

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

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ANÁLISE BIOLÓGICA DE ESPÉCIES DO  
GÊNERO *Baccharis***

**Simone Quintana de Oliveira**

Porto Alegre, 2008

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

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ANÁLISE BIOLÓGICA DE ESPÉCIES DO  
GÊNERO *Baccharis***

Tese apresentada por **Simone Quintana de  
Oliveira** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR  
em Ciências Farmacêuticas

**Orientadora: Profa. Dr. Grace Gosmann**

**Co-orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira**

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 17.01.2008, pela Banca Examinadora constituída por

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

Prof. Dr. Jarbas Alves Montanha  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Kellen Christinia Borges de Souza  
Universidade de Caxias do Sul

048c

Oliveira, Simone Quintana de

Composição química e análise biológica de espécies do gênero Baccharis/Simone Quintana de Oliveira – Porto Alegre: UFRGS, 2008. iv, 127 p.:il., tab.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Farmacologia. 2. Baccharis. 3. Asteraceae. I. Gosmann, Grace. II. Moreira, José Cláudio Fonseca. III. Título.

CDU: 547.9:582.998.2

Bibliotecária responsável:

Cláudia da Silva Gonçalves de Leon - CRB 10/1012

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa para o desenvolvimento deste trabalho, ao Laboratório de Fitoquímica deste programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, no qual foi desenvolvida a maior parte do presente trabalho, ao Laboratório de Microbiologia do Curso de Farmácia da UPF, onde foram realizados os ensaios de atividade antibacteriana e ao Laboratório 32 do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS onde foram desenvolvidos os experimentos de avaliação da atividade antioxidante.

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Grace Gosmann pela orientação, amizade, carinho, estímulo e confiança no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira pela co-orientação nos experimentos relativos à atividade antioxidante.

Aos queridos amigos Simone Gnoatto, Juliane Fleck, Gustavo Provensi e Claiton Lencina pela amizade, cumplicidade e muito trabalho em todos estes anos.

Aos queridos amigos Fernanda de Costa, Gisele Barbon, Everton Morais, Anna Carolina Yendo, Luciana Dala Vechia, Cristiane de Oliveira, Caroline e Alexandre Ferraz pelo apoio, carinho e amizade.

Às amigas Vânia Trentin e Virginia Kappel pela ajuda e parceria inestimáveis neste trabalho.

À Viviane Silva Pires, pela amizade e parceria, mesmo à distância.

Ao meu grande amor Gustavo por ter chegado para alegrar ainda mais as nossas vidas e por compreender as ausências da mamãe no final deste trabalho.

Ao Flávio, por tudo.

Aos meus pais, pela vida, dedicação, amor e por terem cuidado com tanto carinho do Gustavo para que eu pudesse concluir este trabalho.

Aos meus sogros, por todo o carinho, amizade e compreensão.

## Sumário

Lista de figuras.....	III
Lista de tabelas.....	IV
Lista de abreviaturas e símbolos.....	V
Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>5</b>
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>9</b>
3.1 Aspectos botânicos.....	11
3.2 Aspectos etnofarmacológicos.....	12
3.3 Aspectos biológicos, farmacológicos e toxicidade.....	13
3.3.1 Atividade antioxidante.....	13
3.3.2 Atividade antimicrobiana.....	16
3.3.3 Atividade antiedematogênica.....	19
3.3.4 Atividades hepatoprotetora e gastroprotetora.....	22
3.3.5 Atividade antiviral.....	23
3.3.6 Toxicidade de espécies do gênero <i>Baccharis</i> .....	24
3.4 Composição química do gênero <i>Baccharis</i> .....	25
3.4.1 Óleos voláteis.....	25
3.4.2 Sesquiterpenos.....	26
3.4.3 Diterpenos.....	28
3.4.4 Triterpenos e saponinas.....	29
3.4.5 Compostos fenólicos.....	30
3.4.5.1 Flavonóides.....	30
3.4.5.2 Outros compostos fenólicos.....	32
<b>CAPÍTULO 1 - Análise cromatográfica de espécies do gênero <i>Baccharis</i> do Sul do Brasil.....</b>	<b>35</b>
<b>Publicação - Differentiation of South Brazilian <i>Baccharis</i> species by TLC.....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 2 - Isolamento e elucidação estrutural das substâncias presentes na fração <i>n</i>-BuOH de <i>B. articulata</i> e <i>B. usterii</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>Publicação a ser submetida - Phytochemical analysis of <i>n</i>-Butanol fractions from <i>Baccharis articulata</i> and <i>Baccharis usterii</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO 3 - Análise da atividade antioxidante dos extratos, frações e substâncias isoladas a partir das partes aéreas de <i>B.</i> <i>articulata</i> e <i>B. usterii</i>.....</b>	<b>63</b>
<b>Publicação a ser submetida - Antioxidant activity of <i>Baccharis articulata</i> and <i>Baccharis usterii</i> extracts and their isolated compounds.....</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO 4 - Avaliação da atividade antibacteriana de <i>B. articulata</i>, <i>B.</i> <i>spicata</i>, <i>B. trimera</i> e <i>B. usterii</i>.....</b>	<b>83</b>
<b>Publicação - Screening of antibacterial activity of South Brazilian <i>Baccharis</i> species.....</b>	<b>85</b>
<b>4 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>91</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>
<b>BIOGRAFIA.....</b>	<b>125</b>

## Lista de figuras

<b>Revisão da literatura</b>	
Figura 1:	<i>B. articulata</i> , <i>B. spicata</i> , <i>B. trimera</i> e <i>B. usterii</i> ..... 12
Figura 2:	Estruturas de tricotecenos macrocíclicos de <i>B. coridifolia</i> ..... 27
Figura 3:	Diterpenos em <i>B. articulata</i> , <i>B. trimera</i> e <i>B. spicata</i> ..... 29
Figura 4:	Flavonóides isolados de <i>B. articulata</i> e <i>B. trimera</i> ..... 31
Figura 5:	Glicosídeos do ácido caféico isolados de <i>B. dracunculifolia</i> ..... 32
Figura 6:	Substância Ba II isolado de <i>B. articulata</i> ..... 33
Figura 7:	Compostos fenólicos isolados de <i>B. usterii</i> e <i>B. trimera</i> ..... 33
<b>Capítulo 1</b>	
Figura 1:	Perfil cromatográfico dos extratos aquosos das espécies de <i>Baccharis</i> com anisaldeído sulfúrico/aquec. 100°C/UV <sub>366 nm</sub> ..... 40
Figura 2:	Perfil cromatográfico dos extratos aquosos das espécies de <i>Baccharis</i> com reagente natural/UV <sub>366 nm</sub> ..... 40
Figura 3:	Perfil cromatográfico dos extratos <i>n</i> -BuOH das espécies de <i>Baccharis</i> com anisaldeído sulfúrico/aquec. 100°C..... 41
<b>Capítulo 2</b>	
Figura 1:	Structures of Ba III, Ba IV, BuF1 and BuF2 compounds..... 61
<b>Capítulo 3</b>	
Figura 1:	TRAP profile of <i>n</i> -butanol fraction from <i>B. articulata</i> and its isolated compounds (A) and <i>n</i> -butanol fraction from <i>B. usterii</i> , its sub-fractions and isolated compounds (B)..... 78
Figura 2:	TAR index (I0/I) of <i>n</i> -butanol fraction from <i>B. articulata</i> and its isolated compounds (A) and <i>n</i> -butanol fraction from <i>B. usterii</i> , its sub-fractions and isolated compounds (B)..... 79
Figura 3:	TBARS levels of <i>n</i> -butanol fraction from <i>B. articulata</i> and its isolated compounds (A) and <i>n</i> -butanol fraction from <i>B. usterii</i> , its sub-fractions and isolated compounds (B)..... 80
Figura 4:	Structures of Ba III, Ba IV, BuF1 and BuF2 compounds..... 81

## Lista de tabelas

	<b>Revisão da literatura</b>	
Tabela 1:	Diterpenos encontrados em espécies do gênero <i>Baccharis</i> .....	28
	<b>Capítulo 2</b>	
Tabela 1:	<sup>13</sup> C and <sup>1</sup> H-NMR data for Ba III and Ba IV compounds.....	59
Tabela 2:	<sup>13</sup> C and <sup>1</sup> H-NMR data for BuF1 and BuF2 compounds.....	60
	<b>Capítulo 4</b>	
Tabela 1:	Results of screening of <i>Baccharis</i> extracts/fractions using disk diffusion method.....	87
Tabela 2:	Results of MBC of active extracts from <i>Baccharis</i> species.....	88



## Lista de Abreviaturas e Símbolos

AcOEt	- Acetato de etila
brs	- broad singlet (simpleto largo)
<i>n</i> -BuOH	- <i>n</i> -butanol
$\delta$	- Valor de deslocamento químico em ppm no espectro de ressonância magnética nuclear
$\delta_C$	- Valor de deslocamento químico em ppm no espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13
$\delta_H$	- Valor de deslocamento químico em ppm no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio
HOAc	- ácido acético
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	- Diclorometano
CHCl <sub>3</sub>	- Clorofórmio
CL	- chemiluminescence (quimioluminescência)
Cq	- Carbono quaternário
<i>d</i>	- Duplete
<i>dd</i>	- Duplo duplete
DEPT	- Distortion less enhancement by polarization transfer
EtOH	- Etanol
ES-MS	- Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
FAB-MS	- Espectroscopia de massas por bombardeamento rápido de átomos
Gli	- Glicose
HMBC	- Heteronuclear multiple bond connectivity
HMQC	- Heteronuclear multiple quantum coherence
<i>J</i>	- Constante de acoplamento
Metanol-d <sub>4</sub>	- Metanol deuterado
PBS	- Tampão salina-fosfato
Rf	- Razão de frente
RMN de <sup>13</sup> C	- Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	- Simpleto
TBARS	- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
sh	- shoulder (ombro)
TRAP	- Potencial antioxidante total
TAR	- Reatividade antioxidante total
<i>t</i>	- Tripleto
UV	- Ultravioleta

## Resumo

O gênero *Baccharis*, Asteraceae, compreende mais de 500 espécies distribuídas exclusivamente no continente Americano. No Brasil estão descritas 120 espécies, sendo que, no Rio Grande do Sul, há relatos de setenta espécies distribuídas desde a região serrana até o litoral. Conhecidas popularmente como carquejas, muitas destas plantas são utilizadas na medicina popular, apesar da sinonímia popular comum e da difícil identificação botânica. Visando ampliar os estudos químicos e biológicos com espécies do gênero *Baccharis* este trabalho teve como objetivos prosseguir os estudos fitoquímicos de *B. articulata*, *B. cylindrica*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*, visando a diferenciação química das mesmas através de cromatografia em camada delgada, avaliar a atividade antibacteriana de *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*, isolar e identificar os compostos presentes nas frações *n*-BuOH de *B. articulata* e *B. usterii* e, ampliar as investigações quanto à atividade antioxidante dessas espécies. Os resultados obtidos permitiram detectar diferenças qualitativas no perfil químico das amostras testadas através da cromatografia em camada delgada e propor metodologia para sua diferenciação química. A partir das frações *n*-BuOH de *B. articulata* e *B. usterii* foram isoladas sete substâncias codificadas como: Ba III (4'-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-3,5-dimetóxi-benzil-tetrahidro-2H-pirano-2-il-acetil-carbonato), Ba IV (4'-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-3,5-di-metóxi-fenil-metanol), Ba V, Ba VI, BuF1 (ácido 4,5-O-[E]-di-cafeoilquínico), BuF2 (7-hidróxi-5,4'-di-metóxi-flavona) e BuT1, respectivamente. As substâncias Ba V, Ba VI e BuT1 encontram-se em elucidação estrutural. Quanto à atividade antioxidante verificou-se que as frações *n*-BuOH de *B. articulata* e *B. usterii* apresentaram efeito antioxidante na concentração de 1,25  $\mu$ g/mL e mantiveram este efeito no decorrer do ensaio TRAP. As substâncias isoladas a partir da fração *n*-BuOH de *B. articulata* não apresentam potencial antioxidante na mesma intensidade que a referida fração. No índice TAR, verificou-se a reatividade instantânea das frações *n*-BuOH destas espécies, bem como da substância BuF1. Quanto a capacidade protetora contra a peroxidação lipídica, as frações *n*-BuOH, as substâncias Ba III, Ba IV, Ba V, as sub-frações fenólica e terpênica (*B. usterii*) e a substância BuF1 foram eficientes em proteger as células da peroxidação. Quanto à atividade antibacteriana verificou-se que a fração *n*-BuOH de *B. spicata* (concentração 1 mg/mL) foi ativa frente a *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *E. faecium* (CBM 50 mg/mL). A fração *n*-BuOH de *B. usterii* na mesma concentração apresentou efeito contra *S. aureus* (CBM 25 mg/mL), *E. faecalis* e *E. faecium* (CBM 50 mg/mL). Os extratos brutos (1 mg/mL) de *B. trimera* e *B. usterii* foram ativos frente a *S. aureus* (CBM 12,5 mg/mL e 25 mg/mL, respectivamente). O extrato bruto e as frações de *B. articulata* não apresentaram atividade frente aos microrganismos testados.

**Palavras-chave:** *baccharis*, antioxidante, fitoquímica, antibacteriana

## Chemical constituents and biological analyses of *Baccharis* species

The *Baccharis* genus, Asteraceae, is native to America, encompassing nearly 500 species of which approximately 120 are found in Brazil. Around 70 species were described in the State of Rio Grande do Sul. Popularly known as “carquejas”, aerial parts of *Baccharis* species are used in traditional medicine in spite of the difficult botanical differentiation among them. In order to continue the phytochemical and biological studies about *Baccharis* species, the objectives of this thesis were to propose a chemical differentiation by thin-layer chromatography of *B. articulata*, *B. cylindrica*, *B. spicata*, *B. trimera* and *B. usterii*, to evaluate the antibacterial activity of *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimera* and *B. usterii*, the isolation and identification of compounds from *n*-BuOH fractions of *B. articulata* and *B. usterii* and to evaluate their antioxidant activity. It was possible to propose a methodology to differentiate the *Baccharis* species studied herein by thin-layer chromatography. From *n*-BuOH fractions of *B. articulata* and *B. usterii* were isolated seven compounds: Ba III (4-O- $\beta$ -D-glucopiranosyl-3,5-dimethoxybenzyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl-acetyl-carbonate), Ba IV (4-O- $\beta$ -D-glucopiranosyl-3,5-dimethoxyphenyl-methanol), Ba V, Ba VI, BuF1 (4,5-O-[E]-dicaffeoylquinic acid), BuF2 (7-hydroxy-5,4'-dimethoxy-flavone) e BuT1. Structural elucidation of Ba V, Ba VI and BuT1 compounds are in course. Regarding the antioxidant activity, it was verified that the *n*-BuOH fractions from *B. articulata* and *B. usterii* showed antioxidant effect at concentration of 1.25  $\mu$ g/mL, which was maintained during the analyzed period on TRAP experiment. The isolated compounds did not show the same antioxidant potential than the *n*-BuOH fractions. TAR index showed the instantaneous reactivity of the *n*-BuOH fractions of these species and BuF1 compound. Regarding the capacity of to protect the cells from lipid peroxidation, the *n*-BuOH fractions, Ba III, Ba IV, Ba V compounds, the phenolic and terpenic sub-fractions (*B. usterii*) and BuF1 compound were efficient to protect the cells from lipid peroxidation. In relation to antibacterial activity it was verified that the *n*-BuOH fraction of *Baccharis spicata* (1 mg/mL) was effective against *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* (MBC 50 mg/mL). The *n*-BuOH fraction of *Baccharis usterii* (1 mg/mL) was effective against *S. aureus* (MBC 25 mg/mL), *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* (MBC 50 mg/ml). The crude extract of *Baccharis trimera* (1 mg/mL) showed activity against *S. aureus* (MBC 25 mg/mL and 12.5 mg/mL, respectively). Extract and fractions from *B. articulata* were not active against the microorganisms tested.

**Key-words:** *baccharis*, antioxidante, fitoquímica, antibacteriana

## 1 Introdução

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae e compreende mais de 500 espécies distribuídas exclusivamente no continente Americano, sendo que a maior concentração destas encontra-se no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México (BUDEL et al., 2005; VERDI et al., 2005). No Brasil estão descritas 120 espécies, sendo que, no Rio Grande do Sul, há relatos de setenta espécies distribuídas desde a região serrana até o litoral (GIULIANO, 2001; BARROSO; BUENO, 2002).

Conhecidas popularmente como carquejas, muitas destas plantas são utilizadas indiscriminadamente pela população, uma vez que, aliado à sinonímia popular comum, destaca-se a difícil identificação botânica, sobretudo para as espécies de caules alados. As espécies tri-aladas, como *B. trimera*, *B. cylindrica* e *B. usterii* são muito difíceis de diferenciar na ausência de flores, assim como as bi-aladas, *B. articulata* e *B. gaudichaudiana*, que são consideradas taxonomicamente semelhantes (ZARDINI, 1984; GIULIANO, 2001; BARROSO; BUENO, 2002).

Destaca-se, também, o elevado valor sócio-econômico atribuído às espécies deste gênero, que além de seu uso medicinal como estomáquicas, sua importância ecológica, na produção de própolis de elevada qualidade e na extração de óleos essenciais empregados na indústria de perfumaria, são também empregadas no combate a erosão e como plantas ornamentais (VERDI et al., 2005).

Por outro lado, outras espécies deste gênero podem ser consideradas plantas invasivas de difícil combate em pastagens, como *B. neglecta* e *B. halimifolia*, as quais são tóxicas para o gado em algumas regiões do Texas e *B. salicifolia*, que inutiliza fontes de água na mesma região (VERDI et al., 2005). Já em pastagens Sul-americanas, os registros apontam para elevada toxicidade de *B. megapotamica* e *B. coridifolia*, que acumulam tricotecenos, substâncias responsáveis pela morte de muitos animais em pastagens brasileiras, uruguaias e argentinas (JARVIS et al., 1991).

Apesar de sua ampla utilização, como destacado acima, os estudos fitoquímicos e biológicos com espécies do gênero *Baccharis* ainda são restritos, especialmente se considerarmos o número de espécies descritas, mesmo aquelas de uso difundido popularmente. Na literatura, os estudos desenvolvidos com

diferentes espécies do gênero *Baccharis*, relatam a presença de diterpenos e flavonóides como constituintes químicos majoritários, e as atividades antiedematogênica, antimicrobiana e antioxidante como as mais relevantes (PALACIOS et al., 1983; GIANELLO; GIORDANO, 1984; ADZET et al., 1991; GENÉ et al., 1996). Outro fato a ser destacado é que esta diversidade de representantes do gênero pode remeter a um grande potencial em metabólitos secundários e atividades biológicas ainda inexploradas.

Em 2003, nosso grupo de pesquisa relatou a presença de um derivado do ácido caféico de caráter inédito (codificado como substância Ba II), isolado do extrato *n*-butanólico de partes aéreas de *B. articulata* e identificado como éster 4'-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-3,5-dimetóxi-benzil-cafeato, o qual apresentou elevada atividade antioxidante (TRAP) (De OLIVEIRA et al., 2003).

Diante desses resultados, iniciamos análises preliminares do potencial antioxidante de extratos brutos e fracionados de outras espécies do gênero, como *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*, os quais apontaram um comportamento semelhante ao observado para *B. articulata*, sendo os extratos *n*-butanólicos, mais ativos que os demais extratos testados. Foi possível verificar também que os extratos *n*-butanólicos de *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*, nas concentrações testadas, apresentaram atividade similar ao Trolox<sup>®</sup>, substância empregada como referência (De OLIVEIRA et al., 2004).

Dessa forma, visando ampliar os estudos iniciados por nosso grupo de pesquisa, este trabalho tem como objetivo prosseguir as análises fitoquímicas destas espécies, contribuindo assim, para a diferenciação química das mesmas, ampliar as investigações quanto à atividade antioxidante e avaliar a atividade antibacteriana dessas espécies, uma vez que não foram encontrados na literatura trabalhos com tais espécies.

## 2 Objetivos

O presente trabalho está dividido em quatro capítulos, os quais contemplam os seguintes objetivos:

**CAPÍTULO 1** – Análise cromatográfica de espécies do gênero *Baccharis* do sul do Brasil;

**Objetivo:** Diferenciar quimicamente através de cromatografia em camada delgada *B. articulata*, *B. cylindrica*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*.

**CAPÍTULO 2** – Isolamento e elucidação estrutural das substâncias presentes na fração *n*-butanólica de *B. articulata* e *B. usterii*;

**Objetivo:** Isolar e identificar os compostos presentes no extrato *n*-butanólico de *B. articulata* e *B. usterii*, visando à atividade antioxidante.

**CAPÍTULO 3** – Análise da atividade antioxidante dos extratos, frações e substâncias isoladas a partir das partes aéreas de *B. articulata* e *B. usterii*;

**Objetivo:** Avaliar o potencial antioxidante dos extratos, frações e substâncias obtidas dos extratos *n*- BuOH de *B. articulata* e *B. usterii*.

**CAPÍTULO 4** – Avaliação da atividade antibacteriana de *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*;

**Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos e frações obtidos a partir das partes aéreas de *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*.

### 3 Revisão da Literatura

A revisão da literatura realizada neste trabalho empregou as seguintes bases de dados: MEDLINE, SCIENCE DIRECT, LILACS, SCIELO, SCOPUS e Web of Science no período de 1970 a 2007.

#### 3.1 Aspectos botânicos

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae abrangendo mais de 500 espécies de ocorrência exclusiva no continente Americano. Para o Brasil são descritas aproximadamente 120 espécies distribuídas desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo que neste Estado são estimadas cerca de setenta espécies (ZARDINI, 1984; CORREIA-JÚNIOR et al., 1991; GIULIANO, 2001; BARROSO; BUENO, 2002; VERDI et al., 2005).

*Baccharis articulata* (Lam.) Persoon (figura 1) é uma espécie comum nos campos secos e pedregosos de São Paulo ao Rio Grande do Sul, Uruguai, Paraguai e Argentina, sendo descrita como arbusto dióico ramificado, com até um metro de altura, com ramos articulados, sem folhas na fase adulta, bialadas, com alas estreitas, planas, verde-acinzentadas e membranoso–coriáceas. Floresce na primavera apresentando flores agrupadas em inflorescência do tipo capítulo, dispostas nas terminações dos ramos, perfumadas, unissexuais, com coloração branca amarelada (BARROSO, 1976; FREIRE; URTUBEY, 1999).

*Baccharis spicata* (Lam.) Baillon (figura 1) é descrita como arbusto, de folhas uni ou trinervadas. Os capítulos são dispostos em glomérulos, os caules se reúnem em ramos foliosos que ocasionalmente podem aparecer isolados. As flores são estaminadas com poucos ramos, aderidos ou separados. As corolas são carpeladas com ápice denticulado (GIULIANO, 2001).

*Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle (figura 1) ocorre no sul do Brasil, Bolívia, Uruguai, Paraguai e Argentina. Está classificada como arbusto ramificado, com ramos articulados, trialados, planos, verde-acinzentados e membranoso–coriáceos. As flores são agrupadas em inflorescência do tipo capítulo, com

coloração branca amarelada, com corolas carpeladas irregularmente denticuladas (BARROSO, 1976; FREIRE; URTUBEY, 1999; GIULIANO, 2001).

*Baccharis usterii* Heering (figura 1) ocorre no Brasil nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, sem registro em outros países. É um arbusto ramificado, com cerca de 0,5 a 1 m de altura, ramos trialados, com alas planas, glabras, com 0,5 a 1,5 cm de largura. As folhas são ovais, curtamente pecioladas, trinérveas. Os capítulos são dispostos em ramos espiciformes, ordenados em panículas amplas. Possui aquênio com cerca de 1 a 1,5 mm de comprimento (BARROSO; BUENO, 2002).



*B. articulata* (Lam.) Persoon



*B. trimera* (Less.) A. P. de Candolle



*B. spicata* (Lam.) Baillon



*B. usterii* Heering

Figura1: *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*  
(<http://www.ib.unicamp.br/plant-aq-SP/img/plantas/Baccharis.html>).



## 3.2 Aspectos etnofarmacológicos

Diversas espécies de *Baccharis* são amplamente utilizadas na medicina popular. Paralelamente a este fato, existe a sinonímia popular comum de carqueja empregada para classificar algumas dessas espécies. *B. articulata* e *B. trimera* são comumente empregadas como hepáticas, digestivas, tônicas e diuréticas (ZARDINI, 1984; ADZET et al., 1991; GUPTA, 1995).

Não foram encontrados dados na literatura sobre a utilização popular de *B. spicata* e *B. usterii*, mas sabe-se que também são conhecidas popularmente com o nome de carqueja, assim como *B. articulata* e *B. trimera*.

## 3.3 Aspectos biológicos, farmacológicos e toxicidade

Diversas espécies do gênero *Baccharis* foram objeto de estudos biológicos, farmacológicos e toxicológicos.

Os primeiros relatos de estudos biológicos do gênero *Baccharis* datam de 1952, quando PAVAN realizou a determinação do índice de amargor, índice de formação de espuma, atividades hemolítica e ictiotóxica, bem como avaliou a toxicidade de extratos preparados por decocção das partes aéreas de *B. trimera*. Os resultados revelaram que os extratos testados possuíam elevado índice de amargor e de formação de espuma, o que poderia ser indicativo da presença de saponinas e, estas substâncias poderiam ser responsáveis pela estimulação gástrica.

