

SIMONE DIAS FRANCO

***Bidens segetum* Mart. ex Colla: Isolamento e identificação dos poliacetilenos com atividade antifúngica (gênero *Cladosporium*) e polifenóis com atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRA em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO
2019

SIMONE DIAS FRANCO

***Bidens segetum* Mart. ex Colla: Isolamento e identificação dos poliacetilenos com atividade antifúngica (gênero *Cladosporium*) e polifenóis com atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRA em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: Dra. LUCE MARIA BRANDÃO TORRES

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Franco, Simone Dias

F825b *Bidens segetum* Mart. ex Colla: Isolamento e identificação dos poliacetilenos com atividade antifúngica (gênero *Cladosporium*) e polifenóis com atividade antioxidante do extrato etanólico de folhas / Simone Dias Franco -- São Paulo, 2019.
88p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2019.
Bibliografia.

1. Asteraceae. 2. Atividade anti-radicalar. 3. Atividade antioxidante.
I. Título.

CDU: 582.998.0

“Não importa onde você parou... em que momento da vida você cansou...

O que importa é que sempre possível e necessário “recomeçar”.

Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo... renovar as esperanças na vida e, o mais importante...acreditar em você de novo.

Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado...

Chorou muito? Foi limpeza da alma...

Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia...

Sentiu-se só por diversas vezes? É porque fechaste a porta até para os anjos...

Acreditou que tudo estava perdido? Era o início, tua melhora...

Aonde você quer chegar? Ir alto? Sonhe alto...

Queira o melhor do melhor... Se pensamos pequeno... coisas pequenas teremos...

Mas se desejarmos fortemente o melhor e principalmente lutarmos pelo melhor... o melhor vai se instalar em nossa vida.

Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho da minha altura.”

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

A conclusão desse trabalho representa mais uma conquista e a superação de mais uma etapa da minha formação acadêmica e profissional, onde pude perceber que sou capaz de ir muito além do que eu possa imaginar desde que haja muito esforço e dedicação, e isto não seria possível sem a ajuda de muitas pessoas que estiveram comigo nesta etapa, tornando esse sonho realidade. Agradeço imensamente a:

Deus,

Pela vida e oportunidades que colocou em meu caminho;

Minha mãe,

Geni Dias, pela amizade, apoio, dedicação e por acreditar em minha capacidade de alcançar os meus objetivos;

Dra. Luce Maria Brandão Torres,

Minha orientadora, por toda credibilidade, confiança, paciência, amizade e por todo aprendizado transmitido durante todo o período de nossa convivência;

Dr. Marcelo J. Pena Ferreira,

Colaborador do meu trabalho, que se dedicou em me auxiliar no isolamento e identificação das substâncias ativas, ajudando muito na concretização desse projeto;

Dra. Fabiana Henrique Machado,

Colaboradora do meu trabalho, que me mostrou outras possibilidades de análises, enriquecendo meus resultados

Dra. Cynthia Murakami,

Pela amizade, acolhimento, força e por toda ajuda e ensinamento durante todo o período de mestrado, me ajudando muito sempre que precisei;

A todos meus colegas do Instituto de Botânica,

Em especial à Juliane Galdino, Gabriela Tavares, Celso M. José, Alessandra Urakawa, por todo companheirismo, ajuda e apoio;

Cinthia Tamayose e Juliana Cajado,
E a todos funcionários do laboratório de fitoquímica do Instituto de Biociências da USP, que
me acolheram e me ajudaram sempre que eu precisei;

Jaqueline Pereira Moura Soares,
Por toda dedicação e empenho com as minhas análises realizadas na Faculdade de Ciências
Médicas da Santa Casa de Misericórdia

Pesquisadores e funcionários,
Do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, por toda convivência e apoio;

CNPq,
Pela bolsa concedida;

Amigos,
Que sempre me ajudaram a descontraír nos momentos de sufoco e me mostraram que a
vida vai muito além do que as paredes de laboratório;

Instituto de Botânica,
Em especial a todos que tive contato durante o período de mestrado;

E a todos que de alguma forma estiveram presentes durante esse momento da minha vida,

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Bidens segetum Mart. ex Colla (Asteraceae) é popularmente conhecida como "picão do mato", uma planta herbácea que ocorre no bioma Cerrado de alguns estados brasileiros. As espécies de *Bidens* são usadas na medicina popular, muitas das quais já foram estudadas. As atividades atribuídas a estas plantas estão relacionadas aos metabólitos secundários ou produtos naturais, que são sintetizados para desempenhar funções ecológicas primárias, responsáveis pelas interações com o meio ambiente, proteção contra raios ultravioleta (UV), polinização e podem ter sua síntese alterada em função das condições ambientais. Entre os metabólitos secundários, relatados na literatura para o gênero *Bidens* estão os polifenóis e os poliacetilenos. O objetivo do presente trabalho foi isolar, purificar e identificar os poliacetilenos com atividade antifúngica e os polifenóis com atividade antioxidante das frações obtidas do extrato etanólico de *B. segetum*. As folhas frescas foram coletadas de espécimes de *B. segetum* cultivadas no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo, SP (IBt, SP). As folhas foram pesadas, congeladas, liofilizadas, trituradas e maceradas com etanol (93°) por três dias, obtendo-se o extrato bruto (EEBs). Os métodos de fracionamentos monitorados foram realizados com EEBs. O primeiro por cromatografia de exclusão (Sephadex LH-20) em coluna de topo aberto e gradiente com os eluentes hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e H₂O e o segundo por partição líquido-líquido em funil de vidro, com Hex, AcOEt e H₂O. A avaliação do potencial antioxidante baseou-se no ensaio qualitativo em CCD, sílica gel e quercetina como padrão e quantitativo em microplaca e ácido clorogênico como padrão, ambos utilizando o ensaio do radical livre DPPH. Para avaliar a atividade antifúngica foram realizadas bioautografias em CCD e a determinação do limite de detecção com os fungos filamentosos *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* e nistatina como padrão. Para otimizar o método de extração de poliacetilenos responsáveis pela atividade antifúngica, extratos foram obtidos com folhas frescas congeladas e liofilizadas e folhas secas (60° C) por imersões em diclorometano (DCM) e AcOEt e os perfis cromatográficos dos extratos (HPLC-DAD) mostraram que folhas frescas, congeladas e liofilizadas constituem uma boa matriz para o estudo de poliacetilenos, presentes na parte superficial das folhas. O estudo fitoquímico foi realizado por CCD utilizando reveladores específicos para as classes de metabólitos, especialmente para compostos fenólicos, como flavonoides (NP - PEG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica e semi-preparativa e detecção na região do ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (EM/EM), cromatografia líquida em camada preparativa (CCDP, sílica gel) e em coluna de topo aberto usando fase reversa (C18) e ressonância magnética nuclear uni (¹HNMR) e bidimensionais (HSQC, HMBC). As subfrações PP4 e PFFR3.3 foram obtidas dos sucessivos fracionamentos de EEBs, purificação em CCDP e cromatografia líquida de alta eficiência em escala semi-preparativa e apresentaram os melhores resultados para grau de pureza (CLAE-DAD) e atividade em ensaios antifúngicos (*Cladosporium*) e anti-radicalar (DPPH) respectivamente. Os dados das análises mostraram que a subfração PFFR3.3 é rica em 5-CGA, similar ao padrão (5-O-E-cafeoilquinico). Para a subfração PP4 com atividade antifúngica (10 µg, *C. sphaerospermum*), foram identificados poliacetilenos (LC-DAD/EM/EM) nos tempos de retenção de Tr=17.7 min (C₂₂H₂₆O₈) e m/z = 419 Da [M+H⁺] na forma glicosilada e outro no Tr=22.6 min (C₃₁H₃₄O₁₀) de m/z = 567 Da [M+H⁺] esterificado com o derivado do ácido 2-O-cafeoil-2-metil-D-eritônico. A PP4, PFFR3.3 e o ácido clorogênico (5-CGA) em várias concentrações foram avaliados nos ensaios *in vitro*, em diferentes tempos (5, 15 e 30 min) com células de melanócitos (NGM) e linhagens de melanoma de crescimento radial (Wm 1552), crescimento vertical (Wm 1366) e crescimento metastático (Lu 1205) que quantificam a produção de ânion superóxido, com base na oxidação de DHE (dihidroetídio), molécula sonda. Os resultados mostraram que não houve diminuição dos níveis de ânion superóxido (O₂⁻), em relação ao controle, ou seja, não foi observado inibição na produção de ânion superóxido em células de melanócito (NGM) e linhagens de melanoma testadas nas subfrações PP4, PFFR3.3 e padrão 5-CGA.

Palavras chave: Asteraceae, Atividade anti-radicalar, Atividade antioxidante, Compostos fenólicos, Poliacetilenos.

ABSTRACT

Bidens segetum Mart. ex Colla (Asteraceae) is popularly known as "picão do mato", an herbaceous plant that occurs in the Cerrado biome of some Brazilian states. *Bidens* species are used in folk medicine, many of which have already been studied. The activities attributed to these plants are related to secondary metabolites or natural products, which are synthesized to perform primary ecological functions, responsible for interactions with the environment, protection against ultraviolet rays (UV), pollination and may have their synthesis altered as a function of their characteristics environmental conditions. Among the secondary metabolites reported in the literature for the genus *Bidens* are polyphenols and polyacetylenes. The objective of the present work was to isolate, purify and identify polyacetylenes with antifungal activity and polyphenols with antioxidant activity from the fractions obtained from *B. segetum* ethanolic extract. The fresh leaves were collected from *B. segetum* specimens grown at the Núcleo de Pesquisa de Fisiologia e Bioquímica from Instituto de Botânica de São Paulo, SP (IBt, SP). The leaves were weighed, frozen, lyophilized, crushed and macerated with ethanol (93°) for three days to obtain crude extract (EEBs). The monitored fractionation methods were performed with EEBs. The former by exclusion chromatography (Sephadex LH-20) on an open top column and gradient with the eluents hexane (Hex), ethyl acetate (AcOEt), methanol (MeOH) and H₂O and the second by liquid-funnel partition. glass, with Hex, AcOEt and H₂O. The evaluation of antioxidant potential was based on the qualitative assay on CCD, silica gel and quercetin as standard and quantitative on microplate and chlorogenic acid as standard, both using the DPPH free radical assay. To evaluate antifungal activity, CCD bioautographs were performed and the detection limit was determined with the filamentous fungi *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides* and nystatin as standard. To optimize the extraction method of polyacetylenes responsible for antifungal activity, extracts were obtained with frozen and lyophilized fresh leaves and dried leaves (60°C) by dichloromethane (DCM) and AcEOt immersions and the chromatographic profiles of the extracts (HPLC-DAD) showed whereas fresh, frozen and lyophilized leaves are a good matrix for the study of polyacetylenes present in the superficial part of the leaves. The phytochemical study was performed by CCD using class specific metabolite developers, especially for phenolic compounds such as flavonoids (NP - PEG), high performance liquid chromatography (HPLC) on analytical and semi-preparative scale and detection in the ultraviolet region (UV) and mass spectrometry (MS / MS), preparative layer (CCDP, silica gel) and open-top column chromatography using reverse phase (C18) and uni (¹HNMR) and two-dimensional (HSQC, HMBC) nuclear magnetic resonance). The subfractions PP4 and PFFR3.3 were obtained from successive EEBs fractionations, CCDP purification and semi-preparative high performance liquid chromatography and showed the best results for purity (HPLC-DAD) and activity in antifungal assays (*Cladosporium*) and anti-radical (DPPH) respectively. Analysis data showed that the PFFR3.3 subfraction is rich in 5-CGA, similar to the standard (5-O-E-cafeoylquinic). For PP4 subfraction with antifungal activity (10 µg, *C. sphaerospermum*), polyacetylenes (LC-DAD / MS / MS) were identified at retention times of Tr = 17.7 min (C₂₂H₂₆O₈) at / z = 419 Da [M + H +] in glycosylated form and another at Tr = 22.6 min (C₃₁H₃₄O₁₀) of m / z = 567 Da [M + H +] esterified with the 2-O-cafeoyl-2-methyl-D-erythronic acid derivative. PP4, PFFR3.3 and chlorogenic acid (5-CGA) at various concentrations were evaluated in in vitro assays at different times (5, 15 and 30 min) with melanocyte cells (NGM) and radial growth melanoma strains. (Wm 1552), vertical growth (Wm 1366) and metastatic growth (Lu 1205) which quantify superoxide anion production based on the oxidation of DHE (dihydroethidium) probe molecule. The results showed that there was no decrease in superoxide anion (O₂⁻) levels compared to control, that is, no inhibition of superoxide anion production was observed in melanocyte (NGM) cells and melanoma strains tested in PP4 subfractions. PFFR3.3 and 5-CGA standard.

Keywords: Asteraceae, Anti-radical activity, Antioxidant activity, Phenolic compounds, Polyacetylenes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A - Flores de <i>Bidens segetum</i> B - <i>Bidens segetum</i> : Flores com polinizadores.....	3
Figura 2 - Fatores que influenciam na síntese dos metabólitos secundários (Gobbo – Neto & Lopes 2007).....	6
Figura 3 - Esquema adaptado das rotas de biossíntese das principais classes de metabólitos secundários (Taiz & Zeiger 2006).....	7
Figura 4 - Fórmula estrutural dos Ácidos Clorogênicos (CGAs).	10
Figura 5 - Exemplos de poliacetilenos isolados no gênero <i>Bidens</i>	12
Figura 6 - (1) Forma radicalar e (2) não radicalar do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). (Sucupira et al. 2015).	15
Figura 7 - Fluxograma 1 com as etapas de obtenção, separação e purificação do material vegetal (folhas frescas de <i>Bidens segetum</i>) a partir do 1º fracionamento e da coluna de fase reversa.	23
Figura 8 - Fluxograma 2 com as etapas de obtenção, separação e purificação do material (folhas frescas de <i>Bidens segetum</i>) a partir do 2º fracionamento e da cromatografia de camada delgada preparativa – CCDP.	25
Figura 9 - Comparação entre os perfis cromatográficos das folhas de <i>B. segetum</i> em AcOEt obtidos a partir da técnica de CLAE - DAD. A – Folhas secas em estufa a 60°C; B - Folhas liofilizadas. Corrida de 60 min. λ – 352 nm. 1 = 14.564 min; 2 = 16.887 min; 3 = 17.514 min; 4 = 19.519 min; 5 = 39.372 min; 6 = 45.371 min; 7 = 47.732 min; 8 = 51.327 min; 9 = 52.433 min.....	34
Figura 10 - Foto das placas cromatográficas (CCD, em sílica gel F ₂₅₄ eluídos em BAW) 1-FH ₁ , 2-FH+AcEt ₁ , 3-FAcEOt ₁ , 4-FAcEOt+MeOH ₁ , 5-FMeOH ₁ , 6- Quercetina. A - Revelada λ = 254 nm, B - Revelada com DPPH sob luz branca.....	37
Figura 11 - Foto das placas cromatográficas (CCD, em sílica gel F ₂₅₄ eluídos em BAW) A - AM1 a AM9; B - AM10 a AM18; C – AM19 a AM26; D – AM27 a AM34; Padrão Quercetina; Reveladas com DPPH sob luz branca.	38
Figura 12 - Foto das placas cromatográficas (CCD, em sílica gel F ₂₅₄ eluídos em BAW) 1 e 2 - AM17; 3 - AM18; 4 - AM19; 5 e 6 - AM20; 7 e 8 - AM21; 9 e 10 - AM22; 11 e 12 - AM23. Revelada com DPPH sob luz branca.....	40
Figura 13 - Foto da placa cromatográfica (CCD, em sílica gel F ₂₅₄ eluída em BAW) 1 – FFR1; 2 – FFR2; 3 e 4 – FFR3; 5 – FFR4; 6 a 10 – FFR5; 11 – FFR6; 12 – FFR7. Revelada com DPPH sob luz branca.....	41

Figura 14 - Foto da placa cromatográfica (CCD, em sílica gel F ₂₅₄ eluída em BAW) 1 – PFFR3.1; 2 – PFFR3.2; 3 – PFFR3.3. Revelada com DPPH sob luz branca.....	42
Figura 15 - Gráfico da curva de atividade anti-radicalar do padrão 5 - CGA do método de sequestro do radical DPPH.....	43
Figura 16 - Gráfico da quantificação da atividade anti-radicalar do padrão 5 – CGA nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/mL.....	44
Figura 17 - Gráfico da quantificação da atividade anti-radicalar (DPPH) da subfração PFFR3.3 nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/mL.	44
Figura 18 - Gráfico da quantificação da atividade anti-radicalar da subfração PFFR3.3 nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 250, e 300 µg/mL e padrão Ácido clorogênico (5 - CGA).	45
Figura 19 - Foto das placas cromatográficas (CCD, em sílica gel F ₂₅₄ eluídos em BAW) A – AM1 a AM9; B - AM10 a AM18; C – AM19 a AM26; D – AM27 a AM34; Padrão Quercetina; Reveladas com NP – PEG λ = 366nm.....	46
Figura 20 - Foto da placa cromatográfica (CCD, em sílica gel F ₂₅₄ eluída em BAW) 1 – PFFR3.1; 2 – PFFR3.2; 3 – PFFR3.3. Revelada com NP – PEG A : λ = 366nm; B : Luz branca.	47
Figura 21 - Foto dos cromatogramas (CCD, em sílica gel F ₂₅₄ eluído em CHCl ₃ /MeOH 9:1, sob luz branca) 1 -FH ₂ , 2 -FAcEOt ₂ (A), 3 -FAcEOt ₂ (B), 4 -MeOH, 5 -Nistatina. A - Revelada com esporos do fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i> , B - Revelada com esporos do fungo <i>Cladosporium sphaerospermum</i> . Fotografadas sob luz branca.	48
Figura 22 - Foto dos cromatogramas (CCD, em sílica gel F ₂₅₄ eluído em CHCl ₃ /MeOH 9:1, sob luz branca) 1 -PP1, 2 -PP2, 3 -PP3, 4 -PP4, 5 -PP5, 6 -PP6, 7 -PP7, 8 -PP8, 9 -PP9, 10 -PP10, 11 - Ác. Cinâmico, 12 -Nistatina. A - Revelada com esporos do fungo <i>C. cladosporioides</i> , B - Revelada com esporos do fungo <i>C. sphaerospermum</i> . Fotografadas sob luz branca.	49
Figura 23 - Foto do bioautograma de PP4 mostrando os halos brancos proporcionais às concentrações em relação ao padrão Nistatina (limite de detecção, em sílica gel F ₂₅₄ , sob luz branca, <i>C. sphaerospermum</i> nas concentrações de 100; 50; 25; 10 e 05 µg e padrão Nistatina 05 µg).	50
Figura 24 - Foto do bioautograma de PP4.1 mostrando resultados negativos, halos brancos não foram observados comparado ao padrão nistatina (limite de detecção, em sílica gel F ₂₅₄ , sob luz branca, <i>C. sphaerospermum</i> nas concentrações de 100; 50; 25; 10 e 05 µg e padrão Nistatina 05 µg).	50
Figura 25 - Gráficos de atividade antioxidante da subfração PFFR3.3 em células de melanoma humano (tempo de ação 30 min). A - Wm1552; B - Wm1366; C - Lu1205.	52
Figura 26 - Gráfico da atividade antioxidante da subfração PFFR3.3 em cultura de células do melanoma linhagem LU 1205. A – 5 min; B – 15 min.	52

Figura 27 - Gráfico da atividade antioxidante da PFFR3.3 em culturas de células de melanócito (NGM) nas concentrações de 0, 5; 1; 10 e 100 µg e tempo de ação da droga de 30min.	53
Figura 28 - Gráficos de atividade antioxidante do padrão 5 - CGA em células de melanoma humano A - Wm1366 > concentração; B - Wm1366 < concentração; C – Wm 1552 e D - Lu1205.	54
Figura 29 - Gráfico da atividade antioxidante do padrão 5 - CGA em culturas de células de melanócito (NGM) nas concentrações de 1; 10 e 100 µg.	54
Figura 30 - Gráfico da atividade antioxidante da subfração PP4 em cultura de células do melanoma linhagem LU 1205. A – 5 min; B – 15 min.	55
Figura 31 - Perfil cromatográfico (HPLC – DAD) da subfração PFFR3.3. A - Cromatograma registrado no comprimento de onda $\lambda=325$ nm B - Espectro de UV.	56
Figura 32 - Estrutura química do ácido 5-O-(E)-cafeoilquínico.	56
Figura 33 - Perfil cromatográfico (HPLC-DAD) da subfração PP4.1 A - Cromatograma em CLAE no comprimento de onda $\lambda=325$ nm. B - Espectro de UV.....	57
Figura 34 - Perfis cromatográficos (LC-DAD/MS/MS/ESI ⁺) da subfração PP4. A - $\lambda=254$ nm, B – $\lambda=315$ nm, C – Cromatograma de íons totais (TIC).	58
Figura 35 - Dados das análises LC-DAD/MS/MS/ ESI ⁺ dos picos cromatográficos com Tr = 17.7 min. e Tr= 22.6 min. A - Dados do ion de m/z [M+H] ⁺ = 419 Da. B – Espectro de massas MS ² 419 Da Tr= 17.7 min, C - Dados do ion de m/z [M+H] ⁺ = 567 Da Tr= 22.6 min. D – Espectro de massas MS ² 567 Da..	59
Figura 36 - Estrutura proposta para o poliacetileno presente em PP4 com m/z [M+H] ⁺ = 419 Da e Tr =17.7 min. Fórmula molecular C ₂₂ H ₂₇ O ₈ (M =418 Da). Íon fragmento m/z=257 Da (100%) [M ⁺ - 162].	60
Figura 37 - Estrutura proposta para o poliacetileno presente em PP4 com m/z [M+H] ⁺ = 567 Da. e Tr = 22.6 min C ₃₁ H ₃₄ O ₁₀	60
Figura 38 - Perfil cromatográfico (HPLC – DAD) da subfração FFR4 no comprimento de onda $\lambda=352$ nm.	61
Figura 39 - Perfil cromatográfico (HPLC – DAD) da subfração FFR4 no comprimento de onda $\lambda=352$ nm.	61
Figura 40 - Estrutura química do ácido 3,4 – dicafeoilquínico.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimento do extrato etanólico das folhas de <i>B. segetum</i> – EEBs.....	33
Tabela 2 - Rendimento das frações obtidas do 1º fracionamento do Extrato Etanólico – EEBs (45,0 g)	35
Tabela 3 - Rendimentos obtidos da coluna LH 20 (AM1-AM47) e das subfrações resultantes da coluna de fase reversa.....	36
Tabela 4 - Rendimento das subfrações obtidas da FFR3 por purificação em placa cromatográfica preparativa (CCDP) 23,6 mg.	36
Tabela 5 – Rendimento das subfrações (2º fracionamento) do EEBs (75 g) e das subfrações da FAcEOt ₂ (300 mg) obtidas por cromatográfica de camada delgada preparativa (CCDP).....	37
Tabela 6 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) das frações ativas com o ensaio do DPPH.	38
Tabela 7 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) das subfrações (AM1 – AM34) obtidas com o ensaio do DPPH.	39
Tabela 8 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) obtidos pelas subfrações (AM17 – AM23) ativas para atividade anti-radicalar.....	40
Tabela 9 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) obtidos pelas subfrações (FFR1 – FFR7) ativas para atividade anti-radicalar.....	41
Tabela 10 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) obtidos pelas subfrações (PFFR3.1 – PFFR3.3) ativas para atividade anti-radicalar.....	42
Tabela 11 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) obtidos pelas subfrações (AM1 – AM34) ativas no teste com NP-PEG.	47
Tabela 12 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) obtidos pelas subfrações (PFFR3.1 – PFF3.3) ativas no teste com NP-PEG.	48
Tabela 13 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) obtidos pelas frações do 2º fracionamento do EEBs ativas para atividade antifúngica com os fungos <i>C. cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	49

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ACN	acetonitrila
AcOEt	acetato de etila
BAW	butanol, ácido acético e água (butanol/acetic acid/ water)
BDA	batata/dextrose/ágar
CCD	cromatografia de camada delgada
CCDP	cromatografia de camada delgada preparativa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CHCl₃	clorofórmio
cm	centímetros
DHE	dihidroetídio
DAD	detector de arranjos de diodos
DMSO	dimetilsufóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EEBs	extrato etanólico de <i>Bidens segetum</i>
ESI	ionização por electrospray (electrospray ionization)
EtOH	etanol
g	gramas
GC	cromatografia a gás (gas chromatography)
h	horas
¹HRMN	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
HMBC	<i>gradiente Heteronuclear Mutiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>gradient Heteronuclear Sigle Quantum Coherence</i>
H₂O	água
IC₅₀	concentração inibitória de 50% (inibitory concentration of 50%)
J	constante de acoplamento (em Hertz)
LC	equipamentos de cromatografia líquida (Liquid Chromatography)
MeOH	metanol
mg	miligramas
[M-H]⁺	Massa (+) hidrogênio
MHz	megahertz

min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
MS	espectrometria de massas (Mass Spectrometry)
<i>m/z</i>	relação massa/carga
nm	nanômetro
NGM	células do melanócito
NMR	ressonância magnética nuclear (Nuclear Magnetic Ressonance)
NP – PEG	2 - (difetil-borilox) – etilamina/ polietileno glicol 2000
Rf	fator de retenção (retention factor)
PBS	tampão fosfato salino (phosphate buffered saline)
Tr	tempo de retenção
UV	detector de luz ultravioleta
%	porcento
µg	micrograma
µL	microlitro
°C	graus Célsius

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 Gênero <i>Bidens</i>	1
1.1.1 <i>Bidens segetum</i>	2
1.2 Importância dos produtos naturais.....	3
1.3 Metabólitos secundários	5
1.3.1 Terpenoides.....	7
1.3.2 Compostos nitrogenados	8
1.3.3 Compostos fenólicos	9
1.3.4 Poliacetilenos	10
1.4 Antioxidantes.....	12
1.4.1 Atividade antioxidante em cultura de células <i>in vitro</i>	15
1.5 Antifúngicos	16
2. Objetivos	19
2.2 Objetivos específicos:.....	19
3. Material e Métodos.....	20
3.1 Material vegetal e obtenção dos extratos.....	20
3.2 Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEBs) e purificação das frações.....	21
3.2.1 Cromatografia Flash em Coluna aberta (Sílica gel 60 Merck 200-500 mμ) – 1º Fracionamento do EEBs	21

