

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANÁLISE QUÍMICA E EFEITO DE *Baccharis trimera* NA PROLIFERAÇÃO E
MORTE CELULAR EM LINHAGENS HUMANAS DE CARCINOMA CERVICAL E
DE CÂNCER DE MAMA**

Cristiane Bernardes de Oliveira

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANÁLISE QUÍMICA E EFEITO DE *Baccharis trimera* NA PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR EM LINHAGENS HUMANAS DE CARCINOMA CERVICAL E DE CÂNCER DE MAMA

Tese apresentada por
Cristiane Bernardes de Oliveira
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Grace Gosmann
Co-Orientadora: Profa. Dr. Andréia Buffon

Porto Alegre, 2012

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em Nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 18.12.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Nance Beyer Nardi
Universidade Luterana do Brasil

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Cristiane Bernardes de
ANÁLISE QUÍMICA E EFEITO DE Baccharis trimera NA
PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR EM LINHAGENS HUMANAS DE
CARCINOMA CERVICAL E DE CÂNCER DE MAMA / Cristiane
Bernardes de Oliveira. -- 2012.
144 f.

Orientadora: Grace Gosmann.
Coorientadora: Andréia Buffon.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2012.

1. Baccharis trimera. 2. Cancer de colo de útero.
3. Cancer de mama. 4. Atividade antioxidante . 5.
Atividade antiproliferativa. I. Gosmann, Grace,
orient. II. Buffon, Andréia, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Fitoquímica e Síntese Orgânica e de Análises Bioquímicas e Citológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com financiamento da CAPES, do CNPq e da FAPERGS. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

DEDICO ESTE ESTUDO,

À MINHA FAMÍLIA...
...Ao meu esposo **Michael** e
às minhas filhas
Gabriela e Eduarda

Agradecimentos

Foram longos momentos de desafios e provações, porém momentos de intenso aprendizado e prazer. Meu grato reconhecimento:

À Deus, por ser minha fonte de luz e inspiração.

À profa. Dra. Grace Gosmann pela confiança em mim depositada durante a realização deste trabalho e ainda, pelos ensinamentos, que com sua seriedade, tranquilidade e conhecimento, me guiaram para caminhos corretos e compensadores. Agradeço pelo incentivo, pela compreensão, pelo exemplo de docente, pesquisador e principalmente ao exemplo relacionado ao valor da vida...

À profa Dra. Andréia Buffon pela confiança, convívio, aprendizado e pela contribuição direta e essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À profa Dra. Alessandra Nejar Bruno pela parceria.

Ao prof. Dr. Sergio Bordignon pela identificação botânica.

Aos professores membros da banca de qualificação e defesa Dra. Gilsane von Poser, Dra. Nance Nardi, Dra. Márcia Wink e Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, que gentilmente aceitaram ler este manuscrito, pela contribuição e tempo dispendido.

Ao Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica, que me acolheu durante esses seis anos de trabalho, desde a realização do meu mestrado. Durante este período conheci pessoas incríveis que com certeza ficarão guardadas no meu coração. A todas as minhas colegas de laboratório por tudo o que vivemos juntas, por me ajudarem, ouvirem e acolherem. Em especial à minha bolsista de iniciação científica e agora Mestre Lucimara Nardi Comunello, pelo carinho, amizade, força e companheirismo desde o mestrado e às minhas bolsistas de iniciação científica Érica Sena Maciel e Carulina Mesquita também pela amizade, atenção e companheirismo. À Mônica de Oliveira Duarte pela amizade, convivência e principalmente pelas boas risadas. Às professoras Dra. Simone Gnoatto e Dra. Aline Zimmer, que além de grandes profissionais, são pessoas maravilhosas. Ao Dr. Mauro Muniz, também colega de laboratório.

À Scheron Rathke Giubel do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, pela parceria, disponibilidade e companheirismo no auxílio aos ensaios biológicos.

Às colegas do Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas (LABC) da UFRGS, em especial a Jéssica Nascimento por estar sempre disposta a auxiliar.

Ao LAPPS pela utilização do aparelho CLAE-PDA, em especial a Marcella Herbstrith de Oliveira.

À profa. Dra. Stela Maris Kuze Rates e a Dra. Luiza Salles pela utilização e auxílio do aparelho CLAE-UV.

Ao Jeferson Segalin e o Centro de Biotecnologia da UFRGS pela realização das análises de massas.

À Rosana Fogaça pela amizade, ensinamentos e por estar sempre solícita quando necessário.

Ao meu esposo Michael pela paciência durante esses quatro anos de trabalho árduo. Às minhas filhas Gabriela e Eduarda, pelo simples fato delas existirem. Pela paciência e amor incondicional! Eu amo vocês!

Aos meus pais Carlos Alberto e Marli pelo amor, força, incentivo e por estarem sempre presentes na minha vida! Aos meus irmãos Bárbara e Carlos Eduardo e ao meu cunhado Giovani Sartori pela amizade e companheirismo.

À minha sogra Maria Helena e a Dona Dorvalina "*in memorian*" pelo apoio, carinho e respeito ao meu trabalho. Sem o auxílio de vocês no cuidado da Gabriela e da Eduarda, teria sido muito difícil à realização deste grande sonho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo apoio técnico e financeiro para a realização deste trabalho e a todos os professores e funcionários desta instituição.

À CAPES, pela bolsa concedida e apoio financeiro ao projeto. CNPq e FAPERGS.

Muito obrigada!!!

