

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

RAQUEL ENDLER SIMIONI

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DOS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE TRÊS ESPÉCIES *BACCHARIS* DA SEÇÃO *CYLINDRICA*E:
Baccharis pentodonta, *Baccharis tridentata* e *Baccharis rufescens***

**PONTA GROSSA
Agosto 2013**

RAQUEL ENDLER SIMIONI

**CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DOS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE TRÊS ESPÉCIES *BACCHARIS* DA SEÇÃO *CYLINDRICA*E:
Baccharis pentodonta, *Baccharis tridentata* e *Baccharis rufescens***

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Química Aplicada no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes

PONTA GROSSA

Agosto 2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Simioni, Raquel Endler
S591 Contribuição ao conhecimento químico
dos metabólitos secundários de três
espécies Baccharis da seção Cylindricae:
Baccharis pentodonta, Baccharis tridentata
e Baccharis rufescens/ Raquel Endler
Simioni. Ponta Grossa, 2013.
115f.

Dissertação (Mestrado em Química
Aplicada - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Domingos Sávio
Nunes.

1.Baccharis pentodonta. 2.Baccharis
rufescens. 3.Baccharis tridentata. 4.Óleos
essenciais de espécimes masculinos e
femininos. 5.Espatulenol. I.Nunes,
Domingos Sávio. II. Universidade Estadual
de Ponta Grossa. Mestrado em Química
Aplicada. III. T.

CDD: 547

TERMO DE APROVAÇÃO

RAQUEL ENDLER SIMIONI

“CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO QUÍMICO DOS METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE TRÊS ESPÉCIES *BACCHARIS* DA SEÇÃO *CYLINDRICA*E:
BACCHARIS PENTODONTA, *BACCHARIS TRIDENTATA* E *BACCHARIS RUFESCENS*”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.



Orientador:

Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes
UEPG/PR



Profa. Dra. Maria Helena Sarragiotto
UEM/PR



Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Marques
UEPG/PR

Ponta Grossa, 29 de agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

À minha família e ao meu noivo pelo apoio e compreensão.

Ao professor orientador, mestre e doutor, pela oportunidade de participar no projeto de pesquisa, apoio frente às dificuldades e principalmente ao ensino.

Às amigas e colegas do laboratório 12.

Aos professores de todas as matérias cursadas, pelo aprendizado que contribuiu para o desenvolvimento da pesquisa.

À memória do Dr. Gerth Hatschbach do Museu Botânico Municipal de Curitiba pelas identificações botânicas.

À professora Jacqueline Aparecida Marques pela ajuda e ensino para a prova de proficiência de inglês.

Aos técnicos, funcionários e professores do Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelas análises realizadas.

Aos técnicos, funcionários e professores do Laboratório de Cromatografia da Fundação Universidade Regional de Blumenau pelas análises realizadas.

Aos técnicos, funcionários e professores da Universidade Federal de Sergipe pelas análises realizadas.

Aos técnicos, funcionários e professores da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI pelas análises realizadas.

Aos técnicos, funcionários e professores da Universidade Estadual de Maringá pelas análises realizadas.

À CAPES pela bolsa de estudos.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo estudar quimicamente os metabólitos secundários de inflorescências e folhas de espécimes masculinos e femininos de três espécies do gênero *Baccharis*: *B. rufescens*, *B. pentodonta* e *B. tridentata*. Os materiais vegetais foram hidrodestilados para a obtenção e análise dos óleos essenciais por técnicas de CG-EM-DIC, UV-Vis, IV e RMN de ^1H e de ^{13}C . O fracionamento em coluna cromatográfica do óleo essencial de espécimes masculinos de *B. rufescens* levou ao isolamento de dois álcoois sesquiterpênicos, espatulenol e (*E*)-nerolidol, e da cetona 4,7(11)-amorfadien-8-ona, que foi obtida pela primeira vez em quantidade suficiente para estudos detalhados sobre sua estrutura com uso de técnicas de RMN 2D. Os óleos essenciais de espécimes femininos de *B. rufescens* foram analisados por RMN de ^{13}C , confirmando a presença majoritária de (*E*)-nerolidol e ausência da mencionada cetona. Os óleos de espécimes masculinos e femininos de *B. pentodonta* mostraram-se muito similares entre si, identificando-se como majoritários os sesquiterpenos espatulenol, epiglobulol, viridiflorol, (+)-torreiol e α -cadinol. Da mesma forma, as composições dos óleos essenciais de espécimes masculinos e femininos de *B. tridentata* mostraram-se muito similares, identificando-se o espatulenol como componente majoritário, seguido de óxido de cariofileno e (+)-torreiol. O extrato aquoso restante após a hidrodestilação dos óleos essenciais de *B. tridentata* foi submetido à extração com clorofórmio e em seguida com acetato de etila em pH 8 e em pH 4. O extrato obtido com acetato de etila em pH 8 foi analisado por UV-Vis com adição de reagentes de deslocamento, tornando possível observar a presença de uma flavanona cujos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C indicaram tratar-se de eriodictiol. O extrato foi cromatografado em coluna de sílica e a estrutura do eriodictiol foi assegurada por UV-Vis, IV e RMN de ^1H e de ^{13}C . O extrato acetato de etila em pH 4 foi analisado por UV-Vis e RMN de ^1H e de ^{13}C , verificando-se a provável presença do ácido 3-cafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico.

Palavras-chave: *Baccharis pentodonta*. *Baccharis rufescens*. *Baccharis tridentata*. Óleos essenciais de espécimes masculinos e femininos. Espatulenol. (*E*)-Nerolidol. 4,7(11)-amorfadien-8-ona. α -Cadinol. Compostos fenólicos. Eriodictiol. Ácidos cafeoilquínicos.

ABSTRACT

This research aimed to chemically study the secondary metabolites from inflorescences and leaves of male and female specimens of three species from the genus *Baccharis*: *B. rufescens*, *B. pentodonta* and *B. tridentata*. The plant materials were hydrodistilled for the collection and analysis of the obtained essential oils by GC/MS/FID, UV-Vis, IR and ^1H and ^{13}C NMR. The column chromatographic fractionation of the essential oil from male specimens of *B. rufescens* led to the isolation of two sesquiterpene alcohols, namely spathulenol and (*E*)-nerolidol, and the ketone 4,7(11)-amorphadien-8-one, which was obtained for the first time making it possible to study its structure using 2D NMR techniques. The essential oils of female specimens of *B. rufescens* were analyzed by ^{13}C NMR, confirming the presence of (*E*)-nerolidol and the absence of the mentioned ketone. The oils of male and female specimens of *B. pentodonta* were very similar, presenting the major sesquiterpenes spathulenol, epiglobulol, viridiflorol, (+)-torreyol and α -cadinol. Likewise, the compositions of the essential oils from male and female specimens of *B. tridentata* were very similar, showing spathulenol as the major component, followed by caryophyllene oxide and (+)-torreyol. The aqueous extract remaining after the steam distillation of essential oils from *B. tridentata* was subjected to extraction with chloroform and then with ethyl acetate at pH 8 and pH 4. The extract obtained with ethyl acetate at pH 8 was analyzed by UV-Vis and shift reagents were added, making it possible to observe the presence of a flavanone whose ^1H and ^{13}C NMR spectra indicate that this substance is eriodictyol. The extract was chromatographed on a column of silica and structure of eriodictyol was carried out by UV-Vis, IR and ^1H and ^{13}C NMR. The ethyl acetate extract at pH 4 was analyzed by UV-Vis and ^1H and ^{13}C NMR, verifying the likely presence of 3-caffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid and 4,5-dicaffeoylquinic acid.

Keywords: *Baccharis pentodonta*. *Baccharis rufescens*. *Baccharis tridentata*. Essential oils from male and female specimens. Spathulenol. (*E*)-Nerolidol. 4,7(11)-amorphadien-8-one. α -Cadinol. Phenolic compounds. Eriodictyol. Caffeoylquinic acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Compostos presentes nos óleos essenciais de espécies do gênero <i>Baccharis</i>	21
Figura 2 - Estrutura química das flavonas identificadas em <i>B. articulata</i> e <i>B. trimera</i>	24
Figura 3 - Partes aéreas de <i>Baccharis rufescens</i>	25
Figura 4 - Substâncias identificadas nos óleos essenciais de <i>B. rufescens</i> e <i>B. tridentata</i>	26
Figura 5 - Partes aéreas de <i>Baccharis tridentata</i>	27
Figura 6 - Partes aéreas de <i>Baccharis pentodonta</i>	27
Figura 7 - Esquema de obtenção do óleo essencial e dos extratos em clorofórmio, AcOEt em pH ácido e básico de <i>B. tridentata</i>	37
Figura 8 - Teste preliminar das frações coletadas durante as extrações.	39
Figura 9 - CCD de todas as frações reunidas.	39
Figura 10 - CCD dos óleos essenciais de <i>B. rufescens</i> e <i>B. tridentata</i>	41
Figura 11 - Teste preliminar das frações do fracionamento do óleo essencial de <i>B. rufescens</i>	42
Figura 12 - Comparação entre os espectros dos óleos essenciais das folhas e inflorescências dos espécimes masculinos e femininos de <i>B. pentodonta</i>	48
Figura 13 - Espectros de UV-Vis dos óleos essenciais das folhas e das inflorescências dos espécimes masculinos e femininos de <i>B. pentodonta</i>	49
Figura 14 - Numeração atribuída às estruturas químicas do α -cadinol (18) e (+)-torreiol (23).	51
Figura 15 - Numeração atribuída às estruturas químicas do epiglobulol (24) e do viridiflorol (25).	53
Figura 16 - Comparação entre os espectros dos óleos essenciais das folhas e inflorescências dos espécimes masculinos e femininos de <i>B. rufescens</i>	57
Figura 17 - Estruturas químicas do (<i>E</i>)-nerolidol (17) e 4,7(11)-amorfadien-8-ona (26).	57

Figura 18 - Espectro de IV do óleo essencial das folhas com inflorescências do espécime feminino (BRFF).....	57
Figura 19 - Espectro de IV do óleo essencial das folhas do espécime feminino (BRLF).....	58
Figura 20 - Espectro de IV do óleo essencial das folhas com inflorescências do espécime masculino (BRFM).....	58
Figura 21 - Espectro de IV do óleo essencial das folhas do espécime masculino (BRLM).	58
Figura 22 - Espectro de massas da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (26).....	59
Figura 23 - Espectros de UV-Vis dos óleos essenciais de <i>B. rufescens</i>	60
Figura 24 - Estruturas químicas da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (26) com a numeração recomendada pela IUPAC (1999) e de seu derivado biossintético (+)- α -copaen-8-ona (27).....	62
Figura 25 - Estruturas químicas do espatulenol (7) e (<i>E</i>)-nerolidol (17).....	65
Figura 26 - Espectros de UV-Vis do extrato obtido com AcOEt em pH = 8.....	69
Figura 27 - Espectro de infravermelho do eriodictiol (22) isolado medido em KBr.	70
Figura 28 - Estrutura química da substância (22) e os espectros de RMN de ¹ H e de ¹³ C medidos em CD ₃ OD em equipamento de 400MHz do eriodictiol (22) isolado do extrato acetato de etila em pH = 8 de <i>B. tridentata</i>	71
Figura 29 - Espectros UV-Vis do extrato AcOEt em pH = 4 com uso dos reagentes recomendados para análise de flavonoides segundo Markham (1982). ..	72
Figura 30 - Estruturas químicas dos derivados de ácidos cafeoilquínicos do extrato em pH = 4 de <i>B. tridentata</i>	73
Figura 31 - Espectros dos óleos essenciais das partes aéreas de <i>B. tridentata</i>	76
Figura 32 - Espectros de UV-Vis dos óleos essenciais das partes aéreas de <i>B. tridentata</i> dos espécimes masculinos e femininos.....	77
Figura 33 - Estrutura química do óxido de cariofileno (9).....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados das coletas de cada material vegetal.....	35
Tabela 2 - Rendimento dos óleos essenciais das triplicatas dos óleos essenciais de <i>B. pentodonta</i> , <i>B. rufescens</i> e <i>B. tridentata</i>	36
Tabela 3 - Frações da coluna cromatográfica do isolamento do extrato de BTL em AcOEt/pH8.	40
Tabela 4 - Frações da coluna cromatográfica do isolamento do óleo essencial de <i>B. rufescens</i>	42
Tabela 5 - Composição química dos óleos essenciais de folhas e inflorescências de <i>B. pentodonta</i> feminina.....	46
Tabela 6 - Composição química dos óleos essenciais de <i>B. pentodonta</i> masculina.....	47
Tabela 7 - Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C do α-cadinol (18) presente nas amostras de óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos de <i>B. pentodonta</i> comparados com os dados da literatura.	50
Tabela 8 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C do (+)-torreiol (23) presente nas amostras de óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos de <i>B. pentodonta</i>	51
Tabela 9 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C do epiglobulol (24) presente nas amostras de óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos de <i>B. pentodonta</i>	52
Tabela 10 - Valores dos deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C do viridiflorol (25) presente nas amostras de óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos de <i>B. pentodonta</i>	53
Tabela 11 - Valores dos deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C do espatulenol (7) presente nas amostras de óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos de <i>B. pentodonta</i>	53
Tabela 12 - Composição química dos óleos essenciais de <i>B. rufescens</i>	55
Tabela 13 - Absorções no espectro de infravermelho dos óleos essenciais de <i>B. rufescens</i>	59
Tabela 14 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C confirmando a identificação da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (26) como composto majoritário (53,28%) no óleo essencial de espécimes masculinos de <i>B. rufescens</i> ...	62

Tabela 15 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do (<i>E</i>)-nerolidol (17) presente nas amostras de óleos essenciais de espécimes femininos e masculinos de <i>B. rufescens</i>	62
Tabela 16 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C do espatulenol (7) isolado do óleo essencial de <i>B. rufescens</i> comparados com dados da literatura.	64
Tabela 17 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C do (<i>E</i>)-nerolidol (17) isolado do óleo essencial de <i>B. rufescens</i> comparados com dados da literatura.	64
Tabela 18 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (26) isolada do óleo essencial de <i>B. rufescens</i>	66
Tabela 19 - Análise do óleo essencial das folhas de <i>B. tridentata</i>	67
Tabela 20 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do eriodictiol (22) presente no extrato AcOEt em pH=8 de <i>B. tridentata</i> e de (22) isolado em comparação com dados publicados.	70
Tabela 21 - Composição química dos óleos essenciais de <i>B. tridentata</i>	75
Tabela 22 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do óxido de cariofileno (9) presente na amostra do óleo essencial das partes aéreas de espécimes masculinos de <i>B. tridentata</i>	78
Tabela 23 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do espatulenol (7) presente na amostra do óleo essencial das partes aéreas de espécimes masculinos de <i>B. tridentata</i>	78
Tabela 24 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do (+)-torreiol (23) presente na amostra do óleo essencial das partes aéreas de espécimes masculinos de <i>B. tridentata</i>	78

LISTA DE SIGLAS

AcOEt _{pH4}	Extrato acetato de etila em pH = 4
AcOEt _{pH8}	Extrato acetato de etila em pH = 8
BPLF	<i>Baccharis pentodonta</i> folhas de espécimes femininos
BPFF	<i>Baccharis pentodonta</i> inflorescências de espécimes femininos
BPLM	<i>Baccharis pentodonta</i> folhas de espécimes masculinos
BPFM	<i>Baccharis pentodonta</i> inflorescências de espécimes masculinos
BRLF	<i>Baccharis rufescens</i> folhas de espécimes femininos
BRFF	<i>Baccharis rufescens</i> folhas contendo inflorescências de espécimes femininos
BRLM	<i>Baccharis rufescens</i> folhas de espécimes masculinos
BRFM	<i>Baccharis rufescens</i> folhas contendo inflorescências de espécimes masculinos
BTL	<i>Baccharis tridentata</i> folhas
BTPaF	<i>Baccharis tridentata</i> partes aéreas de espécimes femininos
BTPaM	<i>Baccharis tridentata</i> partes aéreas de espécimes masculinos
CCD	Cromatografia de camada delgada
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG-EM-DIC	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com detector de ionização de chama
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DEPT	<i>Distortionless enhancement of polarization transfer</i>
d	Dubleto
dl	Dubleto largo
gCOSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
gHSQC	<i>Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HIV-1	Sub-categoria 1 do vírus HIV
HIV-2	Sub-categoria 2 do vírus HIV
IRR _{cal} *	Média dos índices de retenção relativa calculado
IRR _{lit}	Índice de retenção relativo publicados
ISO	<i>International Standard Organization</i>
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento

m	Multipeto
RMN de ^1H	Ressonância magnética nuclear de próton
RMN de ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN 1D	Ressonância magnética nuclear de uma dimensão
RMN 2D	Ressonância magnética nuclear de duas dimensões
<i>R_f</i>	Fator de retenção
s	Singleto
sl	Singleto largo
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visível
λ	Comprimentos de onda
δ	Deslocamento químico
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 GÊNERO <i>Baccharis</i> L.	16
1.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	18
1.3 ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES <i>Baccharis</i>	19
1.4 SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DE <i>Baccharis</i>	23
1.5 <i>Baccharis pentodonta</i> , <i>Baccharis rufescens</i> E <i>Baccharis tridentata</i>	24
2 JUSTIFICATIVA	28
3 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA	29
4 HIPÓTESES	30
5 OBJETIVOS	31
5.1 OBJETIVO GERAL	31
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
6 EQUIPAMENTOS E REAGENTES	32
7 MÉTODO	34
7.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PREPARO DE MATERIAIS VEGETAIS.....	34
7.2 OBTENÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	35
7.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>B. tridentata</i>	36
7.4.1 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ACETATO DE ETILA EM pH = 8 DE <i>B. tridentata</i>	38
7.5 FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis rufescens</i>	40
8 DADOS ESPECTROMÉTRICOS	43
8.1 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis pentodonta</i>	43
8.2 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis rufescens</i>	43
8.3 FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis rufescens</i>	44
8.4 SUBSTÂNCIAS NEUTRAS DE <i>Baccharis tridentata</i>	44
8.5 ÁCIDOS ORGÂNICOS DE <i>Baccharis tridentata</i>	44
8.6 ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis tridentata</i>	44
9 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
9.1 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Baccharis pentodonta</i>	45
9.2 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Baccharis rufescens</i>	54
9.2.1 FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis rufescens</i>	63
9.3 ESTUDO QUÍMICO PRELIMINAR DAS FOLHAS DE <i>Baccharis tridentata</i>	66
9.3.1 ESTUDO PRELIMINAR DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Baccharis tridentata</i>	67

9.3.2 ESTUDO DAS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS NEUTRAS DE <i>Baccharis tridentata</i>	68
9.3.3 ESTUDO PRELIMINAR DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS DE <i>Baccharis tridentata</i>	72
9.4 ÓLEOS DE ESPÉCIMES MASCULINOS E FEMININOS DE <i>Baccharis tridentata</i>	74
10 CONCLUSÕES	80
11 REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO 1 - Espectro de RMN de ¹³ C do óleo essencial das inflorescências dos espécimes masculinos de <i>B. pentodonta</i> , amostra BPFM2 (item 9.1).	94
ANEXO 2 - Ampliações do espectro de RMN de ¹³ C do óleo essencial das inflorescências dos espécimes masculinos de <i>B. pentodonta</i> , amostra BPFM2 (item 9.1).	95
ANEXO 3 - Espectro de RMN de ¹³ C DEPT 135 do óleo essencial das inflorescências de espécimes masculinos de <i>B. pentodonta</i> , amostra BPFM2 (item 9.1).	99
ANEXO 4 - Ampliações do espectro de RMN de ¹³ C DEPT 135 do óleo essencial das inflorescências de espécimes masculinos de <i>B. pentodonta</i> , amostra BPFM2 (item 9.1).	100
ANEXO 5 - Espectro de RMN de ¹³ C do óleo essencial das folhas contendo inflorescências de espécimes masculinos de <i>B. rufescens</i> , amostra BRFM (item 9.2).	102
ANEXO 6 - Espectro de RMN de ¹³ C DEPT 135 do óleo essencial das folhas contendo inflorescências de espécimes masculinos de <i>B. rufescens</i> , amostra BRFM (item 9.2).	103
ANEXO 7 - Espectro de RMN de ¹³ C do espatulenol (7) isolado do óleo essencial de <i>B. rufescens</i> (item 9.2.1).	104
ANEXO 8 - Espectro de RMN de ¹³ C DEPT 135 do espatulenol (7) isolado do óleo essencial de <i>B. rufescens</i> (item 9.2.1).	105
ANEXO 9 - Espectro de RMN de ¹ H do espatulenol (7) isolado do óleo essencial de <i>B. rufescens</i> (item 9.2.1).	106
ANEXO 10 - Espectro de RMN de ¹³ C do (<i>E</i>)-nerolidol (17) isolado do óleo essencial de <i>B. rufescens</i> (item 9.2.1).	107
ANEXO 11 - Espectro de RMN de ¹³ C DEPT 135 do (<i>E</i>)-nerolidol (17) isolado do óleo essencial de <i>B. rufescens</i> (item 9.2.1).	108

ANEXO 12 - Espectro de RMN de ^1H do (<i>E</i>)-nerolidol (17) isolado do óleo essencial de <i>B. rufescens</i> (item 9.2.1).	109
ANEXO 13 - Espectro de RMN de ^{13}C , DEPT 135 e DEPT 90 da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (26) isolada do óleo essencial de <i>B. rufescens</i> (item 9.2.1).....	110
ANEXO 14 - Espectro de RMN gCOSY da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (26) isolada do óleo essencial de <i>B. rufescens</i> (item 9.2.1).....	111
ANEXO 15 - Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD dos derivados de ácidos cafeoilquínicos isolados do extrato em acetato de etila em pH = 4 de <i>B. tridentata</i> (item 9.3.3).	112
ANEXO 16 - Espectro de RMN de ^{13}C em CD_3OD dos derivados de ácidos cafeoilquínicos isolados do extrato em acetato de etila em pH = 4 de <i>B. tridentata</i> (item 9.3.3).	113
ANEXO 17 - Espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das partes aéreas de espécimes masculinos de <i>B. tridentata</i> , amostra BTPaM3 (item 9.4).	114
ANEXO 18 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 do óleo essencial das partes aéreas de espécimes masculinos de <i>B. tridentata</i> , amostra BTPaM3 (item 9.4). ...	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 GÊNERO *Baccharis* L.

Pertence à tribo *Asterae* e à subtribo *Baccharidinae*, exclusivamente americana e constituída pelos gêneros *Archibaccharis* e *Baccharis*, que é caracterizado botanicamente por apresentar espécimes na forma de arbustos ou pequenas árvores. O gênero *Baccharis* predomina na América do Sul com aproximadamente 400 espécies que estão distribuídas em grande parte na Argentina, Colômbia, Chile, México e Brasil, sendo 120 delas de ocorrência brasileira (GIULIANO, 2001; LAGO; ROMOFF; FÁVERO, 2008; MÜLLER, 2006). A alta concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que uma dessas áreas é o provável centro de origem desse gênero (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

As espécies do gênero podem ser agrupadas de acordo com a morfologia das flores e folhas. Geralmente estas plantas possuem caule, ramos cilíndricos e ramificados com altura variando de 50 cm a 4 m de altura, apresentando folhas sésseis (BARROSO, 1976).

Estas espécies possuem alto valor sócio-econômico, com ampla dispersão em várias regiões do país, onde grande número delas é utilizado na medicina popular para controle ou tratamento de várias doenças (CORRÊA, 1984). Geralmente são usadas como infusões ou decocções para fins medicinais ou em menor extensão como alimento ou matéria-prima para diferentes indústrias (MARTINEZ; BESSA; BENTO, 2005).

Por exemplo, *Baccharis trimera* conhecida popularmente como carqueja, apresenta atividades hepatoprotetora, anti-inflamatória, bacteriostática, analgésica, bactericida, moluscicida, antiproteolítica, anti-hemorrágica contra veneno de cobra e antidiabética (GENÉ et al., 1996; TORRES et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2004; BUDEL; DUARTE, 2009).

No estudo realizado por Sens (2002) com os índios Xokleng da Terra Indígena Ibirama, na região do Alto Vale do Itajaí no estado de Santa Catarina, com o objetivo de tornar possível a escolha de meios adequados para a auto sustentação dos Xokleng por meio do estudo das suas plantas medicinais mostrou que, dentre as

várias espécies de plantas existentes naquele local, a *Baccharis elaeagnoides* Steud. ex Sch. Bip., conhecida como vassourinha, é utilizada em forma de chá para banhar-se nos locais afetados pela sarna. Já a *Baccharis uncinella* DC. (vassoura-do-campo) é consumida sob a forma de chá, quente ou frio, como regulador da pressão e como calmante.

A *Baccharis dracunculifolia* DC., popularmente conhecida como alecrim-do-campo, é utilizada na medicina popular para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, sintomas febris e debilidade orgânica (BUDEL et al., 2004).

Por outro lado, o estudo realizado por Alda e colaboradores (2009) descreve um surto de intoxicação espontânea por *Baccharis coridifolia* em equinos. A intoxicação ocorreu no estado do Paraná numa área em que a planta estava em brotação. Os animais apresentaram inicialmente desconforto abdominal, aumento da frequência cardíaca e nos movimentos respiratórios, anorexia, hipermotilidade do intestino delgado e cólon, presença de gás no ceco e diarreia. A evolução da enfermidade variou de 18-36 horas, sendo que um dos animais afetados sobreviveu após tratamento sintomático.

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, pelos efeitos medicinais que produzem (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002). Os extratos de várias espécies de *Baccharis* têm demonstrado bioatividades variadas: antiinflamatório, antimicrobiano, antiviral (HIV), antisséptico, alelopático, citotóxico, gastroprotetor, antirreumático e diurético (SIQUEIRA; ALICE; THIESEN, 1988; CEÑAL et al., 1997; NASCIMENTO et al., 2007; BUDEL; DUARTE, 2009).

A família Asteraceae vem sendo intensivamente estudada quanto à sua morfologia, anatomia, ecologia, composição química e atividade biológica (HATTORI; NAKAJIMA, 2008). Estes trabalhos científicos realizados com espécies da família Asteraceae apresentaram o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários com destaque para os flavonoides, monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; ABAD; BERMEJO, 2007).

1.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produto de excreção do vegetal, com estruturas químicas variadas e, algumas vezes, propriedades biológicas intensas. Atualmente, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação da planta produtora ao seu meio. De fato, já foram reconhecidas como funções de várias substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos, tais como, defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e participação em alelopatias (SANTOS, 2003).

Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante e, portanto, a sua biossíntese é frequentemente afetada por condições ambientais. Entre os principais fatores que podem alterar a taxa de produção desses metabólitos são: a sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação UV, nutrientes, poluição atmosférica, altitude, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, variações decorrentes do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Devido à crescente popularidade dos medicamentos fitoterápicos a presença de moléculas bioativas em plantas de interesse medicinal tem sido amplamente estudadas nos últimos anos por meio de análises químicas, isolamento, determinação de processos de obtenção e atividades biológicas (DINIZ; ASTARITA; SANTARÉM, 2007; HENNIG et al., 2011).

Nas *Baccharis* ocorrem várias classes de metabólitos secundários, mas apenas cerca de 15% das espécies foram estudadas do ponto de vista fitoquímico e poucas delas têm estudos mais completos (AGOSTINI et al., 2005).

Os metabólitos secundários mais abundantes nessas espécies são os flavonoides (BIANCHI et al., 1993; GIANELLO et al., 2000; SHARP et al., 2001; BESTEN, 2012), monoterpenos e sesquiterpenos (FERRACINI et al., 1995; COBOS et al., 2001; AGOSTINI et al., 2005; MENDES, 2007; BESTEN, 2012), diterpenos (FULLAS et al., 1991; GIANELLO et al., 2000), taninos (SÁ; NEVES, 1996; ORTINS; AKISUE, 2000; FRIZZO et al., 2001) e saponinas (BIANCHI, 1993; ORTINS; AKISUE, 2000). Aproximadamente 120 espécies do gênero foram estudadas e, pelo

menos, 30 delas tiveram as atividades biológicas testadas. Os resultados mais relevantes encontrados nessas pesquisas foram os de atividades referentes a efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos e anti-inflamatórios (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

1.3 ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES *Baccharis*

O mercado internacional de óleos essenciais movimenta anualmente aproximadamente 1,8 milhões de dólares, e a participação brasileira nesse mercado é pequena, de apenas 0,1%, concentrada basicamente sobre os óleos cítricos, que são subprodutos da produção de suco concentrado de laranja. A grande biodiversidade brasileira, ainda pouco explorada em relação à composição química da sua flora, coloca o Brasil numa situação muito promissora para aumentar a sua participação futura no mercado dos óleos essenciais. Diversas espécies nativas brasileiras, ainda em pequena escala, já estão sendo exploradas para a extração de óleos essenciais, utilizados pela indústria de perfumaria e cosméticos na fabricação de produtos para o mercado interno e externo (NASCIMENTO et al., 2007; BIASI; DESCHAMPS, 2009).

O cultivo de espécies aromáticas tem aumentado para a obtenção de óleos essenciais que são amplamente utilizados como fragrância em cosméticos, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica, como, por exemplo: detergentes, sabões, repelentes de insetos e aromatizantes de ambiente, além de seu emprego como intermediários sintéticos de perfumes (WOOLF, 1999).

Óleos essenciais são líquidos oleosos que se volatilizam quando expostos ao ar, também são conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos (denominação referente à solubilidade em solventes orgânicos apolares, como o éter) ou simplesmente essências (VITTI; BRITO, 2003; LAHLOU, 2004).

São produzidos por estruturas secretoras especializadas (pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou bolsas específicas), tais estruturas podem estar localizadas em algumas partes específicas ou em toda a planta, como: partes aéreas em geral, ou flores, folhas, frutos, madeira, cascas do caule, raízes, rizomas e sementes. Ainda, os óleos essenciais obtidos de diferentes

órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores distintos (SIMÕES; SPITZER, 2003).

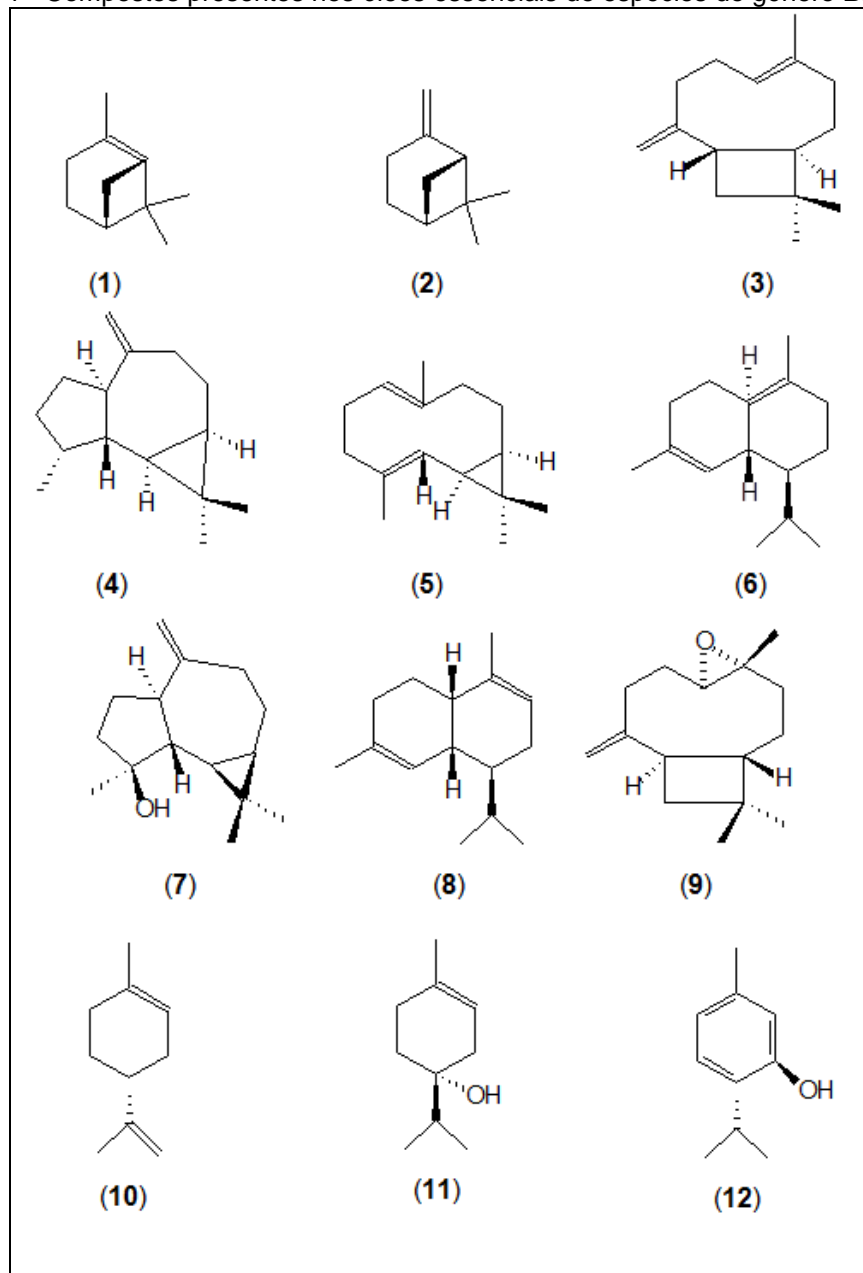
Quimicamente, são constituídos principalmente por monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), fenilpropanóides e outras substâncias de baixo peso molecular. Normalmente são usados *in natura*, como misturas, pois as propriedades organolépticas estão associadas a vários componentes que formam o *bouquet* de cada óleo em particular (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Os estudos de óleos essenciais de espécies de *Baccharis* são geralmente realizados com o objetivo de pesquisar novas matérias - primas para a indústria de fragrâncias ou para avaliar suas interações com micro-organismos. Estimasse que acima de 50 espécies desse gênero tiveram as composições dos seus óleos essenciais estudadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (ASCARI, 2007; MENDES et al., 2008; ASCARI et al., 2009).

Na pesquisa realizada por LAGO e colaboradores (2008) sobre a composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* da Mata Atlântica Paulista, foram identificados 67 compostos e apenas seis foram detectados simultaneamente em quatro ou cinco espécies. A Figura 1 apresenta as estruturas químicas dos componentes identificados nos óleos essenciais das folhas: o α -pineno (1) (*Baccharis microdonta*, *Baccharis regnelli*, *Baccharis schultzii*, *B. trimera* e *B. uncinella*), o β -pineno (2) (*B. dracunculifolia*, *B. microdonta*, *B. schultzii* e *B. uncinella*), o β -cariofileno (3) (*B. dracunculifolia*, *B. microdonta*, *B. schultzii* e *B. uncinella*), o aromadendreno (4) (*B. dracunculifolia*, *B. microdonta*, *B. trimera* e *B. uncinella*), o biciclogermacreno (5) (*B. dracunculifolia*, *B. microdonta*, *B. regnelli*, *B. schultzii* e *B. trimera*) e o δ -cadineno (6) (*B. microdonta*, *B. regnelli*, *B. schultzii* e *B. uncinella*). Esses resultados mostram diversos componentes voláteis majoritários ocorrendo em várias espécies vegetais.

Os óleos essenciais apresentaram grandes diferenças de composição em duas amostras de *Baccharis semiserrata* coletadas no estado do Rio Grande do Sul, em diferentes localidades e em diferentes períodos. Tiveram o espatulenol (7) (Figura 1) como seu principal constituinte, em proporções de 15,5 e 25,5% e conteúdo de monoterpenos entre 14,4 e 35,6% (AGOSTINI et al., 2005).

Figura 1 - Compostos presentes nos óleos essenciais de espécies do gênero *Baccharis*



Fonte: PHEROBASE, 2013.

No entanto, os óleos essenciais das folhas de espécimes femininos e masculinos de *B. semiserrata*, coletadas no estado do Paraná, apresentaram baixo conteúdo em monoterpenos, e o sesquiterpeno espatulenol (7) como seu componente principal, atingindo 50,75% no óleo do espécime masculino, e 42,65% no óleo do espécime feminino. Os outros sesquiterpenos majoritários encontrados foram o aromadendreno (9,61-2,33%), α -muuroleno (8) (8,88-2,38%) e δ -cadineno (9,52-3,93%) (MENDES et al., 2008). As razões para as diferenças encontradas nas

composições mencionadas podem estar relacionadas a questões genéticas e ambientais que não foram ainda estudadas.

Para quatro amostras de folhas de *B. uncinella* provenientes dos Campos Gerais do Paraná, sendo duas amostras de espécimes femininos e duas de espécimes masculinos, as composições químicas dos óleos essenciais mostraram-se muito similares. São caracterizados pela baixa proporção de monoterpenos e presença dos sesquiterpenos β -cariofileno, espatulenol e óxido de cariofileno (9) como principais componentes (JASINSKI, 2010).

Na pesquisa realizada por Besten (2012), das análises dos óleos essenciais das três espécies da seção Caulopterae: *B. trimera*, *Baccharis milleflora* e *Baccharis pentaptera*, verificou-se que os metabólitos secundários dessas espécies são distintos, e que a principal variação dentro de uma espécie se relaciona com o órgão da planta e na maioria dos casos não há diferenças entre espécimes masculinos e femininos.

Os óleos essenciais do gênero *Baccharis* também são estudados quanto à sua capacidade de interação com os microrganismos e atividade biológica (testes *in vivo* e *in vitro*). Na pesquisa realizada por LOSQUI e colaboradores (2009), avaliou-se a ação do óleo essencial de *B. trimera* sobre a cultura de células do sistema nervoso central, onde utilizaram células de retina de ratos neonatos tratadas pelo óleo de carqueja em concentrações e períodos de incubação diferentes. Observaram que a carqueja possui ação inibitória na diferenciação de células neuronais *in vitro* quando tratadas cronicamente e também uma redução na sobrevivência de células neuronais e diminuição da proliferação de células gliais.

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresenta atividade antimicrobiana sobre as bactérias cariogênicas (FERRONATTO et al., 2007) e também, apresentou atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania donovani* e alta atividade no ensaio esquistossomicida (PARREIRA et al., 2010).

O óleo essencial de *Baccharis darwinii* possui propriedades antifúngica e inseticida contra *T. infestans* e *C. capitata* que podem ser relacionadas ao elevado teor de D-limoneno (10), terpinen-4-ol (11) e timol (12) (Figura 1). A magnitude dos efeitos dos óleos depende da concentração dos componentes principais enquanto que os componentes minoritários têm papel modulador (KURDELAS et al., 2012).

1.4 SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS DE *Baccharis*

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas à açúcares e proteínas, os quais estão divididos em duas categorias principais: fenóis e flavonoides (MALACRIDA; MOTTA, 2005; SOUSA et al., 2007).