3.2.2 Cromatografia líquida de exclusão em Sephadex LH-20 das frações FAcEOt+FMeOH e FMeOH.....	21
3.2.3 Cromatografia em fase reversa das subfrações AM17 a AM23	22
3.2.4 Cromatografia por partição líquido-líquido – 2º Fracionamento do EEBs.....	23
3.2.5 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) - Purificação da fração acetato de etila (FAcEOt ₂) e da subfração FFR3.	24
3.3 Ensaios qualitativos por cromatografia em camada delgada (CCD)	25
3.4 Ensaio anti-radicalar com DPPH	26
3.4.1 Ensaio qualitativo em cromatografia em camada delgada (CCD).....	26
3.4.2 Ensaio quantitativo em microplaca (Teste ELISA)	26
3.5 Ensaio para detecção de compostos fenólicos com NP – PEG	27
3.6 Avaliação da atividade antifúngica.....	28
3.6.1 Atividade antifúngica por bioautografia em cromatografia de camada delgada (CCD)	28
3.6.2 Limite de detecção por bioautografia em CCD	29
3.7 Ensaio <i>in vitro</i> em cultura de células para determinação de atividade antioxidante	29
3.8 Estudo Fitoquímico.....	30
3.8.1 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do Ultravioleta (UV)	30
3.8.2 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativo.....	31
3.8.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) experimentos uni (¹ HRMN) e bidimensionais (HSQC e HMBC) para a identificação dos compostos isolados	31
3.8.4 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)	32
4. Resultados e Discussão	33
4.1 Obtenção e rendimento do extrato etanólico (EEBs) e frações	33
4.2 Obtenção e rendimento das frações e subfrações	35

4.3 Ensaio anti-radicalar com DPPH.....	37
4.3.1 Ensaio qualitativo em cromatografia em camada delgada (CCD).....	37
4.3.2 Ação anti-radicalar (DPPH) em microplaca das subfrações PFFR3.1 a PFFR3.3 ..	43
4.4 Cromatografia em CCD das subfrações (AM1 – AM34 e PFFR3.1 – PFFR3.3) Revelação com NP - PEG	46
4.5 Atividade antifúngica com fungos do gênero <i>Cladosporium</i>	48
4.5.1 Ensaio antifúngico por biautografia das frações do EEBs e subfrações PP1 – PP10	48
4.5.2 Limite de detecção da subfração PP4 e PP4.1 – ensaio biautográfico com <i>C. sphaerospermum</i> e <i>C. cladosporioides</i>	50
4.6 Atividade antioxidante em culturas de células <i>in vitro</i>	51
4.7 Estudos Fitoquímicos	55
4.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD) das frações PFFR3.3 e PP4	55
4.7.2 Cromatografia líquida acoplada com espectrometria na região do ultravioleta e de massas (LC- DAD/MS/MS/ESI ⁺)	57
4.8 Análises da subfração FFR4 com atividade anti-radicalar (DPPH)	61
5. Considerações Finais.....	63
6. Referências Bibliográfica	64
7. ANEXOS.....	70

1. Introdução

1.1 Gênero *Bidens*

As espécies do gênero *Bidens* pertencem a família Asteraceae da tribo Heliantheae (Julio & Oliveira 2009). A família Asteraceae é uma das mais numerosas do grupo das Angiospermas, compreende cerca de 1.535 gêneros e ~ 25.000 espécies, no Brasil ocorrem cerca de 2.000 espécies e 250 gêneros, são cosmopolitas de aspecto muito variado, sua grande maioria são de pequeno porte, podendo ser anual ou perene, as flores estão entre as mais especializadas evolutivamente, as espécies são generalista e pioneiras em áreas degradadas, sendo encontradas em diferentes tipos de habitats, principalmente em regiões montanhosas da América do Sul e bastante conhecidas por suas propriedades terapêuticas, cosméticas e aromáticas e dentre seus constituintes químicos estão presentes os monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, poliacetilenos, saponinas, alcaloides, e compostos fenólicos, como flavonoides e ácidos clorogênicos (Verdi *et al.* 2005, Raven *et al.* 2007, Lelis 2008, Fabri *et al.* 2011, Bonnet *et al.* 2012, Souza & Lorenzi 2012).

O gênero *Bidens* é caracterizado por ervas anuais ou perenes, pouco ramificadas, com aproximadamente um metro de altura que ocorrem em regiões com fisionomias de Cerrado (Julio & Oliveira 2009). Apresenta cerca de 240 espécies distribuídas ao longo de toda a zona intertropical do planeta, conhecidas popularmente como picão sendo comumente encontradas em estradas e terrenos baldios, consideradas plantas invasoras (Joly 1998, Souza & Lorenzi 2005).

As espécies são compostas por folhas opostas, pecioladas, com lâmina foliar simples podendo ser inteira ou dissecta, bordas serrilhadas e inflorescências em capítulos terminais com flores tubulares e radiadas pequenas e geralmente de coloração amarelada, frutos escuros quando maduros e formados por aquênios lineares ou fusiformes com pequenos ganchos aderentes (*pappus*) de cor preta que auxiliam na sua dispersão (Lorenzi 2000, Nakajima 2000).

Segundo Silveira *et al.* (2009), as espécies do gênero *Bidens* são ricas em quercetina e outros compostos polifenólicos, possuem ação antimalárica, antioxidante, antibacteriana e imunomodulador. A espécie mais conhecida é a *Bidens pilosa* L. usada na medicina popular para a desobstrução do fígado, reumatismo articular, tosse, gonorreias e afecções de garganta (Rodrigues & Carvalho 2001) e em casos de mordidas de cobras e picadas de insetos, feridas, infecções, problemas pulmonares dentre outros (Lima *et al.* 2011). Outras espécies também são utilizadas na medicina popular, como por exemplo, a *B. alba* utilizada como antineoplásico (Nowill *et al.* 2007), para cicatrização de feridas, hipertensão e diabetes e até em casos de icterícia e a espécie e a *B. tripartita* usada como antimalárica e contra rinite e sinusite (Brandão 1997).

Dentre os constituintes químicos mais comuns no gênero estão os poliacetilenos (34%); chalconas (12%); flavonoides (9%); fenilpropanoides (9%); derivados de tiofeno (9%) e auronas (5%) (Silva 2009).

1.1.1 *Bidens segetum*

A espécie *Bidens segetum* conhecida como picão do mato, pode ser encontrada no bioma Cerrado de alguns estados do Brasil, como em Goiás, Minas Gerais e Paraná, assim como em outros países da América do Sul, como no Peru e na Bolívia. Ela se desenvolve em locais úmidos, na beira de estradas, matas e em afloramentos rochosos (Lorenzi 1994, Nakajima 2000).

De acordo com Lelis (2008), a espécie *Bidens segetum* Mart. ex Colla apresenta folhas simples ou 3-partidas, capítulos com flores do raio liguladas de cor amarela, e flores do disco numerosas, tubulosas, o androceu é formado por cinco estames com anteras sinanteras. O gineceu possui ovário ínfero e estilete com dois ramos e nectário bem desenvolvido de coloração amarelada e brilhante localizado acima do ovário. As plantas variam de subarbustos a arbustos que podem atingir de 1,5 à 2 m, possui ramos cilíndricos, estriados e glabros a tomentosos (**Figura 1**) (Nakajima, 2000).



Figura 1 - **A** - Flores de *Bidens segetum* **B** - *Bidens segetum*: Flores com polinizadores.

1.2 Importância dos produtos naturais

A natureza sempre foi a maior fonte das substâncias orgânicas conhecidas e o reino vegetal tem contribuído com grande parte das substâncias orgânicas utilizadas no tratamento de doenças que acometem os seres humanos (Montanari & Bolzani 2001). As primeiras descobertas sobre a fitoterapia foram relatadas com base em estudos arqueológicos em ruínas do Irã e datam mais de sessenta mil anos (Rezende & Cocco 2002). Foi a partir do século XIX que se iniciou o registro de estudos com plantas medicinais com base científica, levando ao isolamento de alguns princípios já então utilizados como benéficos no tratamento de doenças como, por exemplo, a morfina, cocaína e cânfora, produtos estes que são utilizados até nos dias atuais (Montanari & Bolzani 2001, Viegas Jr. *et al.* 2006).

Muitas civilizações como, por exemplo, a Chinesa, Egípcia e Greco-romana carregam em sua história de desenvolvimento a utilização de recursos naturais no controle de pragas, na medicina e como mecanismos de defesas como os venenos que eram utilizados para caça e na execução de prisioneiros, como a do filósofo Sócrates durante o Império Grego (Viegas Jr. *et al.* 2006). O uso de plantas medicinais está marcado na história da humanidade e tem grande importância tanto no aspecto medicinal quanto cultural (Rezende & Cocco 2002).

Durante a chegada de Portugal ao Brasil, os médicos portugueses vendo a escassez dos remédios utilizados na Europa, logo começaram a fazer uso dos produtos naturais, isso se deu com a colaboração dos indígenas, negros e jesuítas e as técnicas de tratamento com plantas medicinais utilizadas nesta época que são conhecidas e utilizadas até a atualidade (Pinto *et al.* 2002, Rezende & Cocco 2002). Além disso, nessa época iniciou-se a busca de especiarias do sertão por Portugal como a baunilha, raízes aromáticas, urucum, sementes oleaginosas, canela entre outras assim como pela exploração do pau-brasil (*Cesalpina echinata*), do qual era extraído um corante de coloração vermelha utilizado como tinta de escrever e para o tingimento de roupas (Montanari & Bolzani 2001, Viegas Jr. *et al.* 2006).

De acordo com Santana *et al.* (2018), “a fitoterapia é a arte de prevenir e curar doenças através da utilização de práticas naturais, principalmente por plantas com caráter medicinal”. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos.” Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua portaria no. 6 de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.” Neste contexto podemos dizer que a diferença entre plantas medicinais e fitoterápicos é a técnica empregada para o resultado final (Junior *et al.* 2005).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 60% a 80% da população dos países em desenvolvimento faz uso do tratamento de doenças com plantas medicinais pelo difícil acesso aos centros de saúde e pelo alto custo dos medicamentos industrializados (Junior *et al.* 2005, Junior 2008).

O tratamento com fitoterápicos pode ser realizado com diversas partes das plantas: folhas, sementes, raízes, cascas e caules, de acordo com as características da espécie utilizada, assim como

também há diferentes formas de preparo sendo as mais comuns infusão, decocção e emplastos (Rezende & Cocco 2002).

Os produtos fitoterápicos não têm restrições de venda, sendo assim, qualquer pessoa pode fazer uso seja por automedicação e ou por orientação farmacêutica, as populações mais carentes utilizam de plantas medicinais pelo conhecimento empírico mantendo a tradição passada por seus antepassados e pelo fácil acesso e baixo custo e a população de países desenvolvidos utilizam de fitomedicamentos pelo modismo criado em volta dos produtos naturais e por acreditarem que estes terão menos efeitos adversos do que os medicamentos industrializados (Rates 2001, Junior 2008, Santana *et al.* 2018).

Apesar do fácil acesso e a falsa ideia de que se é planta não faz mal, existem muitos riscos que podem acarretar ao uso de plantas medicinais, tais como: identificação errônea da espécie, reações alérgicas ou tóxicas, superdosagem e interações dos compostos ativos das plantas medicinais com outros medicamentos alopáticos (Junior *et al.* 2005).

1.3 Metabólitos secundários

Segundo Pereira & Cardoso 2012, o metabolismo pode ser definido como o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células renovando a energia do organismo e garantindo sua homeostase e de acordo com García & Carril 2009, metabolismo é o conjunto de reações químicas onde a partir de substâncias químicas simples são geradas substâncias mais complexa ou substâncias complexas que são quebradas e transformadas em substâncias mais simples.

Nos vegetais, os metabólitos primários são encontrados em grande abundância e são essenciais, como exemplo os carboidratos, ácidos graxos, proteínas e ácidos nucleicos, eles exercem funções estruturais, plásticas, de armazenamento de energia e são vitais aos processos vegetais tais como a fotossíntese, respiração, crescimento, divisão celular, reprodução e transporte de nutrientes (Raven *et al.* 2001, Taiz & Zeiger 2006, Fumagali *et al.* 2008, García & Carril 2009, Pereira & Cardoso 2012).

Os metabólitos secundários desempenham funções especiais, são produzidos em órgãos específicos da planta e sua síntese depende de fatores tais como a sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, altitude, incidência de radiação ultravioleta, temperatura, pH, nutrientes, luminosidade, fisiologia e idade da planta. Com base nestes fatores bióticos e abióticos a produção dos metabólitos está diretamente relacionada ao meio, ao qual a planta está inserida (Gobbo-Neto & Lopes 2007, García & Carril 2009, Gottlieb & Borin 2012, Pereira & Cardoso 2012, **Figura 2**).

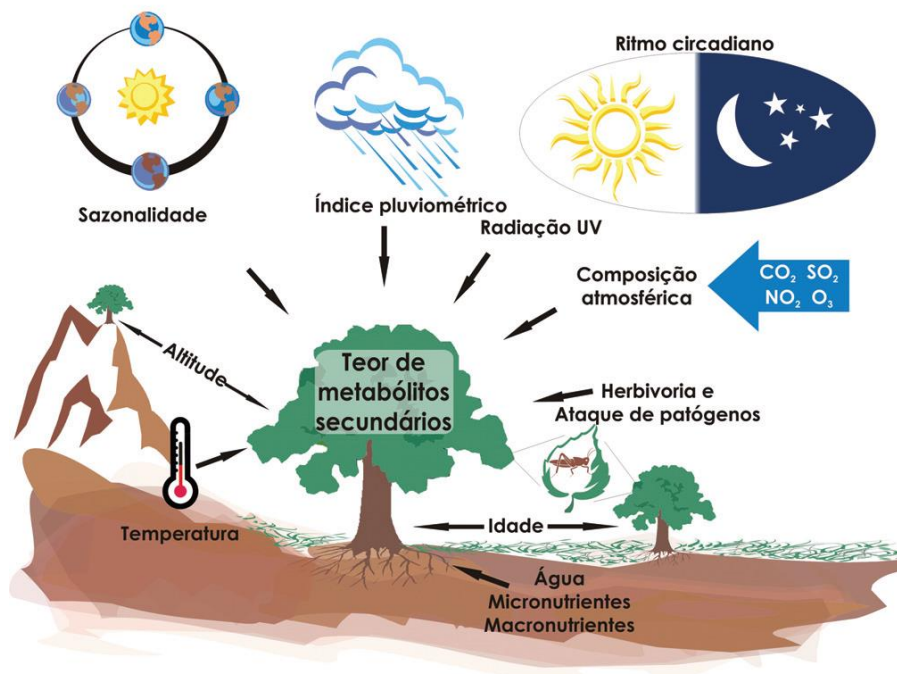


Figura 2 - Fatores que influenciam na síntese dos metabólitos secundários (Gobbo – Neto & Lopes 2007).

Os metabólitos secundários são responsáveis pela interação da planta com o meio ambiente garantindo a sobrevivência das espécies (Taiz & Zeiger 2006). As principais funções são: proteção contra o ataque de patógenos, parasitas e herbívoros, também são responsáveis pela atração de polinizadores e dispersores de sementes e muitos metabólitos possuem função alelopática (Raven *et al.* 2001, Taiz & Zeiger 2006, Fumagali *et al.* 2008, Pereira & Cardoso 2012).

As principais rotas de síntese dos metabólitos secundários (**Figura 3**) derivam do metabolismo da glicose por duas vias principais: a via do ácido chiquímico e a via do acetato (Simões *et al.* 2007, Taiz & Zeiger 2006).

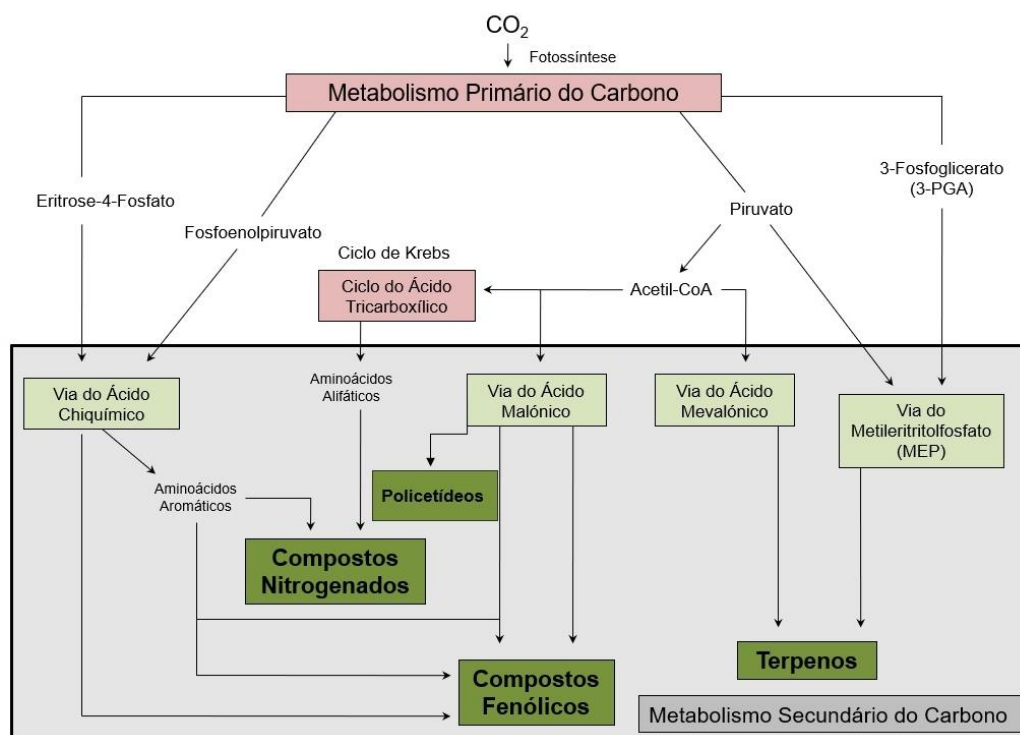


Figura 3 - Esquema adaptado das rotas de biossíntese das principais classes de metabólitos secundários (Taiz & Zeiger 2006).

Esses compostos são classificados de acordo com sua via biossintética e as principais classes são: terpenoides, alcaloides, poliacetilenos e os compostos fenólicos, incluindo o grupo dos flavonoides e dos ácidos clorogênicos (Harborne 1998, Taiz & Zeiger 2006).

1.3.1 Terpenoides

Os terpenos ou terpenoides correspondem ao maior grupo de metabólitos secundários, os metabólitos pertencentes a esse grupo são geralmente de baixa polaridade e sintetizados pela via do ácido mevalônico (uma molécula com 5 átomos de carbono) e do metileritritolfosfato (MEP). Os terpenos apresentam diversas funções químicas como aldeídos, álcoois, cetonas, éteres entre outras, sendo classificados de acordo com a quantidade de unidades de cinco átomos de carbono (regra do isopreno) que possuem em sua constituição (Taiz & Zeiger 2006, Garcia & Carril 2009, Felipe & Bicas 2017).

Os terpenos são distribuídos em seis grupos principais, são eles: os hemiterpenos constituídos por uma unidade de isopreno (5 carbonos), os monoterpenos com 10 unidades de carbono, os sesquiterpenos com 15 carbonos, os diterpenos com 20 carbonos, os triterpenos com 30 carbonos, os tetraterpenos com 40 carbonos e os polisoprenos com mais de 40 unidades de carbono (Briskin 2000, Taiz & Zeiger 2006, Garcia & Carril 2009).

As diversas funções dos terpenos estão associadas as suas propriedades físicas e químicas, assim, os monoterpenos e sesquiterpenos encontrados nos óleos voláteis, tem caráter lipofílico, baixo peso molecular, odor e sabor característicos, estão localizados nos tricomas glandulares das superfícies das folhas e flores e possuem ação contra ataques de herbívoros e parasitas (Taiz & Zeiger 2006, Garcia & Carril 2009). Os óleos voláteis, especialmente os constituídos de compostos da classe dos terpenoides são bastante utilizados na indústria de perfumes, cosméticos e na indústria alimentícia (Garcia & Carril 2009, Felipe & Bicas 2017).

1.3.2 Compostos nitrogenados

Os compostos nitrogenados são compostos orgânicos que apresentam pelo menos um átomo de nitrogênio em sua estrutura molecular e são representados pelos alcaloides e pelos glicosídeos cianogênicos (Briskin 2000, Taiz & Zeiger 2006).

Os alcaloides possuem caráter alcalino devido à presença do átomo de nitrogênio e são sintetizados por alguns grupos de plantas, fungos, etc. Os principais efeitos farmacológicos para os seres humanos estão relacionados aos distúrbios emocionais por atuarem no sistema nervoso. São largamente utilizados na medicina, mas podem ser tóxicos, por isto, alguns podem ser considerados venenos ou alucinógenos (Briskin 2000, Taiz & Zeiger 2006, Fumagali *et al.* 2008).

1.3.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos representam um dos maiores grupos de metabólitos secundários e são constituídos por um grupo fenol, uma hidroxila ligada à um anel aromático. (Taiz & Zeiger 2006).

São compostos responsáveis pelo odor, sabor e cor dos vegetais sendo atrativos para diversos animais ajudando no processo de polinização e dispersão de semente, também possuem ação antioxidante reduzindo os danos causado às plantas da exposição aos raios ultravioleta, protegem os vegetais do ataque de insetos, microrganismos e muitos possuem ação alelopáticas inibindo o crescimento de plantas competidoras (Taiz & Zeiger 2006, Fumagali *et al.* 2008, Silva *et al.* 2010).

Dentre seus principais representantes estão ácidos fenólicos e os flavonoides, polifenóis que corresponde a maior classe de compostos fenólicos encontrados principalmente em plantas superiores como as angiospermas, são formados a partir de 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três carbonos, sendo distribuídos em: flavonóis, flavanonas, flavonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (Taiz & Zeiger 2006, Fumagali *et al.* 2008).

Esses compostos estão presentes em frutas, vegetais e leguminosas e são bastantes conhecidos devido sua ação antioxidante protegendo o vegetal da fotoxidação e trazendo benefícios na alimentação humana, como também, auxiliar nos processos oxidativos, na redução de colesterol e no combate a doenças crônicas degenerativas (Fumagali *et al.* 2008, Silva *et al.* 2010, Pereira & Cardoso 2012).

Os ácidos fenólicos correspondem a uma subclasse de compostos fenólicos e são divididos em ácidos hidroxicinâmicos como por exemplo o ácido *p*-cumárico, cafeico, sinápico e ferúlico que podem estar esterificados ao ácido quínico, ácido tartárico ou carboidratos e derivados, e os ácidos hidroxibenzoicos que são componentes das complexas estruturas dos taninos hidrolisáveis (Oliveira & Bastos 2011).

Os ácidos clorogênicos (CGAs) (**Figura 4**) são ácidos fenólicos derivados dos ácidos hidroxinâmicos, inicialmente conhecido como ácido 3-cafeoilquínico que atualmente é denominado de ácido 5-cafeoilquínico (nomenclatura proposta pela UIPAC), são ésteres formados pela

esterificação do ácido quínico com um dos seguintes ácidos trans-cinâmicos: o ácido cafeico (3,4-dihidroxicinâmico), o *p*-cumárico (4-hidróxi), o ferúlico (3-metoxi, 4-hidróxi) ou o sinápico (3,5-dimetóxi, 4-hidróxi), sendo o grupo mais abundante o ácido cafeioquínico (ACQ), (Maria & Moreira 2004, Jaiswal *et al.* 2011, Oliveira & Bastos 2011).

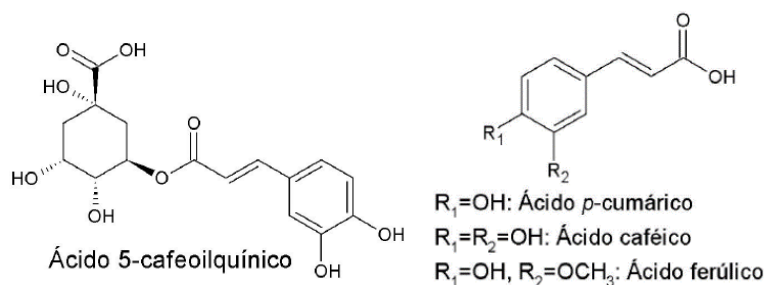


Figura 4 - Fórmula estrutural dos Ácidos Clorogênicos (CGAs).

Os ácidos clorogênicos são encontrados em alimentos de origem vegetal principalmente o café (*Coffea canéfora*), mas também em outras bebidas como a erva mate (*Ilex paraguariensis*) e frutas como a maçã, cereja e ameixa (Maria & Moreira 2004, Oliveira & Bastos 2011).

Representam um dos maiores grupos de metabólitos secundários encontrados em espécies do gênero *Bidens* e apresentam uma variedade de atividades biológicas como antioxidante, anti-inflamatório, além de serem considerados benéficos para a saúde humana (Silva 2009, Jaiswal *et al.* 2011).

1.3.4 Poliacetilenos

Os poliacetilenos são caracterizados como derivados acetilênicos de cadeia longa composta por vinte a trinta átomos de carbono aproximadamente, são hidrocarbonetos relativamente instáveis sendo suas atividades biológicas facilmente alteradas com a exposição à luz, pois absorvem fortemente a luz ultravioleta e são muito reativos conseguindo ser suficientemente estáveis para serem isolados por técnicas fitoquímicas padronizadas (Harbone 1998).

A maioria dos poliacetilenos possuem grupos funcionais adicionais podendo ser aromáticos, ésteres, ácidos, álcoois, furanos e cetonas e apenas alguns são derivados de hidrocarbonetos de cadeia simples (Wat *et al.* 1980, Harbone 1998).

É uma classe relativamente rara que ocorre geralmente em apenas cinco famílias de organismos vivos, alguns são considerados fitoalexinas devido a sua toxicidade para microrganismos que atacam plantas que os possuem em sua constituição (Harborne 1998).

Apesar de ser uma classe rara entre os organismos vivos, os poliacetilenos representam uma classe majoritária de metabólitos secundários que prevalecem dentro do gênero *Bidens* e em sua maioria apresentam cadeia carbônica de 13 átomos de carbono podendo ser aromática ou alifática sendo sua biossíntese derivada do ácido crepenínico e em menores proporções, ocorrem acetilenos com 17 átomos de carbono que apesar de cadeias carbônicas mais longas, não apresentam maiores extensões de conjugação (Lucchetti *et al.* 2009, Silva 2009).

