



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Centro de Biotecnologia

Programa de Pós Graduação em Biologia celular e Molecular

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGENICA DOS  
EXTRATOS DE *Baccharis trinervis* DO BRASIL E DA COLÔMBIA

Dissertação de Mestrado

VICTORIA PATRICIA JARAMILLO GARCIA

Porto Alegre

2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Centro de Biotecnologia  
Programa de Pós Graduação em Biologia celular e Molecular

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGENICA DOS  
EXTRATOS DE *Baccharis trinervis* DO BRASIL E DA COLÔMBIA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa  
de Pós Graduação em Biologia celular e Molecular da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial para a obtenção do grau de mestre em ciências

VICTORIA PATRICIA JARAMILLO GARCIA

Orientador: Prof. Dr. João Antônio Pegas Henriques

Co-orientador: Profa. Dra. Juliana Da Silva

Porto Alegre

2013

*“Não há limite para a produção de livros, e estudar demais deixa exausto o corpo”.*

*Eclesiastés 12:12.*

*“En adelante van estos lugares  
ya tienen su diosa coronada”*

*Leandro Díaz*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Henriques, por ter aceitado ser meu orientador, por abrir a porta que me permitiu vir ao Brasil. Nem preciso dizer que ele é “um grande cientista”, mas não é só isso, é um exemplo de trabalho, de esforço, de humildade.

A professora Juliana da Silva, minha co-orientadora, por todas as contribuições no trabalho, por cada vez que fez que eu ficasse calma, por cada conselho e por me ajudar a abrir a minha mente.

Ao professor Alexandre Ferraz, ao professor Sidnei Moura e a professora Dione Correa por fazer parte do projeto, e pela valiosa ajuda na parte fitoquímica.

Ao professor Milton Quintana, por ter me animado e ter batido portas junto comigo pra eu vir ao Brasil.

A professora Jaqueline Picada e ao professor Guido Lenz, por terem sido da minha comissão de acompanhamento.

Aos membros da banca, a professora Jaqueline Picada, a professora Mirian Salvador e a professora Claudia Ó Pessoa pelas suas sugestões, com certeza elas contribuíram ao melhoramento do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular por todos os ensinamentos durante as disciplinas.

Ao pessoal do laboratório 210, (alguns já não fazem mais parte do lab) por formar um ótimo lugar de trabalho, seja de dia, de noite, de segunda a sexta ou nos finais de semana, obrigada mesmo pela companhia, as conversas, as saidinhas, as comidas, as fofocas: Grethel, Lyda, Cristiano, Larissa, Michelle, Iuri, Juliane, André, Fernanda, Diana, Ana, Patricia, Clara, Iranez, Priscila, eles estão no meu coração.

Ao pessoal do GENOTOX-ROYAL, por todo o tempo convivido e a ajuda que sempre me brindaram.

A Nucha (Temenuga Nikolova Guecheva) pelas suas contribuições, especialmente na parte final do trabalho.

Ao Luciano e a Silvia, por ser como eles são, por sempre estar prestes pra ajudar com um sorriso.

A Miriam Benicio, pela grande ajuda ao corrigir o “portunhol” da dissertação e fazer que ele virasse “português” (Se tem erros nos agradecimentos é por que não mostrei pra ninguém).

Aos meus amigos colombianos, por ser o pedacinho da minha terra aqui, por tudo o tempo convivido, por que eu sentia que estava na Colômbia estando perto de eles, por me ajudar a matar as saudades de casa.

Aos meus amigos “falantes de espanhol” por que sempre foi bom encontrar eles e bater um papo na minha língua.

A gurizada da IBC, em especial as gurias de PG, ao Gabriel, ao Rempel e ao Alejandro, por ser uma benção na minha vida.

A Carolina, a Grethel e a Lyda; por todas as vezes que a gente “fez família”, por tudo o que me aguentaram, pela força e ajuda em todo.

Aos meus amigos que ficaram na Colômbia, por que eu sinto a torcida ainda na distância.

Ao meu namorado, Bladimir, por ser minha companhia mesmo na distancia, pela força, ânimo, cuidado, exemplo e ajuda técnica.

A minha família, por ser a minha força e minha motivação... por ser tudo!

Ao meu Deus, pela sua misericórdia e a sua graça, por que sem Ele nada tivesse sido possível.

"No solo no hubiera sido nada sin ustedes,  
sino con toda la gente que estuvo alrededor desde el comienzo;  
algunos siguen hasta hoy.  
¡Gracias totales!"  
**Gustavo Cerati.**

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de reparo de DNA de eucariotas do departamento de biofísica da universidade federal do rio grande do sul.o projeto Foi subsidiado pelo conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CNPq), coordenação de aperfeiçoamento e formação de pessoal de nível superior (CAPES), fundação de amparo a pesquisa do estado do rio grande do sul (FAPEGS)- PRONEX/FAPERGS/CNPq(n°10/0044-3) e pelo instituto de educação para pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica Royal, Unidade GENOTOX-ROYAL, Centro de Biotecnologia/Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A redação da dissertação fundamentou-se nas recomendações do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular desta universidade.

## ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

O presente trabalho está dividido na seguinte forma: Introdução geral, Objetivos (gerais e específicos), dois capítulos escritos na forma de artigos científicos, discussão geral, conclusões (geral e específicas), perspectivas e referências bibliográficas.

A introdução geral discorre a respeito do uso das plantas com fins medicinais, em especial a utilização de *Baccharis trinervis*, ressaltando os metabolitos secundários produzidos e as suas atividades.

O capítulo I refere-se à caracterização química e a avaliação da atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica dos extratos e frações de *B. trinervis* do sul do Brasil e do norte da Colômbia.

O capítulo II apresenta os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante e antígenotóxica dos extratos e frações de *B. trinervis* do sul do Brasil e do norte da Colômbia.

A discussão geral contempla os comentários sobre os resultados apresentados nos dois capítulos e a sua importância para a contribuição científica deste estudo. Após, estão descritas as conclusões e as perspectivas geradas por este trabalho, as referências bibliográficas utilizadas na elaboração desta dissertação, e como anexo o *Curriculum Vitae*.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS.....	12
ABREVIATURAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Plantas Medicinais.....	16
1.1.1. Terpenoides.....	18
1.1.2. Alcaloides.....	19
1.1.3. Compostos fenólicos.....	20
1.1.3.1. Flavonoides.....	21
1.1.3.2. Não flavonoides.....	23
1.1.3.2.1. Ácidos fenólicos.....	23
1.1.3.2.2. Ligninas.....	24
1.1.3.2.3. Estilbenos.....	24
1.2. Família Asteraceae e o gênero <i>Baccharis</i> .....	24
1.2.1. Atividade biológica e composição química.....	26
1.3. Espécie deste estudo: <i>Baccharis trinervis</i> .....	30
1.3.1. Descrição botânica e composição química.....	30

1.3.2. Medicina popular e atividade biológica.....	32
1.4. Estudos citotóxicos e genotóxicos de produtos naturais.	33
1.4.1. Ensaio em células de mamíferos.....	34
1.4.1.1. Citotoxicidade.....	34
1.4.1.2. O ensaio cometa.....	36
1.4.1.3. O teste de micronúcleos.....	38
1.4.2. Ensaio em células Procarióticas. ....	39
1.4.2.1. Teste <i>Salmonella</i> /microsoma.....	39
2. OBJETIVOS.....	42
2.1. Objetivo geral.....	42
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. CAPITULO I.....	43
4. CAPITULO II.....	76
5. DISCUSSÃO.....	96
6. CONCLUSÕES.....	101
6.1. Conclusão geral.....	101
6.2. Conclusões específicas. ....	101
7. PERSPECTIVAS.....	103
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104
<i>Curriculum vitae</i> .....	113

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.	Rotas Biosintéticas dos metabólitos secundários.....	18
Figura 2.	Estrutura do Isopreno .....	19
Figura 3.	Exemplos de alcalóides. ....	20
Figura 4.	Estrutura básica dos flavonóides. ....	22
Figura 5.	<i>Baccharis trinervis</i> .....	30
Figura 6.	Diferentes classes de danos (0-4) de células obtidas pelo ensaio cometa. ....	37
Figura 7.	Micronúcleos em células binucleadas. ....	39

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.	Classificação dos compostos fenólicos. ....	21
Tabela 2.	Atividades farmacológicas de diferentes espécies do gênero <i>Baccharis</i> .....	28
Tabela 3.	Atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica de diferentes espécies do gênero <i>Baccharis</i> . ....	29
Tabela 4.	Compostos identificados em <i>Baccharis trinervis</i> .....	31
Tabela 5.	Linhagens utilizadas no Teste de Ames.....	40

**ABREVIATURAS**

CHO	Ovário de Hamster Chinês
AEC	Extrato aquoso de Colômbia
AEB	Extrato aquoso de Brasil
EAFB	Fração acetato de etila de Brasil
E AFC	Fração acetato de etila de Colômbia
BFB	Fração butanol de Brasil
BFC	Fração butanol de Colômbia
ARB	Resíduo aquoso de Brasil
ARC	Resíduo aquoso de Colômbia
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução
ESI-MS	espectrometria de massas com ionização por electrospray
ENDO III	Endonuclease III
FPG	Formamidopirimidina DNA glicosilase
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
SFB	Soro Bovino Fetal

## RESUMO

A composição química dos extratos e frações de *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia foi analisada. 13 compostos foram descritos pela primeira vez em *B. trinervis*, 8 deles foram identificados por HRMS-ESI-MS e 5 foram descritos por HPLC. Os compostos identificados por HPLC encontram-se em maior concentração no extrato aquoso da Colômbia em relação ao extrato aquoso de Brasil, adicionalmente, a luteolina foi identificada unicamente no extrato aquoso de Colômbia. Após exposição aos extratos e frações de *B. trinervis* foram observados efeitos doses dependentes na sobrevivência celular e indução de genotoxicidade avaliados pelo teste MTT, ensaio clonogênico e cometa alcalino respectivamente. As frações acetato de etila de ambos os países apresentaram maior atividade citotóxica e genotóxica quando comparadas com as outras frações, sendo mais evidente na fração acetato de etila de Colômbia. Este efeito pode ser explicado pela capacidade pró-oxidante dos compostos umbeliferona, diterpenos labdano, rutina, ácido elágico, ácido cafeico, ácido rosmarínico e luteolina e seu efeito sinérgico na mistura complexa da fração. A redução dos danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio evidenciado pelo cometa alcalino com e sem enzimas de reparo de DNA (FPG e ENDO III) demonstra o efeito antígenotóxico dos extratos e frações de *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia. Os extratos aquosos e as frações acetato de etila de ambos os países evidenciaram efeito protetor contra os danos oxidativos induzidos pelos peróxido de hidrogênio, por capacidade antioxidante. Os efeitos citotóxicos, genotóxicos, antígenotóxicos e antioxidantes dos extratos e frações de *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia podem ser explicados pela presença de umbeliferona, diterpenos labdano, rutina, ácido elágico, ácido cafeico, ácido rosmarínico e luteolina. Estes compostos podem agir como pró-oxidantes ou antioxidantes dependendo da concentração.

## ABSTRACT

The chemical composition of extracts and fractions of *B. trinervis* from Brazil and Colombia was analyzed. Thirteen compounds were described for the first time in *B. trinervis* using two methods, by HRMS-ESI-MS were identified eight compounds and, by HPLC five compounds. Thirteen compounds were described for the first time in *B. trinervis* by HRMS-ESI-MS (eight compounds) and HPLC (five compounds). In relation to the compounds identified by HPLC, the aqueous extract of Colombian *B. trinervis* had highest concentration than the Brazilian counterpart; additionally, Luteolin was identified only in Colombian aqueous extract. Chinese hamster ovary (CHO) cells were treated with extracts and fractions of *B. trinervis* from Brazil and Colombia. Doses dependent effects in cell survival and induction of genotoxicity were observed in the MTT, cloning ability forming, and alkaline comet assays. Ethyl acetate fractions from both countries had highest cytotoxic and genotoxic activity than the other fractions; the ethyl acetate fraction of Colombian *B. trinervis* showed highest cytotoxic activity. This effect can be explained by the pro-oxidant capacity of umbelliferone, rutin, ellagic acid, caffeic acid, rosmarinic acid, luteolin, and labdane type diterpens and their synergistic effect on fraction complex mixture. The reduction of DNA damage induced by hydrogen peroxide was evidenced by alkaline comet assay with and without DNA repair enzymes (FPG and ENDO III) evidencing the antigenotoxic effect of extracts and fractions of *B. trinervis* from both countries. Aqueous extracts and ethyl acetate fractions from both countries showed highest protective effects against oxidative damage induced by hydrogen peroxide due to the antioxidant capacity. Cytotoxic, genotoxic, antigenotoxic and antioxidant effects of extracts and fractions of *B. trinervis* can be explained by the presence of umbelliferone, labdane type diterpens, rutin, ellagic acid, caffeic acid, rosmarinic acid and Luteolin. These compounds can act as antioxidants or pro-oxidant depending on their concentrations.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Plantas Medicinais

O uso das plantas com fins terapêuticos remonta à história das civilizações humanas, onde elas constituíram o único recurso medicinal até meados do século XIX, sendo o conhecimento transmitido por gerações, e chamado “Medicina Tradicional” (Firmo *et al* .2011). A partir do século XX, o ser humano começou a estudar as plantas em função de seu uso para os mais diversos fins e se estabeleceu paulatinamente a tendência de utilização dos princípios ativos (Elisabetsky 2003)

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é definida como sendo “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”. As plantas medicinais constituem o principal recurso da medicina tradicional, que segundo a OMS, ainda é de amplo uso no mundo. Dependendo do país, a utilização pode ser até de 90% da população; na América Latina, entre o 40% e 80% da população usa quase que exclusivamente a medicina tradicional (OMS 2002).

Em tempos modernos, a etnobotânica tem relacionado o estudo das propriedades químicas das plantas como uma importante ferramenta em bioprospecção. Desta forma, numerosas pesquisas têm associado informações sobre o uso tradicional das plantas com a fitoquímica e os estudos farmacológicos para o desenvolvimento de novos fármacos (Albuquerque and Hanazaki 2006)



O intenso desenvolvimento de áreas como a biologia molecular e a química combinatória desencoraja a pesquisa de produtos naturais em empresas farmacêuticas, as quais começaram fazer triagem na tentativa de acelerar seus resultados em relação à multiplicidade de novos fármacos (Tsao 2010). A área de produtos naturais é a responsável pela obtenção de aproximadamente 50% de pequenas moléculas que constituem novas entidades químicas (NCE`s) aprovadas, considerando as categorias: a) produtos naturais propriamente ditos; b) derivados de produtos naturais, produtos sintéticos cujo farmacóforo foi desenvolvido a partir de um produto natural; e c) produtos sintéticos (Newman *et al.* 2003).

As plantas são capazes de produzir, acumular e transformar inúmeras substâncias não necessariamente relacionadas diretamente à manutenção da sua vida. Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, com bioquímica e metabolismo específicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização. Estes produtos, conhecidos como metabólitos secundários, não são necessariamente essenciais para o organismo produtor, mas garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie em seu ecossistema (Simões and Schenkel 2002).

Os metabólitos secundários estão envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação da planta ao seu meio, como defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra radiação ultravioleta (UV), à atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, e proteção contra influências

externas como temperatura e umidade, além de suprir a deficiência de nutrientes minerais. Assim, os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, frequentemente, apresentam atividades biológicas interessantes e muitos são de importância comercial nas áreas farmacêuticas, alimentar, agrônômica e da perfumaria (Crozier *et al.* 2006).

Baseada na origem biosintética, os metabólitos secundários das plantas podem ser divididos em três grandes grupos: 1) terpenos, 2) alcaloides e 3) compostos fenólicos (Fig. 1).

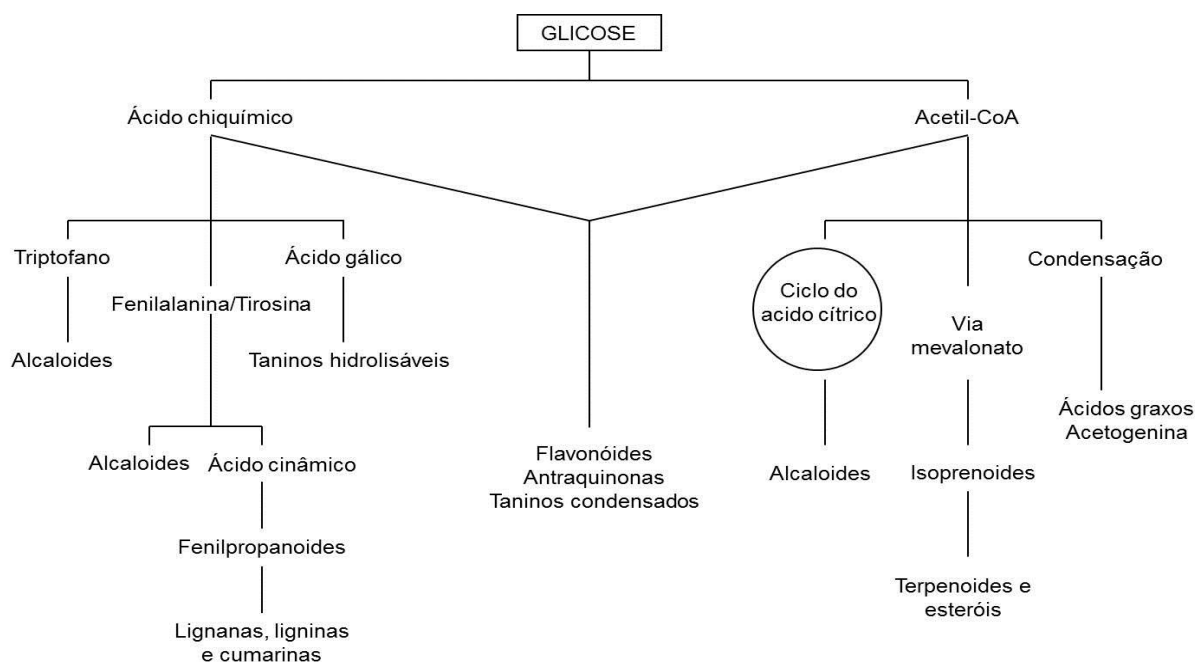


Figura 1. Rotas Biosintéticas dos metabólitos secundários. Adaptado de Simões *et al.* (2010).

### 1.1.1. Terpenoides

Este grupo de compostos ocorre abundantemente nas plantas e apresentam múltiplas funções. Essencialmente, derivam-se do isopreno (Fig. 2), biossinteticamente, como isopentenil pirofosfato, que se deriva da via do ácido

mevalônico. Os terpenos podem ser classificados em monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>) e esteroides (C<sub>30</sub>). Mono e sesquiterpenos são os principais componentes dos óleos voláteis, dentre os triterpenos e esteroides encontram-se as saponinas, esteroides e esteróis. Os terpenoides são componentes de bálsamos, resinas, ceras e borrachas, dentro das suas funções destaca-se a atividade repelente a insetos filófagos (Abad and Bermejo 2007).

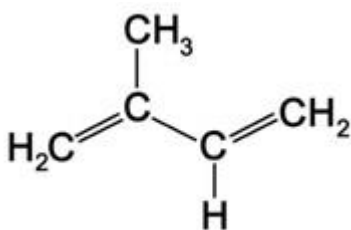


Figura 2. Estrutura do Isopreno

Nas plantas, os terpenoides atraem aos polinizadores e estão envolvidos na defesa contra a herbivoria e a agentes patógenos (Cheng *et al.* 2007). Além disto, estes compostos apresentaram efeitos antibacteriano, diuréticos e espasmolítico (Bach 2010).

### 1.1.2. Alcaloides

Os alcaloides são um grupo diverso de metabólitos secundários (Fig. 3), constituído por aproximadamente 20.000 compostos isolados e identificados. Os representantes deste grupo são compostos naturais que contêm um nitrogênio orgânico, com exceção de aminoácidos, peptídeos, purinas, aminoglicosídeos e antibióticos; geralmente, o átomo de nitrogênio faz parte de um anel heterocíclico. A biossíntese dos alcaloides ocorre principalmente a partir de aminoácidos, embora alguns podem ser derivados de purinas (Wansi *et al.* 2010).

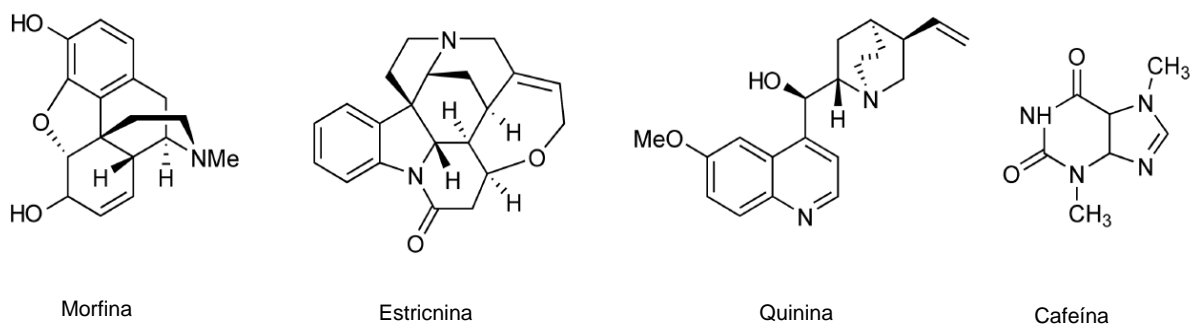


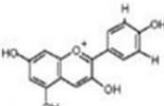
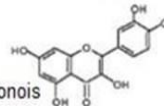
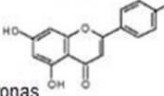
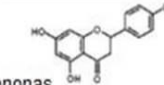
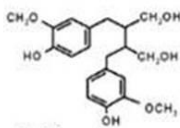
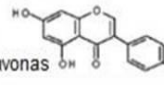
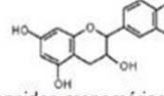
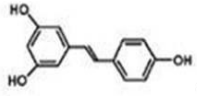
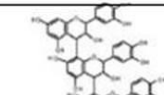
Figura 3. Exemplos de alcaloides. Adaptado de O'Connor, 2010.

A função dos alcaloides nas plantas não tem sido elucidada totalmente. Acredita-se que são usados pelas plantas em mecanismos de defesa e interações com o ecossistema. Entre os alcaloides com importância industrial, cita-se a cafeína e a nicotina, e com valor farmacológico a morfina e a quinina, além destes, a cocaína, a heroína e a escopolamina apresentam interesse social (O'Connor 2010).

### 1.1.3. Compostos fenólicos

São moléculas que possuem pelo menos uma unidade de fenol. Existem como constituintes comuns das plantas; classificam-se com base no número e organização dos seus átomos de carbono (Tabela 1) e podem estar ligados a açúcares e a ácidos orgânicos; classificam-se em flavonoides e não-flavonoides (Singh *et al.* 2008)

Tabela 1. Classificação dos compostos fenólicos. Adaptado de Singh *et al.* (2008).

COMPOSTOS FENOLICOS	
FLAVONOIDES	NÃO FLAVONOIDES
 1. Antocianinas Exemplos: Cianidinas, Malvidina. Fontes: Uvas, vinho tinto, bagas	Ácidos fenólicos 1. Derivados do ácido benzoico Exemplos: Ác. cafeico, ác. coumarico Fontes: Morango, framboesa 2. Derivados do ácido cinâmico Exemplos: Kiwi, batata, café, pera.
 2. Flavonóis Exemplos: Qercitina, kaempferol Fontes: Tomate, brócolis, maçã.	
 3. Flavonas Exemplos: Apigenina, Luteolina Fontes: Aipo, salsa, tomilho	
 4. Flavononas Exemplos: Naringenina, hesperina Fontes: Frutas cítricas	Exemplos: Matairesinol Fontes: Cenoura, pera, lentilha  2. Lignanas
 5. Isoflavonas Exemplos: Daidzeína, genisteína Fontes: Legumes, soya	
 6. Flavonoides monoméricos e poliméricos Exemplos: Catequinas, epicatequina Fontes: Chá preto e verde, chocolate, uva, maçã	Exemplos: Resveratrol Fontes: Uvas, amendoim, granadilha  3. Estilbenos
 7. Proantocianinas Fontes: Chocolate, uvas, vinho tinto, bagas, maçãs	

Os compostos fenólicos possuem grande capacidade antioxidante, que se complementam às funções das vitaminas e enzimas, como defesa contra o estresse oxidativo causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Tsao 2010).

### 1.1.3.1. Flavonoides

Constituem o principal grupo dentro dos compostos fenólicos e apresentam como estrutura básica C6-C3-C6 (Fig. 4), onde uma ponte de três carbonos e um oxigênio (anel C) liga dois anéis de natureza fenólica, nomeados como A e B (dos

Santos *et al.* 2011). Encontram-se distribuídos em grandes concentrações principalmente na epiderme das folhas e na casca das frutas. Os flavonoides estão envolvidos em numerosos mecanismos nas plantas, como a proteção ante a radiação ultravioleta UV, pigmentação, estimulação dos nodos fixadores de nitrogênio e proteção contra vírus, bactérias, fungos e insetos e propriedades organolépticas de frutas e os seus derivados (Koyama *et al.* 2012).

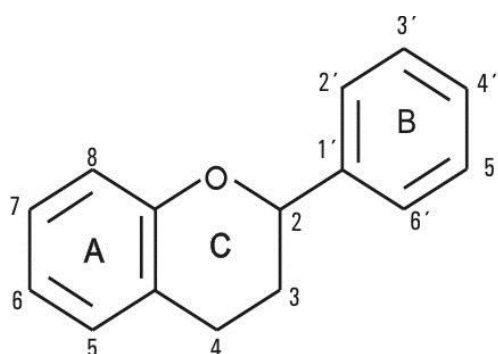


Figura 4. Estrutura básica dos flavonoides.

As principais subclasses (Tabela. 1) são as flavonas, flavonóis, flavon-3-óis, isoflavonas, flavononas e antocianinas. Outros grupos menos comuns de flavonoides são dihidroflavonois, flavon-3,4-dios, cumarinas, chalconas, dihidrochalconas e auronas. A estrutura básica pode possuir numerosos substituintes, sendo os grupos hidroxilas os mais comuns e que apresentam-se nas posições 4', 5 e 7. A maioria destes compostos existe em forma glicosilada, sendo que os grupos hidroxilo e açúcares incrementam a solubilidade em água. Grupos metil e isopentil e outros substituintes dão caráter lipofílico aos flavonoides (Tsao 2010).

Estes compostos apresentam atividade antioxidante, podendo ativar enzimas antioxidantes, agir na quelação de metais, inibir oxidases, incrementar as propriedades antioxidantes de outros compostos. Além disso, os flavonoides exibem múltiplos efeitos biológicos como antiviral, antimicrobiano, antitumoral, anti-inflamatório, vasodilatador, pelos quais tem desencadeado a sua importância farmacológica (Procházková *et al.* 2011).

### **1.1.3.2. Não flavonoides**

#### **1.1.3.2.1. Ácidos fenólicos**

São compostos que apresentam pelo menos um grupo carboxila e um grupo fenol, sendo derivados do ácido benzoico ou do ácido cinâmico (Tabela. 1) e possuindo como esqueletos bases estruturais C1-C6 e C3-C6 respectivamente. Encontra-se em maior proporção em frutas, vegetais, grãos e sementes (Garcia and Carril 2009). Estes compostos possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antipiréticas, e agem como substâncias protetoras. Cita-se dentre derivados do ácido benzoico o ácido salicílico e o ácido gálico, dentre os derivados do ácido cinâmico o ácido cafêico e o ácido p-cumárico. Por outro lado, ácido gálico e o ácido elágico estão envolvidos na síntese dos taninos hidrolisáveis (Simões 2010).

