2004). O ácido cafeoilquínico (ACQ), um éster do ácido cafeico com o ácido quínico, o ácido dicafeoilquínico (diACQ), éster de resíduos de dois ácidos cafeico e um quínico e ácido feruloilquínico (AFQ) ésteres de ácido ferúlico e ácido quínico, são considerados os mais abundantes na natureza, porém foram reportados por Clifford apud Maria & Moreira, presença de triACQ e tetra ACQ em Asteraceae.

A biossíntese de ácidos clorogênicos (Figura 1) envolve reações em sequência intermediadas por enzimas específicas. O aminoácido fenilalanina é convertido em ácido cinâmico mediante atuação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), seguida da enzima cinamato 4'-hidroxilase (C4H) a qual propicia a síntese do ácido p-cumárico e finalmente, a 4-cinamoil-CoA ligase (4CL) responsável pela formação do p-cumaroil-CoA. Essa molécula é considerada ponto de partida para a formação de outras moléculas aromáticas podendo gerar flavonoides, estilbenos e monolignóides; caso sofra hidroxilação, produzirá o cafeoil-CoA mediante ação da enzima p-cumaroil 3'-hidrolase (C3H) e se esterificado com um ácido quínico propiciado pela enzima hidroxicinamoil CoA:hidroxicinamoil quinato transferase (HQT) obteremos o 5-O-p-ácido cumaroilquínico. Cafeoil-CoA através da ação da enzima S-adenosil-L-metionina:cafeoil-CoA-3-O-metiltransferase (CCoAMT) permite a biossíntese de feruloil-CoA, um precursor da lignina (CLIFFORD, 2017).

Ligninas representam um reservatório de incontáveis estruturas aromáticas, são polímeros de fenilpropanóides responsáveis pelo enrijecimento das paredes celulósicas dos vegetais, permitindo a sustentação da planta em ambiente terrestre através da rigidez mecânica fortalecendo os caules e os vasos condutores permitindo dessa forma que a água alcance partes fotossintéticas (TAIZ & ZEIGER, 2006; DEWICK, 2009).

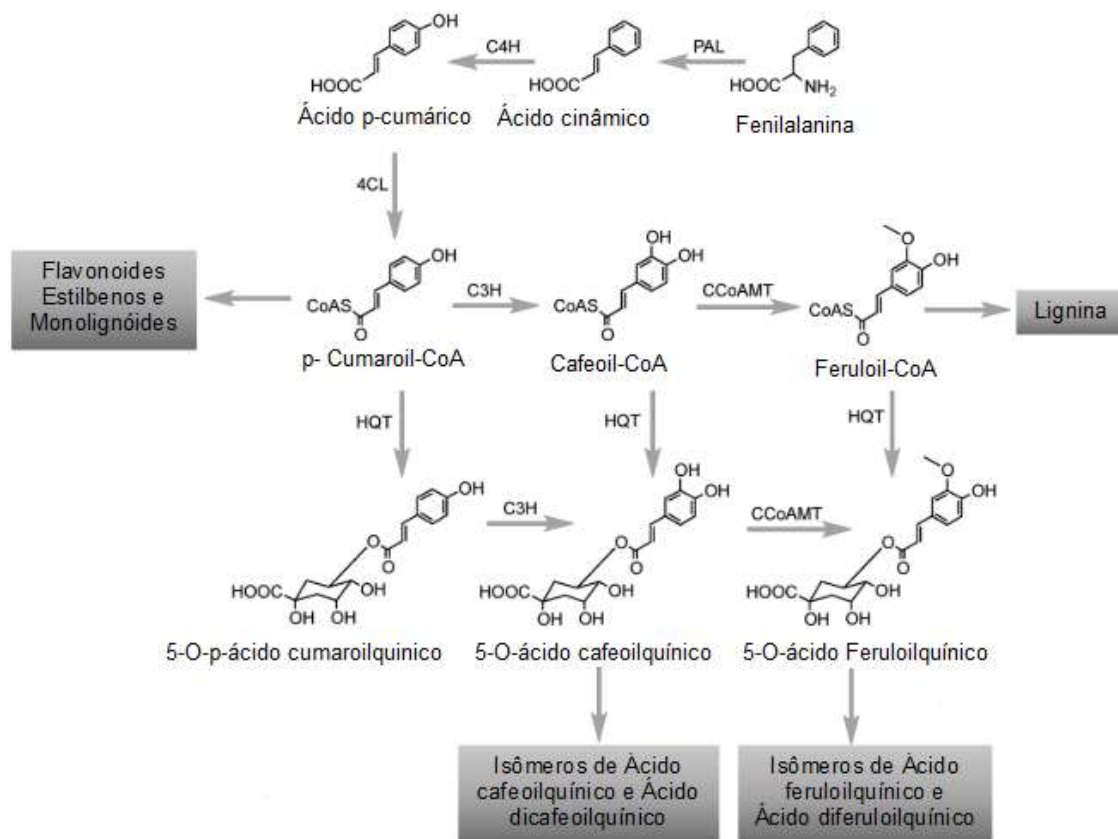


Figura 1 – Rota biossintética para formação de ácidos clorogênicos (CLIFFORD et al., 2017.)

Os ácidos acil-quinicos podem estar relacionados como metabólitos de defesa, através de redes de sinalização são ativadas por fitohormônios, produzindo uma variedade desses ácidos com intuito de matar ou impedir a invasão de microrganismos ou possíveis herbívoros. Do ponto de vista molecular, esses ácidos podem inibir enzimas que degradam a parede celular como poligalacturonase e cutinase, produzidas pelos patógenos (DEWICK, 2009).

O ácido cafeico e seu derivados apresentam características significativas em relação a sua atividade antirradicalar pois envolve sequestro de radicais

livres, a quelação de íons metálicos e inibem enzimas que atuam na formação desses radicais (KIKUZAKI et al. 2002). Antioxidantes oriundos de ácidos hidroxicinâmico atraem a atenção de vários pesquisadores, onde, cada vez mais são realizados estudos de suas atividades antirradicalares para diversas finalidades como já retratadas anteriormente (CHEN & HO, 1997).

Apesar de observarmos incontáveis propostas científicas que evidenciam ações benéficas dos antioxidantes oriundos dos compostos fenólicos alguns pesquisadores, em meados da década de oitenta, associaram o 5-ACQ como agente indutor de alterações no DNA em células animais o que vai na contramão das pesquisas evidenciando sua forte capacidade em estabilizar os radicais livres formados (BORISH et al. 1985).

Como visto anteriormente, o p-cumaroil-CoA pode gerar outros compostos aromáticos mais complexos como por exemplo, os flavonoides que são formados a partir de várias reações envolvendo um leque enzimático específico e aminoácidos aromáticos: L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano. Para que haja a biossíntese de compostos aromáticos reações sequenciais percorrem caminhos metabólicos específicos conhecidos como rota do chiquimato ou ácido chiquímico. Os aminoácidos fenilalanina e tirosina formam uma unidade C₆-C₃ (4-hidroxicinamoil-CoA), estrutura essencial observada em ácidos cinâmicos, cumarinas e lignanas, por exemplo. Mediante a atuação da enzima chalcona sintase ocorre a extensão da cadeia de malonil-CoA formando um policetídeo e através da reação de Claisen, forma o segundo anel aromático que seguido por uma enolização resulta na formação da chalcona (DEWICK, 2009).

A terminologia de flavonoides provém de um conjunto de pigmentos derivados da benzo- γ -piron, podem ocorrer como aglicona na sua forma livre e glicosiladas quando ligadas à açucares (glicoses, ramnoses etc.) Também podem estar associados a polímeros como as lignanas embora a maior ocorrência encontra-se na forma glicosilada (BEHLING et al., 2004).

De acordo com os padrões de oxidação do anel C (Figura 2), um flavonoide pode ser subdividido em: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ol e antocianidinas (TAMAYOSE, 2014; SKERGET, 2005; SOARES, 2002).

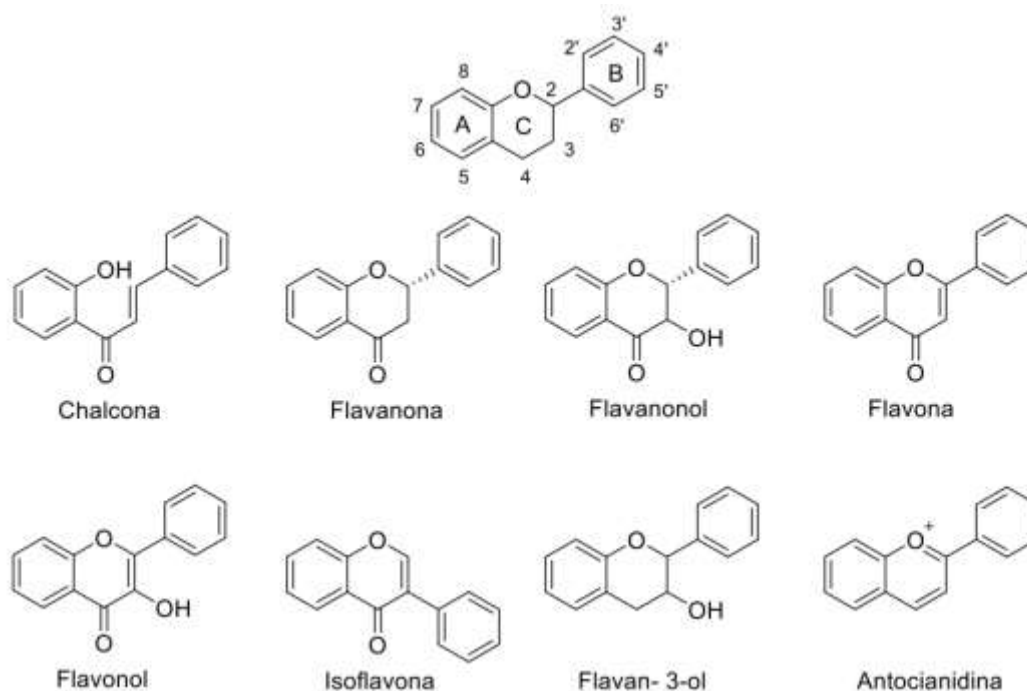


Figura 2 – Estrutura molecular das subclasses de flavonoides, (TAMAYOSE, 2014)

A estrutura do flavonoide é fator indispensável para que haja a estabilização do radical livre. As características quanto a estrutura química são: a deslocalização do elétron propiciada pela presença de um *orto*-dihidroxi, conhecido como catecol (Figura 3-A), na estrutura do anel B, a presença de dupla ligação em C₂-C₃ em conjunção ao grupo 4-oxo (Figura 3-B), permitindo a deslocalização dos elétrons do anel B, e a presença de duas hidroxilas situadas nas posições 3, 5 (Figura 3-C), favorecendo ligações de hidrogênio com o grupo oxo (CROFT, 1998 e TAMAYOSE, 2014).

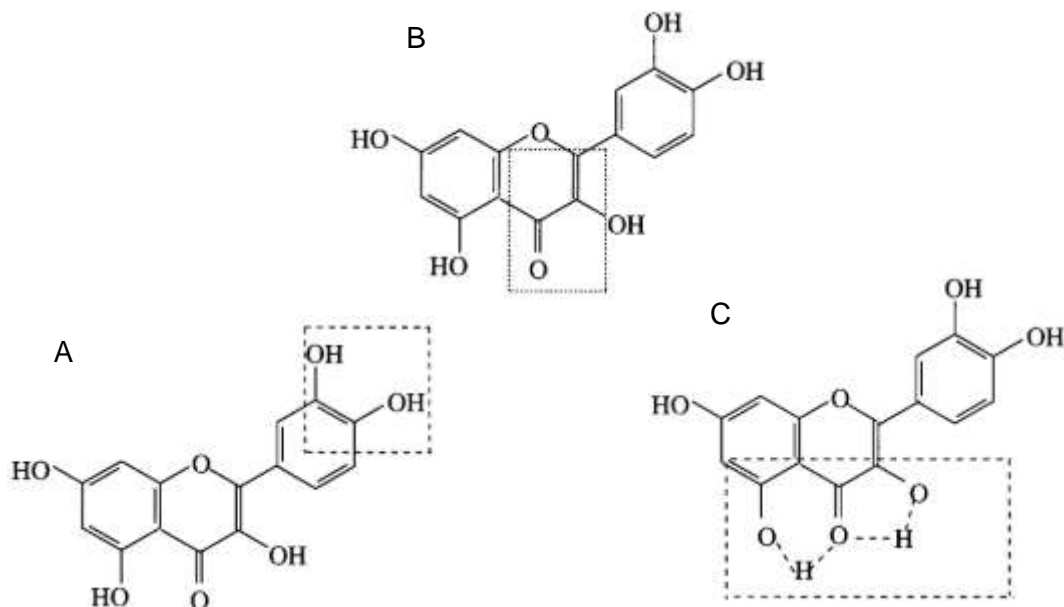


Figura 3 – Requisitos estruturais em flavonoides responsáveis pela estabilização dos radicais CROFT, 1998.

2.2. Citotoxicidade

Uma definição aceita para câncer é um conjunto de mais de cem doenças, que apresentam crescimento desordenado de células, que pode ser considerado maligno, quando invadem os tecidos intactos e que apresentam a possibilidade de se espalhar pelo organismo, fenômeno nomeado de metástase (INCA, 2018).

Mutações no material genético podem levar a prejuízos na divisão celular ocasionando um crescimento desordenado levando a muitos óbitos pelo mundo (ARANHA, 2014). Dentre as doenças e agravos não transmissíveis (DANT), o câncer é detentor de um quinto de todas as mortes ocasionadas por essas doenças em todo o planeta. A estimativa para incidência de câncer no Brasil entre 2018-2019, está em torno de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano sendo as taxas de ocorrência maiores em indivíduos do sexo masculino (Tabela 1) (INCA, 2018).

Uma célula atinge o nível tóxico, devido a alterações irreversíveis na membrana plasmática, inibição enzimática ou morte programada (apoptose), fenômeno descrito como citotoxicidade (VIANA et al., 2011). A cultura de células fornece dados importantes para averiguação do correto funcionamento celular; uma análise do metabolismo da mesma assim como do comportamento das

células frente a um componente a ser testado, é possível ser realizado *in vitro* pois conseguimos manter a viabilidade celular durante toda a fase de testes (LUIZI, 2006 apud VIANA et al., 2011).

Tabela 1 - Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas, ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização. INCA- Estimativas 2018 (Adaptado).

Localização Primária (♂)	Casos novos	%	Localização Primária (♀)	Casos novos	%
Próstata	68.220	31,7	Mama Feminina	59.700	29,5
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7	Cólon e Reto	18.980	9,4
Cólon e Reto	17.380	8,1	Colo de Útero	16.370	8,1
Estômago	13.540	6,3	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2
Cavidade Oral	11.200	5,2	Glândula Tireoide	8.040	4,0
Esôfago	8.240	3,8	Estômago	7.750	3,8
Bexiga	6.690	3,1	Corpo do Útero	6.600	3,3
Laringe	6.390	3,0	Ovário	6.150	3,0
Leucemias	5.940	2,8	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7	Leucemia	4.860	2,4

Um dos maiores desafios da medicina está no tratamento dos cânceres. As formas mais comuns de tratamento nos tempos atuais, baseiam-se na extensão, no local e no tipo de câncer, (OLIVEIRA et al. 2014).

A medicina lança uso de quimioterápicos para tratamento de neoplasias, esses são conhecidos por não apresentarem seletividade acometendo células cancerosas e saudáveis, esse fato explica o alto índice de efeitos colaterais, comuns em pacientes que fazem uso dessa classe de medicamentos. As pesquisas de substâncias que possam atenuar ou eliminar esses efeitos são de

grande importância e implicam, consideravelmente, na adesão do tratamento pelo paciente perante ao seu tratamento.

Os produtos naturais sob o ponto de vista da terapêutica atendem a população, isso vem sendo motivado pois há certa dificuldade de assistência médica e farmacêutica para o povo, principalmente os mais carentes (SIMÕES et al., 1998 apud BRASILEIRO, 2008).

O campo da pesquisa em relação às plantas medicinais, visando atender um número cada vez amplo de pessoas, utilizam produtos naturais para tratar moléstias, fato esse é constatado pelo aumento da demanda dos mesmos e a observação gradual da queda da utilização de medicamentos sintéticos. O Brasil é de fato um país de grande extensão territorial o qual abriga uma infinidade de espécies vegetais, porém carente em pesquisa que informem o potencial antitumoral das substâncias produzidas pelas plantas (PEREIRA & CARDOSO, 2012).

Alguns compostos fenólicos tem seu potencial citotóxico compreendidos como no trabalho de Huang e colaboradores realizado em 2010, onde os autores evidenciam compostos fenólicos regulando os metabolismos em células carcinogênicas assim como a expressão oncogênica interferindo na migração, proliferação, diferenciação e bloqueio das vias de sinalização dessas células. Além disso, os autores mencionam que além dos efeitos de citotoxicidade de alguns compostos fenólicos, podem ser observados efeitos antimutagênico e anti-inflamatórios.

A atividade biológica dos extratos vegetais pode ser discutida de acordo com a classe de compostos secundários a qual determinada espécie produz; compostos fenólicos estão relacionados diretamente a capacidade antioxidante, através da possibilidade de estabilizar os radicais livres, dessa forma pode evitar ou melhorar quadros clínicos de doenças crônico-degenerativas, tais como: diabetes, processos inflamatórios, doenças cardiovasculares e câncer (ROCHA et al., 2011).

Vários experimentos apontam que o uso de certas plantas pode promover uma ação de prevenção química e/ou antineoplásica. Esse tipo de conduta terapêutica já é bem utilizado nos países desenvolvidos e vem ganhando forças em países em desenvolvimento em decorrência da preocupação dos efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos (FUKUMASU et al., 2008).

Dentre os polifenóis existem as catequinas, encontradas no chá verde, framboesas, uvas roxas e no vinho tinto, estão associadas com atividade antioxidantes, anti-inflamatórias, termogênicas e anticarcinogênicas (COZZOLINO, 2009 apud PEREIRA & CARDOSO, 2012). Vários estudos foram realizados para investigar a atividade antineoplásica em relação aos compostos fenólicos, no trabalho de SCHIMITZ et al., e colaboradores em 2011, são observados várias comprovações profiláticas oriundas dos polifenóis como mencionado no trabalho de Krul et al. (2001), a qual verificou essa atividade para os polifenóis presentes no chá verde (*Camellia sinensis* L. Kuntze).

Estudos com *Conyza bonariensis* L. (Asteraceae) mostraram-se promissoras em relação à atividade citotóxica que foi detectada empregando método colorimétrico, utilizando sal de MTT proposto por Mosmann em 1983, evidenciando atividade antiproliferativa e citotóxica nas concentrações de $5\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $5000\mu\text{g.mL}^{-1}$ (VIANA et al., 2011).

Para os flavonoides 5,4'-diidroxí-7- metoxiflavona (genkwanina), 5,4'-diidroxí-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina), 5,7,4'-triidroxí-6-metoxiflavona (hispidulina) e 5,7,4'-triidroxiflavona (apigenina), flavonas encontradas na carqueja (*Baccharis crispa* Spreng.), foram evidenciadas atividades antimutagênicas, as quais foram maiores nas flavonas hidroxiladas e também foi verificado a ocorrência dessa atividade quando as hidroxilas foram substituídas por metoxilas (VERDI et al., 2005).

2.3. Objetivos

Avaliar o potencial bioativo de *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. em relação as atividades antirradicalar e citotóxica dos extratos, fases de partição e compostos isolados.

2.4. Materiais e Métodos

2.4.1. Coleta do material vegetal

Baccharis oblongifolia (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae) foi coletada em 22 de outubro de 2016, nos Campos de Altitude da Serra da Mantiqueira, próximo as coordenadas 22 45'47" S e 45 35'02" W, no município de Campos do Jordão,

SP. A identificação da espécie foi realizada pela Prof^a. Dr. Oriana A. Fávero e as exsiccatas da coleta foram depositadas no herbário do IB-USP, sob o *voucher* Fávero et al., 535, e o acesso cadastrado no SisGen sob o número A47125D.

2.4.2. Materiais e Reagentes utilizados

No preparo dos extratos vegetais e fases de partição foram empregados os solventes hexano, metanol, diclorometano, acetato de etila e butanol grau P.A. da marca Synth.

Para o fracionamento em coluna cromatográfica foi utilizado como adsorvente Sephadex LH-20 da GE Healthcare e como fase móvel metanol. As frações foram reunidas em grupos através de cromatoplasmas de sílica impregnadas em alumínio da Merck®.

2.4.3. Preparo dos extratos e fases de partição de *Baccharis oblongifolia*

O material vegetal recém-coletado foi submetido à secagem em estufa, sob ventilação a 50°C, visando eliminação total de água. Após triagem segregando folhas de caules, procedeu-se a moagem em moinho de facas e submissão à extração exaustiva com hexano. Posterior a essa etapa, os materiais vegetais foram extraídos com metanol até esgotamento. As amostras foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida obtendo-se, então, os extratos brutos.

Para obtenção dos extratos hexano e metanólico foram utilizados cerca de 373g de folhas e 478g de caules. O extrato metanólico foi submetido à partição com solventes em escala crescente de polaridade, obtendo dessa maneira fases em hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol e hidroalcoólica.

2.4.4. Grupos e substâncias avaliadas nos ensaios propostos

A fase em acetato de etila foi fracionada através de uma coluna cromatográfica de Sephadex LH-20 tendo metanol como eluente. Desse procedimento foram obtidos sete grupos cromatográficos que, posteriormente, foram analisados para identificação das substâncias.

Nesse estudo apenas as substâncias isoladas de *B. oblongifolia* foram avaliadas em relação a atividade antirradicalar e citotóxica. Dessa forma, os componentes presentes e identificados por adição de padrões não foram avaliados individualmente nos ensaios. Sendo assim, as substâncias analisadas foram: o éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico, os ésteres metílicos dos ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico, a quercetina-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo, o caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo e o ácido 3,4,5-tricafeoil-quínico.

2.4.5. Ensaios para avaliação antirradicalar

Para as análises da atividade antirradicalar foi preparado inicialmente uma solução de DPPH 0,20mM e 0,5mg/mL de Trolox. Foi corrigido a absorvância do DPPH utilizando metanol até absorvância entre 1,0 e 0,9.

Alíquotas de Trolox foram utilizadas para construção da curva padrão; para isso em cada poço da microplaca de Elisa foi pipetado 200μL de DPPH e 20 μL da solução padrão em cada concentração. Foram utilizadas concentrações de 25 a 200 μL variando de cada 25 μL. Como controle negativo foi pipetado 20μL de metanol em 200μL de DPPH. Os ensaios foram realizados em quadruplicata para assegurar maior confiabilidade dos resultados.

Os extratos de *Baccharis oblongifolia* foram obtidos no próprio laboratório e as concentrações ajustadas individualmente, afim de obter curvas de cinética de reação adequadas ao consumo do radical estável DPPH•.