Em trabalho realizado por Rodrigues (2010), foram identificados os poliacetilenos 3-O- β -glicopiranosil-tetradeca-6(E),12(E)-dieno-8,10-diino-1,14-diol e 1-O- β -glicopiranosil-14-hidróxi-tetradeca-6(E),12(E)-dieno-8,10-diino-3-ona em *B. gardneri* e também o poliacetileno 2-O- β -glicopiranosil-trideca-3(E),11(E)-dien-5,7,9-Triino-1,13-diol, sendo este um poliacetileno pouco encontrado no gênero, sido relatado apenas em *B. campylotheca*, *B. gardneri* e *B. bipinnata* e Chang *et al.* (2004) isolou os poliacetilenos 2- β -glicopiranosiloxi-1-hidroxi-5(E)-trideceno-7,9,11-triino e o 3- β -D-glicopiranosil-1-hidroxi-6(E)-tetradeceno-8,10,12-triino de *Bidens pilosa* (**Figura 5**).

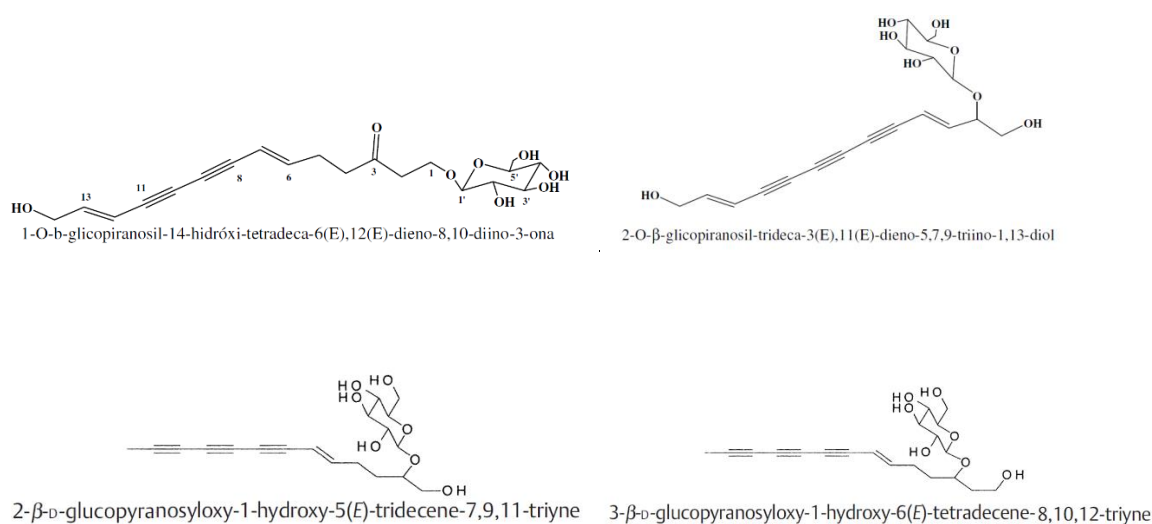


Figura 5 - Exemplos de poliacetilenos isolados no gênero *Bidens*.

Esses poliacetilenos relatados têm mostrado diversas atividades biológicas de interesse no tratamento de doenças devido suas atividades antibacteriana, antifúngica, imunossupressora, antiangiogênica, anti-inflamatória, antitumoral, no tratamento de diabetes Mellitus dentre outras (Chang *et al.* 2004, Lucchetti *et al.* 2009, Gilbert *et al.* 2013).

Em trabalho realizado por Kwiecinski (2013) com *Bidens pilosa*, foi utilizado um método de extração supercrítica que envolve a utilização de gases densos elevados acima de sua temperatura crítica para a separação de poliacetilenos com propriedades antitumorais.

Wat *et al.* (1980) observaram que extratos de espécies de *Bidens* e outras espécies da família Asteraceae perdiam atividade citotóxica diante de fungos, bactérias e larvas de insetos, evidenciando a relação entre a atividade citotóxica e a presença de compostos poliacetilenos o que corrobora com os dados aqui obtidos, relacionando a atividade antifúngica de *B. segetum* da fração analisada e sua resposta a atividade citotóxica a qual foi submetida.

1.4 Antioxidantes

Em todos os sistemas biológicos aeróbicos desde os procariontes até sistemas mais complexos como as plantas e animais, durante o processo de produção de energia na mitocôndria e no meio

citoplasmático são produzidos os radicais livres como subproduto normal de oxi-redução (Vicentino & Menezes 2007, Silva *et al.* 2010).

Radical livre é um átomo ou molécula altamente reativo, que contém um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, tornando-os altamente instáveis que tende a se associar rapidamente a outras moléculas de carga positiva com as quais pode reagir ou oxidar, são, portanto, formados a partir do processo de óxido-redução, ou seja, ou sedem o elétron solitário oxidando-se ou recebem um elétron reduzindo-se (Ferreira & Matsubara 1997, Vicentino & Menezes 2007, Alves *et al.* 2010, Lima & Bezerra 2012).

Contudo, os agentes reativos formados durante o processo oxidativo do metabolismo aeróbico, não necessariamente apresenta um número desemparelhado na sua última camada eletrônica, sendo portando designados como Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio (ERMOs) (Ferreira & Matsubara 1997, Vicentino & Menezes 2007, Alves *et al.* 2010).

A produção desenfreada de ERMOs leva ao estresse oxidativo que se dá devido ao desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação, provocando efeitos deletérios nas células como danos ao DNA, proteínas e organelas, levando ao envelhecimento precoce do organismo e a doenças crônicas degenerativas como Parkinson, Alzheimer e cânceres e a doenças inflamatórias crônicas como diabetes, aterosclerose, artrites dentre outras (Ferreira & Matsubara 1997, Vicentino & Menezes 2007, Alves *et al.* 2010, Fabri *et al.* 2011).

Antioxidante por definição é uma substância que em concentrações ideais consegue prevenir ou retardar os efeitos causados pelo estresse oxidativo e por isso, tem se intensificado a busca por produtos com ação antioxidante que auxiliem na prevenção de doenças relacionadas aos danos causados pelo estresse oxidativo (Vicentino & Menezes 2007, Lima & Bezerra 2012, Sucupira *et al.* 2015).

Os antioxidantes podem ser endógenos ou exógenos e podem ser classificados como primários que são aqueles que doam oxigênio radical impedindo que o processo oxidativo se inicie e secundários que são aqueles que bloqueiam ou decompõem os produtos das reações oxidativas

tornando-os inativos, podem ser ainda enzimáticos ou não enzimáticos e naturais ou sintéticos (Ferreira & Matsubara 1997, Silva *et al.* 2010, Lima & Bezerra 2012, Sucupira *et al.* 2015).

Dentre os principais exemplos de antioxidantes naturais estão os compostos fenólicos em especial os flavonoides, as vitaminas C e E, os carotenoides que agem impedindo que o processo oxidativo se inicie ou interrompem a cadeia de propagação de reações oxidativas causadas pelos radicais livres, além disso o organismo humano possui um complexo enzimático formado pelas enzimas superóxido dismutase, catalases, glutathione peroxidase e sistemas tioredox e também antioxidantes não enzimáticos como a glutathione, a bilirubina, a melatonina, o ácido úrico dentre outros que são bastante eficientes na defesa do organismo contra os efeitos das ERMOS (Vicentino & Menezes 2007, Silva *et al.* 2010).

A capacidade antioxidante de substâncias biologicamente ativas pode ser avaliada por meio de vários parâmetros, dentre os diversos métodos *in vitro* estão: FRAP - ferric reducing antioxidant power, ABTS - 2,2'-azino-bis (ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico), DPPH - 2,2-difenil-1-picrylhydrazil e ORAC - oxygen radical absorbance capacity que são os mais utilizados, o método de branqueamento de β -caroteno, que avalia o nível de inibição dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico, também é bastante conhecido (Alves *et al.* 2010, Sucupira *et al.* 2015).

Dentre estes, o método de sequestro de radical livre DPPH é um dos mais utilizados pois a molécula do DPPH é bastante estável na ausência de luz além de possuir fácil aplicabilidade e viabilidade (Oliveira 2015).

Este ensaio se baseia na medida da capacidade de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina (**Figura 6**). Por ser um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, este apresenta um cromóforo que absorve no comprimento de onda de 518nm, de coloração violeta. Este radical livre estável (DPPH) em presença de um composto antioxidante ou doador de átomos de hidrogênio é reduzido alterando

a estrutura do DPPH e sua coloração muda de violeta para amarelo, ou seja, diminui a intensidade de absorção do DPPH (Alves *et al.* 2010, Sucupira *et al.* 2015, Oliveira 2015).

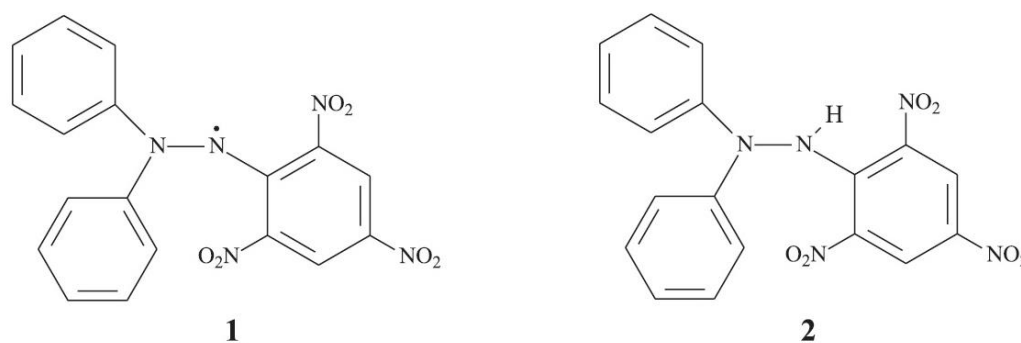


Figura 6 - (1) Forma radicalar e (2) não radicalar do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

1.4.1 Atividade antioxidante em cultura de células *in vitro*

O uso de produtos naturais como agentes antioxidantes começou com a medicina popular e ao longo dos tempos passou a ser empregado na medicina alelopática e tradicional e muito dos fármacos que são utilizados hoje no tratamento da quimioterapia, foram isolados de plantas como, por exemplo, a vimblastina e a vincristina isolados de *Catharanthus roseus* (Kwiecinski 2007). Além disso, vem se buscando alternativas de remédios que tenha maior seletividade das células tumorais, diminua os efeitos adversos das células normais e a resistência da carcinogênese (Centa 2014).

Espécies do gênero *Bidens* são muito utilizadas no Brasil no tratamento de diversas doenças devido suas propriedades terapêuticas e por isso foram realizados vários estudos químicos que comprovam forte atividade antioxidante, em destaque a *Bidens pilosa*, uma das espécies mais utilizadas e que é rica em quercetina e outros compostos polifenólicos e sendo estes grupos de metabólitos secundários os responsáveis pelas atividades antioxidantes observadas (Santos & Cury, 2011).

O câncer está entre as doenças que podem ser originadas devido a danos oxidativos e há descrito na literatura vários estudos de substâncias com atividade antioxidante que foram usadas para análise no tratamento de doenças crônicas causadas por radicais livres (Castro & Freeman 2001).

O câncer é uma neoplasia maligna, sendo uma das principais causas de morte humana no ocidente, estando o seu aparecimento relacionado a vários fatores como pré-disposição genética, sexo, idade, raça e fatores ambientais (Kwiecinski 2007).

O melanoma, é o tipo de câncer de pele de menor frequência correspondendo por 3% - 4% dos casos, sua incidência, porém é letal em cerca de 75% - 80% e sua ocorrência vem crescendo anualmente em todo o mundo, estima-se que ele seja responsável por cerca de 1% a 2% das mortes de câncer por ano. O prognóstico de morte para esse tipo de tumor é de 6 a 9 meses, e a taxa de sobrevivência por 5 anos é menor que 5%, sendo as chances de cura maiores quanto mais cedo for diagnosticada a doença e iniciado o tratamento (Figueiredo *et al.* 2003, Massaro 2014).

O melanócito (NGM) é a célula responsável pela produção da melanina, pigmento que dá coloração a pele e a protege da exposição ao sol, podendo estas serem lesadas devido a exposição aos raios UV o que pode ocasionar a formação de células anormais levando a mutações genéticas (Kwiecinski 2007, Niero 2010).

Os compostos que possuem atividade antioxidante como os carotenóides e os compostos fenólicos podem auxiliar na redução do risco de uma variedade de doenças crônicas. Esses antioxidantes agem absorvendo radicais livres ou inibindo a cadeia de iniciação ou interrompendo a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (Silva *et al.* 2010, Martínez-Flórez *et al.* 2002)

1.5 Antifúngicos

Nos lugares onde se pratica uma agricultura econômica é muito comum o uso de pesticidas para o controle de pragas e doenças, o que em curto prazo pode trazer um efeito benéfico nas plantações, a longo prazo pode causar o surgimento de pragas e fitopatógenos resistentes além de problemas ecológicos como poluição de rios e solos devido aos resíduos químicos utilizados (Schwan-Estrada *et al.* 2000).

Por isso tem se dado lugar para a prática de agricultura alternativa com o uso de produtos naturais para o controle de pragas e doenças nas plantações (Zacaroni *et al.* 2009).

Fungos do gênero *Cladosporium* foram identificados pela primeira vez em 1815, são caracterizados pela ausência de fase de proliferação e fazem parte do grupo dos Deuteromycota, os fungos desse gênero estão presentes em ambientes externos e internos podendo se desenvolver até mesmo em tubulações de água e superfícies de vidro e também são encontrados em alimentos estragados, contudo, muitas espécies do gênero *Cladosporium* são capazes de produzir metabólitos secundários que podem ser utilizados como antibióticos inibidores de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (AlMatar & Makky 2016).

O fungo *Cladosporium sphaerospermum* (Penzig) é uma espécie comum e cosmopolita que ocorre como um invasor secundário em plantações de arroz, milho e feijão (Hoog & Garro 1995). E o fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, é uma espécie fitopatogênica que ocorre em plantações de caju e tomate sendo encontrado nos estados da Bahia, Ceara, Piauí em Rondônia (Mendes 1998).

Nos seres humanos os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* podem ser patogênicos causando principalmente doenças do trato respiratório (Yano *et al.* 2003).

1.6 Justificativa

A natureza é uma fonte de inestimável riqueza para novos medicamentos e os produtos naturais são considerados como uma das maiores fontes de diversidade química.

A importância que determinadas substâncias naturais podem adquirir no mercado está inversamente relacionada com sua disponibilidade. Muitas vezes, a substância química não pode ser sintetizada, ou o custo de sua síntese é muito elevado, obrigando sua extração *in natura*.

A possibilidade de se encontrar uma nova substância ativa, um modelo estrutural para a síntese de novos compostos ou simplesmente a demanda pela utilização de um fitoterápico, com comprovação científica, tem justificado o investimento de milhões de dólares por todo o mundo.

O Brasil é um dos países com maior diversidade vegetal do mundo, mas com ecossistemas tão ameaçados que o número de informações sobre plantas medicinais tem crescido muito pouco anualmente. Mesmo assim, estudos fitoquímicos tradicionais com espécies brasileiras conduziram até o momento ao isolamento de grande quantidade de metabólitos secundários, mas a maioria destes continuam sem qualquer aplicação devido à falta de programas de bioensaios preliminares para que possam ser triados e selecionados para estudos farmacológicos posteriores.

Neste contexto, este trabalho visa contribuir para um maior conhecimento da flora brasileira, mais especificamente do bioma do Cerrado, através do estudo da composição química do extrato das folhas de *B. segetum*, que pode ser usado na realização de bioensaios que buscam identificar possíveis aplicações para esta espécie ainda pouco estudada.

2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram isolar e caracterizar os poliacetilenos com atividade antifúngica e os polifenóis com atividade antioxidante das frações ativas do extrato etanólico de *Bidens segetum*.

2.2 Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar as frações com atividade antioxidante e antifúngica por técnicas cromatográficas e bioensaios de bancada;
- ✓ Purificar as frações com atividade antioxidante e antifúngica;
- ✓ Isolar os compostos ativos;
- ✓ Identificar os poliacetilenos com atividade antifúngica e os polifenóis com atividade antioxidante por métodos espectrométricos (HPLC, LC-EM);
- ✓ Ensaios *in vitro* em cultura de células para determinação de atividade antioxidante

3. Material e Métodos

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica (IBt) da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SIMA/SP).

A identificação da espécie foi realizada pela Dra. Inês Cordeiro, pesquisadora responsável pelo Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo (IBt-SP) e há uma exsicata depositada nas coleções do Herbário do Instituto de Botânica - SP com a denominação: SP 452794, coleta: Nascimento A 101 – Fazenda Campininha, subdistrito de Martinho Prado, Mogi Guaçu, São Paulo – Brasil.

Os espécimes utilizados neste trabalho foram trazidos da Fazenda Campininha e plantados nos canteiros das coleções de plantas do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica - SP.

3.1 Material vegetal e obtenção dos extratos

Folhas de *Bidens segetum* foram coletadas dos canteiros de coleções de plantas do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica em março de 2017. As folhas foram selecionadas, pesadas, congeladas e liofilizadas (liofilizador Eduards). Após liofilização o material vegetal foi moído, pesado e submetido a extração por maceração a frio com etanol 93° por três dias, após este período, o líquido foi filtrado com algodão hidrofílico e o processo repetido por mais três dias. O líquido obtido após esse processo foi concentrado em evaporador rotatório (BUNCHI) e levado em banho maria 40°C para completa eliminação do solvente, obtendo-se o material seco denominado de Extrato Etanólico (EEBs).

O estudo comparativo dos extratos em acetato de etila (AcEOt) foi realizado com o objetivo de mostrar que o processo de secagem influi na obtenção de frações ricas em poliacetilenos. Estes extratos foram obtidos de folhas frescas coletadas em 05 de julho de 2018 e divididas em duas partes iguais, onde uma parte (FE, 155 g) foi colocada em saco de papel e seca em estufa a 60°C e a outra

parte (FL,155g) congelada e liofilizada e ambas foram imersas em AcEOt para extrair os compostos presentes em suas superfícies.

3.2 Fracionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEBs) e purificação das frações

3.2.1 Cromatografia Flash em Coluna aberta (Sílica gel 60 Merck 200-500 μ m) – 1º Fracionamento do EEBs

O extrato etanólico obtido de folhas frescas liofilizada (45,0 g do EEBs) foi fracionado por cromatografia em coluna usando sílica (60 g, Merck 200-500 μ m) e sistema de vácuo. O EEBs foi solubilizado em metanol (100%) e misturado com sílica gel 60 (23 g). No processo de eluição foi usado um gradiente de solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano; hexano + acetato de etila 5:5 (vv); acetato de etila; metanol + acetato de etila 5:5 (vv); metanol e metanol + H₂O 2:8(vv). As frações resultantes foram concentradas sob vácuo no evaporador rotatório e levadas a banho maria a 40°C para eliminação completa dos solventes e nomeadas como: fração hexânica (FH₁); fração hexano + acetato de etila (FH+ FAcEOt₁); fração acetato de etila (FAcEOt₁); fração acetato de etila + metanol (FAcEOt+FMeOH₁); fração metanólica (FMeOH₁); fração metanólica + H₂O (FMeOH + H₂O).

3.2.2 Cromatografia líquida de exclusão em Sephadex LH-20 das frações FAcEOt+FMeOH e FMeOH.

As frações FAcEOt+MeOH₁ e FMeOH₁ (14,0 g) obtidas do 1º fracionamento por coluna de cromatografia flash identificadas com atividade anti-radicalar em trabalho anterior, foram reunidas e submetidas a um novo fracionamento por cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20. Essas frações reunidas (FAcEOt+MeOH₁ e FMeOH₁) foram solubilizadas em 10 mL de metanol e aplicadas no topo de uma coluna cromatográfica de topo aberto de 25 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro preparada com LH 20 (35 g Pharmacia) com 150 mL de metanol (Merck PA). A eluição foi realizada

com 1400 mL de metanol (MeOH) onde ao final da separação obteve-se 47 subfrações, que foram secas, pesadas e nomeadas (AM1 – AM47) para análises posteriores.

3.2.3 Cromatografia em fase reversa das subfrações AM17 a AM23

As subfrações AM17 a AM23 obtidas do fracionamento por coluna Sephadex LH-20 que mostraram forte atividade anti-radicalar foram submetidas separadamente à cromatografia de coluna de fase reversa (Tubo SPE Discovery DSC -18, 10 g, 60 mL, SUPELCO) com gradiente dos solventes: 100 mL de H₂O MiliQ, 100 mL de H₂O MiliQ e metanol (8:2, v:v), 100 mL de H₂O MiliQ e metanol (5:5, vv) e 100 mL de metanol 100%. Obtendo-se ao final 12 subfrações de cada uma das subfrações (AM17 – AM23), totalizando 72 subfrações (**Figura 7 - Fluxograma 1**).

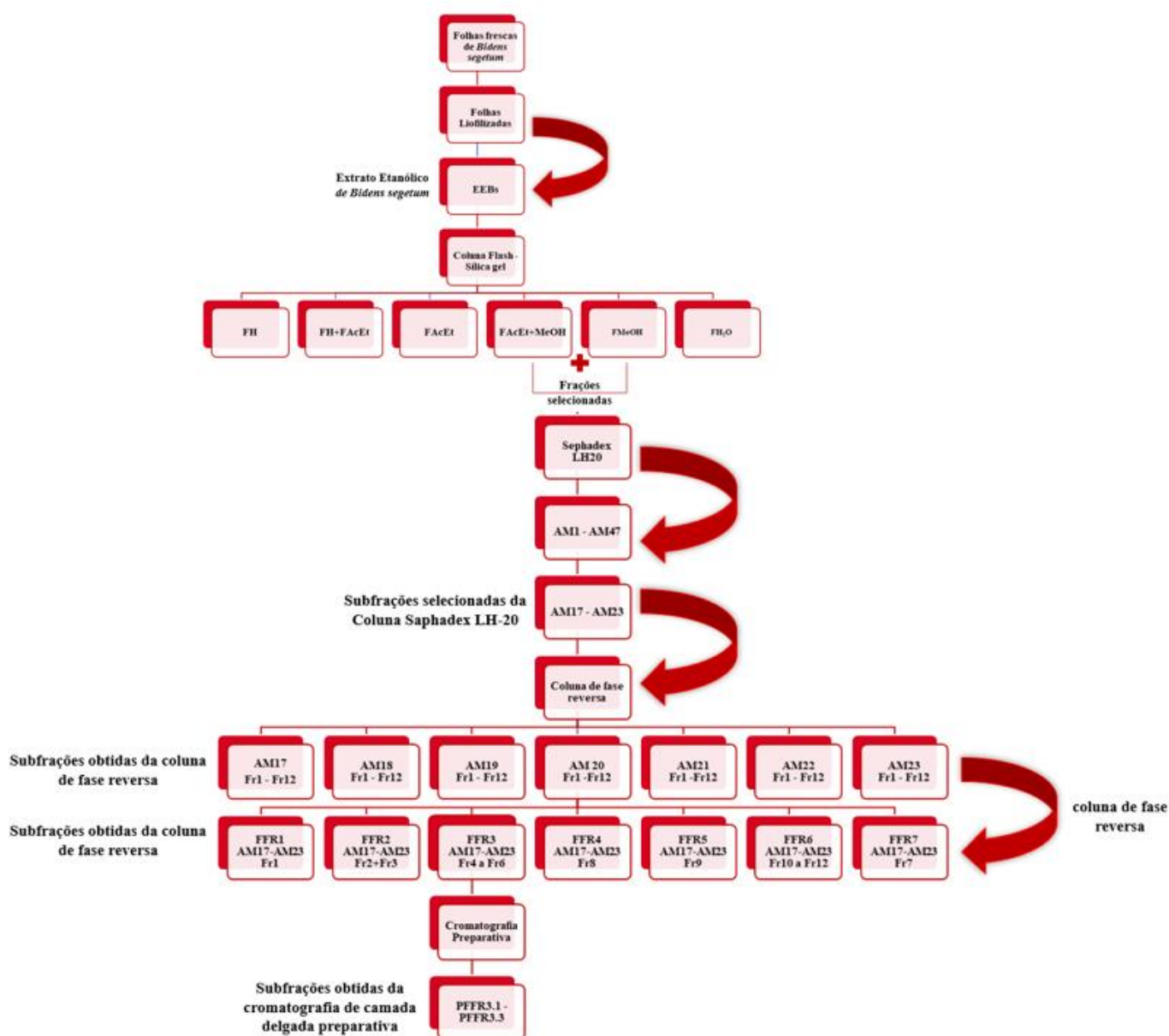


Figura 7 - Fluxograma 1 com as etapas de obtenção, separação e purificação do material vegetal (folhas frescas de *Bidens segetum*) a partir do 1º fracionamento e da coluna de fase reversa.

3.2.4 Cromatografia por partição líquido-líquido – 2º Fracionamento do EEBs

O segundo fracionamento do EEBs foi para melhorar o rendimento da fração AcEOt que mostrou forte atividade antifúngica em estudos anteriores. O EEBs (75,0 g) foi solubilizado em água destilada e submetido a partição líquido/líquido em funil de separação com solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano e acetato de etila. As frações orgânicas e aquosa foram concentradas no

evaporador rotatório e levadas a banho maria a 40°C para eliminação completa dos solventes, obtendo-se as frações: hexânica (FH₂); acetato de etila (FACeOt₂) e aquosa residual (FH₂O).

3.2.5 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) - Purificação da fração acetato de etila (FACeOt₂) e da subfração FFR3.

A FACeOt₂ foi purificada por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) em sílica gel PF₂₅₄ (1 mm de espessura, placa de vidro 20 x 20 cm, Merck). A FACeOt₂ (30 mg) foi aplicada e a eluição foi realizada com a mistura de CHCl₃:MeOH 8:2 (v:v), em cuba cromatográfica. Foram utilizadas 10 placas (CCDP) e após o término da eluição as placas foram visualizadas sob luz UV nos comprimentos (λ) 254 nm e 366 nm, as faixas de interesse foram marcadas, separadas e, posteriormente a sílica contendo material adsorvido foi submetida a extração com metanol e filtrada em funil de placa porosa (ϕ da placa porosa 0,40mm) sob vácuo. As subfrações resultantes foram concentradas no evaporador rotatório (BUNCHI), levadas ao banho-maria (40°C) para eliminação completa dos solventes, pesadas para cálculos de rendimento, denominadas de (PP1 a PP10, **Figura 8 - Fluxograma 2**) e re-submetidas à ensaios biológicos para a confirmação e seleção das mais ativas.