Posteriormente, diversas espécies do gênero *Baccharis* foram avaliadas quanto as suas propriedades antioxidantes, antiedematogênicas, antimicrobianas, hepatoprotetoras e antiviral dentre outras atividades.

### 3.3.1 Atividade antioxidante

Diversas espécies vegetais foram avaliadas quanto as suas propriedades antioxidantes. A maioria dessas espécies apresenta em sua constituição química compostos fenólicos, como flavonóides, antocianidinas e fenilpropanóides, derivados dos ácidos caféico, *p*-cumárico e clorogênico (CAO, 1999; HALLIWELL;

GULTERIDGE, 1999; LOPES et al., 1999; CARTROM et al., 2001; SAKIHAMA et al., 2002).

Em relação aos estudos com espécies de *Baccharis*, o primeiro relato é de MONGELLI et al. (1997), os quais avaliaram as atividades antioxidante e citotóxica de diferentes extratos de *B. coridifolia*. A atividade antioxidante foi realizada empregando a indução de quimioluminescência por hidroperóxido em homogenato de fígado de rato. O extrato aquoso apresentou atividade antioxidante com um IC<sub>50</sub> de 141 µg/mL e, os extratos diclorometano e metanol foram pró-oxidantes (1000 µg/mL). Os estudos de citotoxicidade serão discutidos posteriormente neste trabalho.

Ainda em 1997, DESMARCHELIER et al., utilizaram a mesma técnica citada acima e o ensaio com ácido tiobarbitúrico (TBARS) para avaliar a atividade antioxidante de extratos aquosos de dezenove plantas argentinas, incluindo entre estas, *B. coridifolia*, *B. crispa* e *B. grisebach*. Os autores verificaram que *B. coridifolia* e *B. crispa* apresentaram atividade antioxidante dose-dependente nas concentrações de 10-1000 µg/ml em ambos os ensaios realizados e *B. grisebach* apresentou atividade pró-oxidante nas mesmas concentrações.

HERAS et al. (1998) também investigaram a atividade antioxidante de plantas utilizadas na medicina popular do Equador, dentre estas, *B. trinervis*. O extrato etanólico obtido a partir das partes aéreas desta planta apresentou significativa atividade antioxidante *in vitro* na dose de 100 µg/ml, nos três testes empregados: peroxidação microsossomal lipídica (inibição de 74,8 +/- 1,3%), produção de superóxido (inibição de 78,5 +/- 1,3%) e xantina oxidase (inibição de 24,7 +/- 3,1%).

O extrato butanólico de *B. articulata* e a substância Ba II (figura 6), derivada do ácido caféico, identificada como éster 4'-O-β-D-glicopiranosil-3,5-dimetóxi-benzílico, isolada como composto majoritário a partir deste extrato foram empregados em um estudo preliminar do potencial antioxidante. A substância Ba II foi testada nas concentrações de 0,1, 0,2 e 2,0 mM no ensaio para avaliar o potencial antioxidante total (TRAP) e apresentou atividade antioxidante similar ao Trolox<sup>®</sup> em concentrações equimolares. Também foi verificado perfil de atividade semelhante entre esta substância e o extrato butanólico. A substância Ba II, nas concentrações de 0,2 e 2,0 mM, reduziu a formação de substâncias reativas ao

ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a mortalidade celular (em células de Sertoli) induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A proteção contra o estresse oxidativo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi superior ao Trolox<sup>®</sup> nas mesmas concentrações (De OLIVEIRA et al., 2003).

PAREJO et al. (2003) avaliaram a atividade antioxidante de *B. pentlandii* e *B. platypoda* dentre outras plantas da família Asteraceae de ocorrência boliviana. Os autores prepararam um extrato bruto metanólico através de maceração e um outro extrato originado da lavagem deste primeiro extrato com hexano. Além disso, foram testadas também frações hexano, diclorometano e acetato de etila de cada espécie. Os experimentos realizados avaliaram o conteúdo total de compostos fenólicos dos extratos, atividade antioxidante total, a atividade seqüestradora de radicais DPPH, hidroxila e superóxido e a estabilidade oxidativa. As frações acetato de etila de todas as espécies testadas apresentaram maior conteúdo de compostos fenólicos, expressos por GAE/mg (equivalentes do ácido gálico por mg de extrato), sendo que para as espécies de *Baccharis* acima, os valores foram  $207,5 \pm 8,8$  e  $292,3 \pm 14,5$  GAE/mg.

A atividade antioxidante total dos extratos expressa em percentual de inibição, para as espécies de *Baccharis* testadas apresentou valores percentuais baixos comparados às substâncias de referência quercetina e 3-(*t*-butila)-4-hidróxi-anisol (BHA) na ordem de 3,5 a 16 %. Quanto à atividade seqüestradora de radicais livres, o extrato bruto metanólico de *B. pentlandii* exibiu um percentual de inibição do radical superóxido de 93%. Quanto à estabilidade oxidativa (proteção contra rancificação), cujos resultados são apresentados como fator de proteção, a fração acetato de etila de *B. pentlandii* mostrou resultado similar ao da quercetina e superior ao BHA (PAREJO et al., 2003).

De OLIVEIRA et al. (2004), avaliaram a atividade antioxidante de extratos brutos e fracionados de *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii* empregando as técnicas do TRAP e TBARS. Os resultados apontaram que os extratos *n*-BuOH de *B. spicata* e *B. trimera*, na concentração de 25 µg/ml, apresentaram maior potencial antioxidante que o Trolox (1 mM). Em *Baccharis usterii* observou-se que o extrato *n*-BuOH nesta concentração apresentou perfil de atividade similar ao Trolox. Os extratos *n*-BuOH destas espécies, na concentração de 2,5 µg/ml inibiram a peroxidação lipídica causando uma diminuição significativa na produção de malondialdeído (MDA) no

ensaio de TBARS e também foram capazes de proteger as células contra estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Recentemente, SIMÕES-PIRES et al. (2005), realizaram o isolamento e identificação de compostos antioxidantes de *B. trimera*, *B. crispa* e *B. usterii* por HPLC-UV-MS/MS. Os autores isolaram, a partir dos extratos aquosos destas plantas, seis derivados do ácido quínico (ácidos 3-O-[*E*]-cafeoilquinico, 5-O-[*E*]-cafeoilquinico, 4-O-[*E*]-cafeoil-1-metil-quinico, 4,5-O-[*E*]-di-cafeoilquinico, 3,4-O-[*E*]-di-cafeoilquinico e 3,5-O-[*E*]-di-cafeoilquinico). Estes e seus extratos foram avaliados quanto as suas propriedades antioxidantes frente ao radical DPPH empregando bioautografia. Foram empregados quercetina e 2,6-di(*t*-butila)-4-metil-fenol (BHT) como substâncias de referência, e o DPPH foi empregado como agente revelador. Os autores verificaram que os seis compostos isolados, bem como seus extratos de origem, foram capazes de reduzir o radical DPPH.

Em 2007, BRIGHENTE et al., avaliaram a atividade antioxidante frente ao radical DPPH e determinação do teor de compostos fenólicos totais através do método de Folin-Ciocalteu de extratos hidroetanólicos, etanólicos e clorofórmicos das folhas, flores e raízes de *B. illinita* e folhas e raízes de *B. platipoda*, dentre outras plantas. Como substâncias de referência foram empregados os ácidos gálico e ascórbico. Os autores verificaram que a atividade seqüestradora do radical DPPH dos extratos etanólicos das folhas, flores e raízes de *B. illinita* (IC<sub>50</sub> 4,0; 7,0 e 9,0 µg/ml, respectivamente) foi significativa em relação ao ácido ascórbico (IC<sub>50</sub> 8,4 µg/ml). Para os extratos etanólicos das folhas e raízes de *B. platipoda* (IC<sub>50</sub> 9,0 µg/ml, para ambas os extratos) os autores também verificaram o mesmo perfil de atividade. Além disso, em concordância com esses resultados, os extratos que apresentaram maior potencial antioxidante, também apresentaram o maior teor de fenólicos totais em relação ao ácido gálico (IC<sub>50</sub> 2,6 µg/ml).

### **3.3.2 Atividade antimicrobiana**

PALACIOS et al. (1983) foram os primeiros a relatar atividade antimicrobiana para os extratos etanólicos de *B. crispa* e *B. notoserghila*. Os autores prepararam um extrato hidroetanólico na proporção 1:1 a partir das partes aéreas de *B. crispa* e *B.*

*notoserqila*. A verificação da atividade antimicrobiana foi através de bioautografia, técnica que possibilita a observação imediata da(s) substância(s) ativa(s). O flavonóide gencavanina (380 µg) foi ativo frente a *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*, enquanto que a apigenina (750 µg) apresentou atividade frente a *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*.

Outra abordagem foi empregada por RAHALISON et al. (1995) para investigar o efeito antimicrobiano de *B. pedunculata*. Os autores optaram por estudar um extrato apolar desta espécie, ao contrário do trabalho anteriormente citado, obtido por maceração com diclorometano, além de testar a atividade deste contra os fungos *Candida albicans*, *Pityrosporum ovale*, *Aspergillus fumigatus*, *Epidermophytum floccosum*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Cladosporium cucumerinum*, através de bioautografia e diluição em Agar Sabouraud.

A partir deste extrato foram isoladas quatro substâncias, o flavonóide 5,7-diidróxi-6,4'-dimetóxi-flavona, não apresentou atividade frente aos microrganismos testados, o flavonóide 5, 4'-diidróxi-3,6,7-trimetóxi-flavona (100 µg) foi ativo frente a *Candida albicans* e *Cladosporium cucumerinum*, uma acetona acetilênica (10 µg/ml) foi ativa frente a *Epidermophytum floccosum*, *Microsporium gypseum* e *Candida albicans* e, a cumarina ulopterol, frente a *Epidermophytum floccosum* (10 µg/ml) e *Cladosporium cucumerinum* (100 µg) (RAHALISON et al., 1995).

VERÁSTEGUI et al. (1996) empregaram o extrato etanólico de *B. glutinosa* e a técnica de diluição em caldo para avaliar a atividade antimicrobiana frente aos seguintes microrganismos: *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Candida rugosa*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus albidus*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton tonsurans*, *Enterococcus floccosum*, *Sporotrix schenkii*, *Neisseria asteróides*, *Neisseria brasiliensis*, *Salmonella thyphimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris* e *Clostridium perfringens*. O extrato foi preparado com etanol a 80% a temperatura ambiente.

O extrato etanólico de *B. glutinosa* foi ativo frente a *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton tonsurans*, *Enterococcus floccosum*, *Sporotrix schenkii*, *Neisseria asteróides*, *Neisseria brasiliensis*, *Listeria monocytogenes*,

*Proteus vulgaris* e *Clostridium perfringens*, em concentrações que variaram de 10 a 16 mg/mL (VERÁSTEGUI et al., 1996).

Em 2001, COBOS et al., avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *B. notoserghila*. Os autores empregaram cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG – EM) para analisar a composição do óleo essencial obtido das partes aéreas da planta, identificando trinta e um compostos, sendo o  $\alpha$ -pineno, o limoneno, o  $\beta$ -cariofileno e o spatulenol os majoritários. A técnica utilizada para o estudo da atividade antimicrobiana foi a difusão em disco. O óleo foi ativo frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*, nas concentrações de 10 e 50  $\mu$ L com CIM de 227 e 454  $\mu$ g/mL.

Os extratos hexano, diclorometano e metanólico de *B. grisebachii* também foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana empregando métodos de diluição, frente a *E. coli*, *S. aureus* (cepas sensíveis e resistentes a meticilina), *C. albicans*, *C. neoformans*, *S. cerevisiae*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *M. canis*, *T. rubrum*, *E. floccosum*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*. Os extratos hexano e diclorometano foram ativos frente a todos os fungos testados com CIM  $\leq 25$  a  $\leq 1000$   $\mu$ g/mL. *Trychophyton rubrum* foi o microorganismo mais susceptível e *C. neoformans* foi inibida unicamente pelo extrato diclorometano da planta (600  $\mu$ g/mL). Este extrato também foi ativo contra *S. aureus* (sensível/resistente a meticilina) com CIM de 125 a  $\leq 500$   $\mu$ g/mL (FERESIN et al., 2001).

Em 2003, FERESIN et al., ampliando seus estudos da atividade antimicrobiana de *B. grisebachii*, investigaram novamente o extrato diclorometano do qual isolaram doze substâncias. Destas, oito são derivadas do ácido *p*-cumárico, duas são diterpenos tipo labdanos e duas são flavonóides. O extrato e as substâncias isoladas foram testados frente aos mesmos microorganismos empregados no trabalho anteriormente citado e a técnica de verificação da atividade antimicrobiana também foi a mesma.

O diterpeno labda-7,13*E*-dien-2 $\beta$ ,15-diol, foi ativo frente a *M. canis*, *T. rubrum*, *E. floccosum*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*, com CIM entre 12,5 e 50  $\mu$ g/mL. Esta substância também apresentou atividade frente *S. aureus* (cepas sensíveis e resistentes a meticilina) com CIM de 125  $\mu$ g/mL. Os derivados do ácido *p*-cumárico

foram ativos principalmente frente a *E. floccosum*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* com CIM entre 50 e 250 µg/mL. Todos os compostos testados não apresentaram atividade frente a *E. coli* (FERESIN et al., 2003).

### 3.3.3 Atividade antiedematogênica

Em 1987, SALAMA et al. determinaram a atividade antiedematogênica dos extratos metanólico, clorofórmico e etéreo das folhas de *B. decussata* através da indução de edema plantar por dextrano em ratas, empregando fenilbutazona como substância de referência. Os extratos foram administrados aos animais por via gástrica na dose de 10 mg/kg. Os resultados apontaram que os extratos metanólico e etéreo apresentaram efeito antiedematogênico maior que a substância de referência na dose de 65 mg/kg.

*Baccharis crispa* e *B. articulata* também foram analisadas quanto à atividade antiedematogênica por ADZET et al. (1991), através da indução de edema plantar por carragenina em ratas, utilizando como substância de referência, naproxeno. O extrato aquoso das partes aéreas de cada uma dessas espécies foi administrado intraperitonealmente na dose de 100 mg/kg de peso do animal. O extrato aquoso de *B. articulata* não produziu atividade significativa em relação à substância de referência nas três medidas realizadas. Para *B. crispa*, as medidas realizadas no extrato aquoso na terceira e quinta horas transcorridas da administração, apontaram percentual de inibição de 32,85 e 30,00% respectivamente.

GENÉ et al. (1992) investigaram a ação antiedematogênica dessas mesmas espécies e, também, de *B. trimera*. Os autores empregaram a mesma técnica do trabalho anterior, porém os extratos aquosos dessas plantas foram administrados por via oral e intraperitoneal (100 mg/kg) às ratas. Os resultados apontam que os extratos aquosos de *B. articulata* e *B. crispa* não produziram efeito antiedematogênico quando comparados ao naproxeno na dose de 5 mg/kg. O extrato aquoso de *B. trimera* administrado via intraperitoneal produziu um índice de inibição de edema de 61,34%, sendo superior ao efeito produzido pelo naproxeno (47,14%).

PÉREZ et al. (1995) avaliaram a atividade antiedematogênica do extrato diclorometano obtido a partir das partes aéreas de *B. incarum*. Os autores também empregaram a metodologia de indução de edema plantar com carragenina em ratos Wistar. O extrato foi administrado via intraperitoneal na dose de 100 mg/kg e o naproxeno na dose de 5 mg/Kg aos animais testados. Os resultados apontaram que o extrato diclorometano de *B. incarum* produziu um efeito inibitório de 44,5%, sendo superior ao naproxeno que foi de 25,9%.

Os extratos diclorometano, aquoso e metanólico obtidos por maceração das partes aéreas de *B. tucumanensis* também foram avaliados por MUSCHIETTI et al. (1996), quanto à ação antiedematogênica, por via tópica, na dose de 1 mg/orelha, e intraperitoneal, na dose de 100 mg/Kg. Seus efeitos foram comparados à indometacina na dose de 2,5 mg/kg. A metodologia empregada foi a indução de edema com carragenina e com óleo de *Croton* sp. nas orelhas dos animais. Edema subplantar também foi induzido por carragenina e os extratos foram administrados via intraperitoneal. Foi observado que os extratos aquoso e metanólico produzem índices de inibição de 28,1 e 55,3%, respectivamente, sendo superiores ao da indometacina (19,1%), ao contrário do extrato diclorometano, cujo índice inibitório foi de 14%. Quando os extratos foram administrados via tópica e o edema induzido com óleo de *Croton* sp., foi verificado que os extratos aquoso, metanólico e diclorometano apresentam índices inibitórios de 58, 93,4 e 100%, respectivamente, produzindo um efeito antiedematogênico superior ao da indometacina (49%) (MUSCHIETTI et al., 1996).

GENÉ et al. (1996) investigaram as atividades antiedematogênica, analgésica e ulcerogênica da fração butanólica obtido a partir de um extrato aquoso das partes aéreas de *B. trimera*. Para a avaliação da atividade antiedematogênica, os autores utilizaram o método de indução de edema plantar em ratos com carragenina e dextrano e administraram o extrato, via intraperitoneal, nas doses de 40 e 80 mg/kg. O naproxeno (5 mg/kg) foi empregado como substância de referência. Para a avaliação da atividade ulcerogênica foram empregadas soluções aquosas da fração butanólica de *B. trimera*, nas doses de 50 e 100 mg/kg. Transcorridas quatro horas da administração do extrato aquoso e da fração butanólica, os estômagos dos animais foram removidos e examinados ao microscópio. A atividade analgésica foi avaliada mediante administração da fração butanólica de *B. trimera* nas doses de 50



e 100 mg/kg, via intraperitoneal, trinta minutos após a estimulação do processo doloroso com ácido acético 0,8% na dose de 1 mL/100 g, via intraperitoneal. Os resultados demonstraram que há um efeito dose dependente no edema induzido por carragenina, evidenciado no aumento da inibição do edema com o aumento da dose da fração butanólica.

O percentual de inibição do edema da fração butanólica de *B. trimera*, nas doses de 40 e 80 mg/Kg foi superior ao naproxeno. Quando a indução do edema foi conduzida fração para se obter efeito inibitório, como observou-se na dose de 100 mg/kg que foi capaz de produzir inibição do edema superior a metisergida na dose de 1 mg/kg. Quanto à atividade ulcerogênica os resultados demonstram que a fração butanólica de *B. trimera* foi capaz de produzir pequenas úlceras, conforme o aumento da dose administrada (GENÉ et al., 1996). Os autores relataram o fracionamento bioguiado pelo experimento de indução de edema plantar, da fração butanólica de *B. trimera* originando uma fração ativa composta por uma mistura de saponinas identificadas por hidrólise como derivadas do ácido equinocístico. Esta fração produziu um efeito inibitório na dose de 3,5 mg/kg via intraperitoneal de 48,3%, enquanto que a indometacina na dose de 2,5 mg/kg apresentou um percentual de inibição de 72,6% (GENÉ et al., 1996).

HERAS et al. (1998) investigaram a atividade antiedematogênica do extrato etanólico de *B. trinervis* obtido a partir das partes aéreas da planta. Os autores também empregaram a indução de edema por carragenina em pata de rato, sendo a administração do extrato realizado por via oral, na dose de 1,25 g/kg, utilizando como veículo uma mistura de Tween 80, etanol e água na proporção (2:2:20, v/v), após 1 hora da indução do edema. A fenilbutazona (2,5 mg/kg) foi empregada como substância de referência. O edema produzido foi medido em 3, 5 e 7 horas após o tratamento com o extrato. Os resultados indicaram que o extrato testado, nas três medidas realizadas, produziu efeito inferior ao da fenilbutazona. Os índices inibitórios foram de 12,6, 32,9 e 21,8% para o extrato etanólico de *B. trinervis* e 71,4, 66,6 e 59,2% para a fenilbutazona.

GIANELLO et al. (1999) investigaram a atividade antiedematogênica dos flavonóides 7,3'-dimetil-éter-luteolina, homoeridictiol e eridictiol isolados a partir do extrato acetônico das partes aéreas de *B. calliprinos* e *B. rhetinodes*. As substâncias foram administradas via intraperitoneal na dose de 75 mg/kg e seus efeitos foram

comparados a fenilbutazona, 1, 3, 5 e 7 horas após a indução do edema. Os resultados apontaram que o flavonóide 7,3'-dimetil-éter-luteolina foi o composto mais ativo, atingindo índices inibitórios de 18, 32, 40 e 13%, nas quatro medidas realizadas, enquanto que os índices observados para a fenilbutazona foram 19, 44, 40 e 37%.

CIFUENTE et al. (2001) estudaram a atividade antiedematogênica de *B. medullosa* e *B. rufescens* através de indução de edema plantar em ratos com carragenina, empregando fenilbutazona como substância de referência. Foi preparado um extrato bruto acetônico das partes aéreas das plantas o qual, depois de evaporado o solvente e retomado em água, foi submetido a sucessivos particionamentos em *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila. O extrato bruto, as frações e a substância de referência foram administradas via intraperitoneal nas doses de 80 mg/kg, e o edema plantar medido após 1, 3, 5 e 7 horas transcorridas da administração do agente flogístico. A fração *n*-hexano de *B. medullosa* e o extrato acetônico e a fração clorofórmica de *B. rufescens* apresentaram percentual de inibição de edema máximo após 5 horas de 64, 52 e 50% respectivamente, enquanto que a fenilbutazona apresentou um percentual de 48% no mesmo período.

### **3.3.4 Atividades hepatoprotetora e gastroprotetora**

SOICKE; LENG-PESCHLOW (1987) avaliaram a ação hepatoprotetora do extrato acetato de etila obtido a partir das partes aéreas de *B. trimera* e dos flavonóides quercetina, luteolina, nepetina, apigenina e hispidulina, isolados do mesmo. O extrato e os flavonóides isolados foram administrados via intraperitoneal nas doses de 10 e 50 mg/kg, após processo de ressuspensão em salina com Tween 20 e centrifugação, sendo apenas o sobrenadante utilizado. A atividade hepatoprotetora foi identificada em ratos intoxicados com 3,4 mg/kg de faloidina via intraperitoneal. Transcorrida 1 hora da administração da faloidina, o extrato aumentou a sobrevivência dos animais. O composto isolado mais ativo foi a hispidulina, aumentando o índice de sobrevivência para 80%.

BAGGIO et al. (2003) publicaram um estudo sobre o efeito gastroprotetor de extratos brutos hidroalcoólico e aquoso de *B. illinita*. Foram induzidas lesões gástricas agudas nos ratos com o uso de etanol 70% (grupo 1), indometacina (20

mg/kg, via subcutânea) (grupo 2) e estresse (induzido por anestesia com éter até a imobilização) (grupo 3), caracterizando três grupos teste distintos. Os animais foram sacrificados uma hora após o tratamento no grupo 1, seis horas no grupo 2 e três horas no grupo 3. Os estômagos foram removidos e a mucosa lavada e examinada para a quantificação das lesões. O extrato hidroalcoólico administrado nas doses de 1 a 6 g/kg via oral, não produziu sinais de toxicidade nos animais e protegeu-os contra lesões produzidas por etanol. Os autores concluíram que estas plantas apresentaram um efeito protetor contra lesões da mucosa gástrica envolvendo os fatores naturais de proteção da mesma como a manutenção do muco, fluxo de bicarbonato e sangue.

### 3.3.5 Atividade antiviral

*Baccharis trinervis* e *B. teindalensis* foram submetidas a um *screening* de atividade antiviral *in vitro* contra o HSV-1 (vírus do Herpes simplex tipo I), VSV (vírus da estomatite vesicular) e poliovírus tipo 1 através da avaliação do efeito citopático sobre células HeLa (células de carcinoma cervical humano). O extrato aquoso de *B. trinervis* apresentou o potencial de inibição contra a replicação do HSV-1 de 100%, nas concentrações de 50 – 200 µg/mL, sem apresentar efeito citotóxico. O extrato etanólico de *B. teindalensis* (50 – 125 µg/mL) inibiu a replicação do VSV. Nenhum extrato foi efetivo sobre a replicação do poliovírus tipo 1 (ABAD et al., 1999a).

Extratos etanólico e aquoso de *B. genistelloides* e *B. rubricaulis* também foram submetidos à avaliação da atividade antiviral empregando a mesma técnica e frente aos os mesmos vírus do trabalho anterior. O extrato aquoso de *B. genistelloides* inibiu a replicação do HSV-1 nas concentrações de 25 – 50 µg/mL, bem como a replicação do VSV nas concentrações de 25 – 125 µg/mL (ABAD et al., 1999b).

PALOMINO et al. (2002), realizaram um estudo de atividade antiviral contra o HIV (vírus da imunodeficiência humana) com extratos aquosos e etanólicos de *B. trinervis*, *B. teindalensis*, *B. genistelloides* e *B. rubricaulis*. Unicamente o extrato aquoso (10 - 400 µg/mL) de *B. trinervis* apresentou potente atividade inibitória contra este vírus *in vitro* no ensaio MTT, e nenhum efeito citotóxico foi observado mesmo

na maior concentração empregada. Este extrato foi submetido a fracionamento preliminar em coluna cromatográfica com Sephadex LH-20, sendo obtidas quatro frações, as quais também foram submetidas ao mesmo ensaio. As duas primeiras frações eluídas da coluna inibiram a replicação do HIV em células MT-2 (linfoma humano) infectadas, sem apresentar efeitos citotóxicos, nas concentrações de 10 a 200 µg/mL.