#### **1.1.3.2.2. Ligninas**

As ligninas (Tabela 1) são compostos fenólicos bioativos não calóricos e não nutritivos. Encontram-se em altas concentrações em sementes de linho e gergelim e em menores concentrações em outras sementes, frutas e vegetais (Tsao 2010).

Principalmente, são derivados dos ácidos hidroxinâmicos, podem se encontrar de forma livre ou ligada a açúcares, o pinoresinol, secoisolariciresinol, e seringaresinol são exemplos deles (Peterson *et al.* 2010).

#### **1.1.3.2.3. Estilbenos**

Os compostos deste grupo possuem como estrutura C6-C2-C6 (Tabela 1). São produzidos pelas plantas para se proteger contra ataques de fungos, bactérias e vírus. O membro mais conhecido é o resveratrol, presente na semente das uvas. Estilbenos são grandemente usados na fabricação do vinho como agentes antifúngicos (Crozier *et al.* 2006).

### **1.2. Família Asteraceae e o gênero *Baccharis***

A família Asteraceae, também conhecida como Compositae ou Compostas, é o grupo sistemático mais numeroso e uma das famílias mais evoluídas dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies (Alvarenga *et al.* 2005). O nome Asteraceae deriva da estrutura característica da inflorescência em capítulos florais, sendo plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Cerca de 98% dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, e são encontradas



em todos os tipos de habitats, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (Heemann *et al.* 2006).

Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química (Hristozov *et al.* 2007) e a sua atividade biológica (Jürgens *et al.* 2010; Maggi *et al.* 2009).

O gênero *Baccharis* é um dos principais da família Asteraceae, possuindo aproximadamente 500 espécies. Em geral, são arbustos que crescem em média de 0,5 à 4 metros de altura, ramificados, dioicos, com caule e ramos cilíndricos, afilos ou folhoso, ou ainda mais ou menos angulosos e então providos de alas foliáceas. As plantas deste gênero têm colonizado uma grande variedade de ambientes e constitui um elemento importante em numerosas formações vegetais. Aproximadamente 90% encontra-se na América do Sul, cinco espécies são endêmicas da América do Norte e o norte do México, 38 espécies distribuem-se no México e a área continental de América Central e sete espécies endêmicas ocorrem no oeste da Índia (Abad Martinez *et al.* 2007).

Devido a grande quantidade de espécies do gênero *Baccharis*, observa-se uma ampla gama de aplicações, por causa dos diferentes produtos e compostos obtidos, como exemplo, pode-se citar a própolis e os óleos voláteis.

Propolis é um termo genérico usado para descrever uma mistura resinosa coletada por abelhas da espécie *Apis mellífera* de diversas partes da planta como

gemas vegetativas, gemas florais e exudados resinosos (Guimarães *et al.* 2012). A própolis apresenta atividade antibiótica (Orsi *et al.* 2005), hepatoprotetiva (Seo *et al.* 2003), anti-inflamatória (Paulino *et al.* 2008), cicatrizante (De Funari *et al.* 2007), anestésica, antiviral (Búfalo *et al.* 2009), antioxidante (Kumazawa *et al.* 2004), antiparasitária (Freitas *et al.* 2006).

Os óleos voláteis ou essências são misturas complexas geralmente de compostos oxigenados ou hidrocarbonados, obtidas a partir de plantas, constituídos por substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas (Simões and Spitzer 2003). Para o vegetal, a função biológica destes metabólitos secundários consiste em inibir a germinação, proteger contra predadores, atrair polinizadores e controlar a temperatura (Singh *et al.* 2008). Os óleos essenciais extraídos das folhas de algumas espécies como *B. dracunculifolia*, *B. anomala* e *B. genisteloides* são usados principalmente na indústria da fragrância (Hajhashemi *et al.* 2010).

### **1.2.1. Atividade biológica e composição química**

As espécies do gênero *Baccharis* são consumidas principalmente na forma de chás, com indicações para distúrbios estomacais, hepáticos, anemias, inflamações, diabetes, ulcera, febre, infecções gastrointestinais, sendo também indicada como diurético, analgésico, antiespasmódico e no processo de desintoxicação do organismo (Abad and Bermejo 2007).

*B. megapotamica*, *B. trimera*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. trinervis* têm sido as espécies mais estudadas; na tabela 2 estão relacionadas às principais atividades farmacológicas das espécies de

*Baccharis*, com os seus respectivos modelos de estudo. Na tabela 3 descrevem-se o potencial citotóxico, genotóxico e mutagénico de diferentes espécies de *Baccharis*.

Estudos fitoquímicos de várias espécies do género *Baccharis* revelam a presença de diferentes classes fitoquímicas, tais como triterpenos, diterpenos, sesquiterpenos taninos, saponinas e tricotecenos entre outros (Budel and Duarte 2008; de Oliveira *et al.* 2003; Halliwell *et al.* 2005; Orsi *et al.* 2005; Riceli *et al.* 2013; Simões *et al.* 2005).

Além disso, cabe destacar a frequente ocorrência de flavonóides, caracterizada por apresentar distintos tipos de núcleos dessa classe química, como flavanonas, flavonas e flavonóis (Grecco *et al.* 2012; Sharp *et al.* 2001).

Tabela 2. Atividades farmacológicas de diferentes espécies do gênero *Baccharis*

<b>Espécie</b>	<b>Atividade</b>	<b>Concentração</b>	<b>Modelo de estudo</b>	<b>Extrato/Fração</b>	<b>Referencia</b>
<i>B. boliviensis</i>	Alelopática	0,4 mg/mL	<i>Trichocereus pasacana</i>	Extrato clorofórmico	Cazon <i>et al.</i> 2002
<i>B. coridifolia</i>	Antioxidante	141 µg/ml	Fígado de camundongo	Extrato aquoso	Mongelli <i>et al.</i> 1997
<i>B. dracunculifolia</i>	Tripanozoidal	3,0 mg mL <sup>-1</sup>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Extrato bruto	Silva Filho <i>et al.</i> 2004
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimicrobiano	30 uL/placa	<i>Proteus sp.</i>	Óleo essencial	Gelinski <i>et al.</i> 2007
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimicrobiano	30 uL/placa	<i>Staphylococcus sp.</i>	Óleo essencial	Gelinski <i>et al.</i> 2007
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimicrobiano	30 uL/placa	<i>Escherichia coli</i>	Óleo essencial	Gelinski <i>et al.</i> 2007
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimicrobiano	30 uL/placa	<i>Listeria monocytogenes</i>	Óleo essencial	Gelinski <i>et al.</i> 2007
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimicrobiano	25%	<i>Escherichia coli</i>	Fração polar	Pires de Abreu & Onofre 2010
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimicrobiano	6,25 %	<i>Staphylococcus aureus</i>	Fração polar	Pires de Abreu & Onofre 2010
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimicrobiano	25%	<i>Staphylococcus aureus</i>	Fração apolar	Pires de Abreu & Onofre 2010
<i>B. erioclada DC.</i>	Anti HSV1	2.5 mg/ml	Células Vero	Extrato aquoso	Montanha <i>et al.</i> 2004
<i>B. erioclada DC.</i>	Anti HSV1	1 mg/ml	Células Vero	Extrato hidroetanólico	Montanha <i>et al.</i> 2004
<i>B. illinita</i>	Anti-inflamatória	0,1 mg	Camundongos Swiss	Extrato bruto	Boller <i>et al.</i> 2010
<i>B. latifolia</i>	Antifúngica	157,4 mg/ml,	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Óleo essencial	Zapata <i>et al.</i> 2009
<i>B. megapotamica</i>	Anti HSV1	0,0097 mg/ml	Células Vero	Extrato hidroetanólico	Montanha <i>et al.</i> 2004
<i>B. trimera</i>	Antidiabético	2000 mg/kg	Camundongos Swiss	Fração aquosa	Oliveira <i>et al.</i> 2005
<i>B. trimera</i>	Antioxidante	92,39 µg/mL,	Camundongos CF-1	Extrato aquoso	Rodrigues <i>et al.</i> 2009
<i>B. trimera</i>	Anti-inflamatória	3 µg/kg	Células HEK	Fração etanólica	Nogueira <i>et al.</i> 2011
<i>B. trimera</i>	Antissecretória	2 g/Kg	Camundongos F1	Extrato aquoso	Biondo <i>et al.</i> 2011
<i>B. trinervis</i>	Antifúngica	64 mg/ml	<i>Trichophyton rubrum</i>	Extrato aquoso	Ocampo <i>et al.</i> 2006
<i>B. trinervis</i>	Antioxidante		Camundongos	Extrato etanólico	B. de las Heras <i>et al.</i> 1998
<i>B. trinervis</i>	Anti HIV	10 µg/ml	Células MT-2	Extrato aquoso	Sanchez Palomino <i>et al.</i> 2002
<i>B. trinervis</i>	Antimicrobiano	5,7 mg/mL	<i>Staphylococcus aureus</i>	Óleo essencial	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
<i>B. trinervis</i>	Antimicrobiano	2.85 mg/mL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Óleo essencial	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
<i>B. trinervis</i>	Antimicrobiano	5,7 mg/mL	<i>Escherichia coli</i>	Óleo essencial	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
<i>B. trinervis</i>	Antimicrobiano	2,85 mg/mL	<i>Salmomonella chorelae-suis</i>	Óleo essencial	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
<i>B. trinervis</i>	Antifúngica	5,7 mg/mL	<i>Candida albicans</i>	Óleo essencial	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
<i>B. uncinella DC.</i>	Anti HSV1	2,5 mg/ml	Células Vero	Extrato hidroetanólico	Montanha <i>et al.</i> 2004

Tabela 3. Atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica de diferentes espécies do gênero *Baccharis*.

<b>Espécie</b>	<b>Atividade</b>	<b>Concentração</b>	<b>Modelo de estudo</b>	<b>Extrato/Fração</b>	<b>Referencia</b>
<i>B. articulata</i>	Antimutagênica	1 mg/placa	TA100	Extrato aquoso	Rodríguez <i>et al.</i> 2011
<i>B. articulata</i>	Mutagênica	15 mg/ml	<i>Allium cepa</i>	Extrato aquoso	Fachinetto & Tedesco, 2009
<i>B. coridifolia</i>	Citotóxica	4. 2 µg/ml	Células KB	Extrato diclorometano	Mongelli <i>et al.</i> 1997
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimutagênica	6 mg/Kg	Camundongo Wistar	Extrato acetato de etila	Resende <i>et al.</i> 2007
<i>B. dracunculifolia</i>	Mutagênica	100µg/mL	Células CHO	Extrato acetato de etila	Munari <i>et al.</i> 2008
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimutagênica	12.5 µ/mL	Células CHO	Extrato acetato de etila	Munari <i>et al.</i> 2008
<i>B. dracunculifolia</i>	Genotóxica	2 mg/mL	Camundongos CF-1	Extrato aquoso	Rodrigues <i>et al.</i> 2009
<i>B. dracunculifolia</i>	Mutagênica	0.5 mg/mL	Camundongos CF-1	Extrato aquoso	Rodrigues <i>et al.</i> 2009
<i>B. dracunculifolia</i>	Genotóxica	100 µg/mL	Células CHO	Extrato etanólico da própolis	Tavares <i>et al.</i> 2006
<i>B. dracunculifolia</i>	Antigenotóxica	12.5 µg/mL	Células CHO	Extrato etanólico da própolis	Tavares <i>et al.</i> 2006
<i>B. dracunculifolia</i>	Citotóxica	400.0 µg/mL	Células V79	Extrato acetato de etila	Munari <i>et al.</i> 2010
<i>B. dracunculifolia</i>	Genotóxica	50.0 µg/mL	Células V79	Extrato acetato de etila	Munari <i>et a.</i> 2009
<i>B. dracunculifolia</i>	Antigenotóxica	12.5 µg/mL	Células V79	Extrato acetato de etila	Munari <i>et al.</i> 2009
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimutagênica	11.4 µg/placa	TA 98	Extrato acetato de etila	Resende <i>et al.</i> 2012
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimutagênica	11.4 µg/placa	TA100	Extrato acetato de etila	Resende <i>et al.</i> 2012
<i>B. dracunculifolia</i>	Antimutagênica	11.4 µg/placa	TA97a	Extrato acetato de etila	Resende <i>et al.</i> 2012
<i>B. trimera</i>	Mutagênica	15 mg/ml	<i>Allium cepa</i>	Extrato aquoso	Fachineto & Tedesco. 2009
<i>B. trimera</i>	Antigenotóxica	3x500 mg/kg	Camundongos CF-1	Extrato aquoso	Rodrigues <i>et al.</i> 2009
<i>B. trimera</i>	Mutagênica	3x1000 mg/kg	Camundongos CF-1	Extrato aquoso	Rodrigues <i>et al.</i> 2009
<i>B. trimera</i>	Genotóxica	4.2 mg/kg.	Camundongo SW	Extrato aquoso	Nogueira <i>et al.</i> 2011
<i>B. trimera</i>	Citotóxica	182.6 µg/ml	Camundongo SW	Extrato aquoso	Nogueira <i>et a.</i> 2011
<i>B. trimera</i>	Citotóxica	78.1 µg/ml	Células HEK	Fração etanólica	Nogueira <i>et a.</i> 2011
<i>B. trimera</i>	Citotóxica	86.2 µg/ml	Células HEK	Resíduo Aquoso	Nogueira <i>et al.</i> 2011

### 1.3. Espécie deste estudo: *Baccharis trinervis*

#### 1.3.1. Descrição botânica e composição química

As plantas da espécie *B. trinervis* (Fig. 5) basicamente apresentam-se como arbustos perenes, dioicos, raramente polígamos, escandentes ou subescandentes, escalando até 4 metros de altura, galhos e folhas espalhadas e pubescentes entre um e dez centímetros de comprimento e de até três centímetros de largura. Possui inflorescências em panículas, entre as folhas ou sobressaindo levemente, com distribuição desde o México até a Argentina (Missouri Botanical Garden 2013).



Figura 5. *Baccharis trinervis*. Adaptado de Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 22 Aug 2013 <http://www.tropicos.org>"

Quanto à composição química, de forma similar a outras de seu gênero, a *B. trinervis* apresenta flavonoides, clerodanos, lábdanos e flavonas, embora também se tenha observado com certa frequência a presença de kauranos, diterpenos, triterpenos, germacreno, ácidos cumáricos, tricotecenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (Tabela 4).

Tabela 4. Compostos identificados em *Baccharis trinervis*

Composto	Metodologia	Referencia
5-Hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone (salvigenina)	HNMR e CNMR	Sharp <i>et al.</i> 2001
5,4'-OH-3,6,7-OMe flavona (penduletina)	HNMR e CNMR	Sharp <i>et al.</i> 2001
5,7-OH-6,4'-OMe flavona (pectolinaringenina)	HNMR e CNMR	Sharp <i>et al.</i> 2001
5,7-OH-3',4'-OMe flavona	HNMR e CNMR	Arriaga Giner <i>et al.</i> 1982
5-OH-7,4'-OMe flavona	HNMR e CNMR	Arriaga Giner <i>et al.</i> 1982
5,4'-OH-7-OMe flavona (genkwanina)	HNMR e CNMR	Arriaga Giner <i>et al.</i> 1982
5,7,4'-OH flavona (apigenina)	HNMR e CNMR	Arriaga Giner <i>et al.</i> 1982
5,7-OH-4'-OMe flavona (acacetina)	HNMR e CNMR	Arriaga Giner <i>et al.</i> 1982
5,3'-OH-7,4'-OMe flavona (pilloina)	GC-MS, HNMR e CNMR	Herrera, JC. <i>et al.</i> 1996
5-OH-7,3',4'-OMe flavona	GC-MS, HNMR e CNMR	Herrera, JC. <i>et al.</i> 1996
5,4'-OH-7-OMe flavanona (sakuranetina)	GC-MS, HNMR e CNMR	Herrera, JC. <i>et al.</i> 1996
methyltrineracetal	HNMR e CNMR	Kuroyanagi <i>et al.</i> 1993
epimethyltrineracetal	HNMR e CNMR	Kuroyanagi <i>et al.</i> 1993
Methyl (Z)-dec-2-en-4,6-diynoate	HNMR e CNMR	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
Methyl (E)-dec-2-en-4,6-diynoate	HNMR e CNMR	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\alpha$ -Thujene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\alpha$ -Pinene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
Camphene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
Sabinene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\beta$ -Pinene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\beta$ -Myrcene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\beta$ -Phellandrene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
(Z)- $\beta$ -Ocimene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
(E)- $\beta$ -Ocimene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\Upsilon$ -Terpinene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
<i>cis</i> -Sabinene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
<i>trans</i> -Sabinene hydrate	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004

<i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
<i>trans-p</i> -Menth-2-en-1-ol	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
Terpinen-4-ol	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
Cryptone	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\alpha$ -Terpineol	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
<i>cis</i> -Chrysanthenyl acetate	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\alpha$ -Terpinyl acetate	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
Neryl acetate	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\alpha$ -Copaene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\beta$ -Elemene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
<i>trans</i> -Caryophyllene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\alpha$ -Humulene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
$\gamma$ -Muurolene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004
Bicyclogermacrene	GC-MS	Albuquerque <i>et al.</i> 2004

---

### 1.3.2. Medicina popular e atividade biológica de *B. trinervis*

Na medicina popular, as partes aéreas são usadas em infusão como antisséptico e para o tratamento de febres muito altas, edema, hemorroidas, reumatismo, câibras musculares e desordens gastrointestinais (Freire *et al.* 2007).

Extratos de *B. trinervis* têm sido testados para determinar ação antiviral (Sanchez-Palomino *et al.* 2002), atividade antifúngica contra *Trichophyton rubrum* (Ocampo *et al.* 2006) anti-inflamatória e antioxidante (de las Heras *et al.* 1998). O extrato aquoso desta planta demonstrou pouca toxicidade e alta ação anti-HIV quando testado *in vitro* (Sanchez-Palomino *et al.* 2002). O óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Albuquerque *et al.* 2004).



#### **1.4. Estudos citotóxicos e genotóxicos de produtos naturais**

Se a população dos países em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais por tradição e/ou ausência de alternativas econômicas viáveis, nos países desenvolvidos observa-se um maior uso de fitoterápicos influenciado pelo modismo de consumo de produtos naturais. Este modismo favoreceu a difusão das promessas de cura através das plantas medicinais para diferentes enfermidades. Na mesma época surgiu o conceito de que as plantas medicinais não representam quaisquer riscos para a saúde humana por serem naturais e terem sido testadas através de séculos pela população de todo o mundo (Ramirez, 2006).

Infelizmente, a maior parte dos fitoterápicos e/ou medicamentos que são utilizados atualmente por automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (Mello 2008). Por outro lado, a utilização inadequada de um fitoterápico, mesmo de baixa toxicidade, pode induzir problemas graves principalmente quando há fatores de risco, tais como contra-indicações ou uso concomitante de outros medicamentos (Amorim *et al.* 2007).

Com base nisso, é de grande importância realizar estudos de toxicidade em extratos de plantas, bem como identificar seus constituintes biologicamente ativos, que podem ser tóxicos e apresentarem potencial mutagênico e/ou carcinogênico.

A avaliação da atividade toxicológica de um fitoterápico constitui uma medida prioritária, uma vez que vários constituintes biologicamente ativos podem causar efeitos tóxicos. Portanto, experimentos capazes de fornecer uma faixa de segurança

e indicações sobre os riscos envolvidos na sua utilização são fundamentais (Ramirez 2006).

#### **1.4.1. Ensaios em células de mamíferos**

Para a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade em células de mamíferos, diversos ensaios podem ser utilizados, tais como aberrações cromossômicas, troca entre cromátides irmãs, mutação genica, micronúcleos e cometa, dependendo da finalidade do estudo. Dentre eles, destacam-se os ensaios do cometa e micronúcleo.

##### **1.4.1.1. Citotoxicidade**

A necessidade de usar os melhores métodos *in vitro* para medir e avaliar a citotoxicidade nunca foi tão grande. Isto é verdade porque a toxicidade é a principal razão para a alta taxa de falha (40-50%) de drogas farmacêuticas. Além disso, a química combinatória, tecnologias com alto rendimento para triagem e o interesse em produtos naturais produziram grandes bibliotecas de compostos químicos novos, complexos e altamente diversos que devem ser rastreados para a citotoxicidade *in vitro*. O Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) sugere que pelo menos 30 mil novas substâncias químicas terão que ser testados quanto ao potencial de citotoxicidade nos próximos 15 anos. Portanto, a escolha do ensaio de citotoxicidade *in vitro* adequado torna-se fundamental. De fato, a evidência mostra que o grau de citotoxicidade de uma substância pode variar, e depende fortemente dos ensaios utilizados para estimar esta (Amorim *et al.* 2007).

O ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) mede a função mitocondrial e é frequentemente utilizado para detectar a

sobrevivência celular/viabilidade celular, devido a um fármaco ou toxina. No entanto, este ensaio metabólico não pode diferenciar entre fármacos/compostos citotóxicos e citostáticos, e pode não ser suficientemente sensível ao trabalhar com baixo número de células.

Embora o ensaio de MTT possa avaliar a potência de um agente citotóxico, este ensaio de curto prazo pode subestimar a citotoxicidade, em comparação com os ensaios de longo prazo para o crescimento celular ou a eficiência de clonagem. Por outro lado, ensaios de citotoxicidade não clonogênicos às vezes podem superestimar a citotoxicidade por não avaliarem danos reversíveis ou regeneração de células resistentes à droga/agente citotóxico. Por estas razões, é aconselhável incluir ensaios de sobrevivência de células em estudos de citotoxicidade *in vitro*. O ensaio clonogênico avalia os efeitos citostáticos de longo prazo de uma droga (composto)/agente citotóxico, medindo a capacidade proliferativa de uma única célula para formar um clone e produzir uma colônia viável. O ensaio clonogênico é o mais confiável quando é avaliado índice de letalidade da célula (Ramirez 2006). Estas observações podem ser explicadas pela constatação de que o dano no DNA correlaciona diretamente com redução da eficiência de clonagem e foi associada com o aparecimento de marcadores de apoptose em certas linhagens de células tumorais (Swartz *et al.* 2007).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA estabeleceu o “Guia para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-clínica de Fitoterápicos”, que inclui os estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, utilizando células de mamíferos

e bactérias (Brasil 2004). Os biomarcadores constituem uma ferramenta útil para avaliar o risco potencial das diferentes exposições ambientais.

Os biomarcadores ou marcadores biológicos são as mudanças que podem ser medidas, sejam estas bioquímicas, fisiológicas ou morfológicas, que se associam a exposição a um tóxico ou qualquer alteração bioquímica precoce, cuja determinação permita avaliar a intensidade (Ramirez 2006).

#### **1.4.1.2. O ensaio cometa**

O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese de célula única em gel, é amplamente empregado para avaliar dano ao DNA e reparação em células eucarióticas. A popularidade deste teste deve-se à sua sensibilidade, custo relativamente baixo e simplicidade. Além disso, o teste pode ser realizado em uma suspensão celular contendo uma população pequena de células, em proliferação ou não, e corresponde a um teste citogenético (Dusinska and Collins 2008; Shaposhnikov *et al.* 2008).

O princípio desse ensaio leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização no núcleo celular. Para a realização do ensaio, as células são embebidas em agarose, suas membranas são permeabilizadas com uso de detergentes em pH alcalino e as proteínas nucleares são removidas com uso de altas concentrações salinas. Dessa maneira, na lâmina permanece apenas o nucleóide íntegro. Quando a lâmina é submetida ao campo elétrico, o DNA do nucleóide migra no gel de acordo com seu tamanho. Os

fragmentos pequenos migram com velocidade maior que a matriz nuclear. Assim sendo, células com DNA danificado formam, após a migração, o aspecto de um cometa (Fig. 6) e a extensão da migração correlaciona-se diretamente com a quantidade de dano ocorrido (Burlinson *et al.* 2007; Kumaravel *et al.* 2009).

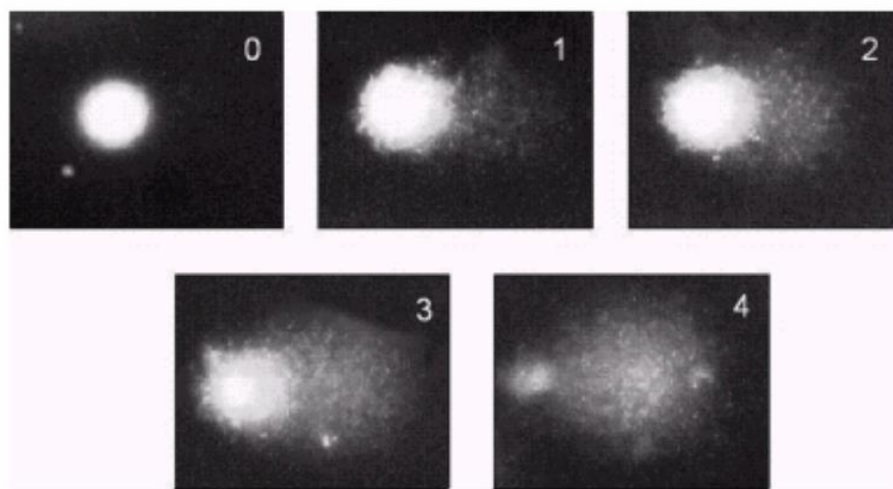


Figura 6. diferentes classes de danos (0-4) de células obtidas pelo ensaio cometa. Adaptado de Kumaravel *et al.* 2007.

Esse teste pode ser usado para avaliar a genotoxicidade/antigenotoxicidade, detectando danos primários ao DNA induzidos por uma série de substâncias químicas, como agentes intercalantes, alquilantes e oxidantes (Collins 2004). Os danos detectados são principalmente quebras simples e duplas na fita de DNA, eventos de reparo por excisão incompleta, sítios álcali-lábeis, ligações cruzadas entre moléculas de DNA, entre DNA e proteínas e entre DNA e xenobióticos (Collins *et al.* 2008; Shaposhnikov *et al.* 2008). Embora seja possível quantificar o dano, não é possível identificar com clareza qual desses eventos foi responsável pela indução

da lesão. A versão alcalina do ensaio cometa é mais empregada por ser mais abrangente, pois além de detectar danos diretos, torna possível a avaliação de danos indiretos como lesões por metilação e adutos, os quais sendo álcali-lábeis expressam-se como quebras simples frente ao tratamento alcalino (Olive and Banáth 2006).

#### **1.4.1.3. O teste de micronúcleos**

O ensaio de micronúcleos é amplamente utilizado para *screening* de produtos e biomonitoramento (Fenech 2006; Iamarcovai *et al.* 2006) e apresenta vantagens, tais como o uso de baixas concentrações do agente a ser testado e uma análise mais rápida quando comparada com o ensaio de aberrações cromossômicas (Garriot *et al.* 2002)

Os MN podem ser visualizados no citoplasma das células filhas como pequenos núcleos adicionais próximos aos núcleos principais (Fenech *et al.* 2011). Podem ser formados de maneira espontânea ou como resposta à ação de determinados agentes (clastogênicos e/ou aneugênicos), como resultado da perda de fragmentos de cromossomas e/ou cromossomos inteiros durante a divisão celular (Ceppi *et al.* 2010)

O MN deve apresentar as seguintes características: a) forma arredondada ou ovalada, b) cor e textura semelhantes ao do núcleo principal, c) estar no mesmo plano do núcleo principal, d) não estar ligado ao núcleo principal, e) apresentar tamanho entre 1/16 e 1/3 do núcleo principal, f) não ser refringente (Fenech *et al.* 2003).

No teste de MN com bloqueio da citocinese, após as células completarem uma divisão nuclear, são tratadas com Citocalacina-B, um inibidor da polimerização da actina, necessária para formação dos microfilamentos que constroem o citoplasma entre os núcleos filhos durante a citocinese, permitindo que as células em divisão sejam rapidamente identificadas pelo aspecto binucleado (Fig. 7) (Fenech 2006).