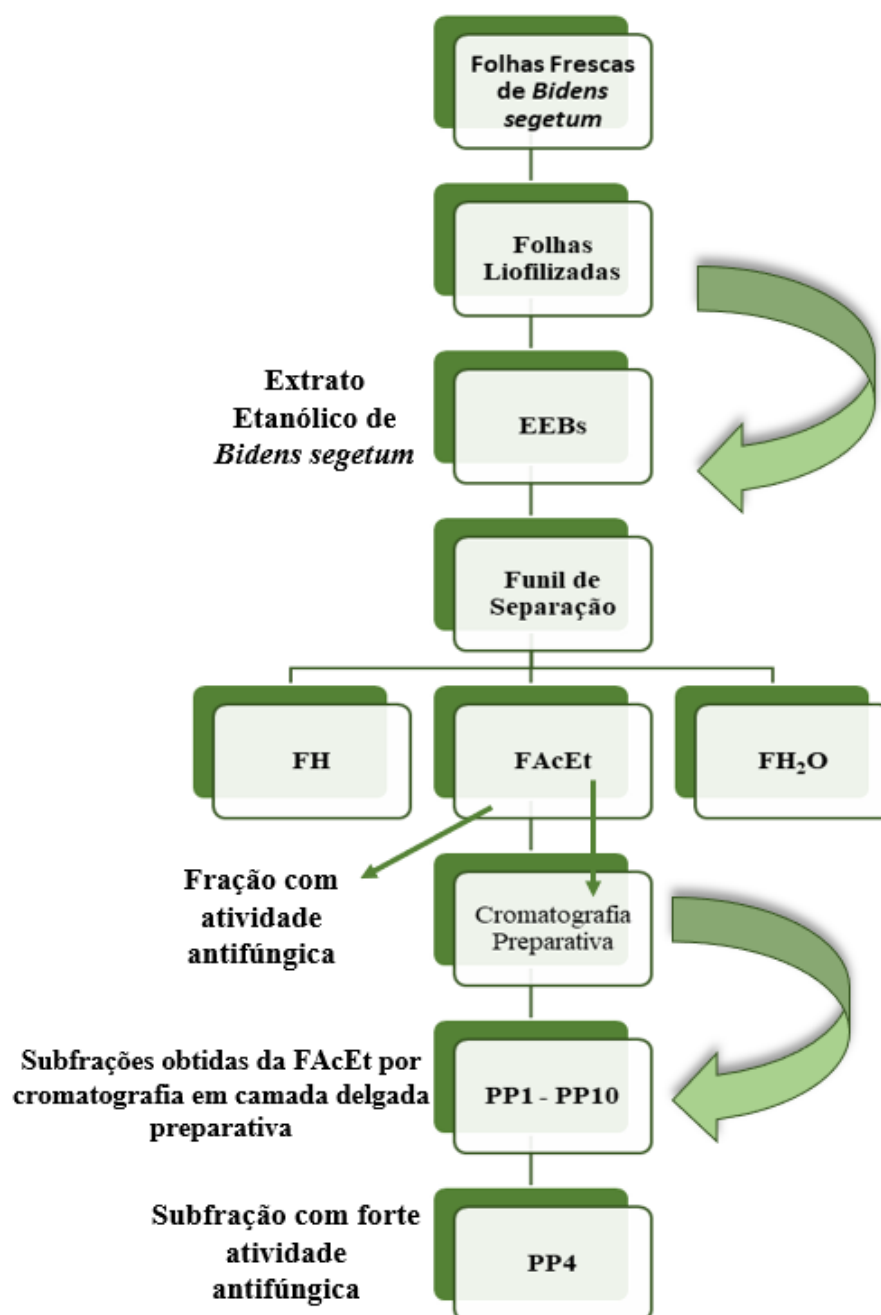


Figura 8 - Fluxograma 2 com as etapas de obtenção, separação e purificação do material (folhas frescas de *Bidens segetum*) a partir do 2º fracionamento e da cromatografia de camada delgada preparativa – CCDP.

3.3 Ensaios qualitativos por cromatografia em camada delgada (CCD)

As cromatografias em camada delgada comparativa foram realizadas para monitoramento das frações obtidas dos fracionamentos 1 e 2 utilizando placas de sílica gel F₂₅₄ (0,2 mm, Merck). As placas foram eluídas em sistema de solventes apropriados para cada ensaio biológico, da seguinte forma:

- A fase superior de BAW (n-butanol/ácido acético/água, 4:1:5, vv) para o ensaio anti-radicalar;

- Clorofórmio e metanol (9:1, v/v) para o ensaio antifúngico.

Ao término da eluição, as placas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda (λ) de 254 nm e 366 nm e sob luz branca, em equipamento CAMAG ReproStar 3 e fotografadas em câmera Epson PhotoPC 3000Z.

3.4 Ensaio anti-radicalar com DPPH

3.4.1 Ensaio qualitativo em cromatografia em camada delgada (CCD)

Alíquotas de 200 μ g dos extratos brutos e 100 μ g das frações e subfrações obtidas do 1º fracionamento (Figura 7), foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de sílica gel F₂₅₄ (0,2 mm, Merck), eluídas com a fase superior de BAW (n- butanol/ ácido acético glacial/água, 4:1:5, vv) e o padrão autentico Quercetina (2,5 μ g/mL) dissolvida em metanol.

A revelação das placas foi realizada com uma solução metanólica do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (0,2% - DPPH, Sigma-Aldrich). Após aproximadamente 30 min de nebulizado com o revelador DPPH apareceram manchas brancas ou amareladas sob um fundo roxo indicando que houve sequestro do radical DPPH (Boveris *et al.* 2000). Os resultados foram observados e registrados em sistema CAMAG, fotografados e os valores do Fator de retenção (Rf) calculados.

3.4.2 Ensaio quantitativo em microplaca (Teste ELISA)

As subfrações (PFFR3.1, PFFR3.2 e PFFR3.3) e o padrão Ácido Clorogênico (5 – CGA) que mostraram forte atividade anti-radicalar em CCD, foram submetidos à quantificação em microplaca para a determinação da porcentagem de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura que absorve a 518 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie

radicalar (R[•]), o DPPH é reduzido formando difenilpicril- hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância.

Em microplaca de 96 poços foram colocados em triplicatas 178,5 µL das subfrações nas concentrações de 300, 250, 200, 150, 100, 50 e 25 µg/mL e 72 µL de solução metanólica de DPPH (0,3 mM), o controle negativo contendo 178,5 µL de metanol e 72 µL de DPPH (0,3 mM) e o controle positivo 178,5 µL do ácido clorogênico (25 µg/mL) e 72 µL de solução de DPPH (0,3 mM) em metanol. Após aplicação das amostras, a microplaca foi mantida a temperatura ambiente, no escuro durante 30 minutos, a absorbância foi medida a 518 nm em aparelho BIOTEK KC4. O cálculo da porcentagem de inibição foi determinado comparando-se as velocidades de reação das amostras em relação ao branco. (Brand-Williams *et al.* 1995, Tepe *et al.* 2005).

A porcentagem de sequestro do radical DPPH foi calculado através da equação a seguir:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{[(\text{Abs. da amostra} - \text{Abs. do branco}) \times 100]}{\text{Abs. do controle negativo}}$$

Abs. da amostra é a absorbância da amostra com DPPH; *Abs. do branco* é a absorbância da amostra sem o DPPH e *Abs. do controle negativo* é a absorbância da solução de DPPH em metanol.

A determinação da IC₅₀ foi calculada utilizando o programa GraphPad Prims 5.

3.5 Ensaio para detecção de compostos fenólicos com NP – PEG

Para a identificação de compostos fenólicos como os flavonoides e os ácidos fenólicos nas frações ativas, foram utilizadas alíquotas de 200 µg dos extratos brutos e das frações obtidas do 1º fracionamento (Item 3.2.1), aplicadas em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel F₂₅₄ (0,2 mm, Merck), para a fase móvel foi utilizada a parte superior do eluente BAW (n- butanol, ácido acético glacial e água – 4:1:5, vv) e o padrão Quercetina (2,5 µg) dissolvida em metanol. Após eluição, foi nebulizado o revelador 2 - (difenil-borilox) – etilamina/ polietileno glicol 2000 (NP/PEG) seguindo o protocolo:

NP-PEG: Nebulizar primeiro a solução **A** - contendo 2 - (difetil-borilox) – etilamina em MeOH) e depois a solução **B** (polietileno glicol 2000 – 5% em EtOH). Visualizar sob luz UV (366 nm) em sistema Camag.

3.6 Avaliação da atividade antifúngica

3.6.1 Atividade antifúngica por bioautografia em cromatografia de camada delgada (CCD)

Os fungos filamentosos *Cladosporium sphaerospermum* Penz (CCIBt 491) e *Cladosporium cladosporioides* Fresen de Vries (CCIBt140) foram utilizados como reveladores no bioensaio de detecção de substâncias fungitóxicas. Para a obtenção das culturas, os fungos foram mantidos em placas de Petri com meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), incubadas a 24°C, no escuro, por 14 dias. As suspensões de esporos dos fungos foram extraídas em solução de sais e glicose (6:1, v/v) e armazenadas em freezer.

Alíquotas de 200 µg para o EEBs bruto e 100 µg para as frações e subfrações obtidas do 2º fracionamento (Item 3.2.4 e 3.2.5) foram aplicadas (10 µL) em CCD de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck). Como controle positivo foi utilizado a Nistatina (5 µg). As placas cromatográficas foram eluídas com CHCl₃:MeOH (9:1, v/v). Após a eluição e eliminação completa dos solventes as cromatoplas foram nebulizadas com as suspensões de esporos (5×10^7 esporos/mL) dos fungos *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*, separadamente, e incubadas em câmara úmida a 27 °C no escuro por 48 horas (Homans & Fuchs 1970).

Após o período de incubação apareceram manchas claras sobre um fundo de coloração verde escuro indicativas de atividade inibidora do crescimento dos fungos. As placas foram observadas na luz branca em equipamento CAMAG ReproStar 3 e fotografadas em câmera fotográfica Epson PhotoPC 3000Z e os valores de R_f calculados.

As cepas dos fungos *C. sphaerospermum* Penz (CCIBt 491) e *C. cladosporioides* Fresen de Vries (CCIBt140) são mantidas no Instituto de Botânica/ Secretaria do Meio Ambiente, por repicagem em meio de Batata-Dextrose-Agar e incubação a 26°C, no escuro.

3.6.2 Limite de detecção por biautografia em CCD

As subfrações PP4 e PP4.1 ativas na inibição do crescimento dos fungos do gênero *Cladosporium* foram submetidas ao ensaio para determinação do limite de detecção que determina a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento de um microrganismo, utilizando placas cromatográficas de sílica gel F₂₅₄ (0,2mm Merck) de 5 cm aplicando as respectivas concentrações de cada fração: 100, 50, 25, 10 e 05 µg e o padrão a Nistatina (5 µg).

As placas foram nebulizadas com suspensão dos esporos dos fungos *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* (item ao item 3.6.1) e após o período de três dias em estufa a 27 °C foi possível observar a presença ou ausência de crescimento dos fungos, sendo as concentrações presentes nos halos de inibição consideradas como limite de detecção inibitório.

3.7 Ensaio *in vitro* em cultura de células para determinação de atividade antioxidante

Inicialmente foi realizada a multiplicação das células de melanócito humano (NGM) e de linhagens de melanoma humano sendo (Wm 1552, uma linhagem de crescimento radial; a Wm 1366, uma linhagem de crescimento vertical e Lu 1205, uma linhagem de crescimento metastático) em placas de Petri. Depois de realizada a contagem das células, o número de células plaqueadas foi de 1.2×10^3 para as linhagens NGM e Wm 1366 e de 1.5×10^3 para Wm 1552 e Lu 1205 em quintuplicata em microplaca de 96 poços. Após 48 h as células foram tratadas com ácido clorogênico (padrão sigma-Aldrich) ou com as subfrações FFR3.3 ou PP4 que mostraram forte atividade antioxidante e antifúngica respectivamente, solubilizadas em DMSO nas seguintes concentrações: para a linhagem Wm 1552 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 5 µg/mL e 0,5 µg/mL; Wm 1366 nas

concentrações de 500 µg/mL, 400 µg/mL, 200 µg/mL; 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL; e nas células Lu 1205 nas concentrações 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL por 5, 15 ou 30 minutos na estufa a 37°C. Em seguida, o meio contendo os tratamentos foi retirado, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado em cada poço da microplaca 60 µL do indicador de fluorescência DHE (dihidroetídio – Molecular Probes) (comprimento de onda de excitação 480nm; comprimento de onda de emissão 567nm) na concentração de 25 µm. Após 40 minutos de incubação a 37°C na estufa as células foram lavadas com PBS para retirada do excesso de DHE e realizou-se a leitura no fluorímetro utilizando-se o filtro com comprimentos de onda de excitação de 488nm e de emissão de 620 nm.

Estes ensaios foram realizados no Núcleo de Fisiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – FCMSCSP, sob a responsabilidade da Dra Fabiana H. Machado e sua aluna Jaqueline Soares.

3.8 Estudo Fitoquímico

3.8.1 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção na região do Ultravioleta (UV)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica foi realizada em cromatógrafo Agilent modelo 1260, constituído de um forno termostático G1316A, um injetor automático G1329B, um compartimento de amostras termostático G1330B, uma bomba G1311B, equipado com detector por varredura de espectro no Ultravioleta por arranjo de fotodiodos com célula de fluxo de 60 mm. Como fase estacionária para as análises em escala analítica foi utilizada uma coluna Zorbax Eclipse plus de fase reversa C18 (4,6 x 150 mm) e 3,5 µm de diâmetro de partícula e um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹. Os solventes utilizados foram grau HPLC (T. J. Baker).

Dois sistemas de gradientes foram utilizados com a fase móvel os eluentes (A) água deionizada (Sistema Merck) acidificada com 0.1% de ácido acético (Merck) e (B) acetonitrila (ACN).

Utilizou-se um método para detecção e identificação de compostos fenólicos presentes nos extratos e frações e o outro para os extratos obtidos por imersão das folhas secas em estufa (FE) a 60° C e folhas liofilizadas (FL). O primeiro gradiente foi iniciado (tempo 0 min) com uma mistura de 90% de A e 10% de B (ACN) até 6 min, de 6 min a 7 min 85% de A, de 7 a 22 min 85% de A, de 22 a 23 min 80% de A, 33 a 34 min 75% de A, 34 a 44 min 75% de A, 44 a 54 min 50% de A, 54 a 60 min 50 a 100% de B. O segundo gradiente o tempo 0 min (início da corrida) 90% de A.

Estas análises foram realizadas no Instituto de Biociências no Laboratório de Fitoquímica da Universidade de São Paulo – SP, sob responsabilidade do Dr. Marcelo Pena.

3.8.2 Análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativo

Para separações empregando-se o CLAE semi-preparativo foi usado um cromatógrafo Agilent 1200 e uma coluna Zorbax eclipse plus LC-18 de fase reversa C18 (25 cm x 10 mm), com partículas de diâmetro de 5 µm e um fluxo de 4,176 mL.min⁻¹. O sistema de eluição empregado foi o modo gradiente iniciado e constituído por uma mistura de 75% de H₂O acidificada com 0,1% de ácido acético e 25% de acetonitrila (ACN) por 2 minutos, de 2 a 7 min atingindo 50% de ACN, de 7 a 25 min atingindo 90% de ACN, de 25 a 26 min 100% de ACN, o qual foi mantido por mais um minuto.

Estas análises foram realizadas no Instituto de Biociências no Laboratório de Fitoquímica da Universidade de São Paulo – SP, sob responsabilidade do Dr. Marcelo Pena.

3.8.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) experimentos uni (¹HRMN) e bidimensionais (HSQC e HMBC) para a identificação dos compostos isolados

As subfrações FFR4.3, FFR5.4 e PP4.1 foram solubilizadas em DMSO e analisadas por ¹HRMN, e para a FFR5.4 foram realizados espectros de correlação bidimensionais HSQC (conectividade direta C-H com constante de acoplamento J=1) e HMBC (conectividade até três ligações J=3). A análise anterior para a identificação do composto presente na fração PP4 foi utilizado como solvente clorofórmio deuterado e foram realizadas análises de ¹HRMN, HSQC e HMBC. Estes

espectros foram registrados em espectrômetro Bruker AIII 500MHz e todas estas análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo - USP, SP, pelo técnico responsável.

3.8.4 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)

A fração PP4 que mostrou forte atividade antifúngica, foi solubilizada em metanol PA., e para a obtenção dos espectros foi utilizado o cromatografo líquido CBM-20A- Shimadzu, bombas: LC-20AD Shimadzu com detector: SPD-20A – Shimadzu Forno: CTO-20A – Shimadzu e autoinjeter : SIL 20AC – Shimadzu e espectrômetro de massas Esquire 3000 plus – Bruker Daltonics, com capilar de 4000V, nebulizador 27 Psi, temperatura de 300°C e fluxo de gás de 7L/min. Operando no modo de aquisição de dados MS e MS/MS com fonte de elétron-spray no modo positivo (ESI⁺).

4. Resultados e Discussão

4.1 Obtenção e rendimento do extrato etanólico (EEBs) e frações

As folhas frescas de *Bidens segetum* foram liofilizadas e a partir delas obteve-se o extrato etanólico (EEBs) por maceração a frio com etanol comercial 93° onde pesos e rendimentos estão na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Rendimento do extrato etanólico das folhas de *B. segetum* – EEBs.

Material - folhas frescas	1,345 Kg
Material liofilizado	485,0 g
Rendimento do material liofilizado	27,731%
Extrato Etanólico (EEBs)	123,284 g
Rendimento da extração	25,419%

As análises por CLAE-DAD dos extratos de *Bidens segetum* em AcEOt obtidos por imersão de folhas secas em estufa a 60°C (FE) e folhas liofilizadas (FL), com objetivo de extrair os compostos presentes em suas superfícies apresentaram perfis cromatográficos com bandas de absorção na região do ultravioleta características dos poliacetilenos, quando comparadas com os dados da literatura. Estes dados confirmam que o extrato em AcEOt de folhas liofilizadas é rico em poliacetilenos e podem ser os responsáveis pela proteção contra herbivoria e das atividades biológicas relatadas para os mesmos (Brandão *et al.* 1997, Kwiecinski *et al.* 2008).

Dados da literatura (Kwiecinski 2013) com *Bidens pilosa* mostraram também que o método de extração com fluido supercrítico, com a utilização de gases densos elevados acima de sua temperatura crítica forneceu extrato rico em poliacetilenos. Com base nestas evidências podemos inferir que o método de extração com folhas frescas liofilizadas também pode ser uma alternativa para otimizar o processo de obtenção de poliacetilenos (**Figura 9**).

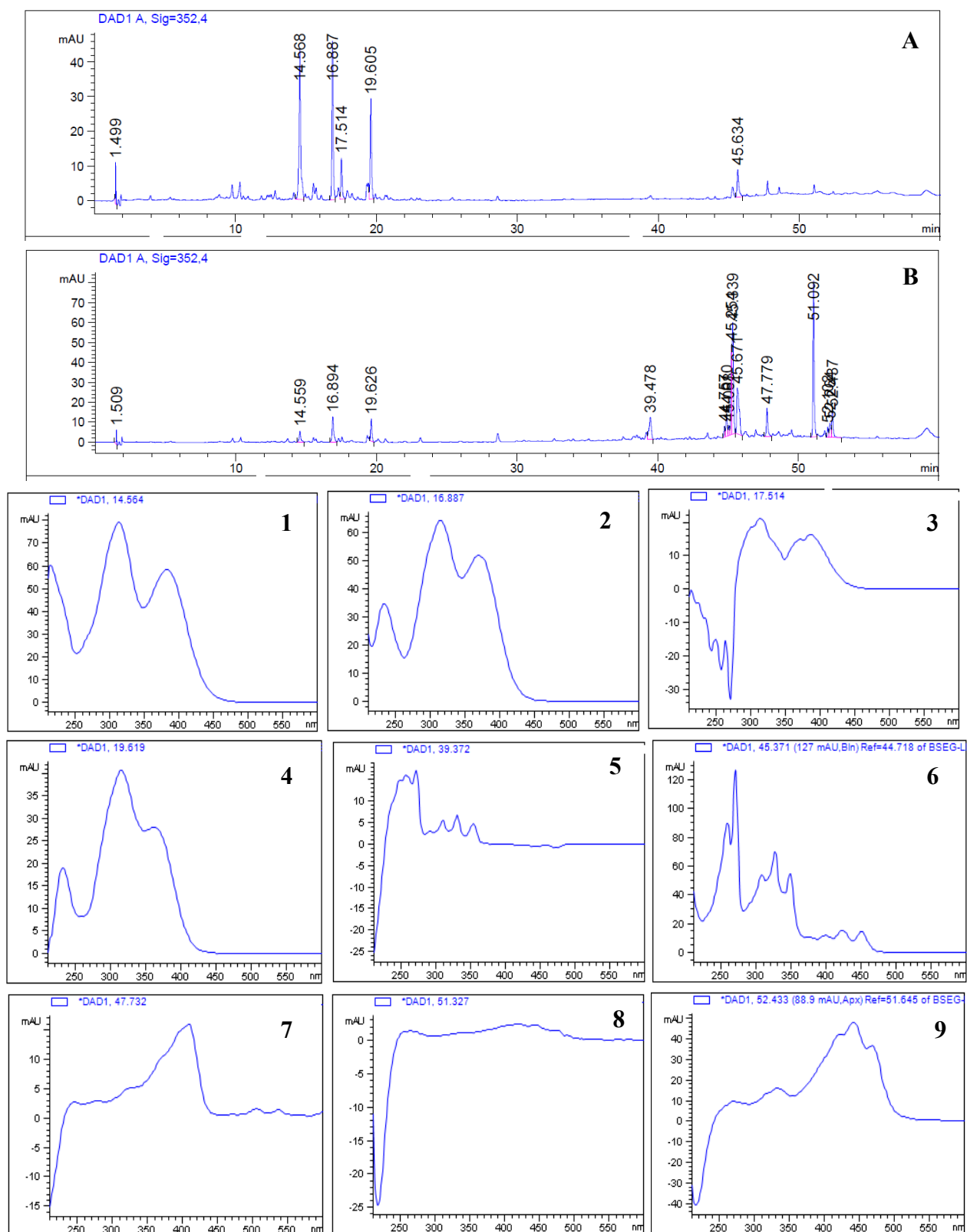


Figura 9 - Comparação entre os perfis cromatográficos das folhas de *B. segetum* em AcOEt obtidos a partir da técnica de CLAE - DAD. **A** – Folhas secas em estufa a 60°C; **B** - Folhas liofilizadas. Corrida de 60 min. λ – 352 nm. **1** = 14.564 min; **2** = 16.887 min; **3** = 17.514 min; **4** = 19.519 min; **5** = 39.372 min; **6** = 45.371 min; **7** = 47.732 min; **8** = 51.327 min; **9** = 52.433 min.

4.2 Obtenção e rendimento das frações e subfrações

O 1º fracionamento do Extrato Etanólico - EEBs (45,0 g) em coluna com sílica Flash forneceu 7 frações denominadas de: Fração hexânica (FH₁); Fração hexano + acetato de etila (FH+ FAcEOt₁); Fração acetato de etila (FAcEOt₁); Fração acetato de etila + metanol (FAcEOt+FMeOH₁); Fração metanólica (FMeOH₁) e Fração metanólica + água (FMeOH + H₂O) (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Rendimento das frações obtidas do 1º fracionamento do Extrato Etanólico – EEBs (45,0 g)

Frações	Peso	Rendimento
FH ₁	6,272 g	13,937%
FH+ FAcEOt ₁	4,127 g	9,171%
FAcEOt ₁	3,236 g	7,191%
FAcEOt+FMeOH ₁	16,042 g	35,648%
FMeOH ₁	2,823 g	6,273%
FMeOH + H ₂ O	1,028 g	2,284%

Abaixo é apresentado o rendimento das frações reunidas FAcEOt+MeOH₁ e FMeOH₁ e das subfrações obtidas por cromatografia por exclusão LH-20 e de fase reversa (AM17 – AM23 e FFR1 – FFR7, **Tabela 3**)

Tabela 3 - Rendimentos obtidos da coluna LH 20 (AM1-AM47) e das subfrações resultantes da coluna de fase reversa.

Coluna LH 20 (AM1 – AM47) 14,0 g		Peso	Rendimento
		6,131 g	43,792%
Coluna de Fase Reversa (AM17 - AM23)	Peso	Coluna de Fase Reversa (FFR1 – FFR7)	Peso
AM17	188,5 mg	FFR1	139,4 mg
AM18	170,2 mg	FFR2	93,8 mg
AM19	180,7 mg	FFR3	23,6 mg
AM20	158,3 mg	FFR4	16,0 mg
AM21	160,1 mg	FFR5	20,1 mg
AM22	81,2 mg	FFR6	17,6 mg
AM23	108,5 mg	FFR7	24,3 mg

A subfração FFR3 foi selecionada para purificação em placa cromatográfica preparativa (CCDP), por apresentar maior grau de pureza e os compostos ativos de interesse fornecendo três novas subfrações denominadas de PFFR3.1, PFFR2 e PFFR3.3 (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Rendimento das subfrações obtidas da FFR3 por purificação em placa cromatográfica preparativa (CCDP) 23,6 mg.

Frações	Peso	Rendimento
PFFR3.1	8,58 mg	37,304%
PFFR3.2	7,33 mg	31,869%
PFFR3.3	4,23 mg	18,391%

O 2º fracionamento do Extrato Etanólico – EEBs (75 g) por partição em funil de separação com solventes de polaridade crescente forneceu três frações denominadas de: fração hexânica (FH₂); fração acetato de etila (FACeOt₂) e fração aquosa (FH₂O).

A purificação da FACeOt₂ (300 mg) por cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP) forneceu 10 subfrações (PP1- PP10, **Tabela 5**).