MONTANHA et al. (2004) verificaram a atividade antiviral contra o vírus HSV-1 (cepas KOS, ATCC e AC-R) em células Vero de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *B. articulata*, *B. cylindrica*, *B. conyzoides*, *B. erigeroides*, *B. erioclata*, *B. megapotamica*, *B. mesoneura*, *B. patens*, *B. pseudotenuifolia*, *B. punctulata*, *B. radicans*, *B. semiserrata*, *B. spicata*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. uncinella* e *B. usterii* dentre outras plantas. Os resultados (efeito citopático – CPE) indicaram que o extrato aquoso (1,25 mg/mL) e hidroetanólico (0,5 mg/mL) de *B. erioclata* foi ativo frente as três cepas virais avaliadas. Para o extrato hidroetanólico de *B. megapotamica* (0,005 mg/mL) foi verificada atividade anti-herpética frente a cepa KOS, enquanto que o extrato hidroetanólico de *B. uncinella* (1,25 mg/mL) foi ativo frente as cepas KOS e AC-R.

### 3.3.6 Toxicidade de espécies do gênero *Baccharis*

As espécies do gênero *Baccharis*, sobre as quais existe maior número de estudos quanto à toxicidade são *B. coridifolia* e *B. megapotamica*. Tal propriedade vincula-se a presença de tricotecenos macrocíclicos nessas espécies.

Os primeiros relatos são da década de 70 quando TOKARNIA e DOBEREINER (1976) e DOBEREINER et al. (1976) relataram seus estudos de intoxicação experimental de bovinos, ovinos e coelhos por *B. coridifolia*, demonstrando que tal planta poderia causar a morte desses animais. Já nas décadas de 80 e 90 outros autores descobriram que o responsável pela intoxicação dos animais por *B. coridifolia* era a presença de micotoxinas tóxicas conhecidas como tricotecenos macrocíclicos (HABERMEHL et al., 1985, 1989; JARVIS et al., 1987b, 1988, 1991, 1996; RIZZO et al., 1997). Também foi relatada a presença de

tricotecenos em *B. megapotamica* (KUPCHAN et al., 1971, 1977; JARVIS et al., 1987a) e em *B. artemisoides* (RIZZO et al., 1997).

MONGELLI et al. (1997) verificaram que o extrato diclorometano de *B. coridifolia* (1 mg/mL) inibiu o crescimento das células KB (células do carcinoma oral epidermóide humano) em 78%. Os estudos da atividade antioxidante deste e outros extratos desta planta foram relatados anteriormente.

Em 2000, MONGELLI et al. estudaram a atividade citotóxica dos extratos diclorometano e metanólico das partes aéreas de *B. grisebachii*, usada na medicina popular da Argentina contra o câncer. Os extratos da planta foram testados frente a uma linhagem de células KB (células de carcinoma oral epidermóide humano), quanto à inibição de tumores superiores de vesícula e interação com DNA. Os extratos cuja ED<sub>50</sub> foram menores que 50 µg/mL foram considerados ativos em relação aos primeiros testes. O extrato diclorometano de *B. grisebachii* foi inativo frente às células KB, apresentando um ED<sub>50</sub> maior que 200 µg/mL, apresentou atividade inibitória dos tumores superiores de vesícula na ordem de 60% e não foi capaz de interagir com DNA, pois o índice de diminuição da absorvidade do complexo DNA - verde de metila foi inferior a 20%. O extrato metanólico não apresentou atividade nos testes realizados.

### **3.4 Composição química do gênero *Baccharis***

#### **3.4.1 Óleos voláteis**

Estudos demonstram uma grande diversidade quanto à composição de óleos voláteis em espécies do gênero *Baccharis*.

MOLT; TRKA (1983) identificaram mirceno, *p*-cimeno,  $\Delta^3$ -careno,  $\beta$ -felandreno, cariofileno,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ -elemeno, espatulenol e di-hidrocinamato de etila no óleo volátil de *B. dracunculifolia*.

Em *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon e *Baccharis crispa* foram identificados  $\alpha$ -pineno, *cis*-cariofileno,  $\beta$ -guaieno,  $\gamma$ -elemeno,  $\delta$ -cadineno e aromadendreno (TONN et al., 1987).

Das partes aéreas de *B. ochracea* foram caracterizados terpinen-4-ol, cariofileno,  $\beta$ -cariofileno e germacreno-D (SOBOTTKA, 1992).

LOAYZA et al. (1995) analisaram *B. salicifolia*, *B. latifolia* e *B. dracunculifolia* coletadas em diferentes áreas de cultivo relatando a presença de quatro grupos de compostos, monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, como a germacrona e o ledol.

FERRACINI et al. (1995) investigaram a composição dos óleos voláteis em 7 espécies do gênero *Baccharis*. Foram relatadas as presenças de  $\beta$ -cariofileno em *B. dracunculifolia*,  $\beta$ -pineno, limoneno,  $\beta$ -cariofileno e espatulenol em *B. erioclata*,  $\delta$ -cadineno, (*E*)-nerolidol e espatulenol em *B. myriocephala*, espatulenol em *B. platipoda* e *B. tridentada* e  $\beta$ -cariofileno e  $\delta$ -adineno em *B. vincaefolia*.

A composição de óleos voláteis de três espécies do gênero *Baccharis* foi descrita por ZUNINO et al. (1998) relatando como constituintes majoritários de *B. articulata* o  $\beta$ -cariofileno e o (*E*)-nerolidol, de *B. myrtilloides* o germacreno-D e de *B. rufescens*, o limoneno e o (*E*)-nerolidol.

BAILAC et al. (2001) relataram a composição do óleo volátil de *B. coridifolia*, destacando como componentes majoritários isocariofileno,  $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno e  $\beta$ -selineno.

COBOS et al. (2001) avaliaram a composição do óleo volátil de *B. notoserghila*. Foram identificados  $\alpha$ -pineno, limoneno,  $\beta$ -cariofileno e espatulenol. Os autores também verificaram que este óleo apresentou moderada atividade antimicrobiana.

Ainda em 2001, ZUNINO et al. identificaram trans-nerolidol, cadinol e cubenol, como constituintes principais em *B. cordobensis*.

No mesmo ano, a partir do óleo volátil de *B. uncinella*, FRIZZO et al. obtiveram  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, espatulenol, globulol, (*E*)-nerolidol, biciclogermacreno e terpinen-4-ol.

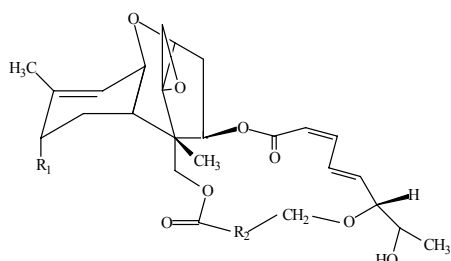
### 3.4.2 Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos mais importantes relatados para o gênero *Baccharis* são os tricotecenos. Essas substâncias representam o mais importante grupo de micotoxinas, responsáveis por um grande número de relatos de intoxicações em animais e em humanos. Os tricotecenos são amplamente estudados devido sua potencial atividade citotóxica sobre alguns tipos de células tumorais, sobretudo em células sangüíneas e também por suas propriedades antibióticas (KUPCHAN, 1977; JARVIS et al., 1986, 1987b, 1991, 1996; RIZZO et al., 1997; VARASCHIN et al., 1998).

Estes compostos encontram-se principalmente em *B. coridifolia* e *B. megapotamica* estando divididos em duas categorias, os tricotecenos simples, como as toxinas T2 e HT-2, descritos por MIROCHA et al. (1988; 1989) e os tricotecenos macrocíclicos, baccharinoides, roridinas e verrucarinas (figura 2) (HABERMEHL et al., 1985; JARVIS et al., 1986, 1987, 1991, 1996; VARASCHIN et al., 1998).

RIZZO et al. (1997) também descreveram a presença das roridinas A, E e D em *B. artemisioides*, sendo este o único relato da presença destas substâncias em outra espécie do gênero *Baccharis*.

Por outro lado, os tricotecenos também são relatados em fungos do gênero *Myrothecium* sp., os quais, muitas vezes, encontram-se associados às espécies do gênero *Baccharis*. Inicialmente, acreditava-se que a produção destas substâncias ocorria devido à interação planta-fungo, entretanto, os pesquisadores verificaram que plantas não infectadas por estes fungos também produzem tricotecenos (JARVIS et al., 1989, 1991; ROSSO et al., 2000; GARCIA et al., 2002).



**roridina A:**  $R_1 = \text{CHOHCH}_2\text{CH}_2$ ;  $R_2 = \text{CH}=\text{CCH}_2\text{CH}_2$

**roridina D:**  $R_1 = \text{CHOCCCH}_2\text{CH}_2$ ;  $R_2 = \text{CH}=\text{CCH}_2\text{CH}_2$

**roridina E:**  $R_1 = \text{H}$ ;  $R_2 = \text{CH}=\text{CCH}_2\text{CH}_2$

**verrucarina A:**  $R_1 = \text{CHOHCHCH}$ ;  $R_2 = R_3 = \text{O}$

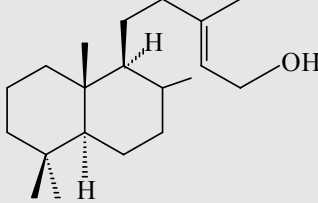
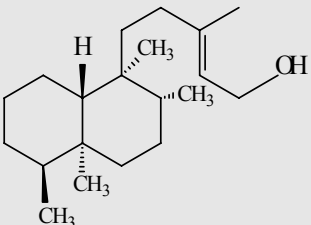
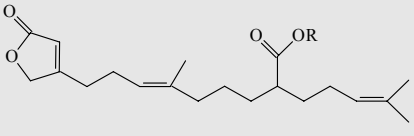
**verrucarina J:**  $R_1 = \text{CH}=\text{CCH}_2$ ;  $R_2 = R_3 = \text{O}$

Figura 2: Estruturas de tricotecenos macrocíclicos de *B. coridifolia* (JARVIS et al., 1988).

### 3.4.3 Diterpenos

Os diterpenos constituem a classe de compostos mais abundante em espécies do gênero *Baccharis*, sendo relatados para a maioria das espécies (tabela 1). As estruturas dos diterpenos relatados para as espécies de interesse neste trabalho estão representadas na figura 3.

Tabela 1: Diterpenos encontrados em espécies do gênero *Baccharis*

Tipos de Diterpenos (núcleo básico)	Espécies	Referências
<p><b>clerodanos</b></p> 	<p><i>B. artemisioides</i>  <i>B. articulata</i>  <i>B. boliviensis</i>  <i>B. gilliesii</i>  <i>B. myrsinites</i>  <i>B. obtusifolia</i>  <i>B. peruviana</i>  <i>B. pingraea</i>  <i>B. trimera</i>  <i>B. tricuneata</i>  <i>B. rhetinoides</i>  <i>B. salicifolia</i>  <i>B. santelicis</i>  <i>B. sarothroides</i>  <i>B. vaccinoides</i>  <i>B. crispa</i>  <i>B. lejia</i>  <i>B. flabellata</i>  <i>B. gaudichaudiana</i></p>	<p>TONN et al., 1982.            STAPEL et al., 1980; DAI et al., 1993            ZDERO et al., 1989            LI et al., 1997            ZDERO et al., 1986.            ZDERO et al., 1986            ARRIAGA - GINER et al., 1986.            ZDERO et al., 1986.            ZDERO et al., 1989.            WAGNER et al., 1978.            ZDERO et al., 1989.            ZDERO et al., 1986.            ZDERO et al., 1991.            ZDERO et al., 1989.            CEÑAL et al., 1997            LABBE et al., 1991.            SAAD et al., 1988;            HIKAWCZUK et al., 2002.            AKAIKE et al., 2003; GUO et al.,            2006, 2007.</p>
<p><b>Labdanos</b></p> 	<p><i>B. boliviensis</i>  <i>B. gaudichaudiana</i>  <i>B. latifolia</i>  <i>B. paniculata</i>  <i>B. pedunculata</i>  <i>B. petiolata</i>  <i>B. pingraea</i>  <i>B. salicifolia</i>  <i>B. sternbergiana</i>  <i>B. polifera</i></p>	<p>ZDERO et al., 1989.            FULLAS et al., 1992.            ZDERO et al., 1989.            FAINI; CASTILLO, 1990.            JAKUPOVIC et al., 1991.            ZDERO et al., 1991.            ZDERO et al., 1986; WÄCHTER et al.,            1999            ZDERO et al., 1986.            ZDERO et al., 1989.            ZDERO et al., 1986</p>
<p><b>Der. Geranilgeraniol</b></p> 	<p><i>B. ochraceae</i></p>	<p>SCHENKEL et al., 1997.</p>



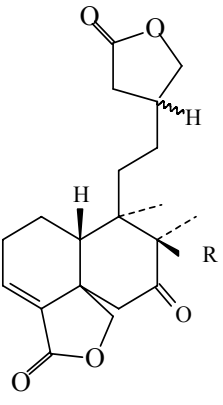
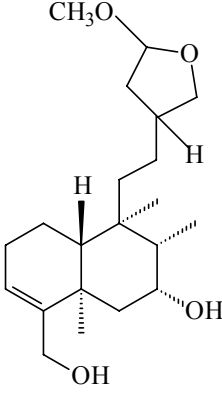
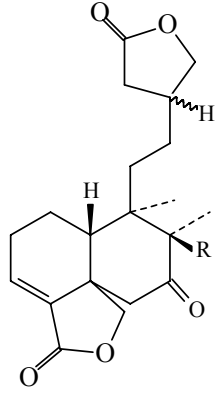
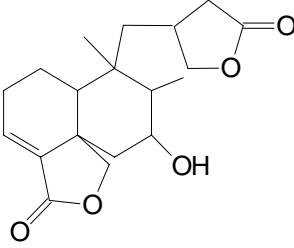
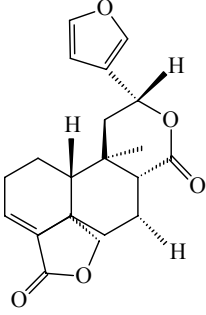
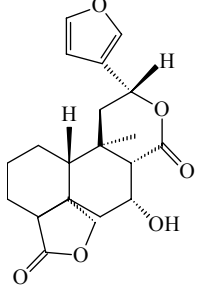
		
<p><b><i>Baccharis articulata</i></b> articulina R=H acetato de articulina R= CH<sub>3</sub>OCO-</p>	<p><b><i>Baccharis articulata</i></b> 15,16-epóxi-7<math>\alpha</math>,18-diidróxi- 15-metóxi-<i>ent</i>-cleroda-3- eno</p>	<p><b><i>Baccharis articulata</i></b> R=OH (8<math>\beta</math>-hidróxi-7-oxo- <i>ent</i>-cleroda-3-en-15,18- diácido-16,19-dilactona) R=H (7-oxo-16,19-diidróxi- 3,4-desidroclerodan-15,20- diácido-dilactona)</p>
		
<p><b><i>Baccharis trimera</i></b> lactona diterpênica</p>	<p><b><i>Baccharis spicata</i></b> bacchotriconeatina A</p>	<p><b><i>Baccharis spicata</i></b> 6<math>\alpha</math>-hidróxi- bacchotricuneatina A</p>

Figura 3: Diterpenos em *B. articulata*, *B. trimera* e *B. spicata* (STAPEL et al., 1980; ZDERO et al., 1989; DAI et al., 1993; GALLARDO et al., 1996).

### 3.4.4 Triterpenos e saponinas

Os triterpenos são encontrados em algumas espécies do gênero *Baccharis*, sendo o mais comum representante dessas substâncias o ácido oleanólico, descrito por SILVA et al. (1971) em *B. rhomboidales*. Essa substância também é relatada em *B. gilliessi* (GIANELLO; GIORDANO, 1984), *B. salicifolia* (WARNING et al., 1986), *B.*

*patagonica* (RIVERA et al., 1988), *B. flabellata* (SAAD et al., 1988) e *B. linearis* (HE et al., 1996; ARGANDOÑA et al., 1993).

A presença de saponinas é mencionada por PAVAN (1952) e SALAMA et al. (1987) através da determinação do índice de espuma e do poder hemolítico em *B. trimera* e *B. decussata*.

GENÉ et al. (1996) detectaram a presença de cinco saponinas em *B. trimera*, sendo que apenas a aglicona da saponina majoritária, obtida através de hidrólise ácida da fração bruta, foi identificada como derivada do ácido equinocístico.

Não foram encontrados na literatura relatos da presença dessas substâncias em *B. articulata*, *B. spicata* e *B. usterii*.

### 3.4.5 Compostos fenólicos

#### 3.4.5.1 Flavonóides

Em *Baccharis sarothroides* destacam-se flavonóides com atividade citotóxica, como a centauredina e 3,4'-di-metóxi-3',5,7-tri-hidróxi-flavona (KUPCHAN; BAUERSCHMIDT, 1971).

A partir das partes aéreas de *B. crispa* foram isolados e identificados a gencavanina, apigenina, 7,4'-dimetilapigenina, 5-hidróxi-7,4'-di-metóxi-flavona e 5,3'-di-hidróxi-7,4'-dimetil-flavona (BANDONI et al., 1978; PALACIOS et al., 1983; GIANELLO; GIORDANO, 1984).

Em *Baccharis gilliessi* e *B. myrtilloides* foi caracterizado o flavonóide jaceidina (GIANELLO; GIORDANO, 1984).

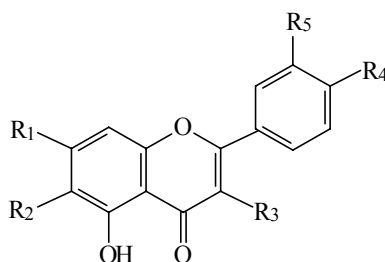
Além desses, ainda são citados flavonóides para *B. petiolata* (isoramnetina e desmetoxicentauredina), *B. confertifolia* (7,4'-di-metil-naringenina, 7,3',4'-tri-metil-eriodictiol, 7,3'-di-metil-eriodictiol, 3',4'-di-metil-eridictiol e escopoletina), *B. paniculata* (3,7-di-metil-quercetina, isoramnetina e 7-metil-eriodictiol) e *B. concava* (cirsimaritina) (ZAMORANO et al., 1987; FAINI; CASTILLO, 1990), *B. angustifolia* (isoquercitrina) (WAGNER et al., 1972), *B. grisebachii* (pectoolinaringenina e nevadencina) (GIANELLO; GIORDANO, 1987), *B. ochracea* (isoquercitrina)

(SCHENKEL et al., 1997), *B. glutinosa* (5,7-di-hidróxi-flavanona) (MIYAKADO et al., 1976), *B. magellanica* (hispidulina e escopoletina) (RIVERA et al., 1988), *B. calliprinos* (7,3'-di-metil-éter- luteolina, homoeriodictiol e eridictiol-3',4'-di-metil-éter), *B. rethinoides* (7,3'-di-metil-éter-luteolina) (GIANELLO et al., 1999).

Para *Baccharis trinervis* são descritos pectolinarigenina, salvigenina e penduletina (SHARP et al., 2001).

A distribuição de flavonóides nas espécies de interesse neste estudo é bastante diversificada. Especificamente para *Baccharis articulata* foram caracterizados os flavonóides gencavanina, acacetina, 7,4'-di-metil-apigenina, cirsimaritina e salvigenina (GIANELLO; GIORDANO, 1984). Para *B. trimera* foram descritos eupatorina, cirsimaritina, hispidulina, canferol, luteolina, nepetina, quercetrina, 5-hidróxi-3',4',6,7-tetra-metóxi-flavona, 3-O-metil-quercetina e apigenina, dentre outros (HERZ et al., 1977; SANTOS FILHO et al., 1980; DAILY et al., 1984; SOICKE; PESCHLOW, 1987; MELLO, 1989; RENDON; VILA, 1995; GENÉ et al., 1996). A figura 4 apresenta os flavonóides descritos para estas espécies.

Para as demais espécies não foram encontrados relatos da ocorrência destas substâncias.



Espécie	Nome	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b><i>B. articulata</i></b>	acacetina	H	H	H	CH <sub>3</sub>	H
	7,4'- dimetil-apigenina	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H
	cirsimaritina	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H
	salvigenina	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H
	gencavanina	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H
<b><i>B. trimera</i></b>	quercetina	OH	H	OH	OH	OH
	luteolina	OH	H	H	OH	OH
	nepetina	OH	CH <sub>3</sub> O	H	OH	OH
	apigenina	OH	H	H	OH	H
	hispidulina	OH	CH <sub>3</sub> O	H	OH	H

Figura 4: Flavonóides isolados de *B. articulata* e *B. trimera* (GIANELLO; GIORDANO, 1984; ARRIAGA-GINER, 1986; SOICKE; PESCHLOW, 1987; MELLO, 1989; RENDON; VILA, 1995; GENÉ et al., 1996).

### 3.4.5.2 Outros compostos fenólicos

Derivados do ácido caféico também são encontrados em algumas espécies do gênero *Baccharis*. NAGATANI et al. (2001) relataram o isolamento de dez novos glicosídeos derivados do ácido caféico (dracunculifosídeos) a partir das partes aéreas de *B. dracunculifolia*. Estes consistem em  $\beta$ -D-glicopiranosídeos ou acrescidos de um grupo (*E*) cafeoil (figura 5).

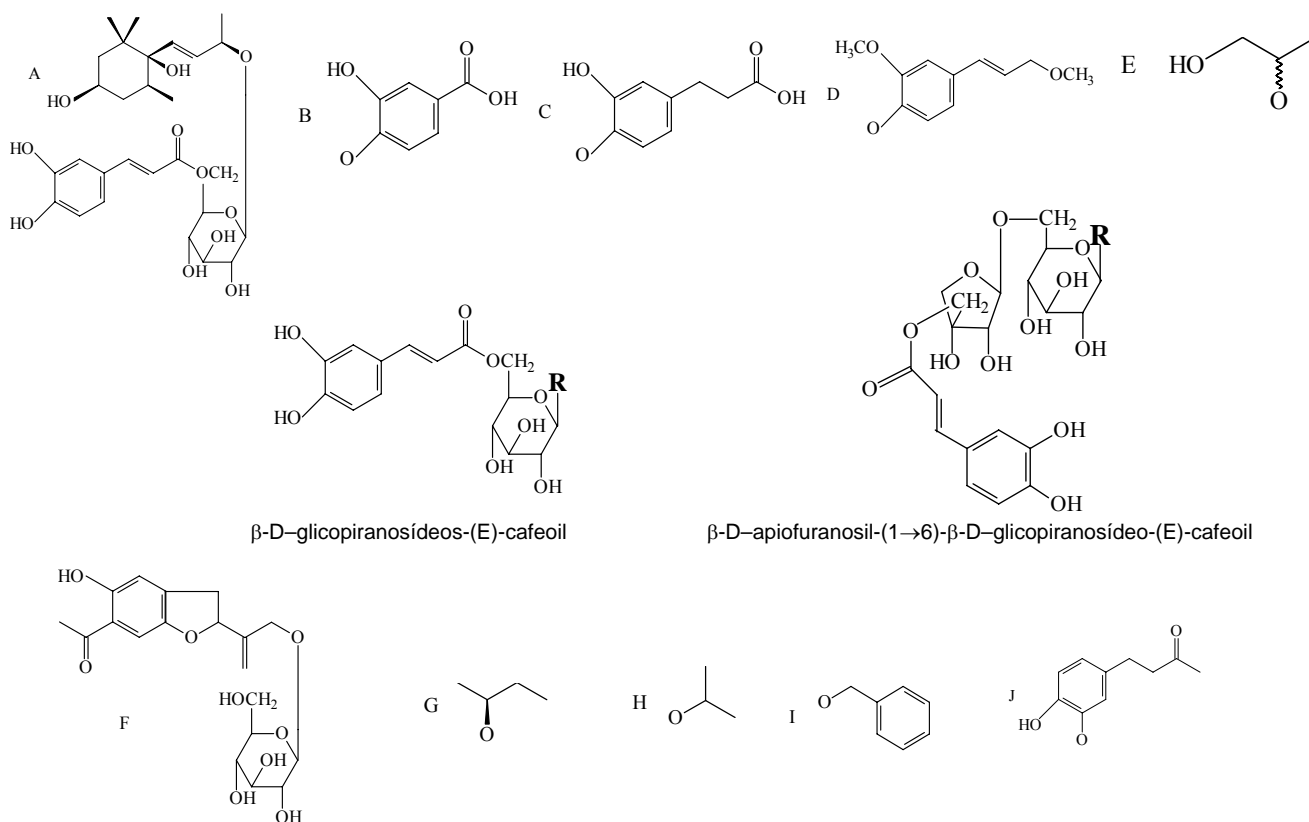


Figura 5: Glicosídeos do ácido caféico (dracunculifosídeos A - J) isolados de *B. dracunculifolia* (NAGATANI et al., 2001).