Figura 7. Micronúcleos em células binucleadas. Adaptada de Fenech, 2007.

#### 1.4.2. Ensaio em células Procarióticas.

##### 1.4.2.1. Teste *Salmonella*/microsoma

O teste *Salmonella*/microsoma (Teste de Ames), desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores na década de 70, é um ensaio bacteriano de curta duração que busca identificar substâncias que causem danos genéticos e possam evoluir a mutações. Este ensaio se baseia na indução de mutações reversas em linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina que conduzem as mesmas à prototrofia (Maron and Ames 1983; Gee *et al.* 1994; Mortelmans and Zeiger 2000).

Nas linhagens de *Salmonella typhimurium* utilizadas no teste *Salmonella*/microsoma (Tabela 5), a resposta aos danos ao DNA é potencializada pela presença do plasmídeo pKM101, o qual permite a síntese translesão de DNA,

levando, portanto, à mutagênese (Mortelmans 2006). Estas linhagens ainda contam com outras mutações que também auxiliam a identificação de substâncias que lesam o DNA: mutação no gene *rfa*, que acarreta na perda parcial da barreira de polissacarídeos da parede bacteriana, aumentando desta forma a permeabilidade e facilitando a entrada de moléculas maiores na célula; deleção do gene *uvrB*, responsável pelo sistema de reparação por excisão de nucleotídeos do DNA, o que impede esta via de reparação de atuar nestas linhagens, possibilitando a fixação das mutações (Swartz *et al.* 2007).

Tabela 5. Linhagens utilizadas no Teste de Ames.

<b>Linhagem</b>	<b>Genótipo</b>	<b>Tipo da Mutação Detectada</b>	<b>Referência</b>
<b>TA100</b>	<i>bio chID uvrB gal, rfa, pKM101</i>	Substituição de pares de bases	MORTELMANS & ZEIGER, 2000
<b>TA1535</b>	<i>bio chID uvrB gal, rfa</i>	Substituição de pares de bases	MORTELMANS & ZEIGER, 2000
<b>TA97a</b>	<i>bio chID uvrB gal, rfa, pKM101</i>	Alteração no quadro de leitura	LEVIN <i>et al.</i> 1982b
<b>TA98</b>	<i>bio chID uvrB gal, rfa, pKM101</i>	Alteração no quadro de leitura	MORTELMANS & ZEIGER, 2000
<b>TA102</b>	<i>rfa, pKM101, pAQ1</i>	Transição/transversão	LEVIN <i>et al.</i> 1982

Em testes com procaríotos um componente importante é o sistema de indução microsossomal, extraído de células de fígado de ratos pré-tratados com um indutor enzimático, que possui a função de reproduzir o metabolismo de mamíferos, permitindo que também seja avaliada a ação genotóxica dos metabólitos dos



agentes testados (Mortelmans and Zeiger 2000). Além disso, já existem preparações da fração microsomal hepática humana disponíveis para o uso em testes de mutagênese (Hakura *et al.* 2005). A combinação de testes com presença e ausência de ativação metabólica e linhagens bacterianas sensíveis a diferentes agentes possibilita determinar tanto substâncias com ação genotóxica direta como monitorar a atividade, positiva ou negativa, dos metabólitos gerados pela biotransformação (Ku *et al.* 2007).

Deste modo, a descoberta de compostos tóxicos possibilita esclarecer à população dos riscos aos quais estão expostos ao utilizarem folhas, raízes, cascas em forma de banhos ou infusões com o objetivo de tratar doenças (Andrade *et al.* 2003). Com isso, o presente estudo buscou elucidar esses mecanismos que mediam os efeitos das frações de *Baccharis trinervis* antes de poder considerá-los verdadeiros agentes terapêuticos, eliminando assim estudos controversos e vieses sobre citotoxicidade e genotoxicidade/antigenotoxicidade e mutagenicidade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a composição fitoquímica, os efeitos citotóxicos, genotóxicos, antigenotóxicos e mutagênicos dos extratos aquosos da *Baccharis trinervis* nativa do sul do Brasil e do norte da Colômbia.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar a composição fitoquímica dos extratos aquosos e das frações acetato de etila, fração butanólica e resíduo aquoso de *B. trinervis*.
2. Identificar dos constituintes dos extratos aquosos de *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia por HPLC
3. Identificar dos constituintes das frações de *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia por espectrometria de massa com ionização por electrospray- HRMS-ESI-MS.
4. Avaliar a citotoxicidade de todas as frações pelo teste de MTT e ensaio Clonogênico em cultura de células de ovário de hamster Chinês (CHO) *in vitro*.
5. Determinar o potencial genotóxico e antigenotóxico pelo ensaio cometa alcalino e modificado das frações em cultura de células de ovário de hamster Chinês (CHO) *in vitro*.
6. Verificar o potencial mutagênico das frações de *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia em células procarióticas de *Salmonella tiphymurium*.

# Capítulo I

## **Chemical characterization, cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of Colombian and Brazilian *Baccharis trinervis* (Lam, Persoon).**

Victoria Jaramillo<sup>1</sup>, Cristiano Trindade<sup>1</sup>, Sidnei Moura<sup>2</sup>, Temenouga Nikolova<sup>3</sup> Guecheva, Dione Correa<sup>3</sup> Alexandre Ferraz<sup>4</sup>, Juliana Da Silva<sup>4</sup>, João Antônio Pegas Henriques<sup>1,2,3</sup>.

1. Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia–UFRGS, Porto Alegre- RS-Brasil
  2. Instituto de Biotecnologia UCS, Caxias do Sul— RS-Brasil
  3. Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica–ROYAL Unidade GENOTOX–ROYAL/Centro de Biotecnologia , Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) , Porto Alegre , RS , Brasil
  4. PPG Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – ULBRA , Canoas – RS-Brasil.
- Manuscrito a ser submetido à Plant Physiology and Biochemistry

**Chemical characterization, cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of Colombian and Brazilian *Baccharis trinervis* (Lam, Persoon).**

Victoria Jaramillo<sup>1</sup>, Cristiano Trindade<sup>1</sup>, Sidnei Moura<sup>2</sup>, Temenouga Nikolova<sup>3</sup> Guecheva, Dione Correa<sup>3</sup> Alexandre Ferraz<sup>4</sup>, Juliana Da Silva<sup>4</sup>, João Antônio Pegas Henriques<sup>1,2,3</sup>.

1. Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia–UFRGS, Porto Alegre- RS-Brasil
2. Instituto de Biotecnologia UCS, Caxias do Sul— RS-Brasil
3. Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica–ROYAL Unidade GENOTOX–ROYAL/Centro de Biotecnologia , Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) , Porto Alegre , RS , Brasil
4. PPG Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – ULBRA , Canoas – RS-Brasil.

**ABSTRACT**

*Baccharis trinervis* have been long used in folk medicine as an antiseptic, for the treatment of high fevers, edema, sores, muscle cramps, as well as antioxidant, anti HIV, antifungal and antimicrobial properties.

The chemical composition of aqueous extracts and fractions of *B. trinervis* from Brazil (AEB) and Colombia (AEC) were investigated, as well as their cytotoxic and genotoxic effects in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, and mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. The HPLC of EB and AEC showed the presence of rutin and caffeic, ellagic and rosmarinic acid, also luteoline was identified in AEC. The analysis by HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) in positive mode of aqueous extract from Brazil and Colombia, Butanol fraction from Brazil (BFB), Butanol fraction from Colombia (BFC), Aqueous residue from Brazil (ARB), and Aqueous residue from Colombia (ARC) showed similar compounds with an intensive peak  $[M+H]^+$  at  $m/z$  118.0870, which was proposed  $C_5H_{12}NO_2$  as molecular formula. In other hand, were

identified two carboxylic acids and one terpenoid, in negative mode. The analyses in positive mode of Ethyl acetate fractions from Brazil (EAFB) and Ethyl Acetate fraction from Colombia (E AFC) evidenced the presence of phenolic compounds, acetilenes and terpenoids.

Dose-dependent cytotoxic effects were observed in CHO cells treated with Brazilian and Colombia *B. trinervis* fractions by using clonal survival and 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide reduction assay (MTT). Was observed a significant decrease in survival by AEB, EAFB, BFB, and ARB at 0.05 mg/mL and higher concentrations; in addition, AEB and ARB presented a significant decrease at 0.1 mg/mL. The AEB, AEC, ARB, and ARC caused DNA strand breaks in CHO at 0.05 mg/mL with dose-dependent response. Furthermore, the EAFB, E AFC, and BFC showed genotoxic effect at 0.1 mg/mL, while BFB presented a significant difference at 0.5 mg/mL. No mutagenic effects were observed in EAFB and E AFC by the Ames test. The results suggest possibly that flavonoids, phenylpropanoids, coumarines, and diterpens can be responsible, at least in part, for its cytotoxic and genotoxic effects by oxidant potential.

## INTRODUCTION

*Baccharis* species (Asteraceae) have been long used in folk medicine, have been investigated as a source of new natural products with potential antimicrobial, antifungal, antitumoral and insecticidal activities (Verdi *et al.* 2005) . This genus has around 500 species distributed worldwide in which *B. trinervis* (Lam, Persoon) is mainly restricted to the tropical and subtropical zone of South America, including Colombia and Brazil (Fukuda *et al.* 2006). *B. trinervis* is a perennial shrub used in popular medicine as an antiseptic, as well as in the treatment of high fevers, edema, sores and muscle cramps (Freire *et al.* 2007).

Previous phytochemical studies carried out with *B. trinervis* were done with different solvents and plant parts. For instance, dichloromethane extract or branches (Sharp *et al.* 2001a), the ethyl acetate – soluble fraction of methanol extract of aerial parts

(Kuroyanagi and Ueno 1993), essential oils from the aerial parts (Albuquerque *et al.* 2004) and chloroform extract from leaves (Herrera *et al.* 1996) were reported. These studies identified flavones, flavonones, neo-clerodane type diterpenes and terpenes (Albuquerque *et al.* 2004; Herrera *et al.* 1996; Kuroyanagi and Ueno 1993; Sharp *et al.* 2001).

Biological activities were reported for *B. trinervis* extracts. For instance, antioxidant properties have been described using ethanolic extract (de las Heras *et al.* 1998), anti HIV activity using aqueous extract (Sanchez-Palomino *et al.* 2002), antifungal effects (Ocampo *et al.* 2006), and antimicrobial properties using essential oils (Albuquerque *et al.* 2004).

The geographical origin is a relevant factor that can affect the chemical composition of plants. Variability among the weather conditions, proximity of the sea, latitude and longitude must be taken into account in order to characterize the composition of a plant from different geographical areas of provenance (Alissandrakis *et al.* 2007; L. Castro Vasquez *et al.* 2010).

The popular use of *B. trinervis* in Colombia and Brazil contrasts with the rarity of studies about the toxicological effects of their extracts and fractions. For this reason, considering the relationship between therapeutic and toxicological effects is relevant the deepening of studies of plants which are used in popular medicine. The present work aims the evaluation of chemical composition and cytotoxic effects of aqueous extracts and fractions of *B. trinervis*, focusing on their cytotoxicity, genotoxic and mutagenic action using a immortalized Chinese hamster ovary (CHO) cells as well as mutagenic potential in *Salmonella typhimurium* strains.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Chemical reagents**

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, L-glutamine, and penicillin/streptomycin were obtained from GIBCO® (Grand

Island, NY, USA). Hydrogen Peroxide ( $H_2O_2$ ), 3- (4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT) and cytochalasin- B (Cyt-B) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Low melting point agarose and agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Giemsa stain was obtained from Merck (Darmst, Germany). All others reagents were analytical grade.

### **Plant material**

Brazilian *B. trinervis* leaves were collected at Morro Sétimo Céu (Marcelino Ramos-RS) in January 2009 and vouchers specimens were identified by Dr. Sergio Bordignon which were deposited at the Herbarium at Universidade Luterana do Brasil. In the other hand, Colombian *B. trinervis* leaves were collected at Puente - Arroyo El Carbón (Planeta Rica-Cordoba) in December 2008. Vouchers specimens were identified by O. A. Jara and were deposited at the Herbarium at Universidad Nacional de Colombia. Brazilian and Colombian *B. trinervis* leaves were provided by the Biomedical Sciences Laboratory of the Universidad del Sinú in Colombia and the Phytochemical and Pharmacognosy Laboratory at the Universidade Luterana do Brasil-RS.

### **Preparation of extracts and fractions**

Leaves were dried at room temperature, powdered (50 g) and submitted an extraction with water by infusion for 15 min (1/10) plant/solvent). After cooling, the filtered extract was separated in two parts of 250 mL. The first half was frozen and concentrated by lyophilization for five days overnight, obtaining the aqueous extract (AE). The second one was successively partitioned with solvents of different polarities in order to obtain the ethyl acetate fraction (EAF), n-butanol fraction (BF) and aqueous residue (AR). The aqueous residue was either concentrate by lyophilization. All the organic extracts were concentrated to dryness under reduced pressure and temperature below 40 °C.

## **Phytochemical screening**

The fractions were subjected to qualitative chemical screening according to methodology described by Falkenberg *et al.* (2007) and Harbone (1998). The method consists in colorimetric reactions for qualitative detection of flavonoids, tannins, anthraquinones, alkaloids, saponins, and cardiac glycosides. The quantification of flavonoids contents was performed using the methodology described by Woisky and Salatino (1998).

## **Determination of total flavonoid content**

The total flavonoid content was determined following the colorimetric method using aluminum chloride (Woisky and Salatino, 1998). In summary, a number of dilutions of quercetin were obtained to prepare a calibration curve. Flavonoid content was determined dissolving 50 mg of each sample in water and sub-sequent dilution with than olina 25-mL volumetric flask. Secondly, 1 mL of aluminum chloride solution 2.5% was added to 2.0 mL of the stock solution in 25-mL volumetric flask. The final volume was adjusted with ethanol. After 30min, readings at 425 nm were performed in a Shimadzu spectrophotometer for each solution. The determinations were performed in triplicate and the total contents of flavonoid in the fractions were expressed as quercetin equivalents (QE) in mg/g of extract.

## **HPLC analyses**

Chromatographic analyses were carried out through the reverse-phase HPLC using a Waters 2695 Alliance Separation Module. This was equipped with a Waters 2487  $\lambda$  Dual Wavelength UV Detector and controlled by an IEEE-488 interface module. For the stationary phase, a Waters Spherisorb ODS2 reverse phase column (250 x 4.6 mm - 5 $\mu$ m diameter particles) was used. Reference standards were used as external standards. A constant flow-rate of 1 mL.min<sup>-1</sup> was used during the analysis. HPLC grade solvents and milli-Q water were used in the chromatographic studies. The phenolic acids and flavonoids were quantitative determined at 254 and 290 nm using



mobile phases pure acetonitrile (A) and 0.1 % phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (B). The gradient system was adjusted at 0/95, 20/86, 70/65 (min/%B). The correlation of chromatographic peaks was achieved by comparing experimental retention times with reference standards. All chromatographic operations were carried out in triplicate at ambient temperature.

### **Mass analysis**

The dried extracts were dissolved in a solution of 50% (v/v) chromatographic grade acetonitrile (Tedia, Fairfield, OH, USA), 50% (v/v) deionized water. Was added 0.1% formic acid and 0.1% of ammonium hydroxide for analysis in positive and negative mode respectively. The solutions were infused directly individually or with HPLC (Shymadzu) assistance into the ESI source by means of a syringe pump (Harvard Apparatus) at a flow rate of 10  $\mu\text{L min}^{-1}$ . ESI(+)-MS, ESI(-)-MS and tandem ESI(+)-MS/MS, ESI(-)-MS/MS were acquired using a hybrid high-resolution and high accuracy (5  $\mu\text{L/L}$ ) microTof (Q-TOF) mass spectrometer (Bruker Scientific®) under the following conditions: capillary and cone voltages were set to + 3500 V and +40 V, respectively, with a de-solvation temperature of 100 °C. For ESI(+)-MS/MS and ESI(-)-MS/MS the energy for the collision induced dissociations (CID) was optimized for each component. Diagnostic ions in different fractions were identified by the comparison of their dissociation patterns, exact mass and isotopic ratio with compounds identified in previous studies. For data acquisition and processing, TOFcontrol and data analysis software (Bruker Scientific®) were used. The data were collected in the  $m/z$  range of 70–1000 at the speed of two scans per second, providing the resolution of 50,000 (FWHM) at  $m/z$  200. No important ions were observed below  $m/z$  180 or above  $m/z$  650, therefore ESI(+)-MS data is shown in the  $m/z$  180–650 range.

## **Culture and treatment**

Chinese hamster ovary cells (CHO cells) were cultivated under standard conditions in DMEM, supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.2 mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. Cells were kept in tissue-culture flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air and were harvested by treatment with 0.15% trypsin–0.08% EDTA in PBS. Cells ( $1 \times 10^4$ ) for MTT test in 24 well plate, (200) for clonal survival and ( $3 \times 10^5$ ) for comet assays and micronucleus in 6 well plate, were seeded in complete media and grown for one day prior to treatment with as fractions.

The AE, BF, RF were dissolved in distilled water, the AEF were dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide) added to FBS-free media to achieve the different designed concentrations (0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5 and 2.0 mg /mL), and the cells were treated for 3 h under standard conditions. The final DMSO concentration in the media never exceeded 0.2%. The negative control was exposed to an equivalent concentration of solvent. As H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 µM) for genotoxicity assays was used as a positive control.

## **Colony-forming ability (Clonal survival)**

After treatment with the different extracts/fractions of Colombian and Brazilian *B. trinervis*, CHO cells grew exponentially and were washed with PBS and cultivated for 5–7 days. Colonies were fixed with methanol, stained with crystal violet (1%), counted and their survival was calculated as a percentage relative to the survival of the controls.

## **MTT Assay**

MTT reduction was performed according to Denizot and Lang (1986). Briefly, after treatments, cells were washed once with PBS before the addition of 0.1 mL serum-free media containing yellow tetrazolium salt (MTT; 1 mg/mL) dye and incubated for 3 h at 37°C. After incubation, the supernatant was removed, the residual purple formazan product solubilized in 0.4 mL DMSO, stirred for 5 min and its absorbance

measured at 540 nm. The absorbance of negative control cells was set as 100% viability and the values of treated cells were calculated as percentage of control.

### **The alkaline comet assay**

The alkaline comet assay (Tice *et al.* 2010) was performed with minor modifications (Hartmann and Speit 1997). At the end of the treatment, cells were washed with ice-cold PBS and trypsinized (0.15%). After 30 s, 100  $\mu$ L complete DMEM medium was added and the cells were gently resuspended. Immediately, 20  $\mu$ L of cell suspension was dissolved in 0.75% low melting point agarose, and spread on regular, pre-coated agarose-point (1.5%) microscope slides. Thus, cells were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, and 10 mM Tris, pH 10.0, with freshly added 1% Triton X-100 and 10% DMSO) at 4°C for at least 1 h to remove cell proteins, leaving DNA as “nucleoids”. The alkaline comet assay was performed at pH 13. After lysis, slides were then placed in a horizontal electrophoresis box containing freshly-prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH ~13.0) at 4 °C for 20 min in order to facilitate DNA unwinding. A 300 mA and 25 V (0.9 V/cm) electric current was applied for 20 min to perform DNA electrophoresis. All of the above steps were performed under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver nitrate and analyzed using an optic microscope. One hundred cells (100 cells from each of two replicate slides of each treatment) were selected and analyzed for DNA migration. Cells were visually scored according to tail length into five classes: (1) class 0: undamaged, with no tail, (2) class 1: with tail shorter than the diameter of the head (nucleus), (3) class 2: with tail as long as 1-2x the diameter of the head, (4) class 3: with tail longer than 2x the diameter of the head, and (5) class 4: comets with no heads. Damage index (DI) is an arbitrary score calculated for cells in different damage classes, which are visually scored by measuring DNA migration length and the amount of DNA in the tail. DI ranges from 0 (no tail: 100 cells  $\times$  0) to 400 (with maximum migration: 100 cells  $\times$  4)

### ***Salmonella*/microsome mutagenicity assay**

*S. typhimurium* strains TA98, TA97a, TA100, TA102 and TA1535 were kindly provided by B. M. Ames (University of California, Berkeley, CA, USA). Mutagenicity was assayed by the preincubation procedure. The S9 metabolic activation mixture (S9 mix) was prepared according to Maron and Ames (1983). Briefly, 100  $\mu$ L of test bacterial cultures ( $1-2 \times 10^9$  cells/mL) were incubated at 37°C with different amounts of *Baccharis trinervis* ethyl acetate fractions in the presence or absence of S9 mix for 20-30 min, without shaking. Subsequently, 2 mL of soft agar (0.6% agar, 0.5% NaCl, 50  $\mu$ M histidine, 50  $\mu$ M biotin, pH 7.4, 42°C) were added to the test tube and poured immediately onto a plate of minimal agar (1.5% agar, Vogel-Bonner E medium, containing 2% glucose). Aflatoxin B<sub>1</sub> (1 $\mu$ g/plate) was used as positive control for all strains in the presence of metabolic activation (with S9 mix). In the absence of metabolic activation, 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO, 0.5 $\mu$ g/plate) was used for TA97a, TA98, and TA102 strains, and sodium azide (1 $\mu$ g/plate) for TA100 and TA1535 strains. Plates were incubated in the dark at 37°C for 48 h before counting the revertant colonies.

### **Statistical analysis**

All experiments were independently repeated at least three times, results are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and means were compared using the Tukey test, with  $P < 0.05$  considered as statistically significant.

For the Ames test the results were analysed by the *Salmonella* Statistic Assay (Environmental Monitoring System Laboratory, EPA - Software Version 2.3, April 1988). A test substance was considered mutagenic when significant dose-response and ANOVA variance were observed, and the increase in the mean number of revertants on test plates was at least twice higher than that observed in the negative control plates (or  $MI \geq 3$  for TA1535 strain).

## RESULTS

### Phytochemical analyses

Phytochemical analyses in *B. trinervis* extracts/fractions from Brazil and Colombia indicated the presence of saponins and flavonoids (data not show). Other secondary metabolites such as anthraquinones, cardiac glycosides, cumarins, alkaloids and tannins were not detected.

### Determination of total flavonoids

The amount of total flavonoids of *B. trinervis* extracts/fractions from Brazil and Colombia are showed in the table 1. The aqueous extracts showed the highest concentration of flavonoids when compared with the fractions. In addition, among the fractions, the n-butanol exhibited the lowest content of flavonoids.

**Table 1.** Total flavonoids content of *Baccharis trinervis* extracts/fractions from Colombia and Brazil.

Sample	Aqueous extract	Ethyl Acetate Fraction	nbutanol Fraction	Aqueous residue
Brazilian <i>B. trinervis</i>	3,266 ± 0,236	3, 208 ± 0,199	0,645 ± 0,045	2,469 ± 0,097
Colombian <i>B. trinervis</i>	3,704 ± 0,045	2,340 ± 0,09	1,464 ± 0,074	3,718 ± 0,076

Values represent the amount of total flavonoids in quercetin equivalents (QE) in mg/g of extract.  
Data represent the mean ± standard deviation of three independent experiments

### HPLC analyses

The HPLC analyses of aqueous extracts of *B. trinervis* from Brazil and Colombia are showed in Table 2. We identified four new compounds on both samples to *B. trinervis*: rutin and caffeic, rosmarinic, and ellagic acid. In addition, the content of identified compounds is higher in AEC than AEB. The compound luteolin was identified only for AEC at 0,46 mg/mL.

**Table 2.** Compounds identified in the aqueous extract of *B. trinervis* from Brazil and Colombia<sup>a</sup>.

Compounds	Colombian <i>B. trinervis</i> aqueous extract (mg/mL of extract)	Brazilian <i>B. trinervis</i> aqueous extract (mg/mL of extract)
Caffeic acid	6,93	1,44
Rutin	5,16	1,41
Ellagic acid	9,74	1,35
Rosmarinic acid	6,69	1,55
Luteolin	0,46	Not detected

<sup>a</sup> Experiments were carried out in triplicate at ambient temperature.

### Chemical composition

After the identification by HPLC and in order to elucidate the chemical composition and considering the complex constituents of aqueous extracts and fractions of *B. trinervis*, was carried out ESI-MS/MS technique, which is an important tool to characterize and identify metabolites. This method has been used for the rapid analysis of natural products, such as flavonoids (Vessecchi *et al.* 2011), and terpenoids (Yang *et al.* 2007). The measurements were done by HRMS with ESI. Because the chemical composition complexity, the analysis was conducted in both negative and positive mode, and 0.1% of formic acid or 0.1% of ammonium hydroxide was introduced into the sample solution respectively. By the way, the information set as isotopic ratio and exact mass were used for chemical identification of Brazilian and Colombian *B. trinervis* by direct comparison with reference data (Table 3). In some cases, there are no compounds previously identified in literature for this genus, and the molecular formula was indicated.

The spectrum of positive mode obtained from the AEB, AEC, BFB, BFC, ARB, and ARC presented similar fingerprints (Fig. 1) with the intensive  $m/z$  at 118.0870, which

was  $C_5H_{12}NO_2$  as proposed molecular formula. For the other hand, the EAFB and EAFC (Fig. 2) showed different pattern of peaks, evidenced higher content of compounds than the others fractions, in the EAFB and EAFC were identified five news compounds: 7-hydroxy-2*H*-1-Benzopyran-2-one ( $m/z$  163.0386); 2-Propenoic acid, 3-[2,4-dihydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-, (*E*)-(9CI) ( $m/z$  249.1132); 8,15-Heptadecadiene-11,13-diynoic acid, 3-hydroxy-, (*E,Z*)- (9CI) ( $m/z$  275.1647), 5-Heptene-1,2-diol, 2-[(2*S*,3*S*,6*R*)-2-[2-(3-furanyl)ethyl]-1,5-dioxaspiro[2.5]oct-6-yl]-6-methyl-, (2*S*) ( $m/z$  351.2157); and 1-Naphthalenemethanol, 5-[5-(acetyloxy)-3-methyl-3-pentenyl]-1,2,3,4,4a,5,8,8a-octahydro-1,4a,6-trimethyl-acetate (9CI) ( $m/z$  391.2869).

In negative mode (Fig. 3) the results indicate presence of carboxylic acid because it is easily ionization. Were identified the three news compounds: 7-hydroxy-2*H*-1-Benzopyran-2-one ( $m/z$  163.0386); 2-Propenoic acid, 3-[2,4-dihydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-, (*E*)-(9CI) ( $m/z$  249.1132); 8,15-Heptadecadiene-11,13-diynoic acid, 3-hydroxy-, (*E,Z*)- (9CI) ( $m/z$  275.1647), 5-Heptene-1,2-diol, 2-[(2*S*,3*S*,6*R*)-2-[2-(3-furanyl)ethyl]-1,5-dioxaspiro[2.5]oct-6-yl]-6-methyl-, (2*S*) ( $m/z$  351.2157); and 1-Naphthalenemethanol, 5-[5-(acetyloxy)-3-methyl-3-pentenyl]-1,2,3,4,4a,5,8,8a-octahydro-1,4a,6-trimethyl-acetate (9CI) ( $m/z$  391.2869).