Tabela 5 – Rendimento das subfrações (2º fracionamento) do EEBs (75 g) e das subfrações da FAcEOt₂ (300 mg) obtidas por cromatográfica de camada delgada preparativa (CCDP).

Fração	Peso	Rendimento	Subfração	Peso	Rendimento
FH ₂	10,660 g	14,213%	PP1	20,0 mg	6,666%
FAcEOt ₂	5,846 g	7,794%	PP2	10,5 mg	3,500%
FH ₂ O	0,903 g	1,204%	PP3	35,8 mg	11,933%
			PP4	38,3 mg	12,766%
			PP5	26,6 mg	8,866%
			PP6	27,2 mg	9,066%
			PP7	24,2 mg	8,066%
			PP8	29,8 mg	9,933%
			PP9	21,0 mg	7,000%
			PP10	24,3 mg	8,1%

4.3 Ensaio anti-radicalar com DPPH

4.3.1 Ensaio qualitativo em cromatografia em camada delgada (CCD)

O monitoramento das frações obtidas do 1º fracionamento em coluna flash: FH₁; FH+FAcEOt₁; FAcEOt₁; FAcEOt+FMeOH₁ e FMeOH₁ avaliou a capacidade de sequestro do radical livre DPPH utilizando a quercetina como padrão (**Figura 10**).

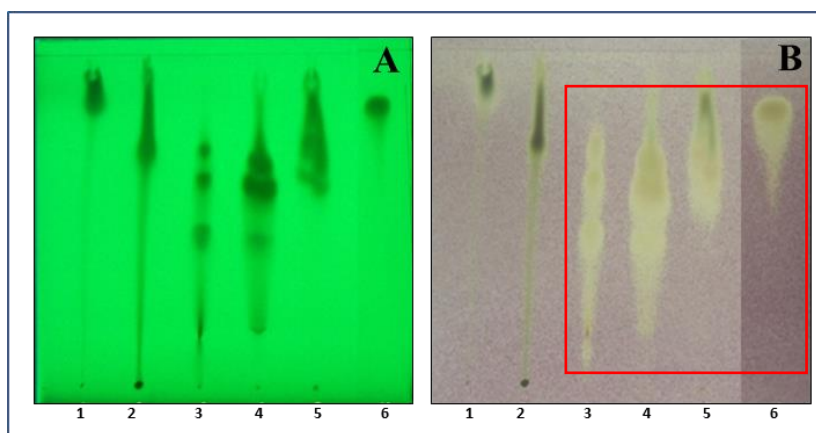


Figura 10 - Foto das placas cromatográficas (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluídos em BAW) 1-FH₁, 2-FH+AcEt₁, 3-FAcEOt₁, 4-FAcEOt+MeOH₁, 5-FMeOH₁, 6- Quercetina. **A**- Revelada λ= 254 nm, **B**- Revelada com DPPH sob luz branca.

A seguir estão apresentados os Fatores de Retenção (Rfs) das frações que apresentaram atividade no sequestro do radical livre DPPH (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) das frações ativas com o ensaio do DPPH.

Fração	Fator de Retenção (Rf)
FAcEOt ₁	0,64; 0,70
FAcEOt+MeOH ₁	0,47; 0,50; 0,64; 0,70
FMeOH ₁	0,47; 0,64; 0,70

Com base nesse resultado, selecionamos as frações FAcEOt+FMeOH₁ e FMeOH₁ que já haviam mostrado atividade anti-radicalar em outros testes com essa mesma metodologia para purificação em coluna Sephadex LH 20, subfrações (AM1 – AM34, **Figura 11**).

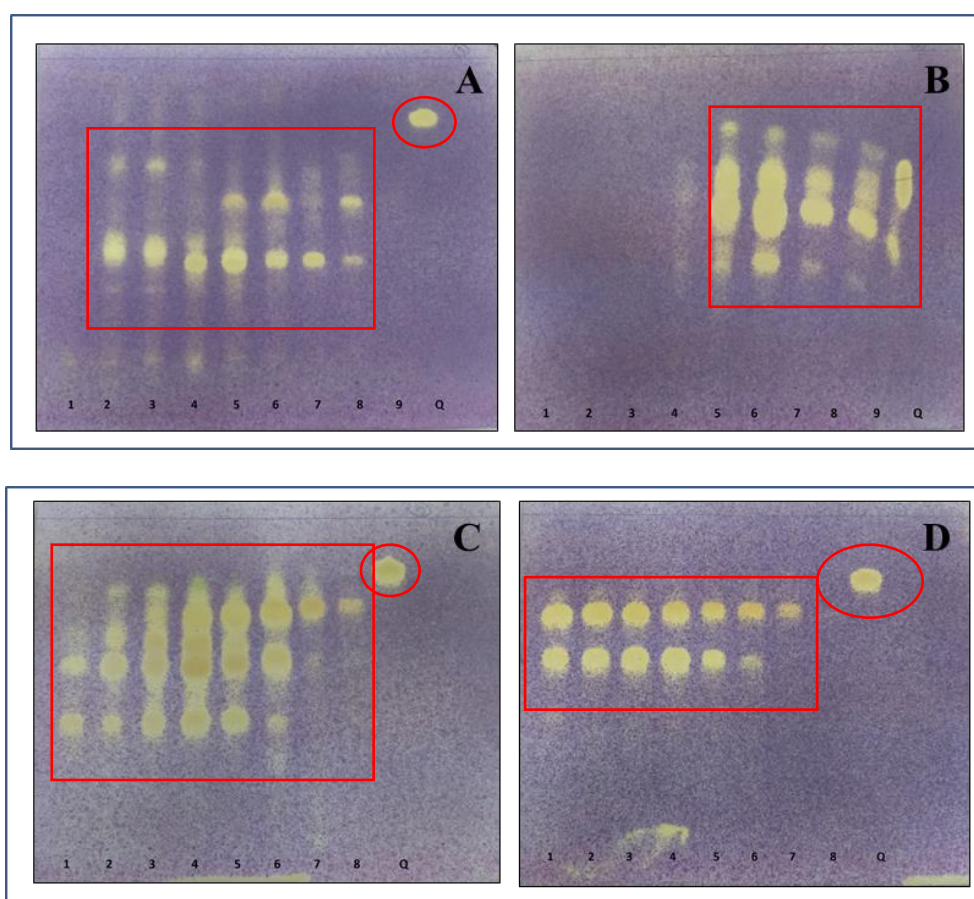


Figura 11 - Foto das placas cromatográficas (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluídos em BAW) **A**- AM1 a AM9; **B** - AM10 a AM18; **C** – AM19 a AM26; **D** – AM27 a AM34; Padrão Quercetina; Reveladas com DPPH sob luz branca.

Os Rfs das subfrações que apresentaram atividade anti-radicalar estão representadas na

Tabela 7.

As subfrações, após a subfração AM33 não apresentaram atividade no ensaio com DPPH.

Tabela 7 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) das subfrações (AM1 – AM34) obtidas com o ensaio do DPPH.

Subfração	Fator de Retenção (Rf)
AM2 e AM3	0,43; 0,68
AM4	0,43
AM5 a AM8	0,43; 0,56
AM14 a AM18	0,43; 0,56; 0,68; 0,81
AM19	0,43; 0,56
AM20 a AM23	0,43; 0,56; 0,66; 0,75; 0,81
AM24	0,43; 0,56; 0,75
AM25 e AM26	0,75
AM27 a AM31	0,62; 0,75
AM32 e AM33	0,75

As subfrações AM17 a AM23 com perfis cromatográficos e cores semelhantes e com maior quantidade em relação as outras subfrações foram selecionadas e fracionadas separadamente em coluna de fase reversa (como descrito no item 3.2.3).

Na **Figura 12** estão as fotos das placas cromatográficas das subfrações resultantes da coluna de fase reversa com as subfrações AM17 a AM23, após análise dos perfis cromatográficos.

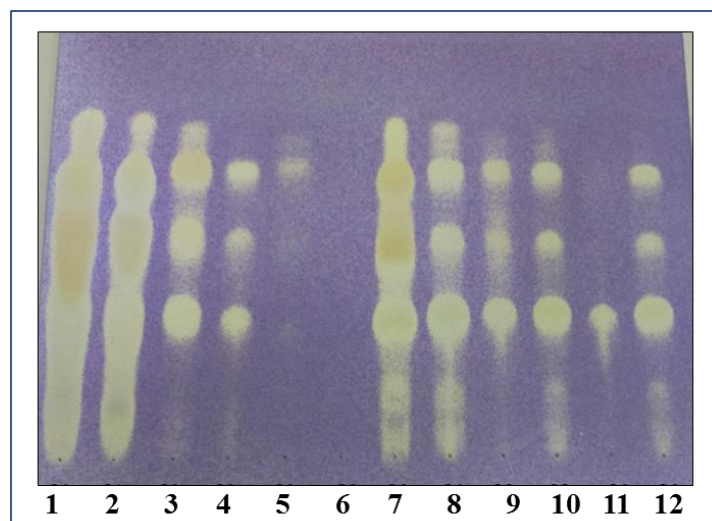


Figura 12 - Foto das placas cromatográficas (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluídos em BAW) **1 e 2** - AM17; **3** - AM18; **4** - AM19; **5 e 6** - AM20; **7 e 8** - AM21; **9 e 10** - AM22; **11 e 12** - AM23. Revelada com DPPH sob luz branca.

As subfrações foram separadas de acordo com a coloração que apresentaram, as que apresentaram mais de uma cor foram pipetadas separadamente para comparação do perfil cromatográfico, assim sendo, os principais Rfs estão apresentados na **Tabela 8** a seguir:

Tabela 8 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) obtidos pelas subfrações (AM17 – AM23) ativas para atividade anti-radicalar.

Subfração	Fator de retenção (Rf)
1 e 2 (AM17)	0,12; 0,37; 0,50; 0,56; 0,68; 0,78
3 (AM18)	0,37; 0,56; 0,68; 0,78
4 (AM19)	0,37; 0,56; 0,68
7 e 8 (AM21)	0,12; 0,37; 0,56; 0,68; 0,78
9 e 10 (AM22)	0,37; 0,56; 0,68
11 (AM23)	0,37
12 (AM23)	0,37; 0,56; 0,68

Os perfis cromatográficos observados nas fotos da Figura 12 das subfrações obtidas da separação na coluna de fase reversa foram reunidos conforme a Tabela 8 por apresentarem Rfs muito

próximos e novamente submetidos a fracionamento em coluna de fase reversa obtendo-se ao final 7 subfrações denominadas de FFR1 a FFR7 (**Figura 13**).

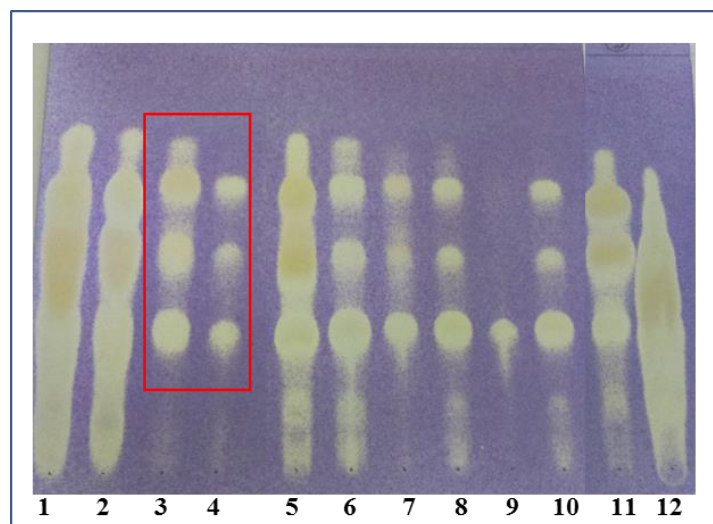


Figura 13 - Foto da placa cromatográfica (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluída em BAW) 1 – FFR1; 2– FFR2; 3 e 4 – FFR3; 5 – FFR4; 6 a 10 – FFR5; 11 – FFR6; 12 – FFR7. Revelada com DPPH sob luz branca.

As subfrações (FFR1-FFR7) por apresentarem parâmetros de cor diferentes foram colocadas na placa de acordo com a coloração apresentada, ou seja, as subfrações que apresentaram apenas uma cor em todos os frascos de coleta foram reunidas e aplicadas apenas uma vez na placa e as subfrações que apresentaram mais de uma cor foram pipetadas e aplicadas na placa cromatográfica de acordo com a quantidade de cores diferentes, resultando 12 *spots*.

Assim sendo, os Rfs apresentados estão representados na **Tabela 9** a seguir:

Tabela 9 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) obtidos pelas subfrações (FFR1 – FFR7) ativas para atividade anti-radicalar.

Subfração	Fator de retenção (Rf)
FFR1	0,12; 0,37; 0,56; 0,68; 0,78
FFR2	0,12; 0,37; 0,56; 0,68; 0,78
FFR3	0,37; 0,56; 0,68
FFR4	0,37; 0,56; 0,68; 0,78
FFR5	0,37; 0,56; 0,68
FFR6	0,37; 0,56; 0,68; 0,78
FFR7	0,12; 0,37; 0,56; 0,68; 0,78

Foi selecionada a subfração FFR3 para purificação em placa cromatográfica preparativa (CCDP). A escolha dessa subfração se deu pelo fato de ela ter apresentado uma boa separação com relação as outras subfrações e massa suficiente para uma nova separação (**Figura 14**).



Figura 14 - Foto da placa cromatográfica (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluída em BAW) 1 – PFFR3.1; 2– PFFR3.2; 3 – PFFR3.3. Revelada com DPPH sob luz branca.

Após purificação a subfração FFR3 apresentou três halos de inibição do radical DPPH (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) obtidos pelas subfrações (PFFR3.1 – PFFR3.3) ativas para atividade anti-radicalar.

Subfração	Fator de retenção (Rf)
PFFR3.1	0,63
PFFR3.2	0,36; 0,48
PFFR3.3	0,36

As subfrações que mostraram forte atividade antioxidante foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Silveira *et al.* (2009) em estudo com a fração acetado de etila com folhas de *Bidens segetum* obteve atividade antioxidante semelhante aos nossos resultados aqui descritos, e sugere que esta atividade pode estar relacionada com a grande quantidade de cumarinas encontradas nesta fração.

Fabri *et al.* (2011) descreve cinco classes de constituintes químicos encontrados em folhas de *Bidens segetum*: Fenois, taninos, flavonoides antraquinonas e esteroides, podendo estes estarem relacionados à atividade antioxidante encontrada na espécie.

Em trabalhos anteriores foram identificados na fração acetato de etila de *B.segetum* ácido clorogênicos identificados e avaliados por ensaios com DPPH e por análise GC-MS, dados estes não publicados.

4.3.2 Ação anti-radicalar (DPPH) em microplaca das subfrações PFFR3.1 a PFFR3.3

Compostos fenólicos são relatados na literatura como compostos capazes de sequestrar o radical livre DPPH, destacando-se o ácido clorogênico (5 – CGA), portanto, inicialmente foi realizado o ensaio com o padrão autêntico de 5 – CGA (**Figura 15**).

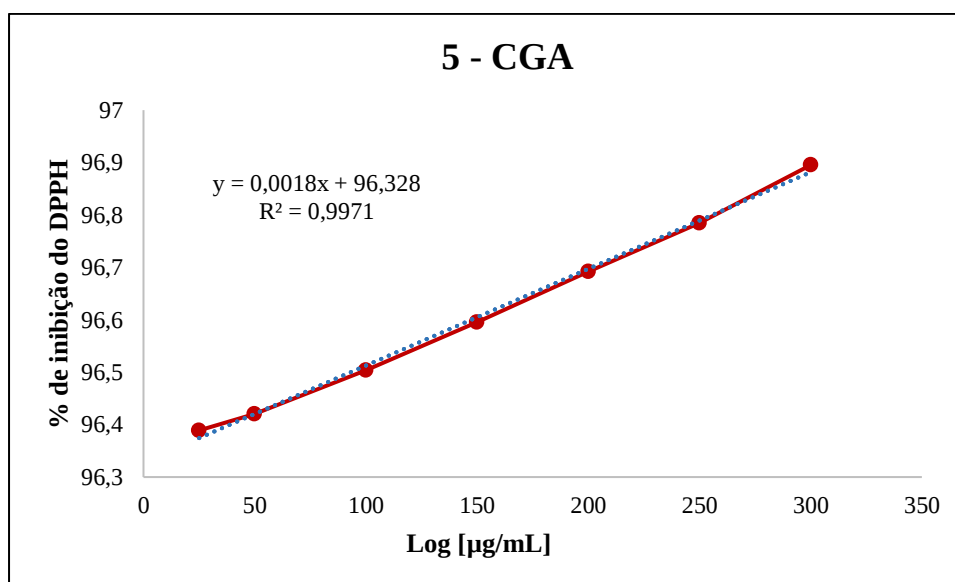


Figura 15 - Gráfico da curva de atividade anti-radicalar do padrão 5 - CGA do método de sequestro do radical DPPH.

A IC₅₀ obtida com base nos dados do padrão 5 – CGA foi de 8,141µg/mL.

Na **Figura 16** estão os valores da porcentagem de sequestro do DPPH pelo padrão 5 - CGA.

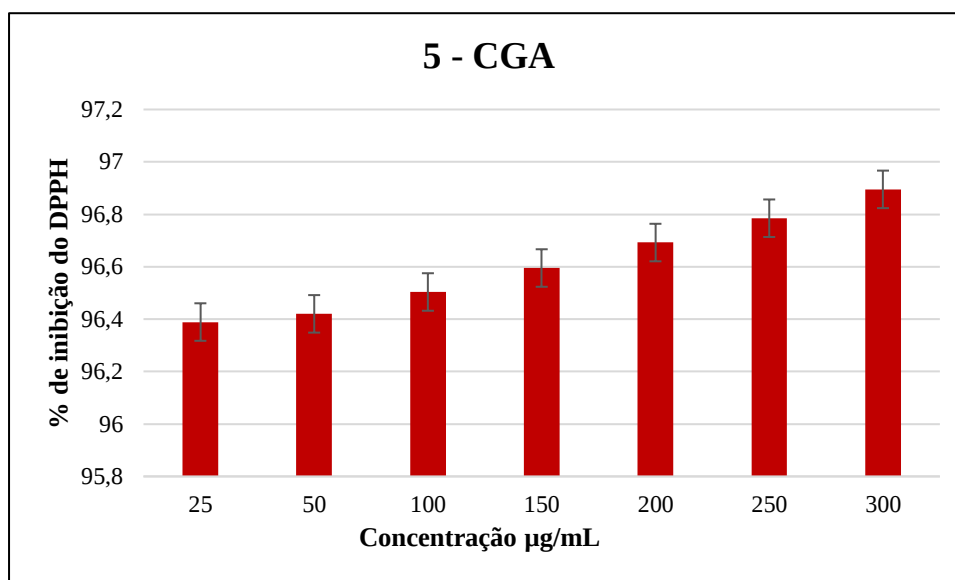


Figura 16 - Gráfico da quantificação da atividade anti-radicalar do padrão 5 – CGA nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/mL.

A subfração PFFR3.3 que mostrou forte atividade antioxidante no método qualitativo em placa cromatográfica (CCD) foi selecionada para análise quantitativa de atividade anti-radicalar em microplaca para calcular a concentração inibitória de 50%, conhecida como IC₅₀. A curva resposta obtida quantificou a capacidade de sequestro do radical DPPH da subfração PFFR3.3 (Figura 17).

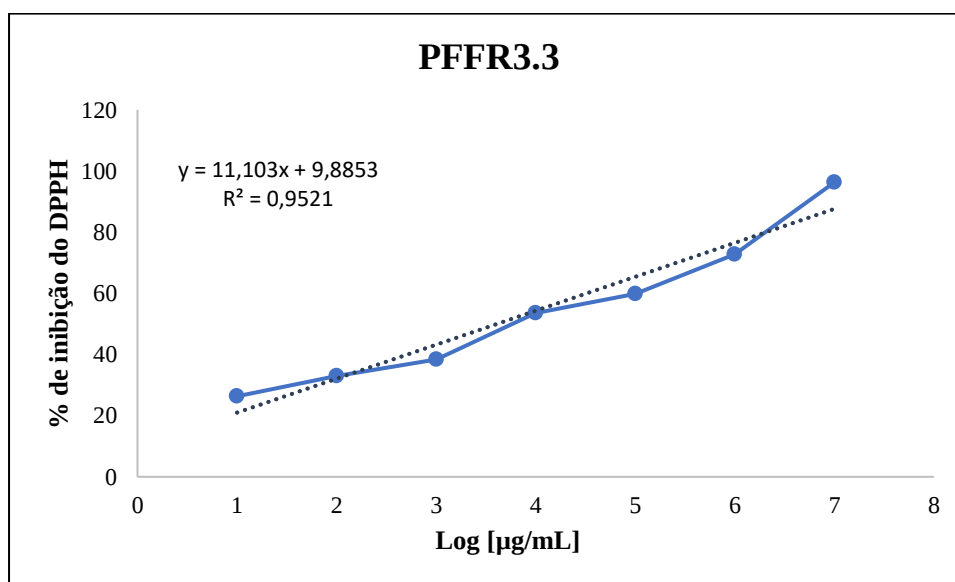


Figura 17 - Gráfico da quantificação da atividade anti-radicalar (DPPH) da subfração PFFR3.3 nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 µg/mL.

A IC_{50} de 132, 2 $\mu\text{g/mL}$ da subfração PFFR3.3 foi calculada a partir da curva resposta da porcentagem de sequestro do radical DPPH (a concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ não foi considerada no cálculo da IC_{50} , pois houve um erro experimental).

Na **Figura 18** estão os valores da porcentagem (%) de sequestro do DPPH de PFFR3.3.

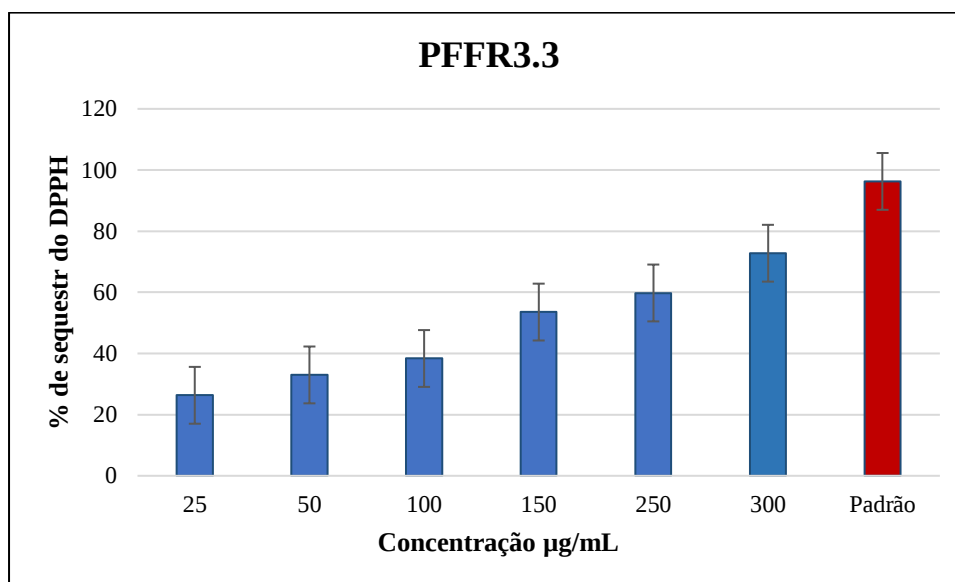


Figura 18 - Gráfico da quantificação da atividade anti-radicalar da subfração PFFR3.3 nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 250, e 300 $\mu\text{g/mL}$ e padrão Ácido clorogênico (5 - CGA).

O composto 3',4',6',7'-Tetrahidroxiaurona isolado de *Bidens pilosa* apresentou forte atividade anti-radicalar (DPPH), com valor de IC_{50} de 8,3 μM . Auronas pertencem a classe dos flavonoides que assim como os ácidos clorogênico são muito encontrados em espécies do gênero *Bidens* e que tem demonstrado forte ação anti-radicalar (Venkateswarlu *et al.* 2004). Em estudo realizado por Scherer *et al.* (2009) em análise do potencial do sequestro do DPPH, o ácido clorogênico apresentou um valor de IC_{50} de 7,4 μM e porcentagem de inibição do DPPH de 10,3%. A estrutura dos compostos fenólicos constituída de um anel aromático ligado a um ou mais grupo hidroxila é um fator determinante para a atividade inibitória de radical livre, conhecida como relação estrutura-atividade, sendo que a ação antioxidante dos compostos fenólicos aumenta com o grau de hidroxilação (Bravo 1998, Balasundram *et al.* 2006).

4.4 Cromatografia em CCD das subfrações (AM1 – AM34 e PFFR3.1 – PFFR3.3) Revelação com NP - PEG

As subfrações que apresentaram atividade anti-radicalar (DPPH) foram selecionadas para ensaio com o revelador (NP/PEG) e a Quercetina como padrão, os resultados mostraram que esse flavonol muito comum em espécies de *Bidens* não foi detectado, conforme mostrado nas **Figura 19**.

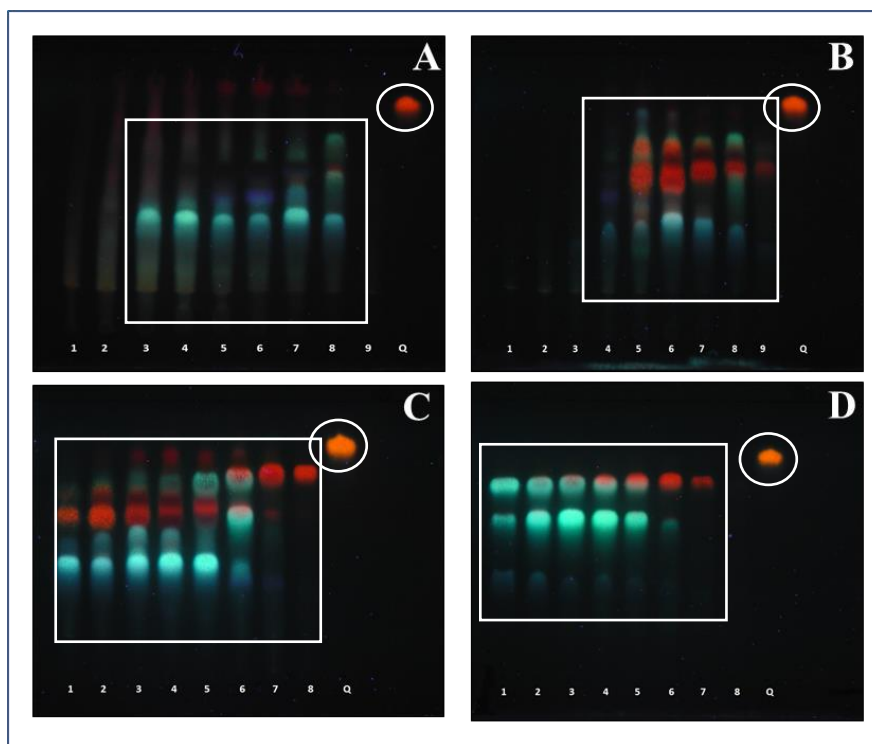


Figura 19 - Foto das placas cromatográficas (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluídos em BAW) **A**- AM1 a AM9; **B** - AM10 a AM18; **C** – AM19 a AM26; **D** – AM27 a AM34; Padrão Quercetina; Reveladas com NP – PEG $\lambda = 366\text{nm}$.

