UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Química

Dissertação de Mestrado

Influência sazonal no óleo essencial da *Baccharis articulata* e *da B. trimera* via cromatografia gasosa mono e bidimensional

Marcelo Möller Alves

Pelotas, 2010

Marcelo Möller Alves

Influência sazonal no óleo essencial da *Baccharis articulata e da B. trimera* via cromatografia gasosa mono e bidimensional

Dissertação apresentada ao Programa de pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Produtos Naturais.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Maria Regina Alves Rodrigues

Pelotas, 2010

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada "Influência sazonal no óleo essencial da *Baccharis articulata* e da *B. trimera* via cromatografia gasosa mono e bidimensional", de autoria de Marcelo Möller Alves.

Banca Examinadora:

_____

Prof[a]. Dr[a]. Maria Regina Alves Rodrigues – Orientadora – UFPel

_____

Prof[a]. Dr[a]. Elina Bastos Caramão – UFRGS

_____

Prof. Dr. Geonir Machado Siqueira – UFPel

À minha amada esposa Renata que sempre esteve presente com muita paciência e muito amor, incentivando e colaborando para a realização deste trabalho, simplesmente muito obrigado.

Ao Lucas, meu filho amado, que com seu nascimento e seus constantes sorrisos foram incentivo e alento nas horas difíceis, minha gratidão eterna.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser tão presente em minha vida e me agraciar constantemente.

A profa. Dra. Maria Regina que sempre me orientou com zelo, solicitude, confiança e paciência, me ensinou e motivou o estudo na área dos produtos naturais.

Ao prof. Dr. Romeu, pela co-orientação e colaboração na busca e obtenção da matéria-prima deste trabalho.

Ao Marco e a Maraísa pela ajuda indispensável nas análises cromatográficas.

A Anelise, Daniela, Gabriela, Victória e Kathleen, bolsistas do Laboratório de Oleoquímica e Biodiesel, pela incansável disposição em me auxiliar nos experimentos da pesquisa.

Aos meus colegas do IFSul, em especial, Pedro, Luiza e Marinês, pelas palavras de motivação e o suporte técnico.

Aos meus colegas do mestrado pela amizade, conhecimento e companherismo.

A profa. Dra. Elina Caramão que possibilitou minha pesquisa e aos demais integrantes da Central Analítica da UFRGS pela colaboração no meu trabalho.

Aos meus pais pela torcida de que mais uma etapa fosse vencida.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a concretização dessa conquista.

A todos vocês minha eterna gratidão.

RESUMO

Título: **Influência sazonal no óleo essencial da *Baccharis articulata e da B. trimera* via cromatografia gasosa mono e bidimensional**

Autor: Marcelo Möller Alves

Orientador: Profa. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues

As carquejas pertencem à família *Asteraceae* e ao gênero *Baccharis,* sendo que a *B. articulata* (carqueja branca) e a *B. trimera* (carqueja verde) são as espécies mais eminentes no Rio Grande do Sul. Os óleos essenciais contribuem para a identificação das espécies botânicas, fato este muito útil ao se tratar das plantas do gênero *Baccharis* que em alguns casos apresentam descrição botânica muito semelhante. O objetivo do presente trabalho foi diferenciar duas espécies do gênero *Baccharis* (carqueja verde e branca) quanto à composição química de seus óleos essenciais, considerando a variação sazonal a fim de diagnosticar a melhor época de colheita da planta para obtenção dos princípios ativos. Esses óleos foram obtidos por arraste de vapor em aparelhos do tipo Clevenger e os constituintes identificados via cromatografia gasosa mono e bidimensional. Os rendimentos de óleos essenciais extraídos da *B. articulata* e *B. trimera* nas quatro estações foram: 0,06 e 0,98% (Verão); 0,13 e 0,62% (Outono); 0,16 e 0,07% (Inverno); e 0,03 e 0,23% (Primavera), respectivamente. A cromatografia gasosa monodimensional permitiu identificar 36 compostos na carqueja branca sendo majoritários o espatulenol (10,3-22,7%) e o β-cariofileno (3,8-9,1%), enquanto que a técnica bidimensional apresentou 84 componentes identificados confirmando a sensibilidade do GC × GC. Da mesma forma para a carqueja verde foram detectados 19 por GC-FID e 61 por cromatografia bidimensional com presença acentuada do acetato de carquejila (41,6-70,9%) e o ledol (8,8-22,9%). Ao relacionar todos os dados obtidos confirmou-se a influência direta de vários fatores na composição química das plantas, em especial a época de floração que foi determinante na presente pesquisa, afirmando assim a infinita possibilidade de estudos na área de produtos naturais.

ABSTRACT

Tittle: **Seasonal influences on essential oil of *Baccharis articulata* and *B. trimera* by gas chromatography one and two-dimensional.**

Author: Marcelo Möller Alves

Academic Advisor: Profa. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues

Carquejas belong to the Asteraceae family and the genus *Baccharis*, but *B. articulata* (white carqueja) and *B. trimera* (green carqueja) are the most prominent species in Rio Grande do Sul. Essential oils contribute to the identification of botanical species, a fact that is very useful when dealing with plants of the genus *Baccharis*, in some cases present botanical description is very similar. The aim of this study was to differentiate two species of the genus *Baccharis* (green and white carqueja) of the chemical composition of essential oils, considering the seasonal variation in order to diagnose the best time to harvest the plant to obtain the active ingredients. These oils were obtained by hydrodestillation(Clevenger apparatus) and constituents identified via gas chromatography one and two-dimensional. Yields of essential oils extracted from *B. articulata* and *B. trimera* in the four seasons were 0.06 and 0.98% (summer), 0.13 and 0.62% (autumn), 0.16 and 0.07% (winter), and 0.03 and 0.23 % (spring), respectively. Gas chromatography one-dimensional allowed to identify 36 compounds in white carqueja is the majority spathulenol (10.3-22.7%) and β-caryophyllene(3.8-9.1%), while the two-dimensional technique showed 84 components identified confirming the sensitivity of GC × GC. Similarly for the green carqueja 19 compounds were detected by GC/MS and 61 by two-dimensional with strong presence of carquejil acetate(41.6-70.9%) and ledol(8.8-22.9%). By linking all data obtained confirmed the direct influence of various factors on chemical composition of plants, especially flowering time that was crucial in this research, thereby affirming the infinite possibility of studies in the area of natural products.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS..... v
RESUMO..... vi
ABSTRACT..... vii
LISTA DE TABELAS..... ix
LISTA DE FIGURAS..... x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS..... xiii
INTRODUÇÃO..... 1
Capítulo 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 4
1.1. A planta..... 5
1.1.1. Família Asteraceae..... 5
1.1.2. Gênero *Baccharis*..... 5
1.1.3. Espécie *Baccharis articulata*..... 6
1.1.4. Espécie *Baccharis trimera*..... 7
1.2. Óleos essenciais..... 9
1.3. Composição química: os terpenóides..... 13
1.4. Fatores de influência na composição dos metabólitos..... 16
1.5. Análise instrumental..... 19
1.5.1. Cromatografia Gasosa..... 19
1.5.2. Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas..... 22
1.5.3. Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente..... 23
Capítulo 2. PARTE EXPERIMENTAL..... 28
2.1. Amostragem..... 29
2.2. Levantamento dos dados meteorológicos..... 29
2.3. Tratamento da amostra..... 30
2.4. Extração do óleo..... 30
2.5. Análise cromatográfica em GC- FID..... 31
2.6. Análise cromatográfica em GC/MS..... 31
2.7. Análise cromatográfica em GC × GC/TOFMS..... 31
2.8. Identificação dos componentes..... 32
Capítulo 3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS..... 33
3.1. Extração e análise dos óleos essenciais..... 34
3.1.1. *Baccharis articulata* (carqueja branca)..... 34
3.1.2. *Baccharis trimera* (carqueja verde)..... 36
3.2. Análise cromatográfica..... 37
3.2.1. *Baccharis articulata*..... 37
3.2.2. *Baccharis trimera*..... 49
CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES..... 60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Unidade do isopreno e a formação dos terpenos..... 14

Tabela 2. Aplicações da GC × GC na análise de óleos essenciais..... 27

Tabela 3. Rendimento do óleo essencial de *B. articulata* e *B. trimera*, temperaturas mínimas e máximas médias e precipitação ao longo das estações do ano de 2008..... 35

Tabela 4. Constituintes químicos do óleo essencial de *Baccharis articulata* nas quatro estações do ano de 2008, obtido por GC-FID..... 38

Tabela 5. Compostos identificados no óleo essencial da *Baccharis articulata* coletada no verão do ano de 2008 via GC × GC. Os compostos já identificados via GC-FID estão destacados em negrito..... 43

Tabela 6. Constituintes químicos do óleo essencial de *Baccharis trimera* nas quatro estações do ano de 2008 via GC-FID.... 50

Tabela 7. Compostos identificados no óleo essencial da *Baccharis trimera* coletada no outono via GC × GC. Os compostos já identificados via GC-FID estão destacados em negrito..... 54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar da espécie *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) e sua distribuição geográfica..... 7

Figura 2. Exemplar da espécie *Baccharis trimera* (Asteraceae) e sua distribuição geográfica..... 8

Figura 3. Precursores dos terpenóides..... 13

Figura 4. Estruturas de monoterpenóides presentes em algumas espécies de *Baccharis*..... 15

Figura 5. Estruturas de sesquiterpenóides presentes em algumas espécies de *Baccharis*..... 15

Figura 6. Fatores que alteram o conteúdo metabólico secundário..... 17

Figura 7. Esquema do cromatógrafo a gás: 1: fonte do gás de arraste; 2: controlador da vazão e regulador de pressão; 3: sistema de injeção da amostra; 4: coluna cromatográfica; 5: sistema de detecção; 6: sistema de registro e tratamento de dados..... 20

Figura 8. Esquema de um equipamento GC/MS. 1: injetor; 2: coluna; 3: detector convencional(opcional); 4: forno; 5: interface; 6: câmara de ionização; 7: analisador de massas; 8: sistema de vácuo; 9: sistema de detecção; 10: sistema para controle do equipamento, registro e tratamento de dados..... 22

Figura 9. Esquema representativo de um sistema GC × GC. I: Injetor; D: detector; M: modulador; C1: coluna da primeira dimensão; C2: coluna da segunda dimensão..... 24

Figura 10. Construção de diagramas tridimensionais sinal × $^{1}t_R$ × $^{2}t_R$ em GC × GC..... 26

Figura 11. Localização geográfica do município de Piratini no estado do Rio Grande do Sul e no Brasil..... 29

Figura 13. Aparelho de Clevenger..... 30

Figura 14. Perfil quantitativo do óleo essencial da *B. articulata* coletada em Piratini, RS, Brasil, nas diferentes estações de 2008..... 34

Figura 15. Perfil quantitativo do óleo essencial da *B. trimera* coletada em Piratini, RS, Brasil, nas diferentes estações de 2008..... 36

Figura 16. Cromatograma do óleo essencial da *B. articulata* coletada no outono obtido via GC-FID. Identificação dos picos apresentados na Tabela 4. Condições cromatográficas descritas na metodologia..... 38

Figura 17. Cromatogramas do óleo essencial da *B. articulata* via GC-FID nas quatro estações do ano de 2008, com a identificação dos picos de compostos que não foram presentes ao longo de todo ano segundo o descrito na Tabela 4..... 41

Figura 18. Variabilidade sazonal das principais classes constituintes do óleo essencial da *Baccharis articulata* coletada em Piratini, RS, Brasil, em 2008..... 42

Figura 19. Perfil quantitativo dos componentes majoritários do óleo essencial da *Baccharis articulata* coletada em Piratini, RS, Brasil, nas diferentes estações de 2008..... 42

Figura 20. Representações da separação obtida por GC × GC/TOFMS para o óleo de *B. articulata* coletada no verão do ano de 2008..... 45

Figura 21. Diagrama de cores demonstrando as principais classes de compostos químicos presentes no óleo essencial da *B. articulata* coletada no verão do ano de 2008..... 46

Figura 22a. Diagrama de cores do GC × GC das amostras de óleo essencial da *B. articulata* obtido na primavera e outono do ano de 2008. (CRBP-Primavera, CRBO-Outono)..... 47

Figura 22b. Diagrama de cores do GC × GC das amostras de óleo essencial da *B. articulata* obtido no inverno e verão do ano de 2008. (CRBI-Inverno, CRBV-Verão)..... 48

Figura 23. Cromatograma do óleo essencial da *B. trimera* coletada no outono obtido via GC-FID. Identificação dos picos apresentados na Tabela 6. Condições cromatográficas descritas no método..... 49

Figura 24. Cromatogramas do óleo essencial da *B. trimera* via GC-FID nas quatro estações do ano de 2008, com a identificação dos picos de compostos que não foram presentes ao longo de todo ano segundo o descrito na tabela 6..... 51

Figura 25. Perfil quantitativo dos componentes majoritários do óleo essencial da *Baccharis trimera* coletada em Piratini, RS, Brasil, nas diferentes estações de 2008..... 53

Figura 26. Variabilidade sazonal das principais classes constituintes do óleo essencial da *Baccharis trimera* coletada em Piratini, RS, Brasil, em 2008..... 53

Figura 27. Diagrama de cores da separação obtida por GC × GC/TOFMS para o óleo de *B. trimera* coletada no outono. Os compostos estão identificados na Tabela 7..... 56

Figura 28a. Diagrama de cores do GC × GC das amostras de óleo essencial da *B. trimera* obtido na primavera e outono do ano de 2008. (CRVP-Primavera e CRVO-Outono)..... 57

Figura 28b. Diagrama de cores do GC × GC das amostras de óleo essencial da *B. trimera* obtido no inverno e verão do ano de 2008. (CRVI-Inverno e CRVV-Verão)..... 58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

GC × GC	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente, do inglês *Comprehensive two-dimensional gas chromatography*
SPME	Micro extração em fase gasosa, do inglês *Solid phase micro extraction*
SFE	Extração com fluído supercrítico, do inglês *Super critical fluid extraction*
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama, do inglês *Gas chromatography flame ionization detector*
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de masssas, do inglês *Gas chromatography mass spectrometry*
Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
Isopentenil-PP	Isopentenil pirofosfato
GC	Cromatografia gasosa, do inglês *Gas chromatography*
IK	Índice de Kovats
MS	Espectrometria de Massas, do inglês *Mass spectrometry*
ppb	Partes por bilhão
NIST	Instituto nacional de padrões e tecnologias, do inglês *National Institute of Standards and Technology*
^{1}**D**	Primeira dimensão
^{2}**D**	Segunda dimensão
TOFMS	Espectrometria de massas por tempo de vôo, do inglês *Time-of-flight mass spectrometry*
GC × GC/TOFMS	Cromatografia gasosa bidimensiol abrangente acoplada a um espectrômetro de massas por tempo de vôo, do inglês, *Comprehensive two-dimensional gas chromatography using a time-of-flight mass spectrometric detector*
GC × GC – FID	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector de ionização em chama, do inglês *Comprehensive two-dimensional gas chromatography flame ionization detector*
$^{1}t_{R}$	tempo de retenção na primeira dimensão
$^{2}t_{R}$	tempo de retenção na segunda dimensão
CRBV	carqueja branca colhida no verão
CRBO	carqueja branca colhida no outono
CRBI	carqueja branca colhida no inverno
CRBP	carqueja branca colhida na primavera
CRVP	carqueja verde colhida na primavera
CRVO	carqueja verde colhida no outono
CRVV	carqueja verde colhida no verão
CRVI	carqueja verde colhida no inverno

INTRODUÇÃO

As carquejas pertencem à família *Asteraceae* e ao gênero *Baccharis.* Este gênero possui uma grande diversidade, sendo que somente no sul do Brasil são encontradas cerca de 20 espécies diferentes. *B. articulata* (carqueja branca) e *B. trimera* (carqueja verde) são as espécies mais eminentes no Rio Grande do Sul e apresentam distribuição ampla com a formação de populações numerosas que contribuem significativamente para a fitofisionomia da região além de seus componentes majoritários possuírem atividade biológica[1].

