

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

VANESSA CRISTINA GODOY JASINSKI

**ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS DE ESPÉCIMES
MASCULINOS E FEMININOS DE *Baccharis uncinella* DC.**

PONTA GROSSA
2010

VANESSA CRISTINA GODOY JASINSKI

**ÓLEOS ESSENCIAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS DE ESPÉCIMES
MASCULINOS E FEMININOS DE *Baccharis uncinella* DC.**

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Química Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador
Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes

PONTA GROSSA
2010

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

Jasinski, Vanessa Cristina Godoy

J39o

Óleos essenciais e compostos fenólicos de espécimes masculinos e femininos de *Baccharis uncinella* DC. / Vanessa Cristina Godoy Jasinski. Ponta Grossa, 2010.

95f.

Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes

1. *Baccharis uncinella*. 2. Espécimes masculinos e femininos.
3. Óleos essenciais. 4. Ácidos dicafeoilquínicos.
5. Flavonóides. I. Nunes, Domingos Sávio. II. T

CDD: 547

Dedico aos meus queridos pais, Nilson e Leonilda, pela compreensão e apoio durante este trabalho, à toda minha família, em especial aos meus filhos Gabriel e Isabela, pelo incentivo e orações. Ao meu marido Josiel, que às vezes, apoiava entendendo meus estresses e por estar ao meu lado nos momentos bons e ruins da vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por suas misericórdias, amabilidade e longanimidade.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela oportunidade

Ao Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes, pela orientação, ensinamentos e sugestões.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada e a todos os professores da área pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) pelas orientações.

À Prof. Dr^a. Mariza Boscacci Marques pela colaboração e amizade.

Ao Prof. Dr. Gerth Hatschbach, do Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba pela classificação botânica e depósito do exemplar da espécie.

Ao Prof. Dr. Nelson Ivo Matzembacher, do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela classificação botânica e depósito do exemplar da espécie.

Ao Prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior, do Instituto de Pesquisas Tecnológicas de Blumenau – IPT-FURB-SC, pelos dados fornecidos das análises por CG-EM.

Ao Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho, da Universidade do Vale do Itajaí, pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub e Prof^a Dra. Carolina Weigert Galvão, do Laboratório de Biotecnologia – UEPG, pela utilização da bomba de baixa pressão.

À Prof. Dr^a. Neiva Deliberali Rosso, do Laboratório de Química Analítica e Inorgânica, pela utilização do espectrofotômetro nas leituras das amostras.

Aos servidores e funcionários do CIPP e da UEPG.

Aos colegas de mestrado que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

Aos amigos e familiares pelo apoio e incentivo no decorrer desta caminhada.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.



“Tudo que fazemos deve ser feito de boa vontade. Devemos levar nossas ofertas com alegria e gratidão, dizendo ao apresentá-las: Das Tuas mãos voluntariamente Te damos. O mais custoso serviço que possamos prestar não passa de ninharia comparado ao dom de Deus ao mundo. Cristo é uma dádiva cada dia. Deus O deu ao mundo, e Ele graciosamente recebe os dons confiados aos Seus agentes humanos para a promoção de Sua obra no mundo. Desse modo mostramos que reconhecemos e confessamos que tudo pertence absolutamente e inteiramente a Deus.”

(Ellen White, Manustrito 124, 1898)

RESUMO

Este estudo teve como objetivos: desenvolver seqüências metodológicas para a obtenção e análise de óleos essenciais e compostos fenólicos de *B. uncinella*, aplicáveis ao estudo de outras espécies do gênero *Baccharis*; determinar por técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, a composição química dos óleos essenciais das folhas de espécimes masculinos e femininos de *B. uncinella* procedentes de diferentes populações da planta crescendo *in natura*; isolar e determinar a estrutura química de compostos fenólicos presentes nas folhas utilizando, principalmente, métodos cromatográficos e espectrométricos. Nos Campos Gerais do Paraná, foi observada a ocorrência de duas supostas variedades de *B. uncinella*, Bu1 e Bu2, com portes acentuadamente diferentes e épocas de floração bem distintas. Pela primeira vez foram coletadas as folhas de espécimes masculinos e femininos de duas populações de *B. uncinella*, procedendo-se à extração e análise de seus óleos essenciais por técnicas de CG-EM. Os óleos essenciais das quatro amostras apresentaram composições muito semelhantes, em contraposição a dados frequentemente publicados, que indicam haver diferenças entre as composições de óleos de espécimes masculinos e femininos da mesma espécie de *Baccharis*. O resultado obtido na presente pesquisa se deve aos cuidados tomados nas coletas dos espécimes masculinos e femininos (mesmo local e horário), na preparação do material (separação minuciosa das folhas), no uso das mesmas condições nas hidrodestilações e nas análises por CG-EM. Todas as quatro amostras apresentaram baixos teores de monoterpenos e os seguintes sesquiterpenos como principais componentes: β -cariofileno (Bu1♂ 10,03% e Bu1♀ 7,64%; Bu2♂ 6,06% e Bu2♀ 7,96%); espatulenol (Bu1♂ 28,99% e Bu1♀ 29,68%; Bu2♂ 24,30 %e Bu2♀ 16,94%); cariofileno óxido (Bu1♂ 12,98% e Bu2♀ 14,24%; Bu2♂ 9,75% e Bu2♀ 23,52%). Estes resultados também confirmaram as identificações botânicas feitas com base na morfologia das flores, indicando a inexistência da suposta variedade. As águas restantes após as hidrodestilações foram extraídas com CHCl_3 e em seguida com AcOEt , obtendo-se quatro extratos contendo principalmente os ácidos 3,5-dicafeoilquínico e 3,4-dicafeoilquínico, como demonstrado por análises dos seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . As folhas foram também extraídas em Soxhlet por solventes em seqüência: CHCl_3 , AcOEt e MeOH . Parte do extrato metanólico foi purificado dissolvendo-se em água, eliminando os precipitados formados por repouso a frio e extraíndo-se com AcOEt . O extrato obtido desta forma com acetato de etila foi submetido a diversas cromatografias a vácuo, sendo isolado e identificado o ácido 3,5-dicafeoilquínico pela análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . Esta rota para os compostos fenólicos foi melhorada através da obtenção de extratos com acetato de etila a partir da solução aquosa em pH 8 e em pH 3. O extrato feito em meio levemente alcalino continha principalmente flavonóides, enquanto que o que foi obtido em pH 3 continha os derivados do ácido quínico. O extrato AcOEt em pH 8 foi fracionado em coluna de sílica gel sob pressão, levando ao isolamento e identificação de três flavonóides, identificados pelos seus espectros de UV, RMN ^1H e ^{13}C (quercetina, luteolina e apigenina). O extrato AcOEt em pH 4 foi fracionado em coluna de sílica gel, isolando-se e identificando-se o ácido 3,4-dicafeoilquínico pelo seus espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Palavras-chave: *Baccharis uncinella*, espécimes masculinos e femininos, óleos essenciais, ácidos dicafeoilquínicos, flavonóides.

ABSTRACT

This study aimed to: develop methodological sequences for the collection and analysis of essential oils and phenolic compounds of *B. uncinella*, applicable to the study of other species of the genus *Baccharis*; determined by techniques of gas chromatography-mass spectrometry, the chemical composition of essential oils from the leaves of male and female specimens of *B. uncinella* from different populations of the plant growing in nature; isolate and determine the chemical structure of phenolic compounds present in leaves using mainly chromatographic and spectroscopic methods. In the Campos Gerais of Paraná, it was observed the occurrence of two supposed varieties of *B. uncinella*, Bu1 and Bu2, with markedly different sizes and quite different flowering times. For the first time the leaves were collected from male and female specimens of two populations of *B. uncinella*, proceed to the extraction and analysis of essential oils by GC-MS techniques. The essential oils of four samples had very similar compositions, as opposed to frequently published data indicating no difference between the compositions of oils of male and female specimens of the same species of *Baccharis*. The results obtained in this study are due to the care in collections of male and female specimens (in the same place and time), in the preparation of material (careful separation of the leaves), using the same conditions in the hydrodistillation and analysis by CG-EM. All four samples had low levels of monoterpenes and the following sesquiterpenes as the main components: β -caryophyllene (Bu1♂ 10.03% and Bu1♀ 7.64%; Bu2♂ 6.06% and Bu2♀ 7.96%); spathulenol (Bu1♂ 28.99% and Bu1♀ 29.68%; Bu2♂ 24.30% and Bu2♀ 16.94%), caryophyllene oxide (Bu1♂ 12.98% and Bu2♀ 14.24%; Bu2♂ 9.75% and Bu2♀ 23.52%). These results also confirmed the botanical identifications that were made based on the morphology of flowers, indicating the inexistence of the supposed sub-species. The water remaining after the hydrodistillation was extracted with CHCl_3 and then with AcOEt, yielding four extracts containing mainly 3,5-dicaffeoylquinic and 3,4-dicaffeoylquinic acids, as demonstrated by analysis of their ^1H and ^{13}C NMR spectra. The leaves were also extracted in Soxhlet using three solvents in sequence: CHCl_3 , AcOEt and MeOH. Part of the methanol extract was purified by dissolving it in water, removing the precipitates formed by a cold rest and extracting it with AcOEt. The extract thus obtained with ethyl acetate was subjected to several vacuum chromatography steps leading to the isolation and identification of 3,5-dicaffeoylquinic acid by the analysis of its ^1H and ^{13}C NMR spectra. This route to the phenolic compounds was improved by obtaining extracts with ethyl acetate from aqueous solution at pH 8 and pH 3. The extract made in slightly alkaline conditions contained mainly flavonoids, while the one obtained at pH 3 contained derivatives of quinic acid. The AcOEt extract at pH 8 was fractionated on silica gel column under pressure leading to the isolation of three flavonoids identified by their UV, ^1H and ^{13}C NMR spectra (quercetin, luteolin and apigenin). The AcOEt extract at pH 4 was fractionated on a silica gel column leading to the isolation and identification of 3,4-dicaffeoylquinic acid by the ^1H and ^{13}C NMR spectra.

Keywords: *Baccharis uncinella*, male and female specimens, essential oils, dicaffeoylquinic acids, flavonoids.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

Bu1 ♀ - população 1 de *Baccharis uncinella* espécime feminino

Bu1 ♂ - população 1 de *Baccharis uncinella* espécime masculino

Bu2 ♀ - população 2 de *Baccharis uncinella* espécime feminino

Bu2 ♂ - população 2 de *Baccharis uncinella* espécime masculino

br dd – duplo duplete largo

br s – singleto largo

CCD – cromatografia em camada delgada

CG – cromatografia gasosa

CG-DIC – cromatografia gasosa com detector de ionização de chama

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

COX – cicloxigenase

d – duplete

DC. – De Candolle

DMSO-*d*6 – dimetilsulfóxido deuterado

dt – duplo tripleto

EMB – extrato metanólico bruto

EMP – extrato metanólico purificado

H_{ax.} – hidrogênio axial

H_{eq.} – hidrogênio equatorial

HIV-1 – Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1

HIV-2 – Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 2

IK – índice de Kovàts

J – constante de acoplamento

LDL – lipoproteína de baixa densidade

m – multipletto

MHz – Mega Hertz

PAL - L –fenilalanina amônio liase

PEP - fosfoenolpiruvato

pH – potencial hidrogeniônico

PPT – precipitado

psi – libra por polegada quadrada

R_f – fator de retenção

RMN ¹H – ressonância magnética nuclear de próton

RMN ¹³C – ressonância magnética nuclear de carbono

s – singleto

sh – ombro

SAM – s – adenosil metionina

td – tripleto duplo

TMS – tetrametilsilano

UV – ultravioleta

UV-VIS – ultravioleta visível

v/v/v – volume/volume/volume

λ - comprimento de onda (nm)

® - marca registrada

α,β – alfa-beta

$\Delta\lambda$ – variação de comprimento de onda

δ – delta

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	<i>Baccharis uncinella</i> DC., Asteraceae: Ramos vegetativos.....	22
Figura 2 -	Rota biossintética dos terpenóides.....	23
Figura 3 -	Estruturas químicas dos principais compostos que ocorrem no óleo essencial de <i>B. uncinella</i>	26
Figura 4 -	Via do ácido chiquínico para biossíntese de compostos fenólicos.....	28
Figura 5 -	Estrutura do ácido chiquímico.....	29
Figura 6 -	Proposta biossintética para o ácido cinâmico.....	30
Figura 7 -	Proposta biossintética para derivados do ácido cinâmico.....	31
Figura 8 -	Estrutura do ácido clorogênico.....	32
Figura 9 -	Comparação dos extratos aquosos de <i>B. usterii</i> , <i>B. crispa</i> e <i>B. trimera</i> analisados por HPLC-UV, mostrando a presença dos ácidos monocateoilquínicos: 3-O-[<i>E</i>]-cateoilquínico (1), 5-O-[<i>E</i>]-cateoilquínico (2), 4-O-[<i>E</i>]-cateoil-1-metilquínico (3) e dos ácidos dicafeoilquínicos: 4,5-O-[<i>E</i>]-cateoilquínico (4), 3,4-O-[<i>E</i>]-cateoilquínico (5) e 3,5-O-[<i>E</i>]-cateoilquínico (6).....	34
Figura 10 -	Estrutura dos compostos 1 a 6.....	34
Figura 11 -	Biossíntese de alguns esqueletos de flavonóides [E-1: chalcona sintase, E-2: chalcona isomerase, E-3: flavona sintase I (2-hidroxiflavanona sintase), E-4: flavona sintase II (2-hidroxiflanona sintase), E-5: isoflavona sintase, E-6: flavanona-3-hidroxilase e E-7: flavonol sintase).....	35
Figura 12 -	Estrutura básica dos flavonóides mais importantes encontrados na natureza.....	36
Figura 13 -	Estrutura carbônica dos flavonóides que apresentam o anel C.....	37
Figura 14 -	Estruturas químicas dos principais flavonóides encontrados em <i>Baccharis</i>	39
Figura 15 -	Amostra em jornal, intercalada com papelão.....	43
Figura 16 -	Amostras colocadas na prensa	43
Figura 17 -	Capítulos florais separados dos ramos	43
Figura 18 -	Folhas separadas dos galhos.....	43

Figura 19 -	Aparelhagem de vidro utilizado para extração de óleos essenciais.....	44
Figura 20 -	Materiais utilizados na cromatografia a vácuo.....	46
Figura 21 -	Fluxograma da obtenção do extrato bruto e isolamento do composto Bu-25.....	46
Figura 22 -	Início da cromatografia em coluna.....	48
Figura 23 -	Eluição da coluna cromatográfica.....	48
Figura 24 -	Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico.....	50
Figura 25 -	<i>B. uncinella</i> de porte herbáceo (Bu2).....	52
Figura 26 -	<i>B. uncinella</i> arbustiva (Bu1).....	52
Figura 27 -	Espectro de RMN ^{13}C do extrato AcOEt Bu1 ♂ ($\text{CD}_3\text{OD}/75\text{ MHz}$).....	57
Figura 28 -	Espectro de RMN ^{13}C do extrato AcOEt Bu1 ♀ ($\text{CD}_3\text{OD}/75\text{ MHz}$).....	57
Figura 29 -	Ácido 3,4-O-[<i>E</i>]-dicafeoilquínico, espectro de ^{13}C nas Fig. 27 e 28.....	57
Figura 30 -	Ácido 3,5-O-[<i>E</i>]-dicafeoilquínico, espectro de ^{13}C nas Fig. 27 e 28.....	58
Figura 31 -	Espectro de RMN ^1H do extrato AcOEt Bu1 ♂ ($\text{DC}_3\text{OD}/300\text{ MHz}$).....	58
Figura 32 -	Ácido 3,4-O-[<i>E</i>]-dicafeoilquínico, espectro de ^1H na Fig. 31.....	59
Figura 33 -	Ácido 3,5-O-[<i>E</i>]-dicafeoilquínico, espectro de ^1H na Fig. 31.....	59
Figura 34 -	Espectro de RMN ^1H do composto Bu-25 ($\text{CD}_3\text{OD}/300\text{ MHz}$).....	61
Figura 35 -	Ácido 3,5-O-[<i>E</i>]-dicafeoilquínico, espectro de ^1H na Fig. 34.....	61
Figura 36 -	Espectro de RMN ^{13}C do composto Bu-25 ($\text{CD}_3\text{OD}/75\text{ MHz}$).....	61
Figura 37 -	Ácido 3,5-O-[<i>E</i>]-dicafeoilquínico, espectro de ^{13}C na Fig. 36.....	62
Figura 38 -	Estrutura de Bu-25 (ácido 3,5-O-[<i>E</i>]-dicafeoilquínico).....	63
Figura 39 -	Espectro de UV-VIS do composto Bu-71.....	64
Figura 40 -	Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-71 ($\text{CD}_3\text{OD}/300\text{ MHz}$).....	65
Figura 41 -	Estrutura de Bu-71 (apigenina), espectro de ^1H na Fig. 40.....	65
Figura 42 -	Espectro expandido de RMN de ^{13}C do composto Bu-71 ($\text{CD}_3\text{OD}/75\text{ MHz}$).....	65

Figura 43 – Estrutura de Bu-71 (apigenina), espectro de ^{13}C na Fig. 42.....	65
Figura 44 – Estrutura de Bu-71 (apigenina).....	66
Figura 45 – Espectro de UV-VIS do composto Bu-86.....	67
Figura 46 – Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-86 ($\text{CD}_3\text{OD}/300$ MHz).....	68
Figura 47 – Estrutura de Bu-86 (luteolina), espectro de ^1H na Fig. 46.....	68
Figura 48 – Espectro expandido de RMN de ^{13}C do composto Bu-86 ($\text{CDCl}_3/75$ MHz).....	69
Figura 49 – Estrutura de Bu-86 (luteolina), espectro de ^{13}C na Fig. 48.....	69
Figura 50 – Estrutura de Bu-86 (luteolina).....	70
Figura 51 – Espectro de UV-VIS do composto Bu-90.....	70
Figura 52 – Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-90 ($\text{DMSO}-d_6/300$ MHz).....	71
Figura 53 – Estrutura de Bu-90 (quercetina), espectro de ^1H na Fig. 52.....	71
Figura 54 – Estrutura de Bu-90 (quercetina).....	72
Figura 55 – Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-41 ($\text{CD}_3\text{OD} /300$ MHz).....	73
Figura 56 – Estrutura de Bu-41, espectro de ^1H na Fig. 55.....	74
Figura 57 – Espectro expandido de RMN de ^{13}C do composto Bu-41 ($\text{CD}_3\text{OD}/75$ MHz).....	74
Figura 58 – Estrutura de Bu-41, espectro de ^{13}C na Fig. 57.....	74
Figura 59 – Estrutura de Bu-41 (ácido 3,4-O-[<i>E</i>]-dicafeoilquínico).....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação dos compostos fenólicos.....	27
Tabela 2 –	Bandas de absorção de flavonóides em solução metanólica e na presença de cloreto de alumínio (AlCl ₃).....	38
Tabela 3 –	Coletas das amostras de <i>B. uncinella</i> utilizadas para obtenção de óleos essenciais.....	42
Tabela 4 –	Rendimentos das extrações da águas restantes após as hidrodestilação das folhas de <i>B. uncinella</i> (Bu1 e Bu2 - ♂ e ♀)	44
Tabela 5 –	Resultados das análises por CG-EM dos óleos essenciais de espécimes masculinos (♂) e femininos (♀) de duas populações de <i>Baccharis uncinella</i> DC. (Bu1 e Bu2).....	54
Tabela 6 –	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para o composto Bu-25 (CD ₃ OD) comparados com os da literatura para o ácido 3,5-O-[<i>E</i>]-dicafeoilquínico.....	62
Tabela 7 –	Valores de deslocamentos químicos para o composto Bu-71 comparados com a literatura.....	66
Tabela 8 –	Valores de deslocamentos químicos para o composto Bu-86 comparados com a literatura.....	69
Tabela 9 –	Valores de deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de deslocamentos para o composto Bu-90 comparados com a literatura.....	72
Tabela 10 –	Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C para o composto Bu-41 (CD ₃ OD) comparados com os da literatura para o ácido 3,4-O-[<i>E</i>]-dicafeoilquínico.....	75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO NA LITERATURA.....	18
2.1	A família Asteraceae	18
2.2	Considerações sobre o gênero <i>Baccharis</i>	19
2.3	Enquadramento taxonômico de <i>Baccharis uncinella</i> DC.....	20
2.4	Descrição botânica de <i>Baccharis uncinella</i> DC.....	21
2.5	Biossíntese dos óleos essenciais.....	22
2.6	Estudo de óleos essenciais de <i>Baccharis uncinella</i> DC.....	23
2.7	Biossíntese dos compostos fenólicos.....	27
2.8	Biossíntese dos ácidos fenólicos e derivados.....	29
2.9	Ácidos fenólicos e derivados em <i>Baccharis</i>	32
2.10	Biossíntese dos flavonóides.....	35
2.11	Estruturas e propriedades dos flavonóides.....	36
2.12	Atividades biológicas dos flavonóides.....	38
3	OBJETIVOS.....	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
4.1	Equipamentos e reagentes.....	40
4.2	Coleta e identificação dos materiais vegetais.....	42
4.3	Preparo do material vegetal.....	43
4.4	Extração dos óleos essenciais.....	43
4.5	Extratos purificados contendo substâncias fenólicas.....	44
4.6	Isolamento de compostos fenólicos.....	45
4.6.1	Obtenção do extrato metanólico bruto.....	45

4.6.2	Cromatografia a vácuo do extrato metanólico purificado.....	45
4.6.2.1	Análise da substância Bu-25.....	47
4.6.3	Fracionamento do extrato metanólico em pH básico.....	47
4.6.3.1	Cromatografia em coluna do extrato obtido em pH básico.....	47
4.6.3.1.1	Análises das substâncias Bu-71, Bu-86 e Bu-90.....	48
4.6.4	Cromatografias em coluna do extrato obtido em pH ácido.....	49
4.6.4.1	Análises da substância Bu-41.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	Identificação botânica de <i>Baccharis uncinella</i> DC.....	51
5.2	Análise dos óleos essenciais de <i>Baccharis uncinella</i> DC.....	52
5.3	Constituintes fenólicos de <i>B. uncinella</i>	55
5.3.1	Extratos contendo compostos fenólicos polares.....	56
5.3.2	Extratos contendo compostos fenólicos de várias polaridades.....	59
5.3.2.1	Identificação de Bu-25.....	60
5.3.3	Extrato obtido com acetato de etila em meio básico.....	63
5.3.3.1	Identificação de Bu-71.....	63
5.3.3.2	Identificação de Bu-86.....	66
5.3.3.3	Identificação de Bu-90.....	70
5.3.4	Extrato obtido com acetato de etila em meio ácido.....	72
5.3.4.1	Identificação de Bu-41.....	73
6	CONCLUSÕES.....	76
7	ANEXOS.....	77
8	REFERÊNCIAS.....	86

1 INTRODUÇÃO

A utilização das espécies vegetais, com fins de tratamento e cura de doenças e sintomas, reporta ao início da civilização, desde o momento em que o homem despertou para a consciência e começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais em prol de seu benefício (DI STASI, 1996).

Atualmente, o intenso desenvolvimento de áreas como a biologia molecular, a química combinatória e a realização de *screening* em alta escala, aceleram a descoberta de novos fármacos (CECHINEL FILHO; YUNES, 2009). Em contrapartida, recentes estudos demonstram um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de produtos naturais e indicam um futuro promissor para o desenvolvimento de novos compostos com propriedades terapêuticas. Neste contexto é importante mencionar que das cerca de 250.000 espécies de plantas superiores existentes no planeta, apenas 5-15% têm sido sistematicamente investigadas, portanto a natureza tem se mostrado uma fonte abundante de novos quimiotipos e farmacóforos vegetais (BRAZ-FILHO, 1994).

Empresas brasileiras do setor farmacêutico no segmento de fitoterápicos buscam alavancar seu progresso e competir com indústrias multinacionais na produção de novos fármacos baseados na nossa biodiversidade. O setor de fitoterapia movimenta globalmente US\$ 21,7 bilhões por ano. No Brasil, não existem dados oficiais atualizados, mas estima-se que esse mercado gira em torno de US\$ 160 milhões por ano (FEBRAFARMA, 2009). Sob este aspecto, é importante ressaltar que o sucesso em toda cadeia produtiva tem sido acompanhado pelas investigações científicas na área de princípios ativos naturais. Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, que antes eram difíceis de identificar, são hoje elucidadas rapidamente (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

As considerações gerais feitas acima já justificariam a presente pesquisa sobre a elucidação dos metabólitos secundários presentes em *Baccharis uncinella* DC., por ser esta uma espécie vegetal muito pouco estudada.

2 REVISÃO NA LITERATURA

2.1 A família Asteraceae

As plantas da família Asteraceae pertencem ao grupo mais numeroso das Angiospermas, abrangendo cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies distribuídas em três

subfamílias: Barnadesioideae, Cichorioideae e Asteroideae, com amplas distribuições e bem representadas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO *et al.*, 1991; JOLY, 1991).

Esta família cosmopolita é encontrada em grandes concentrações de espécies em regiões de climas variados. Também são abundantes em regiões montanhosas na América do Sul (JOLY, 1967). Algumas espécies são verdadeiramente aquáticas, mas a maioria é encontrada mais em regiões áridas do que nas florestas tropicais úmidas. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores (HEYWOOD, 1993).

A família Asteraceae vem sendo intensivamente estudada nos últimos 25 anos não somente quanto à sua morfologia, anatomia e ecologia, mas também quanto a sua química, citogenética e estrutura macromolecular (BREMER, 1996; HIND; BEENTJE, 1996).

2.2 Considerações sobre o gênero *Baccharis*

O gênero *Baccharis* pertence à tribo Astereae e à subtribo Baccharinidae. A subtribo Baccharinidae é exclusivamente americana, sendo constituída pelos gêneros *Archibaccharis* e *Baccharis* (MÜLLER, 2006). O gênero *Baccharis* inclui mais de 500 espécies dióicas distribuídas do sul do Canadá (FIELDING, 2001) até o extremo sul austral da Argentina e do Chile (GIULIANO, 2001), encontradas principalmente em áreas tropicais na América do Sul como Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas (MALAGARRIGA HERAS, 1976). A alta concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que uma destas áreas é o provável centro de origem desse gênero (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). No geral são subarbustos ou arbustos perenes, ramificados, com caule e ramos cilíndricos, podendo medir de 50 cm a 4 m de altura, apresentando folhas sésseis (BARROSO, 1976).

Foram estudadas quimicamente 120 espécies do gênero *Baccharis* e de modo geral os compostos em destaque foram: presença de flavonóides (BIANCHI *et al.*, 1993; GIANELLO *et al.*, 2000; SHARP *et al.*, 2001), diterpenos (FULLAS *et al.*, 1994; GIANELLO *et al.*, 2000), triterpenos (NURNBERG; FUJIWARA; MARSAIOLI, 1998), taninos (SÁ; NEVES, 1996; ORTINS; AKISUE, 2000), óleos essenciais (FERRACINI *et al.*, 1995; LAWRENCE; COMPANY, 1999; ORTINS; AKISUE, 2000; FRIZZO *et al.*, 2001, AGOSTINI *et al.*, 2005), saponinas (BIACHI *et al.*, 1993; ORTINS; AKISUE, 2000) e outros compostos fenólicos (NAGATANI; WARASHINA; NORO, 2002; AKAIKE *et al.*, 2003). Recentemente, muita

atenção tem sido dada para as propriedades antioxidantes dos flavonóides e ácidos fenólicos, as quais afetam os radicais livres do oxigênio e a peroxidação lipídica e estas podem estar envolvidas em várias condições patológicas como aterosclerose, câncer e inflamação crônica (HALLIWELL; GUITTERIDGE, 1999; SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005).

Estudos realizados mostraram que *B. uncinella* se desenvolve de forma considerável sobre áreas com altos teores de bauxita, locais em que pode absorver quantidades consideráveis de alumínio (4750 ppm), titânio (220 ppm) e zircônio (540 ppm) (CUNHA; DANI; FORMOSO, 1990).

Diversas espécies de *Baccharis* são consideradas de valor ecológico e agrônômico para o homem, pois evitam o desgaste efetuado pelas águas correntes sobre a superfície da terra. Há necessidade de estabelecerem-se linhas de ação voltadas para o desenvolvimento de técnicas de manejo ou cultivo, tendo em vista a utilização dessas espécies vegetais pelo homem aliada à manutenção do equilíbrio dos ecossistemas tropicais (SHELDON; BALICK; LAIRD, 1997). Por outro lado, esforços vêm sendo realizados para o controle de algumas espécies do gênero *Baccharis* consideradas tóxicas para o gado como *B. halimifolia* e *B. coridifolia*.

Foram realizados estudos de atividade biológica com extratos e substâncias isoladas de 30 espécies de *Baccharis*, destacando-se os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos e antiinflamatórios. Entre as espécies de *Baccharis* mais pesquisadas quanto à composição química e/ou atividade biológica encontram-se *B. megapotamica*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii* e *B. tricuneata* (VERDI *et al.*, 2005).

O gênero *Baccharis* tem ainda espécies com potencial terapêutico pouco explorado, como o caso da *Baccharis uncinella* DC. que, embora não seja utilizada na medicina popular brasileira, é utilizada pelos índios Xokleng como calmante e regulador da pressão sanguínea (SENS, 2002).

2.3 Enquadramento taxonômico de *Baccharis uncinella* DC.

A classificação taxonômica de *Baccharis uncinella* DC., é dada a seguir:

FILO: Plantae

DIVISÃO: Angiosperma

CLASSE: Magnoliophyta

ORDEM: Asterales

FAMÍLIA: Asteraceae

TRIBO: Astereae

SUBTRIBO: Baccharidinae

GÊNERO: *Baccharis*

ESPÉCIE: *Baccharis uncinella* DC.

De Candolle, em 1836 estabeleceu uma classificação infragenérica de *Baccharis*. Subdividiu o gênero em oito seções, fundamentadas principalmente na morfologia das folhas: *Trinervatae* DC., *Cuneifoliae* DC., *Discolores* DC., *Oblongifoliae* DC., *Sergilae* DC., *Caulopterae* DC., *Distichae* DC. e *Lepidophyllae* DC. A espécie *Baccharis uncinella* DC. está classificada na seção *Discolores* DC e já apresentou como sinonímia *B. discolor* Baker, sendo incluída no grupo *Spicata* (BUDEL; DUARTE, 2008).

2.4 Descrição botânica de *Baccharis uncinella* DC.

De acordo com Barroso (1976), a *B. uncinella* é uma espécie encontrada preferencialmente em áreas campestres do Brasil, como sendo arbusto nativo desde o Rio de Janeiro até regiões bem ao sul. A espécie *B. uncinella* popularmente chamada de vassoura lageana, cresce de forma selvagem no sul do Brasil. As plantas são de porte variado, na forma de arbusto de ramos tomentosos e glabrescentes (Figura 1) e pode crescer a uma altura de 3 a 4 metros. Possui caule e ramos cilíndricos afilos ou folhosos, mais ou menos angulosos e providos de alas foliáceas. As folhas são sésseis, de ovais a elípticas, com face inferior cinéreo tomentosa, margens revolutas, ápice obtuso, mucronulado, uninérvias. O capítulo apresenta-se com 20-40 flores; involúcro campanulado, com brácteas involucrais agudas e pilosas no dorso. A corola da flor feminina mostra-se com ápice laciniado e aquênio com cerca de 1,5 mm de comprimento (TAKEDA; FARAGO, 2001; BARROSO; BUENO, 2002).

É uma espécie normalmente encontrada em campos secos e locais alterados, de aspecto arbustivo tem floração de outubro a novembro de ocorrência em várias regiões do sul do Brasil, a de porte herbáceo com abundante floração em junho a julho numa microrregião do segundo Planalto do Estado do Paraná, conforme observações feitas nos últimos cinco anos (ASCARI, 2007; JASINSKI *et al.*, 2008).



Figura 1 – *Baccharis uncinella* DC., Asteraceae: Ramos vegetativos.
Fonte: Alta Montanha (2009)

2.5 Biossíntese dos óleos essenciais

Os óleos essenciais são substâncias lipofílicas, voláteis, geralmente líquidas e odoríferas, também chamados de óleos etéreos ou essências. Podem conter 100 ou mais compostos orgânicos, sendo os terpenóides e fenilpropanóides as classes de compostos mais comumente encontradas (SIMÕES *et al.*, 2000).

Os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico. Já os terpenóides tem sua origem biossintética derivada de unidades de isopreno (C_5), que é originado pela via do ácido mevalônico. As estruturas típicas contém o esqueleto de carbono representado por $(C_5)_n$ e são classificados como hemiterpenos (C_5 ou 5 átomos de carbono), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e polisoprenóides (C_n), conforme Figura 2 (MANN, 1987; BREITMAIER, 1999).