Table 3. Chemical composition of Colombian and Brazilian *B. trinervis* extract and fractions by HRMS -ESI-MS

Entry	Precursor ion m/z(%)	Isotopic ratio	Elem. comp.	Diff. ppm	Identification	References
<b>Main components in extracts EAFB and EAFC in ESI-MS(+)</b>						
1	163.0386	164.0445 (9.8%)	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	3.18	7-hydroxy-2H-1-Benzopyran-2-one (Umbelliferone)	Bohlmann . <i>et al.</i> 1985
2	249.1132	250.1207 (17.88%)	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	2.07	2-Propenoic acid, 3-[2,4-dihydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-, (E)- (9CI)	Brown, G <i>et al.</i> 1994
3	275.1647	276.1628 (20.86%)	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	0.07	8,15-Heptadecadiene-11,13-dienoic acid, 3-hydroxy-, (E,Z)- (9CI)	Jakupovic <i>et al.</i> .1991
4	351.2157	352.2236 (23.20%)	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	4.12	5-Heptene-1,2-diol, 2-[(2S,3S,6R)-2-[2-(3-furanyl)ethyl]-1,5-dioxaspiro[2.5]oct-6-yl]-6-methyl-, (2S)-	Hikawczuk <i>et al.</i> 2008
5	391.2869	392.2800 (25.48%), 393.2838 (6.51%)	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	5.25	1-Naphthalenemethanol, 5-[5-(acetyloxy)-3-methyl-3-pentenyl]-1,2,3,4,4a,5,8,8a-octahydro-1,4a,6-trimethyl-acetate (9CI)	Tonn, C. <i>et al.</i> 1982
6	413.2703	414.2736 (30.21%), 415.2373 (7.98%)	C <sub>26</sub> H <sub>37</sub> O <sub>5</sub>	2.67		
7	429.3007	430.2967 (22.14%), 431.2686 (10.47%)	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	0.51		
7	517.3683	518.3666 (31.24%), 519.2945 (12.24%)	C <sub>35</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	0.25		
8	561.3984	562.2925 (31.21%), 563.3414 (12.72%)	C <sub>30</sub> H <sub>57</sub> O <sub>9</sub>	3.31		
<b>Main components in extracts EAFB and EAFC in ESI-MS(-)</b>						
9	313.0855		C <sub>31</sub> H <sub>13</sub> O <sub>3</sub>	3.09		
10	327.2315		C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2.76		



11	329.0806		C <sub>21</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	2.38		
Main components in extracts BFB, BFC, AEB, AEC, RFB and RFC ESI-MS (+)						
12	118.0870	119.0800 (6.20%)	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	1.66		
13	217.1070	218.0881 (12.28%)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	2.75		
14	235.1555	236.1230 (10.44%)	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	4.04		
15	565.1726	566.1800 (13.50%)	C <sub>10</sub> H <sub>29</sub> O <sub>11</sub>	2.85		
Main components in extracts BFB, BFC, AEB, AEC, RFB and RFC ESI-MS (-)						
16	191.0565		C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	4.90	1,3,4,5-tetrahydroxy-(1 $\alpha$ ,3R,4 $\alpha$ ,5R)-Cyclohexanecarboxylic acid	Argoti J. <i>et al.</i> 2013
17	255.2335		C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	4.28	Hexadecanoic acid	Silva, D <i>et al.</i> 2009
18	325.2027		C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	3.69		
19	339.2163		C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	2.50	1,4-Cyclohexanedimethanol, $\alpha^1$ -[3-(acetyloxy)-4-methyl-4-penten-1-yl]- $\alpha^1$ -methyl- 4-acetate	Zdero, C. <i>et al.</i> 1989

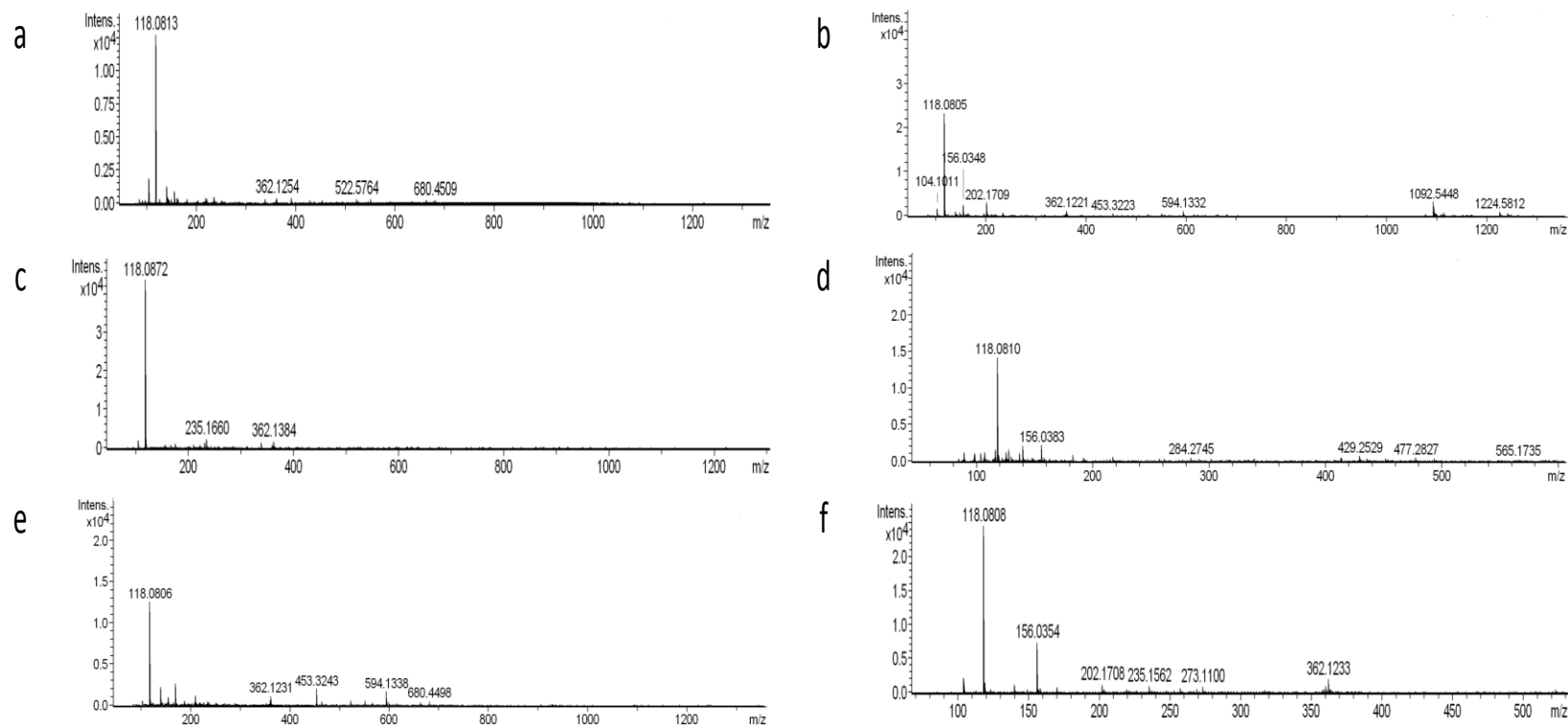


Figure 1 . Full mass spectra of extracts/fractions in positive mode. (a) Aqueous extract Brazilian *B. trinervis*, (b) nbutanol fraction Brazilian *B. trinervis*, (c) Aqueous residue Brazilian *B. trinervis*, (d) Aqueous extract Colombian *B. trinervis*, (e) nbutanol fraction Colombian *B. trinervis* e (f) Aqueous residue Colombian *B. trinervis*.

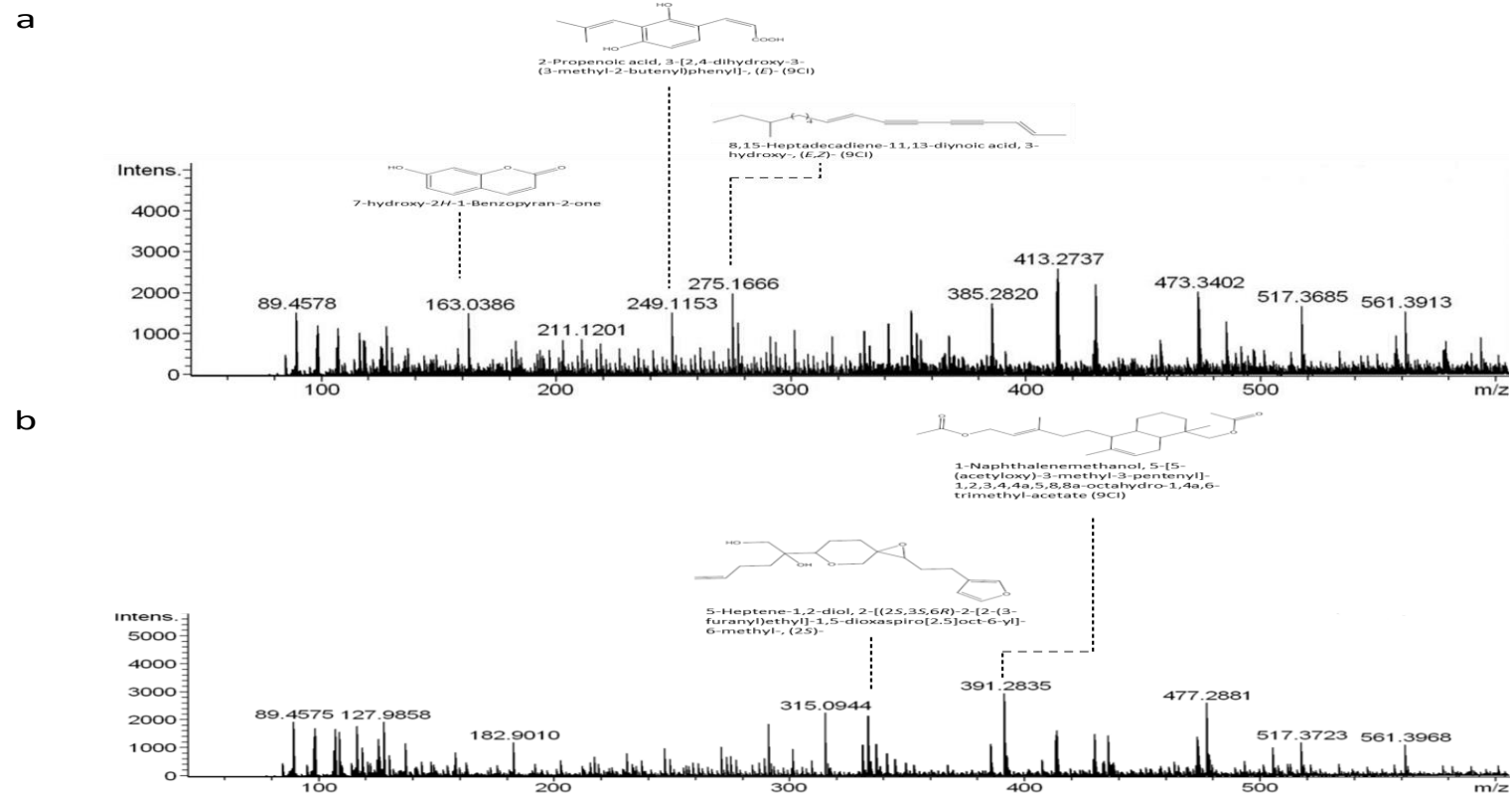


Figure 2. Full mass spectra of extracts in positive mode of Ethyl Acetate Fractions of *B. trinervis* (a) Ethyl Acetate Fractions Brazilian *B. trinervis* (b) Ethyl Acetate Fractions Colombian *B. trinervis*

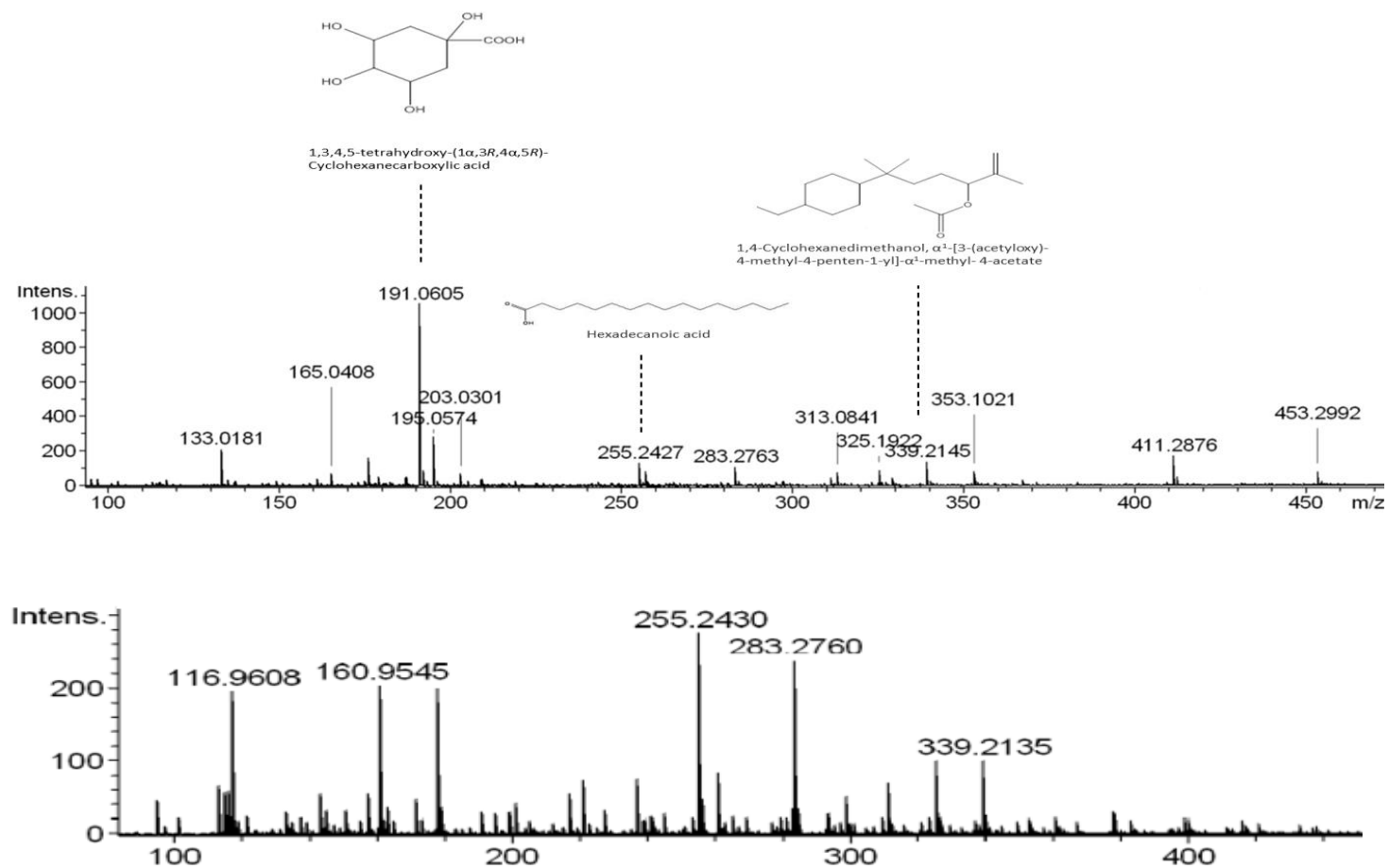


Figure 3. Full mass spectra of extracts in negative mode of *B. trinervis*. (a) Aqueous extract of *B. trinervis* from Colombia  
 (b) Aqueous extract of *B. trinervis* from Brazil

## Cytotoxicity

In order to evaluate the cytotoxic properties of aqueous extract and fractions of Colombian and Brazilian *Baccharis trinervis*, two different approaches were used. MTT reduction of Brazilian *B. trinervis* fractions (Fig. 5a) showed dose-dependent changes in the viability of CHO cells. Our results showed a significant decrease in survival induced by AEB, EAFB, BFB, and ARB at concentrations higher than 0.05 mg/mL. Additionally, Fig. 5c shows the effects on cell growth when evaluated by the colony forming ability in which AEB and ARB presented a significant decrease at 0.1 mg/mL when compared with the negative control.

In the case of Colombian *B. trinervis*, dose-dependent changes in the viability of cells treated with different fractions showed similar toxicity when evaluated by MTT assay (Fig. 5b) and colony forming assay (Fig. 5d). Thus, AEC, EAFC, BFC and ARC induced a significant decrease in cell survival at 0.05 mg/mL when compared to the negative control. The use of this different cell survival test confirms the cytotoxicity of the Brazilian and Colombian *B. trinervis* detected in MTT assay.

## Genotoxicity

Considering the cytotoxic level observed, we investigated if the extracts/fractions were capable of induce DNA damage. Results are shown in table 4. Statistically significant difference was observed in AEB, AEC, ARB and ARC at 0.05 mg/mL with dose-dependent response. On the other hand, the EAFB, EAFC and BFC showed a significant difference at 0.1 mg/mL, while BFB presented a significant difference at 0.5 mg/mL. The EAFB and EAFC were the most genotoxic fractions, in fact; it was not possible to assess the genotoxic effects at 1 mg/mL because the cellular survivals were below 60%.

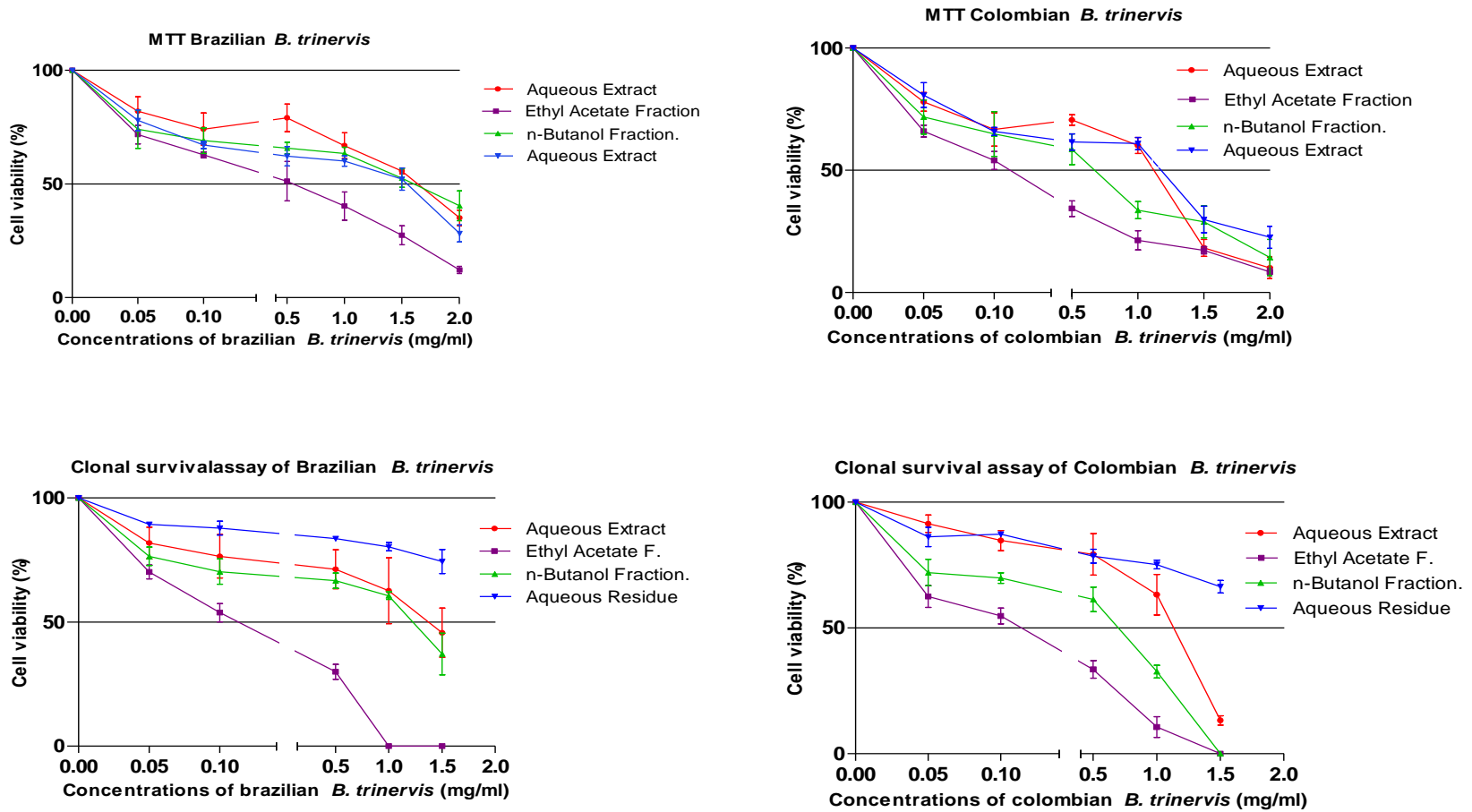


Figure 5. Cytotoxic effects of Brazilian and Colombian *B. trinervis* fractions in CHO cells after 3 hours of exposure by: (a) MTT assay of Brazilian *B. trinervis* fractions, (b) MTT assay of Colombian *B. trinervis* fractions, (c) clonogenic survival of Brazilian *B. trinervis* fractions and (d) clonogenic survival of Colombian *B. trinervis* fractions. Results are expressed as mean percentage in treated cells compared to control negative (FBS - free DMEM medium)  $\pm$  standard deviation of three independent experiments

Table 4. Genotoxic activity of Colombian and Brazilian *B. trinervis* fractions in CHO cells as evaluated by the alkaline comet assay

Group	Damage Index (DI) ± SD							
	Aqueous Extract		Ethyl Acetate Fraction		n-butanol Fraction		Aqueous Residue	
	Brazil	Colombia	Brazil	Colombia	Brazil	Colombia	Brazil	Colombia
NC	13.6 ± 1.8	14.6 ± 11.1	20.0 ± 1.3	15.3 ± 1.2	23.6 ± 2.2	17.8 ± 4.2	17.6 ± 7.5	23.6 ± 2.0
150 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	240.3 ± 13.8 <sup>a</sup>	223.5 ± 10.5 <sup>a</sup>	251.8 ± 4.5 <sup>a</sup>	262.1 ± 8 <sup>a</sup>	274.3 ± 13.7 <sup>a</sup>	294.8 ± 11.8 <sup>a</sup>	215.8 ± 13.5 <sup>a</sup>	221.1 ± 18.0 <sup>a</sup>
<b>Extract/Fractions Concentration</b>								
<b>0.05 mg/mL</b>	63.8 ± 13.0 <sup>a</sup>	46.5 ± 10.1 <sup>a</sup>	32.3 ± 3.5	31.1 ± 6.3	42.8 ± 4.4	61 ± 2.6	73.6 ± 11.0 <sup>a</sup>	93.8 ± 12.6 <sup>a</sup>
<b>0.1 mg/mL</b>	123.1 ± 12.9 <sup>a</sup>	66.1 ± 8.6 <sup>a</sup>	68.5 ± 10.8 <sup>a</sup>	96.3 ± 9.7 <sup>a</sup>	46.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	65.1 ± 5.8 <sup>a</sup>	139.8 ± 8.8 <sup>a</sup>	110.0 ± 7.4 <sup>a</sup>
<b>0.5 mg/mL</b>	144.6 ± 10.1 <sup>a</sup>	108.1 ± 8.8 <sup>a</sup>	195.3 ± 11.4 <sup>a</sup>	249.5 ± 11.0 <sup>a</sup>	56.7 ± 5.6 <sup>a</sup>	93.6 ± 7.5 <sup>a</sup>	168.3 ± 10.7 <sup>a</sup>	117.6 ± 10.5 <sup>a</sup>
<b>1.0 mg/mL</b>	204.3 ± 2.0 <sup>a</sup>	134.8 ± 8.8 <sup>a</sup>	----	----	61.6 ± 5.5 <sup>a</sup>	165.5 ± 12.5 <sup>a</sup>	172.1 ± 8.5 <sup>a</sup>	126.8 ± 15.0 <sup>a</sup>

Induction of DNA strand breaks by *B. trinervis* from Brazil and Colombian in CHO cells after 3 hours of exposure by the alkaline comet assay

Data represent the mean ± standard deviation of three independent experiments. DI: damage index: can range from 0 (completely undamaged. 100 cells×0) to 400 (with maximum damage 100 cells×4). NC: Negative Control (FBS - free DMEM medium); 150 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Positive Control

<sup>a</sup> significant difference as compared to negative control treatment at P<0.001/One-way

### ***Salmonella/microsome assay***

The Ethyl Acetate Fraction of Colombian and Brazilian *B. trinervis* dose range was determined in range finder experiment in TA100 strain, with and without metabolism, and cytotoxicity was observed at concentrations higher than 200  $\mu\text{g}/\text{plate}$  (data not shown). In the mutagenicity assay the dose range between 40-200  $\mu\text{g}/\text{plate}$  was used for the EAFB (Table 5) and the EAFC (Table 6). No mutagenic effect was detected on strains TA98 (detects frameshifts in the DNA target -C-G-C-G-C-G-C-G) and TA97a (detects frameshift mutations in -C-C-C-C-C-C-; +1 cytosine) in the presence or absence of metabolic activation. Also, no mutagenicity was observed in the strains detecting base pair substitutions TA1535 and the corresponding isogenic strain TA100 (detect base pair substitutions of a leucine [GAG] by proline [GGG]). Cytotoxic activities were detected in TA1535 at 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$  and higher concentrations by ethyl acetate fractions. EAFC was cytotoxic without metabolic activation and EAFB after metabolic activation. However, the cytotoxic activity showed by EAFB could not be a real effect, because the number of revertant colonies in the negative control was very high in relation to the historical data in our laboratory ( $8.00 \pm 3.00$ ). For this reason, the AEFB data were taken as a negative result. Negative results were also observed in TA102 strain which is sensitive to oxidative and alkylating mutagens (detects transversions or transitions in TAA DNA sequences) (D.M. Maron 1983)



Table 5. Induction of *his+* revertants in *S. typhimurium* strains by Brazilian *B. trinervis* Ethyl Acetate Fraction with and without metabolic activation (S9 mix)

<i>S. typhimurium</i> strains											
Substance	Concentration (µg/plate)	TA98		TA97a		TA100		TA1535		TA102	
		Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>
Without metabolic activation (-S9)											
NC <sup>c</sup>	-	16.7±9.8	-	77.7±7.8	-	108.0±3.5	-	8.3±3.2	-	333.0±12.8	-
Extract	40	16.0±1.0	0.96	78.0±8.7	1.00	99.7±10.3	0.92	6.0±0.0	0.72	335.3±26.1	1.01
	80	18.3±2.3	1.10	82.7±4.0	1.06	111.0±14.5	1.03	9.0±3.0	1.08	346.3±3.1	1.04
	120	14.3±5.9	0.86	93.3±2.3	1.20	98.3±12.4	0.91	13.0±1.7	1.56	322.7±16.8	0.97
	160	13.0±6.1	0.78	92.0±14.4	1.18	106.7±3.8	0.99	5.0±4.0	0.60	348.0±10.6	1.05
	200	15.7±1.2	0.94	77.3±6.8	1.00	102.0±18.4	0.94	11.0±3.5	1.32	335.0±25.5	1.01
PC <sup>d</sup>	0.5 (4NQO) 1 (NaN <sub>3</sub> )	173.7±6.0 <sup>***</sup>	<b>10.42</b>	471.3±24.0 <sup>***</sup>	<b>6.07</b>	520.0±45.0 <sup>***</sup>	<b>4.81</b>	314.7±24.0 <sup>***</sup>	<b>37.8</b>	3375.7±291.5 <sup>***</sup>	<b>10.13</b>
With metabolic activation (+S9)											
NC <sup>c</sup>	-	43.0±7.2	-	79.7±8.1	-	100.0±13.9	-	22.0±6.9	-	457.7±49.3	-
Extract	40	41.7±8.7	0.97	94.0±5.2	1.18	97.3±15.7	0.97	18.7±8.5	0.85	420.0±47.7	0.92
	80	44.0±2.0	1.02	89.3±0.6	1.12	127.7±6.0	1.28	6.3±4.7	0.29	437.7±50.1	0.96
	120	49.0±17.4	1.14	91.7±10.7	1.15	104.7±11.0	1.05	9.3±1.2	0.42	423.3±58.7	0.92
	160	52.0±2.7	1.21	94.3±8.4	1.18	118.3±11.9	1.18	6.3±3.2	0.29	360.7±27.2	0.79
	200	49.3±7.6	1.15	88.0±10.2	1.10	114.3±17.6	1.14	7.0±6.2	0.32	458.3±46.3	1.00
PC <sup>d</sup>	1 (AFB <sub>1</sub> )	914.7±76.8 <sup>***</sup>	<b>21.27</b>	286.0±3.59 <sup>***</sup>	<b>3.59</b>	282.7±13.2 <sup>**</sup>	<b>2.83</b>	136.0±47.3 <sup>**</sup>	<b>6.18</b>	3094.0±572.8 <sup>***</sup>	<b>6.76</b>

<sup>a</sup>Number of revertants/plate: mean of three independent experiments ± SD; <sup>b</sup>MI: mutagenic index (n<sup>o</sup>. of *his+* induced in the sample/n<sup>o</sup>. of spontaneous *his+* in the negative control);

<sup>c</sup>NC: negative control DMSO (10 µl) used as a solvent for the extract. <sup>d</sup>PC: positive control (-S9) sodium azide to TA100 and TA1535; 4-NQO to TA97a, TA98 and TA102; (+S9)

aflatoxin B<sub>1</sub>; \*Significantly different in relation to the negative control  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Table 6. Induction of *his+* revertants in *S. typhimurium* strains by Colombian *B. trinervis* Ethyl Acetate Fraction with and without metabolic activation (S9 mix).

