

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

ANGELA DE GÓES LARA CARDOZO COSTA

**ESTUDO QUÍMICO DE *Baccharis dracunculifolia* DC. E SUA CORRELAÇÃO COM
A PRÓPOLIS DE UMA MICRORREGIÃO DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ**

PONTA GROSSA
2009

ANGELA DE GÓES LARA CARDOZO COSTA

**ESTUDO QUÍMICO DE *Baccharis dracunculifolia* DC. E SUA CORRELAÇÃO COM
A PRÓPOLIS DE UMA MICRORREGIÃO DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ**

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

Orientador
Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes

PONTA GROSSA
2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

C837e Costa, Angela de Góes Lara Cardozo
Estudo químico de *Baccharis dracunculifolia* DC. e sua correlação com a própolis de uma microrregião dos Campos Gerais do Paraná. / Angela de Góes Lara Cardozo Costa. Ponta Grossa, 2009.
76 f.
Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador : Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes

1. *Baccharis dracunculifolia*. 2. Óleo essencial. 3. Própolis regionais. 4. Atividade antioxidante. 5. CLAE. I. Nunes, Domingos Sávio. II. T.

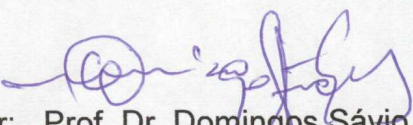
CDD: 547

TERMO DE APROVAÇÃO

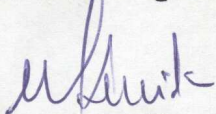
ÂNGELA DE GÓES LARA CARDOZO COSTA

**“ESTUDO QUÍMICO DE *Baccharis dracunculifolia* D.C. E SUA
CORRELAÇÃO COM A PRÓPOLIS DE UMA MICRORREGIÃO DOS CAMPOS
GERAIS DO PARANÁ”**

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


Orientador: Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes
Departamento de Química,UEPG/PR


Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição/ESALQ/USP


Profª. Drª. Mareci Mendes de Almeida
Departamento de Engenharia de Alimentos,UEPG/PR

Ponta Grossa, 29 de junho de 2009.

À minha mãe e primeira professora Terezinha, que ainda hoje com sua paciência e sabedoria tem me ensinado muito. Ao meu esposo e meus filhos Cecília, Pedro Henrique e João Alfredo que com seus encantos tem feito minha vida melhor.

À minha pequena Natália, luz do meu caminho.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela vida.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ao Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes, pela orientação e confiança em mim depositada, por abrir as portas que possibilitaram a melhoria do trabalho e pelo rigor científico em conduzir a realização do mesmo.

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

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) pelas orientações e por proporcionar a realização das análises em CLAE.

À Prof. Dr^a Mariza Boscacci Marques pela colaboração nas análises antioxidantes.

Ao Prof. Dr. Gerth Hatschbach pela classificação botânica.

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

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Ayub e Prof^a Dra. Carolina Weigert Galvão, do Laboratório de Biotecnologia – UEPG, pela utilização do espectrofotômetro nas leituras das amostras.

Aos alunos de iniciação científica Ana Paula I. Malaquias e Renato Marques.

Aos servidores e funcionários do CIPP e da UEPG.

Aos colegas de mestrado cuja amizade que se formou permitiu a conquista desta vitória.

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

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

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
a presença distante das estrelas!

(Mário Quintana)

RESUMO

Neste trabalho, foram analisados extratos de amostras de própolis e de folhas de espécies vegetais do gênero *Baccharis* da região de Ponta Grossa – PR, visando classificar a própolis regional em comparação com a própolis verde (PG12). *Baccharis dracunculifolia*, a fonte da própolis verde, pode apresentar variações metabólicas relacionadas a fatores ambientais. Para comparar dados publicados sobre esta planta com dados obtidos do vegetal coletado nesta região, foram analisados por CG-EM os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas de espécimes feminino (0,81%) e masculino (0,85%) de *B. dracunculifolia* colhidos na estação seca. As duas amostras apresentaram baixa razão monoterpenos/sesquiterpenos (0,85/96,88% ♀; 2,35/95,25% ♂). Foram identificados os monoterpenos β -pineno, limoneno e terpinen-4-ol. Os sesquiterpenos hidrocarbonetos principais foram: β -cariofileno (♀ 7,88%; ♂ 8,88%), α -humuleno (♀ 4,61%; ♂ 2,18%), germacreno D (♀ 5,53%; ♂ 4,04%), *trans*- β -guaiano (♀ 7,98%; ♂ 6,06%) e δ -cadineno (♀ 7,34%; ♂ 5,48%). Os sesquiterpenos oxigenados (*E*)-nerolidol (♀ 24,69%; ♂ 17,16%) e espatulenol (♀ 14,62%; ♂ 21,39%) se encontraram como constituintes majoritários. O alto rendimento, a baixa relação monoterpenos/sesquiterpenos e as altas proporções de sesquiterpenos oxigenados são as principais características do óleo essencial de *B. dracunculifolia* desta região. As folhas de três espécies de *Baccharis* (*B. dracunculifolia*, *B. semiserrata* e *B. uncinella*) foram extraídas em aparelho Soxhlet com a sequência de solventes clorofórmio, acetato de etila e metanol, analisando-se os extratos por CCD, UV e CLAE. Foram identificados os ácidos fenólicos livres: ácido caféico (Bd ♀ e Bd ♂), ácido *p*-cumárico (Bd ♀), ácido ferúlico (Bd ♀, Bd ♂, Bu e Bs) e o flavonóide rutina (Bd ♀, Bd ♂, Bu). Assim, demonstrou-se, pela primeira vez, a co-ocorrência de substâncias fenólicas polares nestas três espécies vegetais. Os extratos etanólicos obtidos de 13 amostras de própolis foram analisados por CCD-AR e UV-VIS, permitindo classificar as própolis regionais em três grupos. Foi escolhida a amostra mais característica de cada grupo (ADI, WS-3, RS-2) para análise por CLAE em comparação com a própolis verde PG12. Brotos frescos dos espécimes masculino e feminino de *B. dracunculifolia* foram extraídos por enxágue com metanol e também submetidos à análise por CLAE. Todos os extratos, de própolis e de *B. dracunculifolia*, apresentaram artepilina C garantindo que esta é a fonte vegetal da própolis regional. Os ácidos caféico, ferúlico e *p*-cumárico foram identificados nas quatro amostras de própolis. Apigenina estaria presente somente nas própolis regionais, entre 2,4% e 3,9%, enquanto a crisina foi identificada somente na PG12, mas como componente principal (18,1%). Um flavonoide ($\lambda_{\text{máx}}$ 365 nm, 42,96 min) é a substância principal das três amostras de própolis regionais e também do extrato obtido por enxágue dos brotos da planta, mas não foi identificado. Todos os extratos etanólicos de própolis regionais apresentaram excelentes níveis de atividade antioxidante quando testados frente ao radical DPPH, vários deles chegando a ser mais efetivos que o da PG12. Uma análise comparativa do poder antioxidante e da composição química das amostras permitem concluir que o flavonóide não identificado é o responsável pela fortíssima atividade antioxidante de ADI e WS-2 em comparação com RS-2 e PG12.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*; óleo essencial; própolis regionais; atividade antioxidante; CLAE.

ABSTRACT

This study aimed to chemically analyze extracts of propolis samples and leaves of plant species of the *Baccharis* genus in the region of Ponta Grossa - PR, to classify the regional propolis compared to the green propolis (PG12). *Baccharis dracunculifolia*, the source of green propolis, may present metabolic changes related to environmental factors. To compare with published data, the essential oils obtained by hydrodistillation from the leaves of female (0.81%) and male (0.85%) specimens of *B. dracunculifolia* harvested in the dry season were analyzed by GC-MS. The two samples showed a low monoterpenes/sesquiterpenes ratio (0.85/96.88% ♀; 2.35/ 95.25% ♂). The monoterpenes β -pinene, limonene and terpinen-4-ol were identified. The main sesquiterpenes hydrocarbons are β -caryophyllene (♀ 7.88%; ♂ 8.88%), β -humulene (♀ 4.61%; ♂ 2.18%), germacrene D (♀ 5.53%; ♂ 4.04%) *trans*- β -guaiene (♀ 7.98%; ♂ 6.06%) and cadinene (♀ 7.34%; ♂ 5.48%). The oxygenated sesquiterpenes (*E*)-nerolidol (♀ 24.69%; ♂ 17.16%) and spathulenol (♀ 14.62%; ♂ 21.39%) were found as the major constituents. The high yield, the low monoterpenes / sesquiterpenes ratio and the high proportions of oxygenated sesquiterpenes are the main characteristics of the essential oil of *B. dracunculifolia* from this region. The leaves of three species of *Baccharis* (*B. dracunculifolia*, *B. semiserrata* and *B. uncinella*) were extracted using a Soxhlet apparatus with the sequence of solvents chloroform, ethyl acetate and methanol, and the extracts were analyzed by TLC, UV and HPLC. Free phenolic acids were identified: caffeic acid (Bd ♀ and Bd ♂), p-coumaric acid (Bd ♀), ferulic acid (Bd ♀, ♂ Bd, Bu and Bs) and the flavonoid rutin (Bd ♀, Bd ♂, Bu). Thus, it is demonstrated for the first time, the co-occurrence of polar phenolic substances in these three plant species. The ethanol extracts obtained from 13 samples of propolis were analyzed by TLC-HR and UV-VIS, allowing the classification of the regional propolis in three groups. The most characteristic sample of each type (ADI, WS-3, RS-2) was chosen for analysis by HPLC in comparison with green propolis PG12. Fresh sprouts of male and female specimens of *B. dracunculifolia* were extracted by rinsing with methanol and the extracts were analyzed by HPLC. All extracts of propolis and *B. dracunculifolia* showed artemillin C ensuring that this plant is the source of regional propolis. The caffeic acid, ferulic acid and p-coumaric acid were identified in the four samples of propolis. Apigenin is present only in the regional propolis samples, between 2.4% and 3.9%, while crisin was identified only in the PG12, but as a main component (18.1%). An unidentified flavonoid (λ_{max} 365 nm, 42,96 min) is the main substance present in the three samples of regional propolis and also the extract obtained by the rinsing of the plant sprouts. All the ethanol extracts of regional propolis showed excellent levels of antioxidant activity when tested against the radical DPPH, several of them getting to be more effective than the PG12. A comparative analysis of antioxidant power and chemical composition of the samples indicates that the unidentified flavonoid is responsible for the strong antioxidant activity of ADI and WS-2 compared to RS-2 and PG12.

Keywords: *Baccharis dracunculifolia*; essential oil; regional propolis; antioxidant activity; GC-MS; HPLC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Dois sesquiterpenos importantes do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	17
Figura 2 -	Estruturas de outros compostos encontrados no óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	17
Figura 3 -	Insetos na espécie <i>B. dracunculifolia</i>	19
Figura 4 -	Desenho esquemático da coleta e utilização da própolis pelas abelhas	20
Figura 5 -	<i>Apis mellifera</i> visitando flores de <i>B. dracunculifolia</i>	21
Figura 6 -	Estrutura do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico	22
Figura 7 -	Estruturas de alguns flavonóides comumente encontrados em própolis e em <i>B. dracunculifolia</i>	22
Figura 8 -	Estruturas de alguns ácidos fenólicos presentes na própolis verde	23
Figura 9 -	Estruturas dos ácidos cafeoil quínicos: ácidos 3,5-dicafeoil-mucoquínico, 3,5-dicafeoil-quínico, 4,5-dicafeoil quínico e 5-cafeoil-quínico (ácido clorogênico)	24
Figura 10 -	Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos etanólicos de <i>B. dracunculifolia</i> (a) e Própolis (b) identificando os ácidos: clorogênico (1), caféico (2), <i>p</i> -cumárico (3), 4,5 dicafeoilquínico (4), 3,4 dicafeoilquínico (5)	25
Figura 11 -	Esquema mostrando as partes de um Cromatógrafo Gasoso	27
Figura 12 -	Espectros de Massa dos principais constituintes do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> obtidos da espectroteca NIST do sistema CG-EM	29
Figura 13 -	Gráfico simplificado mostrando como pode ser explicada a deconvolução	29
Figura 14 -	Cromatógrafo Shimadzu ODS-A utilizado para CLAE	31
Figura 15 -	Reação da sílica com o cloro-metil-silano, utilizado na preparação de colunas cromatográficas	32
Figura 16 -	Representação esquemática de um cromatógrafo líquido para CLAE	32
Figura 17 -	2,2-difenil-1-picrilidrazil como radical livre e como molécula estável DPPH-H	34
Figura 18 -	Mecanismo de transferência de hidrogênio da (+)-catequina para o radical cumilperoxil via transferência de elétrons	36

Figura 19 -	Desenho e medidas do aparelho de hidrodestilação utilizado	41
Figura 20 -	Médias de precipitação mensal dos últimos 10 anos e precipitações mensais medidas durante 2006 próximo ao local onde foram feitas as coletas.....	47
Figura 21 -	Comparação entre os cromatogramas obtidos por detecção de ionização de chama para os óleos essenciais de <i>B. dracunculifolia</i> analisados no presente trabalho.....	49
Figura 22 -	Variação do rendimento do óleo essencial de espécimes feminino e masculino de <i>B. dracunculifolia</i> no decorrer do ano.....	50
Figura 23 -	Análises por CCD dos extratos metanólicos de <i>B. dracunculifolia</i> (BdF e BdM), <i>B. semiserrata</i> (Bs) e <i>B. uncinella</i> (Bu) utilizando sistema eluente polar (AcOEt:MeOH:H ₂ O 7:3:0,5). Revelação: observação sob luz UV de 254 e 360 nm; FeCl ₃ (CCD1); H ₂ SO ₄ e aquecimento (CCD2).....	53
Figura 24 -	Análises por CLAE dos extratos metanólicos das folhas de <i>B. dracunculifolia</i> , <i>B. uncinella</i> e <i>B. semiserrata</i>	55
Figura 25 -	Abelhas coletando de folhas de <i>B. dracunculifolia</i> o material para a produção da própolis verde.....	56
Figura 26 -	Espectros UV-VIS dos extratos etanólicos das amostras WS-3 e RS-2, consideradas típicas de cada um dos dois grupos de própolis regionais...	57
Figura 27 -	Espectro de ultravioleta do pico da artepilina C ($t_R=75,23$ min), com seu máximo de absorção em torno de 280 nm.....	58
Figura 28 -	Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos metanólicos de brotos de <i>B. dracunculifolia</i> masculino (Bd ♂) e feminino (Bd ♀), extratos das própolis regionais WS-3, RS-2, ADI e da PG12.....	60
Figura 29 -	Cinética da reação entre o radical DPPH e os extratos de própolis regionais ADI, WS-3 e RS-2 e de própolis verde PG12 nas alíquotas de 20, 30, 60 e 120 μ L.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Derivados do ácido cafeoil quínico identificados em amostras de própolis brasileira, seus t_R e seus $UV_{máx}$	25
Tabela 2 -	Classificação das própolis brasileiras.....	37
Tabela 3 -	Coletas de material botânico.....	40
Tabela 4 -	Produtores da região e amostras de própolis.....	40
Tabela 5 -	Resultado das extrações de <i>B. dracunculifolia</i> (BdM e BdF), <i>B. uncinella</i> (Bu) e <i>B. semiserrata</i> (Bs).....	42
Tabela 6 -	Componentes dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas de espécimes feminino (♀) e masculino (♂) de <i>B. dracunculifolia</i>	48
Tabela 7 -	Rendimentos das extrações de folhas de três espécies de <i>Baccharis</i> obtidas com a seqüência de solventes.....	52
Tabela 8 -	Máximos de absorção ($\lambda_{máx}$) dos espectros de ultravioleta dos extratos das folhas de <i>B. dracunculifolia</i> (♀ e ♂), <i>B. uncinella</i> e <i>B. semiserrata</i> obtidos com acetato de etila e metanol.....	53
Tabela 9 -	Principais dados das análises por CLAE sobre a rutina e os ácidos fenólicos e derivados dos extratos metanólicos de <i>B. dracunculifolia</i> (Bd ♀, Bd ♂), <i>B. uncinella</i> (Bu) e <i>B. semiserrata</i> (Bs).....	55
Tabela 10 -	Máximos de absorbância (λ máx.) dos extratos etanólicos da própolis PG12 e das própolis regionais separadas em Grupo 1 e Grupo 2.....	57
Tabela 11 -	Reagrupamento das própolis da região de Ponta Grossa.....	59
Tabela 12 -	Principais dados das análises por CLAE dos extratos da própolis PG12, das própolis regionais WS-3, RS-2 e ADI e dos brotos de <i>B. dracunculifolia</i> (Bd ♀ e Bd ♂).....	59
Tabela 13 -	Sequestro do radical DPPH dos extratos de própolis e brotos de <i>B. dracunculifolia</i> em porcentagem.....	62

LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E FÓRMULAS

AcOEt – acetato de etila

Bd ♀ ou BdF - *Baccharis dracunculifolia* espécime feminino

Bd ♂ ou BdM - *Baccharis dracunculifolia* espécime masculino

BHT - 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol

CCD – cromatografia em camada delgada

CCD-AR – cromatografia em camada delgada de alta resolução

CG – cromatografia gasosa

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

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CHCl₃ – clorofórmio

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilidrazil

ERN – espécie reativa de nitrogênio

ERO - espécie reativa de oxigênio

HPLC- High Performance Liquid Chromatography

IK – índice de Kovàts

LDL – lipoproteína de baixa densidade

MeOH – metanol

PG12 - própolis verde utilizada como padrão

Rf – fator de retenção

TIC – cromatograma de íons totais

UV – ultravioleta

λ - comprimento de onda (nm)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	A família Asteraceae e o gênero <i>Baccharis</i>	15
1.2	<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC. e seu óleo essencial.....	16
1.3	<i>Baccharis dracunculifolia</i> e os insetos.....	18
1.4	<i>Baccharis dracunculifolia</i> e a própolis verde.....	20
1.5	Derivados do ácido quínico.....	24
1.6	Métodos de análise importantes para esta pesquisa.....	26
1.6.1	A cromatografia gasosa.....	26
1.6.2	A cromatografia líquida de alta eficiência.....	30
1.7	Avaliação do potencial antioxidante.....	33
2	OBJETIVOS	38
2.1	Geral	38
2.2	Específicos	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Reagentes analíticos.....	39
3.2	Equipamentos.....	39
3.3	Coleta de própolis e materiais botânicos.....	40
3.4	Obtenção de amostras de óleo essencial.....	41
3.5	Obtenção de extratos.....	41
3.5.1	Extratos obtidos com uma sequência de solventes.....	41
3.5.2	Extratos obtidos por enxágue.....	42
3.5.3	Extratos de própolis.....	43

3.6	Análises por CG/EM.....	43
3.7	Análises por espectrofotometria UV-VIS.....	44
3.8	Análises por CCD-AR.....	44
3.9	Análises por CLAE.....	44
3.10	Análises da atividade antioxidante.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	Análise dos óleos essenciais de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	46
4.2	Análises comparativas de três espécies <i>Baccharis</i>	51
4.3	Correlações químicas entre <i>B. dracunculifolia</i> e a própolis regional.....	56
4.4	Atividade antioxidante.....	61
4.5	Conclusões.....	64
4.6	Perspectivas para este trabalho.....	65
5	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 A família Asteraceae e o gênero *Baccharis*

A família Asteraceae, uma das maiores famílias dentro das Angiospermas, compreende cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto à sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos e inseticidas (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

O gênero *Baccharis* é um importante gênero desta família, pertence à tribo Asterae e está representado por mais de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as regiões mais elevadas (BUDEL et al., 2004). A alta concentração de espécies no Brasil e nos Andes indica que uma destas áreas é o provável centro de origem desse gênero (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). No Brasil, estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, distribuídas em maior concentração na Região Sul do país (AGOSTINI et al., 2005).

As espécies deste gênero possuem alto valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul, entre outras regiões do país, onde grande número delas é utilizado na medicina popular para controle ou tratamento de várias doenças (CORRÊA, 1984). São consumidas principalmente na forma de chás com indicações para males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças na próstata, sendo também descritas como remédio para processo de desintoxicação do organismo (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Este gênero produz várias classes de metabólitos secundários, mas apenas cerca de 15% das espécies de *Baccharis* foram estudadas do ponto de vista fitoquímico pelo menos uma vez e poucas delas têm estudos mais completos (AGOSTINI et al., 2005).

Segundo a divisão de Barroso (1976), o grupo *Spicata* compreende arbustos ramificados com 50 cm a 3 m de altura, apresentando folhas sésseis. Sete espécies representam este grupo, dentre elas: *Baccharis dracunculifolia* DC., *B. spicata* (Lam.) Baill., *B. erioclada* DC., *B. caprariaefolia* DC., *B. nummularia* Hees, *B. uncinella* DC., *B. megapotamica* e sua variedade. A espécie *B. dracunculifolia* está classificada na secção *Discolores* DC., e já apresentou as seguintes sinonímias: *B. bracteata* Hook. et Arn., *B. leptospermoides* DC. e *B. tandilensis* Spreng (BUDEL et al., 2004). Atualmente, o banco de

dados IPNI (The International Plant Names Index), criado e mantido pelas três maiores instituições da área da botânica, The Royal Botanic Gardens, The Harvard University Herbaria e o Australian National Herbarium, não reconhece a existência de sinônimos para *B. dracunculifolia*, mas três variedades desta espécie vegetal continuam registradas como válidas: *integerrima* Kuntze, *subdentata* Kuntze e *subviscosa* Kuntze (IPNI, 2009).