A composição dos óleos essenciais tem sido objeto de muitas pesquisas pois sua aplicação tanto na industria farmacêutica quanto na perfumaria e alimentos tem crescido nos últimos anos. Os óleos também contribuem para a identificação das espécies botânicas, fato este muito útil ao se tratar das plantas do gênero *Baccharis* que em alguns casos apresentam descrição botânica muito semelhante.

Os óleos essenciais podem ser extraídos de diversas maneiras, sendo a técnica de arraste de vapor a mais utilizada delas, para então serem analisados via cromatografia. Os principais constituintes dos óleos essenciais são os terpenóides, sejam eles oxigenados ou não, muito presentes nas espécies de *Baccharis* analisadas, principalmente os constituintes β-pineno,espatulenol, ledol e acetato de carquejila.

No entanto essa constituição não é constante, pois muitos fatores ambientais como o solo, clima, altitude, temperatura e a sazonalidade podem influenciar diretamente no metabolismo secundário das plantas justificando dessa maneira a infinidade de pesquisas na área de produtos naturais, pois não há como fixar a composição química de uma planta, onde altera-se um fator há uma grande probabilidade de variação qualitativa e quantitativa dos constituintes do ser vivo.

Entre as técnicas empregadas para a avaliação dos óleos essenciais está a cromatografia gasosa que se acoplada a detector por ionização de chama e com o uso de padrões favorece o cálculo do índice de retenção de Kovats que favorece a identificação dos constituintes, bem como o emprego da espectrometria de massa acoplada a cromatografia graças ao uso de bibliotecas como NIST e Wiley. Porém muitos compostos que possuem concentração extremamente baixa ou que co-

eluem com componentes majoritários acabam não sendo identificados pela cromatografia monodimensional, e aí está a maior vantagem do uso da técnica bidimensional.

A Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC) é uma técnica cromatográfica multidimensional que utiliza duas colunas capilares ligadas em série por uma interface denominada modulador. Entre as suas principais vantagens, podem ser destacadas sua maior capacidade de pico, separação e sensibilidade, além da estruturação dos componentes de misturas complexas no espaço bidimensional. O conjunto desses fatores permite observar a presença de compostos que co-eluem na cromatografia gasosa monodimensional, ou que, por estarem presentes em nível de traços, não são percebidos. Além dessas vantagens ainda existe a disponibilidade dos diagramas bidimensionais, que tornam mais simples as análises para controle de qualidade, comparações de perfis voláteis de dois ou mais tipos de óleos voláteis e detecção de adulterações nas amostras.

Considerando o exposto acima, o objetivo do presente trabalho foi diferenciar duas espécies do gênero *Baccharis* (carqueja verde e branca) quanto à composição química de seus óleos essenciais considerando a variação sazonal a fim de diagnosticar a melhor época de colheita da planta para obtenção dos princípios ativos, utilizando-se de cromatografia mono e bidimensional.

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. A planta

Dentre as plantas de maior uso popular, estão sem dúvida a *Baccharis articulata e a B. trimera*, conhecidas respectivamente por carqueja branca e verde. A carqueja branca é conhecida também por carqueja-doce, carqueja-fina, carqueja do morro, vassoura, carquejinha[2,3] e a verde possui outros nomes como carqueja, carqueja-amarga, carqueja-amargosa, bacárida, carcália, bacanta, bacorida, quina-de-condamine, carqueja-do-mato[4]. Essas espécies são angiospermas que pertencem ao gênero *Baccharis*, família Asteraceae, subtribo Baccharidina e a tribo Astereae[5].

1.1.1. Família Asteraceae

A Asteraceae é uma das famílias com maior sucesso na produção de compostos de defesa e esse seria um dos motivos de sua distribuição cosmopolita. A família Asteraceae possui cerca de 1500 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Cerca de 95% dos gêneros são constituídos por plantas de porte herbáceo e arbustivo e são encontrados em todos os tipos de habitats, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas da América do Sul[6,7]. A família Asteraceae concentra grande número de espécies com potencial terapêutico[8], usadas como anti-inflamatórios, anti-parasíticas, fungicida, bactericida e bacteriostática, além de ser aplicada na indústria de perfumes, cosméticos e medicamentos[9]. Suas aplicações medicinais e a presença de várias classes de metabólitos secundários faz considerar que a composição química é mais importante do que a morfologia na evolução dessa família[10].

1.1.2. Gênero *Baccharis*

Baccharis é o maior gênero da família Asteraceae, com cerca de 500 espécies distribuidas pelos continentes Norte e Sul Americano[11]. As espécies desse gênero estão presentes principalmente em regiões de clima temperado e tropical do

Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e Mexico[12]. No Brasil há 120 espécies descritas de *Baccharis*, a maioria na região sudoeste[7,13]. As espécies do gênero *Baccharis* constituem-se de arbustos em sua maioria e sua altura varia, em média, de 0,5 a 4 m. Apresentam elevado valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul, entre outras regiões do país[14], pois ajudam no combate à erosão e podem ser utilizadas como plantas ornamentais, embora também possam se apresentar como pragas de difícil combate em pastagens, podendo intoxicar o gado. Entretanto, o destaque maior está na medicina, onde várias espécies são utilizadas popularmente[5]. São amargas e consumidas, principalmente, na forma de chás, com as mais variadas indicações, desde males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes e doenças da próstata, sendo também descritas para o processo de desintoxicação do organismo[8,14-20]. Quanto a atividade biológica destacam-se os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos, hipoglicemiantes e anti-inflamatórios[9,21-23].

A fitoquímica do gênero *Baccharis* tem sido extensivamente estudada desde o século passado. Hoje, cerca de 150 compostos tem sido isolados e identificados a partir deste gênero[12]. Para o gênero existem relatos da presença de flavonóides, flavonas, flavononas, terpenos, taninos, saponinas, ácidos cumáricos, glicolipídeos, vitaminas e lactonas[3,10,21,22,24].

1.1.3. Espécie *Baccharis articulata*

Baccharis articulata (Lam.) Pers., conhecida como carqueja, carquejinha, carqueja-branca, carqueja-doce, carquejado-morro, carqueja-miúda e vassoura, é uma planta de sabor amargo, rica em saponinas[12,14,25,26]. Distribui-se geograficamente em países como a Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (Figura 1). Floresce de julho a outubro e sua frutificação e dispersão ocorrem logo após o florescimento e pode se estender até dezembro[1].

É empregada para uso interno na medicina popular como tônica, febrífuga, digestiva, diurética, antidiabética, hepatoprotetora, antianêmica e colagoga e, para uso externo, como anti-séptica e secante de ulcerações[12,14,25,26]. Na Argentina,

acredita-se que *B. articulata* tenha atividade no tratamento da impotência sexual masculina e da esterilidade feminina. No Paraguai, é usada como anti-hipertensiva[14]. Testes biológicos realizados com essa espécie detectaram atividade antiviral *in vitro,* antioxidante *in vitro,* antimicrobiana, antiflamatória e ação bactericida contra bactérias Gram-positivas, impedindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis, Staphylococcus epidermidis, Pseudhmonas aeruginosa, Bacillus subtilis* e de três bactérias Gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Salmonella setubal* [14,16,25].

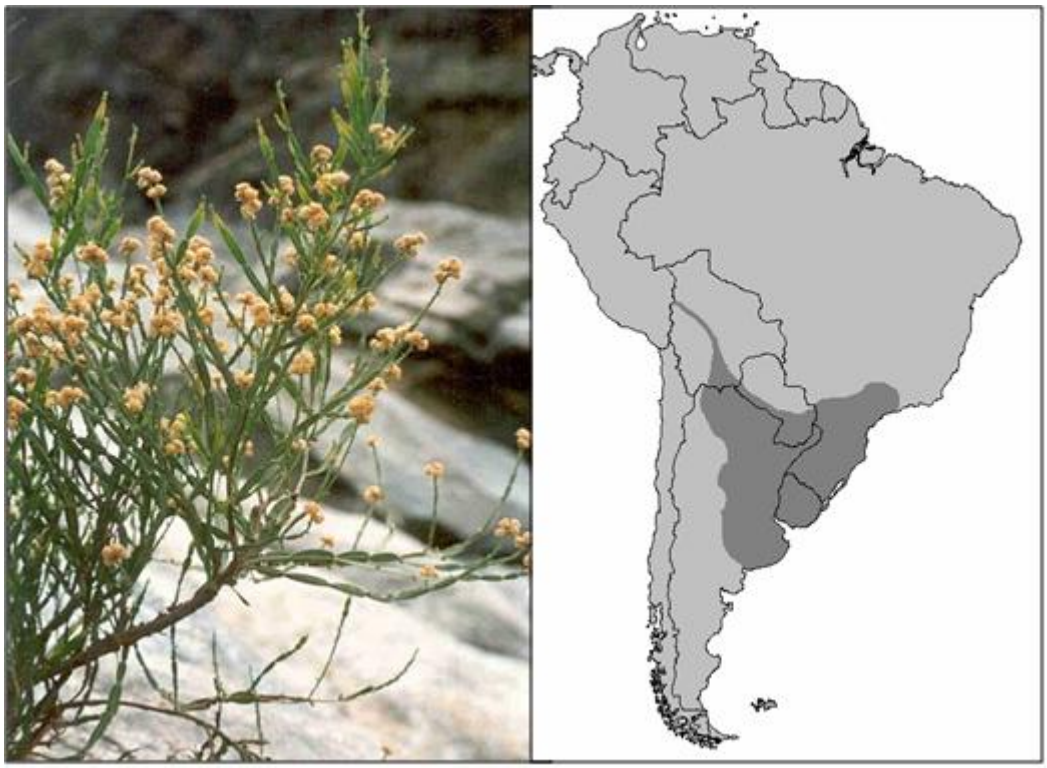


Figura 1. Exemplar da espécie *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae)[27] e sua distribuição geográfica[1].

1.1.4. Espécie *Baccharis trimera*

Baccharis trimera (Less.) DC. popularmente conhecida como carqueja, carquejinha, carqueja amarga ou vassoura pertence à família Asteraceae[28-30]. É também conhecida por diversas sinonímias no Brasil: *Baccharis genistelloides* var.

trimera, *Baccharis triptera*, *Caccalia decurrens*, *Coniza genistelloides*, *Molina reticulata* e *Molina trimera*. É uma planta herbácea, perene e ereta com até 80 cm de altura[11,28]. Floresce de dezembro a março e distribuem-se geograficamente na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai (Figura 2)[27].

Ocorre naturalmente em solos ácidos, pobres em nutrientes e matéria orgânica, pedregosos, margens das estradas, barrancos ou lugares úmidos nas ribanceiras dos rios e até 2.800 m de altitude, preferindo condições de pleno sol para seu crescimento[31]. Em solos férteis e úmidos, desenvolve-se de forma mais exuberante, apresentando resistência à geadas[28,30].

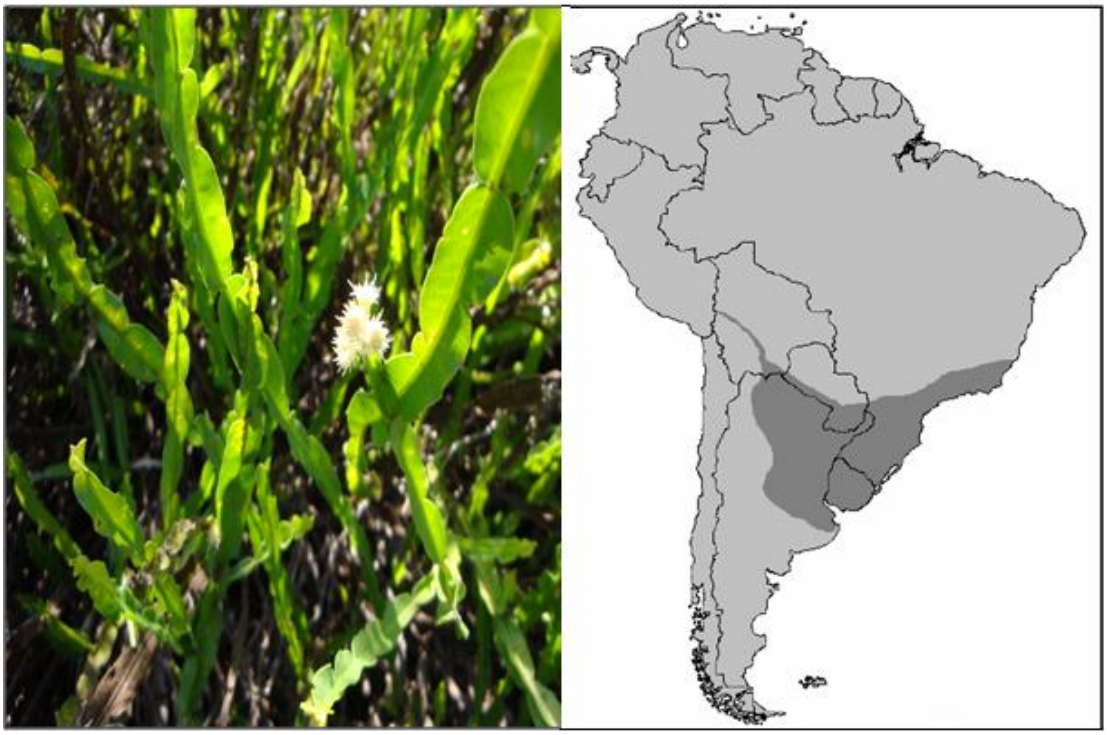


Figura 2. Exemplar da espécie *Baccharis trimera* (Asteraceae)[1] e sua distribuição geográfica[32].

As estruturas excretoras esquizógenas ocorrem com maior freqüência e dimensões nesta espécie, dado este que explicaria a boa quantidade de óleo essencial produzida por essa espécie[15]. Seu óleo essencial está composto principalmente por carquejol, acetato de carquejila e sesquiterpenos, além de palustrol, α e β-pineno, espatulenol entre outros. Também apresenta flavonóides como a quercetina, luteolina, nepetina, apigenina, rutina, hispidulina, eupatorina,

cirsimaritina, cirsiliol, diterpenos, taninos e saponinas[8,24,30,33-36]. Os vapores de carquejol, quando aspirados em grande quantidade são irritantes da mucosa ocular e nasal. Carquejol, em doses baixas, provoca efêmero efeito narcótico, bem como a redução da atividade motora. Em doses mais elevadas, os efeitos narcóticos são mais acentuados, além de provocar a redução da pressão arterial e do ritmo respiratório, aumento rápido da glicemia e redução de cerca de 5-10% do colesterol[9].

Na medicina popular é usada como diurética, tônica, digestiva, protetora e estimulante do fígado, anti-anêmica, anti-reumática, depurativa, para o controle da obesidade, angina, anemia, inflamação urinária, diabetes, hepatite e gastroenterites e cura de chagas ulceradas da pele[11,13,26,29,30,33-36]. Entre os efeitos biológicos desta planta, estão descritos a ação anti-inflamatória, antimutagênica, antiprotozoária, antimicrobiana, analgésica, hepatoprotetora, relaxante da musculatura lisa e recentemente demonstrou um importante potencial anti-ofídico. Estudos fitoquímicos demonstraram entre os componentes da *Baccharis trimera*, a presença de flavonóides e diterpenos, que seriam responsáveis por alguns dos efeitos citados acima[11,16,34,37-39].

Na agricultura é aproveitada pelas propriedades alelopáticas, retardando a velocidade na germinação de sementes, inibindo o crescimento micelial de fungos e de raízes de trigo; também é utilizada na indústria de cervejaria como substituto do lúpulo e na aromatização de refrigerantes e de licores[30].

1.2. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são os princípios odoríferos encontrados em várias partes da planta que realizam a função de adaptação da planta ao meio ambiente. Os nomes dados para estes óleos são devido às suas características físicas. Como se evaporam quando expostos ao ar em temperatura ambiente, sua principal característica, são denominados óleos voláteis. Como são solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter de petróleo, eles podem ser denominados óleos etéreos[7,40,41].