As atividades antimicrobianas de várias espécies do gênero *Baccharis* têm sido relacionadas à presença de flavonoides, isoflavonoides e biflavonas. Os flavonoides são os compostos de maior ocorrência, sendo considerados bons marcadores quimiotaxonômicos para os mais baixos níveis hierárquicos da família Asteraceae (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

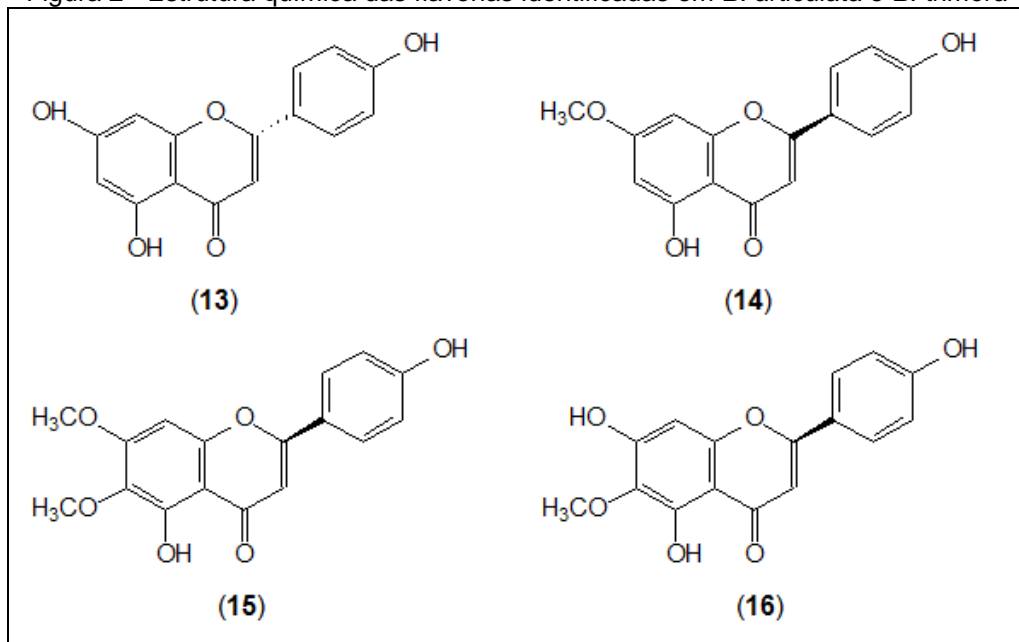
A apigenina (**13**) e genkwanina (**14**) são exemplos de fortes agentes antimicrobianos encontrados em extratos de *Baccharis articulata* (Figura 2). Uma das suas funções nas plantas é a de oferecer proteção contra a radiação UV, além de atuarem como atrativos para insetos e agentes polinizadores, tendo uma função ecológica de garantir a preservação de espécies nativas (VERÁSTEGUI et al., 1996; PRATT; MATHEWS, 2005).

Na pesquisa realizada por Nakasugi e Komai (1998), os extratos metanólicos de *B. trimera* apresentaram quatro flavonas: (**13**), (**14**), cirsimarina (**15**) e hispidulina (**16**), apresentadas na Figura 2.

O extrato aquoso das partes aéreas de *B. uncinella* coletadas em Campos do Jordão levou ao isolamento de ácidos triterpenicos, flavonoides e derivados fenólicos (GRECCO et al, 2010). No entanto, o extrato aquoso de *B. uncinella* coletadas em Ponta Grossa é uma boa fonte de derivados de ácidos arilpropenóicos (ASCARI, 2007).

A ocorrência de ácidos cafeoilquínicos em espécies do gênero *Baccharis* tem sido verificada em poucas outras espécies: *B. dracunculifolia*, *B. trimera*, *Baccharis usterii* e *Baccharis crispa*. Os derivados de ácidos cafeoilquínicos possuem atividades farmacológicas associadas às doenças neurodegenerativas, anti HIV-1, HIV-2, vírus da herpes, bem como os potenciais antioxidante, hepatoprotetor, antibacteriano e anti-histamínico (SIMÕES-PIRES et al., 2005a; ABOY et al., 2012).

Figura 2 - Estrutura química das flavonas identificadas em *B. articulata* e *B. trimera*



Fonte: PHEROBASE, 2013.

Baccharis dracunculifolia possui interações com insetos, sendo considerada a fonte vegetal da chamada própolis verde produzida principalmente nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Uma característica dos compostos fenólicos da própolis verde e de *B. dracunculifolia* é a alta proporção de artepillina C e de outros derivados do ácido cinâmico (ALENCAR et al., 2005).

Dentre os estudos realizados com os óleos essenciais e extratos de várias espécies do gênero *Baccharis* estão os testes positivos de inibição de diversos microrganismos e testes farmacológicos que confirmam atividades relacionadas a usos na medicina popular (FERRONATTO et al., 2007).

1.5 *Baccharis pentodonta*, *Baccharis rufescens* E *Baccharis tridentata*

Nos estudos químicos e farmacológicos realizados por CIFUENTE et al. (2001) com as partes aéreas (Figura 3) de *B. rufescens* coletada na Argentina, a atividade anti-inflamatória dos extratos foi investigada em camundongos submetidos ao edema de pata induzido por carragenina. Os extratos acetônico e clorofórmico inibiram as fases agudas da inflamação neste modelo.

Numa série de estudos realizados com diversos grupos de étnicos bolivianos, foram correlacionados os resultados de testes *in vitro* e *in vivo*,

demonstrando-se que os extratos de *B. rufescens* possuem significativa atividade antimalárica (KOKOSKA; CUSIMMAMANI, 2008).

Dentre as atividades biológicas dos metabólitos secundários já isolados de *B. rufescens* destacam-se aquelas apresentadas pelos flavonoides. A (**15**) apresentou forte atividade antimicrobiana quando comparada com outros flavonoides (MISKI; ULUBELEN; JOHANSSON, 1983). O estudo das folhas dessa variedade levou ao isolamento dos flavonoides cirsimarina e cirsiol, ácido oleanólico e um diterpeno *ent*-kaureno, cujo derivado metilado mostrou significativa atividade diminuidora de apetite de besouros vermelhos da farinha (SIMIGIORTIS et al., 2003).

O óleo essencial das folhas de *B. rufescens* coletadas no Segundo Planalto do Paraná apresentou monoterpenos e sesquiterpenos em maiores proporções, constituídos principalmente por (*E*)-nerolidol (7,16%) (**17**), óxido de cariofileno (10,06%), α -cadinol (12,0%) (**18**) e espatulenol (16,3%) (Figura 4) (COLODEL et al., 2010a).

Figura 3 - Partes aéreas de *Baccharis rufescens*



Fonte: D.S. Nunes, 2011.

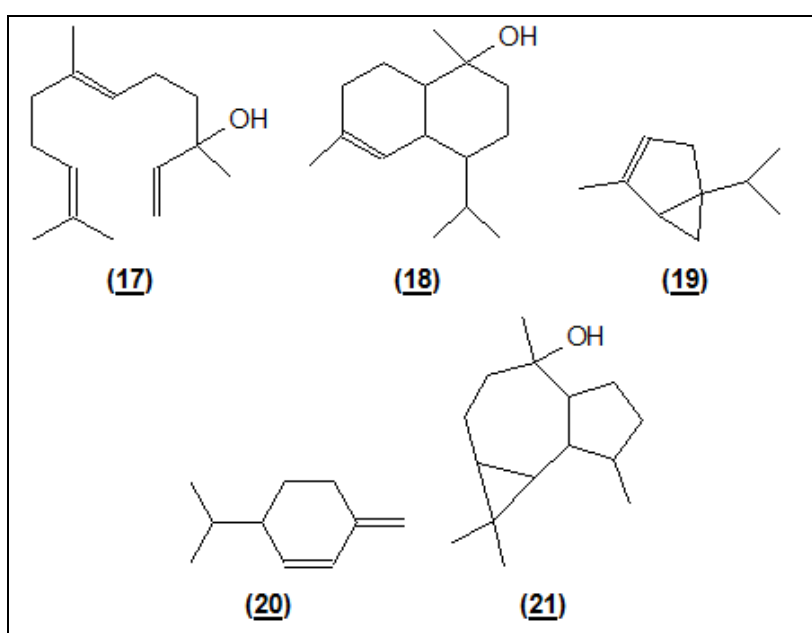
Na pesquisa realizada por Zunino e colaboradores (1998), a composição química dos óleos essenciais de *B. rufescens* apresentou como componentes majoritários o D-limoneno (**10**) (14,4%) e o (*E*)-nerolidol (14,5%) (**17**).

O óleo essencial das folhas de *B. tridentata* coletadas no Município de Itumirim, Minas Gerais, foi pesquisado quanto à sua composição química, atividade antioxidante, fungitóxica e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura.

Foram identificadas 28 substâncias que constituem 93,14% da composição química do óleo essencial. O α -tujeno (**19**) apresentou-se como composto majoritário

(22,93%), seguido pelo β -pineno (20,33%) e β -felandreno (16,15%) (**20**) (SOUZA et al., 2011). Esses resultados não corroboram aqueles encontrados por Ferracini e colaboradores (1995), que estudando a composição química de várias espécies pertencentes ao gênero *Baccharis*, encontraram o espatulenol como constituinte majoritário (21,20%), seguido pelo δ -cadineno (7,68%) e globulol (5,86%) (**21**) como constituintes principais do óleo essencial de *B. tridentata* coletada em Santana do Riacho, Minas Gerais (Figura 4).

Figura 4 - Substâncias identificadas nos óleos essenciais de *B. rufescens* e *B. tridentata*



Fonte: PHEROBASE, 2013.

Segundo SOUZA e colaboradores (2011), os resultados da avaliação antioxidante pelo teste de neutralização do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e pela inibição da oxidação do sistema acoplado β -caroteno/ácido linoleico não apresentaram atividade significativa. Os padrões timol e α -tocoferol exibiram atividades significativas com destaque para o α -tocoferol.

Com relação à atividade fungitóxica, demonstrou-se que pode vir a ser utilizada para o controle de fungos na agricultura e em frutos no período de pós-colheita. As estruturas nas quais os óleos essenciais são armazenados estão situadas na superfície foliar abaxial e adaxial da espécie, classificadas como tricomas glandulares do tipo peltado. São encontrados isolados ou agrupados, observados em ambas as faces baixa densidade dos mesmos, bem como a

ausência de pelos e grande quantidade de ceras situadas nas superfícies abaxial e adaxial.

No óleo essencial de *B. tridentata* (Figura 5) foi obtido a identificação de três novos derivados de cadineno por co-injeção do óleo com o padrões sintéticos e por comparação do padrão de fragmentação com dados da literatura (QUEIROGA; FERRACINI; MARSAIOLI, 1996).

Figura 5 - Partes aéreas de *Baccharis tridentata*



Fonte: D.S. Nunes, 2011.

Poucas pesquisas foram feitas em relação à composição química das espécies *B. rufescens* e *B. tridentata*. Para a espécie *B. pentodonta* (Figura 6) não existem relatos na literatura quanto a composição química dos seus extratos e do óleo essencial.

Figura 6 - Partes aéreas de *Baccharis pentodonta*



Fonte: D.S. Nunes, 2011.

2 JUSTIFICATIVA

Neste trabalho será realizado o estudo químico dos metabólitos secundários de espécimes masculinos e femininos de três espécies do gênero *Baccharis*. Alguns estudos realizados com *Baccharis rufescens* Spreng. demonstraram que seus metabólitos possuem atividade anti-inflamatória, antimalárica e atividade diminuidora de apetite de *Trilobium castaneum* (CIFUENTE et al., 2001; KOKOSKA; CUSIMMANI, 2008). O estudo químico das folhas de *B. rufescens* coletada na Argentina, levou ao isolamento dos flavonoides cirsimarina e cirsilol, ácido oleanólico e um diterpeno *ent*-kaurano (SIMIGIORTIS et al., 2003), enquanto pesquisas sobre a composição química do óleo essencial de folhas coletadas no Segundo Planalto do Paraná encontraram terpenos como componentes principais (COLODEL et al., 2010).

O óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl já foi pesquisado quanto à sua composição química e, varia conforme os locais de coleta. Foi avaliada também a sua atividade biológica apresentando atividades antioxidante e fungitóxica (FERRACINI et al., 1995; SOUZA et al., 2011; QUEIROGA; FERRACINI; MARSAIOLI, 1996). As espécies *B. rufescens* e *B. tridentata* são pouco estudadas e *Baccharis pentodonta* Malme não tem nenhum relato na literatura química.

A presença de moléculas bioativas em plantas de interesse medicinal tem sido amplamente estudada nos últimos anos por meio de análises químicas e atividades biológicas, devido à crescente popularidade dos medicamentos fitoterápicos (HENNIG et al., 2011; DINIZ et al., 2007). Em geral, os espécimes masculinos e femininos apresentam composições químicas muito similares, quando se faz uso de recomendações específicas para as coletas e preparo dos materiais. As coletas dos espécimes masculinos e femininos devem ser realizadas no mesmo local e na mesma hora, eliminando-se dessa forma a maioria dos fatores que influenciam sobre o metabolismo secundário (BESTEN et al., 2012).

Os principais fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários são a sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação UV, nutrientes, poluição atmosférica, altitude, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos, variações decorrentes do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos (GOBBONETO; LOPES, 2007).

3 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA

Num primeiro instante foi definido o estudo de apenas duas espécies do gênero *Baccharis*: *B. tridentata* e *B. pentodonta* quanto à composição química dos espécimes masculinos e femininos, folhas e inflorescências. Ao observar que na literatura existem poucos relatos de pesquisas da composição química do óleo essencial de *B. rufescens*, esta espécie foi inserida no projeto de pesquisa, com objetivo de obter mais informações sobre os metabólitos secundários presentes nas espécies do gênero *Baccharis*, incluindo espécimes masculinos e femininos.

Os óleos essenciais foram obtidos pela técnica de hidrodestilação e as águas restantes após as hidrodestilações foram extraídas com clorofórmio (para obter extratos com terpenóides); acetato de etila em pH = 8 (para obter extratos flavonoídicos) e com acetato de etila em pH = 4 (para obter extratos contendo ácidos).

Os compostos voláteis foram analisados por CG-EM-DIC. Um flavonoide presente no extrato AcOEt em pH = 8 de *B. tridentata* foi isolado por cromatografia em coluna. Os óleos de *B. rufescens* dos espécimes masculinos foram fracionados e posteriormente as frações foram analisadas por CCD e RMN de ^1H e de ^{13}C .

Os componentes químicos das três espécies do gênero *Baccharis* foram analisados por técnicas de cromatografia de camada delgada e por técnicas espectroscópicas de UV-Vis, Infravermelho e RMN de ^1H e de ^{13}C .

As plantas foram coletadas em locais próximos ao Campus, na Rodovia PR-513, Ponta Grossa – Itaiacoca, e identificadas no Herbário do Museu Botânico de Curitiba.

4 HIPÓTESES

A principal hipótese neste estudo refere-se às semelhanças ou diferenças entre os espécimes masculinos e femininos, inflorescências e folhas das espécies *B. pentodonta*, *B. rufescens* e *B. tridentata* quando comparados com pesquisas já realizadas sobre *B. rufescens* e *B. tridentata*, podendo contribuir significativamente na diferenciação dos espécimes.

A espécie *B. pentodonta* ainda não possui estudos químicos sobre os metabólitos secundários do óleo essencial. Tem-se a possibilidade de contribuir com informações relevantes para possíveis aplicações em fármacos fitoterápicos; fragrância em cosméticos; intermediários sintéticos de perfumes; aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica.

Outra hipótese em questão é a possibilidade da separação de flavonoides e derivados do ácido cafeoilquínico em extratos específicos. E a possível identificação de compostos fenólicos presentes em *B. tridentata* utilizando métodos espectrométricos como UV-Vis, IV e RMN ^1H e ^{13}C .

Como existem vários fatores que contribuem para a alteração dos metabólitos secundários presentes nestas espécies vegetais, as coletas serão feitas no mesmo local, na mesma hora e em boas condições climáticas, durante o período de floração, para diminuir a importância dos fatores que causam variações. Será presumida a semelhança entre as composições de óleos essenciais obtidos de folhas ou de inflorescências de espécimes masculinos e femininos, tanto de *B. tridentata* como de *B. pentodonta*.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Estudar quimicamente os metabólitos secundários de espécimes masculinos e femininos, inflorescências e folhas de três espécies do gênero *Baccharis*: *B. pentodonta*, *B. rufescens* e *B. tridentata*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a hidrodestilação de inflorescências e folhas de espécimes masculinos e femininos de *B. pentodonta* e de *B. tridentata*, folhas e folhas contendo inflorescências de *B. rufescens* para a obtenção e análise de seus óleos essenciais;
- Realizar a hidrodestilação de folhas de *B. tridentata* para a obtenção e análise de seus óleos essenciais e, posteriormente, seus extratos obtidos com clorofórmio, acetato de etila em pH = 4 e acetato de etila em pH = 8;
- Analisar por CG-EM-DIC a composição química dos óleos essenciais de *B. pentodonta*, *B. rufescens* e *B. tridentata*;
- Isolar os componentes dos óleos essenciais por cromatografia em coluna, sempre que necessário para a confirmação das identificações;
- Identificar flavonoides ou compostos neutros presentes nos extratos acetato de etila obtidos em pH = 8 e os ácidos cafeoilquínicos presentes nos extratos acetato de etila obtidos em pH = 4 de *B. tridentata*;
- Identificar os componentes químicos por técnicas espectroscópicas de UV-Vis, IV e RMN de ^1H e de ^{13}C .

6 EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Os reagentes e solventes utilizados tiveram procedências variadas: Nuclear®, Merck®, Reagen® e Synth®. A água utilizada proveio do ultra purificador Gehaka com grau de pureza: Resistividade: 18,2 Mohm.cm a 25 °C; Condutividade: 0,054 µS/cm a 25 °C; TOC: < 3 PPB; Bactérias heterotróficas: < 0,1 UFC/mL; Partículas menores que 0,05 µm < 1 partícula/mL; Endotoxina: < 0,125 EU/mL (<0,001EU/mL com filtro apirogênico opcional).

As análises por espectrofotometria UV-Vis foram realizadas no espectrofotômetro CARY- 050 Varian®, utilizado o metanol como solvente e a concentração da amostra foi medida até obter absorvância inferior a 1,0. Os espectros foram medidos entre comprimentos de onda de 200 nm a 800 nm.

Os espectros de IV foram obtidos no equipamento da Shimadzu®, IR Prestige-21 com Transformada de Fourier, software IR Solution®, a partir de 2 mg de amostra em pastilhas de 100 mg de KBr na faixa de 3.900 cm⁻¹ a 450 cm⁻¹.em pastilhas de KBr.

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C dos óleos essenciais de *B. pentodonta*, *B. rufescens* e *B. tridentata* e dos componentes isolados de *B. rufescens* foram obtidos no espectrofotômetro da Bruker modelo AVIII400, operando a 400 MHz para frequência do ¹H e 100 MHz para ¹³C. Todos os espectros foram registrados utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interno. Utilizou-se ~40 mg de cada amostra e clorofórmio deuterado como solvente. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Herz (Hz). Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C dos extratos de acetato de etila em pH = 8 e pH = 4 obtidos das folhas de *B. tridentata* e da substância (**26**) foram registrados em espectrômetro BRUKER AC-200 (300 MHz) da Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI, com o TMS como referência e solvente deuterado (CDCl₃, CD₃OD). Utilizou-se também o espectrômetro da Universidade Estadual de Maringá, marca VARIAN modelo Mercury Plus BB, operando a 300,0 MHz para ¹H e 75,5 MHz para ¹³C, tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS), especialmente para obtenção de espectros de RMN 2D.

Ambas as análises de UV-Vis, IV e RMN ^1H e ^{13}C dos óleos essenciais de *B. pentodonta*, *B. rufescens* e *B. tridentata* e dos componentes isolados de *B. rufescens* foram efetuadas no Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

A cromatografia em camada delgada foi realizada em cromatofolhas de alumínio ou plástico preparada com sílica gel HF-254, Macharey & Nagel.

As amostras de óleo essencial de *B. rufescens* e o óleo essencial das folhas de *B. tridentata* foram analisadas por CG-EM-DIC num sistema composto por um cromatógrafo gasoso Varian[®] CP-3800 acoplado a um espectrômetro de massas Saturn[®], software Saturn[®] GC/MS Workstation 5.51, no Laboratório de Cromatografia da FURB.

Para a identificação qualitativa e quantitativa dos componentes presentes nos óleos essenciais de *B. rufescens* e de *B. tridentata* por CG-EM-DIC, as amostras foram diluídas em éter e injetando-se 1 μL , usando-se uma coluna capilar apolar CP-Sil-8-CB-Low-Bleed/MS de 30 m, 0,25 mm de diâmetro, filme de 0,25 μm de espessura e hélio como gás de arraste num fluxo de 1 mL/min, e o seguinte programa de aquecimento: temperatura do injetor de 250 °C; temperatura do forno de 60 °C por 3 min seguido de aquecimento de 5 °C/min até 220 °C, permanecendo aí por 15 min.

Os óleos essenciais de *B. pentodonta* e *B. tridentata* foram analisados em parceria com a Universidade Federal de Sergipe num cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A acoplado a Espectrômetro de massas QP5050A e a um Detector de Ionização de Chama. As amostras foram injetadas numa coluna capilar DB5-MS (30 m x 0,25 mm; espessura do filme 0,25 μm), temperatura do injetor: 250 °C; temperatura da interface: 300 °C; programação do forno: 60 °C (3 min) a 6 °C min^{-1} até 240 °C (5 min); foi utilizado Hélio como gás de arraste com fluxo constante de 1,2 mL min^{-1} ; injeção em modo *split* com razão de 1:50; espectrômetro operando em modo de varredura (*scan*) de 40 a 550 uma (unidades de massa atômica) por impacto de elétrons (70 eV).

7 MÉTODO

7.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PREPARO DE MATERIAIS VEGETAIS

Para a coleta de *B. pentodonta* foi observada a época de floração para serem obtidas as inflorescências dos espécimes femininos e masculinos. Deste material vegetal foram obtidas triplicatas das folhas femininas (BPLF); inflorescências femininas (BPFF); folhas masculinas (BPLM) e inflorescências masculinas (BPFM), totalizando 12 amostras para posteriores análises.

Para a coleta de *B. rufescens* também foi observada a época de floração e foram obtidas as folhas e inflorescências da espécie. Uma amostra de cada parte da planta foi separada: folhas femininas (BRLF); folhas com inflorescências femininas (BRFF); folhas masculinas (BRLM) e folhas com inflorescências masculinas (BRFM).

Uma amostra das folhas de *B. tridentata* foi coletada em janeiro de 2010 (BTL). E, outra coleta em dezembro de 2010, obtendo-se duas amostras das partes aéreas de espécimes femininos (BTPaF) e das partes aéreas de espécimes masculinos (BTPaM). Na Tabela 1 são apresentadas as datas das coletas de cada material vegetal, parte da planta coletada para a hidrodestilação com seus respectivos códigos que estão relacionados com o gênero, a espécie, o espécime masculino ou feminino e a parte da planta.

Cada uma das três espécies do gênero *Baccharis*, espécimes femininos e masculinos, folhas e inflorescências foram coletadas na Rodovia PR-513, Ponta Grossa – Itaiacoca, no mesmo dia e horário e em boas condições climáticas, livre de chuva e alta umidade. A coleta de todas as espécies foi realizada nas coordenadas: 25°08'25" sul 49°58'55" oeste, a 1060 m de altitude. A primeira coleta de *B. tridentata* (BTL) foi realizada em janeiro de 2010 na posição das coordenadas 25°05'22" sul 50°04'45" oeste, a 940 m de altitude.

Logo após as coletas, as amostras foram secadas à temperatura ambiente por dois dias, separando-se cuidadosamente as impurezas. Os materiais vegetais assim separados foram acondicionados em frascos hermeticamente fechados, em freezer a -18 °C, onde permaneceram até o dia da extração.

A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Gerth Hatschbach do Museu Botânico Municipal de Curitiba, onde as exsiccatas foram depositadas: *B. pentodonta* Malme (365395), *B. rufescens* Spreng. (931128) e *B. tridentata* Vahl (931136).

Tabela 1 - Dados das coletas de cada material vegetal

Data da coleta	Partes da planta coletada			Código da amostra
	Folhas	Flores	Partes aéreas	
21/03/2011	x	-	-	BPLF
	x	-	-	BPLM
	-	x	-	BPFF
	-	x	-	BPFM
21/03/2011	x	-	-	BRLF
	x	-	-	BRLM
	-	x	-	BRFF
	-	x	-	BRFM
21/12/2010	-	-	x	BTPaF
	-	-	x	BTPaM
01/2010	x	-	-	BTL

B. pentodonta: BPLF, folhas femininas; BPLM, folhas masculinas; BPFF, flores femininas; BPFM, flores masculinas. *B. rufescens*: BRLF, folhas femininas; BRLM, folhas masculinas; BRFF, folhas com inflorescências femininas; BRFM, folhas com inflorescências masculinas. *B. tridentata*: BTPaF, partes aéreas femininas; BTPaM, partes aéreas masculinas; BTL, folhas.

7.2 OBTENÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Aproximadamente 50 g de cada um dos materiais vegetais das três espécies (*B. pentodonta*, *B. rufescens* e *B. tridentata*) foram triturados em liquidificador e hidrodestilados por 2 horas e 30 minutos em um balão de 2 litros acoplado a uma aparelhagem de vidro conforme STAHL & SCHILD (1981) contendo aproximadamente 800 mL de água destilada. Os óleos essenciais foram recolhidos em éter etílico, decantando-se os restos de água e evaporando-se o solvente à temperatura ambiente. Após a evaporação do solvente os óleos foram pesados para obter seu rendimento e refrigerados à 7 °C para posteriormente serem analisados. Os rendimentos dos óleos essenciais foram calculados com relação à massa de material vegetal após a secagem (Tabela 2).

Tabela 2 - Rendimento dos óleos essenciais das triplicatas dos óleos essenciais de *B. pentodonta*, *B. rufescens* e *B. tridentata*.

AMOSTRA	MATERIAL VEGETAL (g)	RENDIMENTO (%)
BPFF1	18,10	0,39
BPFF2	18,10	0,37
BPFF3	18,40	0,31
BPLF1	30,90	0,21
BPLF2	28,80	0,34
BPLF3	29,10	0,33
BPFM1	27,10	0,33
BPFM2	27,30	0,34
BPFM3	27,40	0,37
BPLM1	45,40	0,29
BPLM2	44,50	0,40
BPLM3	44,60	0,34
BRFF	52,04	0,86
BRLF	34,81	0,80
BRFM	46,80	0,28
BRLM	38,96	0,48
BTL	38,00	0,57
BTPaF1	15,11	0,46
BTPaF2	19,70	0,51
BTPaF3	18,29	0,53
BTPaM1	13,15	0,53
BTPaM2	16,88	0,54
BTPaM3	15,30	0,47

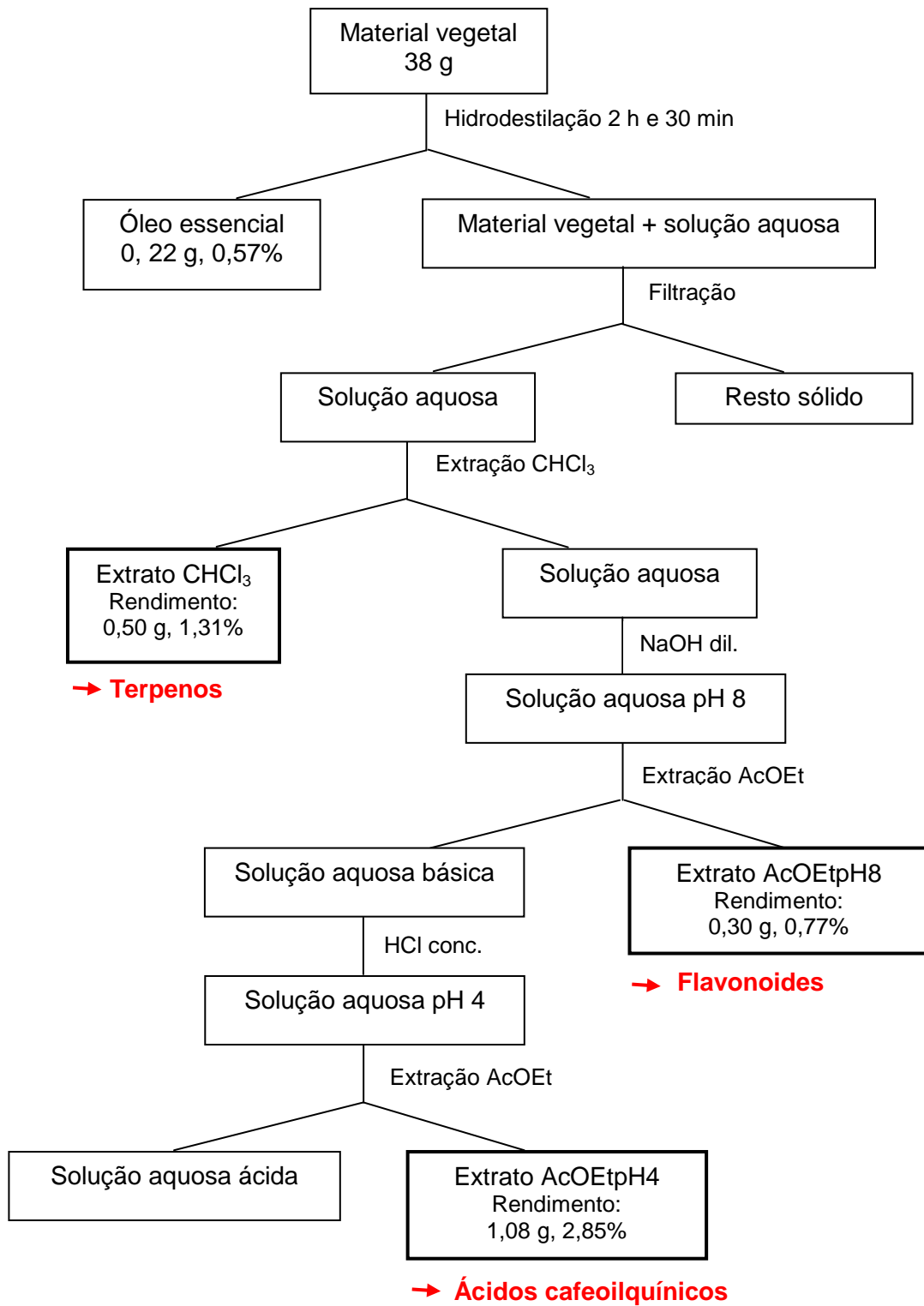
BPFF, inflorescências femininas; BPLF, folhas femininas; BPFM, inflorescências masculinas; BPLM, folhas masculinas; BRFF, folhas com inflorescências femininas; BRLF, folhas femininas separadas; BRFM, folhas com inflorescências masculinas; BRLM, folhas masculinas separadas. BTPaF, partes aéreas femininas; BTPaM, partes aéreas masculinas.

7.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO DE *B. tridentata*

Após a obtenção do óleo essencial das folhas de *B. tridentata* (BTL) a fase aquosa restante foi filtrada por papel de filtro realizando-se três extrações: a primeira com clorofórmio a fim de separar terpenóides; a segunda com acetato de etila em pH = 8 para obter flavonoides e a terceira com acetato de etila em pH = 4 para ácidos cafeoilquínicos.

A solução aquosa obtida da filtração foi primeiramente extraída com duas porções sucessivas de 200 mL de clorofórmio; a fase orgânica foi lavada e secada com Na₂SO₄ anidro, filtrada, concentrada em evaporador rotativo a vácuo e pesada, calculando-se o rendimento em relação à massa do material vegetal (Figura 7).

Figura 7 - Esquema de obtenção do óleo essencial e dos extratos em clorofórmio, AcOEt em pH ácido e básico de *B. tridentata*



Após as extrações com clorofórmio, foi medido o pH da solução aquosa restante e adicionado NaOH diluído com o objetivo de adquirir uma solução em pH = 8. A extração foi realizada em três porções sequenciais de 200 mL com acetato de etila. As fases orgânicas foram concentradas em evaporador rotativo e pesadas.

A solução aquosa básica restante foi acidificada com HCl concentrado até pH = 4 e extraída com quatro porções de 200 mL de acetato de etila e as fases orgânicas também foram reunidas e concentradas, obtendo-se o extrato acetato de etila em pH = 4. Os extratos obtidos em AcOEt em pH ácido e básico foram analisados no espectrofotômetro de UV-Vis, na faixa de comprimentos de onda de 200 a 450nm, utilizando metanol como solvente e os reagentes de deslocamento AcONa, H₃BO₃, solução saturada de AlCl₃ e HCl diluído, e os dados foram interpretados de acordo com a literatura (MARKHAN,1982).

Os extratos obtidos com AcOEt em pH = 8 e pH = 4 (40 mg de cada amostra) também foram analisados por RMN ¹H e ¹³C.

O fluxograma da Figura 7 representa esquematicamente o processo de obtenção do óleo essencial e posteriormente dos extratos em clorofórmio, acetato de etila em pH = 8 e acetato de etila em pH = 4.

7.4.1 COLUNA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA pH = 8 DE *B. tridentata*

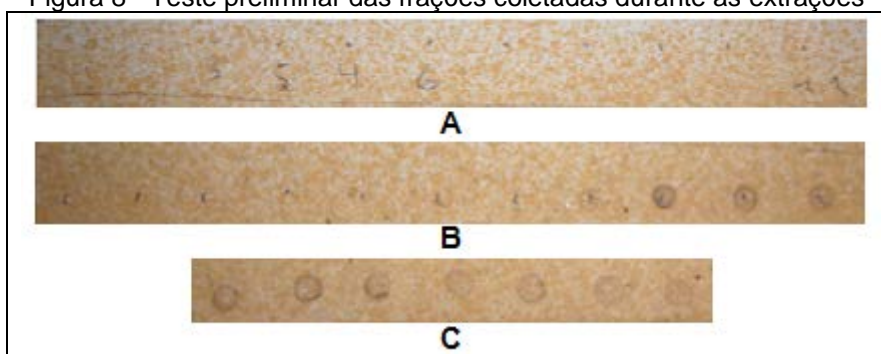
Para o isolamento da substância principal foram utilizados 100 g de sílica flash em uma coluna cromatográfica de 2,8 cm de diâmetro e 42,5 cm de altura. Pesou-se 250 mg do extrato que foi diluído com metanol e clorofórmio até o volume de 5 mL.

Inicialmente a suspensão da sílica foi preparada com 300 mL de clorofórmio e eluída com duas porções de 250 mL de clorofórmio/metanol 5% com fluxo de extração de 10 mL/47 s. Em seguida, mais duas porções de 250 mL de clorofórmio e metanol 10% até o final, recolhendo-se 47 frações de ~20 ml cada. Tanto no empacotamento como no desenvolvimento da coluna cromatográfica, foi usada uma pressão de até 7 psi.

As frações coletadas foram analisadas por CCD (Figura 8), utilizando-se irradiação sob luz UV em 250 e 360 nm e H₂SO₄/MeOH (1:1), seguido de aquecimento a 100°C por 10 min para visualização das manchas.

O eriodictiol (**22**) (Figura 28) foi observado entre as frações 19 e 29 obtendo-se 100 mg de rendimento. Para a análise por CCD (Figura 9) das frações reunidas utilizou-se placa de sílica HF 254 e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 10% como eluente. A placa foi observada sob luz UV e revelada com H_2SO_4 com aquecimento a 100°C por 10 min.

Figura 8 - Teste preliminar das frações coletadas durante as extrações



A: frações de 1 a 11; B: frações de 12 a 22; C: frações de 23 a 29.

O fator de retenção (R_f) calculado para as frações 19 a 29 da substância majoritária foi de 0,58.

Figura 9 - CCD de todas as frações reunidas



1: Frações 19 a 29; 2: Frações 30 a 34; 3: Fração 35; 4: Frações 36 a 37.

Na Tabela 3 estão relacionadas as frações com seus respectivos eluentes e rendimentos.

Tabela 3 - Frações da coluna cromatográfica do isolamento do extrato de BTL em AcOEt pH8

Frações	Eluente	Massa (mg)	Rendimento* (%)
19/29		100	0,25
30/34	CHCl ₃ /MeOH	71	0,18
35	10%	-	-
36/47		34	0,08

Rendimento em porcentagem calculado em relação ao extrato AcOEt obtido em pH = 8 (*B. tridentata*).

Os dados dos deslocamentos químicos e os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C (CD₃OD) da substância isolada estão apresentados no item 9.3.2, na Tabela 20, Figura 28 e Anexos 14 e 15.

7.5 FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis rufescens*

Uma análise preliminar por CCD foi realizada com o objetivo de determinar as condições da coluna cromatográfica para o isolamento das principais substâncias presentes no óleo essencial.

Os óleos de folhas e de folhas com inflorescências foram reunidos obtendo-se 87 mg de óleo essencial das partes aéreas da planta. Essa amostra foi utilizada para o fracionamento na coluna.

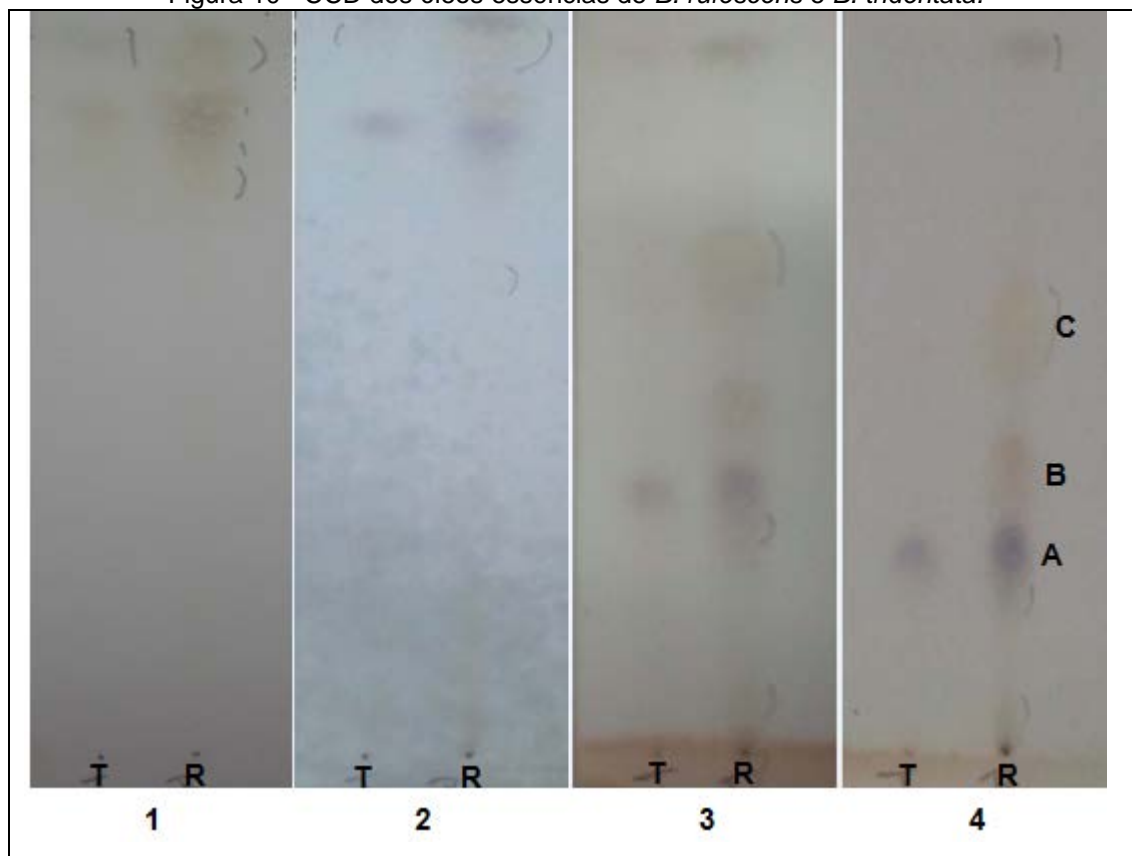
O óleo essencial das partes aéreas de espécimes masculinos de *B. tridentata* foi usado como referência para o espatulenol (**7**) na CCD junto ao óleo de *B. rufescens*. Eluentes de polaridades diferentes foram testados a fim de obter o sistema ideal para o fracionamento do óleo.