Todos os ensaios foram realizados em ELISA e as amostras avaliadas na faixa de absorção de 515nm. As absorções das amostras e das curvas padrão foram monitoradas durante 30 minutos em intervalos de tempo de 20 segundos e a temperatura constante de 25°C. As análises utilizando cada extrato, assim como as substâncias isoladas, tiveram seu tempo de monitoramento de 50 minutos acompanhados em intervalos de tempo de 20 segundos. Dessa maneira foi efetuado o cálculo da variação das absorvâncias (Δ Abs.) para cada concentração do antirradical.

Essas variações permitiram a obtenção de uma curva linear da variação da absorvância em função da concentração do antirradicalar. Todas as amostras

foram comparadas o coeficiente linear da reta (α) com o antirradical referência Trolox®, resultando a capacidade antirradicalar.

Para verificar a estabilidade do radical DPPH• foi observado que as concentrações do mesmo eram inalteradas durante o tempo do experimento revelando a estabilidade para a realização dos ensaios. Dessa forma, limitou-se a variação da concentração do DPPH somente com a interação do mesmo com um antirradical. À medida que a reação do radical DPPH• com o antirradical ocorre, a tonalidade purpúrea do radical estável cede à uma coloração amarelada (Figura 4).

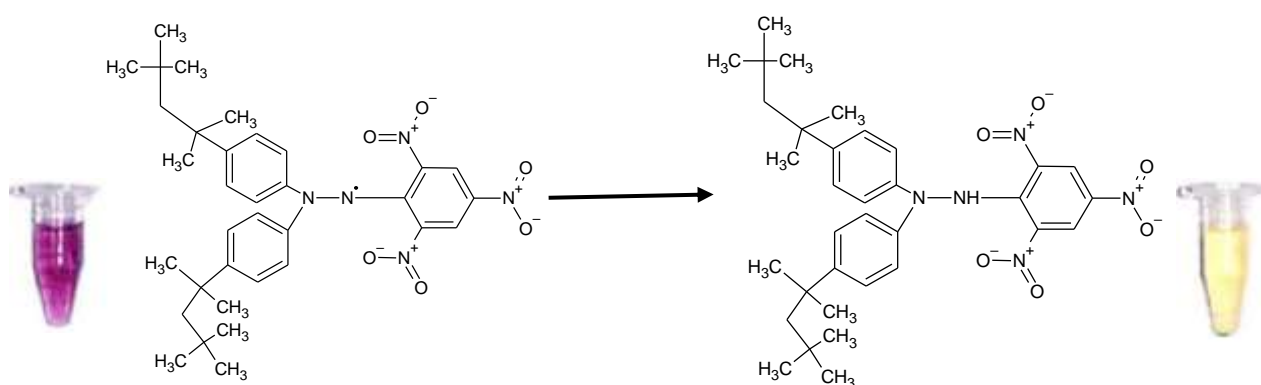


Figura 4 – Esquema do DPPH• radical, de tonalidade purpúrea, reduzida a sua forma em cor amarela mediante atividade de antirradicais por exemplo. Adaptado de (PIRES et al., 2017).

Através da variação da concentração do DPPH• mediante sua reação com compostos antirradicalares, foi possível monitorar espectrofotometricamente a absorbância em intervalos de tempo conhecidos. Dessa maneira, foi viável o cálculo da variação da absorbância (Δ Abs.) Transpondo os dados da variação de absorbância em função da concentração do Trolox® foi calculado o coeficiente angular da reta. As variações dos compostos testados permitiram a obtenção de coeficientes angulares(α) específicos de cada componente, onde através da comparação entre os coeficientes angulares foi possível calcular a % de Trolox® medindo assim a capacidade antirradicalar do antirradical testado comparando com o padrão utilizado.

Cálculos de CI_{50} foram realizados com as substâncias puras isoladas permitindo verificar a concentração inibitória para 50% de atividade antirradicalar

de cada substância. Para isso foi construído um gráfico para cada variação de absorvância em correlação à uma determinada concentração do antirradical testado em $\mu\text{mol.L}^{-1}$. Os testes foram realizados em quadruplicata, sendo a média dos valores obtidos para atividade antirradicalar 50%.

Além dos testes descritos anteriormente, foi relacionado a concentração do antirradical com a variação da absorvância assim como das concentrações dos radicais DPPH• consumidos em nível molecular, conhecido como η^* . A partir desses dados permitiu-se quantificar a quantidade de moléculas do antirradical que estabilizam os radicais livres estáveis de DPPH•.

2.4.6. Atividade citotóxica

As substâncias isoladas e designadas no item 2.4.4. foram avaliadas em relação a atividade citotóxica utilizando concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os testes foram realizados em duplicata utilizando a linhagem tumoral de adenocarcinoma de cólon humano (HCT-116).

O ensaio utilizado empregou o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). A avaliação emprega um ensaio colorimétrico cujo objetivo é quantificar indiretamente células viáveis, baseada na redução metabólica mediada pela enzima succinato-desidrogenase presente na mitocôndria do sal de MTT, que possui coloração amarela, a formazana, de coloração violeta (MOSMANN, 1983; BERRIDGE & TAN, 1993).

Como controle positivo foi utilizado Cloridrato de Doxorubicina (Rubidox®) empregado como quimioterápico na concentração de 2 μM .

Células tumorais de adenocarcinoma de cólon (HCT-116) foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico. O cultivo ocorreu em placas de 96 poços e expostas às amostras por 72 horas. Três horas antes do término do tempo de incubação, o sal de MTT (0,5 mg.mL^{-1}) foi adicionado e a absorvância mensurada a 595 nm após esse período. Para controle positivo foi empregado cloridrato de doxorubicina 2mM, um antineoplásico conhecido na literatura e amplamente utilizado para realização desses testes. A porcentagem de citotoxicidade foi mensurada utilizando o GraphPad Prism 4.0 (Intuitive Software for Science).

2.5. Resultados e Discussão

2.5.1. Ensaio antirradicalares

2.5.1.1. Avaliação antirradicalar do extrato bruto metanólico de *B. oblongifolia* e das respectivas fases de partição.

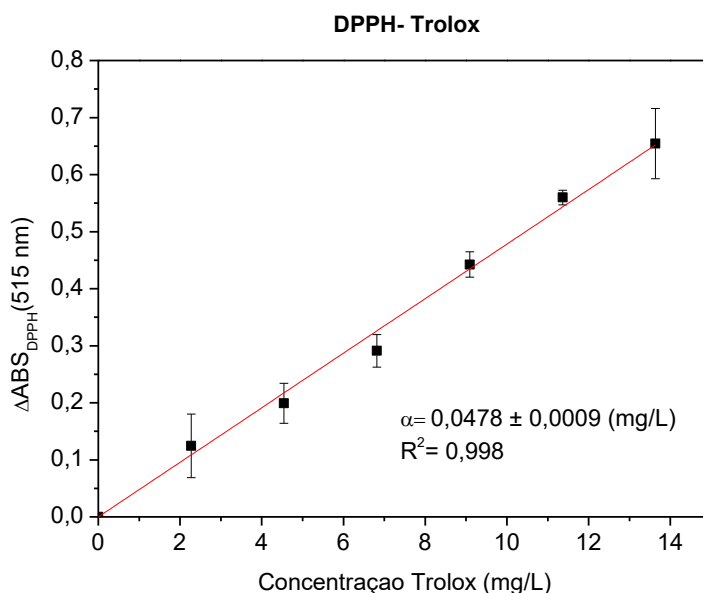
A velocidade da reação do Trolox® com DPPH• foi observada durante intervalo de tempo padrão de 30min e correlacionado com a variação da absorvância em 515 nm. Essa correlação foi marcada pelo decaimento rápido da absorção seguido de pequenas variações ao longo do tempo (Figura 5). A cinética de reação foi isenta de qualquer substância antirradicalar adicional revelando a estabilidade durante todo o intervalo de tempo do ensaio, sendo assim, quaisquer alterações em relação à absorvância e tempo será reflexo da reação entre o radical e os compostos antirradicalares.

Figura 5 - Cinética da reação do Trolox com o DPPH• medida pela variação da absorvância em 515nm.

Para a determinação da atividade antirradicalar dos extratos brutos metanólicos e fases de partição foi executado a correlação linear entre as concentrações das amostras e a variação da absorvância (Δ Abs.) do Trolox® (Figura 6). Os valores obtidos da capacidade antirradicalar, podem ser traduzidos em porcentagens de Trolox® a fim de serem mais bem interpretados. Para tanto, foi construído o gráfico correlacionando absorvância em 515nm pela concentração de Trolox® em mg. L⁻¹, utilizando o programa OriginPro8 (software de análise de dados e gráficos científicos). Comparando os resultados obtidos com o Trolox® podemos correlacionar com a capacidade antirradicalar das

amostras realizadas. Para tanto, comparamos as inclinações das retas como proposto no artigo de Oliveira et al., 2014.

Figura 6 - Correlação linear da Δ Abs. de DPPH^{*} e Trolox®.



A reação do extrato bruto metanólico, fases de partição e o DPPH^{*} foi acompanhado durante 50 minutos a temperatura de 25°C com agitação em equipamento de Elisa. Dessa forma, obtivemos a cinética das reações de cada amostra, isto é, do extrato bruto metanólico e das fases de partição em diclorometano, acetato de etila, butanol e hidroalcoólica (Figura 7). As leituras de absorvância foram realizadas em intervalo mínimo de 20 segundos.

A fim de obter a capacidade antirradicalar dos extratos e fases de partição, foram construídos os gráficos correlacionando a absorvância em 515nm pela concentração das amostras em mg.L⁻¹ para obtenção dos coeficientes lineares da reta (Figura 8). Comparando o coeficiente linear da reta do Trolox x DPPH, com os coeficientes lineares das amostras foi possível verificar as capacidades antirradicalares apresentadas na Tabela 2.

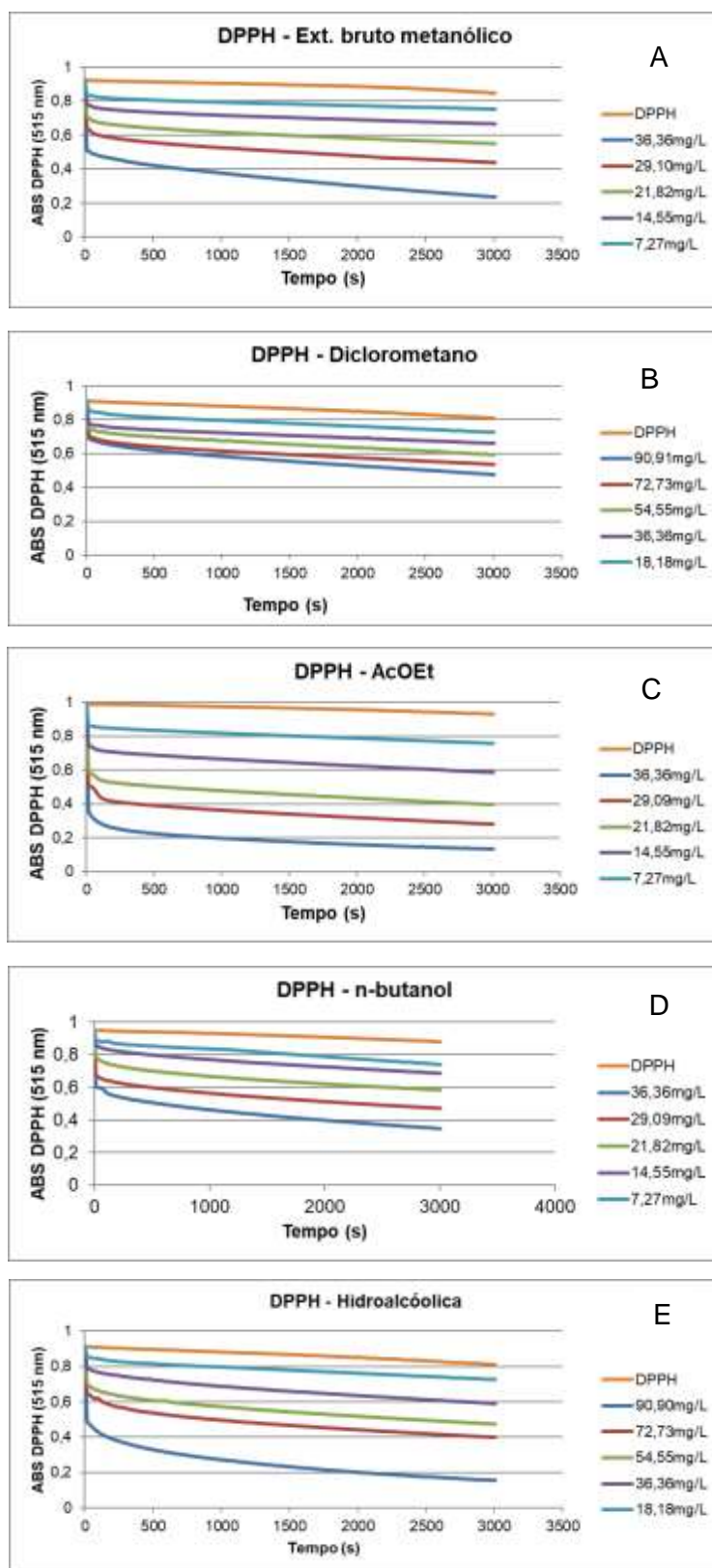


Figura 7 - Cinética da reação do extrato bruto metanólico e das suas fases de partição com o DPPH, medida pela variação da absorbância em 515nm. A) Extrato bruto metanólico, B) Fase em diclorometano, C) Fase em acetato de etila, D) Fase em n-butanol, E) Fase hidroalcoólica.

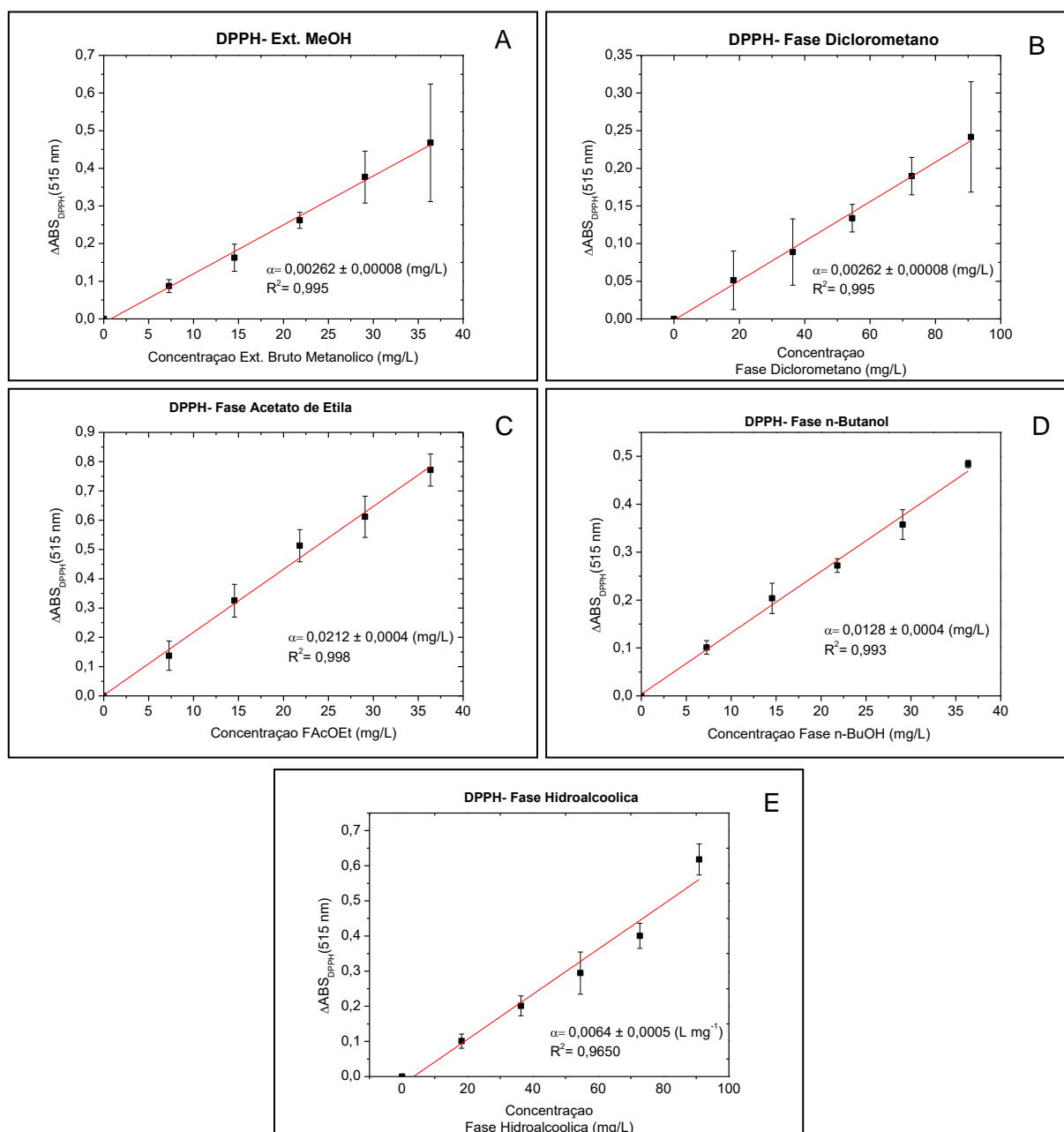


Figura 8 - Correlação linear da variação da absorvância de DPPH' com a concentração de: A) Extrato bruto metanólico, B) Fase em Diclorometano, C) Fase em Acetato de etila, D) Fase em n-Butanol e) Fase hidroalcoólica.

Tabela 2 - Capacidade antirradicalar relativa ao Trolox (% Trolox) do extrato bruto metanólico de *B. oblongifolia* e suas fases de partição.

Amostras	% de Trolox®
Extrato Bruto Metanólico	27,2 ± 5,2
Fase Diclorometano	5,5 ± 1,0
Fase Acetato de etila	44,4 ± 8,4
Fase n-butanólica	26,8 ± 5,1
Fase hidroalcoólica	13,4 ± 2,7

Analisando os resultados temos uma acentuada atividade antirradicalar na fase em acetato de etila proveniente do extrato bruto metanólico.

A fase em acetato de etila apresentou maior atividade antirradicalar em relação as outras fases, esse resultado já eram esperados uma vez que essa fase apresentou a maioria dos componentes encontrados nas outras fases. Algumas substâncias identificadas por comparação de tempo de retenção, revelam derivados do ácido cafeico conhecidamente como ótimo potencial antirradicalar como abordados em inúmeros trabalhos (OLIVEIRA et al., 2011; TAMAYOSE, 2014).

A fase em acetato de etila mostrou-se promissora na estabilização do radical livre DPPH• como apontados no estudo de Oliveira e colaboradores em 2014, sendo também a fase eleita para desenvolvimento da avaliação antirradicalar utilizando diversos métodos para tal, incluindo a mesma metodologia envolvida para avaliar a atividade antirradicalar de *Baccharis oblongifolia*.

2.5.1.2. Avaliação antirradicalar dos grupos provenientes da fase de partição em acetato de etila.

A verificação da atividade antirradicalar dos grupos formados, depois de submetido a cromatografia de exclusão molecular, foram avaliados da mesma maneira do extrato bruto e fases de partição anteriormente expostos.

Foi comparado a cinética e os coeficientes lineares das retas em relação ao Trolox®, Figuras 9 e 10, respectivamente. Sendo assim a capacidade antirradicalar relativa pode ser calculada com base nos resultados obtidos para o Trolox® conforme tabela 3.

Tabela 3 - Capacidade antirradicalar avaliadas em relação a % de Trolox® dos grupos obtidos por fracionamento cromatográfico da fase de partição em acetato de etila de *B. oblongifolia*.

Grupos (<i>Baccharis oblongifolia</i>)	% de Trolox®
BOBAc-1	5,75 ± 0,32
BOBAc-2	1,82 ± 1,38
BOBAc-3	45,45 ± 3,11
BOBAc-4	54,54 ± 3,14
BOBAc-5	56,06 ± 3,15
BOBAc-6	12,88 ± 1,08
BOBAc-7	25,30 ± 1,42

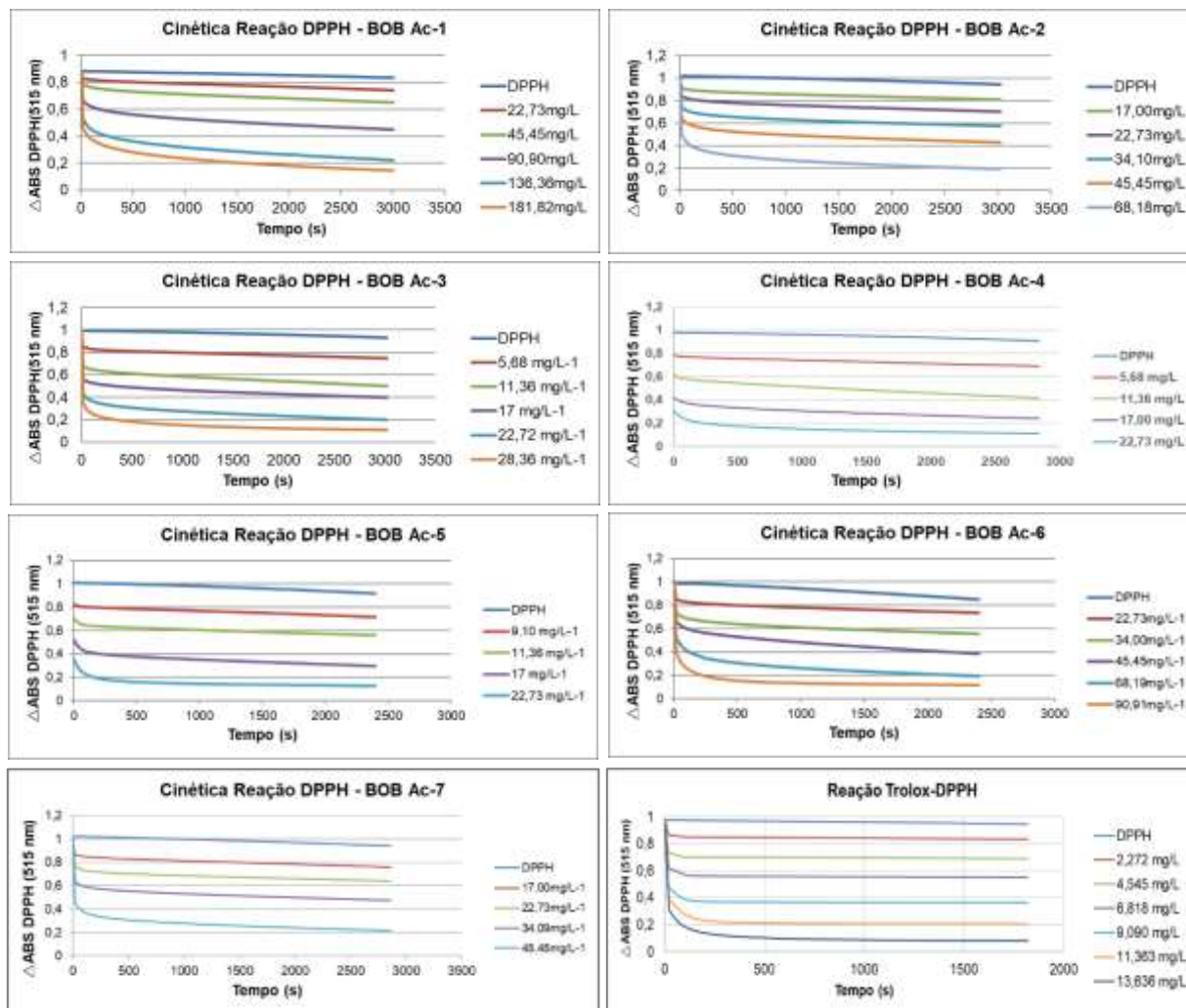


Figura 9 - Cinética da reação do DPPH com o Trolox® e dos grupos obtidos do fracionamento cromatográfico (BOB Ac-1 a BOB Ac-7) da fase em acetato de etila com o DPPH' medida pela variação da absorvância em 515nm.