As subfrações AM1 a AM34 apresentaram um perfil cromatográfico bem semelhante em relação à atividade anti-radicalar e os Rfs apresentados estão na **Tabela 11** a seguir.

Tabela 11 - Valores dos Fatores de Retenção (Rf) obtidos pelas subfrações (AM1 – AM34) ativas no teste com NP-PEG.

Subfração	Fator de retenção (Rf)
AM2 a AM8	0,43
AM14 a AM17	0,43; 0,68; 0,81
AM19	0,43; 0,56
AM20	0,43; 0,56; 0,66
AM21 a AM24	0,43; 0,56; 0,66; 0,75
AM25 e AM26	0,75
AM27 a AM31	0,69; 0,75
AM32 e AM33	0,75
Quercetina	0,80

Os perfis cromatográficos obtidos da purificação da subfração FFR3 (PFFR3.1, PFFR3.2 e PFFR3.3) por CCDP e revelados com NP-PEG/ $\lambda = 366$ nm mostrou halos esverdeados característicos de compostos fenólicos possivelmente ácidos clorogênico (**Figura 20**).

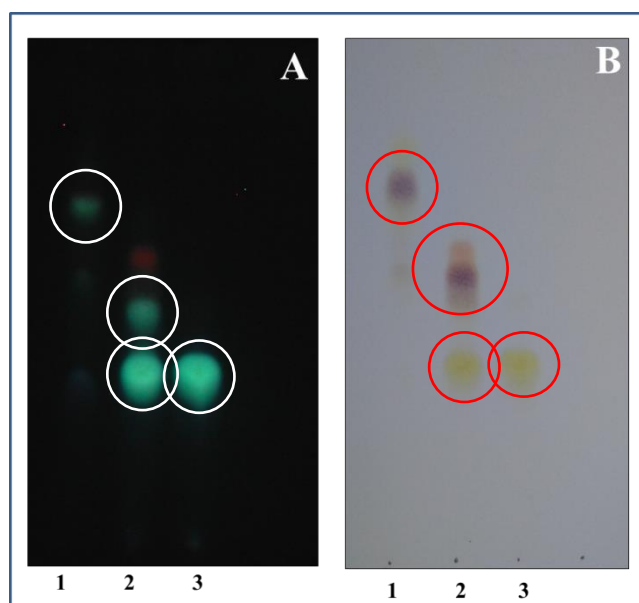


Figura 20 - Foto da placa cromatográfica (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluída em BAW) **1** – PFFR3.1; **2** – PFFR3.2; **3** – PFFR3.3. Revelada com NP – PEG **A**: $\lambda = 366$ nm; **B**: Luz branca.

Com base em análise da placa, esta apresentou três halos semelhantes às correspondentes da atividade anti-radicalar (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Valores dos Fatores de Retenção (Rf) obtidos pelas subfrações (PFFR3.1 – PFF3.3) ativas no teste com NP-PEG.

Subfração	Fator de retenção (Rf)
PFFR3.1	0,63
PFFR3.2	0,36; 0,48
PFFR3.3	0,36

4.5 Atividade antifúngica com fungos do gênero *Cladosporium*

4.5.1 Ensaio antifúngico por biauotografia das frações do EEBs e subfrações PP1 – PP10

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada inicialmente com as frações obtidas do 2º fracionamento do EEBs, pois esse método foi utilizado para otimizar o rendimento da fração AcEOt que já havia mostrado atividade na inibição dos fungos em ensaios anteriores (**Figura 21**).

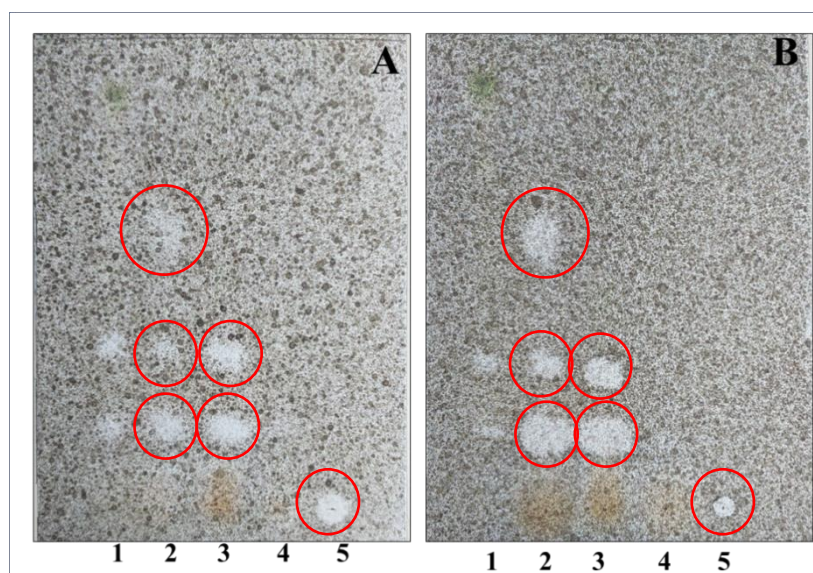


Figura 21 - Foto dos cromatogramas (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluído em CHCl₃/MeOH 9:1, sob luz branca) 1-FH₂, 2-FAcEOt₂ (A), 3-FAcEOt₂ (B), 4-MeOH, 5-Nistatina. **A** - Revelada com esporos do fungo *Cladosporium cladosporioides*, **B** - Revelada com esporos do fungo *Cladosporium sphaerospermum*. Fotografadas sob luz branca.

Após crescimento dos esporos dos fungos nas placas, foi possível observar halos de inibição que mostram a atividade antifúngica das frações obtidas do EEBs (**Tabela 13**).

Tabela 13 - Valores dos Fatores de Retenção (Rfs) obtidos pelas frações do 2º fracionamento do EEBs ativas para atividade antifúngica com os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Fração	Fator de retenção (Rf)
FH ₂	0,2; 0,33
FACeOt ₂ (A)	0,2; 0,33; 0,62
FACeOt ₂ (B)	0,2; 0,33

A fração FACeOt₂ (A e B) com cores diferentes após o ensaio antifúngico apresentaram halos com os mesmos Rfs e foram reunidas.

Os perfis biautográficos da figura 21 e tabela 13 foram semelhantes para os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

As frações FACeOt₂ (A e B) reunidas, com atividade antifúngica, foi purificada em placa cromatográfica preparativa (CCDP) obtendo-se 10 subfrações (PP1 – PP10, **Figura 22**).

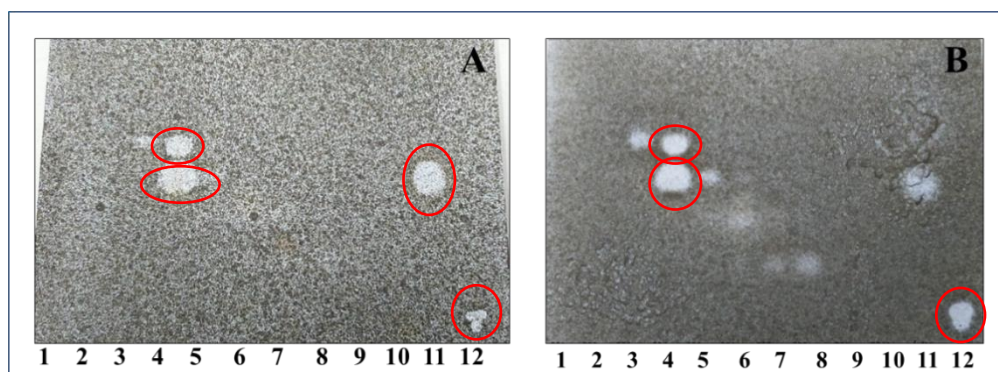


Figura 22 - Foto dos cromatogramas (CCD, em sílica gel F₂₅₄ eluído em CHCl₃/MeOH 9:1, sob luz branca) 1-PP1, 2-PP2, 3-PP3, 4-PP4, 5-PP5, 6-PP6, 7-PP7, 8-PP8, 9-PP9, 10-PP10, 11-Ác. Cinâmico, 12-Nistatina. **A** - Revelada com esporos do fungo *C. cladosporioides*, **B** - Revelada com esporos do fungo *C. sphaerospermum*. Fotografadas sob luz branca.

A subfração PP4 mais ativa no ensaio antifúngico com solução dos esporos dos fungos *C. cladosporioides* e *C. shaerospermum*, com halos de inibição Rfs: 0,56; 0,68, para ambos os fungos, foi purificada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala semi-preparativa (Item 4.7).

4.5.2 Limite de detecção da subfração PP4 e PP4.1 – ensaio biautográfico com *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*

O limite de detecção da subfração PP4 nas concentrações de 100, 50, 25, 10 e 05 µg e o padrão a Nistatina 5 µg, no ensaio por biautografia em placa de sílica gel com esporos do fungo *C. sphaerospermum* está representado na **Figura 23**.

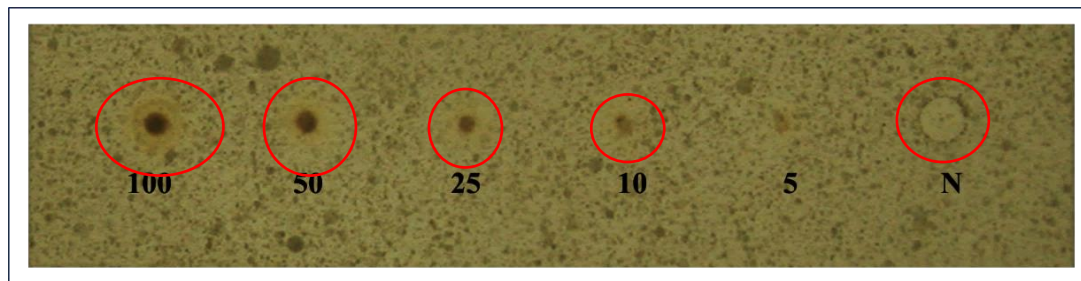


Figura 23 - Foto do biautograma de PP4 mostrando os halos brancos proporcionais às concentrações em relação ao padrão Nistatina (limite de detecção, em sílica gel F₂₅₄, sob luz branca, *C. sphaerospermum* nas concentrações de 100; 50; 25; 10 e 05 µg e padrão Nistatina 05 µg).

O resultado da biautografia com os esporos do fungo *C. sphaerospermum* apresentou halo de inibição até a concentração de 10 µg que corrobora com os dados obtidos no ensaio qualitativo por CCD (Figura 22).

A Subfração PP4 foi purificada em CLAE semi-preparativo (PP4.1 – PP4.5) e analisada por CLAE analítico para quantificação e determinação do grau de pureza e atividade antifúngica. A subfração PP4.1 (100%) no comprimento de onda $\lambda=325\text{nm}$ e tempo de retenção Tr: 49.846 min (Item 4.7) foi submetida ao ensaio biautográfico de limite de detecção com esporos do fungo *C. sphaerospermum* nas concentrações de 100, 50, 25, 10 e 05 µg e padrão Nistatina 05 µg. Os resultados obtidos para a subfração PP4.1 foram negativos como mostrados na **Figura 24**.

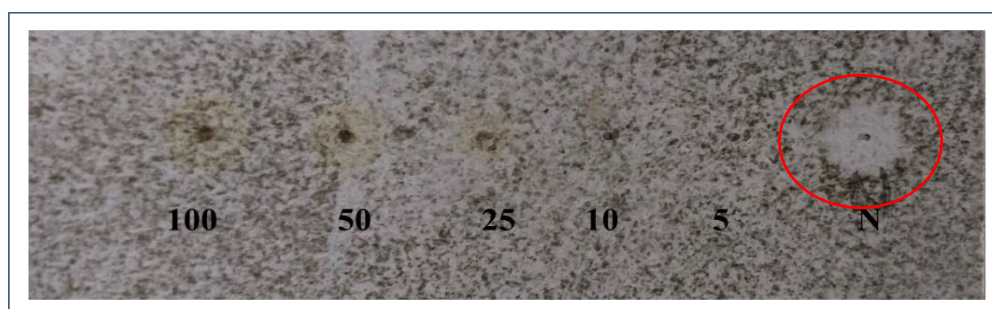


Figura 24 - Foto do bioautograma de PP4.1 mostrando resultados negativos, halos brancos não foram observados comparado ao padrão nistatina (limite de detecção, em sílica gel F₂₅₄, sob luz branca, *C. sphaerospermum* nas concentrações de 100; 50; 25; 10 e 05 µg e padrão Nistatina 05 µg).

O resultado da bioautografia, com os esporos do fungo *C. sphaerospermum* não apresentou halo de inibição para nenhuma das concentrações avaliadas. Sugerindo que a PP4.1 não é o composto ativo responsável pela forte atividade antifúngica presente na subfração PP4.

Nos ensaios bioautográficos realizados com os esporos do fungo *C. cladosporioides* de limite de detecção com PP4 e PP4.1 não houve crescimento do fungo.

Nascimento *et al.* (2013), em pesquisa com óleos essenciais de *B. segetum*, com esporos dos mesmos fungos utilizados neste trabalho *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* em diferentes partes da planta e em diferentes concentrações mostrou forte atividade antifúngica.

As espécies *B. pilosa* e *B. cinapiifolia* em estudo *in vitro* de fungos fitopatogênicos realizados por Tagami *et al.* (2009) e Fenner *et al.* (2006), apresentaram resultado positivo para atividade antifúngica.

Os poliacetilenos compostos encontrados em espécies do gênero *Bidens* são conhecidos por sua atividade antimicrobiana. Esta atividade pode estar relacionada a sua estrutura dos poliacetilenos, conforme relatado na literatura que associa a função acetileno ao crescimento micelial de alguns grupos de fungos (Pedrosa 2012).

4.6 Atividade antioxidante em culturas de células *in vitro*

A subfração PFFR3.3 identificada como o ácido clorogênico ou 5-O-(E)-cafeoilquínico (90%) com forte atividade anti-radicalar (DPPH), foi selecionada para ensaio em cultura de células de linhagens de melanoma e melanócito (item 3.7) em concentrações e tempos diferentes.

Inicialmente os ensaios foram realizados no período de 30 minutos de ação da droga (subfração PFFR3.3) nas linhagens do melanoma Wm1552 (linhagem de crescimento radial), Wm1366 (linhagem de crescimento vertical) e Lu1205 (linhagem de crescimento metastático) e utilizado como o controle linhagens de células não tratadas (**Figura 25**).

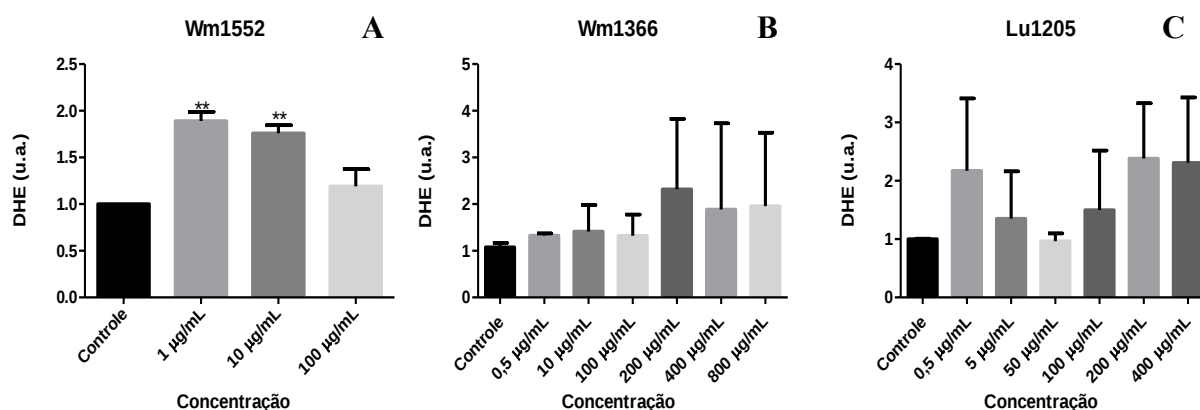


Figura 25 - Gráficos de atividade antioxidante da subfração PFFR3.3 em células de melanoma humano (tempo de ação 30 min). **A** - Wm1552; **B** - Wm1366; **C** - Lu1205.

A partir da análise dos gráficos avaliamos que os resultados obtidos não são conclusivos, mesmo realizados em diversas concentrações há uma grande variação nos resultados finais, as mesmas concentrações aumentaram, diminuíram ou não mudaram a quantidade de ânion superóxido (O_2^-), baseado na oxidação do DHE (dihidroetídio), probe molecular nas diferentes células.

O tempo de ação da droga nos ensaios foi reduzido para 5 e 15 minutos para a verificação do efeito do tempo na ação da droga na diminuição dos níveis de ânion superóxido (O_2^-) na linhagem Lu 1205, e os resultados continuaram inconclusivos (**Figura 26**).

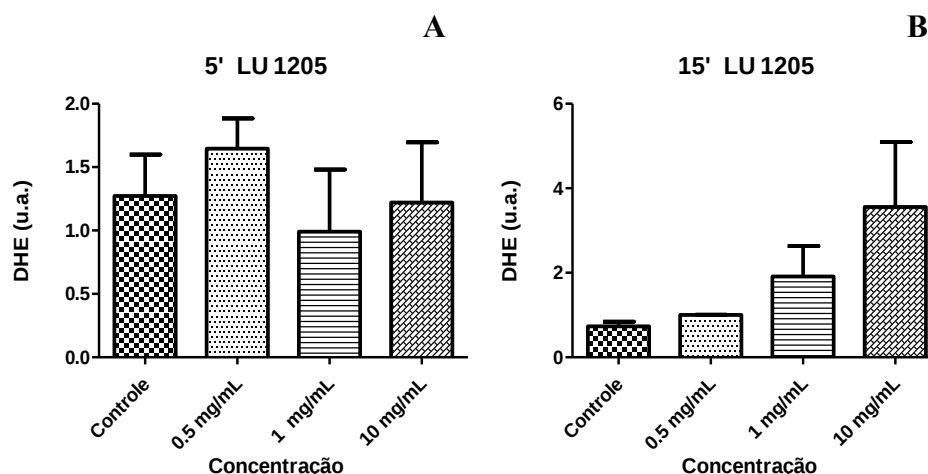


Figura 26 - Gráfico da atividade antioxidante da subfração PFFR3.3 em cultura de células do melanoma linhagem LU 1205. **A** – 5 min; **B** – 15 min.

A PFFR3.3 foi submetida a ensaios com cultura de células de melanócitos (NGM) em menores concentrações e tempo de ação da droga de 30 minutos **Figura 27**.

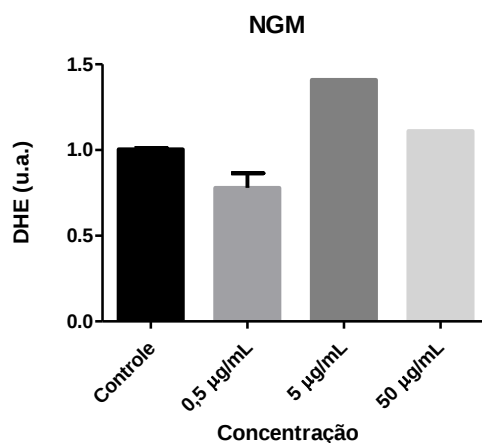


Figura 27 - Gráfico da atividade antioxidante da PFFR3.3 em culturas de células de melanócito (NGM) nas concentrações de 0, 5; 1; 10 e 100 µg e tempo de ação da droga de 30min.

Os resultados também são inconclusivos, mas observa-se que na menor concentração (0,5 µg), semelhante ao resultado com Lu 1205 (1µg, figura 26) há uma diminuição da quantidade de ânion superóxido em relação ao controle.

Foi realizado o mesmo ensaio com linhagens de melanoma e melanócito com padrão 5 – CGA no tempo de 30 minutos (**Figuras 28 e 29**) e com a subfração PP4, com a linhagem Lu 1205 nos tempos de 5 e 15 minutos (**Figura 30**), contudo, em todos os testes o resultado foi negativo em relação a diminuição do ânion superóxido (O_2^-), baseado na oxidação do DHE (dihidroetídio), probe molecular.

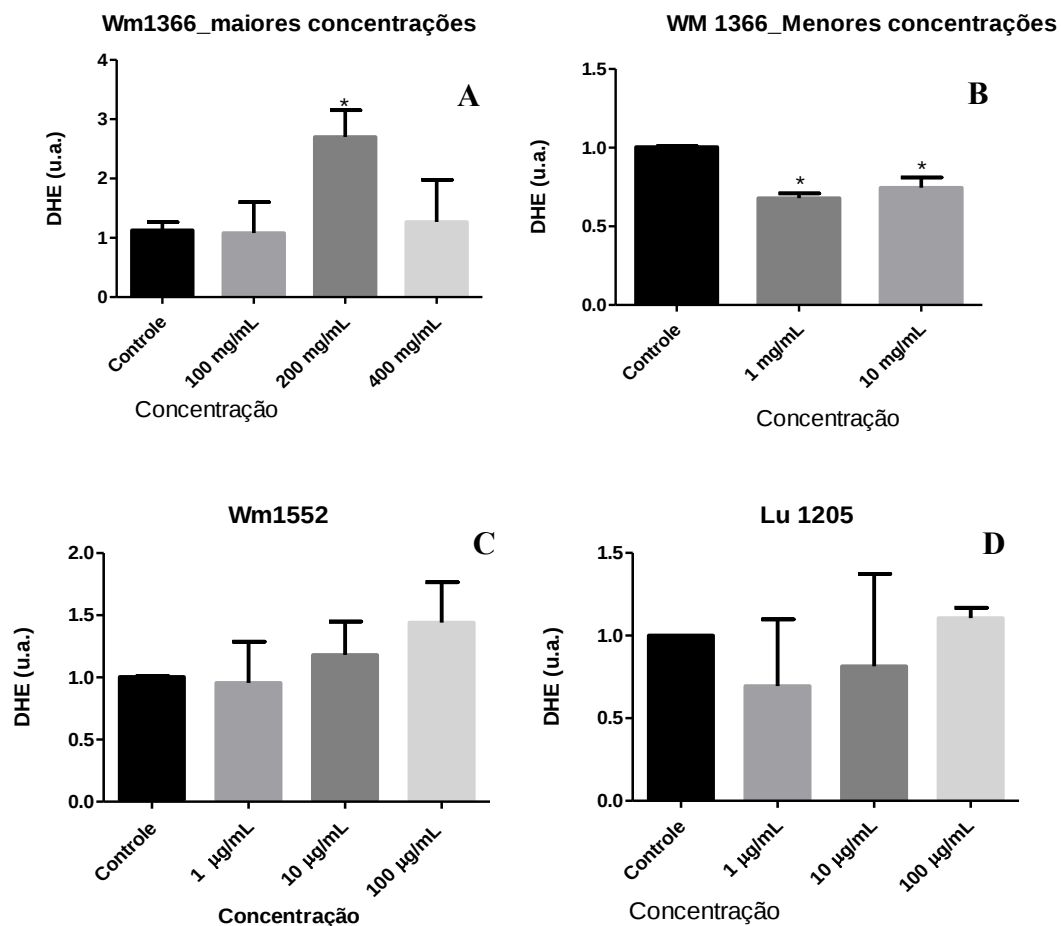


Figura 28 - Gráficos de atividade antioxidante do padrão 5 - CGA em células de melanoma humano **A** - Wm1366 > concentração; **B** - Wm1366 < concentração; **C** - Wm 1552 e **D** - Lu1205.

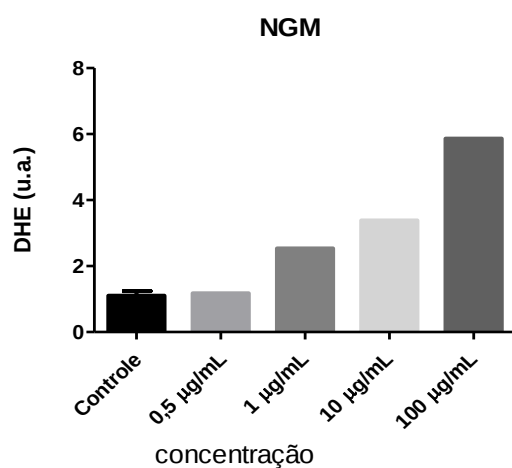


Figura 29 - Gráfico da atividade antioxidante do padrão 5 - CGA em culturas de células de melanócito (NGM) nas concentrações de 1; 10 e 100 µg.

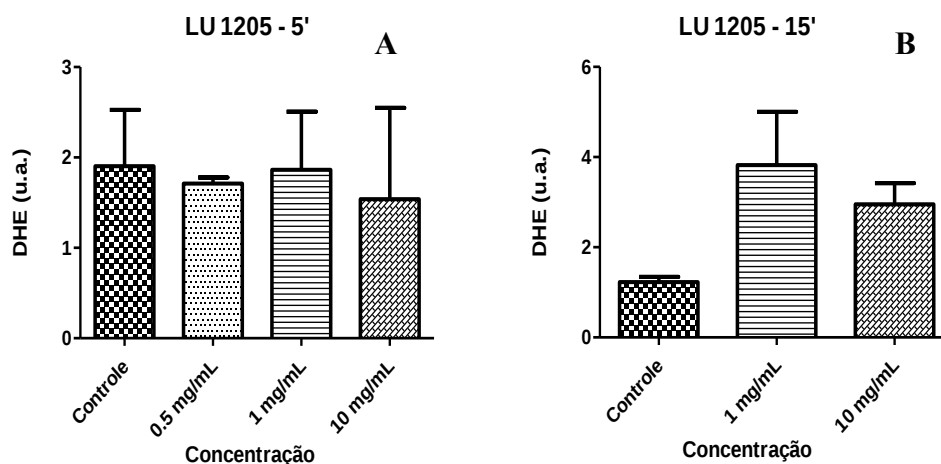


Figura 30 - Gráfico da atividade antioxidante da subfração PP4 em cultura de células do melanoma linhagem LU 1205. A – 5 min; B – 15 min.