RESUMO

O câncer de mama e o câncer de colo de útero são dois grandes problemas de saúde pública no mundo. Apesar do aumento de diagnósticos de câncer, os tratamentos medicamentosos disponíveis têm eficácia variável, possibilidade de recidiva e muitos efeitos colaterais. Considerando a importância das plantas como fontes de novos fármacos, é importante a busca de compostos ativos derivados de plantas como protótipos para novas terapias anticâncer. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae), popularmente conhecida como "carqueja", é amplamente utilizada na medicina popular para problemas digestivos e hepáticos. Em relação à sua composição química é relatada a presença de flavonas, flavonóis e diterpenos. Os estudos farmacológicos demonstraram diversas atividades como anti-inflamatória e antioxidante. Considerando a importante atividade biológica apresentada por *B. trimera*, foi realizado um fracionamento bioguiado dessa planta, e seus extratos foram avaliados para a atividade antitumoral. O método analítico desenvolvido por CLAE para a quantificação de rutina e quercetina na fração de compostos fenólicos de *B. trimera* mostrou ser exato, preciso e específico. A fração de terpenóides e de compostos fenólicos de *B. trimera* demonstraram um efeito anti-proliferativo dose-dependente nas linhagens celulares SiHa e MCF7 após o tratamento por 24 horas pelo ensaio MTT. Esses resultados foram confirmados pela contagem de células, ensaio clonogênico e teste de *wound healing* na linhagem SiHa, além da avaliação da atividade da enzima LDH. Esses resultados, tanto quanto sabemos, são relatados pela primeira vez. Com base nesses resultados, pode-se inferir um efeito importante na indução de morte celular de *B. trimera* em linhagens de células de câncer de mama e de colo do útero. Esses estudos necessitam ser continuados para esclarecer os mecanismos relacionados com a ação farmacológica desses extratos, ajudando na busca de novos protótipos com atividade antitumoral. Partes desta tese foram suprimidas (páginas 27 a 127) em função de não terem sido publicadas.

Palavras-chaves: *Baccharis trimera*, CLAE, atividade antioxidante, câncer de colo de útero, SiHa, câncer de mama, MCF-7, atividade antiproliferativa.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL STUDIES AND EVALUATION OF *Baccharis trimera* IN PROLIFERATION AND CELL DEATH IN HUMAN STRAINS OF CERVICAL CARCINOMA AND BREAST CANCER

Breast cancer and cervical cancer are a major public health problem worldwide. Despite the increasing cancer rates and treatment costs, the available drug treatments have variable efficacy, possibility of recurrence and many side effects. Considering the importance of plants as sources of new drugs, it is necessary to search for active compounds derived from plants as prototypes to new anticancer therapies. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae), popularly known as “carqueja”, is widely used in folk medicine for digestive and liver diseases. In relation to its chemical composition it is reported the presence of flavones, flavonols and diterpenes. Pharmacological studies demonstrated several activities as anti-inflammatory and antioxidant. Considering the potential biological activity of *B. trimera* it was conducted a bioactivity-guided fractionation of the plant which extracts were evaluated to antitumor activity. The developed HPLC analytical method was accurate, precise and specific to the quantification of rutin and quercetin in *B. trimera* phenolic fraction. *B. trimera* crude ethanol extract and the fractions dichloromethane, butanol, ethyl acetate, aqueous terpenoids and phenolic compounds showed an anti-proliferative effect in a dose-dependent in the cell lines SiHa and MCF7 after treatment for 24 hours by MTT assay. These results were confirmed by cell counts, clonogenic assay and *wound healing* test in the cell line SiHa, moreover activity of the enzyme LDH was measured. These results, as far as we know, are reported for the first time. Based on these results, we demonstrated a significant effect on cell death induction of *B. trimera* in breast and cervical cancer cell lines. These studies need continuity to understand the mechanisms related to the pharmacological action of these extracts, thus helping in the search for new prototypes with antitumoral activity. Parts of this work were suppressed (pages 27-127) because they have not been published.

Keywords: *Baccharis triemra*, HPLC, antioxidant, cervical cancer, SiHa, breast cancer, MCF-7, antiproliferation.

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Baccharis trimera</i>	35
Figura 2. Diterpenos em <i>B. trimera</i>	36
Figura 3. Flavonóides isolados de <i>B. trimera</i>	37
Figura 4. Substância Ba II (éster de 4'-O- β -D-glicopiranosil-3,5-dimetóxi-benzil cafeato), isolado de <i>B. articulata</i>	37
Figura 5. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012 (neoplasia maligna da mama feminina).....	51
Figura 6. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012 (neoplasia maligna do colo do útero).....	53
Figura 7. O ciclo viral do Papilomavírus Humano (HPV).....	55
Figura 8. Apoptose extrínseca.....	60
Figura 9. Apoptose intrínseca.....	64
Figura 10. Características morfológicas de apoptose e necrose.....	66
Figura 11: Esquema de obtenção das frações a partir de <i>B trimera</i>	74
Figura 12: CCD da fração diclorometano e do extrato bruto hidroetanólico de <i>B. trimera</i>	90
Figura 13. CCD do fracionamento da fração acetato de etila + <i>n</i> -butanol de <i>B. trimera</i>	91
Figura 14. Curva analítica do ácido gálico.....	92
Figura 15. Curva analítica do DPPH*.....	93
Figura 16. Curva analítica da rutina e quercetina nas concentrações: 10, 15, 20, 25 e 30 μ g/mL em 254 nm.....	95
Figura 17. Cromatograma da fração fenólica (linha rosa) com sobreposição das substâncias de referências (linha preta).....	98
Figura 18. Varredura dos compostos com massa molecular entre 100 Da e 1100 Da da fração de compostos fenólicos de <i>B. trimera</i> em modo	

positivo.....	101
Figura 19. Espectro ampliado na região de 300 Da da fração de compostos fenólicos de <i>B. trimera</i> indicando a presença do pico 5 <i>m/z</i> 303 (M+H)+ atribuído à quercetina.....	101
Figura 20. Espectro ampliado na região de 300 Da da fração de compostos fenólicos de <i>B. trimera</i> indicando a presença do pico 6 <i>m/z</i> 317 (M+H)+ atribuído à nepetina.....	101
Figura 21. Espectro MS/MS do pico 317 apresentando a sua fragmentação no pico principal <i>m/z</i> 302 atribuído a perda da metila da nepetina. Energia de colisão 25 eV.....	102
Figura 22. Figura 22. Espectro ampliado na região de 600 Da da fração de compostos fenólicos de <i>B. trimera</i> indicando a presença do pico 3 <i>m/z</i> 611 (M+H)+ atribuído à rutina.....	102
Figura 23. Espectro ampliado na região de 170 Da da fração de compostos fenólicos de <i>B. trimera</i> com a presença do pico <i>m/z</i> 181 (M+H)+ indicativo da presença de ácido caféico.....	102
Figura 24. Espectro ampliado na região de 270 Da da fração de compostos fenólicos de <i>B. trimera</i> com a presença do pico <i>m/z</i> 271 (M+H)+ indicativo da presença de apigenina.....	103
Figura 25. Espectro ampliado na região de 280 Da da fração de compostos fenólicos de <i>B. trimera</i> com a presença do pico <i>m/z</i> 287 (M+H)+ indicativo da presença de canferol e luteolina.....	103
Figura 26. Espectro ampliado na região de 300 Da da fração de compostos fenólicos de <i>B. trimera</i> com a presença do pico <i>m/z</i> 301 (M+H)+ indicativo da presença de hispidulina.....	103
Figura 27. Espectro ampliado na região de 340 Da da fração de compostos fenólicos de <i>B. trimera</i> com a presença do pico <i>m/z</i> 345 (M+H)+ indicativo da presença de eupatorina.....	103
Figura 28. Viabilidade celular após tratamentos com diferentes concentrações do extrato e frações de <i>B. trimera</i> por 24 horas, para linhagem celular SiHa.....	106
Figura 29. Alterações morfológicas da linhagem celular SiHa.....	107
Figura 30. Viabilidade celular após tratamentos com diferentes concentrações do extrato e frações de <i>B. trimera</i> isolados e em associação com a cisplatina por 24 horas, para linhagem celular	109
Figura 31. Viabilidade celular após trat: com diferentes concentrações	