O termo óleo, provavelmente se origina do fato que o aroma de uma planta ocorre nas glândulas ou entre as células em forma líquida, o qual, como os óleos graxos, são imiscíveis em água. A palavra essencial é derivada do latim “quinta essência” que significava o quinto elemento, notação dada a esses óleos, já que a terra, o fogo, o vento e a água, foram considerados os quatro primeiros elementos[42].

Os óleos essenciais são, de uma maneira geral, misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, de baixo peso molecular extraídas tradicionalmente por processos de arraste de vapor[43-45]. À temperatura ambiente são geralmente líquidos de aparência oleosa (viscosos), de aroma agradável e intenso. São encontrados em cerca de 2000 espécies distribuídas em 60 famílias do reino vegetal[46]. Dentre as famílias estão a Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras[9].

Os óleos essenciais estão localizados em estruturas secretoras especializadas tais como cavidades, canais oleíferos, pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas[7].

A composição química do óleo essencial é particular de cada espécie. Os óleos voláteis obtidos de diferentes órgãos da mesma planta podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores bem distintos[46].

Geralmente, as plantas apresentam uma grande flexibilidade na produção de compostos químicos provocados pela variabilidade genética e fatores fisiológicos, a fim de aumentar o fluxo de energia obtido no primeiro metabolismo (fotossíntese), para o metabolismo secundário[47].

Em óleos voláteis de plantas já foram identificados cerca de 2000 compostos, incluindo hidrocarbonetos (terpenos, sesquiterpenos, entre outros), compostos oxigenados (alcoóis, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, éteres fenólicos, óxidos, entre outros) e compostos sulfurados. Quimicamente, esses compostos derivam dos terpenóides, decorrentes do ácido mevalônico, ou de fenilpropanóides, a partir do ácido chiquímico[7,41,43].

As características físicas dos óleos voláteis são comuns, apesar de apresentarem constituições químicas diferentes. Eles geralmente são insolúveis, ou muito pouco solúveis em água, mas solubilizam em álcool, éter e muitos solventes orgânicos. Eles apresentam odores únicos, índice de refração elevado e são opticamente ativos[40,48].

A quantidade de óleo varia de 0,01 a 10%. A variabilidade depende do quimiotipo, ciclo vegetativo, fatores extrínsecos – tipo de cultura, temperatura, umidade relativa, incidência da luz, colheita, secagem e armazenamento[9].

As plantas sintetizam os óleos voláteis que são armazenados em estruturas especializadas em secreção, tais como glândulas e dutos. A síntese pode ocorrer nas flores, frutos, folhas, raízes, cascas e madeira[7,43].

Biologicamente, os óleos essenciais realizam a função de assegurar a adaptação da planta ao meio ambiente, atuando na defesa contra o ataque dos predadores, atração de agentes polinizadores, a proteção contra a perda hídrica e aumento de temperatura e como inibidores de germinação[9,49]. Economicamente, são utilizados como aromatizantes em alimentos, cosméticos e produtos de limpeza industriais, bem como na medicina alternativa, devido às suas propriedades terapêuticas[7,9]. Atuam como analgésicos, anti-espasmódicos, antiviróticos, auxiliares na recuperação do tecido da pele, cicatrizantes, desinfetantes, expectorantes e relaxantes[36]. No entanto, apesar das características benéficas, os efeitos tóxicos destas substâncias não podem ser descartados, o que poderia levar de uma simples reação da pele aos efeitos convulsivos e psicotrópicos[7].

Devido à labilidade dos constituintes de óleos voláteis, a composição dos produtos de extração por vapor d'água pode diferir da mistura inicial do constituinte. Durante o processo de aquecimento, a acidez e a temperatura podem provocar hidrólise dos ésteres, rearranjos, isomerização, racemização e oxidação, com perdas significativas nos valores de tais substâncias[9].

A destilação por arraste de vapor de água se caracteriza pela sua extrema simplicidade: o material a ser extraído, geralmente moído ou triturado, é colocado em um recipiente através do qual se faz passar uma corrente de vapor de água, com

ou sem pressão. Como os óleos essenciais têm pressão de vapor mais elevada que a água acaba sendo arrastados pelo vapor de água e a mistura de vapores é conduzida a um condensador, onde os compostos são recolhidos em um separador[42].

O método ideal de destilação por arraste de vapor deve possibilitar a maior difusão possível do vapor e da água através das membranas da planta, para que a hidrólise e a decomposição sejam mínimas[40].

A extração com solventes orgânicos é feita em geral com solventes apolares (éter, éter de petróleo ou diclorometano) que, entretanto, extraem outros compostos lipofílicos, além dos óleos voláteis. Mas devido à alta quantidade de ceras e/ou outros compostos de alto peso molecular, freqüentemente dá origem a um concentrado com um aroma muito similar com o material do qual foi derivado. Por isso, os produtos assim obtidos raramente possuem valor comercial[41,50].

Como já citado, algumas técnicas convencionais de extração, podem resultar em alterações da composição química original destes óleos. O uso da micro extração na fase sólida (SPME) é uma alternativa mais branda de extração (menores temperaturas e tempo de extração), prevenindo transformações químicas e resultando em informações complementares sobre a composição de voláteis das plantas[51].

Outra técnica de obtenção de extratos mais puros, ou seja, sem a presença de artefatos, é a extração com fluido supercrítico (SFE), que permite obter determinadas frações, através da variação de temperatura e pressão[52].

Após a extração, purificação e concentração, os óleos essenciais devem ser analisados quali e quantitativamente, de forma geral pela cromatografia gasosa (GC-FID e GC/MS).

1.3. Composição química: os terpenóides

Os terpenóides distribuem-se amplamente na natureza, sendo encontrados em abundância nas plantas superiores. Alguns fungos produzem vários terpenóides interessantes, e os organismos marinhos são uma fonte prolífica de terpenóides pouco comuns. São encontrados também em feromônios de insetos e em suas secreções de defesa[40,41,45,53].

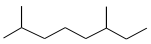
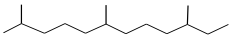
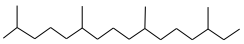
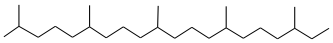
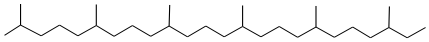
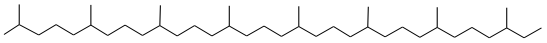
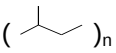
Segundo Robbers e colaboradores[40] há mais de 20 mil diferentes terpenóides isolados de fontes naturais. Os terpenóides de origem vegetal têm papel importante nas discussões sobre ecologia química, pois desempenham funções importantes como insentífugos, agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, feromônios, hormônios vegetais e moléculas de sinalização. Esses compostos são definidos como substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (2-metil-1,3-butadieno), cuja fórmula molecular é C_5H_8.

As unidades do isopreno originam-se biogeneticamente do Acetil-CoA por via do ácido mevalônico que, ao sofrer fosforilação e descarboxilação, gera o isopentenilpirofosfato (isopentenil-PP) que se isomeriza a dimetilalilpirofosfato (Figura 3). A condensação destes isômeros, seguida de posteriores incorporações de unidades de isopentenil-PP, leva à formação de todos compostos terpenóides[40,41,45,53].

Figura 3. Precursores dos terpenóides[45]

As classes de terpenóides obtidas graças a esse fenômeno de isomerização do isopreno estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Unidade do isopreno e a formação dos terpenos[41]

Nº Unidades	Nº átomos de C	Fórmula Molecular	Esqueleto	Nome ou Classe
1	5	C_5H_8		Isopreno
2	10	$C_{10}H_{16}$		Monoterpenos
3	15	$C_{15}H_{24}$		Sesquiterpenos
4	20	$C_{20}H_{32}$		Diterpenos
5	25	$C_{25}H_{40}$		Sesterpenos
6	30	$C_{30}H_{48}$		Triterpenos
8	40	$C_{40}H_{64}$		Tetraterpenos
N	N	$C_{5n}H_{8n}$		Polisoprenos

Os terpenóides podem ser classificados em acíclicos (cadeia aberta), cíclicos (mono e bi), aromáticos e outros. Nos óleos voláteis encontram-se somente os terpenos mais voláteis, que possuem baixo peso molecular como os mono (10C) e sesquiterpenos (15C) [40,41,45,53].

Hoje em dia são conhecidos mais de mil monoterpenóides naturais, a maioria proveniente de plantas superiores, sendo que nos últimos anos foi isolado um certo número de monoterpenóides halogenados a partir de microorganismos marinhos[41,45,53].

Suas características principais são a volatilidade e o odor intenso, sendo eles os componentes mais comuns das plantas responsáveis pelos aromas[40,41,45,53].

Os monoterpenos podem ser acíclicos (mirceno e ocimenos), monocíclicos (α e γ-terpineno, *p*-cimeno) ou bicíclicos (pinenos, Δ^3-careno, canfeno, sabineno). Às vezes constituem mais de 90% do óleo essencial das plantas em geral. Além de hidrocarbonetos, em sua estrutura podem apresentar as funções alcoóis (linalol, α-terpineol) aldeídos, cetonas, ésteres (acetato de carquejila), éteres (1,8-cineol), peróxidos e fenóis[40,41,45,53]. Segundo Agostini e colaboradores[54] em algumas

espécies de *Baccharis* encontram-se os monoterpenóides cujas estruturas são apresentadas na Figura 4.

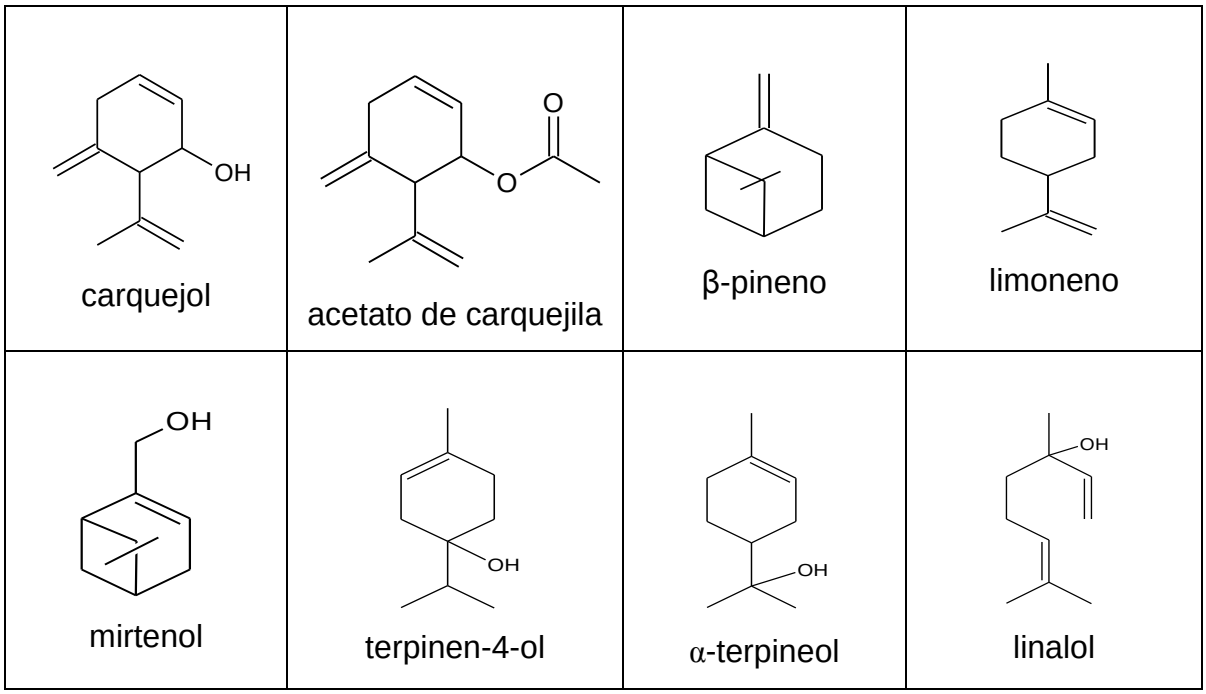


Figura 4. Estruturas de monoterpenóides presentes em algumas espécies de *Baccharis*[55]

Os sesquiterpenos apresentam grande variedade de estruturas, sendo mais freqüentes os hidrocarbonetos, álcoois e cetonas. Dentre alguns sesquiterpenos característicos em óleos essenciais, estão hidrocarbonetos mono ou policíclicos (β-cariofileno, α-eudesmol, β-elemeno), álcoois, cetonas, aldeídos e ésteres[40,41,45,53]. Segundo Agostini e colaboradores[54] em algumas espécies de *Baccharis* encontram-se os sesquiterpenóides cujas estruturas são apresentadas na Figura 5.

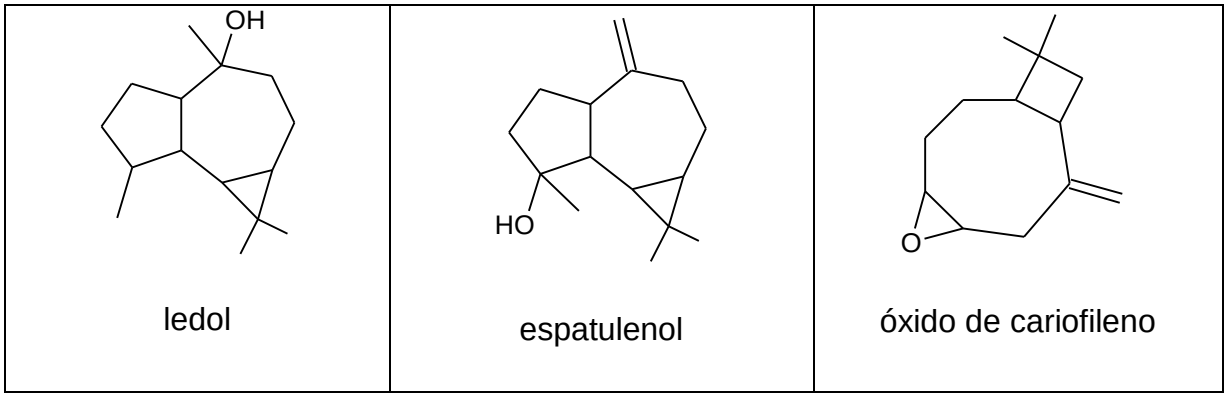


Figura 5. Estruturas de sesquiterpenóides presentes em algumas espécies de *Baccharis*[55]

Devido à presença de insaturação na sua molécula, os terpenóides tendem a se oxidar e rançar os óleos, por isso a indústria procura realizar o processo de retirada desses terpenóides (desterpenação) através de destilação fracionada[42].

Uma outra alternativa é a realização da extração do óleo essencial com fluido supercrítico, pois o CO_2 utilizado é mais seletivo, porque permite a extração dos compostos desejados ajustando os valores da pressão e da temperatura. Dessa forma os monoterpenos responsáveis pelo processo oxidativo não são extraídos[42].

1.4. Fatores de influência na composição dos metabólitos

Então ao traçar-se esse perfil químico torna-se necessário levar em consideração diversos aspectos que podem influenciar na constituição química seja dos extratos quanto dos óleos essenciais obtidos. Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o meio ambiente circundante, portanto, sua síntese é freqüentemente afetada por condições ambientais[56].

Dentre os fatores que podem influenciar na composição química do óleo essencial estão a sazonalidade, o ciclo de crescimento vegetativo, a temperatura, a disponibilidade hídrica, a radiação ultravioleta, os nutrientes do solo, a altitude, a poluição atmosférica, a indução por estímulos mecânicos e o ataque de patógenos (Figura 6), além da localização geográfica, tempo de colheita e o processo de obtenção do óleo[7,41,45,56,57].

O ambiente em que o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo influem na composição química dos óleos essenciais. A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao Sol e o regime de ventos exercem influência direta, principalmente nas espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo na superfície. Por outro lado, nos vegetais em que a localização de tais estruturas é mais profunda, a qualidade dos óleos é mais constante[58].

