



Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona

Júlio C. Borella^{1*}, Donata P. Duarte¹, Aline A.G. Novaretti¹, Ademar Menezes Jr.², Suzelei C. França², Camila B. Rufato³, Pierre A.S. Santos³, Rodrigo C.S. Veneziani³, Norberto P. Lopes³

¹Curso de Ciências Farmacêuticas, Disciplina de Farmacognosia, Universidade de Ribeirão Preto, Av. Costabile Romano 2201, Ribeirânia, 14096-380, Ribeirão Preto, SP, Brasil,

²Unidade de Biotecnologia Vegetal, Universidade de Ribeirão Preto, Av. Costabile Romano 2201, Ribeirânia, 14096-380, Ribeirão Preto, SP, Brasil,

³Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Café s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brasil

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar a sazonalidade sobre o teor de saponinas e o isolamento e elucidação estrutural de constituinte químico (flavona) de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja). O cultivo de indivíduos estaminados de *B. trimera* foi realizado no Campo Experimental da Universidade de Ribeirão Preto - Unaerp, em Ribeirão Preto, no período de janeiro a dezembro de 1998 e foi conduzido em três blocos, sendo que cada um deles era constituído de 48 mudas. As amostras foram colhidas após seis meses do plantio (durante o inverno), três meses após a primeira colheita (durante a primavera) e três meses após a segunda colheita (durante o verão). Após processo de secagem e moagem, as drogas foram submetidas ao ensaio para obtenção do índice de espuma. Os resultados mostraram que não há variabilidade neste índice em função da época de colheita. Parte da droga colhida no verão sofreu análise química para isolamento e elucidação estrutural de componente químico. O isolamento a partir do extrato metanólico de partes aéreas de *B. trimera* foi realizado através de métodos cromatográficos (CC e CLAE) e a identificação estrutural da substância isolada, através de métodos espectrométricos (UV, RMN ¹H e ¹³C). Foi identificada a flavona denominada 5,6-diidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona.

Unitermos: *Baccharis trimera*, Asteraceae, flavonóides, saponinas, variabilidade sazonal.

ABSTRACT: "Seasonal variability in the content of saponins from *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) and isolation of flavone". The aim of this study was to evaluate the seasonal effect on the foam index and the isolation and structural identification of a chemical constituent (flavone) of *Baccharis trimera*. The culture staminate samples of *B. trimera* were realized in the experimental cultivation area of the Universidade de Ribeirão Preto - Unaerp, in Ribeirão Preto, state of São Paulo, Brazil from January to December/1998 and were conducted in three blocks, which received 48 seedlings. The samples were harvested six months after installation (during the winter), three months after the first harvest (during the spring) and three months after the second harvest (during the summer). After the drying process and comminution, an assay to obtain the foam index was performed with the plant material. The results didn't show any alteration, independently of harvest times. Part of the dried plant that had been harvested during the summer was extracted to isolate and identify structurally the chemical compound. The isolation from the methanol extracts of the aerial parts of *B. trimera* has been performed through chromatographic methods (CC and HPLC) and the identification through spectrometric methods (UV, ¹H and ¹³C NMR). A flavone was identified as 5,6-dihydroxy-7,3',4'-trimetoxiflavone.

Keywords: *Baccharis trimera*, Asteraceae, flavonoids, saponins, seasonal variability.

INTRODUÇÃO

O gênero *Baccharis*, incluído na tribo Astereae da família Asteraceae, é constituído por cerca de 500 espécies. Uma das mais importantes é *Baccharis trimera* (Less.) DC, também denominada *Baccharis genistelloides* var. *trimera* (Less.) Baker, com grande utilização na medicina tradicional e na produção de fitoterápicos (Ritter et al., 2002; Nunes et al., 2003;

Pereira et al., 2004). A população brasileira já se habituou com a utilização de espécies vegetais amargas quando tem problemas hepáticos ou relacionados com digestão, por isto a Carqueja, como popularmente é denominada, é uma das espécies mais utilizadas nesta ocasião (Borella; Fontoura, 2002). Ensaio biológicos objetivando atribuir ações farmacológicas para esta espécie foram desenvolvidos, evidenciando efeito antiinflamatório e analgésico (Gené et al., 1996), antimutagênico (Nakasugi;