de rutina e quercetina isoladas e em associação por 24 horas, para linhagem celular SiHa.....	110
Figura 32. Contagem de células após o tratamento com diferentes concentrações do extrato bruto hidroetanólico e frações de <i>B. trimera</i> por 24 h, para linhagem celular SiHa.....	111
Figura 33. Efeito do extrato e frações de <i>B. trimera</i> no potencial clonogênico em linhagem de células tumorais.....	112
Figura 34. Teste de wound healing após tratamento com extrato e frações de <i>B. trimera</i> na linhagem celular SiHa.....	113
Figura 35. Perda da integridade da membrana mensurada pelo ensaio de LDH após tratamento com diferentes concentrações de <i>B. trimera</i> por 24 h, na linhagem celular SiHa.....	114
Figura 36. Viabilidade celular após tratamento com diferentes concentrações de frações de <i>B. trimera</i> , por 24 e 48 h na linhagem celular MCF-7.....	116

Lista de Tabelas

Tabela 1: Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária.....	48
Tabela 2: Estimativas para o ano de 2012 de número de casos novos de câncer, por Estado.....	49
Tabela 3: Estimativas para o ano de 2012 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de novos casos de câncer, segundo sexo e localização primária* para o Rio Grande do Sul e Porto Alegre.....	49
Tabela 4: Tipos de HPV classificados de acordo com seu grau de malignidade.....	55
Tabela 5. Pureza e procedência das substâncias de referência quercetina e rutina.....	77
Tabela 6. Condições cromatográficas.....	77
Tabela 7. Análise dos extratos e frações de <i>Baccharis trimera</i> para o ensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i> , a determinação da capacidade antioxidante em DPPH e a determinação de fenóis totais.....	93
Tabela 8. Resultados obtidos no estudo de linearidade das curvas analíticas.....	95
Tabela 9. Limites de detecção das substâncias de referência rutina e quercetina.....	96
Tabela 10. Limites de quantificação das substâncias de referência rutina e quercetina.....	96
Tabela 11. Valores experimentais obtidos na determinação da repetibilidade e da precisão intermediária do método para a fração de fenólicos por CLAE-UV.....	97
Tabela 12. Determinação da exatidão do método para a fração de compostos fenólicos por CLAE-UV.....	97
Tabela 13. Índice de pureza dos picos cromatográficos para a amostra de compostos fenólicos, utilizando coluna de fase reversa C-18 (4,6 x 250 mm 5 µm), HPLC-PDA, fase móvel metanol:água (40:60) + 0,05% ácido trifluoroacético (pH= 3,0) no HPLC – PDA.....	99

Tabela 14. Quantificação da fração de compostos fenólicos pela interpolação do somatório das áreas dos picos na curva analítica da quercetina (10 a 30 µg/mL).....	100
Tabela 15. Dados de espectroscopia de UV e espectrometria de massas da fração de compostos fenólicos de <i>B. trimera</i>	100
Tabela 16: Concentrações do extrato e frações de <i>B. trimera</i> testadas para a linhagem celular SiHa.....	104
Tabela 17: Concentrações do extrato e das frações <i>B. trimera</i> em associação com a cisplatina para a linhagem celular SiHa.....	108
Tabela 18. Concentração dos flavonóides quercetina e rutina testados para linhagem celular.....	109
Tabela 19. Concentração do extrato e frações de <i>B. trimera</i> para contagem celular na linhagem celular SiHa.....	110
Tabela 20. IC ₅₀ do extrato e frações de <i>B. trimera</i> para linhagem celular SiHa.....	111
Tabela 21. Concentração das amostras de <i>B. trimera</i> para linhagem celular MCF-7.....	115