Em 2003, De OLIVEIRA et al. isolaram do extrato *n*-BuOH de *B. articulata* uma substância derivada do ácido caféico, identificada como éster 4'-O- $\beta$ -D-glicopiranosil-3,5-dimetóxi-benzil caféico, (figura 6) sendo esta de caráter inédito.

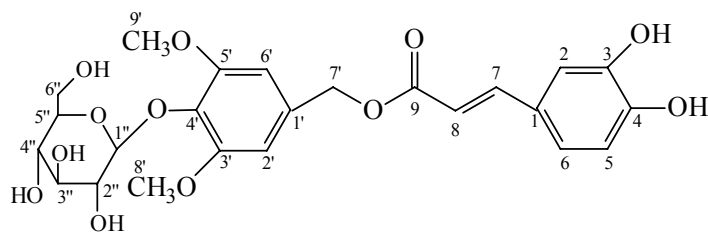


Figura 6: Substância Ba II (éster 4'-O-β-D-glicopiranosil-3,5-dimetóxi-benzil cafeato), isolado de *B. articulata* (De OLIVEIRA et al., 2003).

SIMÕES-PIRES et al. (2005), realizaram o isolamento e identificação de compostos antioxidantes de *B. trimera*, *B. crispa* e *B. usterii* por HPLC-UV-MS/MS. Os autores investigaram os extratos aquosos obtidos das partes aéreas destas plantas, identificando seis derivados do ácido quínico (ácidos 3-O-[*E*]-cafeoilquinico, 5-O-[*E*]-cafeoilquinico, 4-O-[*E*]-cafeoil-1-metil-quinico, 4,5-O-[*E*]-di-cafeoilquinico, 3,4-O-[*E*]-di-cafeoilquinico e 3,5-O-[*E*]-di-cafeoilquinico), os quais apesar de já conhecidos na literatura, foram citados pela primeira vez para espécies do gênero *Baccharis* (figura 7). Além disso, também são relatadas as presenças dos flavonóides isoquercitrina, quercetina e nepetina no extrato de *B. trimera*. A análise incluiu a comparação do perfil cromatográfico por HPLC dos extratos aquosos destas plantas.

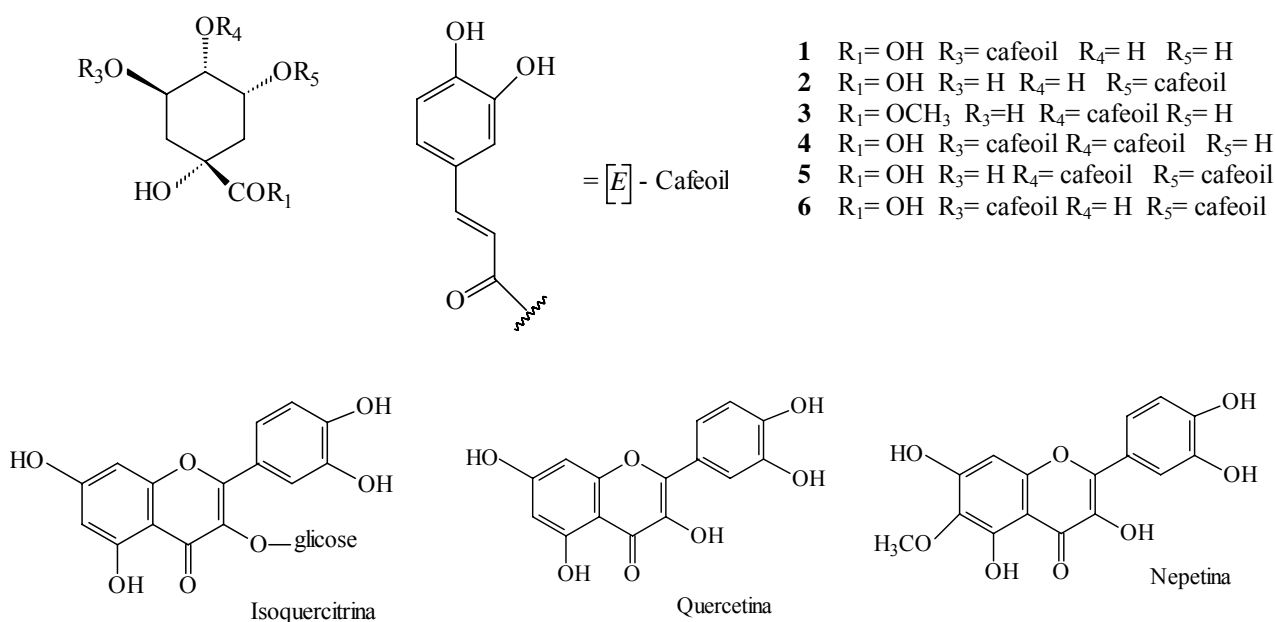


Figura 7: Compostos fenólicos isolados de *B. usterii* e *B. trimera* (SIMÕES-PIRES et al., 2005).

## Capítulo 1

**Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 29: 2603–2609,  
2006.

Copyright # Taylor & Francis Group, LLC

ISSN 1082-6076 print/1520-572X online

DOI: 10.1080/10826070600916609

### **Differentiation of South Brazilian Baccharis Species by TLC**

Simone Quintana de Oliveira, Gisele Barbon and Grace Gosmann

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),  
Porto Alegre, Brazil

Sérgio Bordignon

Curso de Biologia, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas,  
RS, Brazil, and Curso de Ciências Biológicas, Centro Universitário La Salle  
(UNILASALLE), Canoas, Brazil

**Abstract:** The Baccharis species, known in Brazil as “carquejas” are used for digestive disorders in folk medicine. Phytochemical studies reported the presence of phenolic and terpenoid compounds as the main constituents and the literature also describes anti-inflammatory, antioxidant, and antimicrobial activities for the Baccharis species. Due to difficult botanical characterization, the development of chemical differentiation of these plants is important. In this paper, we present the chemical characterization of five native Baccharis species to Southern Brazil by TLC, using just one mobile phase and two colors reagents.

**Keywords:** Baccharis, TLC, Phenolic compounds, Ball compound, Control quality

## INTRODUCTION

The genus *Baccharis* (Asteraceae) is exclusive to America, encompassing nearly 400 species of which approximately 120 grow in Brazil. Around 70 species in the State of Rio Grande do Sul [1–3] are described. Popularly known as “carquejas”, *Baccharis* species aerial parts are used in traditional medicine, mainly for digestive disorders.[4] Previous studies reported the presence of phenolic compounds as flavonoids and phenolic acids,[5,6] diterpenes and saponins.[7–9] Their pharmacological and biological properties are described as anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, and antibacterial for the *Baccharis* species.[4,9 – 11] Although their use is traditional, the botanical differentiation among these species is complex, the correct nomenclature, the synonyms of the members, and especially botany morphology is controversial. It is very difficult for the correct identification of the three winged species, such *B. trimera*, *B. cylindrica*, and *B. usterii*[3,4,12] in the absence of flowers. On the other hand, *B. articulata* is considered to be a very close taxonomically related species to *B. gaudichaudiana*, both two-winged species.[8] Considering that, recently, we reported the isolation and identification of Ball compound (4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3',5'-dimethoxybenzyl-caffeate) from *B. articulata*, and this compound showed antioxidant properties comparable to Trolox,[6] Ball could be used as a good chemical marker for this species. Altogether, considering that these species are used as medicinal plants, often without correct identification, the development of fast and easy TLC methodology may contribute significantly to the differentiation between these plants and to their control quality as raw materials. Herein, we report a chemical characterization by thin-layer chromatography (TLC) of *B. articulata*, *B. cylindrica*, *B. spicata*, *B. trimera*, and *B. usterii*, native species to the State of Rio Grande do Sul, Brazil.

## EXPERIMENTAL

### Plant Material

Aerial parts of *B. articulata* (Lam.) Person (BA), *B. cylindrica* (Less.) DC (BC), *B. spicata* (Lam.) Baillon (BS), *B. trimera* (Less.) DC (BT), and *B. usterii* Heering (BU) were collected in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. Herbarium

specimens are on deposit in the Herbarium of the Botany Department of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Each plant material was air dried and powdered separately.

#### Reference Substance

Pure Ball compound (4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3',5'-dimethoxybenzyl-caffeate) was previously isolated from *B. articulata*.<sup>[6]</sup>

#### Preparation of Plant Extracts

The aqueous extracts from *Baccharis* species were prepared, separately, by decoction of the plant material (1g, 2 x 100 mL) during 30 min. Part of each aqueous extract was evaporated under reduced pressure. The other part of each aqueous extract was partitioned, separately, using *n*-BuOH of which the solvent was evaporated under reduced pressure. Yields of each extract, i.e., of the *Baccharis* species (aqueous extract/*n*-BuOH fraction, mg): *B. articulata* (200/178), *B. cylindrica* (253/117), *B. spicata* (230/104), *B. trimeria* (290/200), and *B. usterii* (270/90) were as given here. Fifteen mL of each sample, dissolved in MeOH (10 mg/mL), was applied to a TLC plate as a band, at the starting line.

#### Thin-Layer Chromatographic Analysis

Phytochemical profiles of *Baccharis* species were established by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel plates (Merck F254, 20 x 20 cm) using as mobile phase chloroform-ethanol-acetic acid (CHCl<sub>3</sub>:EtOH:HOAc, 60:40:6, v/v). The mobile phase was allowed to migrate 15 cm from the starting line. Detections were performed using, separately, two colours of reagents: anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, heating to 100°C, and diphenylboryloxyethylamine 1% in methanol, followed by PEG 400 (5%, w/v) (Natural Reagent).<sup>[13]</sup> Spots were observed under visible light and long-wave UV light after being sprayed by the coloured reagents.

Figures 1 and 2 are photographed chromatographs in long-wave UV light. Figure 3 is a photographed chromatograph in visible light.



## RESULTS AND DISCUSSION

Considering the large use of *Baccharis* species in folk medicine, and the morphological similarity of some native species from Southern Brazil, an analytical method to differentiate these species was developed. The extracts of plants were prepared in order to obtain polar compounds, considering their popular uses,[4] So, aqueous extracts and a *n*-BuOH fraction were used in our TLC analysis. A quick and economical method that had been performed to obtain the differentiation of these *Baccharis* species through their phytochemical profiles is described.

Figure 1 presents the chromatographic profile of aqueous extracts from the *Baccharis* species using silicagel 60 plates GF<sub>254</sub>, CHCl<sub>3</sub>:EtOH:HOAc (60:40:6, v/v) as mobile phase, anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, heating to 100°C as colour reagent, and visualisation under UV light, 356 nm. It is possible to verify that some extracts have important characteristics. *B. articulata* has a major blue spot (Rf 0.6) not detectable elsewhere and identified as Ball compound. Additionally, it was also possible to differentiate *B. trimera* aqueous extract that shows two yellow spots (Rf 0.6 and 0.8) and *B. usterii* with two major spots (one red and another one brown), at Rf 0.7 and 0.5, respectively. *B. spicata* has one yellow spot at Rf 0.2. *B. cylindrica* extract did not show any characteristic using this chromatographic condition.

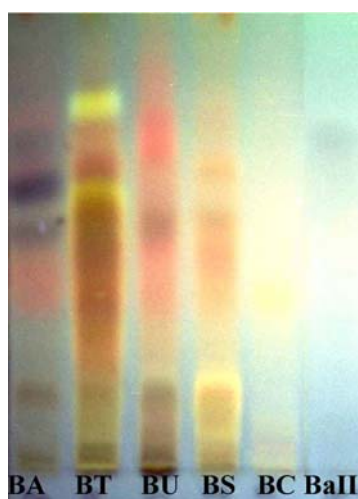


Figure 1. TLC profile of aqueous extract from *Baccharis* species. Chromatographic system: Si gel GF<sub>254</sub>, CHCl<sub>3</sub>:EtOH:HOAc (60:40:6, v/v), anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> then heating (100°C)/UV356. For sample codes see Experimental section.

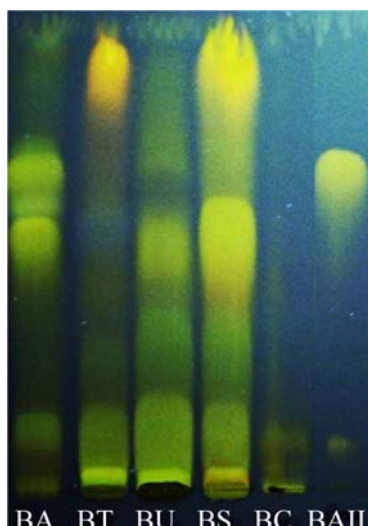


Figure 2. TLC profile of aqueous extract from *Baccharis* species. Chromatographic system: Si gel GF254, CHCl<sub>3</sub>:EtOH:HOAc (60:40:6, v/v), natural reagent/UV356. For sample codes see Experimental section.

Figure 2 shows the chromatographic profile of *Baccharis* species using the same chromatographic conditions of Figure 1, except the natural reagent as colour reagent was used. Using this reagent, it is possible to observe the profile of the phenolic compounds present in the aqueous extracts. First, it is clear to observe that *B. cylindrica* aqueous extract does not present phenolic compounds. *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimera*, and *B. usterii* extracts can be differentiated through their chromatographic profile.

Figure 3 presents the pattern of *n*-BuOH fractions from *Baccharis* species using silicagel plates GF<sub>254</sub>, CHCl<sub>3</sub>:EtOH:HOAc (60:40:6, v/v) as mobile phase and anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> then heating (100°C) as colour reagent. A predominance of polar compounds with terpenoid colour characteristic was observed at all studied species. *B. articulata* is the only species presenting the Ball compound (R<sub>f</sub> 0.6). Another important characteristic is that the *B. usterii* chromatographic profile showed three major violet spots undetectable in the other species. In relation to the other *Baccharis* species, *B. cylindrica* has an important quantity of terpenoid compounds. Through the use of one mobile phase, and changing only the colour reagent, it was possible to differentiate the five South Brazilian *Baccharis* species studied herein. It is possible to observe qualitative and quantitative differences on the chemical profile of aqueous extract and a *n*-BuOH fraction from these species.

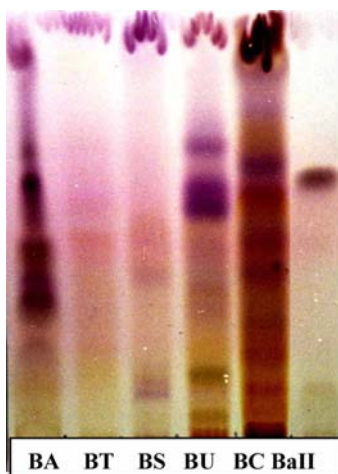


Figure 3. TLC profile of n-BuOH fraction from *Baccharis* species. Chromatographic system: Si gel GF<sub>254</sub>, CHCl<sub>3</sub>:EtOH:HOAc (60:40:6, v/v), anisaldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> then heating (100°C). For sample codes see Experimental section.

Although the botanical differentiation among these plants is complex due to morphological similarity, their chemical profiles can be easily differentiated by the chromatographic conditions presented herein. Accordingly, terpenoids and phenolic compounds can be used as quality markers in the identification of the species studied herein. Especially, the Ball compound could be used as a quality marker in the identification of *B. articulata*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Marcos Sobral (UFRGS) for collecting and identifying part of the plant material. This work was supported by CNPq (Brazil) and FAPERGS (Brazil).

## REFERENCES

1. Barroso, G.H. Compositae: Subtribo Baccharidinae Hoffmann. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. *Rodriguesia* 1976, 28, 28–53.
2. Freire, S.E.; Urtubey, E. Compuestas medicinales de la provincia biogeográfica pampeana: Claves para su determinación e iconografías. Parte I: Compuestas espinosas (grupo 1) y compuestas con tallos alados (grupo 2). *Acta Farm. Bonaerense* 1999, 18, 191–199.
3. Barroso, G.M.; Bueno, O.L. Compostas. 5. Subtribo Baccharidinae. I Parte. In *Flora Ilustrada Catarinense*; Reis, A., Ed.; Herbário Barbosa Rodrigues: Itajaí, 2002; 1065.
4. Zardini, E.M. Etnobotánica de Compuestas Argentinas com especial referencia a su uso farmacológico (primera parte). *Acta Farm. Bonaerense* 1984, 3, 77–99.
5. Gianello, J.C.; Giordano, O.S. Examen químico en seis especies del genero *Baccharis*. *Rev. Latinoam. Quim.* 1984, 15, 84–86.
6. De Oliveira, S.Q.; 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 Rad. Res.* 2003, 37, 555–559.
7. Zdero, C.; Bohlmann, F.; King, R.M.; Robinson, H. Diterpene glycosides and other constituents from Argentinian *Baccharis* species. *Phytochemistry* 1986, 25, 2841–2855.
8. Dai, J.; Suttisri, R.; Bordas, E.; Soejarto, D.D.; Kinghorn, D. Clerodane diterpenoids from *Baccharis articulata*. *Phytochemistry* 1993, 34, 1087–1090.
9. Gene, R.M.; Castaña, C.; Adzet, T.; Marin, E.; Parella, T.; Cañigüeral, S. Antiinflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of active constituents. *Planta Med.* 1996, 62, 232–335.
10. 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 Farm. Bonaerense* 2004, 23, 365–368.
11. De Oliveira, S.Q.; Trentin, V.H.; Kappel, V.D.; Barelli, C.; Gosmann, G.; Reginatto, F.H. Screening of antibacterial activity of South Brazilian *Baccharis* species. *Pharm. Biol.* 2005, 43, 434–438.

## Capítulo 2 - Isolamento e elucidação estrutural das substâncias presentes na fração *n*-butanólica de *B. articulata* e *B. usterii*

### Phytochemical analysis of *n*-Butanol fractions from *Baccharis articulata* and *Baccharis usterii*

Simone Q. de Oliveira,<sup>a</sup> Gisele Barbon,<sup>a</sup> Claiton L. Lencina,<sup>b</sup> Viviane S. Pires,<sup>b</sup> Pascal Sonnet<sup>b</sup>  
and Grace Gosmann<sup>\*,a</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752,  
90610-000 Porto Alegre-RS, Brazil

<sup>b</sup> Facultes de Médecine and Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

\*e-mail: grace.gosmann@ufrgs.br

#### Abstract

*Baccharis articulata* and *Baccharis usterii*, members of Asteraceae are native species to South Brazil, Paraguay, Uruguay and Argentina. Their aerial parts have been used in folk medicine as diuretic and digestive. In recent years there is a rapid increase in the information available on the structures and pharmacological activities of novel compounds isolated and identified from this genus. Herein, we report the isolation and characterization of two new compounds from *n*-BuOH fraction of *B. articulata* (4'-O- $\beta$ -D-glucopiranosyl-3,5-dimethoxybenzyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl-acetyl-carbonate and 4'-O- $\beta$ -D-glucopiranosyl-3,5-dimethoxybenzyl-methanol) and two compounds from *B. usterii* (4,5-O-[*E*]-dicaffeoylquinic acid, a known substance and 7-hydroxy-5,4'-dimethoxy-flavone, a new compound). These compounds were characterized by ESMS, UV, NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC and HMQC) and also by comparison with literature data.

**Keywords:** *Baccharis*, isolation and structural elucidation, phenolic compounds

(artigo a ser submetido)

## Introduction

*Baccharis articulata* and *Baccharis usterii*, members of Asteraceae are native species to South Brazil, Paraguay, Uruguay and Argentina. Their aerial parts have been used in folk medicine as diuretic and digestive.<sup>1</sup> In recent years there was a rapid increase in the information available on the structures and pharmacological activities of novel compounds isolated and identified from this genus.<sup>2</sup> About 150 compounds have been isolated and identified from *Baccharis* species and the most prominent compounds are diterpenoids, flavonoids and phenolic acids derivatives, respectively.<sup>2-8</sup> In our previous work, we reported the isolation and identification of **Ba II** compound (4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3',5'-dimethoxybenzyl-cafate) from *B. articulata* and this compound showed antioxidant properties comparable to Trolox<sup>®</sup>.<sup>8</sup>

Herein, we report the isolation and characterization of four compounds from *n*-BuOH fraction of *B. articulata* and *B. usterii*, respectively. Their structures were determined on basis of spectrometric analysis including ESMS, UV, NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HMBC and HMQC) and also by comparison with literature data.

## Results and discussion

Considering the large use of *Baccharis* species in folk medicine, the discovery of new molecules from these plants and information about their pharmacological activities are important by scientific knowledge about this genus.

The *n*-butanol fraction of *B. articulata* (4 g) was column chromatographed on silica gel using a gradient of ethyl acetate–methanol. **Ba III** compound (38 mg) was further purified by precipitation with methanol.

Ba III was isolated as an amorphous white solid. The structure of Ba III was assigned by a combination of one and two-dimensional NMR methods, ESMS and data comparison of Ba II compound, isolated and identified in our previous work.<sup>8</sup> Ba III ESMS spectrum exhibited molecular ion peak at  $m/z$  539  $[M + Na]^+$ . This information together with the presence of 23 signals in <sup>13</sup>C-NMR spectrum suggested the molecular formula C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>13</sub>. The DEPT spectrum revealed two methoxyls, seven methylenes, eight methane and six quaternary carbon atoms (table 1). The chemical shift of the three methylene groups ( $\delta$  66.4, 69,2 and 61,5) evidenced that they were substituted by an oxygen atom. <sup>1</sup>H-NMR spectrum exhibited one singlet (6H) at  $\delta$  3.80 that indicated the presence of two methoxyl groups. Two broad singlets

at  $\delta$  6.90 (2H) also suggested the presence of one tetrasubstituted aromatic nucleus.<sup>9</sup> Analysis of the remaining signals suggested the presence of a sugar residue whose anomeric proton was at  $\delta$  4.90 (d,  $J$ = 7.5 Hz, 1H) was typical of  $\beta$ -D-glucose.<sup>9-11</sup>  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum confirmed the presence of two carbonyl functions ( $\delta$  170.8 and 174.0), two methoxyl groups ( $\delta$  56.0), two aromatic methine carbons ( $\delta$  106.2) attributed to a symmetric nucleus substituted with two methoxy groups.<sup>9</sup> The final structural assignment was established by heteronuclear 2D NMR experiments which showed correlations between the methylene hydrogens ( $\delta$  5.10, H-7) and quaternary carbon of the tetrasubstituted aromatic nucleus ( $\delta$  133.1, C-4). Also observed correlations between anomeric carbon of  $\beta$ -D-glucose (H-1') and quaternary carbon of aromatic ( $\delta$  135.6, C-1). The methylene hydrogens ( $\delta$  4.30, H-9) showed correlations with carbonyl at ( $\delta$  174.0, C-10). Therefore, **Ba III (figure 1)** was identified 4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,5-dimethoxybenzyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl-acetyl-carbonate, a novel compound.

**Ba IV** substance (21 mg) was obtained by preparative TLC using dichloromethane-methanol (90:10, v/v). The ESMS spectrum exhibited molecular ion peak at  $m/z$  369 [ $\text{M} + \text{Na}$ ]<sup>+</sup> indicating a molecular mass of 346. Considering the presence of 15 signals in  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum, the molecular formula  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_9$  was suggested. The one and two-dimensional NMR spectra of Ba IV were very similar to those of Ba II<sup>8</sup> and Ba III compounds. The  $^1\text{H}$ -NMR spectrum (table 1) showed a singlet at  $\delta$  6.70 (2H) indicating the presence of a tetrasubstituted aromatic nucleus.<sup>9</sup> A signal at  $\delta$  3.85 (6H) indicated the presence of two methoxyl groups. A doublet at  $\delta$  4.30 ( $J$ = 7.7 Hz, 1H) revealed the presence of an anomeric hydrogen of  $\beta$ -D-glucose.<sup>12</sup> The  $^{13}\text{C}$ -NMR experiment presented 15 signals, attributed to four quaternary carbons ( $\delta$  153.2 and 138.7), two aromatic methines ( $\delta$  104.0), five methine groups attributed to sugar ( $\delta$  103.1, 76.9, 77.1, 70.6 and 74.0), two methylene groups ( $\delta$  65.0 and 61.7) and confirmed the presence of two methoxyl groups at ( $\delta$  55.9). HMBC experiment showed long-range correlations between the hydrogen signal at  $\delta$  3.85 (methoxyls) and quaternary carbons at  $\delta$  153.0 (C-6/C-2). Also it was possible observed long-range correlation between methylene group at  $\delta$  65.0 (C-7) and quaternary carbons at  $\delta$  138.0 (C-4) and 104.0 (C-5/C-3). Considering these data and the NMR data from Ba II and Ba III, it was possible to established to Ba IV the structure of 4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,5-dimethoxybenzyl-methanol, a new compound.

The *n*-butanol fraction of *B. usterii* (5 g) was subjected to gel permeation column chromatography on Sephadex LH-20 (Pharmacia) eluted with methanol affording a phenolic (1.5 g) and terpenic (2.8 g) sub-fractions. The phenolic sub-fraction, after purification by column chromatography on silica RP-18, originated two compounds, **BuF1** (30 mg) and **BuF2** (18 mg).