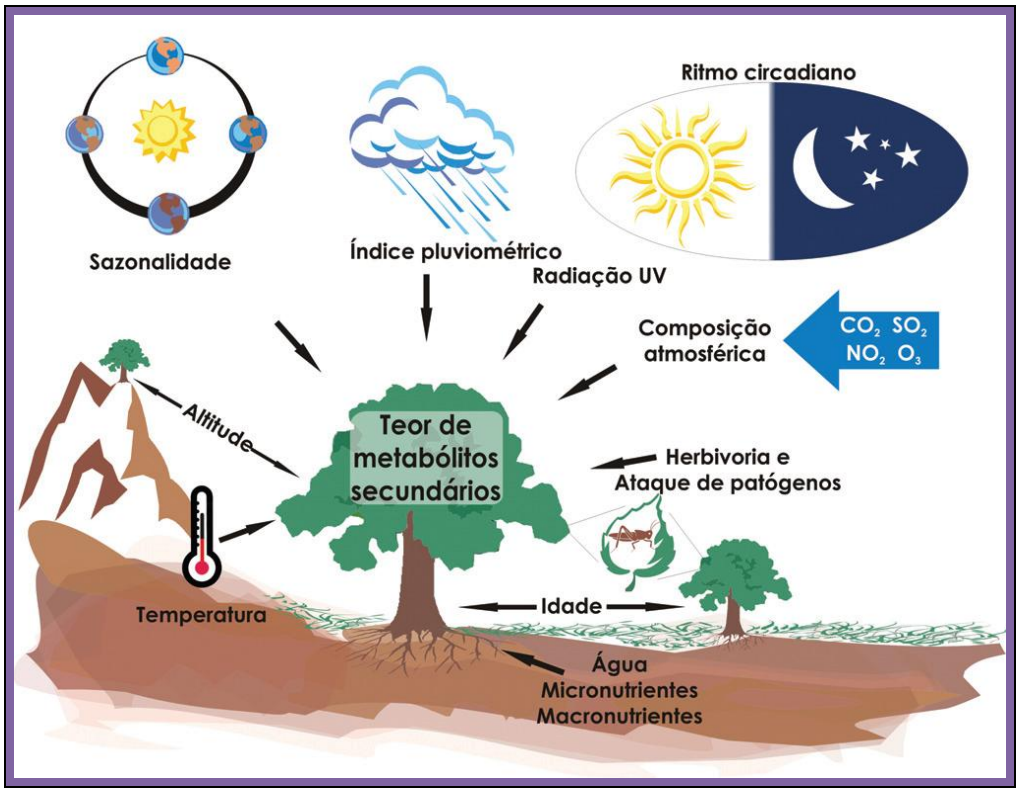


Figura 6. Fatores que alteram o conteúdo metabólico secundário[56]

Hess e colaboradores (2007)[59] avaliaram a influencia sazonal na composição química da *Elyonurus muticus* e observaram que os sesquiterpenóides β-cariofileno, biciclogermacreno, espatulenol e óxido de cariofileno foram os principais compostos identificados e que suas porcentagens no óleo essencial mudaram de acordo com o período de colheita da planta. O β-cariofileno foi o componente majoritário no inverno e na primavera enquanto que o biciclogermacreno foi superior no verão e no outono. O óxido de cariofileno e o espatulenol que possuem ação bactericida contra a *Staphylococcus aureus*, tiveram maior rendimento na primavera, concluindo dessa forma que essa é a melhor estação de colheita da planta quando o objetivo é sua ação bactericida.

Ao avaliar a influencia dos raios UV-B na produção de voláteis da *Ocimum basilicum* L., Johnson e colaboradores (2002)[60], observaram que o teor de óleo essencial foi dependente também da idade das folhas analisadas. O valor foi muito maior nas folhas em desenvolvimento sob o tratamento com UV-B das que não

passaram por esse processo. Mas o aumento significativo se deu nas folhas maduras em que o tratamento com UV-B duplicou o conteúdo de voláteis.

Palá-Paúl e colaboradores (2001)[61] avaliaram a produção de metabólitos secundários da *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia* de acordo com as condições climáticas. Apesar de alguns componentes apresentarem composição aleatória ou constante, outros como o capileno teve suas concentrações aumentadas quando as condições lhe foram favoráveis, nesse caso, presença de precipitação. Compostos como o β-felandreno, o limoneno e o 1,8-cineol tiveram suas concentrações aumentadas quando a temperatura diminuía.

Durante a pesquisa com uma população de plantas da espécie *Leontodon hispidus* L., Zidorn e Stuppner (2001)[62] observaram que a altitude influenciava na composição química das plantas, pois, as amostras provenientes de diferentes altitudes apresentaram correlação positiva quanto ao conteúdo total de flavonóides, ao contrário dos ácidos fenólicos que não mostraram variação significativa.

O efeito do ferimento mecânico sobre o metabolismo do alcalóide foi analisado em amostras de *Catharanthus roseus*. O ferimento induziu um aumento na acumulação de ajmalicina e de vindolina, enquanto o teor de catarantina permaneceu inalterado. Os efeitos foram detectados entre 12 e 24 h após o dano mecânico e, aparentemente, resultou na transformação acelerada do intermediário tabersonina em vindolina[63].

Silva e colaboradores (1999)[64] atestaram a influência do ritmo circadiano na composição química do óleo essencial da *Ocimum gratissimum*, pois o teor de eugenol que era de 98% às 12 h foi para 11% às 5 h do dia seguinte. Este resultado mostrou a influencia da luz solar na produção desse metabólito, indicando o melhor horário para a coleta da planta.

Ao avaliar a produção de fitomassa de folhas, o teor e a qualidade do óleo essencial de *Mentha x gracilis Sole* cultivada em quatro doses diferentes de potássio, Garlet e colaboradores (2007)[65], observaram que as concentrações de K alteraram a produção de fitomassa fresca de folhas, o teor e a qualidade do óleo essencial. A dose máxima de K proporcionou aumento no teor do óleo essencial,

porém reduziu a acumulação de fitomassa das folhas, diminuindo o rendimento do óleo por planta e a quantidade de linalol, o principal constituinte desse quimiotipo.

Como mostram os exemplos citados acima, a constância da concentração dos metabólitos secundários na planta é praticamente uma exceção. Porém estudos recentes revelaram que as concentrações desses metabólitos permaneceram constantes em espécies vegetais selvagens, amostradas diretamente de seu habitat natural[66].

O reconhecimento dessas variações poderá, no futuro, auxiliar na ampliação dos conhecimentos sobre interações ecológicas do vegetal com seu ambiente, além, é claro, de contribuir significativamente na justificativa de uma rigorosa análise química das plantas destinadas ao uso terapêutico.

1.5. Análise instrumental

1.5.1. Cromatografia gasosa (GC)

A cromatografia é um método de separação no qual os componentes de uma amostra são distribuídos entre duas fases: uma dessas fases é a estacionária com uma grande superfície, e a outra é uma fase móvel que percola através do leito fixo[67].

No sistema cromatográfico a mistura de solutos é levada a migrar através da fase estacionária, por meio de fluxo constante da fase móvel, sendo a diferença de velocidade de migração provocada por processo de competição pelo soluto, entre as duas fases, em função de uma dada propriedade[68].

Na cromatografia gasosa a amostra líquida volátil ou gasosa é inserida no injetor, vaporizando rapidamente. O vapor é arrastado através da coluna por meio de um gás de arraste (fase móvel) onde ocorre a interação com a fase estacionária que geralmente é um líquido não-volátil ou um sólido, depois os analitos separados fluem pelo detector, cuja resposta é observada em computador[69] (Figura 7).

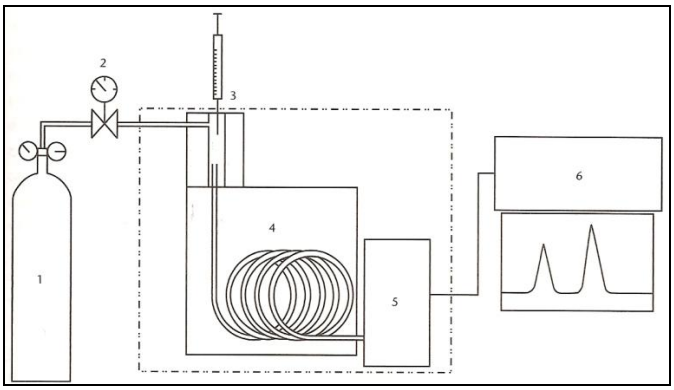


Figura 7. Esquema do cromatógrafo a gás: 1: fonte do gás de arraste; 2: controlador da vazão e regulador de pressão; 3: sistema de injeção da amostra; 4: coluna cromatográfica; 5: sistema de detecção; 6: sistema de registro e tratamento de dados[70].

A cromatografia gasosa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas. Além de possuir um alto poder de resolução, é muito atrativa devido à possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas (10^{-9}-10^{-12} g). A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou estável termicamente, embora amostras não voláteis ou instáveis possam ser derivadas quimicamente. Pode ser utilizada para separações preparativas apenas na faixa de microgramas a miligramas, não sendo muito empregada para esse fim[71].

Além de permitir a separação das substâncias presentes em uma amostra, a cromatografia pode ser usada para a identificação destes compostos. A identificação pode ser feita comparando-se o tempo de retenção de um padrão com o tempo de retenção ajustado da amostra, pois dois ou mais compostos podem ter o mesmo tempo de retenção em determinadas condições de análise. Pode-se ainda relacionar o logaritmo de um dado de retenção com uma propriedade da amostra como a temperatura de ebulição, número de átomos de carbono, massa molar, etc [70].

Para ser mais independente das variações do tempo de retenção, sob condições diferentes de medida, foi introduzido o índice de Kovats (IK) que relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos. Tais índices permitem uma comparação melhor dos dados entre laboratórios diferentes[41,72].

O índice de retenção para um alcano de cadeia linear é igual a 100 vezes o número de átomos de carbono. Para o octano, IK=800, e para o nonano , IK=900. Um composto eluído entre o octano e o nonano terá um índice de retenção entre 800 e 900. Esse valor pode ser determinado, usando-se um gráfico, que relaciona o número (Z) de átomos de carbono de alcanos saturados normais com o logaritmo dos tempos de retenção ajustados (t'_R) desses alcanos, ou pelo cálculo, aplicando-se a equação de Kovats[69] conforme descrita abaixo:

$$I = 100\,Z + 100\,(\log t'_{R(X)} - \log t'_{R(Z)} / \log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{R(Z)}$$

Adams (2001)[55] elaborou uma tabela com os índices de Kovats para compostos voláteis que permitem uma comparação com componentes da amostra. Os valores encontram-se entre 900 (volátil) e 1900 (menos volátil). Como duas substâncias podem ter, por acaso, o mesmo índice de Kovats muito parecidos em uma coluna, é recomendável usar pelo menos duas colunas com polaridades diferentes. Se os IK de uma substância e de um padrão são muito próximos, usando as duas colunas é muito provável que seja a mesma substância[41].

Para ter mais segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico, é recomendável analisar um óleo volátil também por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

1.5.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS)

A identificação confirmatória de um composto em uma mistura complexa, analisada por GC, requer necessariamente a obtenção da impressão digital, isto é, espectral, do composto. A informação complementaria a dos tempos de retenção, obtidos por GC, é o espectro de massas, que apresenta uma combinação única de fragmentos carregados (íons) gerados durante a dissociação ou fragmentação da molécula, previamente ionizada. A complementaridade da análise cromatográfica com dados espectrais confirmatórios se obtém usando-se a combinação GC/MS[73].

O acoplamento GC/MS combina as vantagens de ambas as técnicas: o alto poder de resolução e a velocidade de análise do GC, enquanto que o MS prevê identificação dos compostos e análises quantitativas em nível de ppb[67].

A GC/MS consta de um cromatógrafo, usualmente com coluna capilar, uma interface para ligação dos dois sistemas, uma câmara de ionização onde os íons são formados, uma câmara mantida sob vácuo onde ocorre a separação destes e um sistema para a detecção dos íons, acoplado a um sistema de registro com um programa para a interpretação dos dados obtidos (Figura 8)[70].

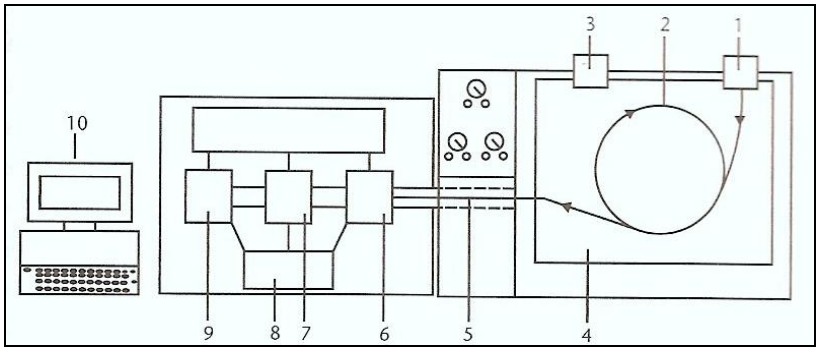


Figura 8. Esquema de um equipamento GC/MS. 1: injetor; 2: coluna; 3: detector convencional(opcional); 4: forno; 5: interface; 6: câmara de ionização; 7: analisador de massas; 8: sistema de vácuo; 9: sistema de detecção; 10: sistema para controle do equipamento, registro e tratamento de dados[70].

O espectro da amostra é comparado com os das substâncias da biblioteca e o computador faz propostas de probabilidade quanto à identidade da substância analisada[41].

Quando se usa índices de retenção e espectros de massas, extraídos da literatura especializada como a tabela descrita por Adams[55], ou das bases de dados (NIST, Wiley, Adams, entre outras), e se comparam com os parâmetros espectroscópicos e cromatográficos da substância problema, a coincidência conduz a um reconhecimento de sua estrutura, embora não haja uma identificação absoluta, inequívoca[73].

Graças às vantagens como a simplicidade, rapidez e a precisão da análise o uso da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas difundiu-se em

todo mundo, de maneira que seus resultados são aceitos nas mais diversas instâncias e aplicação do método acaba ocorrendo tanto na industrial quanto nos laboratórios de pesquisa.

1.5.3. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC)

Muitas amostras como petróleo e derivados, aromas naturais e alimentos são muito complexas para que se possa atingir a separação de seus componentes em uma só fase estacionária, pois muito de seus constituintes estão presentes em quantidades traço e acabam coeluindo com compostos que se encontram em maior quantidade. Essa coeluição representa um problema real para detecção, identificação e quantificação dos compostos de interesse.

Uma maneira mais eficiente de melhorar a resolução é alterar o valor do fator de separação. Isso pode ser alcançado através da cromatografia gasosa multidimensional, usando-se fases estacionárias distintas. Atualmente uma das técnicas empregadas é a cromatografia gasosa bidimensional abrangente.

Desde que foi descrita pela primeira vez em 1991 por Phillips e Liu, a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC) foi reconhecida com um método capaz de fornecer uma capacidade significativamente maior de picos (poder de separação) para análise de amostras complexas[74].

Para que uma técnica cromatográfica multidimensional seja considerada abrangente, todo o efluente da primeira dimensão (^{1}D), ou uma parte suficientemente representativa do mesmo, deverá ser introduzido na segunda dimensão (^{2}D), mantendo as características da separação ocorrida na primeira dimensão. Se apenas algumas regiões da primeira dimensão forem introduzidas na segunda, a técnica será multidimensional, mas não abrangente[75].

A cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC, “Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography”) é caracterizada, além da abrangência, pela ortogonalidade obtida pela utilização sequencial de duas colunas

cromatográficas, uma convencional (que normalmente contém uma fase estacionária não-polar) e a outra curta (do tipo de coluna usada para “fast-GC”) e polar. As duas fases estacionárias devem proporcionar mecanismos de separação diferentes, independentes um do outro (ortogonais), a fim de que se alcance o melhor resultado ao final do processo cromatográfico. Assim, se na primeira dimensão os compostos são separados por volatilidade ao utilizar-se uma coluna apolar, na segunda dimensão que é mais curta e polar, podendo ser considerada isotérmica, a contribuição da volatilidade não existirá e o processo de separação dar-se-á por interações específicas como a polaridade. Dessa forma, teremos portanto um sistema ortogonal[76,77].