A Figura 10 mostra as placas cromatográficas com as suas respectivas fases móveis: CHCl₃/MeOH 2%; CHCl₃/MeOH 1%; 100% CHCl₃; 2% Hexano/CHCl₃. Após o desenvolvimento, as placas foram reveladas com solução de H₂SO₄/MeOH (1:1) seguido de aquecimento.

O sistema eluente da placa 4 foi escolhido para o fracionamento do óleo essencial devido à melhor separação dos componentes presentes. O fator de retenção (*R_f*) calculado para o sistema 2% Hexano/CHCl₃ apresentou *R_f* = 0,27 para o espatulenol (**7**), *R_f* = 0,27 para o (*E*)-nerolidol (**17**) e *R_f* = 0,56 para o componente não identificado.

Para o isolamento das substâncias foi utilizada sílica gel 60 (0,04 - 0,063 mm / 23-240 mesh ASTM) em uma coluna cromatográfica de 0,8 cm de diâmetro e 19 cm de altura.

Figura 10 - CCD dos óleos essenciais de *B. rufescens* e *B. tridentata*.



T: óleo essencial de *B. tridentata* partes aéreas masculinas; R: óleo essencial de *B. rufescens* folhas e folhas com inflorescências masculinas; 1: CHCl₃/MeOH 2%; 2: CHCl₃/MeOH 1%; 3: 100% CHCl₃; 4: 2% Hexano/CHCl₃; A: espatulenol (**7**); B: (*E*)-nerolidol (**17**); C: componente não identificado.

A sílica gel foi suspensa em 400 mL de solvente (80 mL de hexano e 320 mL de clorofórmio), eluindo-se com o mesmo solvente, obtendo-se 40 frações com 10 mL cada usando um fluxo de 5 mL por minuto.

Para uma avaliação preliminar das frações obtidas, volumes idênticos da seqüência de frações foram aplicados sobre uma placa cromatográfica, observando-se sob luz UV de 254 nm. Em seguida, a placa foi revelada com solução de H₂SO₄/MeOH (1:1) e aquecida em chapa térmica a 100 °C por 10 min. A Figura 11 mostra a análise preliminar de todas as frações coletadas depois da revelação com o ácido e a queima na chapa térmica.

Figura 11 - Teste preliminar das frações do fracionamento do óleo essencial de *B. rufescens*

Após análises por CCD as frações foram reunidas em três grupos para obter as substâncias principais presentes no óleo. Na Tabela 4 estão representados os grupos de frações, os respectivos eluentes, massas e os seus rendimentos.

Tabela 4 - Frações da coluna cromatográfica do isolamento do óleo essencial de *B. rufescens*

Fração	Eluente	Massa (mg)	Rendimento (%)	Substância isolada
5/8	CHCl ₃ /hexano 20%	27	31,03	Não identificada
12/17		20	23,00	(<i>E</i>)-nerolidol (17)
19/22		16	18,39	Espatulenol (7)

Os dados dos deslocamentos químicos e os espectros de RMN de ¹H, ¹³C e DEPT 135 (CDCl₃) das substâncias isoladas estão apresentados no item 9.2.1: Tabela 16 e Anexos 21 a 23 para o espatulenol (**7**) (Figura 25) ; Tabela 17 e Anexos 24 a 26 para o (*E*)-nerolidol (**17**) (Figura 25) e a Tabela 18 e os Anexos 27 e 28 da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) (Figura 24).

8 DADOS ESPECTROMÉTRICOS

8.1 ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis pentodonta*

BPLF: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 204,0.

BPFF: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 203,1.

BPLM: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 204,0.

BPFM: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 203,1.

RMN de ^{13}C (CDCl_3), item 9.1, amostras BPLF2 e BPFM2:

Tabela 8, α -cadinol (**18**);

Tabela 9, (+)-torreiol (**23**);

Tabela 10, epiglobulol (**24**);

Tabela 11, viridiflorol (**25**);

Tabela 12, espatulenol (**7**).

8.2 ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis rufescens*

BRLF: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 231,9.

IV (KBr, cm^{-1}): 3.412; 3.082; 2.966; 2.922; 2.858; 1.446; 1.375; 1.643.

BRFF: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 230.

IV (KBr, cm^{-1}): 3.439; 3.080; 2.966; 2.922; 2.860; 1.446; 1.375; 1.643.

BRLM: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 247,9.

IV (KBr, cm^{-1}): 3.080; 2.962; 2.922; 2.870; 1.446; 1.375; 3.450; 1.680.

BRFM: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 247,0.

IV (KBr, cm^{-1}): 3.078; 2.960; 2.922; 2.870; 1.446; 1.375; 3.464; 1.680.

RMN de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3), item 9.2, amostra BRFM:

Tabela 16, 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**).

RMN de ^{13}C (CDCl_3), item 9.2, amostra BRFM e BRLF:

Tabela 17, (*E*)-nerolidol (**17**).

8.3 FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis rufescens*

RMN de ^1H e de ^{13}C (CDCl_3), item 9.2.1:

Tabela 18, espatulenol (**7**);

Tabela 19, (*E*)-nerolidol (**17**);

Tabela 20, 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**).

8.4 SUBSTÂNCIAS NEUTRAS DE *Baccharis tridentata*

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 288,1; 327,2.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AcONa, nm): 288,1; 323,9.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AcONa+ H_3BO_3 , nm): 288,6; 374,4.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+ AlCl_3 , nm): 291,3; 412,9.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+ AlCl_3 +HCl, nm): 299,5; 371,7.

8.5 ÁCIDOS ORGÂNICOS DE *Baccharis tridentata*

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 300; 329.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AcONa, nm): 300; 329.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+AcONa+ H_3BO_3 , nm): 300; 360.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+ AlCl_3 , nm): 300; 361.

$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH+ AlCl_3 +HCl, nm): 329; 361.

8.6 ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis tridentata*

BTPaM: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 203,1.

BTPaMF: $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH, nm): 204,0.

RMN de ^{13}C (CDCl_3), item 9.4:

Tabela 25, óxido de cariofileno (**9**);

Tabela 26, espatulenol (**7**);

Tabela 27, (+)-torreiol (**23**).

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Baccharis pentodonta*

Os óleos essenciais de *B. pentodonta* apresentaram coloração amarelada escura, com odor amadeirado quando comparado ao óleo essencial de *B. rufescens*.

Em geral, os rendimentos das triplicatas dos óleos essenciais das folhas e inflorescências dos espécimes masculinos e femininos de *B. pentodonta* foram similares mesmo usando-se massas de material vegetal diferentes.

As análises por CG-EM-DIC dos óleos essenciais das folhas e inflorescências dos espécimes femininos (Tabela 5) mostraram os sesquiterpenos oxigenados (BPFF1: 56,87%; BPFF2: 85,31%; BPFF3: 84,66%; BPLF1: 85,45%; BPLF2: 86,00%; BPLF3: 93,04%) como os constituintes majoritários. E os sesquiterpenos não oxigenados como a segunda classe dos principais componentes dos óleos (BPFF1: 41,24%; BPFF2: 14,68%; BPFF3: 14,85%; BPLF1: 11,54%; BPLF2: 11,69%; BPLF3: 5,58%).

Os óleos essenciais das inflorescências femininas não apresentaram monoterpenos. No entanto, os monoterpenos oxigenados α -terpineol e o terpinen-4-ol (**11**) estão presentes nas folhas (BPLF1 e BPLF2) e menores porcentagens nas inflorescências, exceto, na amostra BPFF2 que não contém estes álcoois.

O α -cadinol (**18**) é predominante nos óleos essenciais dos espécimes femininos assim como seu isômero (+)-torreiol (**23**) e os outros álcoois: espatulenol (**7**), epiglobulol (**24**) e viridiflorol (**25**). Uma comparação dos espectros das amostras BPLF1 e BPFF3 indica grande similaridade entre os óleos dos espécimes femininos. Essas considerações podem ser observadas na própria Tabela 5.

A composição química do óleo essencial de *B. crispa* coletada em Guaíba – RS; também apresentou α -cadinol (**18**), mas, em menores proporções (4,6%) que o epiglobulol (**24**), representando 16,8% do seu óleo. Já a *B. crispa* coletada em Castro – PR exibiu o globulol (**21**) como o componente majoritário (30%), seguido de espatulenol (**7**) e germacreno D (23,6% e 16,5%) (SIMÕES-PIRES et al., 2005b). Como em muitos outros casos, variações em óleos essenciais de espécies *Baccharis* são muito comuns. Somente uma das nossas amostras (BPFF1) destoa

dos outros óleos por apresentar o germacreno D e o β -cariofileno (**3**) em proporções maiores e o α -cadinol (**18**) em proporções bem menores.

Tabela 5 - Composição química dos óleos essenciais de folhas e inflorescências de *B. pentodonta* feminina

COMPONENTES	1	2	3	1'	2'	3'	IRR _{CAL} *	IRR _{LIT} **
	%							
β -pineno	-	-	-	0,42	0,30	1,09	977	980
terpine-4-ol	1,05	-	-	0,99	0,84	-	1178	1177
α -terpineol	0,84	-	0,49	1,59	1,19	-	1191	1189
β -elemeno	5,51	2,05	1,55	1,24	1,15	-	1392	1393 [#]
β -cariofileno	9,99	5,50	4,88	5,34	5,20	4,47	1421	1418
α -cariofileno	2,24	-	3,31	0,63	0,77	-	1455	1454
γ -muuroleno	2,58	-	-	0,62	0,61	-	1477	1477
germacreno D	13,28	3,49	0,55	1,01	1,82	-	1483	1480
β -selineno	1,49	-	-	0,79	0,55	-	1488	1485
biciclogermacreno	-	2,13	3,02	-	-	-	1498	1494 [#]
2,6-dibutil-4-metilfenol	3,72	4,19	2,62	1,60	1,61	3,23	1513	1512
δ -cadineno	6,15	1,51	1,54	1,91	1,59	1,11	1525	1524
(<i>E</i>)-nerolidol	1,34	-	1,25	1,65	1,61	-	1563	1565
espatulenol	11,24	14,79	14,30	10,56	11,34	12,36	1582	1576
epiglobulol	12,01	16,00	16,81	13,43	14,17	15,20	1588	1588 [#]
viridiflorol	6,33	10,14	9,30	9,39	9,97	12,31	1596	1590
(+)-torreiol	9,46	12,16	15,06	14,33	15,21	13,98	1647	1645
α -cadinol	12,77	28,03	25,32	34,49	32,09	35,96	1660	1653
%								
Monoterpenos não oxigenados	-	-	-	0,42	0,30	1,09		
Monoterpenos oxigenados	1,89	-	0,49	2,58	2,03	-		
Sesquiterpenos não oxigenados	41,24	14,68	14,85	11,54	11,69	5,58		
Sesquiterpenos oxigenados	56,87	85,31	84,66	85,45	86,00	93,04		
Total	100	99,99	100	99,99	100	99,71		
Rendimento	0,39	0,37	0,31	0,21	0,34	0,33		

* IRR_{cal} = média dos índices de retenção relativa calculados para cada componente em todas as análises; ** IRR_{lit} = índices de retenção relativa publicados (ADAMS, 1995) a menos que indicado individualmente; 1393[#] (CHOI, 2003); 1494[#] (TELLEZ et al., 1999); 1588[#] (APEL et al., 2004); 1 = BPF1; 2 = BPF2; 3 = BPF3; 1' = BPL1; 2' = BPL2; 3' = BPL3; % = porcentagem relativa da concentração dos componentes.

Assim como nos óleos essenciais dos espécimes femininos, os óleos dos espécimes masculinos também apresentaram os sesquiterpenos oxigenados como os principais componentes (BPFM1: 82,95%; BPFM2: 82,15%; BPFM3: 89,84%; BPLM1: 86,22%; BPLM2: 86,22%; BPLM3: 93,00%).

A Tabela 6 apresenta as análises por CG-EM-DIC das amostras das folhas e inflorescências masculinas com seus índices de retenção relativos calculados (IRR_{cal}^*) e índices de retenção relativos da literatura (IRR_{lit}^{**}) (ADAMS, 1995).

Tabela 6 - Composição química dos óleos essenciais de *B. pentodonta* masculina

COMPONENTES	1	2	3	1'	2'	3'	IRR_{cal}^*	IRR_{lit}^{**}
	%							
α -pineno	0,58	-	-	-	-	-	933	939
β -pineno	2,34	0,54	1,41	1,25	1,38	0,53	977	980
D-limoneno	0,65	-	-	0,36	-	-	1028	1031
terpine-4-ol	0,76	0,77	-	1,26	1,03	0,64	1178	1177
α -terpineol	1,33	1,12	1,28	1,97	1,41	1,46	1191	1189
β -elemeno	2,84	3,39	1,66	1,29	1,08	-	1392	1393 [#]
β -cariofileno	4,39	5,68	3,80	3,45	3,92	2,37	1421	1418
α -cariofileno	0,41	0,76	-	0,42	-	-	1455	1454
germacreno D	1,69	2,67	1,40	1,75	1,32	0,80	1483	1480
β -selineno	0,80	1,17	-	0,56	-	-	1488	1485
2,6-dibutil-4-metilfenol	1,88	2,51	2,77	1,30	1,97	1,46	1513	1512
δ -cadineno	1,28	1,56	0,61	1,45	1,60	1,18	1525	1524
(E)-nerolidol	1,55	1,34	1,07	2,44	2,25	2,38	1563	1564
espatulenol	16,59	13,70	9,52	21,37	21,64	18,95	1582	1576
epiglobulol	13,40	12,98	19,64	16,18	16,81	15,41	1588	1588 [#]
viridiflorol	8,28	9,33	14,95	9,00	8,92	9,01	1596	1590
γ -eudesmol	1,25	1,46	1,30	1,64	1,53	1,64	1627	1630
(+)-torreiol	12,18	12,08	11,18	7,07	5,49	13,55	1645	1645
α -cadinol	27,82	28,75	29,41	27,22	29,63	30,60	1660	1653
	%							
Monoterpenos não oxigenados	3,57	0,54	1,41	1,61	1,38	0,53		
Monoterpenos oxigenados	2,09	1,89	1,28	3,23	2,44	2,10		
Sesquiterpenos não oxigenados	11,41	15,23	7,47	8,92	7,92	4,35		
Sesquiterpenos oxigenados	82,95	82,15	89,84	86,22	88,24	93,00		
Total	100	99,81	100	99,98	99,98	99,98		
Rendimento	0,33	0,34	0,37	0,29	0,40	0,34		

* IRR_{cal} = média dos índices de retenção relativa calculados para cada componente em todas as análises; ** IRR_{lit} = índices de retenção relativa publicados (ADAMS, 1995) a menos que indicado individualmente; 1393[#] (CHOI, 2003); 1588[#] (APEL et al., 2004); 1 = BPFM1; 2 = BPFM2; 3 = BPFM3; 1' = BPLM1; 2' = BPLM2; 3' = BPLM3; % = porcentagem relativa da concentração dos componentes.

Todas as amostras exibem monoterpenos oxigenados e não oxigenados. As amostras BPFM1 e BPLM1 diferenciam-se das outras em relação aos monoterpenos devido à presença α -pineno (1) e D-limoneno (10).

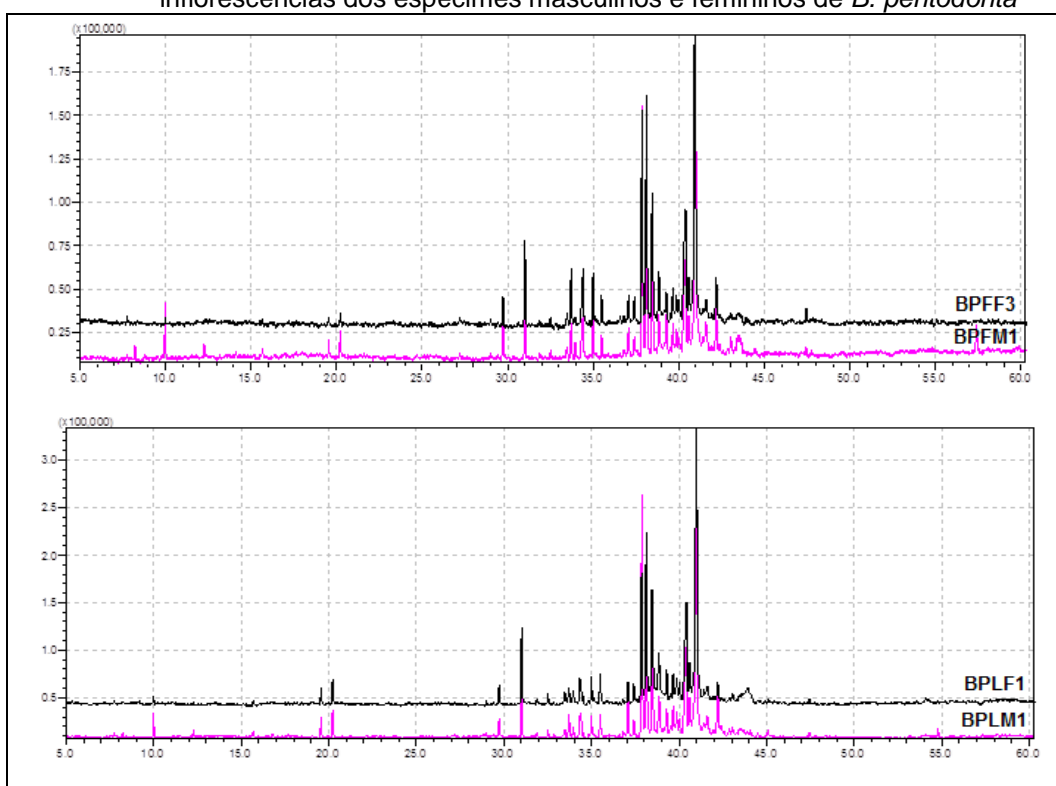
Em todas as amostras de óleo dos espécimes masculinos e femininos, o β -cariofileno (3) está presente. Nas folhas e inflorescências femininas este

sesquiterpeno está em maiores porcentagens do que nas amostras masculinas. Já, o γ -eudesmol está presente somente nos óleos essenciais dos espécimes masculinos.

Muitos componentes são identificados nas *Baccharis* e aparecem em várias espécies. O β -pineno (**2**), D-limoneno (**10**) e o espatulenol (**7**) estão presentes, por exemplo, em *B. articulata*, *B. semiserrata*, *B. oxyodonta*, *B. cognata*, *B. uncinella* e *B. milleflora* que foram coletadas em locais diferentes do estado do Rio Grande do Sul (AGOSTINI et al., 2005).

A semelhança entre a composição química dos óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos de *B. pentodonta* apresentados nas Tabelas 5 e 6, é facilmente percebida pela comparação entre os respectivos espectros (Figura 12). Os sesquiterpenos espatulenol (**7**), epiglobulol (**24**), viridiflorol (**25**), (+)-torreiol (**23**) e α -cadinol (**1**) podem ser considerados como os marcadores químicos destes óleos essenciais.

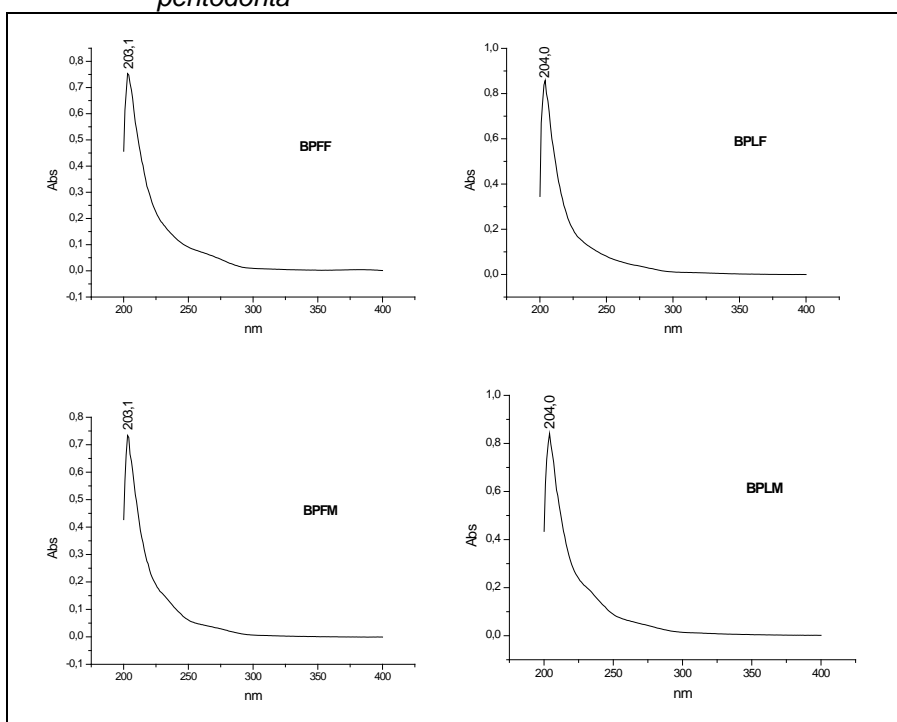
Figura 12 - Comparação entre os espectros dos óleos essenciais das folhas e inflorescências dos espécimes masculinos e femininos de *B. pentodonta*



B. pentodonta: BPF3, inflorescências femininas, terceira triplicata; BPLF1, folhas femininas, primeira triplicata; BPLM1, folhas masculinas, primeira triplicata; BPFM1, inflorescências masculinas, primeira triplicata.

Os espectros de UV-Vis (Figura 13) estão de acordo com os dados de identificação dos componentes (Tabelas 5 e 6). As absorções observadas mostram que não há altas proporções de componentes contendo conjugações de duplas ligações em suas estruturas, observando-se absorções em comprimentos de onda próximos a 203,1 nm. Essa conclusão é válida para os óleos essenciais das inflorescências dos espécimes femininos e masculinos.

Figura 13 - Espectros de UV-Vis dos óleos essenciais das folhas e das inflorescências dos espécimes masculinos e femininos de *B. pentodonta*



BFFF, inflorescências femininas; BPLF, folhas femininas; BPFM, inflorescências masculinas; BPLM, folhas masculinas.

Foram escolhidas amostras representativas dos óleos essenciais de *B. pentodonta* para medidas de espectros RMN de ^{13}C , complementando as identificações feitas por CG-EM-DIC. A análise de RMN de ^{13}C é uma ferramenta complementar para o estudo de óleos essenciais. Este método tem vantagem em comparação com a espectrometria de massas na identificação de estereoisômeros e de compostos termicamente instáveis, enquanto a sua desvantagem é a dificuldade na identificação de constituintes leves de cadeia aberta, por exemplo, pertencentes da composição química dos óleos essenciais (SMELCEROVIC et al., 2013).

O α -cadinol (**18**) (Figura 14), principal componente destes óleos essenciais, atingindo proporções entre 12,77% e 35,96%, foi caracterizado pelos espectros de

RMN (Tabela 7) em comparação com os dados disponíveis na literatura (QUEIROGA; FUKAI; MARSAIOLI, 1990; COSTA et al., 2005). O espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença de 15 átomos de carbonos, indicando dois carbonos quaternários, um dos quais está mais desprotegido por ser carbono insaturado ligado à um grupo metila (135,56 ppm), enquanto que o outro é um carbono saturado ligado à hidroxila (72,26 ppm). Um outro carbono sp^2 é um C-H observado em 122,35 ppm.

Tabela 7 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C do α -cadinol (**18**) presente nas amostras de óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos de *B. pentodonta* comparados com os dados da literatura

C	RMN ^{13}C (ppm)				
	(18) ¹	(18) ²	REF ¹	REF ²	REF ³
1 CH	50,03	49,92	50,3	49,9	50,21
2 CH₂	24,81	23,00	23,0	23,9	22,87
3 CH₂	30,83	30,83	31,3	31,0	31,13
4 C	134,93	135,12	134,8	135,8	135,21
5 CH	122,35	122,35	122,7	122,3	122,52
6 CH	39,99	39,89	40,2	39,9	40,06
7 CH	46,74	46,38	47,0	46,8	46,89
8 CH₂	22,65	22,20	22,3	22,8	22,15
9 CH₂	42,22	42,22	42,5	42,8	42,40
10 C	72,42	72,45	72,8	72,4	72,66
11 CH₃	23,85	23,85	24,2	21,6	24,07
12 CH	26,08	26,08	26,3	26,1	26,18
13 CH₃	16,34	16,34	15,5	15,3	15,33
14 CH₃	21,77	21,78	21,9	22,0	21,74
15 CH₃	20,77	20,77	21,1	21,6	20,99

(**18**)¹ = α -cadinol em BPLF2; (**18**)² = α -cadinol em BPFM2 REF¹ = COSTA et al., 2005; REF² = QUEIROGA et al., 1990; REF³ = SZAFRANEK et al., 2005.

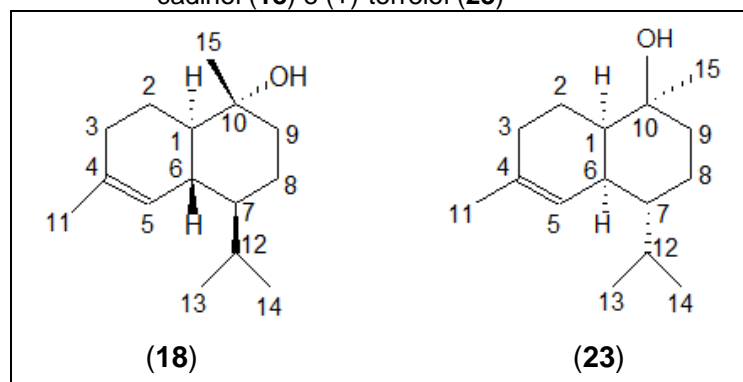
Em comparação com o α -cadinol (**18**), o seu isômero (+)-torreiol (**23**) possui junção *cis* entre os dois anéis, além de configurações invertidas no carbono quaternário saturado e no carbono terciário que ostenta o grupo isopropanila (Figura 14). Os espectros de RMN ^{13}C , no entanto, puderam ser atribuídos com certa facilidade para ambos os isômeros (**18**) e (**23**) em pleno acordo com a literatura. Os deslocamentos químicos do (+)-torreiol (**23**) estão representados na Tabela 8 (EIJK; ROEIJMANS; VERWIEL, 1984; AINSWORTH et al., 1990).

Tabela 8 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do (+)-torreiol (**23**) presente nas amostras de óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos de *B. pentodonta*

C	RMN ^{13}C (ppm)			
	(23) ¹	(23) ²	REF ¹	REF ²
1 CH	45,88	45,88	45,5	45,7
2 CH ₂	18,84	18,84	18,5	18,6
3 CH ₂	31,79	31,79	31,1	31,3
4 C	134,31	134,95	134,3	134,5
5 CH	124,72	124,73	124,6	124,7
6 CH	36,80	36,80	36,8	36,9
7 CH	45,40	45,41	44,0	44,2
8 CH ₂	21,98	21,98	21,5	21,6
9 CH ₂	35,33	35,33	35,3	35,5
10 C	72,73	72,73	72,5	72,7
11 CH ₃	23,58	23,47	23,6	23,7
12 CH	26,69	26,86	-	26,5
13 CH ₃	21,88	21,88	21,7	21,8
14 CH ₃	15,45	15,44	15,3	15,4
15 CH ₃	27,45	27,45	27,9	28,1

(**23**)¹ = (+)-torreiol em BPLF2; (**23**)² = (+)-torreiol em BPFM2
 REF¹ = AINSWORTH et al., 1990; REF² = EIJK;
 ROEIJMANS; VERWIEL, 1984.

Figura 14 - Numeração atribuída às estruturas químicas do α -cadinol (**18**) e (+)-torreiol (**23**)



Fonte: EIJK; ROEIJMANS; VERWIEL, 1984; SZAFRANEK et al., 2005

As estruturas de três outros álcoois sesquiterpênicos majoritários, os dois isômeros (Figura 15) epiglobulol (**24**) (Tabela 9) e viridiflorol (**25**) (Tabela 10), e o espatulenol (**7**) (Tabela 11), também puderam ser confirmados pelos espectros de RMN ^{13}C , de acordo com comparação com os dados publicados (QUEIROGA et al., 1990; FAURE et al., 1991; HANSON; HITCHCOCK; MANICKAVASAGAR, 1994; BOMBARDA et al., 2001; MOREIRA et al., 2007; BESTEN, 2012). Ajudaram nas

confirmações por RMN de ^{13}C das estruturas destes álcoois sesquiterpênicos, identificados por CG-EM-DIC como componentes majoritários presentes nas amostras estudadas de óleos essenciais de *B. pentodonta*: 1) o fato de o espatulenol (7) já ter sido encontrado em diversas espécies do gênero *Baccharis* estudadas em nosso laboratório, inclusive nas duas outras espécies vegetais do presente estudo, *B. rufescens* e *B. tridentata*; 2) na maioria dos casos, a presença do (7) é notável, podendo ser considerado como um marcador químico para o gênero (por exemplo, entre 45 e 53% do óleo essencial de *B. tridentata*; 3) o viridiflorol (25) foi encontrado em proporções acima de 33% no óleo essencial de *B. milleflora*, tendo sido inclusive isolado e identificado por técnicas de RMN 2 D (BESTEN, 2012).

Tabela 9 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do epiglobulol (24) presente nas amostras de óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos de *B. pentodonta*

C	RMN ^{13}C (ppm)				
	(24) ¹	(24) ²	REF ¹	REF ²	REF ³
1 CH	54,91	54,92	55,9	55,9	55,9
2 CH ₂	26,54	26,54	26,64	26,5	26,5
3 CH ₂	34,64	34,64	34,68	34,6	34,6
4 CH	36,38	36,38	35,82	35,7	35,7
5 CH	37,76	37,80	37,59	37,5	37,4
6 CH	28,59	28,59	28,91	28,8	28,7
7 CH	26,98	26,98	27,12	27,0	27,1
8 CH ₂	19,37	19,13	19,20	19,1	19,1
9 CH ₂	43,40	43,40	42,92	42,8	42,8
10 C	72,24	72,26	72,39	72,2	72,2
11 C	20,60	20,82	20,6	20,5	20,5
12 CH ₃	28,68	28,68	28,82	28,8	28,8
13 CH ₃	15,82	15,82	15,91	15,8	15,8
14 CH ₃	30,08	30,08	31,19	31,1	31,1
15 CH ₃	16,84	16,84	16,65	16,6	16,6

(24)¹ = epiglobulol em BPLF2; (24)² = epiglobulol em BPFM2; REF¹ = BOMBARDA et al., 2001; REF² = HANSON; HITCHCOCK; MANICKAVASAGAR, 1994; REF³ = QUEIROGA et al., 1990.

Os Anexos 1 e 2 mostram os espectros de RMN de ^{13}C e suas respectivas ampliações do óleo essencial das inflorescências de espécimes masculinos de *B. pentodonta*. O Anexo 3 apresenta os espectros de RMN de DEPT 135, também,

suas ampliações no Anexo 4. As expansões desses espectros exemplificam como as atribuições foram realizadas para esta pesquisa.

Tabela 10 - Valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do viridiflorol (**25**) presente nas amostras de óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos de *B. pentodonta*

C	RMN ^{13}C (ppm)			
	(25) ¹	(25) ²	REF ¹	REF ²
1 CH	58,25	58,25	58,40	58,20
2 CH ₂	29,27	29,24	29,29	29,00
3 CH ₂	25,80	25,80	25,96	25,80
4 CH	38,48	38,48	38,65	38,40
5 CH	39,76	39,76	39,92	39,70
6 CH	22,34	22,34	22,50	22,20
7 CH	28,37	28,37	28,87	28,80
8 CH ₂	19,34	19,87	18,59	18,40
9 CH ₂	37,99	37,99	37,96	37,70
10 C	74,61	74,63	74,80	74,60
11C	18,80	18,80	19,01	18,80
12 CH ₃	16,57	16,57	16,52	16,30
13 CH ₃	28,48	28,59	28,75	28,70
14 CH ₃	32,37	32,13	32,30	32,10
15 CH ₃	16,13	16,13	16,30	16,10

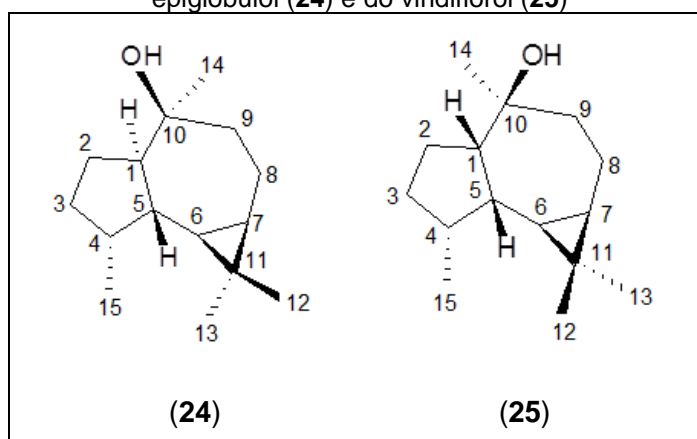
(25)¹ = viridiflorol em BPLF2; (25)² = viridiflorol em BPFM2 REF¹ = BESTEN, 2012; REF² = FAURE et al., 1991.

Tabela 11 - Valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do espatulenol (**7**) presente nas amostras de óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos de *B. pentodonta*

C	RMN ^{13}C (ppm)			
	(7) ¹	(7) ²	REF ¹	REF ²
1 CH	54,34	54,35	54,3	54,3
2 CH ₂	26,74	26,74	26,7	26,7
3 CH ₂	41,78	41,78	41,7	41,7
4 C	80,96	80,98	80,9	80,9
5 CH	53,43	53,43	53,3	53,4
6 CH	30,34	30,35	29,9	30,0
7 CH	27,53	27,54	27,4	27,5
8 CH ₂	24,81	24,81	24,8	24,8
9 CH ₂	38,89	38,89	38,8	38,9
10 C	153,42	153,43	153,4	153,2
11 C	20,27	20,31	20,2	20,3
12 CH ₃	28,59	28,48	28,6	28,7
13 CH ₃	16,29	16,29	16,2	16,4
14 CH ₃	26,00	26,03	26,0	26,0
15 CH ₂	106,29	106,29	106,0	106,1

(7)¹ = espatulenol em BPLF2; (7)² = espatulenol em BPFM2; REF¹ = MOREIRA et al., 2007; REF² = QUEIROGA et al., 1990.

Figura 15 - Numeração atribuída às estruturas químicas do epiglobulol (**24**) e do viridiflorol (**25**)



Fonte: BOMBARDA et al., 2001; BESTEN, 2012.

9.2 ANÁLISE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Baccharis rufescens*

O óleo essencial de *B. rufescens* vem sendo estudado pelo grupo há vários anos (COLODEL et al., 2012; COLODEL et al., 2010a; COLODEL et al., 2010b), tendo sido encontradas importantes diferenças entre as composições de voláteis obtidos de espécimes masculinos e femininos dessa espécie vegetal. Em contraposição com toda a literatura anterior, espera-se que as composições de óleos essenciais obtidos de espécimes masculinos e femininos de espécies do gênero *Baccharis* apresentem-se com elevado grau de similaridade (BESTEN et al., 2012). Assim, o presente estudo foi empreendido utilizando materiais vegetais procedentes de uma nova coleta, visando verificar mais uma vez a possibilidade de encontrar composições de óleos essenciais similares obtidos a partir de espécimes masculinos e femininos de *B. rufescens*.

As pequenas quantidades de materiais vegetais obtidos nesta coleta não permitiram obter inflorescências em quantidade suficiente para a hidrodestilação. Assim, os quatro óleos essenciais analisados foram obtidos a partir de amostras de folhas de espécimes femininos (BRLF), folhas de espécimes masculinos (BRLM), folhas contendo inflorescências de espécimes femininos (BRFF) e folhas contendo inflorescências obtidas de espécimes masculinos (BRFM). Os rendimentos obtidos foram maiores para as amostras de espécimes femininos, não havendo explicações plausíveis para as diferenças observadas.

Foram identificados 37 compostos nos óleos essenciais de *B. rufescens* (Tabela 12), sendo os majoritários: 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) (BRFM: 56,43%; BRLM: 44,22%), δ -cadinol (**18**) (BRFF: 6,75%; BRLF: 5,02%), D-limoneno (**10**) (BRFF: 13,39%) e o álcool terciário (*E*)-nerolidol (**17**) (BRFF: 61,51%; BRLF: 84,46%; BRFM: 22,97%; BRLM: 40,61%). Os óleos essenciais apresentaram coloração amarelada e odor cítrico característico, similar para todas as amostras e mais acentuado nas advindas de espécimes femininos.

Na pesquisa realizada por Colodel e colaboradores (2010a; 2010b), a composição química do óleo essencial de *B. rufescens* apresentou o α -cadinol (**18**), óxido de cariofileno (**9**), espatulenol (**7**) e o (*E*)-nerolidol (**17**) como os constituintes majoritários. O estudo efetuado anteriormente por Zunino e colaboradores (1998) apontou o (**17**) e o (**10**) como os principais componentes do óleo de *B. rufescens*.

