UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Thalita Dias de Oliveira

Atividade antiproliferativa do extrato do ápice foliar de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae)

Juiz de Fora
2024

Thalita Dias de Oliveira

Atividade antiproliferativa do extrato do ápice foliar de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae)

Defesa de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito à obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração: Produtos naturais e sintéticos ativos.

Orientador: Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho

Co-Orientador: Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares

Juiz de Fora

2024

Dias de Oliveira , Thalita.
Atividade antiproliferativa do extrato do ápice foliar de Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae) / Thalita Dias de Oliveira . -- 2024.
67 f.

Orientador: Ademar Alves da Silva Filho
Coorientador: Guilherme Diniz Tavares
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Câncer de pele. 2. Baccharis dracunculifolia. 3. atividade antiproliferativa. I. Alves da Silva Filho, Ademar, orient. II. Diniz Tavares, Guilherme, coorient. III. Título.

Thalita Dias de Oliveira

Atividade antiproliferativa do extrato do ápice foliar de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do titulo de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 29 de fevereiro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ademar Alves da Silva Filho -
Orientador Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Guilherme Diniz Tavares
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. João Paulo Barreto de Sousa
Universidade de Brasília

Juiz de Fora,
09/02/2024.

Documento assinado eletronicamente por **Ademar Alves da Silva Filho**, **Professor(a)**, em 29/02/2024, às 16:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **João Paulo B Sousa**, **Usuário Externo**, em 29/02/2024, às 19:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Maria Pinto Vilela**, **Professor(a)**, em 04/03/2024, às 10:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Diniz Tavares**, **Professor(a)**, em 04/03/2024, às 11:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-U f (www2.u f.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1702793** e o código CRC **2084C979**.

Nunca é tarde para mudar a direção da sua vida.
Sempre haverá uma nova rota ou uma nova chance de recomeço.
- Santa Rita de Cássia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que me concedeu sabedoria e paciência para viver esse período desafiador.

Aos meus amados pais, Ana e Manoel, e ao meu padrinho Ocimar, que foram fonte de perseverança até aqui.

Aos meus amigos Leivis, Michel, Cristney e Luana que sempre me incentivaram e viveram comigo de perto as batalhas desse tempo. Gratidão!

Às minhas amigas queridas, Michele, Larissa, Luiza e Mirsiane, que desde a graduação foram força, apoio e refrigério. Um presente para a vida toda!

Aos queridos Vinicius, Débora e Caroline, que consolidaram o verdadeiro sentido de presença nos dias em que tudo parecia distante de se tornar realidade. O *quarteto da qualidade* fez muita diferença nesse tempo. Gratidão pela amizade que construímos!

À querida Natália, por ter me acompanhado em todos os experimentos e ter sido pilar na realização desse estudo. Gratidão!

Ao professor Dr. Ademar Alves da Silva Filho, por me ensinar além da técnica e me fazer entender (desde a graduação) que as melhores coisas da vida, não são coisas, são pessoas, histórias e momentos que ficam eternizados no livro da vida. Gratidão, por me acolher com tanto carinho, cuidado e compreensão. Privilégio ter sua orientação durante esses anos!

Ao professor Dr. Guilherme Diniz Tavares, pelo incentivo e por sempre acreditar no meu potencial. Gratidão!

Ao TEAM NIPPAN que será, para sempre, o melhor lugar da Faculdade de Farmácia da UFJF. Privilégio fazer parte desse time ao longo de tantas gerações!

Às agências de fomento Capes, CNPQ e Fapemig (APQ 00705-22).

Pessoas precisam de pessoas.
Das pessoas certas!

RESUMO

O câncer é um problema de saúde mundial, que continua exigindo inovação constante nos protocolos terapêuticos. Nesse cenário, é relevante a busca por novos ativos que possam melhorar as propostas terapêuticas. As espécies vegetais se destacam, devido à sua composição química complexa capazes de propiciar o atingimento de atividades farmacológicas diversas. Nesse sentido o gênero *Baccharis* merece destaque. *Baccharis dracunculifolia (Bd),* conhecida como alecrim-do-campo, é considerada a principal fonte botânica da própolis verde. Diversas fontes vegetais apresentam atividade antiproliferativa, peça chave no tratamento de diversos tipos de câncer, sobretudo o câncer de pele. Nesse sentido, o presente trabalho caracterizou o extrato do ápice foliar de Bd por CLUE-EM-QTOF, tendo sido anotados 12 compostos, especialmente flavonoides e ácidos fenólicos, dentre eles o ácido cumárico, o artepilin C, a acacetina e ácido cafeico. A concentração de artepilin C foi de 1,18 µg/mL. Avaliou-se a citotoxicidade do extrato frente a fibroblastos (L929), queratinócitos (HaCaT) e melanoma (B16F10) pelo método de redução do sal de tetrazólio, cujas concentrações de extrato variaram entre 6,25 - 100 µg/mL. Apenas as maiores concentrações foram tóxicas para as células, e a menor concentração 6,25 µg/mL apesentou viabilidade superior a 70% em todas as células testadas. A atividade antiproliferativa do extrato foi avaliada através do ensaio clonogênico utilizando a concentração de 6,25 µg/mL frente a melanoma (B16F10). O extrato foi ativo e reduziu a formação de colônias mantendo apenas 33,75% das células viáveis.

Palavras-chave: Câncer de pele, *Baccharis dracunculifolia*, atividade antiproliferativa.

ABSTRACT

Cancer is a global health problem that continues to require constant innovation in therapeutic protocols. In this scenario, the search for new active ingredients that can improve therapeutic proposals is relevant. Plant species stand out due to their complex chemical composition, capable of providing the achievement of various pharmacological activities. In this sense, the genus *Baccharis* deserves to be highlighted. *Baccharis dracunculifolia* (Bd), known as rosemary, is considered the main botanical source of green propolis. Several plant sources have antiproliferative activity, which is a key element in the treatment of various types of cancer, especially skin cancer. In this sense, the present study characterized the extract of the leaf apex of Bd by CLUE-EM-QTOF, and 12 compounds were recorded, especially flavonoids and phenolic acids, among them coumaric acid, artepilin C, acacetin and caffeic acid. The artepilin C concentration was 1.18 µg/mL. The cytotoxicity of the extract against fibroblasts (L929), keratinocytes (HaCaT) and melanocytes (B16F10) was evaluated by the tetrazolium salt reduction method, whose extract concentrations ranged from 6.25 to 100 µg/mL. Only the highest concentrations were toxic to the cells, and the lowest concentration 6.25 µg/mL showed viability greater than 70% in all cells tested. The antiproliferative activity of the extract was evaluated by clonogenic assay using a concentration of 6.25 µg/mL against melanocytes (B16F10). The extract was active and reduced colony formation, keeping only 33.75% of viable cells.

Keywords: Skin cancer, *Baccharis dracunculifolia*, antiproliferative activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	*Baccharis dracunculifolia* De Candolle (DC).....	15
Figura 2	Abelha *Apis Mellifera* coletando material resinoso no ápice foliar	16
Figura 3	Estruturas químicas dos metabólitos secundários de *B. dracunculifolia*.....	17
Figura 4	Local de coleta do material vegetal *in* natura	18
Figura 5	Extratos de *Baccharis dracunculifolia*.....	28
Figura 6	Perfil cromatográfico BdEtOH.....	29
Figura 7	Perfil cromatográfico BdAcOEt.....	29
Figura 8	Comparação entre os perfis BdAcOEt x BdEtOH.....	30
Figura 9	Estrutura química, espectro UV e perfil Cromatográfico HPLC de BdAcOEt (A) e artepillin C (B)…….	32
Figura 10	Estrutura química dos compostos anotados.....	34
Figura 11	Formação de colônias melanoma murinos (B16F10) após 8 dias de tratamento com CN: Controle negativo; CS: controle do solvente.....	43
Figura 12	Formação de colônias melanoma murinos (B16F10) após 8 dias de tratamento com extrato de BdAcOEt.....	43
Figura 13	Diluição das colônias utilizando LSS. CN: controle negativo, CS: controle do solvente.....	44
Figura 14	Diluição das colônias formadas após tratamento com extrato de BdAcOEt, utilizando LSS.....	44
Figura S1	UPLC-HR-MS/MS cromatograma em modo de ionização negativa do extrato do ápice da folha de B. dracunculifolia.....	55
Figura S2	EM^2 espectro do ácido cumárico (**1**)…….	56
Figura S3	EM^2 espectro do ácido cafeico (**10**)……..	57
Figura S4	EM^2 espectro do Artepilin C (**12**)……....	58
Figura S5	EM^2 espectro do ácido 3-*O*-cafeoilquínico (**2**)…….……..	59
Figura S6	EM^2 espectro do ácido 4-*O*- cafeoilquínico (**4**)……	60
Figura S7	EM^2 espectro do ácido 3,4 Dicafeoilquínico (**3**)……..	61

Figura S8 EM^2 espectro do ácido 4,5- Dicafeoilquínico (**5**)……. 62
Figura S9 EM^2 espectro da aromadendrina 4-metil éter (**6**)…… 63
Figura S10 EM^2 espectro do betuletol (**7**)……. 64
Figura S11 EM^2 espectro do kaempferide (**9**)…….. 65
Figura S12 EM^2 espectro da acacetina (**11**)……. 66
Figura S13 EM^2 espectro do kaempferol (**8**)……. 67
Gráfico 1 Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) expostos a tratamento com extrato de BdAcOEt - 24 h..... 39
Gráfico 2 Viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) expostos a tratamento com extrato de BdAcOEt - 24 h..... 40
Gráfico 3 Viabilidade celular de melanoma murinos (B16F10) expostos a tratamento com extrato de BdAcOEt - 48 h..... 41
Gráfico 4 % de absorbância dos poços corados com giensa pelo ensaio de clonogenicidade (proliferação) em células de câncer de pele (B16F10) após incubação com extrato de BdAcOEt e quantificados pelo GraphPrism..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados UPLC-HR-EM/EM de compostos anotados no extrato do ápice da folha de *B. dracunculifolia* (espectros EM/EM nas Figuras Suplementares S2-S13).....37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bd	*Baccharis dracunculifolia*
BdAcOEt	Extrato de *Baccharis dracunculifolia* em acetato de etila
CO_2	Gás Carbônico
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
DEMEM	Meio de cultura Dubelcco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DC	De Candolle
EM	Espectrometria de massas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-cético, Ethylenediamine tetraacetic acid
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LdNano	Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados
$[M-H]^-$(m/z)	Relação massa carga
EM/EM (EM^2)	Espectrometria de massas em tandem
MTT	Brometo de 3- (4,5 dimetiltiazol-2-il) 2,5 difeniltetrazólio
PBS	Tampão fosfato salino
SFB	Soro Fetal Bovino
QTOF	Tempo de vôo quadrupolo
Rt	Tempo de Retenção
RDB	Anéis e equivalentes de ligação dupla

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 REVISÃO DA LITERATURA 13
2.1 CÂNCER DE PELE 13
2.2 GÊNERO *BACCHARIS* 14
2.2.1 *Baccharis dracunculifolia* DC 15
2.2.2 Composição química de *B. dracunculifolia* 16
3 OBJETIVO GERAL 19
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19
4 MATERAL E MÉTODOS 20
4.1 AUTORIZAÇÃO DE COLETA E ACESSO AO PATRIMÔNIO PELO SISGEN: **..20**
4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO 20
4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO DE *B. dracunculifolia* EM HPLC-DAD e CLUE-EM-QTOF E ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS 21
4.3.2 Análise em CLUE-EM-QTOF do extrato BdAcOEt 21
4.3.3 Identificação e quantificação de artepillin C 23
4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE *B. dracunculifolia* 23
4.4.1 Cultivo celular 23
4.4.2 Ensaio de viabilidade celular 24
4.5 ENSAIO CLONOGÊNICO 25
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA 27
6 RESULTADOS PRÉVIOS E DISCUSSÃO 28
6.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE *Baccharis dracunculifolia* 28
6.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ARTEPILIN C 31
6.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO DE *B. dracunculifolia* EM CLUE-EM-QTOF E ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS 33
6.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR 39
6.5 ENSAIO CLONOGÊNICO 42
7 CONCLUSÃO 48
REFERÊNCIAS 49
ANEXO 55

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde mundial, que continua exigindo inovação constante nos protocolos terapêuticos (OMS, 2020; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). É uma doença complexa, heterogênea e altamente dinâmica envolvendo o crescimento acelerado e desordenado das células, que pode invadir órgãos e tecidos (MOSES et al., 2018).

O câncer de pele é um tipo de câncer comum e incorpora uma gama de entidades patológicas que se originam de diferentes células da derme e da epiderme. No Brasil estima-se que até 2025 haja a incidência de 220.490 novos casos (INCA,2024). As altas taxas de mortalidade estão relacionadas ao diagnóstico tardio, uma vez que lesões iniciais podem ser removidas por intervenção cirúrgica com altos índices de cura. Entretanto, esse tipo de abordagem não se aplica aos pacientes que apresentam a doença em fase avançada (LIMA *et al*., 2018).

Existem inúmeras limitações no tratamento convencional com a quimioterapia, que em geral causam resposta clínica não satisfatória e diversos efeitos adversos. Por essa razão, a busca por novas substâncias que possam melhorar os protocolos farmacoterapêuticos têm sido cada vez mais frequentes (NEWMAN; CREGG, 2020).

Diversos estudos da literatura descrevem a variedade farmacológica apresentada por compostos vegetais e a busca por novas substâncias com atividade anticarcinogênica têm sido crescentes (ASHIQUE, et al, 2023; BATISTA, et al, 2022; SHARMA, et al, 2023; AHMED, et al, 2023).

Nesse contexto, a espécie *Baccharis dracunculifolia* De Candole (Asteraceae) merece destaque. Conhecida popularmente como alecrim do campo, é uma planta nativa do Brasil encontrada principalmente em áreas de cerrado de Minas Gerais. É um arbusto lenhoso, com folhas dotadas de tricomas tectores e glandulares, os quais atuam como barreira contra o ataque de predadores e auxiliam as abelhas *Apis mellifera* na coleta de material resinoso para a produção de própolis verde (LEMOS, et al, 2007, DA SILVA FILHO, 2012).

Várias atividades biológicas para extratos oriundos da *B. dracunculifolia* já foram descritas, dentre as quais as atividades anti-inflamatória (FERREIRA, et al; 2023), antimicrobiana (TIMBE, et al, 2021; MONTEIRO, et al, 2022) e antioxidante (DE LIMA, et al, 2019). A espécie é caracterizada quimicamente pela presença de

terpenoides, flavonoides e, principalmente, fenilpropanoides e derivados do ácido cumárico, como a bacarina, drupanina e artepilin C (DE OLIVEIRA et al., 2014; BONIN, et al, 2020).

É documentado na literatura o potencial anticancerígeno de compostos fenólicos, principalmente os derivados do ácido cinâmico, frente a células de melanoma (RODRIGUES, 2021). Além disso, pesquisadores demonstraram atividade antitumoral promissora para extratos da própolis verde, o que pode sugerir atividade similar para extratos de B. dracunculifolia, tendo em vista que esta espécie vegetal é a principal fonte botânica para este tipo de própolis (DE OLIVEIRA, et al, 2014).

Com base no exposto, o presente trabalho objetiva avançar no estudo investigativo da atividade antiproliferativa do extrato do ápice foliar de *B. dracunculifolia* frente a linhagem celular de melanoma murino B16F10.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE PELE

O câncer é um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, e constitui a segunda maior causa de morte da população mundial, ficando atrás somente das mortes ocasionadas por doenças cardiovasculares (OMS, 2020; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). É uma doença complexa, heterogênea e altamente dinâmica envolvendo o crescimento acelerado e desordenado das células, que pode invadir órgãos e tecidos (MOSES et al., 2018).

O câncer de pele é o mais comum de todos os tipos de câncer e incorpora uma gama de entidades patológicas que se originam de diferentes células da derme e da epiderme (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020). Os principais tipos de câncer de pele são: o carcinoma de células escamosas, o carcinoma basocelular (câncer de pele não melanoma - benigno), que são a maioria dos casos, e o câncer de pele melanoma (maligno), que se forma nos melanoma, células responsáveis pela produção da melanina (HENCH, et al., 2023; DESSINIOTI, et al., 2024). É a forma mais agressiva de câncer de pele, devido ao seu alto potencial metastático. Sua ocorrência está relacionada a exposição exarcebada a luz solar, alterações genéticas e epigenéticas, e acomete principalmente a população caucasiana de ambos os sexos (LEONARDI et al., 2018; MILLER et al, 2016).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que para cada ano do triênio de 2023 a 2025 haja a incidência de 220.490 novos casos de câncer de pele não melanoma. Por outro lado, para o câncer de pele melanoma, a incidência estimada é de 8.980 novos casos (INCA, 2024).

O diagnóstico precoce, sobretudo do melanoma, é de fundamental importância para o sucesso do tratamento. As opções terapêuticas, são dependentes do tipo e extensão do tumor, localização e estágio. Podem ser resumidas em ressecção cirúrgica, quimioterapia, radioterapia, terapia fotodinâmica, imunoterapia ou terapia direcionada (BATUS et al., 2013; MILLER et al., 2016).

Diversos fármacos são utilizados no tratamento do melanoma, dacarbazina, e seu análogo temozolomida, são exemplos. No entanto, efeitos adversos, respostas clínicas não são satisfatórias, e resistência das células tumorais a esses fármacos

têm limitado o sucesso da farmacoterapia (AUSTIN et al., 2017; RICHMOND et al., 2019).

Por isso, a busca por novos fármacos que sejam capazes de melhorar a eficácia terapêutica têm sido constantes, nesse cenário, os produtos naturais são fontes importantes na descoberta de novas substâncias. É sabido que os compostos fenólicos possuem atividades antioxidantes, quimiopreventivas e quimioterapêuticas (SOBRINHO et al*.,* 2016).

Diversos estudos na literatura comprovam que os compostos fenólicos são capazes de minimizar a capacidade proliferativa de células de melanoma, dessa forma, extratos vegetais têm sido investigados devido à complexidade de sua composição química, agindo de forma sinérgica, e também às propriedades biológicas já comprovadas que estes apresentam (LIN et al., 2020; DAIKH et al, 2020; NEWMAN; CRAGG,2020; LU et al*.,* 2013*;* NOR, et al., 2021; CAMPOCCIA, D. et al*.,*2021*;*CISlLOTTO*,* et al.,2018*)*. As espécies de origem tropical, em especial da biodiversidade brasileira, têm despertado grande interesse de pesquisadores, nesse cenário, o gênero *Baccharis*, sobretudo a espécie *Baccharis dracunculifolia* merece destaque.

2.2 GÊNERO *BACCHARIS*

O gênero *Baccharis*, pertence à família Asteraceae e possui com cerca de 500 espécies (FERREIRA, et al; 2023). No Brasil, há grande concentração de espécies de *Baccharis*, principalmente no Cerrado, caracterizando a região como provável centro de origem do gênero (MONTEIRO, et al; 2022). Esse gênero é considerado um dos maiores da família Asteraceae, e é muito utilizado na medicina popular na forma de chás, para o controle e tratamento de diversas doenças como diabetes, doenças da próstata, males do fígado e estômago, anemias, inflamações e para processos de desintoxicação do organismo (VERDI et al., 2005).