Na GC × GC (Figura 9) é fundamental o uso de uma coluna de segunda dimensão (^{2}D) curta e eficiente. Misturas simples (como as frações coletadas e transferidas) podem ser separadas em alguns segundos, possibilitando ciclos de modulação rápidos e fracionamento completo da amostra eluída, sem aumento significativo do tempo total de análise em relação a uma separação por GC monodimensional[78].

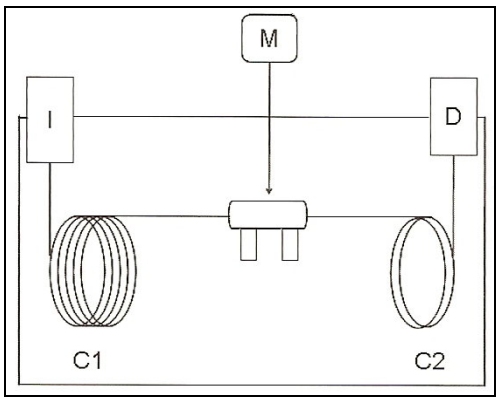


Figura 9. Esquema representativo de um sistema GC × GC. I: Injetor; D: detector; M: modulador; C1: coluna da primeira dimensão; C2: coluna da segunda dimensão[79].

O sistema de modulação entre as duas colunas causa uma compressão da banda cromatográfica que elui da primeira coluna, e esta banda é direcionada para a coluna de menor tamanho, de forma que a separação na segunda coluna é extremamente rápida e preservando a separação obtida na primeira dimensão[76,80].

Os períodos de modulação devem ser ajustados a fim de que sejam compatíveis com o tempo de separação na segunda coluna, minimizando o alargamento da banda comprimida. Desta forma, a sensibilidade é significativamente incrementada (relação sinal/ruído aproximadamente 10 vezes maior) e a resolução aumenta de forma expressiva, se comparada à cromatografia gasosa monodimensional (1D-GC, “One-Dimensional Gas Chromatography”). A combinação de duas colunas cromatográficas com mecanismos de separação ortogonais entre si leva a um significativo aumento de seletividade, uma maior capacidade de observação de picos[76,77].

A integração de um detector de MS com GC × GC proporciona maior capacidade de identificar os componentes secundários, determina os membros da série homóloga, e caracteriza os picos padrões ordenados dos componentes relacionados que são visíveis no cromatograma GC × GC [81].

Quando um detector de espectrometria de massas é usado, cada pico resolvido do GC × GC rende um componente único, a livre interferência do espectro de massa leva a correspondência exata com a massa de bibliotecas espectrais, favorecendo a identificação do pico[82].

O uso do espectrômetro de massas por tempo de vôo (TOFMS) acoplado ao GC × GC tem despertado interesse na comunidade científica. Pois esse instrumento oferece alta capacidade de aquisição de dados (por exemplo, 200 Hz ou mais rápido) com uma série de recursos não disponíveis no espectrômetro de massas quadrupolares. Para análises GC × GC, o TOFMS fornece a validação da separação pela cromatografia bidimensional de amostras complexas, pois a identificação do espectro de massas é possível, especialmente quando padrões individuais não estão totalmente disponíveis[74].

O GC × GC/TOFMS é um meio muito poderoso de análise de estruturas de substâncias desconhecidas enquanto que o GC × GC – FID proporciona maior precisão quantitativa. A combinação de ambos seria um meio ideal para uma performance abrangente do GC × GC em análise qualitativa e quantitativa[77].

O processo de aquisição de dados durante a análise por GC × GC gera um grande número de cromatogramas curtos obtidos nas análises da segunda dimensão (etapa 1. Modulação). Ao passar por esse processo obtém-se um cromatograma bruto correspondente ao somatório de todos os cromatogramas obtidos na ^{2}D. A transformação desses dados brutos em um cromatograma bidimensional é realizada através de um software específico (etapa 2. Transformação). O registro desses cromatogramas, associado ao período de modulação e ao tempo de início de processo de modulação permite que sejam construídos gráficos tridimensionais com o sinal do detector, o tempo de retenção na ^{1}D e o tempo de retenção na ^{2}D (Figura 10)[79].

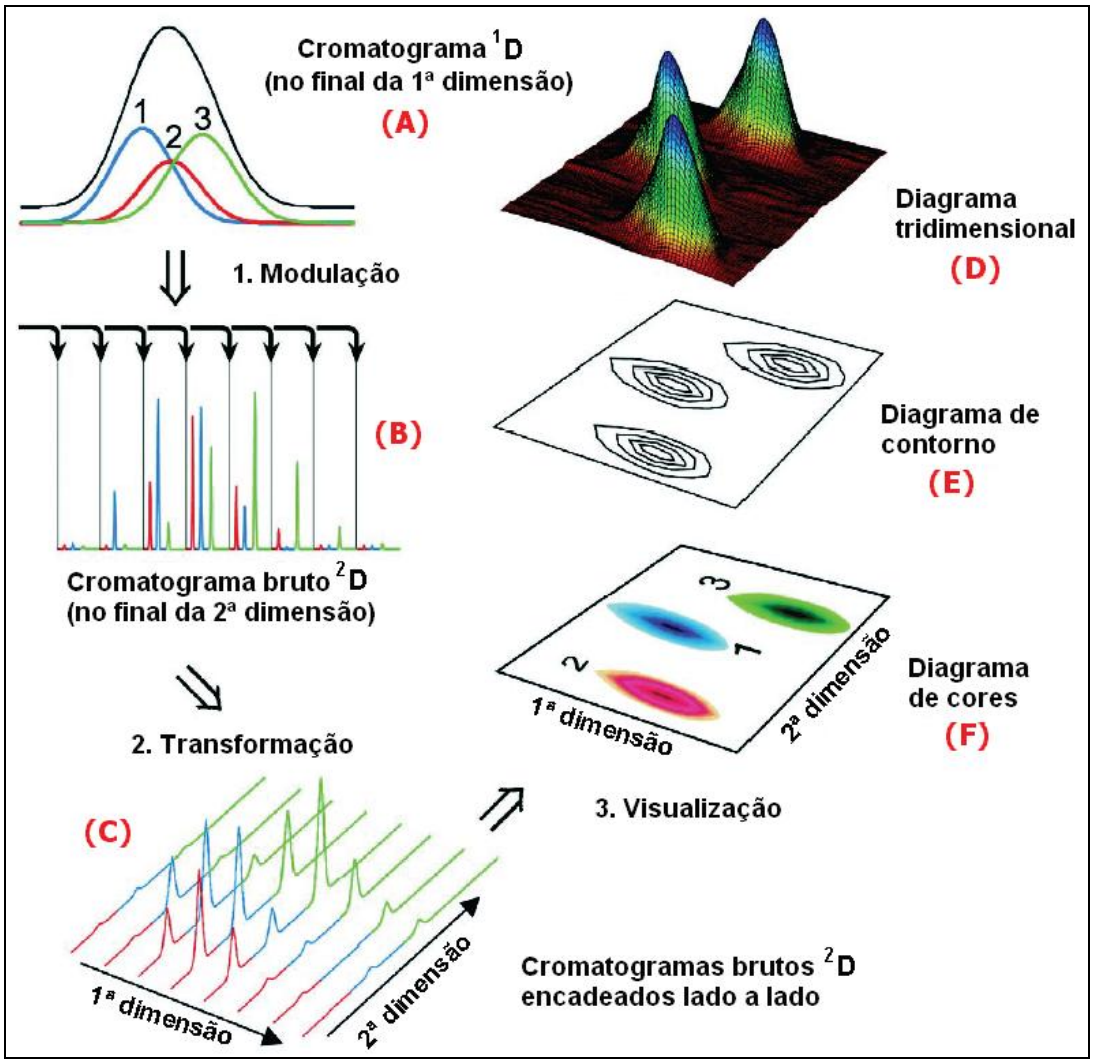


Figura 10. Construção de diagramas tridimensionais sinal × $^{1}t_R$ × $^{2}t_R$ em GC × GC[79].

Para uma tecnologia ainda nova, a cromatografia gasosa bidimensional abrangente atingiu o status de uma das mais poderosas ferramentas de análise de compostos orgânicos voláteis. Seu principal uso se dá na área da petroquímica[76,83-85] mas, por serem misturas bastante complexas também, os óleos essenciais que contém muitas classes de compostos com grandes diferenças de polaridade entre si, tornam-se objetos de análise perfeitos para a aplicação da GC × GC, como já registrados por alguns pesquisadores[77,86]. Algumas aplicações da cromatografia gasosa bidimensional na análise de óleos essenciais estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Aplicações da GC × GC na análise de óleos essenciais.

Óleo essencial	Equipamento	Referência
Mentha piperita	GC × GC-FID	86
Mentha spicata		
Lavandula angustifolia	GC × GC-FID	87
Lavandula hybridia		
Lavandula latifolia		
Melaleuca alternifolia	GC × GC-FID	88
Coriandrum sativum	GC × GC-TOFMS	89
Eryngium foetidum		
Humulus lupulus	GC × GC-TOFMS	90
Notopterygium incisum	GC × GC-FID	91
Ting ex H.T. chang	GC × GC-TOFMS	
Tabaco	GC × GC-FID	92
	GC × GC-TOFMS	
Artemisia annua L.	GC × GC-TOFMS	93
Teucrium chamaedrys	GC × GC-TOFMS	94
Eucalyptus dunnii	GC × GC-TOFMS	95
Ocimum basilicum L.	GC × GC-TOFMS	96
Pinus spp.	GC × GC-TOFMS	97
Rosa damascena Mill.	GC × GC-TOFMS	98

Capítulo 2

PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Amostragem

As amostras das espécies *Baccharis articulata* (carqueja branca) e *Baccharis trimera* (carqueja verde) foram coletadas nos meses de fevereiro, maio, agosto e novembro de 2008, sempre ao alvorecer, na região de São Timóteo (1º Subdistrito de Piratini/RS), localizado a uma latitude 31º26'53" sul e a uma longitude 53º06'15" oeste, estando a uma altitude de 349 metros (Figura 11).

Figura 11. Localização geográfica do município de Piratini no estado do Rio Grande do Sul e no Brasil.

Uma excicata da planta de cada espécie foi encaminhada ao HERBARIOPEL pertencente à Universidade Federal de Pelotas, onde foi devidamente identificado e armazenado pela Profª. Drª. Elen Garcia com o registro PEL 23.879 (*Baccharis articulata*) e PEL 23.880 (*Baccharis trimera*).

2.2. Levantamento dos dados meteorológicos

Os dados meteorológicos de temperatura média mínima e máxima bem como o índice pluviométrico foram obtidos a partir dos registros do Centro de Pesquisas e Previsões Meteorológicas da Universidade Federal de Pelotas. Os dados foram tabulados e utilizados, para fins de comparação, com as variações quantitativas e qualitativas observadas para o óleo essencial da *B. articulata* e *B. trimera*.

2.3. Tratamento da amostra

As partes aéreas das amostras foram picadas e secas à 35^{o}C por cerca de 24 horas em estufa com circulação de ar da marca Marconi MA035. Depois foram devidamente armazenadas em pacotes de papel pardo e colocadas em sala com umidade e temperatura controlada, no Departamento de Bioquímica da UFPel, até o momento da extração. Essa sala é mantida a 20% de umidade relativa do ar e 25^{o}C de temperatura por um desumificador ARSEC 160.

2.4. Extração do óleo

Para a extração do óleo essencial foram utilizadas 100 g de amostra e cerca de 1000 mL de água destilada em aparelho para extração por arraste de vapor do tipo Clevenger (Figura 13) por 4 horas e em triplicata[42,99]. A mistura de óleo, solvente (diclorometano-Quimex/SP/Brasil) e água foi seca com sulfato de sódio anidro (Quimex/SP/Brasil), depois o frasco foi pesado e colocado em repouso para a evaporação do solvente até obtenção de peso constante. Assim que o óleo estava seco foi devidamente lacrado e mantido sob refrigeração.

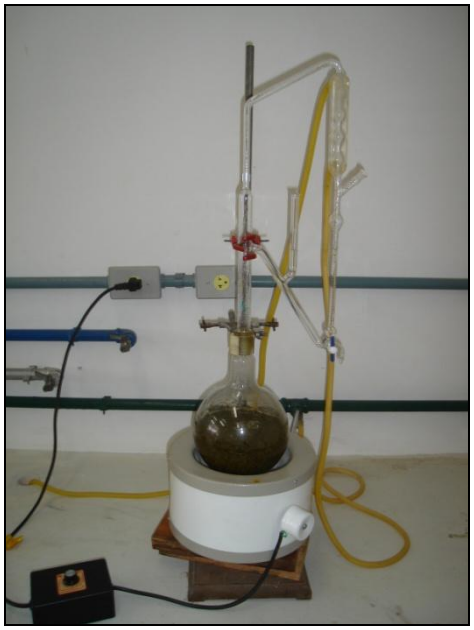


Figura 13. Aparelho de Clevenger.

2.5. Análise cromatográfica em GC-FID

As análises cromatográficas foram realizadas num cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama (GC-FID, Schimadzu 2014) equipado com uma coluna capilar (metilsilicone com 5% de grupos fenil) DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), e a seguinte programação de temperatura: o forno a 60ºC aquecendo a uma taxa de 3^{o}C min^{-1}, até 240^{o}C, depois a 10^{o}C min^{-1} até 280^{o}C, permanecendo por 10 min; temperatura do injetor e detector a 280^{o}C; razão split 1:10; gás de arraste N_2/ar sintético (89,8 kPa)[54]. Os óleos essenciais foram diluídos em hexano grau PA(Quimex/SP/Brasil), obtendo-se uma concentração de 1000 mg L^{-1}.

2.6. Análise cromatográfica em GC/MS

Os óleos essenciais também foram analisados num cromatógrafo gasoso acoplado com detector de espectrometria de massas (Shimadzu QP 2010 plus), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida (5% de grupo fenil) Elite-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), usando-se a mesma programação do GC-FID. A temperatura da interface foi de 280°C; razão de split 1:10; gás de arraste He (57,5 kPa); fluxo de 1,0 mL min^{-1}; energia de ionização 70 eV; volume injetado de 1mL diluído em hexano (500 mg L^{-1}).

Também foi utilizada uma coluna capilar polar com fase polietilenoglicol modelo Rtx-Wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e a seguinte programação de temperatura: o forno a 40ºC aquecendo a uma taxa de 3^{o}C min^{-1}, até 220^{o}C, permanecendo por 20 min; temperatura do injetor foi de 220^{o}C; temperatura da interface foi de 220^{o}C; razão split 1:10; gás de arraste He (49,7 kPa); fluxo de 1,0 mL min^{-1}; volume injetado de 1mL diluído em hexano (500 mg L^{-1})[100].

2.7. Análise cromatográfica em GC × GC/TOFMS

As análises cromatográficas gasosas bidimensionais foram realizadas num cromatógrafo gasoso (GC 6890N – Agilent Technologies) acoplado com detector de

espectrometria de massas por tempo de vôo (TOFMS – Pegasus IV – LECO). Para se obter as condições de análise via GC × GC/TOFMS, inicialmente foram utilizadas as programações empregadas nas técnicas monodimensionais, que foram otimizadas inicialmente no GC × GC-FID. Dessa forma, o equipamento foi operado com duas colunas capilares, uma apolar modelo DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e outra polar modelo DB-Wax (2,56 m x 0,1 mm x 0,1 μm), com a seguinte programação de temperatura: o forno a 40ºC permanecendo por 0,2 min, a seguir, aquecendo a uma taxa de $5^{o}C\ min^{-1}$, até $110^{o}C$, depois a $1^{o}C\ min^{-1}$ até $150^{o}C$, seguindo a $10^{o}C\ min^{-1}$ até $230^{o}C$ permanecendo por 10 min. A temperatura no injetor foi de $250^{o}C$; a diferença de temperatura entre os fornos foi de $5^{o}C$; a temperatura na linha de transferência era de $250^{o}C$; modulador criogênico com N_2 e com 4 jatos; período de modulação de 11s; duas corridas com razão split 1:20 e uma com razão 1:70; gás de arraste He; fluxo de 1 mL min^{-1} e taxa de aquisição de 100 Hz.