Os compostos terpênicos que aparecem com maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos (cerca de 90% dos óleos essenciais) e os sesquiterpenos. Já os diterpenos

podem ser encontrados como constituintes minoritários de óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e são mais comuns em óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos (SIMÕES *et al.*, 2004).

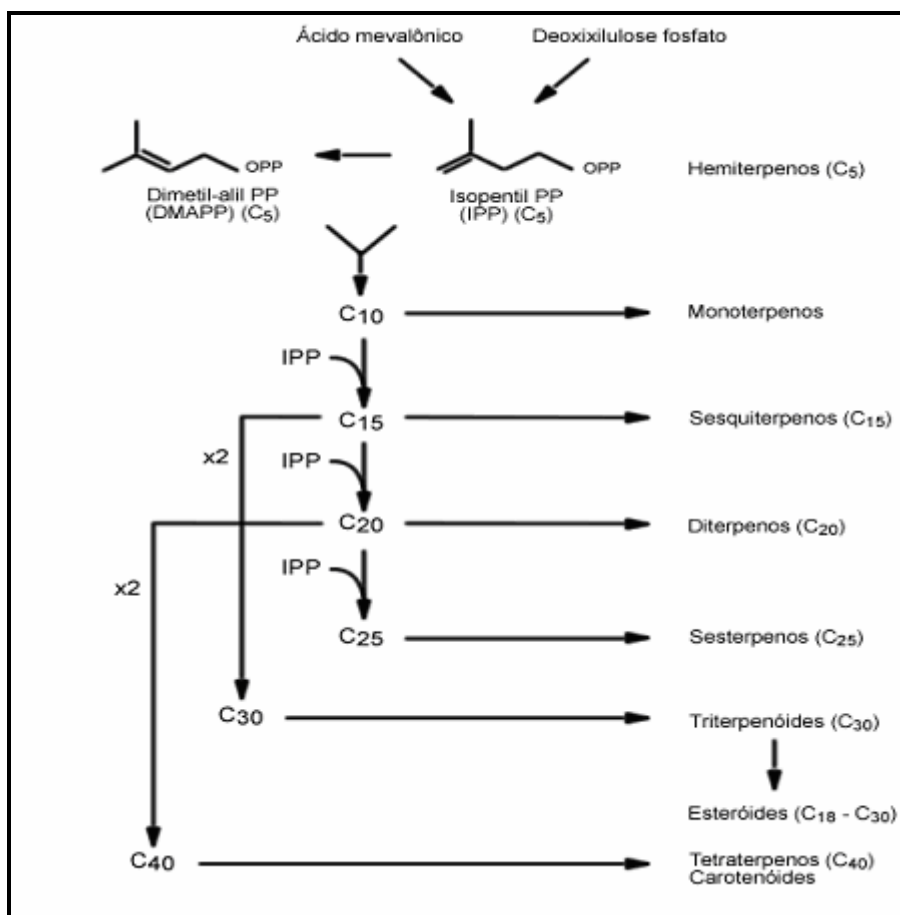


Figura 2 - Rota biossintética dos terpenóides. Fonte: Mann (1987), Breitmaier (1999).

2.6 Estudo de óleos essenciais de *Baccharis uncinella* DC.

Estudos com óleos voláteis de espécies do gênero *Baccharis* demonstraram variações quantitativas e qualitativas em sua composição química. Esta variabilidade química, como em espécies vegetais pertencentes a outros gêneros, pode ocorrer naturalmente devido à influência de fatores climáticos e ambientais, tais como temperatura, precipitação, umidade relativa do ar, luz solar, regime de ventos, altitude, tipo de solo, disponibilidade hídrica e nutricional, depende parcialmente do estágio fenológico e do sexo da planta (BRUNETON, 1995; FERRACINI *et al.*, 1995; LAGO; FÁVERO; ROMOFF, 2006). Ainda, em populações de plantas silvestres, podem ocorrer variações genéticas devido principalmente à fecundação cruzada, resultando em plantas com a morfologia externa idêntica, mas que diferem, às vezes

na sua composição química, e podem ser denominadas quimiotipos (SIMÕES; SPITZER, 2003). As variações na composição química dos óleos voláteis também podem alterar a atividade biológica que lhes é atribuída (CIMANGA *et al.*, 2002).

Informação sobre a composição dos componentes voláteis de *B. uncinella* são escassos, havendo alguns estudos já realizados no Rio Grande do Sul envolvendo várias coletas feitas na região conhecida como Serra Gaúcha (FRIZZO *et al.*, 2001; AGOSTINI *et al.*, 2005; FRIZZO *et al.*, 2008). Mais recentemente, foram encontrados resultados muito semelhantes aos mencionados acima, para uma coleta feita no sudoeste do Estado do Paraná, em que aparecem altas proporções de monoterpenos (FABIANE *et al.*, 2008). No entanto, uma razão monoterpenos/sesquiterpenos muito baixa foi encontrada em óleos essenciais obtidos de *B. uncinella* da Região dos Campos Gerais do Paraná (ASCARI *et al.*, 2009). Além disso, um óleo desta planta apresentando uma composição acentuadamente diversa foi obtido de material coletado em Campos do Jordão, no Estado de São Paulo (LAGO; ROMOFF; FÁVERO, 2008).

O estudo relatado por Frizzo e colaboradores (2001), na caracterização do óleo essencial extraído por hidrodestilação das partes aéreas frescas de *B. uncinella*, utilizando a combinação do CG e CG/EM e identificado com base em compostos padrões, apresentou 61 componentes, o que representa 95% do total do óleo. Os mais abundantes foram o α -pineno (16%), β -pineno (15%), limoneno (13%), espatulenol (10%), globulol (5%), (*E*)-nerolidol (4%), biciclogermacreno (3%) e terpinen-4-ol (2%). Os monoterpos (58,6%) apresentaram proporção muito elevada em comparação aos sesquiterpenos (36%) (FRIZZO *et al.*, 2001).

Agostini e colaboradores (2005) avaliaram amostras de óleos essenciais extraídas por hidrodestilação de seis diferentes espécies de *Baccharis* (*B. articulata*, *B. semiserrata*, *B. oxyodonta*, *B. cognata*, *B. milleflora* e *B. uncinella*). As duas amostras de *B. uncinella* apresentaram como componentes majoritários o sesquiterpeno espatulenol (47,7% e 23,1%) seguido dos monoterpenos: limoneno (16,8% e 14,2%), β -pineno (10,2% e 9,8%) e α -pineno (8,1% e 12,9%). As variações qualitativas e quantitativas observadas na composição química destas duas amostras de *B. uncinella* não foram esclarecidas, atribuindo-se a elas causas gerais como o estágio de desenvolvimento da planta e a condições ambientais e geográficas em geral (AGOSTINI *et al.*, 2005).

O estudo das partes aéreas da planta seca de *B. uncinella* do Rio Grande do Sul, apresentou duas amostras com composições semelhantes entre si e sem grandes diferenças em relação aos outros estudos daquela região. Foram identificados 68 compostos, representando 92,3 e 94,3% do total da composição, com concentrações de β -pineno de 15,5% e 17,4%, α -

pineno de 16,1% e 15,3%, limoneno de 13,1% e 9,9%, espatulenol de 9,8% e 14,5% e globulol de 4,4% e 4,4%, respectivamente para as duas coletas, conforme estruturas apresentadas na figura 3. Os hidrocarbonetos monoterpenos estavam predominantes (55,5% e 52,6%), seguidos pelos sesquiterpenos oxigenados (24,2% e 31,4%), enquanto que os monoterpenos oxigenados constituem a menor fração. Segundo Frizzo e colaboradores (2008), estes resultados sugerem que o período adequado para um processamento industrial do óleo de *B. uncinella* corresponde à estação de floração, quando as plantas produzem baixa concentração de hidrocarbonetos monoterpênicos, enquanto as concentrações dos sesquiterpenos oxigenados mantêm-se estáveis (FRIZZO *et al.*, 2008).

O óleo essencial de folhas secas de *B. uncinella* coletada no sudoeste do Estado do Paraná, foi hidrodestilado e apresentou como destaque os compostos β -pineno de 18,7%, limoneno de 6,7%, (*E*)-nerolidol de 12,9% e espatulenol de 10,5%. Esta amostra apresentou-se muito similar às estudadas no Rio Grande do Sul, com destaque para os monoterpenos que totalizaram 37,86% do total do óleo (FABIANE *et al.*, 2008).

Em trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório, óleos essenciais de duas amostras de *B. uncinella* coletadas na região dos Campos Gerais do Paraná e uma amostra coletada em Vacas Gordas, Santa Catarina, foram analisados e comparados. O óleo das folhas coletadas em Vacas Gordas foi hidrodestilado e apresentou alta proporção de monoterpenos (36,17%, contendo α -pineno 12,9%, β -pineno 5,25%, limoneno 9,9%), mostrando-se muito similar aos dados publicados sobre óleos de amostras coletadas no sudoeste do Paraná e Rio Grande do Sul. No entanto, uma das amostras de óleo das folhas secas coletadas na região de Ponta Grossa foi extraída pelo método de hidrodestilação e a outra amostra por arraste à vapor, mas ambas as amostras apresentaram baixas proporções de monoterpenos (até 3,0%) e sesquiterpenos em maior proporção, tendo como componentes principais: espatulenol de 17,20% a 32,93% e óxido de cariofileno de 16,20% a 27,78% (ASCARI, 2007). Na Figura 3 estão apresentadas algumas estruturas químicas destes compostos.

Lago e colaboradores (2008) estudaram amostras de óleos voláteis das folhas frescas hidrodestiladas dos diferentes espécies do gênero *Baccharis* (*B. dracunculifolia*, *B. microdonta*, *B. regnelli*, *B. schultzii*, *B. trimera* e *B. uncinella*) de uma área elevada de Campos do Jordão. A amostra de *B. uncinella* apresentou um perfil sesquiterpênico qualitativo diferente dos analisados anteriormente, com δ -cadineno de 13,2%, guaiol de 11,3% e cubenol de 8,25%, como compostos principais e uma proporção de monoterpenos também elevada (21,3%) e constituída principalmente por α -pineno (13,59%) e β -pineno (6,69%) (LAGO *et al.*, 2008).

Os dados publicados comentados acima mostraram que os óleos essenciais de amostras do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sudoeste do Paraná e Campos do Jordão são similares quanto a suas elevadas proporções de monoterpenos. Em contraste, as amostras de óleos essenciais da Região dos Campos Gerais, apresentaram razões monoterpenos/sesquiterpenos muito baixa.

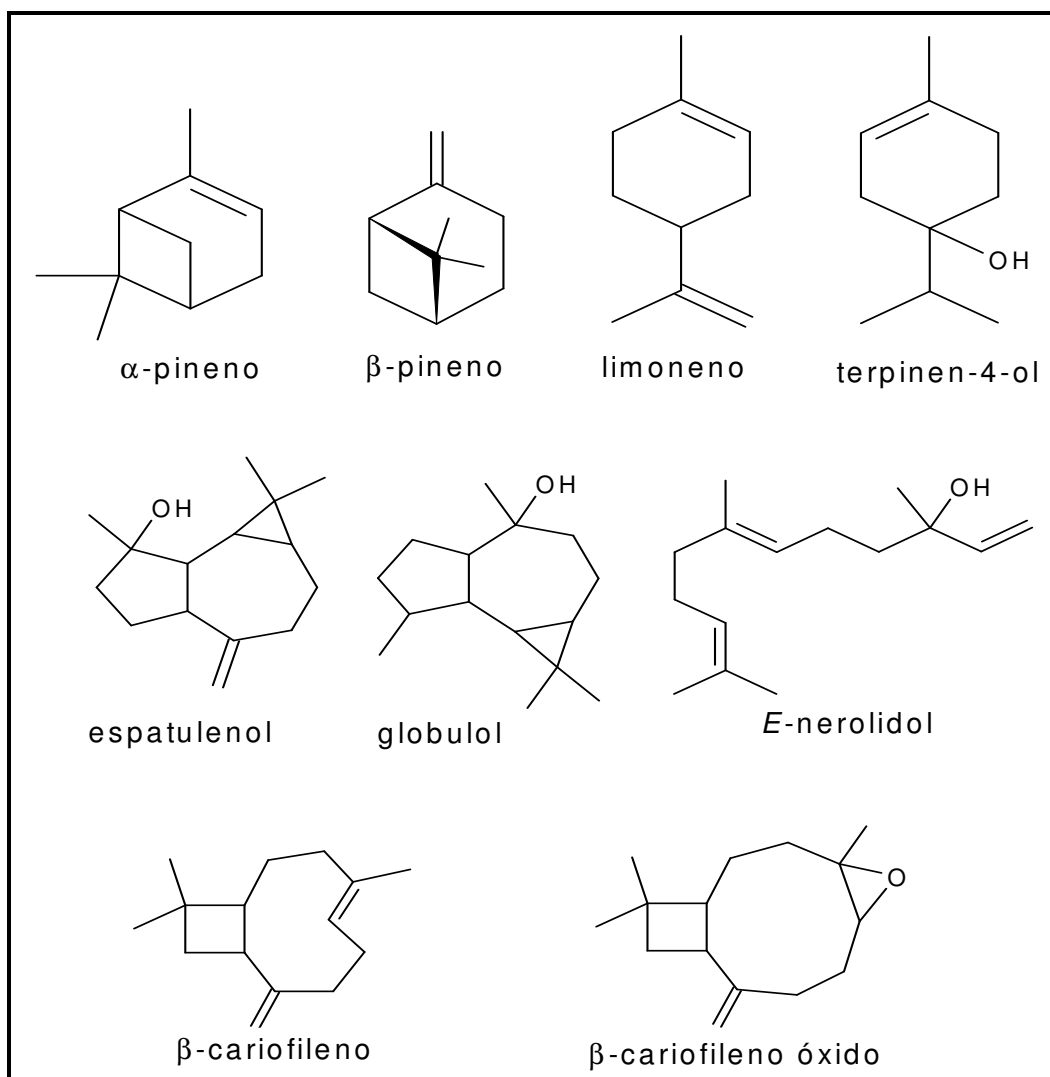


Figura 3 - Estruturas químicas dos principais compostos que ocorrem no óleo essencial de *B. uncinella*. Fontes: Frizzo *et al.* (2008); Ascari (2007).

Um aspecto importante, que não foi considerado nos estudos dos óleos essenciais de *B. uncinella* publicados até agora, é que as espécies do gênero *Baccharis* são dióicas, e é preciso esclarecer se há diferenças nas composições dos óleos essenciais produzidos por espécimes masculinos e femininos. Já foram encontradas diferenças acentuadas entre as composições dos óleos essenciais de espécimes masculinos e femininos de três espécies de

Baccharis (*B. dracunculifolia*, *B. caprariaefolia* e *B. erioclada*), as quais foram atribuídas à presença ou ausência de inflorescências junto com as folhas colocadas a hidrodestilar (FERRACINI *et al.*, 1995).

2.7 Biossíntese dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, cujas estruturas se caracterizam por apresentar pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático. Em princípio, os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático e, neste caso, a síntese dos compostos fenólicos em pequena quantidade é feita utilizando o anel aromático presente em compostos da dieta alimentar. No entanto, os vegetais e a maioria dos microorganismos têm a capacidade de sintetizar anéis aromáticos e, a partir deles, produzir diferentes tipos de compostos fenólicos (SIMÕES *et al.*, 2001).

É de se destacar que os componentes fenólicos exercem funções fundamentais nas plantas, agindo principalmente na defesa destas contra mudanças do ambiente (BOUDET, 2007). Atuam também, contra o ataque de agentes patogênicos e herbívoros, e na absorção de luz, promovendo a associação benéfica com os microorganismos para a fixação do nitrogênio (WILDMAN, 2001).

Os compostos fenólicos podem ser classificados de acordo com o número de carbonos conforme apresentado na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1 – Classificação dos compostos fenólicos. Fonte: Simões *et al.* (2004)

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas, benzofenonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides, isoflavonóides e chalconas
(C6-C3) ₂	Lignanais
(C6-C3-C6) ₂	Diflavonóides
(C6) _n	Melaninas vegetais
(C6-C3) _n	Ligninas
(C6-C1) _n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) _n	Taninos condensados

Os compostos fenólicos podem ser formados através de duas rotas biogenéticas: pela via do ácido chiquímico a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato que inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A origem biogenética determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa maneira, pela via do ácido chiquímico obtêm-se compostos com grupos hidroxilas em posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em *meta* (DEWICK, 1998). Tirosina e ácidos cinâmicos são formados a partir da L-fenilalanina amônio liase (PAL) pela via do ácido chiquímico (Figura 4).

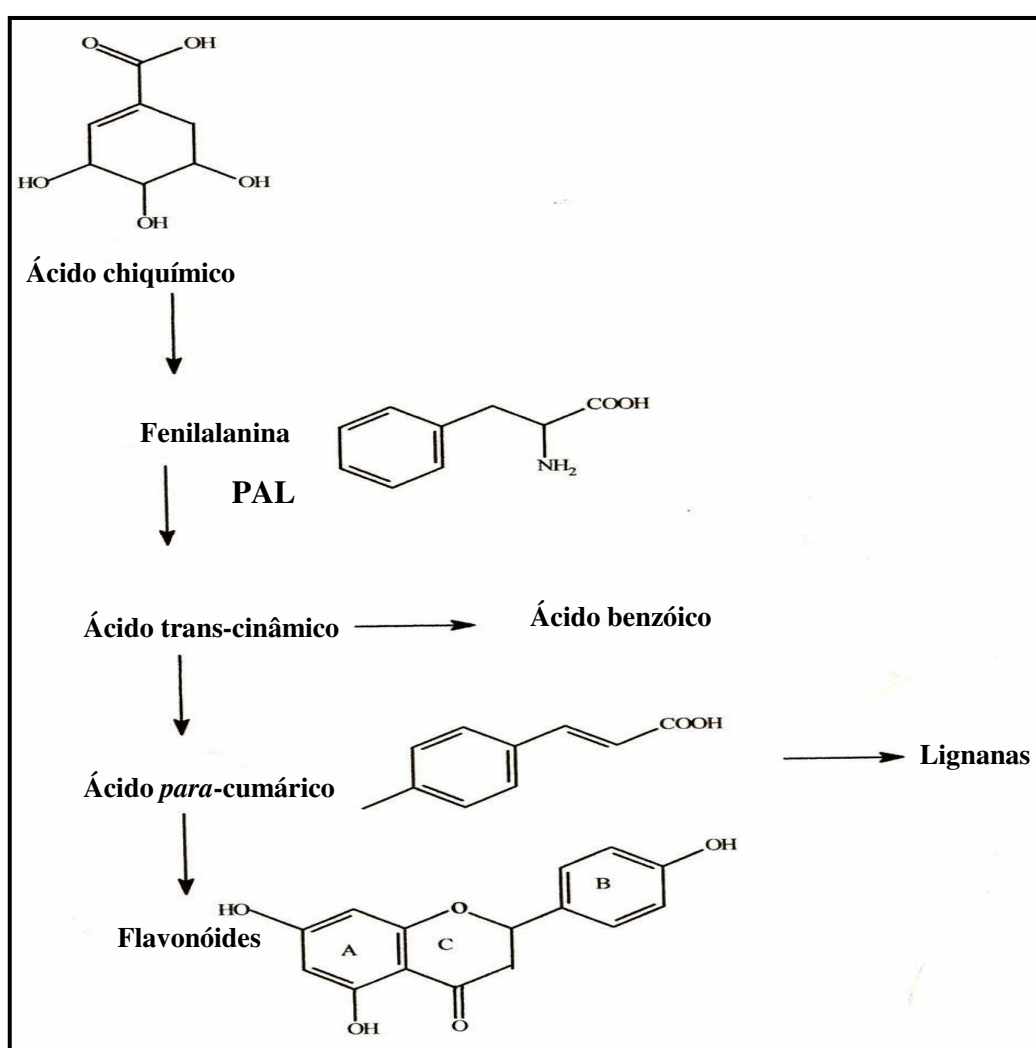


Figura 4 – Via do ácido chiquímico para biossíntese de compostos fenólicos.

Fonte: Shahidi e Naczk (2004)

No que refere às propriedades químicas, a maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada na natureza no estado livre, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Tais compostos são muito reativos quimicamente, possuem em geral características ácidas e podem ser isolados por

meio da sua solubilidade em soluções fracamente básicas. Por serem compostos aromáticos, apresentam intensa absorção na região do ultravioleta, e uma característica importante é a sua complexação com metais, sendo que muitos desses quelatos metálicos são importantes em diversos sistemas biológicos. Os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, tanto por meio de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, luz e calor em meio alcalino, ocasionando o escurecimento de soluções ou compostos isolados. São instáveis principalmente em altas temperaturas, em meio básico e em valores de pH extremos, originando misturas de seus isômeros de posição. Esses compostos podem formar ligações pontes de hidrogênio, e estas podem ser tanto intramoleculares quanto intermoleculares (SIMÕES *et al.*, 2004).

2.8 Biossíntese dos ácidos fenólicos e derivados

Os ácidos fenólicos naturais sejam eles provindos do ácido benzóico ou do ácido cinâmico, têm a sua origem derivada da rota do ácido chiquímico. É através do ácido chiquímico (Figura 5) que são formados muitos constituintes químicos das plantas que contenham anel aromático em sua estrutura.

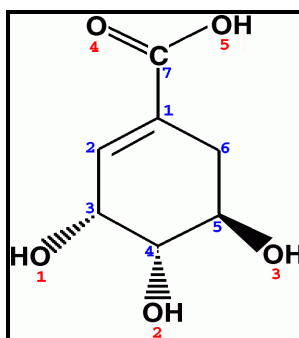


Figura 5 – Estrutura do ácido chiquímico

A formação do ácido chiquímico procede dos precursores de três e quatro átomos de carbono, o fosfoenolpiruvato (PEP) e a eritrose-4-fosfato, respectivamente, através de uma série de etapas como ilustrado na Figura 6.

A reação do ácido chiquímico com fosfoenolpiruvato conduz a formação do chiquimato 3-fosfato, que sob a influência da enzima corismato sintase, sofre a perda de ácido fosfórico produzindo o corismato. O corismato através da ação da enzima corismato mutase, sofre um rearranjo de Claisen para gerar o prefenato. Finalmente, a aminação redutiva do prefenato forma a fenilalanina, que é um aminoácido importante na construção de outras

substâncias naturais, tais como as proteínas, alcalóides e o ácido cinâmico (substância com esqueleto C₆-C₃). O ácido cinâmico é formado a partir da fenilalanina, pela ação da enzima L-fenilalanina amônia liase (PAL), que é capaz de catalisar a remoção da amônia, Figura 6 (MANN, 1987).

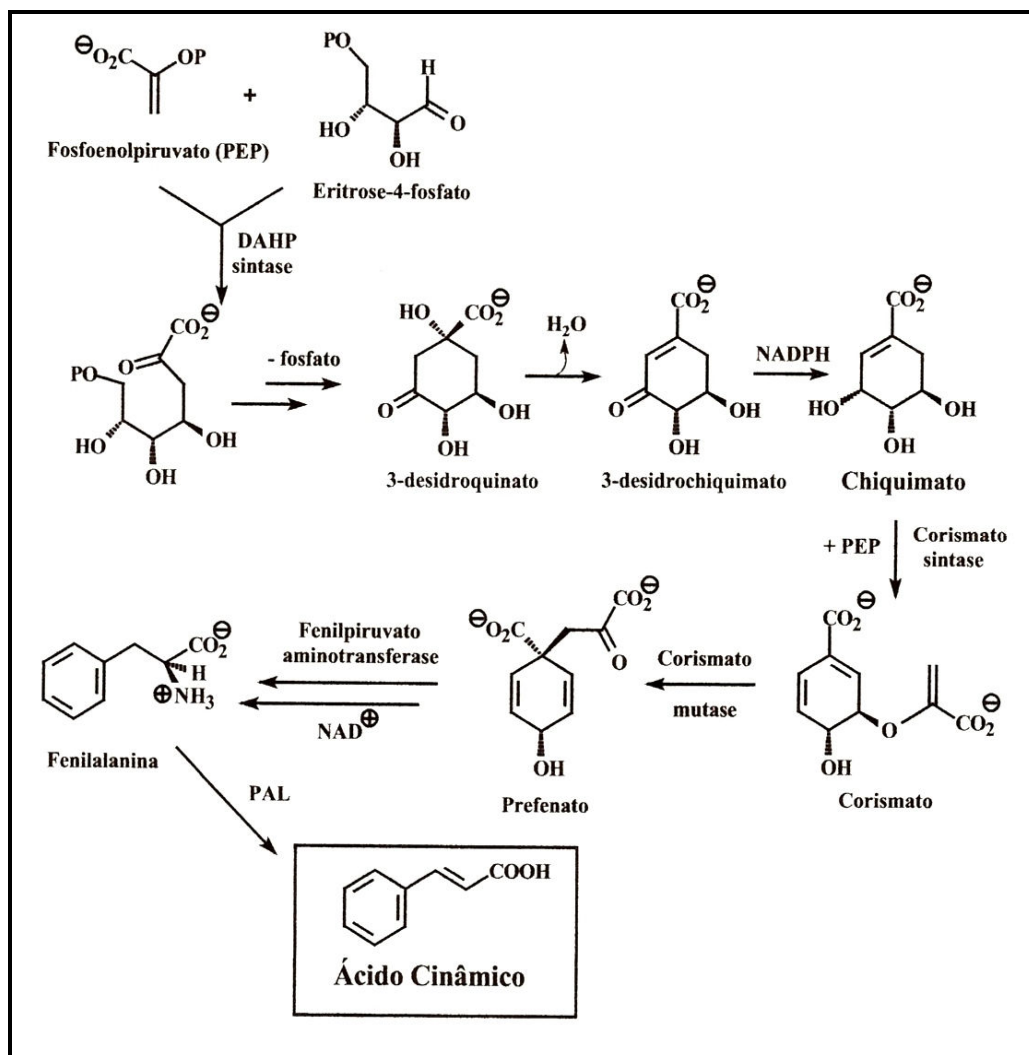


Figura 6 – Proposta biossintética para o ácido cinâmico (MANN, 1987).

A importância do ácido cinâmico e de seus derivados o ácido *para*-hidroxicinâmico (*para*-cumárico), ácido 3,4-diidroxicinâmico (ácido caféico), ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (ácido ferúlico), ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinâmico (ácido sinápico) e ácido *para*-metoxicinâmico como constituintes naturais e como prováveis progenitores para a formação de outras substâncias contendo esqueleto do tipo C₆-C₃ foi descrita por Harborne em 1989 (DEWICK, 2001). Uma grande parte desses derivados é formada a partir de processos oxidativos e/ou de reações de metilação (sendo estes derivados formados pela ação do cofator enzimático s-adenosil metionina - SAM) sobre o ácido cinâmico (Figura 7).

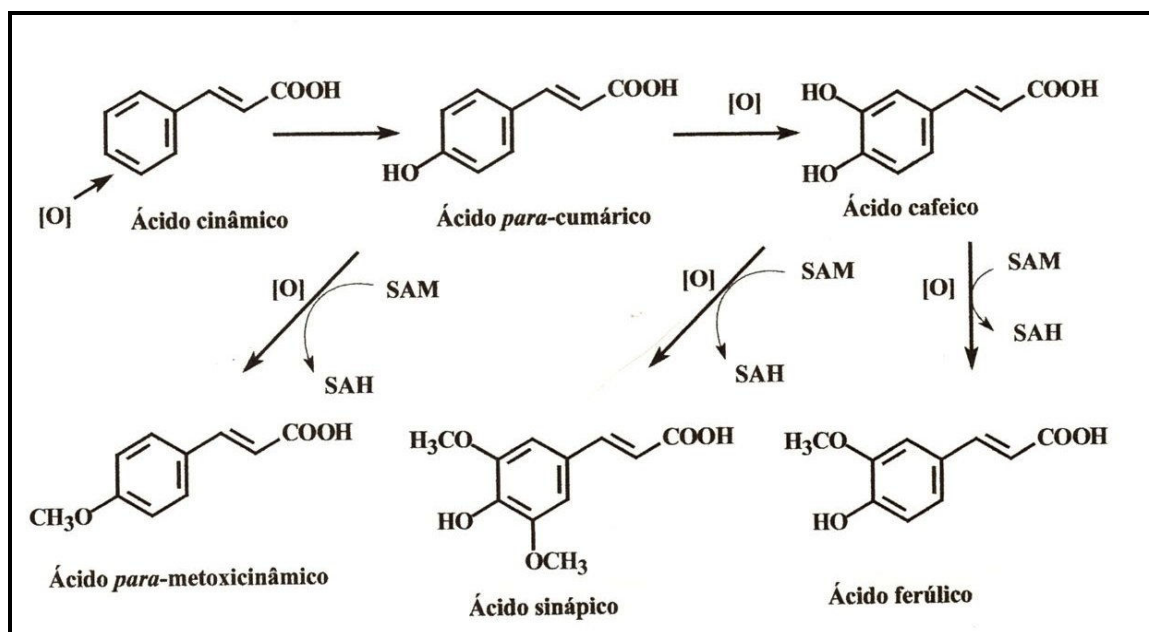


Figura 7 – Proposta biossintética para derivados do ácido cinâmico (MANN, 1987).

Portanto, os ácidos cinamoilquínicos são produtos finais; eles se acumulam nas plantas, e embora exista alguma razão para acreditar que eles sofram alterações metabólicas, são colocados na rota principal de formação das substâncias com esqueleto C₆-C₃. Então, pressupõe-se que a reação de esterificação pela qual o resíduo cinamoil é ligado ao grupo hidroxila do ácido quínico envolve o éster do ácido cinâmico com a coenzima A. Assim, este éster representa o início para muitos tipos de metabólitos do ácido cinâmico: formação de éster, β-oxidação, redução de aldeídos e extensão de cadeia pela reação com unidades de malonil-CoA.

O grupo de substâncias derivadas do ácido fenilacrílico apresenta ampla distribuição nas plantas superiores na forma de ésteres, glicosídeos e amidas. Destacam-se neste grupo os derivados do ácido caféico. O primeiro composto conhecido dessa série foi o ácido clorogênico (Figura 8), obtido de grãos de café por Payen em 1846. Posteriormente, essa substância foi identificada como ácido 3-O-cafeoilquínico, éster do ácido 3,4-dihidróxicinâmico, denominado ácido caféico, e ácido quínico, através da esterificação da hidroxila em C-3 desse último. Mais tarde, foram descritos os isômeros provenientes da esterificação em outras posições do ácido quínico: o ácido criptoclorogênico (ou ácido 4-O-cafeoilquínico), e o ácido neoclorogênico (ou ácido 5-O-cafeoilquínico); o ácido isoclorogênico mostrou ser, de fato, uma mistura de derivados 3,4-O-dicafeoilquínico, 3,5-O-dicafeoilquínico e 4,5-O-dicafeoilquínico. O ácido 1,3-O-dicafeoilquínico, frequentemente encontrado em Asteraceae, é conhecido como cinarina (CLIFFORD, 2000).

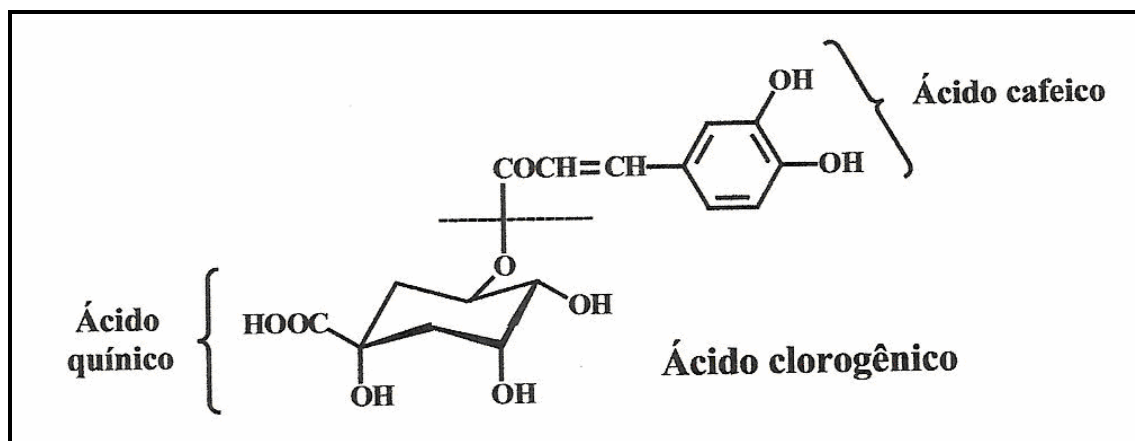


Figura 8 – Estrutura do ácido clorogênico (ácido 3-cafeoilquínico).