Quimicamente, é marcada pela presença de flavonoides (principalmente flavonas e flavonóis), triterpenos e diterpenos (dos tipos labdanos e clerodanos) e derivados do ácido cumárico. Os metabólitos secundários expressos por esse gênero, são encontrados principalmente nas partes aéreas, apresentam diversas atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana,

cicatrizante, anticarcinogênica, imunomoduladora, dentre outras (DA SILVA FILHO, 2012).

Devido à vasta aplicabilidade das plantas desse gênero na medicina popular para o tratamento de diversas patologias, aliada à sua importância comercial e ecológica, o interesse pela pesquisa e aprofundamento da composição química de espécies de *Baccharis sp* tem aumentado, com o intuito de desenvolver novos medicamentos. Entre as espécies do gênero de grande importância está *B. dracunculifolia*.

2.2.1 Baccharis dracunculifolia DC

Baccharis dracunculifolia De Candolle (Asteraceae) (figura 1), conhecida popularmente como alecrim-do-campo e vassourinha, é uma espécie nativa do Brasil e ocorre principalmente na região sudeste do país, especialmente em pastagens abandonadas e áreas de cerrado do estado de Minas Gerais (RIANI, et al., 2017; MARTINEZ, et al., 2012). Apresenta sementes e galhos bem ramificados, e sua epiderme foliar é dotada de tricomas agrupados e distribuídos regularmente pelo limbo, sendo que seu ápice foliar apresenta grande quantidade de tricomas glandulares que agem como proteção ao ataque de predadores e, auxiliam as abelhas *Apis mellifera* na coleta de material resinoso para posterior produção da própolis verde (TEIXEIRA et al., 2005)

Figura 1. *Baccharis dracunculifolia De Candolle (DC).*



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Essa relação com as abelhas (figura 2) torna a espécie potencial alvo de investigações fitoquímicas e farmacológicas, tendo em vista as diversas propriedades da própolis verde já reportadas na literatura, o que pode sugerir similaridade à *B. dracunculifolia* uma vez que esta é sua principal fonte botânica.

Figura 2. Abelha *Apis mellifera* coletando material resinoso no ápice foliar.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

De acordo com a literatura as abelhas cortam os ápices foliares da planta e com o auxílio de suas patas vão formando “bolotas verdes”, repletas de fragmentos epidérmicos e tricomas glandulares, as quais são carregadas para a colmeia e utilizadas na elaboração da própolis, denominada assim “verde” (BASTOS, 2001; KUMAZAWA et al., 2003).

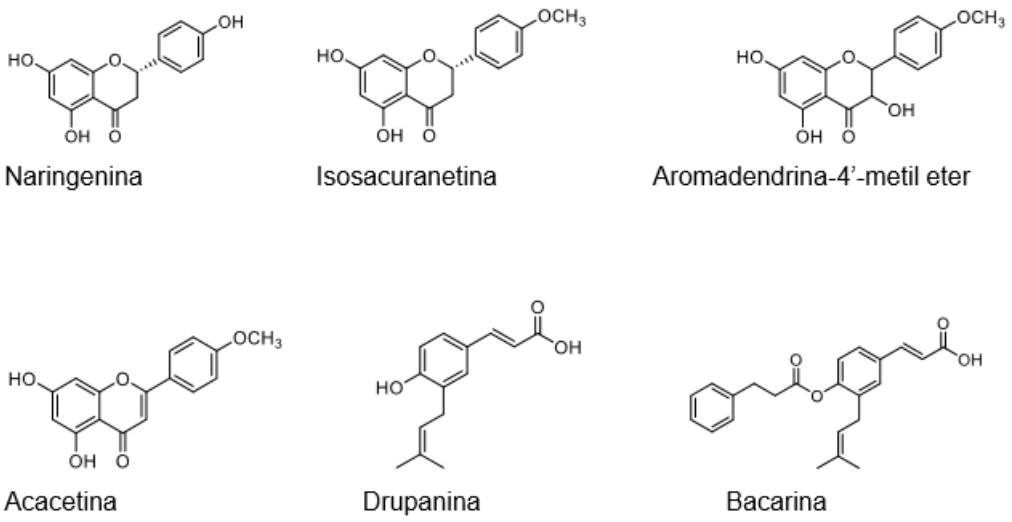
2.2.2 Composição química de B. dracunculifolia

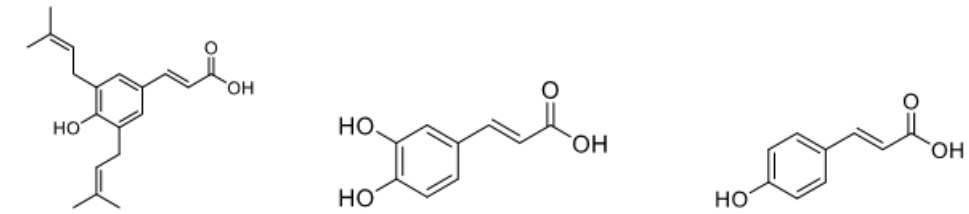
Os primeiros compostos identificados e isolados das partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia* foram os fenilpropanoides bacarina, drupanina e artepilin C (Figura 3), em um estudo realizado por Bohlmann (1981). A partir desse estudo, diversos trabalhos foram realizados com o interesse em conhecer a composição

química e as propriedades biológicas dessa espécie (BERNARDES, et al., 2022; RIGOTTI, et al., 2023; LUCHESI, et al., 2022; BRANDENBURG, et al.,2020; VILAS-BOAS, et al.,2023).

Park *et al.* (2002) identificou em extratos de folha de Bd, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, a presença do ácido cumárico, ácido ferúlico e isosacuranetina (Figura 3). Nagatani *et al.* (2001) verificou a presença de substâncias como, naringenina, acacetina, aromadendrina-4-metil-éster, além das substâncias previamente identificadas artepilin C, drupanina e bacarina, dentre outras substâncias no extrato metanólico da planta (figura 3). Por ser a principal fonte botânica da própolis verde, Kumazawa e colaboradores (2003) e Sawaya e colaboradores (2004) avaliaram a similaridade entre os perfis cromatográficos de extratos hidroalcoólicos de Bd e própolis verde utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM), e foram identificadas várias substâncias, como o ácido cafeico, ácido cumárico, aromadendrina-4-metil-éster, bacarina e artepilin C. Corroborando com outros trabalhos da literatura, os ácidos fenólicos prenilados, como artepilin C, foram indicados como as substâncias majoritárias nos ápices foliares de Bd (TEIXEIRA *et al*., 2005; DE OLIVEIRA *et al*., 2014; PAULA *et al*., 2017).

Figura 3. Estruturas químicas de alguns metabólitos secundários de *B. dracunculifolia.*





Artepillin C Ácido cafeico Ácido cumárico

Fonte: Elaborado pela própria autora (2024).

Tendo em vista a estreita correlação entre as substâncias majoritárias presentes nos extratos de *B. dracunculifolia* e os compostos já identificados em extratos de própolis verde, pesquisadores têm conduzido estudos buscando atividade semelhante de ambos os extratos frente a diversas patologias. Cisilotto, J. et. al (2018), conduziram estudo de avaliação de citotoxicidade em células de melanoma e caracterização química de própolis, demonstrando que a presença incomum de alcaloides piperidínicos possui seletividade citotóxica para essas células. Benguedouar, et al (2015), avaliaram a progressão de melanoma de camundongos, após tratamento com extrato etanólico de própolis e observaram diminuição significativa. Também já foi relatado por Paulino *et al.* (2008) expressiva atividade anti-inflamatória da própolis verde e, em contrapartida, Santos *et al*. (2010) conduziram um estudo com extrato hidroalcoólico de partes aéreas de Bd, e constataram a expressiva atividade anti-inflamatória do extrato.

Assim, estudos da literatura comprovam a similaridade na composição químico-biológica entre a própolis verde e sua principal fonte vegetal, a *Baccharis dracunculifolia*, indicando a possível similaridade entre suas propriedades biológicas.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antiproliferativa do extrato do ápice foliar de *Baccharis dracunculifolia DC* (Asteraceae).

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato em acetato de etila do ápice foliar de *Baccharis dracunculifolia* (BdAcOEt)*;*
- Caracterizar o extrato BdAcOEt por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detector por espectrometria de massas de alta resolução (CLUE-EM-QTOF);
- Avaliar a viabilidade celular de fibroblasto, queratinócito e melanoma murinos frente ao tratamento com extrato de BdAcoEt;
- Avaliar o potencial efeito antiproliferativo *in vitro* do extrato BdAcOEt frente a melanoma murinos (B16F10).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AUTORIZAÇÃO DE COLETA E ACESSO AO PATRIMÔNIO PELO SISGEN:

A coleta do material vegetal de *B. dracunculifolia* e sua experimentação foi devidamente cadastrada no Sistema Nacional de Cadastro ao Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob o número: AE32DB3.

4.2 COLETA DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO

As partes aéreas da planta *in natura* para o estudo, foram coletadas manualmente no dia sete de julho de 2022 às 10:00 horário de Brasília, no campus da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), entre as faculdades de Farmácia (FF) e Economia, (21°46’34.8”S 43°21’ 52.4”W) conforme figura 4. Foram coletadas plantas com altura média entre 1 e 2 m, com folhas e ápices foliares bem evidentes.

Figura 4. Local de coleta do material vegetal *in* natura.



Fonte: Google maps (2022).

Após coleta, os ápices foliares foram separados e secos em temperatura ambiente ao abrigo da luz na sala de secagem da FF durante duas semanas. Em seguida, foram estabilizados em estufa de ar quente e circulante (SoLab, modelo 102) à temperatura de 40°C por 24 hrs.

Posteriormente, o material vegetal foi pulverizado em moinho de facas e foram obtidos 7g de pó de ápices foliares. Em seguida, o pó obtido foi submetido à

processo de maceração à temperatura ambiente, por 48h em frasco âmbar, utilizando acetato de etila (500 mL) ou etanol PA (500 mL) como líquidos extratores. Após o tempo de maceração, as soluções extrativas foram filtradas e concentradas à pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório (Rotavapor® R-210, Buchi, Suíça) à temperatura de 40°C, obtendo-se 1,6 g do extrato em acetato de etila (BdAcOEt) e 2,0 g do extrato etanólico (BdEtOH) dos ápices foliares de *B. dracunculifolia* (figura 5).

4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO DE *B. dracunculifolia* EM HPLC-DAD e CLUE-EM-QTOF E ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS

4.3.1 Análise em HPLC-DAD do extrato de BdAcOEt.

A avaliação do perfil cromatográfico dos extratos BdAcOEt e BdEtOH foi realizado de acordo com o método adaptado descrito por Marquiafável e colaboradores (2015). As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Bioprodutos e Bioprocessos (CentralBio) da FF da UFJF, utilizando um HPLC Waters, composto por um detector de arranjo de diodos (DAD), bomba binária de HPLC e um amostrador automático. Foi utilizada uma coluna analítica SunFire C_{18} (tamanho de partícula de 5 µm, 4,6 mm x 250 mm) com uma pré-coluna SunFire C_{18} (tamanho de partícula de 5 µm, 4,6 mm x 20 mm). A fase móvel foi uma mistura de água ultrapura acidificada com ácido acético 0,1% (A) e metanol acidificado com ácido acético 0,1% (B). O método do gradiente foi: 20–100% (B) em 0-70 min e mantido dentro de 25 min linearmente a 100% do solvente B com vazão de 1 mL/min. O extrato BdAcOEt (2 mg) foi diluído em metanol (grau HPLC) para atingir uma concentração final de 2 mg/mL. Depois, a mistura foi sonicada por 15 min a 40ºC, centrifugada por 5 min a 4000 x G e filtrada através de filtros de membrana de 0,45 µm. O volume de injeção foi de 30 µL.

4.3.2 Análise em CLUE-EM-QTOF do extrato BdAcOEt

O extrato BdAcOEt foi analisado em um equipamento de cromatografia de ultra eficiência (Ultra Performance Liquid Chromatography-UPLC) usando um sistema Acquity UPLC (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), equipado com uma bomba binária, desgaseificador e amostrador automático acoplado a um sistema de

ionização por eletrospray, e espectrômetro de massas quadrupolo de tempo de voo (ESI-QTOF-MS / MS) (Waters Corporation, Milford, MA, EUA).

A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna BEH C_{18} (100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm, Milford, MA, EUA). A fase móvel composta por água de grau LC com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila de grau LC (B) com os seguintes perfis de gradiente: 0–2 min, 5% B; 2–14 min, 5–98% B; 14–16 min, 98% B; e 16–20 min, 98–5% B. A vazão foi de 0,4 mL/min.

Ao extrato BdAcOEt (5,0 mg) foi adicionado 2 mL de MeOH (grau CLUE) para solubilização. Posteriormente, a amostra foi submetida a banho ultrassônico por 15 minutos, ou até completa solubilização das amostras. Em seguida, a solução foi centrifugada a 10.000 RPM por 5 minutos e, 1 mL do sobrenadante de cada amostra foi coletado, adicionado de 0,1 mL de H_2O ultrapurificada, e centrifugado novamente a 15.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado em quantidade suficiente utilizando unidades filtrantes PVDF 0,22 µm e injetados (volume de injeção de 30 µL) para análise em CLUE-EM-QTOF.

A análise por espectrometria de massas foi realizada com um espectrômetro de massas XEVO G2S QTOF (Waters Corporation, Milford, MA, EUA) com ESI operando no modo de ionização negativa para varredura. A faixa de varredura foi definida em m/z 100–1000. A tensão capilar foi de 3,0 kV, a baixa energia de colisão foi de 6 eV e a maior energia de colisão foi de 15–30 eV. A temperatura da fonte de íons foi de 120°C e a temperatura de dessolvatação foi de 450°C. O nitrogênio foi utilizado como fonte de gás de dessolvatação (800 L·h−1) e gás de cone (50 L·h−1). Para medições de massa precisas, os dados foram centralizados durante a aquisição a 200 pg·mL^{-1} de leucina-encefalina (m/z 565,2771) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), dissolvidos em acetonitrila/0,1% de ácido fórmico (50 :50, v/v) e foi infundido continuamente como uma referência externa (LockSpray™) na fonte ESI com correção automática de massa habilitada. Os dados CLUE-HR-MS/MS foram processados usando o gerenciador de aplicativos Chromalynx™ com software MassLynx™ 4.1 (Waters Corporation, Milford, MA, EUA). As principais ferramentas para anotação dos compostos foram a interpretação dos espectros MS^2 adquiridos em comparação com aqueles encontrados na literatura e em bases de dados online, como PubChem, ChemSpider e MassBank.

4.3.3 Identificação e quantificação de artepillin C

Artepillin C foi identificado em BdAcOEt com base em seu espectro UV e tempo de retenção comparado ao padrão puro, isolado da própolis verde brasileira (RIANI, *et al.*, 2021). O padrão de artepillin C foi obtido anteriomente (RIANI, *et al.*, 2021) e disponibilizado para a a realização deste trabalho. Além disso, o artepillin C foi quantificado em BdAcOEt usando o método HPLC-DAD modificado de Nobushi *et al* (2012), correlacionando a área do pico do artepillin C com as áreas dos picos das soluções padrão. A curva de calibração do artepillin C foi preparada em metanol, cuja concentração final 100 µg/mL. Além disso, foram preparadas soluções estoque de BdAcOEt (37,6 mg/mL). Em seguida, a solução foi filtrada através de filtros de membrana de 0,45 µm e injetada em diferentes concentrações de BdAcOEt em triplicata. A coluna analítica utilizada foi uma X Bridge (Waters) C_{18} (150 mm x 4,6 mm, 5,0 µm), mantida a 40 ºC, e uma mistura de água ultrapura acidificada com 0,5% de ácido acético (A) e acetonitrila (B) foi usado como fase móvel. O método de gradiente utilizado foi: 30% (B) 0-5 min, 30-100% (B) em 5-30 min com vazão de 1 mL/min e DAD a 320 nm. Os resultados foram expressos em µg/mL de BdAcOEt.

4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO EXTRATO DE *B. dracunculifolia*

4.4.1 Cultivo celular

A linhagem de fibroblastos murinos (L929 - ATCC CCL-1 NCTC) e de queratinócitos murinos (HaCaT) foram cedidas pelo prof. Dr. Frederico Pittella Silva, do Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano) da FF da UFJF. A linhagem celular de melanoma murino (B16F10 - ATCC CRL-6475) foram gentilmente cedidas pela profª. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, do Laboratório NanoTop da Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As linhagens de L929 e B16F10 foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) high glicose, enquanto a linhagens de HaCaT foi cultivada em meio DMEM/F12 (1:1), ambos suplementados com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% da solução de antibióticos [Penicilina (100 UI/mL) e Estreptomicina (100 µg/mL)] em garrafas de cultura de 75 cm^3 (KASVI) e mantidas

em estufa incubadora umidificada à 37ºC com atmosfera de 5% de CO_2 (Panasonic, MCO-18ACL-PA, EUA) até atingirem 80% de confluência.

Em seguida, removeu-se o meio, lavou-se com *Phosphate buffered saline* (PBS) e adicionou-se 2 mL de solução de tripsina/EDTA 2,5% às garrafas de cultura, as quais foram incubadas por 3 minutos (L929 e B16F10) e 10 minutos (HaCaT) à 37ºC com atmosfera de 5% de CO_2. Após, acrescentou-se 4 mL de meio de cultura contendo 10% SBF e 1% da solução de antibióticos para inativação da enzima. Recolheu-se o meio contendo as células e transferiu para um tubo de centrifugação estéril de 15 mL (OLEN), procedendo a centrifugação à 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em meio de cultura suplementado com 10% SBF e 1% de antibiótico. As suspensões de células foram diluídas 10x diretamente no corante Azul de Trypan 0,4% para a contagem em câmara de Neubauer para iniciar o ensaio de viabilidade celular (PAIOLI, F.S., 2010).

4.4.2 Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado conforme descrito pelo método colorimétrico do MTT (MOSSMAN, 1983), com modificações. E para a avaliação dos resultados foi procedido conforme protocolo do guia ISO 10993-5 (ISO,2009). Para a avaliação da viabilidade, as células foram transferidas para microplacas de 96 poços, com densidade celular de 5 x 10^3 células/poço, fibroblastos (L929) e células de melanoma murino (B16F10), e de 1 x 10^4 células/poço, queratinócitos (HaCaT), e incubadas por 24 h em estufa incubadora umidificada à 37ºC com atmosfera de 5% de CO_2. Posteriormente, removeu-se o meio e adicionou-se 100 µL de meio DMEM ou DMEM/F12 suplementado (10% de SBF e 1% da solução de antibióticos) contendo a amostra BdAcOEt previamente diluída em solução de etanol [abaixo de 1% (v/v)]. As concentrações variaram entre 6,25-100 µg/mL, as quais foram obtidas por diluição seriada e avaliadas em quadruplicata.

Como controles foram utilizados meio de cultura suplementado (controle negativo), meio de cultura acrescido do solvente [solução de etanol a 1% (v/v)] (controle do solvente) e meio de cultura contendo dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 5% (controle positivo). As placas foram incubadas por 24 horas

(L929 e HaCaT) e 48 horas (B16F10) à 37ºC com 5% de CO_2. Após esse período, retirou-se o meio e adicionou-se uma alíquota de 90 µL de meio DMEM suplementado acrescido de 10 µL de solução de MTT à 0,5 mg/mL, seguido de um período de incubação de 2:30 h à 37 °C com 5% de CO_2.