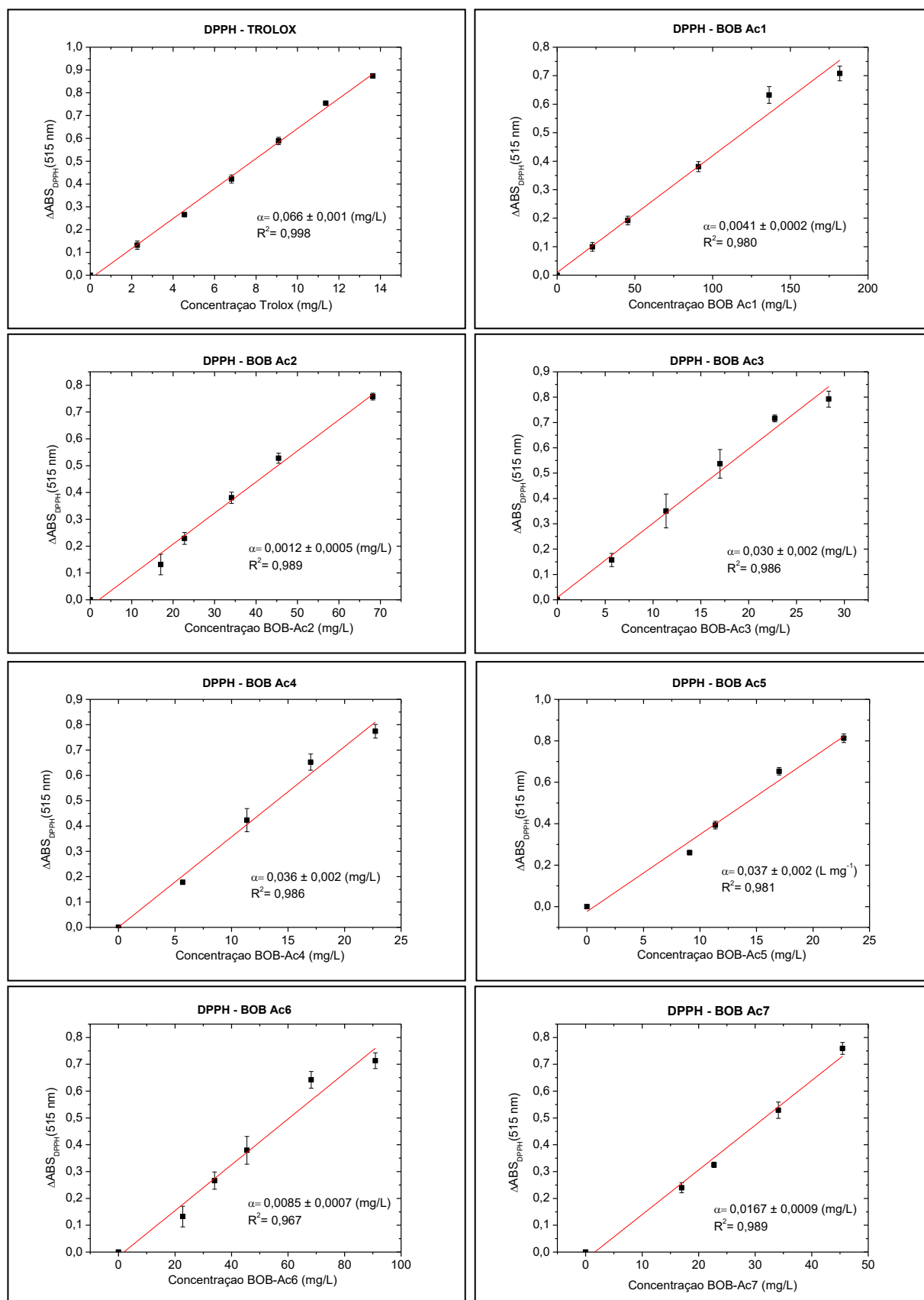


Figura 10 - Correlação linear da variação da absorvância de DPPH' com a concentração de Trolox® e dos grupos BOBAc-1 a BOBAc-7 da fase em acetato de etila, com o DPPH'.

Os grupos da partição provindas da fase em acetato de etila, BOB Ac3, BOB Ac4, BOB Ac5 apresentaram capacidade antirradicalar de cerca de cinquenta por cento em relação ao padrão Trolox®, sendo os grupos com maior concentração de compostos fenólicos conferindo à *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. atividade antirradicalar.

Oliveira e colaboradores apontam presença de derivados de ácido cafeico e ferúlico nos grupos 3 e 4 e uma mistura de 3,5-O- ácido dicafeoilquinico and 3-O-feruloil- 5-O- ácido cafeoilquinico como componentes majoritários no grupo 5, apontando elevada atividade antirradicalar como é esperado para essa classe de substância. Ao compararmos com *Baccharis oblongifolia* notamos a presença de derivados do ácido ferúlico e cafeico de forma significativa a partir do grupo BOB Ac-3 e o declínio na abundância das mesmas a partir de BOB Ac-5 revelando uma queda na atividade antirradicalar a partir desse último grupo; o que não ocorre com *Baccharis burchellii* Baker.

2.5.1.3. Avaliação da atividade antirradicalar das substâncias isoladas

As sete substâncias isoladas de *B. oblongifolia* e descritas no item 2.4.4. foram avaliadas em relação a atividade antirradicalar a partir da comparação entre a cinética das reações e coeficientes lineares das retas (Figuras 11 e 12). Os resultados da atividade antirradicalar em relação ao Trolox são expostos na Tabela 4.

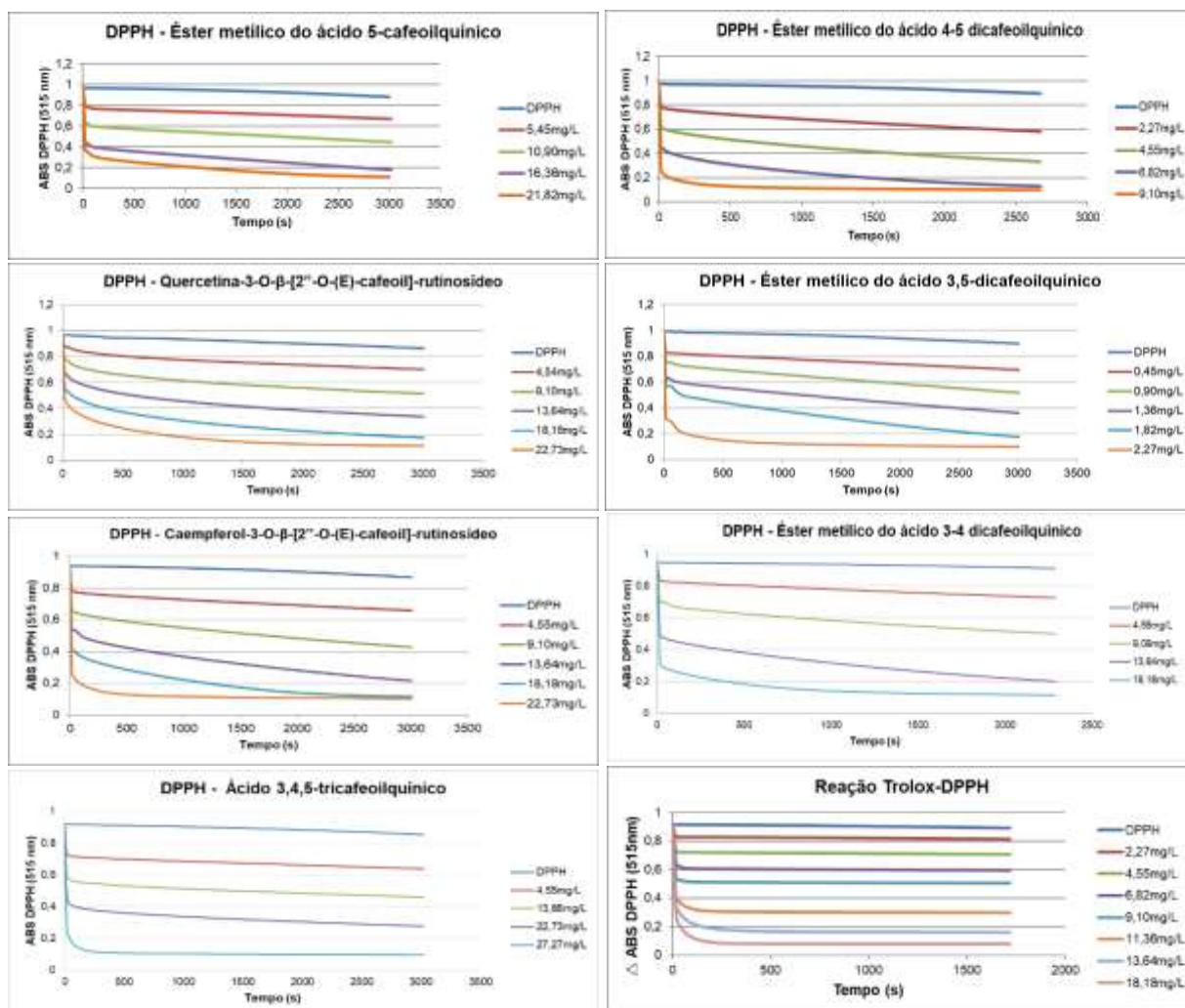


Figura 11 - Cinética da reação do DPPH com o Trolox® e das substâncias isoladas da fase em acetato de etila, com o DPPH' medida pela variação da absorvância em 515nm.

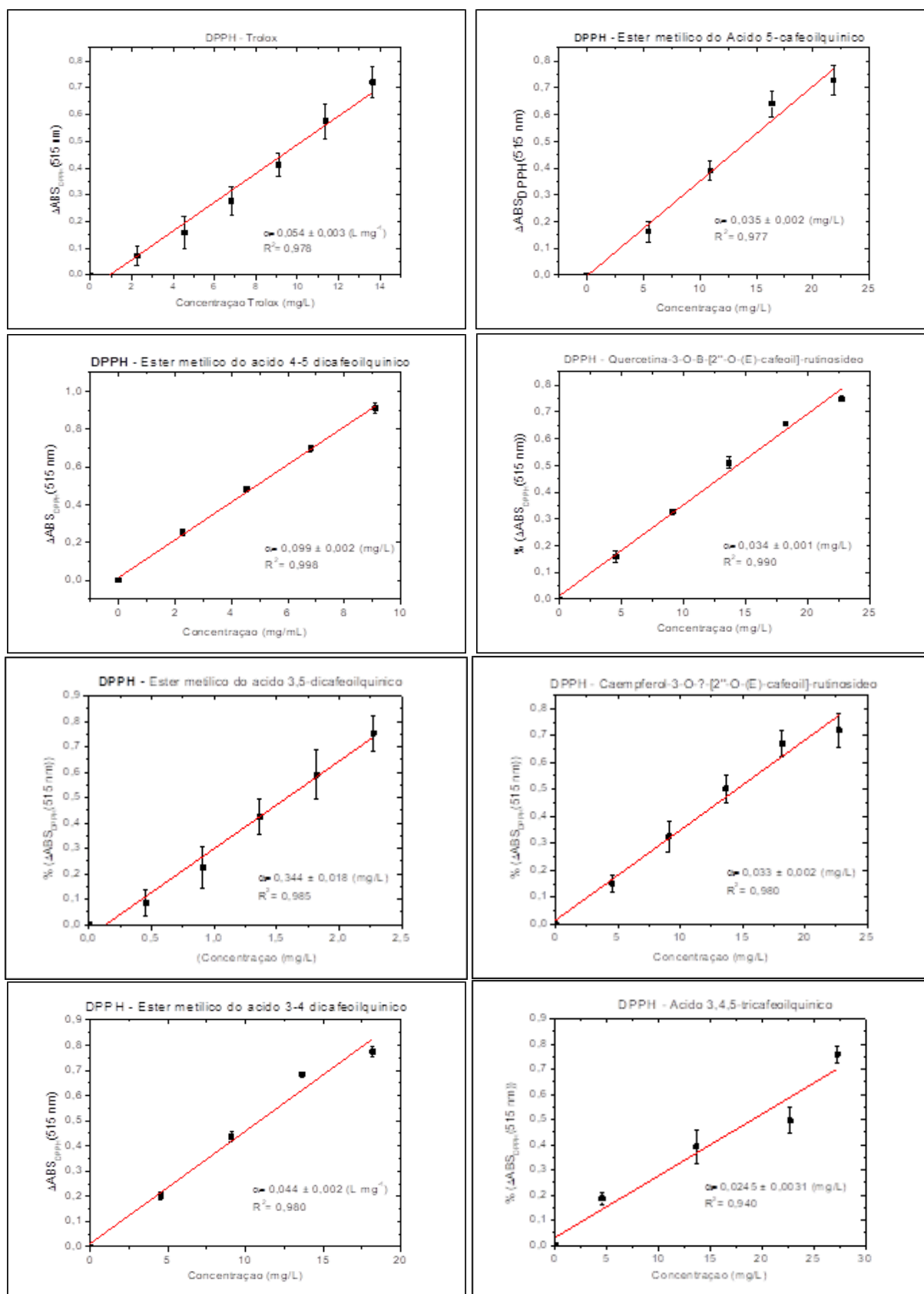


Figura 12 - Correlação linear da variação da absorbância de DPPH' com a concentração de Trolox e das substâncias isoladas de *B. oblongifolia* em relação ao DPPH'.

Tabela 1 - Capacidade antirradicalar relativa ao Trolox das substâncias isoladas de *B. oblongifolia*.

Substância	% de Trolox®
Éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico	64,82 ± 5,17
Éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico	88,88 ± 10,84
Quercetina-3-O-β-[2''-O-(<i>E</i>)-cafeoil]-rutinosídeo	62,96 ± 3,96
Éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico	252,52 ± 49,14
Caempferol-3-O-β-[2''-O-(<i>E</i>)-cafeoil]-rutinosídeo	61,11 ± 5,02
Éster metílico do ácido 3,4-dicafeoilquínico	81,48 ± 5,85
Ácido 3,4,5-tricafeoilquínico	45,37 ± 6,27

Foi calculado o CI_{50} representados através da correlação entre diferentes concentrações em $\mu\text{mol. L}^{-1}$ das substâncias isoladas e a atividade antirradicalar a 50% (Figura 13) e n^* (Figura 14) como descritos na metodologia. Os resultados para cada componente são expostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Dados de concentração inibitória necessária para inibir 50% de DPPH* ($\mu\text{mol. L}^{-1}$) e número de radicais de DPPH* sequestrados por molécula de antirradical (η^*) obtidos para cada substância isolada de *B. oblongifolia*.

Substância	CI_{50}	n^*
Éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,1
Éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico	7,8 ± 0,9	0,54 ± 0,08
Quercetina-3-O-β-[2''-O-(<i>E</i>)-cafeoil]-rutinosídeo	10,5 ± 0,5	0,66 ± 0,05
Éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico	1,8 ± 0,7	14,0 ± 1,0
Caempferol-3-O-β-[2''-O-(<i>E</i>)-cafeoil]-rutinosídeo	9,9 ± 0,8	1,0 ± 0,1
Éster metílico do ácido 3,4-dicafeoilquínico	16,0 ± 0,3	0,98 ± 0,07
Ácido 3,4,5-tricafeoilquínico	23,8 ± 0,4	0,59 ± 0,07

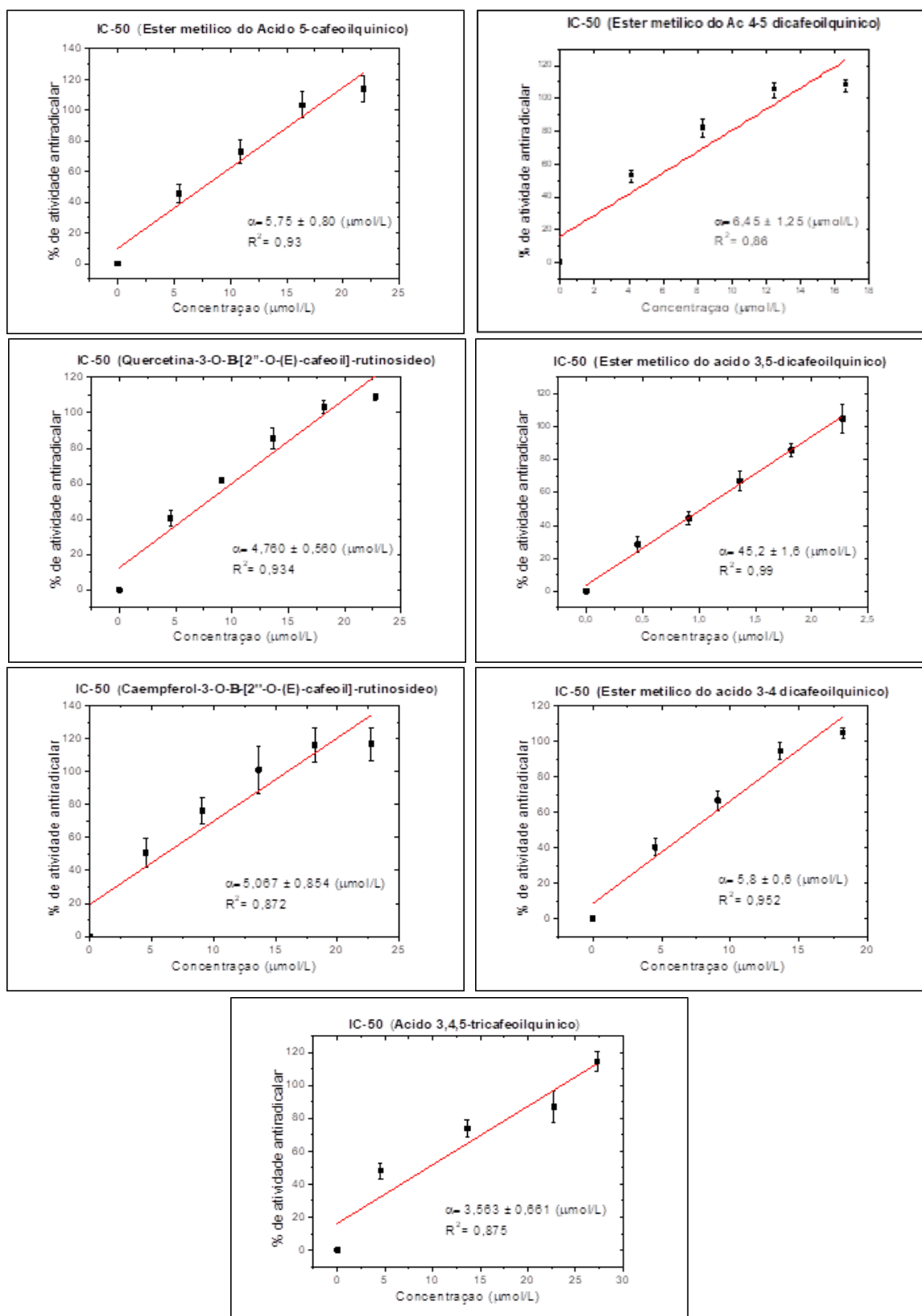


Figura 13 - Correlação linear da porcentagem da atividade antirradicalar com a concentração das amostras isoladas de *B. oblongifolia* em $\mu\text{mol. L}^{-1}$.

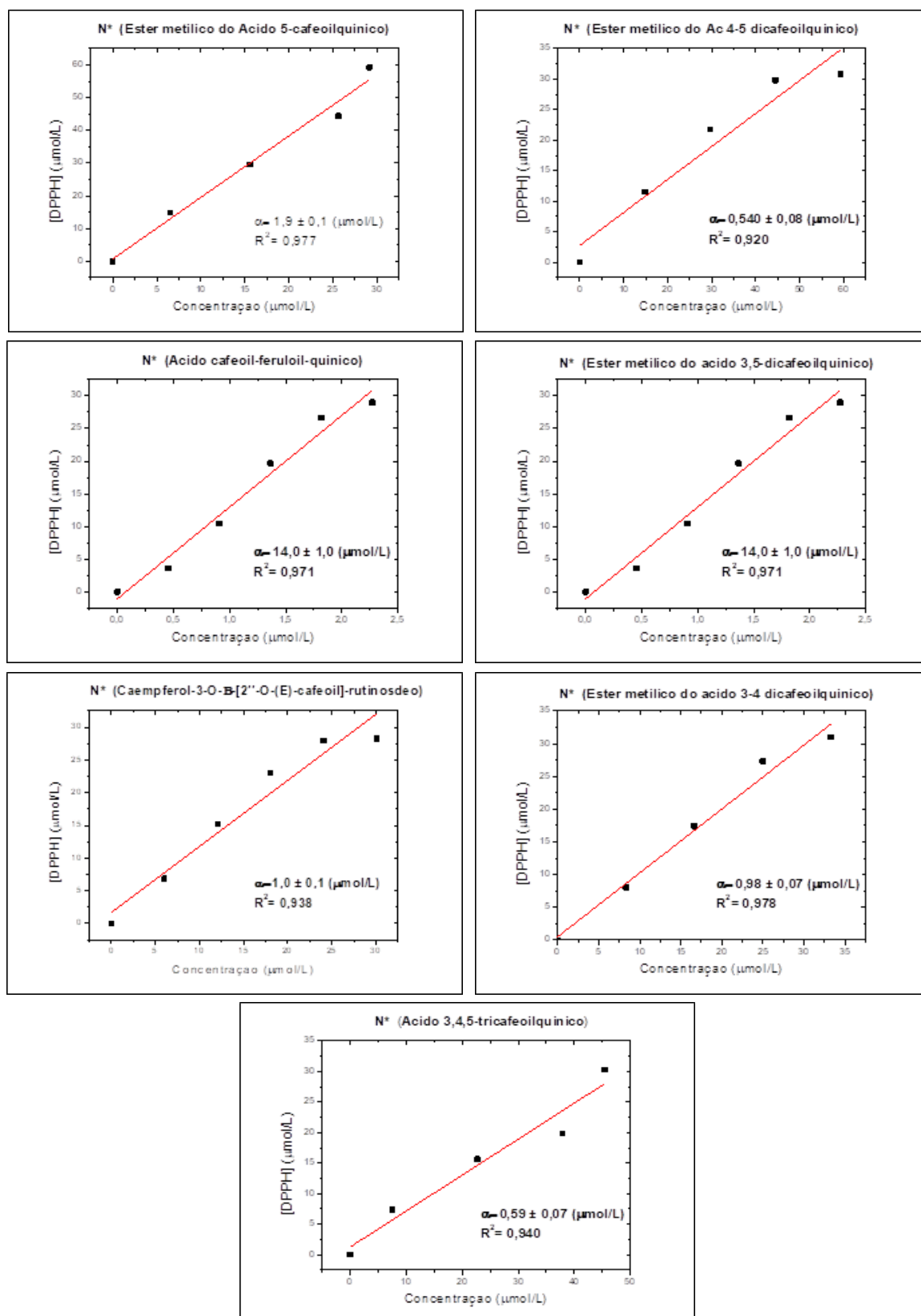


Figura 3 – Correlações lineares da variação da concentração do DPPH• consumidos por molécula de antirradical e as concentrações das substâncias isoladas de *B. oblongifolia*.