Tabela 12 - Composição química dos óleos essenciais de *B. rufescens*

COMPONENTES	1	2	3	4	IRR _{cal} *	IRR _{lit} **
	%					
α -tujeno	0,67	-	0,02	-	921	930
β -mirceno	0,42	-	-	-	978	991
D-limoneno	13,39	-	-	0,03	1016	1031
<i>cis</i> - β -ocimeno	0,62	-	-	-	1037	1040
linalool	1,12	0,36	0,25	0,29	1089	1098
terpinen-4-ol	0,92	0,50	0,34	0,24	1175	1177
geraniol	-	-	0,11	-	1243	1252
bornil acetato	0,82	0,61	0,37	-	1268	1285
β -elemeno	0,51	0,11	1,75	0,83	1370	1379
isocariofileno	-	-	1,69	-	1392	1407 [#]
β -humuleno	0,39	-	0,23	0,09	1425	1440
β -cadineno	-	-	1,55	-	1455	1472
γ -gurjuneno	0,39	0,07	-	-	1467	1473
β -selineno	0,72	0,21	1,41	0,83	1476	1485
γ -muuroleno	0,32	0,10	0,82	0,65	1486	1477
(<i>E</i>)-nerolidol	61,51	84,46	22,97	40,61	1544	1539 [#]
isoaromadendreno epóxido	4,84	3,56	-	-	1552	1579 [#]
ledol	0,50	0,21	0,97	1,02	1560	1565
espatulenol	1,10	0,65	1,32	4,52	1572	1576
óxido de cariofileno	-	-	0,57	-	1578	1581
viridiflorol	-	-	1,14	1,17	1582	1590
γ -eudesmol	-	-	4,85	1,56	1622	1630
δ -cadinol	6,75	5,02	2,50	2,55	1624	1636
cubenol	4,52	3,47	0,72	1,37	1634	1642
4,7(11)-amorfadien-8-ona	-	-	56,43	44,22	1673	1692 [#]
<i>cis</i> - β -santalol	0,49	0,66	-	-	1717	1720
	%					
Monoterpenos não oxigenados	15,10	-	0,02	0,03		
Monoterpenos oxigenados	2,86	1,47	1,07	0,53		
Sesquiterpenos não oxigenados	2,33	0,49	7,45	2,40		
Sesquiterpenos oxigenados	79,71	98,03	91,47	97,02		
Total	100	99,99	100	99,98		
Rendimento	0,86	0,80	0,28	0,48		

* IRR_{cal} = média dos índices de retenção relativa calculados para cada componente em todas as análises; ** IRR_{lit} = Índice de retenção relativa publicados (ADAMS, 1995) a menos que indicado individualmente; 1539[#] (CHOI, 2003); 1407[#] (BARANAUSKIENE; VENSKUTONIS; DEMYTTENAERE, 2003); 1579[#] (CONGIU et al., 2002); 1692[#] (LOAYZA et al., 1995); 1 = BRFF; 2 = BRLF; 3 = BRFM; 4= BRLM; % = porcentagem relativa da concentração dos componentes.

Outras amostras foram pesquisadas pelo grupo, comparando-se pela primeira vez os metabólitos voláteis provenientes de espécimes masculinos e femininos dessa espécie vegetal. Foram observadas grandes diferenças entre as composições químicas dos óleos essenciais obtidos de espécimes femininos e masculinos de *B. rufescens*: ocorrência de (*E*)-nerolidol (**17**) como componente principal apenas nos espécimes femininos, enquanto que os masculinos apresentaram benzilbenzoato como majoritário (COLODEL et al., 2012).

Os óleos essenciais de espécimes masculinos e femininos de cinco espécies de diferentes seções do gênero *Baccharis* (*B. caprariaefolia*, *B. dracunculifolia*, *B. semiserrata* var. *elaegnoides*, *B. coridifolia* e *B. pentaptera*) coletadas no Segundo Planalto do Paraná, foram estudadas quanto às suas composições químicas. Além de ter demonstrado a grande similaridade entre óleos essenciais de espécimes masculinos e femininos proveniente das cinco espécies estudadas, aquela pesquisa demonstrou que todas apresentaram baixos níveis de monoterpenos oxigenados ou não. Os metabólitos secundários voláteis de *B. dracunculifolia* coletada em Ponta Grossa também apresentaram o composto (**17**) em altas proporções, 17,16% nos espécimes masculinos e 24,69% nos femininos (BESTEN et al., 2012).

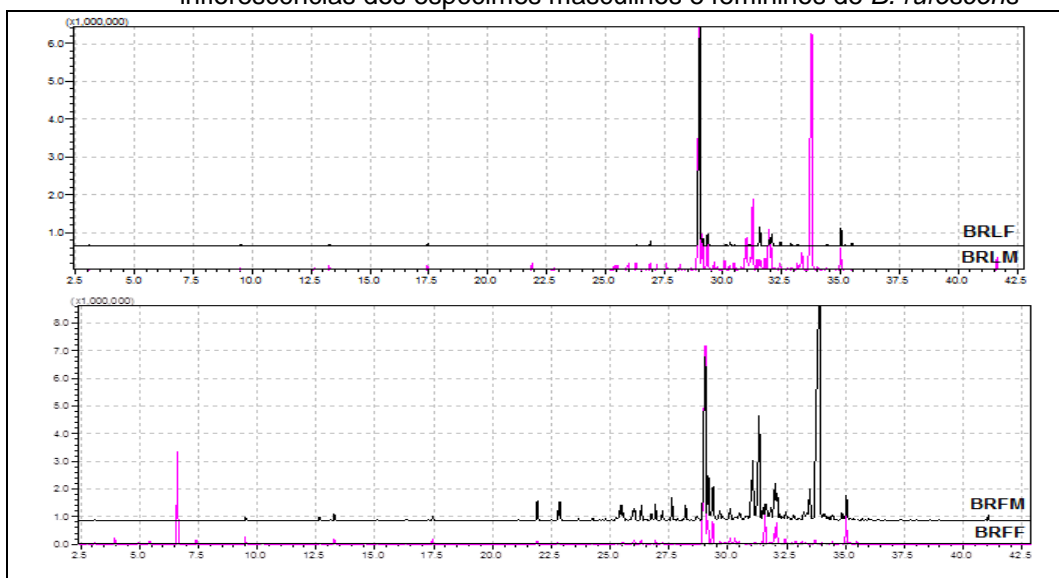
No presente trabalho, observou-se uma maior concentração de sesquiterpenos oxigenados (BRFF: 79,71%; BRLF: 98,03%, BRFM: 91,47%; BRLM: 97,02%) em relação aos sesquiterpenos não oxigenados (BRFF: 2,33%; BRLF: 0,49%, BRFM: 7,45%; BRLM: 2,40%). A análise do óleo essencial da amostra das folhas contendo inflorescências femininas apontou alta concentração de monoterpenos não oxigenados (BRFF: 15,10%) quando comparada com as amostras de espécimes masculinos (BRFM: 0,02% e BRLM: 0,03%). Já os monoterpenos oxigenados estão presentes em todos os óleos essenciais de *B. rufescens* mas representam apenas 2,86% em BRFF; 1,47% em BRLF; 1,07% em BRFM; 0,53% em BRLM.

O (*E*)-nerolidol (**17**) está presente em todas as amostras em proporções acima de 20%, sendo o componente volátil majoritário dos espécimes femininos. E nos espécimes masculinos a 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) é o principal constituinte, representando acima de 43% da massa das amostras BRFM e BRLM.

O monoterpeno D-limoneno (**10**) faz parte da composição química das amostras BRFF e BRLM. Nas inflorescências femininas corresponde a 13,39% do óleo, mas nos espécimes masculinos aparece em proporções abaixo 0,03%. Os espectros da Figura 16 mostram claramente as diferenças dos óleos essenciais das

folhas e folhas com inflorescências dos espécimes masculinos e femininos de *B. rufescens*.

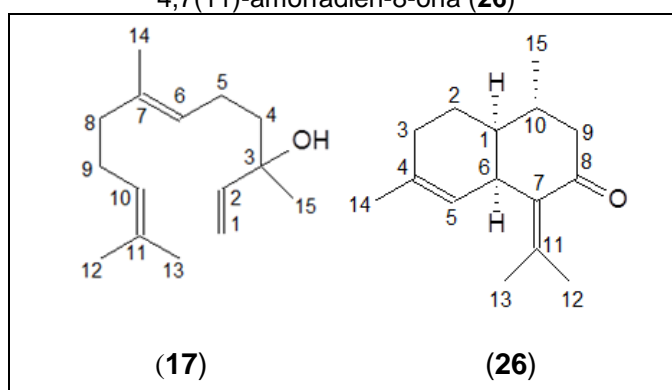
Figura 16 - Comparação entre os espectros dos óleos essenciais das folhas e inflorescências dos espécimes masculinos e femininos de *B. rufescens*



BPFF - folhas com inflorescências femininas; BPLF - folhas femininas; BPFM - folhas com inflorescências masculinas; BPLM - folhas masculinas.

Os espectros de infravermelho mostrados nas Figuras 1, 19, 20 e 21 são das quatro amostras de óleos essenciais de *B. rufescens*. Estes espectros indicaram a presença dos grupos funcionais característicos dos sesquiterpenos identificados como majoritários por CG-EM-DIC. A Tabela 13 apresenta as bandas de absorção características de cada amostra no infravermelho, que estão de acordo com a presença majoritária de (*E*)-nerolidol (**17**) e 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) (Figura 17) (DOSKOTCH et al., 1980; SDBS, 2013).

Figura 17 - Estruturas químicas do (*E*)-nerolidol (**17**) e 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**)



Fonte: SDBS, 2013.

Figura 18 - Espectro de IV do óleo essencial das folhas com inflorescências do espécime feminino (BRFF)

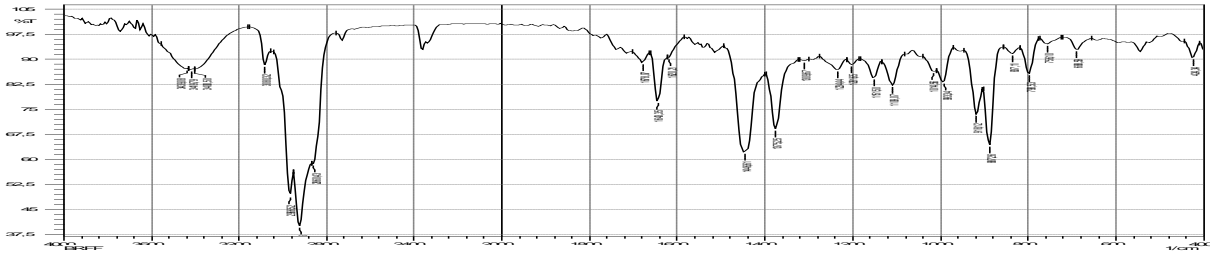


Figura 19 - Espectro de IV do óleo essencial das folhas do espécime feminino (BRLF)

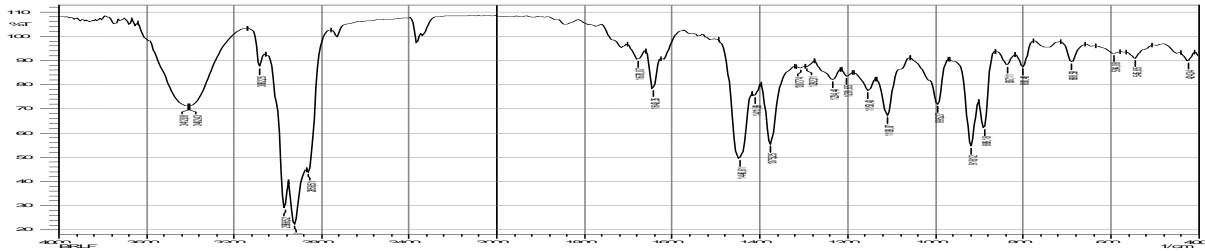


Figura 20 - Espectro de IV do óleo essencial das folhas com inflorescências do espécime masculino (BRFM)

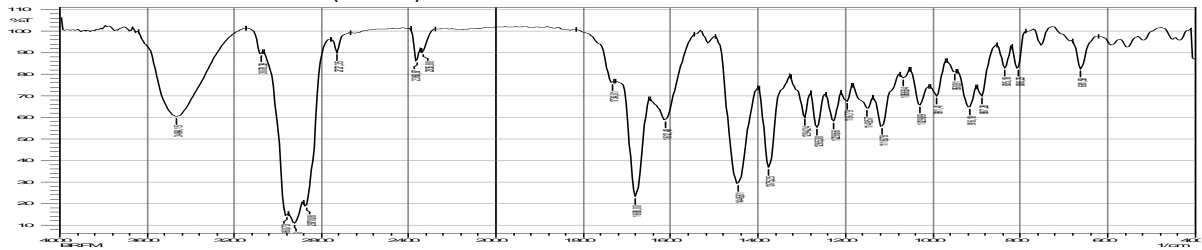
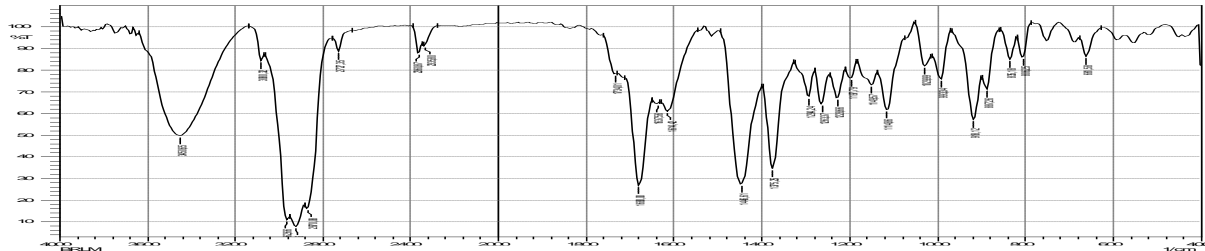


Figura 21 - Espectro de IV do óleo essencial das folhas do espécime masculino (BRLM)

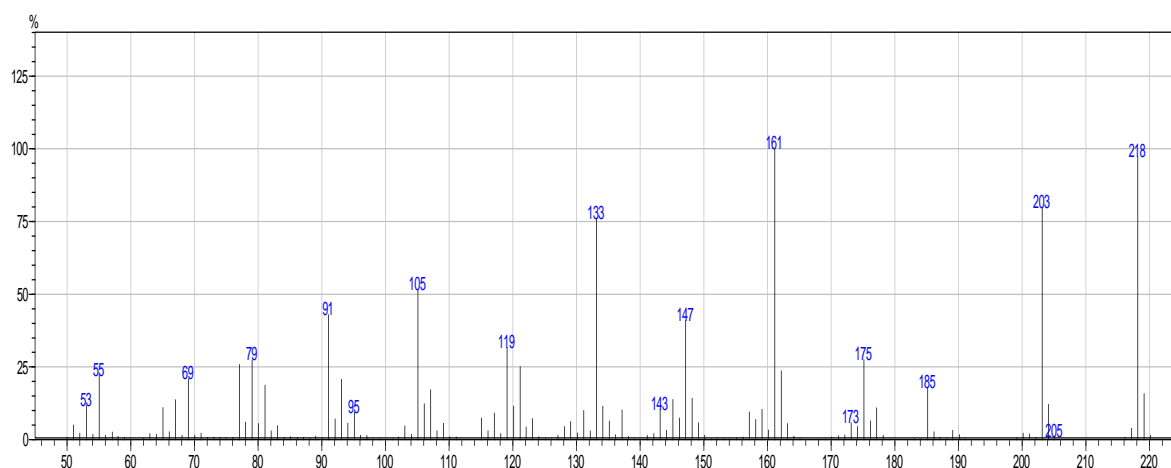


O espectro de massas da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) (Figura 22), presente em altas proporções nos óleos essenciais obtidos de espécimes masculinos de *B. rufescens*, corresponde exatamente aos dados publicados por Bohlmann e colaboradores (1984), sendo uma forte evidência em favor desta estrutura.

Tabela 13 - Absorções no espectro de infravermelho dos óleos essenciais de *B. rufescens*

Grupos	Estiramento	BRLF	BRFF	BRLM	BRFM
sp^2 C-H	δ axial	3082	3080	3080	3078
sp^3 C-H	δ axial	2966	2966	2962	2960
		2922	2922	2922	2922
		2858	2860	2870	2870
sp^3 CH ₃	δ axial	1446	1446	1446	1446
sp^3 CH ₂	δ angular	1375	1375	1375	1375
C=C	δ axial	1643	1643	-	-
O-H	δ axial	3412	3439	3450	3464
C=O	δ axial	-	-	1680	1680

BRLF - folhas femininas; BRFF - folhas com inflorescências femininas; BRLM - folhas masculinas; BRFM - folhas com inflorescências masculinas; δ - deformação.

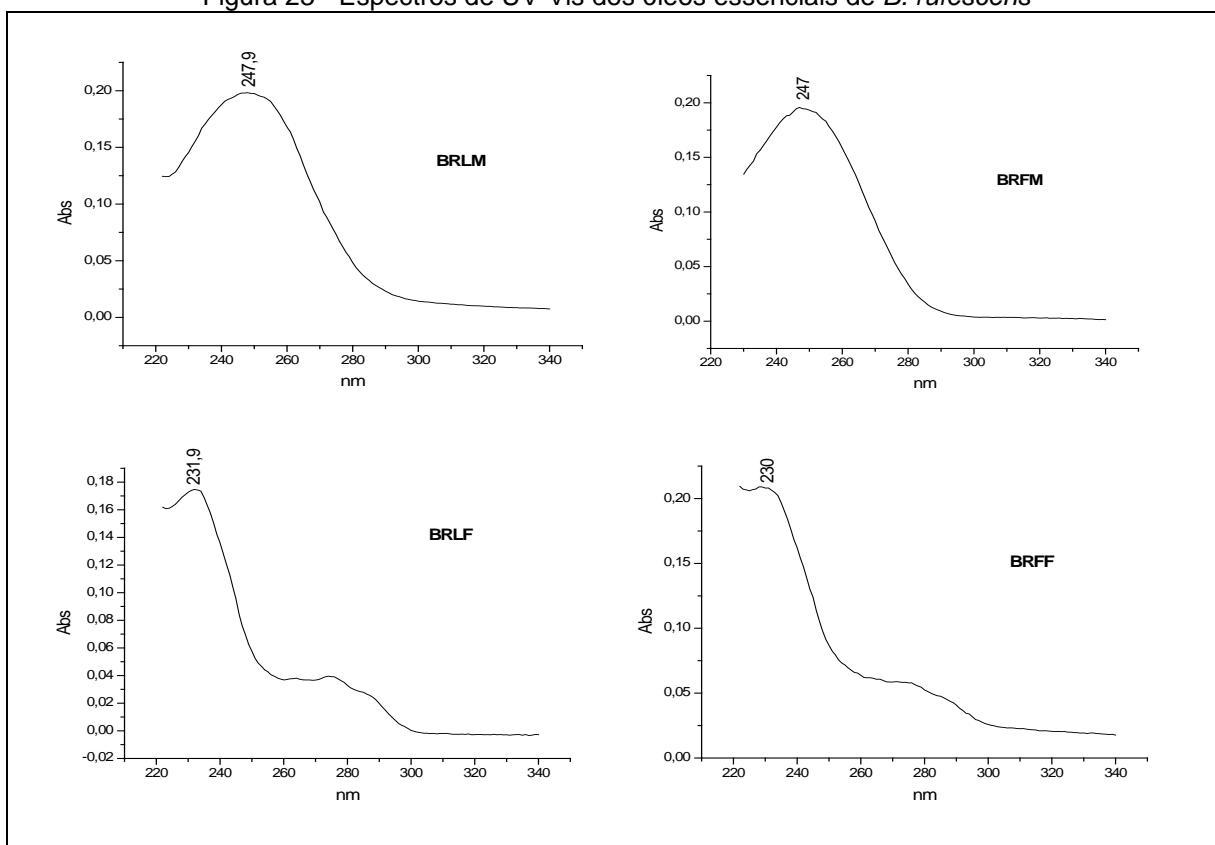
Figura 22 - Espectro de massas da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**)

Os espectros de UV-Vis, utilizando metanol como solvente (Figura 23), mostram intensas absorções em comprimentos de onda próximos a 230 nm nas amostras provenientes de espécimes femininos (BRFF e BRLF) e em torno de 247,0 nm nas de espécimes masculinos (BRFM e BRLM). Esses dados também estão de acordo com a presença da cetona (**26**) nos óleos essenciais dos espécimes masculinos e do álcool (**17**) nos espécimes femininos, como substâncias majoritárias.

Os espectros de RMN ¹³C (Anexo 5; Anexo 6) mostraram-se uma ferramenta importante na confirmação das estruturas dos componentes majoritários nos óleos essenciais das amostras BRLF e BRFM, após as análises por CG-EM-DIC. Na literatura, o primeiro estudo sobre a 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) foi publicado por Bohlmann e colaboradores (1984), que relatam somente poucos dados espectrométricos para esta substância, como a absorção em 1.690 cm⁻¹ para a

carbonila, as fragmentações no espectro de massas, a rotação óptica específica e o deslocamento químico de apenas um próton em δ 3,62 (1H, singlete largo). As conclusões destes autores estão firmadas principalmente em suposições e conhecimentos sobre a biossíntese de outros compostos presentes no óleo essencial de *Baccharis viminea* por eles estudado (BOHLMANN et al., 1984). Seguiram-se outros estudos sobre a ocorrência da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) em diversas outras espécies vegetais como comentado a seguir, mas em nenhum deles os dados de RMN foram publicados.

Figura 23 - Espectros de UV-Vis dos óleos essenciais de *B. rufescens*



Em outras duas espécies de *Baccharis* coletadas nos altos vales da Bolívia, na província de Cochabamba, a cetona (**26**) (Figura 24) também foi identificada em seus óleos essenciais pela técnica de CG-EM-DIC. Em *Baccharis salicifolia*, a 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) apresentou-se em 4,67% e com IRR_{cal} de 1.692; e em *Baccharis latifolia*, em proporções inferiores a 0,80% e com IRR_{cal} 1.696, ambas analisadas em coluna DB5 (LOAYZA et al., 1995).

Há ainda estudos que levaram à identificação desta substância (**26**) em outras plantas, como por exemplo, na pesquisa sobre a composição química dos óleos essenciais de cinco espécies *Neomirandea*. A substância (**26**) foi isolada das partes aéreas da espécie *Neomirandea guevarii* (43 mg) e identificada por RMN ^1H , graças à presença da (+)- α -copaen-8-ona (**27**) (Figura 24), cuja formação biossintética é favorecida pela junção *cis* dos anéis de precursores similares (TAMAYO-CASTILLO et al., 1989).

Os óleos essenciais das partes aéreas de *Eupatorium adenophorum* coletados em diferentes regiões da Índia apresentaram a cetona (**26**), que então passou a ser nomeada como 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) conforme as recomendações da IUPAC (1999). O composto foi encontrado em proporções entre 3,20% e 5,76% dos óleos essenciais de sete amostras pesquisadas por CG-EM-DIC usando uma coluna Rtx-5. Embora seja mencionado o uso de espectros de RMN para a identificação de substâncias ocorrendo em proporções acima de 5%, também nesse caso não foram disponibilizadas análises (PADALIA et al., 2009).

Os deslocamentos químicos foram tentativamente atribuídos aos H e C da estrutura da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) nas análises dos espectros de RMN do óleo essencial bruto de espécimes masculinos de *B. rufescens* de acordo com dados publicados para compostos similares que apresentam inclusive a mesma estereoquímica (ADIO et al., 2007). A presença em (**26**) de três grupamentos CH_2 , dois dos quais são diastereotópicos, além de três grupamentos CH, dificulta sobremaneira as atribuições corretas nos espectros de RMN 1D (Tabela 14).

O (*E*)-nerolidol (**17**) foi identificado por CG-EM-DIC em maiores proporções nos óleos essenciais das folhas dos espécimes femininos de *B. rufescens*, sendo sua estrutura, posteriormente, também confirmada pelos espectros de RMN de ^{13}C , inclusive nos óleos essenciais de folhas de espécimes masculinos contendo inflorescências (Tabela 15).

Tabela 14 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C confirmando a identificação da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) como composto majoritário (53,28%) no óleo essencial de espécimes masculinos de *B. rufescens*

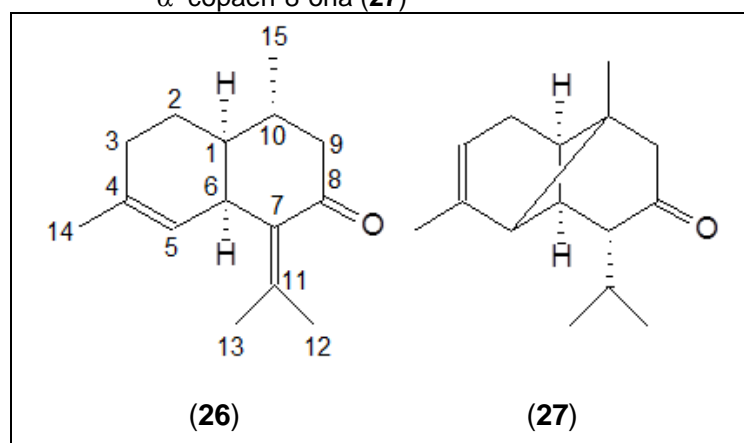
C/H	RMN ^1H (δ)	RMN ^{13}C (ppm)
1 CH	-	39,73
2 CH ₂	2,09, m	24,64
3 CH ₂	-	25,54
4 C	-	134,57
5 CH	4,94, s	123,27
6 CH	3,61, sl	41,99
7 C	-	141,03
8 C=O	-	204,82
9 CH ₂	2,39, dl, J = 2,8 Hz	51,09
10 CH	-	28,41
11 C	-	136,83
12 CH ₃	1,95, s	23,03
13 CH ₃	1,81, s	21,59
14 CH ₃	1,59, s	23,34
15 CH ₃	0,99, d, J = 6 Hz	19,75

Tabela 15 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do (*E*)-nerolidol (**17**) presente nas amostras de óleos essenciais de espécimes femininos e masculinos de *B. rufescens*

C	RMN ^{13}C (ppm)			
	(17) ¹	(17) ²	REF ¹	REF ²
1 CH ₂	111,65	111,65	111,1	111,0
2 CH	145,07	144,95	144,7	144,7
3 C	73,48	74,93	72,9	72,8
4 CH ₂	42,06	42,08	41,7	41,9
5 CH ₂	22,72	22,73	22,2	22,4
6 CH ₂	124,00	124,25	123,8	124,0
7 C	135,54	135,61	135,0	134,4
8 CH ₂	39,70	39,70	39,2	39,4
9 CH ₂	26,65	26,65	26,6	26,4
10 CH	124,25	124,26	123,8	124,0
11 C	131,40	131,41	130,8	130,4
12 CH ₃	17,67	17,68	17,1	17,3
13 CH ₃	25,68	25,86	25,1	25,3
14 CH ₃	16,00	15,72	17,1	15,6
15 CH ₃	27,91	27,98	26,7	27,3

(**17**)¹ = (*E*)-nerolidol em BRLF; (**17**)² = (*E*)-nerolidol em BRFM; REF¹ = DOSKOTCH et al., 1980; REF² = SUAREZ; MENICHINI; MONACHE, 2002.

Figura 24 - Estruturas químicas da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) com a numeração recomendada pela IUPAC (1999) e de seu derivado biossintético (+)- α -copaen-8-ona (**27**)



Fonte: TAMAYO-CASTILLO et al., 1989.

9.2.1 FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis rufescens*

O óleo essencial das folhas dos espécimes masculinos coletados nos Campos Gerais apresentou o benzilbenzoato (74,7%), espatulenol (**7**) (7,6%), (*E*)-nerolidol (**17**) (2,6%) e D-limoneno (10) (1,8%) como os principais constituintes (COLODEL et al., 2012). Os óleos essenciais de espécimes masculinos obtidos das folhas e das folhas contendo inflorescências, também coletadas na mesma região para o presente estudo, apresentaram os compostos (**17**), (**7**) e a 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) entre os constituintes majoritários, mas com ausência total de benzilbenzoato.

Tendo em vista as diferenças nas composições químicas encontradas entre os metabólitos voláteis de materiais vegetais de *B. rufescens* coletados na mesma região, óleos essenciais escolhidos foram reunidos (BRLM e BRFM) e fracionados cromatograficamente visando os isolar componentes majoritários para assegurar as identificações. No presente estudo sobre componentes voláteis de *B. rufescens*, foi possível isolar, pela primeira vez, a substância (**26**) e estabelecer sua estrutura com base nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , contando com as técnicas de medida em 2 D. No mesmo fracionamento foram também isolados espatulenol (**7**) e (*E*)-nerolidol (**17**), os quais foram identificados com uso dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , DETP 90 e DEPT 135 (Tabelas 16 e 17), em comparação com dados publicados (DOSKOTCH et al., 1980; QUEIROGA et al., 1990; SUAREZ; MENICHINI; MONACHE, 2002; MOREIRA et al., 2007).

O espatulenol (**7**) apresentou-se na proporção de apenas 4,39% em uma das amostras de óleo essencial reunidas para o fracionamento (BRLM) e a substância isolada mostrou algumas impurezas por CCD e, conseqüentemente houve algumas dificuldades para a atribuição de todos os sinais no espectro de RMN de ^1H (Anexos 7, 8 e 9).

O (*E*)-nerolidol (**17**) estava em mais elevada proporção, atingindo 39,41% em BRLM e foi isolado em bom grau de pureza, sendo possível reconhecer as correspondências de todos os sinais no espectro de RMN de ^1H (Anexo 12). Para ambas as substâncias (**7**) e (**17**), todos os sinais nos espectros de RMN de ^{13}C puderam ser atribuídos (Tabelas 16 e 17; Anexos 10 e 11). A Figura 25 mostra as estruturas químicas com a numeração dos esqueletos carbônicos dos álcoois sesquiterpênicos espatulenol (**7**) e (*E*)-nerolidol (**17**).

Tabela 16 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C do espatulenol (7) isolado do óleo essencial de *B. rufescens* comparados com dados da literatura

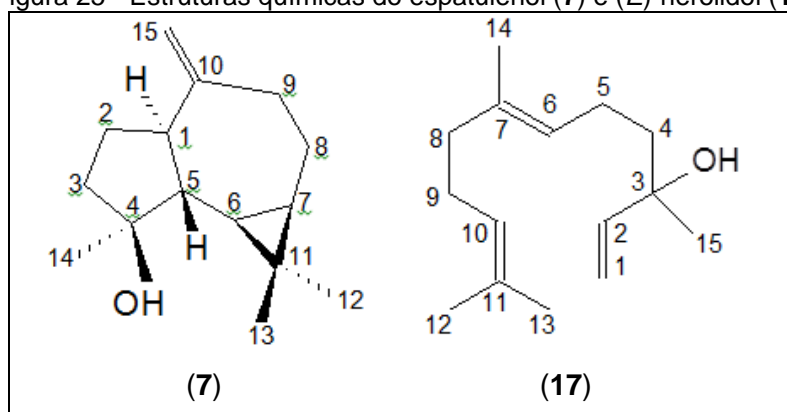
C/H	RMN ^1H (δ)			RMN ^{13}C (ppm)		
	(7)	REF ¹	REF ²	(7)	REF ¹	REF ²
1 CH	-	-	-	54,34	54,3	54,3
2 CH ₂	-	-	-	26,72	26,7	26,7
3 CH ₂	-	-	-	41,75	41,7	41,7
4 C	-	-	-	80,99	80,9	80,9
5 CH	-	-	-	53,40	53,3	53,4
6 CH	0,47 dd J = 10,4; 10,0 Hz	0,46 dd J = 11,2; 9,5 Hz	-	29,91	29,9	30,0
7 CH	0,72 m	0,72 ddd J = 11,2; 9,5; 6,1 Hz	-	27,48	27,4	27,5
8 CH ₂	-	-	-	24,78	24,8	24,8
9 CH ₂	-	-	-	38,87	38,8	38,9
10 C	-	-	-	153,46	153,4	153,2
11 C	-	-	-	20,27	20,2	20,3
12 CH ₃	1,04 s	1,05 s	1,05 s	28,66	28,6	28,7
13 CH ₃	1,05 s	1,06 s	-	16,35	16,2	16,4
14 CH ₃	1,28 s	1,28 s	1,29 s	16,18	26,0	26,0
15a CH ₂	4,69 s	4,69 s	-	106,27	106,0	106,1
15b CH ₂	4,66 s	4,66 s	4,65 s	-	-	-

REF¹ = MOREIRA et al., 2007; REF² = QUEIROGA et al., 1990.

Tabela 17 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C do (*E*)-nerolidol (17) isolado do óleo essencial de *B. rufescens* comparados com dados da literatura

C/H	RMN ^1H (δ)			RMN ^{13}C (ppm)		
	(17)	REF ¹	REF ²	(17)	REF ¹	REF ²
1 CH ₂	5,23-5,01 m	4,95-5,4 m	5,24-5,04 m	111,69	111,1	111,0
2 CH	5,92 dd J = 10,8 e 17,2 Hz	6,0 q	5,92 dd	145,07	144,7	144,7
3 C	-	-	-	73,52	72,9	72,8
4 CH ₂	1,68-1,45 m	-	1,62-1,45 m	42,06	41,7	41,9
5 CH ₂	2,07-1,92 m	-	2,10-1,90 m	22,73	22,2	22,4
6 CH ₂	5,23-5,01 m	4,95-5,24 m	5,24-5,04 m	124,24	123,8	124,0
7 C	-	-	-	135,59	135,0	134,4
8 CH ₂	2,07-1,92 m	1,85-2,3 m	2,10-1,90 m	39,70	39,2	39,4
9 CH ₂	2,07-1,92 m	-	2,10-1,90 m	26,65	26,6	26,4
10 CH	5,23-5,01 m	4,95-5,4 m	5,24-5,04 m	124,21	123,8	124,0
11 C	-	-	-	131,45	130,8	130,4
12 CH ₃	1,68 sl	1,71 s	1,68 s	17,69	17,1	17,3
13 CH ₃	1,60 sl	1,61 s	1,60 s	25,70	25,1	25,3
14 CH ₃	1,60 sl	1,63 s	1,60s	16,02	17,1	15,6
15 CH ₃	1,28 sl	1,29 s	1,28 s	27,90	26,7	27,3

REF¹ = DOSKOTCH et al., 1980; REF² = SUAREZ; MENICHINI; MONACHE, 2002.

Figura 25 - Estruturas químicas do espatulenol (7) e (*E*)-nerolidol (17)

Fonte: = MOREIRA et al., 2007; SUAREZ; MENICHINI; MONACHE, 2002.

Como mencionado acima, a 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) foi identificada na composição química dos óleos essenciais de outras três espécies *Baccharis*: *B. salicifolia* (4,67%), *B. latifolia* (0,80%) e *B. viminea* (BOHLMANN et al., 1984; LOAYZA et al., 1995). No presente estudo sobre *B. rufescens*, esse composto foi encontrado nos óleos essenciais provenientes das folhas (42,91%) e folhas com inflorescências de espécimes masculinos (53,28%), representando uma boa oportunidade para o isolamento. Os outros componentes isolados, (7) e (17), são mais comumente encontrados nos óleos essenciais de diversas espécies do gênero *Baccharis* (LAGO et al., 2008; LAGO; ROMOFF; FÁVERO, 2008; MENDES et al., 2008; MORAIS; CASTANHA, 2011; BESTEN et al., 2012; KURDELAS et al., 2012).

A estrutura da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) isolada foi analisada por RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT 90, DEPT 135, gHSQC, HMBC e gCOSY (Anexos 13 e 14), atribuindo-se todos os sinais que confirmam a estrutura inicialmente proposta e sua estereoquímica. Com o espectro DEPT verificou-se a presença de quatro carbonos quaternários, sendo um de carbonila em 205,4 ppm (C8); quatro grupos metínicos, sendo apenas um de carbono sp^2 ; três grupos carbonos metilênicos sp^3 e quatro grupos metílicos. Os sinais de carbono entre 100 e 150 ppm foram atribuídos a carbonos sp^2 , sendo três deles quaternários e um CH de alceno, que foi atribuído por gHSQC em 4,87 ppm – 123,44 ppm (H5-C5). Foram também atribuídos os demais carbonos quaternários em 134,78 (C4), 137,04 (C11), 141,25 (C7). Foram observados os seguintes acoplamentos por gCOSY: CH (5) – CH (H6-C6) 3,59 ppm – 42,19 ppm, simpleto largo; CH (5) – CH_3 (H14-C14) 1,52 ppm – 23,56 ppm, singleto; CH (5) – CH_2 (H3-C3) 1,70 a 1,80 ppm – 25,71 ppm, multipeto; CH_2 (3) - CH_2 diastereotópico, 1,58 a 1,70 ppm, multipeto, e 1,90 a 1,97 ppm, multipeto –

24,82 ppm (H2-C2); CH₂ (2) – CH (H1-C1) 1,60 – 1,70 ppm, multipeto – 39,91 ppm. O outro grupo CH₂ diastereotópico em 2,31 – 1,99 ppm J = 4,0 e 16,8 Hz – 51,31 ppm (H9-C9), mais desblindado, foi atribuído ao CH₂ α à carbonila; outros acoplamentos foram observados para este grupamento: CH₂ (9) – CH (H15-C15) 0,91ppm, dubleto com J = 8,4 Hz – 19,95 ppm; CH (15) – CH (H10-C10) 1,98 ppm, simpleto – 28,61ppm; CH (6) – CH₂ (2), CH (6) – CH₃ (14). O espectro HMBC mostra acoplamento dos grupos metílicos em 1,88 ppm, simpleto – 23,23 ppm e em 1,74 ppm, simpleto – 21,79 ppm (H12-C12 e H13-C13) com os carbonos quaternários sp² em 141,25 e 137,04 ppm (C7 e C11) e com o carbono da carbonila. Esses dados confirmam a estrutura da cetona (26), e a Tabela 18 resume as atribuições de ¹H e de ¹³C.

Tabela 18 - Deslocamentos químicos de RMN de ¹H e de ¹³C da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (26) isolada do óleo essencial de *B. rufescens*

C/H	RMN ¹ H (δ)	RMN ¹³ C (ppm)
1 CH	1,60 - 1,70 m	39,91
2a CH ₂	1,58 - 1,70 m	24,82
2b CH ₂	1,90 - 1,97 m	-
3 CH ₂	1,70 - 1,80 m	25,71
4 C	-	134,78
5 CH	4,87 s	123,44
6 CH	3,59 sl	42,19
7 C	-	141,25
8 C=O	-	205,4
9a CH ₂	1,99 - 2,31 m	51,31
9b CH ₂	2,31 dd J = 10,2 e 2,4 Hz	-
10 CH	1,98 s	28,61
11 C	-	137,04
12 CH ₃	1,88 sl	23,23
13 CH ₃	1,74 sl	21,79
14 CH ₃	1,52 sl	23,56
15 CH ₃	0,91 d J = 6,3 Hz	19,95

9.3 ESTUDO QUÍMICO PRELIMINAR DAS FOLHAS DE *Baccharis tridentata*

Com um material vegetal de folhas de *B. tridentata* coletado anteriormente (janeiro de 2010), foi realizada uma análise preliminar do óleo essencial (item 9.3.1), dos compostos fenólicos neutros (item 9.3.2) e ácidos (item 9.3.3) dessa espécie

vegetal. Como o material vegetal disponível foi coletado fora da época de floração, não foi possível estabelecer se a coleta era de espécimes masculinos ou femininos, ou mistura de ambos. E mesmo contando somente com folhas, o estudo preliminar foi empreendido visando verificar possíveis diferenças em relação a dois estudos químicos publicados (FERRACINI et al., 1995; SOUZA et al., 2011).

9.3.1 ESTUDO PRELIMINAR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis tridentata*

As análises por CG-EM-DIC (Tabela 19) apontaram os sesquiterpenos como classe majoritária no óleo essencial (63,59%), com grande maioria para os compostos voláteis oxigenados. O espatulenol (**7**) apresentou-se como componente principal (27,86%), seguido por (+)-torreiol (**23**) (12,16%), óxido de cariofileno (**9**) (10,59 %), β -pineno (**2**) (9,51 %) e α -cadinol (**18**) (8,37 %).