1.2 *Baccharis dracunculifolia* DC. e seu óleo essencial

A espécie *Baccharis dracunculifolia* DC., conhecida vulgarmente como “alecrim do campo, alecrim vassoura, carqueja, chilca, cilca, erva-de-são-joão-maria, suncho, thola, vassoureira ou vassourinha”, utilizada para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica (BUDEL et al., 2004) é um arbusto com ocorrência espontânea no Brasil, Uruguai, Argentina, Paraguai e encontrada também nos altos vales da Bolívia, chegando até 3.280 m de altitude (CASSEL et al., 2000), onde é considerada importante pela população local em vista de seus usos na medicina tradicional (LOAYZA et al., 1995).

Esta espécie é arbustiva, possui folhas lanceoladas, membranáceas, uninérvias, com 1 a 2 cm de comprimento e 3 a 4 mm de largura, densamente pontuadas de glândulas, com margens inteiras, 1 a 3 denteadas, raramente apresentando entre 5 e 7 dentes. Possui flor feminina com corola de 2 a 3 mm de comprimento e flor masculina com corola de 2,5 a 3 mm de comprimento. É uma espécie normalmente encontrada em campos secos e locais alterados, florescendo desde o início de janeiro até maio nos Campos Gerais do Paraná, conforme observações feitas no decorrer do presente trabalho de pesquisa. A planta já foi muito utilizada na confecção de vassouras rústicas, de onde vem um de seus nomes populares, e por ser uma planta que cresce espontaneamente em campos de criação de gado, seus efeitos tóxicos já foram observados em animais (TAKEDA; FARAGO, 2001).

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* é produzido no Brasil em pequena escala para uso em perfumaria, pelo seu aroma exótico, dependendo de sua origem geográfica e processo de extração. A sua importância comercial reside nos teores de (*E*)-nerolidol (**1**) e espatulenol (**2**), normalmente encontrados como componentes principais em óleos obtidos com a utilização de processos de hidrodestilação (CASSEL et al., 2000; FABIANE et al. 2008; FERRACINI et al., 1995; FRIZZO et al., 2008). Óleos essenciais com baixas concentrações de (*E*)-nerolidol (**1**) e espatulenol (**2**) são considerados de baixa qualidade e não são aceitos por algumas farmacopéias (WAGNER; BLADT, 1995).

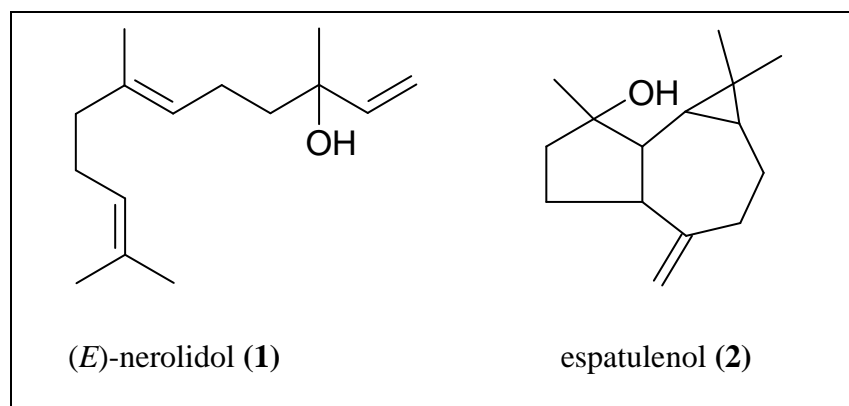


Figura 1 – Dois sesquiterpenos importantes do óleo essencial de *B. dracunculifolia*.

Para Ferracini e colaboradores (1995), na análise dos óleos essenciais obtidos de espécimes feminino e masculino, as concentrações de (*E*)-nerolidol (1) foram de 20,80% (♀) e 12,02% (♂) e de espatulenol (2) foram de 2,58% (♀) e 3,79% (♂). Compostos como germacreno-D (3), β-pineno (4) e δ-cadineno (5) também já foram identificados em proporções de 4%, 18% e 13%, respectivamente (LOAYZA et al., 1995). Outros terpenóides como β-cariofileno (6), β-selineno (7), globulol (8), viridiflorol (9) e α-cadinol (10) já foram também relatados como componentes majoritários em óleos essenciais de *B. dracunculifolia* (FERRACINI et al., 1995; AGOSTINI et al., 2005).

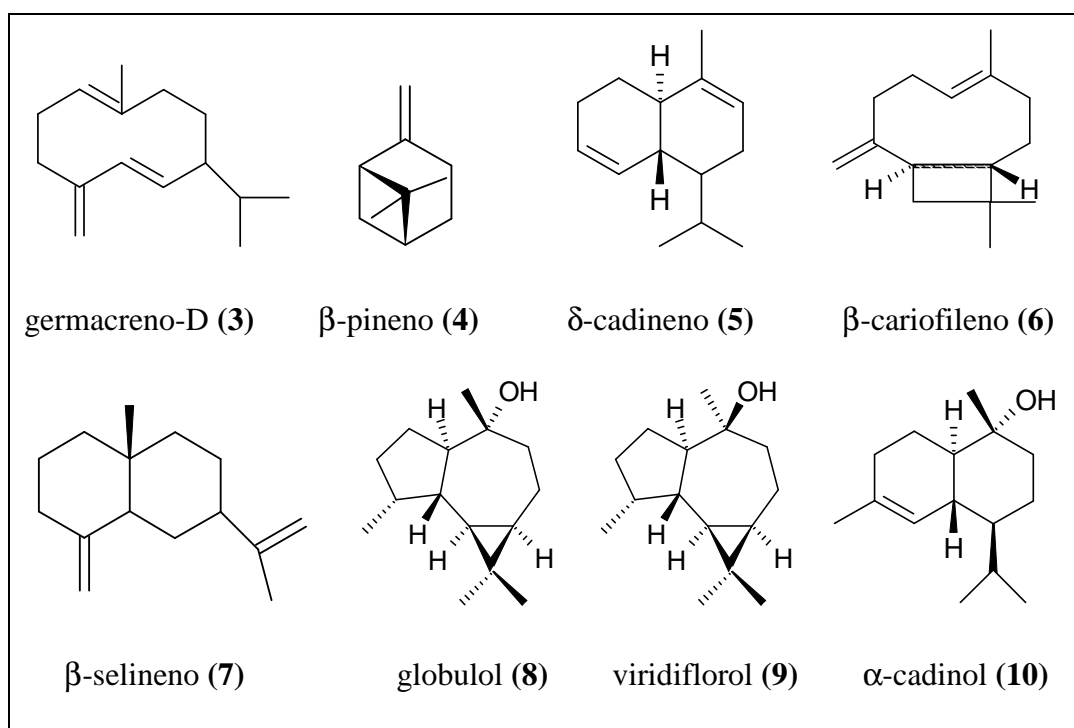


Figura 2 – Estruturas de outros compostos encontrados no óleo essencial de *B. dracunculifolia*

Os óleos essenciais de espécies do gênero *Baccharis* estão sujeitos a variações muito grandes em suas composições, as quais parecem estar fortemente relacionadas a fatores climáticos e outros fatores ambientais. O rendimento de óleo essencial e a concentração de cada um dos constituintes do óleo de uma determinada espécie podem variar durante o ciclo vegetativo do vegetal. Fatores ambientais e práticas de cultivo também causam impactos, influenciando a composição química dos óleos essenciais e o seu rendimento. A temperatura, a umidade relativa, a duração total da exposição ao sol e o regime de ventos também exercem influência direta na composição e rendimento, especialmente em espécies que possuem estruturas superficiais de produção e armazenamento de óleos essenciais (BRUNETON, 1995); e ainda, diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar óleos essenciais com composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos (SIMÕES; SPITZER, 2003).

1.3 *Baccharis dracunculifolia* e os insetos

Os insetos visitam flores para se alimentar de néctar e pólen e nesse processo, eles geralmente polinizam as flores, de modo que ambos se beneficiam dessa associação mutualista (Figura 3). Nesta relação há três fatores bioquímicos que interagem: o cheiro, a cor das flores e o valor nutricional do néctar e pólen. Os insetos vivem no mundo da comunicação química - utilizam feromônios e são capazes de detectar os terpenos e outros voláteis de flores a grandes distâncias. Quando um polinizador se aproxima de uma planta, ele também recebe um sinal visual, que é o destaque das flores coloridas contra o verde da folhagem (FERRACINI, 1995).

Entretanto, é difícil determinar qual ou quais polinizadores são ativos numa espécie vegetal sendo que alguns animais podem visitar flores por outras razões que não sejam a polinização, também podem ser capazes de alimentar-se de néctar, sem que ocorra a polinização necessária à planta. Formigas, por exemplo, são bem conhecidas como visitantes ilegítimos, isto é ladrões de néctar, e são freqüentemente tão pequenas que patrulham as flores por dentro e por fora sem tocar os órgãos reprodutores. Contudo, elas agem como polinizadoras em alguns casos (FERRACINI, 1995). Os insetos herbívoros que utilizam de *B. dracunculifolia* para produzir suas galhas também podem exercer um efeito negativo sobre o desenvolvimento da planta (FAGUNDES; NEVES; FERNANDES, 2005). Galhas são crescimentos especializados em tecidos vegetais, induzidos por alguns vírus, bactérias, fungos, nematóides, ácaros ou insetos. Em galhas induzidas por insetos, quando o indutor

COSTA, A. G. L.C.- Estudo químico de *Baccharis dracunculifolia* DC. e sua correlação com a própolis de uma microrregião dos Campos Gerais do Paraná.

começa a se alimentar, é muito freqüente a formação de tecido nutritivo, revestindo a câmara larval. Emprega-se este termo para as galhas onde estão presentes fungos que servem de alimento para a larva do indutor. No Brasil, já foi descrita a ocorrência de 17 tipos de galhas em *B. dracunculifolia* (ARDUIN; KRAUS, 2001).

No grupo das Angiospermas, a maioria das plantas requer insetos para a polinização. Isto é observado principalmente em plantas dióicas, como é o caso da espécie em estudo, *B. dracunculifolia*.



Figura 3 - Insetos na espécie *B. dracunculifolia* (Fotos de D. S. Nunes, 2006).

1.4 *Baccharis dracunculifolia* e a própolis verde

Própolis é um termo de origem grega que significa “em defesa da cidade”, aplicado a este material que as abelhas produzem para a proteção de suas colméias. É formada por material resinoso e balsâmico de composição química complexa, sendo este coletado pelas abelhas dos brotos, exsudatos de árvores e de outras partes do tecido vegetal (BANKOVA, 2005; SANTOS et al., 2003). Este material é usado pelas abelhas como selante, para fechar as brechas e proteger a colméia contra ataque de micro-organismos e até para mumificar insetos invasores (Figura 4). Estima-se que o uso da própolis na medicina popular antecede 300 a.C. e o consumo mundial está em torno de 700 a 800 toneladas por ano (SILVA et al., 2006).

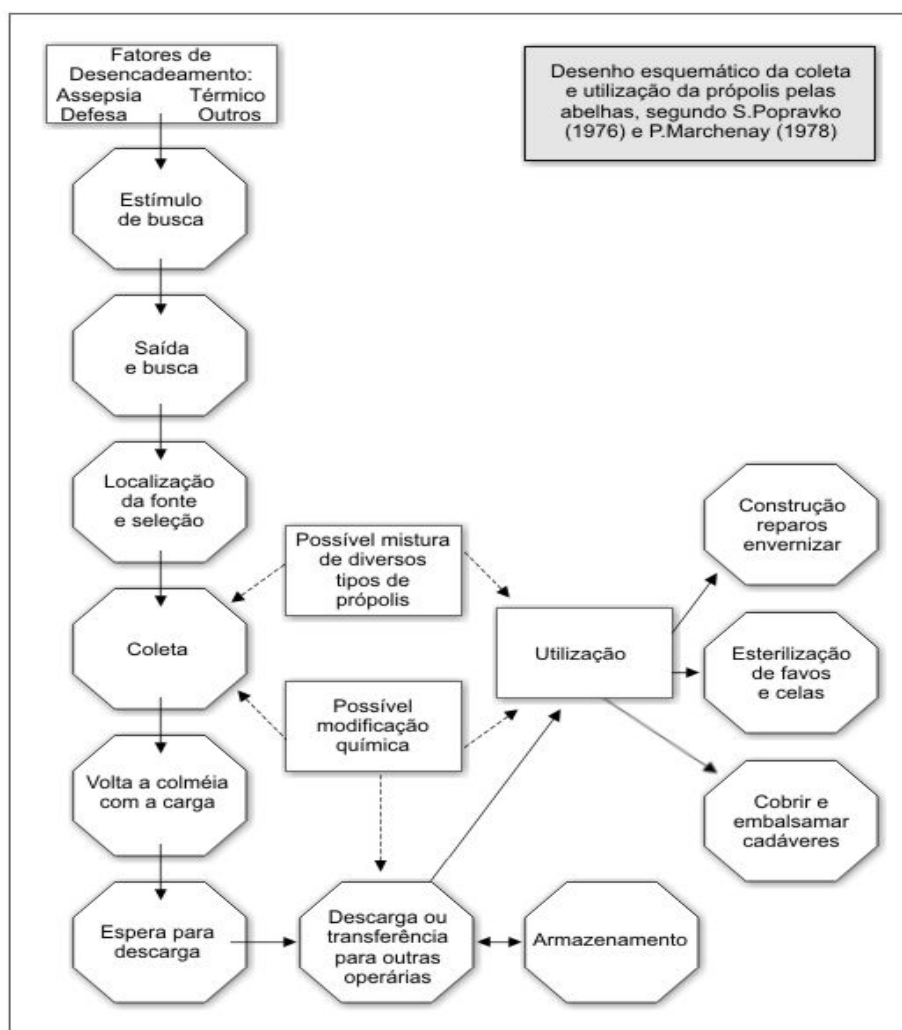


Figura 4 - Desenho esquemático da coleta e utilização da própolis pelas abelhas.
Fonte: Apicultura (2007).

As própolis brasileiras foram classificadas em 12 tipos, segundo o perfil químico, além das atividades antimicrobiana e antioxidante (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000). Para a região sudeste do Brasil, o grupo 12, representa com fidelidade a sua origem botânica: *B. dracunculifolia* (KUMAZAWA et al., 2003; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002).

B. dracunculifolia tem sido apontada como provável fonte de origem da própolis verde, produzida pelas abelhas (Figura 5) que coletam material dos brotos ou exudatos, substâncias voláteis e ceras de plantas (TEIXEIRA et al., 2005). Em estudos onde se observou o comportamento de abelhas da espécie *Apis mellifera* foi relatado que estas obtêm o material para a manipulação da própolis, preferencialmente em espécies de *B. dracunculifolia* (ALENCAR et al., 2005; KUMAZAWA et al., 2003; PARK et al., 2004).



Figura 5 - *Apis mellifera* visitando flores de *B. dracunculifolia*.
(Foto de D. S. Nunes, 2006)

Muitos dos constituintes químicos encontrados na própolis são também encontrados em sua fonte botânica, então, comparando-se a composição química de extratos da planta e da própolis tem-se um bom indicador para avaliar a possível fonte botânica. Alencar et al. (2005) investigaram a composição química da própolis produzida em São Paulo e Minas Gerais pelas abelhas africanizadas *Apis mellifera* e a maior relação encontrada entre a própolis e os extratos metanólicos foi a alta proporção do composto fenólico conhecido como artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (**11**) e outros similares.

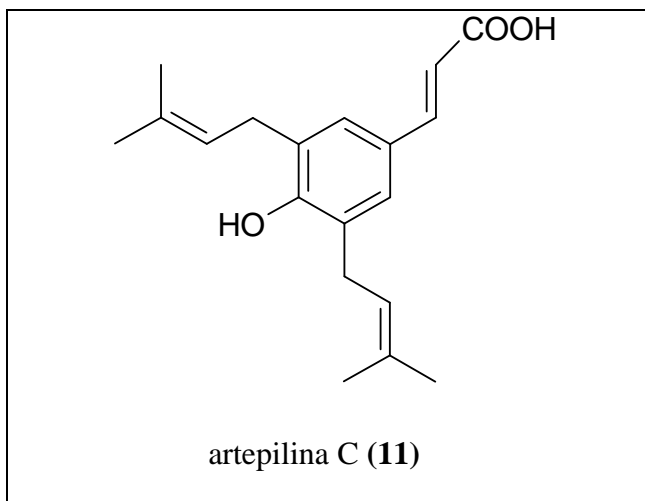


Figura 6 - Estrutura do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico.

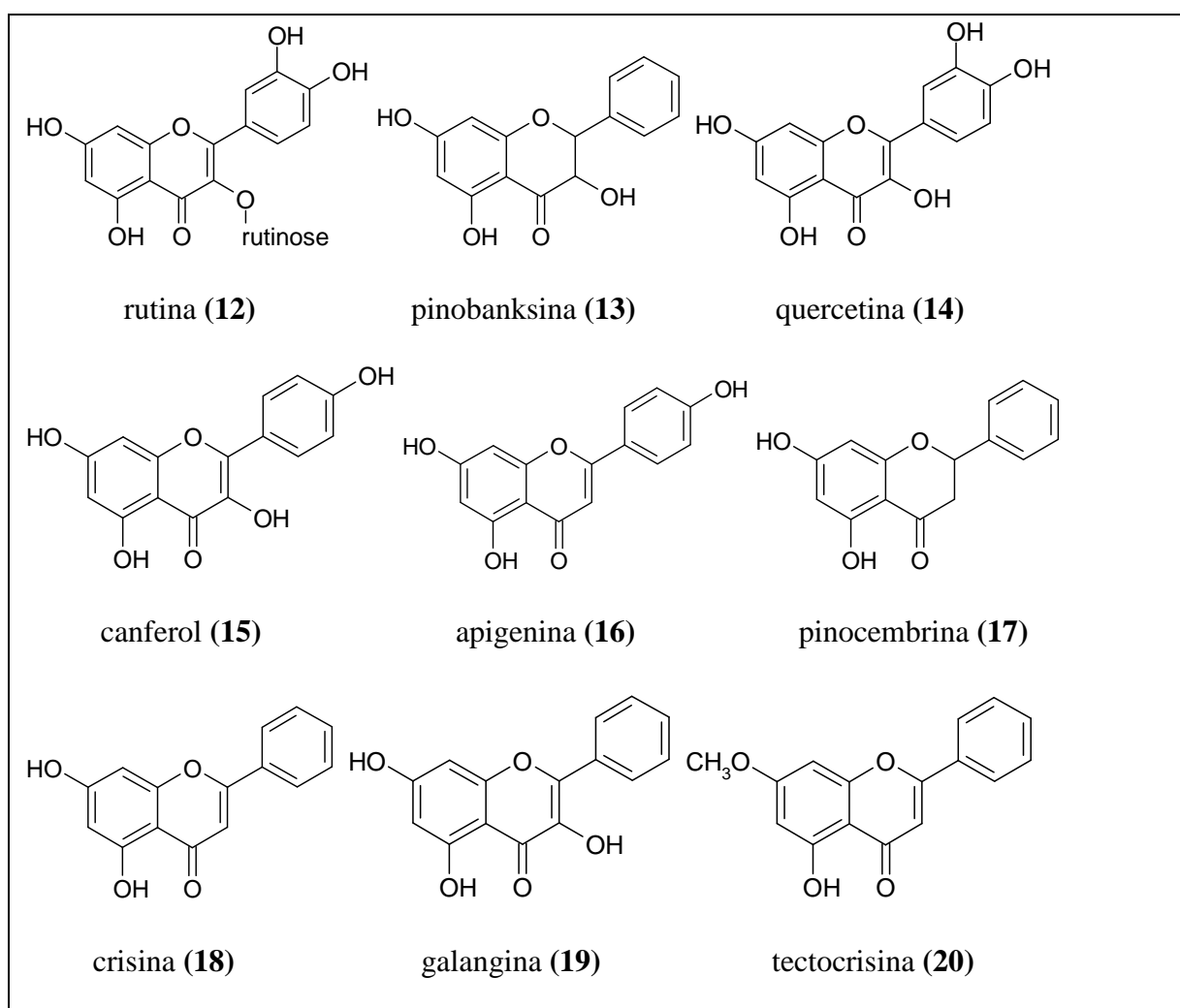


Figura 7 - Estruturas de alguns flavonóides comumente encontrados em própolis e em *B. dracunculifolia*.

A artepilina C é um dos principais ácidos fenólicos presentes no extrato de própolis PG12. Apresenta grande importância por possuir várias atividades biológicas, como anti-

inflamatória (PAULINO et al., 2008), antitumoral, indutora de apoptose, imunomoduladora e antioxidante (PISCO et al., 2006) e supressora da angiogênese tumoral (AHN et al., 2007).