* E-mail: jborella@universiabrasil.net, Tel/Fax + 55-16-36036748

Komai, 1998), vasorelaxante da musculatura lisa (Torres et al., 2000), hipoglicemiante (Matos; Lorenzi, 2002; Barbosa-Filho et al., 2005), antiviral (Abad et al., 1999), gastroprotetor (Gonzales et al., 2000) e hepatoprotetor (Soicke; Leng-Peschlow, 1987). Estes dados científicos parecem ir ao encontro do uso tradicional que se faz desta planta. *B. trimera* é uma espécie dióica e foi submetida a estudos químicos, evidenciando algumas categorias de compostos naturais, tais como diterpenóides (Herz et al., 1977; Torres et al., 2000), flavonóides (Soicke; Leng-Peschlow, 1987; Gené et al., 1996), saponinas (Chicourel et al., 1997/1998; Gené et al., 1996) e óleos essenciais (Agostini et al., 2005). A sua grande utilização levou à sua inclusão na primeira e quarta edição da Farmacopéia Brasileira (Brandão et al., 2006). Nesse contexto várias espécies têm sido investigadas no Brasil, contribuindo para a elucidação morfoanatômica e para o controle de qualidade (Budel et al., 2003; Budel et al., 2004; Zaroni et al., 2004; Budel et al 2005).

Em investigação realizada com *B. trimera*, determinando-se o índice de espuma (análise quantitativa comparativa para saponinas), resultou em valores diferentes entre plantas masculinas e femininas, sugerindo certa diferenciação química em termos quantitativos (Pavan, 1952). Por outro lado, Chicourel et al. (1997/1998) em estudo sazonal qualitativo, evidenciaram que saponinas se mantinham presentes em coletas de *B. trimera* realizadas na primavera, verão e inverno. Os efeitos analgésico e antiinflamatório observados se devem, principalmente, a um complexo de saponinas que tem como componente majoritário o ácido equinocístico (figura 1) (Gené et al., 1996).

No que se refere aos flavonóides, uma série deles já foram isolados (eupafolina, quercetina, luteolina, nepelina, apigenina, hispidulina, quercetina, eupatorina, genkwanina, cirsimaritina, rutina, cirsilol, genkwanina, cirsimaritina, canferol, eupatrina, eriodictiol, 5-OH-6,7,3',4'-OMe flavona, 5,7,3',4'-OH-3-O-ramnosilglicosil flavona.) (Verdi et al., 2005). Em ensaio de adubação realizado para *B. trimera*, variando-se os teores de nutrientes do solo, com doseamento deste tipo de substância, obteve-se resultados muito parecidos, demonstrando que este vegetal é extremamente rústico, não importando o tipo de solo que é cultivado. No entanto, no mesmo experimento, observou-se variação sazonal no teor de flavonóides, obtendo-se uma droga mais rica neles, quando colhida no verão, para partes aéreas de plantas masculinas, com um ano de vida (Borella et al., 2001). Ressalta-se que grande parte das ações farmacológicas citadas para esta espécie se deve a este complexo flavonoídico presente na composição química desta planta.

Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi estudar a variação sazonal em relação ao índice de espuma em plantas estaminadas durante o primeiro ano de desenvolvimento e a composição química desta espécie, realizando o isolamento e a elucidação estrutural