Lista de Abreviaturas

AE = acetato de etila

AQ = aquoso

BU = butanol

CIS = cisplatina

DM = diclorometano

DP = desvio padrão

DPR = desvio padrão relativo

EBH = extrato bruto hidroetanólico

EQ = Equivalentes de quercetina

FEN = compostos fenólicos

IC₅₀ = concentração inibitória para obter 50% do máximo da atividade estimada

MD = média

TP = terpenóides

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	29
3. REVISÃO DA LITERATURA	33
3.1. ASPECTOS ETNOFARMACOLÓGICOS.....	35
3.2. ASPECTOS BOTÂNICOS.....	35
3.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE <i>B. trimera</i>	36
3.3.1. Diterpenos.....	36
3.3.2. Triterpenos e saponinas.....	36
3.3.3. Compostos fenólicos.....	37
3.3.4. Óleos voláteis.....	38
3.3.5. Diferenciação química entre espécies de <i>Baccharis</i>	38
3.4. ASPECTOS BIOLÓGICOS, FARMACOLÓGICOS E TOXICIDADE.....	39
3.4.1. Atividade antioxidante.....	39
3.4.2. Atividade ulcerogênica, hepato e gastropotretora.....	41
3.4.3. Atividade antiedematogênica, anti-inflamatória e analgésica.....	42
3.4.4. Atividade mutagênica, antimutagênica e apoptose.....	44
3.4.5. Outras atividades.....	45
3.5. CÂNCER.....	47
3.5.1. Câncer de mama feminina.....	50
3.5.2. Câncer de colo de útero.....	52
3.5.3. Tratamentos para o câncer de colo de útero e de mama.....	56
3.6. MECANISMOS DE MORTE CELULAR.....	57
3.6.1. Apoptose.....	58
3.6.1.1. Apoptose extrínseca.....	59
3.6.1.2. Apoptose intrínseca.....	61
3.6.2. Necrose regulada.....	65
3.6.3. Morte celular autofágica.....	66
3.6.4. Mitose catastrófica.....	67
3.7. PRODUTOS NATURAIS E O CÂNCER.....	67
4. MATERIAIS E MÉTODOS	71
I. PARTE QUÍMICA	73
I.1. MATERIAL VEGETAL.....	73
I.2. OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Baccharis trimera</i>	73
I.2.1. Preparação do extrato bruto hidroetanólico de <i>B. trimera</i>	73
I.2.2. Preparação de frações: diclorometano, acetato de etila, <i>n</i> -butanol e aquosa de <i>B. trimera</i>	73
I.2.3. Obtenção das frações enriquecidas de terpenos e de compostos fenólicos de <i>B. trimera</i>	74
I.3. ANÁLISE QUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	75
I.4. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU.....	75
I.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FOTOCOLORIMÉTRICO DO DPPH.....	76
I.5.1. Preparação da curva analítica do DPPH.....	76

I.5.2. Preparação das amostras.....	76
I.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	76
I.6.1. Substâncias químicas, reagentes.....	76
I.6.2. Condições cromatográficas.....	77
I.6.3. Fase móvel e solução de diluição.....	77
I.6.4. Preparo das substâncias de referências.....	77
I.6.5. Preparo da amostra.....	78
I.7. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA CLAE-UV.....	78
I.7.1. Linearidade.....	78
I.7.2. Limite de Detecção (LD).....	79
I.7.3. Limite de Quantificação (LQ).....	79
I.7.4. Precisão.....	79
I.7.5. Exatidão.....	79
I.7.6. Especificidade.....	80
I.7.7. Quantificação da fração compostos fenólicos expressa em quercetina por CLAE.....	80
I.8. ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	80
II. PARTE BIOLÓGICA.....	81
II.1. ENSAIO DE LETALIDADE COM ARTEMIA SALINA.....	81
II.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE <i>Baccharis trimera</i> NA PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR EM LINHAGENS HUMANAS DE CARCINOMA CERVICAL E DE CÂNCER DE MAMA.....	81
II.2.1. Materiais.....	81
II.2.2. Linhagens celulares e condições de cultivo.....	81
II.2.3. Avaliação da viabilidade celular.....	82
II.2.3.1 Preparação dos extratos de <i>B. trimera</i>	82
II.2.3.2. Ensaio de MTT.....	82
II.2.3.3. Observação das alterações morfológicas das células.....	83
II.2.3.4. Contagem celular.....	83
II.2.3.5. Ensaio Clonogênico.....	83
II.2.3.6. Teste de <i>Wound Healing</i>	84
II.2.3.7. Ensaio de Lactato Desidrogenase (LDH).....	84
II.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	85
5. RESULTADOS.....	87
I. PARTE QUÍMICA.....	89
I.1. RENDIMENTO DOS EXTRATOS.....	89
I.1.1. Rendimento das frações diclorometano, acetato de etila, <i>n</i> -butanol e aquosa.....	89
I.1.3. Rendimento das frações enriquecidas de terpenóides e de compostos fenólicos.....	89
I.2. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	89
I.3. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU.....	91
I.4. MÉTODO FOTOCOLORIMÉTRICO DO DPPH*.....	92
I.5. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA CLAE-UV PARA FRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE <i>B. TRIMERA</i>	94
I.5.1. Linearidade.....	94
I.5.2. Limite de Detecção.....	95

I.5.3. Limite de Quantificação.....	96
I.5.4. Precisão.....	96
I.5.5. Exatidão.....	98
I.5.6. Especificidade.....	98
I.5.7. Quantificação da fração de compostos fenólicos expressa em quercetina.....	99
I.5.8. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	100
II. PARTE BIOLÓGICA.....	104
II.1. ENSAIO DE LETALIDADE COM ARTEMIA SALINA.....	104
II.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE <i>Baccharis trimera</i> NA PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR EM LINHAGENS HUMANAS DE CARCINOMA CERVICAL E DE CÂNCER DE MAMA.....	104
II.2.1. Ensaio de viabilidade celular	104
II.2.1.1. Linhagem celular SiHa.....	104
II.2.1.1.1. Avaliação da contagem e viabilidade celular.....	104
II.2.1.1.2. Ensaio Clonogênico.....	111
II.2.1.1.3. Teste de <i>Wound Healing</i>	112
II.2.1.1.4. Ensaio de Lactato Desidrogenase (LDH).....	114
II.2.1.2. Linhagem celular MCF-7.....	115
II.2.1.2.1. Ensaio de MTT.....	115
6. DISCUSSÃO.....	117
7. REFERÊNCIAS.....	129

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Objetivos

2. OBJETIVOS

- Análise química por cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato bruto hidroetanólico e das frações de *B. trimera*
- Determinar a quantificação de fenólicos totais das frações de *B. trimera*
- Validar a metodologia de quantificação dos flavonóides rutina e quercetina na amostra da fração de compostos fenólicos de *B. trimera* por CLAE e Espectroscopia de Massas
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das frações de *B. trimera* pelo ensaio com DPPH•
- Identificar o grupo de substâncias (fração) que apresentam compostos mais bioativos pelo ensaio de Letalidade com *Artemia salina*
- Avaliar a proliferação e morte celular em linhagens de células de câncer cervical e de mama após tratamento com o extrato bruto hidroetanólico e frações de *B. trimera*.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

MATERIAIS E MÉTODOS

RESULTADOS

5. RESULTADOS

DISCUSSÃO

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

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

ADZET, T.; MARIN, E.; GENÉ, R.M. Estudio de la actividad antiinflamatoria de especies vegetales de origen centro y sudamericano. **Dominguezia**, v. 9 (1), p. 17-23, 1991.