Além da artepilina C, outros três componentes da própolis brasileira, identificados como ácidos 3-prenil-4-hidroxycinâmico, 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano foram testados contra bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* encontrando-se, em todos os quatro, atividade contra estas bactérias e também contra *Tripanosoma cruzi*, além disso, efeito miorrelaxante foi relatado (MARCUCCI et al., 2001).

Vários flavonóides também estão presentes em amostras de própolis e *B. dracunculifolia*: rutina (12), pinobanksina (13), quercetina (14), canferol (15), apigenina (16), pinocembrina (17), crisina (18), galangina (19), tectocrisina (20) e canferide (MARÓSTICA JUNIOR et al., 2008; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002).

Também os ácidos caféico (21), ferúlico (22) e *p*-cumárico (23) estão presentes na própolis brasileira (MARCUCCI, 2006). Os ácidos caféico e *p*-cumárico mostraram atividade antimutagênica induzida por desoxirribicina (RESENDE et al., 2007).

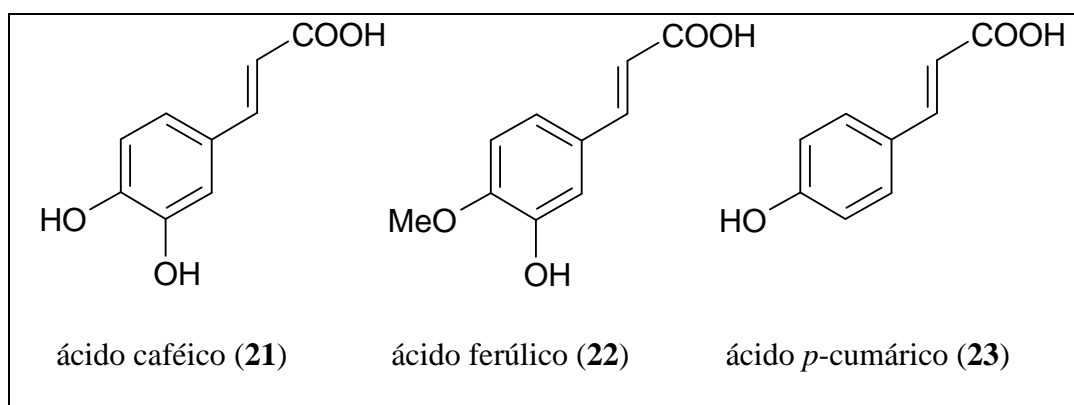


Figura 8 - Estruturas de alguns ácidos fenólicos presentes na própolis verde.

Assim como a própolis possui atividades biológicas: antioxidante (MENEZES, 2005; SHENG et al., 2007; SILVA et al., 2006), antimicrobiana (CASTRO et al., 2007; GEBARA; LIMA; MAYER, 2002; KUJUMGIEV et al., 1999; MARCUCCI, 1996; MENEZES, 2005) citotóxica (MARCUCCI, 1996), anti-inflamatória (MENEZES, 2005), hepatoprotetora (MENEZES, 2005), antitumoral (AHN et al., 2007; FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007), os extratos de *B. dracunculifolia* também apresentaram as suas atividades: antimutagênica (RESENDE et al., 2007) e antibacteriana (FERRONATTO et al., 2007; LEITÃO et al., 2004).

1.5 Derivados do ácido quínico

Nos últimos anos têm se dado atenção especial a estes compostos, principalmente após a confirmação da origem botânica da própolis brasileira. Tendo a própolis merecido destaque por conter tantas atividade biológicas, os extratos de *Baccharis sp.* também foram ocupando espaço na literatura, pois são muito utilizadas na medicina tradicional em toda a América Latina.

Quatro derivados do ácido cafeoil quínico: ácidos 3,5-dicafeoil-muco-quínico (**24**), 3,5-dicafeoil-quínico (**25**), 4,5-dicafeoil quínico (**26**) e 5-cafeoil-quínico (ácido clorogênico) (**27**) foram isolados de *Aster scaber*, estabelecendo-se suas estruturas por RMN de ^1H e de ^{13}C de alta resolução. Estes compostos apresentaram atividade contra proteína do HIV-1 (Figura 9).

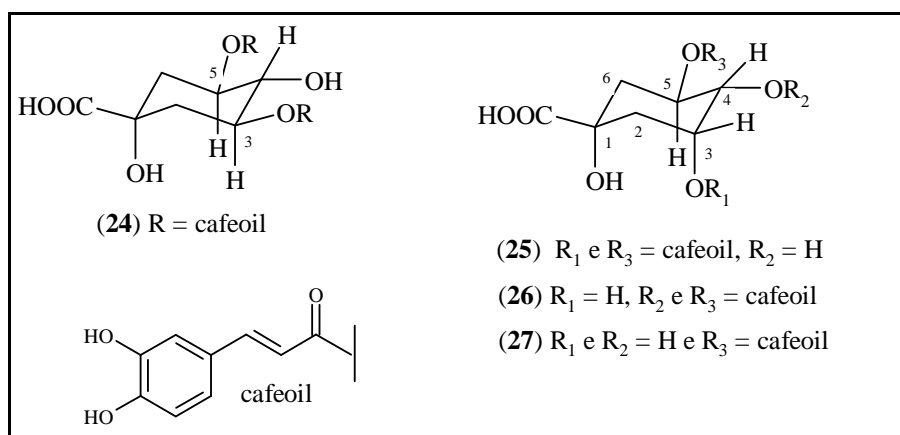


Figura 9 - Estruturas dos ácidos cafeoil quínicos: ácidos 3,5-dicafeoil-muco-quínico (**24**), 3,5-dicafeoil-quínico (**25**), 4,5-dicafeoil quínico (**26**) e 5-cafeoil-quínico (ácido clorogênico) (**27**). Fonte: Kwon et al., 2000.

Extratos metanólicos das folhas de *B. dracunculifolia*, apresentam glicosídeos contendo grupos (*E*)-cafeoil que pela primeira vez foram relatados na literatura (NAGATANI; WARASHINA; NORO, 2001 e 2002). Posteriormente derivados do ácido clorogênico (**27**) foram isolados da parte aérea de *B. dracunculifolia* (ABAD; BERMEJO, 2007).

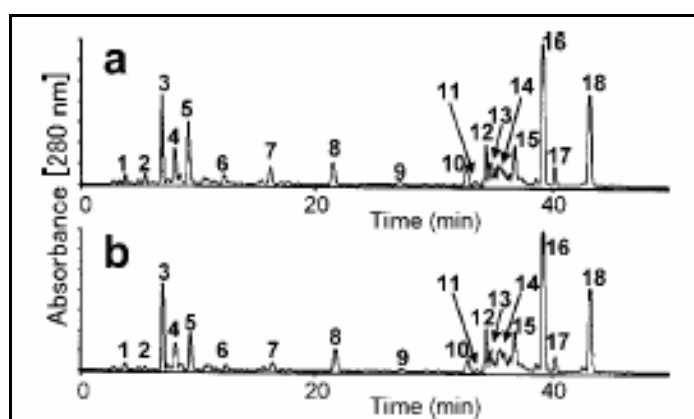
Estas substâncias também foram identificadas em amostras de própolis brasileira: ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico) (**27**) e os seus derivados 3,5-dicafeoilquínico (**25**), 3,4-dicafeoilquínico (**26**) e tricafeoilquínico (GARDANA et al., 2007) (Tabela 1).

Tabela 1 – Derivados do ácido cafeoil quínico identificados em amostras de própolis brasileira, seus t_R e $UV_{máx}$.

Substância	t_R (min)	$UV_{máx}$
ácido clorogênico	2,7	325
ácido caféico	3,4	324
ácido cumárico	4,8	310
ácido ferúlico	5,3	324
ácido dicafeoilquínico	5,3	325
ácido dicafeoilquínico	5,9	325
ácido tricafeoilquínico	13,3	325

Fonte: Gardana et al. (2007).

Derivados do ácido cafeoilquínico (ácido 3,4-dicafeoilquínico, 3,5- dicafeoilquínico e 3,4,5-tricafeoilquínico) foram isolados de própolis de *B. dracunculifolia* e detectados em comprimento de onda de 325 nm. Os extratos de própolis com concentrações definidas de cada componente foram avaliados segundo o potencial de indução na hipotensão em ratos, sugerindo ação anti-hipertensiva para estes compostos (MISHIMA et al., 2005). Estes ácidos foram encontrados em própolis originárias de *B. dracunculifolia* em maiores proporções se comparados com as amostras originárias de *Araucária spp* (SALOMÃO et al., 2007). Para comprovar a relação entre *Baccharis* e própolis, Kumazawa et al. (2003) identificaram como componentes polares, em CLAE, no extrato etanólico de ambos, os ácidos: clorogênico, caféico, *p*-cumárico, 4,5 dicafeoilquínico, 3,4 dicafeoilquínico como mostra a Figura 10.

**Figura 10** - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos etanólicos de *B. dracunculifolia* (a) e Própolis (b) identificando os ácidos: clorogênico (1), caféico (2), *p*-cumárico (3), 4,5 dicafeoilquínico (4), 3,4 dicafeoilquínico (5). Fonte: Kumazawa et al. (2003).

Ésteres do ácido caféico (fenetil éster do ácido caféico) assim como outros compostos fenólicos foram apontados como responsáveis por importantes atividades antimicrobiana e antitumoral (SFORCIN; ORSI; BANKOVA, 2005).

Outro trabalho relevante identificou no extrato metanólico de folhas jovens de *B. dracunculifolia* os seguintes ácidos: clorogênico, caféico, *p*-cumárico, ferúlico e trans-cinâmico. Estes compostos em própolis foram avaliados, levando os autores a afirmar que há um efeito tóxico dose-dependente em fibroblastos de ratos (FUNARI; FERRO; MATHOR, 2007).

Estes ácidos já são conhecidos por possuírem ação potente e seletiva como inibidora de vírus Tipo 1 HIV, não sendo tóxicos nas concentrações utilizadas. O ácido clorogênico é um inibidor competitivo da glucose-6-fosfatase; é ela quem regula a concentração de glicose no sangue. Quando ingerido em alimentos, o ácido clorogênico é absorvido no intestino e passa para a circulação sanguínea. O ácido clorogênico, juntamente com ácido caféico, são antioxidantes “in vitro”, protegendo o LDL (lipoproteína de baixa densidade) da oxidação e conseqüentemente prevenindo contra doenças do envelhecimento (PEREIRA et al., 2003).

Num contexto onde os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica, seja por si ou como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIROS, 2006), o estudo da espécie *Baccharis dracunculifolia* DC. e sua correlação com a própolis merece atenção especial, já que ambas apresentam atividades farmacológicas comprovadas em estudos científicos e também por existirem evidências diretas de que a *B. dracunculifolia* é a fonte de origem da própolis brasileira (PG12).

1.6 Métodos de análise importantes para esta pesquisa

1.6.1 A cromatografia gasosa

Neste método (Figura 11) separa-se uma mistura em seus componentes fazendo-se mover um gás sobre um adsorvente estacionário. A amostra é analisada em fase gasosa e, portanto, os analitos devem ser voláteis ou volatilizáveis.

A cromatografia gasosa é uma técnica com poder de resolução excelente, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma amostra. Dependendo do tipo de substância a ser analisada e do detector empregado, consegue-se detectar cerca de 10^{-12} g

do composto por mL⁻¹ de solução. Essa sensibilidade permite que pequenas quantidades de amostra possam ser analisadas (PERES, 2002).

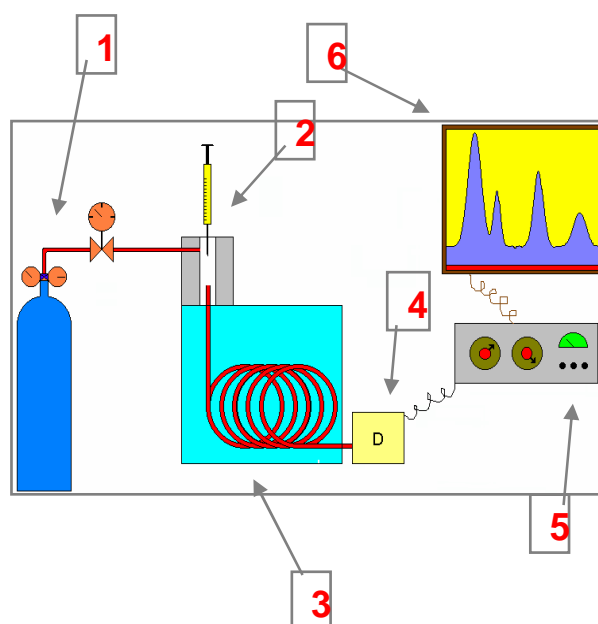


Figura 11 – Esquema mostrando as partes de um cromatógrafo gasoso: 1 reservatório de gás e controles de vazão / pressão; 2 injetor (vaporizador) de amostra; 3 coluna cromatográfica e forno da coluna; 4 detector; 5 eletrônica de tratamento (amplificação) de sinal; 6 registro de sinal (registrador ou computador). (Fonte: Cromatógrafo Gasoso, 2009).

O gás de arraste - A separação é auxiliada pelo gás de arraste que é normalmente o hélio, nitrogênio, hidrogênio ou argônio e a escolha depende da disponibilidade, pureza, consumo e tipo de detector utilizado. Hélio é o preferido com detectores de condutividade térmica porque tem condutividade térmica alta em relação aos vapores da maior parte dos compostos orgânicos. Além do reservatório de gás em alta pressão, são necessários reguladores de pressão e medidores de vazão para controlar e medir o fluxo do gás.

A introdução da amostra - Vários dispositivos de introdução da amostra foram desenvolvidos. O mais importante envolve a introdução de amostras líquidas com uma microseringa dotada de uma agulha hipodérmica; a agulha passa através de um septo de borracha de silicone auto-selante e coloca a amostra em um bloco de metal aquecido que está na entrada da coluna. A temperatura do bloco deve ser suficiente para que a amostra líquida se vaporize rapidamente sem decomposição ou fracionamento. Para melhorar a eficiência, a amostra deve ser a menor possível (1 a 10 µL).

A coluna - A separação dos componentes da amostra que foi injetada é feita na coluna onde a natureza do suporte sólido, o método de empacotamento, o tamanho da coluna e a temperatura são fatores importantes para a resolução desejada. A coluna é colocada em

um forno controlado termostaticamente, de modo a manter a temperatura constante com variação de 0,5°C, garantindo assim condições reprodutíveis. O uso de colunas empacotadas têm diminuído muito nos últimos anos, substituindo-se pelas colunas capilares, que se baseiam na interação entre a mistura e a fase estacionária na forma de um filme fino e coerente depositado na superfície interna de um tubo longo e fino (capilar).

O detector - A função do detector, situado na saída da coluna, é registrar e medir as pequenas quantidades dos componentes da mistura separados na coluna e levados pelo fluxo de gás de arraste. O sinal de saída do detector alimenta um dispositivo que produz um gráfico denominado cromatograma; o detector de ionização de chama (DIC), utilizado em nossa análise, baseia-se na queima do ar efluente da coluna, misturado com hidrogênio, com produção de uma chama de energia suficiente para ionizar as moléculas de soluto cujos potenciais de ionização são baixos, e estes íons produzidos são coletados por eletrodos e a corrente iônica produzida é então medida. O jato do queimador é o eletrodo negativo. O anodo é usualmente um filamento que atinge a extremidade da chama. A combustão de misturas de hidrogênio e ar produz poucos íons e assim, só quando o gás de arraste e o hidrogênio se queimam, obtém-se um sinal praticamente constante. Na presença de compostos que contém carbono, ocorre ionização e a condutividade elétrica da chama aumenta fortemente. A amostra é destruída na chama, assim se usa um dispositivo para dividir o fluxo de efluente quando se deseja continuar a análise da amostra. O divisor de fluxo é colocado entre a coluna e o detector e permite que a maior parte da amostra evite o detector. O detector DIC tem grande aplicabilidade no uso de detecção de compostos orgânicos, além disso, o fato de ser altamente sensível e estável, ter resposta rápida e uma faixa de resposta linear faz com que este tipo de detector seja o mais popular em uso.

O sistema CG/EM

Os sistemas em que são acoplados um Cromatógrafo Gasoso a um Espectrômetro de Massas permitem a redução do tempo necessário para a identificação dos componentes de um cromatograma de íons totais (TIC) através da detecção seletiva de massa, havendo a busca automática em biblioteca de referência de espectros de massa (“espectroteca”) – Figura 12. Os espectros de massas obtidos de uma mistura complexa sofrem a contribuição de componentes vizinhos não resolvidos durante a separação, por sangramento da coluna ou contaminação dos septos. Caracterizar e remover estas contribuições de íons não claros, que dificultam a análise visual e comparativa dos espectros adquiridos de espectrotecas é o papel

COSTA, A. G. L.C.- Estudo químico de *Baccharis dracunculifolia* DC. e sua correlação com a própolis de uma microrregião dos Campos Gerais do Paraná.

essencial da deconvolução (Figura 13), onde o espectro de massas é obtido a partir de modelo de forma, seguido um método de mínimos quadrados.

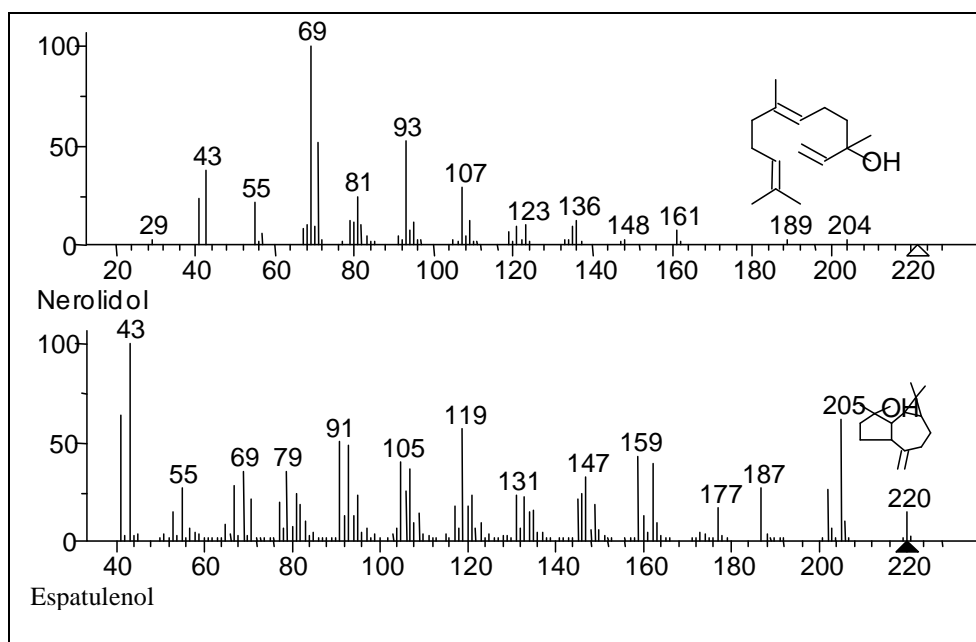


Figura 12 - Espectros de Massa dos principais constituintes do óleo essencial de *B. dracunculifolia* obtidos da espectroteca NIST do sistema CG-EM.

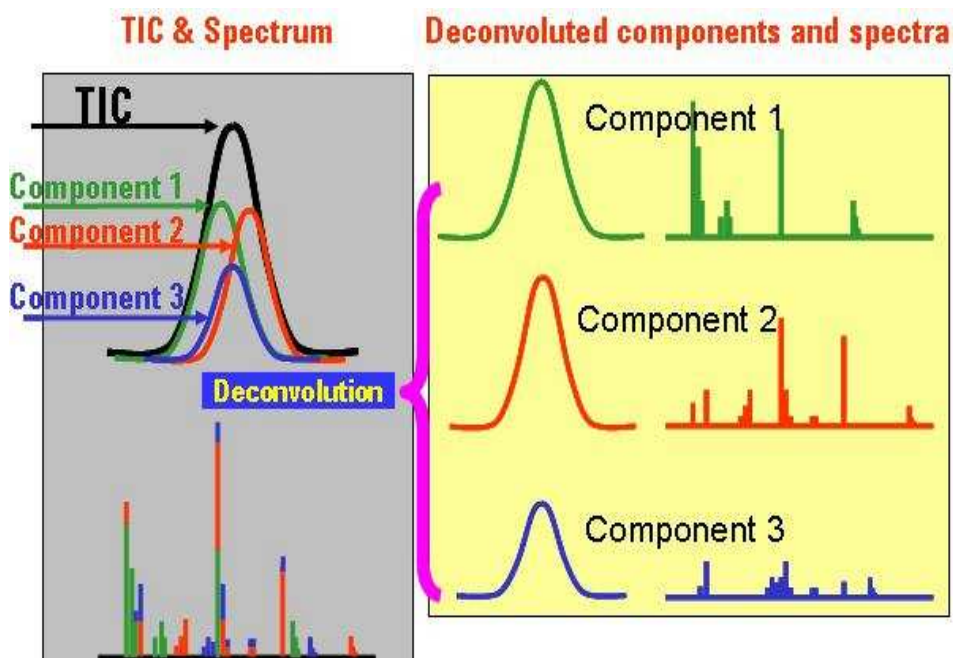


Figura 13 - Gráfico simplificado mostrando como pode ser explicada a deconvolução.