2.9 Ácidos fenólicos e derivados em *Baccharis*

Estudos químicos de espécies do gênero *Baccharis* levaram ao isolamento de derivados do ácido quínico, os ésteres mono e dicafeoilquínico em *Baccharis usterii*, *Baccharis trimera*, *Baccharis crispa* (SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005), *Baccharis gaudichaudiana* (AKAIKE *et al.*, 2003), *Baccharis thesioides* (MIKETOVA *et al.*, 1999), *Baccharis genistelloides* (MARQUES; FARAH, 2009), *Baccharis dracunculifolia* (NAGATANI; WARASHINA; NORO, 2001) e na própolis verde (PEREIRA *et al.*, 2003; TATEFUJI *et al.*, 1996), foram identificados pela comparação de seus dados físicos e espectroscópicos com aqueles relatados na literatura.

Estes ésteres do ácido caféico (fenetil éster do ácido caféico) assim como outros compostos fenólicos foram apontados como responsáveis por importantes atividades antimicrobianas e antitumoral (SFORCIN; ORSI; BANKOVA, 2005). Particularmente os ácidos cafeoilquínicos apresentaram diversos efeitos biológicos especialmente na inibição da lipoxigenase (NISHIZAWA; FUJIMOTO, 1986; NISHIZAWA *et al.*, 1987), atividade antibacteriana e antihelmíntica (SCHOLZ; HEINRICH; HUNKLER, 1993). Além disso, estes ácidos possuem ação antiinflamatória (PELUSO *et al.*, 1995), fracamente antiespasmódico (TRUTE; NAHRSTEDT, 1997; TRUTE *et al.*, 1997), e propriedades antihepatotóxica e hepatoprotetora (KAPIL; KOUL; SURI, 1995; BASNET *et al.*, 1996). Estudos relatam ainda, que os ácidos cafeoilquínicos possuem ação potente e seletiva contra o vírus Tipo 1 da Síndrome Imuno Deficiência Adquirida e também são inibitórios da replicação do HIV-1 em concentrações não tóxicas (PEREIRA *et al.*, 2003).

O ácido clorogênico (ácido 3-cafeoilquínico) é um inibidor competitivo da glucose-6-fosfatase em microsomas ileas. A glucose-6-fosfatase no fígado regula a concentração de

glicose no sangue. Quando ingerimos alimento, o ácido clorogênico é absorvido no intestino e passa para a circulação sanguínea. O ácido clorogênico associado com o ácido caféico, possuem ação antioxidantes *in vitro*, protegendo o LDL (lipoproteína de baixa densidade) da oxidação e consequentemente prevenindo contra doenças do envelhecimento (PEREIRA *et al.*, 2003). A maioria dos resultados terapêuticos atribuídos ao ácido clorogênico é provavelmente devido à ação antioxidante destes compostos, o qual se deve ao seu alto potencial como agentes redutores. Os ácidos clorogênicos atuam como doadores de hidrogênio, agindo sobre o oxigênio singlete de forma a retorná-lo à forma fundamental, e como quelantes de metais. Devido a esta última propriedade, os ácidos hidroxicinâmicos formam complexos com ferro que, segundo a literatura tem prevenido Alzheimer (ANDJELKOVIC *et al.*, 2006).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos é determinada, geralmente, pelo número de hidroxilas presentes na molécula, embora outras características contribuam para essa atividade. A dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico ($-\text{HC}=\text{CH}-\text{COOH}$) participa da atividade do radical por ressonância e deslocamento do elétron desemparelhado. Essa característica permite que os derivados do ácido cinâmico sejam antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico (PELUSO *et al.*, 1995).

Partes aéreas de várias espécies de *Baccharis* foram investigadas, identificando-se compostos de ácidos fenólicos, aos quais são atribuídas ações colerética e hipocolesterolêmica. A atividade colerética tem sido atribuída principalmente aos derivados cafeoilquínicos. Alguns ésteres do ácido caféico são alergênicos e responsáveis pela ocorrência de dermatites em indivíduos sensíveis; outra contra-indicação apontada é o bloqueio dos canais biliares (SIMÕES *et al.*, 2004). Também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres (HARBORNE, 1973; BELITZ, GROSCH, 1987).

Alguns derivados do ácido quínico estão presentes em extratos aquosos em três espécies de *Baccharis* conhecidas como carquejas (*B. usterii*, *B. crispa*, *B. trimera*), as quais apresentaram perfis semelhantes com a identificação de seis derivados do ácido quínico (Figuras 9 e 10). Também foram relatados neste gênero, o isolamento do ácido 3,5-O-[*E*]-dicafeoilquínico e ácido 4,5-O-[*E*]-dicafeoilquínico a partir de *B. thesioides* como componentes ativos contra HIV-1 e HIV-2 (MIKETOVA *et al.*, 1999).

Outro trabalho relevante identificou no extrato metanólico de folhas jovens de *B. dracunculifolia* os seguintes ácidos: clorogênico, caféico, *p*-cumárico, ferúlico e cinâmico. As

atividades destes compostos foram avaliadas na própolis, evidenciando-se uma atividade tóxica dose-dependente em fibroblastos de ratos (FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007).

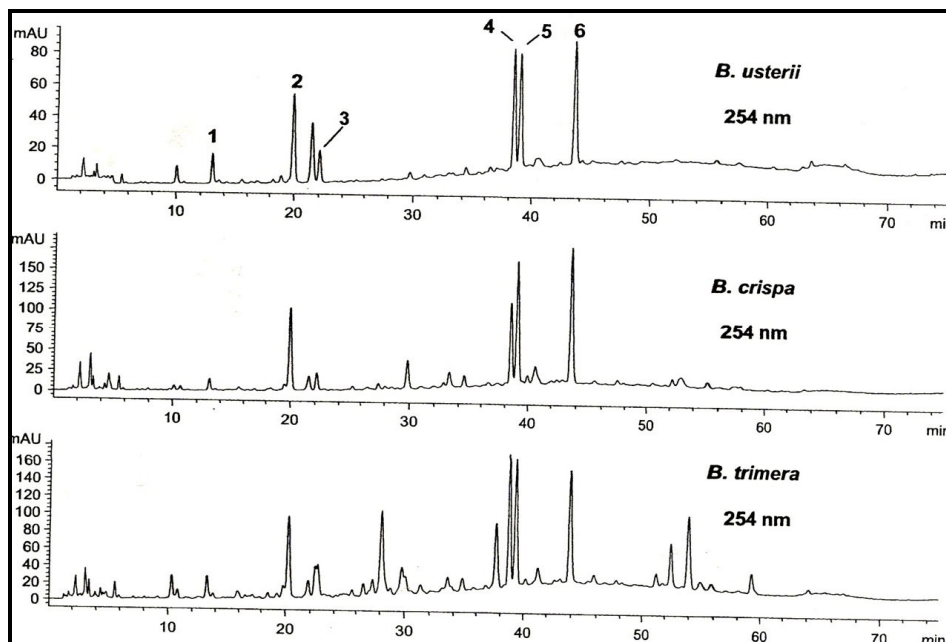


Figura 9 – Comparação dos extratos aquosos de *B. usterii*, *B. crispa* e *B. trimera* analisados por HPLC-UV, mostrando a presença dos ácidos monocateoilquínicos: 3-O-[*E*]-cateoilquínico (1), 5-O-[*E*]-cateoilquínico (2), 4-O-[*E*]-cateoil-1-metilquínico (3) e dos ácidos diccateoilquínicos: 4,5-O-[*E*]-diccateoilquínico (4), 3,4-O-[*E*]-diccateoilquínico (5) e 3,5-O-[*E*]-diccateoilquínico (6). As estruturas são dadas abaixo, na **Figura 10**. Fonte: Simões-Pires *et al.* (2005).

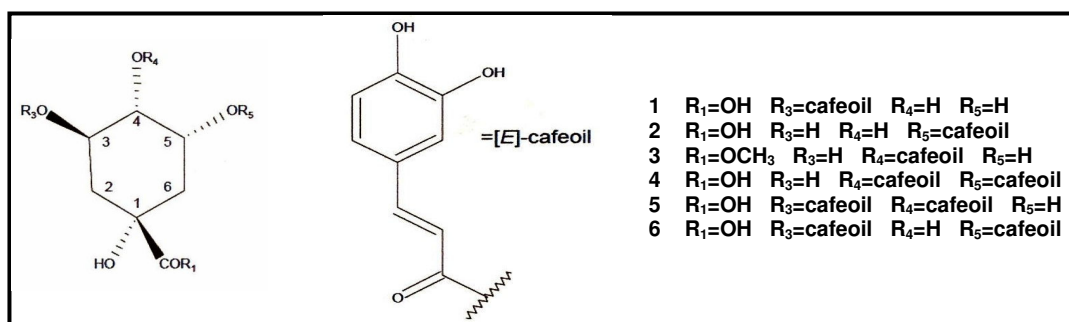


Figura 10 – Estrutura dos compostos 1 a 6.

Costa (2009) apresenta análises por CCD e CLAE indicando a coocorrência de compostos fenólicos majoritários de natureza polar nos extratos metanólicos das folhas de três espécies: *B. dracunculifolia*, *B. semiserrata* e *B. uncinella*. Estes extratos metanólicos foram obtidos após extração inicial com clorofórmio e acetato de etila. Demonstrou-se a presença de ácido ferúlico (2,59%) no extrato de *B. uncinella*. Em *B. dracunculifolia* encontrou-se ácido caféico (de 4,49% a 4,84%), ácido *p*-cumárico (de 0,0 a 6,08%), ácido ferúlico (de 8,48% a 14,18%). O ácido ferúlico foi encontrado também no extrato metanólico da folhas de *B. semiserrata* em 7,56%.

2.10 Biossíntese dos flavonóides

O esqueleto básico dos flavonóides consiste de dois anéis aromáticos e por uma ponte de três átomos de carbono ($C_6-C_3-C_6$), provindo de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido malônico. A via do ácido chiquímico origina a fenilalanina, precursor do ácido cinâmico, sendo este responsável pelo anel aromático B e a ponte de três carbonos. O outro anel aromático, anel A do esqueleto básico dos flavonóides é formado pela rota do acetato (BRAVO, 1998; O'CONNEL; FOX, 2001).

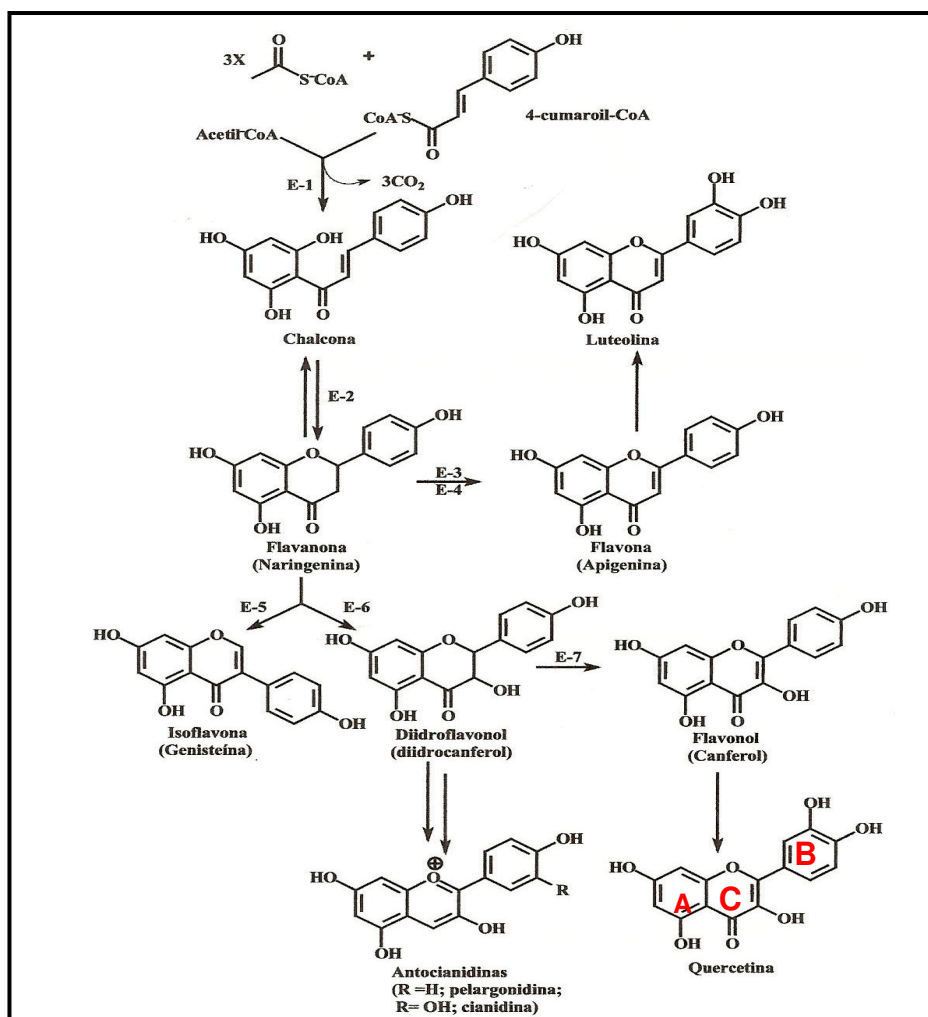


Figura 11 – Biossíntese de alguns esqueletos de flavonóides [E-1: chalcona sintase, E-2: chalcona isomerase, E-3: flavona sintase I (2-hidroxi-flavanona sintase), E-4: flavona sintase II (2-hidroxi-flavanona sintase), E-5: isoflavona sintase, E-6: flavanona-3-hidroxilase e E-7: flavonol sintase]; Fonte: Dewick (2001).

Os flavonóides derivam da condensação de 4-cumaroil-CoA com três grupos malonil-CoA, sob ação da enzima chalcona sintase, pois catalisa a formação do esqueleto C_{15} , e deste

modo ocorre a entrada de hidroxicinamatos na biossíntese. A ciclização da chalcona durante a síntese da flavona é catalisada pela chalcona isomerase encontrada fortemente complexada com a chalcona sintase. A flavanona é precursora de três diferentes classes de flavonóides, isto é, flavonas, isoflavonas e diidroflavonóis. Na formação das flavonas e flavonóis ocorre a formação de uma ligação dupla entre C₂ e C₃. Dois passos são necessários para esta conversão onde são descritas duas flavonas sintase: flavona sintase I (dioxigenase) e flavona sintase II (monoxigenase). A monoxigenase dependente do citocromo P-450, também possui a função de catalisar a epoxidação para a formação das isoflavonas. Os diidroflavonóis são formados pela ação de uma flavanona-3-hidroxilase. A biossíntese dos flavonóides envolve reações enzimáticas na produção das várias classes de flavonóides como mostra na Figura 11 (DEWICK, 2001).

2.11 Estruturas e propriedades dos flavonóides

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal (Figura 12).

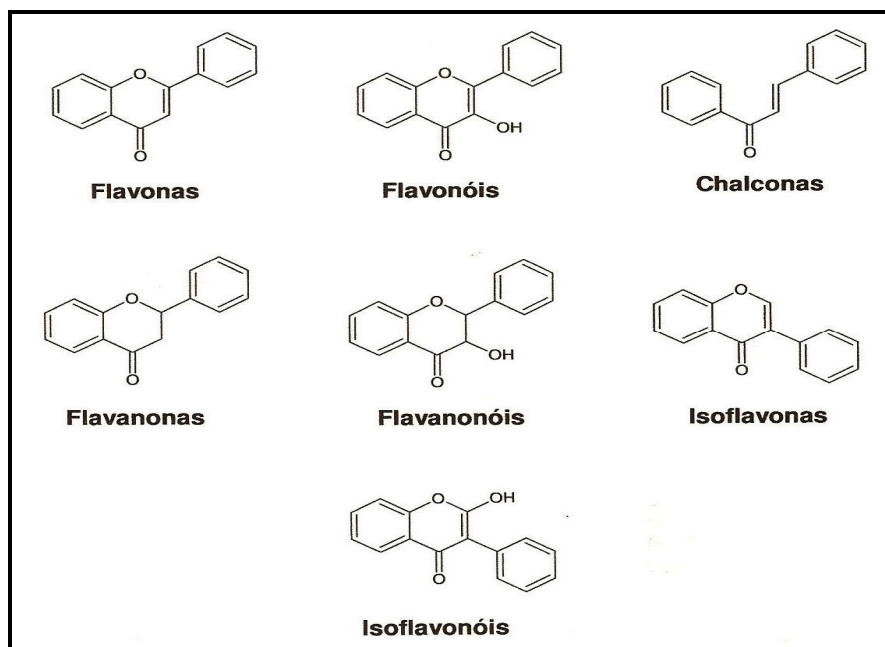


Figura 12 – Estrutura básica dos flavonóides mais importantes encontrados na natureza.

Para a estrutura dos flavonóides, utilizamos o sistema de numeração usado para diferenciar as posições dos carbonos ao redor da molécula, utiliza numeral ordinário para os anéis A e C, e para o anel B numeral ordinário seguido de apóstrofo (Figura 13).

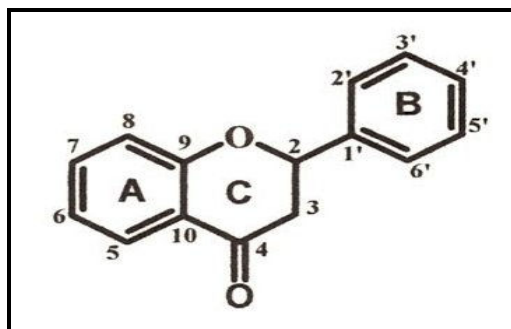


Figura 13 – Estrutura carbônica dos flavonóides que apresentam o anel C. Fonte: Cook e Samman (1996)

A estrutura química dos flavonóides favorece sua ação antioxidante. As atividades de sequestro de radicais livres e antioxidantes dependem do arranjo dos grupos funcionais ao redor da estrutura nuclear, os hidrogênios adjacentes (orto-difenóis), localizados em várias posições dos anéis A, B, C, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo ($-C=O$) de algumas moléculas de flavonóides fornecem a estes compostos alta atividade antioxidante. Assim sendo, o número e a configuração dos grupos hidroxila doadores de hidrogênio são as principais características que as influenciam. Portanto tais atividades acontecem devido a transferência de hidrogênio desse grupo para espécies radicalares ativas, como radical hidroxila ($\cdot OH$), ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e radical lipídico peroxila ($LOO\cdot$). Atualmente, muita atenção tem sido dada para as propriedades antioxidantes dos flavonóides que afetam os radicais livres do oxigênio e a peroxidação lipídica. Estas podem estar envolvidas em várias condições patológicas como aterosclerose, câncer e inflamação crônica (HALLIWELL, 1994).

Os flavonóides são classificados até o presente momento em aproximadamente 12 classes, de acordo com o seu processo de formação, suas características químicas e biossintéticas. Possuem propriedades químicas dos fenóis, sendo relativamente solúveis em água, principalmente quando possuem moléculas de açúcares ligadas à sua estrutura. São levemente ácidos e como são compostos polares ou moderadamente polares, são solúveis em etanol, metanol e butanol, e combinações de solventes com água. Podem sofrer degradação se deixados em meio alcalino na presença de oxigênio. Possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum da benzopirona, com dois

máximos de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (banda II) e outro entre 300-400 nm (banda I), conforme Tabela 2. Em geral, a banda II pode ser considerada como derivada à existência do anel A e a banda I devida ao anel B. O aumento do grau de hidroxilação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico e, conseqüentemente, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda. Portanto, o aumento da faixa de absorção ocorre na faixa entre 250 e 350 nm (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998; MARKHAM, 1982).

Tabela 2 – Bandas de absorção de flavonóides em solução metanólica e na presença de cloreto de alumínio (AlCl_3). Fonte: Markham (1982).

Tipos de Flavonóides	Banda I (nm)	Banda II (nm)	Deslocamento provocado por complexação com AlCl_3 (nm)*
Flavonas	310-350	250-280	+35-55
Flavonóis	350-385	250-280	+35-55
Flavonóis (3-OH substituído)	330-360	250-280	+50-60
Isoflavonas	310-330 ombro	245-275	+50-60
Flavanonas e Diidroflavonóis	300-330 ombro	275-295	+20-26

* Em 415 nm

2.12 Atividades biológicas dos flavonóides

A utilização terapêutica de plantas contendo flavonóides é vasta e, em muitos casos, ainda empírico. Embora alguns resultados tenham mostrado que os flavonóides possam apresentar efeito mutagênico, em geral, são considerados como benéficos. Alguns fármacos são elaborados a partir de flavonóides, em particular para o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão e agindo como cofator da vitamina C. Outras pesquisas sugerem que alguns flavonóides são responsáveis por ação antitumoral considerável (FORMICA; REGELSOM, 1995), podendo ainda agir como antivirais (AMOROS, *et al.*, 1992; CRITCHFIELD; BUTERA; FOLKS, 1996), antihemorrágicos (PARFITT, 1999), hormonais (KNIGHT; EDEN, 1995), antiinflamatórios (ABAD *et al.*, 1993; DUWIEJUA; ZEITLIN, 1993), antimicrobianos (GUTKIND *et al.*, 1984; BEIL; BIRKHOLZ; SEWING, 1995) e antioxidantes (OKAMURA *et al.*, 1994).

Em estudos sobre a atividade antiviral de flavonóides destacam-se a quercetina. Esse flavonol apresentou atividade contra vírus envelopados: vírus do herpes simples Tipo 1, vírus respiratório sincicial, pseudorraiva, parainfluenza 3, sindbis (KAUL, MIDDLETONI; OGRA,

1985; MUCSI; PRAGAI, 1985). Os flavonóides quercetina e luteolina (Figura 14) apresentaram efeito inibidor da peroxidação lipídica em microsomas, destacando-se, portanto, na interferência de reações de propagação e formação de radicais livres.

A atividade antiinflamatória desta classe de substâncias tem sido bastante investigada em extratos aquosos e hidroalcoólico da Família das Asteraceae. Foi demonstrada atividade antiinflamatória para os flavonóides quercetina e luteolina, que é explicada em parte, como devido à inibição da cicloxigenase (COX). Para a quercetina foi observado que inibe seletivamente a enzima 5-lipoxigenase, envolvida na formação dos leucotrienos a partir do ácido araquidônico (MORONEY *et al.*, 1988; SIMÕES *et al.*, 1988). A apigenina (Figura 14) é outra substância com atividade antiinflamatória demonstrada, sendo capaz de inibir o crescimento de fibroblastos, os quais têm importante papel na granulação e no processo de cicatrização (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Vários estudos têm relatado o potencial dos flavonóides na quimioterapia preventiva do câncer, e alguns tem demonstrado capacidade de interagir na gênese do câncer. Para a quercetina, quando aplicada topicamente, foram descritas a inibição da incidência de papilomas de pele em cobaias e a inibição de fibrossarcoma induzido em camundongos (CHANG; KINGHORN, 2001).

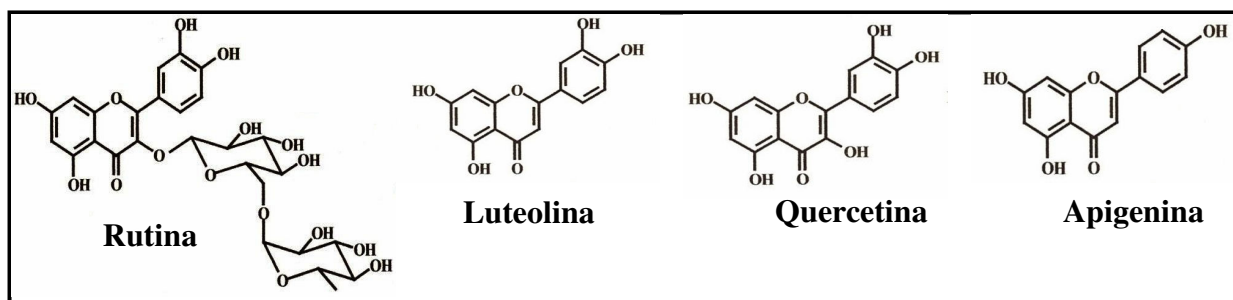


Figura 14 – Estruturas químicas dos principais flavonóides encontrados em *Baccharis*.

Aos flavonóides rutina e quercetina têm sido atribuída propriedade protetora da função capilar e são usados para tratar hemorroidas (PARFITT, 1999). Alguns estudos têm demonstrado que pessoas com baixo consumo de flavonóides apresentaram maior risco de doenças coronarianas (KNEKT *et al.*, 1996). Outros estudos mostraram que dietas ricas em flavonóides, principalmente quercetina, estão associadas a menor incidência de acidente vascular cerebral. Estas substâncias também inibem a peroxidação microsomal no coração, atuando assim como cardioprotetoras (VAN ACKER *et al.*, 1996).

Costa (2009) demonstrou por CLAE a ocorrência do flavonóide rutina (Figura 14) nos extratos metanólicos das folhas de *B. uncinella* (2,76%) e *B. dracunculifolia* (de 3,01 a 3,94%).

3 OBJETIVOS

Desenvolver seqüências metodológicas otimizadas para a obtenção e análise de óleos essenciais e compostos fenólicos de *B. uncinella*, aplicáveis ao estudo de outras espécies do gênero *Baccharis*.

Determinar por técnicas de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, a composição química dos óleos essenciais das folhas de espécimes masculino e feminino de *B. uncinella* procedentes de duas populações diferenciadas por aspectos específicos de seus hábitos e sua fenologia.

Isolar, identificar e determinar a estrutura química de compostos fenólicos presentes em *B. uncinella* utilizando, principalmente, métodos cromatográficos e espectrométricos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e Reagentes

Análises por espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-VIS) foram realizadas em espectrofotômetro Multispec – 1501 Shimadzu, no intervalo de 200 a 450 nm.

As amostras de óleo essencial foram analisadas qualitativamente e quantitativamente em cromatografia a gás em aparelho Cromatógrafo Gasoso da marca Varian® CP – 3800, acoplado a um detector de ionização de chama (DIC) ou de massas (EM) da marca Saturn® 2000, integrado ao software de gerenciamento Saturn® GC – MS Workstation 5.51. A identificação dos compostos foi feita primeiramente pelo cálculo do índice de Kovats de cada componente pela fórmula abaixo (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963) que comparando com os dados publicados (ADAMS, 1995).

$$KI_x = 100_y + 100(z-y) (t_{(r)x} - t_{(r)y} / t_{(r)z} - t_{(r)y})$$

Onde:

KI_x = índice de retenção do compostos considerado;

y = número de carbonos do padrão à esquerda;

z = número de carbonos padrão à esquerda;

$t_{(r)x}$ = tempo de retenção do composto considerado;

$t_{(r)y}$ = tempo de retenção do composto à esquerda;

$t_{(r)z}$ = tempo de retenção do composto à direita.

Feitos os cálculos dos IK para cada componente, seus espectros de massas foram comparados com os fornecidos pelo banco de dados da espectroteca NIST-98 que integra o sistema CG-EM. A quantificação das substâncias voláteis de cada amostra foi feita com base nos cromatogramas obtidos com o detetor FID. Estas análises foram realizadas no Instituto de Pesquisas Tecnológicas da Fundação Universidade Regional de Blumenau. Os arquivos de dados foram submetidos à deconvolução e interpretação utilizando o mesmo software AMDIS[®] que é parte do sistema que acompanha o aparelho analítico do IPT-FURB.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram registrados em espectrômetro BRUKER AC-200 (300MHz) da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI), tendo como referência interna tetrametilsilano (TMS) ou o próprio solvente deuterado (CDCl₃, CD₃OD e DMSO-*d*₆).

Os solventes e reagentes empregados neste trabalho para a análise fitoquímica foram de procedências variadas: Nuclear[®], Merck[®], Reagen[®] e Synth[®]. A água utilizada foi previamente purificada e filtrada com filtro Milli-Q. Os seguintes padrões analíticos de ácidos fenólicos e flavonóides foram utilizados em análises cromatográficas (CCD): quercetina, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e ácido cinâmico.

As cromatografias a vácuo e em colunas foram realizadas em sílica gel 60 da Macherey-Nagel[®], com partículas de 0,04-0,063 mm, 230-400 mesh ASTM como fase estacionária e diversos eluentes como fase móvel, variando o tipo e a proporção conforme a fração utilizada e seu perfil determinado anteriormente em CCD. As eluições foram realizadas com solventes orgânicos, em ordem crescente de polaridade, utilizando pressão negativa na cromatografia a vácuo (entre -200 e -300 mmHg) ou baixa pressão positiva na cromatografia de coluna (até 5 psi).

As cromatografias analíticas em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de alumínio 20×20 cm preparadas com sílica gel HF-254 da Merck[®].

4.2 Coleta e identificação dos materiais vegetais

Cerca de 150 g das partes aéreas de *Baccharis uncinella* DC. foram coletadas de duas populações de plantas crescendo *in natura* na margem da Rodovia BR-376, sentido Curitiba, Paraná, nos seguintes locais e coordenadas: população arbustiva (Bu1) para espécimes masculino e feminino, no km 541 e coordenadas 25°22'01" Sul e 49°49'23,5" Oeste, altitude de 993 metros; população herbácea (Bu2) para espécimes masculino e feminino, no km 547 e coordenadas 25°24'15" Sul e 49°47'07" Oeste, altitude de 1060 metros.

Estas coletas foram realizadas em dias sem chuva, sempre em finais de tardes ensolaradas, conforme especificado na Tabela 3. Foram preparadas exsicatas de cada espécime para identificação botânica pelo Dr. Gerth Hatschbach, que não encontrou diferença botânica entre amostras Bu1 e Bu2, e as depositou no Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba sob os números 338987 para os espécimes masculinos e 338985 para os femininos.

Tabela 3 - Coleta das amostras de *B. uncinella* utilizadas para obtenção de óleos essenciais.

AMOSTRA	LOCALIZAÇÃO	DATA DA COLETA
Bu1♀	Km 541, BR-376	23/outubro/2007
Bu1♂	Km 541, BR-376	23/outubro/2007
Bu2♀	Km 547, BR-376	30/julho/2007
Bu2♂	Km 547, BR-376	11/julho/2007

Foram coletadas também amostras da população de plantas de aspecto herbáceo (Bu2) masculino e feminino, crescendo à margem da Rodovia PR-513 (Ponta Grossa - Itaiacoca), no km 13, em altitude de 1070 metros e coordenadas 25°07'56" Sul e 49°59'40" Oeste. Foram preparadas exsicatas desta coleta, feita em junho 2008, para exame cauteloso pelo especialista Dr. Nelson Ivo Matzembacher do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS. As amostras foram igualmente identificadas como *Baccharis uncinella* DC. e registradas sob o mesmo número 188951 no Herbário ICN da UFRGS. Para o preparo das exsicatas, foram coletados ramos contendo folhas e flores dos espécimes masculino e feminino com aproximadamente 30 a 40 cm de comprimento. Em seguida as amostras foram dispostas em folhas de jornal dobradas ao meio, intercaladas com folhas de papelão para facilitar a secagem. O material foi organizado até formar uma pilha, acondicionado entre prensas de madeira e amarrado por barbantes (Figuras 15 e 16), mantidas a uma temperatura de 37 a 40°C por 15 dias (DI STASI *et al.*, 1996).

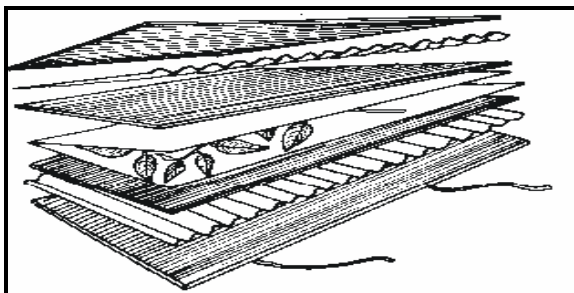


Figura 15 - Amostra em jornal, intercalada com papelão

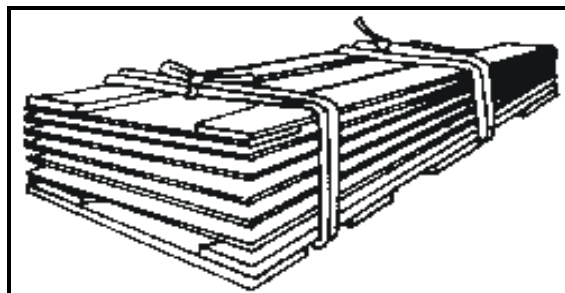


Figura 16 - Amostras colocadas na prensa

4.3 Preparo do material vegetal

Logo após as coletas, os materiais vegetais foram separados em suas partes (capítulos florais e folhas, vide Figuras 17 e 18) para secagem numa superfície plana e lisa forrada com jornal, de maneira a garantir boa circulação de ar, por até sete dias em temperatura ambiente.