ALMEIDA, O. J.; ZEFERINO, L. C.; ALVARENGA, M.; SOUZA, G. A.; PINTO, G. A.; CESTARI, A. L. O. Carcinoma ductal in situ associado a carcinoma invasivo na mesma mama: análise do grau nuclear e da expressão das proteínas p53 e c-erbB-2 e dos receptores de estrógeno. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26 (6), p. 435-439, 2004.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, **RE nº 899, de 29 de maio de 2003**.

ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Ministério da Saúde, Brazil. www.anvisa.gov.br (acessado em maio de 2012).

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIAT, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Products Reports**, v. 24, p. 1225–1244, 2007.

BARROSO, G.H. Compositae – subtribo Baccharidinae Hoffmann – estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguesia**, v. 28 (40), p. 277-273, 1976.

BEARA, I. N.; LESJAK, M. M.; JOVIN, E. D.; BALOG, K. J.; ANACKOV, G. T.; ORCIC, D. Z.; DUKIC, N. M. M. Plantain (*Plantago* L.) species as novel sources of flavonoids antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9268-9273, 2009.

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

BEZERRA, D.P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LATUFO, L. V. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piperazine and piperine. **Journal of Applied Toxicology**, v.28, p. 158-63, 2008.

BIONDO, T. M. A.; TANAE, M. M.; COLETTA, E. D.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 368-373, 2011.

BOLASÉLL, A. H. T.; ZETTLER, C. G.; VINHOLES, J.; MACHADO, S. M.; KLIEMANN, C. Indicadores de prognóstico em câncer de mama com axila negativa: receptor de estrógeno e expressão de p53 e de c-cerbB-2. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22 (7), p. 449- 454, 2000.

BOLIGON, A. A.; PEREIRA, R. P.; FELTRIN, A. C.; MACHADO, M. M.; JANOVIK, V.; ROCHA, J. B. T.; ATHAYDE, M. L. Antioxidant activities of flavonol derivates from the leaves and stem bark os *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6592-6598, 2009.

BONOLI M.; VERARDO V.; MARCONI E.; CABONI M. F. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative pectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v. 52, p. 5195-5200, 2004.

BORGO, J.; XAVIER, C. A. G.; MOURA, D. J.; RICHTER, M. F.; SUYENAGA, E. S. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonóides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20 (1), p. 12-17, 2010.

BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. **Cell Cycle**, v. 6 (21), p. 2612-2619, 2007.

BRACKE, M. E.; VANHOECKE, B. W. A.; DERYCKE, L.; BOLCA, S.; POSSEMIERS, S.; HEYERICK, A.; STEVENS, C. V.; KEUKELEIRE D. D.; DEPYPERE, H. T.; VERSTRAETE, W.; WILLIAMS, C. A.; MCKENNA, S. T.; TOMAR, S.; SHARMA, D.; PRASAD, A. K.; PASS, A. L. ; PARMAR, V. S. Plant polyphenolics as anti-Invasive cancer agents. **Anticancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 171-185, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry**, v.70, p. 231-239, 2005.

BUFFON, A.; WINK, M. R.; RIBEIRO, B. V.; CASALI, E. A.; LIBERMANN, T.A.; ZERBINI, L.F.; ROBSON, S.C.; SARKIS, J.J.F. NTPDase and 5' ecto-nucleotidase expression profiles and the pattern of extracellular ATP metabolism in the Walker 256 tumor. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 1259–1265, 2007.

BUSSMANN, R. W.; MALCA, G.; GLENN, A.; SHARON, D.; NILSEN, B.; PARRIS, B.; DUBOSE, D.; RUIZ, D.; SALEDA, J.; MARTINEZ, M.; CARILLO, L.; WALKER, K.; KUHLMAN, A.; TOWNESMITH, A. Toxicity of

medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 121-140, 2011.

CAO, G.; PRIOR, R.L. Antioxidant capacity and polyphenolic components of teas: implications for altering in vivo antioxidant status. **Experimental Biology and Medicine**, v. 220 (4), p. 255-261, 1999.

CARIDDI, L.; ESCOBAR, F.; SABINI, C.; TORRES, C.; REINOSO, E.; CRISTOFOLINI, A.; COMINI, L.; MONTOYA, S. N.; SABINI, L. Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (ASTERACEAE) on normal cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 155-161, 2012.

CARTRON, E.; CARBONNEAU, M.A.; FOURET, G.; DESCOMPS, B.; LEGER, C.L. Specific antioxidant activity of caffeoyl derivatives and other natural phenolic compounds: LDL protection against oxidation and decrease in the proinflammatory lysophosphatidylcholine production. **Journal of Natural Products**, v. 64 (4), p. 480-486, 2001.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recommendations on the use of quadrivalent human papillomavirus vaccine in males—Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 60, p. 1705-1708, 2011.

CHAN, S. L.; YU, V. C. Proteins of the bcl-2 family in apoptosis signalling: from mechanistic insights to therapeutic opportunities **Clinical and Experimental Pharmacology**, v. 31, p. 119-128, 2004.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9 (12), p. 2783-2797, 2000.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as source of anticancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.72-79, 2005.

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

DE OLIVEIRA, S.Q.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23 (3), p. 365-368, 2004.

DE OLIVEIRA, S.Q. DE; TRENTIN, V.H.; KAPPEL, V.D.; BARELLI, C.; GOSMANN, G.; REGINATTO F.H. Screening of antibacterial activity of south Brazilian *Baccharis* species. **Pharmaceutical Biology**, v. 43 (5), p. 434-438, 2005.

DE OLIVEIRA, S.Q. DE; BARBON G.; GOSMANN, G. Differentiation of South Brazilian *Baccharis* Species by TLC, **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 2603-2609, 2006.

DESAGHER, S.; MARTINOU, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 10, p. 369-377, 2000.

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

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical Science**, v.110, p.525-541, 2006.

DUENSING, S.; MÜNGER, K. Human Papillomavirus Type 16 E7 oncoprotein can induce abnormal centrosome duplication through a mechanism independent of inactivation of retinoblastoma protein family members **JOURNAL OF VIROLOGY**, v.77 (22), p. 12331–12335, 2003.

FEHRMANN, F.; LAIMONIS A; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**, v. 22, p. 5201–5207, 2003.