Fonte: Deconvolução (2009)

1.6.2 A cromatografia líquida de alta eficiência

É um processo de separação de substâncias por adsorção; baseia-se em interações diferenciadas entre os diversos solutos e sítios ativos fixos em um adsorvente sólido finamente dividido (Figura 16).

Fase móvel – Uma separação cromatográfica efetiva depende de diferenças na interação entre os solutos e as fases móvel e estacionária. Os solventes utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência são geralmente muito caros. Para garantir a repetitividade do desempenho, as impurezas dos solventes, inclusive a água, no caso de solventes orgânicos devem estar ao nível de traços. Estes reagentes para uso em CLAE podem ser comprados sem que seja necessária uma purificação, porém, é sempre necessário eliminar os gases imediatamente antes do uso. A fase móvel é vital em CLAE e por isso, vale a pena examinar os fatores que determinam sua escolha. O poder de eluição da fase móvel é determinado por sua polaridade, pela polaridade da fase estacionária e pela natureza dos componentes da amostra. No caso de separação com fase normal, o poder de eluição aumenta com o aumento da polaridade do solvente. Nas separações com fase reversa, o poder de eluição diminui com o aumento da polaridade do solvente. A cromatografia com fase reversa é muito popular, em parte, por causa do tipo de material no qual se usa a cromatografia com fase líquida, mas também porque existem vantagens no uso de fases móveis polares como água e metanol. Em comparação com as fases apolares, as fases polares são mais baratas e a purificação é mais fácil. Além disso, elas são menos afetadas por pequenas quantidades de impurezas e são menos tóxicas. Solventes especialmente purificados para CLAE, livres de impurezas que absorvem no ultravioleta e de partículas sólidas estão disponíveis comercialmente. É importante remover também o ar dissolvido e eventuais bolhas de ar na coluna, que são uma das causas de problemas na bomba e no detector durante o uso. Para evitar estes problemas pode-se degaseificar a fase móvel antes do uso, colocando a fase móvel em vácuo ou aquecendo sob ultra-som. Não existem regras fixas para escolher a melhor fase para uma dada separação, a não ser “o semelhante separa o semelhante”.

Método isocrático e de gradiente - A operação pelo método isocrático é mais simples do que os métodos em gradiente. No método isocrático é possível escolher uma mistura de solventes para ser usada durante todo o experimento. O uso de gradientes na eluição permite freqüentemente a separação de solutos que não podem ser separados por uma operação isocrática, mesmo com solventes mistos. Ela é especialmente eficiente quando os

componentes da amostra diferem muito em polaridade. Muitos cromatógrafos comerciais possuem sistema de manuseio de líquidos que podem misturar dois ou mais solventes em proporções crescentes de 0 a 100% de um dos componentes, gerando um perfil de composição em relação ao tempo.



Figura 14 - Cromatógrafo Shimadzu ODS-A utilizado para CLAE.
(Foto de A. G. L. Cardozo, 2007)

Introdução do solvente – Há certa variedade de sistemas usados em CLAE, onde o mais popular é a bomba de controle alternado, que manipula volumes pequenos, tem fluxo constante e pode fornecer taxas controladas de fluxo da ordem de 1 a 15 mL/min contra uma coluna que exerce pressões de até 7.250 psi (50 MPa).

Injeção da amostra - A introdução da amostra é geralmente feita de duas maneiras por injeção com seringa ou com válvula de amostragem. Os septos de injeção permitem a introdução da amostra com uma seringa de alta pressão que atravessa um septo auto-selante feito com um elastômero. Os dispositivos mais utilizados atualmente em instrumentos comerciais são as válvulas de amostragem de pequeno volume que permitem a introdução da amostra, de forma reprodutiva, em colunas pressurizadas, sem interrupção significativa do fluxo da fase móvel. A amostra é colocada, na pressão atmosférica, no lado externo da válvula e introduzida na corrente de fase móvel pela rotação apropriada da válvula. O volume de amostra pode variar entre 2 μ L e mais de 100 μ L simplesmente com a mudança da válvula ou com válvulas especiais de volume variável. Podem ser usados injetores automáticos de amostra que permitem a operação desassistida do instrumento (durante a

noite, por exemplo). A válvula de injeção é preferida para o trabalho quantitativo devido sua maior precisão com relação à injeção com seringa.

A coluna – Feitas de tubos de aço inoxidável de diâmetro interno controlado, com dimensões entre 10 e 30 cm de comprimento e 4 a 5 mm de diâmetro interno. A fase estacionária, ou empacotamento, é retida por filtros de aço inoxidável com poros de 2 µm ou menos, colocados em cada extremidade. Os empacotamentos usados em quase todas as colunas comercialmente importantes são feitos de partículas porosas de sílica (diâmetro < 10 µm). Pode-se ligar quimicamente a fase estacionária a um material de suporte. Esta forma em que fases monoméricas e poliméricas se ligam a materiais de suporte é chamada cromatografia com fase ligada, onde as reações de silanização são muito usadas (Figura 15). Os grupos silanol da superfície da sílica reagem com cloro-silanos substituídos. Um exemplo típico é a reação da sílica com cloro-metil-silano que produz uma fase monomérica ligada na qual cada molécula do agente de silanização reage com um grupo silanol.

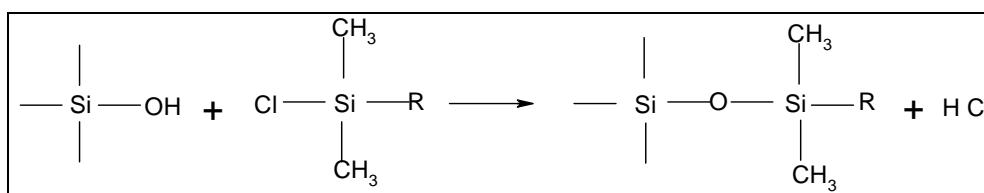


Figura 15 – Reação da sílica com o cloro-metil-silano, na preparação de colunas cromatográficas.

Em colunas analíticas de CLAE o grupo mais importante é do tipo apolar C18 em que o grupo “R” é octadecila. Esta coluna C18 permite a separação de misturas moderadamente polares e é muito usada na análise de produtos farmacêuticos, drogas e pesticidas.

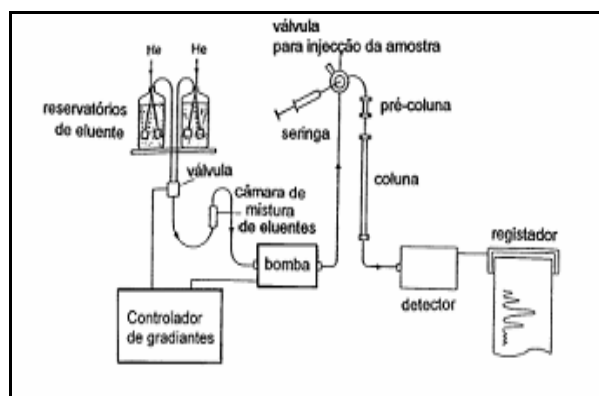


Figura 16 - Representação esquemática de um cromatógrafo líquido para CLAE.
Fonte: Cromatógrafo Líquido para HPLC (2009)

O detector - O detector de CLAE mais utilizado é o de absorção no ultravioleta medindo a quantidade de luz UV/visível absorvida durante a passagem do efluente por uma

pequena célula de fluxo colocada no caminho ótico do feixe de radiação. Possuem alta sensibilidade e por medirem propriedades do soluto, são relativamente insensíveis a variação de temperatura e da velocidade de fluxo do efluente. É apropriado para experimentos em gradiente de eluição porque muitos dos solventes usados em CLAE não absorvem apreciavelmente nos comprimentos de onda usados para monitorar o efluente.

1.7 Avaliação do potencial antioxidante

Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo ataque sobre os lipídios, os aminoácidos das proteínas a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA evitando formação de lesões e a perda da integridade celular (BIANCHI, ANTUNES; 1999). As pesquisas têm se intensificado a procura de produtos que controlem ou acabem com a formação destes radicais, visando à prevenção do envelhecimento celular e conseqüentemente as doenças relacionadas.

Considerando que a própolis é importante fonte de substâncias farmacologicamente ativas, o seu efeito antioxidante, seqüestrador de radicais livres também já está comprovado. A atividade de dois extratos de própolis (etanólico e etéreo) foi determinada pelo método de seqüestro de radicais livres utilizando o DPPH e tiocianato de ferro comparando com 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol (BHT) e α -tocoferol, mostrando que a própolis contém uma alta concentração de substâncias com capacidade antioxidante. Os extratos etanólicos tiveram maior atividade que aqueles obtidos com éter de petróleo na mesma concentração, mas, aumentando-se a concentração do extrato etéreo, pode-se comparar efeitos semelhantes ao extrato etanólico, mostrando que a atividade deste extrato é dose-dependente (SHENG et al., 2007).

Outro trabalho importante avaliando 49 amostras de própolis do Brasil (diferentes estados) mostra que os resultados de maior atividade antioxidante estão diretamente relacionados com a maior concentração de compostos fenólicos. Este fato é conseqüência das diferentes composições químicas encontradas em extratos de própolis, que depende das variáveis biogeográficas (flora local, clima e efeitos sazonais) (SILVA et al., 2006). Recentemente, a síntese de compostos análogos a artepilina C, mereceu especial atenção, principalmente pela sua atividade antioxidante (PISCO et al., 2006).

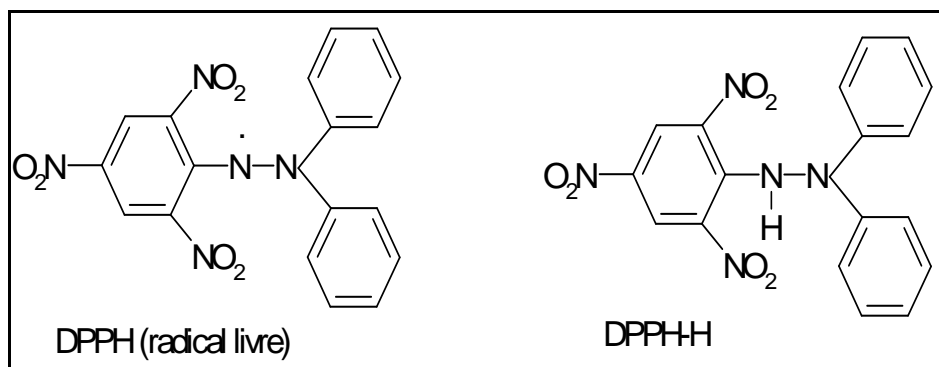


Figura 17 - 2,2-difenil-1-picrilidrazil como radical livre e como molécula estável DPPH-H.

O teste utilizando o radical estável DPPH (Figura 17) mede a capacidade das substâncias em doar hidrogênio radicalar a este radical, assim, quanto maior o número de hidroxilas presentes na amostra, maior pode ser a sua atividade antioxidante. Mas além da hidroxila, a saída de outros tipos de hidrogênio pode levar a formação de radicais muito estáveis, como ocorre nos grupos prenila presentes na artemelina C. A estabilidade dos radicais formados pelo antioxidante é o fator que influencia sobre o potencial, sendo maior nas substâncias com maior capacidade de deslocalizar os elétrons na estrutura (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo, então os radicais livres são produzidos naturalmente, por alguma disfunção biológica, em processos inflamatórios ou provenientes de alimentos.

A produção de radicais livres no organismo está relacionada com fatores endógenos como: respiração aeróbica, inflamações, peroxissomos, enzimas do citocromo P450; e com fatores exógenos como: ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro e outros (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres. Os radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados ERO (espécie reativa de oxigênio) ou ERN (espécie reativa de nitrogênio) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO[•]), superóxido (O₂^{•-}), peroxila (ROO[•]) e alcoxila (RO[•]); e os não radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO[•]), óxido nitroso (N₂O₃), ácido nitroso (HNO₂), nitritos (NO₂⁻), nitratos (NO₃⁻) e peroxinitritos (ONOO⁻). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando

lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios. Existem ainda alguns que são pouco reativos, mas apesar disso podem gerar espécies danosas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curta e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com seu sítio de formação.

De acordo com Halliwell (1994) “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. Os compostos fenólicos podem ser considerados assim e englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização. Estão presentes na natureza na forma livre ou ligados a açúcares ou a proteínas. Dois grandes grupos destes compostos estão largamente distribuídos na natureza: os flavonóides, os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (SOARES, 2002).

Há duas possibilidades no mecanismo de transferência de hidrogênio de compostos fenólicos para espécies radicalares: no primeiro caso ocorre em uma etapa onde há transferência do átomo de hidrogênio e no segundo caso ocorre transferência do elétron seguido pela transferência do próton. Há relatos de que a transferência de hidrogênio da (+)-catequina (flavonóide), um dos mais poderosos antioxidantes naturais, para o radical cumilperoxil procede via transferência de elétron da (+)-catequina para o radical cumilperoxil, a qual é acelerada pela presença do íon escândio (Sc^{3+}) (Figura 18).

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo, formando produtos intermediários relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos indica que as formas isoméricas reunidas do ácido dicafeioquínico são mais eficazes na inibição da peroxidação induzida de microsomas do que os ácidos caféico e clorogênico separadamente, os quais também apresentaram elevado potencial antioxidante (SOARES, 2002).

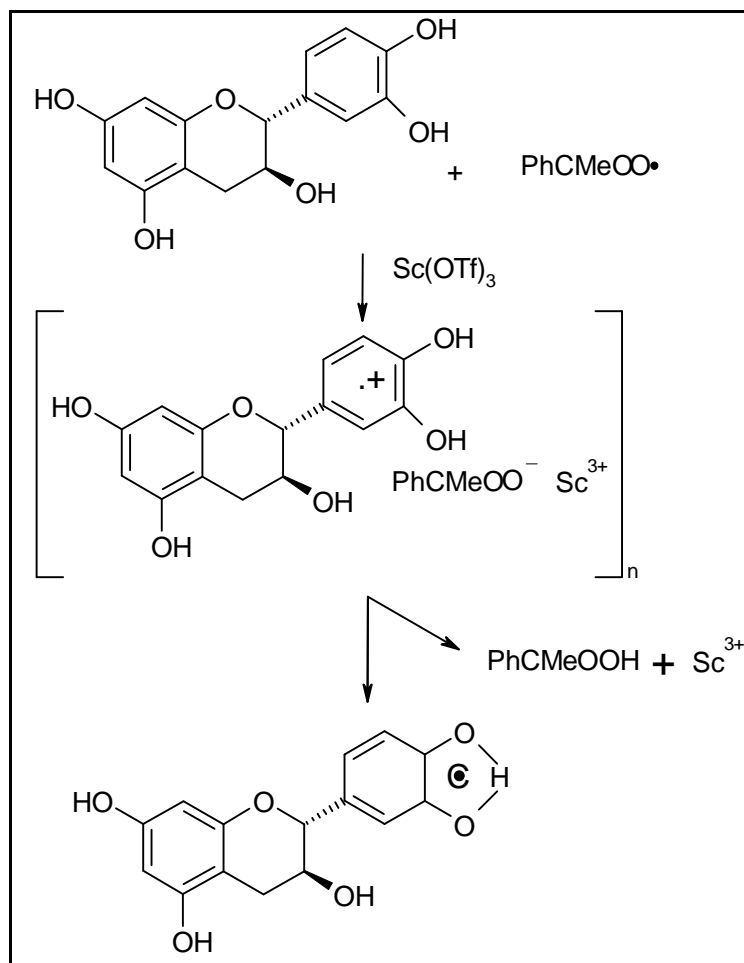


Figura 18 - Mecanismo de transferência de hidrogênio da (+) - catequina para o radical cumilperoxil via transferência de elétrons. Fonte: Nakanishi et al. (2003).

O estudo de espécies do gênero *Baccharis*, tem mostrado avanço no que diz respeito ao seu uso na medicina caseira na América Latina. Em sua fitoquímica se destaca a ocorrência de compostos fenólicos como flavonóides e ácidos fenólicos (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Também ocorrem estes mesmos compostos em própolis de diferentes localizações geográficas (GARDANA et al., 2007).

Foram muitos os artigos que relacionaram diretamente a própolis da região sudeste com a planta *B. dracunculifolia*, desde que Banskota et al. (1998) publicaram sobre um derivado diacilado do álcool dihidrodiconiferil encontrado em própolis e um importante intermediário na formação de lignina da madeira, que já havia sido previamente encontrado em *Baccharis spp.*

Park, Ikegaki e Alencar (2000) classificaram as própolis de diversas regiões do Brasil (Tabela 2) e outros trabalhos relacionaram a própolis do Grupo 12 (PG12) com sua

COSTA, A. G. L.C.- Estudo químico de *Baccharis dracunculifolia* DC. e sua correlação com a própolis de uma microrregião dos Campos Gerais do Paraná.

fonte botânica *B. dracunculifolia* (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; KUMAZAWA et al., 2003).

Tabela 2 - Classificação das própolis brasileiras.

Grupos	Extrato Etanólico de Própolis		Origem da própolis
	Cor	Substâncias Solúveis (%)	
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	57,5	"
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	65,0	"
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	54,5	"
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	58,7	"
Grupo 6 (BA11)	Marrom avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	43,8	"
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	41,3	"
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	"
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	24,1	"
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	23,1	"
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom esverdeado	61,0	Região Sudeste

Fonte: Park; Ikegaki e Alencar (2000)

A classificação adotada por estes pesquisadores tem sido utilizada desde então e a própolis do Grupo 12, que está relacionada a diversas propriedades biológicas tem alto valor comercial.

A composição da própolis depende de sua fonte botânica. A variabilidade na composição dos metabólitos secundários depende tanto de causas internas quanto externas à planta, mormente em espécies vegetais crescendo livremente na natureza. Assim, para o estudo de própolis novas, é altamente recomendável a realização de pesquisas fitoquímicas concomitantes das plantas relacionadas.

Dentro de um projeto de pesquisas mais amplo sobre a química de espécies do gênero *Baccharis*, no qual foram estudadas anteriormente *B. uncinella* e *B. semiserrata*, dá-se atenção agora à *B. dracunculifolia*, tendo em vista a sua relação com a própolis e também a importância comercial de seu óleo essencial.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar quimicamente amostras de própolis e parte aérea de *Baccharis dracunculifolia* DC. da região de Ponta Grossa - PR, comparando com extratos de outras espécies do gênero *Baccharis*, visando classificar a própolis regional em comparação com a própolis verde padrão.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a composição química do óleo essencial das folhas de espécimes masculino e feminino de *Baccharis dracunculifolia* DC. por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, como forma de caracterização química do vegetal que cresce *in natura* em nossa região.

Comparar a composição química de extratos obtidos com diferentes solventes a partir das folhas das três espécies vegetais (*B. dracunculifolia*, *B. uncinella* e *B. semiserrata*), utilizando métodos cromatográficos, especialmente a CLAE e espectrofotometria.

Verificar as correlações químicas existentes entre as três espécies vegetais, especialmente *B. dracunculifolia*, e amostras da própolis produzidas na Região dos Campos Gerais do Paraná.

Mensurar o potencial antioxidante de extratos obtidos de vegetais e de própolis, como mais um parâmetro de comparação com a própolis verde padrão e como indicativo da importância da composição de extratos e de substâncias individuais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes analíticos

Foram utilizados solventes e reagentes com especificação PA ou de outros graus de pureza conforme a necessidade. Para a análise química de antioxidação foi utilizado o radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH, D9132-5G, Sigma Co). Os seguintes padrões analíticos de ácidos fenólicos e flavonóides foram utilizados nas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou por Cromatografia de Camada Delgada (CCD): ácido *para*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido gálico, quercetina, canferol, canferide, apigenina, isosakuranetina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina e miricetina (Extrasynthese Co.).

3.2 Equipamentos

As análises de óleos essenciais foram feitas em Cromatógrafo Gasoso da marca Varian® CP-3800 acoplado a um detector de ionização de chama (DIC) ou de massas (EM) da marca Saturn® 2000, utilizando o software de gerenciamento Saturn® GC-MS Workstation 5.51, numa cooperação informal entre pesquisadores do nosso laboratório de pesquisas e do IPT-FURB, Instituto de Pesquisas Tecnológicas da Fundação Universidade Regional de Blumenau, Blumenau - SC.

As análises de compostos fenólicos sólidos foram feitas por CLAE em cromatógrafo Shimadzu ODS-A com detector de arranjo fotodiodo (SPD-M10AVp, Shimadzu Co.). As análises de varredura espectral foram realizadas em equipamento UV Mini 1240 da Shimadzu em comprimento de onda entre 200-600 nm. Ambos os tipos de análise foram feitas no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo, Piracicaba - SP.

Um espectrofotômetro Multispec – 1501 Shimadzu foi utilizado para as análises de DPPH, com 518 nm de comprimento de onda. Acoplado ao MS-Windows® para coleta de dados e detector de fotodiodos com 512 elementos de precisão espectral de 0,1nm.