BuF1 compound was isolated as yellow solid. The UV spectral data showed absorption band at 370 nm in (NaOH) indicating a bathochromic shift of band II in relation to the absorption in methanol. Additionally, in aluminum chloride and aluminum chloride/hydrochloric acid provided preliminary evidence for an ortho diphenol.<sup>13</sup> ESMS experiment exhibited fragments  $m/z = 190, 163$  and  $353$ , respectively. Considering these informations and the analysis of NMR spectrum, it was established the presence of caffeic and quinic acids residues and molecular mass of 516. So, it was suggested the molecular formula of  $C_{25}H_{24}O_{12}$ . The  $^1H$ -NMR spectrum showed signals at  $\delta$  6.80 (d,  $J= 8.1$  Hz, 2H), 6.90 (d,  $J= 8.0$  Hz, 1H), 7.00 (d,  $J= 8.0$  Hz, 1H) and 7.10 (s, 2H) suggesting the presence of two trisubstituted aromatic nucleus. Additionally, four doublets at  $\delta$  6.30, 6.40, 7.60 and 7.70 (4H) with coupling constants,  $J= 15.8$  Hz were attributed to *trans* olefinic hydrogens. The chemical shifts at  $\delta$  5.20 and 5.80, suggested the position of esterification of quinic acid moiety with caffeic acid residues, because these chemical shifts are characteristic of 4-/5- substitutions at quinic acid.<sup>14-15</sup> The  $^{13}C$ -NMR experiment presented 25 signals attributed to seven quaternary carbons ( $\delta$  75.8, 126.4, 146.1, 148.2, 126.3, 145.9 and 145.2), six aromatic methine groups ( $\delta$  113.5, 113.6, 115.1, 121.6, 121.7 and 113.7), seven methine groups ( $\delta$  69.4, 68.1, 113.7, 145.3 and 148.3), two methylene groups ( $\delta$  39.5 and 37.4) and three carbonyls ( $\delta$  179.0 and 167.3(2x)). Therefore, according these results and literature data BuF1 was identified as 4,5-O-[*E*]-dicaffeoylquinic acid, previously isolated from *Baccharis usterii*.<sup>16</sup>

**BuF2** (18 mg) also was isolated from phenolic fraction as a yellow solid. ESMS spectrum exhibited molecular ion peak at  $m/z$  321  $[M + Na]^+$ . This information together with the presence of 17 signals at  $^{13}C$ -NMR spectrum suggested the molecular formula of  $C_{17}H_{14}O_5$ . The  $^1H$ -NMR spectrum showed signals at  $\delta$  3.91 (s, 6H) indicating the presence of two methoxyl groups. Four doublets at  $\delta$  6.40, 6.81 ( $J= 4$  Hz, 2H) and 6.97 and 8.00 ( $J= 9$  Hz, 4H) suggested the presence of two aromatic nuclei. Additionally, the  $^{13}C$ -NMR spectrum showed seven quaternary carbons ( $\delta$  165.96, 164.94, 162.32, 162.04, 158.07, 121.76 and 105.0), two methoxyl groups ( $\delta$  56.87), one carbonyl ( $\delta$  182.75) and seven methine groups ( $\delta$  129.4, 116.8, 105.0, 98.78, 93.51). The UV spectral data showed absorption band at 352 nm in (NaOAc)



indicating a bathochromic shift of band II in relation to the absorption in methanol, provided preliminary evidence for C-7 OH. Additionally, in aluminum chloride and aluminum chloride/hydrochloric acid did not showed changes in UV profile, suggesting the presence of C-5 methoxyl.<sup>3</sup> Therefore, according to NMR and UV data, **BuF2** was identified as 7-hydroxy-5,4'-dimethoxy-flavone, a new compound.

According to literature, diterpenoids, flavonoids and other phenolic compounds, have been reported as the major constituents of *Baccharis* species. About 120 species were studied in relation to chemical constituents. Other wise, there are few phytochemical studies about *B. articulata* and *B. usterii*.<sup>17</sup> In our previous work, it was reported the isolation and identification of 4'-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3',5'-dimethoxybenzyl-caffeate from *n*-butanol fraction of *B. articulata*.<sup>8</sup> To this species, it was also isolated clerodane diterpenes and flavonoids from dichloromethane and ethyl acetate extracts, respectively.<sup>18-19</sup> As far as we know, *B. usterii* there is only one paper about characterization of dicaffeoylquinic derivatives from the aqueous extract.<sup>16</sup> Herein, we reported the isolation and characterization of four compounds from *n*-BuOH fractions of *B. articulata* and *B. usterii*. From *B. usterii* we confirm the presence of 4,5-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic acid<sup>16</sup> and the new flavone, 7-hydroxy-5,4'-dimethoxy-flavone (**BuF2**). Considering that the occurrence of flavonoidal aglycones is a characteristic from *Baccharis* genus<sup>17</sup> and the common pardon of methoxyl substitution in C-7/C-6 (A ring) and C-4' (B ring) BuF2 compound having a different pardon of methoxyl substitution in C-5.<sup>17</sup> On the other hand, the compounds isolated from *B. articulata* presented structural similarity to the BaII compound,<sup>8</sup> previously isolated for us from *n*-butanol fraction of *B. articulata*.

## Conclusions

*Baccharis* genus presented a considerable number of species distributed at the American continent. Considering the large use in folk medicine, the scientific knowledge about these species is valuable. This study presented the isolation and structural elucidation of three new compounds and one known compound from *B. articulata* and *B. usterii*. Additionally, the *Baccharis* genus is a rich source of active compounds that, after careful scientific investigation, could be used to the development of new drugs.

## Experimental

### *General experimental procedures*

ESMS analysis was performed on a Micromass-Waters Q-TOF Ultima spectrometer. Ultraviolet absorbance measurements were obtained on a Shimadzu UV-2201 spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer (125-500 MHz).

### *Plant material*

Aerial parts of *B. articulata* (Lam.) Person and *B. usterii* Heering were collected in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil, in May 2005. The voucher specimens were identified by Dr. Sérgio Bordignon (UNILASALLE) and herbarium specimens are on deposit in the Herbarium of the Botany Department of Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Each plant material was air dried and powdered separately.

### *Extraction and isolation*

Plant material (1.5 kg) was macerated in ethanol 70% (plant-solvent, 1:10, w/v) (2 X 10 days). The crude extract was obtained after filtration and evaporation of the ethanol under vacuum. Aqueous residues were partitioned separately with dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol (3 x 200 ml, respectively). Each fraction was evaporated separately to dryness under reduced pressure.

The *n*-butanol fraction of *B. articulata* (4 g) was column chromatographed on silica gel (Merck<sup>®</sup>, 70-230 mesh) using a gradient of ethyl acetate-methanol to obtain **Ba III** (4-O-β-D-glucopiranosyl-3,5-dimethoxybenzyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl-acetyl-carbonate) (38 mg) that was further purified by precipitation with methanol. A fraction rich in **Ba IV** compound was obtained by column chromatographic on silica gel (Merck<sup>®</sup>, 70-230 mesh) using a gradient of dichloromethane-ethanol as a solvent. **Ba IV** (4-O-β-D-glucopiranosyl-3,5-dimethoxybenzyl-methanol) (21 mg) was further purified by preparative TLC using dichloromethane-methanol (90:10, v/v). The *n*-butanol fraction of *B. usterii* (5 g) was subjected to gel permeation column chromatography on Sephadex LH-20 (Pharmacia) eluted with methanol and affording a phenolic (1.5 g) and a terpenic (2.8 g) sub-fraction. Two compounds were isolated from phenolic sub-fraction after purification by column chromatography on silica RP-18 (EMD<sup>®</sup>, 230-400 mesh) using a gradient of water-methanol, **BuF1** (4,5-O-[*E*]-dicaffeoylquinic acid) (30 mg) and **BuF2** (7-hydroxy-5,4'-dimethoxy-flavone) (18 mg).

**Ba III**

White amorphous powder. ESMS  $m/z$ : 539, 421, 178 and 116  $[M+Na]^+$ , ( $C_{23}H_{32}O_{13}$ ). For  $^1H$  and  $^{13}C$ -NMR data see Table 1.

**Ba IV**

White amorphous powder. ESMS  $m/z$ : 369, 236 and 231  $[M+Na]^+$ , ( $C_{15}H_{22}O_9$ ). For  $^1H$  and  $^{13}C$ -NMR data see Table 1.

**BuF1**

Yellow solid. UV  $\lambda_{max}/nm$ : 235s; 244; 295s; 330 (MeOH), 262; 310; 370 (NaOH), 234; 244; 300s; 330 (NaOAc), 251; 310s; 340 (NaOAc/ $H_3BO_3$ ), 256; 310s; 348 ( $AlCl_3$ ), 246; 300s; 330 ( $AlCl_3+HCl$ ). ESMS  $m/z$ : 190, 163, 353 and 516  $[M^+]$ , ( $C_{25}H_{24}O_{12}$ ). For  $^1H$  and  $^{13}C$ -NMR data see Table 2.

**BuF2**

Yellow solid. UV  $\lambda_{max}/nm$ : 333; 268; 209 (MeOH), 333; 268; 209 (NaOH), 333; 268; 209 (NaOAc), 352; 346; 301; 276; 206 (NaOAc/ $H_3BO_3$ ), 333; 268; 209 ( $AlCl_3$ ), 333; 268; 209 ( $AlCl_3+HCl$ ). ESMS  $m/z$ : 257 and 298  $[M^+]$ , ( $C_{17}H_{14}O_5$ ). For  $^1H$  and  $^{13}C$ -NMR data see Table 2.

## References

1. Zardini, E. M.; *Acta Farm. Bonaerense* **1984**, *3*, 77.
2. Abad, M. J.; Bermejo, P.; *Arkivoc* **2007**, *vii*, 76.
3. Dai, J.; Suttisri, R.; Bordas, E.; Soejarto, D. D.; Kinghorn, D.; *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1087.
4. Akaike, S.; Sumino, M.; Sekine, T.; Seo, S.; Kimura, N.; Ikegami, F.; *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 197.
5. Guo, Y.; Li, Y.; Xu, J.; Watanabe, R.; Oshima, Y.; Yamakuni, T.; Ohizumi, Y.; *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 274.
6. Cifuentes, D. A.; Borkowski, E. J.; Sosa, M. E.; Gianello, J. C.; Giordano, O. S.; Tonn, C. E.; *Phytochemistry* **2002**, *61*, 899.
7. Feresin, G. E.; Tapia, A.; Gimenez, A.; Ravelo, A. G.; Zacchino, S.; Sortino, M.; Hirschmann, G. S.; *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *89*, 73.
8. De Oliveira, S. Q., Dal Pizzol, F., Gosmann G.; Guillaume, D.; Moreira, J. C. F.; Schenkel, E. P.; *Free Radical Res.* **2003**, *37*, 555.
9. Kijima, H., Ide, T., Otsuka, H., Ogimi, C., Hirata, E., Takushi, A. and Takeda, Y.; *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1551.
10. Shoyama, Y., Hatano, K., Nishioka, I. and Yamagishi, T.; *Phytochemistry* **1986**, *26*, 2965.
11. Ekabo, O.A., Farnsworth, N.R., Santisuk, T. and Reutrakul, V.; *Phytochemistry* **1993**, *32*, 747.
12. Agrawal, P.K. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3307.

13. Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids* Springer: New York, 1970.
14. Pauli, G. F.; Poetsch, F.; Nahrstedt, A. *Phytochem. Analysis* **1998**, *9*, 177.
15. Merfort, I. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 2111.
16. Simões-Pires, C. A.; Queiroz, E. F.; Henriques, A. T; Hostettmann, K.; *Phytochem. Analysis* **2005**, *16*, 307.
17. Verdi, L.G.; Brighente, I.M.C.; Pizzolatti, M.G.; *Quim. Nova*, **2005**, *28*, 85.
18. Gianello, J. C.; Giordano, O. S.; *Rev. Latino. Quim.* **1984**, *15*, 84.
19. Stapel, G.; Menßen, H. G.; Snatzke, G. ; *Planta Med.* **1980**, *39*, 366.

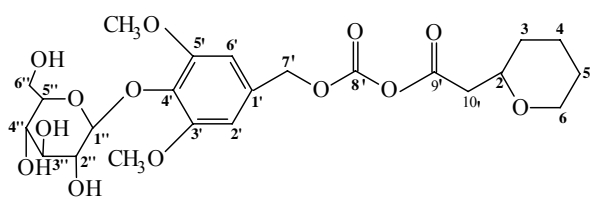
Table 1.  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ -NMR data for Ba III and Ba IV compounds (500 – 125 MHz,  $\delta$ , methanol- $\text{d}_4$ ).

Position	Ba III		Ba IV	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1'	133.1		138.0	
2'	106.2	6.77 brs (2H)	153.0	
3'	153.2		104.0	6.70 s (2H)
4'	135.6		138.0	
5'	153.2		104.0	6.70 s (2H)
6'	106.2	6.77 brs (2H)	153.0	
7'	66.4	5.10 s (2H)	65.0	4.60 s (2H)
8'	170.8			
9'	174.0			
10'	69.2	4.30 brs (2H)		
11	49.0 <sup>§</sup>	3.40 s (1H)		
12	47.2	2.60 brs (2H)		
13	24.4	1.80 m (1H)/2.10 m (1H)		
14	39.9	2.00 m (2H)		
15	45.3	3.00 m (1H)/3.20 m (2H)		
2x OCH <sub>3</sub>	56.0	3.90 brs (6H)	55.9	3.85 brs (6H)
Glucose				
1''	104.1	4.90 d (1H) $J= 7.5$ Hz	103.1	4.30 d (1H) $J= 7.7$ Hz
2''	74.6	3.50 m (1H)	74.0	3.15 m (1H)
3''	76.8	3.40 m (2H)	76.9	3.30 m (1H)/3.40 m (1H)
4''	70.1	3.40 m (2H)	70.6	3.30 m (1H)/3.40 m (1H)
5''	77.3	3.20 m (2H)	77.1	3.30 m (1H)/3.40 m (1H)
6''	61.5	3.70 m (2H)/3.80 m (2H)	61.7	3.85 brs (2H)/3.72m (2H)

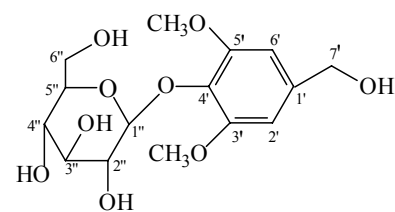
<sup>§</sup>under methanol- $\text{d}_4$  signal

Table 2.  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ -NMR data for BuF1 (methanol- $d_4$ ) and BuF2 (DMSO- $d_6$ ) compounds (500 – 125 MHz).

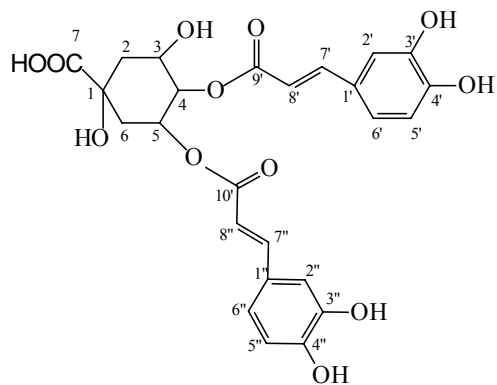
Position	BuF1		BuF2	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	75.8			
2	37.4	2.40 m (2H)	164.9	
3	69.4	4.30 s (1H)	105.0	6.89 s (1H)
4	69.4	5.20 s (1H) $J=9$ Hz	182.7	
5	68.1	5.80 m (1H)	165.9	
6	39.5	2.20 m (1H)/2.30 m (1H)	98.7	6.40 d (1H) $J=4$ Hz
7	179.0		162.0	
1'	126.4		93.5	6.81 d (1H) $J=4$ Hz
2'	113.5	7.10 s (1H)	162.3	
3'	146.1		105.0	
4'	148.2		121.7	
5'	115.1	6.80 d (2H) $J=8.1$ Hz	129.4	8.00 d (2H) $J=9$ Hz
6'	121.6	7.00 d (1H) $J=8.0$ Hz	116.8	6.97 d (2H) $J=9$ Hz
7'	148.3	7.70 d (1H) $J=15.8$ Hz	158.0	
8'	113.7	6.40 d (1H) $J=15.8$ Hz		
9'	167.3			
10'	167.3			
1''	126.3			
2''	113.6	7.10 s (1H)		
3''	145.9			
4''	145.2			
5''	115.1	6.80 d (2H) $J=8.1$ Hz		
6''	121.7	6.90 d (1H) $J=8.0$ Hz		
7''	145.3	7.60 d (1H) $J=15.8$ Hz		
8''	113.7	6.30 d (1H) $J=15.8$ Hz		
2 x OCH <sub>3</sub>			56.8	3.91 s (6H)



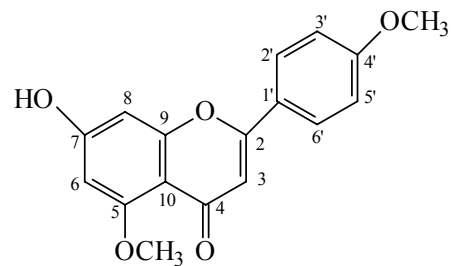
**Ba III**



**Ba IV**



**BuF1**



**BuF2**

**Figure 1.** Chemical structures of Ba III, Ba IV, BuF1 and BuF2 compounds.



**Capítulo 3** Análise da atividade antioxidante dos extratos, frações e substâncias isoladas a partir das partes aéreas de *B. articulata* e *B. usterii*

**Antioxidant activity of *Baccharis articulata* and *Baccharis usterii* extracts and their isolated compounds**

Simone Q. de Oliveira,<sup>a</sup> Gisele Barbon,<sup>a</sup> Virgínia D. Kappel,<sup>b</sup> Claiton L. Lencina,<sup>c</sup> Pascal Sonnet,<sup>c</sup> José Cláudio F. Moreira<sup>b</sup> and Grace Gosmann<sup>\*,a</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, Brazil

<sup>c</sup> Facultes de Médecine and Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

\*e-mail: grace.gosmann@ufrgs.br

**Abstract**

*Baccharis articulata* and *Baccharis usterii*, members of Asteraceae, are native species to South Brazil, Paraguay, Uruguay and Argentina. Their aerial parts have been used in folk medicine as diuretic and digestive<sup>1</sup>. As a continuation of our research on this genus, we now report the evaluation of antioxidant effect through TRAP and TBARS of *n*-butanol fractions and isolated compounds from *B. articulata* (Ba III, Ba IV, Ba V and Ba VI) and *B. usterii* (BuF1, BuF2 and BuT1). In the TRAP assay we used a final concentration of 1.25 µg/ml for all samples and it was possible to observe an antioxidant effect to *n*-butanol fractions of these species. Among isolated compounds, the BuF1, a caffeoylquinic derivative, seems to have an important contribution to the total antioxidant capacity of *n*-butanol fraction from *B. usterii*. The *n*-butanol fractions, Ba III, Ba IV, Ba V and BuF1 compounds studied in this work at 40.0 µg/ml were efficient to protect to the lipid peroxidation on TBARS experiment. The established use of *B. articulata* and *B. usterii* preparations in folk medicine for treatment of a variety of disorders might be attributed, to some degree, to the antioxidant activity of compounds described herein, specially BuF1 compound from *B. usterii*.

**Keywords:** *Baccharis*, antioxidant activity, *n*-butanol fraction, BuF1

(artigo a ser submetido)

## INTRODUCTION

*Baccharis articulata* and *Baccharis usterii*, members of Asteraceae, are native species to South Brazil, Paraguay, Uruguay and Argentina. Their aerial parts have been used in folk medicine as diuretic and digestive<sup>1</sup>. Previous studies reported the identification of phenolic compounds and diterpenes as major constituents of these plants<sup>2-8</sup>. There is an increasing interest in the antioxidant effects of compounds derived from herbs that could be relevant in relation to their nutritional effects and their role in health and disease. A large number of studies have demonstrated that phenolic compounds as flavonoids and phenolic acids derivatives possess antioxidant properties and might play a role in prevention of various pathophysiological processes<sup>9</sup>. These compounds are free radical scavengers because phenolic groups are excellent nucleophiles and are also able to quench lipid peroxidation, acting as chain break antioxidants<sup>10</sup>. Recently, we could demonstrate that Ba II compound (4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3',5'-dimethoxybenzyl-caffeate) isolated from the *n*-butanol fraction of *B. articulata* aerial parts, at concentrations of 0.2 and 2.0 mM, had antioxidant activity comparable to Trolox<sup>®</sup>. We also investigated the antioxidant activity crude dichloromethane, ethanol and aqueous extracts from *B. spicata*, *B. trimera* and *B. usterii* through the evaluation of total antioxidant potential (TRAP), the prevention of formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) induced by hydrogen peroxide and by determination of the protection of Sertoli cells against hydrogen peroxide induces cell damage<sup>11</sup>. Fractions from this aqueous extract (dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol and aqueous residue) were also evaluated. Aqueous extracts from *B. spicata* and *B. trimera*, at a concentration of 25  $\mu$ g/mL, showed a higher antioxidant activity when compared to Trolox<sup>®</sup> (1 mM) and aqueous extract from *B. usterii* exhibit similar activity. In TBARS, ethanol and aqueous extracts and *n*-butanol fractions were effective in the prevention of lipid peroxidation by inhibiting the formation of thiobarbituric acid reactive species and cell mortality induced by hydrogen peroxide<sup>11</sup>. Moreover, *Baccharis grisebachii*<sup>12</sup>, *Baccharis trimera*, *Baccharis crispa* and *Baccharis usterii*<sup>13</sup> showed activity as free radical scavengers by the DPPH decoloration test,<sup>12-13</sup> suggesting that the folk use of *B. articulata* and *B. usterii* could be associated with these antioxidant properties.

Thus, as a continuation of our research, we now report the evaluation of antioxidant effect through TRAP and TBARS (using egg yolk homogenates as lipid media) of *n*-butanol fractions and isolated compounds from *B. articulata* and *B. usterii*. Additionally the structures

of the isolated compounds were determined on basis of spectrometric analysis including ESMS, UV, NMR ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HMBC and HMQC) and also by comparison with literature data.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Antioxidant activity

In this work, *B. articulata* and *B. usterii* fractions and isolated compounds were studied for their activity as scavengers of free radicals and inhibitors of lipid peroxidation *in vitro*, by using TRAP and TBARS assays, respectively. In our previous studies, we observed that the *n*-butanol fractions of these species presented antioxidant activity using the same tests.<sup>8,11</sup> Also Ba II compound, isolated from the *n*-butanol fraction of *B. articulata* aerial parts, presented antioxidant activity comparable to Trolox<sup>®</sup>. Considering these results, this paper presents the evaluation of other isolated compounds of *n*-butanol fractions from *B. articulata* and *B. usterii*.

The total reactive antioxidant potential assay (TRAP) was determined using a method based on the quenching of luminol-enhanced chemiluminescence derived from the thermolysis of a water-soluble azo compound, AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine)dihydrochloride), used as a reliable and quantifiable source of alkyl peroxy radicals. This widely used assay has proved to be a simple, sensitive and reproducible method that can be used to determine the antioxidant capacity in complex mixtures such as plant extracts<sup>14-16</sup>. The TAR index was obtained from the initial decrease in the luminescence associated with the additive incorporation of the sample to the AAPH–luminol system and it indicates the initial reactivity of the sample when compared to Trolox.<sup>®14-16</sup> Evaluation of TRAP level of *n*-butanol fraction from *B. articulata* and isolated compounds (Ba III, Ba IV, Ba V and Ba VI) are shown in **Figure 1A**. The chemiluminescence (CL) profiles obtained after addition of 10  $\mu\text{l}$  of Trolox<sup>®</sup> (final concentration 200 nM), used as a standard, of fractions and isolated compounds (final concentration 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) are presented. The TRAP profiles observed and the CL decrease following addition of the plant extracts and isolated compounds were qualitatively different to that obtained when Trolox<sup>®</sup> was used. The *n*-butanol fraction showed antioxidant activity higher than Trolox<sup>®</sup> and isolated compounds ( $p < 0.05$ ). Besides, the extract showed instantaneous reduction of CL and it maintained this activity during the analyzed period. These properties were not observed to isolated compounds. Ba III, Ba V and Ba VI exhibited capacity in reducing the luminol-enhanced chemiluminescence, on similar levels that Trolox<sup>®</sup>,

according statistical analysis. On the other hand, Ba IV showed lower activity than Trolox ( $p < 0.05$ ). Comparing to TAR index results (**Figure 2A**), the fraction showed a significantly higher TAR index than Trolox<sup>®</sup> and isolated compounds.

Based on these facts and considering that the phenomenon of additive or synergistic effects in complex plant extracts frequently causes loss or impairment of activity during bioguided fractionation<sup>17</sup>, our results led us to propose that the isolated compounds are not directly related with the detected antioxidant activity in the *n*-butanol fraction, and that possibly other metabolites present in *B. articulata* could be responsible for this action.

In relation to TBARS experiment<sup>18</sup> (**Figure 3A**), the *n*-butanol fraction and all isolated compounds from *B. articulata* were efficient to protect the cells of lipid peroxidation causing a significant decrease in MDA production, similar to control ( $p < 0.05$ ).