Figura 17 – Capítulos florais separados dos ramos.
(Foto de V.C.G. Jasinski, 2007)

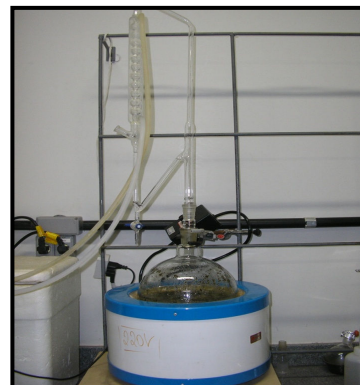


Figura 18 – Folhas separadas dos galhos.
(Foto de V.C.G. Jasinski, 2007)

4.4 Extração dos óleos essenciais

Para a extração dos óleos essenciais por hidrodestilação foi utilizado um aparelho de vidro conforme Stahl & Schild (1981) mostrado na Figura 19. Foram utilizadas folhas secas de cada espécime masculino e feminino, reduzidas a grânulos pequenos em triturador elétrico e colocadas em um balão de fundo redondo de 2 litros de capacidade contendo 1 litro de água destilada. O balão, acoplado ao hidrodestilador, foi aquecido até ebulição, os óleos essenciais foram arrastados pelo vapor de água, condensados no corpo do aparelho e recolhidos em éter etílico. Cada hidrodestilação teve a duração de 4 horas, calculando-se os rendimentos dos óleos essenciais em relação à massa de folhas secas utilizadas, conforme mostrado na Tabela 5 (item 5.2).

Figura 19 – Aparelhagem de vidro utilizado para extração de óleos essenciais (Foto de V.C.G.Jasinski, 2007)



4.5 Extratos purificados contendo substâncias fenólicas

Após as hidrodestilações de cada amostra de folhas, as águas restantes foram filtradas por papel de filtro obtendo-se quatro soluções aquosas límpidas de 100 a 200 mL, procedendo-se as extrações com clorofórmio (3 x 100 mL) e em seguida com acetato de etila (2 a 3 x 100 mL). As frações clorofórmicas de cada partida foram reunidas, secadas com Na_2SO_4 anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotativo a vácuo e reservadas para análise por CCD. As frações fenólicas obtidas com acetato de etila foram reunidas e evaporadas exaustivamente a vácuo em evaporador rotativo e reservadas para análises por CCD e espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . As quantidades obtidas dos extratos clorofórmico e acetato de etila são mostrados na Tabela 4. As análises realizadas por CCD utilizando placas de sílica HF_{254} foram eluídas em sistemas compostos por $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ na proporção 9,0:1,0 para extratos clorofórmicos e por $\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ na proporção 8,0:1,5:0,5 para extratos feitos com AcOEt . Logo após eluição, os cromatogramas foram visualizados sob luz UV (254 e 360 nm) e revelados com solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1) seguido de aquecimento em chapa e numa segunda análise com solução 5% de FeCl_3 em metanol. Os resultados foram arquivados em livro controle e as imagens digitalizadas.

Tabela 4 – Rendimentos das extrações da águas restantes após as hidrodestilação das folhas de *B. uncinella* (Bu1 e Bu2 - ♂ e ♀) *

Espécime/solvente	Folhas (g)	Extrato (g)
Bu1 ♂- CHCl_3	79,48	0,098
Bu1 ♂- AcOEt		0,626
Bu1 ♀- CHCl_3	75,11	0,197
Bu1 ♀- AcOEt		0,353
Bu2 ♂- CHCl_3	51,33	0,306
Bu2 ♂- AcOEt		0,275
Bu2 ♀- CHCl_3	23,44	0,039
Bu2 ♀- AcOEt		0,203

* Estes dados não têm relação quantitativa

4.6 Isolamento de compostos fenólicos

4.6.1 Obtenção do extrato metanólico bruto

O extrato metanólico bruto (EMB) das folhas de *B. uncinella* utilizado nesta pesquisa foi obtido durante a realização de um trabalho anterior em nosso laboratório, conforme a descrição dada a seguir. Uma amostra de 1,05 kg de folhas moídas e secas, coletadas de espécimes masculinos e femininos, foi extraída em aparelho Soxhlet por 30 horas com uso da seguinte seqüência de solventes: CHCl_3 , AcOEt e MeOH. Após a evaporação dos solventes, obteve-se os seguintes extratos e rendimentos: clorofórmico (15,78%), acetato de etila (2,63%) e metanólico (EMB - 14,02%) (ASCARI, 2007).

4.6.2 Cromatografia a vácuo do extrato metanólico purificado

Parte do extrato metanólico bruto (EMB) das folhas secas de *B. uncinella* (20 g) foi suspenso em 600 mL de água destilada aquecida, filtrando-se o precipitado formado (1,8 g). A fase aquosa filtrada permaneceu em repouso por 24 horas, voltando a apresentar turbidez, e foi extraída cinco vezes com 150 mL AcOEt em funil de separação. A forte emulsão formada foi quebrada com uso de NaCl. As fases orgânicas separadas foram reunidas, lavando-se duas vezes com água destilada e evaporando-se em evaporador rotativo a vácuo. O extrato metanólico purificado resultante (EMP, 3,133 g) foi fracionado por repetidas cromatografias a vácuo (Figura 20), como descrito abaixo. O extrato EMP foi dividido em duas amostras de aproximadamente 1,5 g cada. A primeira porção foi cromatografada utilizando-se sistema eluente composto por AcOEt:MeOH:H₂O na proporção 9,0:1,75:0,5. Resultou em cinco frações, reunindo-se as de número 2 e 3 o que resultou em 800 mg. Uma segunda cromatografia foi realizada com a fração reunida, utilizando o mesmo sistema eluente na proporção 9,1:1,50:0,2 e obtendo-se cinco frações idênticas por CCD, não apresentando nenhuma separação dos componentes. A segunda porção de EMP (1,5 g) foi cromatografada em condições de fluxo e volumes similares às utilizadas anteriormente, resultando novamente em cinco frações, reunindo-se as de número 2 e 3 (1,24g); esta fração reunida foi cromatografada novamente com sistema eluente na proporção 9,2:1,25:0,3, obtendo-se sete frações, cuja fração principal apresentou uma massa de 512 mg. Esta fração foi cromatografada com eluente na proporção 9,0:0,8:0,2, obtendo-se de novo sete frações, reunindo-se as de número 4 e 5 (125 mg); foi repetida a purificação da última fração com

sistema eluente na proporção 9,0:1,75:0,5, obtendo-se um composto isolado, que foi codificado como Bu-25 (37,1 mg), conforme mostrado no esquema da Figura 21.



Figura 20 – Materiais utilizados na cromatografia a vácuo (Foto de V.C.G. Jasinski, 2007).

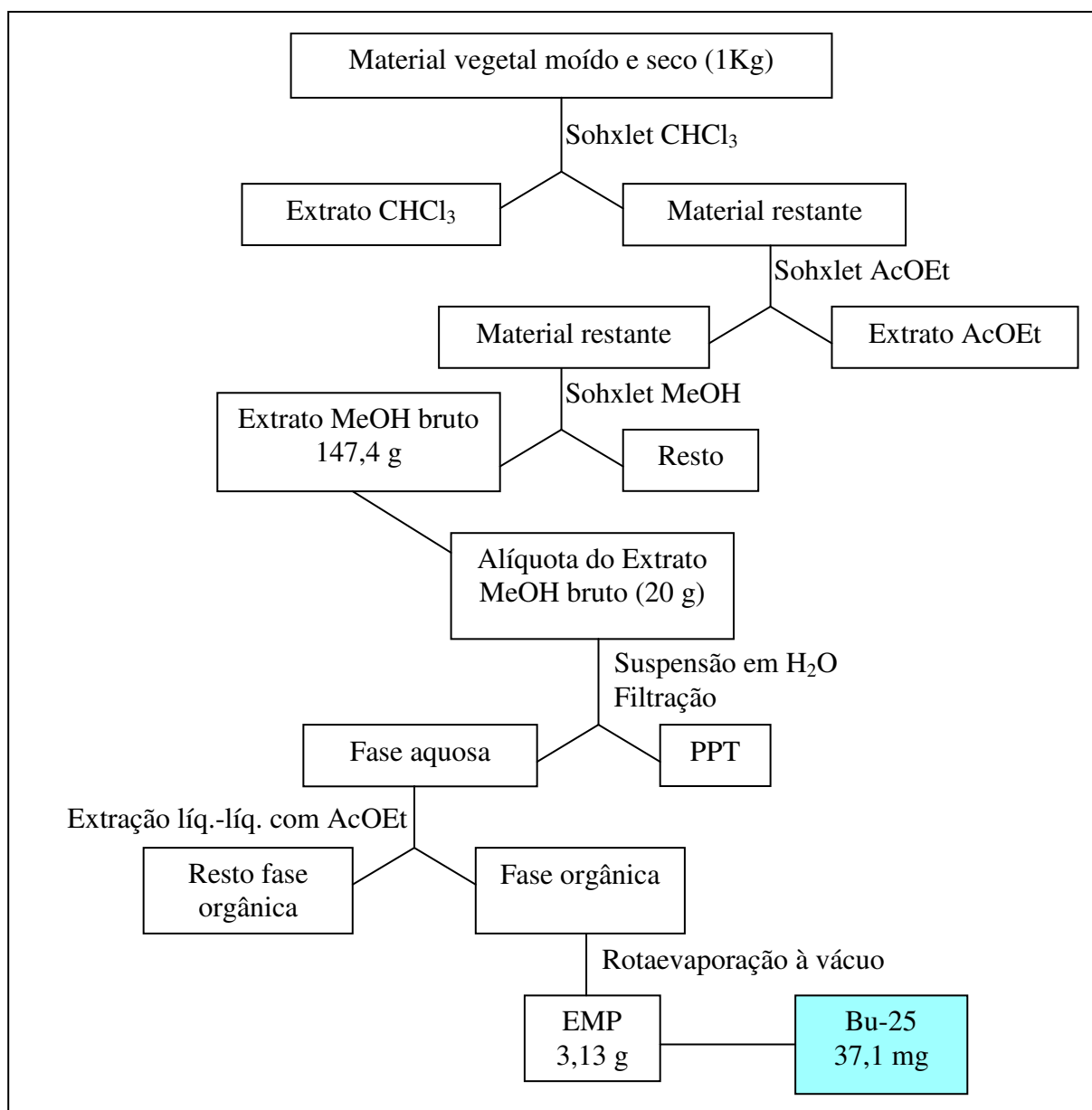


Figura 21 – Fluxograma do isolamento do composto Bu-25

4.6.2.1 Análises da substância Bu-25

As análises de cromatografia em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel HF-254. Uma alíquota de 10 µL do Bu-25 foi aplicada na placa, o tempo de desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 30 min., utilizando o sistema acetato de etila: metanol: água (9,0: 0,8: 0,2 v/v/v), como fase móvel e reveladas para fenóis com solução 5% de FeCl₃ em metanol ou com H₂SO₄/MeOH (1:1) logo após, aquecimento em chapa. Mostrou um componente polar com uma única mancha marrom clara com R_f = 0,33, que também foi analisado em comparação com padrões de ácido caféico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e ácido cinâmico.

A amostra Bu-25 seguiu para análise de RMN ¹H (300 MHz) e ¹³C (75 MHz) utilizando CD₃OD como solvente, os resultados são mostrados na Tabela 6, item 5.3.2.1.

4.6.3 Fracionamento do extrato metanólico em pH básico

O restante do extrato metanólico (127,4 g) foi dissolvido em 450 mL de água destilada em aquecimento brando por 1 hora e com resfriamento durante a noite. A solução aquosa foi centrifugada por 10 min. O precipitado formado foi separado, dissolvido em metanol, concentrado e guardado (PPT1, com 14,65 g). A solução aquosa teve seu volume dobrado e foi resfriada por 72 horas, ocorreu nova centrifugação e o precipitado formado foi separado, dissolvido em metanol, concentrado e guardado (PPT2, com 4,5 g). A solução aquosa foi dividida em duas partes de aproximadamente 450 ml cada (Sol. 1 e Sol. 2). A solução 1 foi extraída com AcOEt por várias vezes (7 × 200mL) e concentrando-se a vácuo. A solução 2 foi deixada na geladeira por 24 horas, decantando-se o precipitado que foi desprezado, a solução foi extraída com AcOEt (7 × 200 mL), que apresentou pH entre 4 – 5, foi basificada até pH 8,0 com 7 gotas de NaOH a 4N, utilizando fitas reativas Merck® para a medida do pH. Os extratos foram reunidos conforme o seu perfil em CCD e concentrados. Obtivemos um extrato principal com 2,62 g (Fração A). A fase aquosa restante foi reservada para os próximos extratos em pH 3,0 (item 4.6.4).

4.6.3.1 Cromatografia em coluna do extrato obtido em pH básico

A pastilha foi preparada com sílica gel 60 (230 - 400 mesh) e o extrato acetato (Fração A) em pH 8,0 (2,62 g), consistindo de 3 partes de sílica gel para cada parte de amostra. A

Fração A foi dissolvida em metanol adicionando-se sílica gel com constante homogeneização e evaporação lenta sobre placa de aquecimento a 60°C, na capela.

No empacotamento da coluna de vidro (52 cm × 4,5 cm) foi usada sílica gel na proporção de 25 partes em relação a quantidade da pastilha, suspensa em 400 ml de clorofórmio. Após o preparo da coluna, foi colocada a pastilha na parte superior (Figura 22). O sistema eluente utilizado consistiu inicialmente de 100% clorofórmio, tendo metanol como gradiente de polaridade, com variação de 1% em 1%, até 7% de metanol. Foram obtidas 132 frações de 100 mL cada, que foram reunidas conforme perfil em CCD (Figuras 23 e 24).

As frações obtidas foram analisadas por CCD em placas de sílica gel HF 254 Merck® como fase estacionária e diversos eluentes constituídos por CHCl₃:MeOH ou AcOEt:MeOH:H₂O, em várias proporções. As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV), em ondas curtas (254 nm) e longas (360 nm). Os reveladores utilizados foram solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl₃) a 5% para compostos fenólicos cujas manchas apresentaram-se coradas de marrom e solução metanólica de ácido sulfúrico (1:1) com aquecimento a 100°C para substâncias orgânicas em geral.

As subfrações que apresentaram perfil cromatográfico semelhante na CCD foram reunidas. A partir da fração 86 isolou-se uma substância cristalina (Bu-86, 14 mg); no grupo de frações 71-73 cristalizou-se uma substância (Bu-71, 38,2 mg), e do grupo de frações 90-94 foi isolado o composto Bu-90 (8mg), todos eluídos da coluna na proporção de 9:1 (v/v) de CHCl₃:MeOH (Figura 24, página 50).

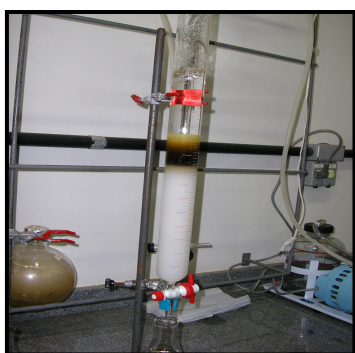


Figura 22 – Início da cromatografia em coluna
(Foto de V.C.G. Jasinski, 2008)



Figura 23 – Eluição da coluna cromatográfica
(Foto de V.C.G. Jasinski, 2008)

4.6.3.1.1 Análises das substâncias Bu-71, Bu-86 e Bu-90

As análises em CCD foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel HF-254. Alíquotas de 10 µL de cada amostra foram aplicadas nas placas, usando-se o sistema

CHCl_3 :MeOH (9,0:1,0 v/v) como fase móvel e reveladas com solução 5% de FeCl_3 em metanol ou com H_2SO_4 /MeOH (1:1) seguida de aquecimento em chapa.

As análises por cromatografia em camada delgada mostraram manchas amareladas de cada composto polar isolado: o composto Bu-71 apresentou $R_f = 0,64$, para Bu-86 o $R_f = 0,43$ e Bu-90 o $R_f = 0,33$, foram analisados em comparação com quercetina padrão que apresentou o mesmo R_f de Bu-90. Foram obtidos os espectros de UV em MeOH, repetindo-se as medidas após a adição de reagentes para diagnóstico de deslocamento (AcONa , H_3BO_3 , AlCl_3 , HCl):

UV-VIS de Bu-71: $\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH): 268, 296 sh e 336 nm;

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + NaOAc): 275, 336 nm

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + NaOAc + H_3BO_3): 275, 336 nm

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + AlCl_3): 268, 371 nm

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + AlCl_3 + HCl): 268, 371 nm

UV-VIS de Bu-86: $\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH): 253, 267, 291 sh, 346 nm;

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + NaOAc): 258, 346 nm

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + NaOAc + H_3BO_3): 258, 362 nm

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + AlCl_3): 253, 381 nm

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + AlCl_3 + HCl): 253, 364 nm

UV-VIS de Bu-90: $\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH): 254, 267 sh, 301 sh, 357 nm;

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + NaOAc): 259, 357 nm

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + NaOAc + H_3BO_3): 259, 379 nm

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + AlCl_3): 266, 397 nm

$\lambda_{\text{máx}}$. (MeOH + AlCl_3 + HCl): 266, 387 nm

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em CD_3OD (Bu-71), CDCl_3 (Bu-86) e $\text{DMSO}-d_6$ (Bu-90) e são apresentados nos itens: 5.3.3.1 na Tabela 7 para Bu-71, 5.3.3.2 na Tabela 8 e 5.3.3.3 na Tabela 9, respectivamente.

4.6.4 Cromatografias em coluna do extrato obtido em pH ácido

A fase aquosa restante após a última extração em pH 8,0 (item 4.6.3.1) foi rebaixada a pH 3,0 com gotas de HCl concentrado e extraído-se com AcOEt sucessivas vezes (10 x 200 mL). O extrato acetato (Fração B - 5,10 g) foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica gel 60 (230 – 400 mesh) utilizando como fase móvel o sistema AcOEt :MeOH: H_2O (8:2:0,5, v/v/v). Dessa coluna principal foram recolhidas 38 frações de 20 mL, reunindo-se as cinco principais e resultando em 3,42 g. Esta fração reunida foi fracionada novamente em

coluna de sílica gel 60 e empacotada com AcOEt:MeOH (8:2, v/v) e eluída num sistema AcOEt:MeOH:H₂O (8:2:0,5, v/v/v). Desta forma foram obtidas 70 frações, que foram reunidas conforme perfil cromatográfico semelhante na CCD. A fração 41-50 apresentou uma substância principal codificada de Bu-41 (25 mg), conforme esquema da Figura 24.

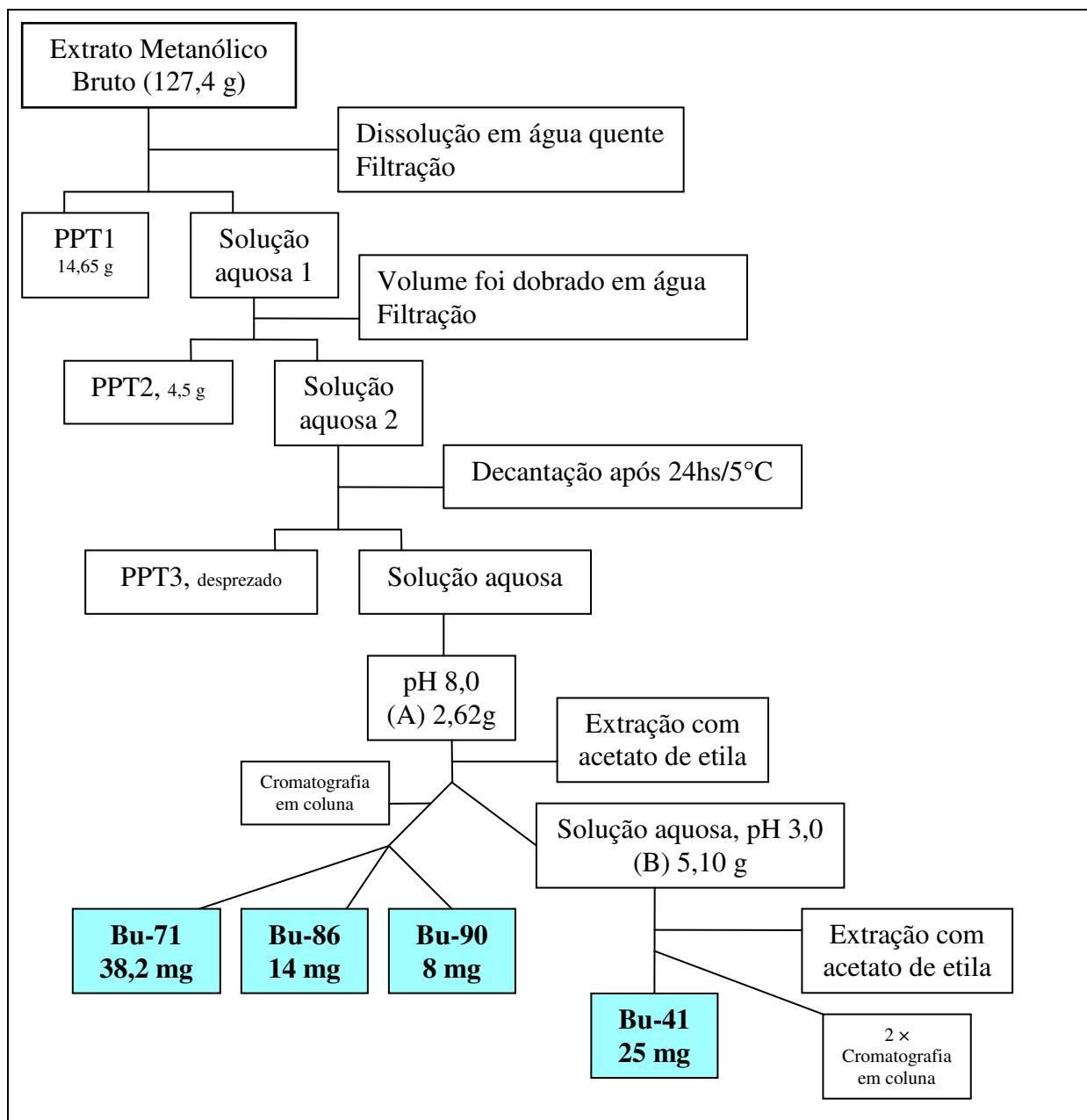


Figura 24 – Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico

4.6.4.1 Análises da substância Bu-41

As análises por CCD foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel HF-254. Alíquotas de 10 µL do Bu-41 foram aplicadas nas placas, tempo de desenvolvimento de 30 min. Utilizando acetato de etila/metanol/água (9,0:1,0:0,5 v/v/v) como fase móvel, revelando-se com solução 5% de FeCl₃ em metanol ou borrifando-se com H₂SO₄/MeOH (1:1) seguido de aquecimento em chapa.

As análises mostraram um componente polar em uma única mancha marrom clara com R_f = 0,30, que foi analisado em comparação com padrões de ácido caféico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico e ácido cinâmico. A amostra Bu-41 seguiu para análise de RMN ¹H e ¹³C em CD₃OD e os valores são apresentados na Tabela 10 da página 72.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação botânica de *Baccharis uncinella*

As plantas de *B. uncinella* utilizadas neste trabalho foram observadas e coletadas em 2007. A primeira coleta ocorreu em populações de plantas com porte herbáceo e com abundante floração em junho a julho, sendo codificada como Bu2 (Figura 25). A segunda colheita realizou-se em população de plantas com aspecto arbustivo e floração de outubro a novembro e recebeu o código Bu1 (Figura 26).

Diante dos diferentes aspectos fenológicos e hábitos observados entre populações de Bu1 e Bu2, propusemos a existência de uma variedade (Bu2) com floração em época distinta e porte diferente. Estes aspectos diferem das plantas comumente encontradas em todo sul do Brasil (Bu1).

No entanto, as amostras foram analisadas por dois especialistas botânicos distintos, os quais emitiram parecer de que ambas as populações Bu1 e Bu2 são idênticas entre si, com base na morfologia das flores.



Figura 25 – *B. uncinella* de porte herbáceo (Bu2), Foto de D.S.Nunes, 2007



Figura 26 – *B. uncinella* arbustiva (Bu1), Foto de D.S.Nunes, 2007

5.2 Análise dos óleos essenciais de *Baccharis uncinella* DC

Foi tomado o cuidado de separar muito bem as folhas, isolando-as das flores e galhos finos, para utilizar apenas folhas de espécimes masculinos e femininos separados, para extração dos óleos essenciais. Os resultados apresentados neste trabalho são os primeiros a serem publicados comparando as composições de voláteis extraídos de espécimes masculinos e femininos de *B. uncinella*.

As coletas de materiais vegetais das duas populações de plantas foram feitas procurando dar toda atenção aos fatores que provavelmente são responsáveis por diferenças

acentuadas nas composições dos óleos essenciais em geral. Estes fatores, no caso de espécies de *Baccharis*, são principalmente referentes ao local de coleta, como por exemplo, as influências devidas a diferentes solos, e ao horário de coleta, especialmente devidas a diferentes intensidades de luz.

As análises dos óleos essenciais de folhas secas de *B. uncinella* foram realizadas por técnicas de Cromatografia Gasosa utilizando-se detectores de massa e de ionização de chama, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.

Os rendimentos de três das quatro amostras foram acima de 0,3%, sendo observado que na amostra de Bu2 masculina apresentou um rendimento de apenas 0,15%, para o que não encontramos uma explicação razoável, mas os rendimentos dos óleos essenciais de *B. uncinella* encontrados na literatura estão entre 0,20 – 0,34% (FRIZZO, 2001; AGOSTINI, 2005; FRIZZO, 2008).

A análise das quatro amostras de óleo essencial obtidas resultou na identificação de 43 compostos, que correspondem de 94,17% a 99,25% do conteúdo total dos óleos, tendo a grande maioria dos compostos já sido identificados em óleos de *B. uncinella*. Os componentes encontrados em maiores proporções nas amostras aparecem em negrito na Tabela 5.

As composições dos óleos essenciais obtidos de espécimes masculino e feminino se mostram semelhantes entre si e muito semelhantes aos resultados obtidos anteriormente por Ascari e colaboradores (2009). Os monoterpenos aparecem em baixas proporções nas quatro amostras coletadas, perfazendo apenas 1,24% da composição do óleo de Bu1 ♂, 2,1% em Bu2 ♀, 3,37% em Bu1 ♀ e 4,64% em Bu2 ♂, com α -terpineol como único monoterpeno presente nas quatro amostras (Tabela 5).

Os sesquiterpenos hidrocarbonetos variaram entre 18,91% a 22,9% , destacando-se a presença de β -cariofileno para Bu1 (♂ 10,03 - ♀ 7,64%) e Bu2 (♂ 6,06 - ♀ 7,96%). Os sesquiterpenos oxigenados constituem as frações majoritárias dos óleos essenciais de ambas as populações Bu1 (♂ 76,27 - ♀ 73,45%) e Bu2 (♂ 66,99 - ♀ 73,16%), apresentando espatulenol [Bu1 (♂ 28,99 - ♀ 29,68%)], [Bu2 (♂ 24,30 - ♀ 16,94%)] e cariofileno óxido [Bu1 (♂ 12,98 - ♀ 14,24%)], [Bu2 (♂ 9,75 - ♀ 23,52%)] como principais componentes, sendo ainda identificados outros dois em porcentagens menores: carotol [Bu1 (♂ 2,91 - ♀ 2,63%)], [Bu2 (♂ 4,94 - ♀ 5,68%)] e α -cadinol [Bu1 (♂ 4,12 - ♀ 2,63%)], [Bu2 (♂ 5,87 - ♀ 6,82%)].

Tabela 5 – Resultados das análises por CG-EM dos óleos essenciais de espécimes masculinos (♂) e femininos (♀) de duas populações de *Baccharis uncinella* DC. (Bu1 e Bu2).

Componentes	Bu1 ♂ 0,33%	Bu1 ♀ 0,30%	Bu2 ♂ 0,15%	Bu2 ♀ 0,34%	IK
limoneno	t	1,00	-	-	1032
linalool	-	-	0,65	0,40	1098
<i>trans</i> -pinocarveol	-	-	1,40	0,40	1137
terpinen-4-ol	0,60	1,55	0,36	t	1178
α -terpineol	0,64	0,82	2,23	1,30	1194
ciclosativeno	-	0,70	0,58	0,44	1369
α -copaeno	-	0,56	0,42	-	1376
β -maaliene	-	-	1,34	0,75	1380
β -elemeno	0,67	0,42	-	-	1390
α -gurjuneno	-	0,53	-	-	1413
β-cariofileno	10,03	7,64	6,06	7,96	1418
α -humuleno	1,76	1,25	3,75	2,72	1456
γ -muuroleno	0,61	-	0,95	0,32	1477
germacreno D	2,03	1,26	2,16	1,23	1482
viridifloreno	1,59	1,88	1,30	0,77	1483
α -selineno	1,22	0,87	1,52	0,54	1488
α -muuroleno	0,60	-	0,50	0,19	1493
γ -cadineno	-	4,61	0,65	0,39	1507
δ -cadineno	1,54	0,92	1,96	1,11	1512
α -cadineno	1,09	0,90	1,03	1,57	1541
α -calacoreno	0,60	0,57	0,68	0,92	1547
(<i>E</i>)-nerolidol	3,10	6,49	0,46	0,58	1566
espatulenol	28,99	29,68	24,30	16,94	1576
ledeno óxido (II)	2,19	-	1,92	0,37	1577
cariofileno óxido	12,98	14,24	9,75	23,52	1584
viridiflorol	4,06	3,20	2,08	0,54	1590
eudesmol	1,45	0,88	0,71	0,70	1596
carotol	2,91	2,63	4,94	5,68	1599
β -oplophenone	1,25	0,94	1,85	1,52	1609
1,10- <i>di-epi</i> -cubenol	1,03	1,46	1,01	0,93	1621
1- <i>epi</i> -cubenol	1,94	1,65	1,83	1,52	1625
não identificado	1,00	0,82	0,87	1,43	1628
γ -eudesmol	2,31	1,84	2,77	2,50	1633
α -muurolol	0,91	0,80	0,98	1,01	1641
α-cadinol	4,12	2,63	5,87	6,82	1653
não identificado	0,93	0,72	0,73	0,46	1655
α -eudesmol	1,40	1,14	2,54	4,13	1665
não identificado	0,72	0,98	-	-	1667
não identificado	1,61	0,82	1,57	1,64	1677
acorenone	1,44	1,11	1,26	1,67	1685
<i>Z,Z</i> -farnesol	0,72	0,78	0,64	0,66	1712
<i>E,E</i> -farnesol	1,21	0,64	0,91	0,54	1722
Hidrocarbonetos monoterpênicos	t	1,00%	-	-	
Monoterpenos oxigenados	1,24%	2,37%	4,64%	2,1%	
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos	21,74%	22,11%	22,9%	18,91%	
Sesquiterpenos oxigenados	76,27%	73,45%	66,99%	73,16%	
Total	99,25%	98,93%	94,53%	94,17%	

Os óleos essenciais de folhas de *B. uncinella* coletadas no Rio Grande do Sul, no sudoeste do Paraná e em Campos do Jordão apresentaram em geral, elevada variação nas proporções de monoterpênicos em comparação com os óleos dos Campos Gerais, para os quais

foram sempre observadas baixas proporções de monoterpenos. Considerando-se os compostos minoritários das quatro amostras da nossa região, observam-se diferenças que podem estar relacionadas a fatores ambientais como o tipo de solo e a causas gerais como o estágio de desenvolvimento da planta ou condições ambientais (item 2.6). Para melhor compreender estas pequenas variações dos metabólitos secundários seria necessária a realização de trabalhos com elevado número de análises, de modo a obterem-se dados estatisticamente significantes para cada região estudada.

Os resultados aqui apresentados confirmam as identificações botânicas – baseadas na morfologia das flores, sendo mais uma indicação de que os sistemas metabólicos dos espécimes coletados das populações Bu1 e Bu2 são muito semelhantes, pelo menos no que diz respeito aos terpenos voláteis.

5.3 Constituintes fenólicos de *B. uncinella*

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram feitas diversas abordagens de purificação e fracionamento, estudando-se o comportamento dos compostos presentes nos vários extratos e observando as diferenças entre várias rotas de isolamento de substâncias fenólicas.