3.3 Coleta de própolis e materiais botânicos

O material botânico utilizado neste trabalho, composto por folhas e galhos, foi coletado na periferia da cidade de Ponta Grossa, Paraná, num terreno situado nas coordenadas 25°05'16" SUL e 50°06'22" OESTE, conforme especificado na Tabela 3.

Foram preparadas exsiccatas dos espécimes masculino e feminino utilizando um ramo contendo folhas e flores, seguindo indicações da literatura (FIDALGO; BONONI, 1989). As amostras foram identificadas como *Baccharis dracunculifolia* DC. pelo Dr. Gert Atschbach e depositadas no Herbário do Museu Botânico de Curitiba sob os números 338991 (espécime masculino, Bd ♂); 338982 (espécime feminino, Bd ♀).

Tabela 3 - Coletas de materiais botânicos

AMOSTRAS	Parte e quantidade coletada	Data da coleta	Finalidade
Bd ♂	~1 Kg de folhas	Agosto de 2006	OE e extração c/ solventes
Bd ♀	~1 Kg de folhas	Agosto de 2006	OE e extração c/ solventes
Bd ♂	20 g de brotos apicais	Julho de 2007	Extração por enxágüe
Bd ♀	20 g de brotos apicais	Julho de 2007	Extração por enxágüe

O material vegetal coletado em maior quantidade, constituído por galhos, passou por um processo de limpeza, eliminando-se matérias estranhas ou partes atacadas por insetos. Efetuou-se a secagem em temperatura ambiente por sete dias, separando-se as folhas cuidadosamente para armazenamento em recipientes herméticos, na temperatura ambiente e ao abrigo da luz até o momento de sua utilização (Item 4.5). Os brotos apicais foram utilizados logo após a coleta (Item 4.6). Treze amostras de própolis foram obtidas de apicultores locais (Tabela 4) e conservadas a frio até o momento das extrações (Item 4.6). A amostra de própolis verde (PG12), utilizada como padrão de comparação neste trabalho, foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Severino Matias de Alencar, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ).

Tabela 4 - Produtores da região e amostras de própolis

Produtor	Número de amostras	Código das amostras
ADI	1	ADI
EBS	3	EBS-1; EBS-2; EBS-3
RA	2	RA-1; RA-2
WS	4	WS-1; WS-2; WS-3; WS-4
RS	3	RS-1; RS-2; RS-3

3.4 Obtenção de amostras de óleo essencial

As folhas secas foram moídas em liquidificador, submetendo-se aproximadamente 100 g de material vegetal dos espécimes masculino e feminino à hidrodestilação em aparelho de vidro (Figura 19), conforme Stahl e Schild (1981).

Foi utilizado um balão de 5 L contendo 2 L de água destilada, destilando-se durante 4 horas. O óleo volátil foi obtido em éter dietílico, secando-se a solução com Na_2SO_4 anidro. O solvente foi evaporado na temperatura ambiente, calculando-se o rendimento (0,85% e 0,81% para os espécimes masculino e feminino, respectivamente).

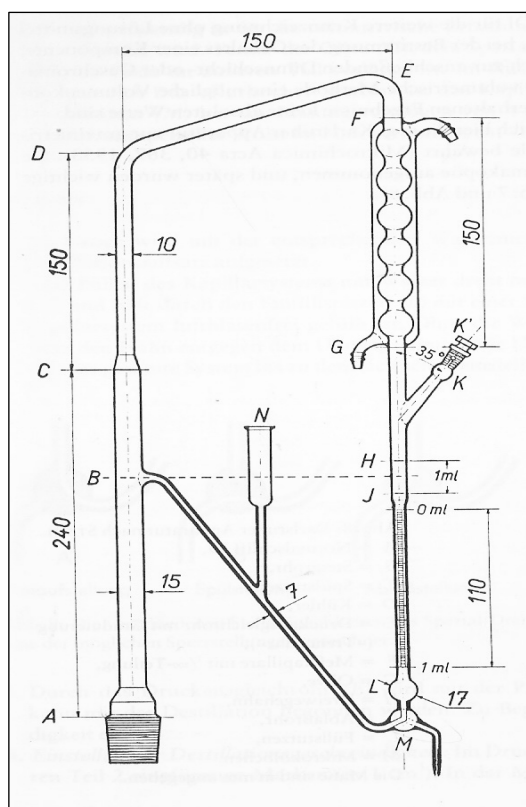


Figura 19 - Desenho e medidas do aparelho de hidrodestilação utilizado. (Stahl; Schild, 1981).

3.5 Obtenção de extratos

3.5.1 Extratos obtidos com uma sequência de solventes

Aproximadamente 20 g de folhas de *B. dracunculifolia* coletadas em 08/2006, após secagem e trituração, foram extraídas exaustivamente em aparelho Soxhlet por 20 horas com cada um dos seguintes solventes: clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt) e

metanol (MeOH). Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo a vácuo (rendimentos na Tabela 5), obtendo-se os espectros de ultravioleta-visível (UV-VIS) e análises por CCD e CLAE.

Foram realizadas diversas análises por CCD sobre placas de sílica HF254 e GF254, utilizando-se sistemas eluentes compostos por AcOEt/MeOH/H₂O ou CHCl₃/MeOH/H₂O em diferentes proporções, fazendo-se comparações entre os extratos metanólicos dos espécimes feminino e masculino de *B. dracunculifolia* com extratos metanólicos de *B. semiserrata* e *B. uncinella*. Após a eluição, os cromatogramas foram visualizados em luz UV nos dois comprimentos de onda e revelados: 1) com solução de H₂SO₄ / metanol (1:1) seguido de aquecimento sobre placa; 2) com solução 5% de FeCl₃ em metanol. Os resultados das placas foram armazenados em arquivos de imagens digitalizadas.

Tabela 5 - Resultado das extrações de *B. dracunculifolia* (Bd ♂ e Bd ♀), *B. uncinella* (Bu) e *B. semiserrata* (Bs)

Espécime/solvente	Folhas (g)	Extrato (g)	Rendimento (%)
Bd ♂-CHCl ₃	9,882	1,1828	11,97
Bd ♂-AcOEt	9,882	0,9712	9,83
Bd ♂-MeOH	9,882	1,1359	11,49
Bd ♀-CHCl ₃	10,0181	1,4784	14,76
Bd ♀-AcOEt	10,0181	1,1293	11,27
Bd ♀-MeOH	10,0181	1,5324	15,39

3.5.2 Extratos obtidos por enxágue

Foram obtidos extratos dos brotos apicais de espécimes masculinos e femininos recém coletados (julho de 2007), utilizando-se a técnica de extração por enxágue. Cerca de 20 g de brotos foram obtidos no local de coleta por corte com tesoura e levados imediatamente ao laboratório, onde foi feita uma limpeza para a retirada de folhas maduras. Com o auxílio de uma pinça, cada broto foi segurado sobre um béquer, procedendo-se então ao enxágue com o auxílio de uma pipeta de Pasteur. Cada broto foi lavado com gotas de metanol por cerca de 2 minutos, trocando o material para novo enxágue até completarem-se 10 mL dos extratos de cada um dos espécimes.

3.5.3 Extratos de própolis

Para a obtenção dos extratos etanólicos de própolis foi utilizada a técnica da maceração. Aproximadamente 2,0 g de própolis e 10,0 mL de etanol a 70% (p/v) ficaram em contato durante 20 dias, ao abrigo da luz, com agitação e posterior filtração, sendo então as soluções etanólicas conservadas em geladeira até o momento das análises. Foram obtidos da mesma forma os extratos das treze amostras de própolis regionais e do padrão de própolis verde (PG12).

3.6 Análises por CG/EM

Tanto na análise por CG-DIC como na CG-EM, foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida apolar CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS (comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,25 mm e filme com espessura de 0,25 μm). O fluxo de hélio, o gás de arraste utilizado, foi de 1,0 mL/min, com a temperatura do injetor mantida em 250 °C e a do detector DIC em 200 °C. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 60 °C, permanecendo por aí 3 minutos, subindo então 5 °C/min até 200 °C e permanecendo na temperatura final por 15 minutos.

O programa AMDIS (Automated Mass Spectra Deconvolution and Identification System) acompanha o sistema CG-EM e permite fazer a deconvolução do arquivo de dados digital obtido para cada amostra injetada no equipamento. A deconvolução leva ao cromatograma TIC (Total Ion Chromatogram), que é obtido a partir do total de fragmentos iônicos de cada substância da amostra que atinge o detector EM. A identificação de cada componente no cromatograma TIC é realizada inicialmente pelo cálculo do seu índice de retenção de Kovàts (IK) (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963), determinado em relação à série homóloga de n-alcenos (C_9 – C_{26}) e comparado com dados publicados (ADAMS, 1995). Em seguida, o espectro de massas da substância em questão é comparado pelo AMDIS com os espectros fornecidos pela biblioteca do sistema NIST, listando-se em ordem decrescente de similaridade as substâncias que apresentam espectros de massas similares, entre as quais normalmente é encontrada aquela que tem também um idêntico valor de IK.

A quantificação das substâncias voláteis de cada amostra foi feita com base em seu cromatograma obtido com uso do detector DIC, transformando-se em porcentagens as áreas sob os picos. Os cálculos dos IK foram feitos de forma semelhante ao explicado acima, a

partir de nova injeção da amostra de óleo essencial e dos padrões de n-alcenos, comparando-se com os dados obtidos anteriormente com uso do TIC.

$$IK_x = 100y + 100(z-y) \frac{t_{(r)x} - t_{(r)y}}{t_{(r)z} - t_{(r)y}}$$

Onde:

y = n^o de carbonos do padrão de n-alceno à esquerda do componente x;

z = n^o de carbonos do padrão de n-alceno à direita do componente x;

t_{(r)x} = tempo de retenção do pico da substância em questão;

t_{(r)y} = tempo de retenção do padrão de n-alceno à esquerda;

t_{(r)z} = tempo de retenção do padrão de n-alceno à direita.

3.7 Análises por espectrofotometria UV-VIS

Todos os extratos obtidos no Item 3.5 foram submetidos à análise do perfil de varredura espectrofotométrica na faixa de comprimento de onda entre 200 nm e 600 nm, utilizando-se metanol como solvente. Os resultados destas análises estão apresentados e discutidos no item 4.3.

3.8 Análises por CCD-AR

Estas análises foram realizadas com os extratos etanólicos das própolis regionais e PG12, extratos obtidos por enxágüe dos brotos de *B. dracunculifolia* feminino (Bd ♀-brotos) e *B. dracunculifolia* masculino (Bd ♂-brotos) (Item 3.5.2 e 3.5.3). Foram utilizadas placas de sílica RP-18 F254, 10x10 da MERCK e a mistura EtOH:H₂O na proporção de 45:55 como eluente. A quantidade de amostra aplicada em cada ponto foi de 3 µL. Após a eluição, as placas foram borrifadas com anisaldeído sulfúrico (0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico) e observadas sob luz UV nos dois comprimentos de onda usuais (254 e 366 nm).

3.9 Análises por CLAE

Foram injetados 15 µL dos extratos das amostras de própolis selecionadas (PG12, WS-3, ADI e RS-2), comparando-se com os extratos de Bd ♀-brotos e Bd ♂-brotos (20 µL).

COSTA, A. G. L.C.- Estudo químico de *Baccharis dracunculifolia* DC. e sua correlação com a própolis de uma microrregião dos Campos Gerais do Paraná.

Também foram analisados por CLAE nas mesmas condições os extratos metanólicos de *B. dracunculifolia* (espécimes masculino e feminino), *B. uncinella* e *B. semiserrata* obtidos com a seqüência de solventes clorofórmio, acetato de etila e metanol.

Os extratos foram filtrados com um filtro de 0,22 µm (Millipore) e injetados no sistema CLAE. A coluna RP-18 (4,6 mm × 250 mm; partículas de 5 µm) foi eluída usando-se um gradiente linear de ácido acético:água (1:20) (solvente A) e metanol (solvente B), iniciando com 30% de B e aumentando até 90% de B, com vazão de solvente de 1 mL/min. Os cromatogramas foram registrados a 260 nm como descrito por Park et al. (1997).

3.10 Análises da atividade antioxidante

A atividade antioxidante das amostras de própolis e de brotos de *B. dracunculifolia* (itens 4.5.2 e 4.5.3) foi medida frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH·) utilizando análise espectrofotométrica em UV/VIS, segundo o método utilizado por Castro e colaboradores (2006). Uma alíquota de cada amostra (20 µL, 30 µL, 60 µL e 120 µL) foi adicionada a 2.700 µL de solução de DPPH· 0,5 µM preparada em etanol absoluto PA para medir a possível atividade redutora em presença do DPPH·.

A cinética de descoloração do DPPH· frente às amostras foi registrada durante 5 minutos em 517 nm. Este experimento foi realizado em triplicata e a porcentagem de atividade seqüestrante foi calculada a partir da fórmula:

$$\frac{[(A_o - A_e)]}{A_o} * 100$$

onde A_o = absorbância sem adição de extrato
 A_e = absorbância com adição de extrato.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise dos óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia*

A composição química do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* (Óleo de Vassoura) tem sido objeto de estudo há muitos anos (FERRACINI et al., 1995; FRIZZO et al., 2008; LOAYZA et al., 1995; QUEIROGA et al., 1990). O valor dado a este óleo pela indústria de perfumes se deve ao seu aroma exótico, que depende da sua composição, origem geográfica e processo de extração. A importância comercial está relacionada à fração oxigenada, especificamente a proporções mais elevadas de (*E*)-nerolidol (**1**) e espatulenol (**2**) (CASSEL et al., 2000).

O presente estudo de *B. dracunculifolia* seguiu uma metodologia desenhada para minimizar os fatores considerados responsáveis por variações na composição química de óleos essenciais. Além dos cuidados práticos considerados importantes no trabalho de obtenção e análise de qualquer amostra de óleo essencial (AGOSTINI et al., 2005; CASSEL et al., 2000; FRIZZO et al., 2008; MARCHESAN et al., 2006), foram adotados aqui vários cuidados especialmente recomendáveis para o estudo dos componentes voláteis de espécies *Baccharis*, com base nos problemas enfrentados em vários estudos encontrados na literatura.

Já que estas plantas são dióicas, a coleta de espécimes masculinos e femininos no mesmo local e horário elimina diversas variáveis importantes associadas a fatores ecológicos como a quantidade de luz e de água disponíveis. Os materiais vegetais utilizados neste trabalho foram exclusivamente folhas, eliminando-se totalmente os galhos finos ou inflorescências, se presentes, e simplificando a comparação entre amostras.

Foi escolhida uma população de plantas com muitos espécimes masculinos e femininos, crescendo em uma propriedade privada próxima ao Campus, há cerca de 10 quilômetros da Fazenda Escola da UEPG, onde se situa a estação meteorológica que forneceu os dados sobre precipitação pluviométrica utilizados neste trabalho. Uma forte florada foi observada no início de 2006, quando diversos espécimes masculinos e femininos foram marcados com etiquetas de plástico, para permitir que a coleta de material identificado pudesse ser feita em agosto, ao final da época de estiagem. O material vegetal foi propositalmente coletado ao final do período mais seco, e ao final de uma tarde de sol, para uma melhor avaliação da influência da disponibilidade de água sobre o rendimento e a composição química dos óleos essenciais.

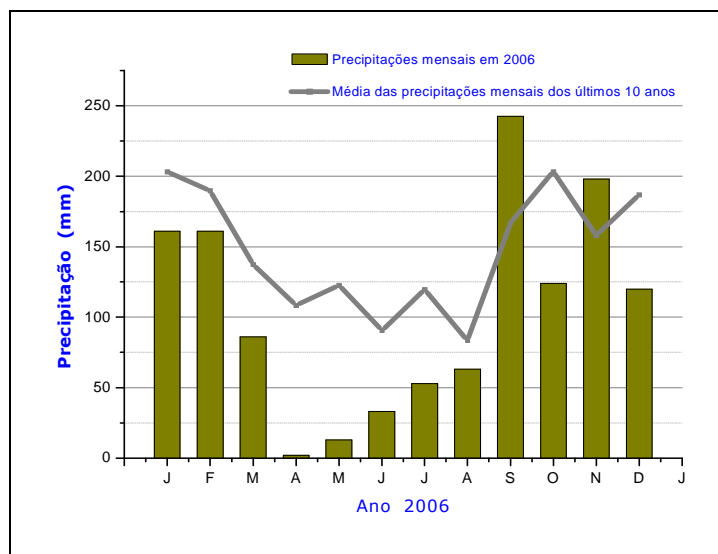


Figura 20 - Médias de precipitação mensal dos últimos 10 anos e precipitações mensais medidas durante 2006 próximo ao local onde foram feitas as coletas. Dados fornecidos pela Estação Meteorológica da Fazenda Escola, UEPG.

O ano de 2006 foi especialmente seco, com precipitação total de 1.257 mm, bem abaixo dos 1.644 mm, que é a média anual calculada para os últimos dez anos. A Figura 20 mostra que as precipitações mensais registradas para aquele ano estiveram quase sempre abaixo das médias mensais dos últimos dez anos e a estação seca, entre abril e agosto, foi drasticamente mais seca do que a média. O material vegetal utilizado neste estudo dos óleos essenciais de *B. dracunculifolia* foi coletado no dia 8 de agosto de 2006, após 10 dias de ausência de chuvas na região.

O resultado das análises da composição dos óleos essenciais das folhas de espécimes feminino e masculino de *B. dracunculifolia*, feitas por técnicas de Cromatografia Gasosa e Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas, são mostrados resumidamente na Tabela 6, onde são apresentadas também as porcentagens dos constituintes e seus Índices de Kovàts calculados para a coluna apolar utilizada (item 3.6.1).

As composições dos óleos essenciais obtidos de espécimes feminino e masculino se mostram semelhantes, com 24 componentes identificados, representando 97,73 e 97,60% dos totais, respectivamente. Os monoterpenos perfazem apenas 0,85% da composição do óleo da planta feminina e 2,35% do óleo da planta masculina, com β -pineno, limoneno e 4-terpineol como componentes identificados. Os sesquiterpenos hidrocarbonetos totalizaram (♀ 45,06 – ♂ 37,84%) destacando-se as presenças de β -cariofileno (♀ 7,88 – ♂ 8,88%), aromadendreno (♀ 2,93 – ♂ 3,02%), α -humuleno (♀ 4,61 – ♂ 2,18%), γ -muuroleno (♀ 3,48 – ♂ 2,33%), germacreno D (♀ 5,53 – ♂ 4,04%), *trans*- β -guaiano (♀ 7,98 – ♂ 6,06%), δ -cadineno (♀ 7,34 – ♂ 5,48%). Os sesquiterpenos oxigenados constituem as frações

majoritárias dos óleos essenciais de ambos os espécimes (♀ 48,88 – ♂ 49,51%), apresentando (*E*)-nerolidol (♀ 24,69 – ♂ 17,16%) e espatulenol (♀ 14,62 – ♂ 21,39%) como principais componentes, identificando-se ainda outros cinco em porcentagens menores: cariofileno óxido (♀ 1,16 – ♂ 2,07%), viridiflorol (♀ 1,61 – ♂ 0,88%), α -cadinol (♀ 1,90 – ♂ 2,83%), β -bisabolol (♀ 0,84 – ♂ 2,86%) e α -bisabolol (♀ 1,86 – ♂ 0,10%).

A Figura 21 permite que se faça uma comparação visual dos cromatogramas registrados nas análises dos dois óleos utilizando um detector de ionização de chama, pois mostram de imediato as baixas proporções de monoterpenos encontradas em ambas as amostras.