Wat *et al.* (1980) observaram que extratos de espécies de *Bidens* e outras espécies da família Asteraceae perdiam atividade citotóxica diante de fungos, bactérias e larvas de insetos, evidenciando a relação entre a atividade citotóxica e a presença de compostos poliacetilenos.

Os ácidos clorogênicos 3,4- e 4,5-dicafeoil-quínicos isolados de diversas partes de *Bidens pilosa* apresentaram potencial antioxidante utilizando o ensaio com DPPH (Gilbert *et al* 2013) confirmando os nossos resultados de atividade anti-radicalar para CGAs.

Ensaio *in vitro* para determinar a inibição da produção do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) com linhagens de melanoma e melanócitos utilizando os CGAs e poliacetilenos não foram relatados na literatura.

4.7 Estudos Fitoquímicos

4.7.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD) das frações PFFR3.3 e PP4

A subfração PFFR3.3, componente majoritário de PFFR3, com atividade anti-radicalar (DPPH) e PP4 com atividade antifúngica (esporos dos fungos do gênero *Cladosporium*) analisadas por CLAE-DAD forneceram perfis cromatográficos e dados de espectros na região do UV e para a

determinação do grau de pureza que permitiram selecioná-las para realizar os ensaios *in vitro* com células das linhagens de melanoma e melanócitos e avançar no estudo fitoquímico.

Os resultados das análises preliminares, triagem fitoquímica de PFFR3.3 (CCD, sílica gel BAW, NP – PEG) mostraram que essa subfração de fator de retenção $R_f=0.7$ e dados de CLAE-DAE com abundância relativa 81.5487% e tempo de retenção $T_r=4.093$ min, no comprimento de onda $\lambda=325$ nm é um polifenol (**Figura 31, A**).

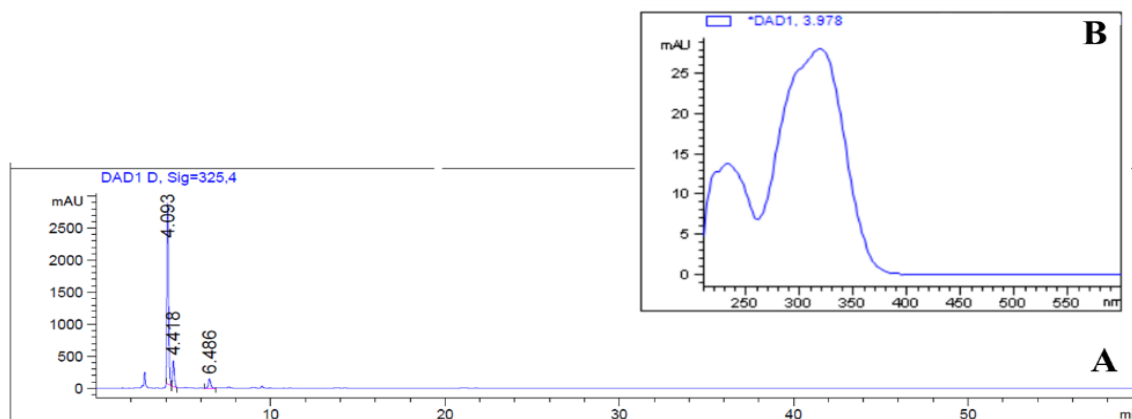


Figura 31 - Perfil cromatográfico (HPLC – DAD) da subfração PFFR3.3. **A**- Cromatograma registrado no comprimento de onda $\lambda=325$ nm **B**- Espectro de UV.

O espectro na região do UV (**Figura 31, B**) mostra bandas de absorção de maior intensidade, nos comprimentos de onda, ($\lambda_{max} = 298$ e 325 nm), características de derivados de ácido cinâmico, como o ácido caféico e ácido ferúlico (Conkerton & Chapttal 1983) e tempo de retenção semelhante ao do padrão de ácido clorogênico (Aldrich), nas mesmas condições de análises. Estes resultados confirmam que o componente majoritário na subfração PFFR3.3 é o 5-O-(E)-cafeoilquínico (5-CGA, **Figura 32**).

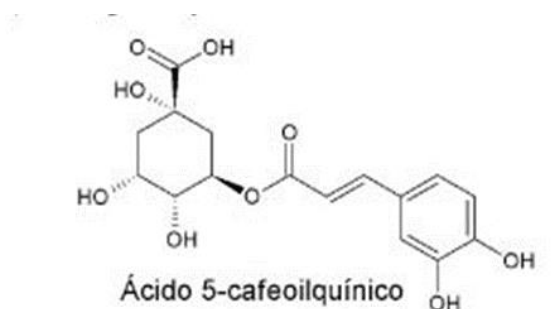


Figura 32 - Estrutura química do ácido 5-O-(E)-cafeoilquínico.

Em trabalho realizado por Freire *et al.* 2018 com *Struthanthus marginatus* (Lorantaceae) com forte potencial anti-radicalar foram identificados o ácido 3-trans-cafeoilquínico (3-trans-CGA) e os isômeros 4-trans-CGA e 5-trans-CGA por cromatografia a gás (GC-EM) e por LC- DAD/EM/EM. Neste trabalho foram publicados os dados espectrais na região do ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 298 \text{ nm}$ e 325 nm) os quais mostraram as mesmas bandas de absorção observadas no espectro de UV para o componente majoritário de PFFR3.3 identificado como o ácido 5-O-(E)-cafeoilquínico.

Os componentes de PFFR3.2 e PFFR31 que também foram ativos (DPPH, Item 4.3.1) são misturas mais complexas de derivados do ácido cinâmico, conforme os dados dos espectros na região do UV obtidos por CLAE-DAD (dados não mostrados).

A subfração PP4, uma mistura, concentrou os compostos com atividade antifúngica e após purificação em CLAE semi-preparativo (PP4.1-PP4.5) e análises por CLAE-DAD em escala analítica forneceu PP4.1 com maior abundância relativa (100%) e tempo de retenção $T_r = 49.846 \text{ min}$ registrado no comprimento de onda $\lambda = 325 \text{ nm}$ (**Figura 33**). PP4. 1 não é o responsável pela atividade antifúngica como mostrado na figura 24.

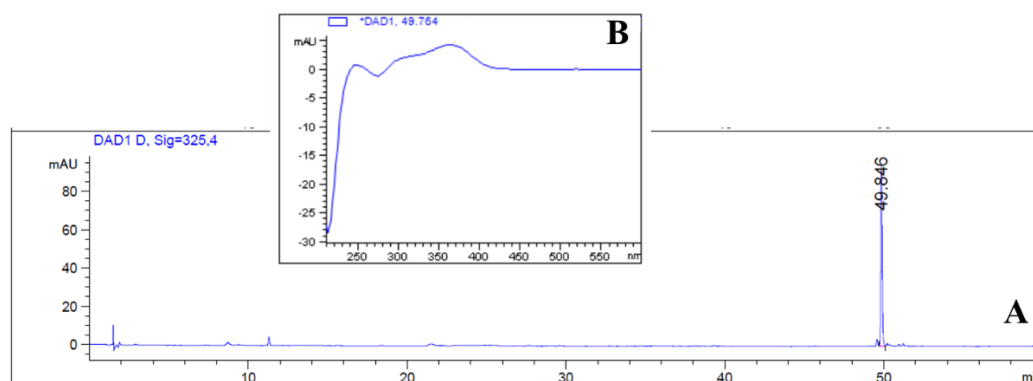


Figura 33 - Perfil cromatográfico (HPLC-DAD) da subfração PP4.1 **A**- Cromatograma em CLAE no comprimento de onda $\lambda = 325 \text{ nm}$. **B**- Espectro de UV.

4.7.2 Cromatografia líquida acoplada com espectrometria na região do ultravioleta e de massas (LC- DAD/MS/MS/ESI⁺)

A PP4 foi submetida a análise em LC-DAD/MS/MS/ESI⁺ (Item 3.8.4). Os perfis cromatográficos registrados nos comprimentos de onda $\lambda_{\text{máx.}} = 250 \text{ nm}$ e 315 nm e o cromatograma de íons totais estão representados na **Figura 34**.

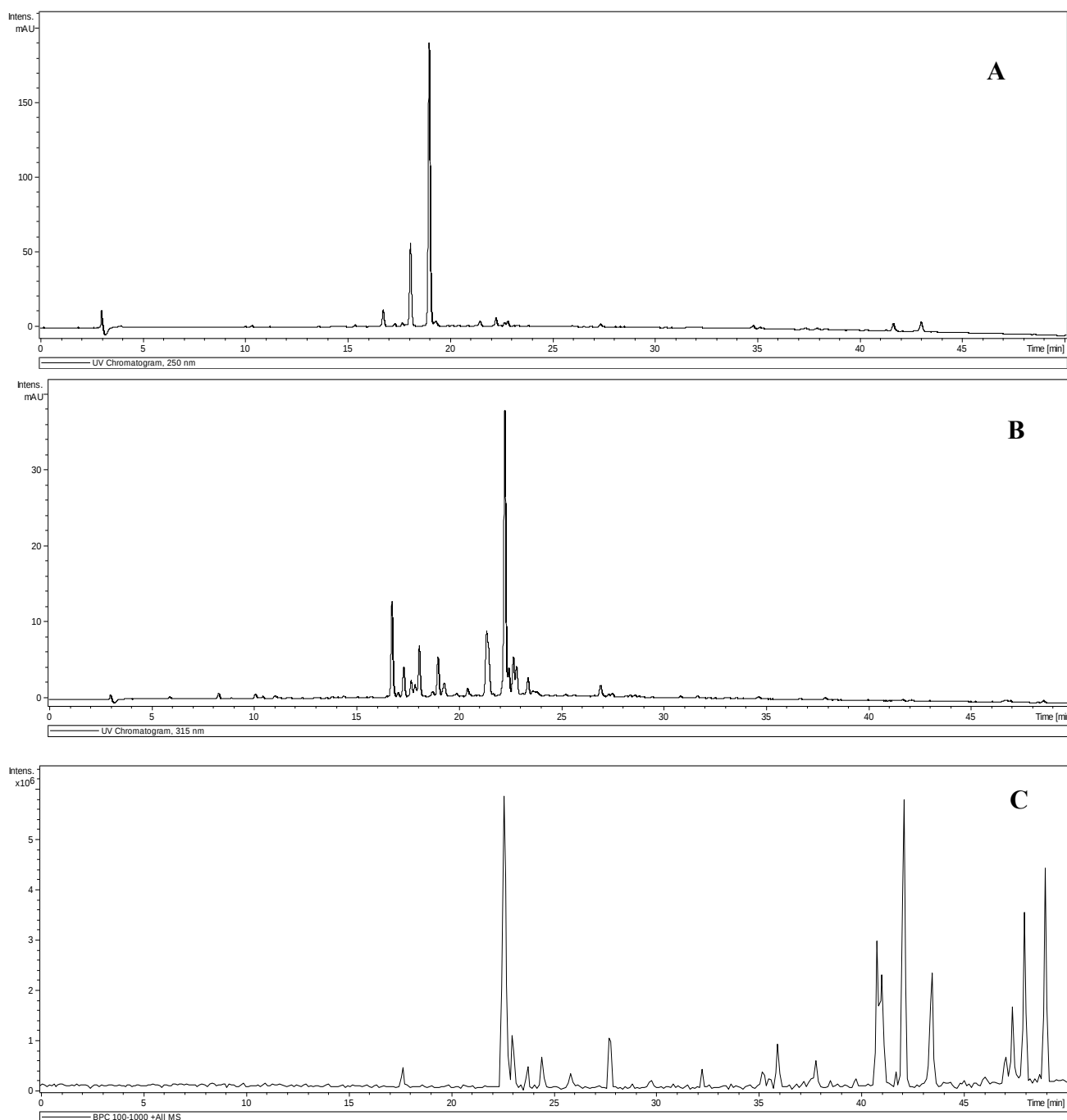


Figura 34 - Perfis cromatográficos (LC-DAD/MS/MS/ESI⁺) da subfração PP4. **A** - $\lambda = 254$ nm, **B** - $\lambda = 315$ nm, **C** - Cromatograma de íons totais (TIC).

Os perfis cromatográficos de PP4 nos comprimentos de onda λ max. de 254 nm e 315 nm e os de íons totais (TIC) Figura 34, confirmam que PP4 é uma mistura de compostos com dados espectrais diferentes conforme o comprimento de onda máximo que foi registrado, os dados de abundância relativa e os dados do cromatograma de íons totais. A quantidade de dados gerados dessas análises e os dados bioautográficos de PP4 (Item 4.5.1) e PP4.1 (Item 4.5.2) mostraram que os

compostos com atividade antifúngica são os mais polares, com fator de retenção ($R_f = 0,2; 0,33; 0,62$). Todos esses dados gerados nos permitiram selecionar os dois picos cromatográficos nos tempos de retenção de $T_r = 17,6$ min e $T_r = 22,26$ min (**Figura 35**).

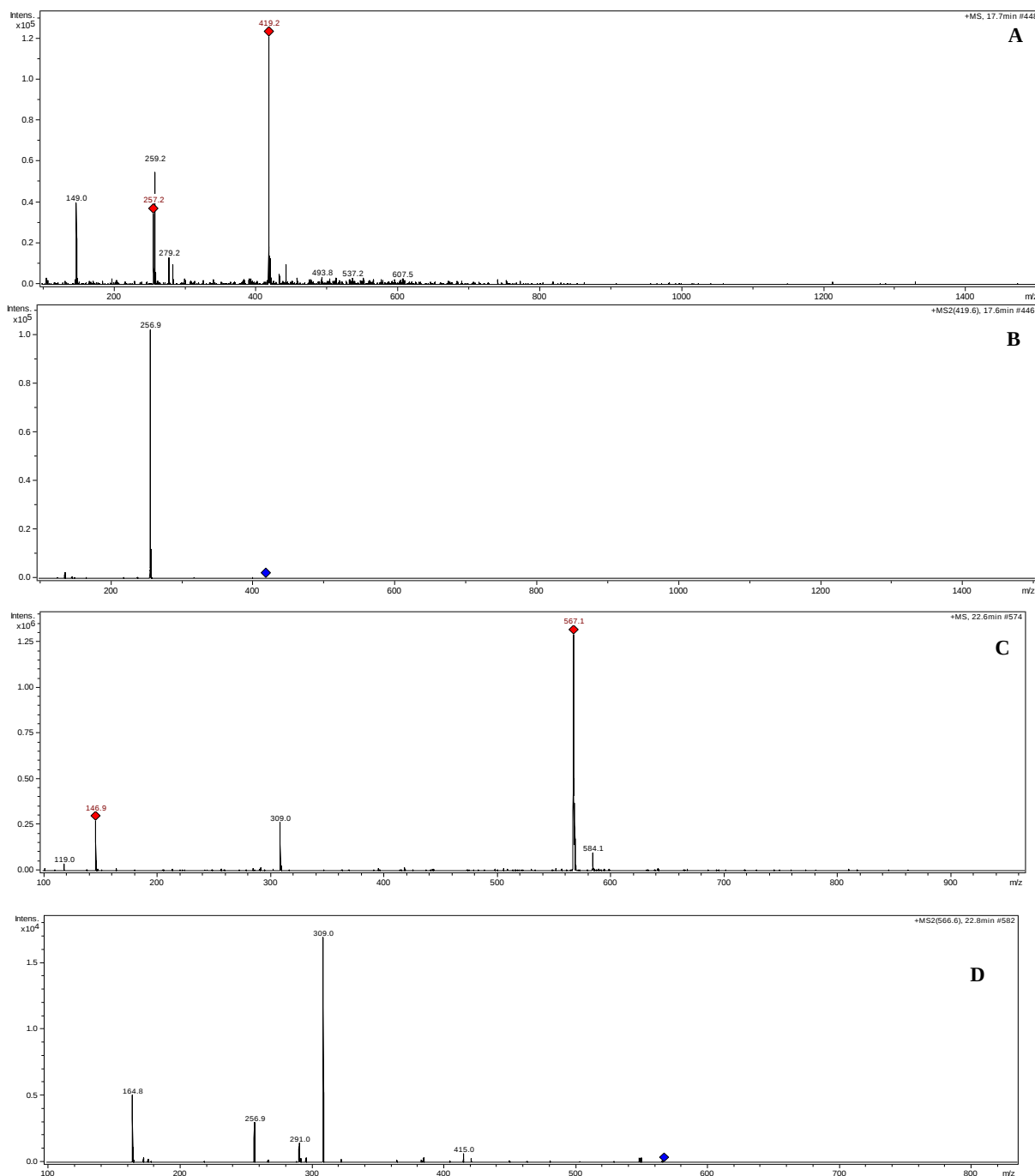


Figura 35 - Dados das análises LC-DAD/MS/MS/ ESI⁺ dos picos cromatográficos com $T_r = 17.7$ min. e $T_r = 22.6$ min. **A** - Dados do ion de $m/z [M+H]^+ = 419$ Da. **B** – Espectro de massas MS² 419 Da $T_r = 17.7$ min, **C**- Dados do ion de $m/z [M+H]^+ = 567$ Da $T_r = 22.6$ min. **D** – Espectro de massas MS² 567 Da..

Os dados de LC/MS/MS (Figura 35) $m/z=419$ Da. e $Tr= 17.7$ min com os dados de HSQC e HMBC com massa molecular ($M= 418$ Da.) foi atribuído à fórmula molecular $C_{22}H_{27}O_8$. O espectro MS^2 (Figura 35, B), apresentou o íon fragmento com 100% de abundância relativa de $m/z= 257$ Da. $[256+H]$ e fórmula molecular $C_{16}H_{17}O_3$ compatível para a perda de uma unidade de hexose (419 Da. – 162). Com base em dados de HSQC e HMBC (**ANEXOS 1 e 2**), foi proposta a estrutura do poliacetileno glicosilado (**Figura 36**).

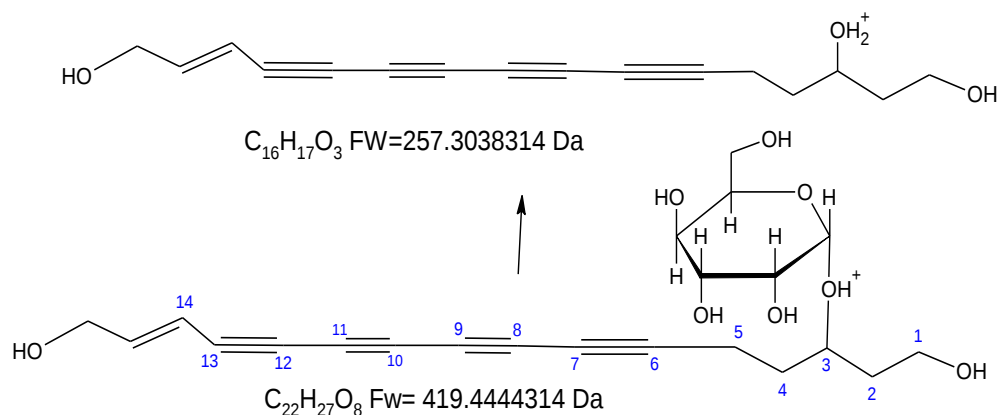


Figura 36 - Estrutura proposta para o poliacetileno presente em PP4 com $m/z [M+H]^+ = 419$ Da e $Tr = 17.7$ min. Fórmula molecular $C_{22}H_{27}O_8$ ($M = 418$ Da). Íon fragmento $m/z=257$ Da (100%) $[M^+ - 162]$.

O pico cromatográfico no $Tr= 22.6$ min (Figura 35 C e D) e $m/z [M+H]^+ = 567$ Da. e fórmula molecular $C_{31}H_{34}O_{10}$ ($M= 566$ Da) foi atribuída ao poliacetileno com estrutura molecular proposta na **Figura 37**. O espectro de MS^2 o íon fragmento de $m/z= 309$ $[308+H]$ com abundância relativa de 100% e fórmula molecular $C_{15}H_{16}O_7$.

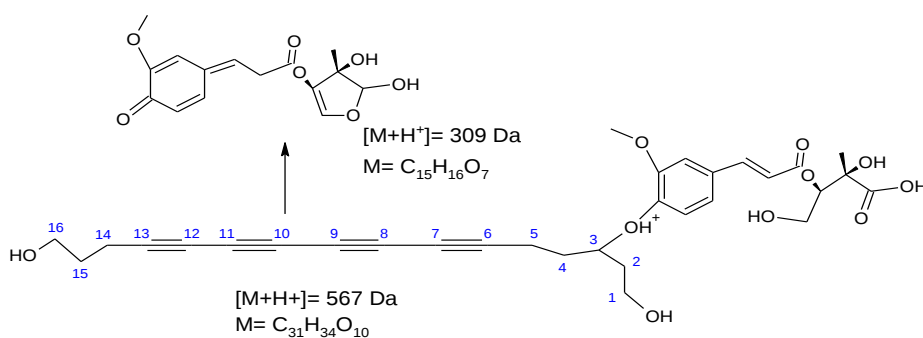


Figura 37 - Estrutura proposta para o poliacetileno presente em PP4 com $m/z [M+H]^+ = 567$ Da. e $Tr = 22.6$ min $C_{31}H_{34}O_{10}$.

4.8 Análises da subfração FFR4 com atividade anti-radicalar (DPPH)

A subfração FFR4 da coluna de fase reversa mostrou um grau de pureza de 31,1841% em Tr: 21.509 min e 24.4523% em Tr: 37.337 min no comprimento de onda $\lambda=352$ nm (**Figura 38**).

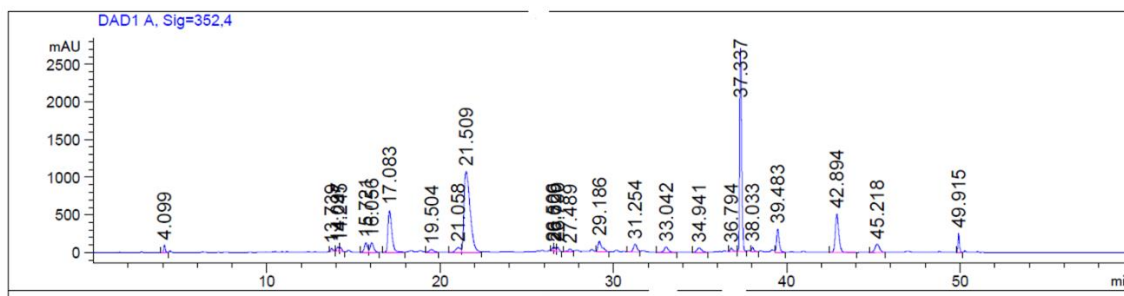


Figura 38 - Perfil cromatográfico (HPLC – DAD) da subfração FFR4 no comprimento de onda $\lambda=352$ nm.

Quando purificada por CLAE semi preparativa como descrito no item 3.8.2 a subfração FFR4 apresentou cinco subfrações (FFR4.1 – FFR4.5), dessas, foi selecionada a subfração de (FFR4.3) para análise de $^1\text{HRMN}$ pois apresentou grau de pureza de 100% no Tr = 20.615 min no comprimento de onda $\lambda=254$ nm (**Figura 39**).

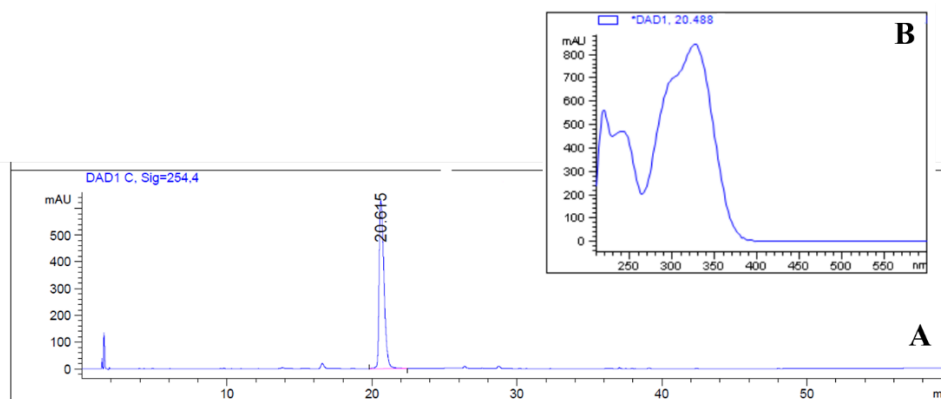


Figura 39 - Perfil cromatográfico (HPLC – DAD) da subfração FFR4 no comprimento de onda $\lambda=352$ nm.

Com base no espectro de UV e confirmado pela análise de $^1\text{HRMN}$ (ANEXO 3), a subfração FFR4.3 foi identificada como sendo o ácido 3,4 – dicafeoilquínico (**Figura 40**).

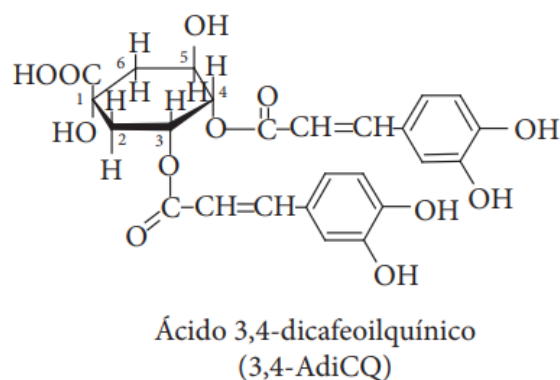


Figura 40 - Estrutura química do ácido 3,4 – dicafeoilquínico.

Santos *et al.* 2015 confirmou a ação antioxidante do ácido clorogênico obtido de extratos obtidos de flores de *Calendula officinalis* L, uma espécie do grupo Asteraceae.