Um dos pioneiros na avaliação da atividade antirradicalar foi Mongelli e colaboradores em 1997, onde *Baccharis coridifolia* DC. foi alvo da pesquisa na ocasião. Mongelli empregou o ensaio de quimioluminescência obtendo no extrato aquoso um IC₅₀ de 141 µg.L⁻¹. No mesmo ano Desmarchelier e colaboradores realizaram o mesmo teste utilizando outras 19 espécies de *Baccharis* tais como: *B. coridifolia* DC., *B. crispa* Spreng., *B. grisebachii* Baker. verificando uma atividade antioxidante de 10-1000 µg.L⁻¹ em *B. coridifolia* DC. e *B. crispa* Spreng.

Em 1998 Heras e colaboradores avaliaram a atividade antioxidante em *B. trinervis* Pers. e detectaram atividade antioxidante no extrato etanólico das partes aéreas do material vegetal, atingindo significativa ação antioxidante. Para isso, os autores utilizaram três testes: peroxidação microsomal (inibindo de 74,8±1,3%), produção de superóxido (inibindo de 78,5±1,3%) além do ensaio de xantina oxidase obtendo como resultado uma capacidade antioxidante de 24,7±3,1%.

Em 2003, o cafeato de 4'-O-β-D-glicopiranosil-3,5-dimetoxibenzila, inédito em *B. articulata* (Lam.) Pers., revelou potencial antioxidante desse derivado do ácido cafeico através do teste TRAP (Total Radical - Trapping Antioxidant Parameter, utilizando concentrações de 0,1, 0,2 e 2,0mM alcançando resultados semelhantes ao Trolox® em concentrações equimolares (OLIVEIRA et al., 2003).

Em 2003, Parejo e colaboradores testaram atividade antioxidante utilizando extrato metanólico, como resultado encontraram maior atividade antioxidante na fase em acetato de etila. O trabalho utilizou duas espécies de *Baccharis*, *B. pentlandii* DC. e *B. platypoda* DC. Os resultados da fase em acetato de etila foi expresso por equivalentes do ácido gálico (GAE/mg) por mg de extrato e os valores obtidos foram 207±8,8 e 292,3±14,5 GAE/mg.

Analisando as substâncias isoladas temos uma alta atividade antirradicalar para o éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico o qual representou atividade antirradicalar de 6,43 vezes maior em relação ao padrão Trolox® seguido pelo éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico alcançando 1,83 vezes maior capacidade antirradicalar em relação ao mesmo padrão testado. Esses dados já eram esperados uma vez que as suas estruturas moleculares apresentam a características necessárias para a estabilização de

radicais livres como a presença de dois *orto*-dihidroxi, presentes no ácido 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico.

2.5.2. Atividade Citotóxica

Há várias formas de uma substância expressar sua citotoxicidade, sendo assim, um único sistema-teste é ineficaz para detectar todos os efeitos citotóxicos. Para contornar esse aspecto negativo, baterias de testes *in vivo* e *in vitro* devem ser realizados, isso é fundamental para atingir um resultado fidedigno (RODRIGUEZ, 2011).

Com base no artigo de Suffness & Pezzuto (1990) e Boik (2001), baseando-se em dados provindos do Instituto Nacional do Câncer, apontam extratos que apresentem valores de $IC_{50} < 30 \mu\text{g. L}^{-1}$ e compostos isolados com valores de $IC_{50} < 4 \mu\text{g. L}^{-1}$ são considerados auspiciosos.

Substâncias fenólicas são conhecidas por seu potencial antitumoral como as citadas no trabalho de Sforcin (2007), onde o autor menciona a presença de dessas substâncias em *Baccharis dracunculifolia* DC., Matsuno em 1995 citado no trabalho de Sforcin em 2007 isolou um diterpenoide descrevendo essa atividade. Em 1997 o mesmo pesquisador isolou o PRF-1 proveniente de extrato aquoso da mesma espécie vegetal comprovando que compostos fenólicos também podem exercer efeitos citotóxicos, além dos já conhecidos diterpenos.

Kimoto e colaboradores em 1998 citados no trabalho de Sforcin em 2007 isolaram a artepelina C (3,5-diprenil-ácido p-cumárico) um dos ácidos fenólicos majoritários encontrados no extrato da própolis verde de *B. dracunculifolia* DC., e responsável pela atividade antitumoral.

Os ácidos cafeico e cinâmico são apontados por apresentarem resultados citotóxicos para células HEP-2 (células tumorais hepáticas), entretanto esses resultados são mencionados *in vitro* carecendo de testes *in vivo* para compreensão dos mecanismos de ação (SFORCIN, 2007).

Apesar de conhecidos resultados positivos para citotoxicidade de compostos fenólicos, os extratos brutos, fases de partição e substâncias isoladas de *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. não apresentaram resultados significativos na supressão de células tumorais, dessa forma os ensaios

realizados em parceria pelo ICB-USP, apresentaram resultados inferiores à 75% como apontados na (Tabela 7).

Tabela 7. Porcentagem de citotoxicidade nas concentrações de 5 e 50 $\mu\text{g. L}^{-1}$ do extrato bruto de *B. oblongifolia* e suas fases de partição.

Amostras	Citotoxicidade (%)	
	5 $\mu\text{g. L}^{-1}$	50 $\mu\text{g. L}^{-1}$
Extrato Bruto metanólico	-18,25	-11,07
Fase Hexânica	29,00	89,35
Fase Diclorometânica	15,83	45,02
Face Acetato de etila	9,98	11,55
Fase n-butanólica	-15,29	55,14
Fase hidroalcoólica	23,69	31,57

Inicialmente foi verificado duas concentrações (5 e 50 $\mu\text{g. L}^{-1}$) para os extratos e fases de partição. Verificado que muitos extratos não apresentaram citotoxicidade, foram conduzidos os demais testes utilizando somente para concentração de 50 $\mu\text{g. L}^{-1}$, conforme tabelas 8 e 9.

Tabela 2 - Porcentagem de citotoxicidade dos grupos provenientes do fracionamento cromatográfico da fase em acetato de etila do extrato bruto metanólico de *B. oblongifolia*.

Citotoxicidade (%)		Citotoxicidade (%)	
Amostras	50 $\mu\text{g. L}^{-1}$	Amostras	50 $\mu\text{g. L}^{-1}$
BOB Ac1	87,88	BOB Ac5	7,21
BOB Ac2	-9,57	BOB Ac6	14,05
BOB Ac3	-0,029	BOB Ac7	38,63
BOB Ac4	-10,18		

Tabela 3 - Porcentagem de citotoxicidade das substâncias isoladas de *B. oblongifolia*.

Substâncias	Citotoxicidade (%)
Éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico	29,42
Éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico	-34,07
Quercetina-3-O-β-[2''-O-(<i>E</i>)-cafeoil]-rutinosídeo	-38,46
Éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico	3,66
Caempferol-3-O-β-[2''-O-(<i>E</i>)-cafeoil]-rutinosídeo	-37,69
Éster metílico do ácido 3,4-dicafeoilquínico	-17,14
Ácido 3,4,5-tricafeoilquínico	-1,95

Das amostras presentes dentre os grupos formados pelas fases de partição somente BOB Ac1 apresentou considerável percentual citotóxico, contudo ao analisarmos a presente fase cromatograficamente não é possível detectar nenhuma substância que absorva no espectro UV sendo assim outras técnicas de identificação podem ser empregadas futuramente como cromatografia a gás por exemplo.

São descritos em literatura, que compostos fenólicos, terpenos e acetilenos apresentam potencial citotóxico como evidenciado em células de câncer de mama (JAGANATHAN et al., 2010), além disso ácido cafeico e seus derivados mostraram-se eficazes na supressão de células tumorais de adenocarcinoma pulmonar (OOI et al., 2011). Marzouk e colaboradores (2011), testaram citotoxicidade com extratos de plantas ricos em compostos fenólicos e verificaram atividade citotóxica para células tumorais de mama, fígado, cervical e as linhas HCT 116, as mesmas utilizadas para avaliação da citotóxica realizada em parceria com o ICB-USP.

Diferentes extratos de asteráceas mostraram-se eficazes na supressão do crescimento de células tumorais, Carvalho e colaboradores (2002) elencaram sete espécies e avaliaram a proliferação celular em diferentes células tumorais, dentre elas as células HCT 116; *Stevia urticifolia* Thunb., *Vernonia polyanthes* Less., *Vernonia crotonoides* (DC.), *Moquinia racemosa* DC., *Mutisia campanulata* Less., *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze e *Calea fruticosa* (Gardner) Urbatsch, Zlotzky & Pruski, onde tiveram seus extratos em hexano, acetato de etila e etanólico submetidos aos testes de citotoxicidade apresentando

resultados favoráveis, quanto ao crescimento e desenvolvimento de células tumorais, na fase em acetato de etila para as células HCT 116.

Estudos realizados com folhas *Baccharis trinervis* (Lam, Persoon) revelaram atividade citotóxica para as quatro fases elaboradas: extrato bruto aquoso, acetato de etila, n-butanol e hidroalcoólica, sendo a fase em acetato de etila mais promissora na supressão de células tumorais; dentre os compostos de alta polaridade identificados estão: luteolina, rutina, ácido cafeico, ácido rosmarínico e ácido elágico. Estudos com as mesmas espécies de *Baccharis* em locais diferentes como Brasil e Colômbia, revelaram a presença das mesmas substâncias identificadas, o que sugere que fazem parte da constituição química da espécie, apresentando alta taxa de toxicidade em células tumorais por compostos fenólicos (GARCIA, 2017).

2.6. Conclusão

A fase de partição em acetato de etila do extrato bruto metanólico de *B. oblongifolia* apresentou maior capacidade antirradicalar em relação às outras fases incluindo o próprio extrato bruto metanólico, atingindo $44,4 \pm 8,4\%$ comparado com a atividade antirradicalar do Trolox® frente ao consumo de DPPH•.

Dentre os grupos originados pela cromatografia de exclusão molecular proveniente da fase de partição em acetato de etila do extrato bruto metanólico, os grupos BOB Ac3, Ac4 e AC5 foram os grupos que apresentaram as maiores atividades antirradicalares em relação aos demais grupos testados quando comparados com Trolox® alcançando respectivamente: $45,45 \pm 3,11\%$, $54,54 \pm 3,14\%$ e $56,06 \pm 3,15\%$, respectivamente, em decorrência da presença significativa de compostos derivados do ácido cafeico como: éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico e o éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico.

Em relação às substâncias isoladas temos como destaque a atividade antirradicalar do éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico com uma porcentagem de $637,72 \pm 49,14$, seguido do éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico com $183,34 \pm 10,84$ e éster metílico do ácido 3,4-dicafeoilquínico $81,48 \pm 5,85$.

O extrato bruto metanólico não apresentou citotoxicidade assim como suas fases de partição, com exceção da fase hexânica atingindo apresentando resultado promissor na inibição do crescimento das células HCT-116.

Na literatura são citadas atividades citotóxicas relacionadas com os terpenos e esteroides em grande maioria. Ao analisarmos os resultados verificamos que as únicas duas amostras que resultaram em atividade citotóxica foram oriundas da fase de partição hexânica proveniente do extrato bruto metanólico e o grupo BOB Ac1, sendo assim essa atividade possivelmente não pode estar associada aos compostos fenólicos analisados no presente trabalho, uma vez que as substâncias testadas não apresentaram resultados significativos de citotoxicidade conforme os procedimentos realizados. Dessa maneira, a atividade citotóxica verificada pode ser proveniente de uma substância que não pode ser detectada pelo U.V.

Em conclusão verificamos que as substâncias presentes em *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. apresentam atividade antirradicalar significativa, contudo, não temos resultados semelhantes sob a perspectiva dos testes citotóxicos.

Ressalta-se a importância de manter estudos constantes acerca de avaliações das atividades dos compostos fenólicos pois, como visto anteriormente, alguns estudos revelam resultados não promissores quanto aos benefícios que os compostos fenólicos trazem.

O Brasil é um país amplo com fronteiras além do conhecimento, a biodiversidade presente no país é detentora de um arsenal infindável de substâncias novas de interesse farmacológico, principalmente. Dessa maneira faz-se necessário o investimento em pesquisa afim de propiciar estudos que esclareçam e revelem essas substâncias.

Referências Bibliográficas

ANAGNOSTOPOULOU, M. A. et al. **Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*)**. Food Chemistry, London, v. 94, n. 1, p. 19-25, 2006.

ARANHA, E.S.P. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICÂNCER IN VITRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DO GÊNERO *Eugenia***. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Programa de Pós-graduação em ciências farmacêuticas na área de concentração bioanálises e desenvolvimento de produtos farmacêuticos, Universidade federal do Amazonas, Manaus, p. 82. 2014.

AHERNE, S.A. e O'BRIEN N. **Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism**. Elsevier, 18: p. 75-8. 2002.

BARATA, C.; VARO, I.; NAVARRO, J.C.; ARUN, S. e PORTE, C. **Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds**. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 140, n. 2, p.175-186, 2005.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. e DAVID, J.P. **Oxidative stress relations between the formation of reactive species and the organism's defense**. Quimica Nova. v. 29, n. 1 p. 113-123. 2006.

BERRIDGE, M. V. e TAN, A.S. **Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction**. Arch Biochem Biophys. v.303. n. 2. p. 474-482. 1993.

BEHLING, E.B., SENDÃO, M.C., FRANCESCATO, H.D.C., ANTUNES, L.M.G., BIANCHI, M.L.P. **FLAVONOIDE QUERCETINA: ASPECTOS GERAIS E AÇÕES BIOLÓGICAS**. Alim. Nutr. Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BOIK, J. **NATURAL COMPOUNDS in CANCER THERAPY: Promising nontoxic Antitumor Agents from Plants & other Natural Sources**. 1.ed. United States: Oregon Medical Press, 541 p. 2001.

BORISH, E. T.; COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F.; DEUTSCH, W. A.; PRYOR, W. A. **CIGARETTE TAR CAUSES SINGLE-STRAND BREAKS IN DNA**. Biochem. Biophys. Res. Commun. v.133, n. 2, p. 780-786, 1985.

BRASILEIRO, B.G., PIZIOLO, V.R., MATOS, D.S., GERMANO, A.M. e JAMAL, C.M. **Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no “Programa de Saúde da Família”, Governador Valadares, MG, Brasil**. Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas, v. 44, n. 4, p. 629-636, 2008.

CARVALHO, C. C.; MACHADO, K.N.; FERREIRA, P.M.P.; PESSOA, C. FONSECA, T.H.S.; GOMES, M. A. e NASCIMENTO, A. M. **Biological screening of extracts of Brazilian Asteraceae plants**. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. v. 7, n. 28, p. 2000-2005, 2013.

CLIFFORD, M.N., JAGANATH, I.B., LUDWIG, I.A. e CROZIER, A. **Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity**. Natural Product Reports. v. 34, p. 1391-1421, 2017.

CHEN, J.H. e HO, C.T. **Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds**. J. Agric. Food Chem, v. 45, p. 2374-2378, 1997.

CROFT, K. D. **The Chemistry and Biological Effects of Flavonoids and Phenolic Acids**. Annals of the New York Academy of Sciences. v. 854, p. 435-442, 1998.

DESMARCHELIER, C.; BERMUDEZ, N.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. e BOVERIS, A. **Antioxidant and Prooxidant Activities in Aqueous Extracts of Argentine Plants**. *International Journal of Pharmacognosy*. v. 35, n. 2, p. 116-120, 1997.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic Approach**. 3. Ed. United Kingdom: WILEY, 546p., 2009.

FUKUMASU, H. et al. *Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer*. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 21, n. 2, p. 49-59, 2008.

GARAMBONE, E. & ROSA, G. **Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde**. *Alimentos e nutrição*. v. 18, p. 229-235, 2007.

GARCIA, V. P.J. **Avaliação Fitoquímica, Citotóxica, Genotóxica e Mutagênica dos extratos de *Baccharis trinervis* do Brasil e da Colômbia**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 120, 2013.

HERAS, B.; SLOWING, K.; BENEDI, J.; CARRETERO, E.; C.; BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M. J.; GOMEZ-SERRANILLOS, P.; LISO, P.A.; VILLAR, A. e CHIRIBOGA, X. **Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador**. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 61, n. 2, p. 161-166, 1998.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z. e ZHANG, Y. **Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention**. *Nutrition and Cancer*. v. 62, n. 1, p. 1–20, 2010.

INCA, **Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp>. Acesso em 22 jul. 2018.

JAGANATHAN, S. K.; MANDAL, S.M.; JANA, S. K. DAS, S. e MANDAL, M. **Studies on the phenolic profiling, anti-oxidant and cytotoxic activity of Indian honey: in vitro evaluation.** Natural Product Research. v. 24, n. 14, p. 1295-1306, 2010.

KIKUZAKI, H. HISAMOTO, M., HIROSE, K., KAYO AKIYAMA, AND TANIGUCHI, H. **Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Related Compounds.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50 (7), 2161-2168. 2002.

KIMOTO, T., ARAI, S., KOHGUCHI, M., AGA, M., NOMURA, Y., MICALLEF, M.J., KURI-MOTO, M., MITO, K. **Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis.** Cancer Detection and Prevention v. 22, p. 506–515, 1998.

KRUL, C; LUITEN-SCHUIITE, A.; TENFELD, A.; VAN OMMEN, B.; VERHAGEN, H.; HAVENAAR, R. **Antimutagenic activity of green tea and black tea extracts studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model.** Mutation Research, Amsterdam. v. 474, p.71-85, Mar. 2001.

KUSS, F. **Agentes oxidantes e Antioxidantes.** Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no primeiro semestre de 2005.

MARIA, C.A.B. & MOREIRA, R.F.A. **MÉTODOS PARA ANÁLISE DE ÁCIDO CLOROGÊNICO.** Química Nova. 27(4): p. 586-592. 2004.

MARZOUK, M.M. **Flavonoid constituents and cytotoxic activity of *Eucaria hispânica* (L.) Druce growing wild in Egypt.** Arabian Journal of Chemistry. v. 9, p. 411-415, 2016.

MATSUNO, T. **A New Clerodane Diterpenoid Isolated from Propolis.** Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences. v. 50, n. 1, p. 93-97. 1995.

MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; TALOU, J.R.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. **In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of Baccharis coridifolia DC.** Journal of Ethnopharmacology, v. 58, n. 3, p. 157-163, 1997.

MORAIS, S.M.; LIMA, K.S.B.; SIQUEIRA, S.M.C.; CAVALCANTI, E.S.B.; SOUZA, M.S.T.; MENEZES, J.E.S.A. e TREVISAN, M.T.S. **Correlação entre as atividades antirradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas.** Revista brasileira de plantas medicinais. v. 15, n. 4, p. 575-582, 2013.

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

OGA, S.; CAMARGO, M.M. de A.; BATISTUZZO, J.A. de O. **Fundamentos de Toxicologia.** São Paulo: ATHENEU, 79 p. 2008.

OLIVEIRA, S. **Determinação da Capacidade Antirradicalar de Produtos Naturais Utilizando-se a Quimioluminescência do luminol e Ensaio Fotométrico com Radicais Estáveis.** Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, p. 93. 2011.

OLIVEIRA, D.M. & BASTOS, D.H.M. **Biodisponibilidade de Ácidos fenólicos.** Quim. Nova. v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, L.A.R.; MACHADO, R.D. e RODRIGUES, A.J.L. **Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis.** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.1, p.32-40, 2014.

OOI, K. L.; MUHAMMAD, T. S. T.; TAN, M. L. e SULAIMAN, S. F. **Cytotoxic, apoptotic and anti- α glucosidase activities of 3,4-di-O-caffeoyl quinic acid, an antioxidant isolated from the polyphenolic-rich extract of *Elephantopus mollis* Kunth.** Journal of ethnopharmacology. v. 135, n. 3, p. 985-695, 2011.

De OLIVEIRA, S. Q.; DAL PIZZOL, F.; GOSMANN G.; GUILLAUME, D.; MOREIRA J.C.F.; SCHENKEL, E. P. **Antioxidant activity of *Baccharis articulata*. Isolation of its active constituent.** Free Radical Research. V. 37, n. 5, p. 555-559, 2003.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROMERO, A.R., SAAVEDRA, G., MURCIA, A.; JIMÉNEZ, A.M. E CODINA, C. **Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity.** Life Sciences v. 73, p. 1667–1681, 2003.

PEREIRA, R.J. & CARDOSO, M.G. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes.** Journal of Biotchnology and Biodiversity. v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PIRES, J.; TORRES, P.B.; SANTOS, D.YA.C. E CHOW, F. **Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas.** Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. ISBN 978-85-85658-71-7, p. 1-6, 2017.

ROCHA, W.S.; LOPES, R.M.; SILVA, D.B.; VIEIRA, R.F.; SILVA, P. e COSTA, T.S.A. **COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E TANINOS CONDENSADOS EM FRUTAS NATIVAS DO CERRADO.** Rev. Bras. Frutic., v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

RODRIGUEZ, J.A. & HAUN, M. **“Cytotoxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on V79 cells and rat hepatocytes”.** Planta Med., v.65, p. 522-526, 1999.

SCHIMITZ, W., SAITO, A.Y., ESTEVÃO, D. E SARIDAKIS, H.O. **O chá verde e suas ações como quimioprotetor.** Revista Brasileira de Farmacognosia. v. 17, n. 4, p. 572-577, 2007.

SFORCIN, J.M. **Propolis and the immune system: a review.** *Journal of Ethnopharmacology*. v.113, p. 1–14, 2007.

SFORCIN, J.M., SOUSA, J.P.B., FILHO, A.A.S., BASTOS, J.K., BÚFALO, M.C., e TONUCCI, L.R.S. **Baccharis dracunculifolia: Uma das principais fontes vegetais da Própolis brasileira.** UNESP, Rio de Janeiro, 103 p. 2012.

SKERGET, M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; HRAS, A.R., SIMONIC, M. e KNEZ, Z. **Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities.** *Food Chemistry*. v. 89, n. 2, p. 191-198. 2005.

SOARES, S. E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes.** *Ver. Nutr.* v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. **In Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity;** Hostettmann, K., Ed.; Academic Press: London, UK; V. 6, pp. 71–133. 1990.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Plant Physiology.** 3. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 690p., 2006.

TAMAYOSE, C.I. **Determinação da Atividade Antirradicalar e da Constituição Química de Infusões de Chás.** Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 72. 2014.