FERNANDES, Jr. A. S.; LIMA A. A. P. R.; LIMA, E. M.; HORTA, H. L.; COUTINHO, L. F. P.; SALLUM, L. F. T. A.; DERCHAIN, S. F. M.; SARIAN, L. O. Z.; SIMÕES, R. Câncer do colo uterino: tratamento. **Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia Sociedade Brasileira de Cancerologia, 2011**. Disponível em: <http://www.projetodiretrizes.org.br/ans/diretrizes/cancer_do_colo_uterino-tratamento.pdf> Acesso em: 20/04/2012.

FINNEY, D. J. Probits analysis. 3 ed. Cambridge University Press. 1971.

FREIRE, S.E.; URTUBEY, E. Compuestas medicinales de La provincia biogeográfica pampeana: claves para su determinación e icnografías. Parte I: compuestas espinosas (grupo 1) y compuestas com tallos alados (grupo 2). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 18 (3), p. 191-199, 1999.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. **Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

FULLAS, F.; HUSSAIN, R. A.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D. Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. **Journal of Natural Products**, v. 57 (6), p. 801-807, 1994.

AWANTU, A. F.; LENTA, B. N.; DONFACK, E. V.; WANSI, J.; NEUMANN, B.; STAMMLER, H-G.; NOUNGOUE, D. T.; TSAMO, E.; SEWALD, N. Flavonoids and other constituents of *Hymenostegia afzelii* (Caesalpinaceae) **Phytochemistry Letters**, v. 4(3), p. 315 – 319, 2011.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; VACCHELLI, E.; KROEMER, G. Cell death signaling and anticancer therapy. *Frontiers in Oncology*, v.1, p. 5-23, 2011.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H-U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 107-120, 2012.

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

GENÉ, R. M.; CARTAÑÁ, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Antiinflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of active constituents. **Planta Medica**. v. 62, p. 232–335, 1996.

GERHÄUSER, C.; KLIMO, K.; HEISS, E.; NEUMANN, I.; ELDEEN, A. G.; KNAUFT J.; LIU, G. Y.; SITTHIMONCHAI, S.; FRANK, N. Mechanism-based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 163 (72), p. 523-524, 2003.

GIANELLO, J. C.; GIORDANO, O. S. Examen químico en seis especies del genero *Baccharis*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 15 (2), p. 84-86, 1984.

GIANELLO, J.C.; CEÑAL, J.P.; GIORDANO, O.S.; TONN, C.E.; PETENATTI, M.E.; DEL VITTO, L.A. Medicamentos herbarios en el centro-oeste argentino. II. “Carquejas”: Control de calidad de las drogas oficiales y sustituyentes. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19 (2), p. 99-103, 2000.

GIULIANO, D.A. Clasificación intragenérica de las especies Argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). **Darwiniana**, v. 39 (1-2), p. 131-154, 2001.

GOSMANN, G.; OLIVEIRA, C.B. DE, COMUNELLO, L.N. *Baccharis trimera* (Less.) DC. Carqueja. In: Amani S. Awaad; J.N.Govil; V.K.Singh. (Org.). **Recent Progress in Medicinal Plants, Ethnomedicine - Source & Mechanism-II**. New Delhi: Studium Press, v. 28, p. 107-120, 2010.

GRANCE, S.R.M.; TEIXEIRA, M.A.; LEITE, R.S.; GUIMARÃES, E.B.; SIQUEIRA, J.M. DE; FILIU, W.F. DE O.; VASCONCELOS S.B. DE S.; VIEIRA M. DO C. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117(1), p. 28-33, 2008.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 267–271, 1998.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. da. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, 2007.

GUPTA, M. A. (Ed.) 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Bogotá: **Cyted-Sebac-Unesco**, 1995.

HAIL, N. Jr.; KIM, H. J.; LOTAN, R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. **Apoptosis**, v. 11, p. 1677-1694, 2006.

HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, p. 691-704, 2004.

HALLIWELL, B.; GULTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1999.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407 (6805), p. 685-687, 2000.

HERZ, W.; PILOTTI, A.; SÖDERHOLM, A.C.; SHUHAMA, I.K.; VICHNEWSKI, W. New *ent*-clerodane type diterpenoids from *Baccharis trimera*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 50, p. 3913-3916, 1977.

HUANG, X.; LEE, S.; CHEN X. Design of “smart” probes for optical imaging of apoptosis. **American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 1 (1), p. 3-17, 2011.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama. Versão revista e ampliada do Programa Viva Mulher, desmembrado pelo Programa Nacional de Controle do Câncer de Mama (INCA, 2010), elaborado pela Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica em abril de 2011a.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil – Rio de Janeiro: 118 p., 2011b.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (BRASIL). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro: 128p., 2011.

JANUÁRIO, A.H.; SANTOS, S.L.; MARCUSSI, S.; MAZZI, M.V.; PIETRO, R.C.L.R.; SATO, D.N.; ELLENA, J.; SAMPAIO, S.V.; FRANÇA S.C.; SOARES A.M. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties, **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, p. 243-251, 2004.

KERR, J. F. R.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73 (8), p. 2013-2026, 1994.

KOMEN, J.; WOLBERS, F.; FRANKE, H. R.; ANDERSSON, H.; VERMES, I.; BERG, A. V. D. Viability analysis and apoptosis induction of breast cancer cells in a microfluidic device: effect of cytostatic drugs. **Biomedical Microdevices**, v. 10, p. 727–737, 2008.

KOSS, L. G.; DURFE, G. R. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 63 (6), p. 1245-61, 1956.

KRAMER, P. H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature**, v. 407, p. 789-795, 2000.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16 (1), p. 3-11, 2009.

KUPCHAN, S. M.; STREELMAN, D. R.; JARVIS, B. B.; DAILEY, R. G. J.R.; SNEDEN, A. T. Isolation of potent new antileukemic trichothecenes from *Baccharis megapotamica*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42 (26), p. 4221-4225, 1977.

KUTUK, O.; BASAGA, H. Bcl-2 protein family: Implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. **Apoptosis**, v. 11, p. 1661–1675, 2006.

LACROIX, M.; TOILLON, R. A.; LECLERCQ, G. p53 and breast cancer, an update. **Endocrine-Related Cancer**, v. 13, p. 293–325, 2006.