Tabela 6 - Componentes dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação das folhas de espécimes feminino (♀) e masculino (♂) de *B. dracunculifolia*

Componentes	Bd ♀ 0,81%	Bd ♂ 0,85%	IK coluna apolar
β -pineno	0,10	1,58	980
limoneno	0,45	0,43	1032
terpinen-4-ol	0,40	0,34	1178
α -cubebeno	0,65	0,43	1350
α -copaeno	0,67	0,99	1376
β -elemeno	0,93	0,72	1393
α -gurjuneno	0,46	0,63	1410
β -cariofileno	7,88	8,88	1418
aromadendreno	2,93	3,02	1446
α -humuleno	4,61	2,18	1456
γ -muuroleno	3,48	2,33	1478
germacreno D	5,53	4,04	1482
α -muuroleno	0,38	0,58	1493
<i>trans</i> - β -guaieno	7,98	6,06	1500
γ -cadineno	2,22	2,50	1507
δ -cadineno	7,34	5,48	1512
não identificado	1,09	0,75	1541
(<i>E</i>)-nerolidol	24,69	17,16	1565
espatulenol	14,62	21,39	1576
cariofileno oxido	1,16	2,07	1581
viridiflorol	1,61	0,88	1590
não identificado	0,10	0,84	1596
carotol	1,03	1,57	1599
não identificado	2,51	3,76	1625
α -cadinol	1,90	2,83	1649
não identificado	0,10	1,34	1655
β -bisabolol	0,84	2,86	1665
α -bisabolol	1,86	0,10	1677
não identificado	0,10	0,42	1765
Total identificado	97,73 %	97,60 %	
Monoterpenos	0,85 %	2,35 %	
Sesquiterpenos	96,88 %	95,25 %	
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	45,06 %	37,84 %	
Sesquiterpenos oxigenados	48,88 %	49,51 %	

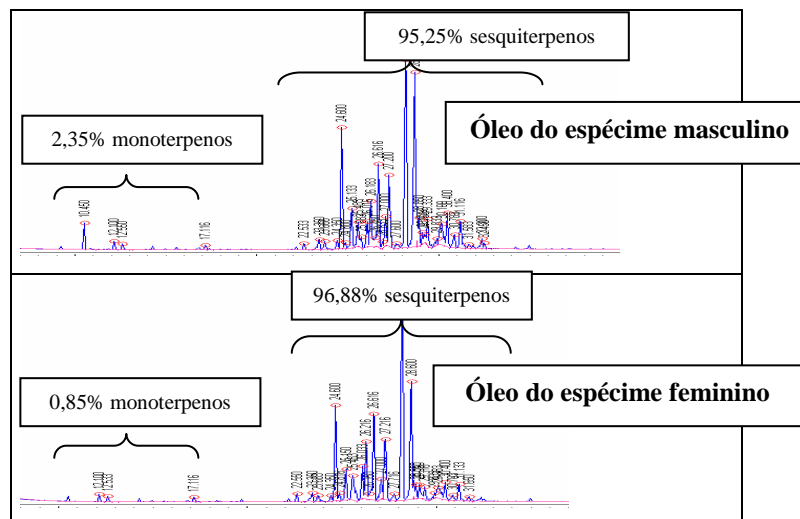


Figura 11 - Comparação entre os cromatogramas obtidos por detecção de ionização de chama para os óleos essenciais de *B. dracunculifolia* analisados no presente trabalho.

Nove amostras de óleos essenciais de *B. dracunculifolia* coletadas no Sul do Brasil (4 amostras), Sudeste do Brasil (1 amostra), Uruguai (3 amostras) e Bolívia (1 amostra), foram apresentadas em uma publicação recente (FRIZZO et al., 2008). Em geral, as diferentes amostras apresentaram índices elevados de monoterpenos, que atingiram 57,2% numa das amostras uruguaias, mas a amostra proveniente do Sudeste (Limeira - SP) tinha apenas 11,5% em monoterpenos, incluindo α -pineno (1,7%), β -pineno (3,5%) e limoneno (5,4%). Esta amostra de Limeira apresentou como principais sesquiterpenos: β -cariofileno (6,5%), germacreno D (3,9%), biciclogermacreno (7,5%), δ -cadineno (5,5%), (*E*)-nerolidol (18,4%) e espatulenol (5,7%), chamando atenção a notável semelhança desta composição com as dos óleos obtidos das folhas coletadas em Ponta Grossa (Tabela 6). É interessante notar também, que os compostos mencionados acima não são os principais componentes encontrados nas demais amostras analisadas por Frizzo et al. (2008), com exceção do espatulenol – presente em todas as amostras, e do (*E*)-nerolidol – ausente nas amostras uruguaias.

Ferracini et al. (1995) analisaram sistematicamente as possíveis causas de variação do conteúdo químico dos óleos essenciais de sete espécies do gênero *Baccharis* coletadas em área de Cerrado, no Estado de São Paulo. Naquele trabalho, pela primeira vez, foram comparadas as composições de voláteis extraídos de espécimes femininos e masculinos de *B. caprariaefolia*, *B. dracunculifolia*, *B. erioclada*. As diferenças encontradas entre os óleos de espécimes masculinos e femininos da mesma espécie vegetal suscitaram a análise experimental de diversas hipóteses. Ao longo dos muitos experimentos de coleta, extração e análise, aqueles autores concluíram que tais diferenças estavam relacionadas à presença de

inflorescências como impureza contida nas folhas destinadas à extração, levando-nos a adotar um estrito controle na separação das folhas para as extrações no presente trabalho. Pode-se considerar que este fator muito contribuiu para a maior similaridade entre os óleos essenciais das folhas dos espécimes masculinos e femininos de *B. dracunculifolia* coletados nos Campos Gerais do Paraná.

Analisando as possíveis causas das diferenças encontradas entre os óleos dos espécimes feminino e masculino de *B. dracunculifolia*, Ferracini et al. (1995) submeteram galhos retirados de uma mesma planta a diferentes condições de irrigação nas 72 horas que precederam cada hidrodestilação. A primeira amostra foi obtida depois de deixar o galho permanecer por 72 horas ao ar; a segunda e a terceira amostras foram obtidas após deixar os galhos com as pontas imersas em água destilada (estresse aquoso) ou em solução aquosa de cloreto de magnésio 10^{-4} M (estresse por $MgCl_2$). Após 72 h nas condições estabelecidas, as folhas de cada amostra foram hidrodestiladas e analisadas por CG. Uma diminuição da razão monoterpenos/sesquiterpenos e um aumento de até 100% no rendimento em óleo foram observados para os materiais vegetais submetidos a estresse por água e por cloreto de magnésio. Outro experimento foi realizado pelos mesmos autores, monitorando os óleos essenciais de uma planta feminina e outra masculina de *B. dracunculifolia* durante a estação chuvosa e a estação seca (Figura 22), observando-se baixos rendimentos em óleo e uma maior razão monoterpenos/sesquiterpenos na estação seca.

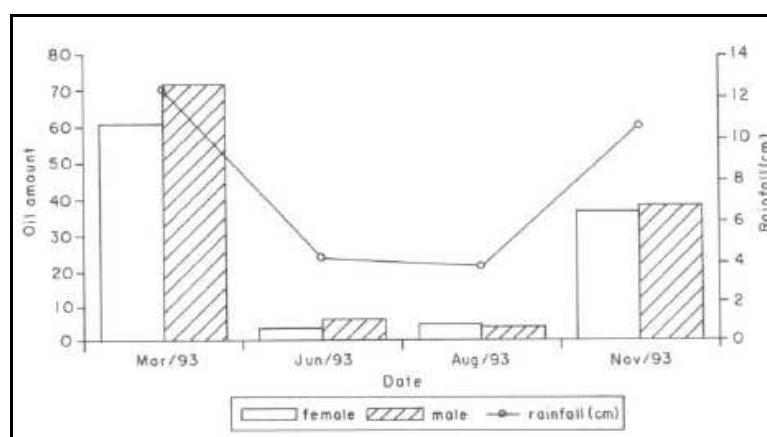


Figura 22 - Variação do rendimento do óleo essencial de espécimes feminino e masculino de *B. dracunculifolia* no decorrer do ano. Fonte: Ferracini et al. (1995).

Os resultados do conjunto de experimentos feitos em Campinas (FERRACINI et al., 1995) são concordantes e complementares entre si. No entanto, observou-se que as duas

amostras do Paraná analisadas no presente trabalho apresentaram também uma baixa razão monoterpenos/sesquiterpenos e um elevado rendimento (0,81 e 0,85%), mesmo tendo sido coletadas em agosto de 2006, ao final da época seca nesta região (vide Figura 20, página 48) e após oito dias de ausência de chuvas. Assim, tudo parece indicar que outros fatores, além da disponibilidade de água para as plantas, estão desempenhando papéis importantes na definição do conteúdo químico dos óleos essenciais.

Os altos rendimentos dos óleos essenciais obtidos de plantas crescendo espontaneamente, as baixas razões monoterpenos/sesquiterpenos e as altas proporções dos sesquiterpenos oxigenados, especialmente (*E*)-nerolidol e espatulenol, são as principais características do óleo das folhas de *B. dracunculifolia* dos Campos Gerais do Paraná, quando coletada em condição de baixa disponibilidade de água. A composição do óleo essencial encontrada aqui reúne propriedades desejáveis sob o ponto de vista comercial (MOTL; TRKA, 1983). Para melhor avaliar os efeitos que a disponibilidade de água tem sobre o metabolismo, seria recomendável o uso de outras técnicas de medida, como as obtidas com a Câmara de Pressão de Scholander (ESPÍRITO-SANTO et al., 2003; SCHOLANDER et al., 1965). Os resultados do presente estudo mostram também que ainda é importante estudar os metabólitos secundários produzidos por esta espécie vegetal crescendo *in natura* nos mais diferentes ambientes.

4.2 Análises comparativas de três espécies *Baccharis*

Dentre as espécies do gênero *Baccharis* que ocorrem na região dos Campos Gerais do Paraná, três delas são conhecidas como “vassouras” e têm estrutura de arbusto: *B. dracunculifolia*, *B. uncinella* e *B. semiserrata*. Em épocas de floração, todas são visitadas por abelhas *Apis mellifera*, sendo possível que seus componentes façam parte do mel e da própolis produzida nesta região (NUNES; SENS; SWITALA, 2001). Plantas deste gênero chamam atenção dos pesquisadores principalmente pela diversidade de metabólitos secundários que podem produzir (AGOSTINI et al., 2005).

Os rendimentos dos extratos das folhas destas três espécies de *Baccharis* obtidos com a seqüência de solventes de polaridade crescente clorofórmio, acetato de etila e metanol, podem ser comparados na Tabela 7. Os extratos das folhas de espécimes feminino (♀) e masculino (♂) de *B. dracunculifolia* foram comparados com extratos similares obtidos em trabalhos de pesquisa anteriores, realizados em nosso próprio laboratório com *B. uncinella* (ASCARI, 2007) e *B. semiserrata* (MENDES, 2007), as quais não haviam sido

diferenciadas, naquele tempo, por identificação dos espécimes masculinos e femininos. Observam-se proporções diferentes de metabólitos secundários extraídos de cada espécie e espécime, com rendimentos totais dos extratos variando de 24,28% até 41,42%.

Tabela 7 - Rendimentos das extrações de folhas de três espécies de *Baccharis* obtidas com a seqüência de solventes

Espécie	CHCl ₃	AcOEt	MeOH	Totais
<i>B. dracunculifolia</i> ♂	11,97 %	9,83 %	11,49 %	33,29%
<i>B. dracunculifolia</i> ♀	14,76 %	11,27 %	15,39 %	41,42%
<i>B. uncinella</i>	15,78%	2,63%	14,02%	32,43%
<i>B. semiserrata</i>	5,77%	8,13 %	10,38 %	24,28%

As amostras de folhas dos espécimes masculino e feminino de *B. dracunculifolia* apresentaram proporções semelhantes nos três extratos, com boa proporção de metabólitos secundários de polaridade média, que aparecem principalmente nos extratos obtidos com acetato de etila. O mesmo não ocorre quando se trata de *B. uncinella*, mostrando que podem ocorrer diferenças significativas entre as espécies.

Todos os extratos obtidos com metanol, último solvente da seqüência, contém quantidades apreciáveis de substâncias fenólicas polares, como mostram claramente as análises por cromatografia de camada delgada. Assim, as placas cromatográficas de sílica dos extratos metanólicos das três espécies de *Baccharis*: *B. dracunculifolia*, *B. uncinella* e *B. semiserrata* foram corridas com sistemas eluentes polares, como AcOEt/MeOH/H₂O na proporção de 7:3:0,5 e reveladas para fenóis com solução 5% de FeCl₃ em metanol ou com H₂SO₄/MeOH (1:1) seguido de aquecimento sobre chapa (Figura 23).

As análises por cromatografia em camada delgada mostraram pelo menos cinco componentes polares com os mesmos R_f, que são encontrados em todos os quatro extratos metanólicos, sendo estas as primeiras observações já feitas sobre a ocorrência de substâncias fenólicas idênticas em *B. dracunculifolia*, *B. semiserrata* e *B. uncinella*. Os extratos das três espécies também foram analisados por CCD com vários sistemas eluentes, em comparação com padrões de ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, ácido gálico e quercetina, mas nenhuma destas substâncias pôde ser detectada em nenhum dos extratos.

Os estudos químicos publicados sobre a composição das folhas de *B. dracunculifolia* (KUMAZAWA et al., 2003; NAGATANI; WARASHINA; NORO, 2001 e 2002), indicam que os principais compostos fenólicos polares aí presentes são quercetina-3-β-O-glucosídeo, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e dracunculifosídeo A. Derivados do

ácido mono-, di-, e tricafeoilquínico já foram também encontrados em própolis provenientes do Brasil (GARDANA et al., 2007) e já foi demonstrada a ocorrência destes compostos na própolis verde (KUMAZAWA et al., 2003).

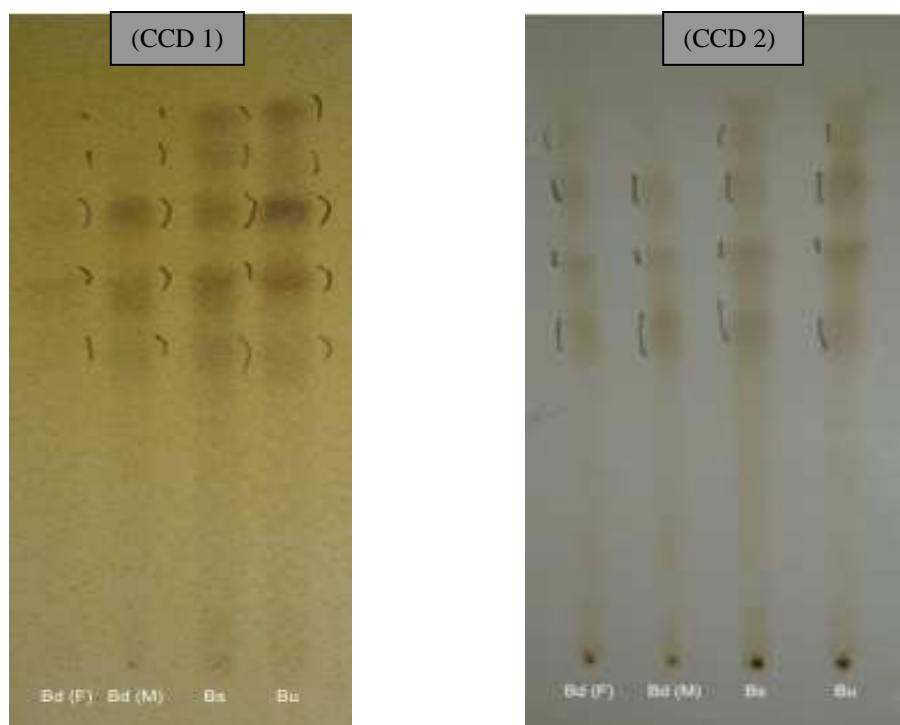


Figura 23 - Análises por CCD dos extratos metanólicos de *B. dracunculifolia* (Bd F e Bd M), *B. semiserrata* (Bs) e *B. uncinella* (Bu) utilizando sistema eluente polar (AcOEt:MeOH:H₂O 7:3:0,5). Revelação: observação sob luz UV de 254 e 360 nm; FeCl₃ (CCD 1); H₂SO₄ e aquecimento (CCD 2).

Os espectros de absorção ultravioleta dos quatro extratos metanólicos apresentaram perfis muito semelhantes: os extratos das folhas dos espécimes feminino e masculino de *B. dracunculifolia* têm máximos de absorção em 323 e 327 nm, respectivamente; *B. uncinella* e *B. semiserrata* em 328 nm (Tabela 8). Estas absorções são características dos mencionados ácidos fenólicos livres e dos ésteres mono-, di- e tricafeoil do ácido quínico (vide Tabela 1).

Tabela 8 – Máximos de absorção dos espectros de UV dos extratos das folhas de *B. dracunculifolia* (♀ e ♂), *B. uncinella* e *B. semiserrata* obtidos com acetato de etila e metanol.

Extrato	UV ($\lambda_{\text{máx}}$)
Bd ♀ MeOH	294 e 323 nm
Bd ♂ MeOH	327 nm
Bu MeOH	328 nm
Bs MeOH	244 e 328 nm
Bd ♀ AcOEt	292 nm
Bd ♂ AcOEt	291 nm
Bu AcOEt	311 nm
Bs AcOEt	320 nm

Nos espectros de ultravioleta dos quatro extratos obtidos com acetato de etila utilizando a seqüência de solventes iniciada com clorofórmio, observa-se que há diferenças significativas. Os dois extratos AcOEt de *B. dracunculifolia* têm máximos em torno de 290 nm, que equivalem aos de alguns flavonóides como pinobancsina, pinocembrina. Uma absorção máxima em 294 nm também foi encontrada no espectro do extrato metanólico do espécime feminino de *B. dracunculifolia*. Por outro lado, os extratos de *B. semiserrata* e *B. uncinella* obtidos com acetato de etila apresentam máximos em 311 e 320 nm, que podem indicar a predominância dos ésteres aromáticos do ácido quínico.

Os extratos metanólicos obtidos ao final da seqüência de solventes a partir de folhas das três espécies *Baccharis* foram também analisados por CLAE, cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando um equipamento Shimadzu ODS-A com detector de arranjo fotodiodo (SPD-M10AVp, Shimadzu Co.). As identificações são asseguradas pelo tempo de retenção e pelo espectro de ultravioleta, que correspondem satisfatoriamente aos dados obtidos na injeção dos padrões. Na Figura 24 são mostrados os cromatogramas CLAE dos quatro extratos vegetais, para uma comparação visual e a Tabela 9 apresenta resumidamente os resultados destas quatro análises.

Estas análises levaram à identificação do flavonóide rutina (**12**) (13,54 min) em ambos os extratos de *B. dracunculifolia* e, pela primeira vez, num extrato de *B. uncinella*. Também é inédita a identificação do ácido ferúlico (**22**) (9,18 min) em *B. uncinella* (2,5%) e em *B. semiserrata* (7,5%). Observa-se um total de ~19% em ácidos aromáticos livres nos dois extratos de *B. dracunculifolia*, aparecendo o ácido ferúlico como um dos principais componentes (♀ 8,4 – ♂ 14,1%); os ácidos caféico (**21**) (♀ 4,5 – ♂ 4,8%, 5,57 min) e *p*-cumárico (**23**) (8,14 min, presente apenas em ♀, 6,0%) foram detectados em menores proporções.

As análises por CLAE confirmam as previsões iniciais, baseadas em CCDs, sobre a co-ocorrência de compostos fenólicos majoritários de natureza polar nos extratos metanólicos das três espécies vegetais. No entanto, as substâncias identificadas por CLAE são os ácidos fenólicos livres, encontrados em menor proporção e que não foram detectados nas análises preliminares por CCD. Vários picos dos cromatogramas apresentaram substâncias com espectros de ultravioleta e máximos de absorção característicos da presença de oxigênio nas posições 3 e 4 dos anéis aromáticos de cafeoilésteres do ácido quínico (em torno de 325 nm), encontrados anteriormente em *B. dracunculifolia* (KUMAZAWA et al., 2003; NAGATANI; WARASHINA; NORO, 2001 e 2002), mas não foram identificados completamente pela inexistência de padrões adequados.

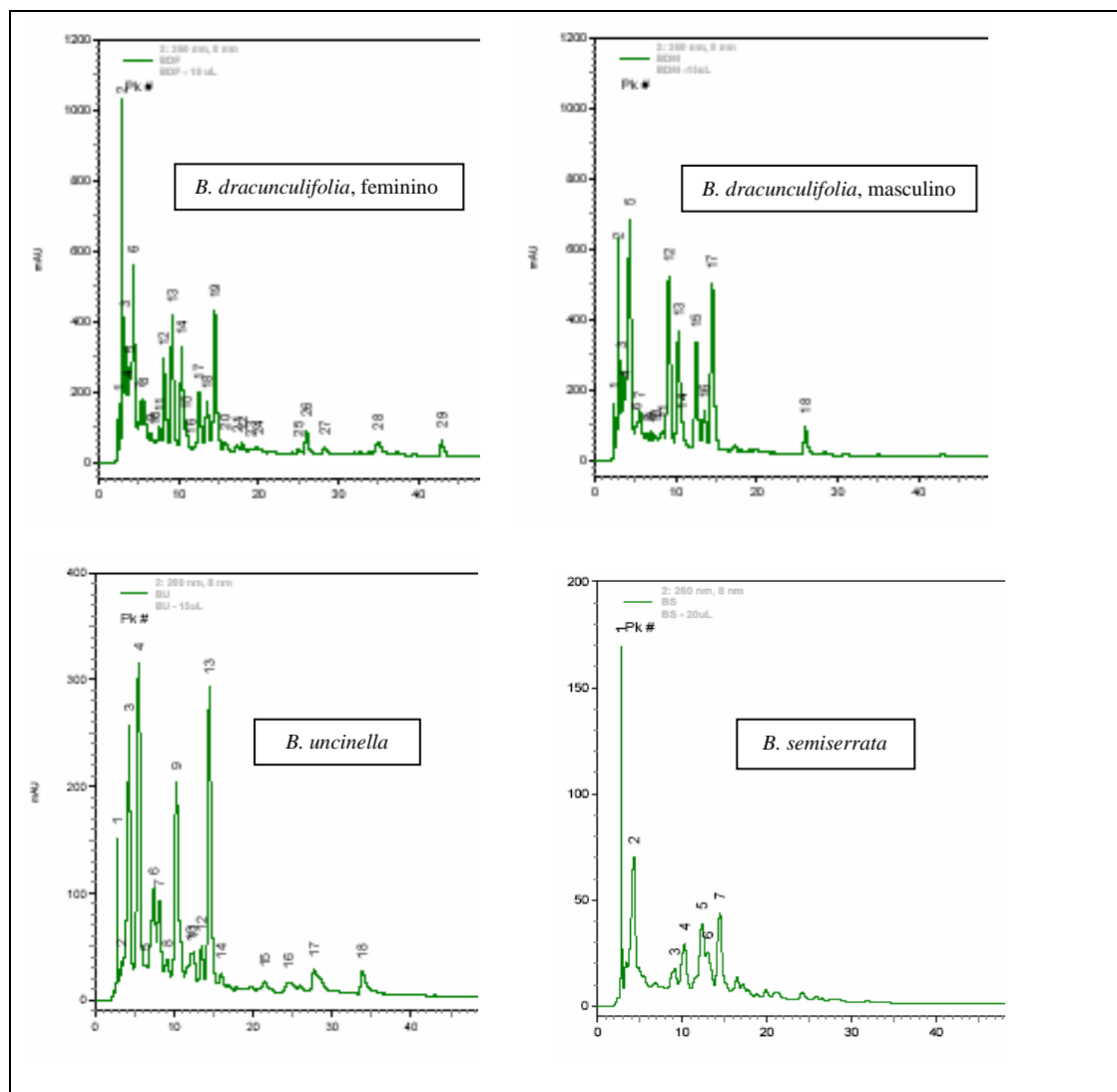


Figura 24 – Análises por CLAE dos extratos metanólicos das folhas de *B. dracunculifolia*, *B. uncinella* e *B. semiserrata*.