de substância da fração flavonoídica.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio para obtenção do índice de espuma em drogas coletadas em diversas estações do ano foi desenvolvido do seguinte modo: Após seleção de planta estaminada para matriz, mudas foram obtidas por estaquia e com três meses de idade foram levadas ao campo. O desenvolvimento destas plantas foi realizado de janeiro a dezembro 1998, no Campo Experimental da Universidade de Ribeirão Preto, localizado em Ribeirão Preto, estado de São Paulo, estando na latitude de 21°10'42"S e longitude de 42°48'24"O. O solo foi analisado física e quimicamente através de amostra coletada na profundidade de 20 cm (pH = 5,2; P = 13 mg.kg⁻¹; Ca = 35 mmol.kg⁻¹; Mg = 14 mmol.kg⁻¹; K = 23 mmol.kg⁻¹; Al = 0 mmol.kg⁻¹; H + Al = 31 mmol.kg⁻¹; matéria orgânica = 25 g.kg⁻¹; V = 62,3%; Areia = 537g.kg⁻¹; Silte = 62g.kg⁻¹; Argila = 401g.kg⁻¹). Foi elevado o índice de saturação de bases a 50%. O plantio foi realizado em fileiras duplas, sendo o espaçamento de 1 m entre as fileiras e estas com 0,5 m entre si, com 0,5 m na linha de plantio. As covas tiveram 0,3 m de profundidade por 0,2 m de diâmetro. Sofreram irrigação duas vezes por semana. O experimento foi conduzido com três blocos, com três repetições. Cada parcela teve três fileiras duplas contendo 48 mudas no total, sendo desprezadas as duas fileiras laterais e as quatro plantas de cada ponta da fileira do meio. Sendo assim, foi considerada para coleta de amostras somente as plantas centrais. As análises foram realizadas em drogas obtidas em três colheitas, sendo a primeira 6 meses após o plantio (inverno); a segunda, 9 meses após o plantio (primavera) e a terceira, 12 meses após o plantio (verão). Utilizando-se tesouras de poda, colheram-se os ramos a 10 cm do nível do solo. Estes foram secos à sombra. Após 4 a 5 dias, quando o teor de umidade nas amostras estavam em níveis inferiores a 15% (p/p), procedeu-se à moagem, em moinho de facas, obtendo-se desta forma o material pulverizado (0,5 – 1,0 mm) que foi submetido aos testes para determinação do índice de espuma (Farmacopéia Brasileira, 2000). Todos os ensaios foram feitos em triplicata e a média foi utilizada para a análise estatística. Um exemplar (exsicata) do material estudado foi depositado no Herbário de Plantas Medicinais da Unidade de Biotecnologia Vegetal da Universidade de Ribeirão Preto sob código HPM25. Após as análises, os dados foram tratados estatisticamente (Teste ANOVA e posteriormente teste de Tukey-Kramer, ao nível de 5% de significância) para avaliarmos as possíveis diferenças entre os valores encontrados.

O estudo químico objetivando o isolamento de constituinte flavonoídico de *B. trimera* foi desenvolvido utilizando parte da droga anteriormente obtida (colhida com um ano de desenvolvimento). Com o material pulverizado (1Kg) foi realizada extração com metanol, com ajuda de ultrassonicador, por 25 minutos. Este

material foi filtrado e o extrato metanólico foi seco em rotavaporador e novamente ressuspendido em metanol: água 1:9. Com este extrato foi realizado partição com diclorometano. A fração hidroalcoólica foi seca, obtendo-se 4 g de material que foi submetido a cromatografia em coluna, tendo como fase estacionária o sephadex LH 20 e fase móvel o metanol. Foram eluídas 93 frações que foram monitoradas por CCD (Silicagel GF₂₅₄; CHCl₃: MeOH 7:3) e reunidas, totalizando 12 frações. A fração de número 11 (0,2 g) sofreu novo fracionamento, através de análise preparativa em cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu mod. LC-6A, coluna ODS; detector $\lambda=280$ nm; metanol:água 6:4; fluxo 9,8 ml/min). Da fração analisada foi isolada uma substância codificada como FL1 (0,01 g). Tal substância sofreu análise para obtenção de espectros de ultravioleta (Beckman DU-70), ressonância magnética nuclear de próton e carbono-13 (1D e 2D) (ARX-300) para que sua estrutura química fosse estabelecida. Os sinais observados no espectro de RMN ¹H são: (300MHz, DMSO, TMS como padrão interno): δ (ppm) 13,04 (s, ArOH); 9,57 (s, ArOH); 7,72 (d, $J = 8,1$ Hz, H₆); 7,61 (s, H₂); 7,24 (d, $J = 8,6$ Hz, H₅); 7,06 (s, H₈); 6,97 (sl, H₃); 4,07 (s, OCH₃); 4,01 (s, OCH₃); 3,86 (s, OCH₃). Os sinais observados no espectro de RMN ¹³C são: (75MHz, DMSO, TMS como padrão interno): δ (ppm) 183,1 (C₄); 159,1 (C₂); 152,0 (C₉);

123,3 (C₁); 118,5 (C₆); 113,5 (C₂); 112,5 (C₅); 105,2 (C₁₀); 103,7 (C₃); 91,9 (C₈); 60,4 (OCH₃); 56,8 (OCH₃); 56,2 (OCH₃).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação aos valores do índice de espuma aferidos decorrentes das análises realizadas nas amostras de *B. trimera*, notou-se que, depois de tratados estatisticamente, eles não se mostraram diferentes quando se compara as colheitas realizadas no inverno, primavera e verão (tabela 1). Este resultado é discordante daquele encontrado para o teor de flavonóides presentes nesta mesma espécie, onde se observou um efeito sazonal, com maior concentração na colheita de verão (Borella et al., 2001). Este dado sugere que, para substâncias com potencial afroagênico, principalmente as saponinas, esta espécie vegetal não é sensível às alterações sazonais, no que se refere a biossíntese deste tipo de metabólito.