Um dos métodos considerados foi o aproveitamento das fases aquosas restantes após as hidrodestilações, extraindo-as inicialmente com clorofórmio para eliminar possíveis traços de compostos sesquiterpenos e resinas terpênicas, e em seguida com acetato de etila. Como resultado, foram obtidos extratos contendo principalmente compostos fenólicos polares, especialmente ácidos clorogênicos, e baixas proporções de flavonóides e de terpenos. Estes extratos não chegaram a ser fracionados, mas o método de purificação foi acompanhado por análises de CCD e RMN de ^1H e ^{13}C (item 5.3.1).

Em outra rota para os compostos fenólicos, as folhas foram extraídas exaustivamente em Soxhlet com CHCl_3 , AcOEt e MeOH em sequência. O extrato metanólico foi suspenso em água, eliminando-se os precipitados formados e extraindo-se com AcOEt. O extrato obtido mostrou conter compostos fenólicos variados, principalmente os cafeoilderivados do ácido quínico acompanhados por flavonóides em menor proporção. O extrato foi submetido a experimentos de fracionamento por cromatografias a vácuo (item 5.3.2).

Ainda, considerando que os ácidos clorogênicos apresentam o grupamento COOH livre, que facilmente reage com soluções levemente alcalinas, foi tentada uma melhoria na rota para os compostos fenólicos pela obtenção de extratos AcOEt em pH básico e ácido.

Assim, o extrato obtido em pH 8,0 continha principalmente flavonóides, enquanto que o extrato obtido em pH 3,0 continha os cafeoilderivados do ácido quínico (item 5.3.3 e 5.3.4).

5.3.1 Extratos contendo compostos fenólicos polares

As soluções aquosas restantes da hidrodestilação das folhas de *B. uncinella* (Bu1 e Bu2, para ambas as colheitas) dos espécimes masculinos e femininos, foram extraídas inicialmente com CHCl_3 . Estes extratos apresentaram aspecto resinoso e de cor marrom-alaranjado e as análises por CCD revelaram que não continham substâncias fenólicas. As fases aquosas foram extraídas em seguida com AcOEt, formando-se extratos destituídos de corantes, que se apresentaram com aspecto de uma espuma seca esbranquiçada após a evaporação a vácuo.

As análises por CCD mostraram que todos os quatro extratos AcOEt continham cinco compostos fenólicos: dois compostos polares como principais constituintes e outros três menos polares em menores proporções. Além disto, a revelação das placas analíticas com $\text{H}_2\text{SO}_4\text{:MeOH}$ seguida de aquecimento sobre chapa indicou que os extratos continham baixas proporções de terpenos. Já com as simples análises por CCD ficou comprovada a grande semelhança entre os quatro extratos, indicando mais uma vez que as populações de plantas Bu1 e Bu2 são formadas por uma só espécie vegetal.

As Figuras 27 e 28 apresentam os espectros de RMN de ^{13}C dos extratos obtidos com acetato de etila a partir de folhas de espécimes masculinos de Bu1 e de espécimes femininos de Bu2. Os espectros foram obtidos com tempo curto de acumulação, aparecendo praticamente só os sinais devidos aos carbonos dos dois principais compostos fenólicos observados antes por CCD. Duas carbonilas de grupamentos ácido carboxílico são vistas em 177,3 e 176,8 ppm, correspondentes a duas unidades de ácido quínico.

Os sinais devidos a carbonos sp^2 são observados acima de 110 ppm, sendo facilmente atribuídos a unidades do grupo cafeoíla. Os 18 sinais de carbonos entre 114,7 e 168,9 ppm podem ser atribuídos a dois grupos cafeoíla, mas não seria possível assegurar quantos destes grupos estão presentes nos principais compostos da amostra, considerando estes picos. Já os sinais que aparecem nas faixas de 35 a 40 ppm e de 68 a 76 ppm, podem ser atribuídos a carbonos sp^3 de esqueletos carbônicos de porções de ácido quínico ligados a grupos cafeoíla (BASNET *et al.*, 1996; CHOI *et al.*, 2004; TATEFUGI *et al.*, 1996).

Uma análise dos sinais de carbonos sp^3 referidos acima, mostrou que eles são em número de doze, indicando tratar-se de duas unidades de ácido quínico, sendo registrados em

76,06 ppm, 75,75 ppm, 74,71 ppm, 72,56 ppm, 72,11 ppm, 70,64 ppm, 69,35 ppm, 68,99 ppm, 39,36 ppm 38,41, 36,01 ppm e 30,77 ppm. Estes dados estão a indicar que os dois principais compostos fenólicos da amostra (CCD) são dois cafeoil derivados do ácido quínico como mostra nas Figuras 29 e 30.

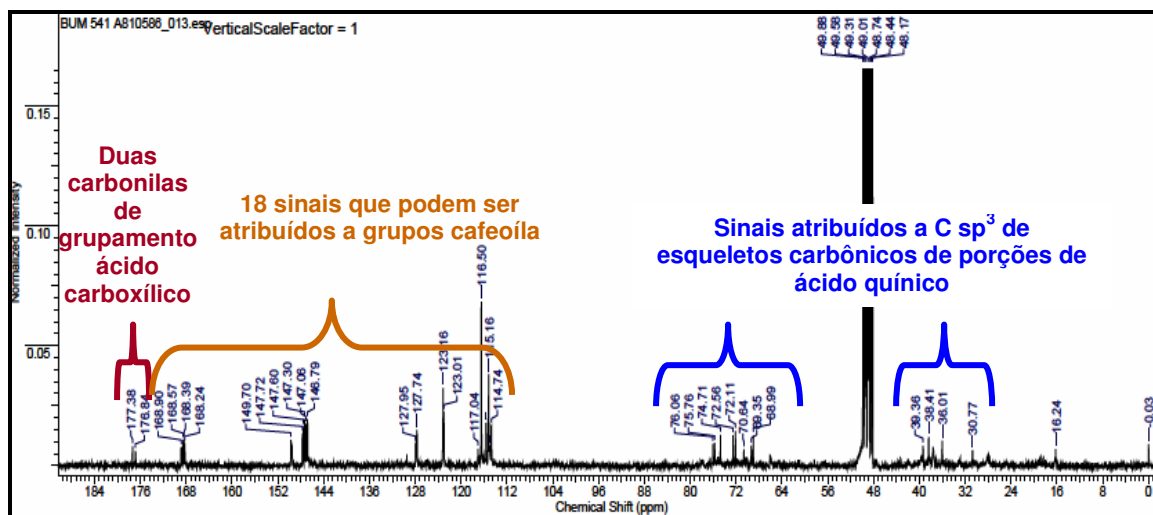


Figura 27 – Espectro de RMN ^{13}C do extrato AcOEt Bu1 ♂ ($\text{CD}_3\text{OD}/75\text{ MHz}$).

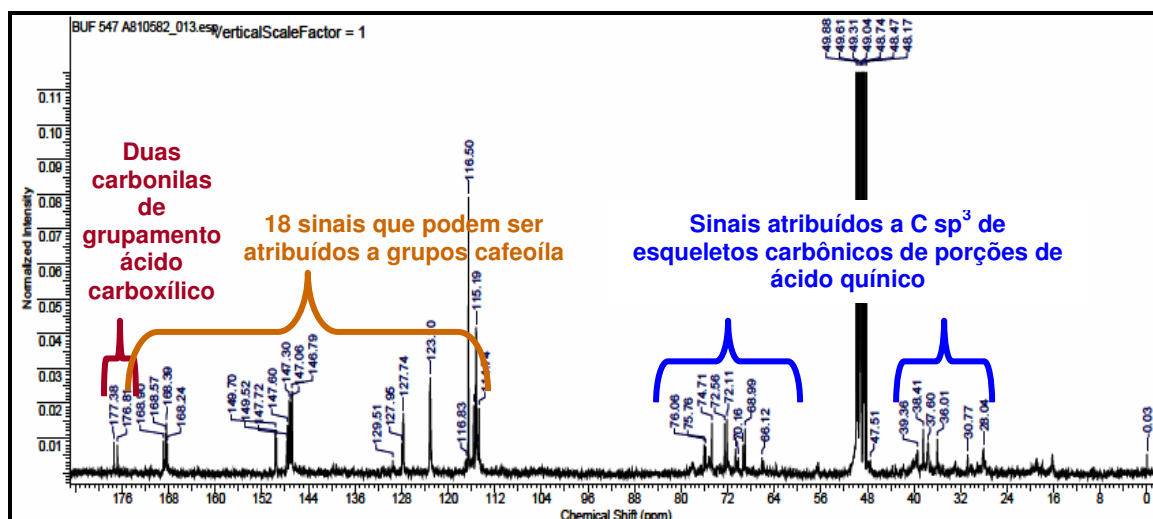


Figura 28 – Espectro de RMN ^{13}C do extrato AcOEt Bu2 ♀ ($\text{CD}_3\text{OD}/75\text{ MHz}$).

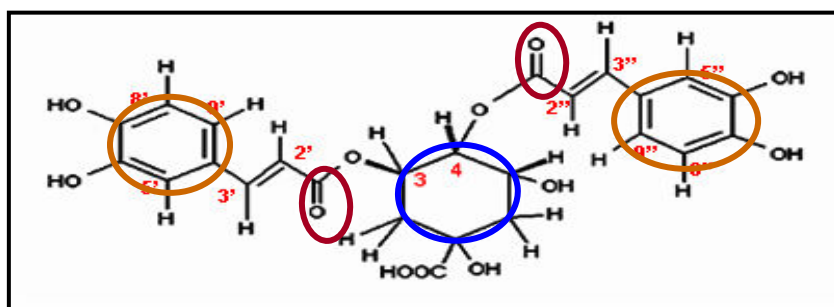


Figura 29 – Ácido 3,4-O-[E]-dicafeoilquínico, espectro de ^{13}C nas Fig. 27 e 28.

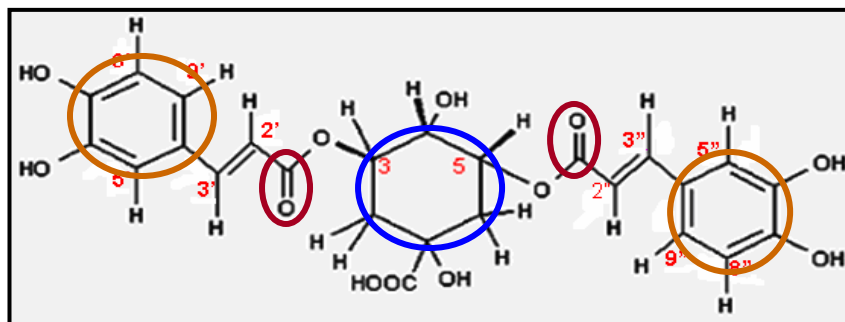


Figura 30 – Ácido 3,5-O-[E]-dicafeoilquínico, espectro de ^{13}C nas Fig. 27 e 28.

Foi feita então uma análise comparativa com dados publicados de RMN de ^{13}C dos chamados ácidos clorogênicos (BASNET *et al.*, 1996; CHOI; CHOI; LEE, 2004; TATEFUGI *et al.*, 1996); conforme Tabela 6 no item 5.3.2.1 e Tabela 10 no item 5.3.4.1), que indicou mais conclusivamente, que os dois principais compostos fenólicos dos extratos AcOEt são misturas dos ácidos 3,4-O-dicafeoilquínico (Figura 29) e 3,5-O-dicafeoilquínico (Figura 30).

Foram também obtidos os espectros de RMN de ^1H de todos os extratos AcOEt de Bu1 ♂ e Bu2 ♀, os quais mostraram-se muito semelhantes entre si. Para ilustrar, é mostrado na Figura 31 o espectro de RMN ^1H de um dos extratos AcOEt correlacionado com a estrutura dos dois cafeoil derivados do ácido quínico mostrados nas Figuras 32 e 33. Uma proporção relativamente baixa de terpenóides presentes na mistura aparece principalmente entre δ 0,7 a 1,7 na forma de multipletos muito complexos. Entre δ 6,1 a δ 7,7 estão todos os sinais devidos a hidrogênios ligados a carbonos sp^2 , que pertencem a grupos cafeoíla, e os sinais entre δ 2,1 - 2,5, δ 3,5 - 4,5 e multipletos em δ 4,40 e δ 5,70, pertencem aos hidrogênios ligados a carbonos sp^3 de porções de ácido quínico (BASNET *et al.*, 1996; CHOI *et al.*, 2004; TATEFUGI *et al.*, 1996).

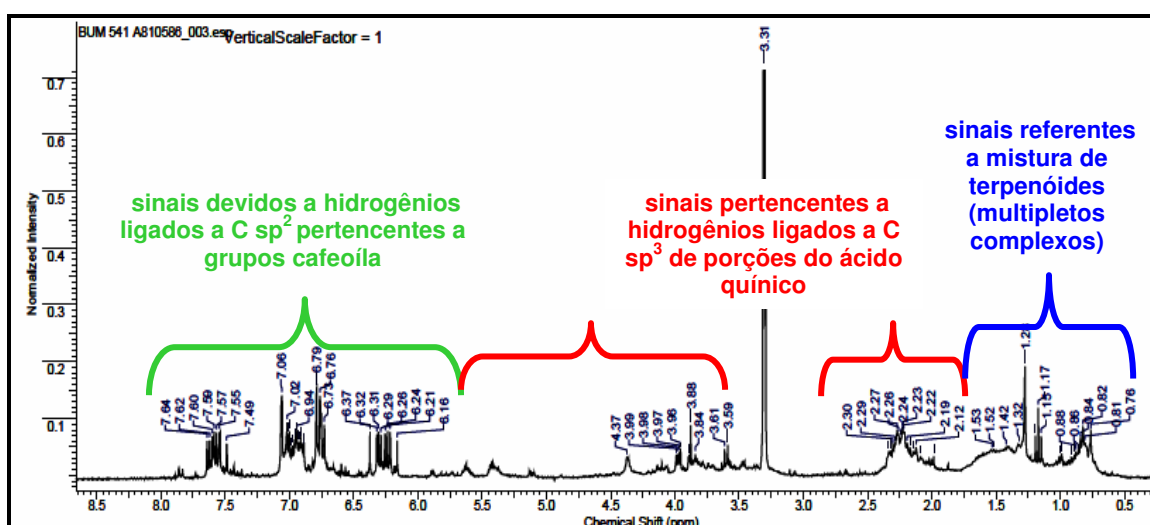


Figura 31 – Espectro de RMN ^1H do extrato AcOEt Bu1 ♂ ($\text{CD}_3\text{OD}/300\text{ MHz}$).

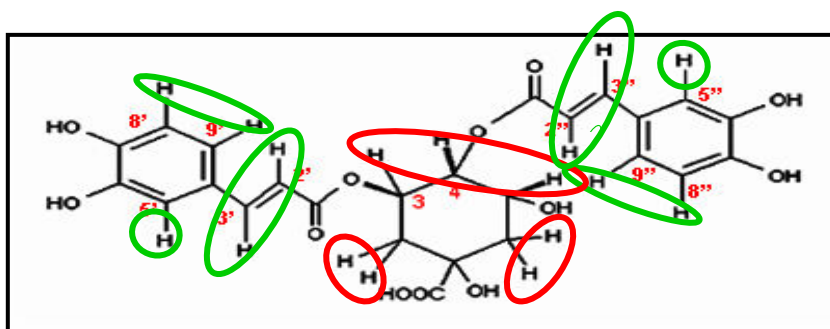


Figura 32 – Ácido 3,4-O-[E]-dicafeoilquínico, espectro de ^1H na Fig. 31.

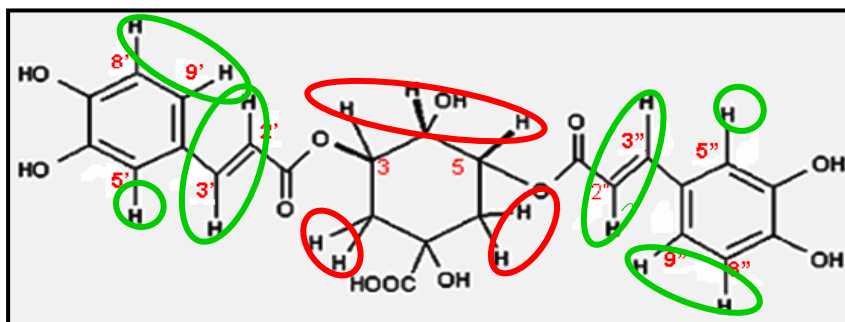


Figura 33 – Ácido 3,5-O-[E]-dicafeoilquínico, espectro de ^1H na Fig. 31.

5.3.2 Extrato contendo compostos fenólicos de várias polaridades

O uso da sequência de solventes de polaridades crescentes clorofórmio, acetato de etila e metanol na extração direta a partir de folhas tem por objetivo obter extratos contendo grupos de substâncias de polaridades crescentes, embora não se possa ter certeza de que isto ocorrerá nas condições empregadas. Não há como prever, devendo-se realizar experimentos de extração e análise para poder estabelecer o método adequado de extração e purificação, visando o isolamento.

No caso das folhas de *B. uncinella*, o extrato clorofórmico apresenta bom rendimento (15,78%) e retém uma alta proporção de corantes e resinas, além de terpenóides de baixa e média polaridade.

O acetato de etila, pela sua capacidade de aceitar ligações de hidrogênio, é um ótimo solvente para substâncias fenólicas e poderia permitir a obtenção de extratos com altos rendimentos, contendo compostos de polaridade média a alta.

Neste estudo das folhas de *B. uncinella*, apenas baixas proporções de substâncias fenólicas foram encontradas nos extratos feitos com acetato de etila, logo após o extrato clorofórmico na sequência de solventes. Já o extrato metanólico, o mais polar da sequência, apresentou a maior parte das substâncias fenólicas, mas acompanhadas por altas proporções de açúcares livres e outras substâncias polares não aromáticas que não foram identificadas.

As análises por CCD indicaram que o referido extrato metanólico deveria passar por algum processo de purificação antes de ser fracionado para o isolamento de compostos fenólicos polares. A eliminação dos precipitados formados na solução aquosa do extrato metanólico permitiu diminuir a quantidade de resinas terpênicas, mas o extrato obtido com acetato de etila por extrações líquido-líquido continha grupos de compostos fenólicos dotados de polaridades bastante diferentes (flavonóides e ácidos clorogênicos).

Mesmo assim, foram feitas várias tentativas de isolamento a partir da fração fenólica, utilizando a cromatografia a vácuo, que é um método de baixo custo, que gasta quantidades reduzidas de sílica gel e de solventes, e assim também expõe o operador a um risco menor de acidentes, do que os métodos cromatográficos tradicionais. Nos primeiros fracionamentos, foi possível perceber a eliminação dos flavonóides pela diminuição da coloração das frações, até a obtenção de uma pequena fração contendo a substância Bu-25.

5.3.2.1 Identificação de Bu-25

A substância Bu-25 apresentou coloração marrom quando os cromatogramas foram revelados com solução H₂SO₄/Metanol (1:1) seguido de aquecimento em chapa.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 34) apresentou duas unidades cafeoíla como mostraram os sinais para hidrogênios olefínicos em relação de acoplamento *trans* em δ_H 6,27 e 7,57 (d, $J=16,0$ Hz, H-2' e H-3') e em δ_H 6,35 e 7,61 (d, $J=16,0$ Hz, H-2'' e H-3''). Os sinais de prótons aromáticos são vistos como dupletos em δ_H 6,77 e 6,80 ($J=8,5$ Hz, H-8' e H-8'') e em δ_H 6,97 e 6,95 ($J=8,0$ Hz, H-9' e H-9'') e singletos largos em δ_H 7,07 e 7,07 (H-5' e H-5''). Além destes sinais foram observados a presença de três hidrogênios metínicos em δ_H 5,42 (m, H-3 e H-5), δ_H 3,98 (dd, $J=7,5$ e $3,0$ Hz, H-4) e de sinais compreendidos na faixa de δ_H 2,16-2,33 ppm, característicos de hidrogênios metilênicos (Figura 35).

A confirmação dos grupos cafeoíla e do esqueleto do ácido quínico foi feito com base nos espectros de RMN de ¹³C (Figura 36), especialmente, pelos sinais para dois grupos carbonilas das unidades cafeoíla em δ_C 168,9 e 168,4, do grupo carboxila em δ_C 177,5, de dois carbonos metilênicos em δ_C 37,8 (C-2) e δ_C 36,1 (C-6); de um carbono quaternário em δ_C 74,8 (C-1) e três carbonos metínicos em δ_C 70,7 (C-3), δ_C 72,6 (C-4) e δ_C 72,1 (C-5). As posições dos grupos cafeoíla foram determinadas com base nos valores de deslocamentos químicos para H-3, H-4 e H-5 e comparação desses com o possível isômero 3,5-dicafeoilquínico com dados publicados como mostra na Figura 37 (CHEMINAT *et al.*, 1988; TATEFUGI *et al.*, 1996; BASNET *et al.*, 1996; PAULI; POETSCH; NAHSTEDT, 1998; LIN; KUO; CHOU,

1999; KWON *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2004; SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005) e estão descritos na Tabela 6.

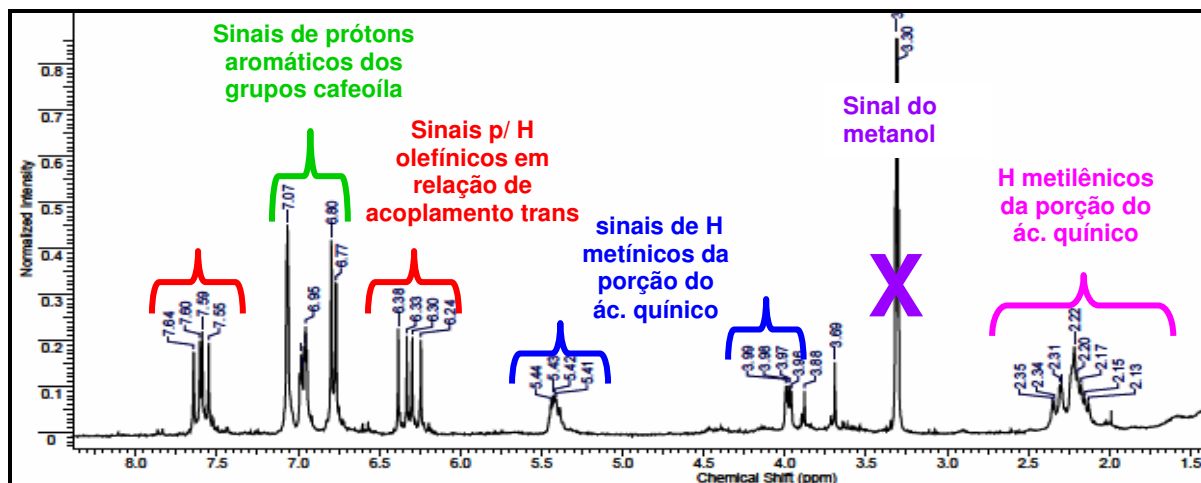


Figura 34 – Espectro de RMN de ^1H do composto Bu-25 (CD_3OD /300 MHz).

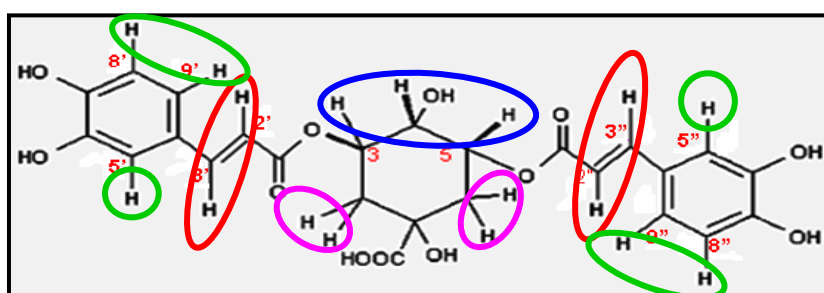


Figura 35 – Ácido 3,5-O-[E]-dicafeoilquínico, espectro de ^1H na Fig. 34.

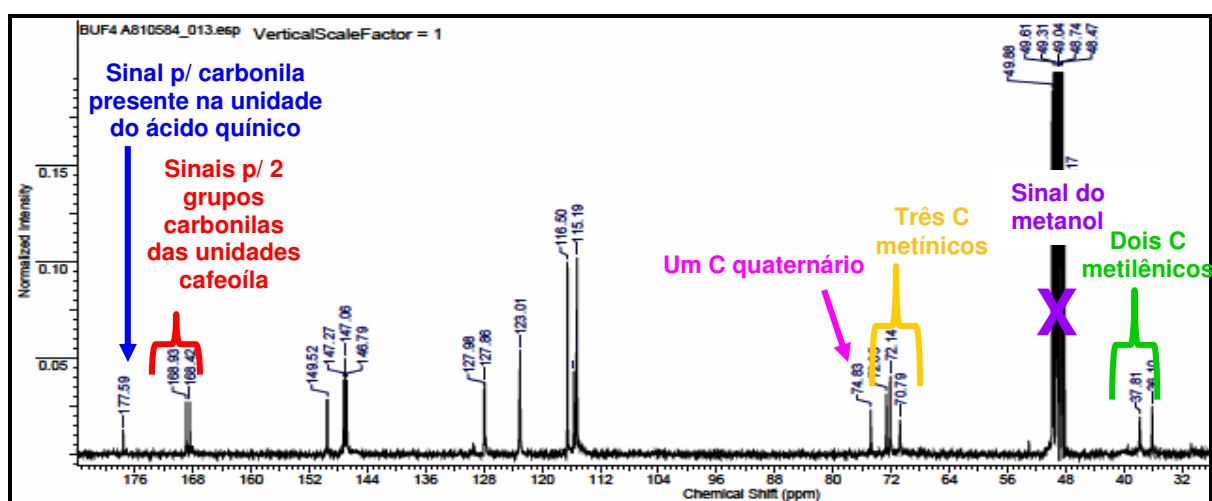


Figura 36 – Espectro de RMN ^{13}C do composto Bu-25 (CD_3OD /75 MHz).

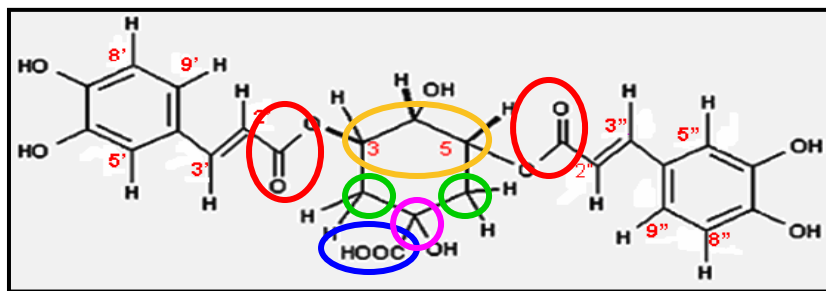


Figura 37 – Ácido 3,5-O-[E]-dicafeoilquínico, espectro de ^{13}C na Fig. 36.

Tabela 6 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto Bu-25 (CD_3OD) comparados com os da literatura para o ácido 3,5-O-[E]-dicafeoilquínico (BASNET *et al.*, 1996; CHOI *et al.*, 2004).

Posição	RMN ^1H (ppm)			RMN ^{13}C (ppm)		
	BASNET <i>et al.</i> , 1996	CHOI <i>et al.</i> , 2004	Bu-25	BASNET <i>et al.</i> , 1996	CHOI <i>et al.</i> , 2004	Bu-25
1	-	-	-	76,33 s	75,6	74,8
2	2,18 m	H_{ax} 2,11 br d, 12,5Hz H_{eq} 1,87 m	2,24 m	40,18 t	37,0	37,8
3	5,47 td, 9,0 e 7,0Hz	5,39 br dd, 6,5 e 3,5Hz	5,42 m	72,78 d	73,7	70,7
4	3,94 dd, 9,0e 3,5Hz	3,41 dd, 9,9 e 2,8Hz	3,98 dd, 7,50 e 3,0Hz	73,02 d	71,8	72,1
5	5,41 dt, 4,5e 3,5Hz	5,49 dd, 9,9 e 4,5Hz	5,42 m	74,33 d	72,2	72,6
6	H_{ax} 2,30dd, 15,0 e 4,0Hz; H_{eq} 2,12dd, 15,0 e 5,5Hz	1,90 m	H_{ax} 2,33 dd, 13,5 e 4,0Hz; H_{eq} 2,16 m	37,66 t	40,3	36,1
1'	-	-	-	169,47 s	167,1	168,4
2'	6,28 d, 16,0Hz	6,24 d, 15,5Hz	6,27 d, 16,0Hz	116,10 d	117,2	115,3
3'	7,58 d, 16,0Hz	7,47 d, 15,5Hz	7,57 d, 16,0Hz	147,83 d	145,7	147,0
4'	-	-	-	128,58 s	126,7	127,8
5'	7,08 d, 1,8Hz	7,06 s	7,07 br s	115,92 d	115,9	115,1
6'	-	-	-	147,46 s	146,9	147,2
7'	-	-	-	150,26 s	149,6	149,5
8'	6,77 d, 8,0Hz	6,76 d, 8,0Hz	6,77 d, 8,5Hz	117,23 d	116,4	116,5
9'	6,96 br d, 8,0Hz	6,96 d, 8,0Hz	6,97 d, 8,0Hz	123,75 d	122,5	123,0
1''	-	-	-	169,93 s	167,3	168,9
2''	6,38 d, 16,0Hz	6,22 d, 15,5Hz	6,35 d, 16,0Hz	116,59 d	116,9	115,6
3''	7,61 d, 16,0Hz	7,46 d, 15,5Hz	7,61 d, 16,0Hz	147,68 d	145,5	146,7
4''	-	-	-	128,76 s	126,6	127,9
5''	7,06 d, 1,8Hz	7,05 s	7,07 br s	115,92 d	115,6	115,1
6''	-	-	-	147,46 s	146,8	147,2
7''	-	-	-	150,13 s	149,4	149,5
8''	6,78 d, 8,0Hz	6,76 d, 8,0Hz	6,80 d, 8,5Hz	117,23 d	116,2	116,5
9''	6,95 br d, 8,0Hz	6,96 d, 8,0Hz	6,95 d, 8,0Hz	123,75 d	122,1	123,0
COOH	-	-	-	180,37 s	178,8	177,59

De acordo com as análises espectroscópicas apresentadas, por comparação com dados da literatura, o composto Bu-25 foi identificado como ácido 3,5-O-[*E*]-dicafeoilquínico (Figura 38).

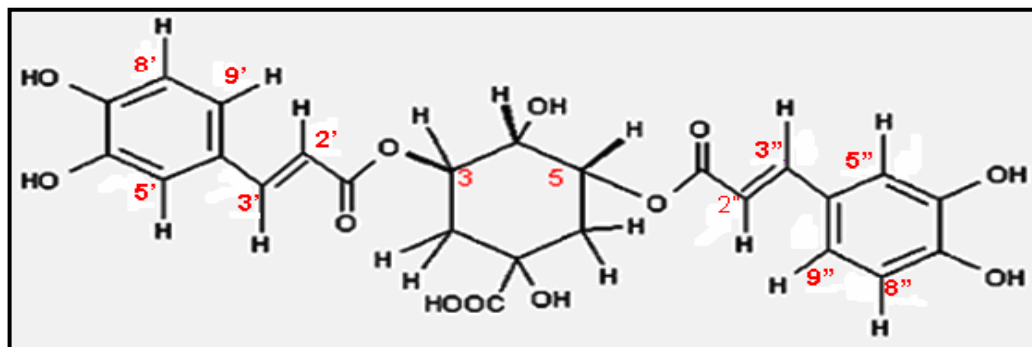


Figura 38 – Estrutura de Bu-25 (ácido 3,5-O-[*E*]-dicafeoilquínico)

5.3.3 Extrato obtido com acetato de etila em meio básico

A formação dos íons carboxilato na solução aquosa em pH 8 impediu a extração das substâncias ácidas pelo solvente acetato de etila, levando a uma fase orgânica apenas dos flavonóides. Esse extrato foi submetido a uma coluna cromatográfica sob condições já descritas no item 4.6.3.1 da página 48, que permitiu o isolamento de três flavonóides: Bu-71, Bu-86 e Bu-90.

5.3.3.1. Identificação de Bu-71

O composto Bu-71 apresentou espectro UV em MeOH, típico de uma flavona, com absorções em $\lambda_{\text{máx.}}$ 268, 296sh, 336nm (Figura 39), sendo registrados também novos espectros após a adição de vários reagentes (MARKHAM, 1982). O deslocamento batocrômico ($\Delta\lambda = 7$ nm) da banda II (entre 250-280 nm) observado após adição de NaOAc indica a presença de uma hidroxila na posição C-7, no anel A. A repetição da medida após adição de H_3BO_3 indicou que a estrutura não possui um sistema *orto*-diidroxilado, por não haver deslocamento batocrômico da banda I (entre 310-350 nm).