Tabela 19 - Análise do óleo essencial das folhas de *B. tridentata*

COMPONENTES	(%)	IRR _{cal} *	IRR _{lit} **
β -pineno	9,51	980	980
linalool	3,69	1100	1098
terpnen-4-ol	3,50	1181	1177
α -terpineol	1,59	1196	1189
β -cariofileno	2,97	1417	1418
espatulenol	27,83	1576	1576
óxido de cariofileno	10,59	1580	1581
viridiflorol	1,67	1592	1590
(+)-torreiol	12,16	1642	1645
α -cadinol	8,37	1656	1653
	%		
Monoterpenos não oxigenados	9,51		
Monoterpenos oxigenados	8,78		
Sesquiterpenos não oxigenados	2,97		
Sesquiterpenos oxigenados	60,62		
Total	81,88		
Rendimento	0,57		

* IRR_{cal} = média dos índices de retenção relativa calculados para cada componente em todas as análises; ** IRR_{lit} = Índice de retenção relativa publicados (ADAMS, 1995); % = porcentagem relativa da concentração dos componentes.

Um estudo anterior (FERRACINI *et al.*, 1995) do óleo essencial das folhas desta espécie vegetal coletada em área de serrado de São Paulo (Santa de Riacha em Minas Gerais) já demonstrou que é uma boa fonte de espatulenol (**7**) (21,2%), encontrando-se também δ -cadineno (**6**) (7,7%), globulol (**21**) (5,9%), α -terpineol (3,9%) e viridiflorol (**25**) (4,0%) indicando pouca semelhança com os resultados obtidos com materiais vegetais do Paraná.

Em outro estudo anterior (SOUZA *et al.*, 2011), *B. tridentata* foi coletada em Itumirim, Minas Gerais, e o óleo essencial das folhas frescas com apenas 0,091% de rendimento apresentou elevada proporção de monoterpenos, com 22,93% de α -tujeno (**19**), 20,33% de β -pineno (**2**), 16,15% de β -felandreno (**20**) e 6,08% de β -mirceno. Por outro lado, baixas proporções de sesquiterpenos foram encontradas, como por exemplo, 0,19% de espatulenol (**7**) e 0,87% de óxido de cariofileno (**9**). Assim, nesse segundo artigo publicado também não se observa semelhança da composição do óleo essencial obtido do material coletado em Minas Gerais com os resultados das análises preliminares realizadas no presente estudo.

9.3.2 SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS NEUTRAS DE *Baccharis tridentata*

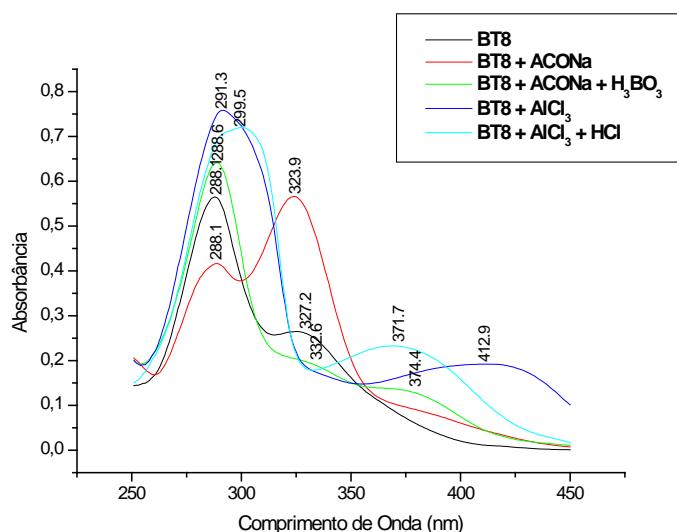
A solução aquosa restante da hidrodestilação das folhas foi filtrada e extraída em pH = 8 com AcOEt, obtendo-se um extrato contendo compostos fenólicos neutros com rendimento de 0,77% (0,30 g). A análise por CCD desse extrato demonstrou a presença maciça de apenas um componente, que revelou positivamente para fenol com solução metanólica de FeCl₃.

A Figura 26 mostra o espectro de UV-Vis do extrato AcOEt obtido em pH = 8 apresentando padrão característico de flavanona ou diidroflavonol. A amostra exibiu absorções da banda II em 288,1 nm e da banda I em 327,2 nm, indicando que não há conjugação entre os anéis A e B. A banda II diminui sensivelmente de intensidade em relação ao espectro em MeOH com a adição da base fraca AcONa, enquanto que a banda I aumentou sua intensidade mostrando máximo de absorção em 323,9 nm (MARKHAM, 1982).

Um deslocamento batocrômico da banda I é observado com adição de AlCl₃, de 327,2 nm (em MeOH) para 412,9 nm, indicando a presença de um grupamento

orto-di-OH no anel B, o que é confirmado pelas absorções após a adição de HCl. O espectro final, com a adição de HCl, ainda apresenta a banda de absorção em 371,7 nm, devido ao complexo de AlCl_3 com o grupo 5-OH e a carbonila na posição C4 (MARKHAM, 1982).

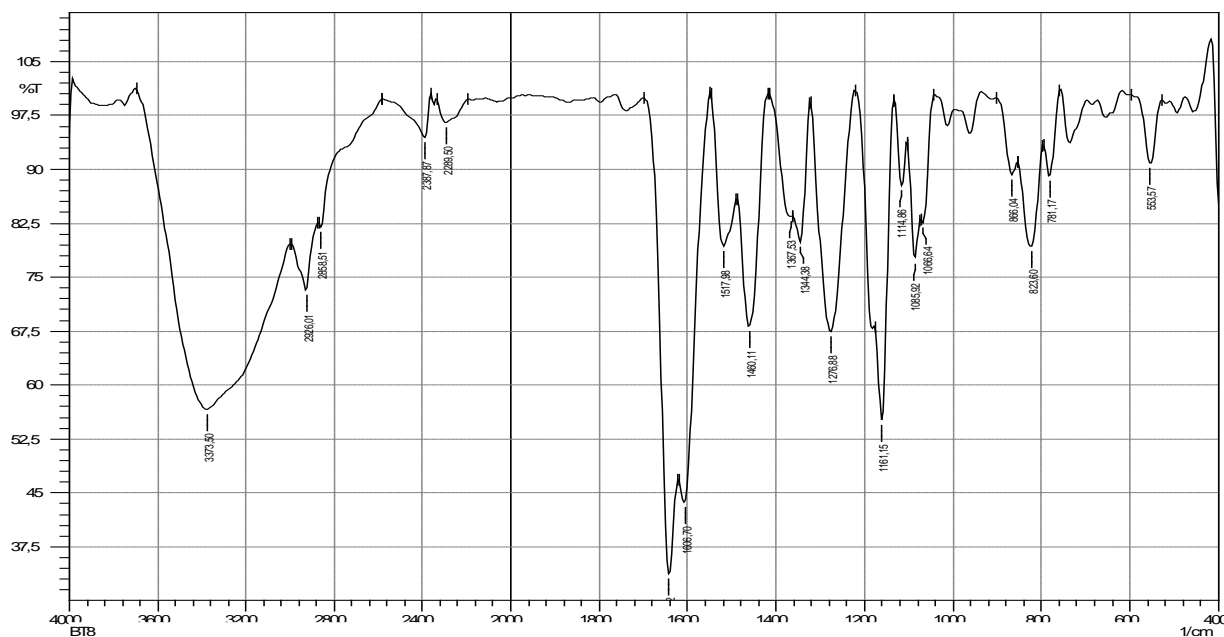
Figura 26 - Espectros de UV-Vis do extrato obtido com AcOEt em pH = 8



As observações feitas nos espectros de UV-Vis permitiram supor a estrutura do eriodictiol (3',4',5,7-tetrahidroxiflavanona) (**22**) para o principal componente do extrato AcOEt em pH = 8.

O flavonoide principal no extrato AcOEt pH 8 foi obtido em forma pura por cromatografia em coluna de sílica gel (item 7.4.1). O espectro de infravermelho (Figura 27) do componente isolado (**22**) apresentou estiramento de grupos hidroxila com uma banda de absorção forte em 3.373 cm^{-1} , e absorções de intensidade moderada para as vibrações de estiramento C-H sp^3 em 2.926 e 2.858 cm^{-1} . Observa-se a banda forte em 1.606 cm^{-1} devida a vibrações de estiramento C=C, que indicam a presença de anel aromático. A banda de absorção em 1.641 cm^{-1} refere-se ao estiramento do grupo carbonila conjugado. Os dados do espectro de infravermelho estão em acordo com os dados publicados para o composto (**22**) no estudo realizado por Oliveira e Carvalho (1999).

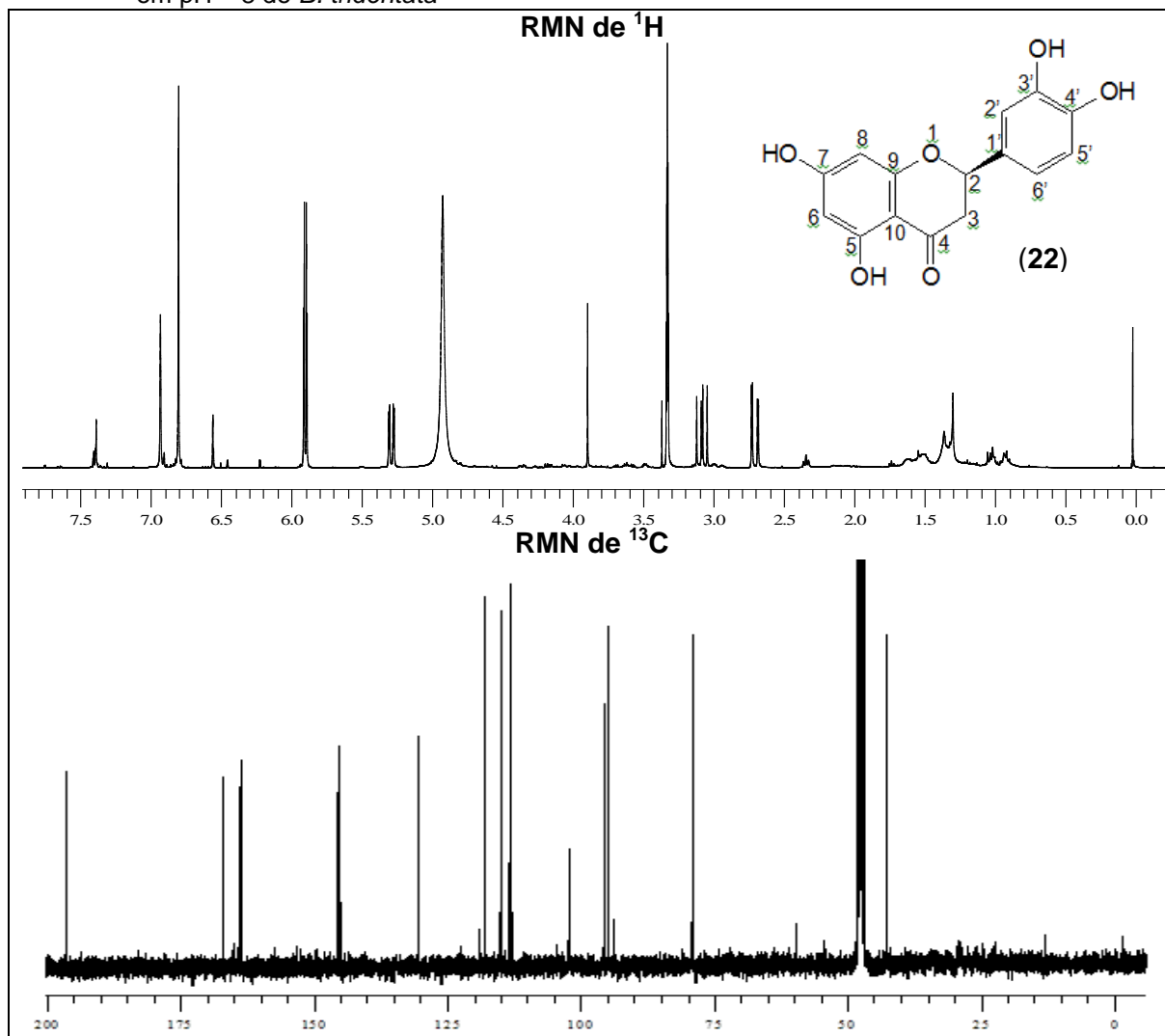
O extrato bruto AcOEt pH 8 e o eriodictiol isolado (**22**) foram analisados por RMN de ^1H e de ^{13}C (Figura 28). A Tabela 20 mostra as atribuições dos deslocamentos químicos comparados com os dados disponibilizados na literatura (OLIVEIRA; CARVALHO, 1999; SILVA et al., 2010; MOREIRA et al., 2003).

Figura 27 - Espectro de infravermelho do eriodictiol (**22**) isolado medido em KBrTabela 20 - Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do eriodictiol (**22**) presente no extrato AcOEt em pH=8 de *B. tridentata* e de (**22**) isolado em comparação com dados publicados

C/H	RMN ^1H (δ)			RMN ^{13}C (ppm)		
	EXT	(22)	REF	EXT	(22)	REF
2 CH	5,26 dd J=3 e 12,6 Hz	5,27 dd J=3,2 e 12,8 Hz	5,26 dd J=3,0 e 12,5 Hz	80,69	79,09	80,5
3a CH₂	3,06 dd J=12,5 e 17,1 Hz	3,08 dd J=12,8 e 17,2 Hz	3,06 dd J=12,5 e 17,0 Hz	44,16	42,70	44,1
3b CH₂	2,68 dd J=3 e 17,1 Hz	2,72 dd J=3,2 e 17,2 Hz	2,68 dd J=3,0 e 17,0 Hz	-	-	-
4 C	-	-	-	197,81	196,35	197,8
5 C	-	-	-	165,52	164,05	165,4
6 CH	6,45 d J=2,1 Hz	5,91 d J=2,0 Hz	5,89 d J=2,0 Hz	97,1	95,63	97,0
7 C	-	-	-	168,49	166,98	168,4
8 CH	6,20 d J=2,1 Hz	5,89 d J=2,0 Hz	5,87 d J=2,0 Hz	96,2	94,77	96,2
9 C	-	-	-	164,94	163,44	164,9
10 C	-	-	-	103,41	101,95	103,3
1' C	-	-	-	131,86	130,38	131,8
2' CH	6,91 s	6,93 sl	6,91 s	114,81	114,85	114,7
3' C	-	-	-	146,65	145,10	146,5
4' C	-	-	-	146,96	145,62	146,9
5' CH	6,79 s	6,80 sl	6,78 s	116,23	115,37	116,2
6' CH	6,79 s	6,80 sl	6,78 s	119,35	118,92	119,3

EXT = extrato bruto, espectro medido em CD_3OD num equipamento de 200MHz; (**22**) = eriodictiol isolado, espectros medidos em CD_3OD num equipamento de 400 MHz; LIT = SILVA et al., 2010.

Figura 28 - Estrutura química da substância (22) e os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C medidos em CD_3OD em equipamento de 400MHz do eriodictiol (22) isolado do extrato acetato de etila em pH = 8 de *B. tridentata*



Os sinais de H do anel A apareceram como dubletos em δ 6,45 (H6) e δ 6,20 (H8) com constante de acoplamento de 2,1 Hz característica de acoplamento *meta*. No anel B, o H2' (δ 6,91) aparece como simpleto, observando-se também simpletos para H6' (δ 6,79) e H5' (δ 6,79). Também, característicos da configuração absoluta *R* de C2, foram observados os prótons H3a em δ 3,06 como duplo dubleto com constantes de acoplamento $J=12,5$ e $17,1$ Hz, H3b em δ 2,68 como duplo dubleto com constantes $J=3,0$ e $17,1$ Hz, e o H2 em δ 5,26 como duplo dubleto com constantes $J=3,0$ e $12,6$ Hz. As esperadas constantes de acoplamento de aproximadamente 8 Hz em dubletos para H6' e H5' não são observadas no espectro de RMN ^1H medido em CD_3OD ou DMSO-d_6 e esse efeito não tem uma explicação clara (ENCARNACIÓN et al., 1999; SILVA et al., 2010). A literatura registra que,

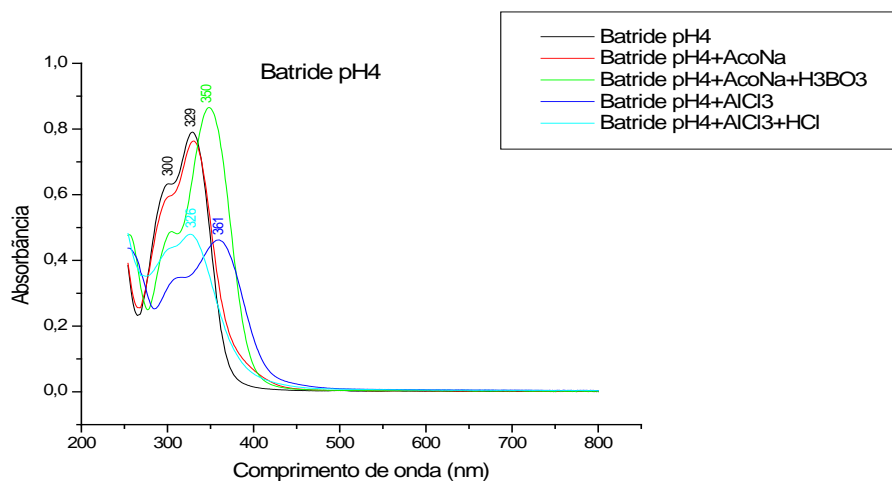
quando o espectro for medido em CDCl_3 , os dubletos de H6' e H5' com $J=8,6$ Hz são observados em δ 7,34 e δ 6,89, respectivamente, e o sinal atribuído ao H2' aparece também sob o dubleto em δ 7,34 (VASCONCELOS; SILVA; CAVALEIRO, 1998).

9.3.3 ESTUDO PRELIMINAR DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS DE *Baccharis tridentata*

O extrato obtido com AcOEt em pH = 4 a partir de folhas da primeira coleta apresentou rendimento bem maior quando comparado com o do extrato em pH básico (2,85%). Em diversas pesquisas anteriores sobre espécies do gênero *Baccharis*, os flavonóides aparecem em proporções mais baixas que os ácidos cafeoilquínicos (SIMÕES-PIRES et al., 2005a; ASCARI, 2007; MENDES, 2007; JASINSKI, 2010; BESTTEN, 2012).

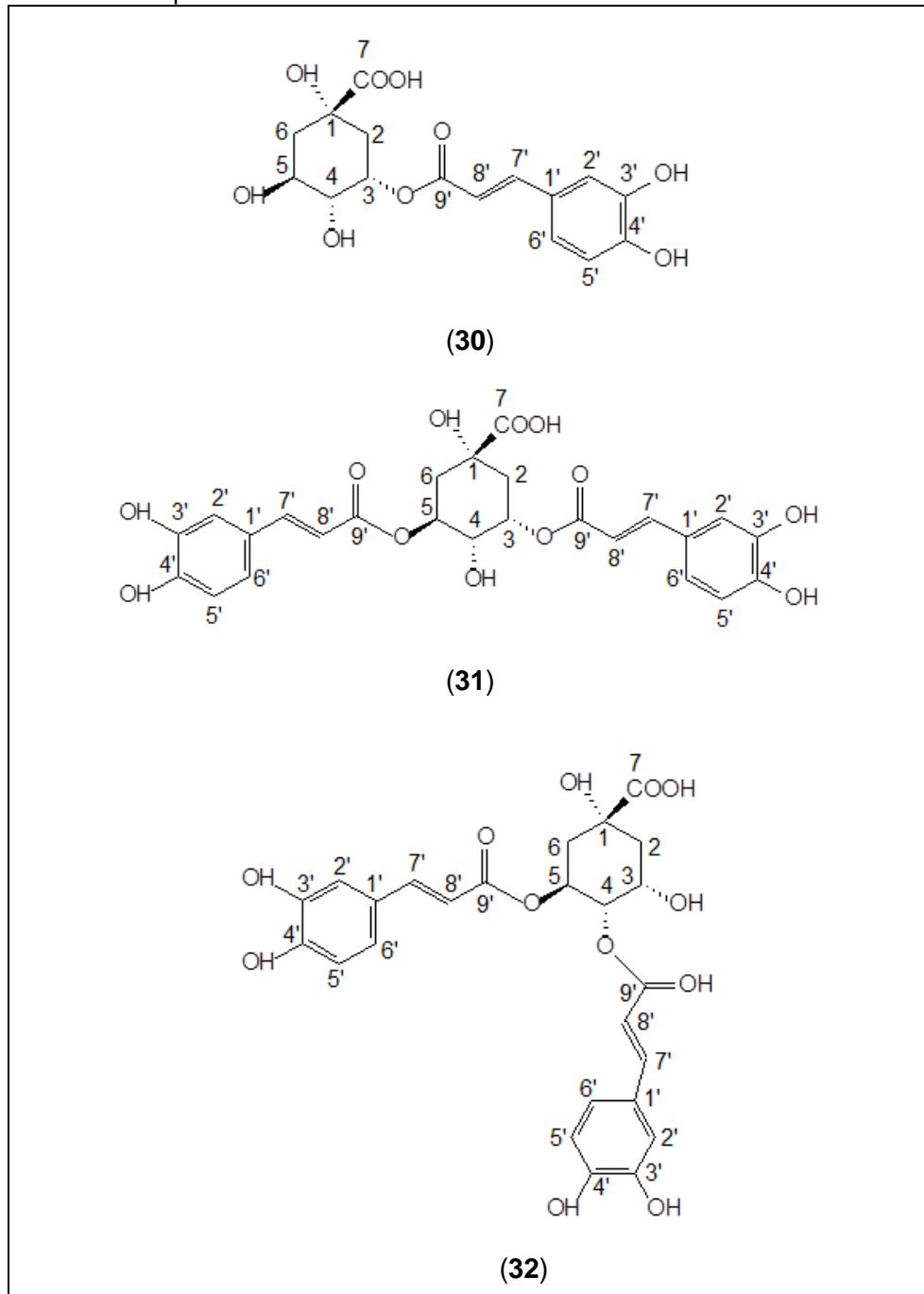
Os espectros de UV-Vis obtido com a adição dos reagentes de deslocamento, (Figura 29) são característicos de ácidos cafeoilquínicos e observa-se o efeito da complexação do AlCl_3 com os grupos orto-diidroxí dos anéis aromáticos de cafeatos, e em seguida, a recuperação dos espectros originais após a adição de HCl. Além disto, os grupamentos orto-diidroxí também mostram complexação característica com H_3BO_3 (MARKHAM, 1982; ASCARI, 2007; MENDES, 2007; JASINSKI, 2010; BESTEN, 2012).

Figura 29 - Espectros UV-Vis do extrato AcOEt em pH = 4 com uso dos reagentes recomendados para análise de flavonoides segundo Markham (1982)



Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C do extrato AcOEt em pH 4 (Anexos 15 e 16) são típicos de derivados ácidos cafeoilquínicos (Figura 30). Nos espectros de ^1H , os sinais aparecem acumulados em multipletos, devido à presença de mistura de vários isômeros, mas distribuídos em deslocamentos químicos característicos dessa classe de compostos (BASNET et al., 1996; JASINSKI, 2010; BESTEN, 2012).

Figura 30 - Estruturas químicas dos derivados de ácidos cafeoilquínicos do extrato em pH = 4 de *B. tridentata*



Fonte: BERREGI et al., 2003; SILVA et al., 2009.

Os sinais em 178,08, 177,47 e 176,89 ppm podem ser atribuídos a carbonilas de ácido carboxílico de unidades do ácido quínico indicando que, pelo menos, três destes compostos estão presentes em proporções similares. Cada unidade de ácido quínico também apresenta três carbonos metínicos (entre 58,5 e 76,7 ppm) e dois metilênicos (entre 36,11 e 43,55 ppm), cujos sinais podem até levar à sugestão de identidades para cada isômero (TATEFUGI et al., 1996).

Como os deslocamentos químicos encontrados nos espectros de RMN de ^1H , quando comparados com os dados publicados, comprovou-se a provável presença do ácido 3-cafeoilquínico (**30**), ácido 3,5-O-dicafeoilquínico (**31**) e ácido 4,5-O-dicafeoilquínico (**32**) (Figura 30).

9.4 ÓLEOS DE ESPÉCIMES MASCULINOS E FEMININOS DE *Baccharis tridentata*

Os materiais vegetais da segunda coleta foram separados em triplicatas e caracterizados apenas como partes aéreas (Pa) em razão da pouca disponibilidade de inflorescências. Assim, os materiais vegetais foram codificados como BTPaM, proveniente de espécimes masculinos, e BTPaF de espécimes femininos.

Ambos os óleos dos espécimes masculinos e femininos apresentaram coloração amarela clara e odor herbáceo suave característico.

As composições químicas das amostras de óleos essenciais analisadas por CG-EM-DIC são apresentadas na Tabela 21. Foram identificados 18 componentes nos óleos essenciais de *B. tridentata*, com os sesquiterpenos oxigenados como os constituintes majoritários (BTPaF1: 78,17%; BTPaF2: 83,29%; BTPaF3: 81,04%; BTPaM1: 88,18%; BTPaM2: 84,48%; BTPaM3: 88,02%), seguindo-se os monoterpenos oxigenados (BTPaF1: 14,71%; BTPaF2: 10,60%; BTPaF3: 12,10%; BTPaM1: 7,53%; BTPaM2: 13,00%; BTPaM3: 10,89%).

Os monoterpenos oxigenados estão presentes nos óleos dos espécimes femininos em até 14,71% e nos masculinos 13,00%. Já os monoterpenos não oxigenados apresentam menor concentração, sempre abaixo de 1%.

Nas amostras dos espécimes masculinos não foi identificada a presença de biciclogermacreno (**5**) e δ -cadineno (**6**). Para ambas as amostras BTPaF e BTPaM os principais constituintes são: o espatulenol (**7**), óxido de cariofileno (**9**), (+)-torreiol (**23**) e α -cadinol (**18**). Em outras espécies do gênero *Baccharis*, os sesquiterpenos

oxigenados também apresentaram-se como constituintes majoritários de seus óleos essenciais. Como exemplos, os óleos essenciais de *Baccharis myriocephala* e *B. tridentata* já apresentaram (7) (9,44% e 21,20%, respectivamente), *Baccharis platipoda* apresentou (7) (8,76%) e (18) (5,09%), enquanto *Baccharis microdonta* o (9) (24,06%) e o (18) (8,44%) (FERRACINI et al., 1995; LAGO; ROMOFF; FÁVERO, 2008).

Tabela 21 - Composição química dos óleos essenciais de *B. tridentata*

COMPONENTES	1	2	3	1'	2'	3'	IRR _{cal} *	IRR _{lit} **	
	%								
β-pineno	0,65	0,50	0,66	-	0,75	-	977	980	
linalool	2,58	2,02	2,49	0,83	1,48	1,19	1100	1098	
trans-pinocarveol	2,61	2,11	2,23	2,14	2,91	2,60	1140	1139	
cis-verbenol	2,61	0,71	0,90	-	0,40	-	1146	1142 [#]	
pinocarvona	1,02	0,69	0,88	0,42	0,91	0,63	1164	1162	
terpine-4-ol	2,00	1,51	1,66	1,02	2,13	2,58	1178	1177	
α-terpineol	1,16	1,12	1,12	0,56	0,95	1,03	1192	1189	
mirtenal	2,73	2,44	2,82	2,56	4,22	2,86	1198	1193	
α-copaeno	0,25	-	0,13	-	-	-	1377	1376	
β-cariofileno	2,34	2,02	2,11	1,07	1,41	1,10	1421	1418	
germacreno D	0,85	0,51	0,54	-	0,37	-	1483	1480	
biciclogermacreno	1,74	0,78	0,81	-	-	-	1498	1494 [#]	
2,6-dibutil-4-metilfenol	0,84	1,73	2,06	2,53	1,60	2,41	1513	1512	
δ-cadineno	0,47	0,56	0,46	-	-	-	1525	1524	
espatulenol	45,40	49,86	46,91	53,09	48,68	51,44	1586	1576	
óxido de cariofileno	15,31	15,17	16,15	14,09	15,32	14,90	1590	1581	
(+)-torreiol	10,95	11,81	11,81	13,39	11,58	12,15	1645	1645	
α-cadinol	6,51	6,45	6,17	7,61	7,29	7,12	1660	1653	
	%								
Monoterpenos não oxigenados	0,65	0,50	0,66	-	0,75	-			
Monoterpenos oxigenados	14,71	10,60	12,10	7,53	13,00	10,89			
Sesquiterpenos não oxigenados	6,49	5,60	6,11	3,60	1,78	1,10			
Sesquiterpenos oxigenados	78,17	83,29	81,04	88,18	84,48	88,02			
Total	100	99,99	99,91	99,31	100,00	100,00			
Rendimento	0,46	0,51	0,53	0,53	0,54	0,47			

*IRR_{cal} = média dos índices de retenção relativa calculados para cada componente em todas as análises; **IRR_{lit} = Índice de retenção relativa publicados (ADAMS, 1995) a menos que indicado individualmente; 1142[#] (KOWALSKI; WOLSKI, 2005); 1494[#] (TELLEZ et al., 1999); 1 = BTPaF1; 2 = BTPaF2; 3 = BTPaF3; 1' = BTPaM1; 2' = BTPaM2; 3' = BTPaM3; % = porcentagem relativa da concentração dos componentes.

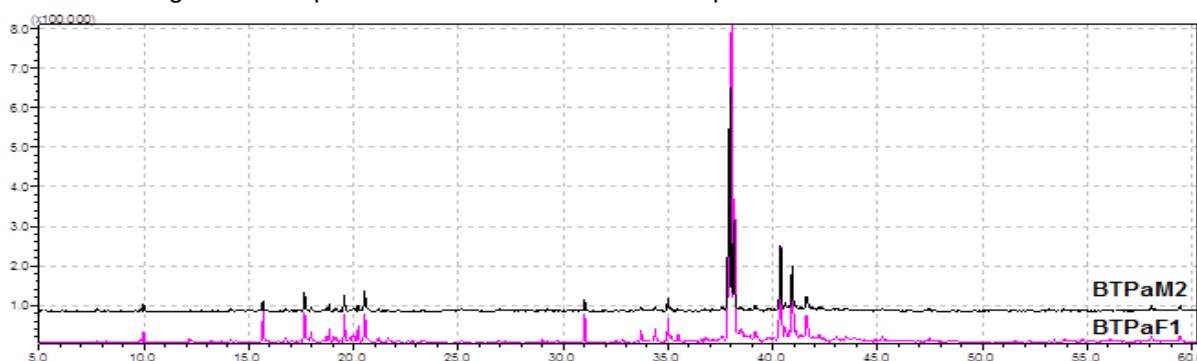
Estes resultados diferem da pesquisa realizada por Souza e colaboradores (2011), que ao analisar o óleo de *B. tridentata* observaram o α-tujeno (19) (22,93%),

β -pineno (**2**) (20,33%) e o β -felandreno (**20**) (16,15%) em maiores proporções do que o espatulenol (**7**), (0,19%), óxido de cariofileno (9) (0,87%) e α -cadinol (**18**) (0,21%), com ausência de (+)-torreiol (**23**). Essas diferenças se devem mais provavelmente a, que nesse estudo, o óleo essencial foi hidrodestilado à partir de material vegetal fresco.

As triplicatas dos espécimes femininos e masculinos apresentam semelhanças entre seus óleos essenciais e as pequenas diferenças da composição química estão nos componentes de baixas porcentagens. Essas considerações também podem ser observadas na Figura 31 que mostra os espectros sobrepostos das amostras BTPaF1 e BTPaM2.

Os óleos essenciais dos espécimes femininos e masculinos, quando comparados em relação a suas composições químicas podem ser considerados bastante semelhantes, com idênticos constituintes majoritários e apresentando diferenças maiores apenas em concentrações de constituintes minoritários.

Figura 31 - Espectros dos óleos essenciais das partes aéreas de *B. tridentata*

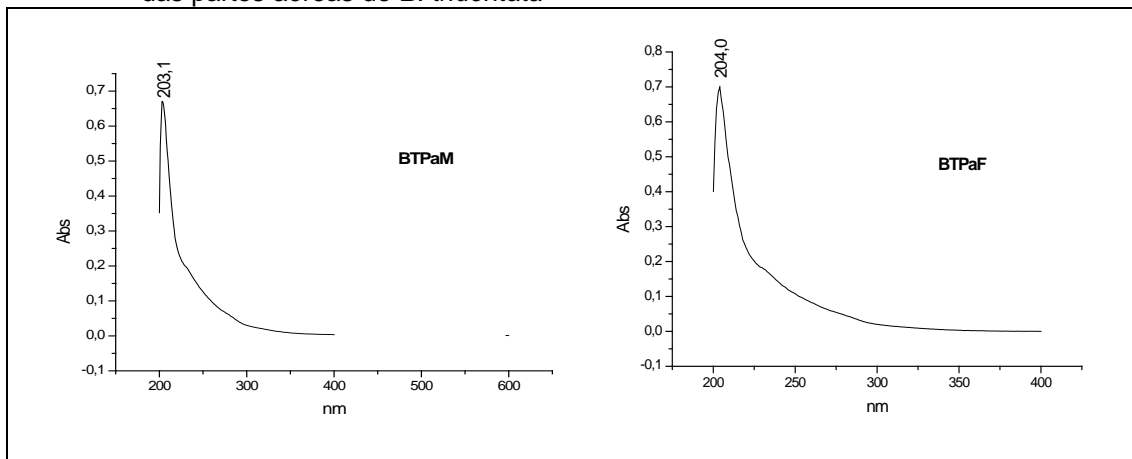


Os espectros de UV-Vis, utilizando metanol como solvente, dos óleos essenciais das partes aéreas femininas e masculinas de *B. tridentata*, mostrados na Figura 32, apresentaram absorções em torno de 204 nm, confirmando a ausência de altas proporções de compostos aromáticos ou contendo duplas ligações conjugadas.

Para complementar as identificações de componentes majoritários presentes nos óleos essenciais de *B. tridentata*, foram realizados os espectros de RMN de ^{13}C , DEPT 90 e DEPT 135 (Anexos 17 e 18) da amostra mais representativa e as atribuições de deslocamentos químicos foram feitas por comparação com dados publicados. Os deslocamentos químicos dos espectros de RMN de ^{13}C do óleo essencial da amostra BTPaM3 foram comparados com os dados da literatura para

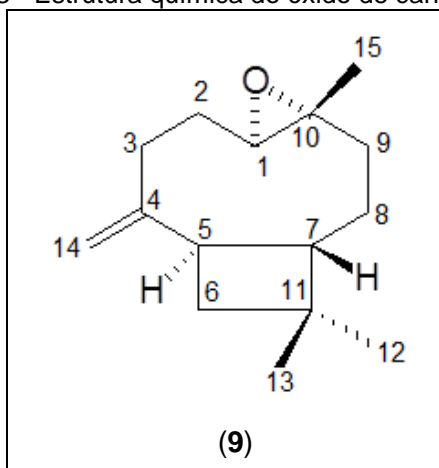
os principais componentes (Tabelas 22; 23 e 24) (EIJK; ROEIJMANS; VERWIEL, 1984; AINSWORTH et al., 1990; QUEIROGA; FUKAI; MARSAIOLI, 1990; MOREIRA et al., 2007).

Figura 32 - Espectros de UV-Vis dos óleos essenciais dos espécimes masculinos e femininos das partes aéreas de *B. tridentata*



Todos os deslocamentos químicos foram atribuídos aos carbonos das substâncias majoritárias (7), (9) (Figura 33) e (23) do óleo essencial dos espécimes masculinos. Porém, o deslocamento químico para o carbono terciário (12 CH) da estrutura do (+)-torreiol (23), que não pode ser confirmado nem pelo DEPT 90 e nem pelo DEPT 135.

Figura 33 - Estrutura química do óxido de cariofileno (9)



Fonte: MOREIRA et al., 2007.

Tabela 22 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do óxido de cariofileno (**9**) presente na amostra do óleo essencial das partes aéreas de espécimes masculinos de *B. tridentata*

C	RMN ^{13}C (ppm)		
	(9)	REF ¹	REF ²
1 CH	63,76	63,70	64,0
2 CH ₂	30,19	30,19	30,4
3 CH ₂	29,83	29,89	30,0
4 C	151,83	151,85	152,1
5 CH	48,74	48,74	49,0
6 CH ₂	39,78	39,81	40,0
7 CH	50,00	50,88	50,9
8 CH ₂	20,20	27,24	27,4
9 CH ₂	39,17	39,21	39,4
10 C	59,88	59,75	60,0
11 C	34,01	34,01	34,2
12 CH ₃	21,63	21,65	21,8
13 CH ₃	29,90	29,90	30,2
14 CH ₂	112,76	112,74	113,0
15 CH ₃	16,99	16,99	17,2

(9): óxido de cariofileno em BTPaM3; REF¹: SDBS, 2013; REF²: MOREIRA et al., 2007.

Tabela 23 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do espatulenol (**7**) presente na amostra do óleo essencial das partes aéreas de espécimes masculinos de *B. tridentata*

C	RMN ^{13}C (ppm)		
	(7)	REF ¹	REF ²
1 CH	54,32	54,3	54,3
2 CH ₂	26,79	26,7	26,7
3 CH ₂	41,76	41,7	41,7
4 C	80,98	80,9	80,9
5 CH	53,42	53,3	53,4
6 CH	29,95	26,6	30,0
7 CH	27,51	27,4	27,5
8 CH ₂	24,79	24,8	24,8
9 CH ₂	38,88	38,8	38,9
10 C	153,42	153,4	153,2
11 C	20,26	20,2	20,3
12 CH ₃	28,67	28,6	28,7
13 CH ₃	16,33	16,2	16,4
14 CH ₃	26,07	26,0	26,0
15 CH ₂	106,5	106,0	106,1

(7): espatulenol em BTPaM3; REF¹: MOREIRA et al., 2007; REF²: QUEIROGA; FUKAI; MARSAIOLI, 1990.

Tabela 24 - Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do (+)-torreiol (**23**) presente na amostra do óleo essencial das partes aéreas de espécimes masculinos de *B. tridentata*

C	RMN ^{13}C (ppm)		
	(23)	REF ¹	REF ²
1 CH	46,69	45,5	45,7
2 CH ₂	19,83	18,5	18,6
3 CH ₂	30,81	31,1	31,3
4 C	134,32	134,3	134,5
5 CH	124,35	124,6	124,7
6 CH	36,78	36,8	36,9
7 CH	44,21	44,0	44,2
8 CH ₂	21,42	21,5	21,6
9 CH ₂	34,63	35,3	35,5
10 C	72,45	72,5	72,7
11 CH ₃	23,77	23,6	23,7
12 CH	-	-	26,5
13 CH ₃	21,56	21,7	21,8
14 CH ₃	15,22	15,3	15,4
15 CH ₃	28,47	27,9	28,1

(23): (+)-torreiol em BTPaM3; REF¹: AINSWORTH et al., 1990; REF²: EIJK; ROEIJMANS; VERWIEL, 1984.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C também apresentaram outros sinais referentes aos outros componentes em menores proporções. No espectro de RMN de ^1H , por exemplo, o sinal do H em δ 9,43 pode estar associado ao hidrogênio do aldeído mirtenal (2,86% em BTPaM3) ou à hidroxila fenólica do 2,6-dibutil-4-metilfenol (2,41% em BTPaM3). No espectro de RMN de ^{13}C , o deslocamento químico do carbono carbonílico do mirtenal é visto em 191,26 ppm.