VASCONCELOS, T.B.; CARDOSO, A.R.N.R.; JOSINO, J.B.; MACENA, R.H.M. e BASTOS, V.P.D. **Radicais livres e Antioxidantes: Proteção ou perigo?** UNOPAR (Científica Ciências Biológicas e da Saúde), Paraná, v. 16, n.3, p. 213-219, 2007.

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

VIANA, A.R., MONTEIRO, F.L., ISAIA, H.A., STEFANON, E.B.C., GARCIA, L.F.M. E SIGRILLO, M.R. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E CITOTÓXICA DO EXTRATO AQUOSO DE *CONYZA BONARIENSIS* (L.) CRONQUIST.** *Revista Contexto & Saúde.* v. 10, n. 20, p. 747-752, 2011.

Resumo (GERAL)

Baccharis é um dos gêneros mais expressivos em Asteraceae, com 360 espécies registradas nas Américas, especialmente na América do Sul. No Brasil são 115 espécies endêmicas, cuja popularidade é difundida na medicina popular em decorrência de espécies medicinais conhecidas como carquejas, e empregadas centenariamente por seus efeitos hepatoprotetor, em desordens renais, no tratamento da diabetes, entre outros. Essas propriedades são decorrentes da elevada diversidade química do gênero, com destaque aos terpenos e compostos fenólicos. O objetivo do trabalho foi caracterizar as substâncias fenólicas presentes nas partes aéreas de *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. e determinar as atividades antirradicalar e citotóxica dos componentes, assim como contribuir na elucidação da constituição química em plantas dioicas, característica marcante do gênero estudado. Após obtenção dos extratos e fases de partição de *B. oblongifolia*, quinze substâncias foram identificadas através dos espectros de RMN ¹H, RMN ¹³C e técnicas bidimensionais, ou por comparação com padrões comerciais e/ou previamente isolados pelo grupo de pesquisa. Entre os componentes foram identificados dez derivados do ácido clorogênico, os ácidos 5-cafeoilquínico, 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, 4,5-dicafeoilquínico e 3,4,5-tricafeoilquínico, e seus respectivos ésteres metílicos, o ácido cafeico, e quatro flavonoides, rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo), nicotiflorina (caempferol-3-O-rutinosídeo), quercetina-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo e caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo. Os dois últimos flavonoides são substâncias inéditas em literatura. As atividades antirradicalar e citotóxica foram avaliadas para todos os extratos, fases de partição e substâncias isoladas obtendo-se resultados promissores para os ensaios antirradicalares. Não houve variação qualitativa entre os metabólitos produzidos nos indivíduos dioicos de *B. oblongifolia*.

Palavras-chave: *Baccharis oblongifolia*, Compositae, ácidos clorogênicos, flavonoides, atividade antirradicalar, atividade citotóxica.

Abstract

Baccharis is one of the most expressive genera in Asteraceae, with 360 species found in the Americas, especially in South America. In Brazil there are 115 endemic species, whose popularity is widespread in folk medicine due to medicinal species known as “carquejas”. For centuries these plants have been used for their hepatoprotective effects, in renal disorders, in the treatment of diabetes, among others. These properties are due to the high chemical diversity found in the genus, with emphasis on terpenoids and phenolic compounds. The objectives of this work were: 1. to characterize the phenolic compounds produced by aerial parts of *Baccharis oblongifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.; 2. to determine the antiradical and cytotoxic activities of the components; 3. to contribute to elucidation of the chemical constitution in dioecious plants, a remarkable characteristic of the genus. After obtaining extracts and partitioning phases from *B. oblongifolia*, fifteen compounds were identified through ¹H NMR, ¹³C NMR and two-dimensional spectra, or by comparison with commercial standards and/or previously isolated compounds by our research group. Among the components, were identified ten chlorogenic acid derivatives, 5-caffeoylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, 4,5-dicaffeoylquinic acid and 3,4,5-tricaffeoylquinic acid, and their respective methyl esters, caffeic acid, and four flavonoids, rutin (quercetin-3-O-rutinoside), nicotiflorin (kaempferol-3-O-glucoside), quercetin-3-O-β-[2''-(*E*)-caffeoyl]-rutinoside and kaempferol-3-O-β-[2''-O-(*E*)-caffeoyl]-rutinoside. The last two flavonoids are new compounds. The antiradical and cytotoxic activities were evaluated for extracts, partition phases and isolated compounds. Promising results were obtained for the antiradical assays. There was no qualitative variation between the metabolites produced in the dioecious individuals of *B. oblongifolia*.

Keywords: *Baccharis oblongifolia*, Compositae, chlorogenic acids, flavonoids, antiradical activity, cytotoxicity.

Discussão Geral e Conclusões

O gênero *Baccharis*, apesar de serem consideradas invasoras em terrenos de pastagem são indiscutivelmente importantes sob o ponto de vista sócio econômico e amplamente difundida na medicina popular.

O presente trabalho compõe um mosaico de vários trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa do IB-USP, do Departamento de botânica, o qual abordam estudos fitoquímicos e biológicos a respeito do gênero *Baccharis*, dessa maneira, o presente estudo com a espécie contribuiu ao conjunto de pesquisas.

Após uma análise cromatográfica, de folhas e folhas de *Baccharis oblongifolia*, verificamos a fase em acetato de etila da folha como a eleita para conduzir os trabalhos, pois apresentou similaridade em relação aos componentes químicos observados nas demais fases (diclorometano, n-butanol e hidroalcoólica).

O emprego de cromatografia em Sephadex LH-20 e eluente metanol, permitiu a separação em sete grupos nomeados: BOB-Ac1, BOB-Ac2, BOB-Ac3, BOB-Ac4, BOB-A5, BOB-Ac6 e BOB-Ac7. Cada grupo foi submetido ao CLAE-UV-DAD semi-preparativo e dessa maneira isolados os picos de interesse, permitindo assim, a identificação de oito substâncias das quinze detectadas no cromatograma da fase em acetato de etila.

Uma análise posterior dessa fase permitiu a identificação de 15 substâncias, das quais oito delas foram identificadas utilizando comparação com padrões comerciais ou previamente identificados pelo grupo de pesquisas utilizando RMN, as demais identificadas por RMN ¹H e RMN ¹³C, identificando dois flavonóis inéditos em literatura e pioneiramente para o gênero *Baccharis*, a quercetina-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo nomeada como oblongifoliosídeo A e caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo nomeado como oblongifoliosídeo B; ambos flavonoides acilados indicando possível sinapomorfias para a seção *Oblongifoliae*.

Ao compararmos o perfil cromatográfico entre indivíduos dióicos da espécie *Baccharis oblongifolia* notamos uma intensa similaridade quantitativa entre os componentes produzidos, análises qualitativas necessitam ser tratadas.

Para os ensaios biológicos, atividades antirradicalares foram identificadas dentre os compostos contendo alto teor de derivados de ácido cafeico, como no caso da fase de partição em acetato de etila, originado a partir o extrato bruto metanólico, observados nos grupos BOB Ac3, Ac4 e AC5 e confirmando as atividades com as substâncias isoladas, com grande atividade antirradicalar em comparação ao padrão Trolox® dos compostos: ácido 4,5-dicafeoilquínico ($45,45 \pm 3,11\%$), o éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico $54,54 \pm 3,14\%$, éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico $56,06 \pm 3,15\%$, ácido 3,5-dicafeoilquínico ($637,72 \pm 49,14$), éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico ($183,34 \pm 10,84$) e éster metílico do ácido 3,4-dicafeoilquínico ($81,48 \pm 5,85$).

Extratos, fases de partição e substâncias isoladas testadas, de *Baccharis oblongifolia*, não resultaram em potenciais agentes citotóxicos.

Referências Bibliográficas

Asteraceae in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB55>. Acesso em: 18 jul. 2018.

BERRY, P.E. **Plant Order Asterales**. Encyclopædia Britannica, inc., disponível em: <https://www.britannica.com/plant/Asterales>. Publicado em 21 jun. 2013. Acesso em 15 jul. 2018.

BOHM, B.A. & STUESSY, T. S. **Flavonoids of the Sunflower Family (Asteraceae)**. SpringerWien, Austria, 831 p. 2001.

BORGES, R.A.X.; FORZA, R.C. **A tribo Astereae (Asteraceae) no Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil**. Bol. Bot. Univ. São Paulo, 26: 131-154. 2008.

CANCELLI, R.R.; EVALDT, A.C.P.; BAUERMANN, G. **Contribuição à morfologia Polínica da Família Asteraceae Martinov**. No Rio Grande do Sul – Parte I. Pesquisas botânicas. N. 28, p. 347-374. 2007.

CALABRIA, L. M.; EMERENCIANO, V.P.; FERREIRA, M.J.P.; SCOTTI, M.T. e MABRY T.J. **A Phylogenetic Analysis of Tribes of the Asteraceae Based on Phytochemical Data**. Natural product communications. 2. 277-285. 2007.

DEMPEWOLF, H, L. RIESEBERG, H. e CRONK, Q.C. **Crop domestication in the Compositae: a family-wide trait assessment**. Genet. Resour. Crop Evol. (in press). 2008.

FUNK, V.A.; SUSANNA, A.; STUESSY, T.F.; BAYER, R.J. **Systematics, Evolution and Biogeography of Asteraceae**. IAPT, Vienna, Austria, 965 p. 2009.

GBIF, **Global Biodiversity Information Facility**. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/3065>. Acesso em 22 jul. 2018.

GILBERT, B.; ALVES, L.F. e FAVORETO, R. **Bidens pilosa L. Asteraceae** (Compositae; subfamília Heliantheae). Revista Fitos. V. 8, N. 1. P. 1-72, 2013.

HATTORI, E.K.O.; NAKAJIMA, J.N. **A Família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil**. Rodriguésia. 59 (4). p. 687-749. 2008.

JUNIOR VIEGAS, C. e BOLZANI V. S. **Os Produtos naturais e a Química Medicinal Moderna**. Quim. Nova. V. 29, N. 2, p. 326-337, 2006.

LÖBLER, L. **Propagação, Metabolismo secundário e Genotoxicidade de Solidago chilensis MEYEN (ASTERACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Exatas) – Programa de Pós-Graduação em Agrobiologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p. 98. 2013.

MACIEL, M. A. M.; ANJOS G.C.; GOMES, F.E.S.; DANTAS, T.N.C.; PINTO, A.C.; KAISER, C.R.; MIRANDA, A.F. e ECHEVARRIA, A. **Estudo fitoquímico de folhas de *Croton cajucara* Benth e determinação da sua propriedade antioxidante**. Revista Fitos, v. 4, n. 02, p. 71-89, out. 2013.

MINISTERIO DA SAÚDE: **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** – PPNPMF. Disponível em: <<https://www.unasus.gov.br/noticia/uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

PANERO, J. L. & CROZIER, B. S. **Asteraceae. Sunflowers, daisies**. Version 27 January 2012. Disponível em: <http://tolweb.org/Asteraceae/20780/2012.01.27> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>. Acesso em 22 jul. 2018.

PANERO, J.L. & FUNK, V. A. **The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of Asteraceae revealed**. Molecular

Phylogenetics and Evolution v.47. p. 757–782, 2008.

PINTO, A.C., SILVA, D.H.S., BOLZANI, V.S., LOPES, N.P. e EPIFANIO, R.A. **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas**. Quim. Nova. v. 25. Supl. 1, p. 45-61, 2002.

PHILLIPSON, J.D. **50 years of medicinal plants research – every progress in methodology is a progress in science**. Planta Médica 69: 491-495. 2003.

ROQUE, N.; BAUTISTA, H. **ASTERACEAE Caracterização e Morfologia Floral**. Universidade Federal da Bahia. Salvador, p.71. 2008.

ROQUE, N.; FERREIRA, S.C.; BERG, C.V.D. **Lapidia, a new monotypic genus of Asteraceae (Eupatorieae) from Brazil, and its phylogenetic placement**. Phytotaxa 291: 001-016. 2017.

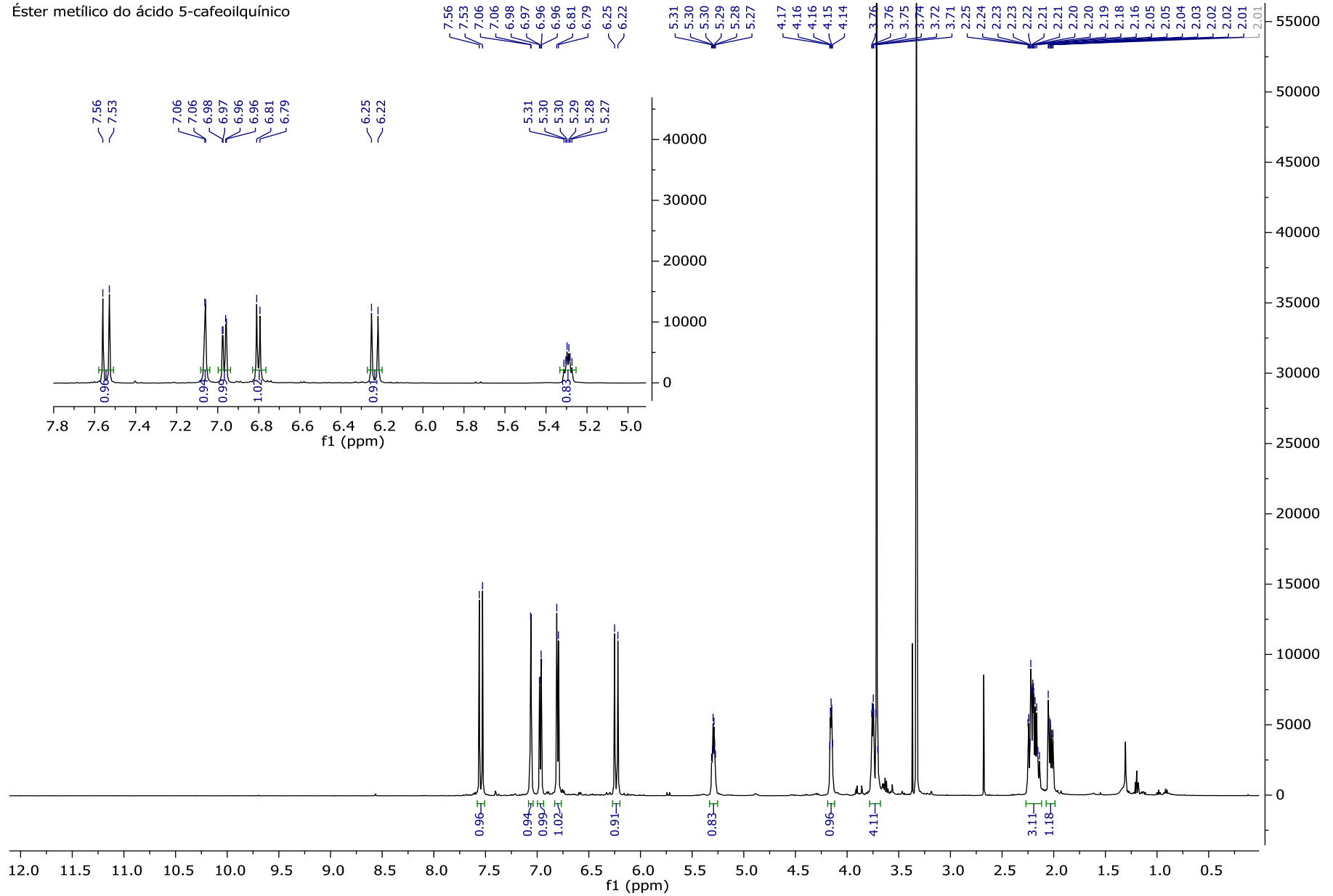
VENABLE, D.L. & LEVIN. D.A. **Morphological dispersal structures in relation to growth habit in the Compositae**. Plant Systematic Evolution 143:1-16. 1983.

WAGNER, G. J. **Secreting glandular trichomes: more than just hairs**. Plant Physiol. 96: 675-679, 1991.

Anexos

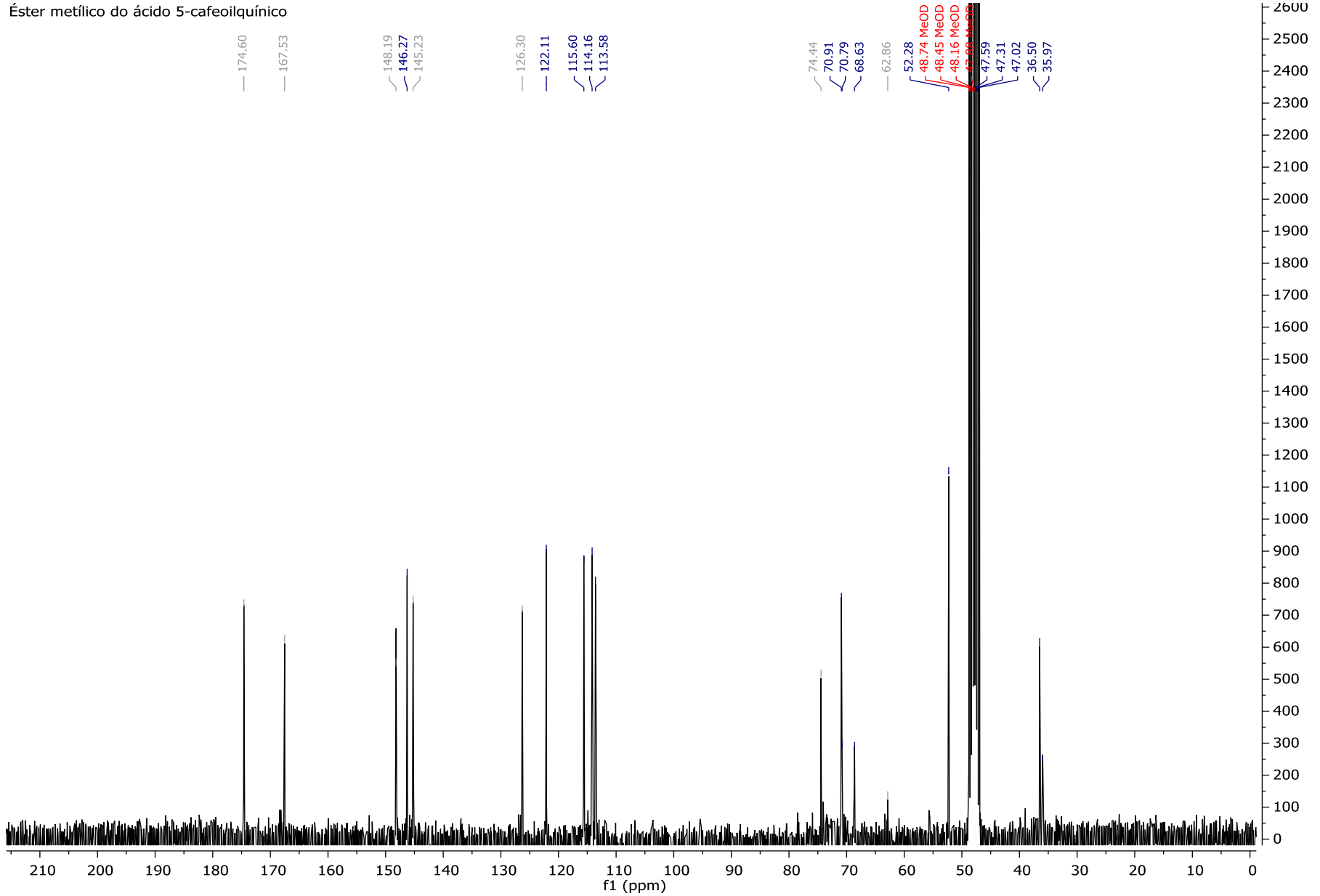
1. Espectros do componente 3: éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico
2. Espectros do componente 9: éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico
3. Espectros do componente 10: quercetina-3-O- β -[2''-O-(*E*)-cafeoil]-rutinosídeo
4. Espectros do componente 11: éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico
5. Espectro do componente 12: caempferol-3-O- β -[2''-O-(*E*)-cafeoil]-rutinosídeo
6. Espectro do componente 13: éster metílico do ácido 3,4-dicafeoilquínico
7. Espectro do componente 14: ácido 3,4,5-tricafeoilquínico

Éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico



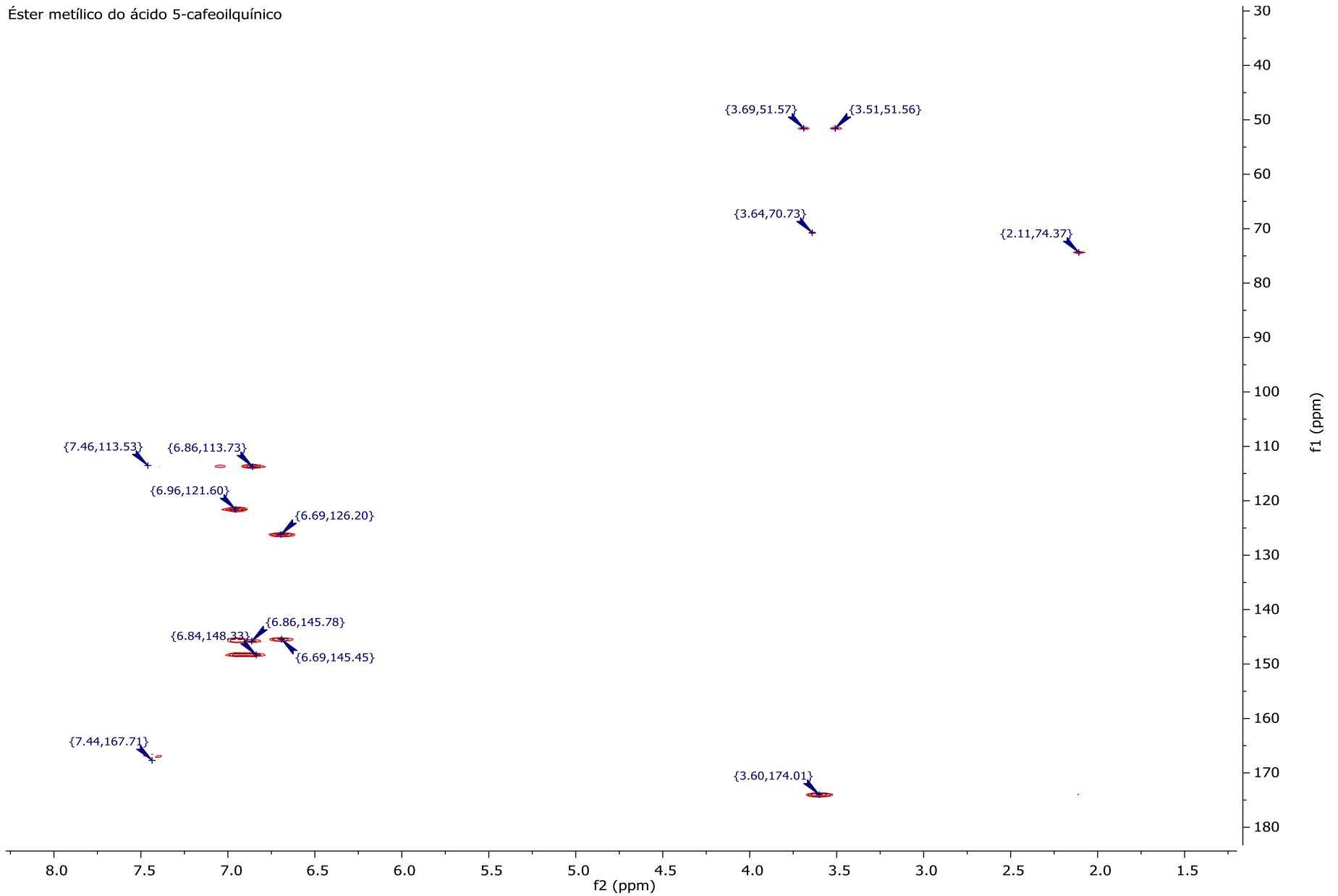
Anexo 1. Espectro de RMN ¹H do componente 3: éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico

Éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico



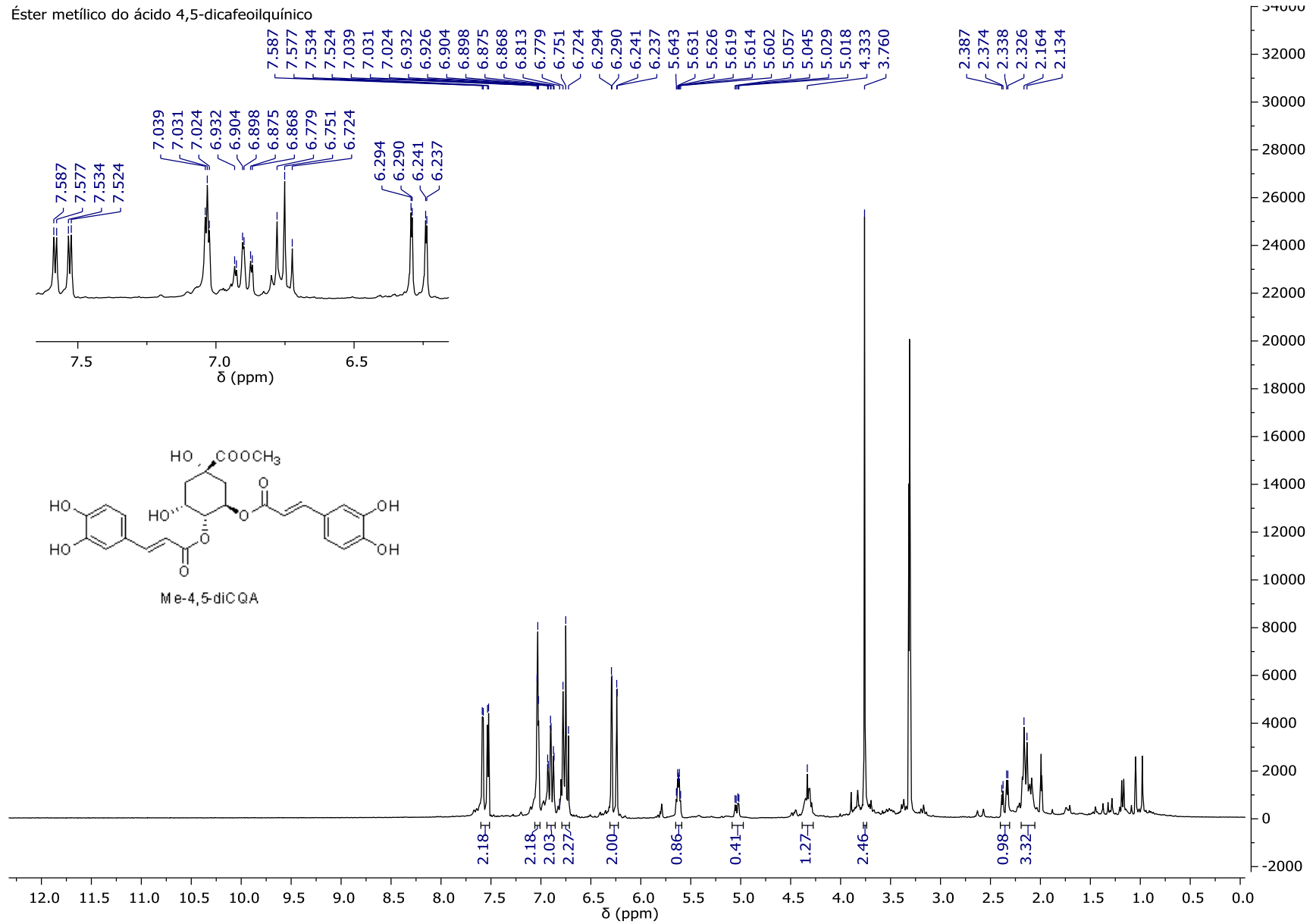
Anexo 1. Espectro de RMN ¹³C do componente 3: éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico

Éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico



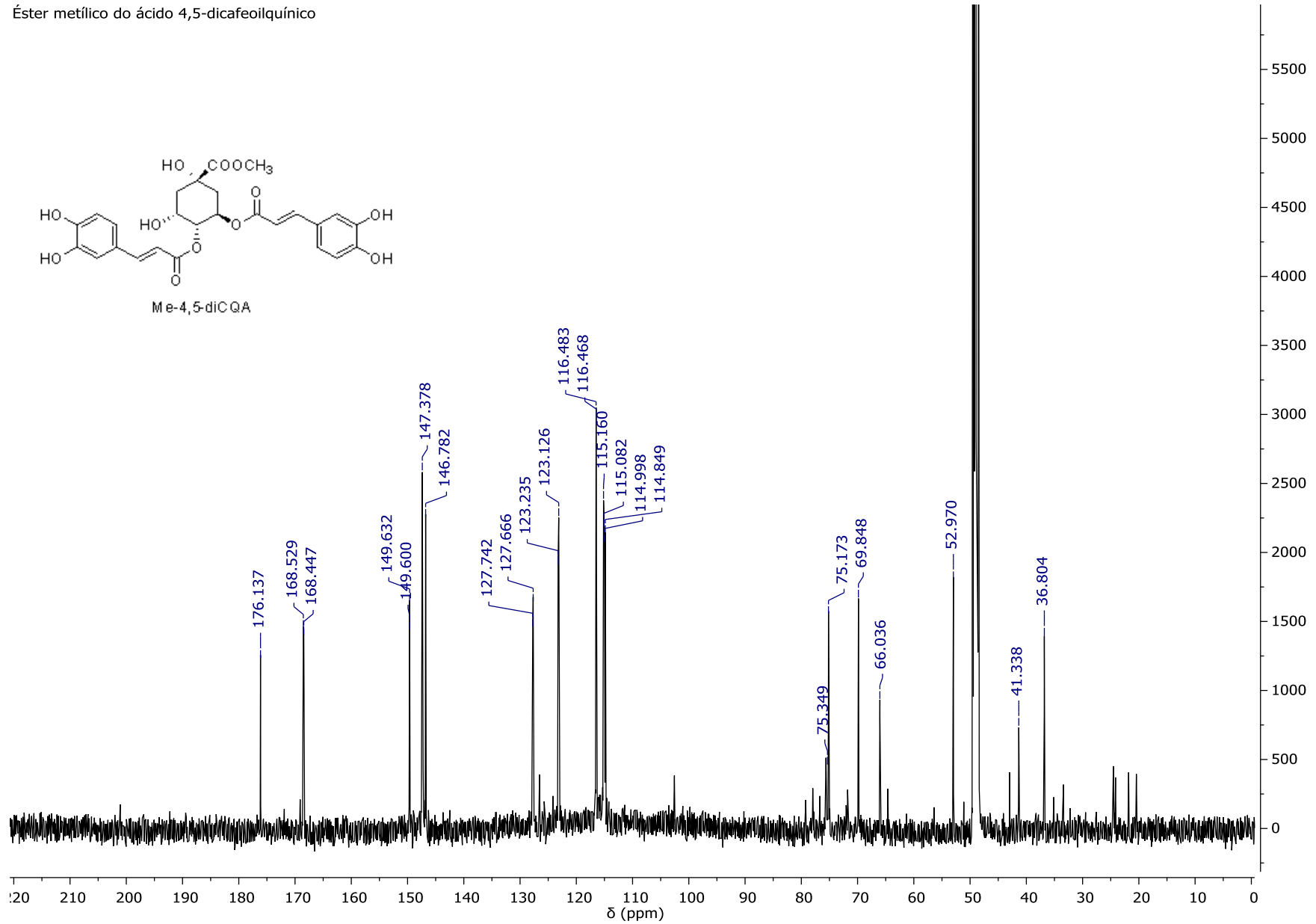
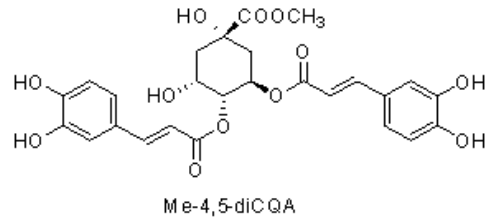
Anexo 1. Espectro bidimensional HMBC do componente 3: éster metílico do ácido 5-cafeoilquínico

Éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico



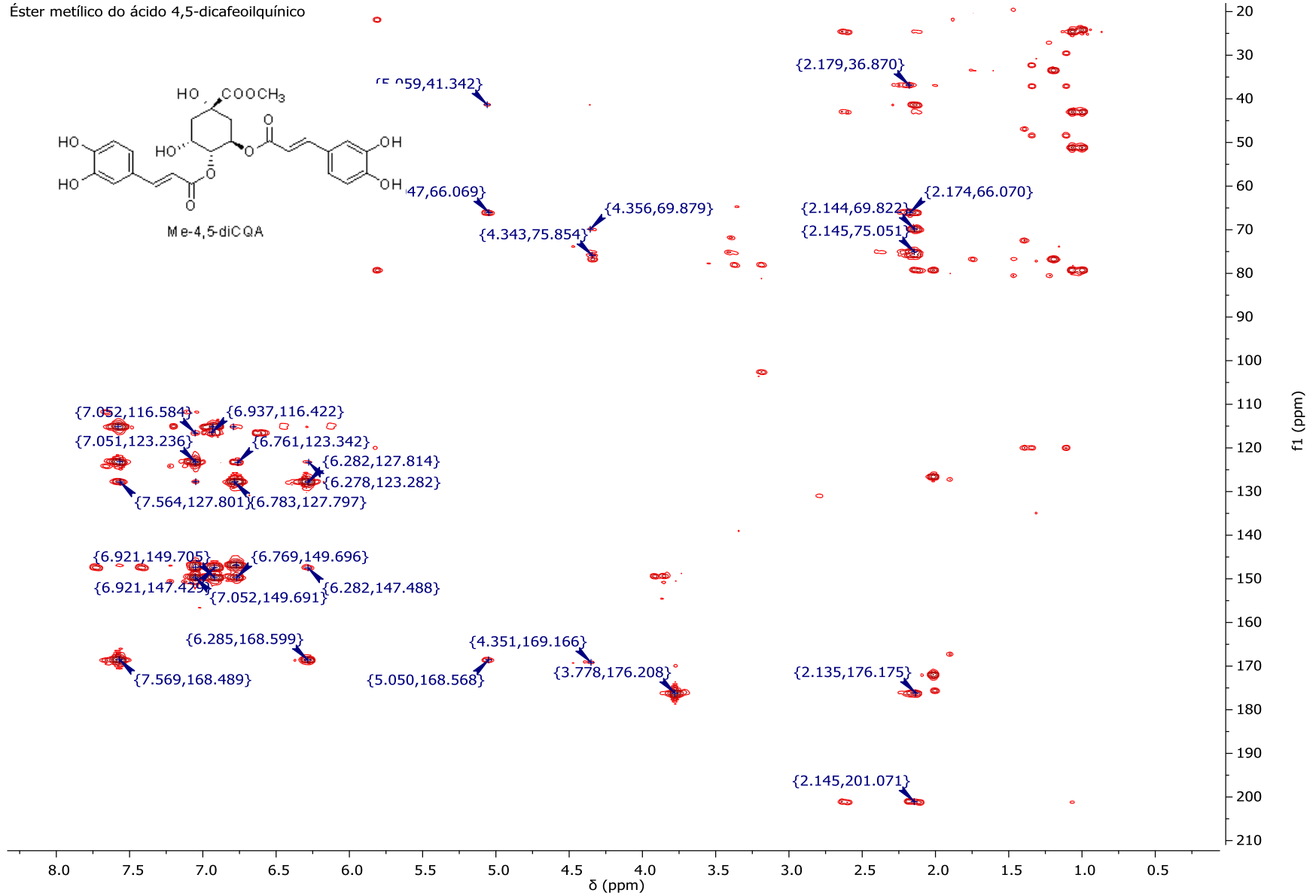
Anexo 2. Espectro de RMN ¹H do componente 9: éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico

Éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico

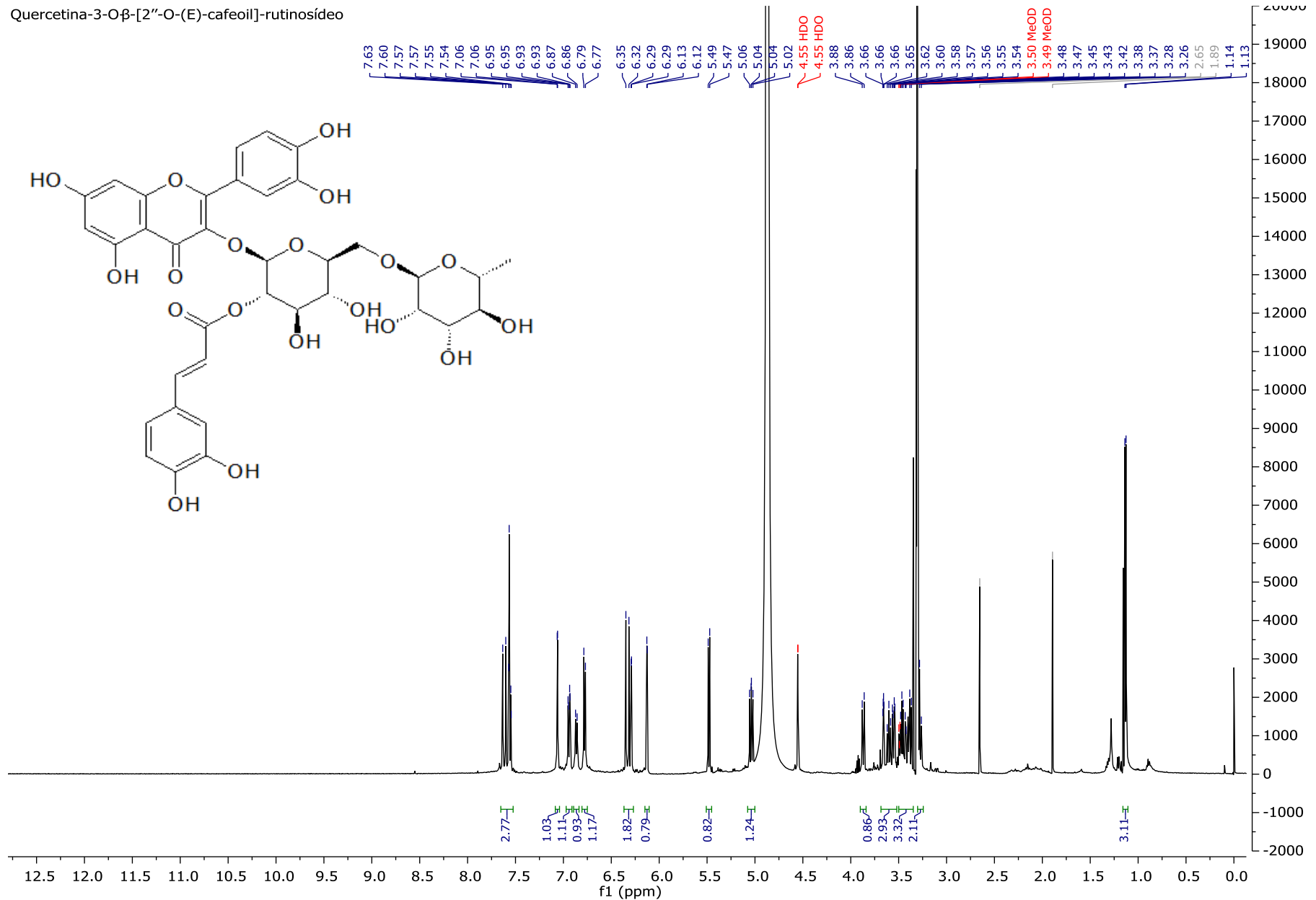


Anexo 2. Espectro de RMN ^{13}C do componente 9: éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico

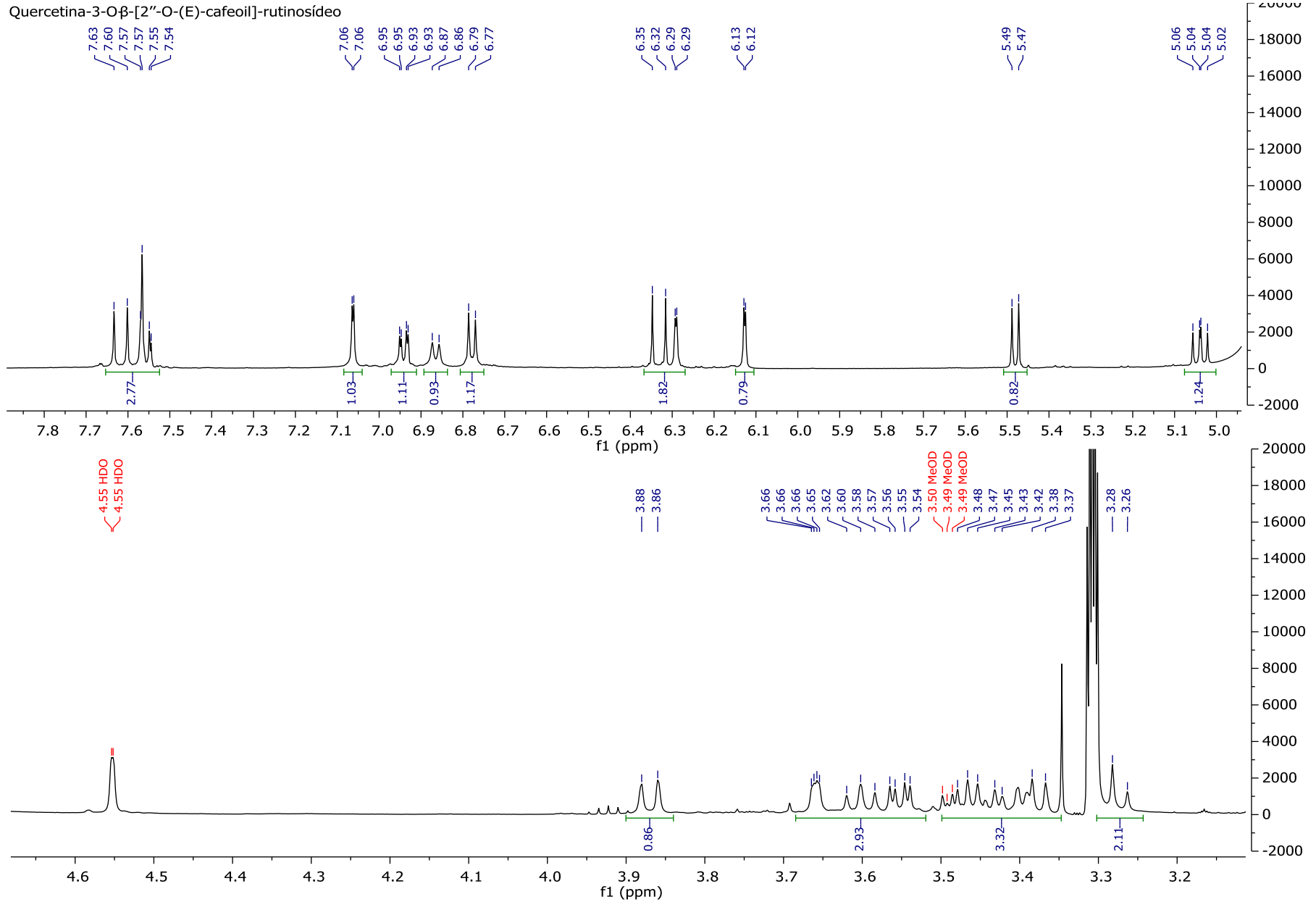
Éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico



Anexo 2. Espectro bidimensional HMBC do componente 9: éster metílico do ácido 4,5-dicafeoilquínico

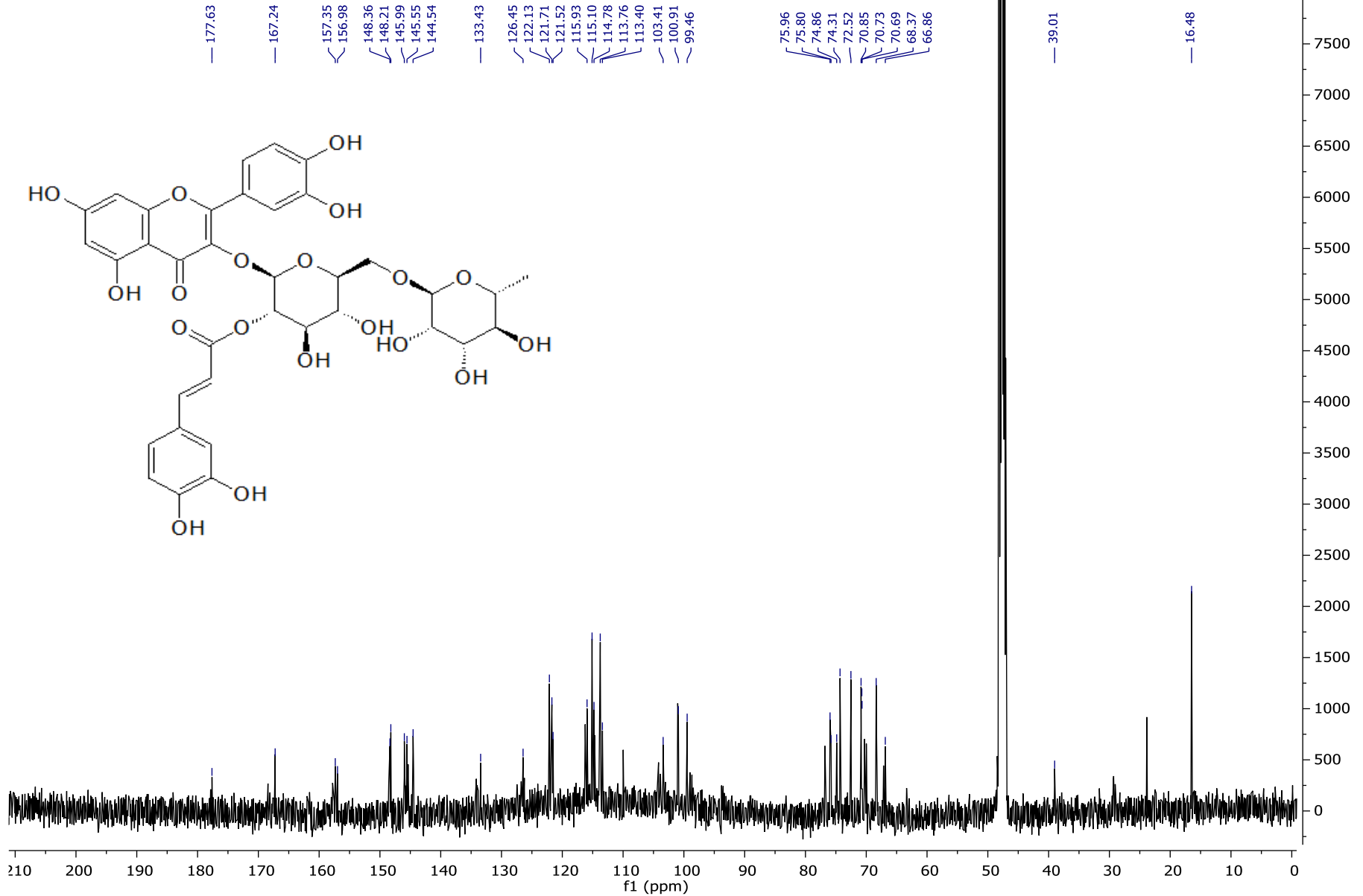


Anexo 3. Espectro de RMN ¹H do componente 10: quercetina-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo



Anexo 3. Ampliações do espectro de RMN ¹H do componente 10: quercetina-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

Quercetina-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo



Anexo 3. Espectro de RMN ¹³C do componente 10: quercetina-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

Quercetina-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo



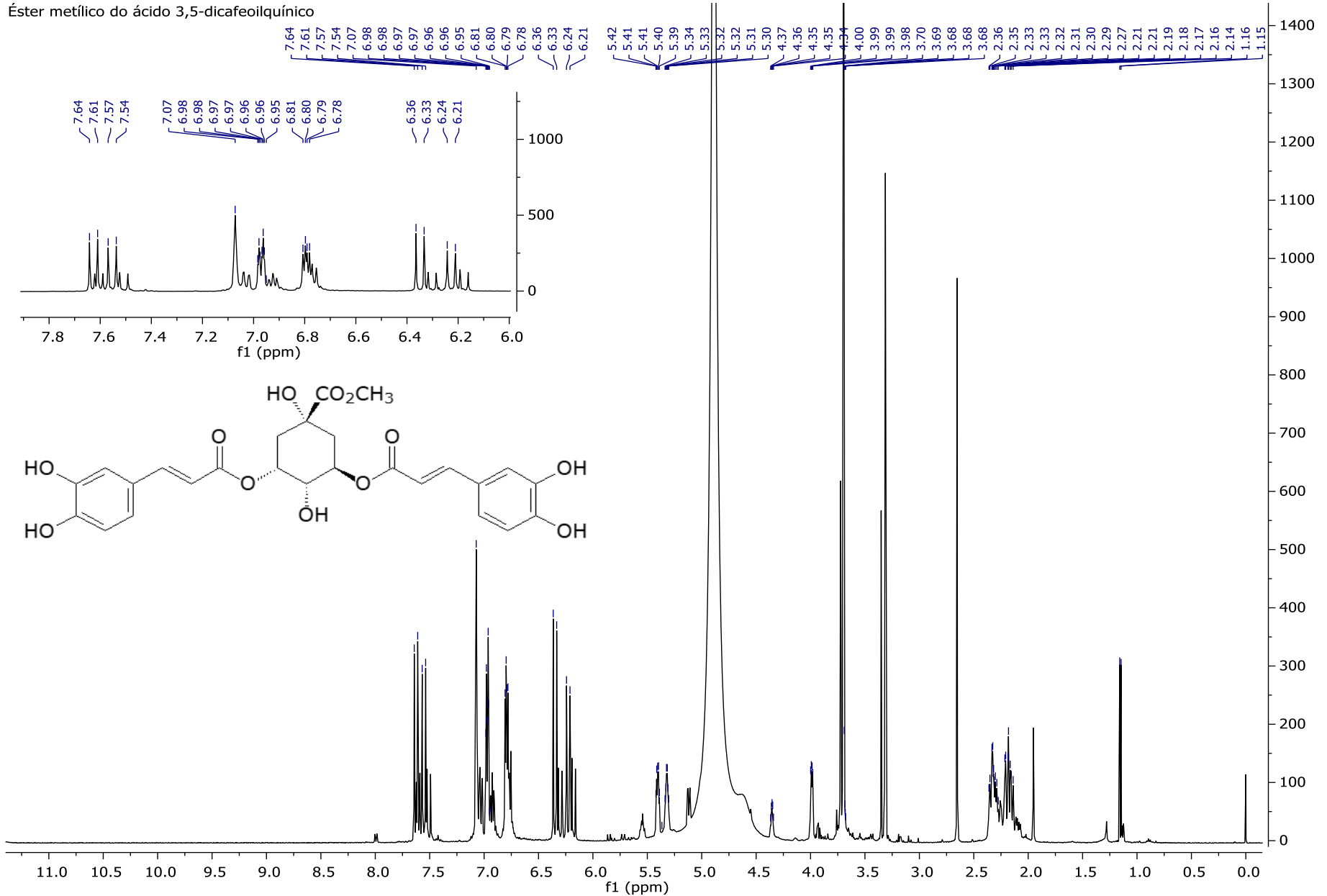
Anexo 3. Espectro bidimensional HSQC do componente 10: quercetina-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

Quercetina-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo



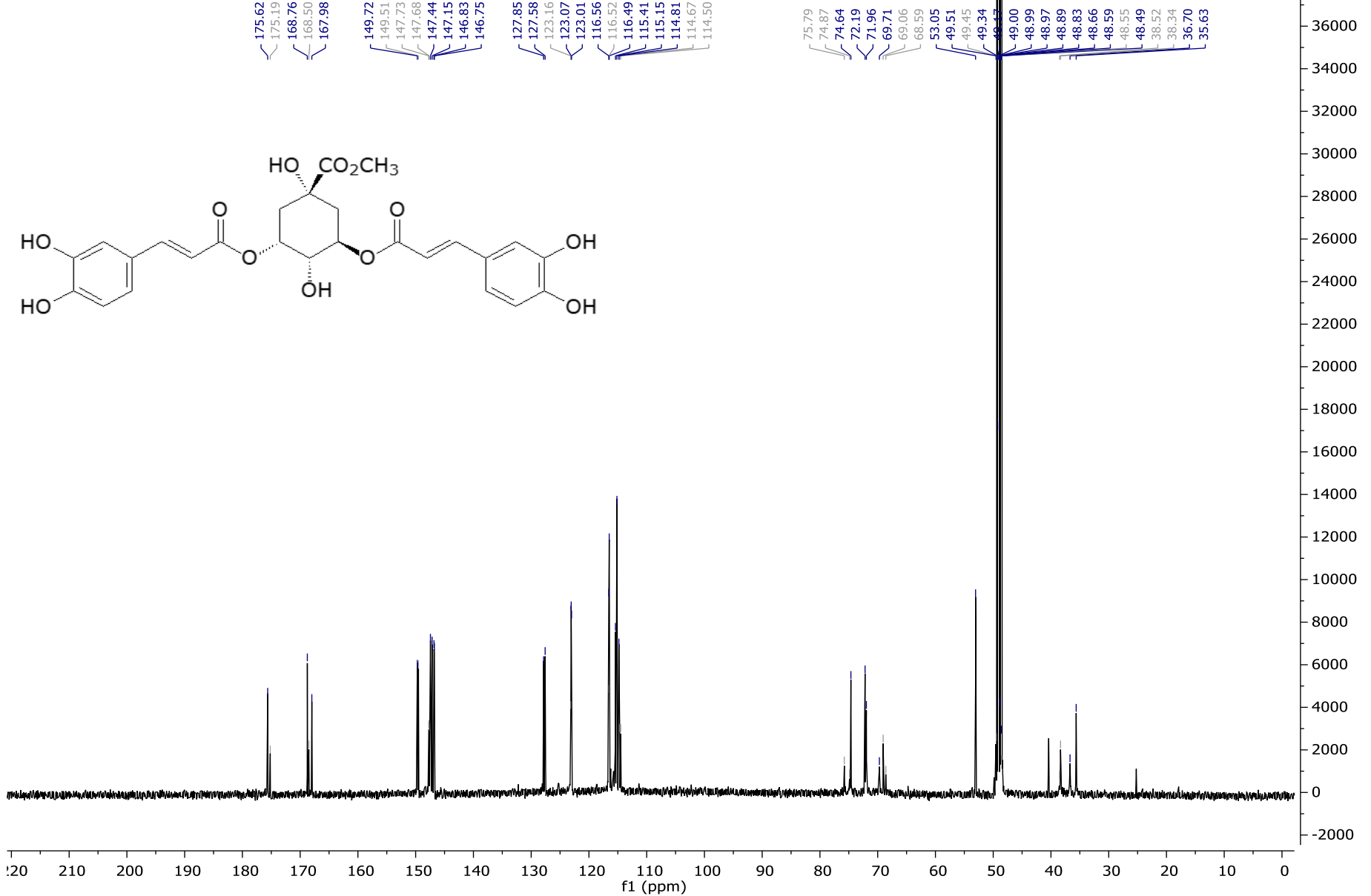
Anexo 3. Espectro bidimensional HMBC do componente 10: quercetina-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

Éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico



Anexo 4. Espectro de RMN ¹H do componente 11: éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico

Éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico



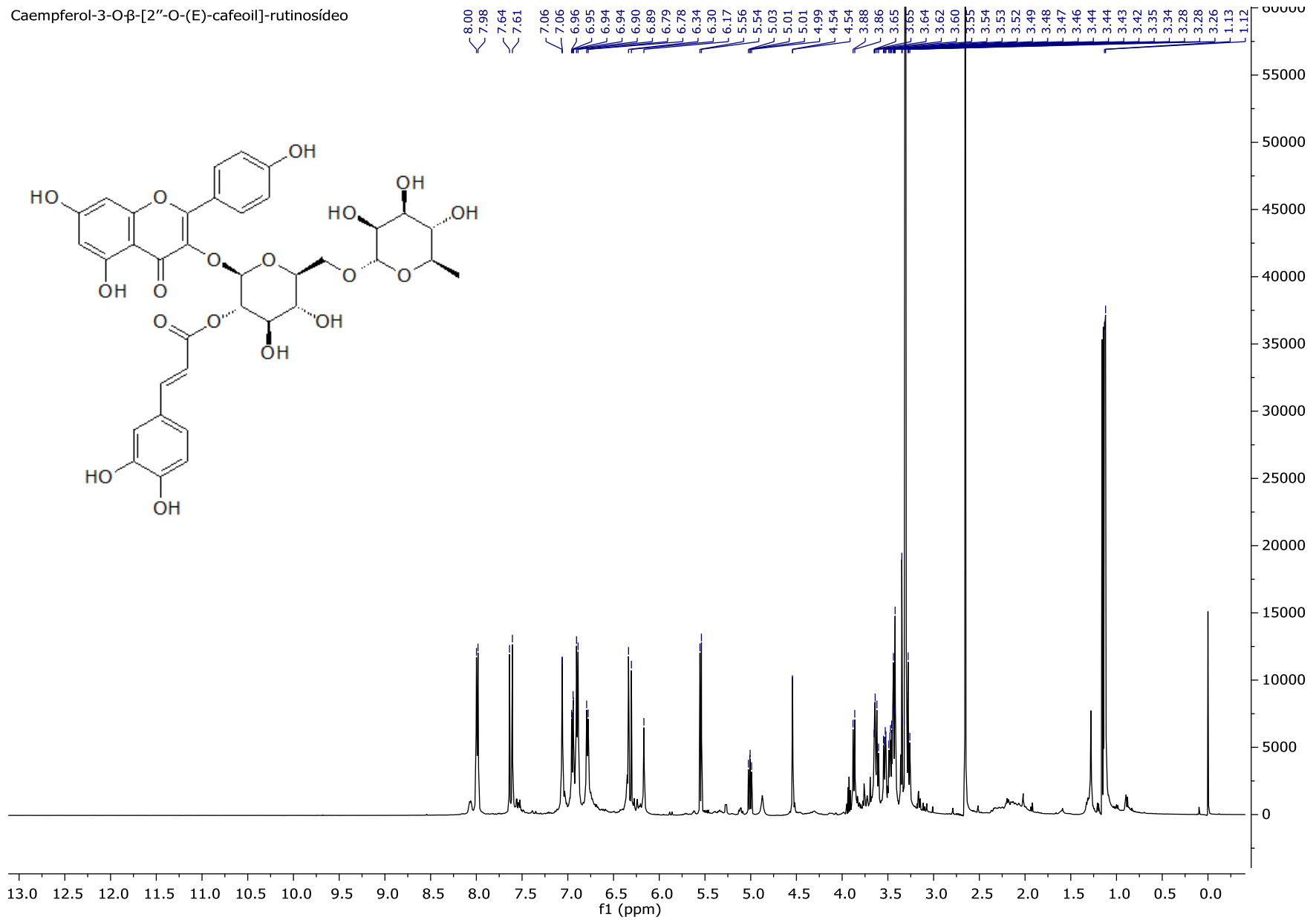
Anexo 4. Espectro de RMN ¹³C do componente 11: éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico

Éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico



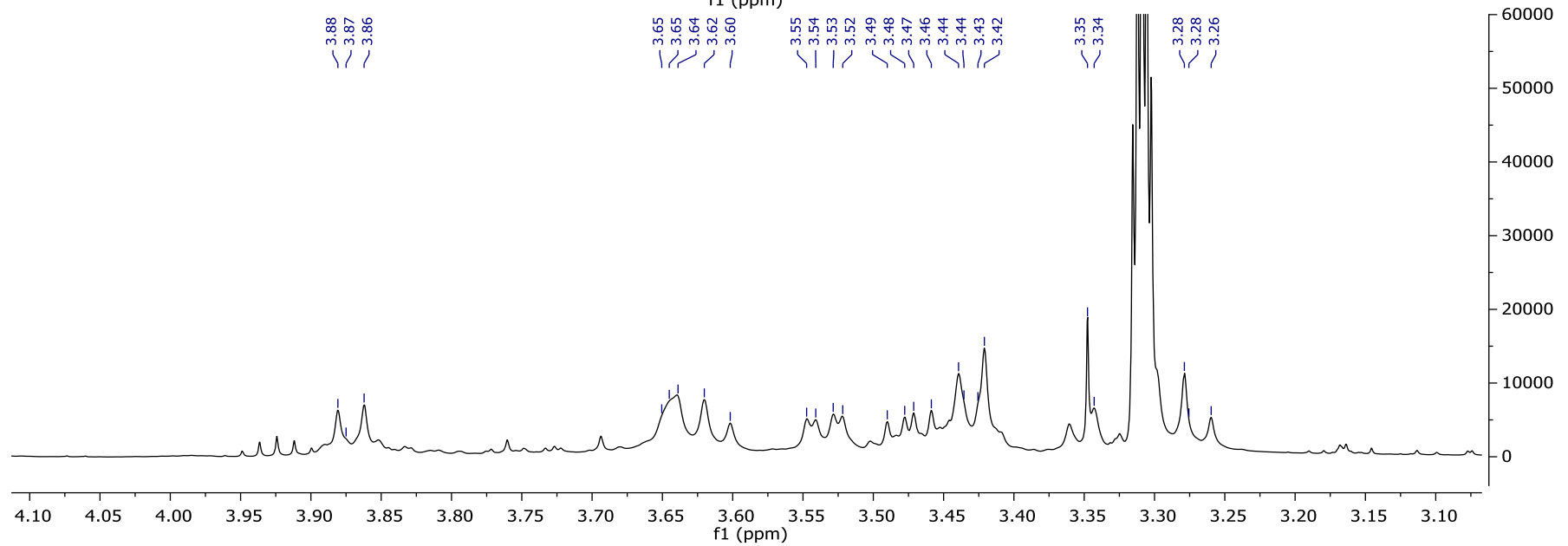
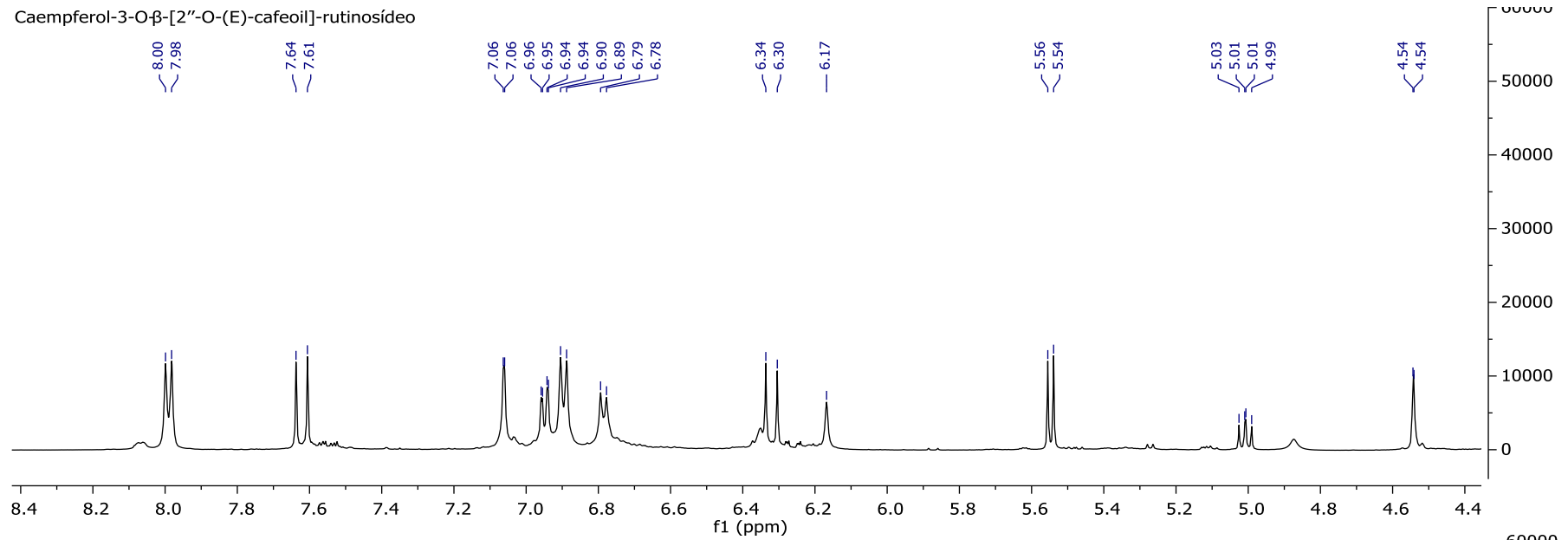
Anexo 4. Espectro bidimensional HMBC do componente 11: éster metílico do ácido 3,5-dicafeoilquínico

Caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

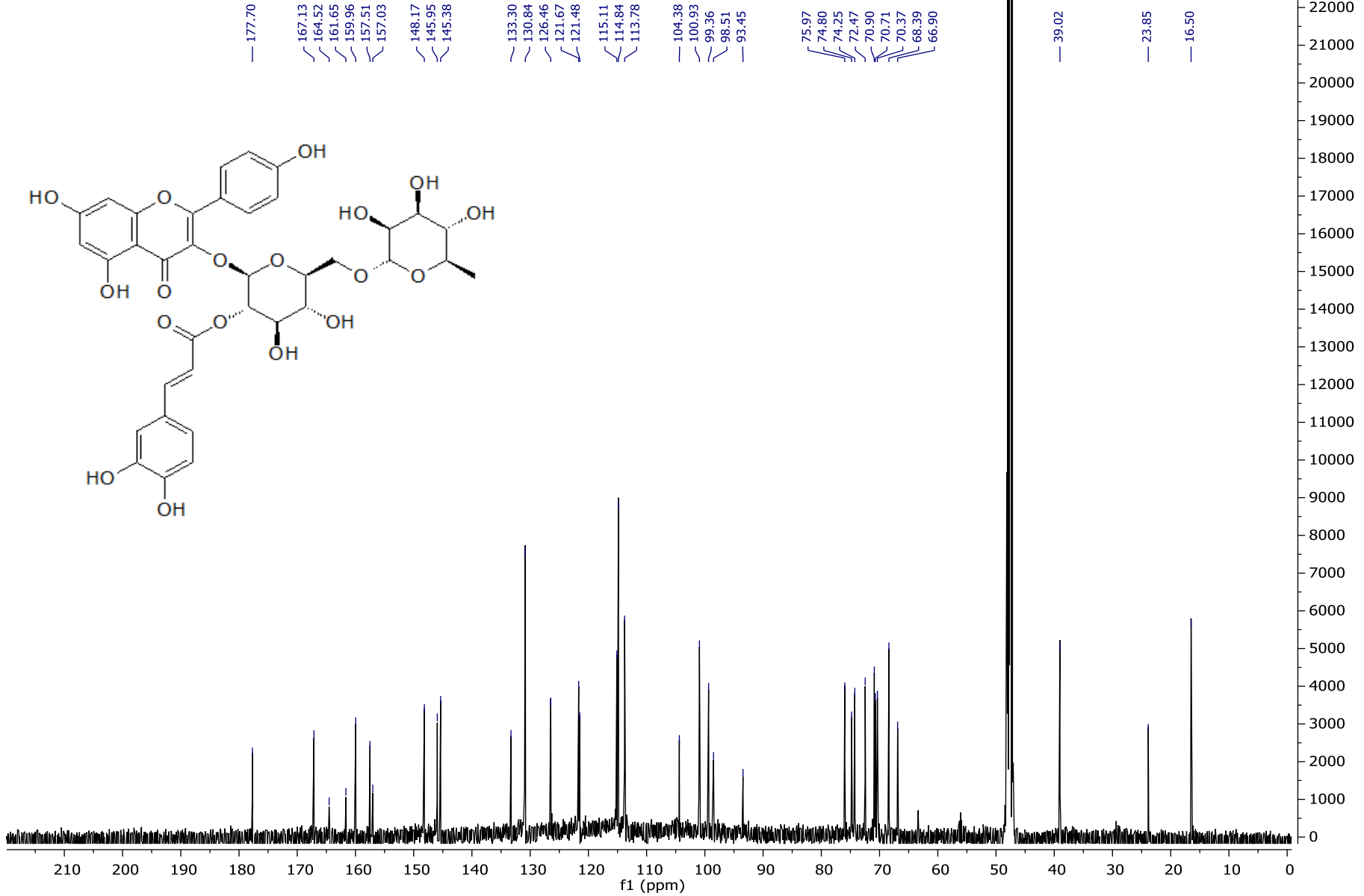


Anexo 5. Espectro de RMN ¹H do componente 12: caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

Caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

Anexo 5. Expansões do espectro de RMN ¹H do componente 12: caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

Caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo



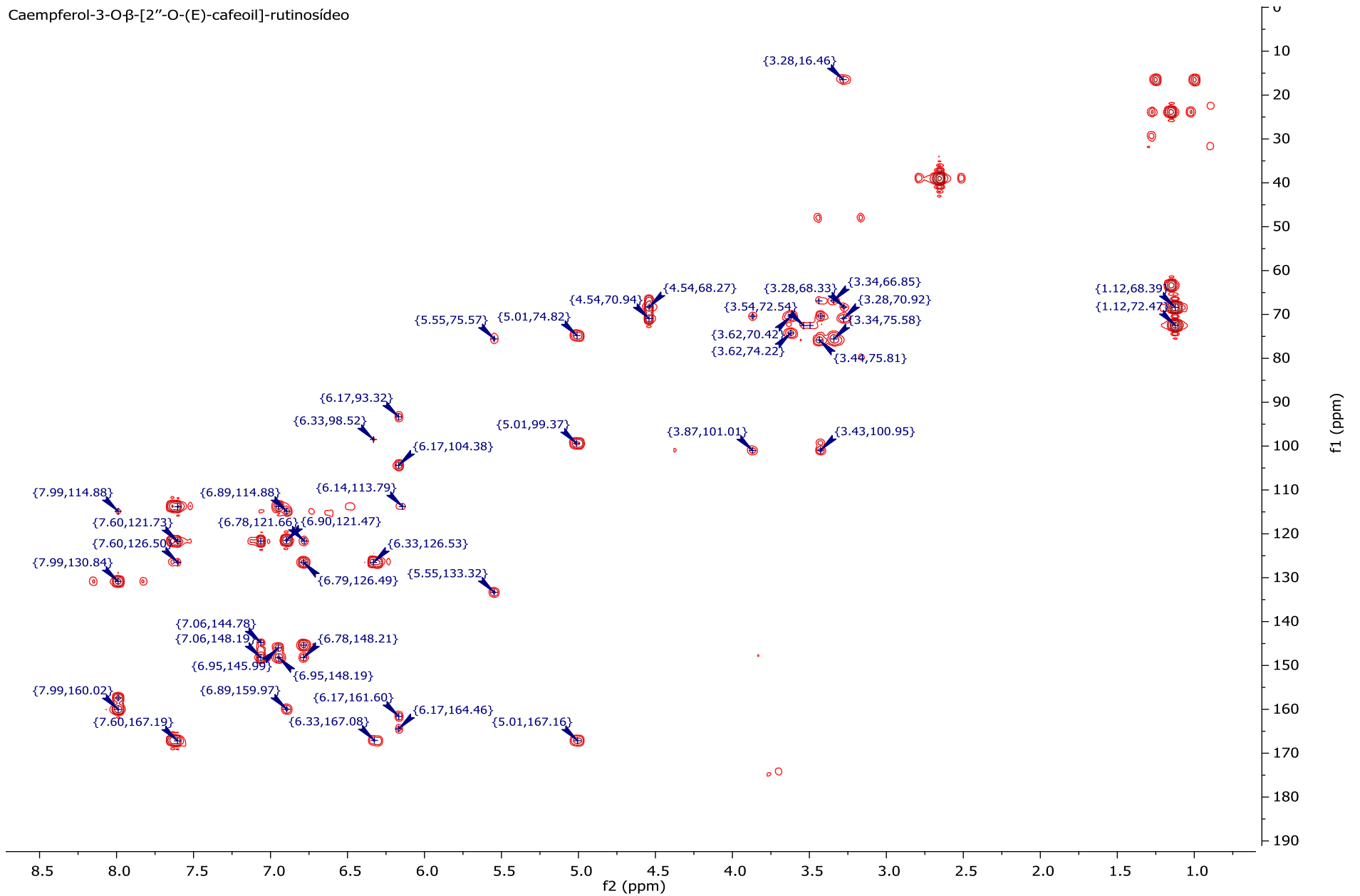
Anexo 5. Espectro de RMN ¹³C do componente 12: caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

Caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo



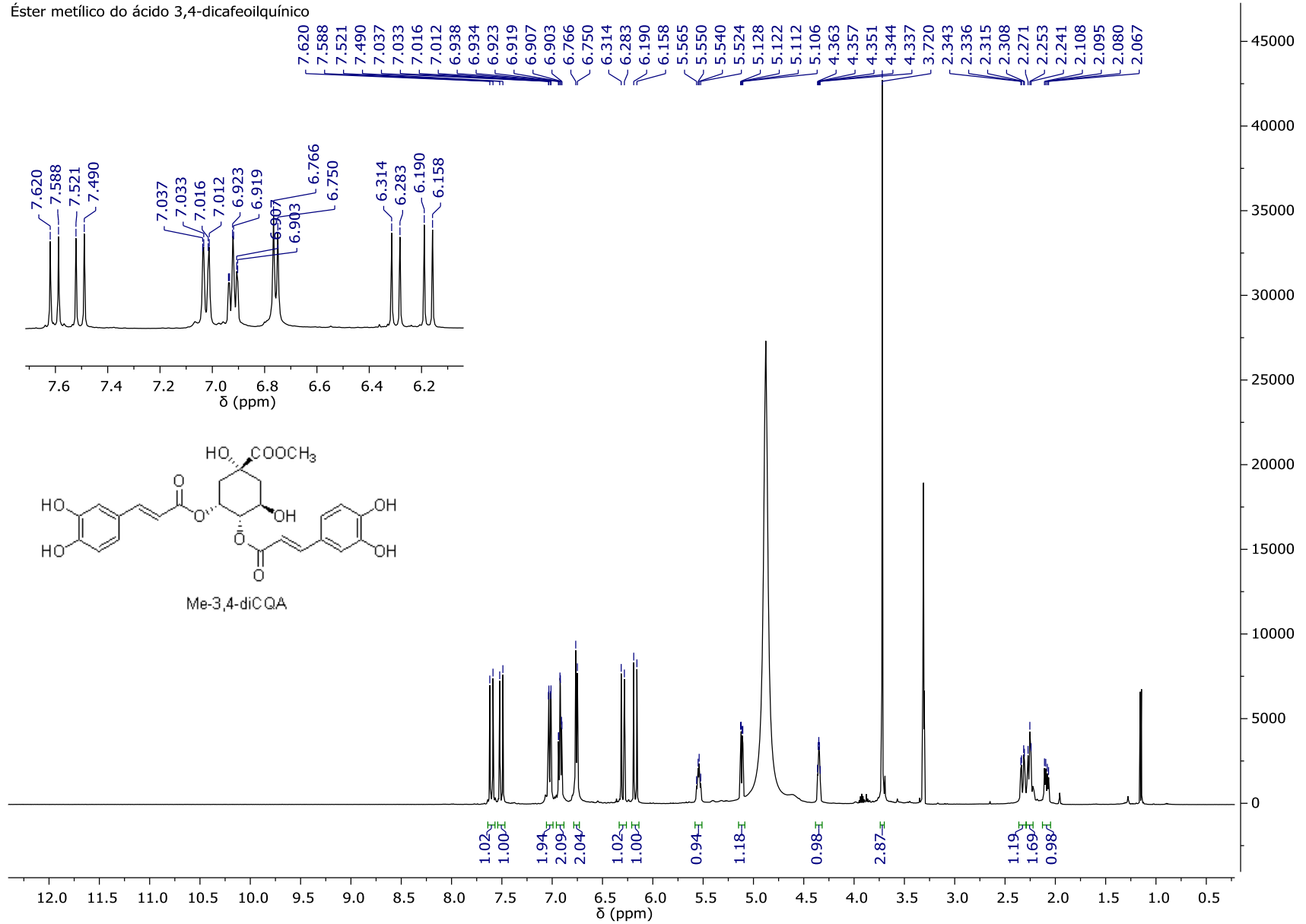
Anexo 5. Espectro bidimensional HSQC do componente 12: caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

Caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

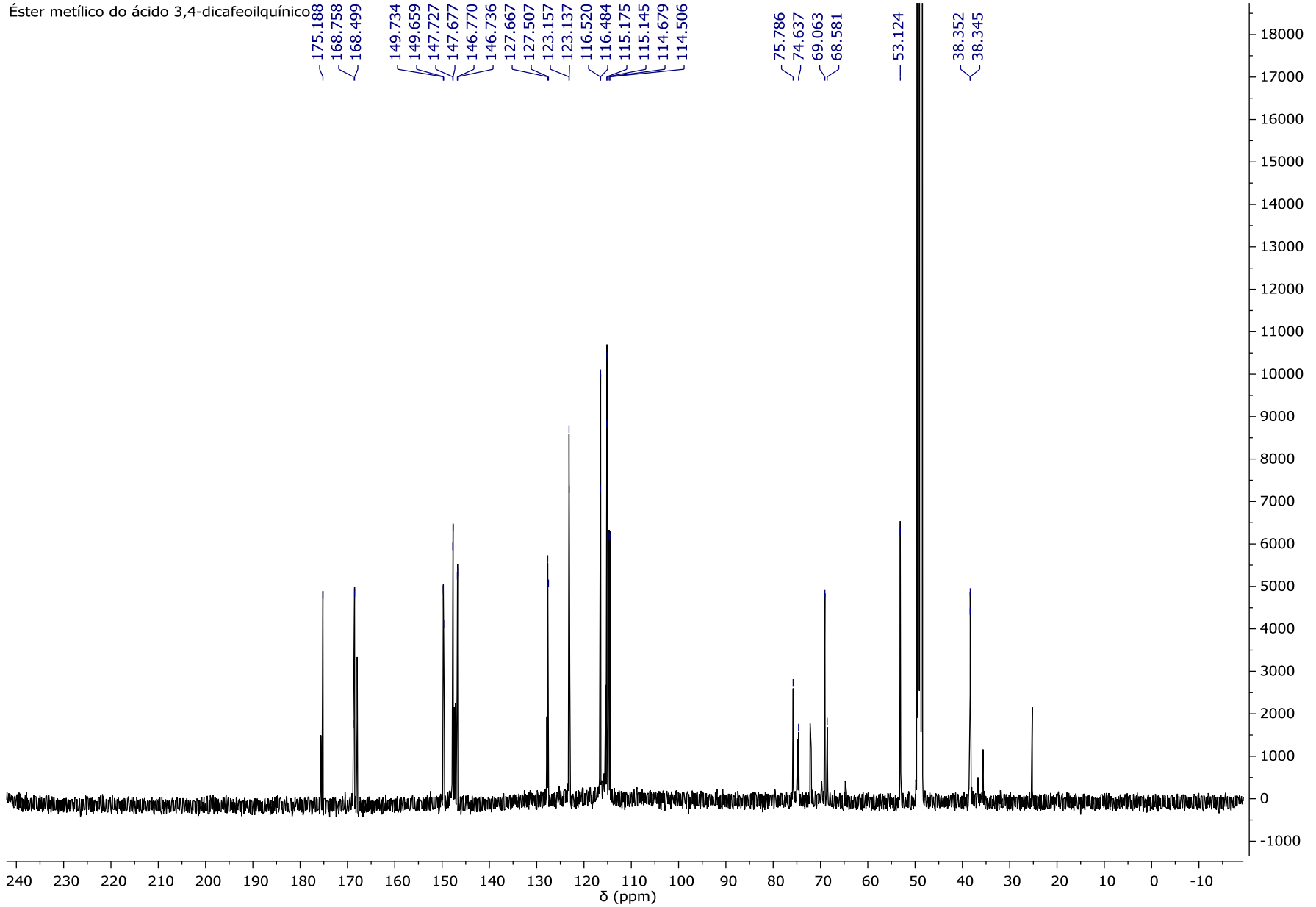


Anexo 5. Espectro bidimensional HMBC do componente 12: caempferol-3-O-β-[2''-O-(E)-cafeoil]-rutinosídeo

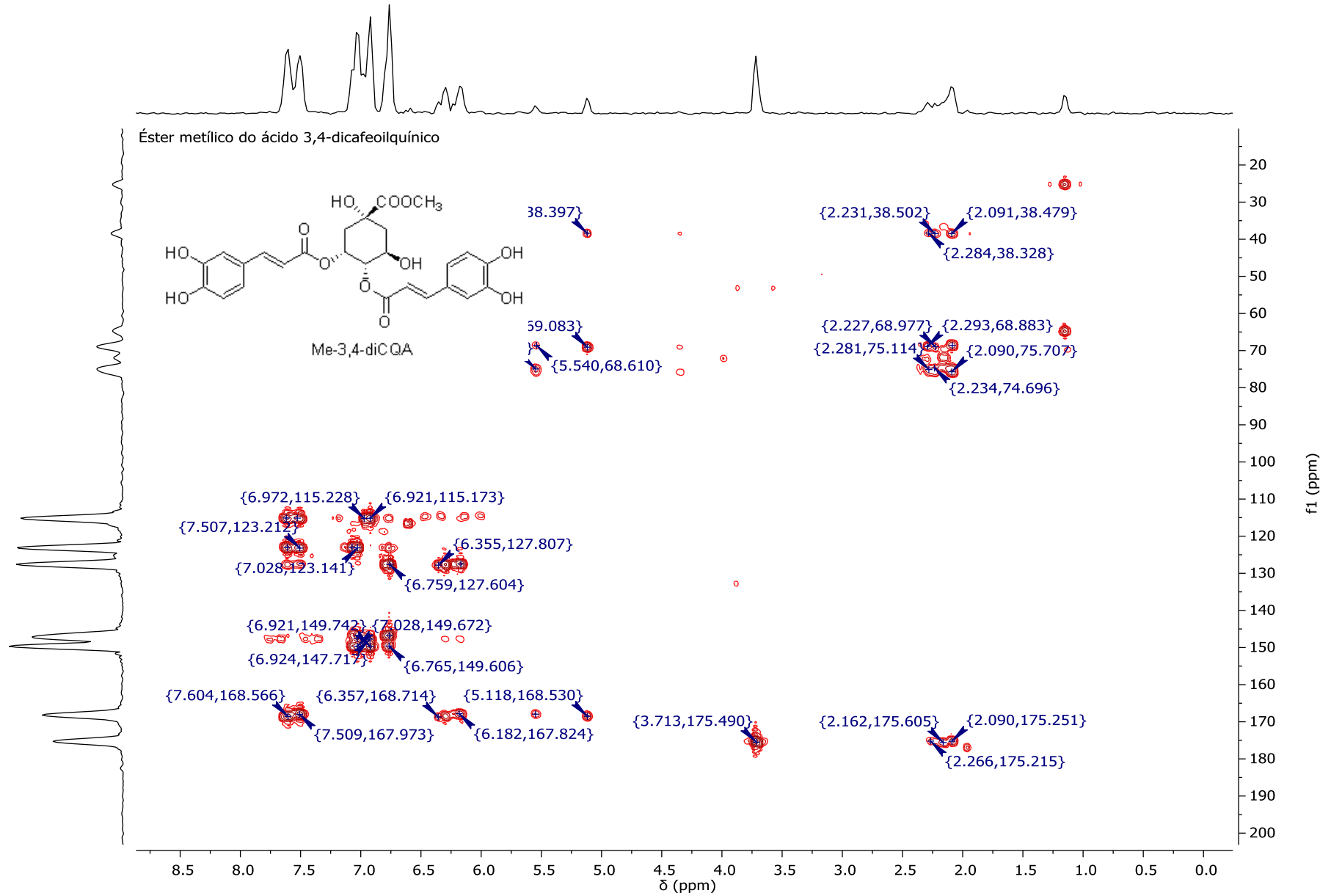
Éster metílico do ácido 3,4-dicafeoilquínico



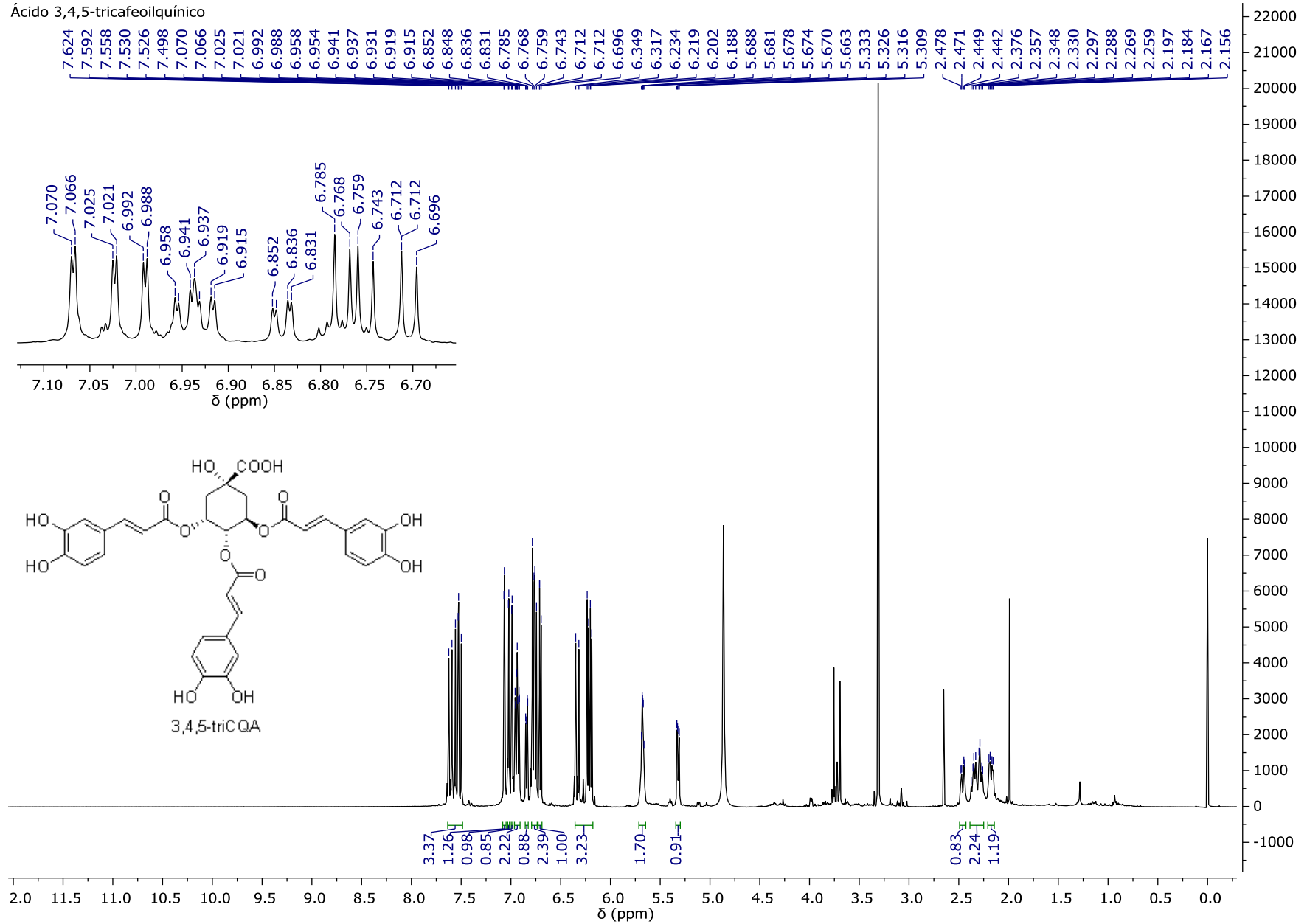
Anexo 6. Espectro de RMN ¹H do componente 13: éster metílico do ácido 3,4-dicafeoilquínico



Anexo 6. Espectro de RMN ¹³C do componente 13: éster metílico do ácido 3,4-dicafeoilquínico

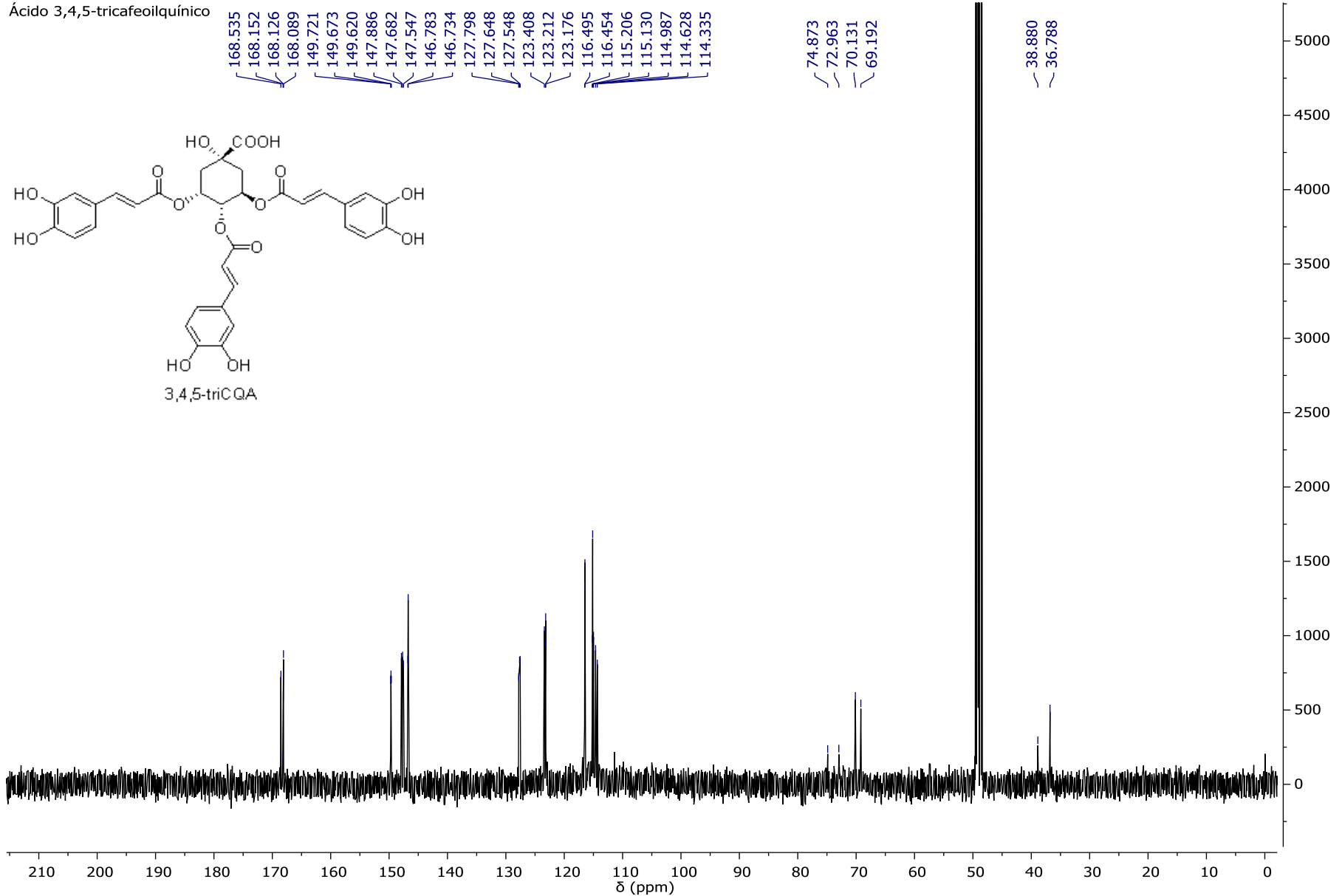


Anexo 6. Espectro bidimensional HMBC do componente 13: éster metílico do ácido 3,4-dicafeoilquínico



Anexo 7. Espectro de RMN ^1H do componente 14: ácido 3,4,5-tricafeoilquínico

Ácido 3,4,5-tricafeoilquínico



Anexo 7. Espectro de RMN ¹³C do componente 14: ácido 3,4,5-tricafeoilquínico