2.8. Identificação dos componentes

Os constituintes dos óleos foram identificados por comparação de seus espectros de massas com aqueles das bibliotecas Wiley e NIST (GC/MS) e com aqueles descritos por Adams (1995)[55], bem como, por comparação do índice de retenção de Kovats com dados da literatura[6,25,54]. O índice de retenção foi calculado através da equação de Kovats, utilizando-se uma solução padrão de hidrocarbonetos C_9 a C_{24} com grau de pureza maior que 98% (Aldrich/WI/USA).

Capítulo 3

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

3.1 Extração e análise dos óleos essenciais

3.1.1. *Baccharis articulata* (carqueja branca)

Os rendimentos de óleos essenciais (Figura 14) extraídos da *Baccharis articulata* nas quatro estações do ano de 2008 foram os seguintes: 0,06% em Fevereiro (Verão), 0,13% em Maio (Outono), 0,16% em Agosto (Inverno) e 0,03% em Novembro (Primavera).

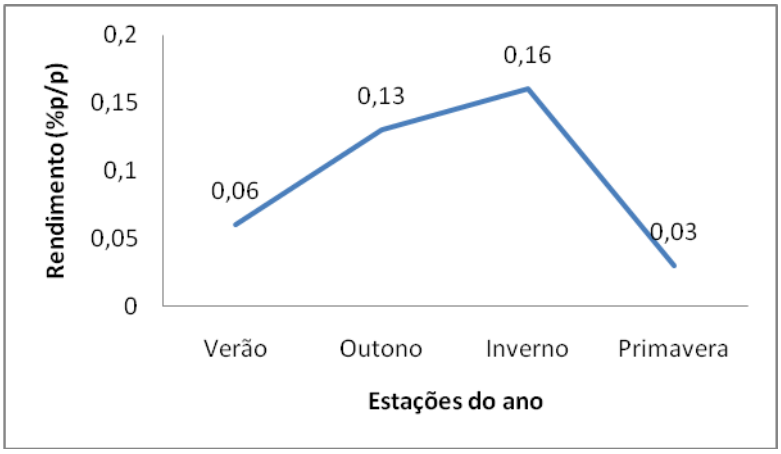


Figura 14. Perfil quantitativo do óleo essencial da *B. articulata* coletada em Piratini, RS, Brasil, nas diferentes estações de 2008.

Pelo gráfico da Figura 14 pode-se observar uma quantidade superior do óleo essencial da *Baccharis articulata* no inverno em relação às demais estações, principalmente quando comparado com a primavera. No inverno, onde se deu o maior rendimento, dá-se início a floração da planta. Assim, a elevada produção de óleo essencial, sugere uma relação com fase de desenvolvimento da planta, sendo que, de modo geral, a maioria de espécies reprodutoras de óleo essencial apresenta a maior porcentagem no início da sua fase reprodutiva[101]. Relacionando os dados meteorológicos presentes na Tabela 3, pode-se observar que as características típicas do outono e do inverno no sul do país como baixas temperaturas e grande precipitação, contribuem significativamente para a produção do óleo essencial. Enquanto que na estação na primavera onde se evidenciam aumento da temperatura e redução na precipitação a quantidade de óleo reduz significativamente.

Tabela 3. Rendimento do óleo essencial de *B. articulata* e *B. trimera*, temperaturas mínimas e máximas médias e precipitação ao longo das estações do ano de 2008.

Estações		**Verão**	**Outono**	**Inverno**	**Primavera**
Rendimento (%)	***B. articulata***	0,06±0,006	0,13±0,006	0,16±0,005	0,03±0,01
	B. trimera	0,98±0,006	0,62±0,005	0,07±0,01	0,23±0,006
Temperatura mínima média (^oC)		18	12	8,5	15
Temperatura máxima média (^oC)		28	20	18	25
Precipitação (mmH_2O)		50 a 90	120 a 150	120 a 150	10 a 40

O rendimento de óleo essencial foi menor que o reportado por vários pesquisadores. Zunino e colaboradores (2004)[102] obtiveram um rendimento de 0,2% em amostra coletadas na Argentina. Em plantas cultivadas ao leste do Rio Grande do Sul (sul do Brasil), Simões-Pires e colaboradores (2005)[103] encontraram 0,3%, na serra gaúcha Agostini e colaboradores (2005)[54] obtiveram 0,5%, enquanto que na região central deste estado, Simionatto e colaboradores (2008)[25] encontraram 0,42%. No Paraná, também na região sul do Brasil, Budel e colaboradores (2005)[5] obtiveram 0,5%. Essa variação no rendimento pode ter sido influenciada pela diferença de localidade de origem da planta.

Assim como os teores médios de umidade encontrados foram considerados satisfatórios por situarem-se entre 8 e 14%, como indicado na Farmacopéia Brasileira[87] e resultados publicados anteriormente[10].

3.1.2. *Baccharis trimera* (carqueja verde)

Os rendimentos de óleos essenciais (Figura 15) extraídos da *Baccharis trimera* nas estações foram os seguintes: 0,98% em Fevereiro (Verão), 0,62% em Maio (Outono), 0,07% em Agosto (Inverno) e 0,23% em Novembro (Primavera).

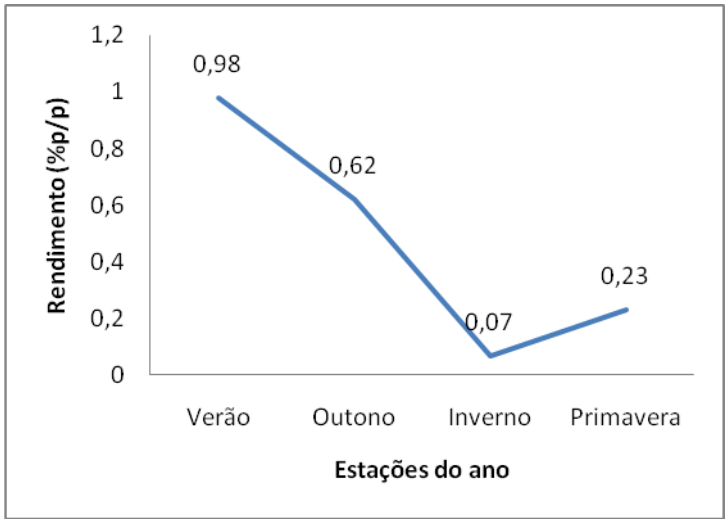


Figura 15. Perfil quantitativo do óleo essencial da *B. trimera* coletada em Piratini, RS, Brasil, nas diferentes estações de 2008.

Pela Figura 15 observa-se uma quantidade maior de óleo nas plantas coletadas no verão em relação às demais estações, principalmente quando comparado com o inverno. Relacionando os dados meteorológicos presentes na Tabela 3 pode-se observar que ao contrário da *B. articulata* foram as altas temperaturas e períodos mais secos que contribuiram com a produção do óleo essencial dessa espécie.

Os percentuais de óleos essenciais obtidos neste trabalho encontraram-se dentro dos valores já citados por outros pesquisadores, como 0,6 a 0,9% por Simões-Pires e colaboradores (2005)[103] em plantas colhidas na Argentina; 0,5 a 1% em amostras oriundas do Paraná cujo óleo foi extraído com fluido supercrítico por Vasconcelos e colaboradores (2007)[37]; 1,2 a 3% presentes em carquejas obtidas por Palácio e colaboradores (2007)[30]; e Ferreira e colaboradores (2009)[104] que encontrou valores entre 0,86 e 2,07% de óleo em amostras de Santa Catarina.

Na comparação entre as duas espécies, uma quantidade significativamente maior de óleo foi obtida em todas as quatro estações na carqueja verde em relação a carqueja branca. Outro fato a considerar, são os resultados obtidos entre as carquejas, constatou-se que as duas tem maior rendimento no período de floração, onde a carqueja verde florece no verão e a carqueja branca no inverno.

Assim, de acordo com os dados disponíveis, pode-se concluir que as espécies respondem diferentemente às condições ambientais que lhe são impostas e, conseqüentemente, podem produzir quantidades distintas de óleos voláteis.

Fatores ambientais, especialmente temperatura e luminosidade, atuam diretamente em processos como a fotossíntese e a respiração, podendo influenciar indiretamente a produção de metabólitos secundários, cuja síntese depende dos mesmos precursores do metabolismo primário. Além disso, a intensidade luminosa pode afetar a produção de óleos voláteis pela ativação de enzimas fotossensíveis envolvidas na sua rota biossintética[6].

3.2. Análise cromatográfica

3.2.1. *Baccharis articulata*

Os óleos analisados são compostos basicamente por mono e sesquiterpenóides. A Figura 16 apresenta um cromatograma do óleo essencial da carqueja branca colhida no outono obtido por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama com a identificação de alguns componentes, pois foi esta estação que apresentou maior diversidade de constituintes. A Tabela 4 apresenta a relação dos compostos identificados, usando o índice de Kovats, como também a concentração dos constituintes calculados pela área normalizada.

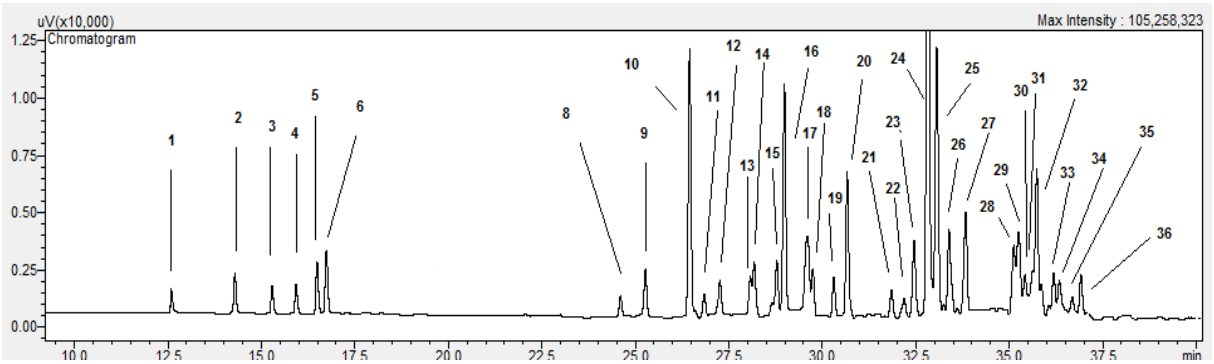


Figura 16. Cromatograma do óleo essencial da *B. articulata* coletada no outono obtido via GC-FID. Identificação dos picos apresentados na Tabela 4. Condições cromatográficas descritas na metodologia.

Tabela 4. Constituintes químicos do óleo essencial de *Baccharis articulata* nas quatro estações do ano de 2008, obtido por GC-FID.

Pico	Componente	PM	I.R.	Verão C (%)	Outono C (%)	Inverno C (%)	Primavera C (%)
	MONOTERPENOS OXIGENADOS						
1	linalol	154	1099	0,48	0,45	--	0,49
2	pinocarveol	152	1139	--	0,99	--	--
3	pinocarvona	150	1163	--	0,63	--	--
4	terpinen-4-ol	154	1178	0,82	0,70	--	0,79
5	α-terpineol	154	1191	2,22	1,26	0,50	1,63
6	mirtenol	152	1197	0,59	1,69	0,41	0,45
7	carvacrol	150	1301	3,51	--	--	--
	SESQUITERPENOS HIDROCARBONADOS						
8	α-copaeno	204	1378	0,56	0,55	--	0,53
9	β-elemeno	204	1394	0,83	1,33	0,70	1,36
10	β-cariofileno	204	1422	7,04	7,33	3,82	9,11
11	β-copaeno	204	1432	0,61	0,72	--	0,75
12	aromadendreno	204	1442	1,96	1,39	0,75	1,13
13	cloveno	204	1462	0,69	1,18	0,62	--
14	aloaromadendreno	204	1464	1,37	1,69	1,01	1,76
15	α-amorfeno	204	1479	1,68	1,73	1,07	1,40
16	germacreno D	204	1484	4,10	6,63	3,23	7,91
17	biciclogermacreno	204	1499	5,82	3,91	2,91	5,24

Tabela 4. Constituintes químicos do óleo essencial de *Baccharis articulata* nas quatro estações do ano de 2008, obtido por GC-FID. (continuação)

Pico	Componente	PM	I.R.	Verão C (%)	Outono C (%)	Inverno C (%)	Primavera C (%)
18	α-muroleno	204	1502	1,29	1,30	1,15	1,23
19	γ-cadineno	204	1517	1,56	1,08	1,25	1,37
20	δ-cadineno	204	1526	4,66	4,00	3,74	4,44
	SESQUITERPENOS OXIGENADOS						
21	palustrol	222	1556	0,53	0,87	1,02	0,65
22	E-nerolidol	222	1565	1,19	0,72	0,80	0,65
23	ledol	222	1571	1,82	2,38	2,08	2,17
24	espatulenol	220	1581	11,11	18,15	22,77	10,32
25	óxido de cariofileno	220	1587	7,65	8,14	9,74	7,02
26	globulol	222	1595	5,87	2,61	5,80	4,09
27	viridiflorol	222	1606	2,40	3,26	4,30	4,81
28	τ-cadinol	222	1641	2,09	2,24	2,72	1,85
29	τ-muurolol	222	1644	4,24	3,32	3,79	4,15
30	cubenol	222	1649	1,49	1,42	1,55	1,58
31	α-eudesmol	222	1654	1,29	1,44	--	1,15
32	α-cadinol	222	1657	4,59	4,65	6,09	4,62
33	14-hidroxi-9-epi-cariofileno	220	1669	1,58	1,02	1,56	1,67
34	óxido de aloaromandreno	220	1673	1,05	1,02	2,11	1,11
35	α-bisabolol	222	1683	--	0,44	0,88	0,63
36	farnesol(Z,Z)	222	1689	0,76	1,07	1,59	1,10
	Monoterpenos não identificados			1,61	1,05	0,86	1,96
	Sesquiterpenos não identificados			5,02	7,19	7,92	7,20
	Total			**94,08**	**99,55**	**96,62**	**96,32**

C (%)=Concentração calculada em relação a área; I.R.=Índice de retenção calculado; (-)= não detectado

Os óleos de carqueja branca apresentaram os sesquiterpenóides. β-cariofileno, espatulenol e óxido de cariofileno em todas as estações do ano, indicando o quimiotipo da espécie na população de plantas estudada. A maioria dos compostos, cerca de 27, foram encontrados em todas as amostras.

Quanto à fração monoterpênica os resultados encontrados nessas condições de análise não evidenciaram os compostos citados por outros autores. Agostini e colaboradores (2005)[54], Simionatto e colaboradores (2008)[25], Abad e Bermejo

(2007)[12], Zunino e colaboradores (2004)[102] e Simões-Pires e colaboradores (2005)[103] encontraram o β-pineno como majoritário, no entanto as amostras de carqueja deste trabalho não apresentaram nenhum sinal desse composto nem de monoterpenos hidrocarbonados.

Dentre a fração sesquiterpênica são evidentes os componentes majoritários já citados, em especial ao composto espatulenol (Figura 17) com concentração chegando a 22,77%, que vem ao encontro aos resultados encontrados[12,25,54,102,103].

A porcentagem relativa de monoterpenóides oxigenados variou na faixa de 0,41 a 3,51%. Já para os sesquiterpenóides hidrocarbonados, a concentração variou de 0,53 a 9,11%, enquanto que os sesquiterpenóides oxigenados se apresentaram em porcentagens que variaram de 0,53 a 22,77%.

A influência sazonal foi observada na variação quantitativa e qualitativa na composição do óleo essencial assim como já descrito por outros autores em trabalhos anteriores com outras espécies[61,105-107]. Muitos compostos foram identificados em apenas duas ou três estações como o linalol, pinocarveol, pinocarvona, terpinen-4-ol, carvacrol, α-copaeno, β-copaeno, cloveno, α-eudesmol e o α-bisabolol apresentados na Figura 17. Cabe salientar a visível variação quantitativa do componente espatulenol ao se comparar a amostra coletada no inverno em relação às demais, mesmo que a menor diversidade de constituintes químicos foi mais evidente nessa estação.