Após, o precipitado de formazan, formado pela metabolização do MTT pelas células metabolicamente viáveis, foi dissolvido em 100 µL de DMSO e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) a 595 nm. O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com diluições das amostras foi feito a partir das médias das respectivas absorbâncias, considerando-se o valor médio da absorbância do grupo controle negativo como 100% de viabilidade. A comparação entre as médias dos valores de viabilidade celular em % e o cálculo do IC50, foi realizada por Análise de Variância *one-way* ANOVA*,* seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi fixado como sendo $p<0,05$.

4.5 ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico foi avaliado, seguindo o protocolo adaptado de FRANKEN *et al* (2006). As células de melanoma murino (B16F10) foram transferidas para placa de 6 poços, com densidade celular de 3×10^2 células/poço, e incubadas por 24 h em estufa incubadora umidificada à 37ºC com atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas. Em seguida, o meio foi removido e os poços foram lavados com 1 mL de solução de PBS. Adicionou-se o meio de cultura suplementado com 2% de SBF e contendo o extrato de BdAcOEt na concentração 6,25 µg/mL (em triplicata). Após tratamento, a placa foi incubada novamente nas mesmas condições por 8 dias.

Findado o período de incubação, o meio com o tratamento foi removido e os poços foram lavados três vezes com 1 mL de solução de PBS. As células foram fixadas com metanol PA gelado durante 20 minutos. Após, a solução de fixação foi descartada e, novamente, os poços foram lavados com 1 mL de solução de PBS. Posteriormente, as células foram coradas com uma solução de Giensa 0,6% por 20 minutos. Em seguida, removeu-se o corante e os poços foram lavados com água destilada e aguardou-se secar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Por fim, as células foram avaliadas por imagem (fotografia) e quantificadas por espectrofotometria. Para tanto, adicionou-se 1 mL de solução de lauril sulfato de sódio (LSS) 2% em cada poço e agitou-se por 30 minutos. Ao final desse tempo, a placa foi lida em espectrofotômetro Spectramax 190 (Molecular Devices, Califórnia, EUA) no comprimento de onda de 516 nm (o espectro de absorbância do corante foi verificado anteriormente em espectrofotometro UV-Vis). Os dados foram tratados através de análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc). A comparação entre as médias dos valores % foi realizada por Análise de Variância *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados. O nível de significância estatística foi fixado como sendo $p<0,05$.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

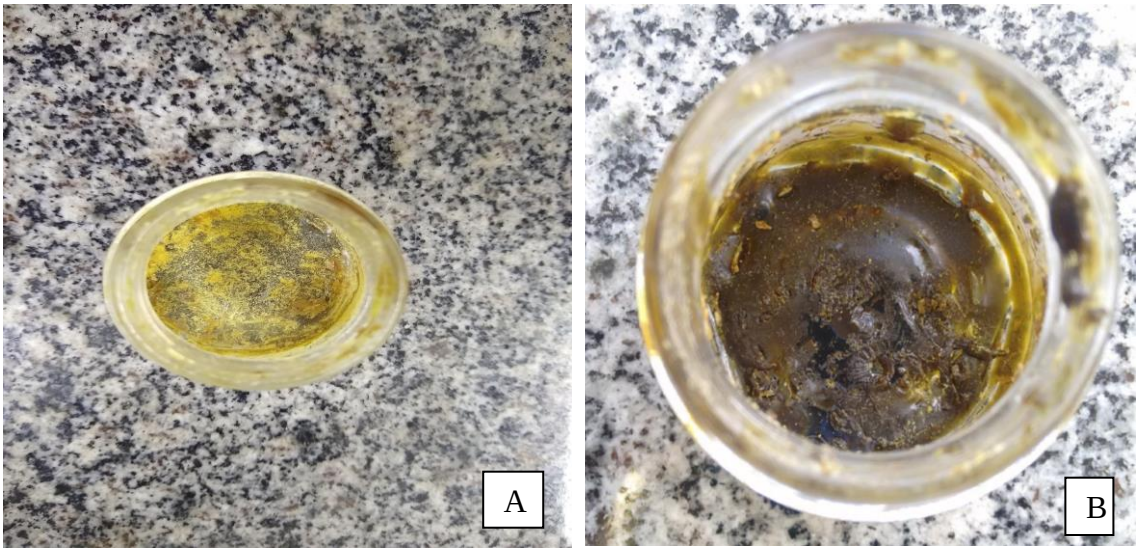
Para a análise estatística dos resultados obtidos será utilizada a análise de variância (ANOVA), utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc). Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados apresentados foram expressos em valores médios ± erro padrão da média, exceto quando devidamente identificado (SOKAL & ROHLF, 1995).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE *Baccharis dracunculifolia*

Após processo de extração por maceração do material vegetal, foram obtidos dois extratos brutos, conforme figura 5. Em seguida, os extratos foram submetidos a análise cromatográfica.

Figura 5. Extratos de *B. dracunculifolia.*



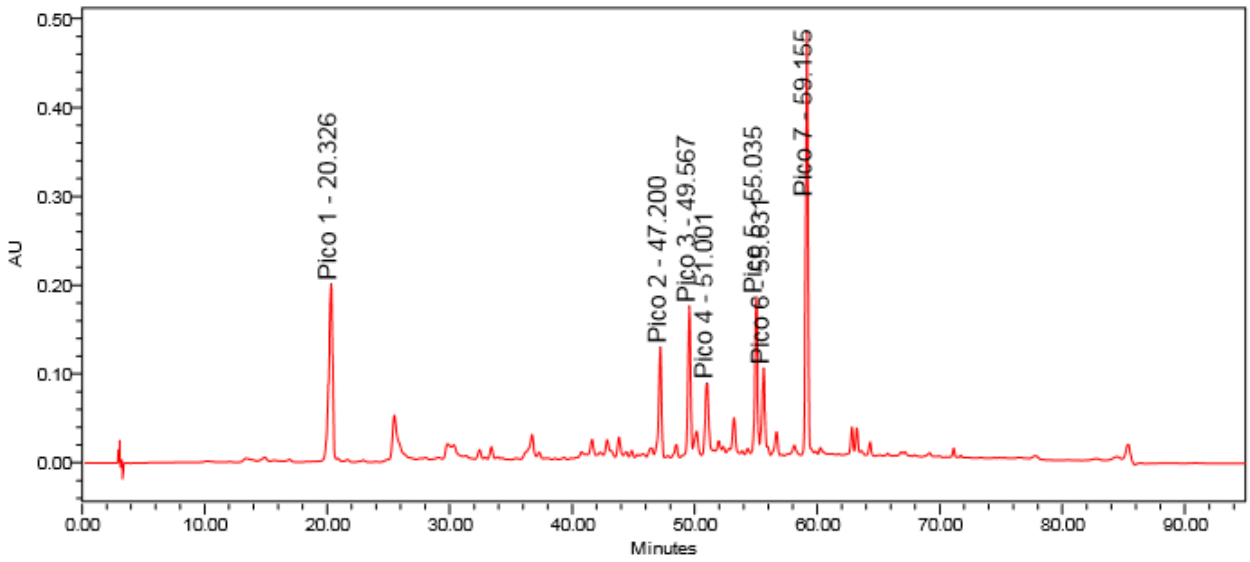
Legenda: **A.** Extrato de ápice foliar de Bd em acetato de etila (BdAcOEt). **B.** Extrato de ápice foliar de Bd em etanol (BdEtOH).
Fonte: Elaborado pela própria autora (2019).

A análise cromatográfica dos diferentes extratos foi realizada para analisar a composição química destas amostras e o potencial de extração dos diferentes solventes utilizados. Para isso, foi escolhida a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodo (HPLC-DAD), que permite realizar análises qualitativa e quantitativa de diversas substâncias presentes em uma amostra (SILVA, 2012).

Foi realizada comparação cromatográfica entre dois extratos de ápice foliar de *Baccharis dracunculifolia* com solventes extratores diferentes, com o objetivo de avaliar as possíveis diferenças nos perfis químicos, tendo em vista que estas diferenças químicas são de extrema importância para as atividades biológicas avaliadas no presente estudo.

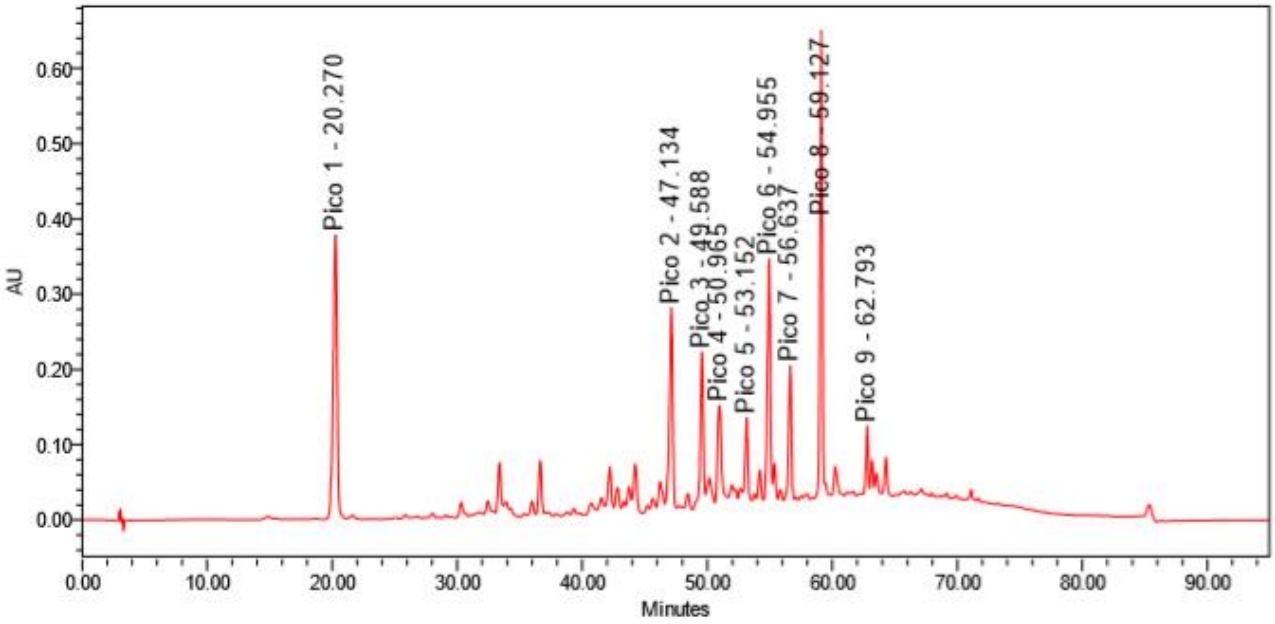
Analisando o perfil cromatográfico de BdEtOH (figura 6) e BdAcOEt (figura 7), bem como a comparação entre os dois (Figura 8), é possível observar similaridade entre as amostras e pouca diferença qualitativa entre os dois extratos.

Figura 6. Perfil cromatográfico BdEtOH.



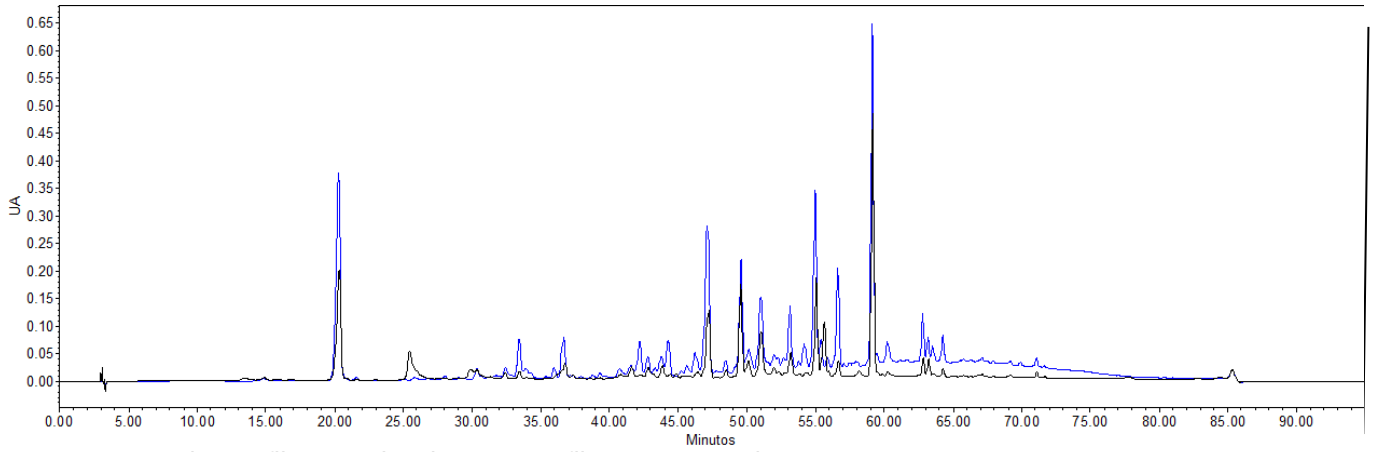
Fonte: Elaborado pela própria autora (2019).

Figura 7. Perfil cromatográfico BdAcOET.



Fonte: Elaborado pela própria autora (2019).

Figura 8. Comparação entre os perfis BdAcOET x BdEtOH



Legenda: Perfil em azul- BdAcOEt; perfil em preto – BdEtOH.

Fonte: Elaborado pela própria autora (2019).

Park e colaboradores (2004), realizaram um estudo comparativo de identificação e quantificação de compostos fenólicos em extratos etanólicos de própolis verde, folhas e brotos de Bd. Após análise por CLAE, observaram à similaridade qualitativa nos perfis cromatográficos da própolis verde e das partes aéreas de Bd, bem como a seletividade do etanol para extrair flavonoides e outros compostos fenólicos.

Além disso, os autores observaram que os constituintes químicos se expressam em maior quantidade no botão foliar quando comparado as folhas, o que justifica a análise apenas do ápice foliar realizada no presente estudo (Park e colaboradores (2004).

Outros estudos da literatura verificaram a influência do etanol no processo de extração de flavonoides e outros compostos fenólicos nas partes aéreas de Bd. Segundo os autores, o etanol em comparação com outros solventes (água, acetonitrila, CO_2 supercrítico etc.), apresentou maior concentração de compostos fenólicos, dentre eles: quercetina, catequina, epigalocatequina e rutina (MARTINEZ-CORREA, *et al*., 2012; PARK, *et al*., 2004; CASAGRANDE *et al*., 2018). Além disso, também é relatado a identificação de ácidos hidroxicinâmicos, que são responsáveis pelas atividades biológicas da planta, como o ácido *p*-cumárico; ácido cafeico; artepilin C e ácido ferúlico (GUIMARÃES, *et al*., 2012; BACHIEGA, *et al*., 2013).

Além disso, pode-se inferir que o pico 7 (59,155 min) refere-se ao artepilin C, uma vez que em trabalhos anteriores do grupo NIPPAN, essa substância foi isolada e identificada utilizando o mesmo método do presente trabalho, sendo observado o pico no mesmo tempo de retenção (RIANI, 2017).

O artepilin C, é uma das substâncias de maior importância nessa espécie vegetal, devido às inúmeras atividades biológicas assosicadas a ela, como por exemplo,atividade antioxidante, antitumoral entre outras atividades biológicas já descritas (TSURUTA, et al.,2022; RIANI, 2017; FERREIRA, et al.,2023).

Considerando a comparação entre os perfis dos dois extratos (Figura 8), é notória à similaridade entre ambos, e a presença das mesmas substâncias em ambos. No entanto, sugere-se que o AcOEt teve uma capacidade extrativa melhor para o artepillin C que o EtOH, pois o pico referente a este composto se apresentou mais intenso no cromatograma do extrato BdAcOEt.

Estudos posteriores do nosso grupo de pesquisa, avaliou o potencial fotoprotetor e antioxidante de ambos os extratos (DE OLIVEIRA, 2019) Após avaliação, foi observado que o extrato em AcOEt demonstrou maior potencial antioxidante e elevado potencial fotoprotetor na região UVA e UVB, quando comparado ao extrato etanólico. Por essa razão, o extrato BdAcOEt foi escolhido para dar continuidade nos estudos (DE OLIVEIRA, 2019).

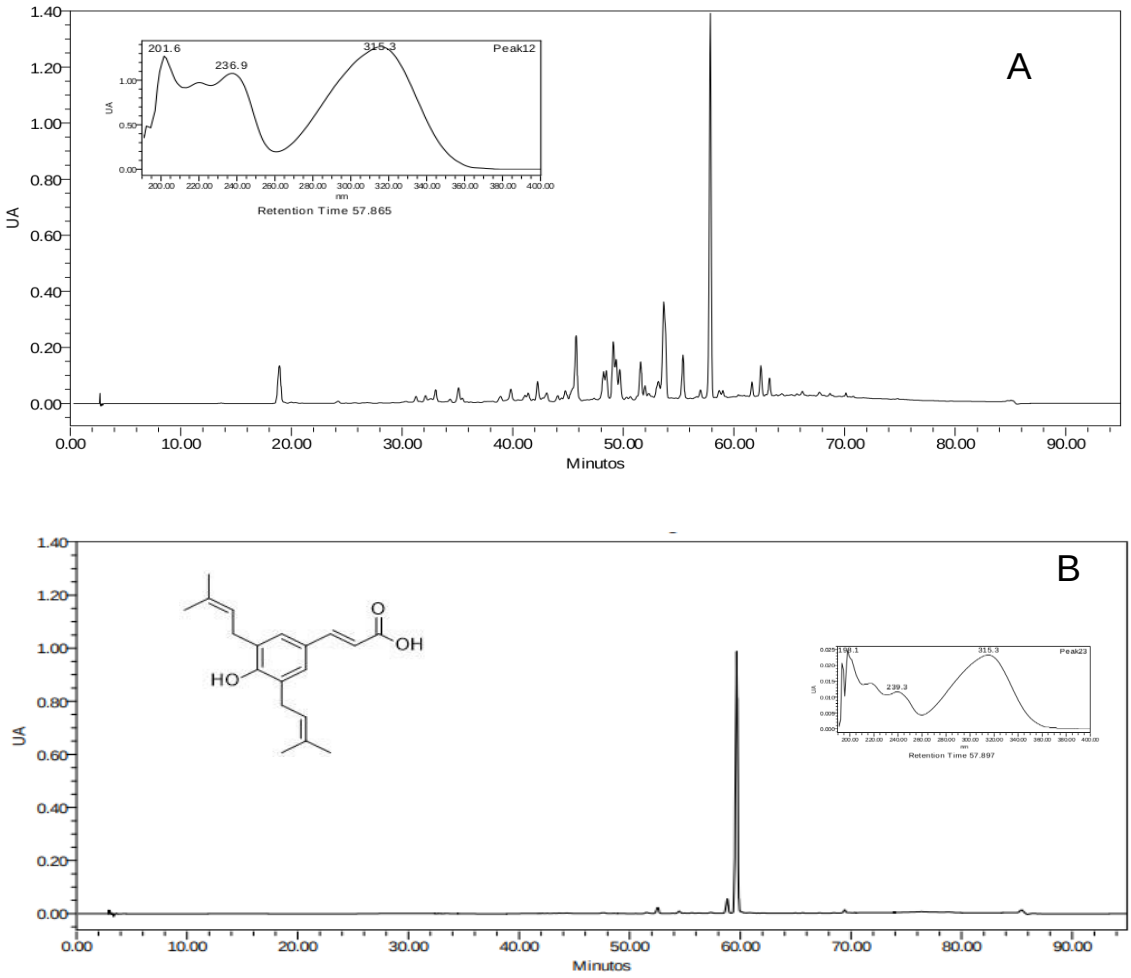
Neste sentido e, considerando os resultados biológicos obtidos com os extratos, foi realizada a identificação e quantificação do artepillin C no extrato BdAcOEt.