<i>S. typhimurium</i> strains											
Substance	Concentration (µg/plate)	TA98		TA97a		TA100		TA1535		TA102	
		Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>	Rev/plate <sup>a</sup>	MI <sup>b</sup>
Without metabolic activation (-S9)											
NC <sup>c</sup>	-	18.7±3.1	-	79.7±10.0	-	114.7±10.6	-	14.3±5.9	-	302.0±32.1	-
Extract	40	15.3±5.1	0.82	74.3±18.5	0.93	104.0±16.4	0.91	13.3±5.9	0.93	308.0±25.5	1.02
	80	14.3±3.8	0.77	65.0±9.9	0.82	103.7±21.7	0.90	6.7±3.8	0.47	288.3±21.4	0.95
	120	15.3±2.9	0.82	78.3±2.9	0.98	96.3±9.3	0.84	8.0±2.7	0.56	300.0±33.9	0.99
	160	15.0±0.0	0.80	75.7±11.2	0.95	88.0±2.7	0.77	7.3±2.5	0.51	284.0±20.2	0.94
	200	18.3±3.5	0.98	71.3±4.0	0.89	88.3±10.5	0.77	2.7±1.2	0.19	269.0±5.3	0.89
PC <sup>d</sup>	0.5 (4NQO) 1 (NaN <sub>3</sub> )	169.0±4.6 <sup>***</sup>	<b>9.05</b>	413.0±54.2 <sup>***</sup>	<b>5.18</b>	561.7±37.4 <sup>***</sup>	<b>4.90</b>	419.7±13.0 <sup>***</sup>	<b>29.29</b>	2449.0±192.6 <sup>***</sup>	<b>8.11</b>
With metabolic activation (+S9)											
NC <sup>c</sup>	-	37.7±4.6	-	85.3±18.5	-	108.7±2.3	-	9.7±6.0	-	408.3±18.6	-
Extract	40	41.0±8.9	1.09	85.0±13.5	1.00	131.3±14.1	1.21	5.7±2.9	0.59	406.0±45.6	0.99
	80	39.0±3.6	1.04	86.0±7.0	1.01	122.7±18.0	1.13	7.0±4.4	0.72	435.0±47.6	1.07
	120	45.7±2.3	1.21	76.3±7.8	0.89	107.3±7.5	0.99	10.3±5.5	1.07	396.3±30.2	0.97
	160	47.0±7.2	1.25	75.7±8.6	0.89	125.0±15.7	1.15	10.3±4.0	1.07	377.0±30.8	0.92
	200	48.7±6.0	1.29	70.0±2.0	0.82	96.0±6.9	0.88	11.3±2.5	1.17	340.0±19.3	0.83
PC <sup>d</sup>	1 (AFB <sub>1</sub> )	737.3±50.8 <sup>***</sup>	<b>19.57</b>	302.3±90.6 <sup>**</sup>	<b>3.54</b>	310.3±50.9 <sup>**</sup>	<b>2.86</b>	110.7±20.5 <sup>**</sup>	<b>11.45</b>	2739.0±595.9 <sup>***</sup>	<b>6.71</b>

<sup>a</sup>Number of revertants/plate: mean of three independent experiments ± SD; <sup>b</sup>MI: mutagenic index (n<sup>o</sup>. of *his+* induced in the sample/n<sup>o</sup>. of spontaneous *his+* in the negative control); <sup>c</sup>NC: negative control DMSO (10 µl) used as a solvent for the extract. <sup>d</sup>PC: positive control (-S9) sodium azide to TA100 and TA1535; 4-NQO to TA97a, TA98 and TA102; (+S9) aflatoxin B1; \*Significantly different in relation to the negative control  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

## Discussion

*B. trinervis* has been used widely in the treatment of several disorders. The biological confirmation of its activities (Albuquerque *et al.* 2004; de las Heras *et al.* 1998; Sanchez-Palomino *et al.* 2002) and the study of the toxicological effects is an important parameter in the evaluation of the use of this plant as a pharmacological drug.

The elevated flavonoids content in aqueous extracts and ethyl acetate fractions of *B. trinervis* from Brazil and Colombia (Table. 1) is in agreement with the sustained order of phenolic compounds content in the different solvents: ethyl acetate, water and butanol (Termentzi *et al.* 2009). The identification by HPLC analyses of acid caffeic, acid ellagic, acid rosmarinic and rutin in AEC and AEB and luteolin only in AEC (Table 2) is the first report of these compounds in *B. trinervis*. These results are in concordance with the presence of flavonoids, and phenolic acids, diterpenes, and triterpenes in *Baccharis* species (Verdi *et al.* 2005). In addition, studies with *B. trinervis* described the chemical composition identified mainly flavonoids (flavones, flavonones) and terpenes (neo-clerodane type diterpenes and terpenes) (Albuquerque *et al.* 2004; Herrera *et al.* 1996; Kuroyanagi and Ueno 1993; Sharp *et al.* 2001b). Moreover, the difference in the concentrations of acid caffeic, acid ellagic, acid rosmarinic and rutin by HPLC (Table 2) could be explained by the difference climatic conditions, the geographical origin and its repercussion in the productions of compound phenolic (Kumar S *et al.* 2012).

In order to get more knowledge about the chemical composition, extracts/fractions of *B. trinervis* from Brazil and Colombia were analyzed by HRMS-ESI-MS. The information set as isotopic ratio and exact mass were used for chemical identification of Brazilian and Colombian *B. trinervis* by direct comparison with reference data (Table 3). Compounds identified in the present study have not been reported in *B. trinervis* (Herrera *et al.* 1996; Kuroyanagi and Ueno 1993; Rose *et al.* 2004; Sharp *et al.* 2001b). Thereby, the umbelliferone (m/z 163, 0386) is a coumarin present in the

EAFB and EAFC and was previously identified in *B. eggers* (Bohlmann *et al.* 1985). 2-Propenoic acid, 3-[2,4-dihydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-, (E)- (9Cl) was identified at  $m/z$  249,1132 corresponding to the molecular formula  $C_{14}H_{16}O_4$ , this phenolic compound has been identified in *B. linearis* (Brown 1994), however, it could be caffeic acid 1,1 dimethyl allyl ester, a derivate of caffeic acid described in brazilian propolis where a botanical origin was *B. dracunculifolia* (Junior *et al.* 2008; Park *et al.* 2004).

The presence of the compounds 3 ( $m/z$  275.1647), 4 ( $m/z$  351.2157) and 5 ( $m/z$  391.2869) in AEFB and AEFC (Tab. 2) are in agreement with the reports of Acetylenes (Bohlmann *et al.* 1985; Jakupovic *et al.* 1991) and linear and labdane-type diterpens in *Baccharis* species (Hikawczuk *et al.* 2008; Tonn *et al.* 1982). In fact, *Baccharis* is the genus of Asteraceae family which has presented the highest number of diterpenes found in 17% of family species (69 species with diterpenes/400 species in *Baccharis*). Within *Baccharis*, the most frequent skeletons are labdanes, clerodanes and kauranes (Alvarenga *et al.* 2005).

In some cases, there are no compounds previously identified in literature for *Baccharis*, and the molecular formula was indicated. Nevertheless, the structural elucidation of not yet identified compounds by its MS spectrum is not trivial and for complete deduction more studies are required. In this way, the isolation of the compounds and chemical structures information will be done by other spectroscopic methods.

In this study, we found that Brazilian and Colombian *B. trinervis* extracts/fractions were able to reduce CHO cell viability in a dose-dependent manner, by cloning forming ability and MTT assay (Fig. 5). It is in agreement with the cytotoxic activity of acetate extract of *B. dracunculifolia* observed at concentrations higher than 400  $\mu\text{g/mL}$  in studies using V79 cells (Munari *et al.* 2010), cytotoxic activity of ethanol fraction and aqueous residue of *B. trimera* in HEK cells at 78,1  $\mu\text{g/mL}$  and 86,2  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. Additionally, the aqueous extract was cytotoxic in swiss mice at

182,6 µg/mL (Nogueira *et al.* 2011). Phenolic compounds have been suggested as principal components responsible for the cytotoxic effects of *Baccharis* species (Munari *et al.* 2010; Nogueira *et al.* 2011; Tavares *et al.* 2006). In this sense, the fractions with major cytotoxic activity were ethyl acetate fractions and, as described above, our identified samples of EAFB and EAFC were phenolic compounds, diterpens, and acetilenes. Some of these compounds showed moderate cytotoxicity against a human pancreatic adenocarcinoma cell line (Sánchez *et al.* 2010), thus, umbelliferone showed cytotoxic activity against glioblastoma cell line (OE21), but it was not cytotoxic against esophageal carcinoma cell line, NSCLC cell line, prostate cancer cell line, melanoma cell line and colon cancer cell line (Bruyère *et al.* 2011). Labdane type diterpenes showed moderate cytotoxicity against human tumor cell lines HEP-2, HT-29, MKN-45, MCF-7, and HeLa (Franco *et al.* 2011); likewise, labdane isolates were studied in A-549 (lung cancer), SK-N-SH (human neuroblastoma), MCF-7 (breast cancer) and HeLa (cervical cancer) cell lines showing cytotoxic activity (Suresh *et al.* 2010). Moreover, phenolic compounds might be responsible for the cytotoxic activity; some studies have shown the growth inhibition in breast cancer cells (Jaganathan *et al.* 2010). In fact, caffeic acid derivate exhibited cytotoxic activity on NCI-H23 (human lung adenocarcinoma) cell lines (Ooi *et al.* 2011). Flavonoids were reported with cytotoxic activity in human carcinoma breast (MCF7), liver (HEPG2), cervix (HELA) and colon (HCT116) cell lines (Marzouk *et al.* 2011). However, the exact cytotoxicity mechanism of these compounds is still unknown.

The comet assay was used to detect DNA damage, such as single (SSBs) and double strand breaks (DSBs), alkali-labile sites, DNA–DNA and DNA–protein crosslinks (Hartmann *et al.* 2003). Our results indicate that AEB, AEC, ARFB, and ARFC induced significant elevation in DNA strand breaks in CHO cells at concentration  $\geq 0.05$  mg/mL; EAFB, EAFC, and BFC showed genotoxic potential at concentration  $\geq 0.1$  mg/mL and BFB at 0.5 mg/mL (Table 4). This results are consistent with the re observed with the aqueous extract of *B. dracunculifolia* in CF-1

mice at 2 mg/mL (Rodrigues *et al.* 2009). Aqueous extract of *B. trimera* also induced genotoxicity in swiss mice at 4,2 mg/kg (Nogueira *et al.* 2011). In studies carried out in mammalian cells, genotoxic potential of ethyl acetate extract of *B. dracunculifolia* was observed at 50 µg/mL (Munari *et al.* 2010); also, ethanol extract of propolis from *B. dracunculifolia* showed genotoxic activity at 100 µg/mL in CHO cells (Tavares *et al.* 2006). Flavonoids, phenylpropanoids, and other phenolic compounds were probably the constituents responsible for the genotoxic effects because these compounds can act as pro-oxidants, depending on their concentration (Munari *et al.* 2010).

In this sense, the ethyl acetate fractions were more genotoxic than the aqueous extracts, n-butanol fractions and aqueous residue by alkaline comet assay (Table 4). This is consistent with a difference in a chemical composition among the fractions, thus, pro-oxidant effects of flavonoids have been reported, which would cause damage to the genetic material (Halliwell *et al.* 2005). In fact, some flavonoids produce genotoxic effect at high concentrations (Ferguson 2001; Pereira *et al.* 2006; da Silva *et al.* 2002) such as quercetin and rutin (Silva *et al.* 2002). Caffeic acid from *B. dracunculifolia* extracts (Munari *et al.* 2008; Resende *et al.* 2007) induced DNA damage in rats at 8 mg/kg (Pereira *et al.* 2006).

However, because the exact toxicity mechanism of these compounds is not completely known, the biological effect of these fractions could not be fully understood and more data are needed to confirm this hypothesis. Further studies with isolated active constituents and use of other biological models should be performed in order to provide a better understanding of the mechanisms underlying the cytotoxic and genotoxic effects of *B. trinervis*.

For all tested *S. typhimurium* strains, EAFB and EAFc were not mutagenic, neither in the presence nor in the absence of S9 mix (Table 5 and 6). However, EAFc showed toxicity in TA1535 at 80 µg/plate and higher concentrations in absence of S9 mix but not in presence of S9 mix (Table 6), this observations suggest induction of oxidative

damage without S9 mix and subsequent repair of this in a presence of S9 mix (Cortés-Eslava *et al.* 2013). This result was consistent with the observed for the aqueous extract, acetate fraction, and ethanol fraction of *B. trimera*, where mutagenic activity was not detected while toxicity was detected *Salmonella*/microsome mutagenicity assay (Nogueira *et al.* 2011). Also, ethyl acetate extract of *B. dracunculifolia* did not induce an increase in the number of revertant colonies in the strains TA98, TA100, TA102 and TA97a of *S. typhimurium* in both presence and absence of S9 mix (Resende *et al.* 2012).

In conclusion, in our experimental conditions, cytotoxic and genotoxic activity of Brazilian and Colombian *B. trinervis* fractions were observed on CHO cell cultures. Flavonoids, phenylpropanoids, coumarines, and diterpens were probably the *B. trinervis* constituents responsible for their cytotoxic and genotoxic effects because these compounds can act either as pro-oxidants. Consequently, infusion of *B. trinervis* should be used with caution since high doses could be genotoxic. Further studies designed to isolate, characterize, and test the compounds of *B. trinervis* should provide a better understanding of the cytotoxic and genotoxic mechanisms observed in the present study.

### **Competing interest**

The author(s) declare that they have no competing interests.

### **Acknowledgments**

This research was supported by Brazilian Agencies Foundation for Research Support of Rio Grande do Sul and National Counsel of Technological and Scientific Development [PRONEX/FAPERGS/CNPq 10/004-3; University Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS].

## References

- Albuquerque, M. R. J. Souza, E. Lins, M. U. Nogueira, N. A. P. Lemos, T. L. G. Silveira, E. R. & Pessoa, O. D. (2004). Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* ( Lam .) Pers . 2004(vi), 59–65.
- Alvarenga, S. A. V, Ferreira, M. J. P. & Rodrigues, G. V. (2005). A general survey and some taxonomic implications of diterpenes in the Asteraceae, (1990), 291–308.
- Bohlmann, F. Banerjee, S. Jakupovic, J. Grenz, M. Misra, L. N. Schmeda-Hirschmann, G. ... Robinson, H. (1985). Clerodane and labdane diterpenoids from baccharz species, 24(3), 0–4.
- Brown, g. D. (1994). Phenylpropanoids and other secondary, 35(4).
- Bruyère, C. Genovese, S. Lallemand, B. Ionescu-Motatu, A. Curini, M. Kiss, R. & Epifano, F. (2011). Growth inhibitory activities of oxyprenylated and non-prenylated naturally occurring phenylpropanoids in cancer cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(14), 4174–9. doi:10.1016/j.bmcl.2011.05.089
- Castro-Vázquez, L. Díaz-Maroto, M. C. de Torres, C. & Pérez-Coello, M. S. (2010). Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. *Food Research International*, 43(10), 2335–2340. doi:10.1016/j.foodres.2010.07.007
- De las Heras, B. Slowing, K. Benedí, J. Carretero, E. Ortega, T. Toledo, C. ... Chiriboga, X. (1998). Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2), 161–166. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198000294>
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1), 81–95. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510700000658>
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1-2), 89–111. doi:10.1016/S0027-5107(01)00073-2
- Franco, m. S. Cordero, c. P. Morantes, s. J. Aristizabal, f. & Osorio, c. (2011). Cytotoxic labdane diterpenoids isolated from the hexane fraction of the *Croton stipuliformis* Stem Bark, 173–182.
- Freire, S. Urtubey, E. & Giulano, D. (2007). epidermal characters of baccharis ( asteraceae ) species used in traditional medicine Caracteres epidérmicos de las especies del género *Baccharis* ( Asteraceae ) usadas en la medicina popular, 29(1), 23–38.



- Fukuda, M. Ohkoshi, E. Makino, M. & Fujimoto, Y. (2006). Studies on the Constituents of the Leaves of *Baccharis dracunculifolia* ( Asteraceae ) and their Cytotoxic Activity, *54*(October), 1465–1468.
- Hartmann, A. & Speit, G. (1997). Toxicology Letters The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test ( comet assay ), *90*, 183–188.
- Herrera, J. Romero, A. R. Crescente, O. E. Acosta, M. & Pekerar, S. (1996). Analysis of 5-hydroxy-7-methoxyflavones by normal-phase high- performance liquid chromatography, *740*, 201–206.
- Hikawczuk, V. E. J. Saad, J. R. Giordano, O. S. García, C. Martín, T. Martín, V. S. ... Tonn, C. E. (2008). Insect Growth Regulatory Effects of Linear Diterpenoids and Derivatives from *Baccharis thymifolia*, 190–194.
- Jaganathan, S. K. Mandal, S. M. Jana, S. K. Das, S. & Mandal, M. (2010). Studies on the phenolic profiling, anti-oxidant and cytotoxic activity of Indian honey: in vitro evaluation. *Natural product research*, *24*(14), 1295–306. doi:10.1080/14786410903184408
- Jakupovic, j. Schuster, a. & Wasshausen, d. C. (1991). Short reports acetylenes and labdanes, *30*(8), 2785–2787.
- Junior, M. R. M. Dausch, A. Moraes, C. S. Queiroga, C. L. Pastore, G. M. & Park, Y. K. (2008). Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*, *28*(1), 178–181.
- Kumar, S. Sharma, S. & Vasudeva, N. (2012). Chemical compositions of *Cinnamomum tamala* oil from two different regions of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, *2*, S761–S764. doi:10.1016/S2222-1808(12)60260-6
- Kuroyanagi, M. & Ueno, A. (1993). Type diterpenes from *baccharis*, *34*(5), 1377–1384.
- Lacorte, S. & Fernandez-Alba, A. R. (2006). Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass spectrometry reviews*, *25*(6), 866–80. doi:10.1002/mas.20094
- Munari, C. C. Alves, J. M. Bastos, J. K. & Tavares, D. C. (2010). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of applied toxicology : JAT*, *30*(1), 22–8. doi:10.1002/jat.1467
- Munari, C. C. Resende, F. A. Alves, J. M. de Sousa, J. P. Bastos, J. K. & Tavares, D. C. (2008). Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal aberration assays in Chinese hamster ovary cells. *Planta medica*, *74*(11), 1363–7. doi:10.1055/s-2008-1081306
- Nogueira, N. P. a, Reis, P. a, Laranja, G. a T. Pinto, a C. Aiub, C. a F. Felzenszwalb, I. ... Coelho, M. G. P. (2011). In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and

- fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *Journal of ethnopharmacology*, 138(2), 513–22. doi:10.1016/j.jep.2011.09.051
- Ocampo, Á. M. M. Zuluaga, C. A. L. Cárdenas, J. E. P. & Mejía, G. I. (2006). ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE *Baccharis* ANTIFUNGAL ACTIVITY IN THE AQUEOUS EXTRACTS OF *Baccharis trinervis*, *Baccharis latifolia* AND *Solanum dolichosepalum*, 51–59.
- Ooi, K. L. Muhammad, T. S. T. Tan, M. L. & Sulaiman, S. F. (2011). Cytotoxic, apoptotic and anti- $\alpha$ -glucosidase activities of 3,4-di-O-caffeoyl quinic acid, an antioxidant isolated from the polyphenolic-rich extract of *Elephantopus mollis* Kunth. *Journal of ethnopharmacology*, 135(3), 685–95. doi:10.1016/j.jep.2011.04.001
- Park, y. K. Paredes-Guzman, j. F. Aguiar, c. L. Alencar, s. M. & Fujiwara, f. (2004). Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis, 1100–1103.
- Pereira, P. de Oliveira, P. A. Ardenghi, P. Rotta, L. Henriques, J. A. P. & Picada, J. N. (2006). Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 99(5), 374–8. doi:10.1111/j.1742-7843.2006.pto\_533.x
- Resende, F. A. Alves, J. M. Munari, C. C. Senedese, J. M. Sousa, J. P. B. Bastos, J. K. & Tavares, D. C. (2007). Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutation research*, 634(1-2), 112–8. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.06.008
- Resende, F. A. Munari, C. C. de Azevedo Bentes Monteiro Neto, M. Tavares, D. C. Bastos, J. K. da Silva Filho, A. A. & Varanda, E. A. (2012). Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(3), 2335–50. doi:10.3390/molecules17032335
- Rodrigues, C. R. F. Dias, J. H. Semedo, J. G. da Silva, J. Ferraz, A. B. F. & Picada, J. N. (2009). Mutagenic and genotoxic effects of *Baccharis dracunculifolia* (D.C.). *Journal of ethnopharmacology*, 124(2), 321–4. doi:10.1016/j.jep.2009.04.022
- Rose, M. Albuquerque, J. R. Souza, E. B. Lins, U. D. S. Nogueira, A. P. Lemos, L. G. & Silveira, E. R. (2004). Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* ( Lam .) Pers . 2004(vi), 59–65.
- Sánchez, M. Mazzuca, M. Veloso, M. J. Fernández, L. R. Siless, G. Puricelli, L. & Palermo, J. a. (2010). Cytotoxic terpenoids from *Nardophyllum bryoides*. *Phytochemistry*, 71(11-12), 1395–9. doi:10.1016/j.phytochem.2010.04.019
- Sanchez-Palomino, S. Abad, M. J. Bedoya, I. M. García, J. Gonzales, E. Chiriboga, x. ... Alcami, j. (2002). Screening of South American Plants against Human Immunodeficiency Virus : Preliminary Fractionation of Aqueous Extract from *Baccharis trinervis*, 25(September), 1147–1150.

- Sharp, H. Bartholomew, B. Bright, C. Latif, Z. Sarker, S. D. & Nash, R. J. (2001a). ( Asteraceae ), 29, 2000–2002.
- Sharp, H. Bartholomew, B. Bright, C. Latif, Z. Sarker, S. D. & Nash, R. J. (2001b). ( Asteraceae ), 29, 2000–2002.
- Silva, J. Herrmann, S. M. Heuser, V. Peres, W. & Marroni, N. P. (2002). Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test, 40, 941–947.
- Singh, N. P. McCoy, M. T. Tice, R. R. & Schneider, E. L. (1988). Technique for Quantitation Damage in Individual of Low Levels of DNA Cells ', 175, 184–191.
- Suresh, G. Reddy, P. P. Babu, K. S. Shaik, T. B. & Kalivendi, S. V. (2010). Two new cytotoxic labdane diterpenes from the rhizomes of Hedychium coronarium. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(24), 7544–8. doi:10.1016/j.bmcl.2010.09.024
- Tavares, D. C. Mazzaron Barcelos, G. R. Silva, L. F. Chacon Tonin, C. C. & Bastos, J. K. (2006). Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 20(7), 1154–8. doi:10.1016/j.tiv.2006.02.009
- Termentzi, A. Zervou, M. & Kokkalou, E. (2009). Isolation and structure elucidation of novel phenolic constituents from Sorbus domestica fruits. *Food Chemistry*, 116(1), 371–381. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.019
- Tonn, C. E. Rossomando, P. C. & Giordano, O. S. (1982). ACID AND FLAVONOIDS FROM TUCUMANENSIS, 21(10), 2599–2600.
- Verdi, L. G. Maria, I. Brighente, C. Pizzolatti, G. Química, D. De, Federal, U. & Catarina, D. S. (2005). Revisão, 28(1), 85–94.

## **Capítulo II.**

### **Assessment of the antigenotoxic properties of Brazilian and Colombian *Baccharis trinervis* (Lam, Persoon)**

Victoria Jaramillo<sup>1</sup>, Cristiano Trindade<sup>1</sup>, Temenouga Nikolova Guecheva<sup>2</sup>, Alexandre Ferraz<sup>3</sup>, Dione Correa<sup>3</sup>, Juliana Da Silva<sup>3\*</sup>, João Antônio Pegas Henriques<sup>1,2,4\*</sup>.

1. Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia–UFRGS, Porto Alegre- RS-Brasil.

2. Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica–ROYAL Unidade GENOTOX–ROYAL/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

3. PPG Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – ULBRA, Canoas – RS-Brasil.

4. Instituto de Biotecnologia UCS, Caxias do Sul-- RS-Brasil

Manuscrito a ser submetido à Food and Chemical Toxicology

## Assessment of the antigenotoxic and antioxidant properties of Brazilian and Colombian *Baccharis trinervis* (Lam, Persoon)

Victoria Jaramillo<sup>1</sup>, Cristiano Trindade<sup>1</sup>, Temenouga Nikolova Guecheva<sup>2</sup>, Alexandre Ferraz<sup>3</sup>, Dione Correa<sup>3</sup>, Juliana Da Silva<sup>3\*</sup>, João Antônio Pegas Henriques<sup>1,2,4\*</sup>.

1. Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia–UFRGS, Porto Alegre- RS-Brasil.

2. Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica–ROYAL Unidade GENOTOX–ROYAL/Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

3. PPG Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – ULBRA, Canoas – RS-Brasil.

4. Instituto de Biotecnologia UCS, Caxias do Sul— RS-Brasil

### Abstract

*Baccharis trinervis* is a perennial shrub used in popular medicine as an antiseptic, for the treatment of high fevers, edema, sores and muscle cramps. The aim of the study was to investigate the antigenotoxic activity of Brazilian and Colombian *B. trinervis* extracts/fractions against of DNA damage induced by 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  by alkaline comet assay with DNA repair enzymes, as well as to evaluate the antioxidant activity of the extract by DPPH test and identified its constituents by HPLC. Our results showed that the aqueous extract (AEB) and the ethyl acetate fraction (EAFB) of Brazilian *Baccharis trinervis* and the ethyl acetate fraction (E AFC) of Colombian *Baccharis trinervis*, exhibited highest antigenotoxic and antioxidant properties. These properties could be attributed to the respective flavonoids contents observed. We concluded from the presented experimental data that the Brazilian and Colombian *B. trinervis* extracts/fractions present antioxidant activity and antigenotoxic effect against oxidative DNA damage and these properties are at least in part due to an antioxidant/free radical scavenging activity of their phenolic constituents.

### Introduction

Antioxidants are known to protect against oxidative stress, which have been involved in the development of several chronic diseases, including cardiovascular disease and cancer. They can prevent the formation of reactive species, to scavenge, neutralize,

and remove reactive species, beside inhibiting the oxidative chain reactions, chelating reactive metals, and repairing damage to biological molecules (Da Costa *et al.* 2012). As shown by numerous studies, some plant-derived natural chemicals have protective effects against genotoxicity induced by oxidative stress (Ruberto and Baratta 2000; Gleis and Pool-Zobel 2006; Plazar *et al.* 2008).