Tabela 9 – Principais dados das análises por CLAE sobre a rutina e os ácidos fenólicos e derivados dos extratos metanólicos de *B. dracunculifolia* (Bd ♀, Bd ♂), *B. uncinella* (Bu) e *B. semiserrata* (Bs).

t_R min	UV $\lambda_{m\acute{a}x}$	Bd ♀ %	Bd ♂ %	Bu %	Bs %
4,31	325 nm	10,13	19,02	12,71	22,39
5,56	324 nm, ácido caféico	4,84	4,49	-	-
6,47	323 nm	1,91	1,80	1,28	-
8,15	310 nm, ácido <i>p</i> -cumárico	6,08	-	-	-
9,18	324 nm, ácido ferúlico	8,48	14,18	2,59	7,56
10,33	325 nm	6,84	9,64	13,44	11,66
13,52	252 nm, rutina	3,94	3,01	2,76	-
14,50	324 nm	10,27	12,60	14,93	15,75
17,97	322 nm	1,30	-	-	-
18,98	313 nm	0,63	-	-	-
21,49	327 nm	-	-	2,18	-
25,99	326 nm	1,99	1,96	-	-

Os dados referentes às três substâncias majoritárias dos quatro cromatogramas, com tempo de retenção em 4,29, 10,36 e 14,52 minutos, sugerem tratar-se dos ácidos clorogênico, 3,4-dicafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico, respectivamente, identificados anteriormente em *B. dracunculifolia* e na própolis verde (KUMAZAWA et al., 2003; NAGATANI; WARASHINA; NORO, 2001 e 2002). Estes dados ampliam o conhecimento científico sobre a ocorrência de derivados do ácido cafeoilquínico no gênero *Baccharis*, que parece ser bem mais generalizada, pois foram também isolados anteriormente de três outras espécies, as carquejas *B. trimera*, *B. usterii* e *B. crispa*, onde desempenham papéis importantes relacionados à suas atividades biológicas já comprovadas em extratos (SIMÕES-PIRES et al., 2005).

4.3 Correlações químicas entre *B. dracunculifolia* e a própolis regional

Muitas plantas são utilizadas pelas abelhas como fonte da própolis. Park, Ikegaki e Alencar (2000), classificaram as própolis brasileiras em 12 grupos, de acordo com a fonte botânica principal. Segundo esta classificação, a própolis de maior importância comercial e considerada também como fonte de substâncias únicas em suas bioatividades, é encontrada na região sudeste do Brasil, principalmente nos estados de São Paulo e Minas Gerais, sendo conhecida como própolis verde pela sua cor e classificada no grupo 12, PG12.



Figura 25 – Abelhas coletando de folhas de *B. dracunculifolia* o material para a produção da própolis verde. Fonte: Kumazawa et al., 2003.

O grupo 12 incluiu as própolis que têm como fonte botânica a planta *Baccharis dracunculifolia* (Figura 25), também conhecida como alecrim-do-campo ou vassoura (KUMAZAWA et al., 2003; ALENCAR et al., 2005).

As abelhas retiram da base dos brotos mais tenros de *B. dracunculifolia* a resina que utilizam para preparar a própolis verde (KUMAZAWA et al., 2003; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). Para o estabelecimento de uma correlação entre a composição química dos brotos apicais de *B. dracunculifolia* e as amostras de própolis da região de Ponta Grossa, a metodologia utilizada foi aquela desenvolvida por Park, Ikegaki e Alencar (2000).

Assim, foram inicialmente comparados os perfis de absorção de luz ultravioleta e visível dos extratos etanólicos de cada amostra de própolis regional (Item 3.5.2), agrupando-as de acordo com a semelhança entre seus máximos de absorção. A análise comparativa dos espectros de absorção UV-VIS sugeriu a separação das amostras em dois grupos distintos, como mostrado na Tabela 10, abaixo.

Tabela 10 - Máximos de absorbância (λ máx.) dos extratos etanólicos da própolis PG12 e das própolis regionais separadas em Grupo 1 e Grupo 2.

Grupo 1	λ máx.	Grupo 2	λ máx.
RA-1	307,0 nm	RS-1	271,0 nm
RA-2	299,5 nm	RS-2	271,5 nm
ADI	306,5 nm	RS-3	274,0 nm
EBS-1	300,5 nm	WS-1	279,0 nm
EBS-2	311,0 nm	WS-2	271,5 nm
EBS-3	311,0 nm		
WS-3	313,0 nm		
WS-4	296,5 nm		
PG12	290,0 nm		

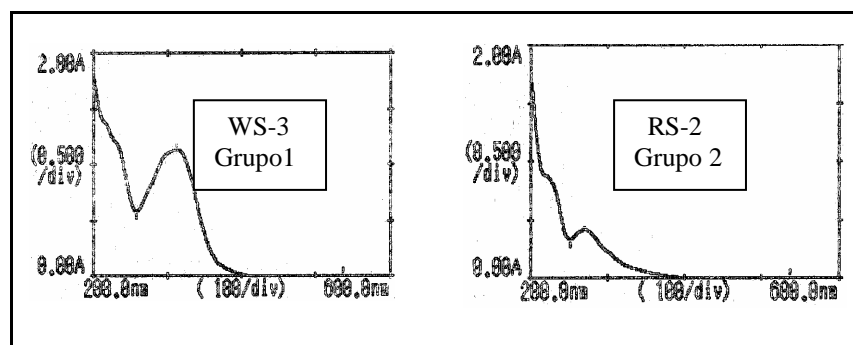


Figura 26 – Espectros UV-VIS dos extratos etanólicos das amostras WS-3 e RS-2, consideradas típicas de cada um dos dois grupos de própolis regionais.

As amostras do Grupo 1 têm espectros de absorção similares ao obtido para o padrão de própolis verde PG12, e aos obtidos por Park, Ikegaki e Alencar (2000) para a própolis do

sudeste do Brasil, com máximos de absorção geralmente entre 290 e 313 nm. O Grupo 2 reúne amostras que apresentaram espectros bastante similares entre si e com máximos entre 271,5 e 279 nm.

Para uma comparação, a Figura 26 apresenta os espectros de ultravioleta de amostras típicas de cada um dos dois grupos, observando-se que os extratos do Grupo 2 apresentaram menores intensidades de absorção, isto podendo indicar a ocorrência de menores concentrações de substâncias fenólicas.

Os extratos obtidos por enxágüe dos brotos frescos de espécimes feminino e masculino de *B. dracunculifolia*, conforme descrito no item 3.5.2, também foram analisados por CCD-AR, demonstrando a predominância das substâncias fenólicas apolares, como esperado em comparação com a literatura (ALENCAR et al., 2005; MARCUCCI et al., 2001). Na obtenção destes extratos foi empregado o método do enxágüe rápido dos brotos apicais frescos, que permite extrair principalmente as substâncias que compõem a resina da planta, onde estão os compostos mais importantes encontrados também na própolis verde. Os espectros de ultravioleta destes extratos obtidos por enxágüe apresentaram dois máximos de absorção, em torno de 281 nm e de 366 nm, já indicando a provável presença de artepilina C (vide espectro, Figura 27).

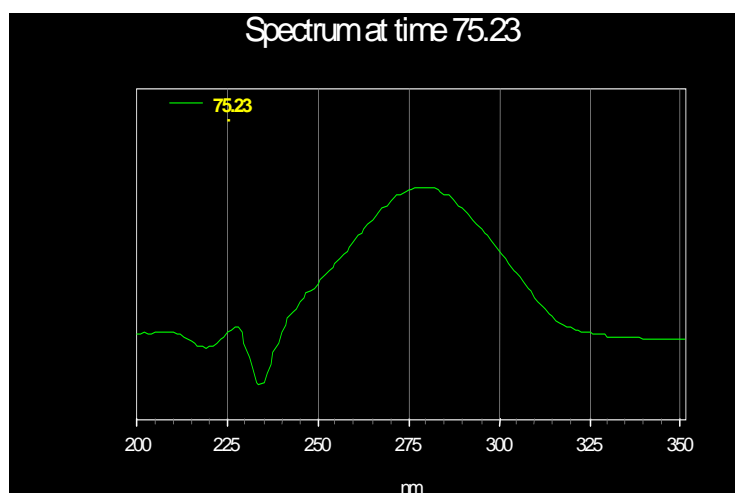


Figura 27 - Espectro de ultravioleta do pico da artepilina C ($t_R=75,23$ min), com seu máximo de absorção em torno de 280 nm.

As análises dos extratos de própolis regionais por CCD-AR (item 3.6.3) mostraram mais alguns detalhes, semelhanças e diferenças nas composições, que indicaram a conveniência de subdividir oito das amostras de própolis regionais em Grupo 1a, Grupo 1b e Grupo 2, como apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 - Reagrupamento das própolis da região de Ponta Grossa.

GRUPO 1		GRUPO 2
1a	1b	
ADI	WS-3	RS-2
RA-2	EBS-2	WS-1
WS-4	PG12	EBS-1

Três amostras de própolis regionais, uma de cada um dos três grupos acima, foram escolhidas para comparação usando CLAE com o padrão de própolis verde PG12: ADI, WS-3 e RS-2. Além disto, os extratos metanólicos obtidos por enxágüe dos brotos de espécimes feminino e masculino de *B. dracunculifolia* também foram submetidos a análises nas mesmas condições. Os resultados destas análises por CLAE são apresentados resumidamente na Figura 28 e na Tabela 12.

Tabela 12 - Principais dados das análises por CLAE dos extratos da própolis PG12, das própolis regionais WS-3, RS-2 e ADI e dos brotos de *B. dracunculifolia* (Bd ♀ e Bd ♂).

Substância identificada	UV $\lambda_{\text{máx}}$	t_R min	PG12 %	WS-3 %	RS-2 %	ADI %	Bd ♀ %	Bd ♂ %
-	324 nm	4,17	1,22	1,08	0,65	3,94	-	-
ácido caféico	322 nm	5,54	traço	0,80	0,56	1,86	-	-
ácido <i>p</i> -cumárico	307 nm	8,08	3,86	3,34	3,26	3,55	-	-
ácido ferúlico	322 nm	10,25	3,15	2,77	2,63	1,21	-	-
-	325 nm	14,44	5,05	4,46	2,70	2,07	-	-
-	289 nm	22,86	2,31	1,15	0,60	0,70	-	-
apigenina	264 nm	34,86	-	3,96	2,46	3,06	4,73	7,34
-	265 nm	42,96	-	17,85	11,85	20,73	10,41	20,02
-	312 nm	45,80	1,01	1,80	5,73	1,73	-	2,31
crisina	269 nm	49,08	18,10	-	-	-	-	-
-	277 nm	49,69	-	2,06	3,37	2,80	31,71	21,84
-	290 nm	55,05	-	2,32	1,24	1,94	17,04	10,98
-	313 nm	64,01	8,59	8,87	10,22	9,74	8,78	9,58
artepilina C	279 nm	75,48	13,25	6,08	4,68	1,88	8,72	10,25
-	314 nm	77,35	2,91	3,54	1,64	3,16	traço	traço

As amostras de própolis apresentaram porcentagens moderadas dos ácidos fenólicos livres, totalizando entre 6,4 e 7,0%, embora o ácido caféico tenha sido detectado apenas como traço no padrão de PG12. As substâncias com tempo de retenção 4,17 min ($\lambda_{\text{máx}} = 324$ nm) e 14,44 min ($\lambda_{\text{máx}} = 325$ nm) são vistas nas quatro amostras de própolis e devem corresponder ao ácido clorogênico a ao ácido 3,5-dicafeoilquínico detectados anteriormente (item 4.2) nos extratos metanólicos das folhas de *B. dracunculifolia*, *B. uncinella* e *B. semiserrata*. Nenhuma destas substâncias polares aparece nos extratos obtidos por enxágüe rápido dos brotos tenros de *B. dracunculifolia*, que extrai essencialmente substâncias presentes na resina e normalmente são preparados para correlacionar amostras de própolis

desconhecidas a esta planta, pela presença de substâncias que podem ser consideradas de polaridades baixas a medianas.

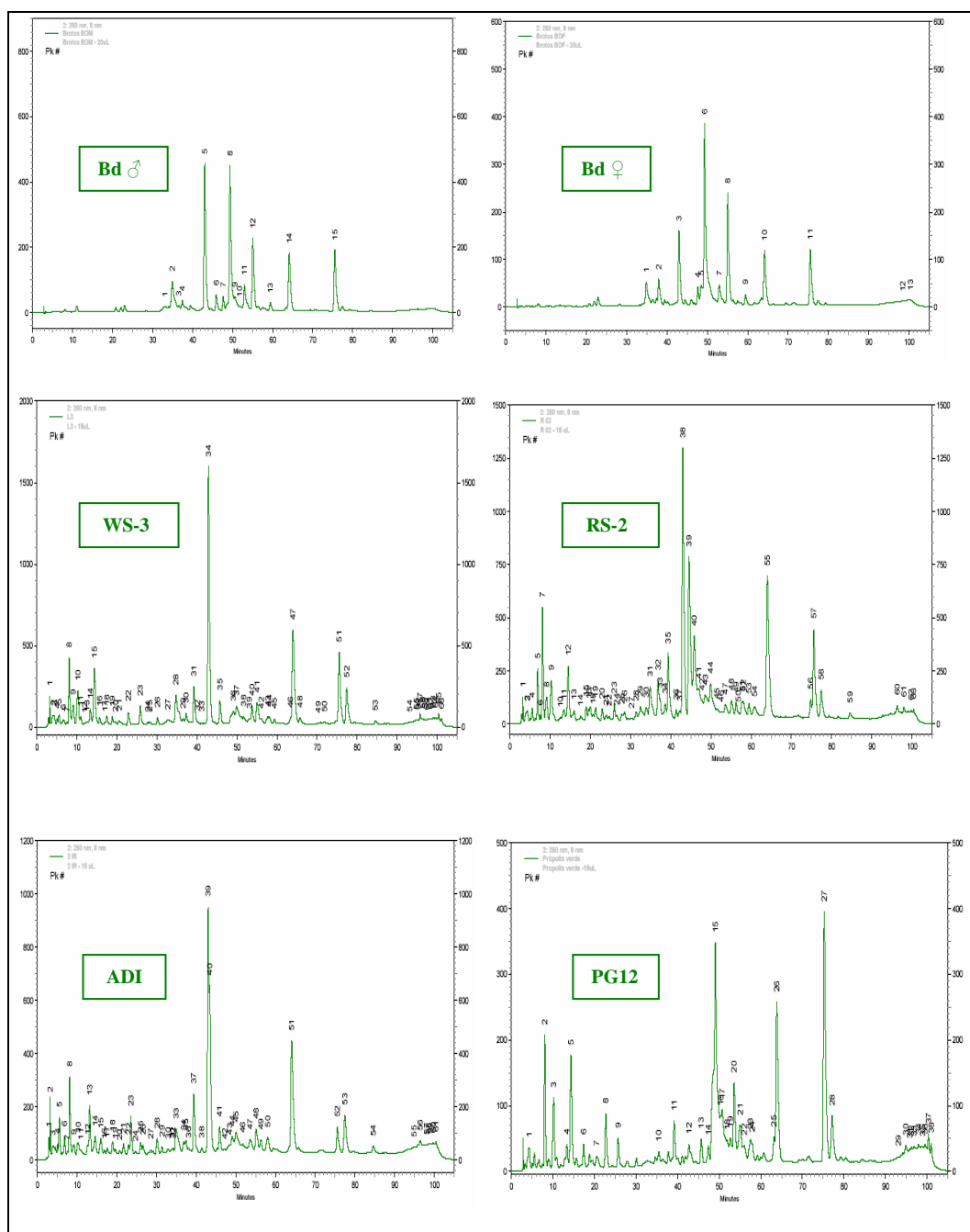


Figura 28 – Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos metanólicos de brotos de *B. dracunculifolia* masculino (Bd ♂) e feminino (Bd ♀), extratos das própolis regionais WS-3, RS-2, ADI e da PG12.

A presença das substâncias apolares com tempos de retenção de 64,01 min, 75,48 min e 77,35 min, em todos os cromatogramas da Figura 28, pode ser considerada uma indicação segura de que as quatro própolis analisadas foram preparadas com resina de *B.*

dracunculifolia (KUMAZAWA et al., 2003; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002). A artepilina C (75,48 min), segunda principal substância presente no extrato de própolis PG12 (13,25%), é de extrema importância para a qualidade da própolis verde brasileira (ALENCAR et al., 2005; KONISHI et al., 2005; PAULINO et al., 2008; PISCO et al., 2006). As amostras de própolis regionais ADI, WS-3 e RS-2 apresentaram proporções baixas de artepilina C, assim como dos outros dois componentes apolares, o que poderia levar a uma depreciação em relação à própolis verde.

Mas, na faixa de tempos de retenção medianos das análises por CLAE, encontramos flavonóides como substâncias principais. A crisina (**18**) (49,08 min), já encontrada antes como um dos principais componentes da própolis verde (GARDANA et al., 2007; MARÓSTICA JR et al., 2008), é também a principal substância do extrato da PG12 (18,1%) mas está ausente nos extratos de própolis regionais. Por sua vez, as amostras ADI, WS-3 e RS-2 apresentaram proporções entre 2,4% e 3,9% de apigenina (**16**) (34,86 min, $\lambda_{\text{máx}} = 264$ nm), não detectada no padrão de PG12. Além disto, a principal substância presente em cada um dos três extratos das própolis regionais, mas ausente na PG12, com porcentagens de até 20,7% (ADI), apresentou tempo de retenção de 42,96 minutos e um máximo de absorção em 265 nm. Apesar de apresentar um máximo de absorção muito similar ao da apigenina, os tempos de retenção diferem grandemente, e a substância não foi identificada pela inexistência de padrão.

Assim, os dados destas análises por CLAE indicam que as própolis regionais têm características químicas gerais muito similares ao padrão da própolis verde PG12 utilizada, sendo garantido que a sua origem vegetal é *B. dracunculifolia*. A principal diferença observada está relacionada ao conteúdo em flavonóides: enquanto que o extrato do padrão PG12 apresentou 18,1% de crisina, os extratos de própolis regionais ADI, WS-3 e RS-2 apresentaram 17,8%, 11,8% e 20,7%, respectivamente, de um flavonóide diferente que não foi identificado. Este suposto flavonóide (42,96 min) aparece também nos extratos dos brotos de *B. dracunculifolia* como componente majoritário, mostrando claramente a existência de uma co-relação química entre a planta que cresce livre na natureza da região dos Campos Gerais e as amostras de própolis ali produzidas.

4.4 Atividade antioxidante

Os resultados do teste de atividade antioxidante das amostras de própolis avaliadas são apresentados Tabela 13, expressos como porcentagem de inibição da oxidação. Em

geral, observou-se que todas as amostras apresentaram excelente atividade antioxidante, várias delas chegando a ser mais efetivas que a própolis PG12 utilizada como referência. Comparativamente, várias amostras também inibiram menos do que 100% do DPPH presente, durante o tempo total de 300 segundos, mesmo com a alíquota de 120 µL de extrato.

Três das amostras de própolis regionais causaram uma inibição de 100% já com a alíquotas de 20 µL (WS-3, RA-1 e RA-2), todas inicialmente reunidas no Grupo 1 das própolis regionais (Tabela 10). O extrato da própolis regional ADI também apresentou comportamento semelhante, inibindo 91% na menor concentração. As análises por CLAE mostraram que as concentrações de substâncias fenólicas nos extratos de própolis podem ser ligeiramente diferentes, além das diferenças nas composições e nas proporções entre os componentes.