O espectro varrido em presença de AlCl_3 mostrou deslocamento batocrômico da banda I de 35 nm em relação à medida feita em metanol. Isto se deve à formação de um complexo entre a hidroxila da posição C-5 e a carbonila da posição C-4, ou também à complexação do AlCl_3 com duas hidroxilas em posição *orto*. Com a adição de HCl à cela não foi observada

nenhuma alteração, indicando ausência de sistema *orto*-diidroxila e confirmando a existência de uma hidroxila em C-5.

Assim, por estas análises de absorções no ultra-violeta, a estrutura de Bu-71 é a de uma flavona com grupos hidroxila em C-5, C-7, não apresentando sistema *orto*-diidroxila.

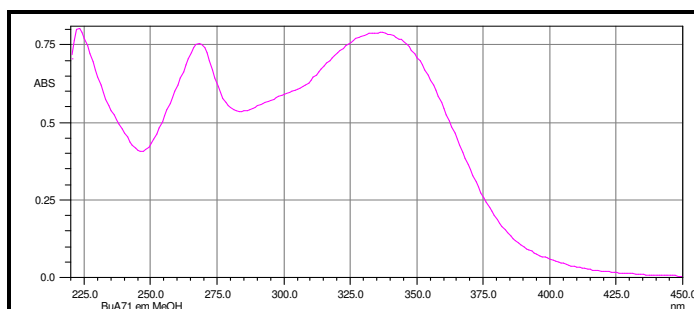


Figura 39 – Espectro de UV-VIS do composto Bu-71

A região do espectro de RMN de ^1H para Bu-71 (Figura 40), apresentou sinais entre 6,00 e 8,00 ppm, corresponde às absorções de hidrogênios dos anéis aromáticos, apresentando dupletos em 7,85 ppm ($J=8,7$ Hz) e 6,93 ppm ($J=8,7\text{Hz}$), com integração para dois hidrogênios cada um, indicando substituição por oxigênio na posição *para* do anel B. As constantes de acoplamento observadas (8,7 Hz) indicam uma relação *orto* entre esses hidrogênios. Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios (H-2' e H-6' em 7,85 ppm; H-3' e H-5' em 6,93 ppm), característicos de um anel aromático substituído na posição 4'.

Como previsto pelo espectro de UV, o anel A deve conter somente os hidrogênios ligados aos carbonos C-6 e C-8, observados como dupletos em 6,20 ppm (H-6, $J=2,1$ Hz) e 6,45 ppm (H-8, $J=2,1\text{Hz}$). A pequena constante de acoplamento observada confirma que o acoplamento entre esses hidrogênios *meta*, mostrando tratar-se de um flavonóide 5,7-diidroxilado. Foi observado também um singlete em 6,59 ppm que indica um hidrogênio que não possui acoplamento com outro hidrogênio, atribuído ao H-3 da flavona (Figura 41). Os sinais foram comparados com os dados publicados por Harborne (1996), como mostra na Tabela 7.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 42), apresentou 13 sinais referentes aos carbonos da flavona e foi comparado com dados publicados por Agrawal (1989). O sinal em 184,0 ppm refere-se à carbonila α,β -insaturada (C4) e o sinal característico do carbono C-3 em 103,9 ppm, indica substituição por um oxigênio (Tabela 7).

Para o anel B, devido a sua simetria, apenas quatro sinais, são observados. Isto devido o fato dos carbonos das posições 3' e 5' (117,1 ppm) e os carbonos das posições 2' e 6' (128,7 ppm) apresentarem equivalência em deslocamento químico (Figura 43).

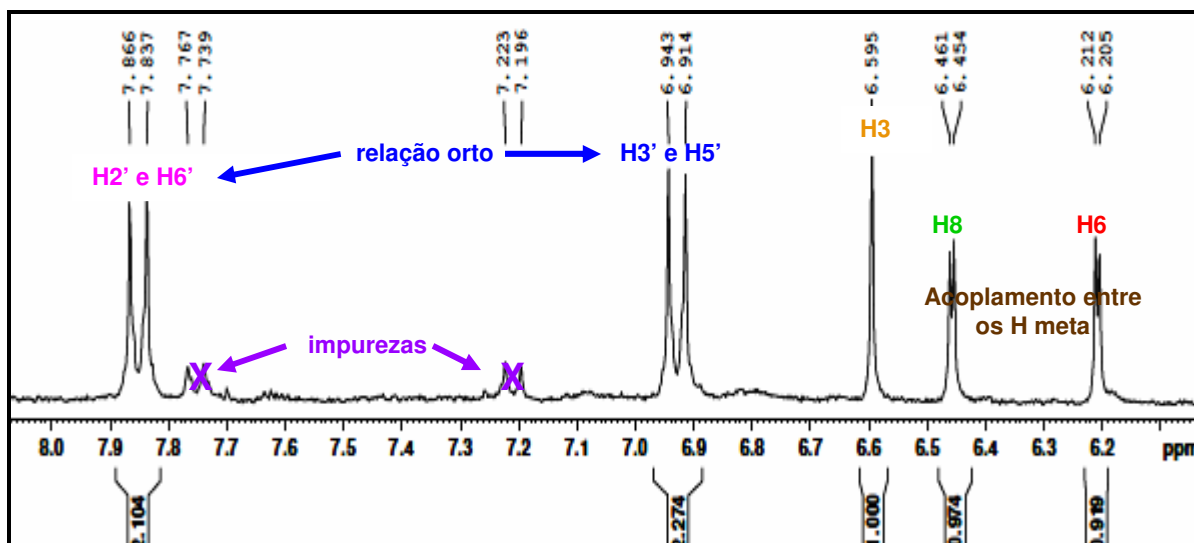


Figura 40 – Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-71 ($\text{CD}_3\text{OD}/300\text{ MHz}$).

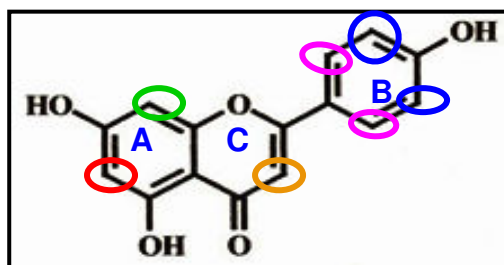


Figura 41 – Estrutura de Bu-71 (apigenina), espectro de ^1H na Fig. 40.

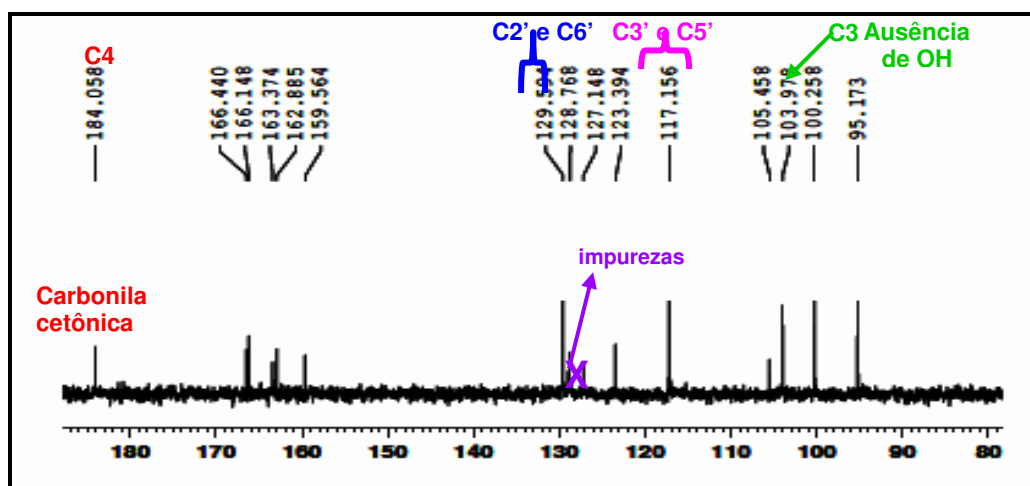


Figura 42 – Espectro expandido de RMN de ^{13}C do composto Bu-71 ($\text{CD}_3\text{OD}/75\text{ MHz}$).

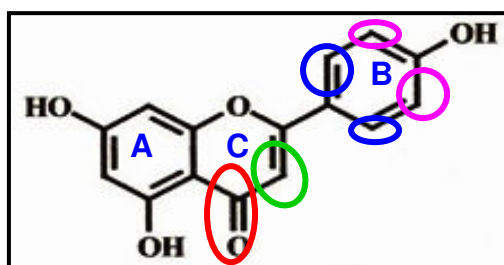


Figura 43 – Estrutura de Bu-71 (apigenina), espectro de ^{13}C na Fig. 42.

Pelos dados acima apresentados, confirma-se para Bu-71 a estrutura 5,7,4'-triidroxiflavona, também conhecida como apigenina (Figura 44). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a molécula, comparados com dados obtidos da literatura, listados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores de deslocamentos químicos para o composto Bu-71 comparados com a literatura (HARBORNE, 1996; AGRAWAL *et al.*, 1989).

Posição	RMN ^1H (δ)		RMN ^{13}C (ppm)	
	(HARBORNE, 1996)	Bu-71	(AGRAWAL <i>et al.</i> , 1989)	Bu-71
2	-	-	164,0	166,4
3	6,77 s	6,59 s	102,6	103,1
4	-	-	181,9	184,0
5	-	-	155,8	159,5
6	6,27 d , 1,8Hz	6,20 d , 2,1Hz	98,9	99,3
7	-	-	162,5	166,1
8	6,47 d , 1,8Hz	6,45 d , 2,1Hz	94,8	95,1
9	-	-	160,6	162,8
10	-	-	104,2	105,4
1'	-	-	121,8	123,3
2'	8,03 d , 8,7Hz	7,85 d , 8,7Hz	128,5	128,6
3'	6,90 d , 8,7Hz	6,93 d , 8,7Hz	116,0	116,0
4'	-	-	160,9	163,3
5'	6,90 d , 8,7Hz	6,93 d , 8,7Hz	116,0	117,1
6'	8,03 d , 8,7Hz	7,85 d , 8,7Hz	128,5	129,5

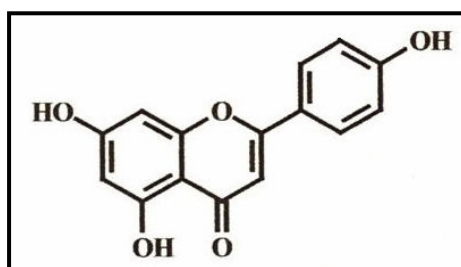


Figura 44 – Estrutura de Bu-71 (apigenina)

5.3.3.2 Identificação de Bu-86

O composto Bu-86 apresentou espectro UV em MeOH, típico de uma flavona, com absorções em $\lambda_{\text{máx}}$. 253, 267, 291 sh , 346 nm (Figura 45), sendo registrados também novos espectros após a adição de vários reagentes (MARKHAM, 1982).

O deslocamento batocrômico ($\Delta\lambda = 5$ nm) da banda II (entre $\lambda = 250$ -280 nm) observado após adição de NaOAc indica a presença de uma hidroxila na posição C-7, no anel A. A repetição da medida após adição de H_3BO_3 indicou que a estrutura possui um sistema *orto*-diidroxilado no anel B, por haver deslocamento batocrômico da banda I (entre $\lambda = 310$ -350 nm).

O espectro varrido em presença de AlCl_3 mostrou deslocamento batocrômico da banda I de 35 nm em relação à medida feita em metanol. Isto se deve à formação de um complexo entre a hidroxila da posição C-5 e a carbonila da posição C-4 e também à complexação do AlCl_3 com duas hidroxilas em posição *orto*.

Com a adição de HCl à cela foi observada um pequeno deslocamento hipsocrômico da banda I, indicando a existência de sistema *orto*-diidroxil menos estável e confirmando a existência de uma hidroxila em C-5.

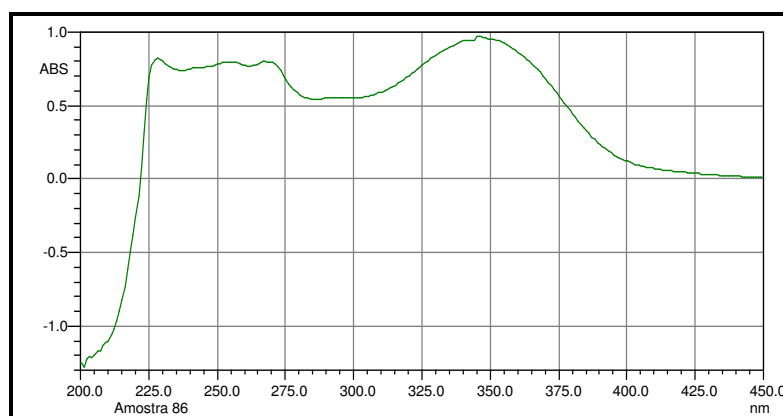


Figura 45 – Espectro de UV-VIS do composto Bu-86

Por estas análises de absorções no ultra-violeta, a estrutura de Bu-86 é de uma flavona com grupos hidroxila em C-5, C-7, apresentando sistema *orto*-diidroxil em C-3' e C-4'.

O espectro de RMN ^1H para Bu-86, realizado em CD_3OD (Figura 46), apresentou sinais compatíveis com a estrutura de uma flavona. Com base nesse espectro foi possível sugerir que se trata da flavona luteolina (5,7,3',4'-tetraidroxiflavona).

A região entre 6,00 e 7,50 ppm, corresponde aos hidrogênios dos anéis aromáticos, apresentando sinais sobrepostos em 7,37 ppm ($J=2,1$ Hz) e 7,39 ppm ($J=2,1$ e 9,0 Hz), com integração para um hidrogênio cada um e duplete em 6,90 ppm ($J=9,0$ Hz) com integração para um hidrogênio, indicando substituição por oxigênios na posição *orto*-diidroxil do anel B. Estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios (H-2' em 7,37 ppm; H-6' em 7,39 ppm e H-5' em 6,90 ppm), característicos de uma anel aromático *orto*-diidroxil substituído na posição 3' e 4'. Para o anel A foram observados singletos largos em 6,20 ppm (H-6, $J=2,1$ Hz) e 6,43 ppm (H-8, $J=2,1$ Hz).

A pequena constante de acoplamento observada confirma o acoplamento entre esses hidrogênios meta, mostrando tratar-se de um flavonóide 5,7-diidroxilado. Observou-se também um singlete em 6,54 ppm que indica um hidrogênio que não possui acoplamento com outro hidrogênio, indicando o H-3 da flavona (Figura 47).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 48) apresentou 15 sinais referentes aos carbonos da flavona e foi comparado com os dados publicados por Agrawal e colaboradores (1989). O sinal em 184,0 ppm refere-se à carbonila α - β insaturada (C-4) e o sinal em 104,0 ppm (C-3) indica presença de oxigênio. Para o anel B, são observados sinais característicos de um grupo catecol em 147,1 ppm e 151,1 ppm. Estes sinais foram atribuídos aos carbonos C-3' e C-4' respectivamente (Figura 49).

Portanto, a partir dos dados acima apresentados, confirma-se para Bu-86 a estrutura (5,7,3',4'-tetraidroxiflavona), chamada de luteolina (Figura 50). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C para a molécula, comparados com dados obtidos da literatura, estão listados na Tabela 8.

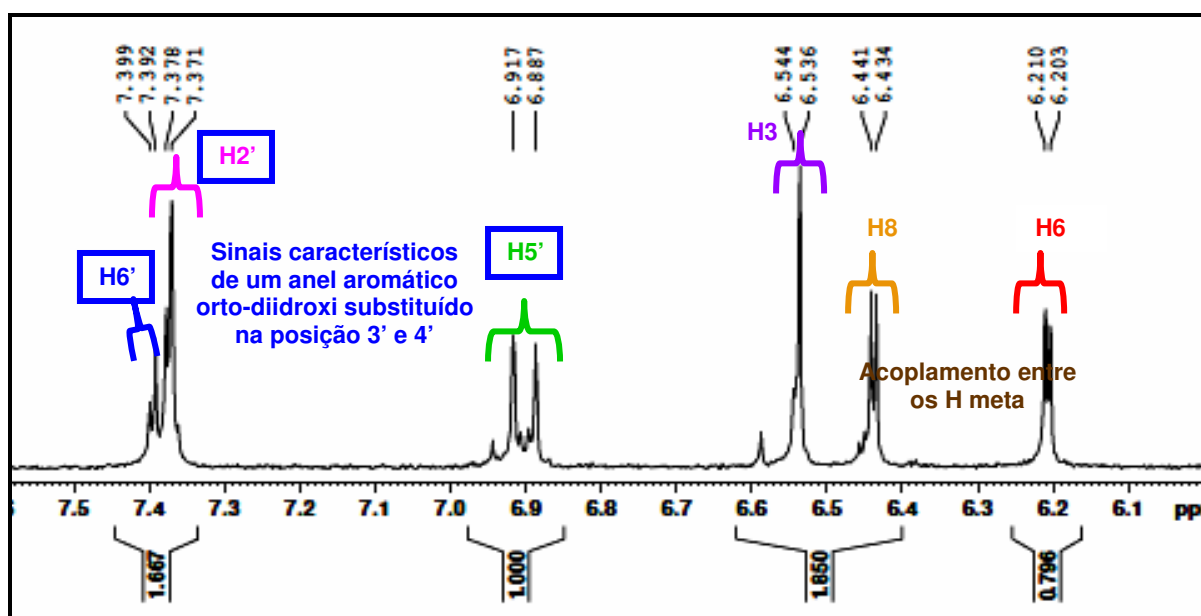


Figura 46 – Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-86 (CD_3OD /300 MHz).

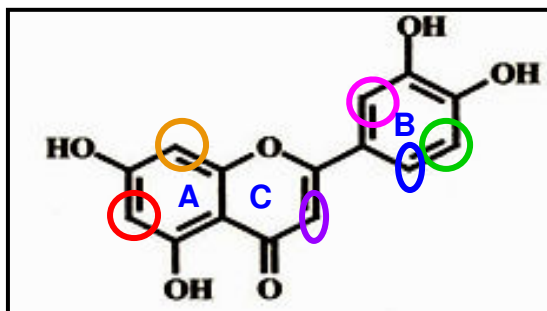


Figura 47 – Estrutura de Bu-86 (luteolina), espectro de ^1H na Fig. 46.

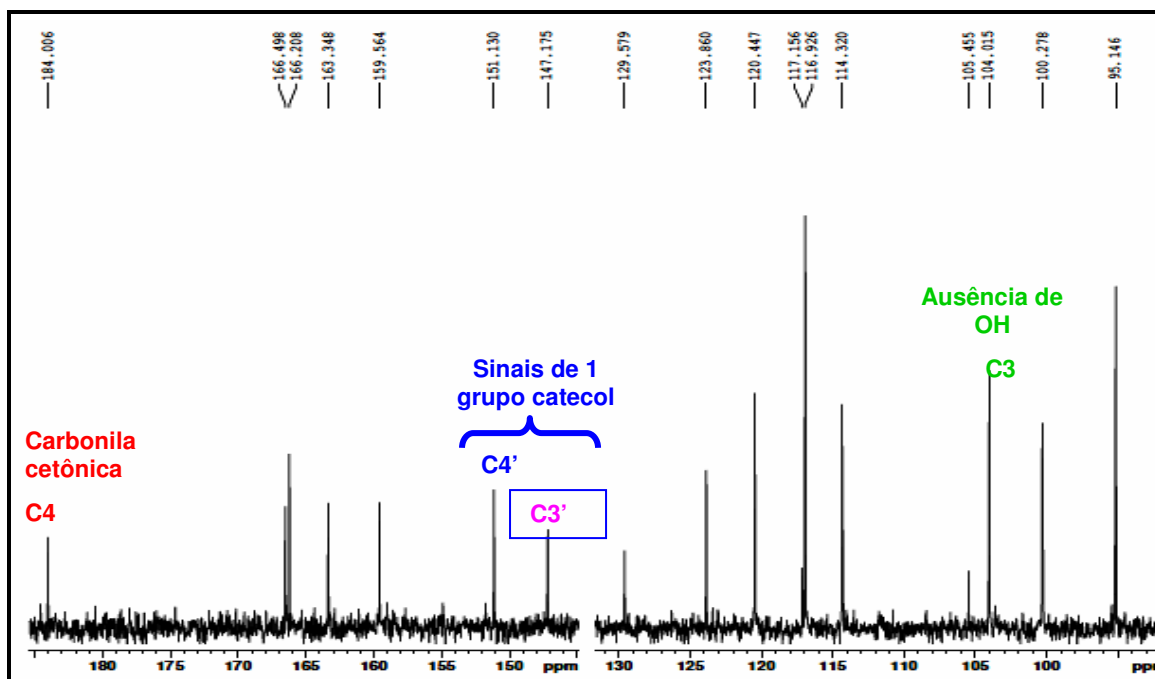


Figura 48 – Espectro expandido de RMN de ^{13}C do composto Bu-86 ($\text{CDCl}_3/75\text{ MHz}$).

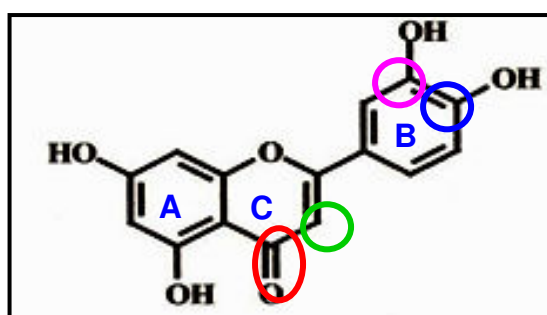


Figura 49 – Estrutura de Bu-86 (luteolina), espectro de ^{13}C na Fig. 48.

Tabela 8 - Valores de deslocamentos químicos para o composto Bu-86 comparados com a literatura (HARBORNE, 1996; AGRAWAL *et al.*, 1989).

Posição	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	HARBORNE, 1996	Bu-86	AGRAWAL <i>et al.</i> , 1989	Bu-86
2	-	-	164,50	166,49
3	6,69 s	6,54 s	103,30	104,01
4	-	-	182,20	184,0
5	-	-	161,0	159,56
6	6,22 d , 2,0Hz	6,20 sl , 2,1Hz	99,20	100,27
7	-	-	164,70	166,20
8	6,47 d , 2,0Hz	6,43 sl , 2,1Hz	94,20	95,14
9	-	-	161,4	163,34
10	-	-	104,20	105,45
1'	-	-	119,30	120,44
2'	7,43 d , 2,0Hz	7,37 d , 2,1Hz	113,80	114,32
3'	-	-	146,20	147,17
4'	-	-	150,10	151,13
5'	6,92 d , 9,0Hz	6,90 d , 9,0Hz	116,40	116,92
6'	7,44 dd , 2,0 e 9,0Hz	7,39 dd , 2,1 e 9,0Hz	122,10	123,86

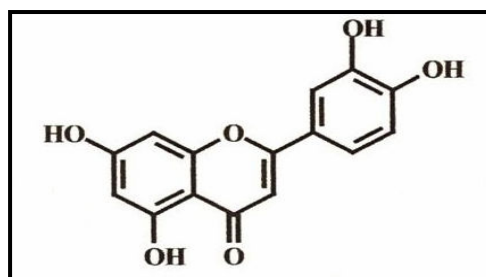


Figura 50 – Estrutura de Bu-86 (luteolina)

5.3.3.3 Identificação de Bu-90

O composto Bu-90 apresentou espectro UV em MeOH, típico de um flavonol, com absorção em $\lambda_{\text{máx.}}$ 254 e 357 nm (Figura 51), sendo registrados novos espectros com a adição de vários reagentes (MARKHAM, 1982). O deslocamento batocrômico ($\Delta\lambda = 5$ nm) da banda II (entre 250-280 nm) observado após adição de AcONa indica a presença de uma hidroxila na posição C-7, no anel A. A repetição da medida após adição de H_3BO_3 indicou que a estrutura possui um sistema *orto*-diidroxilado, por haver deslocamento batocrômico da banda I (entre 350-385 nm).

O espectro obtido em presença de AlCl_3 mostrou deslocamento batocrômico da banda I de 35 nm em relação à medida feita em metanol. Isto se deve à formação de um complexo entre a hidroxila da posição C-5 e a carbonila da posição C-4, ou também à complexação do AlCl_3 com duas hidroxilas em posição *orto*. Com a adição de HCl à cela foi observada uma alteração, indicando presença de sistema *orto*-diidroxí e confirmando a existência de uma hidroxila em C-5. Assim, por estas análises de absorções no ultra-violeta, a estrutura de Bu-90 é a de uma flavonóide com grupos hidroxila em C-5, C-7, C-3 e apresentando sistema *orto*-diidroxí em C-3' e C-4'.

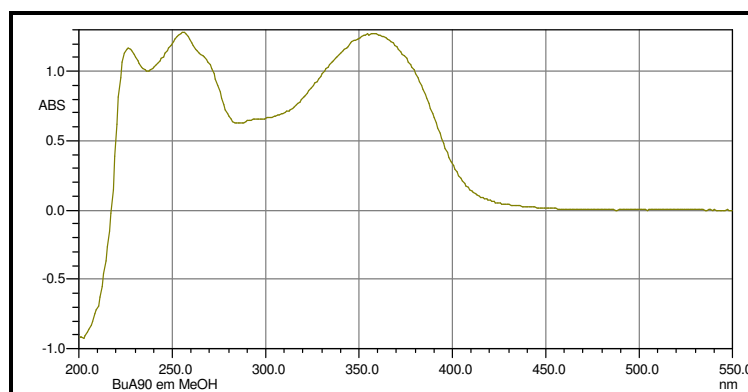


Figura 51 – Espectro de UV-VIS do composto Bu-90

O espectro de RMN de ^1H para Bu-90, realizado em $\text{DMSO-}d_6$ (Figura 52) mostrou sinais compatíveis com a estrutura de um flavonóide. Com base nesse espectro foi possível sugerir que se trata do flavonóide quercetina (3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavonol).

A região entre 6,00 e 8,00 ppm, corresponde aos hidrogênios dos anéis aromáticos, apresentando dupletos em 7,67 ppm ($J=2,1$ Hz) e 6,88 ppm ($J=8,6$ Hz), com integração para um hidrogênio cada um, indicando substituição por oxigênio na posição catecol. Observando-se sinais de sistema AB para o anel A com dupletos em $\delta 6,42$ ($J=1,7$ Hz, H-8) e $\delta 6,18$ ($J=2,0$ Hz, H-6) e sinais característicos de sistema ABC para o anel B com duplo duplete em $\delta 7,53$ ($J=8,8$ Hz, $J=2,0$ Hz, H-6) e dupletos em $\delta 6,88$ ($J=7,6$ Hz, H-5') e em $\delta 7,67$ ($J=2,1$ Hz, H-2'). O espectro de RMN de ^1H (300 MHz), apresentou um sinal em $\delta 12,48$ (s) de OH quelada e 5 sinais na região de deslocamento de hidrogênios em anéis aromáticos (Figura 53).

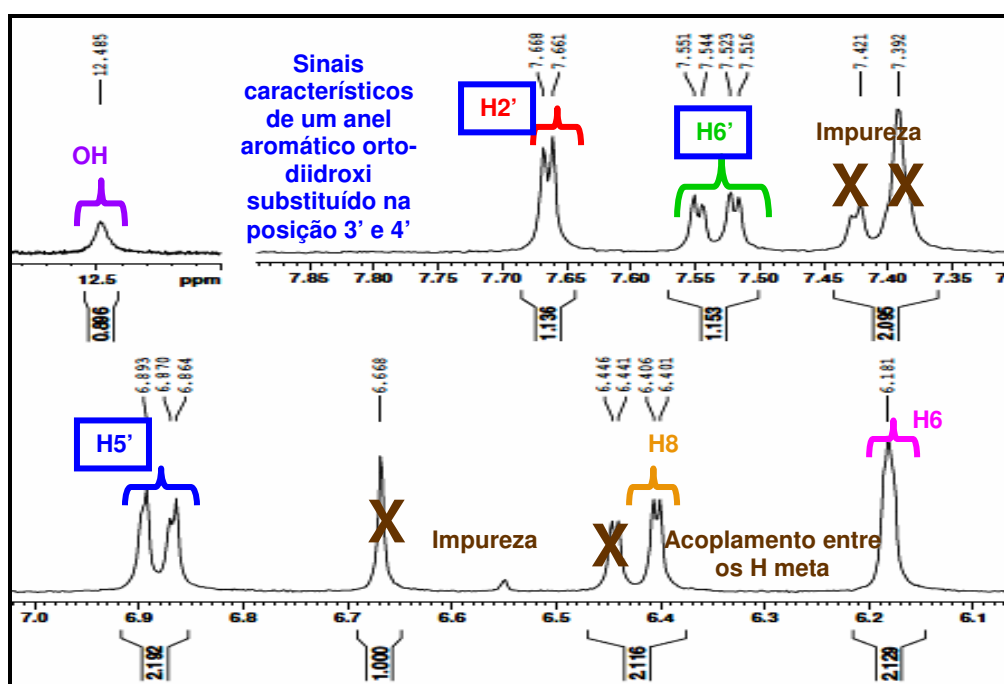


Figura 52 – Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-90 ($\text{DMSO-}d_6/300$ MHz).

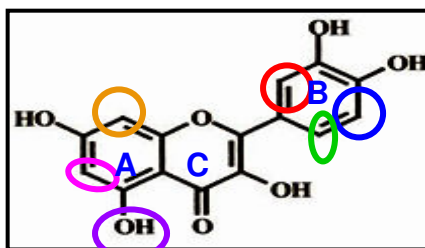


Figura 53 – Estrutura de Bu-90 (quercetina), espectro de ^1H na Fig. 52.

As atribuições dos deslocamentos químicos para os hidrogênios do composto Bu-90 comparados com dados obtidos da literatura estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores de deslocamentos químicos, multiplicidades e constantes de acoplamento para o composto Bu-90 comparados com a literatura (NASCIMENTO, 2006).

Posição	RMN ¹ H (ppm) (NASCIMENTO, 2006)	Bu-90
6	6,17 d , 2,0Hz	6,18 sl , 2,0Hz
8	6,39 d , 1,8Hz	6,42 d , 1,7Hz
2'	7,66 d , 2,2Hz	7,67 d , 2,1Hz
5'	6,86 d , 8,6Hz	6,88 d , 8,6Hz
6'	7,52 dd , 8,5 e 2,1Hz	7,53 dd , 8,8 e 2,0Hz
OH 5	12,48 s	12,48 s

As análises para RMN de ¹³C não puderam ser obtidas por causa da pequena quantidade isolada. Esta substância foi identificada de acordo com as análises espectroscópicas apresentadas por comparação com dados da literatura e comparação por CCD com padrão, o composto Bu-90 foi identificado como quercetina (Figura 54).

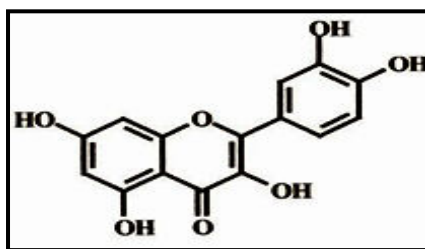


Figura 54 – Estrutura de Bu-90 (quercetina)

5.3.4 Extrato obtido com acetato de etila em meio ácido

A acidificação da fase aquosa até pH 3 transforma os sais em seus respectivos ácidos livres e, os sais de ácido carboxílico vão diminuindo sensivelmente a ionicidade do meio e, conseqüentemente, favorecendo a formação de emulsões, as quais foram quebradas pela adição de solução saturada de NaCl. Esta foi a principal dificuldade em contornar para a obtenção de um extrato com elevadas concentrações dos ácidos dicafeoilquínicos. Esse extrato foi submetido a uma coluna cromatográfica sob condições descritas no item 4.6.4 da página 49, conseguindo-se o isolamento de substância fortemente polar codificada como Bu-41.

5.3.4.1 Identificação de Bu-41

A substância Bu-41 apresentou coloração marrom clara sobre as placas reveladas com solução $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1) seguido de aquecimento sobre chapa elétrica.

O espectro de RMN de ^1H (Figura 55) obtido do composto Bu-41, apresentou duas unidades cafeoíla como indica os sinais para hidrogênios olefínicos em relação de acoplamento *trans* em δ_{H} 7,47 e 6,15 (d, $J=15,5$ Hz, H-3' e H-2') e em δ_{H} 7,57 e 6,27 (d, $J=16,0$ Hz, H-3'' e m, H-2''), de dupletos em δ_{H} 6,71 e 6,77 ($J=9,0$ Hz, H-8' e H-8'') e em δ_{H} 6,86 e 6,88 ($J=3,0$ Hz, H-9' e H-9''), e singletto largo em δ_{H} 6,95 e 6,99 (H-5' e H-5''). Além destes sinais foram observados a presença de três hidrogênios metínicos em δ_{H} 5,13 (dd, $J=3,0$ e $8,4$ Hz, H-4), δ_{H} 4,40 (m, H-5) e δ_{H} 5,70 (m, H-3) e de sinais compreendidos na faixa de δ_{H} 2,14-2,21 ppm, característicos de hidrogênios metilênicos (Figura 56).