6.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ARTEPILIN C

O extrato de BdAcOEt, escolhido para dar continuidade ao trabalho, foi analisado por HPLC-DAD e gerou um perfil cromatográfico com sinal intenso no tempo de retenção de 58 min (Figura 10A). Este pico foi identificado como artepillin C em comparação com um padrão autêntico anteriormente obtido no nosso laboratório (RIANI, 2017) (Figura 10B). Posteriormente, foi realizado uma análise no método adaptado de Nobushi HPLC-DAD para quantificação de artepillin C no extrato. A curva analítica do artepillin C foi obtida, e a equação linear representativa foi y = 153518x – 440,33 (r2 = 0,9986), que mostrou boas relações lineares entre as

áreas e concentrações dos picos e uma concentração de artepillin C de 1,198 µg/mL.

Figura 9: Estrutura química, espectro UV e perfil cromatográfico em HPLC de BdAcOEt (A) e artepillin C (B).



Os resultados obtidos estão de acordo com estudos fitoquímicos anteriores de ápices foliares de *B. dracunculifolia*, que relataram como principais compostos derivados do ácido p-cumárico, principalmente artepillin C (PARK, et al.,2004; FONSECA, 2020; CISILOTTO, et al., 2018; NOR, et al.,2021).

Visto que o artepilin C é a substância de maior interesse, é importante realizar essa quantificação para verificar se a mesma é o composto majoritário no extrato. É possível verificar também, se o método de extração e o solvente extrator utilizado foram seletivos para a classe de substâncias que ele pertence.

6.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO EXTRATO DE *B. dracunculifolia* EM CLUE-EM-QTOF E ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS

Por meio da análise em CLUE-EM-QTOF do extrato do ápice foliar de *B. dracunculifolia,* foi possível obter um perfil químico e anotar alguns flavonóides e ácidos fenólicos, os quais foram previamente descritos para esta espécie (Tabela 1 , Figura S1) (JUNIOR, et al., 2008; VEIGA, et al., 2017; ZHANG, et al., 2017; COSTA, et al., 2018). Na análise, as substâncias **1** (de *m/z* 163,0408 $[M-H]^-$ e tempo de retenção de 4,6 min) e **10** (*m/z* 179,0370 $[M-H]^-$ e tempo de retenção de 9,0 min), exibiram em seus espectros MS^2 os íons fragmentos que correspondem a uma perda neutra de 44 Da (CO_2) (Tabela 1, Figuras S2-S3), característico das substâncias ácido cumárico e ácido cafeico, respectivamente (LI, et al., 2003; SINOSAKI, et al., 2020). Para o composto **12** (*m/z* 299,1690 $[M-H]^-$ e tempo de retenção de 10,4 min), foram observados íons fragmentos no espectro MS/MS de *m/z* 255,1819 $[M-H-CO_2]^-$ e *m/z* 200,1261 $[M-H]^-$ (Tabela 1 , Figura S4) característicos do artepilin C (Sun et al., 2019).

O espectro MS^2 do composto **2** (*m/z* 353,0879 $[M-H]^-$) mostrou íons fragmentos de *m/z* 191,0642, *m/z* 179,0435 e *m/z* 135,0511 (Tabela 1, Figura S5), correspondendo às perdas neutras de porção cafeoil, porção quínica e CO_2, respectivamente, sendo anotado como ácido 3-*O*-cafeoilquínico (CHANSRINIYOM, et al., 2021). Esses mesmos íons fragmentos foram observados no espectro MS^2 do composto **4** (*m/z* 353,0852 $[M-H]^-$), o qual também mostrou um íon de *m/z* 173,0476 (Tabela 1, Figura S6), indicando perdas neutras da porção cafeoíla e H_2O, características do ácido 4-*O*-cafeoilquínico (CHANSRINIYOM,C. et al., 2021).

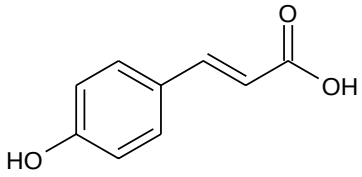
Além disso, íons fragmentados típicos para ácidos dicafeoilquínicos, correspondendo a perdas neutras de duas porções cafeoil e uma porção quínica, foram observados nos espectros MS^2 dos compostos **3** (*m/z* 515,1278 $[M-H]^-$) e **5** (*m/z* 515,1192 M-H]$^-$)(Tabela 1, Figuras S7-S8), sugerindo a presença de ácido 3,4-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico, respectivamente (MAGAÑA, et al., 2021).

Além disso, alguns flavonoides também foram anotados. Os espectros MS^2 dos compostos **6** (*m/z* 301,0757 M-H]$^-$), **7** (*m/z* 329,0691 M-H]$^-$), **9** (*m/z* 299,0553 M-H]$^-$) e **11** (*m/z* 283,0609 M-H]$^-$) (Tabela 1, Figuras SS9 -S12) apresentaram perdas de 15 Da (-CH_3), características de *O*-metil flavonoides e íons fragmentos que

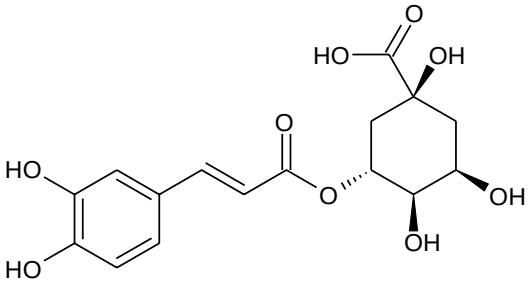
podem corresponder a aromadendrina 4-metil éter, betuletol, kaempferida e acacetina, respectivamente (ZHANG, et al., 2017; COSTA, et al., 2018; YIN, et al., 2019).

Já no espectro MS^2 do composto **8** (de *m/z* 285,0789 $M-H]^-$) (Tabela 1, Figura S13), foram observados os íons fragmentos de *m/z* 268,0420 e *m/z* 243,0653 podem corresponder a perdas neutras de 17 Da (-OH) e 42 Da ($-C_2H_2O$). Esses íons fragmentos são típicos, em MS/MS, do kaempferol (MARCH, et al., 2004).

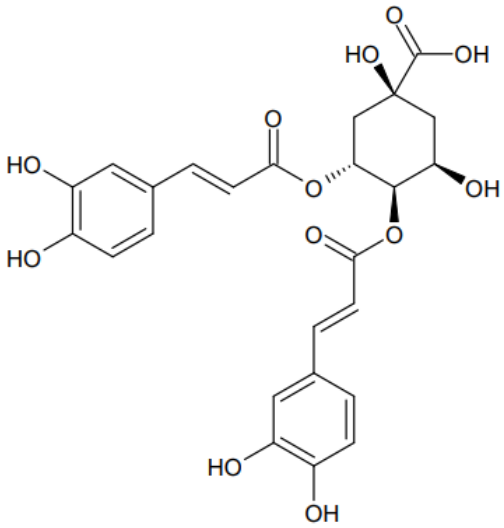
Figura 10. Estruturas químicas dos compostos anotados.



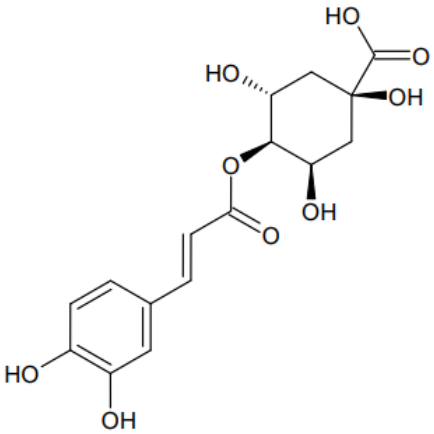
(1)Ácido p-cumárico



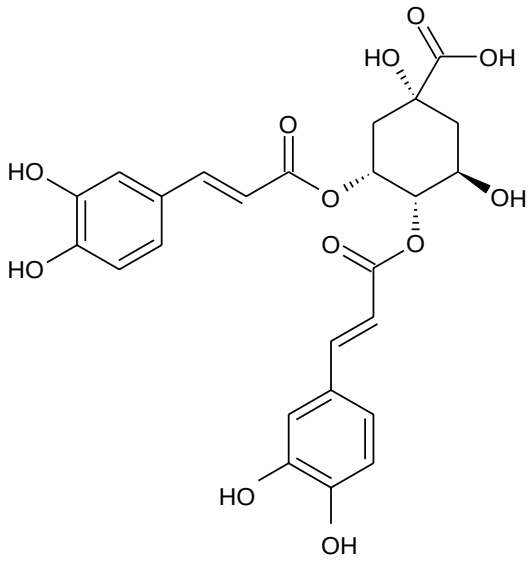
(2)Ácido 3-O-cafeoilquínico



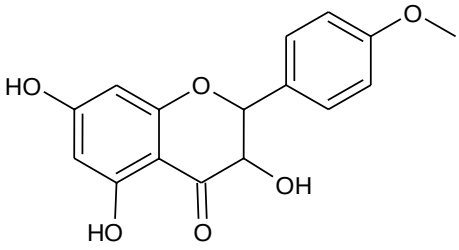
(3) Ácido 3,4-dicafeoilquínico



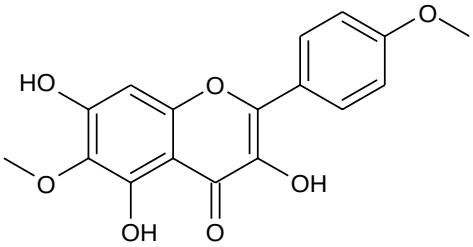
(4) Ácido 4-O-cafeoilquínico



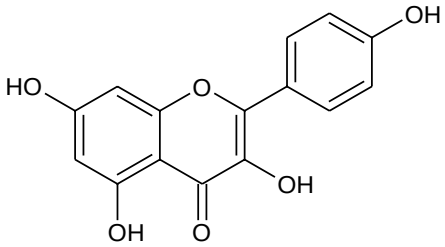
(5) Ácido 4,5-dicafeoilquínico



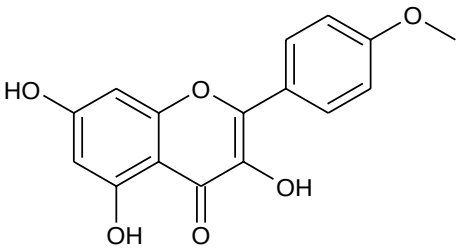
(6) Aromadendrina-4'-metil éter



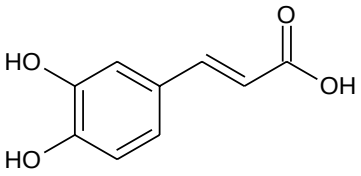
(7) Betuletol



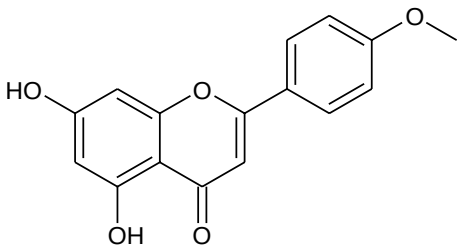
(8) Kaempferol



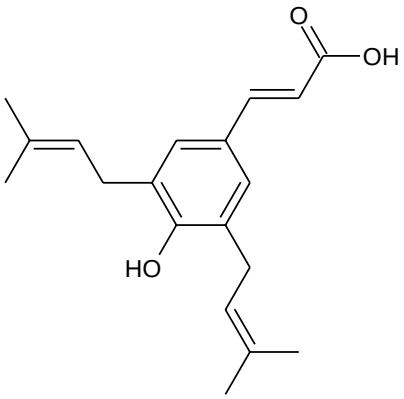
(9) Kaempferido



(10) Ácido cafeico



(11) Acacetina



(12) ArtepilinC

Legenda: As estruturas químicas estão numeradas de 1-12 conforme a disposição dos compostos anotados na tabela 1.

Tabela 1. Dados CLUE-MS/MS de compostos anotados no extrato BdAcOEt (espectros MS/MS nas figuras suplementares S2-S13).

N° do Composto	R_t (min)	$[M-H]^-$ (*m/z*)	Fórmula molecular	RDB	MS/MS (MS^2)	Composto proposto	Referências
1	4.6	163.0408	$C_9H_8O_3$	6.5	119.0508	Ácido cumárico	Li *et al*., 2003; Sinosaki *et al*., 2020
2	5.6	353.0879	$C_{16}H_{18}O_9$	8.5	191.0642; 179.0435; 135.0511	Ácido 3-*O*-cafeoilquínico	Chansriniyom *et al*., 2021
3	5.6	515.1278	$C_{25}H_{24}O_{12}$	14.5	353.1017; 335.0883; 191.0642; 179.0435	Ácido 3,4-dicafeoilquínico	Magaña *et al*., 2021
4	5.8	353.0852	$C_{16}H_{18}O_9$	8.5	191.0586; 179.0380; 173.0476; 135.0464	Ácido 4-*O*-cafeoilquínico	Chansriniyom *et al*., 2021
5	5.8	515.1192	$C_{25}H_{24}O_{12}$	14.5	353.0902; 191.0586; 179.0380; 173.0476	Ácido 4,5-dicafeoilquínico	Magaña *et al*., 2021
6	7.4	301.0757	$C_{16}H_{14}O_6$	10.5	286.0644; 151.0145	Aromadendrina-4'-metil éter	Zhang *et al*., 2017; Costa *et al*., 2018; Yin *et al*., 2019)
7	7.9	329.0691	$C_{17}H_{14}O_7$	11.5	299.1650; 271.1741;	Betuletol	

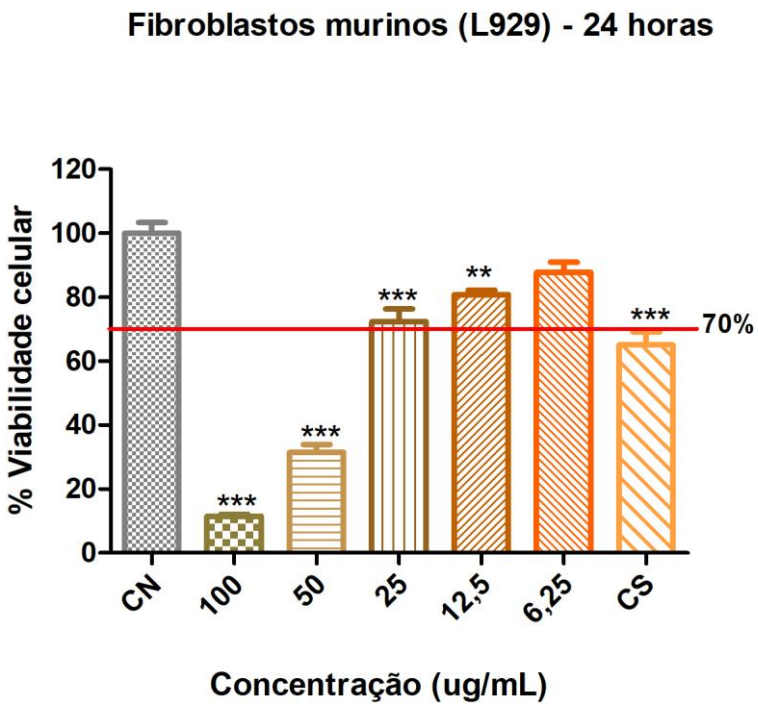
					241.1577		
8	8.7	285.0789	$C_{15}H_{10}O_6$	11.5	268.0420; 243.0653; 211.0419; 164.0118; 151.0043; 136.0186; 119.0508; 108.0233	Kampferol	March *et al*., 2004
9	8.9	299.0553	$C_{16}H_{12}O_6$	11.5	284.0328; 283.0230	Kampferide	
10	9.0	179.0370	$C_9H_8O_4$	6.5	135.0464	Ácido cafeico	Li *et al*., 2003; Sinosaki *et al*., 2020
11	9.3	283.0609	$C_{16}H_{12}O_5$	11.5	268.0386; 151.0043	Acacetina	Sun *et al*., 2019
12	10.4	299.1690	$C_{19}H_{24}O_3$	8.5	255.1819; 200.1261	Artepilin C	

Legenda: R_t: tempo de retenção; $[M-H]^-$ (*m/z*): relação massa carga**;** RDB: Rings and Double Bond Equivalents; EM/EM (EM^2):espectrometria de massas em tandem.

6.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A avaliação da viabilidade celular foi realizada com a linhagem de células de fibroblastos murinos (L929), queratinócitos murinos (HaCaT) e melanomas murinos (B16F10), tratadas com soluções de diferentes concentrações (100 – 6,25 µg/mL) do extrato BdAcOEt. Os resultados, após 24 h de tratamento, para a linhagem de fibroblasto estão expressos no gráfico 1.

Gráfico 1. Viabilidade celular de fibroblastos murinos (L929) expostos a tratamento com extrato de BdAcOEt - 24 h.

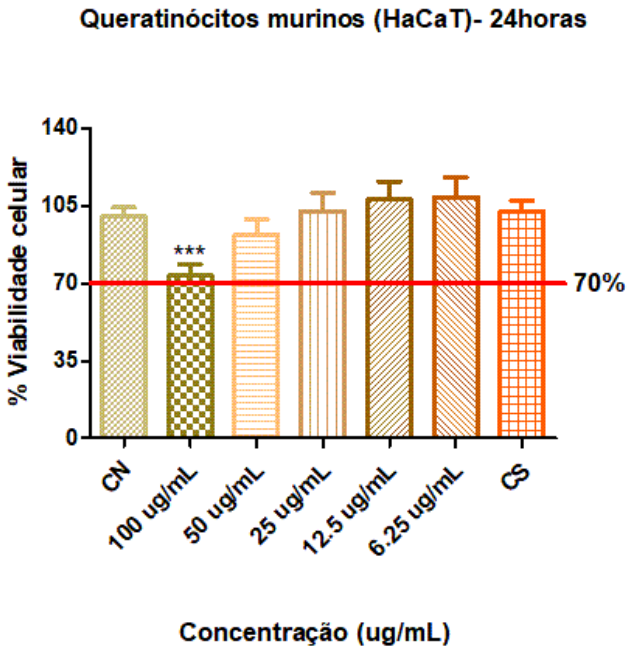


Legenda: Viabilidade celular da linhagem de fibroblastos murinos L929 após tratamento com extrato de BdAcOEt por 24 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle. Dados apresentados por média ± desvio padrão. O asterisco indica significância estatística, comparando o CN com as concentrações de extrato testadas (***p < 0,05); a barra indica a significância estatística, comparando o CS com as concentrações testadas (***p < 0,05; **p < 0,05; *p < 0,05) (One – Way ANOVA, seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados) C.S: controle do solvente, CP: controle positivo.

De acordo com a ISSO 10993-5 (2009), uma amostra teste possui alto potencial citotóxico para a célula quando apresenta viabilidade celular menor que 70%. Dessa forma, é possível observar no gráfico 1 que todas as médias das

concentrações testadas se apresentaram diferentes estatisticamente (p<0,05) em comparação com o controle negativo. Porém, apenas a concentração de 6,25 µg mL^{1} não apresentou diferença significativa, e apresentou viabilidade celular de 87,5%. As concentrações, de 12,5 e 25 µg mL^{-1} apesentaram viabilidade celular significativa (72,3% e 80,0 % respectivamente). Por outro lado, a viabilidade celular da linhagem de queratinócitos (HaCaT), em um período de incubação de 24 horas (gráfico 2), se mostrou semelhante ao perfil demonstrado pela L929 para as menores concentrações.