*Baccharis trinervis* (Lam, Persoon) is a perennial shrub belonging to the Asteraceae family, and within the large genus *Baccharis*, which is mainly restricted to the tropical and subtropical zone of South America, including Colombia and Brazil (Fukuda 2006). *B. trinervis* leaves are used in the preparation of tea in the popular medicine for the treatment of high fevers, edema, sores and muscle cramps, and as antiseptics (Freire 2007). *B. trinervis* presents several biological activities; specifically, antioxidant effect was reported in ethanolic extract (B. de las Heras *et al.* 1998) Likewise, anti HIV activity (Sanchez-Palomino *et al.* 2002) and antifungal activities (Ocampo *et al.* 2006) were reported in the aqueous extract, whereas antimicrobial properties were reported in the essential oils from this plant (Albuquerque *et al.* 2004).

*Baccharis* species have been tested to evaluate the antigenotoxic activity. For example, *B. dracunculifolia* extract was effective in preventing DNA damage induced by methyl methanesulfonate (MMS) in the simultaneous treatment in V79 cells (Munari *et al.* 2009), *B. trimera* showed an antigenotoxic effect in blood from treated mice, protecting cells against oxidative DNA damage induced by the *ex vivo* treatment with hydrogen peroxide (Rodrigues *et al.* 2009). In addition, the antioxidant activity has been tested in *B. trinervis* (B. de las Heras *et al.* 1998), *B. grisebachii* (Tapia *et al.* 2004), *B. trimera* (Rodrigues *et al.* 2009, da Cruz Pádua *et al.* 2010) and, *B. dracunculifolia* (Guimarães *et al.* 2012).

Several studies have been carried out in order to characterize the chemical composition of *B. trinervis* through the ethyl acetate – soluble fraction of methanol extract of aerial parts (Kuroyanagi *et al.* 1993), chloroform extract from leaves (Herrera JC. *et al.* 1996), dichloromethane extract or branches (Sharped *et al.* 2001),

and essential oils from the aerial parts (Albuquerque *et al.* 2004). These studies identified flavones, flavonones, neo-clerodane type diterpenes and terpenes (Kuroyanagi *et al.* 1993, Herrera *et al.* 1996, Sharped *et al.* 2001, Albuquerque *et al.* 2004). We identified phenolic compounds and terpenoids in the ethyl acetate fractions; furthermore, the aqueous extracts, *n*butanol fractions, and aqueous residues presented acids and terpenoids as identified by high-resolution direct-infusion mass spectrometry (unpublished data).

The aim of the present study was to evaluate the effects of Brazilian and Colombian *B. trinervis* fractions on cultured mammalian cells in order to establish new pharmacological applicability. Therefore, the cytotoxic and genotoxic properties were investigated using a permanent lung fibroblast cell line derived from Chinese hamsters (CHO cells) to evaluate the safety of *B. trinervis* use. Furthermore, the present study evaluated the protective effects of Brazilian and Colombian *B. trinervis* fractions against DNA damage induced by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) using simultaneous treatment with the mutagen. The cytotoxicity of the fractions was determined using the MTT assay and the antigenotoxicity was evaluated by the modified comet assay with use of repair enzymes.

## **Materials and methods**

### **Chemical agents**

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, L-glutamine, and penicillin/streptomycin were obtained from GIBCO® (Grand Island, NY, USA). Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-biphenyl tetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Low melting point agarose and agarose were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Folin Ciocalteu, rutin, pyrogallol, acetonitrile, trifluoroacetic acid, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Sigma (St. Louis, USA). All other reagents were analytical grade.

## **Plant material**

Brazilian *B. trinervis* leaves were collected at Morro Sétimo Céu (Marcelino Ramos-RS) in January 2009 and vouchers specimens were identified by Dr. Sergio Bordignon which were deposited at the Herbarium at Universidade Luterana do Brasil. In the other hand, Colombian *B. trinervis* leaves were collected at Puente - Arroyo El Carbón (Planeta Rica-Cordoba) in December 2008. Vouchers specimens were identified by O. A. Jara and were deposited at the Herbarium at Universidad Nacional de Colombia. Brazilian and Colombian *B. trinervis* leaves were provided by the Biomedical Sciences Laboratory of the Universidad del Sinú in Colombia and the Phytochemical and Pharmacognosie Laboratory at the Universidade Luterana do Brasil-RS.

## **Preparation of extracts and fractions**

Leaves were dried at room temperature, powdered (50 g) and submitted an extraction with water by infusion for 15 min (1/10 plant/solvent). After cooling, the filtered extract was separated in two parts of 250 mL. The first half was frozen and concentrated by lyophilization for five days overnight, obtaining the aqueous extract (AE). The second one was successively partitioned with solvents of different polarities in order to obtain the ethyl acetate fraction (EAF), n-butanol fraction (BF) and aqueous residue (AR). The aqueous residue was concentrated by lyophilization. All the organic extracts were concentrated to dryness under reduced pressure and temperature below 40 °C.

## **DPPH radical scavenging assay**

Scavenging of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical by tCNSL was determined using the DPPH discoloration method described by Saito et al. (2007). Summarily, dilutions of tCNSL (500 µl) in methanol were added to 1000 µl of 100 µg/mL DPPH methanolic solution and incubated at 25 °C for 30 min. Absorbance was measured at 515 nm using a Shimadzu spectrophotometer model UV-1602PC



(Kyoto, Japan). The DPPH solution (1000  $\mu$ l) and methanol (500  $\mu$ l) were used as a negative control. Antioxidant activity was expressed as IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration in  $\mu$ g/mL of samples or standard, necessary to reduce the absorbance of DPPH by 50%, compared to the negative control). All experiments were done in triplicate.

### **Culture and treatment**

Chinese hamster ovary cells (CHO cells) were cultivated under standard conditions in DMEM, supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 0.2 mg/mL L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin. Cells were kept in tissue-culture flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in air and were harvested by treatment with 0.15% trypsin–0.08% EDTA in PBS. Cells ( $1 \times 10^4$ ) for MTT test and ( $3 \times 10^5$ ) for modified comet assays were seeded in complete media and grown for one day prior to treatment with as fractions.

The AEs, BFs, RFs were dissolved in distilled water, the AEFs were dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide). The final DMSO concentration in the media never exceeded 0.2%. The negative control was exposed to an equivalent concentration of solvent. For the antigenotoxic 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used as positive control.

For the MTT test CHO cells were treated for 3 hour with 0.005, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1 or 0.3 mg /mL of different fractions of Colombian and Brazilian *B. trinervis* leaves in to FBS-free media under standard conditions.

To determine the antigenotoxicity CHO cells were submitted to simultaneous treatment of 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus different concentrations of the fractions, for EAFs and BFs (0.01, 0.03, 0.05 and 0.1) and for AEs and ARs (0.005, 0.01, 0.03 and 0.05) in FBS-free media under standard conditions.

### **MTT assay**

MTT reduction was performed according to Denizot and Lang (1986). Briefly, after treatments, cells were washed once with PBS before the addition of 0.1 mL serum-

free media containing yellow tetrazolium salt (MTT; 1 mg/mL) dye and incubated for 3 h at 37°C. After incubation, the supernatant was removed, the residual purple formazan product solubilized in 0.4 mL DMSO, stirred for 5 min and its absorbance measured at 540 nm. The absorbance of negative control cells was set as 100% viability and the values of treated cells were calculated as percentage of control.

### **The modified alkaline comet assay - with DNA repair enzymes**

The alkaline comet assay was performed as described by Tice et al. (2010) with minor modifications (Hartmann and Speit, 1997). At the end of the treatment, cells were washed with ice-cold PBS and trypsinized (0.15%). After 30 s, 100 µL complete DMEM medium was added and the cells were gently resuspended. Immediately thereafter, 100 µL of cell suspension was dissolved in 0.75% low melting point agarose, and spread on regular, pre-coated agarose-point (1.5%) microscope slides. Thus, cells were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, and 10 mM Tris, pH 10.0, with freshly added 1% Triton X-100 and 10% DMSO) at 4°C for at least 1 h to remove cell proteins, leaving DNA as “nucleoids”. In the modified comet assay, slides were removed from the lysis solutions, washed three times in enzyme buffer and incubate with 60µL of FPG (45 min 37°C) or Endo III (30 min 37°C). After lysis slides were then placed in a horizontal electrophoresis box containing freshly-prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH ~13.0) at 4 °C for 20 min in order to facilitate DNA unwinding. A 300 mA and 25 V (0.9 V/cm) electric current was applied for 20 min to perform DNA electrophoresis. All of the above steps were performed under yellow light or in the dark in order to prevent additional DNA damage. Slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver nitrate and analyzed using an optic microscope. One hundred cells (100 cells from each of two replicate slides of each treatment) were selected and analyzed for DNA migration. Cells were visually scored according to tail length into five classes: (1) class 0: undamaged, with no tail, (2) class 1: with tail shorter than the diameter of the head (nucleus), (3) class 2: with tail as long as 1-2x the diameter of the head, (4) class 3: with tail longer than 2x the diameter of the head, and (5) class 4: comets with

no heads. Damage index (DI) is an arbitrary score calculated for cells in different damage classes, which are visually scored by measuring DNA migration length and the amount of DNA in the tail. DI ranges from 0 (no tail: 100 cells x0) to 400 (with maximum migration: 100 cells x 4).

## Statistical analysis

All experiments were independently repeated at least three times, results are expressed as means  $\pm$  standard deviation (SD). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and means were compared using the Tukey test, with  $P < 0.05$  considered as statistically significant.

## Results

### Cytotoxicity

MTT reduction assay (Fig. 1.) was used to determinate a cell viability over 60% for antigenotoxic assays. The concentrations chosen were 0.05, 0.01, 0.03 and 0.05 mg/mL for AEC, AEB, ARB and ARC; and furthermore, 0.01, 0.03, 0.05 and 0.01 mg/mL were used for AEFB, AEFC, BFB and BFC.

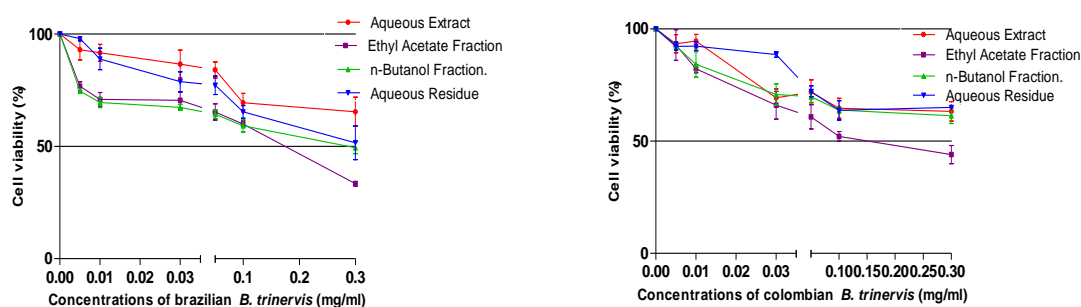


Figure 1. Cytotoxic effects of *B. trinervis* fractions in CHO cells after 3 hours of exposure by MTT assay of (a) Brazilian *B. trinervis* fractions, (b) Colombian *B. trinervis* fractions. Results are expressed as mean percentage in treated cells compared to the negative control (FBS - free DMEM medium)  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

### DPPH free radical scavenging assay

The free radical scavenging effect of *B. trinervis* fractions from Colombia and Brazil was tested using the DPPH free radical scavenging assay and showed the IC<sub>50</sub>

values of the *B. trinervis* fractions presented in Table 1. The EAFB ( $147,37 \pm 7,63$ ) and EAFC ( $105,03 \pm 9,47$ ) exhibited highest activity when compared to the other fractions; the free radical scavenging capacity decreased in direction of BFB, ARB, ARC, BFC, AEB, AEC, EAFB and EAFC.

**Table 1.** DPPH scavenging ability of *B. trinervis* extracts/fractions from Colombia and Brazil.

Samples	DPPH scavenging ability			
	Aqueous Extract	Ethyl Acetate Fraction	n-butanol Fraction	Aqueous Residue
<b>Brazil</b>	206,54 $\pm$ 0,34	147,37 $\pm$ 7,63	809,41 $\pm$ 7,17	448,55 $\pm$ 9,19
<b>Colombia</b>	193,74 $\pm$ 11,28	105,03 $\pm$ 9,47	273,12 $\pm$ 13,3	406,94 $\pm$ 14,3

Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments

Values are expressed the IC<sub>50</sub> (inhibitory concentration) in  $\mu\text{g/mL}$  of samples necessary to scavenge 50% of the DPPH radicals.

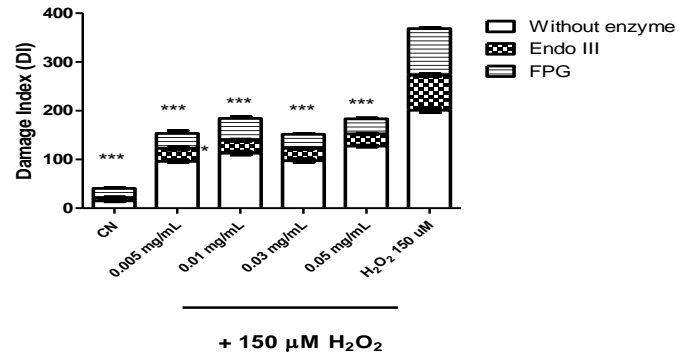
### Antigenotoxic activity.

The modified comet assay data concerning antigenotoxicity expressed as Damage Index (DI) for CHO cells exposed to Brazilian and Colombian AE, EAF, BF or ARF in simultaneous treatment with 150  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as well as the negative and positive control are presented in figures 2 and 3.

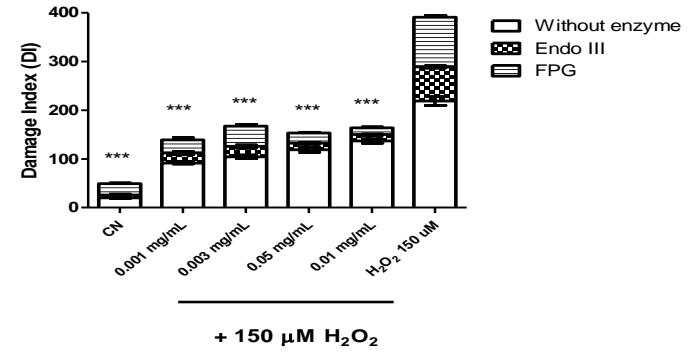
Statistically significant difference in the damage index was observed in AEB, AEC, ARB and ARC at 0.005 mg/mL. On the other hand, the EAFB, EAFC, BFC and BFB showed a significant difference at concentration of 0.01 mg/mL, evidencing antigenotoxic properties. The EAFB, EAFC, EAB, and EAC were the most antigenotoxic fractions, decreasing almost 50% the damage index induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

The extracts/fractions of *B. trinervis* from Colombia showed slightly more protective effect when compared with the extracts/fractions of *B. trinervis* from Brazil in the capacity to protect against DNA damage induced by 150  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

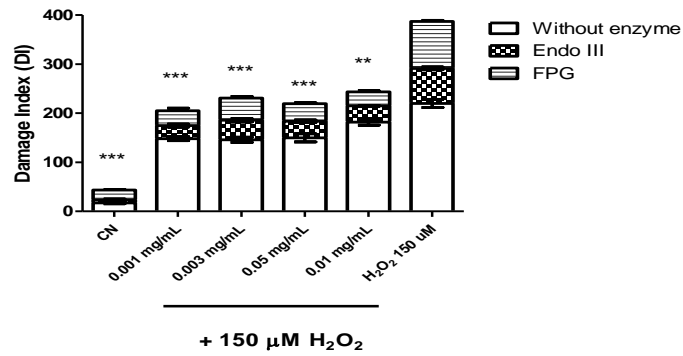
#### Aqueous Extract of Colombian *B. trinervis* (AEC)



#### Ethyl Acetate Fraction of Colombian *B. trinervis* (AECB)



#### n-Butanol Fraction of Colombian *B. trinervis* (BFC)



#### Aqueous Residue of Colombian *B. trinervis* (ARC)

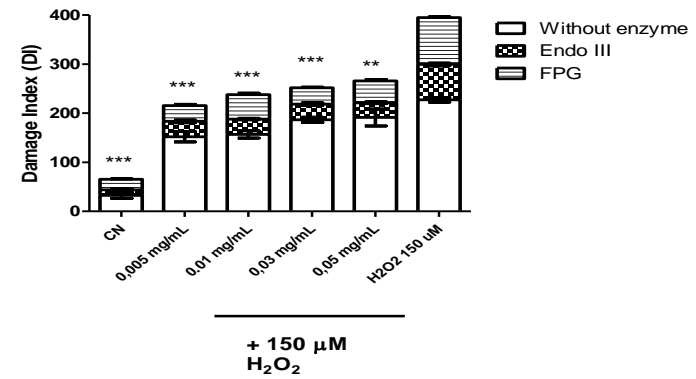
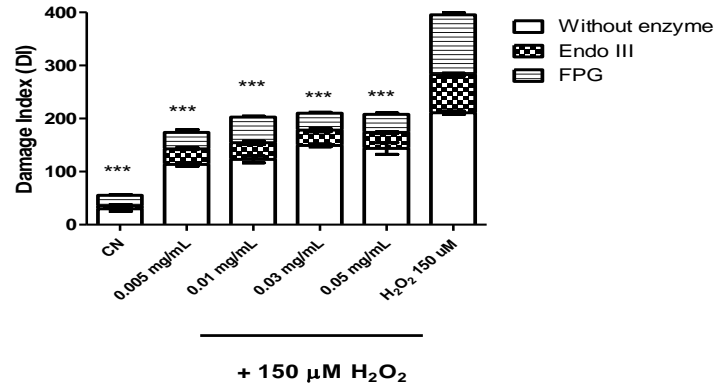
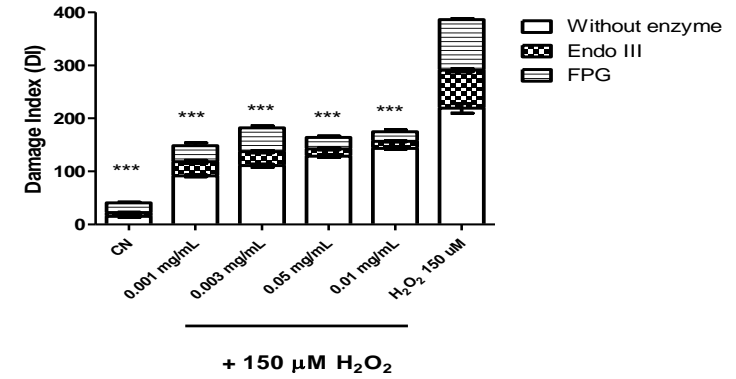


Figure 2. Antigenotoxic effects of Colombian *B. trinervis* in CHO cells after 3 hours of simultaneous exposure to *B. trinervis* extract/fractions and 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. DI: damage index: can range from 0 to 400, negative control (C-): FBS - free DMEM medium. \*\*\* Statistically significant difference as compared to the positive control at  $P < 0.001$ /ANOVA One-way with Dunnett test

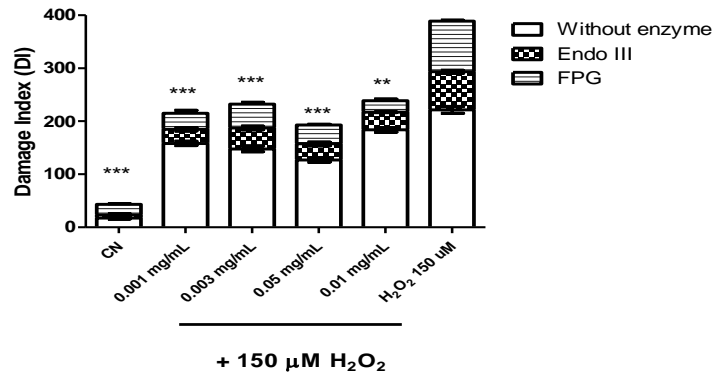
### Aqueous Extract of Brazilian *B. trinervis* (AEB)



### Ethyl Acetate Fraction of Brazilian *B. trinervis* (AEFB)



### n-Butanol Fraction of Brazilian *B. trinervis* (BFB)



### Aqueous Residue of Brazilian *B. trinervis* (ARB)

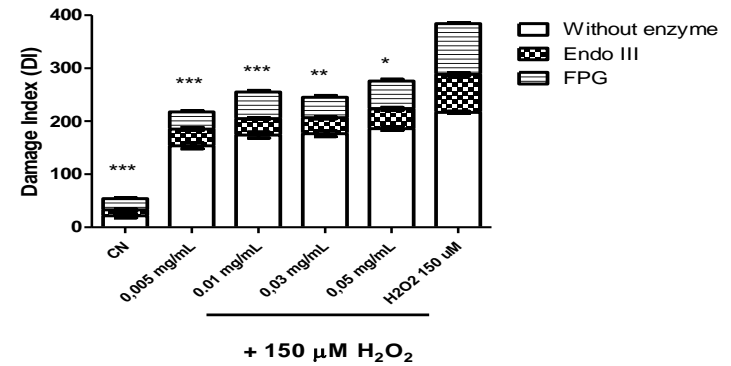


Figure 3. Antigenotoxic effects of Brazilian *B. trinervis* in CHO cells after 3 hours of simultaneous exposure to *B. trinervis* extract/fractions and 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. DI: damage index: can range from 0 to 400, negative control (C-): FBS - free DMEM medium. \*\*\* Statistically significant difference as compared to the positive control at P<0.001/ANOVA One-way with Dunnett test

## Discussion

Many medicinal plants exert their beneficial effects through the additive or synergistic action of several chemical compounds acting at single or multiple target sites associated with a physiological process. Species of the large *Baccharis* genus have been tested to determinate the balance between the therapeutic and toxicological effects as a very important parameter to evaluate the usefulness as a pharmacological drug. We previously analyzed the cytotoxic and genotoxic properties of the Brazilian and Colombian *Baccharis trinervis* extracts/fractions (Jaramillo *et al.* 2013); we observed that AEB, AEC, EAFB, EAFC, BFB, BFC and ARB, ARC induced a significant decrease in cell survival at 0.05 mg/mL when compared with negative control. Additionally, AEB, AEC, ARB and ARC induced genotoxicity at 0.05 mg/mL with dose-dependent response; on the other hand, the EAFB, EAFC and BFC showed a significant difference at 0.1 mg/mL, while BFB presented a significant difference at 0.5 mg/mL. In this study, according our previous study, we chose not cytotoxic and not genotoxic concentrations (0.001-0.05 mg/mL) to determinate the antigenotoxic activity of the Brazilian and Colombian *B. trinervis* extracts/fractions.

The antioxidant activity showed by EAFB, EAFC, AEB and AEC by DPPH, probably results from the sum or synergistic effect of each compound in the extract, mainly phenols and flavonoids – substances with well-known scavenger properties (Dorta *et al.* 2006). In a previous work, we identified compounds of *B. trinervis* extracts/fractions from Brazil and Colombia by HRMS-ESI-MS and HPLC. These compounds are phenolic compounds, such as flavonoids, phenolic acids and coumarines; acetylenes and labdane type diterpens (presented in the table 2).

Table 2. Identified compounds in extracts/fractions of *B. trinervis* from Brazil and Colombia (Jaramillo V. *et al.* 2013)

Compounds	Extract/fractions	Compound type	Method
7-hydroxy-2 <i>H</i> -1-Benzopyran-2-one (Umbelliferone)	EAF and EAFB	Coumarine	HRMS-ESI-MS
2-Propenoic acid, 3-[2,4-dihydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-, ( <i>E</i> )- (9 <i>Cl</i> )	EAF and EAFB	Phenolic Acid Phenolic acid Derivate	HRMS-ESI-MS
8,15-Heptadecadiene-11,13-dienoic acid, 3-hydroxy-, ( <i>E,Z</i> )- (9 <i>Cl</i> )	EAF and EAFB	Acetylene	HRMS-ESI-MS
5-Heptene-1,2-diol, 2-[(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-2-[2-(3-furanyl)ethyl]-1,5-dioxaspiro[2.5]oct-6-yl]-6-methyl-, (2 <i>S</i> )-	EAF and EAFB	Diterpen	HRMS-ESI-MS
1-Naphthalenemethanol, 5-[5-(acetyloxy)-3-methyl-3-pentenyl]-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,5,8,8 <i>a</i> -octahydro-1,4 <i>a</i> ,6-trimethyl-acetate (9 <i>Cl</i> )	EAF and EAFB	Diterpen	HRMS-ESI-MS
1,3,4,5-tetrahydroxy-(1 <i>α</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>α</i> ,5 <i>R</i> )-Cyclohexanecarboxylic acid	BFB, BFC, AEB, AEC, RFB and RFC	Carboxylic Acid	HRMS-ESI-MS
Hexadecanoic acid	BFB, BFC, AEB, AEC, RFB and RFC	Carboxylic Acid	HRMS-ESI-MS
1,4-Cyclohexanedimethanol, $\alpha^1$ -[3-(acetyloxy)-4-methyl-4-penten-1-yl]- $\alpha^1$ -methyl- 4-acetate	BFB, BFC, AEB, AEC, RFB and RFC	Terpene	HRMS-ESI-MS
Caffeic acid	AEC and AEB	Phenolic acid	HPLC
Rutin	AEC and AEB	Flavonoid	HPLC
Ellagic acid	AEC and AEB	Phenolic Acid	HPLC
Rosmarinic acid	AEC and AEB	Phenolic Acid	HPLC
Luteolin	AEC	Flavonoid	HPLC

Flavonoids are particularly effective as inhibitors of the oxidation because they are able to react with the radical species involved in this process (René *et al.* 2010). The high content of phenolic compounds and flavonoids in Brazilian and Colombian *B. trinervis* extracts/fractions probably confers potent antioxidant activity demonstrated in this study that comes from free radicals scavenging activity.



Antioxidant protection from damage due to free radicals is vital for the integrity of cellular structures and ROS can interfere with normal cellular signaling cascades by affecting the activation or expression of transcription factors and upstream kinases, modulated by antioxidative phenolic phytochemicals (Pan and Ho 2008). The vegetal secondary metabolism produces chemical substances responsible for the antioxidant properties in vitro and in vivo of many plant extracts. Such substances are mainly phenolic compounds, able to decrease the production and/or to eliminate produced free radicals (Dorta *et al.* 2006). Among these substances are flavonoids and other phenolic compounds, especially as synthesized in leaves, flowering tissues, and pollens that are intensively studied due to their presence in the human diet (Tsao 2010).

The antioxidant properties detected are in accordance with literature data which show antioxidant properties for *B. trinervis* (de las Heras 1998) and other *Baccharis* species such as *B. trimera* extracts (Oliveira *et al.* 2004), *B. illinita*, *B. platypoda* (Brighente *et al.* 2007), *B. articulate* (Oliveira *et al.* 2003), and *B. grisebachii* (Tapia *et al.* 2004), *B. dracunculifolia* (Park *et al.* 2005). The flavonoids are known for their ability to donate a hydrogen atom to free radicals, thus neutralizing cations capable to produce the hydroxyl radical (Jovanovic *et al.* 1998; Merken and Beecher 2000). These compounds can also modulate a wide range of mammalian enzyme activities, such as cytochrome P450 and several antioxidant enzymes (Ferguson 2001). Moreover, flavonoids, such a rutin and caffeic acid, are among the most abundant antioxidant compounds in vegetables and fruits (Aherne and O'Brien 2002). They have high free radical scavenging activity (Ross and Kasum 2002). These compounds have also been reported as antigenotoxic in various in vitro models (Aherne and O'Brien 2000a; Russo *et al.* 2000; Lo *et al.* 2002; Ross and Kasum 2002).