10 CONCLUSÕES

O método empregado para as coletas, preparação dos materiais vegetais, obtenção e análise dos óleos essenciais das três espécies do gênero *Baccharis* permitiu observar a similaridade entre os óleos das folhas e inflorescências e das partes aéreas de espécimes masculinos e femininos de *B. pentodonta* e *B. tridentata*. As semelhanças entre as composições de óleos essenciais de espécimes masculinos e femininos de mais duas espécies *Baccharis* confirmam achados científicos inéditos que ocorreram ao longo de estudos realizadas pelo grupo (BESTEN et al., 2012).

No entanto, os óleos essenciais das folhas e folhas contendo inflorescências de espécimes femininos de *B. rufescens*, mais uma vez estudados nesta pesquisa, continuaram a mostrar grandes diferenças entre si. Pela primeira vez, a cetona 4,7(11)-amorfadien-8-ona foi identificada nos óleos essenciais dos espécimes masculinos de *B. rufescens*. Pela primeira vez essa substância pode ser isolada para análises por técnicas de RMN 2D. Outros estudos devem ser ainda realizados para obter todas as informações possíveis sobre essa substância, visto que a literatura disponível não apresenta dados mais concretos e precisos.

Os resultados deste trabalho suscitam novas hipóteses. A similaridade, ou as diferenças, entre as composições químicas dos óleos essenciais dos espécimes masculinos e femininos das três espécies *Baccharis* estudadas podem estar relacionadas com a genética do material vegetal e com o ponto de dispersão da planta. Assim, as diferenças entre os metabólitos voláteis dos espécimes masculinos e femininos de *B. rufescens*, não sendo uma espécie tipicamente brasileira, podem ser devidas à distância que separa nossa região e os territórios argentinos, que são considerados centros de dispersão dessa espécie vegetal. Por outro lado, *B. tridentata*, uma espécie brasileira bastante difundida nas regiões sul e sudeste, apresenta composições diferentes nos óleos essenciais dependendo do local de coleta, mas em nosso estudo não apareceram diferenças entre os componentes dos óleos essenciais de seus espécimes masculinos e femininos.

Os extratos obtidos com acetato de etila em pH = 8 e pH = 4 a partir das folhas de *B. tridentata* permitiram a identificação e o isolamento do eriodictiol. No extrato em pH = 4 foram observados os ácidos cafeoilquínico em alta concentração.

Assim, o método de extração permitiu separar os flavonoides dos ácidos fenólicos já nos extratos brutos, e os rendimentos dos extratos mostram que os ácidos cafeoilquínicos estão em maiores proporções que os flavonoides. *Baccharis tridentata* mostrou ser uma fonte vegetal importante para a obtenção desses compostos fenólicos.

11 REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v. 7, p. 76-96, 2007.

ABOY, A. L.; APEL, M. A.; DEBENEDETTI, S.; FRANCESCATO, L.; ROSELLA, M. A.; HENRIQUES, A. T. Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1219, p. 147-153, 2012.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography - Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 1995.

ADIO, A. M.; VON REUß, S. H.; PAUL, C.; MUHLE, H.; KONIG, W. A. Sesquiterpenoid constituents of the liverwort *Marsipella aquatica*. **Tetrahedron: Assymetry**, v. 18, p. 1245-1253, 2007.

ALDA, J. L.; SALLIS, E. S. V.; NOGUEIRA, C. E. W.; SOARES, M. P.; AMARAL, L.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; XAVIER, F.; FREYJR, F.; SCHILD, A. L. Intoxicação espontânea por *Baccharis coridifolia* (Compositae) em equinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 409-414, 2009.

AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M. R.; ZATTERA, F.; WASUM, R.; SERAFINI, L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 3, p. 215-220, 2005.

AINSWORTH, A. M.; RAYNER, A. D. M.; J.; BROXHOLME, S.; BEECHING, J. R.; PRYKE, J. A.; SCARD, P. R.; BERRIMAN, J.; POWELL, K. A.; FLOYD, A. J.; BRANCH, S. K. Production and properties of the sesquiterpene, (+)-torreyol, in degenerative mycelial interactions between strains of *Sfereum*. **Mycological Research**, v. 94, n. 6, p. 799-809, 1990.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y. K. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 909-915, 2005.

ASCARI, J. **Estudo químico e bioatividade de *Baccharis uncinella* DC.** 2007. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2007.

ASCARI, J.; NUNES, D. S.; MARQUES, M. B.; TARDIVO, R. C.; CECHINEL FILHO, V.; SIMIONATTO, E. L.; WISNIEWSKI JR, A. Essential oils of *Baccharis uncinella*

DC.. Publicatio **UEPG. Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias (Impresso)**, v. 15, p. 73-77, 2009.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Essential oil composition of *Eugenia florida* and *Eugenia mansoi*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 4, p. 321-322, 2004.

BARANAUSKIENE, R.; VENSKUTONIS, R. P.; DEMYTTENAERE, J. C. R.. Sensory and instrumental evaluation of catnip (*Nepeta cataria* L.) aroma. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 3840-3848, 2003.

BARROSO, G. M. Compositae-subtribo Baccharidinae Hoffmann. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguésia**, v. 28, n. 40, p.3-273, 1976.

BASNET, P.; MATSUSHIGE, K.; HASE, K.; KADOTA, S. 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.

BERREGI, I.; SANTOS, J. I.; CAMPO, G. D.; MIRANDA, J. I.; AIZPURUA, J. M. Quantitation determination of chlorogenic acid in cider apple juices by ¹H NMR spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 486, p. 269–274, 2003.

BESTEN, M. A. **Estudo químico de três espécies do gênero *Baccharis*: *B. trimera*, *B. milleflora* e *B. pentaptera* (seção Caulopterae)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2012.

BESTEN, M. A.; JASINSKI, V. C. G.; COSTA, A. G. L. C.; NUNES, D. S.; SENS, S. L.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L.; RIVA, D.; DALMARCO, J. B.; GRANATO, D. Chemical composition similarity between the essential oils isolated from male and female specimens of each five *Baccharis* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 6, p. 1041-1047, 2012.

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.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas Aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1ªEd., Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora, 2009.

BOMBARDA, I.; RAHARIVELOMANANA, P.; RAMANOELINA, P. A. R.; FAURE, R.; BIANCHINI, J. P.; GAYDOU, E. M. Spectrometric identifications of sesquiterpene

alcohols from niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) essential oil. **Analytica Chimica Acta**, v. 447, p. 113-123, 2001.

BOHLMANN, F.; BANERJEE, S.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON, H. New cadinene derivatives from *Baccharis viminea*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 15, n. 2, p. 71-73, 1984.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *Baccharis trimera* (Less.) DC., Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 75-85, 2009.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, P. V. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 477-483, 2004.

CAS. **Chemical Abstracts**. Disponível em: <<https://www.cas.org/>>. Acesso em: 21 ago 2013.

CEÑAL, J. P.; GIORDANO, O. S.; ROSSOMANDO, P. C.; TONN, C. E. Neoclerodane diterpenes from *Baccharis crispa*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 490-492, 1997.

CIFUENTE, D. A.; SIMIRGIOTIS, M. J.; FAVIER, S.; ROTELLI, A. E.; PELZER, L. E. Antiinflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sophiifolia* in mice. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 529-531, 2001.

COBOS, M. I.; RODRIGUEZ, J. L.; OLIVA, M. D.; DEMO, M.; FAILLACI, S. M.; ZYGADLO, J. A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserigila*. **Planta Medica**, v. 67, n. 1, p. 84-86, 2001.

COLODEL, C.; NUNES, D. S.; SENS, S. L.; RIVA, D.; SIMIONATTO, E. L. Estudo químico das folhas de *Baccharis rufescens* SPRENG. In: Congresso de Iniciação Científica e Pós-Graduação, Sul Brasil, Florianópolis, I **CICPG - BRASIL SUL**, 2010a.

COLODEL, C.; NUNES, D. S.; SENS, S. L.; RIVA, D.; SIMIONATTO, E. L. Análise do óleo essencial de *Baccharis rufescens* por CG-EM. In: IX Encontro de Pesquisas da UEPG, XXV Encontro Anual de Iniciação Científica, 2010, Ponta Grossa. **IX EUEPG, XXV EAIC - Resumos**. Ponta Grossa: UEPG, 2010b.

COLODEL, C.; NUNES, D. S.; BESTEN, M. A.; RIVA-SCHARF, D. Óleos essenciais de espécimes masculinos e femininos de *Baccharis rufescens*. In: VI Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais, 2012, Ponta Grossa - PR. **Anais do VI**

Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais. Ponta Grossa - PR: Editora UEPG, 2012.

CONGIU, R.; FALCONIERI, D.; MARONGIU, B.; PIRAS, A.; PORCEDDA, S. Extraction and isolation of *Pistacia lentiscus* L. essential oil by supercritical CO₂. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 239-244, 2002.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 1-6, 1984.

COSTA, A. G. L. **Estudo químico de *Baccharis dracunculifolia* DC. e sua correlação com a própolis de uma microrregião dos Campos Gerais do Paraná.** 2009. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2009.

COSTA, J. G. M.; PESSOA, O. D. L.; MONTE, F. J. Q.; MENEZES, E. A.; LEMOS, T. L. G. Benzoquinonas, hidroquinonas e sesquiterpenos de *Auxemma glazioviana*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 591-595, 2005.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

CHOI, H. S. Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 2687-2692, 2003.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia, um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.

DINIZ, A. C. B.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 443-450, 2007.

DOSKOTCH, R. W.; CHENG, H.-Y.; ODELL, T. M.; GIRARD, L. Nerolidol: an antifeeding sesquiterpene alcohol for gypsy moth larvae from *Melaleuca leucadendron*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 6, v. 4, p. 845-851, 1980.

EIJK, G. W. V.; ROEIJMANS, H. J.; VERWIEL, P. E. J. Isolation and identification of the sesquiterpenoid (+)-torreyol from *Xylobolus frustulatus*. **Experimental Mycology**, v. 8, p. 213-275, 1984.

ENCARNACION, D. R.; NOGUEIRAS, C. L.; SALINAS, V. H.; ANTHONI, U.; NIELSEN, P. H.; CHRISTOPHERSEN, C. Isolation of eriodictyol identical with

huazhongilexone from *Solanum hindsianum*. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 53, p. 375-377, 1999.

FAURE, R.; RAMANOELINA, A. R. P.; RAKOTONIRAINY, O.; BIANCHINI, J. P.; GAYDOU, E. M. Two-dimensional nuclear magnetic resonance of sesquiterpenes. 4. Application to complete assignment of proton and carbon-13 NMR spectra of some aromadendrane derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 29, n. 9, p. 969-971, 1991.

FERRACINI, V. L.; PARAIBA, L. C., LEITÃO, H. F; SILVA, A. G; NASCIMENTO, L. R.; MARSAIOLI, A. J. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 4, p. 355-367, 1995.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC. e *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

FULLAS, F.; HUSSAI, R. A.; BORDAS, E.; PEZZUTO, J. M.; SOERJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D. Gaudichaudiosides A-E, five novel diterpene glycoside constituents from the sweet-tasting plant, *Baccharis gaudichaudiana*. **Tetrahedron**, v. 47, n. 40, p. 8515-8522, 1991.

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.6, n.4, p. 286-288, 2001.

GARCIA, D.E. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. **Pastos y Forrajes**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2004.

GENÉ, R. M.; CARTAÑÁ, C.; ADZET, T.; MARÍN, E.; PARELLA, T.; CAÑIGUERAL, S. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta Medica**, v. 62, n. 3, p. 232-235, 1996.

GIANELLO, J. C.; CEÑAL, J. P.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E.; PENTENATTI, M. E.; DEL VITTO, L. A. Medicamentos herbários en el centro-oeste argentino II "Carquejas" control de calidad de las drogas oficiales y sustituyentes. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 19, n. 2, p 99-103, 2000.

GOBBO-NETO, L.; LOPES. N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

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

GRECCO, S. S.; GIMENES, L.; FERREIRA, M. J. P.; ROMOFF, P.; FAVERO, O. A.; ZALEWSKI, C. A.; LAGO, J. H. G. Triterpenoids and phenolic derivatives from *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1234-1237, 2010.

HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA, J. N. A família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, p. 687-749, 2008.

HAMM, S.; BLETON, J.; CONNAN, J.; TCHAPLA, A. A chemical investigation by headspace SPME and GC-MS of volatile and semi-volatile terpenes in various *olibanum* samples. **Phytochemistry**, v. 66, n. 12, p. 1499-1514, 2005.

HANSON, J. R.; HITCHCOCK, P. B.; MANICKAVASAGAR, R. The hydroxylation of globulol and 7-epiglobulol by *Cephalosporium aphidicola*. **Phytochemistry**, v. 37, n. 4, p. 1023-1025, 1994.

HENNIG, L.; GARCIA, G. M.; GIANNIS, A.; BUSSMANN, W. R. New constituents of *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. **ARKIVOC**, v 6. p 74-81, 2011.

HOGNADOTTIR, A.; ROUSEFF, R. L.. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v. 998, p. 201-211, 2003.

IUPAC. **International Union of Pure and Applied Chemistry**. 1999. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/sectionF/terpenoid/terp7.html>>. Acesso em: 22 ago 2013.

JASINSKI, V. C. G. **Óleos essenciais e compostos fenólicos de espécimes masculinos e femininos de *Baccharis uncinella* DC**. 2010. Dissertação (Mestrado em química aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2010.

KARIOTI, A.; SKAL TSA, H.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLOU, D.; ECONOMAKIS, C. D.; SALEM, A. B. Effect of nitrogen concentration of the nutrient solution on the volatile constituents of leaves of *Salvia fruticosa* Mill. in solution culture. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 51, p. 6505-6508, 2003.

KOWALSKI, R.; WOLSKI, T. The chemical composition of essential oils of *Silphium perfoliatum* L. **Journal of Flavour and Fragrance**, v. 20, p. 306-310, 2005.

KOKOSKA, L.; CUSIMMAMANI, E. F. Bolivian plants extracts; traditional medicine. In: R. R. Watson e V. R. Preedey. **Botanical Medicine in Clinical Practice**, p. 40-45, 2008.

KURDELAS, R. R.; LÓPEZB, S.; LIMA, B.; FERESIN, G. E.; ZYGADLO, J.; ZACCHINO, S.; LÓPEZ, M. L.; TAPIA, A.; FREILE, M. L. Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 261-267, 2012.

LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 435-448, 2004.

LAGO, J. H. G.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. 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.

LAGO, J. H.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; SOUZA, F.; SOARES, M. G.; BARALDI, P. T.; CORRÊA, A. G. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 737-740, 2008.

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

LOAYZA, I.; ABUJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; JEAND, F-I. Essential oil of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 2, p. 381-389, 1995.

LOSQUI, Y. R.; ROZETE, F. S. S.; ALMEIDA, M. B.; BITTENCOURT, A. H. C.; PEREIRA, S. P. F. Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) DC., (Asteraceae) sobre cultura de células *in vitro*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 931-936, 2009.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, F. J. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciências e Tecnologia em Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MARTINEZ, M. J. A.; BESSA, A. L.; BENTO, P. B. Biologically active substances from the genus *Baccharis* L. (Compositae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 703-759, 2005.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. Londres: Academic Press. 1982. 113 p.

MENDES, S; NUNES, D. S.; MARQUES, M. B.; TARDIVO, R. C.; FILHO, V. C.; SIMIONATTO, E. L.; JUNIOR, A. W. Essential oil of *Baccharis semiserrata*, a source

of spathulenol. **Publicatio UEPG. Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 14, p. 241-244, 2008.

MENDES, S. **Estudo químico e bioatividade de *Baccharis semiserrata* DC.** 2007. Dissertação (Mestrado em química aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Paraná, 2007.

MISKI, M.; ULUBELEN, A. JOHANSSON, C. Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 6, p. 874-875, 1983.

MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; CONTINI, K.; LAGO, J. H. G. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopiya emarginata* (Annonaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 55-58, 2007.

MOREIRA, F. P. M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A. B. P.; CARO, M. S. B.; BRIGHENTE I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.

MORAIS, L. A. S.; CASTANHA, R. F. Composição química do óleo essencial de duas amostras de carqueja (*Baccharis* sp.) coletadas em Paty do Alferes – Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 628-632, 2011.

MÜLLER, J. Systematics of *Baccharis* (Compositae – Astereae) in Bolivia, including an overview of the genus. **Systematic Botany Monographs**, v. 76, p. 1-341, 2006.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; B, A.M.J.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NAKASUGI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 2560-2564, 1998.

OLIVEIRA, M. C. C.; CARVALHO, M. G. Flavonóides das flores de *Stiffitia chrysantha* Mikan. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 182-184, 1999.

OLIVEIRA, S. Q.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 365-368, 2004.

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. **Bragança Paulista: Lecta**, v. 18, n. 2, p. 9-32, 2000.

PADALIA, R. C.; BISHT, D. S.; JOSHI, S. C.; MATHELA. Chemical composition of the essential oil from *Eupatorium adenophorum* Spreng. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, p. 522-524, 2009.

PARREIRA, N. A.; MAGALHÃES, L. G.; MORAISA, D. R.; CAIXETA, S. C.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L.; NANAYAKKARA, N. P. D.; RODRIGUES, V.; FILHO, A. A. S. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 993-1001, 2010.

PRATT, S.; MATHEWS, K. **Superalimentos: os incríveis efeitos de uma comida que pode mudar a sua vida**. São Paulo: Prestígio, 2005.

PHEROBASE. **The pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals**. Disponível em: < <http://www.pherobase.com/>>. Acesso em: 02 set 2013.

QUEIROGA C. L.; FERRACINI, V. L.; MARSAIOLI, A. J. Three new oxygenated cadinanes from *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1097-1103, 1996.

QUEIROGA, C. L.; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A. J. Composition of the essential oil of vassoura. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 1, n. 3, p. 105-109, 1990.

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

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, N. G.; MELLO, J. C. P.; MENTEZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003, cap. 16, p. 403-434.

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

SDBS. **Spectral Database for Organic Compounds**. disponível em: <http://sdb.srioddb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi>. Acesso em: 26 jun 2013.

SILVA, S. A., AGRA, M. F., TAVARES, J. F., CUNHA, E. V. L., BARBOSA-FILHO, J. M., SILVA, M. S. Flavanonas isoladas das partes aéreas de *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth (Boraginaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 682-684, 2010.

SILVA, F. G.; JANUÁRIO, A. H.; PINTO, J. E. B. P.; NASCIMENTO, V. E.; 4, BARIZAN, W. S.; FRANÇA, S. C. Flavones and 3,5-O-dicaphenoilchinic acid contents on callus and on *in vitro* and *in vivo* *Baccharis trimera* (Less) DC. plants. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 5, n. 1, p. 42-49, 2009.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, N. G.; MELLO, J. C. P.; MENTEZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003, cap. 18, p. 467-495.

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 derivatisation. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 307-314, 2005a.

SIMÕES-PIRES, C. A.; DEBENEDETTI, S.; SPEGAZZINI, E.; MENTZ, L. A.; MATZENBACHER, N. I.; R. P. LIMBERGER, R. P.; HENRIQUES, A. T. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, p. 23-32, 2005b.

SIMIGIORTIS, M. J.; GARCIA, M.; SOSA, M. E.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E. An *ent*-kaurene derivative from aerial parts from *Baccharis rufescens*. **The Journal of Argentine Chemical Society**, v. 91, n. 4-6, p. 109-116, 2003.

SIQUEIRA N. C. S.; ALICE C. B.; THIESEN, F. V. Aspectos farmacognósticos e perfil cromatográfico dos constituintes de *Baccharis articulata* Lam. (Pers.), Compositae. **Caderno de Farmácia**, v. 4, n. 1/2, p. 63-76, 1988.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; GUIMARÃES, L. G. L.; ANDRADE, J.; MALLETT, A. C. T.; NELSON, D. L. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 456-466, 2011.

SOUZA, G. H. B.; MELLO; J. C. P.; LOPEZ, N. P. Substâncias voláteis: técnicas de extrações das clássicas às avançadas. In: **Revisões em processos e técnicas avançadas de isolamento e determinação estrutural de ativos de plantas medicinais**. Ouro-Preto, UFOP, 2012.

SUAREZ, L. E. C.; MENICHINI, F.; MONACHE, F. D. Tetranortriterpenoids and dihydrocinnamic acid derivatives from *Hortia colombiana*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 3, p. 339-344, 2002.

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.

SMELCEROVIC, A.; DJORDJEVIC, A.; LAZAREVIC, J.; STOJANOVIC, G. Recent advances in analysis of essential oils. **Current Analytical Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 61-70, 2013.

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

SZAFRANEK, B.; CHRAPKOWSKA, K.; PAWINÄSKA, M.; SZAFRANEK, J. Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 2817-2822, 2005.

TATEFUJI, T.; IZUMI, N.; OHTA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, Y. 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.

TELLEZ, M. R.; CANEL, C.; RIMANDO, A. M.; DUKE, S. O. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1035-1040, 1999.

TAMAYO-CASTILLO, G.; JAKUPOVIC, J.; CASTRO, V.; KING, R. M. (+)- α -copaen-8-one and other constituents from *Neomirandea* species. **Phytochemistry**, v. 28, n. 3, p. 938- 940, 1989.

TORRES, L. B.; GAMBERINI, M. T.; ROQUE, N. F.; LIMA-LANDMAN, M. T.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. **Phytochemistry**, v. 55, p. 617-619, 2000.

VASCONCELOS, J. M. J.; SILVA, A. M. S.; CAVALEIRO, J. A .S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1421-1424, 1998.

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.

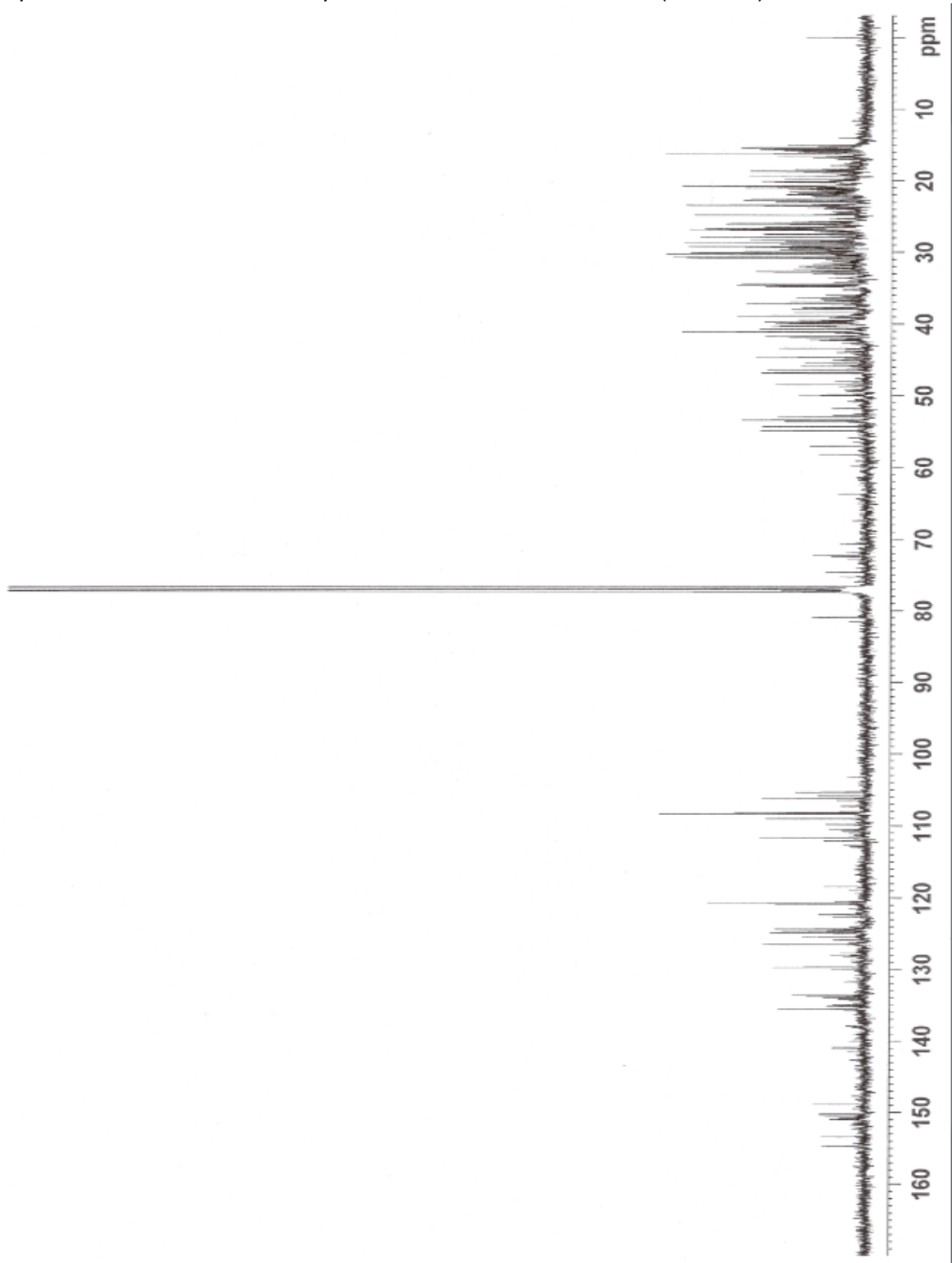
VERÁSTEGUI, M. A.; SÁNCHEZ, C. A.; HEREDIA, N. L.; GARCIA, J. A. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan Desert. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, n. 3, p. 175-177, 1996.

VITTI, A. M. S; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**, v. 17, p. 1-35, 2003.

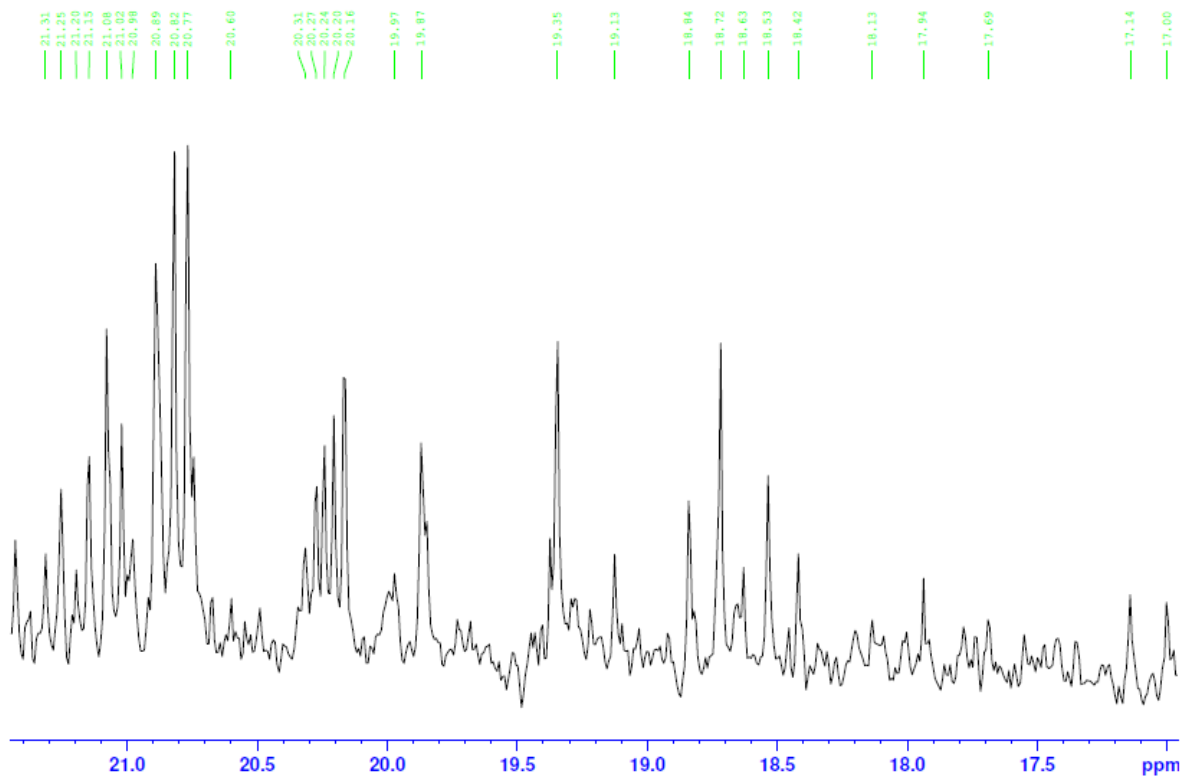
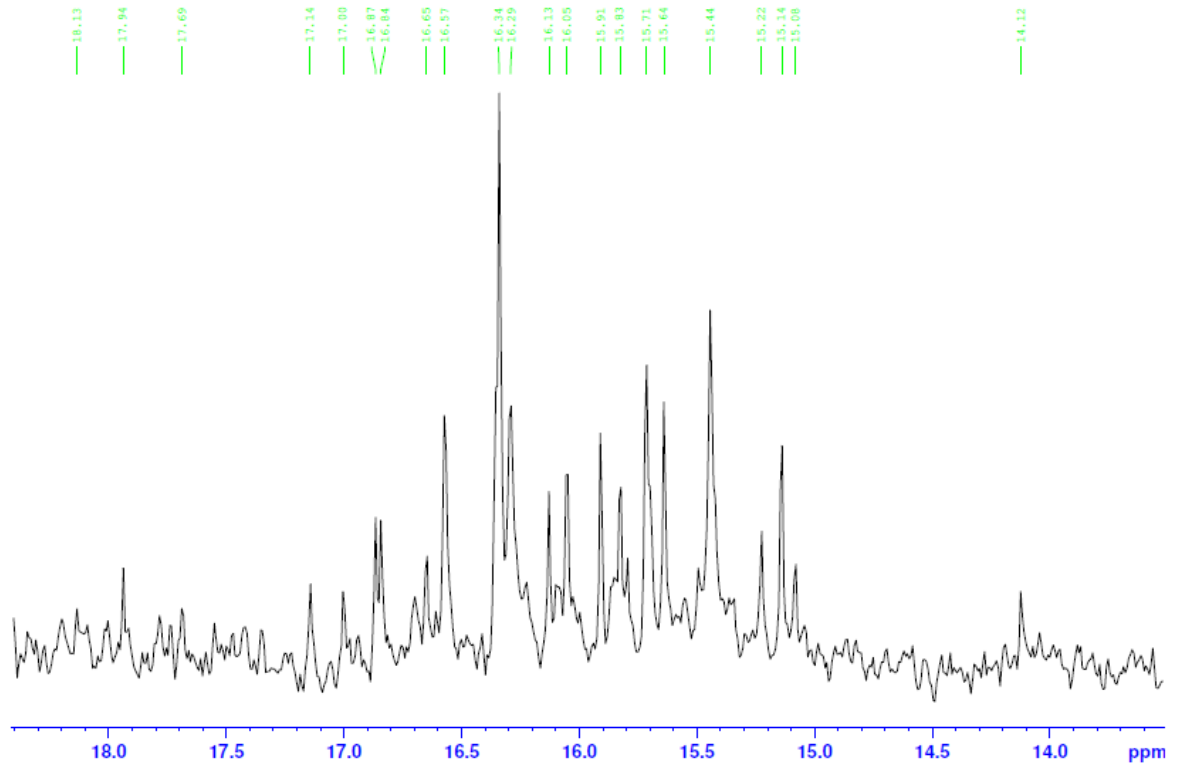
ZUNINO, M. P.; NEWTON, M. N.; MAESTRI, D. M.; ZYGADLO, J. A. Essential oils of three *Baccharis* species. **Planta Medica**, v. 64, n. 1, p. 86-87, 1998.

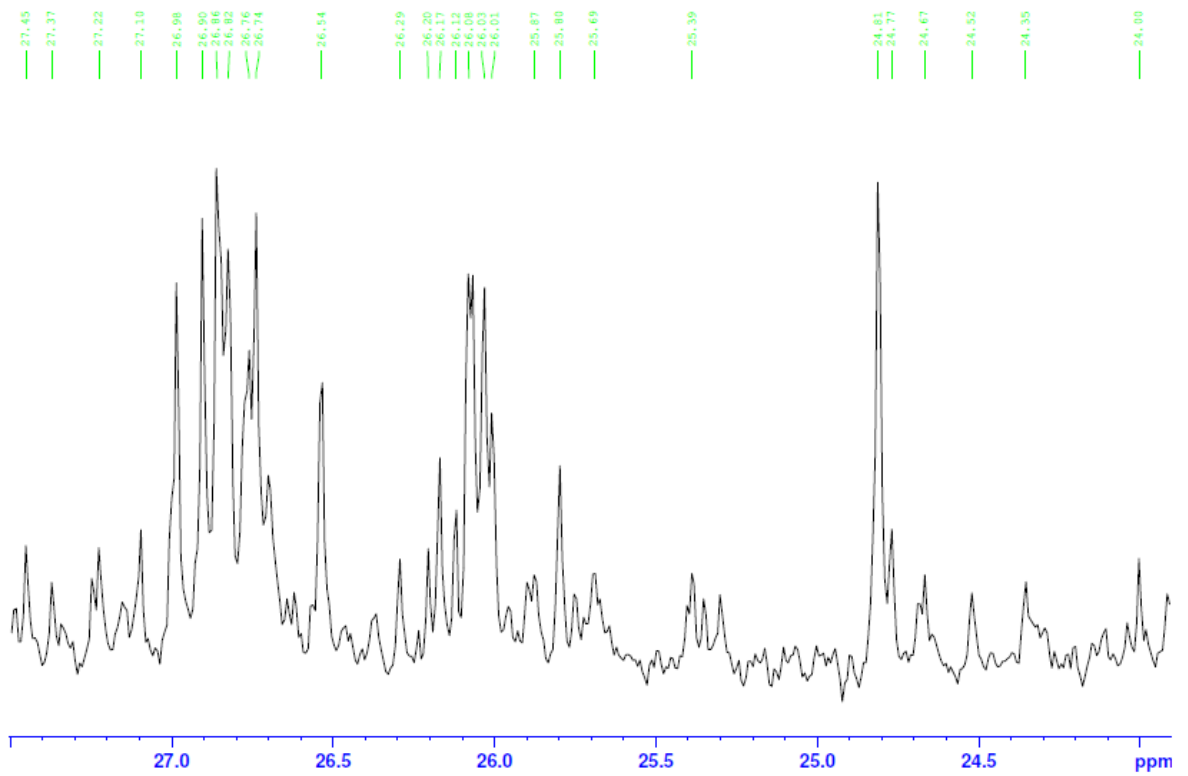
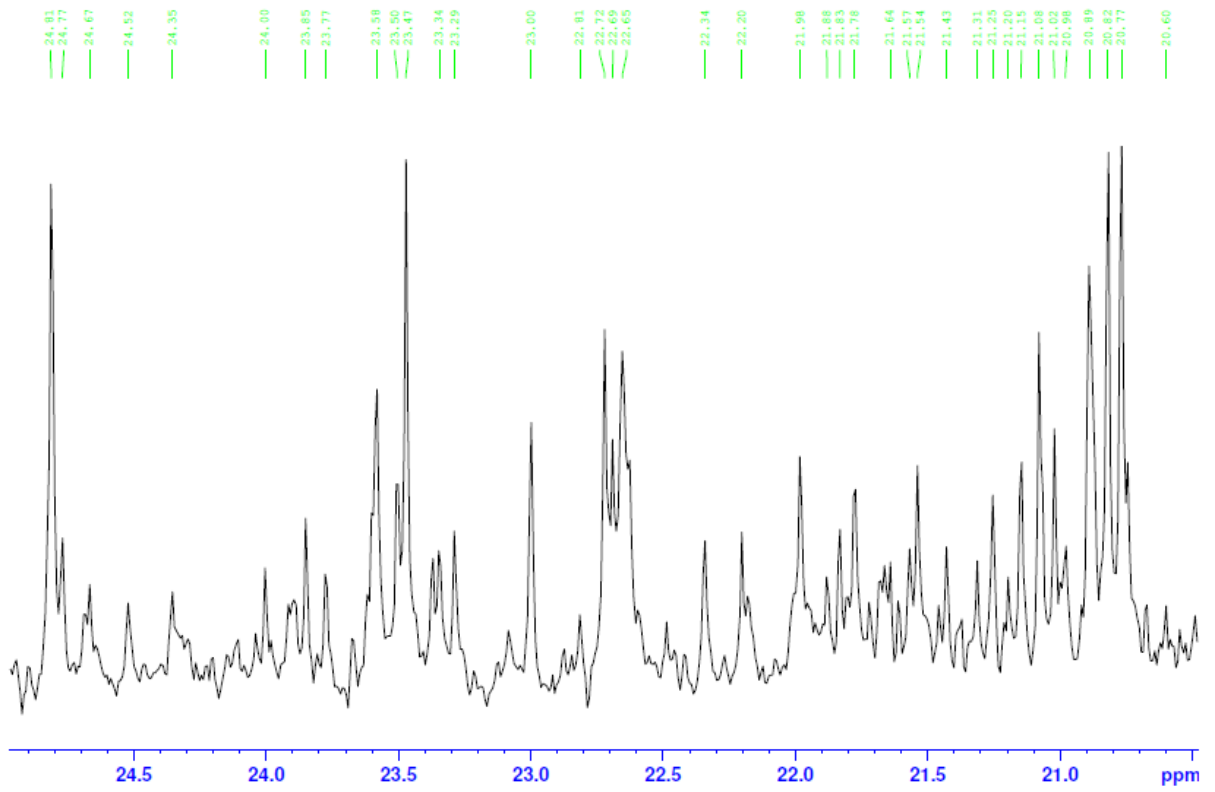
WOOLF, A. Essential oil poisoning. **Clinical Toxicology**, v. 37, n. 6, p. 721-727, 1999.