Regarding the TRAP profiles of *n*-butanol fraction, phenolic and terpenic sub-fractions, BuF1, BuF2 and BuT1 compounds from *B. ustarii* (**Figure 1B**) it was verified that CL decreased following addition of the plant extracts and isolated substances were qualitatively different to that obtained when Trolox<sup>®</sup> was used. The *n*-butanol fraction, phenolic and terpenic sub-fractions, BuF1 reduced instantaneously the luminol-enhanced chemiluminescence and maintained this activity during the analyzed period. The *n*-butanol fraction, phenolic and terpenic sub-fractions and BuF1 compound showed peroxy scavenging properties statistically different from Trolox ( $p < 0.05$ ). The TAR index (**Figure 2B**) suggest that the *n*-butanol fraction, phenolic and terpenic sub-fractions and BuF1 compound had different antioxidant reactivity ( $p < 0.05$ ) and that the BuF1 is significantly higher than Trolox<sup>®</sup>. The results obtained on TBARS assay (**Figure 3B**) indicated that the *n*-butanol fraction, phenolic and terpenic sub-fractions inhibited the lipid peroxidation similarly to control. BuF1 showed higher activity than control ( $p < 0.05$ ), but presented similar activity that the *n*-butanol fraction and phenolic and terpenic sub-fractions.

**Figure 4** presented the chemical structures of compounds Ba III, Ba IV, BuF1 and BuF2.

On the basis of the data presented herein and in our previous works, the fractions and isolated compounds from *B. articulata* and *B. ustarii* showed antioxidant activity. In the TRAP assay we used a final concentration of 1.25  $\mu\text{g/ml}$  for all samples and it was possible to observe a significant antioxidant effect to *n*-butanol fractions of these species. In our previous work we reported antioxidant properties for these fraction at 1000<sup>8</sup> and 25  $\mu\text{g/ml}$ .<sup>11</sup> Among isolated compounds, the BuF1, a caffeoylquinic derivative, previously reported,<sup>13</sup> to have a considerable contribution to the total antioxidant capacity of *n*-butanol fraction from *B.*

*usterii*. The antioxidant potential of BuF1 was confirmed indicating their peroxy scavenging properties.

In this work the *n*-butanol fraction and all isolated compounds from *B. articulata* and the *n*-butanol fraction, phenolic and terpenic sub-fractions and BuF1 compound from *B. usterii* were efficient to protect the cells of lipid peroxidation on TBARS experiment, and our results are in agreement to several studies that investigated the antioxidant activity against lipid peroxidation of several extracts rich in polyphenols.<sup>19-20</sup> In addition, the chemical chromatographic profiles of *B. articulata* and *B. usterii* extracts present great chemical diversity,<sup>21</sup> like the presence of diterpenoids, flavonoids and phenolic acids derivatives compounds,<sup>2-8</sup> suggesting that various chemical groups could be associated with antioxidant properties of *B. articulata* and *B. usterii* herein verified.

Nowadays, *Baccharis* species continue to play an important role in the traditional medicine of many modern cultures, being used for treatment of gastrointestinal and hepatic disorders.<sup>8,12,22</sup> In our opinion, the use of *B. articulata* and *B. usterii* preparations in folk medicine for treatment of a variety of disorders might be attributed, to some degree, to the antioxidant activity of compounds described herein, specially BuF1.

**Structural elucidation of Ba V, Ba VI and BuT1 compounds.** The structural elucidation of Ba V and Ba VI compounds from *n*-butanol fraction of *B. articulata* and BuT1 compound from *B. usterii* are under current analysis.

## MATERIAL AND METHODS

**Reagents.** Thiobarbituric acid (TBA), luminol (3-aminophthalhydrazide), were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). 2,2'-Azobis(2-methylpropionamide)dihydrochloride (AAPH) and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox<sup>®</sup>) were purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). The glycine was purchased from Nuclear (Diadema, SP, Brazil). Trichloroacetic acid (TCA) was purchased from Synth (Diadema, SP, Brazil).

**Plant material.** Aerial parts of *B. articulata* (Lam.) Person and *B. usterii* Heering were collected in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil, in May 2005. The voucher specimens were identified by Dr. Sérgio Bordignon (UNILASALLE) and herbarium specimens are on deposit in the Herbarium of the Botany Department of Universidade Federal

do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. Each plant material was air dried and powdered separately.

**Extraction and isolation.** Plant material (1.5 kg) was macerated in ethanol 70% (plant-solvent, 1:10, w/v) (2 X 10 days). The crude extract was obtained after filtration and evaporation of the ethanol under vacuum. Aqueous residues were partitioned with dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol (3 x 200 ml, respectively). Each fraction was evaporated to dryness under reduced pressure separately.

The **Ba III** (4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,5-dimethoxybenzyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yl-acetyl-carbonate), **Ba IV** (4'-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-3,5-dimethoxybenzyl-methanol), **BuF1** (4,5-O-[*E*]-dicaffeoylquinic acid) and **BuF2** (7-hydroxy-5,4'-dimethoxy-flavone) isolation methodology was previously reported.<sup>23</sup> The isolation of **Ba V**, **Ba VI** and **BuT1** is described bellow. The *n*-butanol fraction of *B. articulata* (4 g) was preliminarily chromatographed on silica gel (Merck<sup>®</sup>, 70-230 mesh) column using a gradient of ethyl acetate-methanol as a solvent<sup>23</sup>. **Ba V** (13 mg) and **Ba VI** (15 mg) were obtained after RP-18 (EMD<sup>®</sup>, 230-400 mesh) column chromatographic using a gradient of water-methanol. From terpenic sub-fraction obtained previously of *n*-butanol fraction of *B. usterii* (5 g)<sup>23</sup> was purified the **BuT1** compound (13.5 mg) by column chromatography on silica RP-18 (EMD<sup>®</sup>, 230-400 mesh) using a gradient of water-methanol and further purification by preparative TLC using *n*-butanol-acetic acid-water (BAW) (12:2:1, v/v/v) as mobile phase.

**Instrumentation.** ESMS analysis was performed on a Micromass-Waters Q-TOF Ultima spectrometer. Ultraviolet absorbance measurements were obtained on a Shimadzu UV-2201 spectrophotometer. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 500 spectrometer (125-500 MHz). The TRAP profile was obtained measuring the CL emission in a liquid scintillation counter (Wallac 1409), operating in the 'out of coincidence' mode, as counts per minute (CPM).

**Antioxidant activity.** The *in vitro* antioxidant activity of the *n*-butanol fractions and isolated substances was estimated by the total reactive antioxidant potential (TRAP) and the total antioxidant reactivity (TAR), as previously described<sup>14-16</sup>. Briefly, the reaction mixture (4 mL), containing AAPH (10 mM) and luminol (4 mM) in glycine buffer (0.1 M), pH 8.6, was incubated at 21°C for 2 h. AAPH is a source of peroxy radicals that react with luminol

yielding chemiluminescence (CL). The system was calibrated using the  $\alpha$ -tocopherol synthetic analogue, Trolox<sup>®</sup>. The addition of 10  $\mu$ L of the *n*-butanol fractions and isolated compounds (final concentration 1.25  $\mu$ g/mL) or of 10  $\mu$ L of Trolox<sup>®</sup> (final concentration 200 nM) decreases the CL proportionally to its antioxidant potential. The TRAP profile was obtained measuring the CL emission in a liquid scintillation counter (Wallac 1409), operating in the 'out of coincidence' mode, as counts per minute (CPM). The CL intensity was monitored for 50 min after the addition of the extracts or Trolox<sup>®</sup>. The TAR index was determined by measuring the initial decrease of luminol luminescence calculated as the ratio  $I_0/I$  where  $I_0$  is the initial emission of CL (before the addition of the antioxidant) and  $I$  is the instantaneous CL intensity after addition of an aliquot of the sample or the reference compound (Trolox<sup>®</sup>).<sup>14-16</sup>

**Lipid peroxidation.** Thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) formation was used to evaluate lipid peroxidation using egg yolk homogenates as lipid media. The homogenate (1 ml of 1%, w/v) and 0.1 ml of samples solubilised in buffer were added to a test tube and made up to 1.0 ml with distilled water. 100  $\mu$ L of AAPH (120 mM) was added to a number of samples to induce lipid peroxidation. In order to precipitate the proteins of the media, 600  $\mu$ L of 15% trichloroacetic acid were added to 300  $\mu$ L of the egg yolk homogenates and centrifuged at 1000g for 10 min. Then, 500  $\mu$ L of supernatant were mixed with 500  $\mu$ L of 0.67% thiobarbituric acid. The reaction mixture was incubated in a boiling water bath for 20 min, cooled to room temperature and the absorbance read at 532 nm.<sup>18</sup> All samples tested in final concentration at 40  $\mu$ g/ml. The results were expressed as nmol MDA equivalents, calculated according standard curve of TMP (tetramethoxylpropane) (2  $\mu$ M) ( $y = 0.1938x + 0.0017$ )  $r^2 = 0.9926$ .

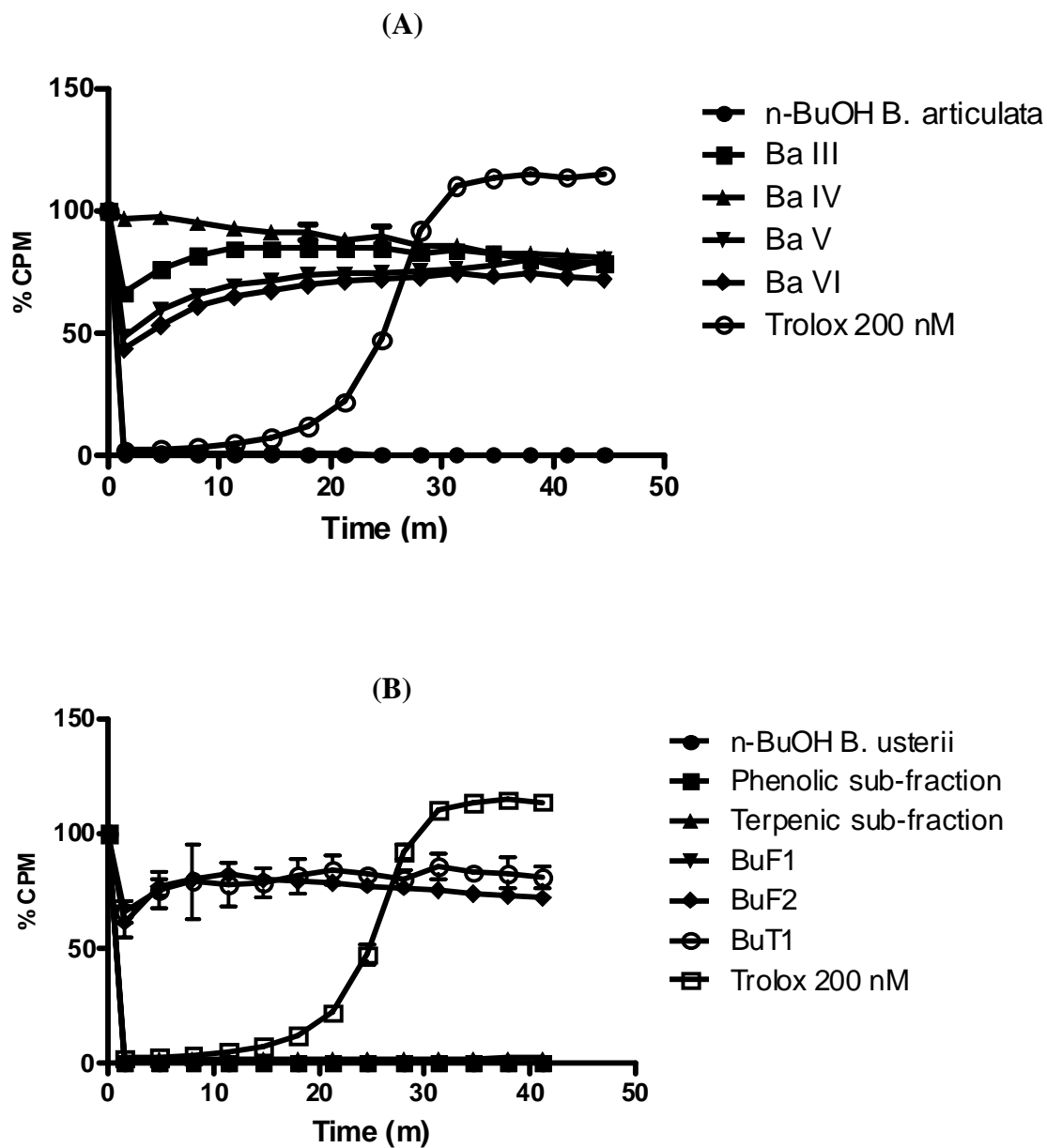
**Statistical analysis.** Data were expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD) of triplicates from two independent experiments. Differences between treatments were compared by one-way ANOVA, followed by Tukey's test for approximately normally distributed variables. Data analyses were performed using the SPSS 13.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL) and the statistical significance was set at the 0.05 level (two-tailed).

## REFERENCES

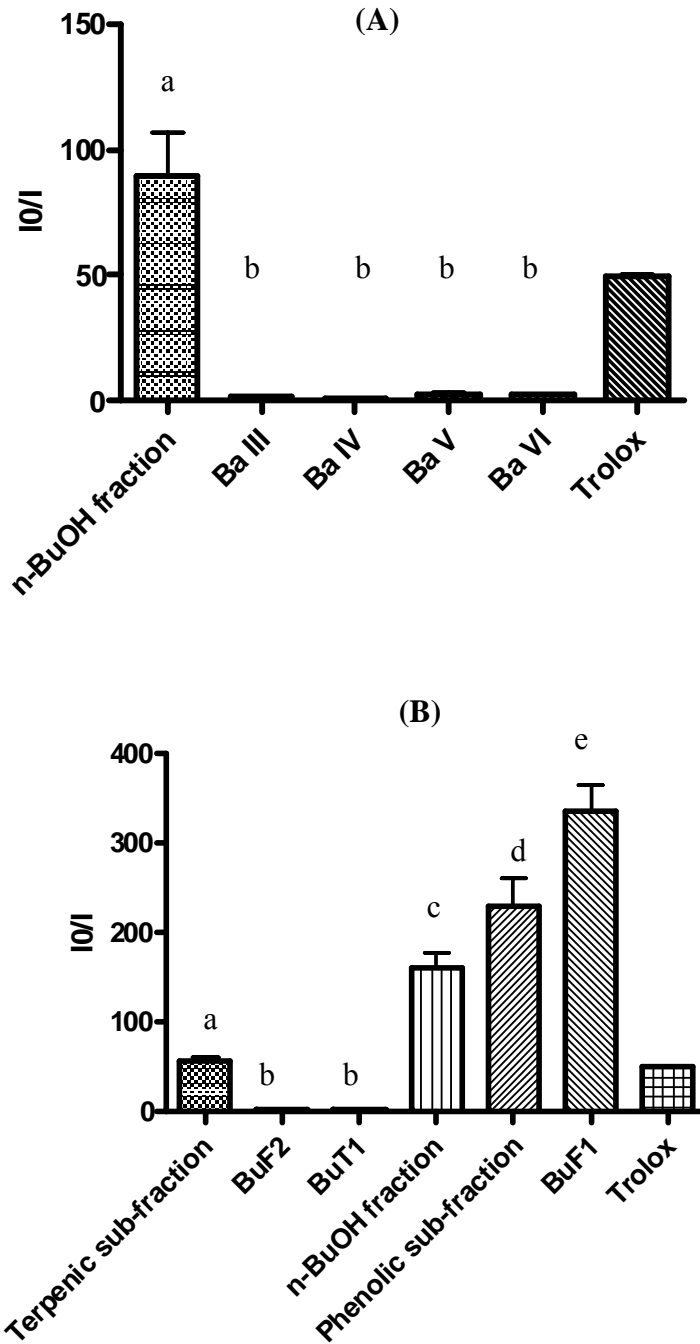
1. Zardini, E. M.; *Acta Farm. Bonaerense* **1984**, *3*, 77.
2. Abad, M. J.; Bermejo, P.; *Arkivoc* **2007**, *vii*, 76.
3. Dai, J.; Suttisri, R.; Bordas, E.; Soejarto, D. D.; Kinghorn, D.; *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1087.
4. Akaike, S.; Sumino, M.; Sekine, T.; Seo, S.; Kimura, N.; Ikegami, F.; *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 197.
5. Guo, Y.; Li, Y.; Xu, J.; Watanabe, R.; Oshima, Y.; Yamakuni, T.; Ohizumi, Y.; *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 274.
6. Cifuentes, D. A.; Borkowski, E. J.; Sosa, M. E.; Gianello, J. C.; Giordano, O. S.; Tonn, C. E.; *Phytochemistry* **2002**, *61*, 899.
7. Feresin, G. E.; Tapia, A.; Gimenez, A.; Ravelo, A. G.; Zacchino, S.; Sortino, M.; Hirschmann, G. S.; *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *89*, 73.
8. De Oliveira, S. Q., Dal Pizzol, F., Gosmann G.; Guillaume, D.; Moreira, J. C. F.; Schenkel, E. P.; *Free Rad. Res.* **2003**, *37*, 555.
9. Sarkar, A. & Bhaduri, A.; *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2001**, *284*, 173.
10. Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; Paganga, G. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 152.
11. De Oliveira, S. Q., Dal Pizzol, F., Moreira, J. C. F.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; *Acta Farm. Bonaerense.* **2004**, *23*, 365.
12. Tapia, A.; Rodriguez, J.; Theoduloz, C.; Lopez, S.; Feresin, F. G.; Schmeda-Hirschmann, G. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 155.



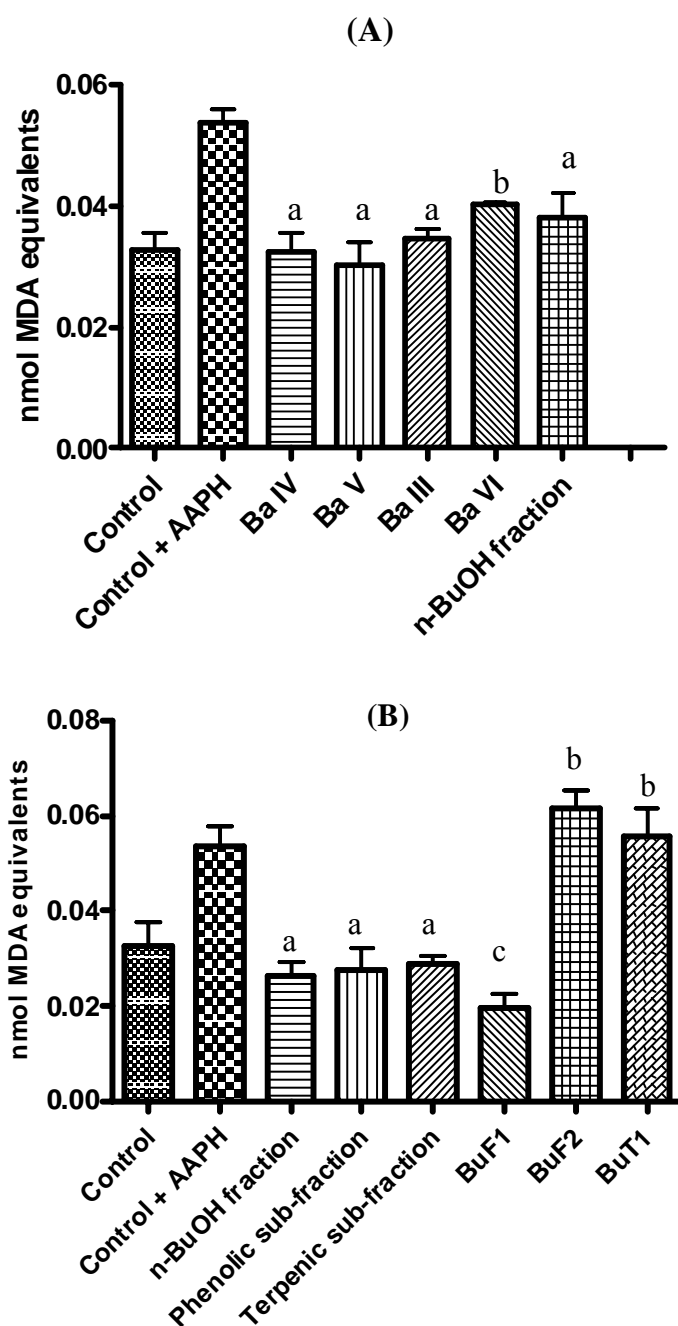
13. Simões-Pires, C. A.; Queiroz, E. F.; Henriques, A. T; Hostettmann, K.; *Phytochem. Analysis* **2005**, *16*, 307.
14. Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; Del castillo, M.D. *Free Radical Res. Comm.* **1992**, *7*, 299.
15. Lissi, E., Salim-Hanna, M., Pascual, C., Del Castillo, M.D. *Free Radical Biol. Med.* **1995**, *18*,153.
16. Desmarchelier, C.; Repetto, M.; Coussio,J.; Llesuy, S.; Ciccía,G. *Int. J. Pharm.* **1997**, *35*,288.
17. Jassim, S.A.A.; Naji, M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective *J.Applied Micr.* **2003**, *95*, 412.
18. Ruberto, G.; Baratta, M. T.; Deans, S. G.; Dorman, H. J. D. *Plant Med.* **2000**, *66*, 687.
19. Desmarchelier, C.; Lisboa Romão, R., Coussio, J.; Ciccía, G. *J. Ethnopharmacol* **1999**, *67*, 69.
20. Polydoro, M.; de Souza, K. C.; Andrades, M. E.; Da Silva, E. G.; Bonatto, F.; Heydrich, J.; Dal-Pizzol, F.; Schapoval, E.E.S.; Bassani, V.L.; Moreira, J.C.F. *Life Sci.* **2004**, *74*, 2815.
21. De Oliveira, S.Q.; Barbon, G.; Gosmann, G.; Bordignon, S.; *J. Liq. Chromatogr.R. T.* **2006**, *29*, 2603.
22. Schinella, G.R., Troiani, G., Da'vila, V., de Buschiazzo, P.M.; Tournier, V. H.; *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2000**, *269*, 357.
23. capítulo 2.



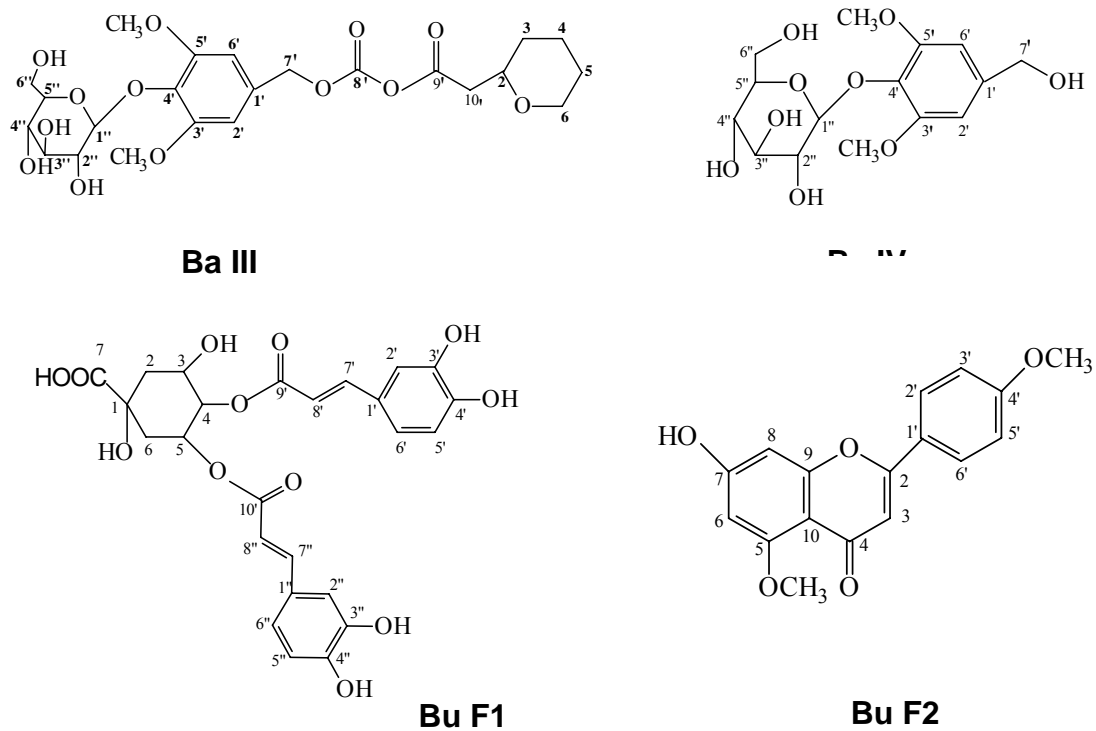
**Figure 1.** TRAP profile of *n*-butanol fraction from *B. articulata* and its isolated compounds (A) and *n*-butanol fraction from *B. usterii*, its sub-fractions and isolated compounds (B). Chemiluminescence intensity (percentage of counts per minute-CPM) measured after addition of 10  $\mu$ l of Trolox (final concentration 200 nM) and the extracts and isolated compounds (final concentration 1.25  $\mu$ g/ml) to 4 ml of glycine buffer (0.1 M), pH 8.6, containing luminol (4 mM) and AAPH (10 mM) at 21 °C. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. of triplicates.



**Figure 2.** TAR index (I0/I) of *n*-butanol fraction from *B. articulata* and its isolated compounds **(A)** and *n*-butanol fraction from *B. usterii*, its sub-fractions and isolated compounds **(B)**. Data are mean  $\pm$  S.D. of  $n=6$ . The values with the same letter indicate no significant differences by Tukey's test ( $p<0.05$ ).