Os dois extratos obtidos por enxágüe dos brotos de *B. dracunculifolia* aparecem separados na Tabela 13, parte inferior, porque podem ser comparados somente entre si. As atividades antioxidantes registradas para estes extratos vegetais mostram coerência com a presença maciça de substâncias fenólicas, como bem mostraram as análises por CLAE. Além disto, observa-se grande semelhança entre os efeitos antioxidantes dos extratos obtidos dos espécimes masculino e feminino, nas quatro concentrações.

Tabela 13 - Seqüestro do radical DPPH dos extratos de própolis e brotos de *B. dracunculifolia* em porcentagem.

EXTRATO	20 µL	30 µL	60 µL	120 µL
EBS-01	59,63%	60,82%	100%	100%
EBS-02	86,47%	91,25%	100%	100%
EBS-03	66,14%	100%	100%	100%
WS-1	59,58%	100%	100%	100%
WS-2	72,83%	100%	100%	100%
WS-4	73,73%	100%	100%	100%
RS-1	59,43%	52,26%	72,79%	100%
RS-3	22,39%	29,78%	50,67%	72,03%
RA-1	100%	100%	100%	100%
RA-2	100%	100%	100%	100%
ADI	91,03%	100%	100%	100%
WS-3	100%	100%	100%	100%
RS-2	25,95%	39,39%	100%	100%
PG12	16,78%	28,54%	51,48%	100%
Bd ♀ brotos	64,64%	72,40%	100%	100%
Bd ♂ brotos	54,43%	73,72%	100%	100%

Os gráficos da Figura 29, abaixo, mostram a cinética de sequestro do radical livre DPPH dos três extratos de própolis regionais em comparação com o extrato de PG12. Pode-se observar que, mesmo na menor concentração, os extratos de própolis ADI e WS-3 reduziram o radical livre DPPH em menos de 1/3 do tempo de leitura de 300 segundos. Por outro lado, os extratos das amostras RS-2 e PG12 apresentaram cinéticas bastante semelhantes, com perfil alongado, atingindo 100% de inibição somente com 60 ou 120 μ L. Todos os extratos de própolis foram preparados de forma idêntica (item 3.5.3), de forma que os resultados dos testes como antioxidante devem ser proporcionais ao conteúdo químico de quantidades iguais de cada amostra.

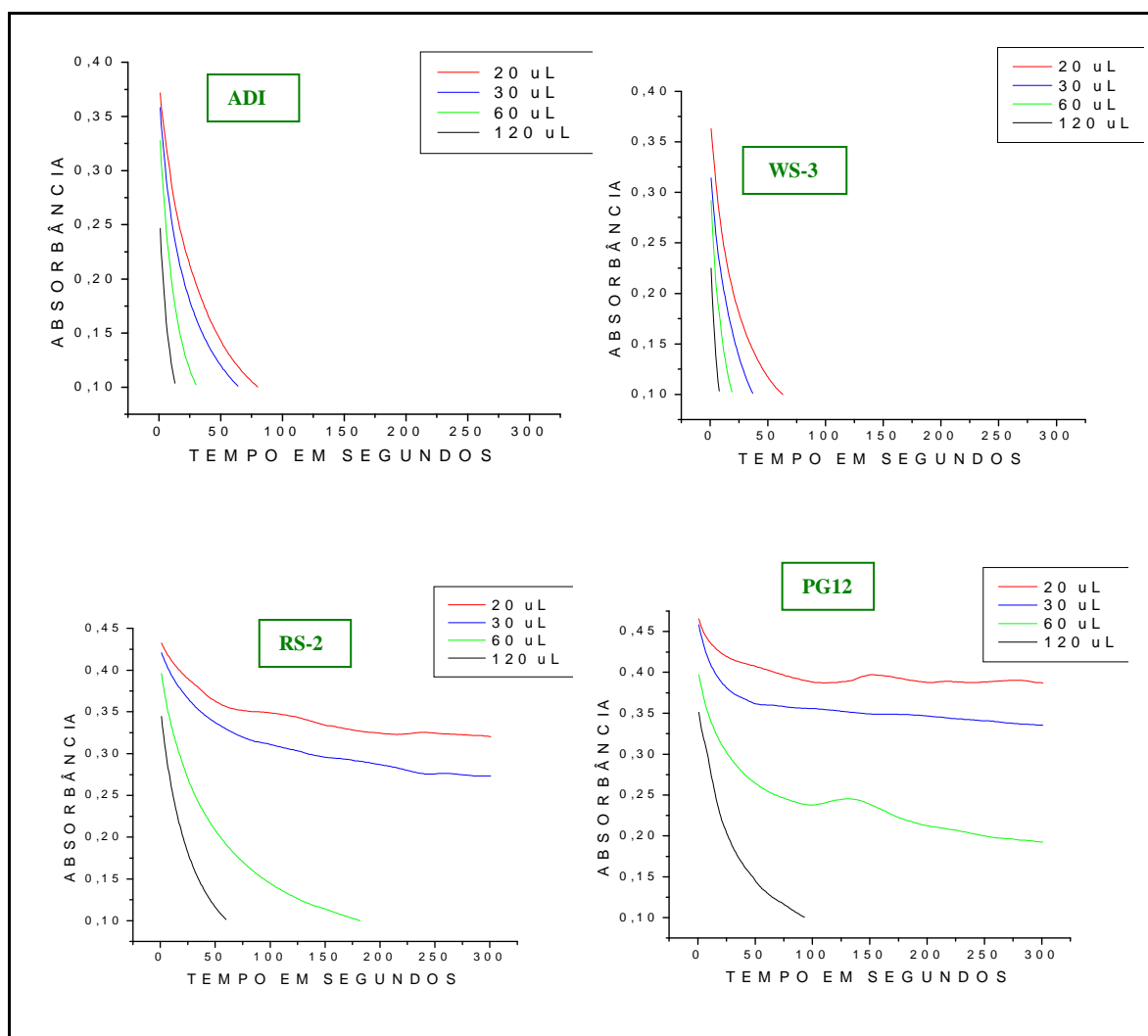


Figura 29 – Cinética da reação entre o radical DPPH e os extratos de própolis regionais ADI, WS-3 e RS-2 e de própolis verde PG12 nas alíquotas de 20, 30, 60 e 120 μ L.

Considerando mais uma vez os resultados das análises por CLAE das quatro amostras de própolis ADI, WS-3, RS-2 e PG12, dados na Tabela 12, observa-se que as seis

substâncias polares presentes nestas amostras entre os tempos de retenção de 4,17 e 22,86 minutos, incluindo os ácidos caféico, *p*-cumárico e ferúlico, aparecem em proporções individuais abaixo de 5,0%, e totalizam entre 10,4 e 15,6% nos extratos. Assim, pode-se esperar que estes componentes não sejam os responsáveis por diferenças importantes entre as atividades antioxidantes medidas nos extratos.

Por outro lado, entre as três substâncias menos polares, foram observadas porcentagens similares entre os picos em 64,01 minutos (de 8,59% a 10,22%) e em 77,35 minutos, mas uma variação grande no conteúdo de artepilina C (de 1,88% a 13,25%). Considerando a baixa influência relativa da crisina sobre a atividade antioxidante em comparação com a artepilina C (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004), pode-se concluir que este ácido fenólico diprenilado é o principal responsável pelo desempenho da própolis PG12 neste teste. No entanto, observou-se que as amostras de própolis regionais apresentaram valores de porcentagens de artepilina C que não tem uma relação direta com os resultados dos testes antioxidantes: 6,08% em WS-3, 4,68% em RS-2 e apenas 1,88% em ADI.

A apigenina, ausente nesta amostra de PG12 e presente em até 3,96% nas própolis regionais, também tem uma baixa influência relativa sobre a atividade antioxidante destes extratos (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004). Assim, parece provável que o flavonóide não identificado nas amostras de própolis regionais ($\lambda_{\text{máx}}$ 365 nm, 42,96 min) seja o principal responsável pelas fortes atividades antioxidantes dos extratos de própolis regionais. WS-3 apresenta 6,08% de artepilina C, menos da metade do que a PG12, mas isto seria compensado pela presença de 17,85% do flavonóide em questão, elevando a atividade antioxidante. A amostra ADI apresenta uma cinética semelhante à WS-3, tendo seu baixo conteúdo em artepilina C (1,88%) compensado pelos 20,73% do flavonóide não identificado. E a amostra RS-2, com 4,68% de artepilina C e apenas 11,85% do suposto flavonóide, acaba apresentando uma cinética diferente das outras duas amostras de própolis regionais, e mais parecida à PG12.

4.5 Conclusões

→ Os altos rendimentos dos óleos essenciais obtidos de plantas crescendo espontaneamente, as baixas razões monoterpenos/sesquiterpenos e as altas proporções dos sesquiterpenos oxigenados, especialmente (*E*)-nerolidol e espatulenol, são as principais características do

óleo essencial das folhas de *B. dracunculifolia* dos Campos Gerais do Paraná, quando coletada em condição de baixa disponibilidade de água.

→ A composição do óleo essencial encontrada aqui reúne propriedades desejáveis sob o ponto de vista comercial.

→ Foram identificados o flavonóide rutina (**12**) em ambos os extratos de *B. dracunculifolia* e, pela primeira vez, num extrato de *B. uncinella*. Também é inédita a identificação do ácido ferúlico (**22**) em *B. uncinella* (2,5%) e em *B. semiserrata* (7,5%).

→ Ácidos aromáticos livres estão presentes nos dois extratos de *B. dracunculifolia*, aparecendo o ácido ferúlico como um dos principais componentes (Bd ♀ 8,4 – ♂ 14,1%); os ácidos caféico (**21**) (Bd ♀ 4,5 – Bd ♂ 4,8%) e *p*-cumárico (**23**) (presente apenas em Bd ♀ - 6,0%) foram detectados em menores proporções.

→ Está confirmada a co-ocorrência de compostos fenólicos majoritários de natureza polar nos extratos metanólicos das três espécies vegetais podendo, sendo muito provável tratar-se de ésteres do ácido quínico.

→ As própolis regionais têm características químicas gerais muito similares ao padrão de própolis verde PG12 utilizado, sendo garantido que a sua origem vegetal é *B. dracunculifolia*.

→ Os extratos de própolis regionais ADI, WS-3 e RS-2 apresentaram um flavonóide diferente que não foi identificado. Este suposto flavonóide mostra claramente a existência de uma co-relação química entre a *B. dracunculifolia* da região dos Campos Gerais e as amostras de própolis.

→ Todas as amostras de própolis utilizadas apresentaram excelente atividade antioxidante.

4.6 Perspectivas para este trabalho

Os resultados do presente estudo mostram que ainda é importante pesquisar os metabólitos secundários produzidos por esta espécie vegetal crescendo *in natura* nos mais

diferentes ambientes. O estudo das variações na composição do óleo essencial de *B. dracunculifolia* ao longo do ano, com avaliação contínua dos efeitos que a disponibilidade de água tem sobre o metabolismo. O uso de técnicas de medida da disponibilidade real de água, como as obtidas com a Câmara de Pressão de Scholander poderiam trazer contribuições importantes no esclarecimento sobre o papel da água na acumulação de compostos voláteis.

Outra perspectiva importante apontada por este trabalho, é o isolamento e a identificação das substâncias polares contidas nos extratos metanólicos de *Baccharis dracunculifolia*, *B. uncinella* e *B. semiserrata*, da mesma forma que o isolamento e identificação do suposto flavonóide ($\lambda_{\text{máx}}$ 365 nm, 42,96 min) presente nos extratos de própolis e de *B. dracunculifolia* regionais.

Os resultados deste trabalho são colocados, desde já, à disposição da comunidade de apicultores da Região dos Campos Gerais como um marco inicial a caminho do reconhecimento dos valores da própolis regional.

5 REFERÊNCIAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **ARKIVOC**, v.2, p.76-96, 2007.

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

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. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 215-220, jul./set. 2005.

AHN, M.; KUNIMASA, K.; OHTA, T.; KUMAZAWA, S.; KAMIHIRA, M.; KAJI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; NAKAYAMA, T. Supression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, v. 252, n. 2, p. 235-243, 2007.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 909-915, jul./ago. 2005.

Apicultura. Disponível em: http://www.breyer.ind.br/apicultura/apicultura_própolis.htm. Acesso em 23 nov. 2007.

ARDUIN, M.; KRAUS, J. E. Anatomia de galhas de ambrosia em folhas de *Baccharis concinna* e *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Revista Brasileira de Botânica**. v. 24, n. 1, p. 63-72, 2001.

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

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Advance Access Publication**, eCAM v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. **J. Nat. Prod.** v. 61, p. 896-900, 1998.

BARREIROS, A. L. B.S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Estresse Oxidativo: Relação entre espécies reativas de oxigênio e a defesa do organismo. **Quím. Nova**. v. 29, p. 113-123, 2006.

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

BIANCHI, M. DE L. P., ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, mai./ago., 1999.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants**. 2. ed. França: Lavoisier Publishing, 1995, 819 p.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, P. V. Morfoanatomia Foliar e Caulinar de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 4, p. 477-83, 2004.

CASTRO, I. A.; ROGERO, M. M.; JUNQUEIRA, R. M.; CARRAPEIRO, M. M. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil free radical scavenging activity of antioxidant mixtures evaluated by response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 59-67, 2006.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. **Quím. Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CASSEL, E.; FRIZZO, C. D.; VANDERLINDE, R.; ATTI-SERAFINI, L.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Extraction of *Baccharis* Oil by Supercritical CO₂. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 39, p. 4803-4805, 2000.

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

Cromatógrafo Gasoso. Disponível em <http://www.iq.unesp.br/pet/analisevinhoscg.pps>. Acesso em 15 de abr. 2009.

Cromatógrafo Líquido para HPLC. Disponível em http://www.dspace.ist.utl.pt/bitstream/2295/49904/1/LQIII-Cromat_HPLC_caféina.pdf. Acesso em 24 jan. 2009.

Deconvolução. Disponível em <http://www.chem.agilent.com/enus/products/instruments/ms/pages/gp14509.aspx>. Acesso em 24 jan. 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J. dos; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 26, n. 2, p. 446-452, abr./jun., 2006.

ESPÍRITO-SANTO, M. M.; MADEIRA, B. G.; NEVES, F. S.; FARIA, M. L.; FAGUNDES, M.; FERNANDES, G. W. Sexual Differences in Reproductive Phenology and their Consequences for the Demography of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), a Dioecious Tropical Shrub. **Annals of Botany**, v. 91, p. 13-19, 2003.

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

FAGUNDES, M.; NEVES, F. S.; FERNANDES, G. W. Direct and indirect interactions ants, insects herbivores, parasitoids, and host plant *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Ecological Entomology**, v. 30, p. 28-35, 2005.

FERRACINI, V. L. **Óleos Essenciais de *Baccharis* e sua interação com insetos polinizadores**. 1995, 205f. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

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

FERRONATO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230, abr./jun, 2007.

FIDALGO, O.; BONONI, V. L. R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização de material botânico**. São Paulo: (Série Documentos) Instituto de Botânica, 1989. 62p.

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

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

GARDANA, C.; SCAGLIANTI, M.; PIETTA, P.; SIMONETTI, P. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 390-399, 2007.

GEBARA, E. C. E.; LIMA L. A.; MAYER, M. P. A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 365-369, 2002.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1220-1234, 2006.

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

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

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

KONISHI, Y.; HITOMI, Y.; YOSHIDA, M.; YOSHIOKA, E. Absorption and Bioavailability of Artemisin C in Rats after Oral Administration. **J. Agric. Food Chem.** v. 53, p. 9928-9933, 2005.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, L.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 235-240, 1999.

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

KUMAZAWA, S., HAMASAKA, T., NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329–339, 2004.

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

LEITÃO, D. P. S.; SILVA FILHO, A. A. da; POLIZELLO, A. C. M.; BASTOS, J. K.; SPADARO, A. C. C. Comparative Evaluation of in-Vitro Effects of Brazilian Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on Cariogenic Factors of *Streptococcus mutans*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 11, p. 1834-1839, 2004.

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

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Quim. Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-533, 1996.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 105-112, 2001

MARCUCCI, M. C. Própolis Tipificada: Um Novo Caminho para a Elaboração de Medicamentos de Origem Natural, Contendo este Produto Apícola. **Revista Fitos**, v. 01, n. 03, p. 36-46, 2006.

MARCHESAN, E. D.; FERRONATTO, R.; BEDNARSKI, F.; ALENCAR, S. M.; ONOFRE, S. B. Ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC. e *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 10, n. 2, p. 63-66, mai./ago. 2006.

MARÓSTICA JUNIOR M. R.; DAUGSCH A.; MORAES C. S.; QUEIROGA C. L.; PASTORE G. M.; PARK Y. K. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its origin *Baccharis dracunculifolia*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, n. 01, p. 178-181, jan./mar. 2008.

MENDES, S. **Estudo Químico e bioatividade de *Baccharis semiserrata* DC.** Dissertação (Mestrado em Química Aplicada). Universidade Estadual de Ponta Grossa. 2007.

MENEZES, H.; Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Boil.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 405-411, jul./set. 2005.

MISHIMA, S.; YOSHIDA C.; AKINO S.; SAKAMOTO T. Antihypertensive Effects of Brazilian Propolis: Identification of Caffeoylquinic Acids as Constituents Involved in the Hypotension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 10, p. 1909-1914, 2005.

MOTL, O., TRKA, A. Zusammensetzung des brasilianischen Vassoura-oils (aus *Baccharis dracunculifolia*). **Parfum. Kosmet.** v. 64, p. 488-491, 1983.

NAGATANI, Y; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC.. **Chem. Pharm. Bull.** v. 49, n. 11, p. 1388-1394, 2001.

NAGATANI, Y.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents from the aerial part of *Baccharis dracunculifolia* DC II. **Chem. Pharm. Bull.** v. 50, n. 5, p. 583-589, 2002.

NAKANISHI, I.; UTO Y.; OHKUBO K.; MIYAZAKI K.; YAKUMARU H.; URANO, S.; OKUDA H.; UEDA J.; OZAWA T.; FUKUHARA K.; FUKUZUMI S.; NAGASAWA H.; HORI, H.; IKOTA N. Efficient radical scavenging ability of artepillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Org. Biomol. Chem.** v. 1, p. 1452-1454, 2003.

NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D.; REIS, D. C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p.379-386, jul./set. 2008.

NUNES, D. S.; SENS, S. L.; SWITALA, M. Investigação de valores químicos e biológicos de Asteraceae comuns nos Campos Gerais. IX Encontro de Química da Região Sul-SBQ-SUL. **Anais**, Londrina, 2001.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J. L. Comparison of flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brasil. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 40, p. 97-106, 1997.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. Classificação das Própolis Brasileira a Partir de Suas Propriedades Físico-Químicas e Propriedades Biológicas. **Mensagem Doce**, n. 58, p. 2-7, 2000.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeast brazilian propolis. **J. Agric. Food Chem.** v. 52, p. 1100-1103, 2004.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian própolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 296-301, 2008.

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

PERES, T. B.; Noções Básicas de Cromatografia . **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 227-229, jul./dez. 2002.

PISCO, L.; KORDIAN, M.; PESEKE, K.; FEIST, H.; MICHALIK, D.; ESTRADA, E.; CARVALHO, J.; HAMILTON, G.; RANDO, D.; QUINCOSES, J. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 401-407, 2006.

QUEIROGA, C. L.; FUKAI, A. E.; MARSAIOLI, A. Composition of the essential oil of vassoura. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 1, p. 105-109, 1990.

RESENDE F. A.; ALVES, J. M.; MUNARI, C. C.; SENEDESE, J. M.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, v. 634, p. 112-118, 2007.

SALOMÃO K.; PEREIRA P. R. S.; CAMPOS L. C.; BORBA C. M.; CABELLO P. H.; MARCUCCI M. C.; CASTRO S. L. de. Brazilian Propolis: Correlation Between Chemical Composition and Antimicrobial Activity. **Advance Access Publication**, eCAM, p. 1-8, 2007.

SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A. F.; MAIA, A. B. R. A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; MOREIRA E. S. A. Brazilian Propolis: Physicochemical Properties, Plant Origin and Antibacterial Activity on Periodontopathogens. **Phytoteraphy Research**, v. 17, p. 285-289, 2003.

SCHOLANDER, P. F. ; HAMMEL, H. T. ; BRADSTREET, E. D. ; HEMMINGSEN, E. A. Sap pressure in vascular plants. **Science**, v. 148, p. 339-346, 1965.

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

SHENG J.; ZHOU J.; WANG L.; XU J.; HU Q. Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 225, p. 249-253, 2007.

SILVA, J. F. M. da; SOUZA, M. C. de; MATTA S. R.; ANDRADE M. R. de; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, p. 431-435, 2006.

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

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

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr. Campinas**, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan./abr. 2002.

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

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

TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MEIRA, R. M. S. A.; MESSAGE, D.; SALATINO, A. Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Advance Access Publication**, eCAM v. 2, n. 1, p. 85-92, 2005.

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

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

VIEGAS, JR. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis – a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 1995. 384 p.