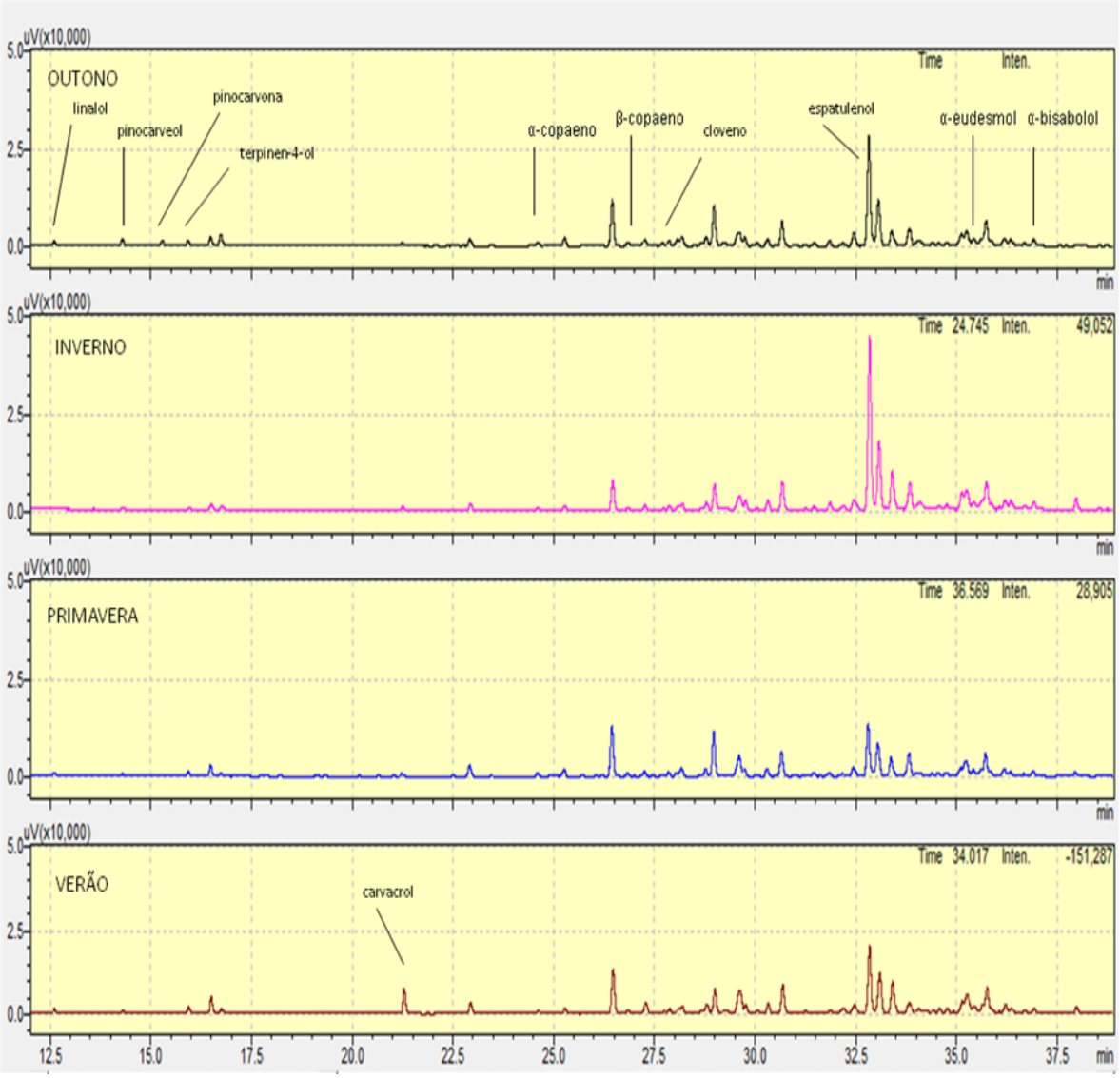


Figura 17. Cromatogramas do óleo essencial da *B. articulata* via GC-FID nas quatro estações do ano de 2008, com a identificação dos picos de compostos que não foram presentes ao longo de todo ano segundo o descrito na Tabela 4.

Os resultados indicam que a sazonalidade afeta de maneira distinta a biossíntese do número de estruturas das duas principais classes de terpenóides presentes no óleo essencial de *Baccharis articulata*. Conforme mostra a Figura 18, enquanto que, no outono, foi observada uma maior diversidade dos monoterpenóides oxigenados, no inverno, que é a estação seguinte, foi encontrada uma menor variação. O fato se repetiu para a fração sesquiterpênica.

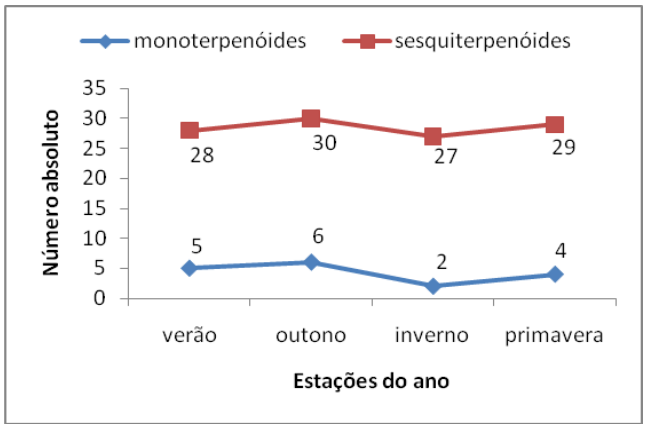


Figura 18. Variabilidade sazonal das principais classes constituintes do óleo essencial da *Baccharis articulata* coletada em Piratini, RS, Brasil, em 2008.

Dentre os componentes majoritários o espatulenol (22,77%) e o óxido de cariofileno (9,74%) apresentaram maior quantidade no inverno, exatamente o oposto do que aconteceu com a concentração de β-cariofileno que apresentou queda nessa estação onde houve maior rendimento de óleo e menor variação de compostos terpênicos conforme mostra a Figura 19.

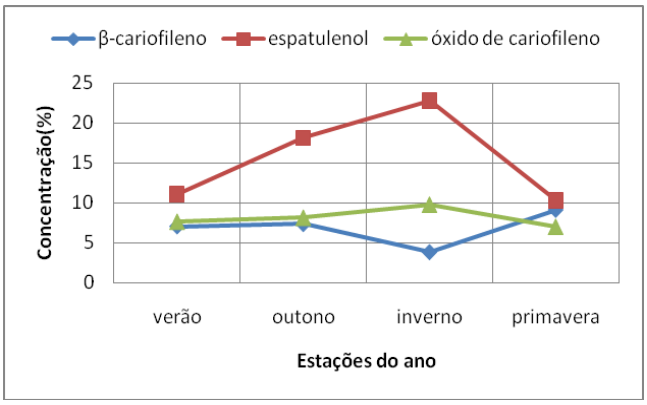


Figura 19. Perfil quantitativo dos componentes majoritários do óleo essencial da *Baccharis articulata* coletada em Piratini, RS, Brasil, nas diferentes estações de 2008.

Ao constatar que determinada classe química, mono ou sesquiterpenóide, teve sua produção favorecida no inverno, nota-se também que o aumento da concentração relativa dos constituintes não ocorre na mesma proporção. Por exemplo, é o que ocorre com o biciclogermacreno que no outono possui

porcentagem relativa menor que no verão e na primavera (Tabela 4). Algumas hipóteses poderiam justificar essas observações. Entre elas encontra-se o fato de que as plantas, através de mecanismos de controle da rota biossintética, favorecem a produção de determinados constituintes, dependendo de suas necessidades[108].

Ao realizar a análise dos óleos da *Baccharis articulata* via cromatografia gasosa bidimensional abrangente foi possível identificar 84 compostos na amostra coletada no verão (Tabela 5), quase três vezes maior que o número de componentes identificados pela cromatografia monodimensional. Cabe salientar que esse método sinalizou a presença de monoterpenos hidrocarbonados não visíveis anteriormente, em especial os compostos β-pineno e limoneno além de confirmar a ausência do acetato de carquejila. (Figura 20).

Tabela 5. Compostos identificados no óleo essencial da *Baccharis articulata* coletada no verão do ano de 2008 via GC × GC. Os compostos já identificados via GC-FID estão destacados em negrito.

Nº.	Composto	$^{1}t_R$	$^{2}t_R$	Similaridade
1.	α-tujeno	13,83	2,67	893
2.	α-pineno	14,20	2,67	938
3.	canfeno	14,75	2,81	946
4.	β-pineno	15,66	2,93	934
5.	β-mirceno	15,85	3,03	868
6.	o-cimeno	17,31	3,72	950
7.	limoneno	17,50	3,31	929
8.	β-felandreno	17,68	3,34	799
9.	eucaliptol	17,68	3,37	858
10.	α-felandreno	18,60	3,48	832
11.	terpinoleno	19,88	3,69	921
12.	**linalol**	20,43	6,89	897
13.	exo-fenchol	21,71	7,76	932
14.	trans-óxido de limoneno	22,45	5,41	843
15.	**trans-pinocarveol**	22,81	9,74	890
16.	cânfora	23,18	6,46	880
17.	canfeno	24,10	7,30	820
18.	borneol	24,65	10,79	896
19.	isopinocanfona	24,83	6,78	891
20.	**terpinen-4-ol**	25,01	7,66	873
21.	**α-terpineol**	25,75	10,26	933
22.	mirtenal	25,93	8,34	915
23.	piperitol	25,93	9,57	832
24.	**mirtenol**	26,11	3,38	892
25.	cis-carveol	27,40	5,04	829
26.	2-borneno	28,13	5,86	881
27.	nerol	29,23	4,83	846
28.	metil-canfeonato	29,60	6,47	832

Tabela 5. Compostos identificados no óleo essencial da *Baccharis articulata* coletada no verão do ano de 2008 via GC × GC. Os compostos já identificados via GC-FID estão destacados em negrito.(continuação)

Nº.	Composto	$^{1}t_R$	$^{2}t_R$	Similaridade
29.	felandral	31,61	9,60	889
30.	isoterpinoleno	32,16	6,60	845
31.	santolina triene	34,91	4,35	848
32.	α-cubebeno	36,93	4,24	894
33.	ylangeno	38,95	4,40	893
34.	α-muuroleno	39,13	4,46	797
35.	**α-copaeno**	39,68	4,44	896
36.	α-bourboneno	40,41	4,67	867
37.	**β-copaeno**	40,60	4,76	889
38.	**β-elemeno**	40,78	5,32	896
39.	α-gurjuneno	41,33	4,40	851
40.	isoledeno	42,43	4,63	901
41.	β-cadineno	42,80	4,77	814
42.	**trans-cariofileno**	43,71	5,36	946
43.	**aloaromadendreno**	44,26	5,27	877
44.	γ-gurjuneno	44,45	4,85	889
45.	β-cubebeno	44,45	5,14	905
46.	α-cubebeno	45,91	5,52	801
47.	**α-amorfeno**	46,46	5,83	816
48.	α-cariofileno	47,01	5,88	932
49.	**aromadendreno**	47,38	5,54	919
50.	calameleno	47,75	5,95	784
51.	γ-muuroleno	48,66	5,86	933
52.	α-curcumeno	49,21	6,92	926
53.	**germacreno D**	49,40	6,21	904
54.	β-farneseno	49,58	5,61	885
55.	β-cadineno	49,95	5,71	897
56.	α-selineno	50,13	6,24	919
57.	ledeno	50,31	5,83	869
58.	**biciclogermacreno**	50,68	6,36	884
59.	**α-muuroleno**	51,05	6,01	932
60.	**δ-cadineno**	51,41	5,88	886
61.	calameneno	53,25	7,52	852
62.	cadina-1,4-dieno	54,16	6,44	866
63.	α-calacoreno	55,08	7,41	828
64.	cis-nerolidol	56,36	6,88	889
65.	epiglobulol	56,55	6,58	859
66.	γ-eudesmol	56,91	6,03	855
67.	**palustrol**	57,10	5,16	907
68.	álcool cariofinílico	57,28	6,72	828
69.	**espatulenol**	57,28	7,25	839
70.	trans-Z- α-bisaboleno	57,65	5,09	819
71.	**óxido de cariofileno**	57,65	5,34	891
72.	**viridiflorol**	58,20	5,53	873
73.	**ledol**	58,56	4,84	884
74.	cis-lanceol	58,56	6,14	820
75.	β-eudesmol	58,75	5,21	854
76.	patchulano	58,75	5,63	827
77.	**cubenol**	58,93	4,69	859
78.	β-selineol	59,30	4,82	832
79.	**τ-cadinol**	59,85	4,79	881
80.	**τ-muurolol**	59,85	4,88	857
81.	**óxido de aloaromadendreno**	60,03	5,54	785
82.	**α-cadinol**	60,21	4,97	934
83.	β-selineno	60,40	5,07	888
84.	cadaleno	60,76	4,60	856

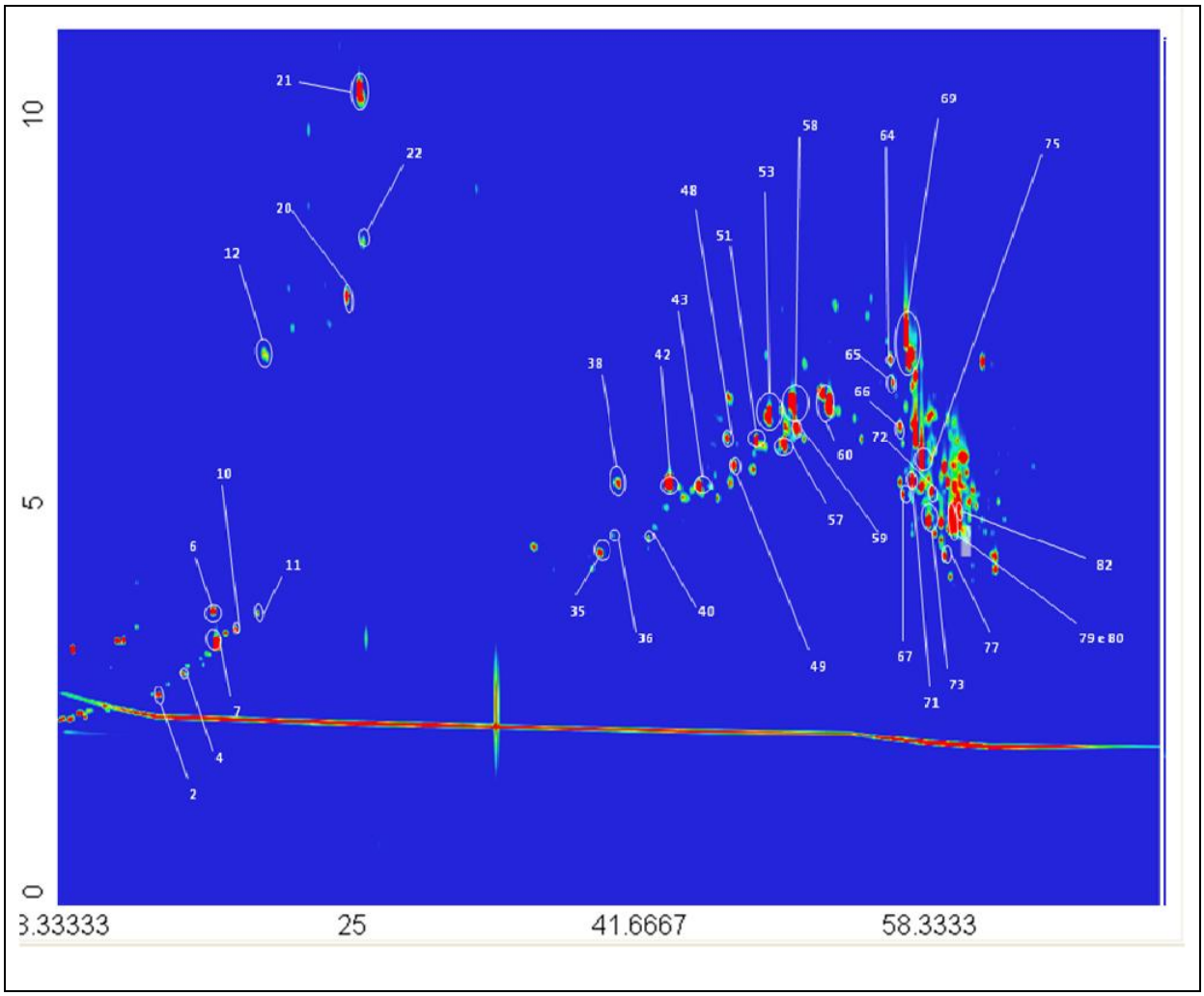


Figura 20. Diagrama de cores da separação obtida por GC × GC/TOFMS para o óleo de *B. articulata* coletada no verão do ano de 2008. Os compostos estão identificados na Tabela 5.