A estrutura da substância isolada no processo de fracionamento do extrato metanólico de partes aéreas de *B. trimera* foi proposta após análise dos espectros. A substância codificada como FL1 foi analisada por espectroscopia de UV, em metanol, onde se observou bandas atribuídas ao anel A (banda II do grupo benzoil) e ao anel B (banda I do grupo cinamoil), com os máximos

Tabela 1. Média dos valores obtidos do índice de espuma em amostras de *Baccharis trimera*

	Amostras colhidas no inverno	Amostras colhidas na primavera	Amostras colhidas no verão
Bloco 1	200,0 ^a	200,0 ^a	273,8 ^a
Bloco 2	333,0 ^a	214,8 ^a	261,1 ^a
Bloco 3	261,0 ^a	259,2 ^a	252,0 ^a

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente entre si, até o nível de 5% pelo teste de Tukey-Kramer (Amostras de inverno: Desvio padrão = 66,576; Erro padrão da média = 38,438. Amostras de primavera: Desvio padrão = 30,809; Erro padrão da média = 17,787. Amostras de verão: Desvio padrão = 10,949; Erro padrão da média = 6,322).

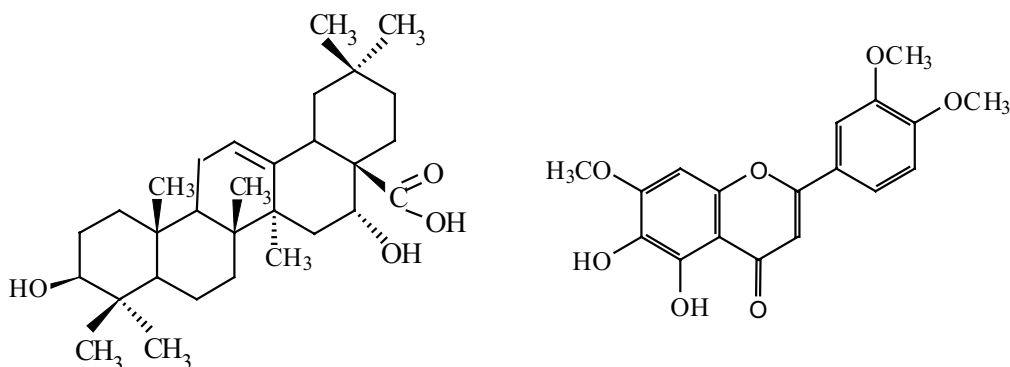


Figura 1. Ácido equinocístico e 5,6-diidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona (FL1).

em 273 nm e 345 nm, respectivamente, características de composto flavonoídico. No espectro de RMN ¹H observaram-se quatro sinais atribuídos aos prótons pertencentes ao anel aromático entre 7,0 e 8,0 ppm e a ocorrência de dois sinais (singletos) com integração para um próton cada, em campo baixo (9,57 e a 13,04 ppm), característicos de prótons de hidroxilas fenólicas e ainda um singlete largo em 6,97 ppm, característico de compostos flavônicos, devido à presença do próton vinílico em C₃. Observou-se, neste espectro, a presença de três singletos, com integração para 3 prótons cada, entre 3,80 a 4,10 ppm, caracterizando a ocorrência de três grupamentos metoxilas. A adição de reagentes de deslocamento junto à solução metanólica deste composto e novamente analisando sua absorção no comprimento de onda do UV levou a determinação das vizinhanças destes grupamentos. Adicionando-se NaOH, notou-se efeito batocrômico de 34 nm da banda I evidenciando a metoxila na posição C₄, e com adição de NaOAc observou-se efeito hipsocrômico de 3 nm da banda II evidenciando outra metoxila em C₇. O espectro de RMN ¹³C confirma a maioria das informações citadas e o espectro bidimensional HETEROCOSY (¹H e ¹³C) auxiliou na correta atribuição dos sinais de ¹³C e ¹H, esclarecendo as vizinhanças de cada um deles. Deste modo, a análise destes dados e comparando-os com aqueles da literatura (Tonn et al., 1982; Zdero et al., 1986) permitiu propor que a flavona FL1 trata-se de 5,6-diidroxí-7,3',4'-trimetoxiflavona (figura 1), até então, não isolada neste gênero.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq e a FAPESP pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

Abad MJ, Bernejo P, Gonzales E, Iglesias I, Irutsum A, Carrasco L 1999. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *Gen Pharmacol* 32: 449-503.