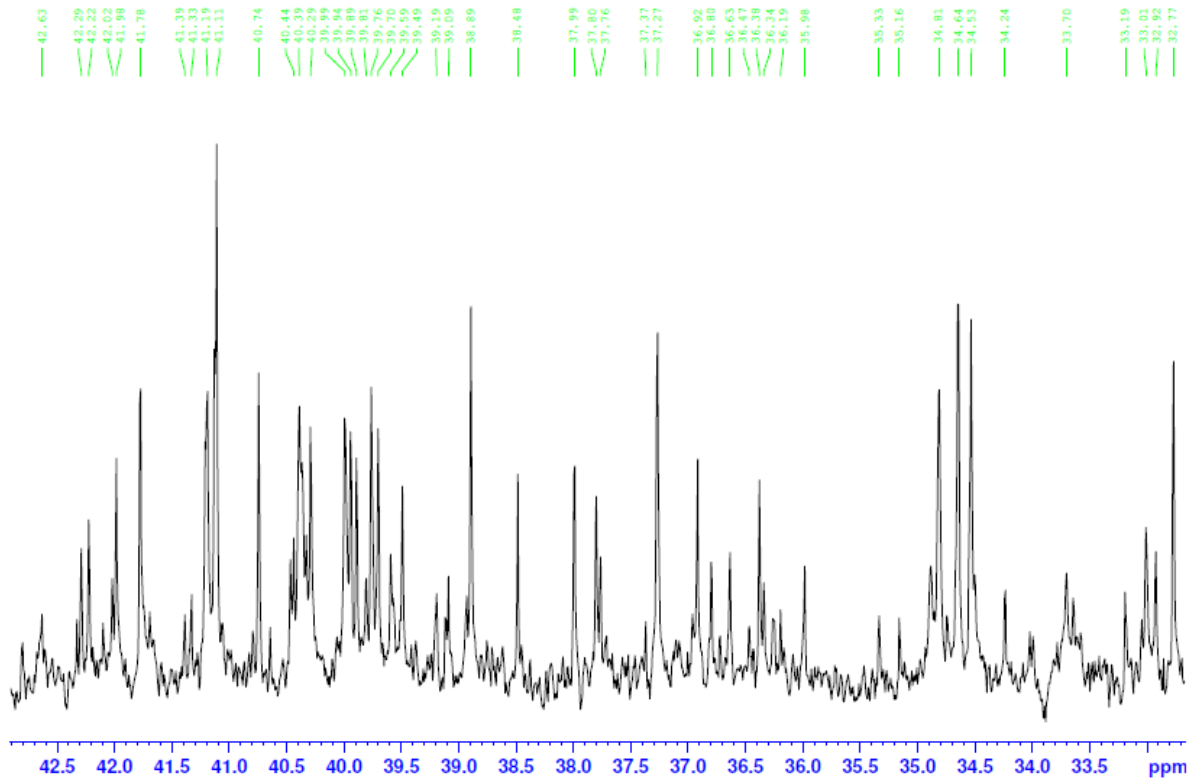
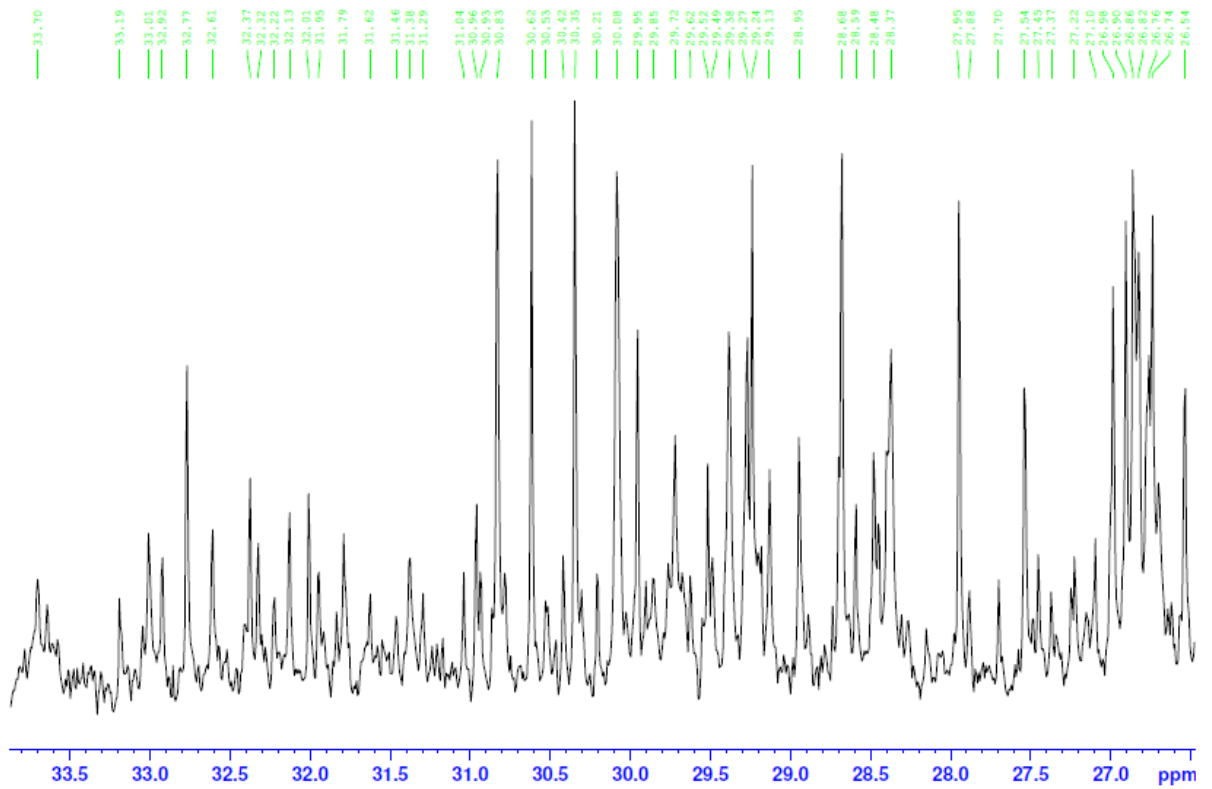
ANEXO 1 - Espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das inflorescências dos espécimes masculinos de *B. pentodonta*, amostra BPFM2 (item 9.1).

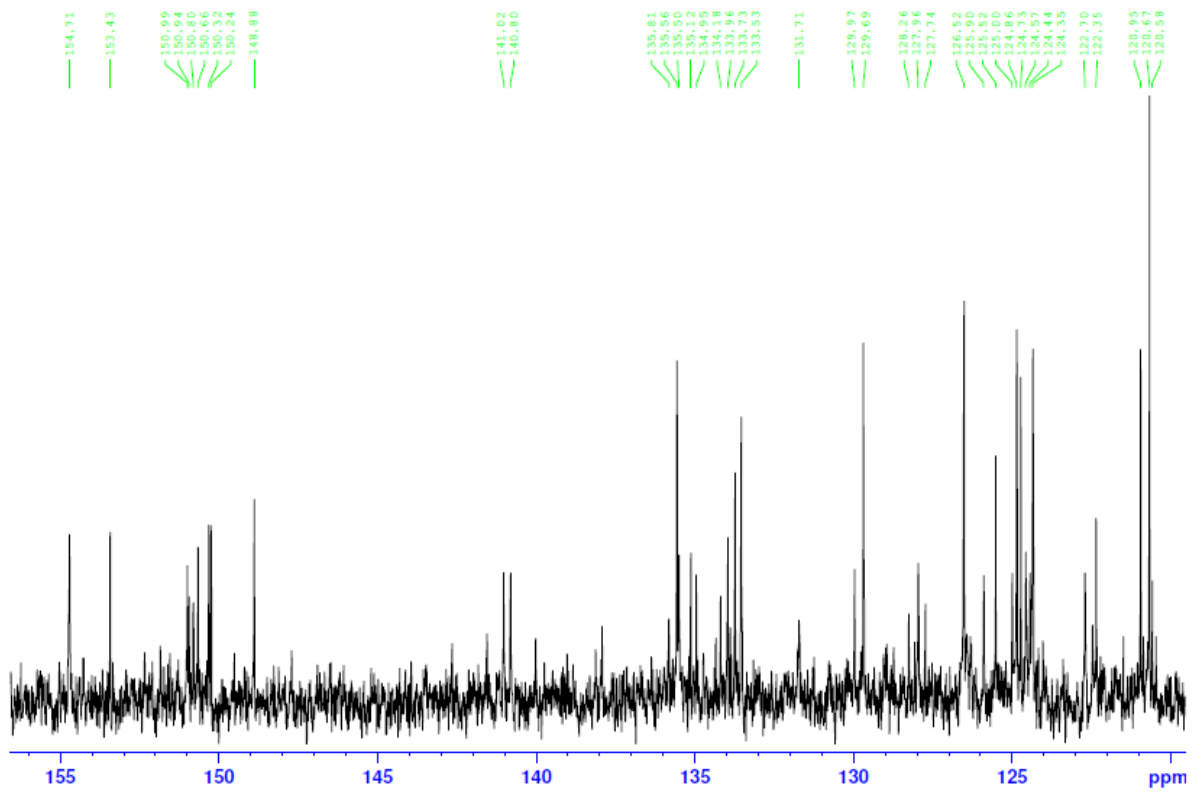
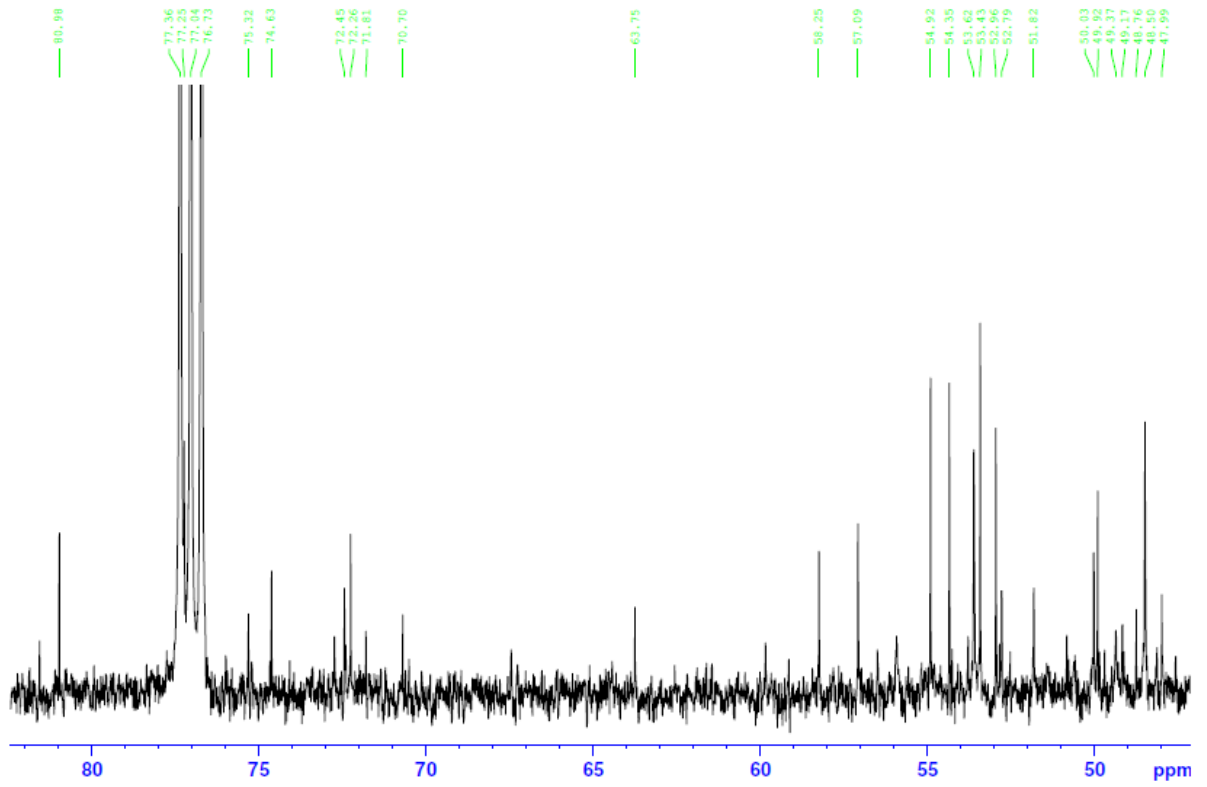


ANEXO 2 - Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das inflorescências dos espécimes masculinos de *B. pentodonta*, amostra BPFM2 (item 9.1).

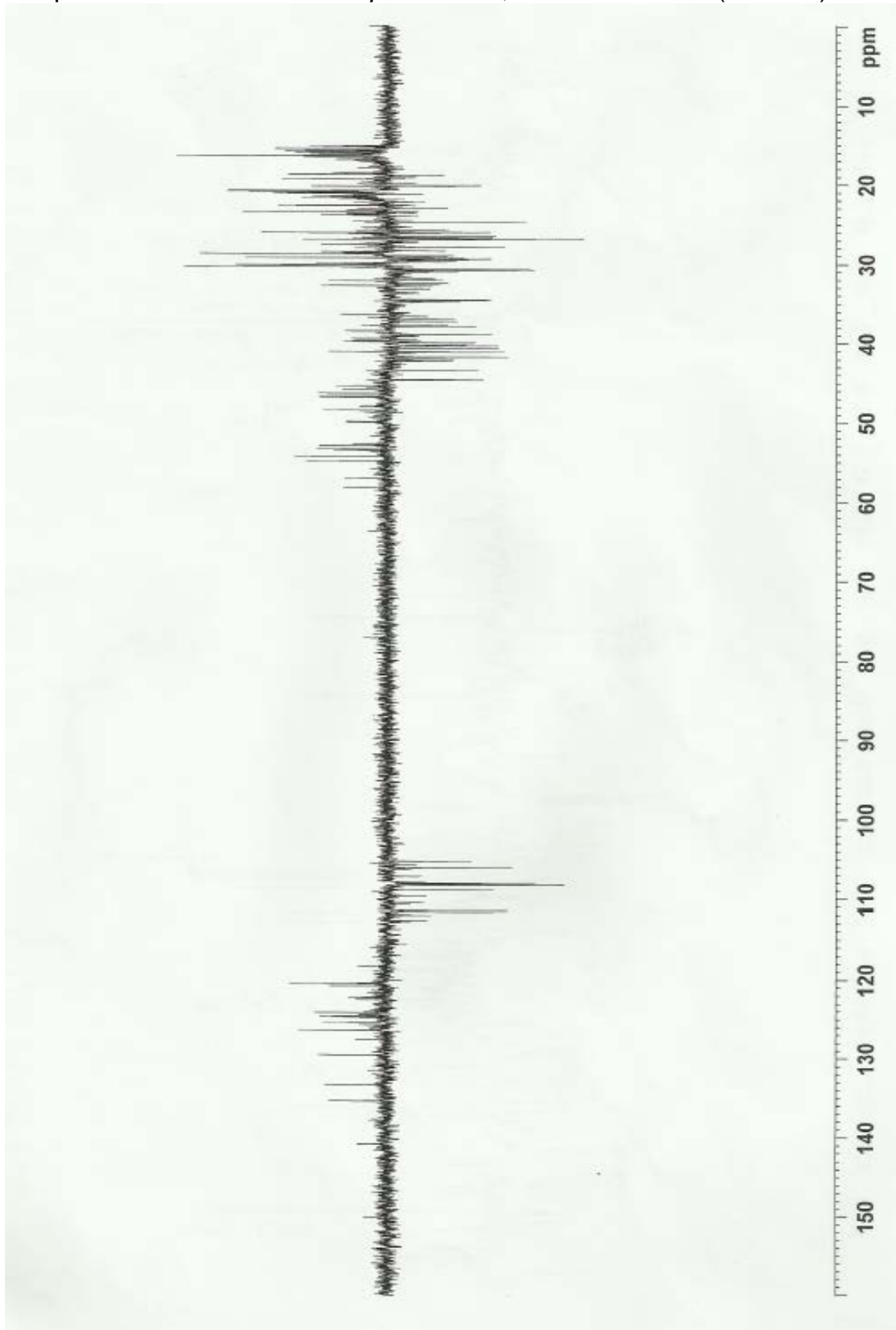




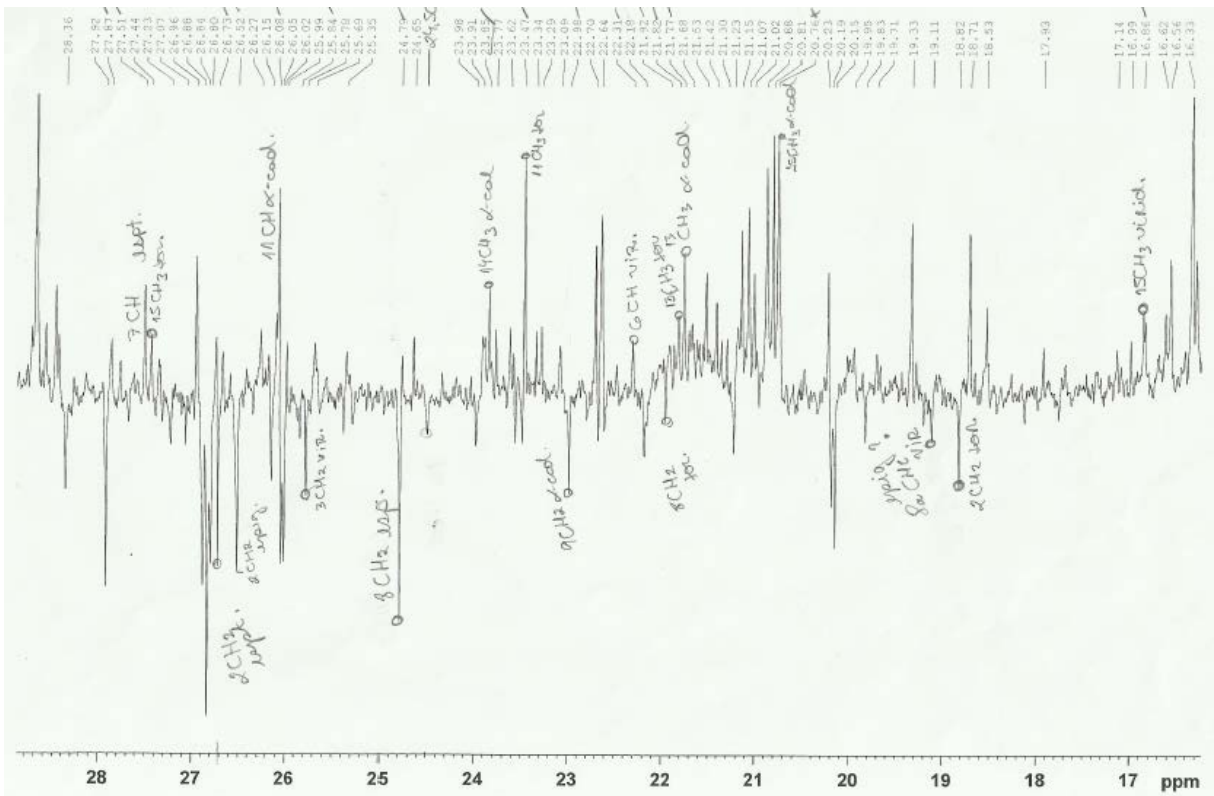
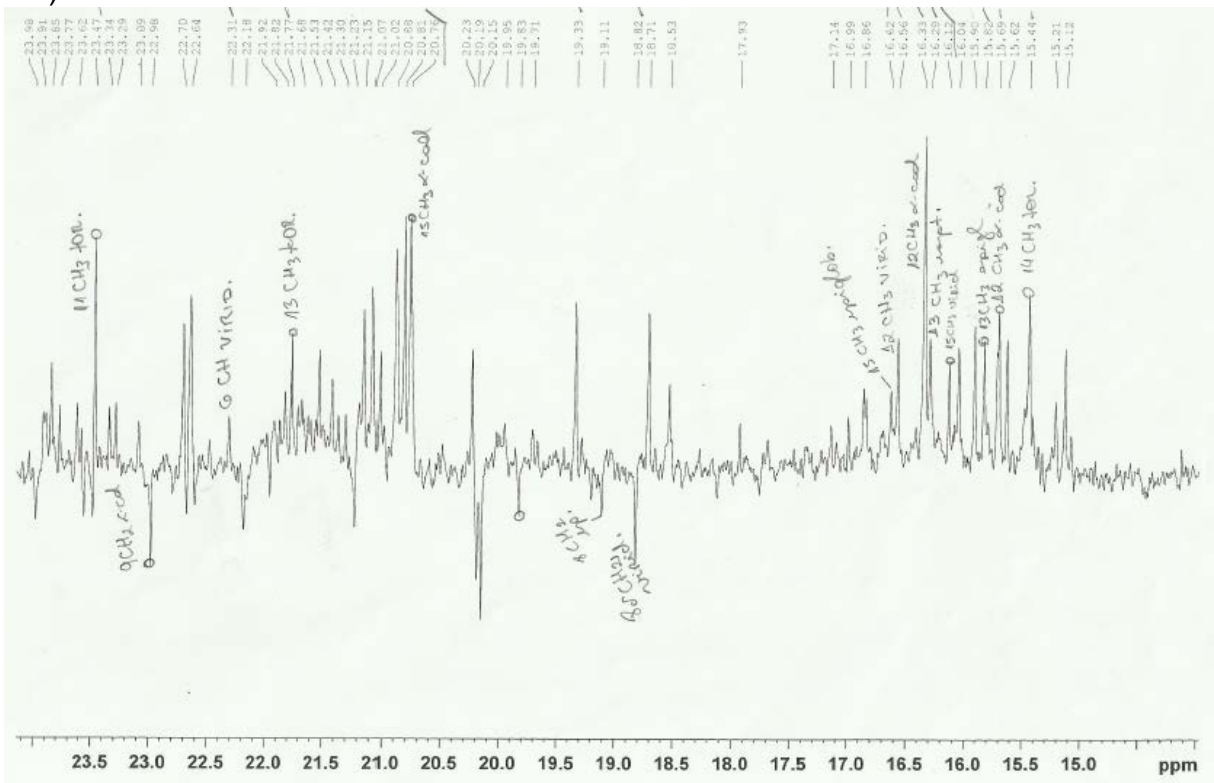


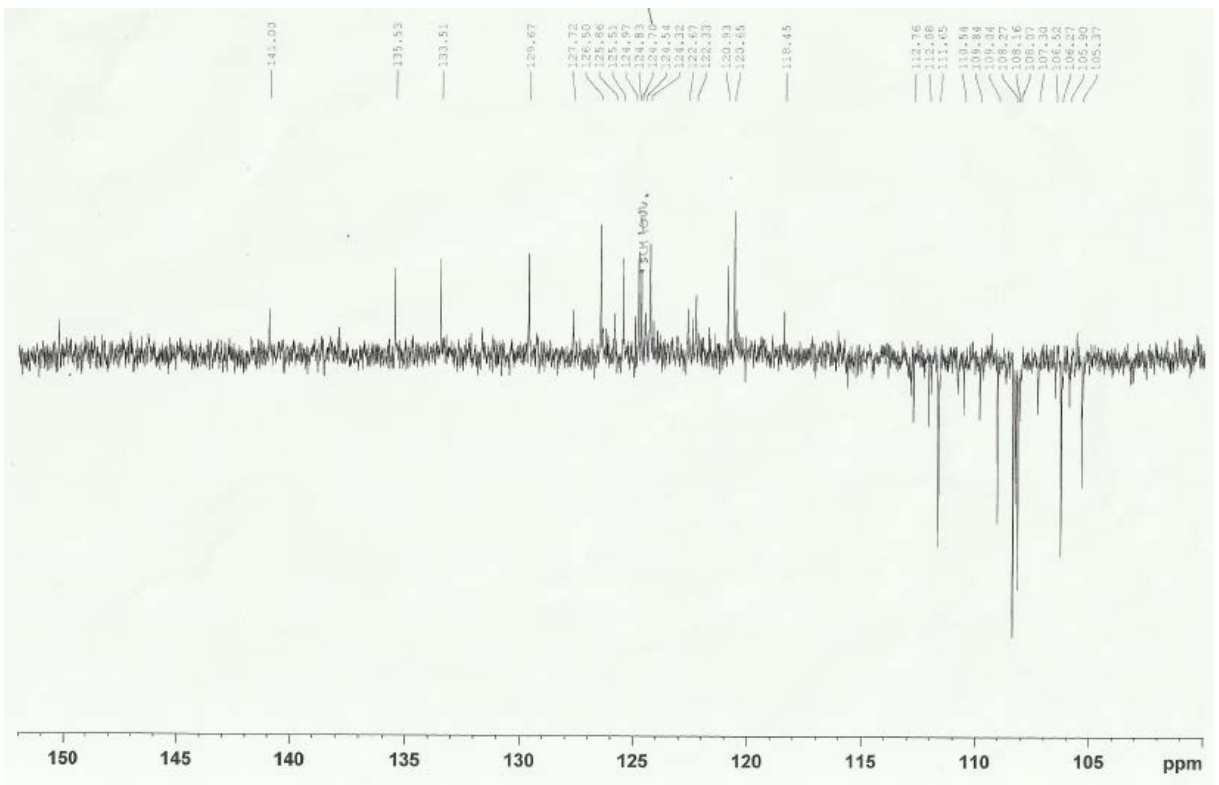
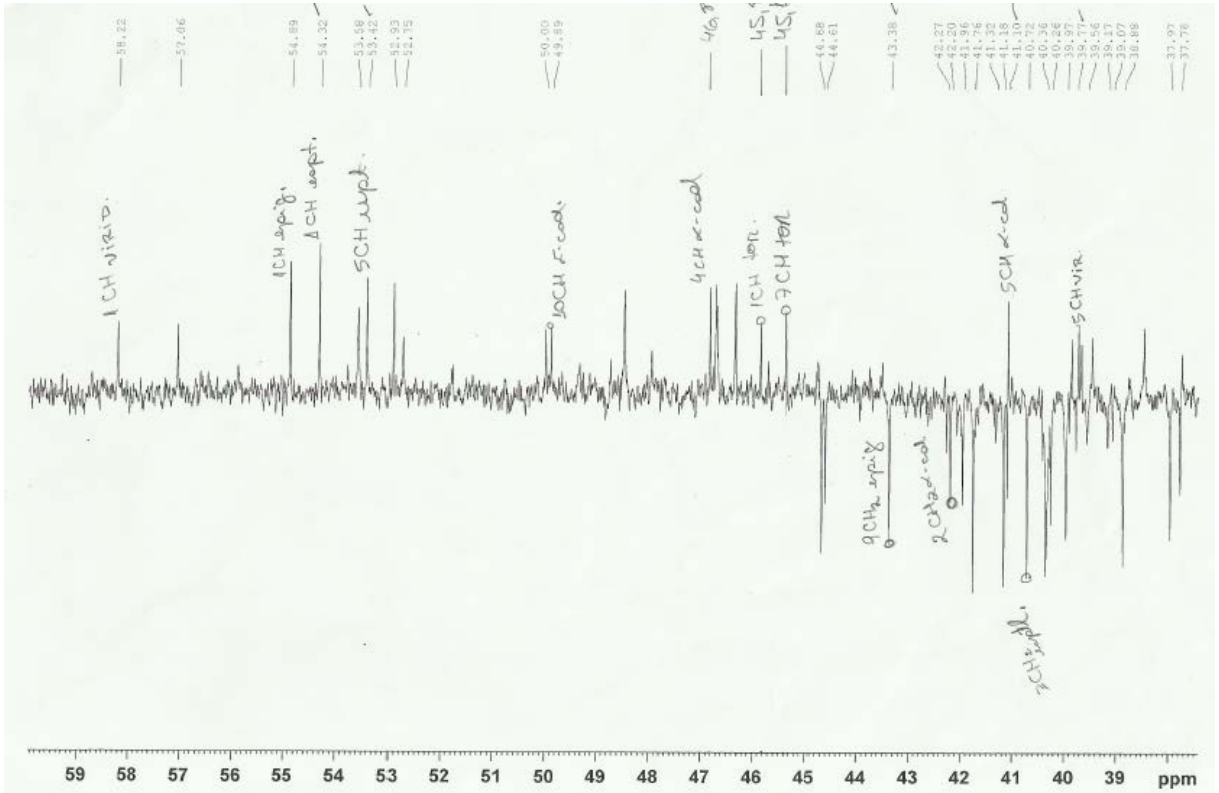


ANEXO 3 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT135 do óleo essencial das inflorescências de espécimes masculinos de *B. pentodonta*, amostra BPFM2 (item 9.1).

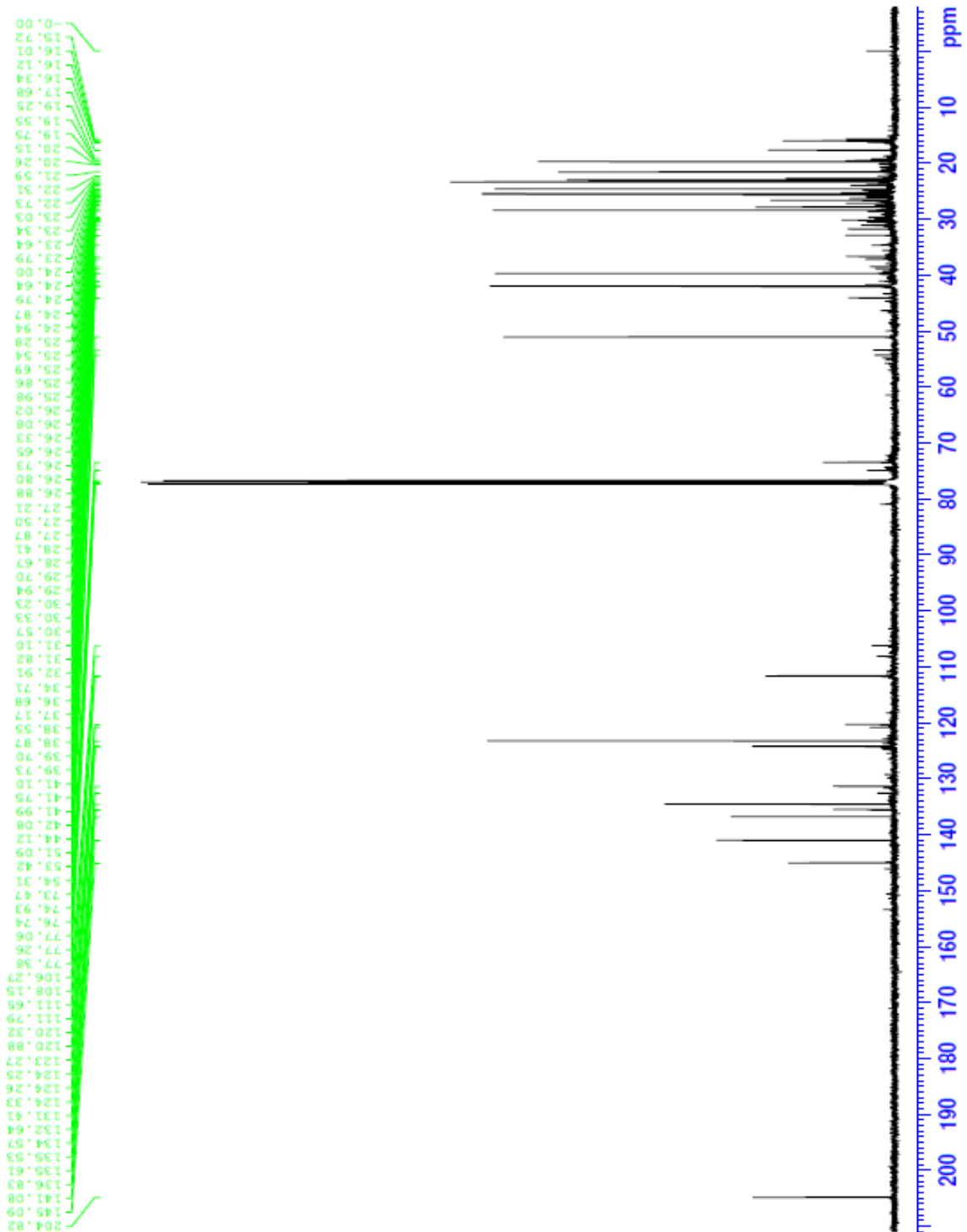


ANEXO 4 - Ampliações do espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 do óleo essencial das inflorescências de espécimes masculinos de *B. pentodonta*, amostra BPFM2 (item 9.1).

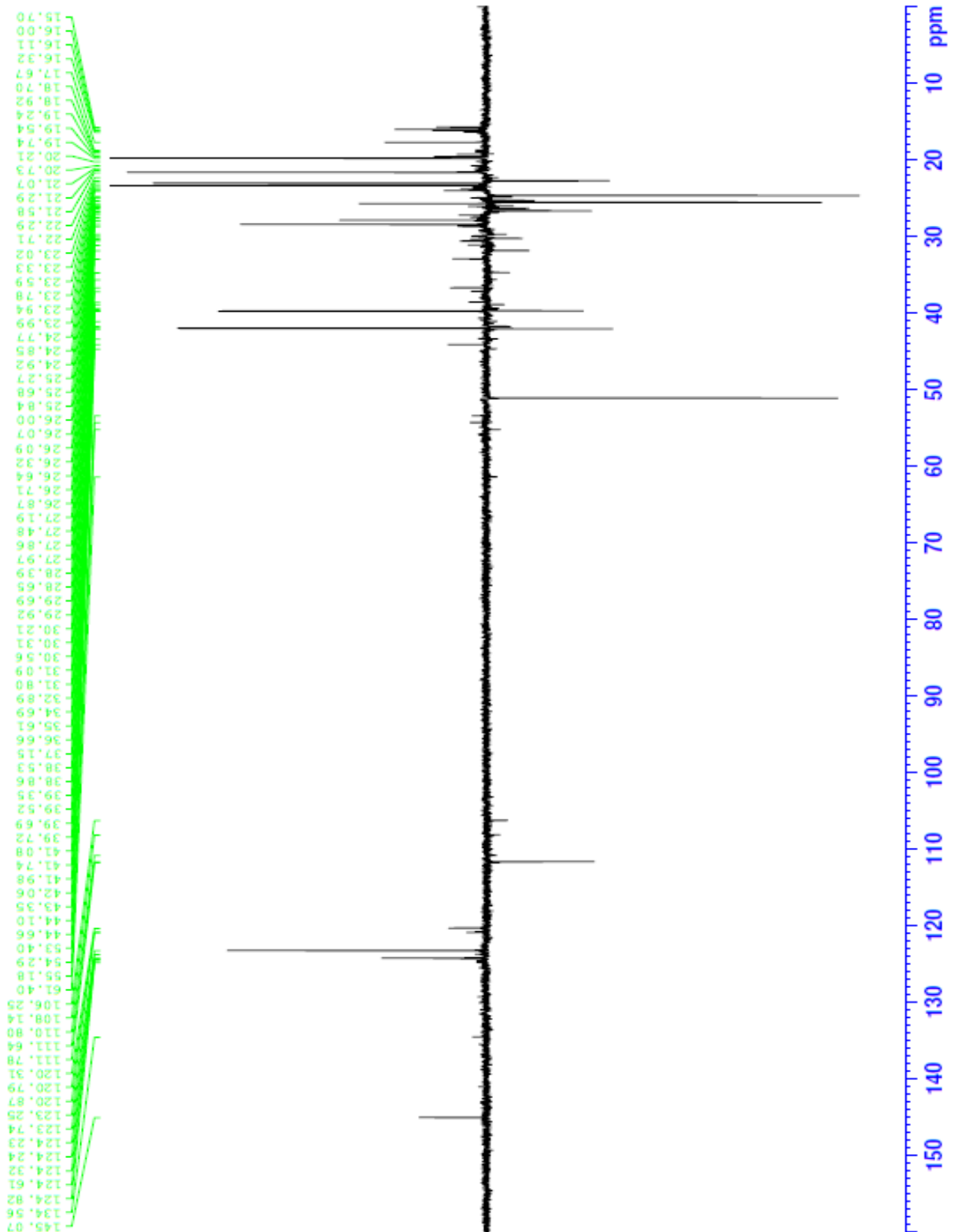




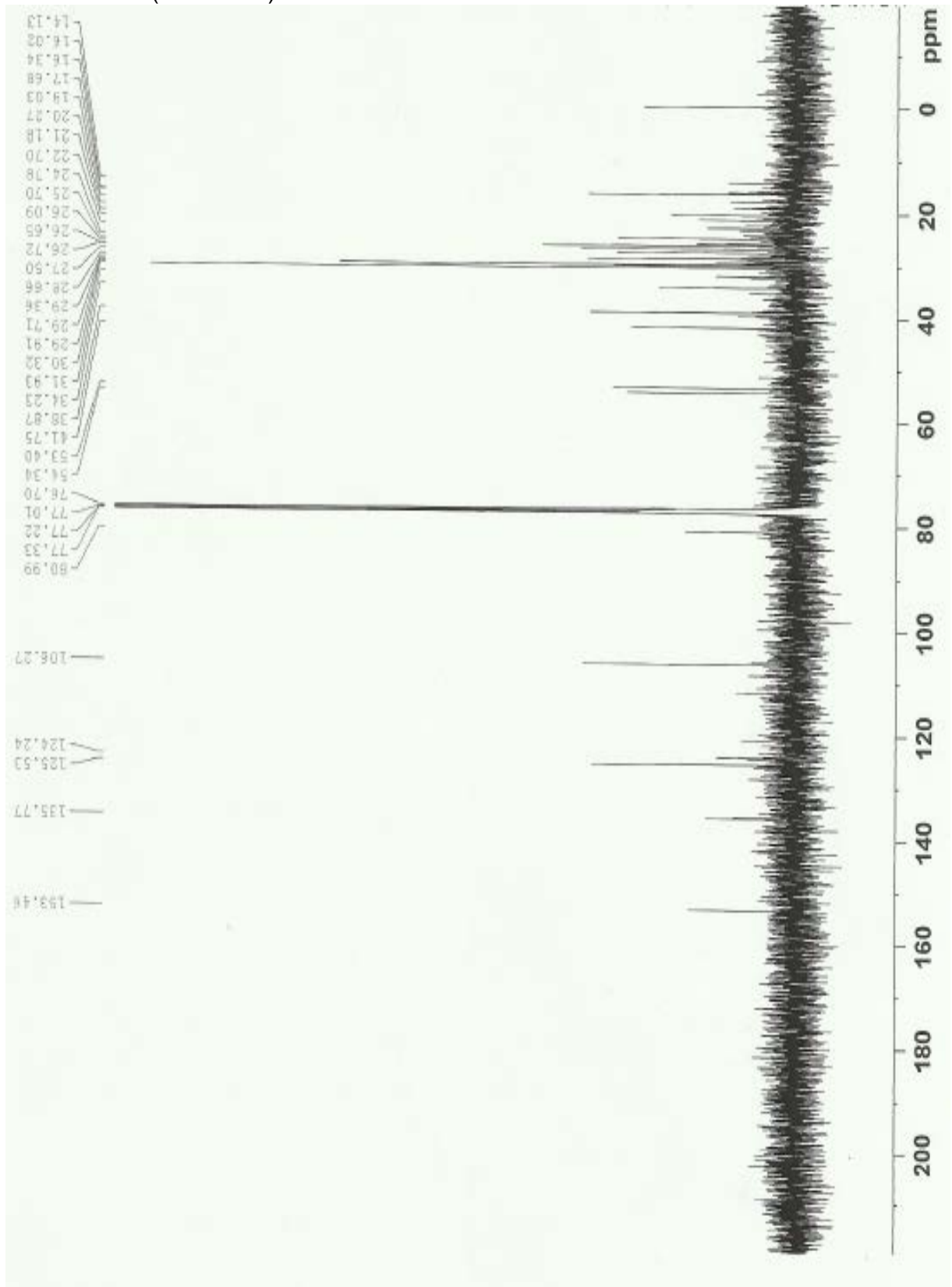
ANEXO 5 - Espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das folhas contendo inflorescências de espécimes masculinos de *B. rufescens*, amostra BRFM (item 9.2).