Gráfico 2. Viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) expostos a tratamento com extrato de BdAcOEt - 24 h.



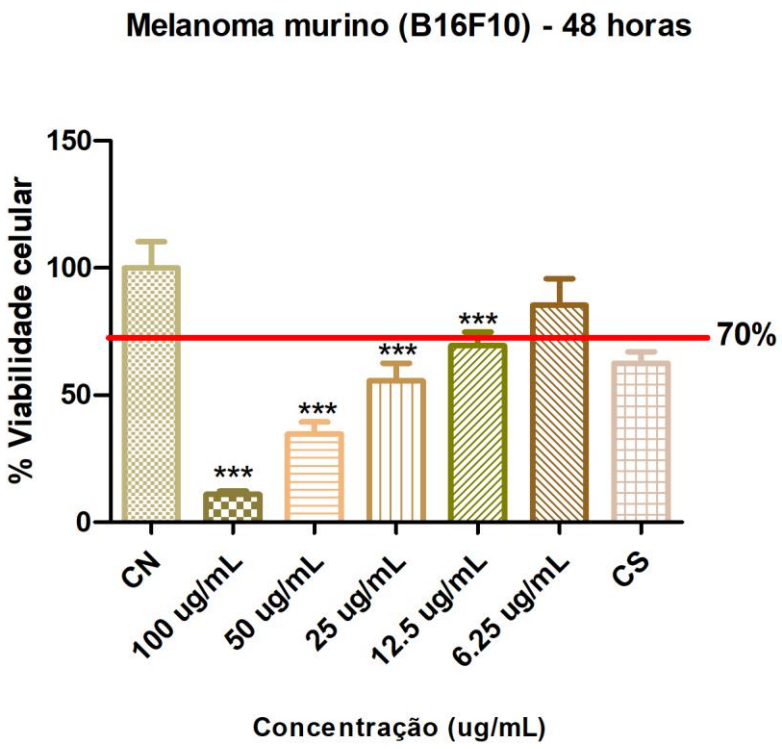
Legenda: Viabilidade celular da linhagem de queratinócitos murinos (HaCaT) após tratamento com extrato de BdAcOEt por 24 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle. Dados apresentados por média ± desvio padrão. O asterisco indica significância estatística, comparando o CN com as concentrações de extrato testadas (***p < 0,05); a barra indica a significância estatística, comparando o CS com as concentrações testadas (***p < 0,05) (One – Way ANOVA, seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados) C.S: controle do solvente, CP: controle positivo.

Diferente dos fibroblastos, para os queratinócitos a maior concentração do extrato (100 µg mL^{-1}) apresentou viabilidade celular um pouco acima de 73,3%. Nenhuma concentração avaliada apresentou resultado abaixo dessa porcentagem

de 70%. Além disso, o extrato aparentemente, demonstrou propriedade nutritivas às células, o que pode ser observado na porcentagem crescente da viabilidade celular nas menores concentrações testadas ultrapassando 90% (102,6%;107,7%;108,9% - respectivamente correspondentes às concentrações de 25,12,5 e 6,125 µg mL^{-1}).

Contudo, para a linhagem de melanoma murino (B16F10) (gráfico 3), o resultado foi um pouco diferente. Todas as concentrações avaliadas do extrato reduziram significativamente a viabilidade de melanoma murinos em comparação ao controle negativo, indicando toxicidade às células viáveis, com exceção da concentração em 6,25 µg mL^{-1} (85,6%).

Gráfico 3. Viabilidade celular de melanoma murinos (B16F10) expostos a tratamento com extrato de BdAcOEt - 48 h.



Legenda: Viabilidade celular da linhagem de melanomas murinos (B16F10) após tratamento com extrato de BdAcOEt por 48 horas. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle. Dados apresentados por média ± desvio padrão. O asterisco indica significância estatística, comparando o CN com as concentrações de extrato testadas (***p < 0,05); a barra indica a significância estatística, comparando o CS com as concentrações testadas (***p < 0,05; **p < 0,05) (One – Way ANOVA, seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados) C.S: controle do solvente, CP: controle positivo.

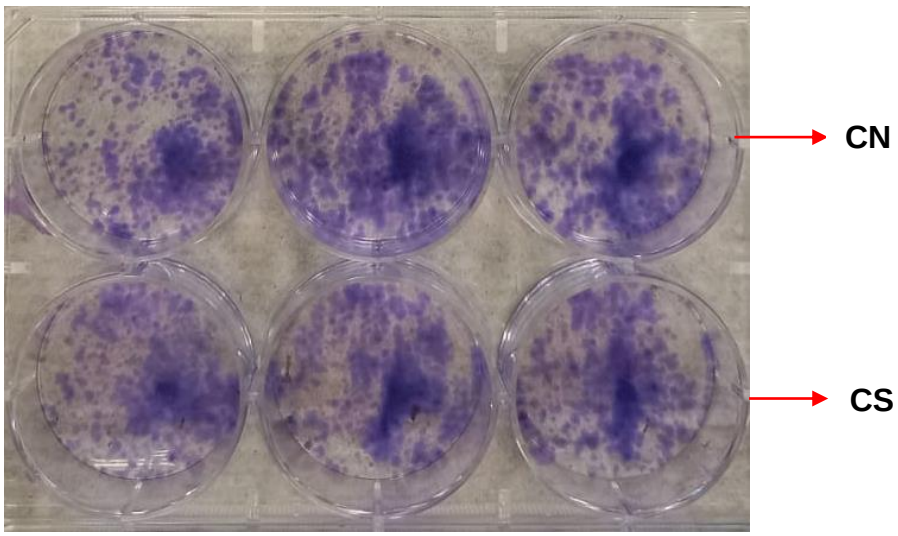
Assim, em relação a porcentagem de viabilidade celular, a concentração em 6,25 µg mL^{-1} do extrato foi a única com viabilidade acima de 70% (85,4%), sugerindo que o extrato possui propriedade nutritivas às células e não apresenta potencial de toxicidade. Por essa razão, esta foi a concentração escolhida para dar continuidade nos estudos e realizar o ensaio de clonogenicidade.

Rodrigues (2021), comprovou a atividade antiproliferativa, através do ensaio clonogênico, de compostos complexos de rutênio e derivados do ácido cinâmico, testados com células de melanoma humano. Visto que o câncer de pele possui elevada incidência no Brasil e no mundo, a investigação de novos ativos que sejam capazes de diminuir e/ou inibir o crescimento das células cancerígenas é de extrema importância.

6.5 ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico avalia a capacidade de uma única célula tumoral formar colônias (clones), estimando seu potencial ilimitado de divisão, estabelecendo uma relação entre a dose do tratamento e a fração de células que mantem sua capacidade reprodutiva (FRANKEN, N.A.P. et al., 2006). A avaliação da proliferação celular, pelo ensaio de clonogenicidade, é observada a partir da formação ou não de colônias, e se o ativo em estudo é capaz de inibir a formação dessas colônias. No presente estudo, foi investigado a capacidade do extrato de BdAcOEt de inibir a formação de colônia de melanoma murinos (B16F10) após 8 dias de incubação. Na figura 11, observamos a formação de colônias após o tratamento com o controle negativo (CN) e o controle do solvente (CS).

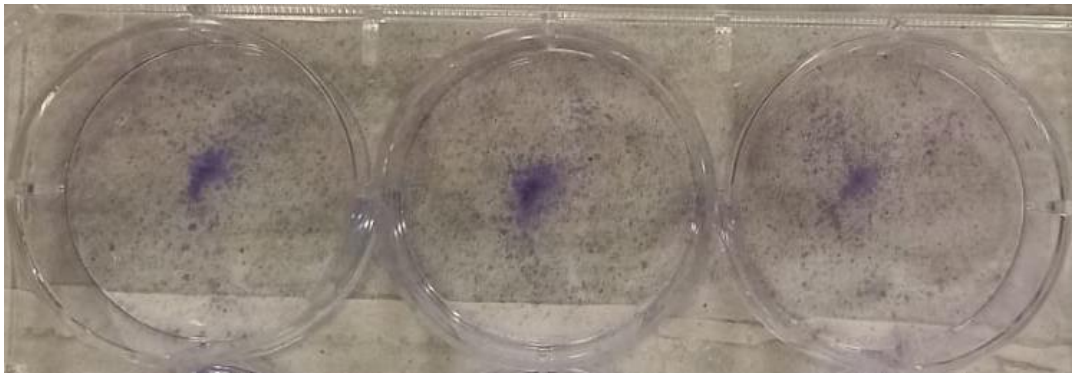
Figura 11. Formação de colônias de melanoma murinos (B16F10) após 8 dias de tratamento com CN: Controle negativo; CS: controle do solvente.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor, 2023.

Como observado na Figura 12, em ambas as amostras, é possível identificar um crescimento demasiado de colônias demonstrando que nenhum dos dois tratamentos interfere no crescimento das células. Por outro lado, após o tratamento com o extrato de BdAcOEt, no período de incubação de 8 dias, foi possível obervar visualmente, diminuição significativa no crescimento das colônias (Figura 12). Desta forma, o percentual de colônias formadas e observadas foi consideravelmente menor em comparação ao CN e ao CS, comprovando que o extrato BdAcOEt foi ativo em inibir a formação de colônias (Figura 12).

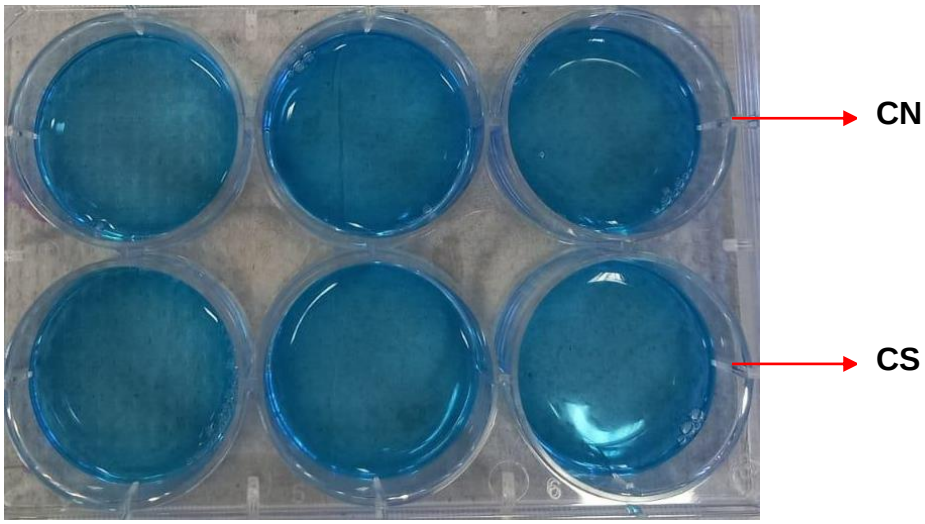
Figura 12. Formação de colônias melanoma murinos (B16F10) após 8 dias de tratamento com extrato de BdAcOEt.



Elaborado pelo próprio autor, 2023.

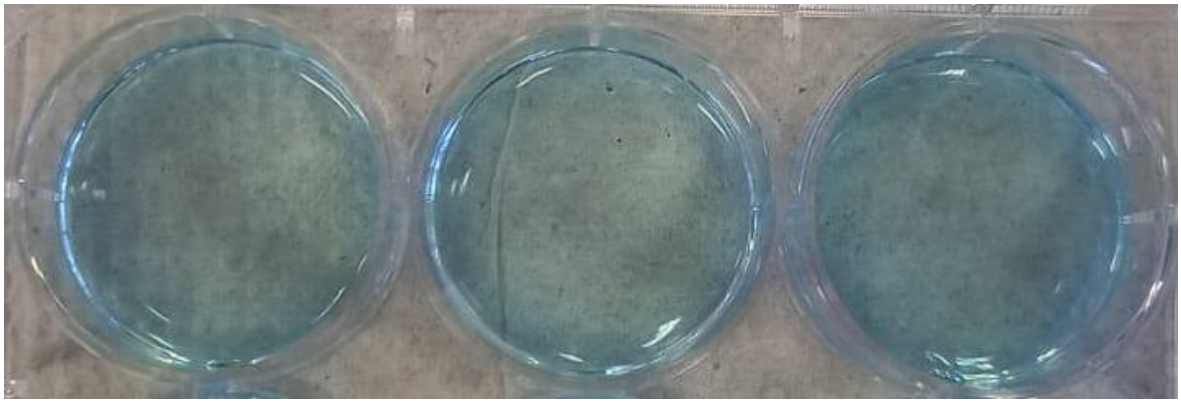
Por outro lado, o crescimento das colônias no CN e no CS foi intensa, o que dificultou a contagem manual das mesmas. Por essa razão, foi realizada a diluição das colônias com Lauril Sulfato de Sódio (LSS), e posterior quantificação com a leitura em espectrofotômetro (figura 13 e 14).

Figura 13: Diluição das colônias utilizando LSS. CN: controle negativo, CS: controle do solvente.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor, 2023.

Figura 14. Diluição das colônias formadas após tratamento com extrato de BdAcOEt, utilizando Lauril sulfato de sódio (LSS).



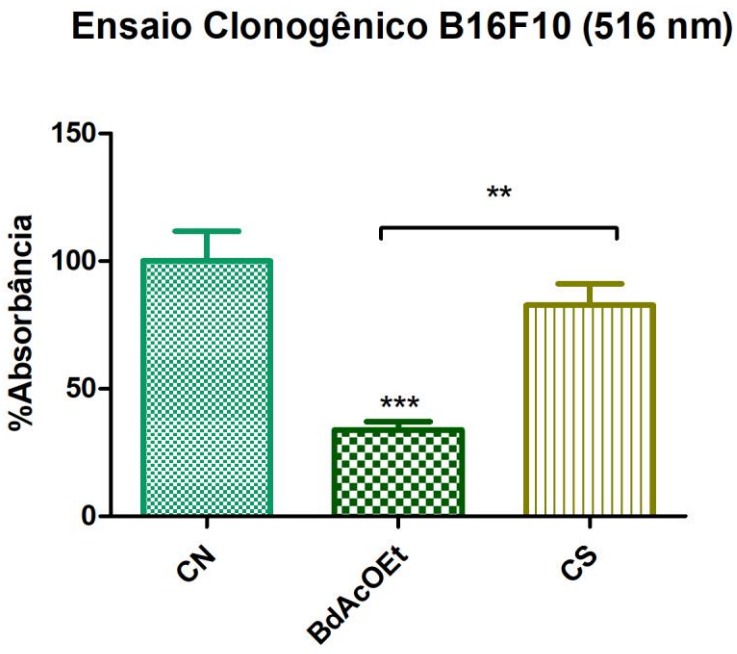
Fonte: Elaborada pelo próprio autor, 2023.

Após a diluição das colônias, foi feita a leitura da placa contendo o tratamento com o extrato no comprimento de onda de 516 nm, e em seguida foi feito a quantificação do percentual de inibição.

A atividade antiproliferativa do extrato frente às células de melanoma murino B16F10 pode ser justificada pela composição química do extrato BdAcOEt, o qual é rico em compostos fenólicos. É descrito na literatura o potencial antiproliferativo do ácido cinâmico, um fenólico encontrado em diversas espécies vegetais, frente a linhagem de melanoma humano (HT-144, CHL-1, SK-MAL-147) (RODRIGUES, ,2021). Há relatos na literatura também, da atividade antiproliferativa de outros compostos isolados presentes em extratos de *Baccharis dracunculifolia*, como por exemplo: isosacuranetina (DRIRA, 2015); acacetina (SINGH, et al, 2020), artepilin C (SHAHINOZZAMAN, et al, 2020), ácido cumárico (SHAHINOZZAMAN, et al, 2020), ácido cinâmico (Vale, 2022).A esses compostos, também é associada a atividade antioxidante, antimicrobiana, imunomoduladora, neuroprotetora, antiinflamatoria (DE OLIVEIRA, et al, 2014).

Sendo assim, os compostos anotados na caracterização química do extrato do presente estudo, justificam o potencial antiproliferativo encontrado no ensaio clonogênico.

Gráfico 4. % de absorbância dos poços corados com Giensa pelo ensaio de clonogenicidade (proliferação) em linhagem de melanoma murino (B16F10) após incubação por 8 dias com extrato de BdAcOEt.



Legenda: Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular em relação ao grupo controle. Dados apresentados por média ± desvio padrão; o asterisco indica a significância estatística da amostra

comparada com o controle negativo (***p < 0,05). A barra indica a significância estatística da amostra com o controle do solvente (**p < 0,05). (One – Way ANOVA, seguido do teste de Tukey com comparação múltipla dos dados) C.N: controle negativo, CS: controle do solvente.

No gráfico 4, observamos o resultado expresso em % de absorbância do ensaio clonogênico. No ensaio, foi avaliado o número de células viáveis dentro de cada poço após o tratamento com o CN, CS e o extrato BdAcOEt.

O controle negativo (DSMO) é o parâmetro para verificar que houve nenhuma inibição celular, ou seja, as células se mantêm viáveis durante o período de tratamento e, em consequência, a formação de colônias foi contínua. O controle do solvente (etanol 1%), deve se apresentar de forma semelhante ao controle negativo (como observado no gráfico 4). Os resultados mostram que, após a análise estatística, ambas as amostras CN e CS não apresentam diferença estatística significativa entre si, com as células apresentando 100% de viabilidade. Por outro lado, o tratamento com o extrato BdAcOEt apresentou percentual médio de redução de 33,75%, comprovando que o extrato BdAcOEt foi ativo inibindo a formação de colônias e, consequentemente, deixando o percentual de células viáveis consideravelmente menor que o CN e o CS.

Estudo semelhante desenvolvido por De Oliveira, et. al (2014) evidenciou um resultado similar comparando extrato de própolis verde, extrato de *Baccharis dracunculifolia* e as substâncias isoladas bacarina e artepilin C. Os autores realizaram o tratamento com diferentes células cancerígenas objetivando avaliar o potencial antiproliferativo das substâncias em estudo. Dentre as células estudas, os melanoma murinos (B16F10), sob tratamento do extrato de *Baccharis dracunculifolia* na mesma concentração utilizada no presente estudo (6,25 µg mL^{-1}), apresentou um IC_{50} e um índice de seletividade significativo (127,8±7,6; 1,6). Além disso, os autores também avaliaram os compostos isolados bacarina e artepilin C, constituintes de maior concentração presentes no extrato. De igual forma, estas substâncias apresentaram índices de seletividade e $IC_{50,}$ significativos, demonstrando que o extrato e os compostos isolados possuem potencial antiproliferativo frente à melanoma, corroborando os resultados encontrados no presente estudo.

Portanto, é possível inferir que os extratos vegetais cuja composição química é rica em compostos fenólicos possui potencial significativo para a redução de células cancerígenas, sobretudo de melanoma murinos, o que pode indicar atividade

semelhante para células de melanoma humano. No entanto, é necessário avançar nas investigações, principalmente no que tange ao desenvolvimento de um novo fármaco contendo essas substâncias isoladas.

7 CONCLUSÃO

A análise do extrato em acetato de etila por CLUE-EM-QTOF permitiu a anotação de 12 compostos, os quais já foram identificados anteriormente na espécie, como o ácido cumárico, o artepilin C, a acacetina, o kaempferol e o ácido cafeico. A quantificação de artepilin C neste extrato apresentou concentração de 1,2 µg/mL.