Agostini F, Santos ACA, Rossato M, Pansera MR, Zattera F, Wasum R, Serafini LA 2005. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 15: 215-220.

Barbosa-Filho JM, Vasconcelos THC, Alencar AA, Batista LM, Oliveira RAG, Guedes DN, Falcão HS, Moura MD, Diniz MFFM, Modesto-Filho J 2005. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Rev Bras Farmacogn* 15: 392-413.

Borella JC, Fontoura A, Menezes Jr A, França SC 2001. Influência da adubação mineral (N-P-K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* (Asteraceae) - Carqueja. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai* 4: 99-102.

Borella JC, Fontoura A 2002. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less) DC., Asteraceae (carqueja)

comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 12: 63-67.

Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 16: 408-420.

Budel JM, Duarte MR, Santos CAM, Cunha LM 2003. Macro and microscopical identification of four species of *Baccharis* from trimera group. *Rev Bras Farmacogn* 13(Supl. 2): 42-43.

Budel JM, Duarte MR, Santos CAM 2004. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). *Rev Bras Farmacogn* 14: 41-48.

Budel JM, Duarte MR, Santos CAM, Farago PV, Matzenbacher NI 2005. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I - Estudos botânicos. *Rev Bras Farmacogn* 15: 268-271.

Chicourel EL, Pimenta DS, Jorge LIF, Ferro VO 1997/1998. Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 7/8: 59-66.

Farmacopéia Brasileira 2000, 4ª ed. Parte II/2º fascículo. São Paulo: Atheneu.

Gené RM, Cartañá C, Adzet T, Marín E, Parella T, Cañigueral S 1996. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. *Planta Med* 62: 232-235.

Gonzales E, Iglesias I, Carretero E, Villar A 2000. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 70: 329-333.

Herz W, Pilotti AM, Soderholm AC, Shuhanal K, Vichnewski W 1977. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. *J Org Chem* 42: 3913-3917.

Matos FJA, Lorenzi H 2002. *Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas*. Nova Odessa: Ed. Plantarum.

Nakasugi T, Komai K 1998. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal carqueja (*Baccharis trimera* Less). *J Agric Food Chem* 46: 2560-3564.

Nunes GP, Silva MF, Resende UM, Siqueira JM 2003. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Rev Bras Farmacogn* 13: 83-92.

Pavan AG 1952. *Baccharis trimera* Less. (carqueja amarga) uma planta da medicina popular brasileira. *Anais da Faculdade Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo* 108: 205-214.

Pereira RC, Oliveira MTR, Lemos GCS 2004. Plantas utilizadas como medicinais no município de Campos de Goytacazes - RJ. *Rev Bras Farmacogn* 14 (Supl. 1): 37-40.

Ritter MR, Sobierajski GR, Schenkel EP, Mentz LA 2002. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 12: 51-62.

Soicke H, Leng-Peschlow E 1987. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Med* 53: 37-39.

Tonn CE, Rossomando OS, Giordano OS 1982. Botudioic acid and flavonoids from *Baccharis tucumanensis*. *Phytochemistry* 21: 2599-2600.

Torres LMB, Gamberini MT, Roque NF, Landman MTL, Souccar C, Lapa AI 2000. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth

- muscle. *Phytochemistry* 55: 617-619.
- Verdi LG, Brighente IMC, Pizzolatti MG 2005. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim Nova* 28: 85-94.
- Zaroni M, Pontarolo R, Abrahão WSM, Fávero MLD, Correa-Júnior C, Stremel DP 2004. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. *Rev Bras Farmacogn* 14: 29-39.
- Zdero C, Bohlmann F, King RM, Robinson H 1986. Diterpene glycosides and other constituents from argentinian *Baccharis* species. *Phytochemistry* 25: 2841-2855.