Thien *et al.* (2017), em extratos de folhas de *Bidens pilosa* isolou dois novos, o 4-O-cafeoil-2-C-metil-D-eritronato de metila e o 4-O-metil-kanonina e sete compostos conhecidos sendo estes o 3-O-cafeoil-2-C-metil-D-eritrono-1,4-lactona, 3,4-di-O-cafeoilquinato de metila, 4,5-di-O-cafeoilquinato de metila, 5-O-E-cafeoilquinato de metila, metil-3,5-di-O-cafeoilquinato, jaceidina e centaureidina.

B. pilosa é utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas enfermidades tais como inflamações, problemas digestivos, infecções, cânceres, feridas, além de apresentar ação hepatoprotetora, antimalárica, anti-hiperglicêmica, anti-hipertensiva, antileucêmica e antibacteriana. Em seus constituintes químicos estão presentes flavonoides, poliacetilenos, ácidos *p*-cumarícos e cafeioquinícos e sesquiterpenos (Bartolome *et al.* 2013, Bastos *et al.* 2016).

5. Considerações Finais

O extrato etanólico de folhas de *Bidens segetum* (EEBs) foi preparado com folhas frescas, congeladas e liofilizadas e são ricos em compostos fenólicos e poliacetilenos como já mostrado neste trabalho e relatado na literatura.

O EEBs constitui uma matriz de alta complexidade, o que tornou difícil o fracionamento e a purificação dos seus componentes para identificação e ensaios das atividades propostas.

Considerando os aspectos citados acima, duas subfrações PFFR3.3 e PP4 foram obtidas das frações FAcOEt que foram obtidas por meio de extratos distintos e concentrou os compostos com as duas atividades sendo o nosso material de estudo principal para avançarmos e atingirmos os objetivos propostos, os quais foram bem definidos: isolar; purificar e identificar os compostos com atividade antioxidante e antifúngica.

A forte atividade antifúngica de PP4 estão nos compostos mais polares dessa subfração e estamos atribuindo aos poliacetilenos 1 e 2. A PP4.1 isolada da parte menos polar de PP4 e grau de pureza 100% não foi ativa. Nos ensaios com as linhagens de células *in vitro* de melanócitos e melanomas humano, que avalia o potencial antioxidante PP4 não foi ativa, o que era de se esperar porque nos ensaios com DPPH não se observou sequestro do radical livre DPPH.

A forte atividade anti-radicalar do 5-CGA, componente majoritário de PFFR3.3 com potencial antioxidante, não indicou que esse polifenol seja um inibidor do ânion superóxido para as linhagens de células de melanócitos e melanoma humano.

Conclui-se que, as folhas de *Bidens segetum* são ricas em poliacetilenos e compostos fenólicos. Os compostos detectados têm forte potencial anti-radicalar e antifúngico e o seu estudo continua sendo desafiador e o estudo da espécie *B. segetum* torna-se mais interessante para novos estudos fitoquímicos e de atividade biológica que justifique a sua característica de planta invasora.

6. Referências Bibliográfica

- Al Matar, M. & E.A. Makky.** 2016. *Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches. 3 Biotech, 6:1-8.
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P. D. L., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M.** 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S.** 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food chemistry, 99(1): 191-203.
- Bartolome, A.P., Villaseñor, I.M., Yang & W.-C.** 2013. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): botanical properties, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. Evid. Based Complement. Altern. Med. 2013, 340215.
- Bastos, C. C. C., de Ávila, P. H. M., dos Santos Filho, E. X., de Ávila, R. I., Batista, A. C., Fonseca, S. G. & Valadares, M. C.** 2016. Use of *Bidens pilosa* L. (Asteraceae) and *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) to treat intestinal mucositis in mice: toxico-pharmacological evaluations. Toxicology reports, 3: 279-287.
- Boveris, A. Bustamante, J., Bersier, G., Romero, M. & Badin, R.A.** 2000. Nitric oxide production and mitochondrial dysfunction during rat thymocyte apoptosis. Arch Biochem. Biophys 239:247.
- Brandão, M. G. L.** 1997. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. Journal of Ethnopharmacology. (Elsevier) 57: 131-138.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T.** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology, 28(1): 25-30.
- Bravo, L.** 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56:317-33.
- Briskin, D.P.** 2000. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. Plant Physiology, 124:507-514.
- Castro, L. & Freenam, B.A.** 2001. Reactive oxygen species in human health and disease. Nutrition, 17(2): 163–165.
- Chang, S.L., Chang, C.L., Chiang, Y.M., Hsieh, R.H., Tzeng, C.R., Wu, T.K., Sytwu, H.K., Shyur, L.F. & Yang, W.C.** 2004. Polyacetylenic compounds and butanol fraction from *Bidens pilosa* can modulate the differentiation of helper T cells and prevent autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. Planta Medica, 70(11) :1045-1051.
- Centa, A.** 2014. Citotoxicidade e atividade antitumoral de sais do galato de dodecila. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
- Conkerton, E. J., & Chapital, D. C.** 1983. High-performance liquid chromatography separation of the cis-trans isomers of cinnamic acid derivatives: Ultraviolet and electrochemical detection. Journal of Chromatography A, 281, 326-329.

- Fabri, R. L., Nogueira, M. S., Dutra, L. B., Bouzada, M. L. M., & Scio, E.** 2011. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 13(2): 183-189.
- Felipe, L. O., & Bicas, J. L.** 2017. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química Nova na Esc*, 39(2): 120-30.
- Fenner, R.; Betti, A. H.; Mentz, L. A.; Rates, S. M. K.** 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* v.42.
- Ferreira, A. L. A., & Matsubara, L. S.** 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da associação médica brasileira*, 43(1): 61-68.
- Figueiredo, L. C., Cordeiro, L. N., Arruda, A. P., Carvalho, M. D. F., Ribeiro, E. M., & Coutinho, H. D. M.** 2003. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. *Rev Bras Cancerol*, 49(3):179-83.
- Freire, S. M. de F., Silva, R. V., Morais, T. M. F., Ribeiro, R. M., Silva, S. do N., Cartágenes, M. D. S. de S., & da Rocha Borges, M. O.** 2018. Protective effect of *Struthanthus marginatus* on ethanol-induced gastric damage in mice. *Pharmacognosy Research*, 10(2): 143.
- Fumagali, E., Gonçalves, R. A. C., Machado, M. F. P. S., Vidoti, G. J., & Oliveira, A. J. B. D.** 2008. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4), 627-641.
- García, A. A., & Carril, E. P. U.** 2009. Metabolismo secundário de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
- Gilbert, B.** 2013. Produtos naturais industrializáveis da Amazônia. *Revista Fitos*, 2(03): 30-38.
- Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P.** 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*, 30(2): 374.
- Gottlieb, O. R., & Borin, M. R. M. B.** 2012. Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma. *Quim Nova*, 35: 2105-2114.
- Harborne, J. B.** 1998. *Methods in plant biochemistry. Plant phenolics*. London: Academic, v.1.
- Homans, A. L., & Fuchs, A.** 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of chromatography*, 51: 327-329.
- Hoog, G. S. & Garro, J.** 1995. *Atlas of Clinical Fungi*. CBS, Spain.
- Horiuchi, M., Wachi, H., & Seyama, Y.** 2010. Effects of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff on experimental gastric lesion. *Journal of natural medicines*, 64(4):430-435.
- Jaiswal, R., Kiprotich, J., & Kuhnert, N.** 2011. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. *Phytochemistry*, 72(8): 781-790.
- Joly, A. B.** 1998. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 12 ed. Companhia Editora Nacional, São Paulo. 634 p.
- Julio, P. G. dos S. & Oliveira, D. M. T.** 2009. Morfoanatomia comparada e ontogênese do pericarpo de *Bidens gardneri* Baker e *B. pilosa* L. (Asteraceae). *Revista Brasil Botânica*, 32:1, 109-116.
- Junior, V. F. V., Pinto, A. C., & Maciel, M. A. M.** 2005. Plantas medicinais: cura segura. *Química nova*, 28:3, 519-528.

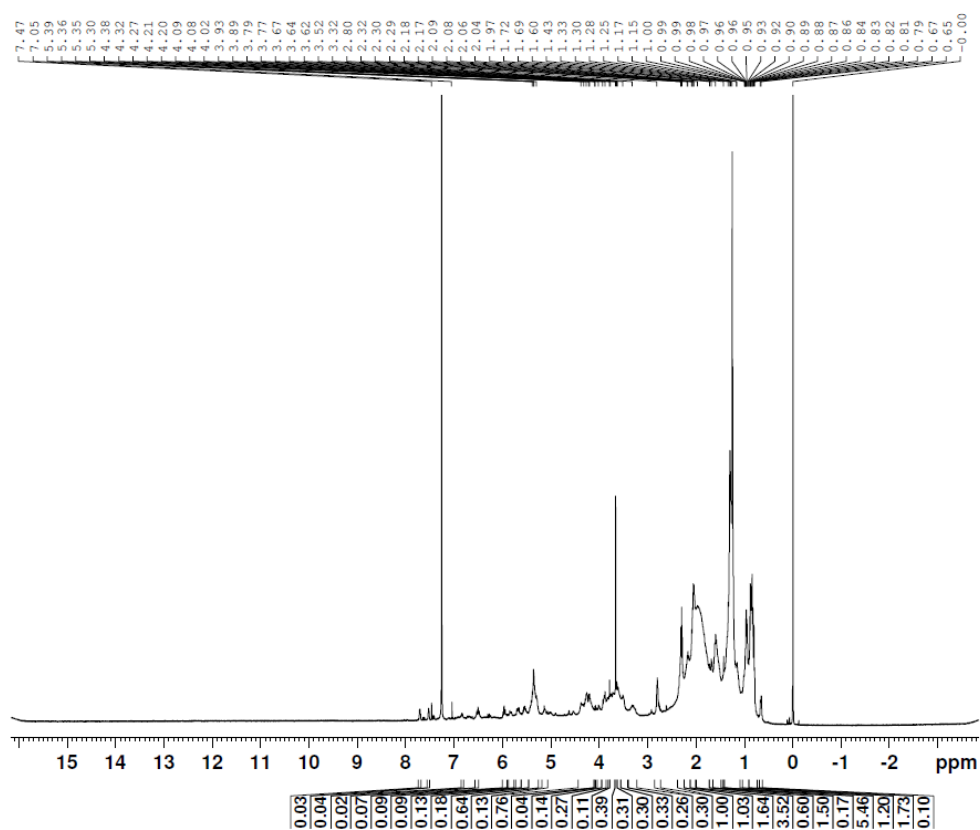
- Junior, V. F. D.** 2008. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev. bras. farmacogn*, 18(2), 308-313.
- Kwiecinski, M. R.** 2007. Avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 134f.
- Kwiecinski, M. R., Felipe, K. B., Schoenfelder, T., de Lemos Wiese, L. P., Rossi, M. H., Gonzalez, E. & Pedrosa, R. C.** 2008. Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 117(1): 69-75.
- Kwiecinski, M. R.** 2013. Atividade antitumoral de extratos de *Bidens pilosa* Linné ricos em poliacetilenos e de juglona associada ao ascorbato. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, 143f.
- Leis, S. M.** 2008. Biologia reprodutiva de *Bidens segetum* Mart. ex Colla (Heliantheae, Asteraceae). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 45f.
- Lima, C.P.; Cunico, M. M.; Miguel, O. G. & Miguel, M. D.** 2011. Efeito dos extratos de duas plantas medicinais do gênero *Bidens* sobre o crescimento de plântulas de *Lactuca sativa* L. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 32: 83-87.
- Lima, F. O., & Bezerra, A. S.** 2012. Flavonoides e radicais livres. *Disciplinarum Scientia| Naturais e Tecnológicas*, 13(1): 111-124.
- Lorenzi, H.** 1994. Manual de identificação e controle de plantas daninhas. 4 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Lorenzi, H.** 2000. Plantas Daninhas do Brasil – Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas. 3ª edição, Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP.
- Lucchetti, L., Teixeira, D. F., Barbi, N. S., & Silva, A. J.** 2009. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). *Revista Fitos*, 4(2): 60-70.
- Machado, H.; Nagem, T. J.; Peters, V. M.; Fonseca, C. S.; Oliveira, T. T.** 2008. Flavonoides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora* 27: 33-39.
- Maria, C. A. B., & Moreira, R. F. A.** 2004. Métodos para análise de ácido clorogênico. *Química Nova*, 27(4): 586-592.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M.** 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17(6): 271-278.
- Massaro, R. R.** 2014. Efeito do resveratrol e do 2-Metoxiestradiol em linhagens de melanoma humano em modelos de monocamada e de pele reconstituída Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo.
- Mendes, M. A. S., Silva, V. L., Dianese, J. C. Ferreira, M. A. S. V., Santos, C. E. N., Gomes Neto, E., Urban, A. F. & Castro, C.** 1998. Fungos em plantas no Brasil. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CENARGEN. 569 p.
- Montanari, C. A., & Bolzani, V. D. S.** 2001. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*, 105-111.

- Nakajima, J. N.** 2000. A família Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. 2000. 467f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Nascimento, A. L., Raggi, L., Young, M. C. M., & Moreno, P. R.** 2015. Chemical characterization of the volatile compounds of the flowers of *Bidens segetum* Martius ex Colla (Asteraceae). Journal of Essential Oil Research, 27(1): 70-75.
- Niero, E. L. D. O.** 2010. Efeitos de ácido cinâmico sobre melanócitos e células derivadas de melanomas humanos: avaliação do seu potencial antitumoral e de proteção contra danos celulares causados por radiação ultravioleta Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo.
- Nowill, A.E., Queiroga, C. L., Franchi Junior, G. C. & Grombone, M. T. G.** 2007. Process for obtaining an antineoplastic phytotherapeutic compound from an extract of *Bidens alba*.
- Oliveira, G. L. S.** 2015. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, 17(1): 36-44.
- Oliveira, D. M., & Bastos, D. H. M.** 2011. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. Quimica Nova, 34(6): 1051-1056.
- Pedrosa, F. P. D. C.** 2012. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas pertencentes à CPMA-Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA-UNICAMP.
- Pereira, R. J., & das Graças Cardoso, M.** 2012. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. Journal of biotechnology and biodiversity, 3(4).
- Pinto, A. C., Silva, D. H. S., Bolzani, V. D. S., Lopes, N. P., & Epifanio, R. D. A.** 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Química nova, 45-61.
- Rates, S. M. K.** 2001. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. Revista Brasileira de Farmacognosia, 11(2): 57-69.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E.** 2001. Biologia vegetal. 6 ed. Guanabara Koogan SA.
- Raven, P. H.; Evert, R. F. & Eichhorn, S. E.** 2007. Biologia vegetal. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 830p.
- Rezende, H. A. D., & Cocco, M. I. M.** 2002. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. Revista da Escola de Enfermagem da USP, 36(3): 282-8.
- Rodrigues, E. D.** 2010. Estratégias de aumento de eficiência da análise de Produtos Naturais por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo.
- Rodrigues, V. E. G. & Carvalho de, D. A.** 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. Ciências Agrotécnica 1: 102-123.
- Santana, M. D. O., de Sá, J. S., Neves, A. F., Figueredo, P. G. J., & Viana, J. A.** 2018. O poder das plantas medicinais: uma análise histórica e contemporânea sobre a fitoterapia na visão de idosas. Multidebates, 2(2): 10-27.
- Santos, R.I.** 2004. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petronick (eds.). Farmacognosia - da planta ao medicamento, 5ed. Florianópolis: Editora da UFSC & Editora da UFRS, p. 403-434.

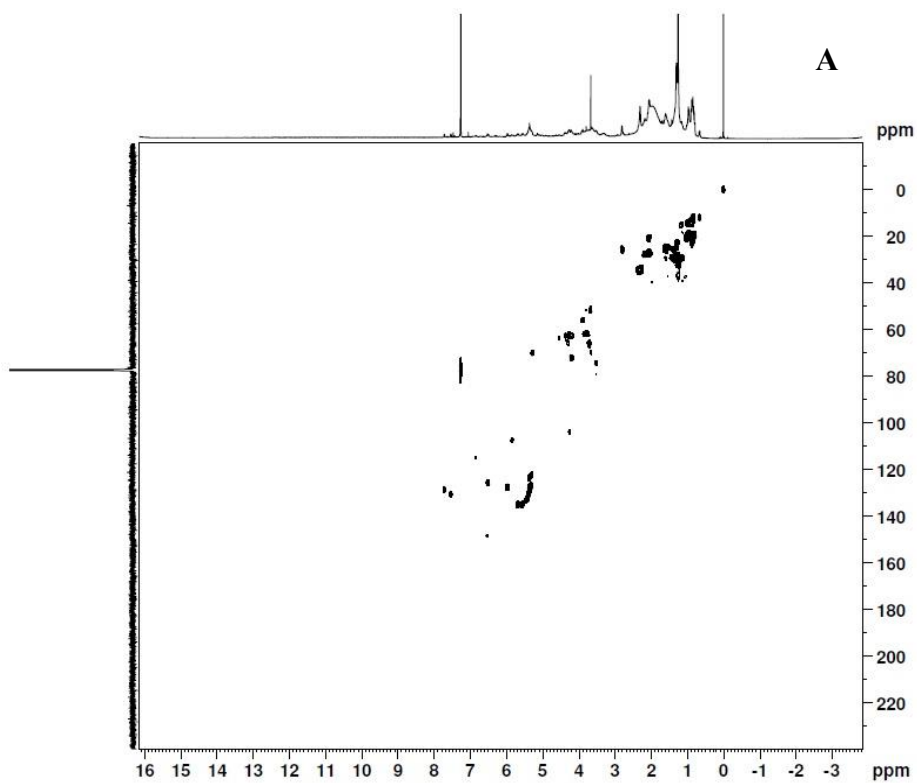
- Santos, L. M. O.** 2015. Análise de amostras de flores de Calêndula (*Calendula officinalis* L., Asteraceae) comercializadas na grande Curitiba. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 36(2):251-258.
- Santos, J. B., & Cury, J. P.** 2011. Picão-preto: uma planta daninha especial em solos tropicais. *Planta daninha*, 29(special n).
- Scherer, R., Wagner, R., Duarte, M. C. T., & Godoy, H. T.** 2009. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*.
- Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., & Cruz, M. E. D. S.** 2000. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Floresta*, 30 (1/2).
- Silva, Bretan da. D.** 2009. Atividade antialérgica e estudos químicos das espécies *Bidens gardneri* Bak. e *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch. Bip. (Asteraceae). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 425p.
- Silva, M. L. C., Costa, R. S., Santana, A. dos S., & Koblitz, M. G. B.** 2010. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3): 669-682.
- Silveira, C. S.; Martins, F. O.; Costa, C. dos S.; Romanos, M. T. V. Kaplan, M. A. C. & Menezes, F. de S.** 2009. In vitro cytotoxic, antioxidant and antiviral effects of *Pterocaulon alopecuroides* and *Bidens segetum* extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19:343-348.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A. & Petrovick, P. R.** 2007. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p.
- Souza, V. C. & Lorenzi, H.** 2005. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 1 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.
- Souza, V. C. & Lorenzi, H.** 2012. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil. baseado em APG III. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Sucupira, N. R., da Silva, A. B., Pereira, G., & da Costa, J. N.** 2015. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. *Journal of Health Sciences*, 14(4).
- Tagami, O. K., Gasparin, D. G., Schwan-Estrada, K. R. F., Cruz, M. E. da S., Itako, A. T., Júnior, J. B.T. & Stangarlin, J. R.** 2009. Fungitoxidade de *Bidens pilosa*, *Thymus vulgaris*, *Lippia alba* e *Rosmarinus officinalis* no desenvolvimento in vitro de fungos fitopatogênicos. *Semina: Ciências Agrárias*, 30(2).
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2006. Fisiologia vegetal. Artmed, Porto Alegre.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M.** 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food chemistry*, 90(3), 333-340.
- Thien, T. V. N., Huynh, V. H. T., Vo, L. K. T., Tran, N. T., Luong, T. M., Le, T. H., & That, Q. T.** 2017. Two new compounds and α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Bidens pilosa* L. *Phytochemistry letters*, 20: 119-122.
- Verdi, L. G.; Brighente, I. M.C. & Pizzolatti, M. G.** 2005. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*, 28(1): 85-94.

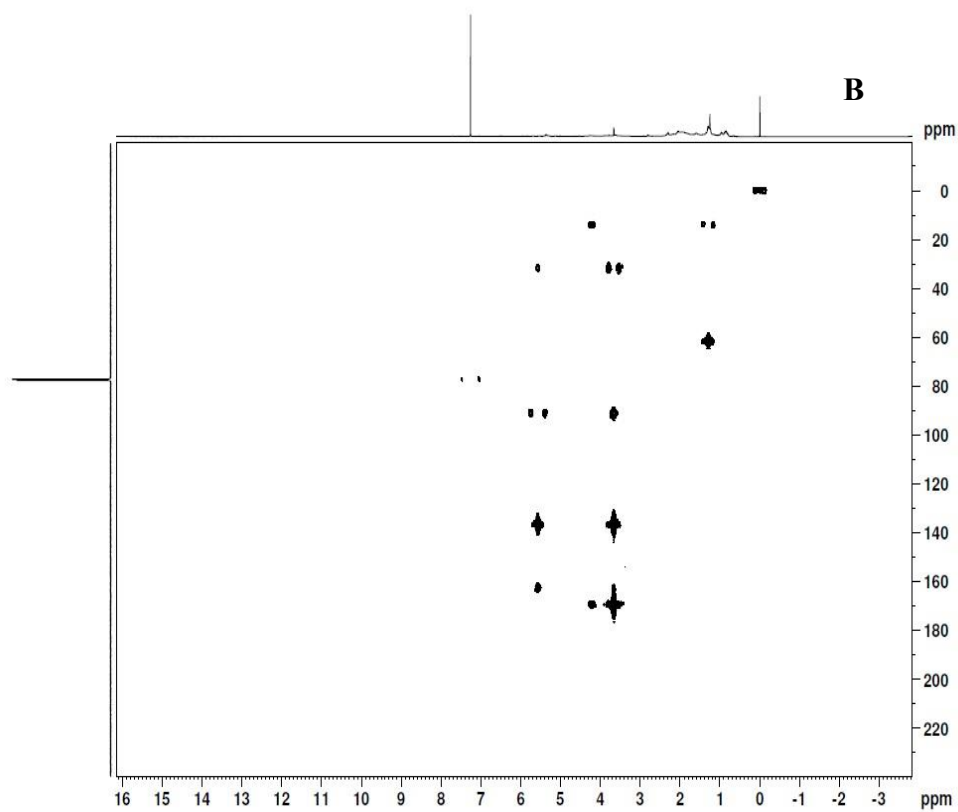
- Venkateswarlu, S., Panchagnula, G. K., & Subbaraju, G. V.** 2004. Synthesis and antioxidative activity of 3', 4', 6, 7-tetrahydroxyaurone, a metabolite of *Bidens frondosa*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 68(10), 2183-2185.
- Vicentino, A. R., & Menezes, F. D. S.** 2007. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. Rev Bras Farmacognosia, 17(3): 384-387.
- Viegas Jr, C., Bolzani, V. D. S., & Barreiro, E. J.** 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. Química Nova, 326-337.
- Yano, S.; Koyabashi, K; Kato, K.** 2003. Intrabronchial lesion due to *Cladosporium phaerospermum* in a healthy, non-asthmatic woman. Mycoses 46: 330–332.
- Wat, C. K.; Johns, T. & Towers, G. H. N.** 1980. Phototoxic and antibiotic activities of plants of the Asteraceae used in folk medicine. J. Ethnopharmacol. 2(3):279-290.
- Zacaroni, L. M., Cardoso, M. G., Souza, P. E., Pimentel, F. A., Guimaraes, L. D. L., & Salgado, A. P. S. P.** 2009. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em periódico indexado (ALICE).

7. ANEXOS

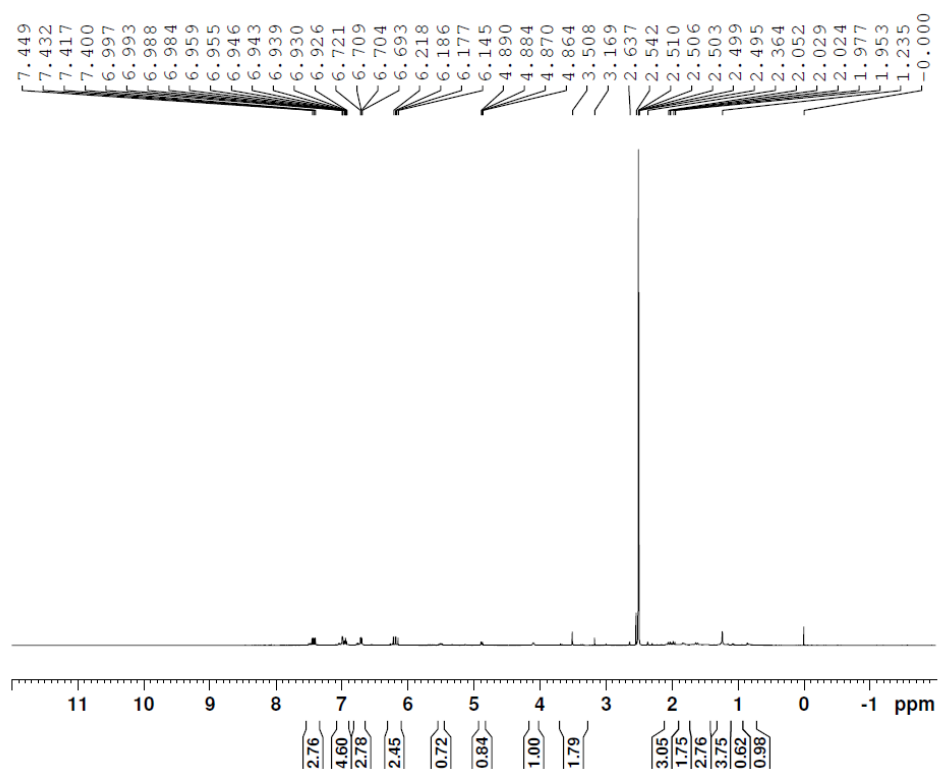


Anexo 1 - Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, CHCl_3) da subfração PP4.





Anexo 2 - Dados de espectros bidimensionais (500 MHz, CHCl_3) da subfração PP4. **A** - HSQC; **B**- HMBC



Anexo 3 - Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, DMSO) da subfração FFR4.3 identificada como sendo o ácido 3,4 – dicafeoilquínico.