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

LAVRIK, I. N.; GOLKS, A.; KRAMMER, P. H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 15, p. 2665-2672, 2005.

LEITE, C.E.; LUNARDELLI, A.; CASTAMAN, T.A.; PAUL E.L.; OLIVEIRA J.R. Extrato aquoso de *Baccharis trimera* (Asteraceae) diminui a inflamação e o dano celular em pleurisia induzida por veneno de *Dirphia* sp. (Saturniidae), **Revista Brasileira de Análises Clínicas [on line]**, v. 39 (1), p. 29-32, 2007.

LIN, C.; YU, Y.; ZHAO, H.; YANG, A.; YAN, H.; CUI, Y. Combination of quercetin with radiotherapy enhances tumor radiosensitivity *in vitro* and *in vivo*. **Radiotherapy and Oncology**, v. 104 (3), p. 395-400, 2012.

LONNI, A.A.S.G.; SCARMINIO, I.S.; SILVA, L.M.C.; FERREIRA, D.T. Numerical taxonomy characterization of *Baccharis* genus species by ultraviolet-visible spectrophotometry. **Analytical Sciences**, v. 21, p. 235-239, 2005.

LOPES, G.K.; SCHULMAN, H.M.; HERMES-LIMA, M. Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. **Biochemistry Biophysical Acta**, v. 1472 (1-2), p. 142-152, 1999.

LOSQUI, Y. R.; ROZETE, F. S. S.; ALMEIDA, M. B.; BITTENCOURT, A. H. C.; PEREIRA, S. P. F. Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) DC., (Asteraceae) sobre cultura de células *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19 (4), p. 931-936, 2009.

MADKAN, V. K.; COOK-NORRIS, R. H.; STEADMAN, M. C.; ARORA, A.; MENDOZA, N.; TYRING, S. K. The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors. **British Journal of Dermatology**, v. 157, p. 228–241, 2007.

MARSH, S.; LIU G. Pharmacokinetics and pharmacogenomics in breast cancer chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 381–387, 2009.

MENDEZ A.; CHAGASTELLES P.C.; PALMA E.; NARDI N.B.; SHAPOVAL E. Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, p. 95-102, 2008.

MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 872-885, 2008.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MILEO, A. M.; VENERE, D. D.; LINSALATA, V.; FRAIOLI, R.; MICCADEI, S. Artichoke polyphenols induce apoptosis and decrease the invasive potential of the human breast cancer cell line MDA-MB231. *Journal of Cellular Physiology*, v. 227, p. 3301-3309, 2012.

MONGELLI, E.; PAMPURO, S.; COUSSIO, J.; SALOMON, H.; CICCIA, G. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 71, p. 145-151, 2000.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. ***The New England Journal of Medicine***, v. 348, p. 518–527, 2003.

NAKASUGI T.; KOMAI K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 46, p. 2560–2564, 1998.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the Last 25 years. ***Journal of Natural Products***, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. ***Journal of Natural Products***, v. 75, p. 311–335, 2012.

NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. ***Pharmacological Research***, v. 59, p. 365–378, 2009.

NOGUEIRA, N.P.A.; REIS, P.A.; LARANJA, G.A.T.; PINTO, A.C.; AIUB, C.A.F.; FELZENSZWALB, I.; PAES, M.C.; BASTOS, F.F.; BASTOS, V.L.F.C.; SABINO, K.C.C.; COELHO, M.G.P. *In vitro* and *in vivo* toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 138, p. 513– 522, 2011.

NOGUEIRA, R. C.; CERQUEIRA, H. F.; SOARES, M. B. P. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. ***Expert Opinion on Therapeutic Patents***, v. 20, p.1-13, 2010.

OLIVEIRA, C. B. de; COMUNELLO, L. N.; LUNARDELLI, A.; AMARAL, R. H.; PIRES, M. G. S.; SILVA, G. L. da; MANFREDINI, V.; VARGAS, C. R.; GNOATTO, S. C. B.; OLIVEIRA, J. R. de; GOSMANN, G. Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. ***Molecules***, v.17, p. 1113-1123, 2012.

OTAKE, A. H.; CHAMMAS, R.; ZATZ, R. Cancer. Novos alvos para tratamento. **Ciência Hoje**, v.38 (223), p.28-33, 2006.

PÁDUA, B.C.; SILVA, L.D.; JÚNIOR, J.V.R.; HUMBERTO, J.L.; CHAVES, M.M.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.; COSTA, D.C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 381–386, 2010.

PAIM C.S.; FUHR F.; BARTH A.B.; GONCALVEZ C.E.I.; NARDI N.B.; STEPPE M.; SCHAPOVAL, E.E.S. Gemifloxacin mesylate (GFM) stability evaluation applying a validated bioassay method and in vitro cytotoxic study. **Talanta**, v. 83, p. 1774-1779, 2011.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the stimulate of medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plants extracts. **Phytomedicine**, v. 8 (5), p. 395-400, 2001.

PAUL E. L.; LUNARDELLI, A.; CABERLON, E.; OLIVEIRA, C. B. de; SANTOS, R. C. V.; BIOLCHI, V.; BASTOS, C. M. A.; MOREIRA, K. B.; BORDIGNON, F.; GOSMANN, G.; De OLIVEIRA, J. R. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. **Inflammation**, V. 32 (6), p. 419-425, 2009.

PAVAN, A. *Baccharis trimera* Less. (Carqueja Amarga) Uma Planta da Medicina Popular Brasileira. **Anais da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade Federal de São Paulo**, v.10, p. 205-214, 1952.

PERON, A.P.; FELIPES, J.; MATTGE, G.I.; CANTAGALLI, L.B.; MARIUCCI R.G.; VICENTINI V.E.P. Mutagenic evaluation of the medicinal plants *Baccharis trimera* Less. and *Solanum melongena* L. in Wistar rats bone marrow cells. **Revista Brasileira de Biociências [on line]**, v. 6 (2), p. 127–130, 2008.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W.; Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1644, p. 83– 94, 2004.

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

PRIYADARSINI, R. V.; MURUGAN, R. S.; MAITREYI, S.; RAMALINGAM, K.; KARUNAGARAN, D.; NAGINI,S. The flavonoid quercetin induces cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa)

cells through p53 induction and NF-kB inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 649, p. 84-91, 2010.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I. C.S. F.; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p.771-780, 2004.