Modified comet assay was performed in order to evaluate if *B. trinervis* fractions from Brazil and Colombia cause oxidative DNA damage in simultaneous treatment. Then, slides were incubated with lesion-specific enzymes and the difference of DNA breaks

formation was evaluated. As illustrated on figures 2 and 3, EAC, EAB, EAFB, EAFC, BFB, BFC, ARB and ARC protected the CHO cell against DNA damage; however, the EAC, EAB, EAFB and EAFC presented the major protection against the damage produced by 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . This is consistent with the results obtained concerning the amount of total flavonoids in the extracts/fractions (Jaramillo *et al.* 2013. In preparation) which determined that AEC, AEB, EAFC and AEFB presented higher content of total flavonoids than the other fractions. ARB and ARC showed the lowest protection and the lowest content of total flavonoids. In relation to the difference between the origin of samples, Colombian *B. trinervis* showed a slightly higher protective effect against the DNA damage induced by 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  than the Brazilian *B. trinervis*. The observed difference could be due to geographical, ecological and climatic differences between these countries, (Castro-Vázquez *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2012).

Other species of *Baccharis* such as, *B. trimera* showed an antigenotoxic effect in blood from treated mice, thus protecting cells against oxidative DNA damage induced by the *ex vivo* treatment with hydrogen peroxide (Rodrigues *et al.* 2009). The antigenotoxic potential of *B. dracunculifolia* ethyl acetate fraction reduced the frequency of DNA damage induced by MMS in simultaneous treatment. However, this chemopreventive activity depended on the concentrations and treatment regimens used. Pretreatment protocol had no antigenotoxic effects against MMS-induced damage (Munari *et al.* 2009). Baccharin, a compound present in some *Baccharis* species, showed a chemopreventive effect and can be one of the chemical compounds responsible for the antigenotoxicity demonstrated by the *B. dracunculifolia* as well (de Oliveira *et al.* 2012).

Oxidative stress is a condition characterized by the oxidative damage of biomolecules by free radicals when they are overproduced and/or the ability of the cellular antioxidant systems is decreased. The  $\text{H}_2\text{O}_2$  is a potent genotoxin and can form  $\text{HO}\cdot$ , able to induce oxidative DNA damage, including 8-oxo-2'-deoxyguanosine, DNA

single-strand breaks and Double-strand breaks and oxidation of lipids (Bronzetti *et al.* 2003; Halliwell *et al.* 2007). The ability of these radical damage biomolecules is superior to the other ROS due to their high reactivity and because the body does not have a system of enzymatic defense against this ROS (Halliwell and Gutteridge 2007).

CHO cells treated with AEC, AEB, EAFB or AEFC and 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  simultaneously, in the presence of enzymes ENDO III and FPG (Figure 2), demonstrated a decrease in the oxidative damage when compared to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . These results indicated that the oxidative damage was counteracted principally by the phenolic compounds present in *B. trinervis* extracts/fractions. Moreover, BER DNA-repair enzymes could be activated as a result of ROS accumulation. This is likely to have occurred in cells co-treated with the fractions once the DI after incubation with enzymes in these samples (Fig. 2) was lower than the observed after treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$  alone. The most common base modification formed into DNA is 8-OHdG and if unrepaired could lead to mutation induction. FPG protein has been used to assess oxidative DNA base damage because it detects 8-OHdG and other oxidatively damaged purines. Besides, FPG also detects alkylation damage with high sensitivity in the comet assay (Collins *et al.* 2008).

In conclusion, under the present experimental conditions, Brazilian and Colombian *B. trinervis* extracts/fractions presented antioxidant activities and antigenotoxic effect against oxidative DNA damage in CHO cells. These properties are at least in part due to the antioxidant/free radical scavenging activity of the phenolic compounds identified in the extracts. Further studies designed to isolate, characterize and test the *B. trinervis* components should provide a better understanding of the antigenotoxic and antioxidant mechanisms observed in this study.

### **Competing interest**

The author(s) declare that they have no competing interests.

## Acknowledgments

This research was supported by Brazilian Agencies Foundation for Research Support of Rio Grande do Sul and National Counsel of Technological and Scientific Development [PRONEX/FAPERGS/CNPq 10/004-3; University Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS].

## References

- Aherne, S. A. & O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, *18*(1), 75–81. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0899900701006955>
- Albuquerque, M. R. J. Souza, E. Lins, M. U. Nogueira, N. A. P. Lemos, T. L. G. Silveira, E. R. & Pessoa, O. D. (2004). Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* ( Lam .) Pers . *2004*(vi), 59–65.
- Brighente, I. M. C. Dias, M. Verdi, L. G. & Pizzolatti, M. G. (2007). Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharmaceutical Biology*, *45*(2), 156–161. doi:10.1080/13880200601113131
- Casagrande, R. Georgetti, S. R. Verri, W. A. Dorta, D. J. dos Santos, A. C. & Fonseca, M. J. V. (2006). Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *84*(1), 21–27. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134406000285>
- Castro-Vázquez, L. Díaz-Maroto, M. C. de Torres, C. & Pérez-Coello, M. S. (2010). Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. *Food Research International*, *43*(10), 2335–2340. doi:10.1016/j.foodres.2010.07.007
- Collins, A. R. Oscoz, A. A. Brunborg, G. Gaivão, I. Giovannelli, L. Kruszewski, M. ... Stetina, R. (2008). The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, *23*(3), 143–51. doi:10.1093/mutage/gem051
- Da Costa, L. A. Badawi, A. & El-Soheby, A. (2012). Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Annals of nutrition & metabolism*, *60 Suppl 3*(Suppl. 3), 27–36. doi:10.1159/000337311
- De las Heras, B. Slowing, K. Benedí, J. Carretero, E. Ortega, T. Toledo, C. ... Chiriboga, X. (1998). Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, *61*(2), 161–166. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198000294>

- De Oliveira, P. F. Leandro, L. F. Montanheiro, G. Bastos, J. K. da Silva Filho, A. A. & Tavares, D. C. (2012). Baccharin prevents genotoxic effects induced by methyl methanesulfonate and hydrogen peroxide in V79 cells. *Journal of food science*, 77(8), T138–42. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02808.x
- De Oliveira, S. Q. Dal-Pizzol, F. Gosmann, G. Guillaume, D. Moreira, J. C. F. & Schenkel, E. P. (2003). Antioxidant Activity of Baccharis articulata Extracts: Isolation of a New Compound with Antioxidant Activity. *Free Radical Research*, 37(5), 555–559. doi:10.1080/1071576031000076259
- Ferguson, L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 475(1-2), 89–111. doi:10.1016/S0027-5107(01)00073-2
- Freire, S. Urtubey, E. & Giulano, D. (2007). EPIDERMAL CHARACTERS OF BACCHARIS ( ASTERACEAE ) SPECIES USED IN TRADITIONAL MEDICINE Caracteres epidérmicos de las especies del género Baccharis ( Asteraceae ) usadas en la medicina popular, 29(1), 23–38.
- Fukuda, M. Ohkoshi, E. Makino, M. & Fujimoto, Y. (2006). Studies on the Constituents of the Leaves of Baccharis dracunculifolia ( Asteraceae ) and their Cytotoxic Activity, 54(October), 1465–1468.
- Furtado, R. A. de Araújo, F. R. R. Resende, F. A. Cunha, W. R. & Tavares, D. C. (2010). Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *Journal of applied toxicology : JAT*, 30(3), 254–9. doi:10.1002/jat.1491
- Glei, M. & Pool-Zobel, B. L. (2006). The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 20(3), 295–300. doi:10.1016/j.tiv.2005.08.002
- Guimarães, N. S. S. Mello, J. C. Paiva, J. S. Bueno, P. C. P. Berretta, A. a, Torquato, R. J. ... Rodrigues, T. (2012). Baccharis dracunculifolia, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(3-4), 1091–7. doi:10.1016/j.fct.2011.11.014
- Herrera, J. Romero, A. R. Crescente, O. E. Acosta, M. & Pekerar, S. (1996). Analysis of 5-hydroxy-7-methoxyflavones by normal-phase high- performance liquid chromatography, 740, 201–206.
- Jaramillo-Garcia, V. Trindade, C. Moura, S. Guecheva, T. N. Correa, D. Ferraz, A. ... Henriques, J. A. P. (2013). Chemical characterization, cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of Colombian and Brazilian Baccharis trinervis (Lam, Persoon). (*in prepare*).

- JOVANOVIC, S. V. & SIMIC, M. G. (2006). Antioxidants in Nutrition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 326–334. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06197.x
- Kumar, S. Sharma, S. & Vasudeva, N. (2012). Chemical compositions of Cinnamomum tamala oil from two different regions of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, S761–S764. doi:10.1016/S2222-1808(12)60260-6
- Kuroyanagi, M. & Ueno, A. (1993). Type diterpenes from baccharis, 34(5), 1377–1384.
- Merken, H. M. & Beecher, G. R. (2000). Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *Journal of chromatography. A*, 897(1-2), 177–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11128201>
- Munari, C. C. Alves, J. M. Bastos, J. K. & Tavares, D. C. (2010). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of Baccharis dracunculifolia extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of applied toxicology : JAT*, 30(1), 22–8. doi:10.1002/jat.1467
- Munari, C. C. de Oliveira, P. F. de Souza Lima, I. M. de Paula Lima Martins, S. de Carvalho da Costa, J. Bastos, J. K. & Tavares, D. C. (2012). Evaluation of cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of Solanum lycocarpum fruits glicoalkaloid extract in V79 cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(10), 3696–701. doi:10.1016/j.fct.2012.07.028
- Ocampo, Á. M. M. Zuluaga, C. A. L. Cárdenas, J. E. P. & Mejía, G. I. (2006). ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE Baccharis ANTIFUNGAL ACTIVITY IN THE AQUEOUS EXTRACTS OF Baccharis trinervis , Baccharis latifolia AND Solanum dolichosepalum, 51–59.
- Oliveira, S. Q. de, Dal-Pizzol, F. Moreira, J. C. F. Schenkel, E. P. & Gosmann, G. (2004). Actividad antioxidante de Baccharis spicata, Baccharis trimera y Baccharis usterii. *Acta Farmacéutica Bonaerense*. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10915/6666>
- Pádua, B. da C. Silva, L. D. Rossoni, J. V. Humberto, J. L. Chaves, M. M. Silva, M. E. ... Costa, D. C. (2010). Antioxidant properties of Baccharis trimera in the neutrophils of Fisher rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 129(3), 381–386. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110002497>
- Pan, M.-H. & Ho, C.-T. (2008). Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chemical Society reviews*, 37(11), 2558–74. doi:10.1039/b801558a
- PARK, Y. K. PAREDES-GUZMAN, J. F. AGUIAR, C. L. ALENCAR, S. M. & FUJIWARA, F. (2004). Chemical Constituents in Baccharis dracunculifolia as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis, 1100–1103.

- Ramos, a a, Lima, C. F. Pereira, M. L. Fernandes-Ferreira, M. & Pereira-Wilson, C. (2008). Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. *Toxicology letters*, 177(1), 66–73. doi:10.1016/j.toxlet.2008.01.001
- René, A. Abasq, M.-L. Hauchard, D. & Hapiot, P. (2010). How do phenolic compounds react toward superoxide ion? A simple electrochemical method for evaluating antioxidant capacity. *Analytical chemistry*, 82(20), 8703–10. doi:10.1021/ac101854w
- Rodrigues, C. R. F. Dias, J. H. de Mello, R. N. Richter, M. F. Picada, J. N. & Ferraz, A. B. F. (2009). Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 125(1), 97–101. doi:10.1016/j.jep.2009.06.006
- Ross, J. A. & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition*, 22, 19–34. doi:10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957
- Ruberto, G. Baratta, M. T. Deans, S. G. & Dorman, H. J. (2000). Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. *Planta medica*, 66(8), 687–93. doi:10.1055/s-2000-9773
- Sanchez-Palomino, S. Abad, M. J. Bedoya, I. M. García, J. Gonzales, E. Chiriboga, x. ... Alcami, J. (2002). Screening of South American Plants against Human Immunodeficiency Virus : Preliminary Fractionation of Aqueous Extract from *Baccharis trinervis*, 25(September), 1147–1150.
- Sharp, H. Bartholomew, B. Bright, C. Latif, Z. Sarker, S. D. & Nash, R. J. (2001). ( Asteraceae ), 29, 2000–2002.
- Tapia, A. Rodriguez, J. Theoduloz, C. Lopez, S. Feresin, G. E. & Schmeda-Hirschmann, G. (2004). Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of ethnopharmacology*, 95(2-3), 155–61. doi:10.1016/j.jep.2004.06.035
- Tice, R. R. Agurell, E. Anderson, D. Burlinson, B. Hartmann, A. Kobayashi, H. ... Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10737956>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231–46. doi:10.3390/nu2121231

## 5. DISCUSSÃO

O gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae, compreende aproximadamente 500 espécies, a maioria são arbustos ramificados providos de alas foliáceas. (Abad *et al.* 2007) Embora exista uma grande quantidade de espécies, até o presente momento a sistemática do gênero não se encontra bem elucidada (Lonni *et al.* 2005). Devido à similaridade de algumas espécies, muitas plantas são utilizadas com fins terapêuticos e normalmente diferentes espécies são confundidas e/ou nomeadas com o nome popular “carqueja”. Apesar de este nome ser amplamente aceito pela etnobotânica para referir-se a *Baccharis trimera*, é também usado para outras espécies com características morfológicas similares como a *Baccharis trinervis* que, não obstante, filogeneticamente não pertencem a clados estreitamente relacionados dentro o gênero *Baccharis* (Giuliano 2001). Assim, diversas espécies de *Baccharis* são utilizadas para o tratamento das mesmas doenças, sendo desconhecidas as verdadeiras propriedades terapêuticas de cada uma e expondo a possíveis intoxicações pelo uso da planta errada.

A diferença entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos constitui uma importante informação quando se procura determinar uma faixa de concentração segura para o uso como fitoterápico (Munari *et al.* 2012). Desta forma, a avaliação do potencial citotóxico e genotóxico, mutagênico, antigenotóxico e antioxidante dos extratos e frações de *B. trinervis* do Brasil e Colômbia permitem uma melhor compreensão dos efeitos biológicos desta planta e inferir os principais compostos responsáveis por estes efeitos.

As amostras de *B. trinervis* foram coletadas em dois ecossistemas diferentes. A Colômbia, por encontrar-se na zona tropical, recebe raios solares durante o ano todo, sem ter estações climáticas, onde existem duas épocas, uma de chuva e uma seca. As amostras de *B. trinervis* da Colômbia foram coletadas na época seca (Rangel-Buitrago *et al.* 2013). Ao contrário, o lugar da coleta no Brasil encontra-se na zona temperada sul, onde apresenta as quatro estações do ano bem definidas,



desencadeando grandes diferenças na temperatura (Gelcer *et al.* 2013). Convém salientar que a coleta da planta no Brasil foi feita no verão, período que a vegetação recebe maior irradiação solar e conseqüentemente altas temperaturas e baixos níveis de precipitação. A origem geográfica da vegetação influencia na expressão de metabólitos secundários (Castro-Vázquez *et al.* 2010), uma vez que estes estão envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação da planta ao seu meio, como defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra radiação ultravioleta UV), à atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, e proteção anti-influências externos como temperatura e umidade, além de suprir a deficiência de nutrientes minerais (Crozier *et al.* 2006).

A análise fitoquímica de *B. trinervis* do norte da Colômbia e do sul do Brasil contribui com a descrição de treze novos compostos (Capítulo II, tabela 2) para um melhor conhecimento dos constituintes desta espécie. A identificação realizada por HPLC (Capítulo I, tabela 2) evidenciou que existem diferenças em presença/ausência e em concentração dos compostos fenólicos como a luteolina, rutina, ácido elágico, ácido cafeico e ácido rosmarínico nos extratos aquosos do Brasil e da Colômbia. Todos os compostos quantificados nos extratos aquosos da Colômbia apresentaram maior concentração que nos extratos aquosos do Brasil. Esta diferença é evidenciada principalmente no ácido elágico, que na amostra da Colômbia encontra-se sete vezes mais concentrado que na amostra do Brasil (9,74 mg/g e 1,35 mg/g respectivamente). Adicionalmente, a luteolina foi detectada unicamente no extrato aquoso da Colômbia. Estas diferenças podem ser explicadas com base nas condições climáticas dos lugares onde as plantas foram coletadas. Devido à maior exposição de raios solares, há um aumento na expressão de genes envolvidos na produção de compostos fenólicos em resposta às exigências do meio para adaptarem-se às altas temperaturas e às secas (Feng, Li *et al.* 2013; Peinado *et al.* 2013). Existe uma relação direta entre a densidade e as concentrações de fenólicos e a exposição solar, e uma relação inversa com os níveis de precipitação (Ferrer-gallego *et al.* 2012). Além disso, a presença da luteolina unicamente no extrato da

Colômbia pode ser explicada por sua origem biossintética. A rutina é um dos precursores de luteolina (Yang *et al.* 2013), e em concordância com o maior teor da rutina no extrato da Colômbia, existiria maior substrato para ser produzida a luteolina; adicionalmente, a quantidade de luteolina e rutina aumentam com a elevação da temperatura (Peinadoa *et al.* 2013)

Para complementar as análises químicas das frações, foi realizado o HRMS-ESI-MS. Dentre os compostos identificados por primeira vez em *B. trinervis*, cinco foram encontrados nas frações acetato de etila e três compostos nos extratos aquosos, frações *n*-butanol e nos resíduos aquosos do Brasil e da Colômbia. Os produtos identificados foram compostos fenólicos, acetilenos e terpenos na fração acetato de etila, e, acetilenos e terpenos foram identificados no extrato aquoso, fração *n*-butanol e no resíduo aquoso do Brasil e da Colômbia, respectivamente. As discrepâncias nos resultados da caracterização química pelos dois métodos utilizados devem-se as diferenças nos princípios das técnicas. O HRMS-ESI-MS reconhece os picos dos compostos que ionizaram com maior estabilidade (Vessecchi *et al.* 2011), possivelmente, os compostos identificados pelo HPLC podem corresponder aos picos sem razão *m/z* caracterizados. Além disso, este trabalho é o primeiro relato da caracterização química em espécies de *Baccharis*, onde foram identificados e quantificados compostos bastante conhecidos tais como ácido cafeico, elágico, rutina, ácido rosmarínico e luteolina por HPLC, mostrando que ainda faltam muitos estudos farmacológicos sobre as espécies de *Baccharis* utilizadas pela medicina popular. Vários antioxidantes e oxidantes naturais, principalmente flavonoides, cumarinas e compostos fenólicos foram identificados em muitas plantas da família asteraceae, tais como *Baccharis articulata* (Cariddi *et al.* 2012), *Achillea sieheana* (Albayrak 2013), *Vernonia patula* (Hira *et al.* 2013) entre outras.

As frações de acetato de etila contêm principalmente flavonoides (Mujwah *et al.*) cumarinas (Tosun *et al.* 2009) e outros compostos fenólicos (Ju *et al.* 2012). Neste estudo, foram identificados cinco novos compostos na fração acetato de etila de *B. trinervis* de ambos os países por HRMS-ESI-MS (Capítulo I, tabela 3), dentre os

quais, o umbeliferona é o único composto com atividade biológica descrita até o momento. Além disso, os compostos identificados de nº 9 e 10 (Capítulo II, tabela 2) pertencem ao grupo diterpeno labdano, não existindo, porém, nenhum estudo farmacológico com os compostos identificados.

Nos ensaios de MTT e sobrevivência clonogênica, foi observado que todas as frações foram citotóxicas (Capítulo I, Figura 5). No entanto, a genotoxicidade foi observada a partir da concentração de 0,1 mg/mL em todas as frações Capítulo I, Tabela 5). Dentre as frações estudadas, as frações de acetato de etila do Brasil e da Colômbia exibiram acentuadas atividades citotóxicas e genotóxicas. Estes efeitos podem estar relacionados principalmente à mistura complexa de umbeliferona, diterpenos labdano, rutina, ácido elágico, ácido cafeico, ácido rosmarínico e luteolina. Diversos estudos mostraram atividade citotóxica e genotóxica dos compostos umbeliferona e ácido cafeico em linhagens tumorais de fígado HepG2) e gliomas OE21) humanos *in vitro* (Bruyère *et al.* 2011) e o efeito genotóxico do ácido rosmarínico em camundongos (Ramos *et al.* 2008)

A presença da luteolina somente na fração acetato de etila da Colômbia poderia explicar o efeito mais pronunciado nos ensaios citotóxicos e genotóxicos em comparação com a fração acetato de etila do Brasil. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que no teste *Salmonella*/Microsoma nenhuma das frações testadas de ambos os países apresentaram resposta mutagênica frente as linhagens de em *S.typhimurium*, tendo sido observado somente uma forte toxicidade para a fração de acetato de etila da Colômbia para a linhagem TA1535 na ausência de ativação metabólica Capítulo I, Tabela 4). Esta citotoxicidade é, possivelmente, decorrente da ação oxidante da luteolina. De acordo com essas observações (Attoub *et al.* 2011) demonstraram a citotoxicidade da luteolina por estresse oxidativo em camundongos e em linhagens tumorais de pulmão (LNM35), cólon (HT29), fígado (HepG2) e mama (MCF7/6 e MDA-MB231-1833) *in vitro*.

Diversos estudos demonstraram que alguns flavonóides (ex: rutina, luteolina), cumarinas (ex: umbeliferona) e ácidos fenólicos (ex: ácido elágico e ácido cafeico) apresentam citotoxicidade e genotoxicidade em determinada concentração (Bhat *et al.* 2007; da Silva *et al.* 2002). Porém, em baixas concentrações, estes compostos podem apresentar efeito antioxidante e antígenotóxico contra  $H_2O_2$  (Carrillo *et al.* 2013; Figueiredo-rinhel *et al.* 2013; Ju *et al.* 2012). Nossos resultados demonstraram que em concentrações não citotóxicas e não genotóxicas, todas as frações de *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia apresentaram efeito citoprotetor contra os efeitos tóxicos do  $H_2O_2$  (Capítulo II, Figuras 2 e 3). Esse efeito foi mais pronunciado nos extratos aquosos e nas frações acetato de etila de ambos os países. A atividade antígenotóxica pode estar baseada nos constituintes das frações citadas, tais como rutina, luteolina, ácido elágico, ácido cafeico, ácido rosmarínico e umbeliferona, o que corrobora com vários trabalhos que demonstraram efeitos antígenotóxicos e antioxidantes desses compostos de forma isolada (Berni *et al.* 2012; Orhan *et al.* 2013; Zaabat *et al.* 2011). Além de reduzir os danos ao DNA evidenciados no ensaio cometa alcalino (Capítulo II, Figuras 2 e 3), estas frações diminuíram purinas e pirimidinas oxidadas no DNA após a exposição ao  $H_2O_2$  (Capítulo II, Figuras 2 e 3), como foi observado no ensaio cometa alcalino modificado utilizando enzimas de reparo de DNA. Esta observação sugere atividade antioxidante, possivelmente pela sua capacidade de neutralizar radicais livres ao doar um elétron ou um átomo de hidrogênio, deixando-os estáveis e menos reativos. Esta capacidade foi confirmada pelo DPPH (Capítulo II, tabela 1), evidenciando que os extratos aquosos e as frações acetato de etila apresentaram maior capacidade antioxidante.

Em resumo, o presente trabalho abre novas perspectivas no estudo do mecanismo de ação citotóxica, genotóxica, mutagênica, antígenotóxica e antioxidante da *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia. Este é o primeiro trabalho descrevendo treze novos compostos em *B. trinervis*, e mostrando que as quantidades dos compostos variaram de acordo com a origem geográfica. O fato das frações apresentarem atividade citotóxica e genotóxica em células CHO e não

apresentarem mutagenicidade em *S. typhimurium* torna bastante promissores futuros estudos com modelos animais, bem como para a identificação dos compostos biologicamente ativos presentes na planta, que em concentrações não citotóxicas e não genotóxicas apresentaram atividade antioxidante.

## 6. CONCLUSÕES

### 6.1. Conclusão geral

*B. trinervis* do Brasil e da Colômbia apresentaram efeitos citotóxicos, genotóxicos, antigenotóxicos e antioxidantes em células de ovário de hamster Chinês (células CHO) e não apresentaram mutagenicidade em linhagens de *Salmonella typhimurium* devido a sua composição química constituída principalmente em compostos fenólicos, acetilenos e diterpenos tipo lábdano.

### 6.2 Conclusões específicas.

- Os principais grupos químicos presentes em *B. trinervis* são acetilenos, diterpenos tipo lábdanos e compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos e cumarinas.
- O teor dos compostos fenólicos, tais como rutina, ácido elágico, ácido rosmarínico e ácido cafeico, é maior em todas as frações de *B. trinervis* da Colômbia quando comparada com as frações de *B. trinervis* do sul do Brasil.
- Todas as frações de *B. trinervis* de ambos os países foram citotóxicas e genotóxicas, possivelmente por ação oxidante dos compostos fenólicos, tais como luteolina, rutina, ácido elágico, ácido rosmarínico e ácido cafeico.
- As frações acetato de etila de Brasil e Colômbia exibiram maior atividade citotóxica e genotóxica quando comparadas com os extratos aquosos, as frações n-butanol e os resíduos aquosos de ambos os países.
- A presença da Luteolina somente no extrato da Colômbia pode explicar em parte a maior atividade citotóxica e genotóxica das amostras de Colômbia.

- Em concentrações não citotóxicas e não genotóxicas, os extratos aquosos e as frações acetato de etila de *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia exibiram atividade antígenotóxica, protegendo as células CHO contra os danos produzidos pelo peróxido de hidrogênio.
- As frações acetato de etila de Brasil e Colômbia não apresentaram resposta mutagênica em *Salmonella typhimurium*. Porém, a fração acetato de etila da Colômbia foi citotóxica para a linhagem TA1535 sem ativação metabólica.
- A atividade antioxidante dos extratos e frações pode ser explicada pela ação antioxidante dos compostos fenólicos tais como luteolina, rutina, ácido elágico, ácido rosmarínico e ácido cafeico.

## 7. PERSPECTIVAS

Para o seguimento do trabalho, complementação dos resultados e progresso do conhecimento em relação à avaliação fitoquímica, citotóxica, genotóxica e antigenotóxica de *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia, propõem-se algumas abordagens experimentais.