A confirmação dos grupos cafeoíla e do esqueleto do ácido quínico foi baseado nos espectros de RMN de ^{13}C (Figura 57), especialmente, pelos sinais para dois grupos carbonilas das unidades cafeoíla em δ_{C} 168,7 e 168,6, do grupo carboxila em δ_{C} 179,3, de dois carbonos metilênicos em δ_{C} 40,5 (C-2) e δ_{C} 38,6 (C-6); de um carbono não hydrogenado em δ_{C} 76,8 (C-1) e três carbonos metínicos em δ_{C} 69,3 (C-3), δ_{C} 75,5 (C-4) e δ_{C} 70,4 (C-5). As posições dos grupos cafeoílas foram determinadas com bases nos valores de deslocamento químicos para H-3, H-4 e H-5 e comparações desses com o possível isômero 3,4-dicafeoilquínico encontrado na literatura, Figura 58 (TATEFUGI *et al.*, 1996; BASNET *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1999; SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005).

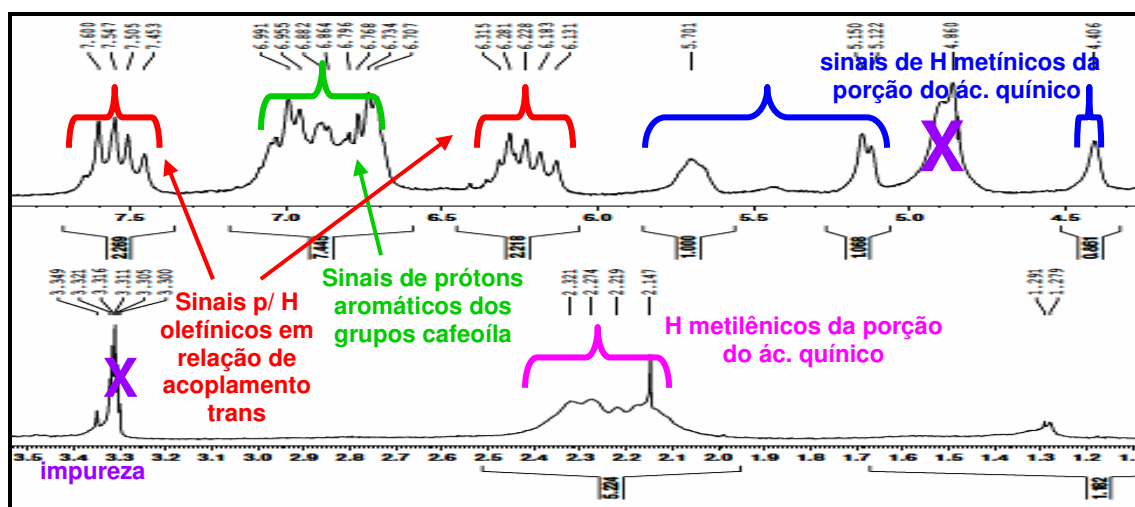


Figura 55 – Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-41 ($\text{CD}_3\text{OD}/300$ MHz).

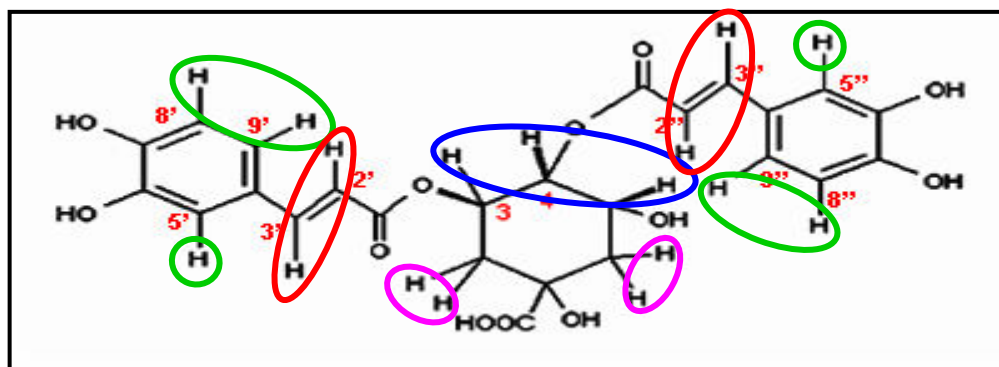


Figura 56 – Estrutura de Bu-41, espectro de ^1H na Fig. 55.

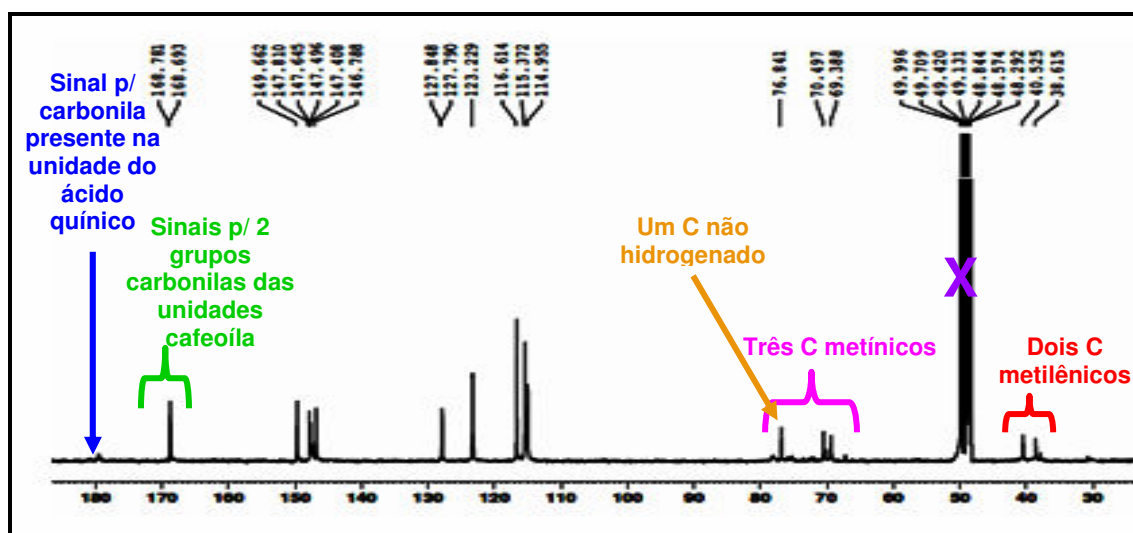


Figura 57 – Espectro expandido de RMN de ^{13}C do composto Bu-41 ($\text{CD}_3\text{OD}/75\text{ MHz}$).

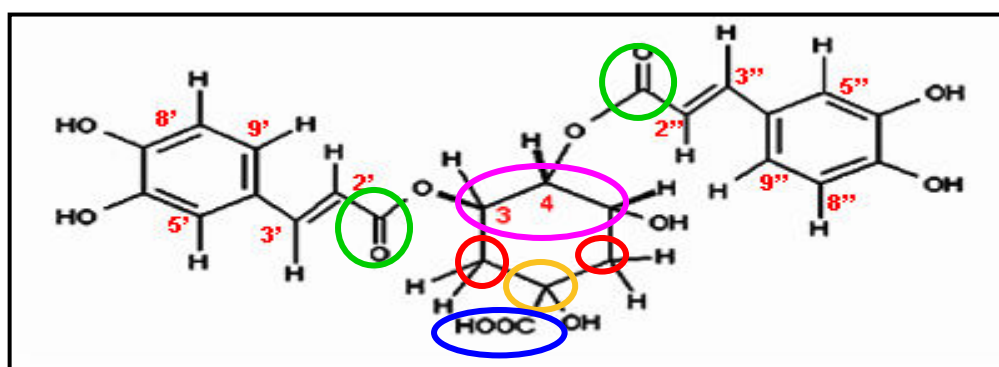


Figura 58 – Estrutura de Bu-41, espectro de ^{13}C na Fig. 57.

A comparação dos dados de Bu-41 com os do composto ácido 3,4-O-[*E*]-dicafeoilquínico (Figura 59) indicam tratar-se do ácido 3,4-O-[*E*]-dicafeoilquínico, como descritos na Tabela 10.

Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto Bu-41 (CD_3OD) comparados com os da literatura para o ácido 3,4-O-[E]-dicafeoilquínico (TATEFUGI *et al.*, 1996; BASNET *et al.*, 1996).

Posição	RMN ^1H (ppm)			RMN ^{13}C (ppm)		
	TATEFUGI <i>et al.</i> , 1996	BASNET <i>et al.</i> , 1996	Bu-41	TATEFUGI <i>et al.</i> , 1996	BASNET <i>et al.</i> , 1996	Bu-41
1	-	-	-	76,1	77,88 s	76,8
2	2,2-2,4	2,20 m	2,21 m	39,4	40,24 t	40,5
3	5,62	5,68 dt, 10,0 e 5,0Hz	5,70 m	69,0	70,11 d	69,3
4	5,12	5,12 dd, 10,0 e 3,0Hz	5,13dd, 8,4 e 3,0 Hz	75,8	77,52 d	76,8
5	4,37	4,35 dt, 3,0 e 2,5Hz	4,40 m	69,4	71,08 d	70,4
6	2,0 – 2,4	H_{ax} 2,29 dd, 14,0 e 3,0Hz; H_{eq} 2,02 dd, 14,0 e 3,0Hz	H_{ax} 2,29 m; H_{eq} 2,14 m	38,4	39,48 t	38,6
1'	-	-	-	168,3	169,26 s	168,6
2'	6,19	6,19 d, 16,0Hz	6,15 d, 15,5Hz	114,76	115,59 d	114,95
3'	7,51	7,50 d, 16,0Hz	7,47 d, 15,5Hz	147,6	148,22 d	147,4
4'	-	-	-	127,7	128,40 s	127,7
5'	7,00	6,99 d, 2,0Hz	6,95 br s	115,2	115,89 d	115,3
6'	-	-	-	146,8	147,46 s	146,7
7'	-	-	-	149,7	150,32 s	149,6
8'	6,74	6,73 d, 8,0Hz	6,71 d, 9,0Hz	116,5	117,20 d	116,6
9'	6,90	6,88 dd, 8,0 e 2,0Hz	6,86 d, 3,0 Hz	123,2	123,87 d	123,2
1''	-	-	-	168,6	169,38 s	168,7
2''	6,28	6,27 d, 16,0Hz	6,27 m	114,81	115,59 d	114,9
3''	7,60	7,59 d, 16,0Hz	7,57 d, 16,0Hz	147,8	148,37 d	147,7
4''	-	-	-	127,8	128,46 s	127,8
5''	7,02	7,02 d, 2,0Hz	6,99 br s	115,3	115,89 d	115,3
6''	-	-	-	146,8	147,46 s	146,7
7''	-	-	-	149,7	150,32 s	149,6
8''	6,75	6,74 d, 8,0Hz	6,77 d, 9,0Hz	116,5	117,20 d	116,6
9''	6,91	6,90 dd, 8,0 e 2,0Hz	6,88 d, 3,0 Hz	123,2	123,87 d	123,2
COOH	-	-	-	176,8	180,10 s	179,3

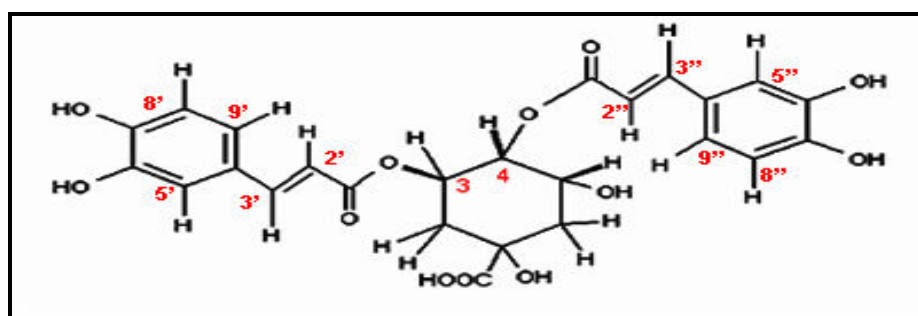


Figura 59 – Estrutura de Bu-41 (ácido 3,4-O-[E]-dicafeoilquínico).

6 CONCLUSÕES

→ Foram analisadas as composições químicas dos óleos voláteis e dos extratos obtidos com acetato de etila das folhas de espécimes masculinos e femininos das populações de Bu1 e Bu2. Os resultados indicaram grande semelhança entre os metabólitos secundários das duas populações de plantas, confirmando as identificações botânicas feitas com base na morfologia das flores.

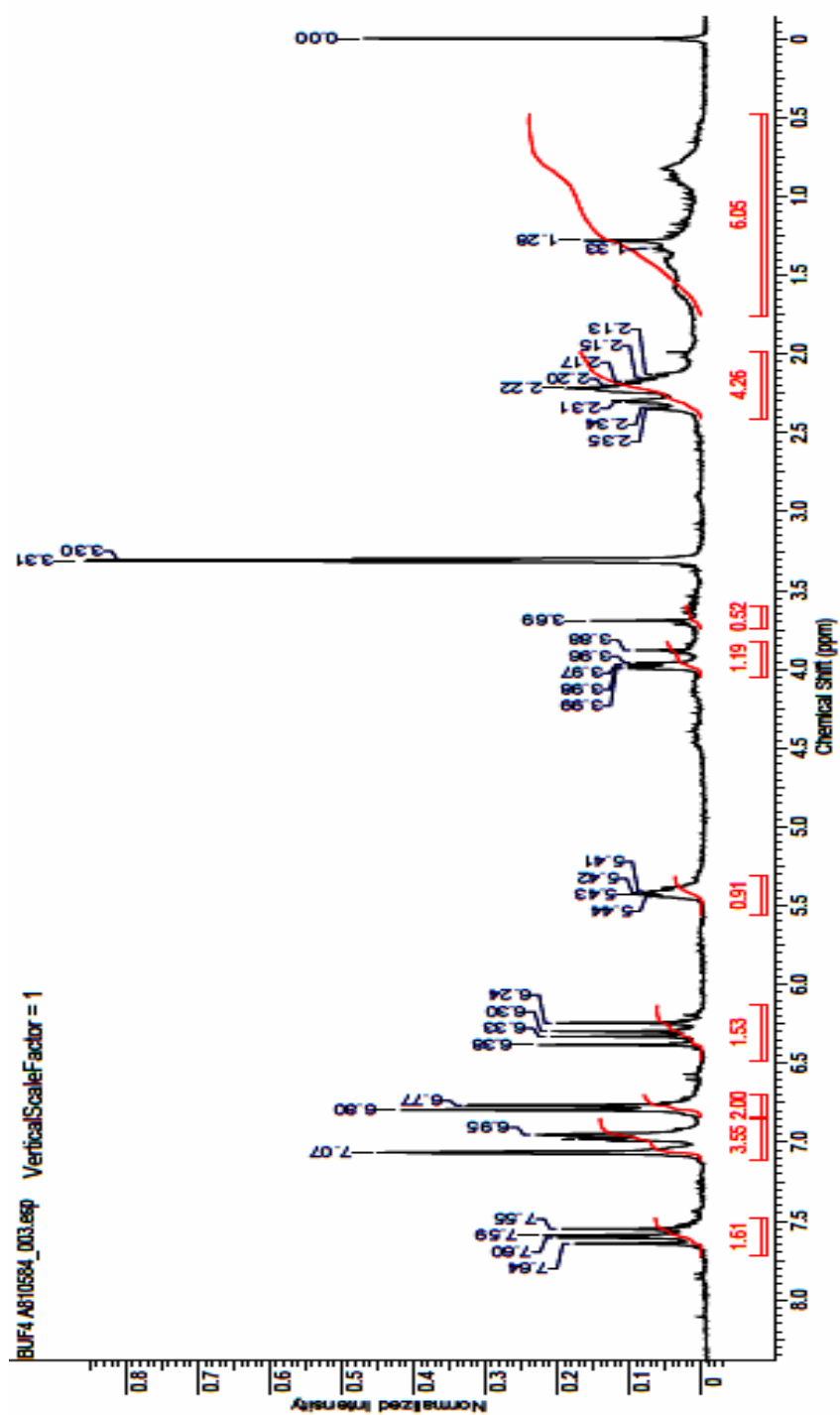
→ As composições químicas dos óleos essenciais das duas populações Bu1 e Bu2 mostraram-se também muito similares aos resultados registrados anteriormente para outras amostras de folhas provenientes dos Campos Gerais do Paraná. A definição das características do óleo essencial das folhas de *B. uncinella* desta região de planalto adquire forma agora, após a análise de várias amostras. Os óleos são caracterizados pela baixa proporção de monoterpenos e presença dos sesquiterpenos cariofileno, espatulenol e cariofileno óxido como principais componentes.

→ Os quatro extratos acetato de etila de Bu1 e Bu2 foram comparados por cromatografia de camada delgada, evidenciando presença de dois compostos polares como principais constituintes. A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C destes extratos permitiu identificar os dois principais componentes: os ácidos 3,5-O-dicafeoilquínico e 3,4-O-dicafeoilquínico.

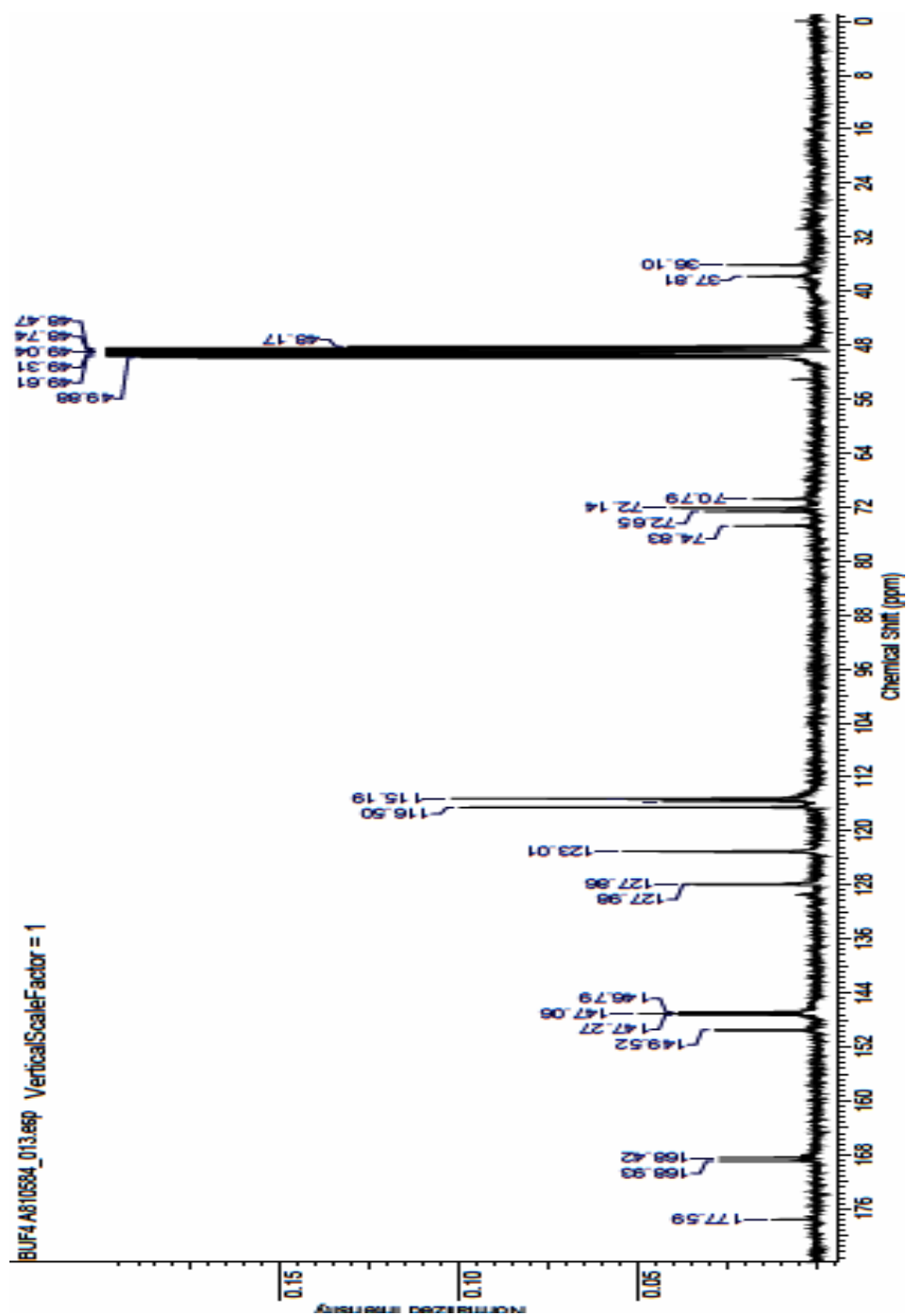
→ Foram isolados e identificados pela primeira vez os ácidos: 3,5-O-dicafeoilquínico e 3,4-O-dicafeoilquínico, assim como os flavonóides quercetina, luteolina e apigenina, a partir de extratos de *B. uncinella* e, também são inéditos os processos de purificação de diferentes maneiras.

→ A soma dos resultados obtidos abre espaço para a continuação deste trabalho em busca do isolamento de outras substâncias, dispondo-se agora da experiência acumulada durante os trabalhos de desenvolvimento de métodos.

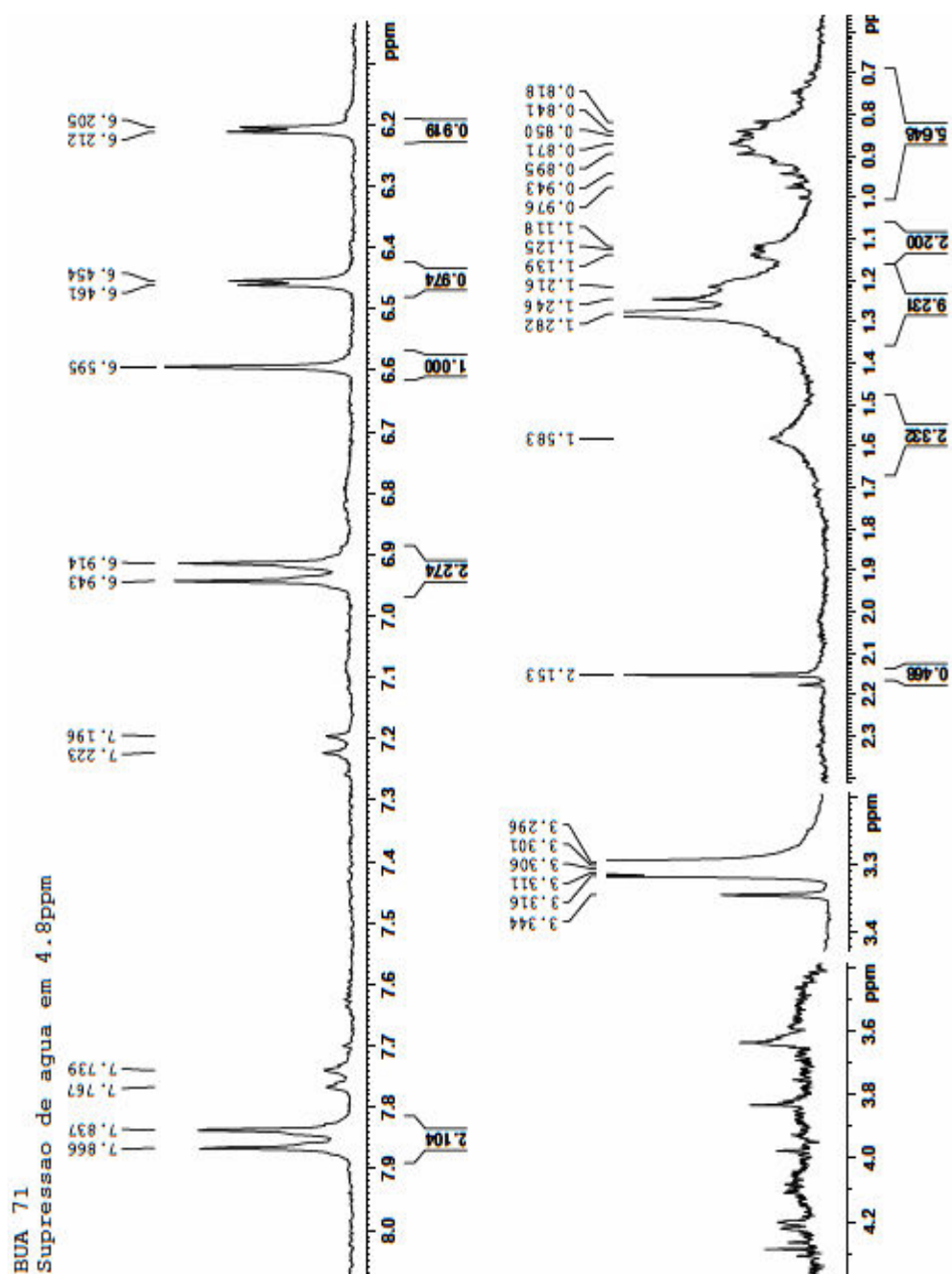
7 ANEXOS



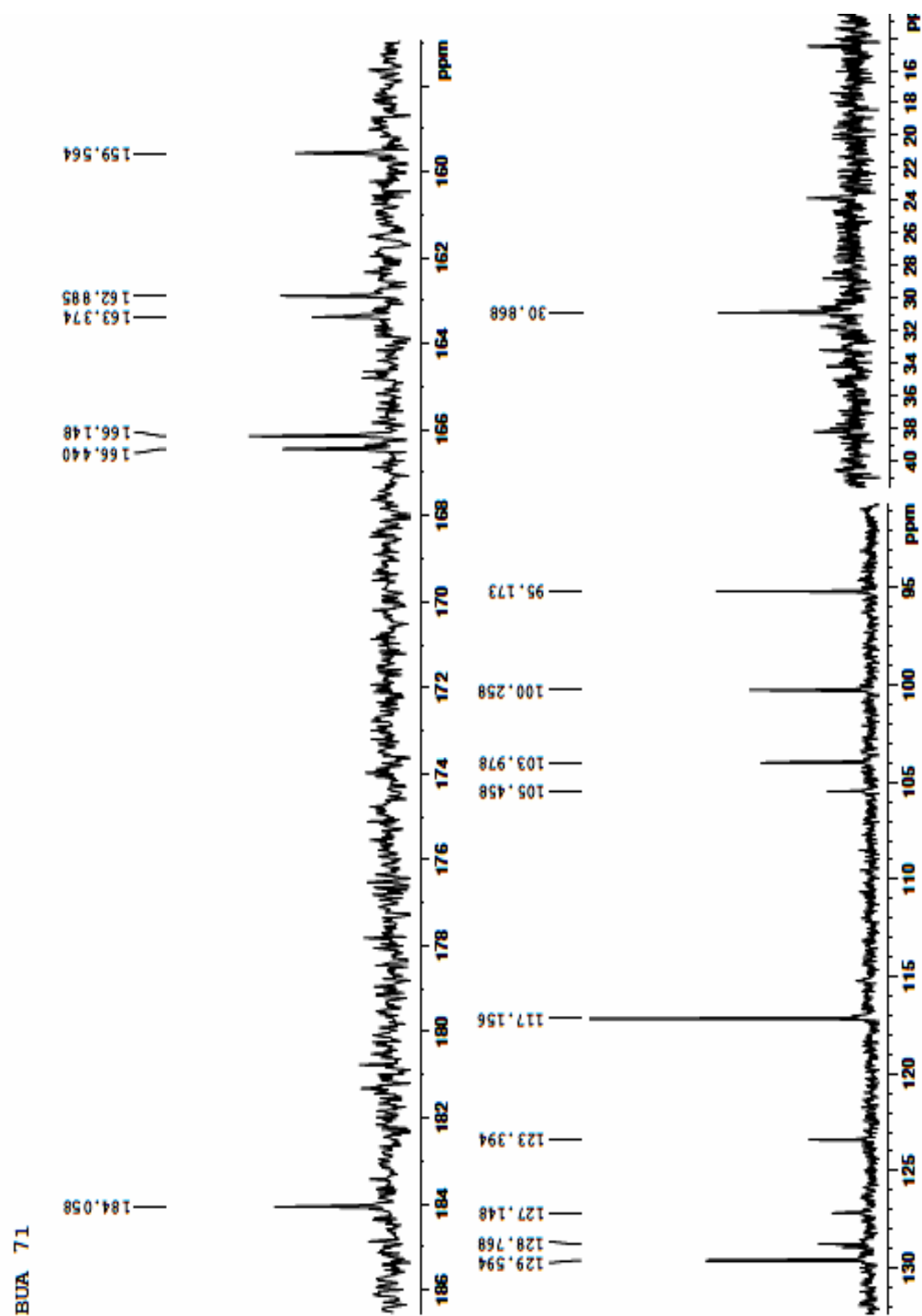
Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-25 em CD_3OD , 300 MHz.



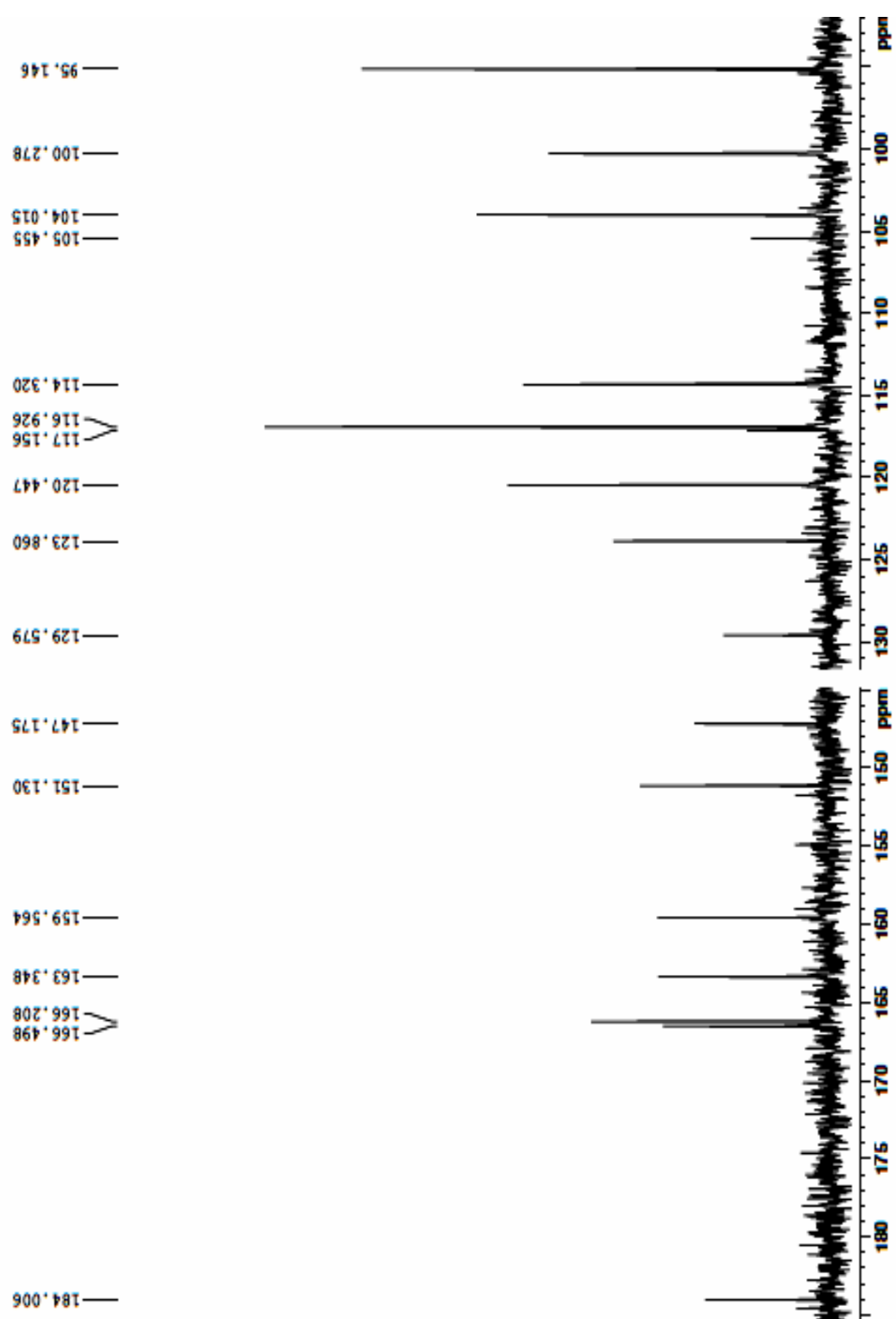
Espectro expandido de RMN de ^{13}C do composto Bu-25 em CD_3OD , 75 MHz.