ROCKENBACH, L.; BAVARESCO, L.; FARIAS, P. F.; CAPPELLARI, A. R.; BARRIOS, C. H.; MORRONE, F. B.; BATTASTINI, A. M. O. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. **Urologic Oncology**, article in press, 2011.

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

RODRIGO, G.; ALMANZA G. R.; CHENG, Y.; PENG, J.; HAMANN, M.; DUAN, R.; AKESSON, B. Antiproliferative effects of curcuphenol, a sesquiterpene phenol. **Fitoterapia**, v. 81, p. 762-766, 2010.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M.F.; GRACE, S.C.; YAMASAKI, H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, v. 177 (1), p. 67-80, 2002.

SGAMBATO, A.; CITTADINI, A. Inflammation and cancer: a multifaceted link. **European Review for Medical Pharmacological Science**, v.14 (4), p.263-268, 2010.

SHEN, S.; LEE, W.; YANG, L.; TSAI, H.; YANG, L.; CHEN, Y. Quercetin enhancement of arsenic-induced apoptosis via stimulation ROS-dependent p53 protein ubiquitination in human HaCaT keratinocytes. **Experimental Dermatology**, v. 21, p. 370-375, 2012.

SILVA, F.G.; OLIVEIRA, C.B.A.; PINTO, J.E.B.P.; NASCIMENTO, V.E.; SANTOS, S.C.; SERAPHIN, J.C.; FERRI, P.H. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18 (5), p. 990-997, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. 1. Reimpressão, Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 1104 P.,2010.

SIMÕES-PIRES, C.A.; DEBENEDETTI, S.; SPEGAZZINI, E.; MENTZ, L.A.; MATZENBACHER, N.I.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, p. 23-32, 2005a.

SIMÕES-PIRES, C. A.; QUEIROZ, E. F.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* Species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. **Phytochemical Analyses**, v. 16, p. 307-314, 2005.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v. 53, p. 37-39, 1987.

SONG, L. L.; KOSMEDER II, J. W.; LEE, S. K.; GERHÄUSER, C.; LANTVIT, D.; MOON, R. C.; MORIARTY, R. M.; PEZZUTO, J. M. Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. **Cancer Research**, v.59, p.578-585, 1999.

SREELATHA, S.; JEYACHITRA, A.; PADMA, P. R. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cell. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1270-1275, 2011.

STAHL, E. Thin-layer chromatography a laboratory handbook. 2 ed. New York Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1041 p., 1969.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecology Oncology**, v. 109, p. 15-21, 2008.

TAKEI, T.; KUGE, Y.; ZHAO, S.; SATO, M.; STRAUS, H. W.; BLANKENBERG, F. G.; TAIT, J. F.; TAMAKI, N. Enhanced apoptotic reaction correlates with suppressed tumor glucose utilization after cytotoxic chemotherapy: use of ^{99m}Tc-annexin v, ¹⁸F-FDG, and histologic evaluation. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 46 (5), p. 794-799, 2005.

TAN, G.; GYLLENHAAL, C.; SOEJARTO, D. D. Biodiversity as a source of anticancer drug. **Current Drug Targets**, v.7, p.265-277, 2006.

THOMPSON, A.M. p53 and breast cancer. **Breast**, v. 2, p. 8-10, 1993.

THORBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies within. **Science**, v. 281, p. 1312-1316, 1998.

TJALMA, W.; DE CUYPER, E.; WEYLER, J.; VAN MARCK, E.; DE POOTER, C.; ALBERTYN, G.; VAN DAM, P. Expression of bcl-2 in invasive and in situ carcinoma of the uterine cervix. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 178 (1), p.113-117, 1998.

TONN, C.E., GIANELLO, J.C., GUIDUGLI, F.H. Some essential oil components of *Baccharis crispa* and *Baccharis articulata*. **Anales de la Asociacion Quimica Argentina**, v. 75 (1), p. 5-6, 1987.

TRUMP, B. F.; BEREZESKY, I. K.; CHANG, S.H.; PHELPS, P. C.; The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicologic Pathology**, v. 25 (1), p.82-88, 1997.

TUNGTEAKKHUN, S. S.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. **Archives of Virology**, v. 153, p.397–408, 2008.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos, **Química Nova**, v. 28 (1), p. 85-94, 2005.

VIEIRA, T. O.; SEIFRIZ, I.; CHARÃO, C. C. T.; DE OLIVEIRA, S. Q.; Creczynski-Pasa, T.B. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21(4), p. 601-607, 2011.

VOUSDEN, K. H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1602, p. 47-59, 2002.

WINTERS, M. Ancient medicine, modern use: *Withania somnifera* and its potential role in integrative oncology. **Alternative Medicine Review**, v. 11 (4), p. 269-277, 2006.

WENTZENSEN, N.; VINOKUROVA, S.; DOEBERITZ, M. VON K. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. **Cancer Research**, v. 64, p. 3878–3884, 2004.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. International agency for research on cancer. **Globocan 2008**. Lyon, 2008. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>. Acesso em: 30.04.2012

XU, G.; MCLEOD, H. L. Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 3314-3324, 2001.

YUAN, Z.; LONG, C.; JUNMING, T. Quercetin-induced apoptosis of HL-60 cells by reducing PI3K/Akt. **Molecular Biology Reports**, v. 39 (7), p. 7785-7793, 2012.

ZARDINI, E.M. Etnobotánica de compuestas argentinas com especial referencia a su uso farmacológico (primera parte). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 3 (1), p. 77-99, 1984.

ZDERÒ, C.; BOHLMANN, F.; SOLOMON, J.C.; KING, R.M.; ROBINSON, H. *Ent*-clerodanes and other constituents from Bolivian *Baccharis* species, **Phytochemistry**, v. 28 (2), p. 531-542, 1989.

ZUNINO, M.P., NEWTON, M.N., MAESTRI, D.M., ZYGADLO, J.A. Essential oils of three *Baccharis* species. **Planta Medica**, v. 64 (1), p. 86-87, 1998.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92 (9), p. 690-698, 2000.

ZUR HAUSSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**, v. 384, p.260-265, 2009.

<http://www.ib.unicamp.br/plant-q-SP/img/plantas/Baccharis.html> (acesso em 14/12/2007).