Com relação às atividades antiproliferativas, o extrato em acetato de etila de *B. dracunculifolia* apresenta baixa toxicidade nas células viáveis das linhagens celulares de fibroblastos murinos (L929), queratinócitos (HaCaT) e melanoma (B1610F). Além disso, este extrato foi capaz de inibir a formação de colônias frente a linhagem celular B16F10, demonstrando atividade antiproliferativa promissora.

Por fim, este estudo demonstrou que o extrato de ápice foliar em acetato de etila de *Bd*, similar à própolis verde, possui potencial ação antiproliferativa e abrem perspectivas para a exploração desta espécie para o desenvolvimento de insumos ativos em preparações para melanoma.

Contudo, estudos adicionais são necessários para aprofundar a compreensão dos mecanismos de ação e do potencial de utilização clínica.

REFERÊNCIAS

AUSTIN, E. *et al.* Laser and light-based therapy for cutaneous and soft-tissue metastases of malignant melanoma: a systematic review. **Archives of dermatological research**, 1 maio. 2017. v. 309, n. 4, p. 229–242.

BACHIEGA, T. F.; DE SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. **Natural Product Research**, v. 27, n. 18, p. 1646–1650, 2013.

BENGUEDOUAR, L. *et al.* Algerian ethanolic extract of Propolis and galangin decreased melanoma tumour progression in C57BL6 mice. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, 2015. v. 142, n. 6–7, p. S294.

BERNARDES, C. T. V. *et al.* Disinfectant activities of extracts and metabolites from Baccharis dracunculifolia DC. **Letters in Applied Microbiology**, 1 ago. 2022. v. 75, n. 2, p. 261–270.

BRANDENBURG, M. M. *et al*. Baccharis dracunculifolia (Asteraceae) essential oil displays anti-inflammatory activity in models of skin inflammation,**Journal of Ethnopharmacology**. V. 259. 2020. 112840.

BOEING, T. *et al.* Gastric healing effect of p-coumaric acid isolated from Baccharis dracunculifolia DC on animal model. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2021. v. 394, n. 1, p. 49–57.

BONIN, E. *et al.* Baccharis dracunculifolia: Chemical constituents, cytotoxicity and antimicrobial activity. **Lwt**, 2020. v. 120, p. 108920. Disponível em:

CASAGRANDE, M.; ZANELA, J.; JÚNIOR, A. W.; BUSSO, C.; WOUK, J.; IURCKEVICZ, G.; MALFATTI, C. R. M. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of Baccharis dracunculifolia: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. **Industrial Crops and Products**, v. 125, p. 207–219, 2018.

CAMPOCCIA, D. *et al.* Exploring the anticancer effects of standardized extracts of poplar-type propolis: In vitro cytotoxicity toward cancer and normal cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2021. v. 141, p. 111895. Disponível em:

CAZELLA, L. N. *et al.* Antimicrobial activity of essential oil of baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae) aerial parts at flowering period. **Frontiers in Plant Science**, 2019. v. 10, n. January, p. 1–9.

CISILOTTO, J. *et al.* Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF/MS2 chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis: Uncommon presence of piperidinic alkaloids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2018. v. 149, p. 502–511.

COSTA, P.; et al. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-*O*-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 226, 82-89, 2018.

CHANSRINIYOM, C.; et.al. Tamdem mass spectrometry of aqueous extract from *Ficus dubia* sap and its cell-based assessments for use as a skin antioxidant. **Scientific Reports**, v. 11, 16899, 2021.

DAIKH, A. *et al.* Comparative study of antibiofilm, cytotoxic activity and chemical composition of Algerian propolis. **Journal of Apicultural Research**, 2020. v. 59, n. 2, p. 160–169.

DRIRA, R., SAKAMOTO, K. Isosakuranetin, a 4′-O-methylated flavonoid, stimulates melanogenesis in B16BL6 murine melanoma cells**, Life Sciences**, V.143.Pag. 43-49. ISSN 0024-3205.2015.

DESSINIOTI, C. *et al.* EJC Skin Cancer Independent association of sex , age and the melanoma subtype with histological regression in invasive melanomas : A retrospective study. **EJC Skin Cancer**, 2024. v. 2, n. February, p. 100020.

DE OLIVEIRA, P. F.; DE SOUZA LIMA, I. M.; MUNARI, C. C.; BASTOS, J. K.; DA SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C. Comparative evaluation of antiproliferative effects of Brazilian green propolis, its main source *Baccharis dracunculifolia*, and their major constituents artepillin C and baccharin. **Planta medica**, v. 80, n. 06, p. 490-492, 2014.

DE OLIVEIRA, D.T. **Avaliação do potencial fotoprotetor e da atividade inibitória da tirosinase de extratos de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae).** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2019.

DE OLIVEIRA, T. D., RIANI, L. R., COSTA, M. P., FABRI, R. L., NASCIMENTO, J. W. L., SILVA, F. P., DA SILVA FILHO, A.A., TAVARES, G. D. *Baccharis dracunculifolia* extract-loaded chitosan nanoparticles: development, physicochemical characterization and cytotoxicity evaluation. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 7, p. 72010-72022, 2021.

FERREIRA, E. A. *et al. Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) Root Extract and Its Triterpene *Baccharis* Oxide Display Topical Anti-Inflammatory Effects on Different Mice Ear Edema Models. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2023. v. 2023.

FRANKEN, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, 2006. v. 1, n. 5, p. 2315–2319.

GUIMARÃES, N.S.S.; MELLO, J.C.; PAIVA, J.S.; BUENO, P.C.P.; BERRETTA, A.A.; TORQUATO, R.J.; NANTES, I.L.; RODRIGUES, T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food Chemestry Toxicology**, v. 50, p. 1091–1097, 2012.

HENCH, J. *et al.* Clinical, histopathological and molecular features of dedifferentiated melanomas: An EORTC Melanoma Group Retrospective Analysis. **European Journal of Cancer**, 2023. v. 187, p. 7–14. Disponível em:.

ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. [s.d.]. Disponível em:

ISO 113581. INTERNATIONAL STANDARD iTeh STANDARD iTeh STANDARD PREVIEW. **International Organization for Standardization**, 2015. v. 10406– 1:20, p. 3–6.

JUNIOR, M. R. M.; et. al. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. **Food Science and Technology**, v. 28(1), 178-181, 2008.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.

LEONARDI, G. C. *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International journal of oncology**, 1 abr. 2018. v. 52, n. 4, p. 1071–1080.

LIMA, D. R. F. DE. E Potencialidades Da Própolis Verde E Sua Fonte Botânica *Baccharis* Evaluation of Properties and Potentials of Propolis Green and Its Botanical Source. 2019. p. 93–110.

LI, W.; SUN, Y.; LIANG, W.; FITZLOFF, J.F.; BREEMEN, R. B. V. Identification of caffeic acid derivatives in *Actea racemose* (*Cimicifuga racemose*, black cohosh) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.17, 978-982, 2003.

LIN, S. R. *et al.* Natural compounds as potential adjuvants to cancer therapy: Preclinical evidence. **British Journal of Pharmacology**, 2020. v. 177, n. 6, p. 1409–1423.

LUCHESI, A. L. *et al*. Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of essential oils from *Baccharis dracunculifolia* and Pogostemon cablin against Fusarium graminearum, **Natural Product Research**. V.36, Issue 3. 2022. Pag. 849-852. ISSN 1478-6419.

MAGAÑA, A. A.; KAMIMURA, N.; SOUMYANATH, A.; STEVENS, J. F.; MAIER, C. S. Caffeoylquinic acids: chemistry, biosynthesis, occurrence, analytical challenges, and bioactivity. **The Plant Journal**, 2021.

MARCH, R. E.; MIAO, X. S. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 231, 157-167, 2004.

MARQUIAFÁVEL, F. S.; NASCIMENTO, A. P.; BARUD, H. S.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; FREITAS, L.A.P.; BASTOS, J.K.; BERRETTA, A.A. Development and characterization of a novel standardized própolis dry extract obtained by factorial design with high artepilin C contente. **Journal of Pharmaceutical Technology & Drug Research**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2015.

MARTINEZ CORREA, H. A.; CABRAL, F. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; GODOY, A. T.; SÁNCHEZ CAMARGO, A. P.; Paviani, L. C. Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO_2, ethanol and water*.* ***The Journal of Supercritical Fluids****,* v*.* 63*,* p. 31–39, 2012.

MONTEIRO, R. G. AMANDA ALVIM NEGRETI RODRIGUES Efeitos de complexos de rutênio (II) contendo derivados do ácido cinâmico sobre células derivadas de melanoma humano Efeitos de complexos de rutênio (II) contendo derivados do ácido cinâmico sobre células derivadas de me. 2021. n. 35.

MONTEIRO, R. C.; KISHORE, B. N.; BHAT, R. M.; SUKUMAR, D.; MARTIS, J.; GANESH, H. K. A comparative study of the efficacy of 4% hydroquinone vs 0.75% kojic acid cream in the treatment of facial melasma. **Indian journal of dermatology**, v. 58, n. 2, p. 157, 2013.

MOSES, C. *et al.* Hallmarks of cancer: The CRISPR generation. **European Journal of Cancer**, 2018. v. 93, p. 10–18.

MOSSMAN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. V. 65. Pag.55-63.1983.

NAGATANI, Y. *et al*. Studies on the constituints from the aerial parto f *Baccharis dracunculifolia* DC. III. **Natural Medicines**, 1388-1394,2001.

NOBUSHI, Y. *et al.* Determination of artepillin-C in Brazilian propolis by HPLC with photodiode array detector. **Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences**, 2012. v. 2, n. 2, p. 127–131.

NÖR, F. *et al.* Propolis reduces the stemness of head and neck squamous cell carcinoma. **Archives of Oral Biology**, 2021. v. 125, p. 1–16.

OLIVEIRA, C.V., BASTOS, M.E.Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (*Asteraceae*) visando a identificação da origem botânica da própolis. **Acta bol. bras**. 12(3): 431-439.1998 (Suplemento).

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; PAREDES GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100–1103, 2004.

PAULINO, Niraldo *et al*. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1-3, p. 296-301, 2008.

RIANI, L. R.; SILVA, L. M. ; SILVA, O. O. Z.; JUNQUEIRA, L. R. ; NASCIMENTO, J.W. L. ; SILVA FILHO, A. A. Development and validation of a uhplc-esi-ms/ms method for the quantification of artepillin c in brazilian green propolis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 2021. v. 42, p. e727.

RIANI, L.R. **Artepilina C: isolamento, desenvolvimento e validação de metodologia de quantificação por CLUE-EM-Q-TOF e avaliação das atividades biológicas em *Caenorhabditis elegans* e Zebrafish.** 2017. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2017.

RIGOTTI, M. *et al*.Chemical and genetic diversity of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) from the Cerrado biome,**Biochemical Systematics and Ecology**,V. 111. 2023.

SHAHINOZZAMAN, Md et al. Artepillin C: A comprehensive review of its chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. **Fitoterapia**, v. 147, p. 104775, 2020.

SANTOS, D.A.; FUKUI, M.J.; NANAYAKKARA, D.N.P.; KHAN, S.I.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F.; SILVA FILHO, A.A.; QUINTÃO, N.L.M. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal Ethnopharmacol**, v. 127, p. 543–550, 2010.

SAWAYA, A.C.; TOMAZELA, D.M.; CUNHA, I.B.; BANKOVA, V.S.; MARCUCCI, M.C.; CUSTODIO, A.R.; EBERLIN, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*, v.129, n.8, p.739-744, 2004.

SILVA MONTEIRO, E. DA *et al.* Chemical and antibacterial properties of *Baccharis dracunculifolia* DC essential oils from different regions of Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, 2 nov. 2022. v. 34, n. 6, p. 524–532.

SINGH, Shilpi, et al. "Acacetin, a flavone with diverse therapeutic potential in cancer, inflammation, infections and other metabolic disorders." *Food and Chemical Toxicology* 145 (2020): 111708.

SINOSAKI, N. B. M.; TONIN, A. P. P.; RIBEIRO, M. A. S.; POLISELI, C. B.; ROBERTO, S. B.; SILVEIRA, R.; VISENTAINER, J. V.; SANTOS, O. O.; MEURER, E. C. Structural study of phenolic acids by triple quadrupole mass spectrometry with electrospray ionization in negative mode and H/D isotopic exchange. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 31(2), 2020.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J..Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. **W.H. Freeman and Co.**3rd Edition. 1995.

TEIXEIRA, É. We. *et al*. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 85-92, 2005.

TIMBE, P. P. R. *et al.* Antimicrobial activity of *Baccharis dracunculifolia* DC and its synergistic interaction with nisin against food-related bacteria. **Journal of Food Science and Technology**, 2021. v. 58, n. 8, p. 3010–3018.

TSURUTA, H. et al.Enhanced production of IL-2 from anti-CD3 antibody-stimulated mouse spleen cells by artepillin C, a major component of Brazilian green propolis,**Journal of Oral Biosciences**,Vol.64.Issue 3.Pag 366-375.2022.

VALE, Juliana Alves do. **Prospecção de compostos derivados do ácido cinâmico com potencial antimelanoma.** 2022. 199 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2022.

VILAS-BOAS, I.T., *et al*. Optimized *Baccharis dracunculifolia* extract as photoprotective and antioxidant: In vitro and in silico assessment,**Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. V. 440. 2023. 114654. ISSN 1010-6030.

VEIGA, R. S.; et.al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122(4), 911-920, 2017.

ZHANG, C.; Shen, X.; Chen, J.; Jiang, X.; Hu, F. Identification of free radical scavengers from Brazilian green propolis using off-line HPLC-DPPH assay and LC-MS. **Journal of Food Science**, 1-6, 2017.

YIN, J.; MA, Y.; LIANG, C.; GAO, J.; WANG, H.; ZHANG, L. A systematic study of the metabolites of dietary acacetin in vivo and in vitro based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, 5530-5543, 2019.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. **Quimica Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005

ANEXO

Figura S1. UPLC-HR-MS/MS cromatograma em modo de ionização negativa do extrato do ápice da folha de B. dracunculifolia.

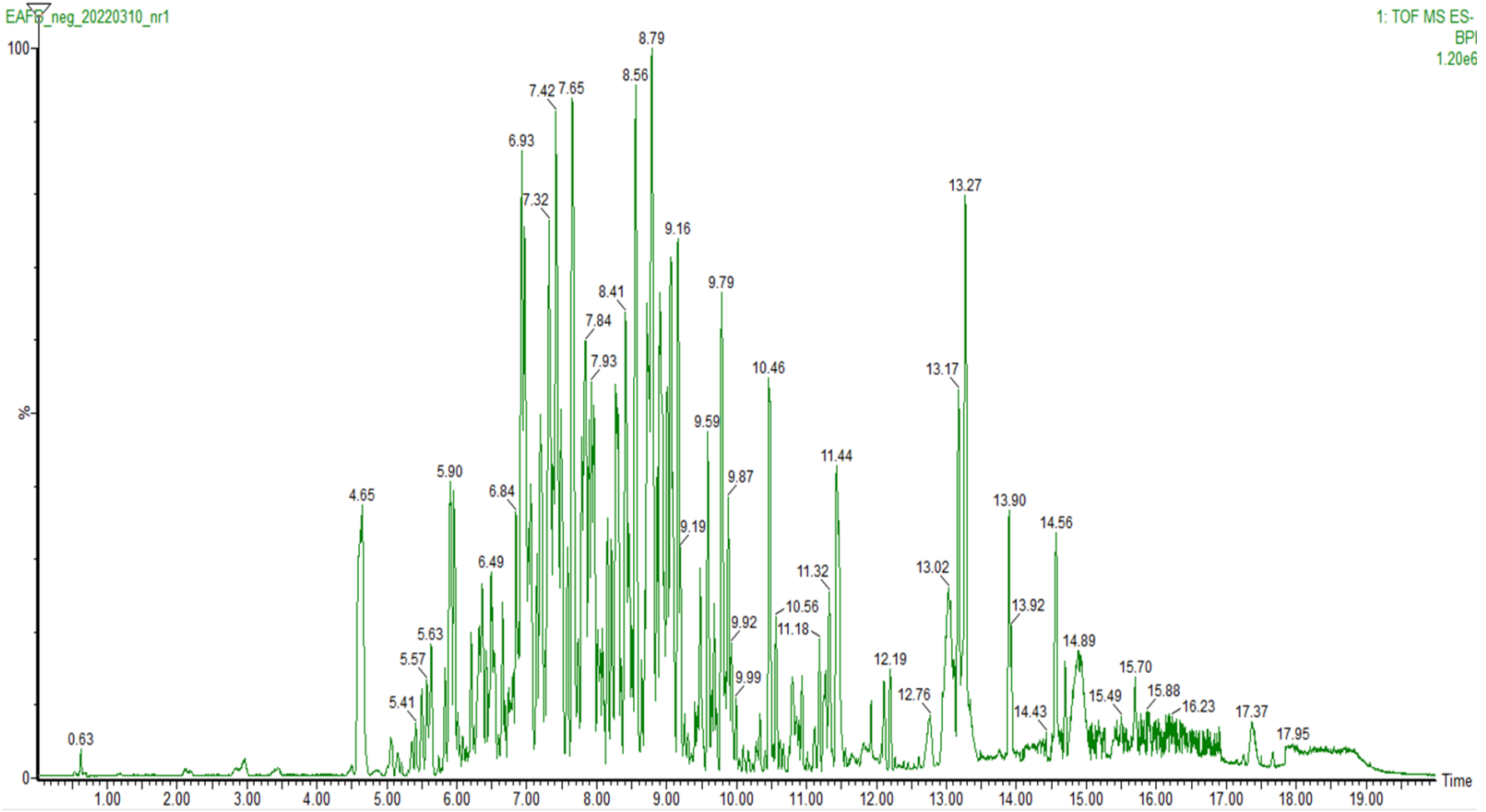


Figura S2. MS^2 espectro do ácido cumárico (**1**).

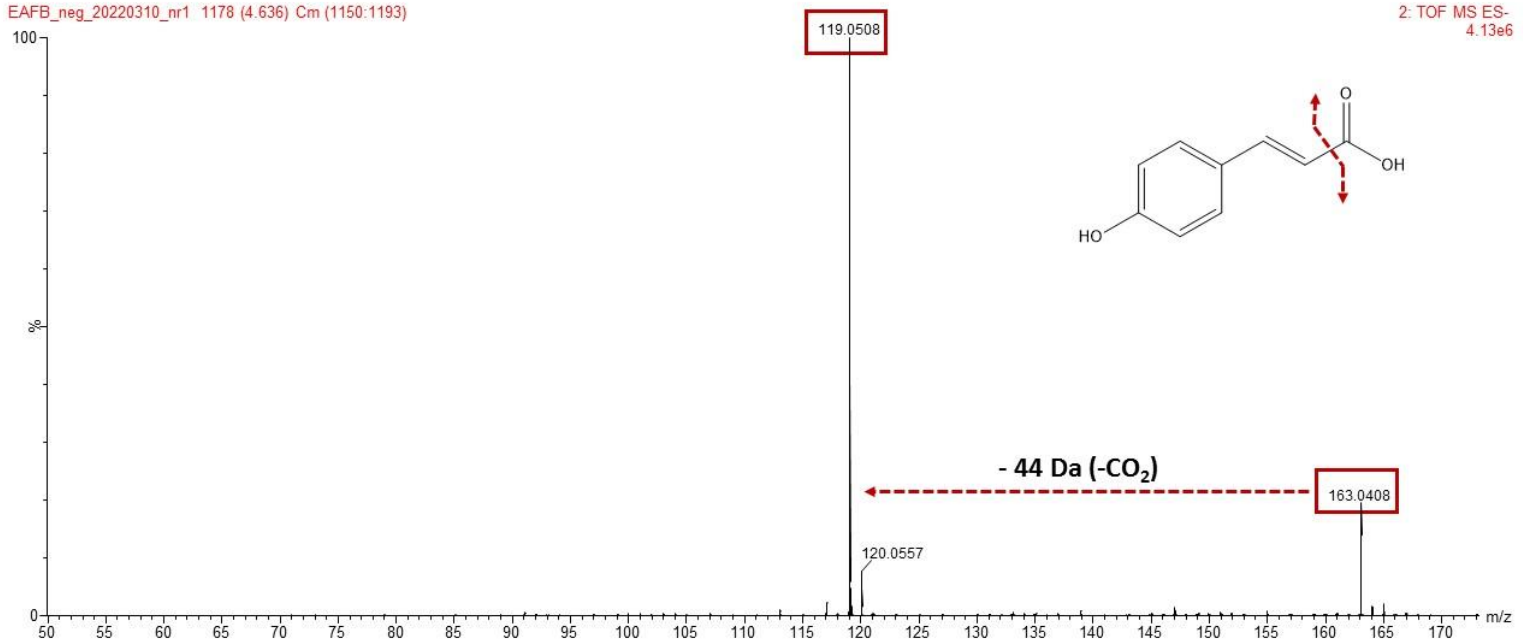


Figura S4. MS^2 espectro do artepilin C (**12**).