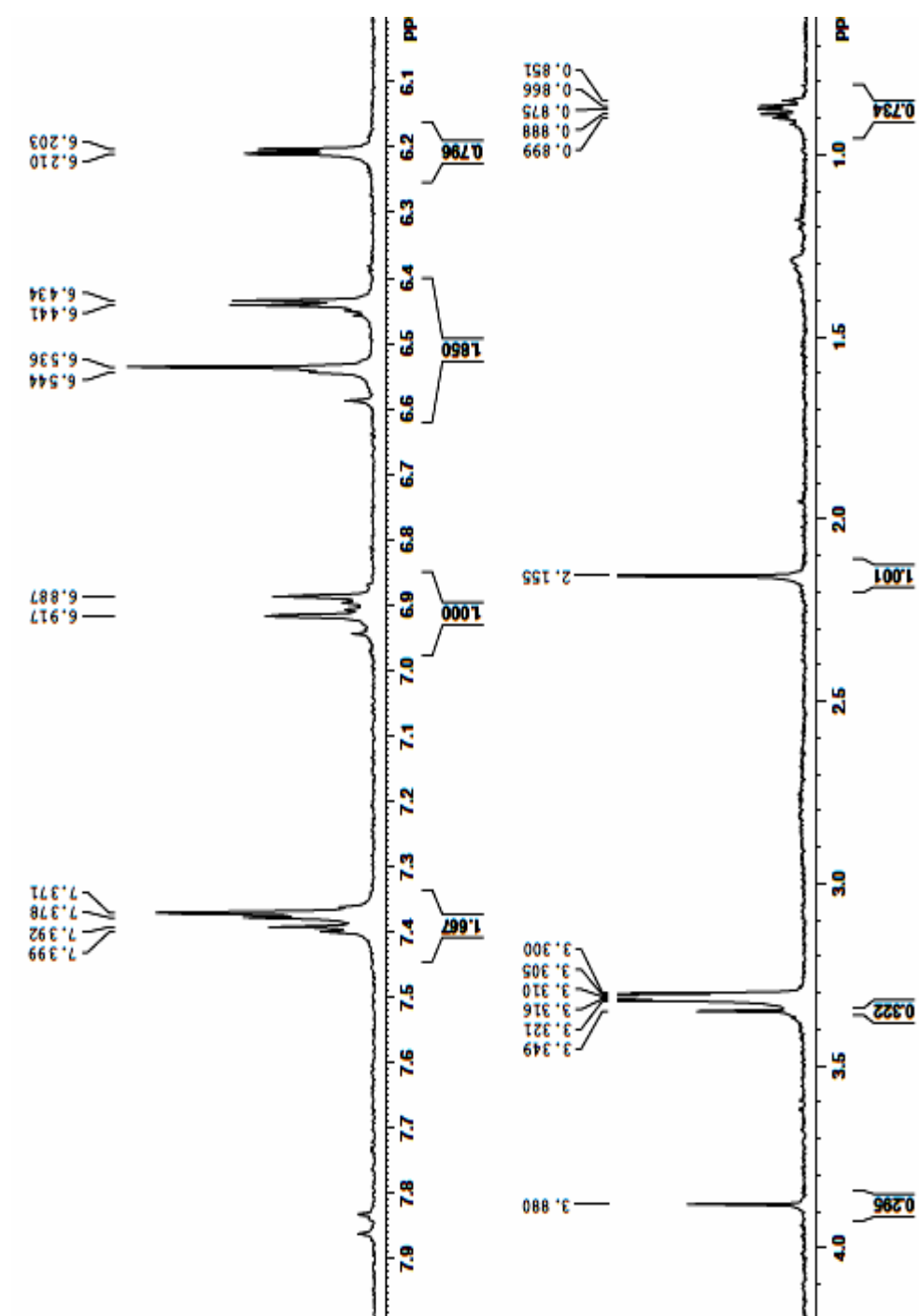
Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-71 em CD_3OD , 300 MHz.



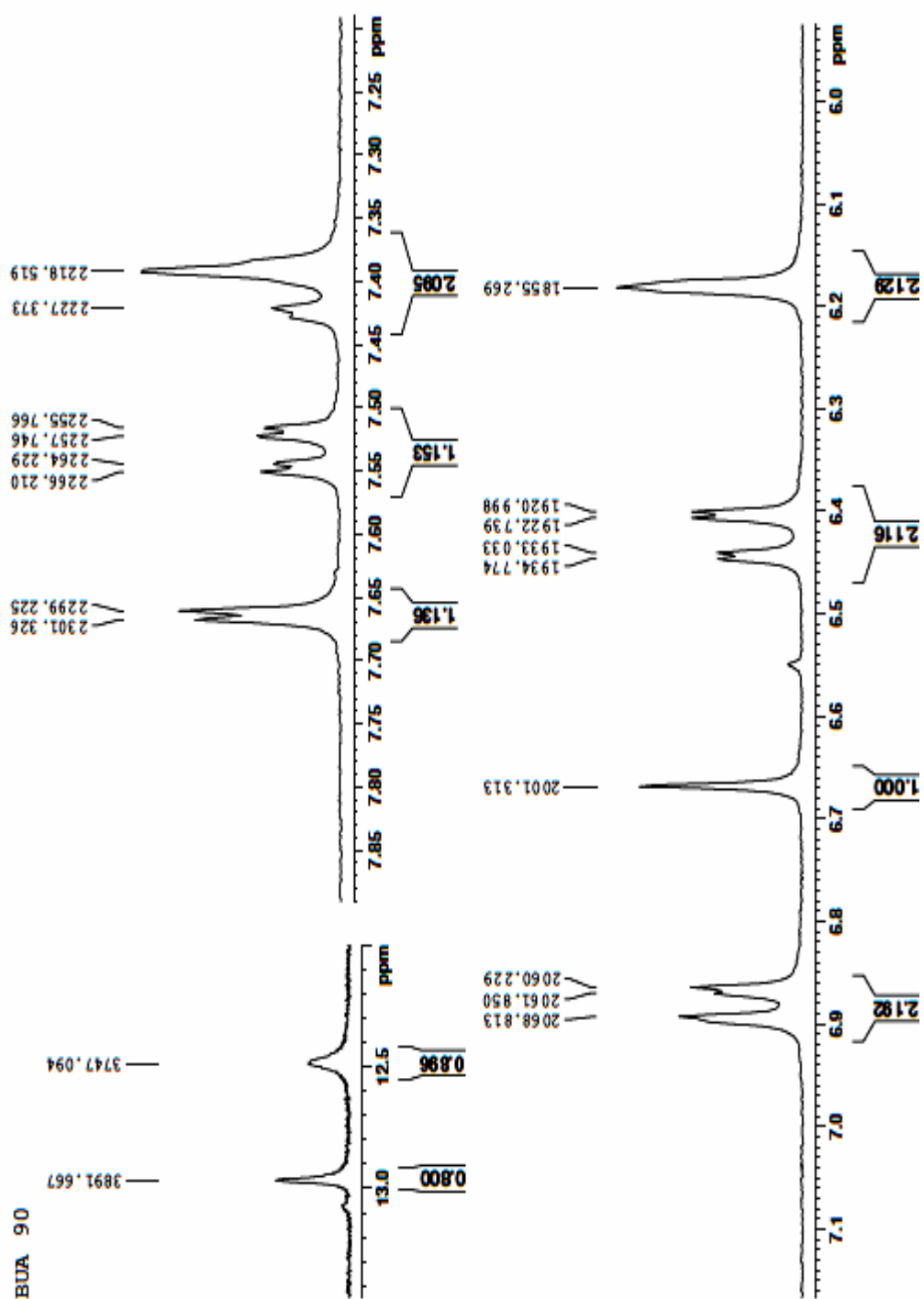
Espectro expandido de RMN de ^{13}C do composto Bu-71 em CD_3OD , 75 MHz.



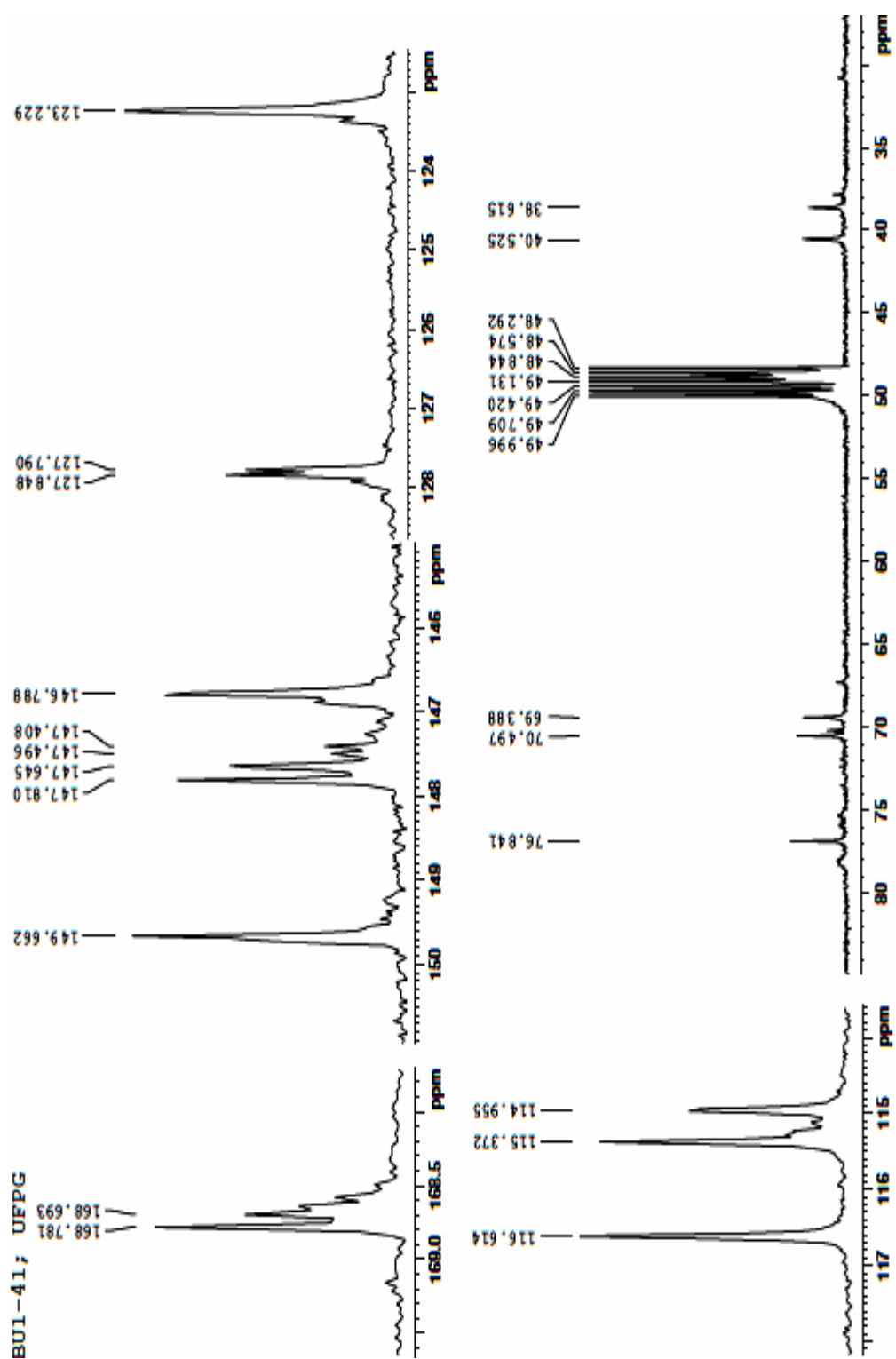
Espectro expandido de RMN de ^{13}C do composto Bu-86 em CDCl_3 , 75 MHz.



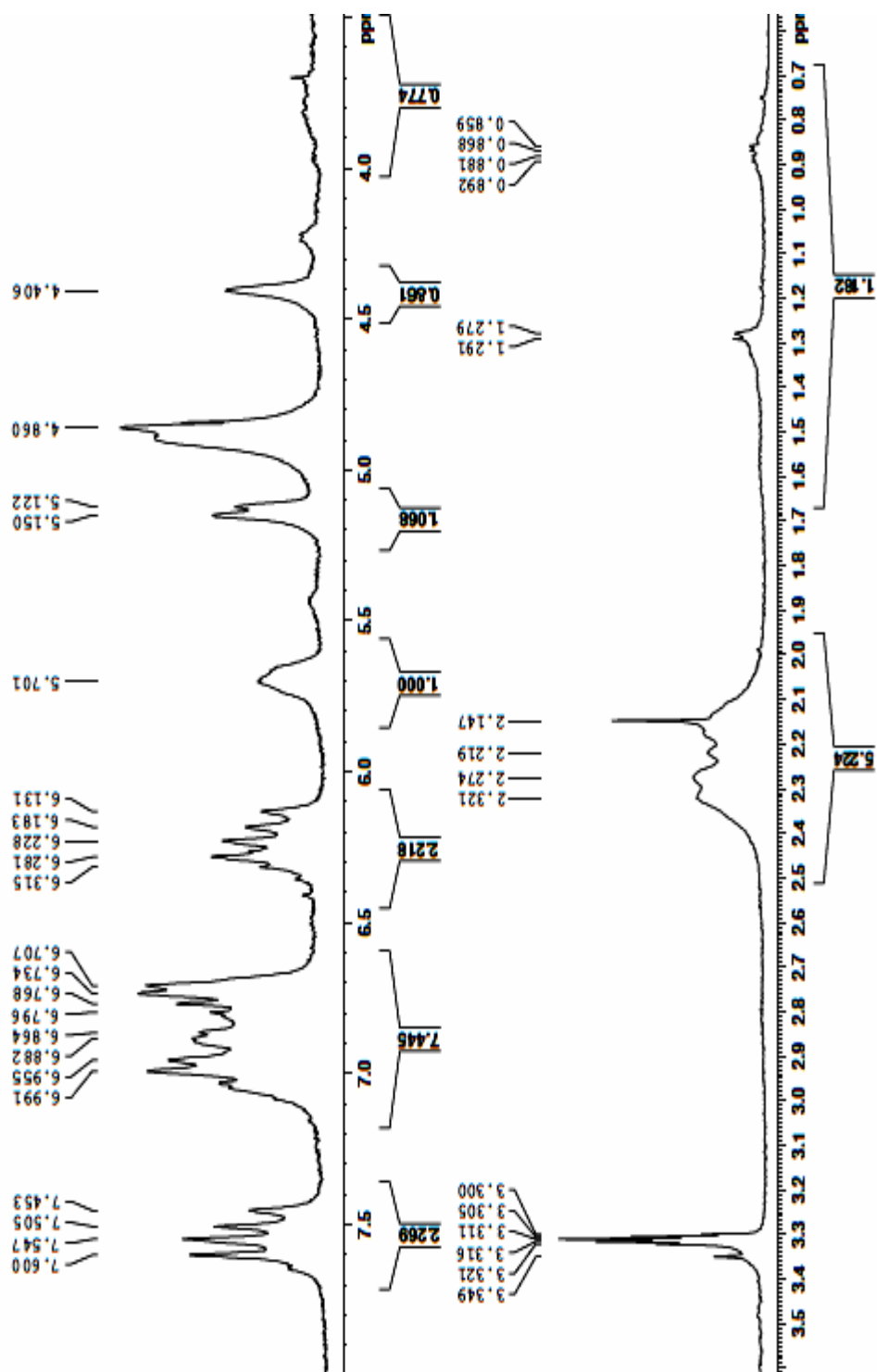
Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-86 em CD_3OD , 300 MHz.



Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-90 em $\text{DMSO-}d_6$, 300 MHz.



Espectro expandido de RMN de ^{13}C do composto Bu-41 em CD_3OD , 75 MHz.



Espectro expandido de RMN de ^1H do composto Bu-41 em CD_3OD , 300 MHz.

8 REFERÊNCIAS

ABAD, M.J; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; VALVERDE, S. Anti-inflammatory activity of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1164-1167, 1993.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gás Chromatography – Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured, p. 469, 1995.

AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSEIRA, M. R.; ZATTERA, F.; WASUM, R.; SERAFINI, L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 215-220, jul./set. 2005.

AGRAWAL, P. K; THAKUR, R. S.; BANSAL, M. C.; MARKHAM, K. R.; PORTER, L. J.; FOO, L. Y. Studies in Organic Chemistry – Carbon -13 NMR of Flavonoids. New York: Elsevier **Science Publishing Company**,. 1989, 564 p.

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

ALTA MONTANHA – Portal de Montanhismo e Escalada. Disponível em: <<http://www.altamontanha.com/iviturui/flora02.html>>. Acesso em: 23 out. 2009.

AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, R.L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Synergic effect of flavones and flavonols against *Herpes simplex* vírus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v.55, p. 1732-1740, 1992.

ANDJELKOVIC, M.; CAMP, J. V.; DE MEULENAER. B.; DEPAEMELAERE, G.; SOCACIU, C.; VERLOO, M.; VERHE, R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. **Food Chemistry**. V. 98, p. 23-31, 2006.

ASCARI, J. **Estudo Químico e Bioatividades de *Baccharis uncinella* DC**. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2007.

ASCARI, J.; NUNES, D. S.; MARQUES, M. B.; TARDIVO, R. C.; FILHO, V. C.; SIMIONATTO, E. L.; WISNIEWSKI JÚNIOR, A. Essential oils of *Baccharis uncinella* DC. **Publicatio**, v. 15, n. 1, 2009.

BARROSO, G.M. Compositae-subtribo Baccharidineae Hoffmann. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguesia**, v. 28, n. 40, p. 1-273, 1976.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. Sistemática das angiospermas do Brasil. **Editora Universitária UFV**, Viçosa, v. 3, 1991.

BARROSO, G. M.; BUENO, O. L. Compostas. Subtribo: Baccharidinae. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 2002.

BASNET, P.; MATSUSHIGE, K.; HASE, K.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Four Di-O-caffeoyl Quinic Acid Derivatives from Propolis. Potent Hepatoprotective Activity in Experimental Liver Injury Models. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 11, p. 1479-1484, 1996.

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K.F.R. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Arzneim. Forsch.**, v. 45, p. 697-699, 1995.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. Lipids. **Food chemistry**, Berlin, Springer Verlag, 1987, 203 p.

BIANCHI, N. R.; SILVA, M. O.; SPIASSI, L.; BERGONCI, J. I.; MACHADO, C. A. Ensaio de toxicidade excessiva e *screening* fitoquímico de algumas espécies do gênero *Baccharis* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, n. 3, p. 79-80, 1993.

BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**. V. 68, n. 22-24, p. 2722-2736, 2007.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 405-445, 1994.

BREITMAIER, E. **Terpene**. Stuttgart: Teubner. 1999, 277 p.

BREMER, K. major clades and grades of the Asteraceae. In *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference*, Kew, 1994 (D. J. N. Hind & H. J. Beentje, eds.). **Royal Botanic Gardens**, Kew, v. 1, p. 1-7, 1996.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. 2. ed. França: Lavoisier Publishing, 1995.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Estudo Farmacobotânico de Folha e Caule de *Baccharis uncinella* DC., Asteraceae. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 27, n. 5, p. 6-740, 2008.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Editora UNIVALI, 2ª ed., 319 p, 2009.

CHANG, L. C.; KINGHORN, A. D. Flavonoids as Cancer Chemopreventive Agents. In TRINGALI, C. (ed) **Bioactive Compounds from Natural Sources**. London: Taylor & Francis, 2001.

CHEMINAT, A.; ZAWATZKY, R.; BECKER, H.; BROUILLARD, R. Caffeoyle conjugates from *Echinacea* species structures and biological activity. **Phytochemistry**, v. 37, n. 9, p. 2787-2794, 1988.

CHOI, S. Z.; CHOI, S. U.; LEE, K. R. Pytochemical Constituents of the Aerial Parts from *Solidago virga-aurea* var. *gigantea*. **Archives Pharmacal Research**, v. 27, n. 2, p. 164-168, 2004

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; de BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTLÉ, J.; VLIENTINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 213-220, 2002.

CLIFFORD, M.N. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 1033-1042, 2000.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids- Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996

COSTA, A. G. L. C. **Estudo químico de *Baccharis dracunculifolia* DC. e sua correlação com a própolis de uma microrregião dos Campos Gerais do Paraná**. 2009, 74 p. Dissertação – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Paraná, 2009.

CRITCHFIELD, J.W.; BUTERA, S.T.; FOLKS, T.M. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoids compounds. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 12, p. 39-46, 1996.

CUNHA, M. C. L.; DANI, N.; FORMOSO, M. L. L. A importância do estudo biogeoquímico na mobilidade dos elementos residuais em ambientes supergênico. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 20, p. 173-177, 1990.

DE CANDOLLE, A. P. **Compositae: *Baccharis prodromus***, v. 5, p. 398-429, 1836.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of shikimate metabolites. **Natural Products Report**. Cambridge, c. 15, n. 1, p. 15-58, 1998.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**. London: John Wiley, 2nd ed., 2001, 507 p.

DI STASI, L. C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo, ed. UNESP, 1996, 230 p.

DUWIEJUA, M.; ZEITLIN, I.J. Plants as a source of anti-inflammatory substances. In: HARVEY, A.L. **Drugs from Natural Products: Pharmaceuticals and Agrochemicals**. New York: Elis Horwood, 1993.

FABIANE, K. C.; FERRONATTO, R.; SANTOS, A. C. dos; ONOFRE, S. B. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 197-203, abr./jun. 2008.

FEBRAFARMA – Federação Brasileira Das Indústria Farmacêutica. Disponível em: <<http://www.pfarma.com.br>>. Acesso em: 29 nov. 2009.

FERRACINI, V. L.; PARAIBA, L. C.; LEITÃO FILHO, H. F.; SILVA, A. G.; NASCIMENTO, L. R.; MARSAIOLI, A. G. Essential Oils of Seven Brazilian *Baccharis* Species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p. 355-367, 1995.

FIELDING, R. R. *Baccharis*: a genus of the Asteraceae new to Canada. **Proceedings of the New Scotian Institute of Science**, v. 41, n. 4, p. 214-215, 2001.

FORMICA, J.V.; REGELSOM, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, p. 1061-1080, 1995.

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

FRIZZO, C. D.; SERAFINI, L. A.; LAGUNA, S. E.; CASSEL, D. L.; DELACASSA, E. Essential oil variability is *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 99-106, 2008.

FULLAS, F.; HUSSAIN, R. A.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, D. Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 6, p. 801-807, 1994.

FUNARI, C. S. de; FERRO, V. de O.; MATHOR, M. B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 206-212, 2007.

GIANELLO, J. C.; CEÑAL, J. P.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E.; PETENATTI, E. M.; DEL VITTO, L. A. Medicamentos herbários en el centro-oeste argentine II. “Carquejas”: control de calidad de las drogas oficiales e sustituyentes. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 19, n. 2, p. 99-103, 2000.

GIULIANO, D. A. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). **Darwiniana**, v. 39, p. 131-154, 2001.

GUTKING, G.; NORBEDO, C.; MOLLERACH, M.; FERRARO, G.; DE TORRES, R. Antibacterial activity of *Achyrocline flaccida*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 10, p. 319-321, 1984.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 51, n. 8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; GUITTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ª ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**. London: Champman and Hall, 295 p., 1973.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman and Hall, 676 p., 1996.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of word**, Oxford University Press: New York, 1993.

HIND, D. J. N.; BEENTJE, H. J.; **Compositae: Systematics**. Proceedings of the International Compositae Conference, Kem, 1994. Royal Botanic Gardens, Kem. V. 1, p. 621-626, 1996.

IPNI – International Plant Names Index. Disponível em: <<http://www.ipni.org>>. Acesso em: 02 de maio de 2009.

ISI - Institute of Scientific Information, Web of Knowledge. Disponível em: <<http://www.portal.isiknowledge.com>>. Acesso em: 18 de julho de 2008.

JASINSKI, V. C. G.; NUNES, D. S.; WISNIEWSKI JR, A.; SENS, S. L.; Óleos essenciais de *Baccharis uncinella* DC. da região de Ponta Grossa-PR. XVI Encontro de Química da Região Sul-SBQ-Sul. **Anais**, Blumenau, 2008.

JOLY, A. B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal, 7ª ed., **Cia Editora Nacional**: São Paulo, 1967.

JOLY, A. B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal, 10ª ed., **Cia Editora Nacional**: São Paulo, 1991.

KAPIL, A.; KOUL, J. B.; SURI, O. P.; Antihepatotoxic effects of chlorogenic acid from *Anthocephalus cadamba*. **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 189-193, 1995.

KAUL, T. N.; MIDDLETON Jr., E.; OGRA, P. L.. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. **Journal Medical Virology**, v. 15, p. 71-79, 1985.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J.. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **British Medical Journal**, v. 312, p. 478-481, 1996.

KNIGHT, D.C.; EDEN, J.A. Phytoestrogens - a short review. **Maturitas**, v. 22, p. 167-175, 1995.

KWON, H. C.; JUNG, C. M.; SHIN, C. G.; LEE, J. K.; CHOI, S. U.; KIM, S. Y.; LEE, K. R. A New Caffeoyl Quinic Acid from *Aster scaber* and Its Inhibitory Activity against Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1) Integrase. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 11, p. 1796-1798, 2000.

LAGO, J. H. G.; FÁVERO, O. A.; ROMOFF, P.. Microclimatic factors and phenology influences in the chemical composition of the essential oils from *Pittosporum undulatum* Vent. Leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 1334-1338, 2006.

LAGO, J. H. G.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de “Campos de Altitude” da Mata Atlântica Paulista. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 727-730, 2008.

LAWRENCE, B. M.; COMPANY, R. J. R. T., Progress in essential oils. **Perfumer & Flavorist**, v. 24, p. 53-63, 1999.

LIN, L. C.; KUO, Y. C.; CHOU, C. J.. Immunomodulatory Principles of *Dichrocephala bicolor*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 405-408, 1999.

MALAGARRIGA HERAS, R. D. P. (1976). Mem. Soc. Cienc. Nat. 23: 129. apud. Verdi, L. G.; Brighente, I. M. C.; Pizzolatti, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

MANN, J. **Secondary Metabolism**, Claredon Press: Oxford, v. 8, 1987.

- MARKHAM, K. R. **Techniques of Flavonoid Identification**. Academic Press, 113 p., 1982.
- MARQUES, V.; FARAH, A., Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, n. 113, p. 1370-1376, 2009.
- MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, v. 46, p. 13-18, 1998.
- MIKETOVA, P.; SCHRAM, K. H.; WHITNEY, J.; KEARNS, E. H.; TIMMERMAN, B. N.. Mass Spectrometry of 3,5- and 4,5-Dicaffeoylquinic Acids and Selected Derivatives. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 4, p. 1240-1252, 1999.
- MORONEY, M-A.; ALCARAZ, M. J.; FORDER, R. A.; CAREY, F.; HOULT, J. R. S.. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. **Journal Pharmaceutical Pharmacology** v. 40, p. 787-792, 1988.
- MÜLLER, J. Systematics of *Baccharis* (Compositae- Astereae) in Bolivia, including an overview of the genus. **Systematic Botany Monographs**, v. 76, p. 1-341, 2006.
- MUCSI, I.; PRAGAI, B. M. Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. **Experientia**, v. 41, p. 930-931, 1985.
- NAGATANI, Y; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC.. **Chemical Pharmaceutical Bulletin** v. 49, n. 11, p. 1388-1394, 2001.
- NAGATANI, Y; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC. II. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 5, p. 583-589, 2002.
- NASCIMENTO, R. J. B. **Estudo de Espécies do Gênero *Solanum* (Solanaceae): quimiotaxonomia e ensaios biológicos**. Dissertação de Mestrado em Farmacoquímica. Universidade Federal da Paraíba, 2006.
- NISHIZAWA, M.; FUJIMOTO, Y. Isolation and structural elucidation of a new lipoxygenase inhibitor from *Gardeniae fructus*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, n. 4, p. 1419-1421, 1986.
- NISHIZAWA, M.; IZUHARA, R.; KANEKO, K.; FUJIMOTO, Y. 3-Caffeoyl-4-sinapoylquinic acid, a novel lipoxygenase inhibitor from *Gardeniae fructus*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, n. 5, p. 2133-2135, 1987.

NURNBERG, V.; FUJIWARA, F. Y.; MARSAIOLI, A. J. Total NMR chemical shift assignments of *Baccharis* oxide via 2D-inadequate. **Magnetic Ressonance in Chemistry**, v. 36, p. 766-768, 1998.

O' CONNELL, J.E.; FOX, P.F. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 103-120, 2001.

OKAMURA, N.; HARAGUCHI, H.; HASHIMOTO, K.; YAGI, A. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1463-1466, 1994.

ORTINS, G. M. M.; AKISUE, G. Estudo morfo-histológico, *screening* fitoquímico, constantes físicas e análise cromatográfica da droga e do extrato fluido, visando o controle de qualidade da espécie *Baccharis articulata* Pers. **Lecta**, v. 18, n. 2, p. 9-32, 2000.

PARFITT, K. (ed.) **Martindale – The complete drug reference**. 32nd. Ed. Tounton: World Color Book services, 1999.

PAULI, G. F.; POETSCH, F.; NAHSTEDT, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. **Phytochemical Analyses**, v. 9, p. 177-185, 1998.

PELUSO, G.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; BRESCIANO, E.; VUOTTO, M. L. Studies on the inhibitory effects of caffeoylquinic acids on monocyte migration and superoxide íon production. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 639-646, 1995.

PEREIRA, A. dos S.; PEREIRA, A. F. de M.; TRUGO, L. C.; AQUINO NETO, F. R. de. Distribution of Quinic Acid Derivatives and Other Phenolic Compounds in Brazilian Propolis. **Z. Naturforsch.** v. 58, p. 590-593, 2003

SÁ, M. F. A.; NEVES, L. De J. Contribuição ao estudo das plantas medicinais *Baccharis myriocephala* DC.. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 77, n. 3, p. 88-96, 1996.

SCHOLZ, E.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D. Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*. **Planta Medica**, v. 60, p. 360-364, 1993.

SENS, S. L. **Alternativas para a auto-sustentabilidade dos Xokleng da Terra Indígena Ibirama**. Dissertação de Mestrado em Engenharia da Produção. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002.

SFORCIN, J. M.; ORSI R. O.; BANKOVA V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 301-305, 2005.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Capítulo 1. Biosynthesis. Classification, and Nomenclature of Phenolics in food and nutraceuticals. Boca Raton, FL: CRC Press Ed., 558 p., 2004.

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

SHELDON, J. W.; BALICK, M. J.; LAIRD, S. A. **Medicinal plants: can utilization and conservation coexist? In: Advances in economic botany**. New York: The New York Botanical Garden, v. 12, p. 104, 1997.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 22, p. 281-293, 1988.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 821 p., 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 833 p., 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 1102 p., 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V.; Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 5. ed. rev. atual. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS; UFSC, 2003.

SIMÕES-PIRES, C. A.; QUEIROZ, E. F.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatization. **Phytochemical Analysis**, v. 16, n. 5, p. 307-314, 2005.

STAHL, E.; SCHILD, W. **Pharmazeutische Biologie. 4. Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierungen**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. p. 19, 1981.

TAKEDA, I.J.M.; FARAGO, P. **Vegetação do Parque Estadual de Vila Velha: guia de campo**. Ponta Grossa: Serzegrat, 419 p., 2001.

TATEFUGI, T.; IZUMI, N.; OHTA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Isolation and Identification of Compounds from Brazilian Propolis which Enhance Macrophage

Spreading and Mobility. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 7, p. 966-970, 1996..

TRUTE, A.; NAHRSTEDT, A. Identification and quantitative analysis of phenolic compounds from dry extract of *Hedera helix*. **Planta Medica**, v. 63, p. 177-179, 1997.

TRUTE, A.; GROSS, J.; MUTSCHLER, E.; NAHRSTEDT, A. In vitro antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix* L. **Planta Medica**, v. 63, p. 125-129, 1997.

VAN ACKER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D-J; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 331-342, 1996.

VAN DEL DOOL, H.; KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gás-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p. 463-471, 1963.

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

WILDMAN, R. E. C. **Classifying nutraceuticals**. In: Handbook of nutraceuticals and functional foods. Boca Raton. FL: CRC Press. p. 13-30, 2001.