**Figure 3.** Effect of *n*-butanol fraction from *B. articulata* and its isolated compounds (A) and *n*-butanol fraction from *B. usterii*, its sub-fractions and isolated compounds (B) (final concentration of 40  $\mu\text{g/ml}$ ) on TBARS levels. Control: 1000  $\mu\text{l}$  egg yolk homogenates and 200  $\mu\text{l}$  TBA buffer. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of triplicates from two independent experiments. Values with the same letter indicate no significant difference by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).



**Figure 4.** Chemical structures of Ba III, Ba IV, BuF1 and BuF2 compounds.

**Antibacterial Activity of South Brazilian *Baccharis* species**

Vânia H. Trentin<sup>a</sup>, Virgínia Kappel<sup>a</sup>, Simone Quintana de Oliveira<sup>a</sup>, Cristiane Barelli<sup>a</sup>, Grace Gosmann<sup>b</sup>, Eloir Paulo Schenkel<sup>c</sup> and Flávio Reginatto<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Curso de Farmácia, Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, Brazil

<sup>b</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

<sup>c</sup> Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brazil

**Abstract**

South Brazilian *Baccharis* species were studied for antibacterial activities against gram-positive and gram-negative bacterial using disc diffusion and broth dilution assays. The results showed that the *n*-BuOH fraction (100 µg) from *B. usterii* exhibited inhibitory activity against *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. faecium*. The *n*-BuOH fraction of *B. spicata* (1000 µg) was effective against *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* and *E. faecium*. The crude extract of *B. trimera* showed activity against *S. aureus*. The MBC obtained from *n*-BuOH fraction of *B. spicata* were 50 mg/mL against *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* and *E. faecium*. From crude extract of *B. trimera* the MBC obtained were 25 mg/mL against *S. aureus*. The *n*-BuOH fraction of *B. usterii* showed a MBC of 25 mg/mL against *S. aureus* and 50 mg/mL against *E. faecalis* and *E. faecium*, while crude extract of this plant showed a MBC of 12.5 mg/mL against *S. aureus*.

**Keywords:** Antimicrobial activity, *Baccharis*, disc-diffusion method, MBC, MIC

## **Introduction**

The multiple drug-resistant organisms, that are resistant to major classes of antibiotics, created an urgent need for new antibacterial agents (American Society of Microbiology, 1995). Natural products from plants provide a tremendous variety of lead structures, which are used as templates for the development of new products by the pharmaceutical industry. While microbial products have been the mainstay of industrial natural products discovery (Borris, 1996), in recent years many researchers have turned to discover the scientific basis of effects related of the traditional folk medicine and some natural products have been approved as new antibacterial drugs (Cragg et al., 1997).

Several species of *Baccharis* are used in folk medicine in form of infusions as curing wounds or locals infections and as digestives, suggesting a possible antibacterial activity (Palacios et al., 1983; Zardini, 1984; Gené et al., 1996).

*B. anomala*, *B. crispa*, *B. glutinosa*, *B. grisebacchii*, *B. microdonta*, *B. notoserigila* e *B. pedunculata* (Palacios et al., 1983; Anesini & Perez, 1993; Rahalison et al., 1995; Verástegui et al., 1996; Feresin et al., 2001; Coelho de Souza et al., 2004) and specially reports indicating that the antibacterial activity described from *Baccharis* genus are attributed of flavonoids like gencawanin and apigenin (Palacios et al., 1983; Xu and Lee, 2001).

In the South of Brazil, the main species of *Baccharis* used folk medicine are *B. trimera* and *B. articulata* for digestives properties (Verástegui et al., 1996; Oliveira et al., 2003, Oliveira et al., 2004).

Considering that are few chemical and pharmacological information of these plants, the present study aimed carry out a screening of some native South Brazilian *Baccharis* species in order to detect new sources of antibacterial agents.

## **Material and methods**

### **Plant material**

The aerial parts of *B. articulata* (Lam.) Persoon, *B. trimera* (Less) A. P. de Candolle were collected in Camargo, State of Rio Grande do Sul, Brazil in April of 2003. The voucher specimens were identified by Profa. Msc. Branca Severo from Universidade de Passo Fundo and are on deposited in the herbarium of Instituto de Ciências Biológicas from this University. *B. spicata* (Lam.) Bailon and *B. usterii* Heering were collected in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil in February of 2002. The voucher specimens were identified by Marcos Sobral from Universidade Federal do Rio Grande do Sul and are on deposited in the herbarium of the Botanical Department of this University.

### **Preparation of plant extracts**

Aerial parts (50 g) of *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimera* and *B. usterii* were crushed and extracted under reflux (90°C) with 500 mL of ethanol 40°GL for 30 min. After cooling, each extract was filtered separately and the volume was adjusted to 500 mL with water being separated in two fractions of 250 mL. One fraction was evaporated under reduced pressure to dryness to obtain the crude extract. The ethanol content of the second fraction was removed under reduced pressure, its volume was adjusted to 250 mL with water and this aqueous suspension was successively partitioned (3 x 50 mL) with ethyl acetate (yielding the ethyl acetate fraction) and *n*-BuOH (yielding the *n*-BuOH fraction). These fractions were evaporated to dryness and re-dissolved with sterile water in concentrations of 50, 10, 5, 2.5 and 1.25 mg/mL to biological tests.



### **Phytochemical characterization of plants extracts by TLC**

The presence of different constituents in crude extracts from *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimera* and *B. usterii* was established by TLC on silica gel plates (Merck 60 F<sub>254</sub> 20 x 20 cm) using as mobile phases CHCl<sub>3</sub>-EtOH-HOAc (100:40:6 v/v) and BAW (5:1:3 v/v). The detections of this TLC were, respectively, chlorosulphonic acid-glacial acetic acid reagent spraying and heating from terpenoids and from phenolic compounds, fluorescence at 365 nm after spraying with 1% diphenylboryloxyethylamine in CH<sub>3</sub>OH (Wagner, 1983).

### **Antibacterial assays**

The disc-diffusion method was used as a screening test for antibacterial activity. Filter paper discs (6 mm in diameter) impregnated with extracts solutions were placed on Mueller-Hinton agar plates (Merck®), which have been inoculated with test organisms according to the standard protocol described by the National Committee of Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 2004. The filter paper discs were impregnated with 20 µL of the extracts solutions in order to obtain final concentrations of 1000, 200, 100, 50 and 25 µg of extracts in the discs. The microorganisms from the American Type Culture Collection used for the biological evaluation, were *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506) and *Enterococcus faecium* (ATCC 10541) (Rios et al., 1988).

The plates were incubated at 35°C (±1°C) and after 18 h the diameters of the inhibition zones were measured. Filter paper discs containing sterile water without any test compound were negative control and no inhibition was observed. Standard antibiotic disc were selected according to the sensitivity of the bacterial tested. So ampicilin (10 µg), cloranphenicol (30 µg) and ceftazidin (30 µg) were used (Rios et al., 1988).

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts was determined by the macrobroth dilution assay. The bacterial suspensions were diluted from the original suspensions, which had a turbidity of 0.5 MacFarland standard (1.5 X 10<sup>8</sup> CFU/mL). The tubes were incubated at 35°C (±1°C) for 18 h. For the evaluation of the active extract four dilutions at 100, 50, 25 and 12.5 mg/mL were prepared. MIC was determinate as the lowest concentration of the extract that completely inhibited growth of the test organisms (Rios et al., 1988; Mazzanti et al., 2000).

The tube that showed negative visible growth after 18 h of incubation was replated on BHI (brain-heart infusion) plates. The viability of bacteria was assessed from the forming

colonies after 18 h incubation at 35°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). The lowest concentration of the extracts giving negative growth of bacteria was recorded as the minimum bactericidal concentration (MBC) (Wongkham et al., 2001).

## Results and discussion

The development of new drugs with antimicrobial properties has been the mainstay in recent years. Natural products from plants and microorganisms traditionally have provided many lead compounds in the search for new drugs and medicines (Borris, 1996).

Research of antimicrobial activity of medicinal plant has encountered some problems because of the diversity of criteria and techniques employed and the lipophilic properties of some samples. Diffusion and dilution methods have been employed to study the antimicrobial activity of medicinal plants (Rios et al., 1988)

Considering the large use of the genus *Baccharis* in folk medicine as anti-inflammatory and antibacterial, and that literature did not present a screening of antibacterial activity to native South Brazilian *Baccharis* species and the potential therapeutically importance of the title plant, we decided to verify the antibacterial activity of *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimeria* and *B. usterii*.

The extracts of plants were prepared in order to obtain polar compounds considering ethno-pharmacological uses of the plants in the rural areas to antibacterial activity. The inhibition zones diameters of sixteen extracts were measured and are shown in table 1. We verified that four extracts showed antibacterial activity displayed varying degrees and specificity of inhibition against different bacterial species.

The *n*-BuOH fraction of *B. usterii* exhibited good activity against gram-positive bacteria (*S. aureus*, *E. faecium* and *E. faecalis*) in concentration of 1000  $\mu\text{g}$ , with a similar inhibition zone for *E. faecalis* when compared to positive control (ampicilin). The same fraction also has antibacterial activity in concentrations of 100 and 200  $\mu\text{g}$ , although with inhibition zone lower than positive control.

*B. spicata* showed activity against gram-positive (*S. aureus*, *E. faecium* and *E. faecalis*) and gram-negative bacteria (*E. coli*) in concentration of 1000  $\mu\text{g}$ . However, herein, the higher activity was verified against *E. faecium*, with similar inhibition zone to positive control.

The weakest activity was found with the crude extract of *B. trimera* and *B. usterii* against *S. aureus*, which showed in concentration of 1000 µg, inhibition zone lower than positive control.

### **Table 1**

The difference in the antibacterial spectra suggests that the active components present among fractions are different. TLC analyses of *n*-BuOH fractions of *B. spicata* and *B. usterii* showed a predominance of polar compounds, mainly flavonoids and terpenoids, these components, notwithstanding cannot be identified, probably could be contribute to the inhibitory effect displayed by these fractions (data not showed).

None of the extracts from *B. articulata* were active against microorganisms tested.

Unfortunately none of the extracts tested showed activity against *P. aeruginosa*, which have in clinical cases a high degree of resistant forms against different antibacterial drugs.

The extracts and fractions that showing antibacterial activity by the disc-diffusion-method were further tested by the macro broth dilution to determine the MICs. Considering that in this method, turbidity is taken as an indication of bacterial density and that color of the active extracts could be influence in the results obtained, we decided replated on BHI plates the tubes that showed negative visible growth after 18 h of incubation, in order to obtain MBC of the extracts.

The MBC obtained for the active extracts were 50, 25 and 12.5 mg/ml, and that obtained for standard cloranphenicol was 4 mg/mL (table 2).

These findings suggest that results obtained herein to crude extracts and fractions have potential antimicrobial activity, suggesting that this activity should be higher when the compounds were isolated.

### **Table 2**

The antibacterial activity presented herein to tested *Baccharis* species must not be considered high in relation to drugs used as references, but are similar to the results observed to *B. glutinosa* extract against *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus vulgaris* and others microorganisms (Verástegui et al., 1996).

In *Baccharis* species, the antibacterial activity was attributed to the presence of flavonoids as gencawanin and apigenin, and diterpenes (Palacios et al., 1983; Anesini and Perez, 1993; Rahalison et al., 1995; Verástegui et al., 1996; Cowan, 1999; Feresin et al.,

2001). It was also reported the antibacterial activity of some chalcones, isoflavones and biflavones (Xu and Lee, 2001).

Although the literature confirms that flavonoids gencawanin and apigenin are present in extracts of *B. articulata* (Gianello and Giordano, 1984) and that these compounds are potential antimicrobial agents, our results showed no activity for this extract to the bacterium tested.

This study presents a screening to antibacterial compounds from South Brazilian *Baccharis* species used in South American traditional medicine. Bioguided fractionation is carried out using the active fraction detected herein in order to identify the active compounds.

#### *Acknowledgements*

We are grateful to Marcos Sobral (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS), Prof. Dr. Sérgio Bordignon (ULBRA) and Profa. Msc. Branca Severo (ICB-UPF) for locating, collecting and identifying the plant material. This work was supported by FAPERGS (02/0057.0-PROADE2-RS/BRAZIL) and fellowship to GG CNPq (Brazil).

## References

- American Society of Microbiology (ASM) Task Force on Antibiotic Resistance. (1995) Report of the ASM Task Force on antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother* 39 (suppl.): 2-23.
- Anesini C, Perez C (1993): Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 39: 119-128.
- Borris RP (1996): Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J Ethnopharmacol* 51: 29-38.
- Coelho de Souza G, Hass APS, von Poser GL, Schapoval EES, Elizabetsky E (2004): Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol* 90: 135-143.
- Cowan MM (1999): Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564-582.
- Cragg GM, Newmann DJ, Snader KM (1997): Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 60: 52-60.
- Feresin GE, Tapia A, López SN, Zacchino SA (2001): Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine. *J Ethnopharmacol* 78: 103-107.
- Gené, RM, Cartaña C, Adzet T, Marín E, Parella T, Cañigüeral S (1996): Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of active constituents. *Planta Med* 62: 232-235.
- Gianello JC, Giordano OS (1984): Examen químico en seis especies del genero *Baccharis*. *Revista Latinoamericana de Química* 15: 84-86.
- Mazzanti G, Mascellino NT, Pattinelli L, Coluccia D, Manganario M, Saso L (2000): Antimicrobial investigation of semipurified fractions of *Ginkgo biloba* leaves. *J Ethnopharmacol* 71: 83-88.
- National Committee of Clinical Laboratory Standards (2004): Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard.
- Oliveira SQ, Dal-Pizzol F, Gosmann, G, Guillaume D, Moreira JCF, Schenkel EP (2003): Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. *Free Rad Res* 37: 555-559.

- Oliveira SQ, Dal-Pizzol F , Moreira JCF, Schenkel EP, Gosmann G (2004): Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. *Acta Farm Bonaerense*. *In press*
- Palacios P, Gutkind G, Rondina RVD, Torres R, Coussio JD (1983): Antimicrobial Activity of *Baccharis crispa* and *Baccharis notoserigila* (II). *Planta Med* 49: 128.
- Rahalison L, Benathan M, Monod M, Frenk E, Gupta MP, Solis PN, Fuzzati N (1995): Antifungal Principles of *Baccharis pedunculata*. *Planta Med* 61: 360-362.
- Rios JL, Recios MC, Villar A (1988) Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J Ethnopharmacol* 23: 127-149.
- Verástegui MA, Sánchez CA, Heredia NL, Garcia-Alvarado JA (1996): Antimicrobial Activity of Extracts of Three Major Plants From the Chihuahuan Desert. *J Ethnopharmacol* 52: 175-177.
- Wagner H (1983): Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. Berlin, Springer Verlag, pp. 291-293.
- Wongkham S, Laupattarakasaem P, Pienthaweechai K, Areejitranusorn P, Wongkham C, Tchanitiswad T (2001): Antimicrobial activity of *Streblus asper* Leaf extract. *Phytother Res* 15: 119-121
- Xu HX, Lee SF (2001): Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytother Res* 15: 39-43.
- Zardini EM (1984): Etnobotánica de Compuestas Argentinas com especial referencia a su uso farmacológico (primera parte). *Acta Farm Bonaerense* 3: 77-99.

Table 1: Results of screening of extracts from *Baccharis* extracts/fractions using the disc-diffusion method.

Extracts	Doses ( $\mu\text{g}$ )		<i>B. trimera</i>					<i>B. spicata</i>					<i>B. usterii</i>				
	Bacterial	Positive controls (mm)	1000	200	100	50	25	1000	200	100	50	25	1000	200	100	50	25
	Crude extract	<sup>1</sup> <i>S. aureus</i>	28	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-
<sup>2</sup> <i>E. coli</i>		26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<sup>1</sup> <i>E. faecium</i>		27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<sup>1</sup> <i>E. faecalis</i>		30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<sup>3</sup> <i>P. aeruginosa</i>		28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EtOAc fraction	<sup>1</sup> <i>S. aureus</i>	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<sup>2</sup> <i>E. coli</i>	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<sup>1</sup> <i>E. faecium</i>	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<sup>1</sup> <i>E. faecalis</i>	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<sup>3</sup> <i>P. aeruginosa</i>	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -BuOH fraction	<sup>1</sup> <i>S. aureus</i>	27	-	-	-	-	-	15	-	-	-	-	21	11	8	-	-
	<sup>2</sup> <i>E. coli</i>	26	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<sup>1</sup> <i>E. faecium</i>	27	-	-	-	-	-	24	-	-	-	-	16	11	9	-	-
	<sup>1</sup> <i>E. faecalis</i>	29	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	29	15	12	-	-
	<sup>3</sup> <i>P. aeruginosa</i>	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aqueous residue	<sup>1</sup> <i>S. aureus</i>	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<sup>2</sup> <i>E. coli</i>	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<sup>1</sup> <i>E. faecium</i>	28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<sup>1</sup> <i>E. faecalis</i>	29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<sup>3</sup> <i>P. aeruginosa</i>	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Inhibition zone (mm)														
<b>Positive controls</b>			<sup>1</sup> ampicilin (10 $\mu\text{g}$ )					<sup>2</sup> cloranphenicol (30 $\mu\text{g}$ )					<sup>3</sup> ceftazidin (30 $\mu\text{g}$ )				

(-): Not showed activity

Table 2: Results of minimum bactericidal concentration (MBC) of active extracts from *Baccharis* species.

Bacterial		<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Plants	Extracts	MBC (mg/mL)				
<b>B. spicata</b>	<i>n</i> -BuOH fraction	50	50	50	50	-
<i>B. trimera</i>	Crude extract	25	-	-	-	-
<i>B. usterii</i>	Crude extract	12.5	-	-	-	-
	<i>n</i> -BuOH fraction	25	-	50	50	-
Cloranphenicol		4 mg/mL				

(-) Activity higher than 100 mg/ml





## 4 Discussão Geral

O gênero *Baccharis* (Asteraceae) possui importância sócio-econômica elevada devido a sua utilização na medicina popular, sua importância ecológica na produção de própolis de elevada qualidade e, em contrapartida, por seus efeitos negativos na agricultura e pecuária, uma vez que algumas espécies são consideradas plantas invasivas em pastagens e são tóxicas para os animais (JARVIS et al., 1991; VERDI et al., 2005).

O presente trabalho dá continuidade aos estudos realizados pelo nosso grupo com *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii* (DE OLIVEIRA et al., 2003; 2004) abordando estudos fitoquímico e biológico, em especial as atividades antioxidante e antibacteriana.

A partir das análises cromatográficas foi possível estabelecer parâmetros de diferenciação entre *B. articulata*, *B. cylindrica*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*, comparando-se valores de R<sub>f</sub>s e a coloração desenvolvida pelas substâncias presentes nos extratos aquosos e *n*-BuOH frente aos agentes cromogênicos. Além disso, destaca-se o fato de que através do emprego de um sistema cromatográfico (CHCl<sub>3</sub>:EtOH:HOAc, 60:40:6, v/v/v) e de dois agentes reveladores (reagente natural e anisaldeído sulfúrico) foi possível detectar diferenças qualitativas no perfil químico dos extratos aquosos e *n*-BuOH destas espécies.

A análise fitoquímica das frações *n*-BuOH de *B. articulata* e *B. usterii* permitiu o isolamento de sete substâncias.

A partir de *B. articulata* foram isoladas as substâncias Ba III (4'-O-β-D-glicopiranosil-3,5-dimetóxi-benzil-tetrahidro-2H-pirano-2-il-acetil carbonato), Ba IV (4'-O-β-D-glicopiranosil-3,5-di-metóxi-benzil metanol), Ba V e Ba VI (cujas elucidações estruturais estão em andamento). Até o momento, cabe salientar que não foram encontrados relatos do isolamento de Ba III e Ba IV, portanto sugere-se que estas apresentam caráter inédito.

Em relação a *B. usterii* foram isoladas duas substâncias a partir da fração fenólica, substância BuF1 (ácido 4,5-O-[*E*]-di-cafeoilquínico) cuja estrutura já é conhecida e relatada para esta espécie (SIMÕES-PIRES et al., 2005) e a substância

BuF2 (7-hidróxi-5,4'-di-metóxi-flavona) da qual não foram encontrados relatos. Já a partir da fração terpênica foi isolada a substância BuT1 cuja elucidação estrutural encontra-se em andamento.

Em relação às investigações da atividade antioxidante para as espécies do gênero *Baccharis*, neste trabalho foi dada continuidade a estes estudos iniciados pelo nosso grupo, como citado anteriormente, empregando-se as mesmas técnicas utilizadas previamente, porém com uma modificação em relação ao ensaio TBARS o qual foi realizado em homogenato de gema de ovo e não mais em células de Sertoli.

As frações *n*-BuOH, as sub-frações e substâncias isoladas (concentração final 1,25 µg/ml) foram avaliadas quanto ao potencial antioxidante total (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR). Para a verificação do potencial de inibição da peroxidação lipídica (TBARS) através do qual avalia-se a inibição da formação de MDA (malonil-di-aldeído) todas as amostras foram testadas na concentração de 40 µg/ml.

Para *Baccharis articulata* observou-se que a fração *n*-BuOH (concentração final 1,25 µg/ml) foi capaz de inibir a formação do radical peroxila praticamente de modo instantâneo e de manter esta atividade durante todo o período do experimento (50 minutos). Além disso, esta fração apresentou atividade significativamente maior que a substância de referência (Trolox) e que as substâncias isoladas a partir dela, Ba III, Ba IV, Ba V e Ba VI ( $p < 0,05$ ). Em relação a estas, Ba III, Ba V e Ba VI apresentaram atividade similar ao Trolox ( $p < 0,05$ ). A reatividade instantânea da fração *n*-BuOH pode ser também verificada no índice TAR, no qual foi observado que não existe diferença significativa na reatividade imediata observada para as substâncias isoladas ( $p < 0,05$ ).

Considerando o efeito aditivo ou sinérgico, freqüentemente observado para extratos vegetais, resultam em uma menor atividade após o fracionamento bioguiado, nossos resultados sugerem que os compostos isolados não estão diretamente relacionados com a atividade antioxidante observada, ou ainda, que outro metabólito possa estar relacionado com esta ação.

Em nosso trabalho anterior, relatamos a atividade antioxidante da substância Ba II (éster 4'-O-β-D-glicopiranosil-3,5-dimetóxi-benzil caféico), também obtida a partir da fração *n*-BuOH de *B. articulata*, a qual apresentou atividade antioxidante

similar a fração *n*-BuOH e ao Trolox (DE OLIVEIRA et al., 2003). No entanto, neste trabalho, as análises fitoquímicas indicaram a ausência desta substância na fração *n*-BuOH da referida espécie, embora, esta fração tenha apresentado atividade antioxidante, mesmo em uma concentração menor (1,25 µg/ml) que a testada em nosso trabalho anterior (1 mg/ml).

Quanto à inibição da peroxidação lipídica, verificou-se que as substâncias Ba III, Ba IV e Ba V foram capazes de proteger a membrana celular do processo oxidativo de modo similar ao controle ( $p < 0,05$ ). Apenas a substância Ba VI não apresentou diferença em relação ao controle induzido.

Para *B. usterii* observou-se que a fração *n*-BuOH, sub-frações fenólica e terpênica e a substância BuF1 reduziram instantaneamente a formação do radical peroxila e, assim como foi observado para *B. articulata*, mantiveram esta atividade durante todo o período de tempo do experimento. A substância BuF2 apresentou a menor atividade quando comparada às demais ( $p < 0,05$ ). A fração *n*-BuOH, a sub-fração fenólica e a substância BuF1 apresentaram atividade antioxidante estatisticamente superior ao Trolox ( $p < 0,05$ ). Na avaliação do índice TAR, confirmou-se estes resultados. Além disso, também foi possível constatar que a fração *n*-BuOH, sub-frações fenólica e terpênica foram capazes de proteger as células da peroxidação lipídica similarmente ao controle ( $p < 0,05$ ) e que BuF1 apresentou atividade estatisticamente superior a este, mas semelhante a fração *n*-BuOH e sub-frações fenólica e terpênica ( $p < 0,05$ ). As substâncias BuT1 e BuF2 não foram capazes de proteger as células do processo oxidativo ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos para *B. usterii* no TRAP em relação à fração *n*-BuOH divergem, ligeiramente, daqueles obtidos em nossos resultados anteriores (De OLIVEIRA et al., 2004). No presente trabalho a fração *n*-BuOH (concentração final 1,25 µg/ml) apresentou maior atividade que o Trolox (200 nM). Nos nossos resultados anteriores, a fração *n*-BuOH (concentração final 2,5 µg/ml) apresentou menor potencial antioxidante que o Trolox (1 mM).

Esta divergência pode estar relacionada à composição química da fração *n*-BuOH desta planta que, embora apresente perfil cromatográfico semelhante ao verificado anteriormente, a concentração das substâncias pode não ser a mesma, uma vez que não foi utilizado o mesmo material de partida para a preparação dos extratos.

Além disso, observamos que a substância BuF1 é um derivado cafeoilquínico

No presente trabalho também foi avaliada a atividade antibacteriana dos extratos brutos (hidroetanólicos) e frações (AcOEt, *n*-BuOH e resíduo aquoso) de *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*, frente às bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *E. faecium* e *P. aeruginosa*.