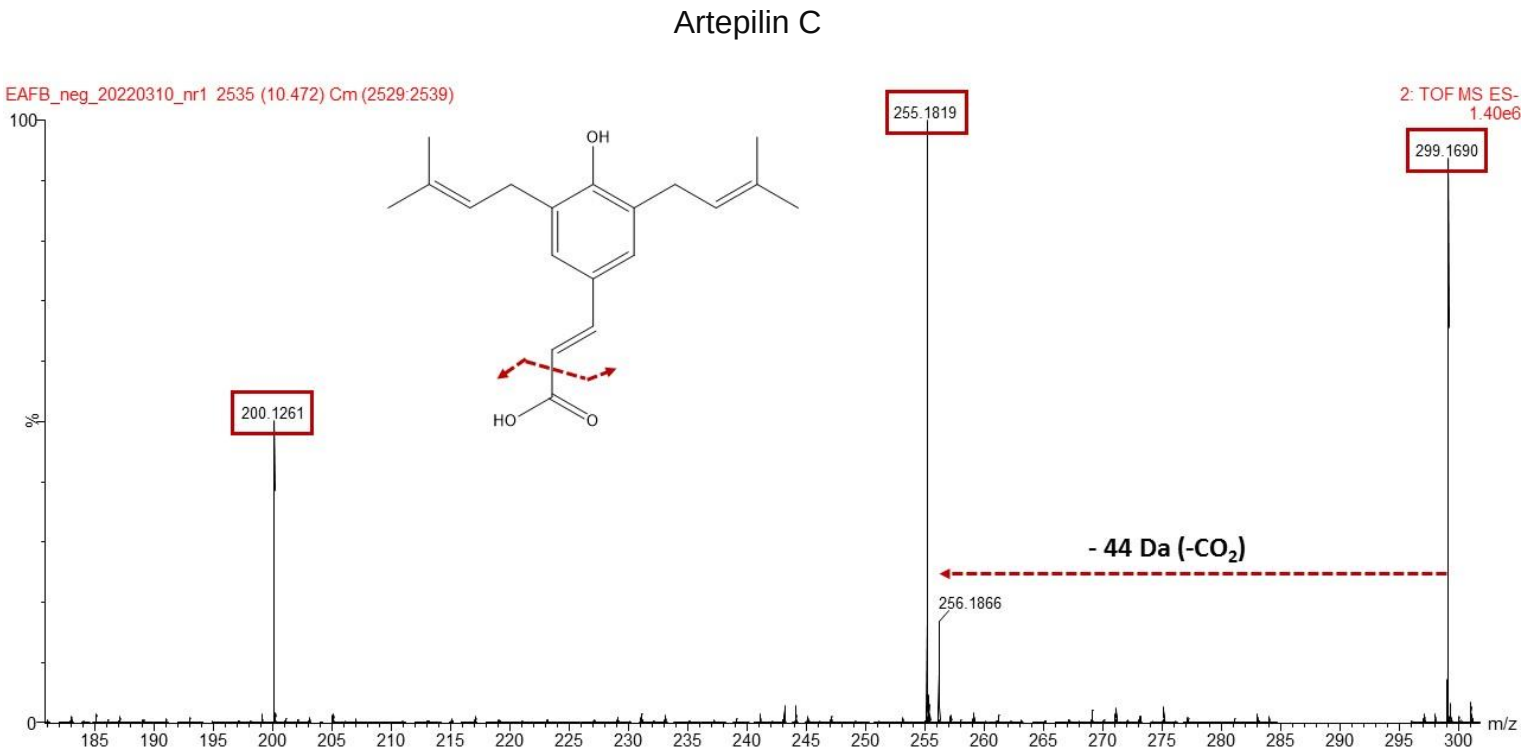


Figura S3. MS^2 espectro do ácido cafeico (**10)**

Ácido Cafeico

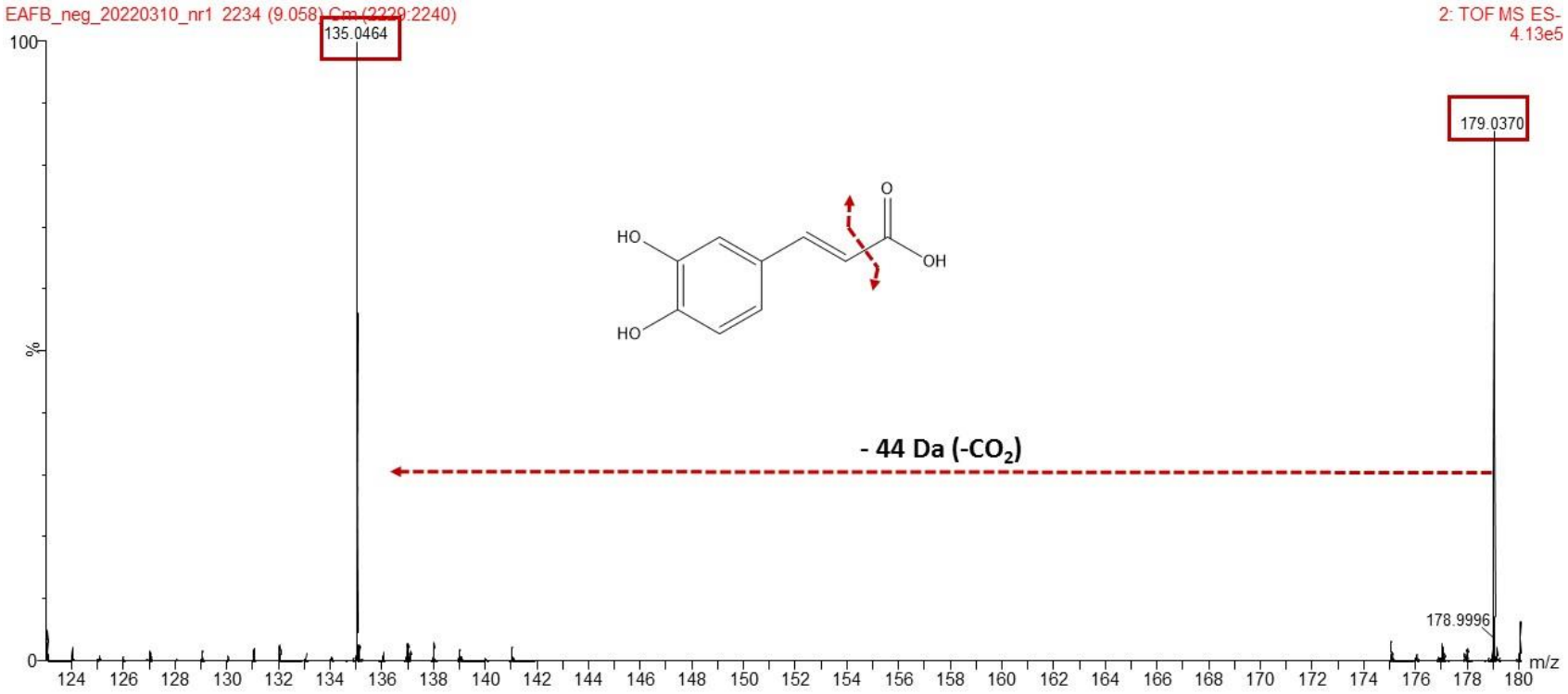


Figura S5. MS^2 espectro do 3-*O*- ácido cafeoilquínico (**2)**

3-*O*- ácido cafeoilquínico

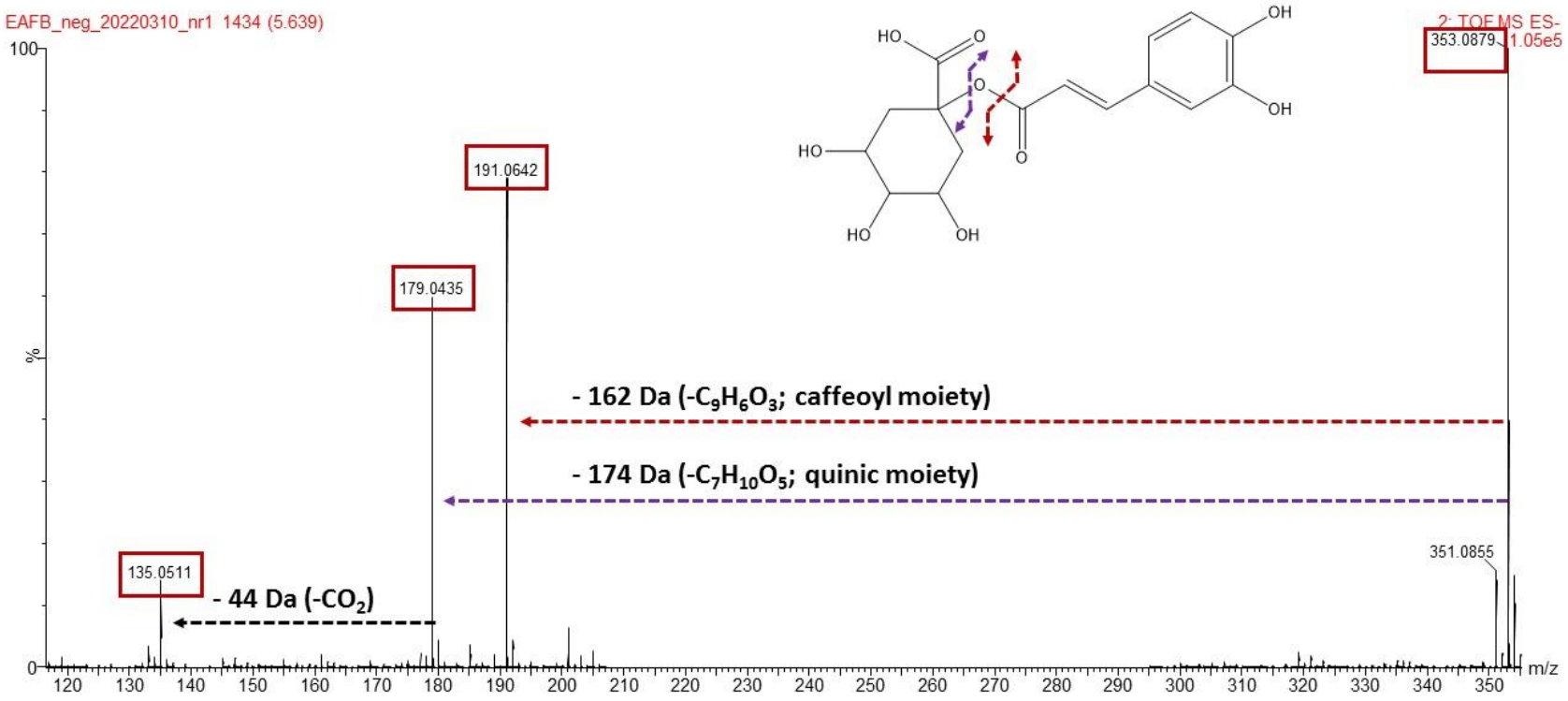


Figura S6. MS^2 espectro do 4-*O*- ácido cafeoilquínico (**4**).

4-*O*- ácido cafeoilquínico

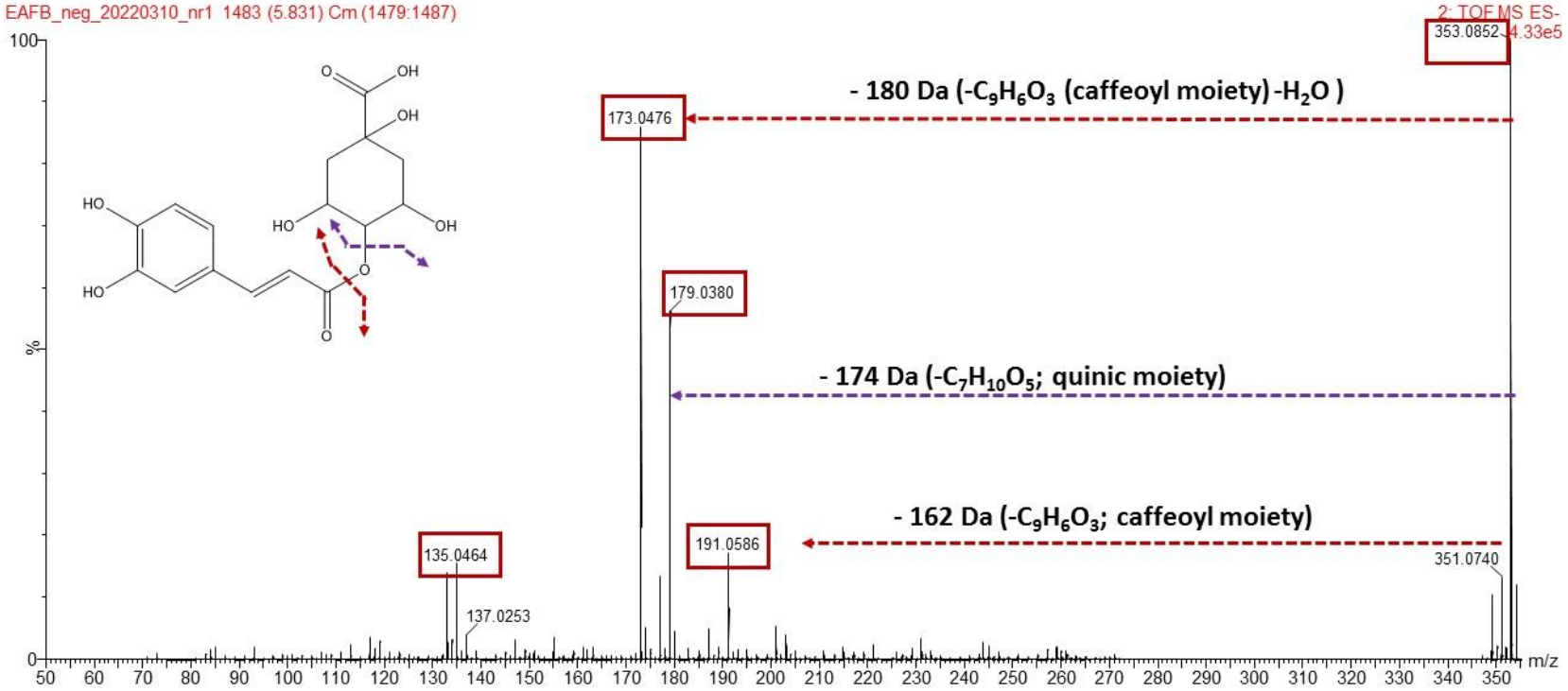


Figura S7. MS^2 espectro do 3,4- Ácido dicafeoilquínico (**3**).

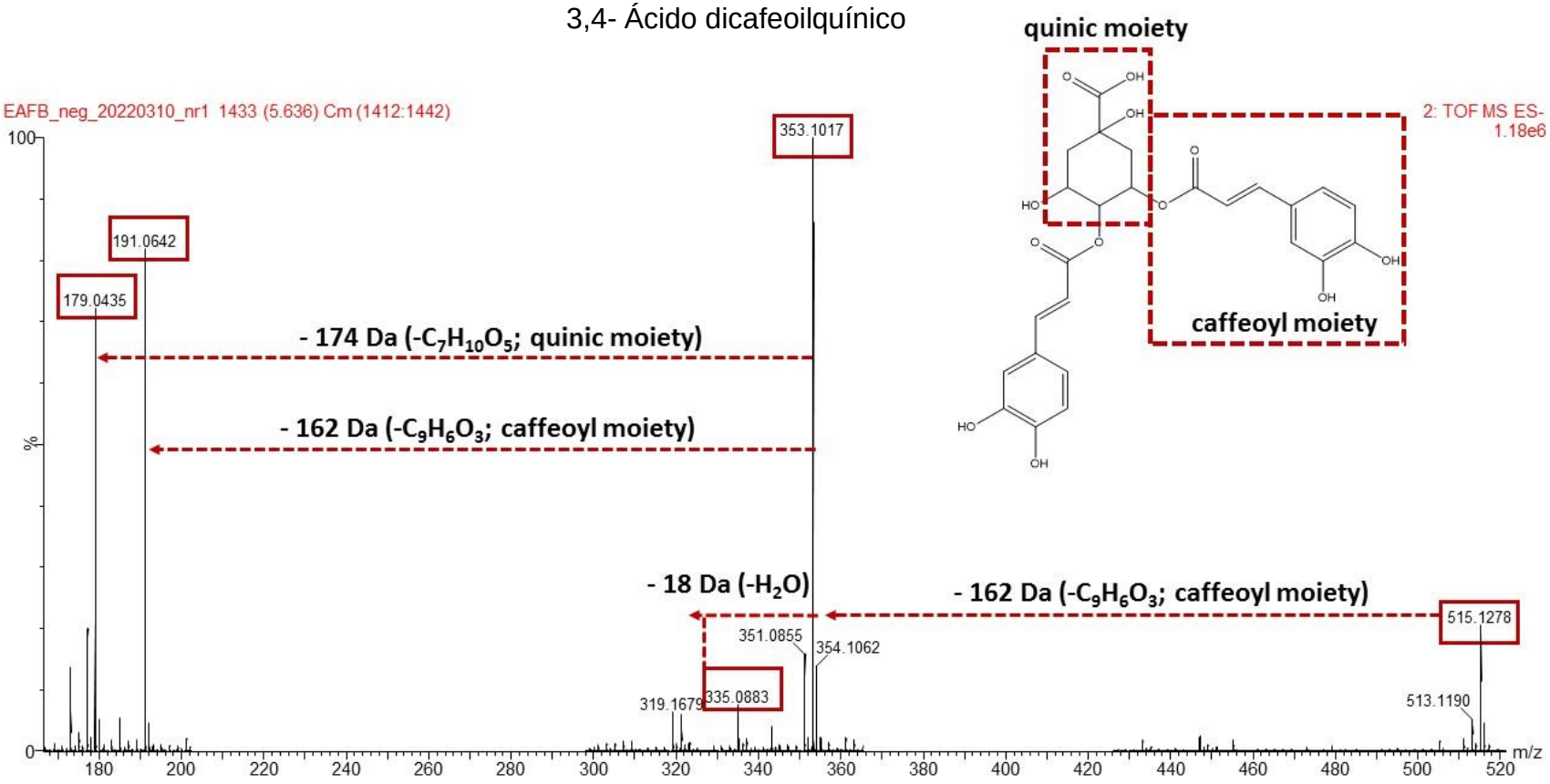


Figura S8. MS^2 espectro do 4,5-Ácido dicafeoilquínico (**5**).