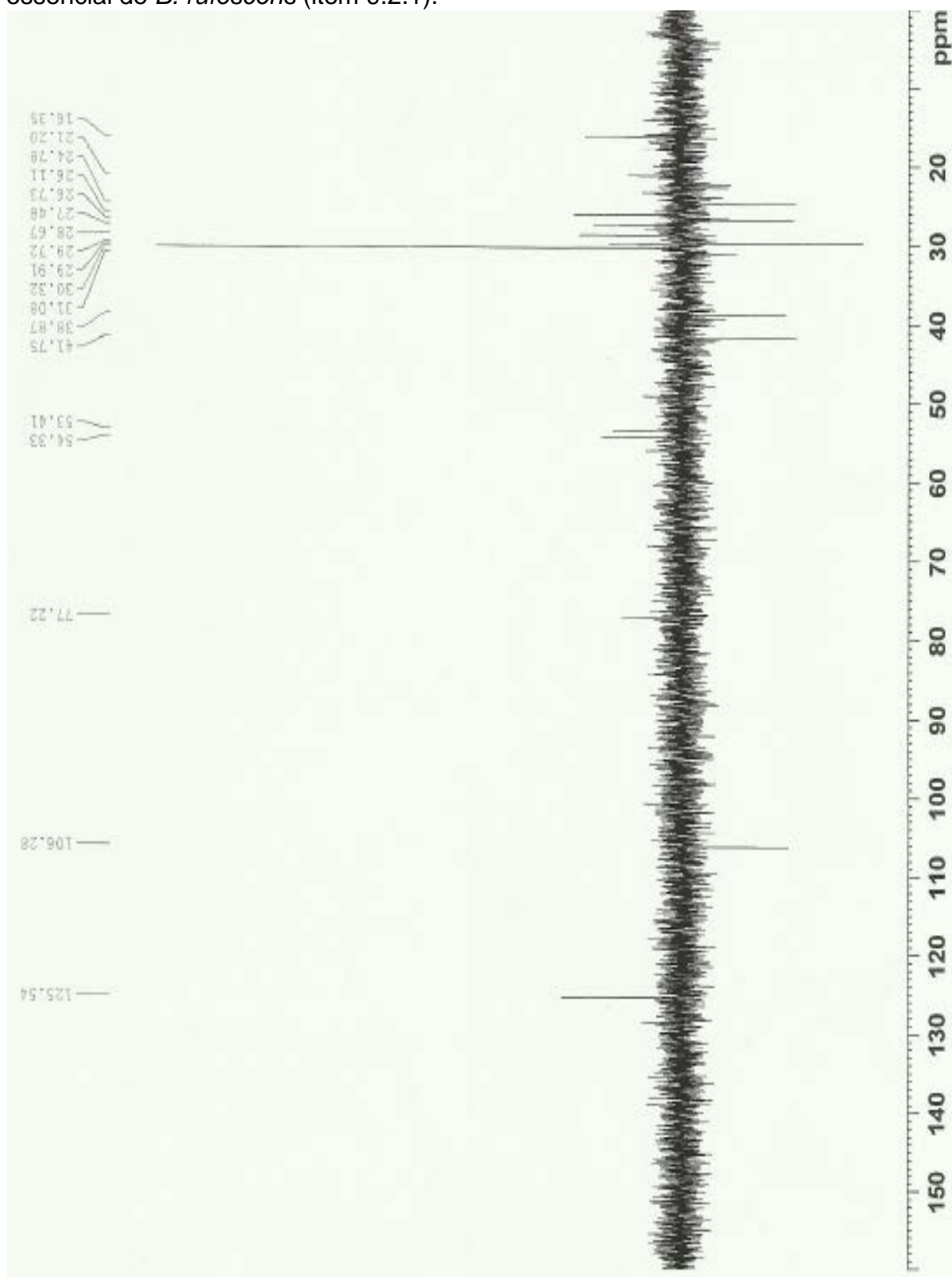
ANEXO 6 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 do óleo essencial das folhas contendo inflorescências de espécimes masculinos de *B. rufescens*, amostra BRFM (item 9.2).



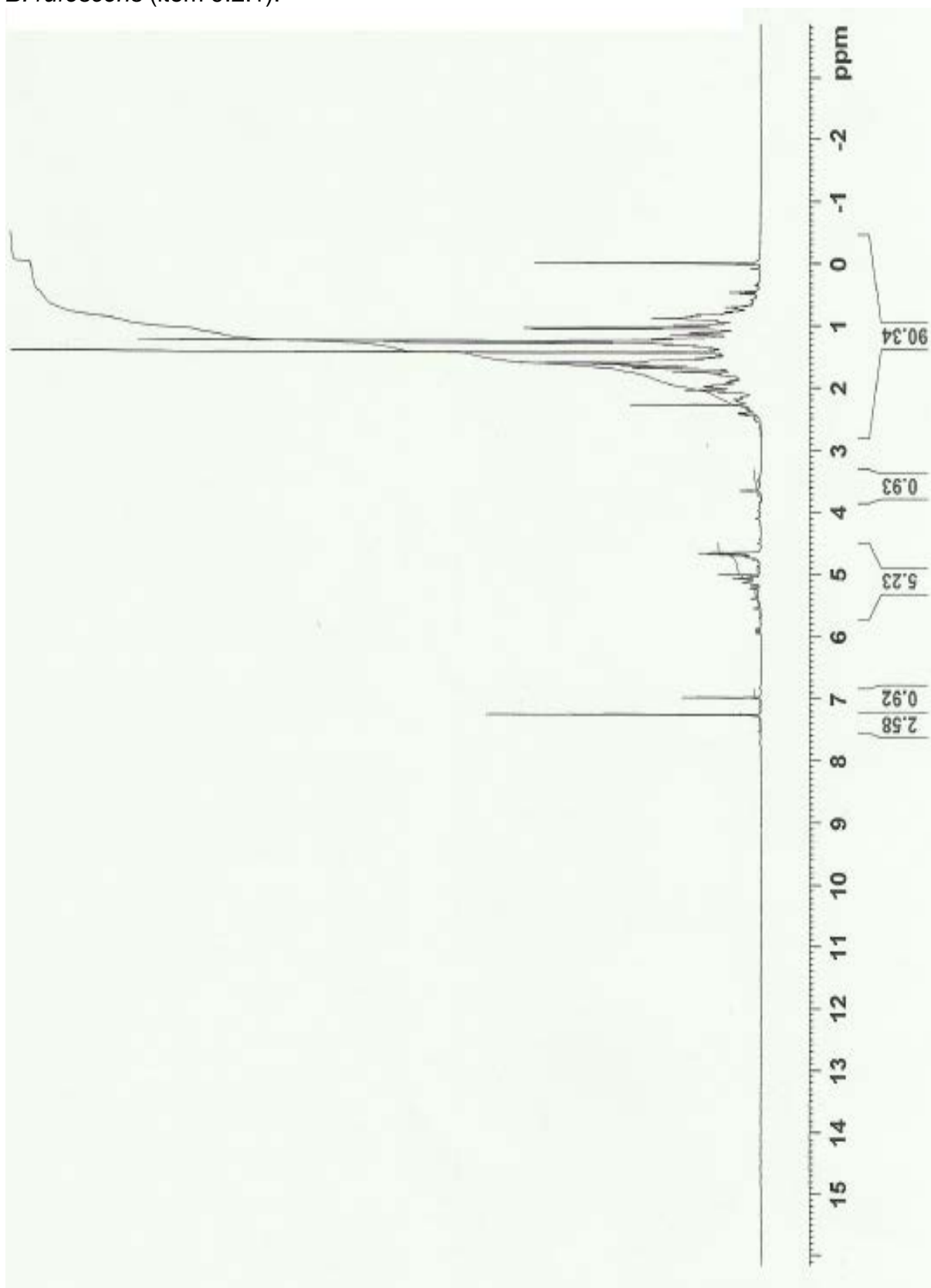
ANEXO 7 - Espectro de RMN de ^{13}C do espatulenol (7) isolado do óleo essencial de *B. rufescens* (item 9.2.1).



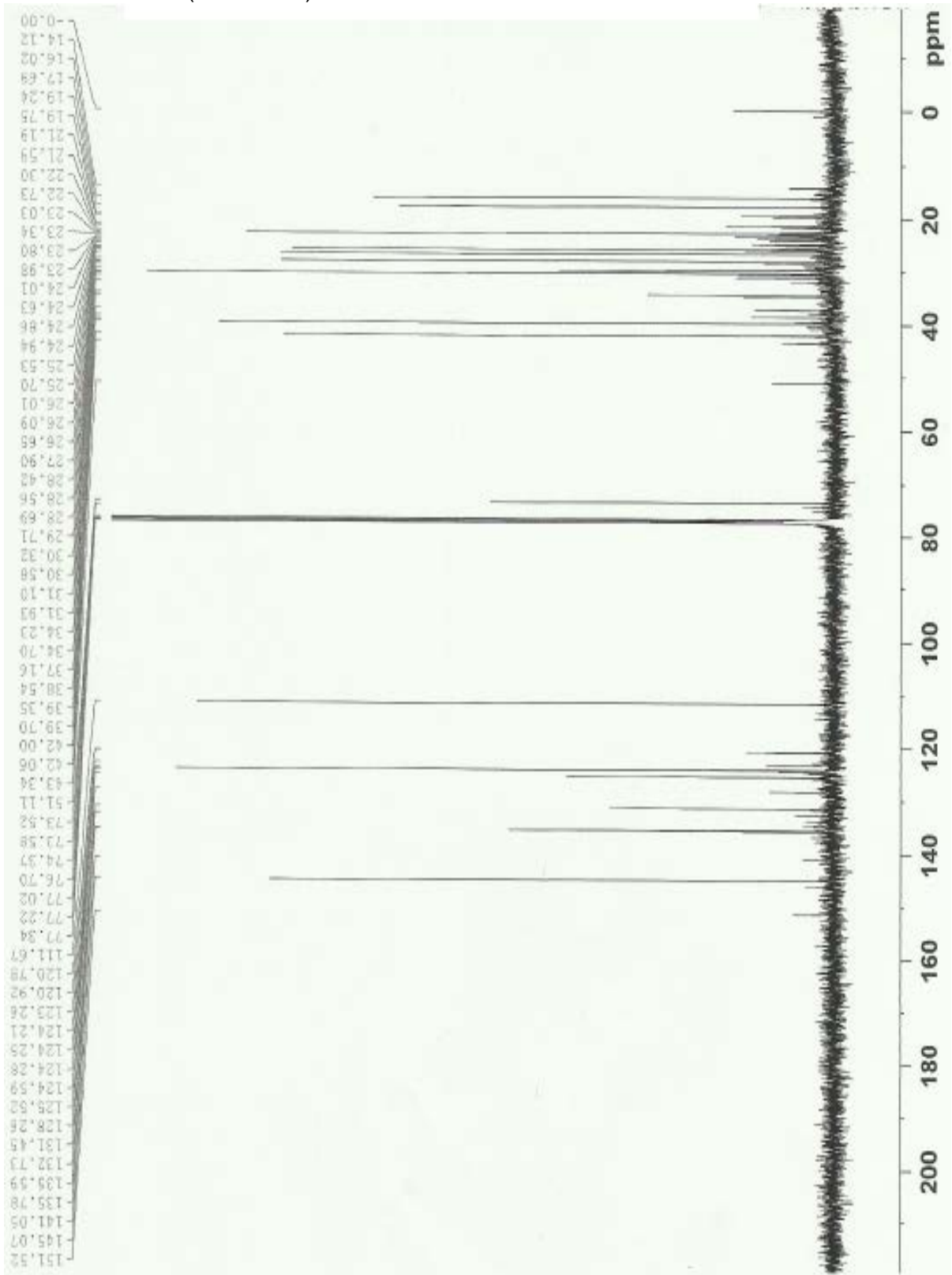
ANEXO 8 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT135 do espatulenol (7) isolado do óleo essencial de *B. rufescens* (item 9.2.1).



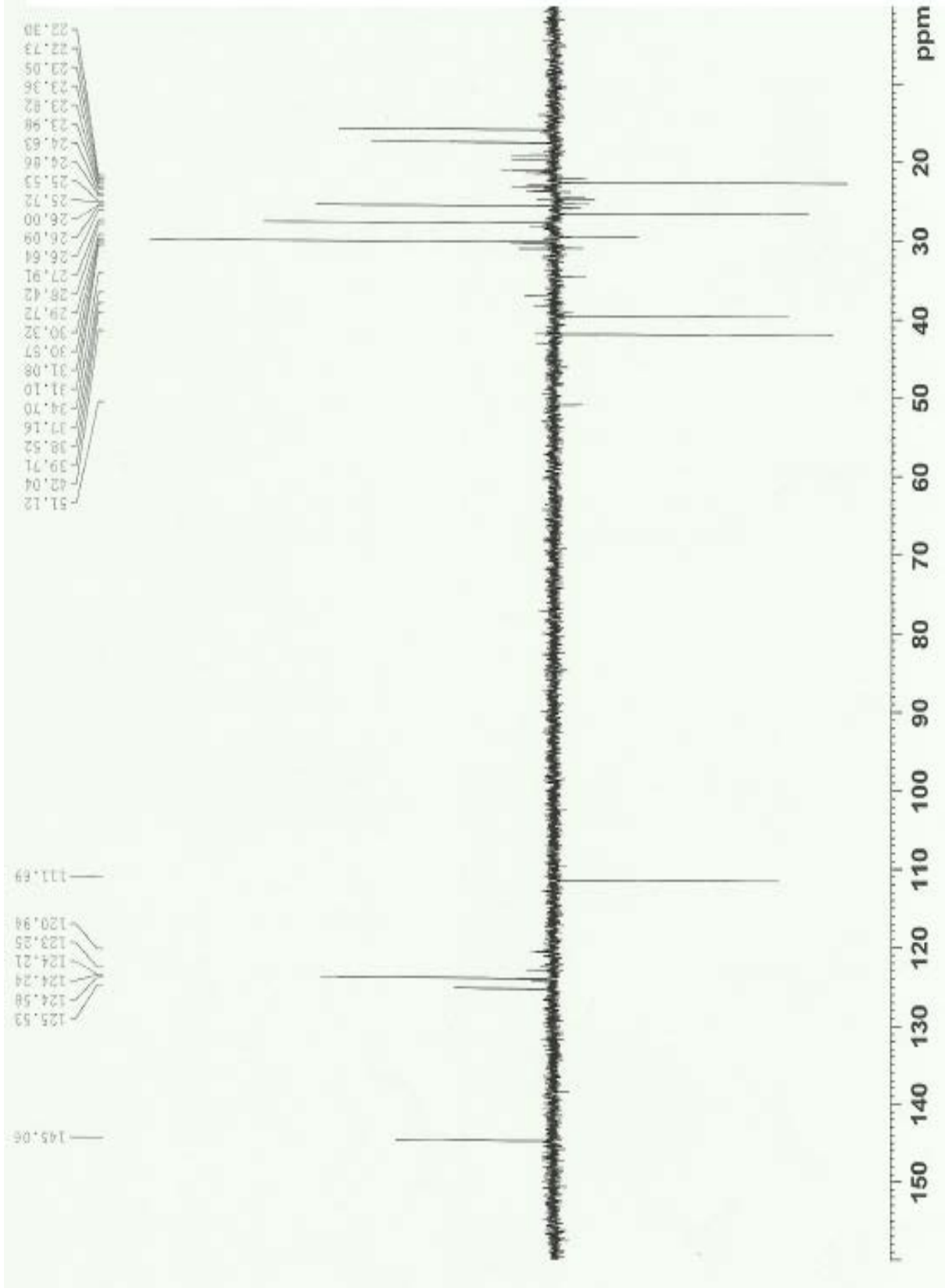
ANEXO 9 - Espectro de RMN de ^1H do espatulenol (**7**) isolado do óleo essencial de *B. rufescens* (item 9.2.1).



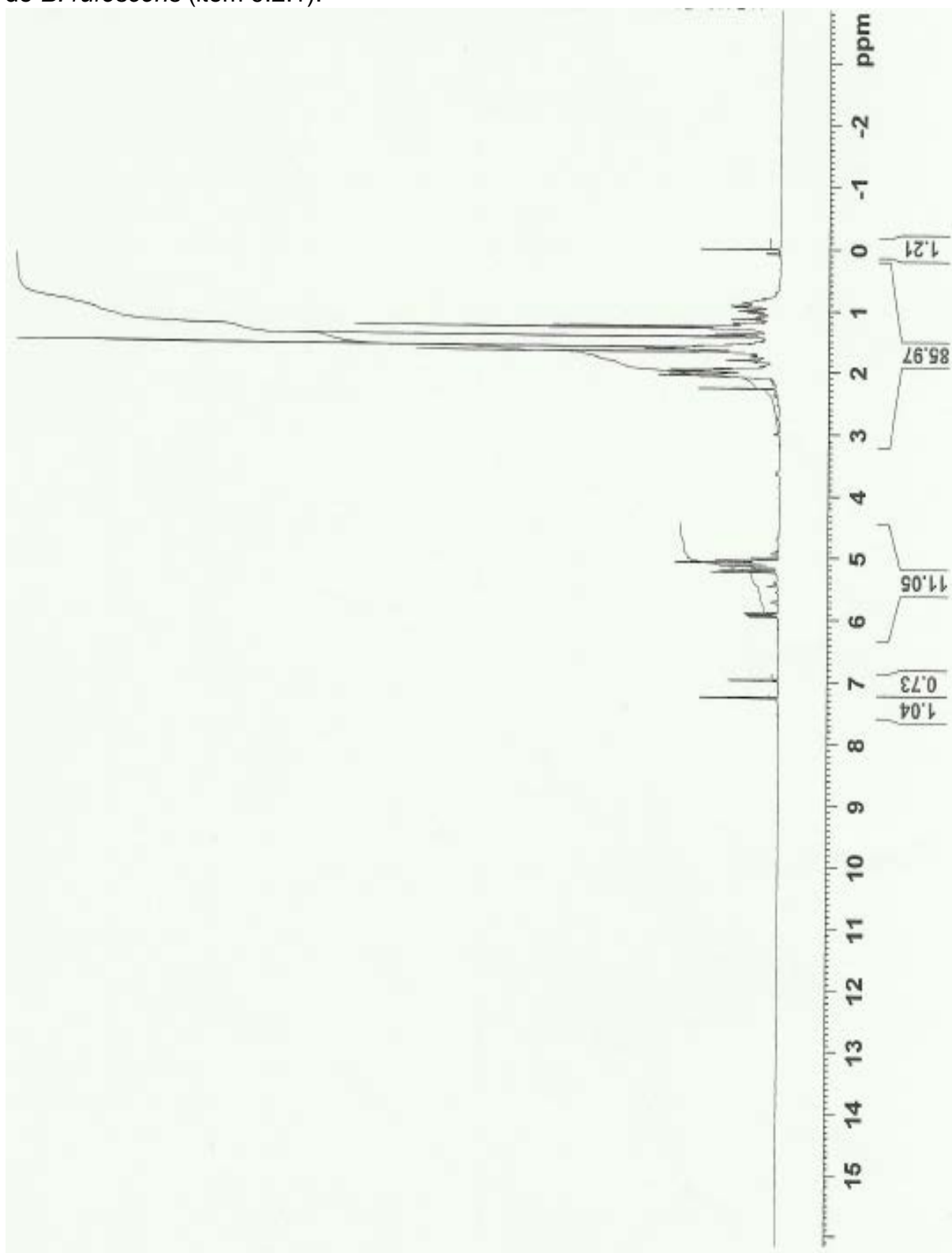
ANEXO 10 - Espectro de RMN de ^{13}C do (*E*)-nerolidol (**17**) isolado do óleo essencial de *B. rufescens* (item 9.2.1).



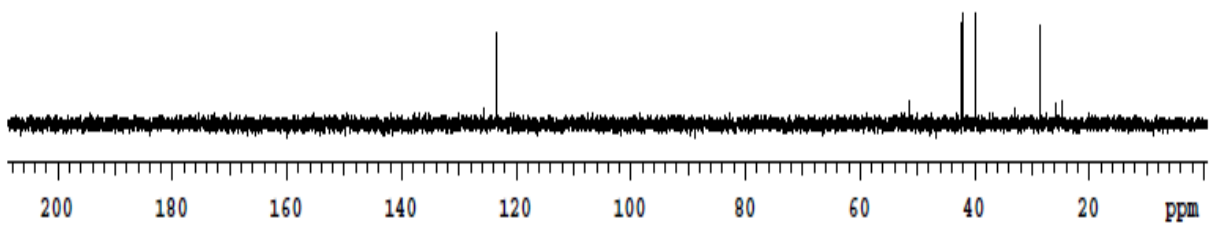
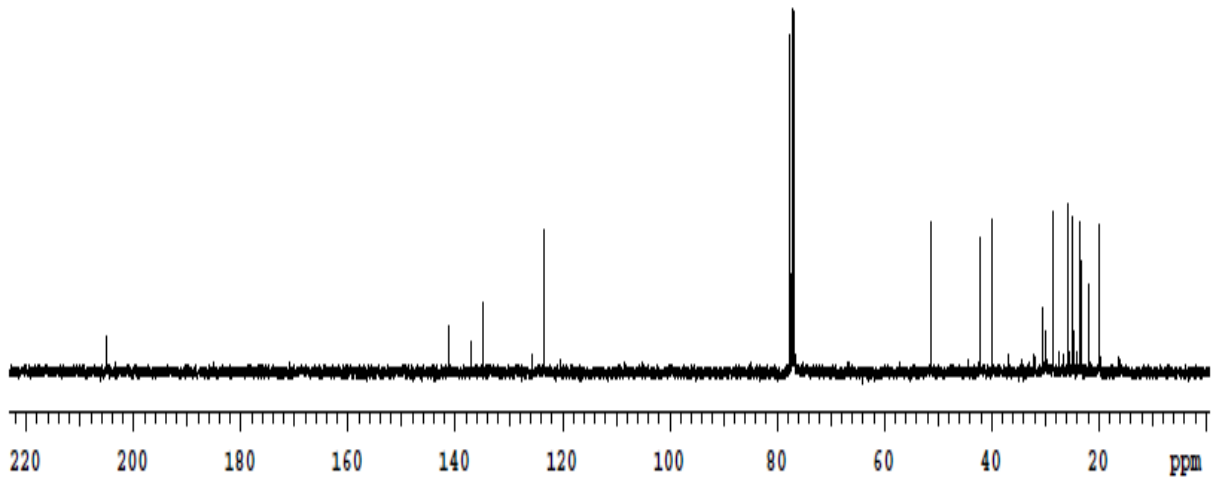
ANEXO 11 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 do (*E*)-nerolidol (**17**) isolado do óleo essencial de *B. rufescens* (item 9.2.1).



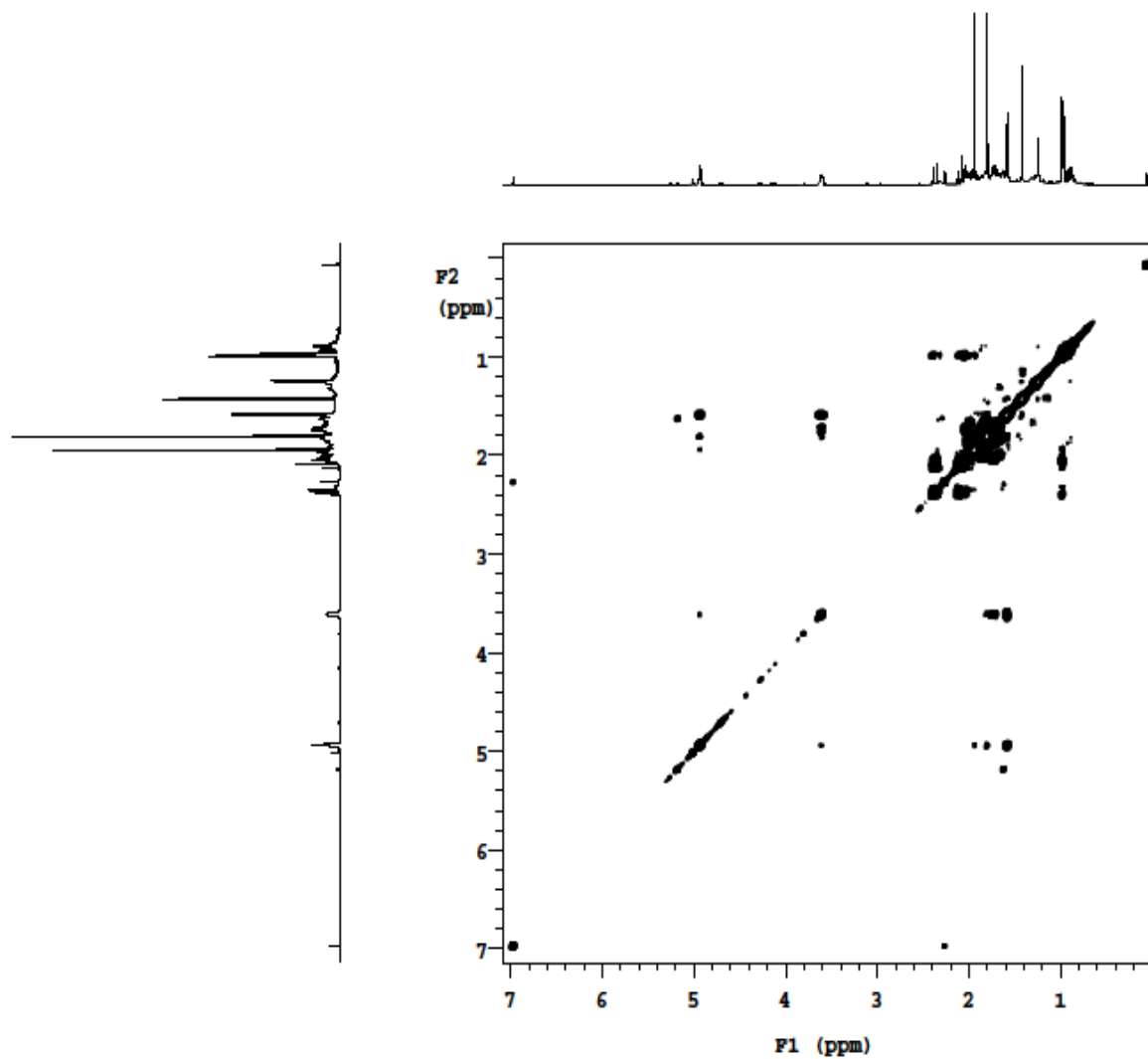
ANEXO 12 - Espectro de RMN de ^1H do (*E*)-nerolidol (**17**) isolado do óleo essencial de *B. rufescens* (item 9.2.1).



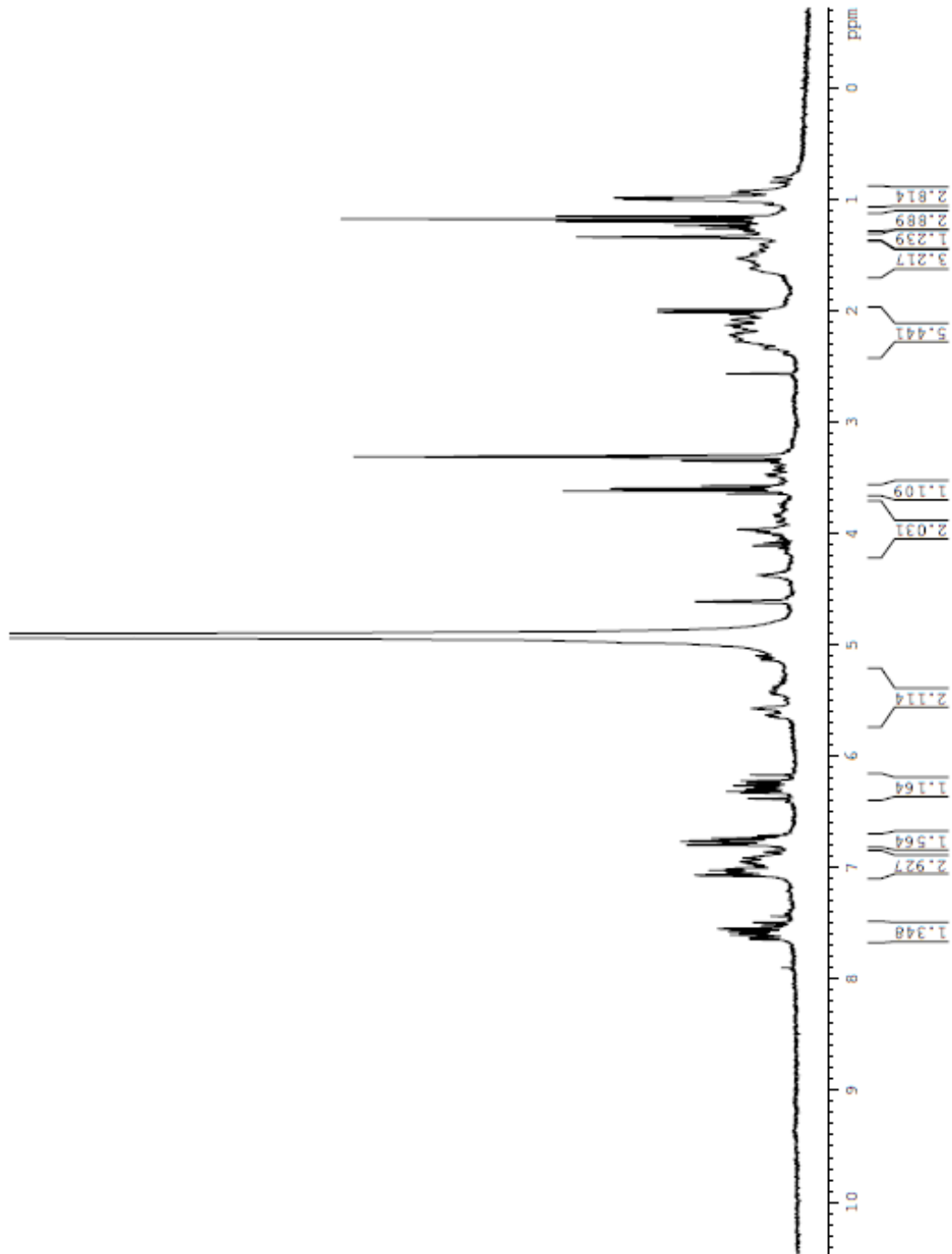
ANEXO 13 - Espectro de RMN de ^{13}C , DEPT 135 e DEPT90 da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) isolada do óleo essencial de *B. rufescens* (item 9.2.1).



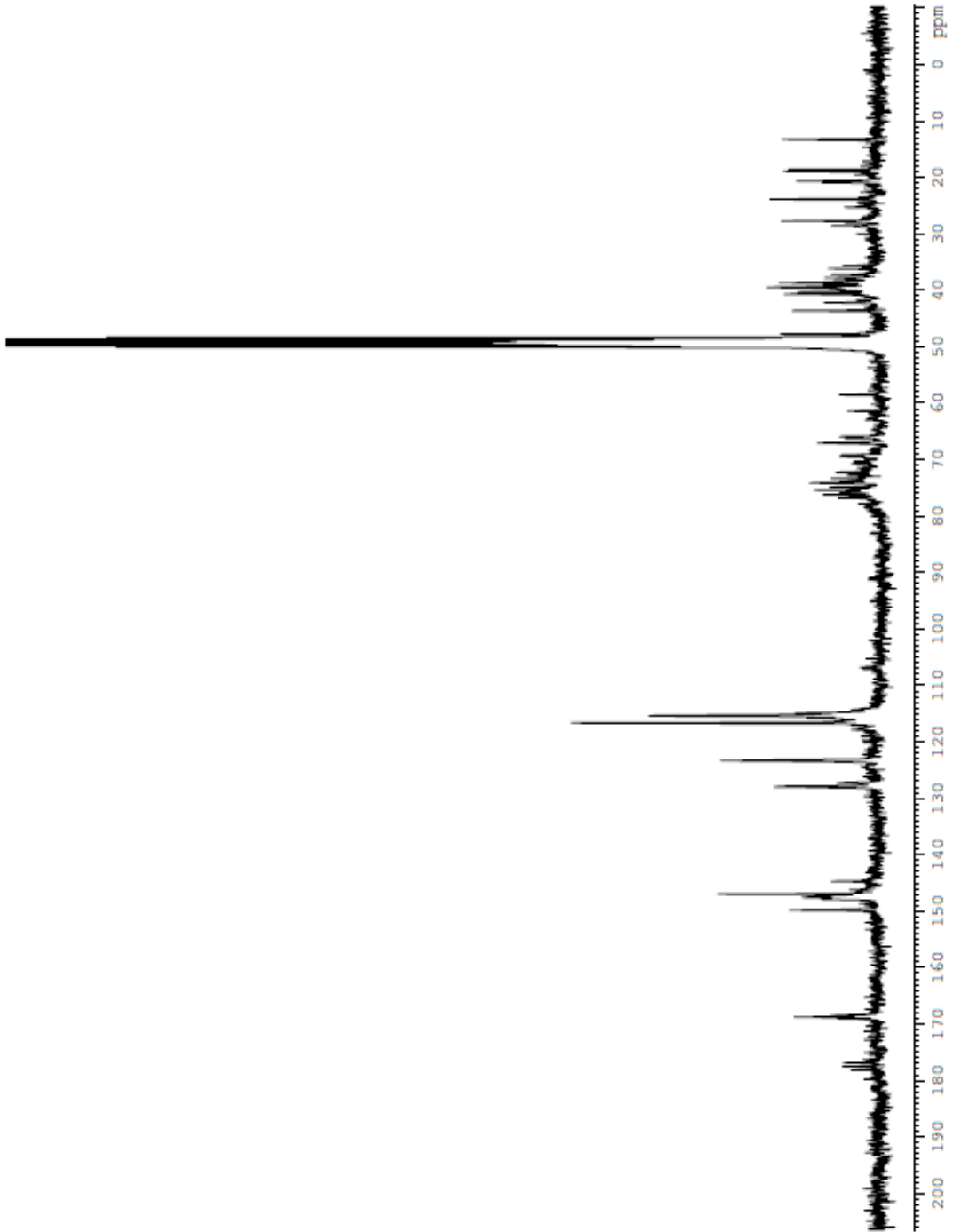
ANEXO 14 - Espectro de RMN gCOSY da 4,7(11)-amorfadien-8-ona (**26**) isolada do óleo essencial de *B. rufescens* (item 9.2.1).



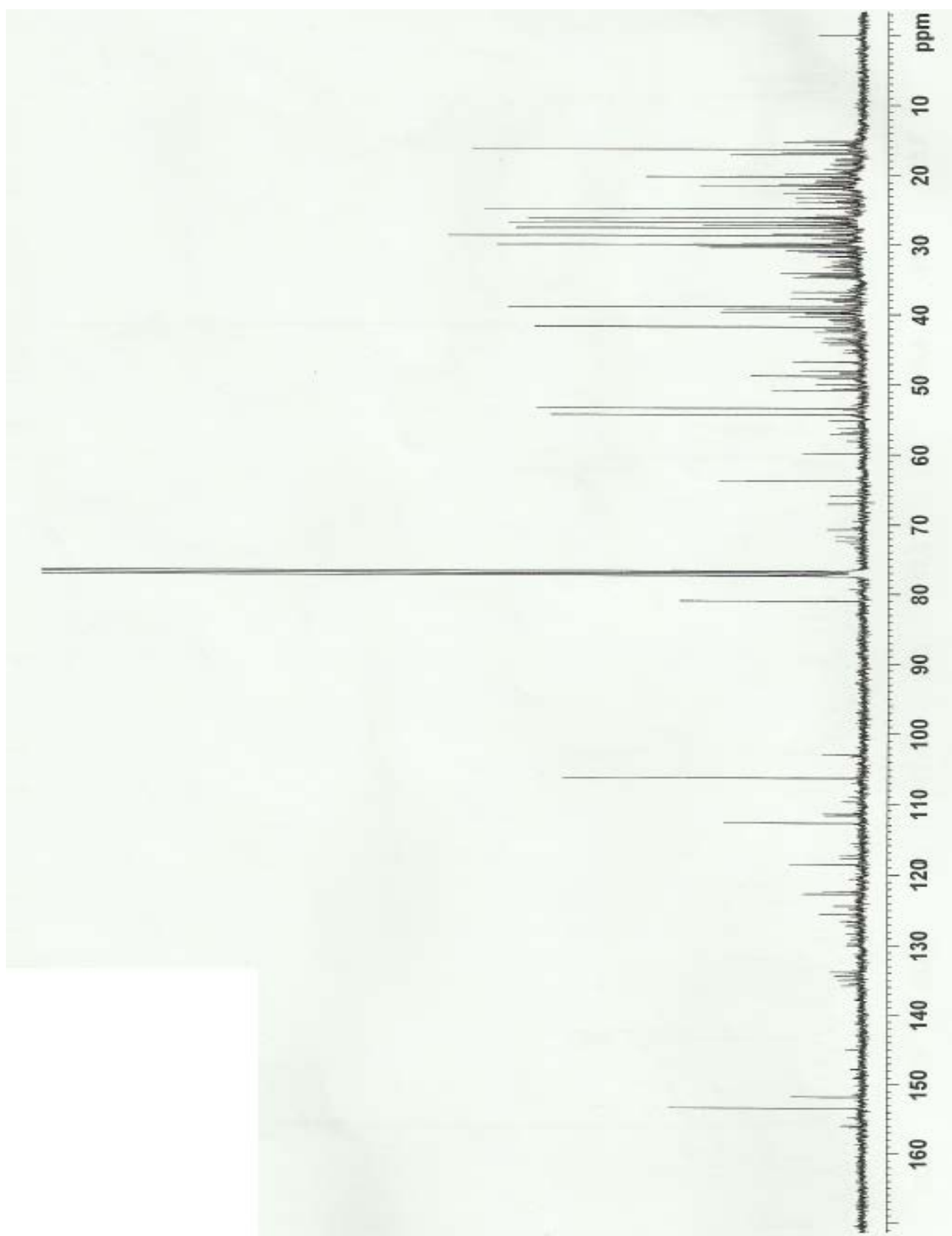
ANEXO 15 - Espectro de RMN de ^1H em CD_3OD dos derivados de ácidos cafeoilquínicos isolados do extrato em acetato de etila em $\text{pH} = 4$ de *B. tridentata* (item 9.3.3).



ANEXO 16 - Espectro de RMN de ^{13}C em CD_3OD dos derivados de ácidos cafeoilquínicos isolados do extrato em acetato de etila em $\text{pH} = 4$ de *B. tridentata* (item 9.3.3).



ANEXO 17 - Espectro de RMN de ^{13}C do óleo essencial das partes aéreas de espécimes masculinos de *B. tridentata*, amostra BTPaM3 (item 9.4).



ANEXO 18 - Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 do óleo essencial das partes aéreas de espécimes masculinos de *B. tridentata*, amostra BTPaM3 (item 9.4).