A fração *n*-BuOH de *B. spicata* na concentração de 1 mg/ml mostrou-se ativa frente a *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *E. faecium* (CBM 50 mg/ml). A fração *n*-BuOH de *B. usterii* na mesma concentração foi ativa contra *S. aureus* (CBM 25 mg/ml), *E. faecalis* e *E. faecium* (CBM 50 mg/ml). Em concentrações menores, 200 e 100 µg/ml, esta fração foi ativa frente às referidas bactérias. Também foi possível verificar que os extratos brutos (1 mg/ml) de *B. trimera* e *B. usterii* foram ativos frente a *S. aureus* (CBM 12,5 mg/ml e 25 mg/ml, respectivamente). O extrato bruto e as frações de *B. articulata* não apresentaram atividade frente aos microorganismos testados.

As concentrações empregadas na avaliação da atividade antibacteriana destas amostras são consideradas elevadas (1 mg/ml), quando se compara a uma substância isolada. No entanto, a literatura demonstra que concentrações similares já foram empregadas para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de *Baccharis glutinosa* (VERASTEGUI et al., 1996).

Enfim, o conjunto dos resultados obtidos nesta tese aponta para o potencial biológico das espécies estudadas, sobretudo, no que refere-se à atividade antioxidante. Considerando o amplo emprego na medicina popular e a difícil caracterização botânica do gênero *Baccharis*, também houve uma importante contribuição na diferenciação química destas espécies, através das análises cromatográficas e do isolamento de sete substâncias a partir de seus extratos, contribuindo, também, para a ampliação do conhecimento científico do gênero.

## 5 Conclusões

No presente trabalho foram abordados aspectos químicos e biológicos de espécies do gênero *Baccharis*, além de uma extensa revisão da literatura sobre este gênero.

Foi verificado que o emprego do sistema cromatográfico (CHCl<sub>3</sub>:EtOH:HOAc, 60:40:6, v/v/v) e de dois agentes reveladores com características químicas diferentes (reagente natural e anisaldeído sulfúrico) possibilitou detectar diferenças qualitativas no perfil químico das amostras testadas.

A partir das frações *n*-BuOH de *B. articulata* e *B. usterii* foram isoladas sete substâncias codificadas como: Ba III, Ba IV, Ba V, Ba VI, BuF1, BuF2 e BuT1, respectivamente.

As substâncias Ba III e Ba IV foram identificadas como 4'-O-β-D-glicopiranosil-3,5-dimetóxi-benzil-tetrahydro-2H-pirano-2-il-acetil-carbonato e 4'-O-β-D-glicopiranosil-3,5-di-metóxi-benzil-metanol, respectivamente das quais, até o momento, não foram encontrados relatos na literatura consultada, sugerindo-se, portanto, o caráter inédito de ambas. As substâncias Ba V e Ba VI encontram-se em elucidação estrutural e, segundo os dados espectroscópicos, pode-se sugerir que apresentam características de compostos de origem terpênica.

Em relação a *B. usterii* a substância BuF1 foi identificada como o ácido 4,5-O-[*E*]-di-cafeoilquinico cuja estrutura já é conhecida e relatada para esta espécie. A substância BuF2 foi identificada como 7-hidróxi-5,4'-di-metóxi-flavona da qual também não foram encontrados relatos na literatura. Para a substância BuT1, cuja elucidação estrutural encontra-se em andamento, também é possível sugerir um caráter terpênico.

As frações *n*-BuOH de *B. articulata* e *B. usterii* apresentaram alto efeito antioxidante e mantiveram este efeito no decorrer do ensaio TRAP. As substâncias isoladas a partir da fração *n*-BuOH de *B. articulata* não apresentam potencial antioxidante na mesma intensidade que a referida fração, fato que pode estar relacionado a uma possível ação sinérgica destes compostos.

Os resultados obtidos na avaliação do índice TAR, apontam para reatividade instantânea das frações *n*-BuOH destas espécies, bem como da substância BuF1, previamente isolada da fração *n*-BuOH de *B. usterii*.

Quanto à proteção contra peroxidação lipídica, verificou-se que as frações *n*-BuOH, as substâncias Ba III, Ba IV, Ba V, as sub-frações fenólica e terpênica (*B. usterii*) e o composto BuF1 foram capazes de proteger as células contra a peroxidação lipídica no ensaio TBARS.

No quarto capítulo foi avaliada a atividade antibacteriana dos extratos brutos (hidroetanólicos) e frações (AcOEt, *n*-BuOH e resíduo aquoso) de *B. articulata*, *B. spicata*, *B. trimera* e *B. usterii*, frente às bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis*, *E. faecium* e *P. aeruginosa*.

A fração *n*-BuOH de *B. spicata* (concentração 1 mg/ml) foi ativa frente a *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *E. faecium* (CBM 50 mg/ml).

A fração *n*-BuOH de *B. usterii* na mesma concentração apresentou efeito contra *S. aureus* (CBM 25 mg/ml), *E. faecalis* e *E. faecium* (CBM 50 mg/ml).

Os extratos brutos (1 mg/ml) de *B. trimera* e *B. usterii* foram ativos frente a *S. aureus* (CBM 12,5 mg/ml e 25 mg/ml, respectivamente).

O extrato bruto e as frações de *B. articulata* não apresentaram atividade frente aos microorganismos testados.

## 6 Referências

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

ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; SÁNCHEZ, P. S.; CHIRIBOGA, X.; CARRASCO, L. Antiviral activity of some South American medicinal plants. *Phytotherapy Research* v. 13, p. 142-146, 1999a.

ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; IRURZUN, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. **General Pharmacology**, v. 32, n. 4, p. 499-503, 1999b.

AKAIKE, S.; SUMINO, M.; SEKINE, T.; SEO, S.; KIMURA, N.; IKEGAMI, F. A new *ent*-clerodane diterpene from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 2, p. 197 – 199, 2003.

ARGANDOÑA, V. H.; FAINI, F. A. Oleanolic acid content in *Baccharis linearis* and its effects on *Heliothis zea* larvae. **Phytochemistry**, v. 33, n. 6, p. 1377-1379, 1993.

ARRIAGA-GINER, F. J.; WOLLENWEBER, E.; SCHOBER, I. DOSTAL, P.; BRAUN, S. 2 $\beta$ -hydroxyhauriwaic acid, a clerodane type diterpenoid and other terpenoids from three *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 25, n.3, p. 719-721, 1986.

BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; RIECK, L.; MARQUES, M. C. A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, n. 1, p. 93–98, 2003.

BAILAC, P. N.; DELLACASA, A. D.; BERNASCONI, H. O. et al. Essential oil of female plants of *Baccharis coridifolia* De Candole. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 1, p. 23-24, 2001.

BANDONI, A. L.; MEDINA, J. E.; RONDINA, R. V. D.; COUSSIO, J. D. Genus *Baccharis* L. I: phytochemical analysis of a non polar fraction from *B. crispa* Sprengel. **Planta Medica**, v. 34, n. 6, p. 328-331, 1978.

BARROSO, G. H. Compositae – subtribo baccharidinae Hoffmann - estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguesia**, v. 28, n. 40, p. 7-273, 1976.



BARROSO, G. H; BUENO, O. L. Compostas: subtribo baccharidinae. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2002.

BRIGHENTE, I. M. C.; DIAS, M.; VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 2, p. 156-162, 2007.

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, n. 4, p. 255 – 261, 1999.

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

CEÑAL, J. P.; GIORDANO, O. S.; ROSSOMANDO, P. C. TONN, C. E. Neoclerodane diterpenes from *Baccharis crispa*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 5, p. 490-492, 1997.

CIFUENTE, D. A.; SIMIRGIOTIS, M. J.; FAVIER, L. S.; ROTELLI, A. E.; PELZER, L. E. Antiinflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sophiifolia* in mice. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 6, p. 529-531, 2001.

COBOS, M. I.; RODRIGUEZ, J. L.; OLIVA, M.; DEMO, M.; FAILLACI, S. M.; ZYGADLO, J. A. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Baccharis notoserghila*. **Planta Medica**, v. 67, n. 1, p. 84-86, 2001.

CORREIA-JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. Cultivo de Plantas Medicinais, Codimentares e Aromáticas. Curitiba: EMATER, 1991.

DAI, J.; SUTTISRI, R.; BORDAS, E. SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, D. Clerodane diterpenoids from *Baccharis articulata*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 4, p. 1087-1090, 1993.

DAILY, A.; WAGNER, H.; SELIGMANN, O. Hispidolin and Stigmasta-7, 22-dien-3-ol from *Baccharis genistelloides*. **Fitoterapia**, v. 55, n. 4, p. 236-237, 1984.

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.

De OLIVEIRA, S. Q., DAL PIZZOL, F., MOREIRA, J. C. F.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimeris* and *Baccharis usterii*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 365-368, 2004.

DESMARCHELIER, C.; BERMUDEZ, M. J. N.; COUSSIO, J.; CICCIA, G.; BOVERIS, A. Antioxidant and prooxidant activities in aqueous extracts of Argentine plants. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n. 2, p. 116-120, 1997.

DOBEREINER, J.; REZENDE, A. M. L.; TOKARNIA, C. H. Intoxicação experimental por *Baccharis coridifolia* em coelhos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira Série Veterinária**, v. 11, p. 27-35, 1976.

FAINI, C. L. F.; CASTILLO, M. Diterpenoids from Chilean *Baccharis* Species. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 324-325, 1990.

FERESIN, G. E.; TAPIA, A.; LÓPEZ, S. N.; ZACCHINO, S. Antimicrobial activity of traditional medicine of San Juan province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, pp. 103-107, 2001.

FERESIN, G. E.; TAPIA, A.; GIMENEZ, A.; RAVELO, A. G.; ZACCHINO, S.; SORTINO, M.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, pp. 73-80, 2003.

FERRACINI, V. L.; PARAIBA, L. C.; FILHO, H. F. et al. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 4, p. 355-367, 1995.

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

FRIZZO, C. D.; SERAFINI, L. A.; DELLACASA, E. LORENZO, D.; MOYNA, P. Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. From southern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 4, p. 286-288, 2001.

FULLAS, F.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D. A Bitter-Tasting Trihomolabdane Arabinoside from *Baccharis gaudichaudiana*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 7, p. 2543-2545, 1992.

GALLARDO, O.; TONN, C. E.; NIETO, G.; MORALES, B. GIORDANO, O. S. Bioactive neo-clerodane diterpenoids toward *Tenebrio molitor* larvae from *Teucrium nudicaule* and *Baccharis spicata* (Lam.) Beill. **Natural Products Letters**, v. 8, p. 189-197, 1996.

GARCIA, C. C.; ROSSO, M. L.; BERTONI, M. D.; MAIER, M. S.; DAMONTE, E. B. Evaluation of the antiviral activity against junin virus of macrocyclic trichothecenes produced by the hypocrealean epibiont of *Baccharis coridifolia*. **Planta Medica**, v. 68, n. 3, p. 209 – 212, 2002.

GENÉ, R. M.; CARTAÑÁ, C.; ADZET, T.; MARIN, E.; PARELLA, T.; AÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of active constituents. **Planta Medica**, v. 62, n. 3, p. 232-335, 1996.

GENÉ, R.; MARIN, E.; ADZET, T. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. **Planta Medica**, v. 58, n. 6, p. 565-566, 1992.

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

GIANELLO, J. C.; CIFUENTE, D. A.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E. Bioactive flavones and terpenes from *Baccharis calliprinos* and *B. rhetinodes* (ASTERACEAE). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 18, n. 2, p. 99-102, 1999.

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

GUO, Y.; LI, Y.; XU, J.; WATANABE, R.; OSHIMA, Y.; YAMAKUNI, T.; OHIZUMI, Y. Bioactive *ent*-clerodane diterpenoids from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 2, p. 274-276, 2006.

GUO, Y.; LI, Y.; XU, J.; LI, N.; YAMAKUNI, T.; OHIZUMI, Y. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 10, p. 1532-1534, 2007.

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

HABERMEHL, G. G. Isolation and structure of new toxins from plants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 377-380, 1989.

HABERMEHL, G. G.; BUSAM, L.; HEYDEL, P. MEBS, D.; TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; SPRAUL, M. Macrocyclic trichothecenes: cause of livestock poisoning by the Brazilian plant *Baccharis coridifolia*. **Toxicon**, v. 23, n. 5, p. 731-745, 1985.

HALLIWELL B.; GULTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1999.

HE, K.; MONTENEGRO, G.; HOFFMANN, J. J. Diterpenoids from *Baccharis linearis*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 4, p. 1123-1127, 1996.

HERAS, B.; SLOWING, K.; BENEDI, J.; CARRETERO, E.; TOLEDO, C.; BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M. J.; GOMEZ – SERRANILLOS, P.; LISO, P. A.; VILLAR, A.; 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.

HERZ, W.; PILOTTI, A.; SÖDERHOLM, A.; SHUHAMA, J. K.; VICHNEWSKI, W. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 3913-3916, 1977.

HIKAWCZUK, V. E. J.; ROSSOMANDO, P. C.; GIORDANO, O. S.; SAAD, J. R. *neo* – Clerodane diterpenoids from *Baccharis flabellata*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 389 – 394, 2002.

JAKUPOVIC, J.; SCHUSTER, A.; WASSHAUSEN, D. C. Acetylenes and labdanes from *Baccharis pedunculata*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2785-2787, 1991.

JARVIS, B. B.; PENA, N. B.; CÖMEZOGLU, S. N.; RAO, M. M. Non-trichothecenes from *Baccharis megapotamica*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 2, p. 533-535, 1986.

JARVIS, B. B.; CÖMEZOGLU, S. N.; AMONN, H. L.; BREEDLOVE, C. K.; MILLER, R. W.; STREELMAN, D. R.; SNEDEN, A. T.; DAILEY Jr, R. G.; KUPCHAN, M. New macrocyclic trichothecenes from *Baccharis megapotamica*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 5, p. 815-828, 1987a.

JARVIS, B. B.; WELLS, K. M.; LEE, Y. W. BEAN, G. A.; KOMMEDAHL, T.; BARROS, C. S.; BARROS, S. S. Macrocyclic trichothecene mycotoxin in Brazilian species of *Baccharis*. **Phytopathology**, v. 77, n.6, p. 980-984, 1987b.

JARVIS, B. B.; MIDIWO, J. O.; BEAN, G. A. ABOUL – NASR, M. B.; BARROS, C.S. The mystery of trichothecenes antibiotics in *Baccharis* species. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 4, p. 736-744, 1988.

JARVIS, B. B.; MOKHTARI-REJALI, N.; SCHENKEL, E. P.; BARROS, C.S.; MATZENBACHER, N. I. Trichothecenes mycotoxins from Brazilian *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 30, n. 3, p. 789-797, 1991.

JARVIS, B.; WANG, S.; COX, C. RAO, M. M.; PHILIP, V.; VARASCHIN, M. S.; BARROS, C. S. Brazilian *Baccharis* toxins: Liverstock poisoning and the isolation of macrocyclic trichothecene glucosides. **Natural Toxins**, v. 4, n. 2, p. 58-71, 1996.

KUPCHAN, S. M.; BAUERSCHMIDT, E. Cytotoxic Flavonols from *Baccharis sarothroides*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 3, p. 664-666, 1971.

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

LABBE, C.; CASTILLO, M.; HERNABDEZ, M. Diterpenoids from *Baccharis lejía*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1607-1611, 1991.

LI, C.J.; AHMED, A. A.; ARIAS, A. C. MABRY, T. J. Clerodane diterpenoids, long chain esters of coumaric acid and other compounds from *Baccharis myrsinites*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 3, p. 571-574, 1997.

LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; IDA, F. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *Baccharis latifolia* and *Baccharis dracunculifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 2, p. 381-389, 1995.

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, n. 1-2, p. 142 –152, 1999.

MELLO, J. C. P. **Desenvolvimento galênico de macerados de *Baccharis trimera* (less.) DC.-Compositae-(carqueja)**. 1989. 136 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1989.

MIROCHA, C. J.; ABBAS, H. K.; KOMMEDAHL, T.; JARVIS, B. B. Mycotoxin production by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium sporotrichioides* isolated from *Baccharis* spp. from Brazil. **Applied e Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 254-255, 1989.

MIROCHA, C. J.; ABBAS, H. K.; TREEFUL, L.; BEAN, G. T-2 toxin and diacetoxys cirpenol metabolism by *Baccharis* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2277-2280, 1988.

MIYAKADO, M.; KATO, T.; OHNO, N.; MABRY, T. J. Pinocembrin and (+)- $\beta$ -eudesmol from *Hymenoclea monogyra* and *Baccharis glutinosa*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 5, p. 846, 1976.

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.

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, n.1-2, p. 145-151, 2000.

MOLT, O.; TRKA, A. Zusammensetzung des brasilianischen vassoura-óls aus *Baccharis dracunculifolia*. **Parfümerie und Kosmetik**, v. 64, n. 9, p. 488-491, 1983.

MONTANHA, J. A.; MOELLERKE, P.; BORDIGNON, S. A. L.; SCHENKEL, E. P.; ROEHE, P. M. Antiviral activity of Brazilian plant extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 2, p. 183-186, 2004.

MUSCHIETTI, L.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; COUSSIO, J.; SEGURA, L.; CARTAÑÁ, C.; CAÑIGUERAL, S.; ADZET, T. The antiinflammatory effect of some species from South America. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 1, p. 84-86, 1996.

NAGATANI, Y.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 11, p. 1388 – 1394, 2001.

PALACIOS, P.; GUTKIND, G.; RONDINA, R. V. D. COUSSIO, J. D. Antimicrobial activity of *Baccharis crispa* and *Baccharis notoserjila* (II). **Planta Medica**, v. 49, n. 2, p. 128, 1983.

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

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

PALOMINO, S. S.; ABAD, M. J.; BEDOYA, L. M.; GARCÍA, J.; GONZALES, E.; CHIRIBOGA, X.; BERMEJO, P.; ALCAMI, J. Screening of South American plants against human immunodeficiency virus: Preliminary fractionation of aqueous extract from *Baccharis trinervis*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, V. 25, n. 9, p. 1147-1150, 2002.

PÉREZ, F.; MARIN, E.; ADZET, T. The antiinflammatory effect of several Compositae from South America extracts in rats. **Phytotherapy Research**, v. 9, n. 2, p. 145-146, 1995.

RAHALISON, L.; BENATHAN, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; GUPTA, M. P.; SOLIS, P. N.; FUZZATI, N. Antifungal principles of *Baccharis pedunculata*. **Planta Medica**, v. 61, pp. 360–362, 1995.

RENDON, W.; VILA, J. L. Phytochemical study of *Baccharis trimera*. **Revista Boliviana de Química**, v. 12, n. 1, p. 13-15, 1995.

RIVERA, A. P.; FAINI, C. L. F.; CASTILLO, M. 15 $\alpha$ -hydroxy- $\beta$ -amirin and Patagonic acid from *Baccharis magellanica* and *Baccharis patagonica*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 1, p. 155-157, 1988.

RIZZO, I.; VARSAVKY, E.; HAIDUKOWSKI, M.; FRADE, H. Macrocyclic trichothecenes in *Baccharis coridifolia* plants and endophytes and *Baccharis artemisioides* plants. **Toxicon**, v. 35, n. 5, p. 753-757, 1997.

ROSSO, L.; MAIER, M. S.; BERTONI, M. D. Trichothecenes production by the hypocrealean epibiont of *Baccharis coridifolia*. **Plant Biology**, v. 2, p. 684-686, 2000.

SAAD, J. R.; DAVICINO, J. G.; GIORDANO, O. S. A Diterpene and Flavonoids of *Baccharis flabellata*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1884-1887, 1988.

SALAMA, A. M.; POLO N, A.; CONTRERAS, C. R. MALDONADO, L. Analisis fitoquimico y farmacologico preliminar de las hojas de *Baccharis decussata*. **Revista Colombiana de Ciencias Quimico-Farmacéuticas**, v. 16, p. 45-50, 1987.

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, n. 1, p. 67 – 80, 2002.

SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J.; VICHNEWSKI, W. BULHÕES, M. S.; LEITÃO FILHO, H. F. Atividade moluscicida em *Bionphalaria glabrata* de uma lactona diterpênica e de uma flavona isoladas de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candole. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto**, v. 17, n. 1, p. 43-47, 1980.

SHARP, H.; BARTHOLOMEW, B.; BRIGHT, C. LATIF, Z.; SARKER, S. D.; NASH, R. J. 6-oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 1, p. 105-107, 2001.

SCHENKEL, E. P.; SOBOTTKA, A. M.; LANKHORST, P. P.; SCHRIPSEMA, J. An unusual diterpene and other constituents from *Baccharis ochracea*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 4, p. 755-757, 1997.

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 Analysis**, v. 16, p. 307-314, 2005.

SILVA, M.; MUNDACA, J. M.; SAMMES, P. G. Flavonoid and triterpene constituents of *Baccharis rhomboidalis*. **Phytochemistry**, v. 10, n. 8, p. 1942-1943, 1971.

SOBOTTKA, A. M. **Estudo químico de *Baccharis ochracea* spreng. e *Iodina rhombifolia* Hook. et Arn. e efeito de seus extratos aquosos sobre a reprodução de ratas**. 1992. 102 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1992.



SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v. 53, n. 1, p. 37-39, 1987.

STAPEL, G.; MENßEN, H. G.; SNATZKE, G. Isolierung und strukturaufklärung von zwei diterpenen aus *Baccharis articulata*. **Planta Medica**, v. 39, n. 4, p. 366-374, 1980.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J. Intoxicação experimental em ovinos por "Mio-mio", *Baccharis coridifolia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira Série Veterinária**, v. 11, p. 19-26, 1976.

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, n. 1, p. 5-6, 1987.

VARASCHIN, M. S.; BARROS, C. S. L.; JARVIS, B. B. Experimental poisoning by *Baccharis coridifolia* (Compositae) in cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 69-75, 1998.

VERASTEGUI, M. A.; SANCHEZ, C. A.; HEREDIA, N. L.; GARCIA-ALVARADO, J. A. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan Desert. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, pp. 175-177, 1996.

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

WÄCHTER, G. A.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMANN, B. N. Diterpenoids from *Baccharis pingraea*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 2, p. 307-308, 1998.

WAGNER, H.; IYENGAR, M. A. Flavonol-3-glucosides in *Baccharis angustifolia* and *Berlandiera pumila*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 1, p. 444, 1972.

WAGNER, H.; SEITZ, R.; LOTTER, H.; HERZ, W. New furanoid *ent*-clerodanes from *Baccharis tricuneata*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 17, p. 3339-3345, 1978.

WARNING, U.; BOHLMANN, F.; SANCHEZ, H.; DEL RIO, S. E.; DOMINGUEZ, X. A. New constituents of *Baccharis salicifolia*. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 17, n. 3-4, p. 199-200, 1986.

ZAMORANO, R.; AGUIRRE, M. E.; MUÑOZ DE LA PENA, A. et al. Flavonoids from *Baccharis concava* Pers. **Boletín de la Sociedad Chilena de Quimica**, v. 32, n. 2, p. 101-103, 1987.

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

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; KING, R. M. ROBINSON, H. Diterpene glycosides and other constituents from Argentinian *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 25, n. 12, p. 2841-2855, 1986.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; SOLOMON, J. C.; ROBINSON, H. ROBINSON, H. Ent-clerodanes and other constituents from Bolivian *Baccharis* Species. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 531-542, 1989.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; NIEMEYER, H. M. An unusual dimeric sesquiterpene and other constituents from chilean *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 30, n. 5, p. 1597-1601, 1991.

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

ZUNINO, M. P.; LOPEZ, M. L.; FAILLACI, S. M. LOPEZ, A. G.; ESPINAR, L. A.; ZYGADLO, J. A. Essential oil of *Baccharis cordobensis* Heering. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, n. 3, p. 151-152, 2001.

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

## **Biografia**

### **Dados Pessoais**

Nome: Simone Quintana de Oliveira

Data de nascimento: 07/04/73

Naturalidade: Porto Alegre/RS

Nacionalidade: Brasileira

Filiação: Moacir Viegas de Oliveira e Eva Eloina Quintana de Oliveira

Profissão: Farmacêutica

### **Dados Acadêmicos**

1992/02: Ingresso na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

1997/02: Obtenção do Grau de Farmacêutico - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

1995-1998: Bolsista de Iniciação Científica (PROPESQ – UFRGS) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia (UFRGS) sob a orientação do Prof. Dr. Volker Spitzer.

1998-2000: Bolsista de Iniciação Científica (CNPq) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia (UFRGS) sob a orientação do Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel.

março/2000-abril/2002: Bolsista de Mestrado (CAPES) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia (UFRGS) sob a orientação da Profa. Dra. Grace Gosmann.

Agosto/2003: Ingresso no Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia (UFRGS) sob a orientação da Profa. Dra. Grace Gosmann.

Bolsista de Doutorado (CNPq) no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia (UFRGS) a partir de setembro de 2005.

### **Publicações**

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.

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 Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 365-368, 2004.

De OLIVEIRA, S.Q., TRENTIN, V.H., KAPPEL, V.D., BARELLI, C., GOSMANN, G., REGINATTO, F. Screening of Antibacterial Activity of South Brazilian *Baccharis* Species. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, n. 5, p. 434–438, 2005.

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