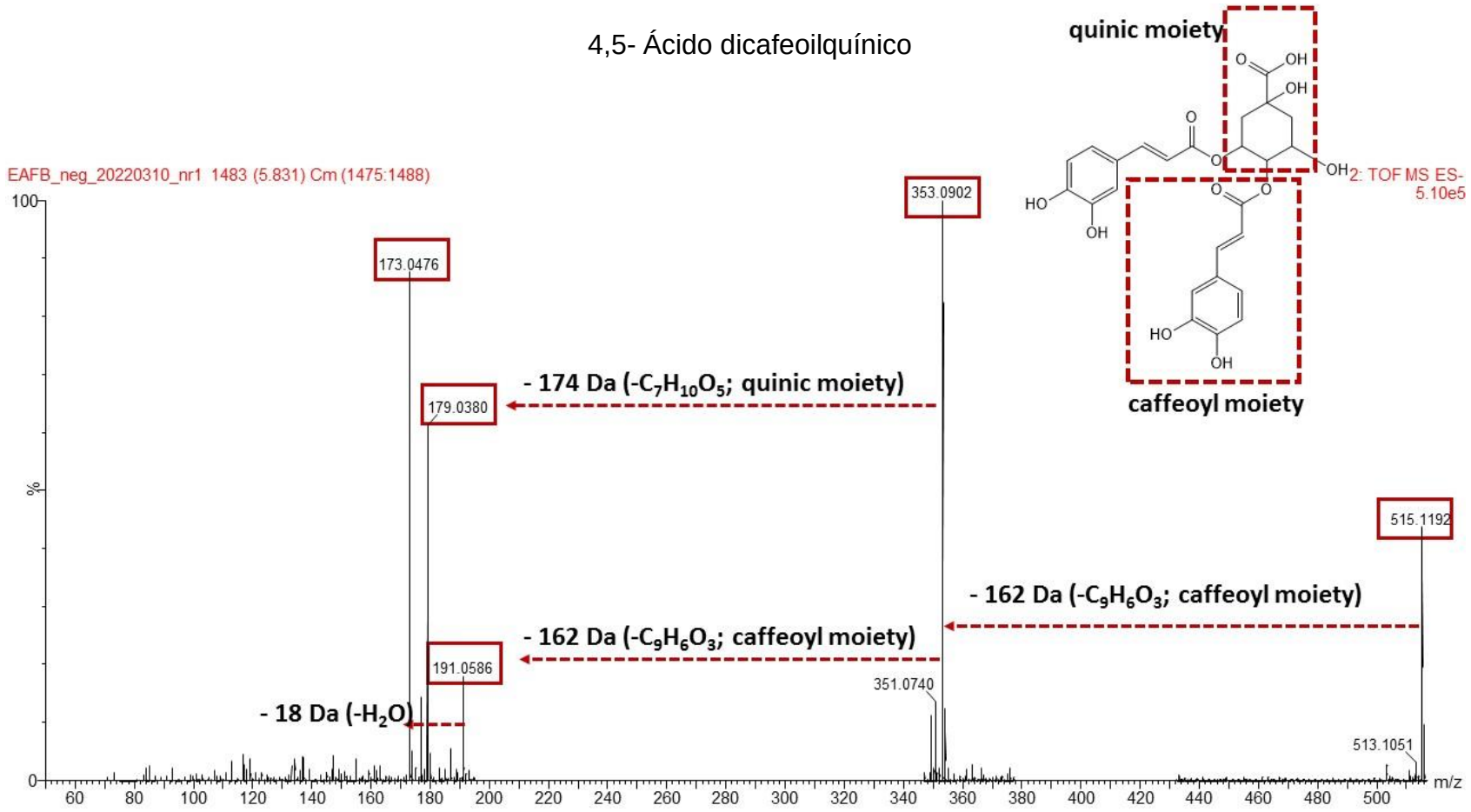


Figura S9. MS^2 espectro da aromadendrina 4-metil éter (**6**).

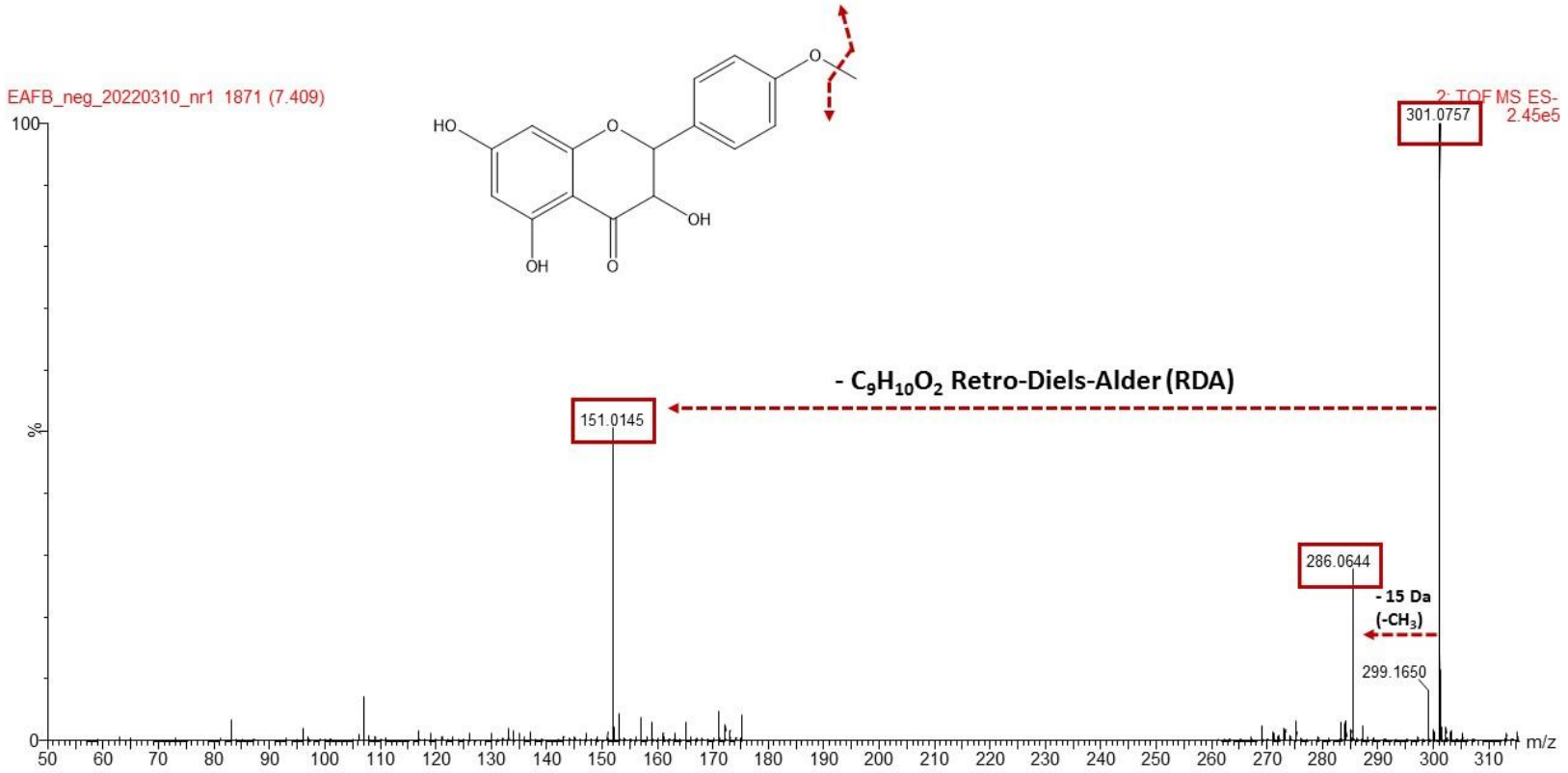


Figura S10. MS^2 espectro do betuletol (**7**).

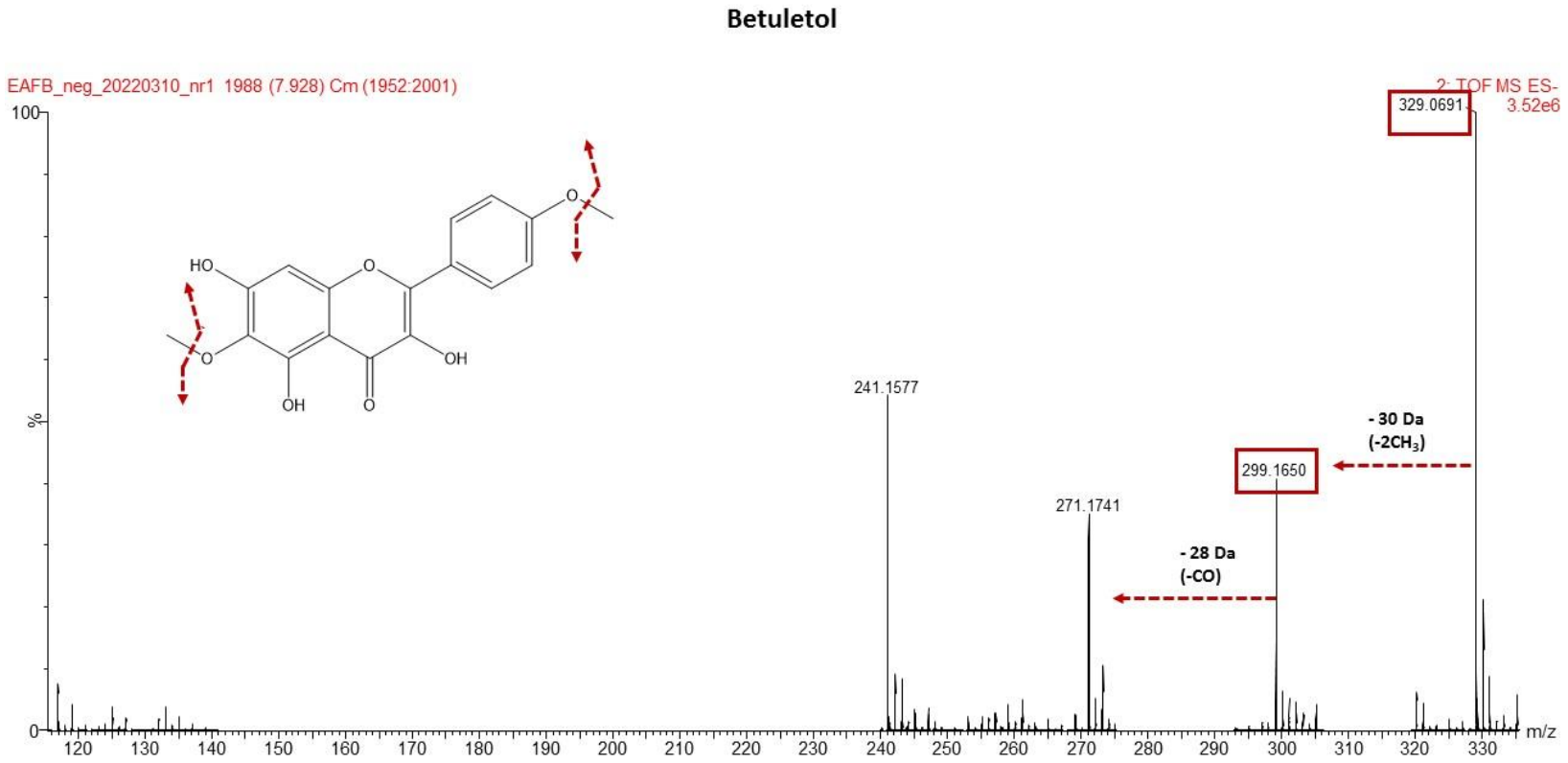


Figure S11. MS^2 espectro do kampiferide (**9**).

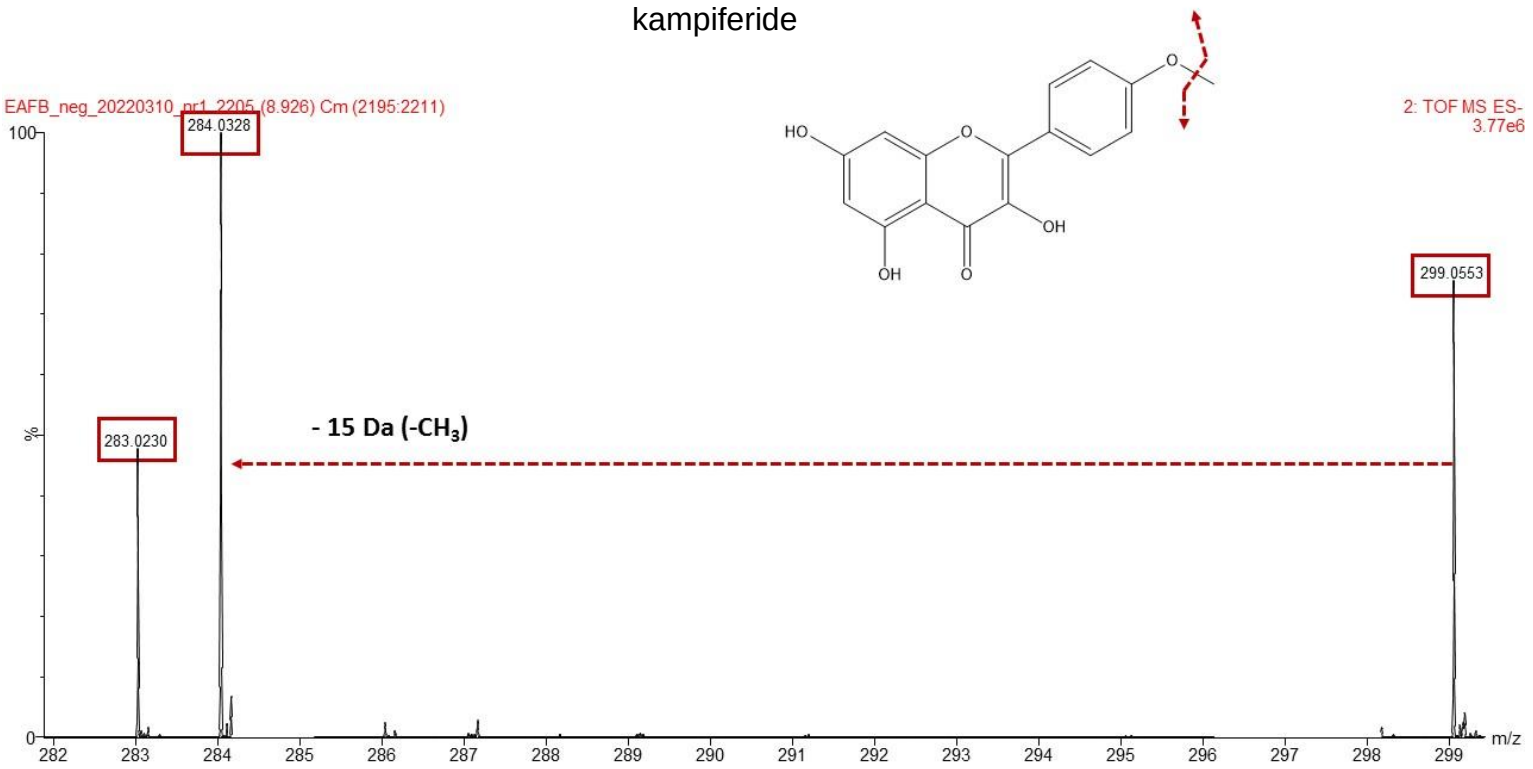


Figura S12. MS^2 espectro da acacetina (**11**).

Acacetina

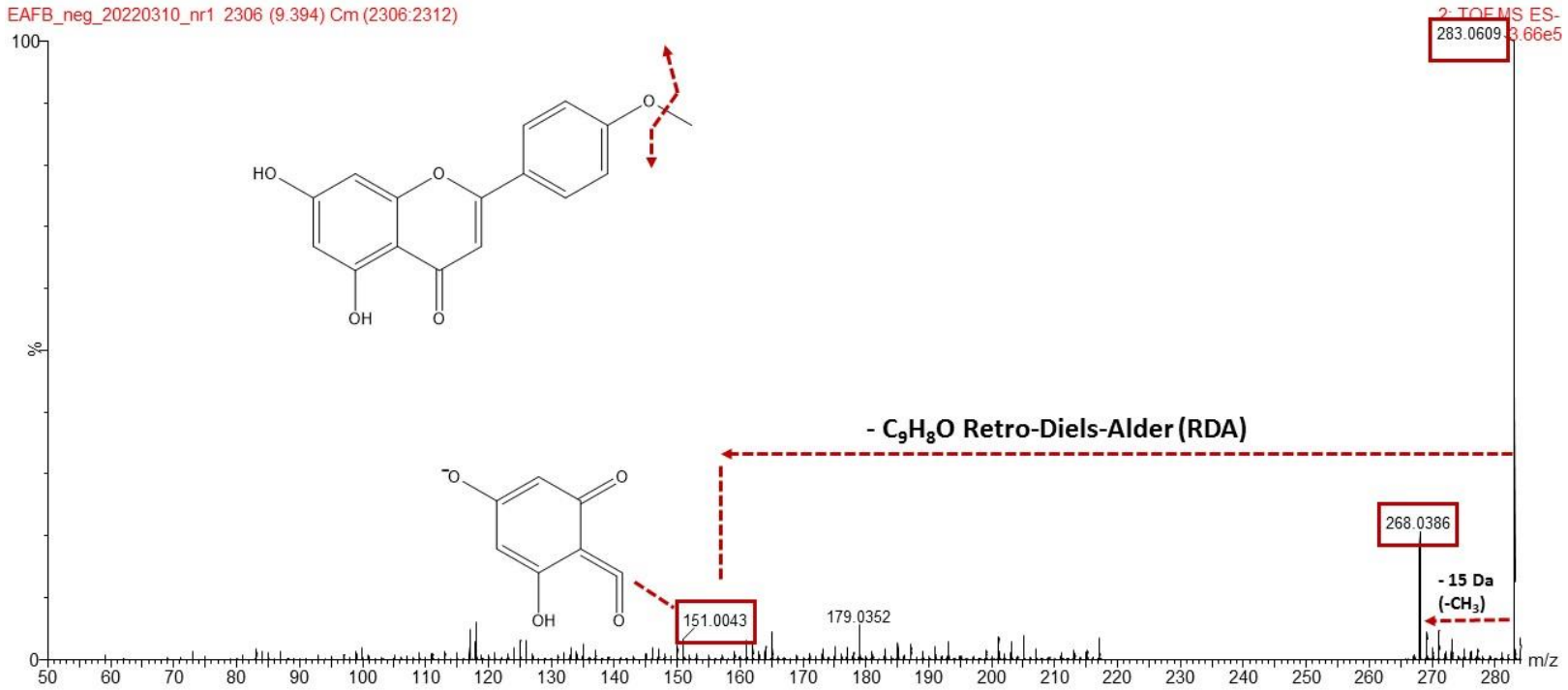


Figura S13. MS^2 espectro do kampeferol (**8**).

Kampeferol