- Avaliar a expressão de genes que possam estar envolvidos nas diferenças do conteúdo de compostos fenólicos identificados em *B. trinervis* do Brasil e da Colômbia.
- Determinar o nível de peroxidação lipídica por produção de malondialdeído e conteúdo total de glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSH) em células CHO.
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em células CHO.
- Identificar e isolar os principais produtos ativos dos extratos e frações.
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos de *B. trinervis* em linhagens tumorais.
- Verificar os efeitos do tratamento com os extratos e os produtos ativos de *B. trinervis* sobre a progressão do ciclo celular e a indução de morte celular por necrose e apoptose em células tumorais.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A, E. M. Desmarchelier, C. Talou, J. R. Coussio, J. & Ciccia, G. (1997). In vitro antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC, 8741(97).
- Abad, M. J. & Bermejo, P. (2007). *Baccharis* ( Compositae ): a review update, 2007(vii), 76–96.
- Albayrak, S. (2013). The Volatile Compounds and Bioactivity of *Achillea sieheana* Stapf. (Asteraceae). *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, 12(1), 37–45. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3813214&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Albuquerque, M. R. J. Souza, E. Lins, M. U. Nogueira, N. A. P. Lemos, T. L. G. Silveira, E. R. & Pessoa, O. D. (2004). Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* ( Lam .) Pers . 2004(vi), 59–65.
- Albuquerque, U. P. & Natália Hanazaki. (2006). Divulgação As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico : fragilidades e pespectivas, 16, 678–689.
- Alvarenga, S. A. V, Ferreira, M. J. P. & Rodrigues, G. V. (2005). A general survey and some taxonomic implications of diterpenes in the Asteraceae, (1990), 291–308.
- Attoub, S. Hassan, A. H. Vanhoecke, B. Iratni, R. Takahashi, T. Gaben, A. ... Petroianu, G. (2011). Inhibition of cell survival , invasion , tumor growth and histone deacetylase activity by the dietary flavonoid luteolin in human epithelioid cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 651(1-3), 18–25. doi:10.1016/j.ejphar.2010.10.063
- Bach, T. (2010). Preclinical and Clinical Overview of Terpenes in the Treatment of Urolithiasis. *European Urology Supplements*, 9(12), 814–818. doi:10.1016/j.eursup.2010.11.009
- Berni, A. Grossi, M. R. Pepe, G. Filippi, S. Muthukumar, S. Papeschi, C. ... Palitti, F. (2012). Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Protective effect of ellagic acid ( EA ) on micronucleus formation induced by N -methyl- N -nitro- N -nitrosoguanidine ( MNNG ) in mammalian cells , in in vitro assays and in vivo. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 746(1), 60–65. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.03.007



- Bhat, S. H. Azmi, A. S. & Hadi, S. M. (2007). Prooxidant DNA breakage induced by caffeic acid in human peripheral lymphocytes: Involvement of endogenous copper and a putative mechanism for anticancer properties, *218*, 249–255. doi:10.1016/j.taap.2006.11.022
- Bruyère, C. Genovese, S. Lallemand, B. Ionescu-Motatu, A. Curini, M. Kiss, R. & Epifano, F. (2011). Growth inhibitory activities of oxyprenylated and non-prenylated naturally occurring phenylpropanoids in cancer cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, *21*(14), 4174–9. doi:10.1016/j.bmcl.2011.05.089
- Budel, J. M. & Duarte, M. R. (2008). Artigo, *18*, 761–768.
- Búfalo, M. C. Figueiredo, A. S. de Sousa, J. P. B. Candeias, J. M. G. Bastos, J. K. & Sforcin, J. M. (2009). Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *Journal of applied microbiology*, *107*(5), 1669–80. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04354.x
- Cariddi, L. Escobar, F. Sabini, C. Torres, C. Reinoso, E. Cristofolini, A. ... Sabini, L. (2012). Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(2), 155–161. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511005825>
- Carrillo, L. C. Londoño-londoño, J. & Gil, A. (2013). Comparison of polyphenol , methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *FRIN*. doi:10.1016/j.foodres.2013.06.019
- Castro-Vázquez, L. Díaz-Maroto, M. C. de Torres, C. & Pérez-Coello, M. S. (2010). Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. *Food Research International*, *43*(10), 2335–2340. doi:10.1016/j.foodres.2010.07.007
- Cheng, A.-X. Lou, Y.-G. Mao, Y.-B. Lu, S. Wang, L.-J. & Chen, X.-Y. (2007). Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, *49*(2), 179–186. doi:10.1111/j.1744-7909.2007.00395.x
- Da Silva, J. Herrmann, S. M. Heuser, V. Peres, W. & Marroni, N. P. (2002). Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test, *40*, 941–947.
- De Funari, C. S. de Oliveira Ferro, V. & Mathor, M. B. (2007). Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse

fibroblasts. *Journal of ethnopharmacology*, 111(2), 206–12.  
doi:10.1016/j.jep.2006.11.032

- De las Heras, B. Slowing, K. Benedí, J. Carretero, E. Ortega, T. Toledo, C. ... Chiriboga, X. (1998). Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 61(2), 161–166. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198000294>
- De Oliveira, S. Q. Dal-Pizzol, F. Gosmann, G. Guillaume, D. Moreira, J. C. F. & Schenkel, E. P. (2003). Antioxidant Activity of *Baccharis articulata* Extracts: Isolation of a New Compound with Antioxidant Activity. *Free Radical Research*, 37(5), 555–559. doi:10.1080/1071576031000076259
- Elisabetsky, E. (2003). Etnofarmacologia. *Ciência e Cultura*, 55(3), 35–36. Retrieved from [http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252003000300021&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000300021&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- Fachinetto, J. . & Tedesco, S. B. (2009). Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* ( Less .) A . P . de Candolle e *Baccharis articulata* ( Lam .) Pers . ( Asteraceae ) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. *Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu*, v.11, n.4,, 360–367.
- Feng, F. Li, M. Ma, F. & Cheng, L. (2013). Plant Physiology and Biochemistry Phenylpropanoid metabolites and expression of key genes involved in anthocyanin biosynthesis in the shaded peel of apple fruit in response to sun exposure. *Plant Physiology et Biochemistry*, 69, 54–61. doi:10.1016/j.plaphy.2013.04.020
- Ferrer-gallego, R. Hernández-hierro, J. M. Rivas-gonzalo, J. C. & Escribano-bailón, M. T. (2012). Analytica Chimica Acta Influence of climatic conditions on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L . cv . Graciano, 732, 73–77. doi:10.1016/j.aca.2011.12.072
- Figueiredo-rinhel, A. S. G. Kabeya, L. M. Bueno, P. C. P. Jorge-tiossi, R. F. Elisa, A. Azzolini, C. S. ... Lucisano-valim, Y. M. (2013). Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC ( Asteraceae ) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(2), 655–664. doi:10.1016/j.jep.2013.09.019
- Firmo, W. da C. A. Menezes, V. de J. M. de, Passos, C. E. de C. Dias, C. N. Alves, L. P. L. Dias, I. C. L. ... Olea, R. S. G. (2011). CONTEXTO HISTÓRICO, USO POPULAR E CONCEPÇÃO CIENTÍFICA SOBRE PLANTAS MEDICINAIS.

- Freire, S. Urtubey, E. & Giulano, D. (2007). EPIDERMAL CHARACTERS OF BACCHARIS ( ASTERACEAE ) SPECIES USED IN TRADITIONAL MEDICINE Caracteres epidérmicos de las especies del género Baccharis ( Asteraceae ) usadas en la medicina popular, 29(1), 23–38.
- Freitas, S. F. Shinohara, L. Sforcin, J. M. & Guimarães, S. (2006). In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine*, 13(3), 170–175. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711305001236>
- García, A. Á. & Carril, Elena Perez-Urria. (2009). Metabolismo secundario de plantas, 2(3), 119–145.
- Gelcer, E. Fraisse, C. Dzotsi, K. Hu, Z. Mendes, R. & Zotarelli, L. (2013). Effects of El Niño Southern Oscillation on the space–time variability of Agricultural Reference Index for Drought in midlatitudes. *Agricultural and Forest Meteorology*, 174, 110–128. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168192313000348>
- Giuliano, D. A. (2001). CLASIFICACIÓN INFRAGENÉRICA DE LAS ESPECIES ARGENTINAS DE BACCHARIS ( ASTERACEAE , ASTEREAE ), (1976), 131–154.
- Grecco, S. Ferreira, M. J. P. Romoff, P. Favero, O. A. Henrique, J. & Lago, G. (2012). Phenolic derivatives from *Baccharis retusa* DC . ( Asteraceae ). *Biochemical Systematics and Ecology*, 42, 21–24. doi:10.1016/j.bse.2011.12.014
- Guimarães, N. S. S. Mello, J. C. Paiva, J. S. Bueno, P. C. P. Berretta, A. a, Torquato, R. J. ... Rodrigues, T. (2012). *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(3-4), 1091–7. doi:10.1016/j.fct.2011.11.014
- Hajhashemi, V. Ghannadi, A. & Hajiloo, M. (2010). Analgesic and Anti-inflammatory Effects of *Rosa damascena* Hydroalcoholic Extract and its Essential Oil in Animal Models. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 163–168. Retrieved from [http://ijpr.sbm.ac.ir/?\\_action=articleInfo&article=852](http://ijpr.sbm.ac.ir/?_action=articleInfo&article=852)
- Halliwell, B. Rafter, J. & Jenner, A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 268S–276S. Retrieved from <http://ajcn.nutrition.org/content/81/1/268S.abstract>

- Heemann, Ana Carolina Winkler, O. G. M. Miguel, M. D. Sasaki, C. M. & Franco Delle Monache. (2006). Estudo fitoquímico da espécie *Pterocaulon interruptum*, 42, 1–4.
- Herrera, J. Romero, A. R. Crescente, O. E. Acosta, M. & Pekerar, S. (1996). Analysis of 5-hydroxy-7-methoxyflavones by normal-phase high- performance liquid chromatography, 740, 201–206.
- Hira, A. Dey, S. K. Howlader, M. S. I. Ahmed, A. Hossain, H. & Jahan, I. A. (2013). Anti-inflammatory and antioxidant activities of ethanolic extract of aerial parts of *Vernonia patula* (Dryand.) Merr. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(10), 798–805. doi:10.1016/S2221-1691(13)60158-6
- Hristozov, D. Costa, F. B. Da, & Gasteiger, J. (2007). Sesquiterpene Lactones-Based Classification of the Family Asteraceae Using Neural Networks and k -Nearest Neighbors, 9–19.
- Ju, H.-Y. Chen, S. C. Wu, K.-J. Kuo, H.-C. Hseu, Y.-C. Ching, H. & Wu, C.-R. (2012). Antioxidant phenolic profile from ethyl acetate fraction of *Fructus Ligustri Lucidi* with protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3), 492–502. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511006272>
- Jürgens, A. Viljoen, A. M. Hulley, I. M. Viljoen, A. M. Tilney, P. M. Van Vuuren, S. F. ... Van Wyk, B.-E. (2010). The ethnobotany, leaf anatomy, essential oil variation and biological activity of *Pteronia incana* (Asteraceae). *South African Journal of Botany*, 76(4), 668–675. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629910002097>
- Koyama, K. Ikeda, H. Poudel, P. R. & Goto-yamamoto, N. (2012). Phytochemistry Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape. *Phytochemistry*, 78, 54–64. doi:10.1016/j.phytochem.2012.02.026
- Kumazawa, S. Hamasaka, T. & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3), 329–339. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603002164>
- Kuroyanagi, M. & Ueno, A. (1993). Type diterpenes from *Baccharis*, 34(5), 1377–1384.
- Lonni, A. A. S. G. L. Scarminio, I. S. Silva, L. M. C. & FERreira, D. T. F. (2005). Numerical Taxonomy Characterization of *Baccharis* Genus Species by Ultraviolet-Visible Spectrophotometry, 21(March), 235–239.

- Maggi, F. Bramucci, M. Cecchini, C. Coman, M. M. Cresci, A. Cristalli, G. ... Vittori, S. (2009). Composition and biological activity of essential oil of *Achillea ligustica* All. (Asteraceae) naturalized in central Italy: Ideal candidate for anti-cariogenic formulations. *Fitoterapia*, 80(6), 313–319. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X09000756>
- Maria Carolina de Souza dos Santos, C. F. L. G. Vaisman, M. Ferreira, A. C. F. & Carvalho, D. P. de. (2011). Impact of flavonoids on thyroid function. *Food and Chemical Toxicology*, 49(10), 2495–2502. doi:10.1016/j.fct.2011.06.074
- Mujwah, A. A. Mohammed, M. A. & Ahmed, M. H. (2010). First isolation of a flavonoid from *Juniperus procera* using ethyl acetate extract. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(2), 85–88. doi:10.1016/j.arabjc.2010.02.003
- Munari, C. C. Alves, J. M. Bastos, J. K. & Tavares, D. C. (2010). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. *Journal of applied toxicology: JAT*, 30(1), 22–8. doi:10.1002/jat.1467
- Munari, C. C. de Oliveira, P. F. de Souza Lima, I. M. de Paula Lima Martins, S. de Carvalho da Costa, J. Bastos, J. K. & Tavares, D. C. (2012). Evaluation of cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Solanum lycocarpum* fruits glicoalkaloid extract in V79 cells. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(10), 3696–701. doi:10.1016/j.fct.2012.07.028
- Munari, C. C. Resende, F. A. Alves, J. M. de Sousa, J. P. Bastos, J. K. & Tavares, D. C. (2008). Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal aberration assays in Chinese hamster ovary cells. *Planta medica*, 74(11), 1363–7. doi:10.1055/s-2008-1081306
- Newman, D. J. Cragg, G. M. & Snader, K. M. (2003). Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981 - 2002, 1022–1037.
- Nogueira, N. P. a, Reis, P. a, Laranja, G. a T. Pinto, a C. Aiub, C. a F. Felzenszwalb, I. ... Coelho, M. G. P. (2011). In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *Journal of ethnopharmacology*, 138(2), 513–22. doi:10.1016/j.jep.2011.09.051
- O'Connor, S. E. (2010). 1.25 Alkaloids, 2.
- Ocampo, Á. M. M. Zuluaga, C. A. L. Cárdenas, J. E. P. & Mejía, G. I. (2006). ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS DE *Baccharis*

ANTIFUNGAL ACTIVITY IN THE AQUEOUS EXTRACTS OF *Baccharis trinervis*, *Baccharis latifolia* AND *Solanum dolichosepalum*, 51–59.

- Orhan, F. Gulluce, M. Ozkan, H. & Alpsoy, L. (2013). Determination of the antigenotoxic potencies of some luteolin derivatives by using a eukaryotic cell system, *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 141(1), 366–372. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613002525>
- Orsi, R. O. Sforcin, J. M. Funari, S. R. C. & Bankova, V. (2005). Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *International Immunopharmacology*, 5(2), 359–368. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567576904003418>
- Paulino, N. Abreu, S. R. L. Uto, Y. Koyama, D. Nagasawa, H. Hori, H. ... Bretz, W. A. (2008). Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *European Journal of Pharmacology*, 587(1), 296–301. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299908002616>
- Peinadoa, J. Nieves López de Lermac, Angela Peralbo-Molinab, D. & Feliciano Priego-Capoteb, d, Cristina de Castroe, B. M. (2013). Sunlight exposure increases the phenolic content in postharvested white grapes . An evaluation of their antioxidant activity in *Saccharomyces cerevisiae*, 1–10. doi:10.1016/j.jff.2013.06.007
- Peterson, J. Dwyer, J. Adlercreutz, H. Scalbert, A. & Jacques, P. (2010). Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction, 68(10), 571–603. doi:10.1111/j.1753-4887.2010.00319.x
- Procházková, D. Bou, I. & Wilhelmová, N. (2011). Fitoterapia Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids ☆, 82(524), 513–523. doi:10.1016/j.fitote.2011.01.018
- Ramos, a a, Lima, C. F. Pereira, M. L. Fernandes-Ferreira, M. & Pereira-Wilson, C. (2008). Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. *Toxicology letters*, 177(1), 66–73. doi:10.1016/j.toxlet.2008.01.001
- Rangel-buitrago, N. Correa, I. D. Anfuso, G. Ergin, A. & Williams, A. T. (2013). Assessing and managing scenery of the Caribbean Coast of Colombia. *Tourism Management*, 35, 41–58. doi:10.1016/j.tourman.2012.05.008

- Resende, F. A. Alves, J. M. Munari, C. C. Senedese, J. M. Sousa, J. P. B. Bastos, J. K. & Tavares, D. C. (2007). Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. *Mutation research*, 634(1-2), 112–8. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.06.008
- Resende, F. A. Munari, C. C. de Azevedo Bentes Monteiro Neto, M. Tavares, D. C. Bastos, J. K. da Silva Filho, A. A. & Varanda, E. A. (2012). Comparative Studies of the (Anti) Mutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* and Artepillin C by the Bacterial Reverse Mutation Test. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 17(3), 2335–50. doi:10.3390/molecules17032335
- Riceli, P. Ribeiro, V. Castro, D. De, Ávila, A. T. Braz-filho, R. Lenise, M. ... Lima, S. (2013). Clerodane and patchoulene terpenes as new constituents from *Baccharis salzmannii* DC. *Biochemical Systematics and Ecology*, 50, 101–105. doi:10.1016/j.bse.2013.03.042
- Rodrigues, C. R. F. Dias, J. H. de Mello, R. N. Richter, M. F. Picada, J. N. & Ferraz, A. B. F. (2009). Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *Journal of ethnopharmacology*, 125(1), 97–101. doi:10.1016/j.jep.2009.06.006
- Rodríguez, M. D. L. N. Gianuzzi, L. Reta, M. & Larramendy, M. L. (2011). The antimutagenic capacity of the aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93(2), 251–260. doi:10.1080/02772248.2010.509164
- Sanchez-Palomino, S. Abad, M. J. Bedoya, L. M. García, J. Gonzales, E. Chiriboga, X. ... Alcami, J. (2002). Screening of South American Plants against Human Immunodeficiency Virus: Preliminary Fractionation of Aqueous Extract from *Baccharis trinervis*, 25(September), 1147–1150.
- Seo, K. W. Park, M. Song, Y. J. Kim, S.-J. & Yoon, K. R. (2003). The protective effects of Propolis on hepatic injury and its mechanism. *Phytotherapy research: PTR*, 17(3), 250–3. doi:10.1002/ptr.1120
- Sharp, H. Bartholomew, B. Bright, C. Latif, Z. Sarker, S. D. & Nash, R. J. (2001). ( Asteraceae ), 29, 2000–2002.
- Simões, C. M. O. & Schenkel, E. P. (2002). A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12(1), 35–40. doi:10.1590/S0102-695X2002000100005

- Simões-pires, C. A. Queiroz, E. F. Henriques, A. T. & Hostettmann, K. (2005). Isolation and On-line Identification of Anti-oxidant Compounds from Three Baccharis Species by HPLC-UV-MS / MS with Post-column Derivatisation, *314*(June 2004), 307–314.
- Singh, M. Arseneault, M. Aanderson, T. Murthy, V. & Ramassamy, C. (2008). Challenges for Research on Polyphenols from Foods in Alzheimer ' s Disease : Bioavailability , Metabolism , and Cellular and Molecular Mechanisms, 4855–4873.
- Tavares, D. C. Mazzaron Barcelos, G. R. Silva, L. F. Chacon Tonin, C. C. & Bastos, J. K. (2006). Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, *20*(7), 1154–8. doi:10.1016/j.tiv.2006.02.009
- Tosun, A. Akkol, E. K. & Yeşilada, E. (2009). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of coumarins from *Seseli gummiferum* subsp. *corymbosum* (Apiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, *64*(1-2), 56–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19323267>
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231–46. doi:10.3390/nu2121231
- Vessecchi, R. Zocolo, G. J. Gouvea, D. R. Hübner, F. Cramer, B. Rosa, M. ... Lopes, N. P. (2011). Re - examination of the anion derivatives of isoflavones by radical fragmentation in negative electrospray ionization tandem mass spectrometry : experimental and computational studies, (May). doi:10.1002/rcm.5075
- Wansi, J. D. Hussain, H. Tcho, A. T. Kouam, S. F. Specht, S. Sarite, S. R. ... Krohn, K. (2010). Antiplasmodial activities of furoquinoline alkaloids from *Teclea afzelii*. *Phytotherapy research : PTR*, *24*(5), 775–7. doi:10.1002/ptr.2894
- Yang, K. Song, Y. Ge, L. Su, J. Wen, Y. & Long, Y. (2013). Fluid Phase Equilibria Measurement and correlation of the solubilities of luteolin and rutin in five imidazole-based ionic liquids, *344*, 27–31. doi:10.1016/j.fluid.2013.01.026
- Zaabat, N. Hay, A.-E. Michalet, S. Darbour, N. Bayet, C. Skandrani, I. ... Dijoux-Franca, M.-G. (2011). Antioxidant and antigenotoxic properties of compounds isolated from *Marrubium deserti* de Noé. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(12), 3328–3335. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511004431>



*Curriculum vitae*  
*Victoria Jaramillo Garcia.*

---

# VICTORIA PATRICIA JARAMILLO GARCIA

Biólogo

## *Informação Pessoal*

---

Lugar y Data de Nascimento:	Abril 16 de 1.984 Montería
Pais de Nascimento:	Colômbia
Pasaporte:	25.785.292
CPF:	859.372.310-15
Endereço residencial:	Rua Santana 205 ap 202
Endereço acadêmico:	Av Bento Gonçalves, 9500- Predio 43422 Lab 210
Telefone:	(55) 51-8174-3439 (55) 51- 3308-7602
Estado Civil:	Solteira
E-mail:	biovick@gmail.com

## *Estudos Realizados*

---

- Biólogo, Ano: 2007

Universidad de Cordoba - Colômbia

T.C.C.: Estudo de susceptibilidade antimicrobiana e produção de enterotoxinas em cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina na cidade de Monteria

Orientador: Prof. Dr. Salim Mattar Velilla

Co-orientador: Prof. Alfonso Calderon

- Mestre em Biologia Celular e Molecular, Ano 2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dissertação: Avaliação fitoquímica, citotóxica, genotóxica e mutagênica das frações de *Baccharis trinervis* de Brasil e Colômbia.

Orientador: Prof. Dr. João Antônio Pegas Henriques

Co-orientador: Profa. Dra. Juliana da Silva

- Aluna de doutorado no Programa de Pós-Graduação em biologia celular e molecular, ano 2014

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. João Antônio Pegas Henriques

## *Formação complementar*

---

- Universidad de Cordoba, Centro De Inglês: Curso de Inglês, 700 Horas (Nível Básico, Intermédio e Avançado B) 2006.
- Ministério do meio ambiente, vivenda e desenvolvimento territorial: Capacitação em resolução de conflitos ambientais. 20 de novembro de 2003 a 5 de maio de 2004. Bolívar, Córdoba e Sucre (Colômbia).
- Universidad del Sinú: I Curso teórico em epidemiologia molecular, epigenética y exposición ocupacional a genotóxicos. Julho de 2009. Montería-Colômbia.
- Fundação para Pesquisas Biológicas Aplicadas: Análises taxonômicas, fisiológicas y molecular de cianobactérias y de toxinas presentes em florações, como estratégias de controle y monitoramento, y aplicações tecnológicas. Setembro e outubro de 2010. Mar del Plata. Argentina
- Escola Latino Americana de Genética Humana e Medica: VIII Curso da ELAG. Abril de }2. Caxias do Sul-RS-Brasil.

## *Atuação profissional*

---

- Universidad de Cordoba: Apoio técnico no processamento das amostras para diagnostico de bruceloses bovino.  
Novembro 2007-Julho 2008

- Universidad del Sinú: Pesquisador no projeto “Caracterização de bactérias gram positivos (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negativos e *Enterococcus sp* adquiridos na comunidade vs nosocomiales em três hospitais do caribe colombiano.  
Novembro 2008-2009
- Universidad del Sinú: Pesquisador do programa “Jovem Pesquisador e inovador de COLCIENCIAS” Identificação, detecção y quantificação de cianobactérias, microcistinas e genes responsáveis da produção de citotoxinas no antigo delta do Río Sinú (ADRS), departamento de Córdoba, Colômbia.  
Julho 2009-Março 2010.
- Universidad del Sinú: Pesquisador do programa “Jovem Pesquisador e inovador de COLCIENCIAS” no projeto Avaliação do dano citogenético em uma população ocupacionalmente exposta a mineração do carvão em Puerto Libertador - Córdoba – Colômbia  
Março 2010-Março 2011.

## *Produção bibliográfica*

---

- Coautoria do capítulo: “**Extinção de espécies nativas de importância socioeconómica e cultural por as mudanças no uso do solo nas áreas de influencia dos relictos de bosque seco atuais**” publicado em “**Resolução de conflitos ambientais. Metodologia y estudos de caso no caribe colombiano**”, pertencente ao convenio de cooperação científica e tecnológica entre Ministério do meio ambiente, vivenda e desenvolvimento territorial y a corporação Ecofondo.

- Coautoria de material didático: Alimentos, o que você gostaria de saber a ciência pode explicar. 2012. Universidade Federal do Rio grande do Sul

## *Resumos publicados em eventos*

---

- Produção de enterotoxinas em cepas de *Satphylococcus aureus* isoladas de mastitis bovina na cidade de Montería. Em: VI Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, 2008, Santa Marta
- Identificação, detecção y quantificação de cianobactérias e microcistinas no antigo delta do Río Sinú (ADRS), departamento de Córdoba, Colômbia. Em: IV oficina sobre Cianobactérias toxígenas na Argentina: Bases para o desenvolvimento de ferramentas para prevenção e manejo de florações y para assegurar a qualidade do recurso agua. Mar del Plata. 2010
- Avaliação fitoquímica, citotóxica e genotóxica das frações do extrato de *Baccharis trinervis* do Brasil e Colômbia. Em: In: XIII reunião anual de pós-graduação em biologia celular e molecular, 2012, Porto Alegre. XIV reunião anual de pós-graduação em biologia celular e molecular, 2011.
- Avaliação citotóxica e genotóxica dos extratos aquosos de *Baccharis trinervis* do Brasil e Colômbia. Em: XV Congreso Latinoamericano de Genetic, 2012, Rosario. Actas Alag 2012, 2012. v. XXIII. p. 343-344.
- Avaliação citotóxica e genotóxica dos extratos aquosos de *Baccharis trinervis* do Brasil e Colômbia. Em: XIV reunião anual de pós-graduação em biologia celular e molecular, Porto Alegre, 2012

- Evaluation of the phytochemical, cytotoxic and genotoxic potential of the aqueous extract of *Baccharis trinervis* from Brazil and Colombia. Em: 11<sup>th</sup> International Conference Environmental Mutagenesis. Foz de Iguaçu, novembro de 2013.
- Avaliação da composição fitoquímica, citotóxica e genotóxica dos extratos aquosos de *Baccharis trinervis* do Brasil e Colômbia. Em: XV reunião anual de pós-graduação em biologia celular e molecular. Porto Alegre, Novembro de 2013.
- Avaliação fitoquímica, citotóxica e genotóxica dos extratos aquosos de *Baccharis trinervis* do Brasil e Colômbia. Em: V Workshop em produtos naturais. Caxias do Sul, Maio de 2014.

## *Participação em Eventos*

---

- I Encuentro internacional sobre E.T.V. Malaria y Dengue, una mirada para el siglo XXI. Montería, Julio 16-18 de 2.003
- Capacitación en resolución de conflictos ambientales, realizado en los departamentos de Bolívar, Córdoba y Sucre, entre el 20 de noviembre de 2.003 y el 5 de mayo de 2.004 con una intensidad de 62 horas
- Curso Internacional de Biotecnología. Montería Noviembre 22 y 23 de 2.004
- I Simposio de Biología. Montería Octubre 19-21 de 2.004
- II Simposio de Biología. Montería Octubre 8-10 de 2.005
- IV Simposio de Biología. Cambio Climático ¿Hacia dónde Vamos? Montería, Septiembre 19-21 de 2.007
- VI Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, 2008, Santa Marta
- IV Simposio internacional de enfermedades emergentes y re-emergentes: enfermedades transmitidas por vectores, 2009, Monteria.

- I Curso teórico en epidemiología molecular, epigenética y exposición ocupacional a genotóxicos. Montería, 21-23 de julio, 2.009
- III Simposio era postgenómica, VIH-Cáncer, avances en el tratamiento, Montería, Octubre 7-8 2.009
- IV oficina sobre Cianobacterias toxígenas na Argentina: Bases para o desenvolvimento de ferramentas para prevenção e manejo de florações y para assegurar a qualidade do recurso agua. Mar del Plata. 2010
- XIII reunião anual de pós-graduação em biologia celular e molecular, 2012, Porto Alegre. XIV reunião anual de pós-graduação em biologia celular e molecular, 2011.
- XV Congreso Latinoamericano de Genetic, 2012, Rosario. Actas Alag 2012, 2012. v. XXIII. p. 343-344.
- XIV reunião anual de pós-graduação em biologia celular e molecular, Porto Alegre, 2012
- 11<sup>th</sup> International Conference Environmental Mutagenesis. Foz de Iguaçu, novembro de 2013.
- XV reunião anual de pós-graduação em biologia celular e molecular. Porto Alegre, Novembro de 2013.
- V Workshop em produtos naturais. Caxias do Sul, Maio de 2014.

*Victoria Jaramillo Garcia*

---

**VICTORIA JARAMILLO GARCIA**

**C.C. 25'785.292 de Montería**