Uma maneira mais rápida de identificar a presença de separação por classes químicas, sem a necessidade de identificação pico a pico é a construção de diagrama de cores com a seleção de íons característicos selecionados de uma determinada classe química. A Figura 21 ilustra as principais classes de compostos químicos presentes no óleo essencial da *B. articulata*.

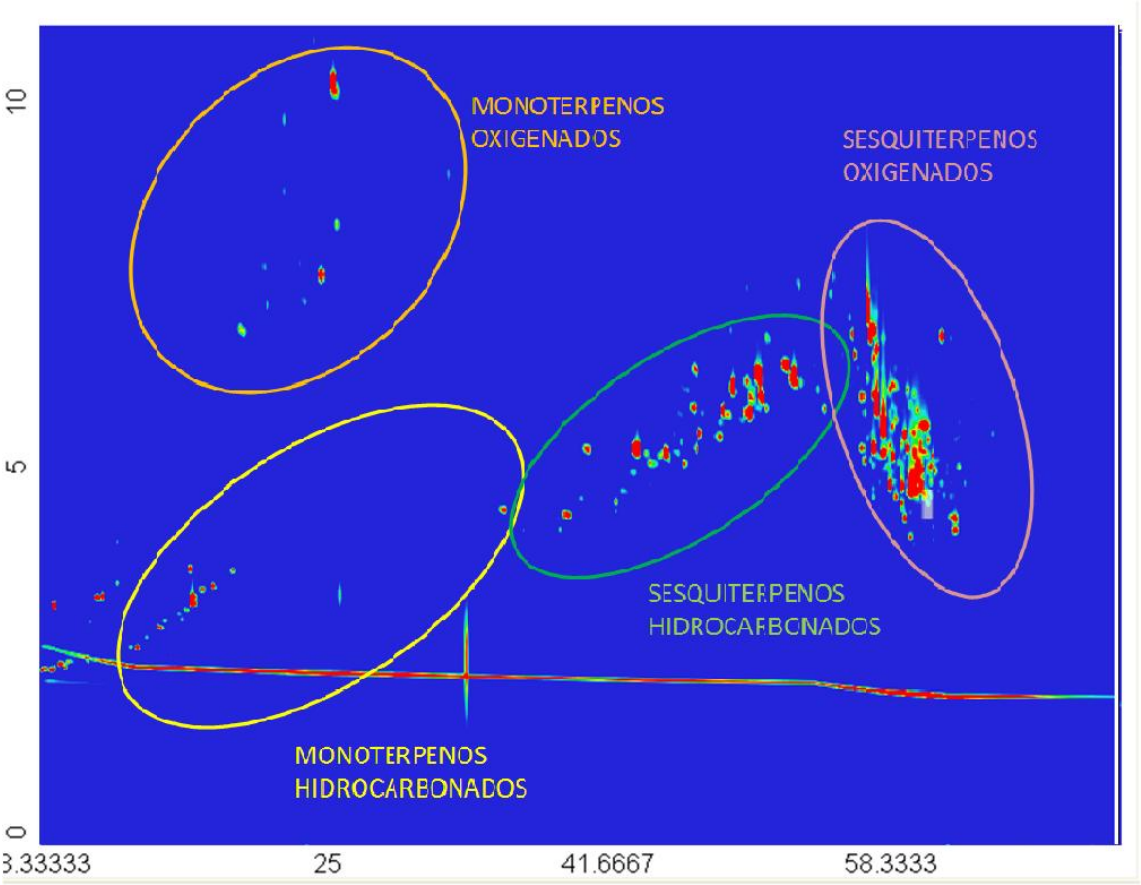


Figura 21. Diagrama de cores demonstrando as principais classes de compostos químicos presentes no óleo essencial da *B. articulata* coletada no verão do ano de 2008, obtido por GC × GC/TOFMS.

Assim como na cromatografia monodimensional, os dados obtidos pela GC × GC demonstraram variação evidente na composição química do óleo ao longo do ano como se pode observar na Figura 22. Os cromatogramas obtidos pela cromatografia bidimensional também acentuaram o óleo obtido das plantas coletadas no inverno como sendo o de menor variedade de componentes, e ainda apresentam o óleo obtido da planta coletada no verão como o mais rico quali e

quantitativamente diferentemente do resultado encontrado no GC-FID, comprovando assim a eficiência da técnica bidimensional na sensibilidade da análise.

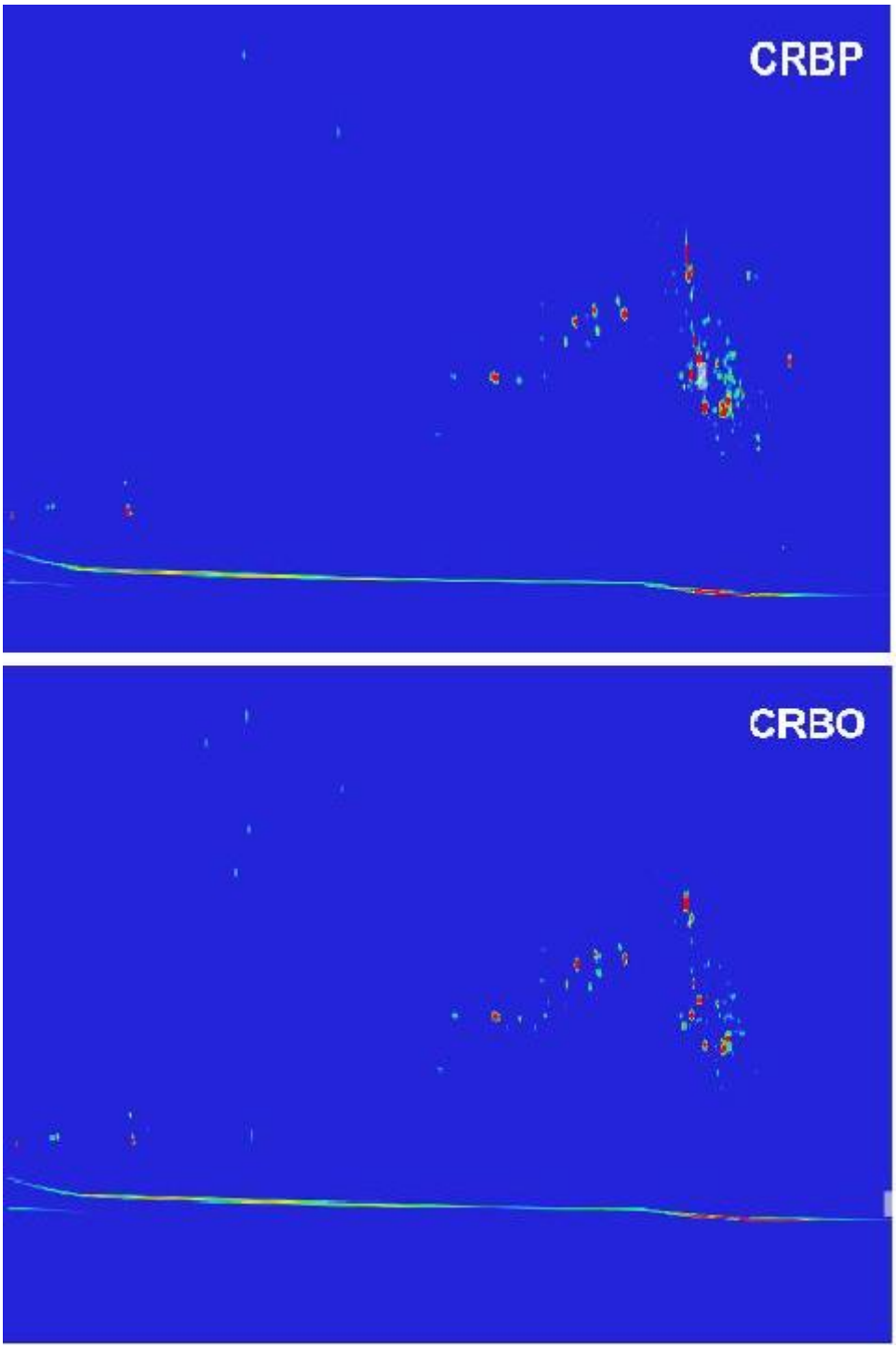


Figura 22a. Diagrama de cores do GC × GC das amostras de óleo essencial da *B. articulata* obtido na primavera e outono do ano de 2008. (CRBP-Primavera, CRBO-Outono)

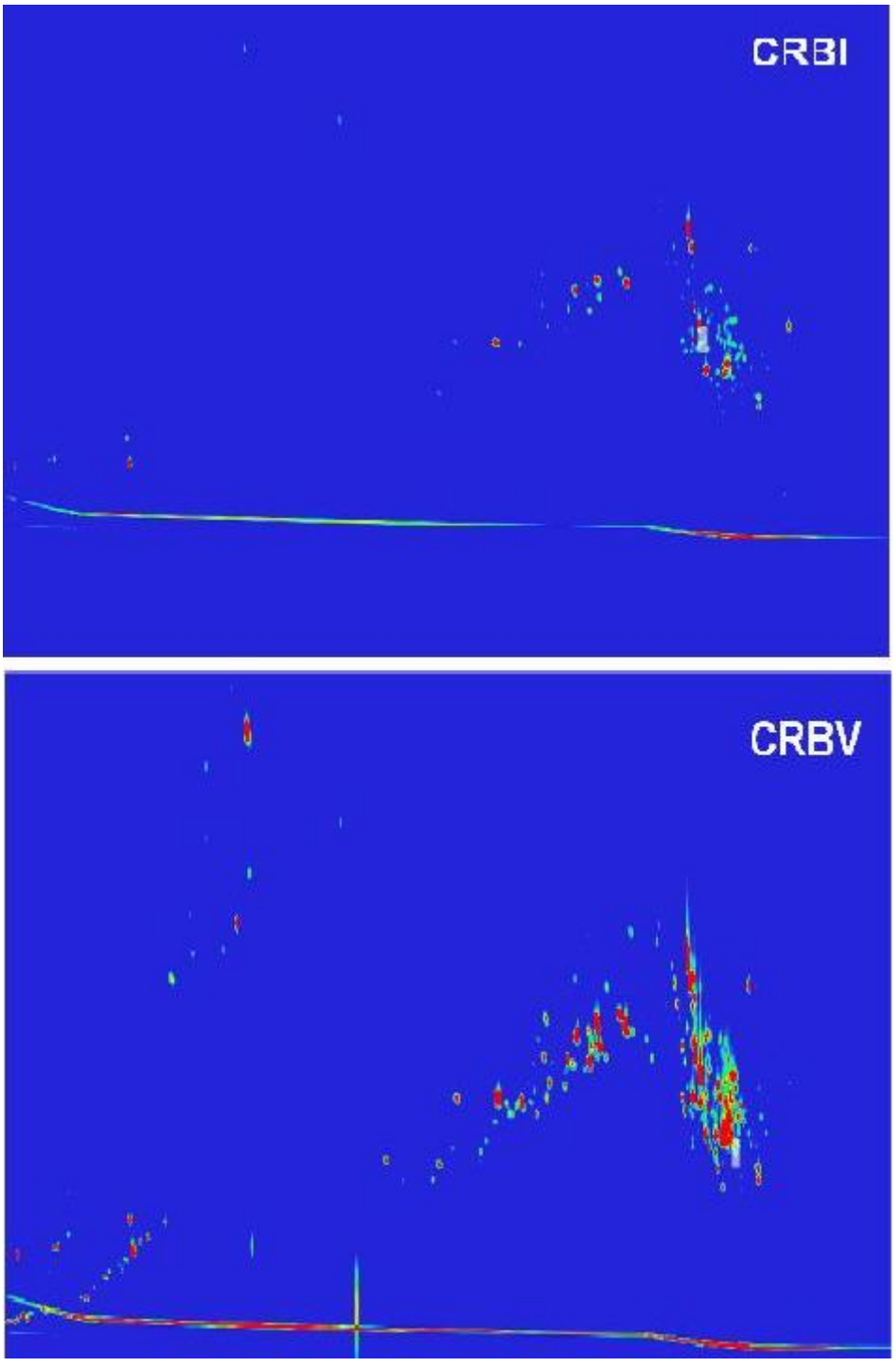


Figura 22b. Diagrama de cores do GC × GC das amostras de óleo essencial da *B. articulata* obtido no inverno e verão do ano de 2008. (CRBI-Inverno, CRBV-Verão)

3.2.2. *Baccharis trimera*

Assim como a *B. articulata*, os óleos essenciais da *B. trimera* foram analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama originando o seguinte cromatograma (Figura 23).

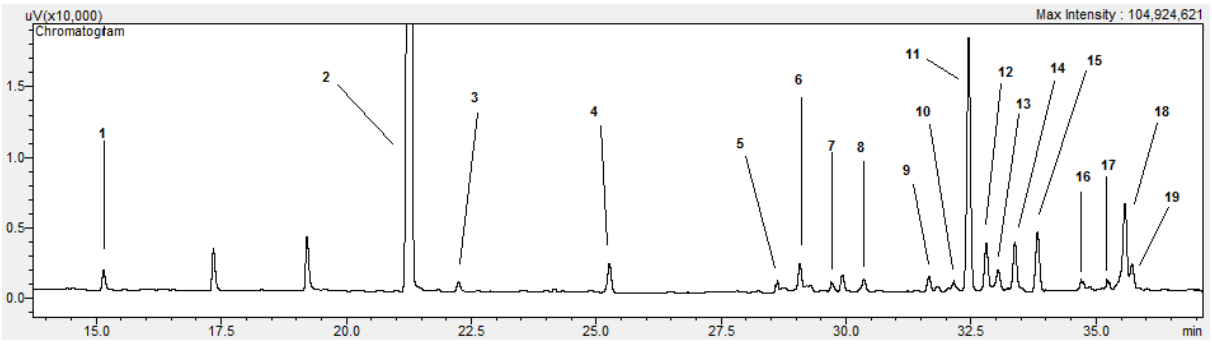


Figura 23. Cromatograma do óleo essencial da *B. trimera* coletada no outono obtido via GC-FID. Identificação dos picos apresentados na Tabela 6. Condições cromatográficas descritas no método.

Os componentes dos óleos essenciais de *B. trimera* obtidos das plantas coletadas nas quatro estações do ano de 2008 são apresentados na Tabela 6. Ao todo foram identificados 19 constituintes, sendo que 11 deles permaneceram presentes ao longo do ano. O acetato de carquejila e o ledol foram os constituintes majoritários em todas as estações do ano.

Simões-Pires e colaboradores (2005)[103] sugeriram que o acetato de carquejila, encontrado também no presente trabalho, poderia ser considerado o quimiotipo para a identificação da *B. trimera*, desde que seus resultados apresentem uma concentração relativa superior a 69% (p/p). Por outro lado, Ferri e colaboradores (2007)[34] não identificaram esse composto em seus óleos, afirmando que se deve ter cuidado ao utilizar um único composto (acetato de carquejila) como um marcador químico para essa espécie. Já o ledol que se apresentou em alta quantidade também para Ferri e colaboradores (2007)[34], não foi identificado por Lago e colaboradores (2008)[109].

Tabela 6. Constituintes químicos do óleo essencial de *Baccharis trimera* nas quatro estações do ano de 2008 via GC-FID.

Pico	Componente	PM	I.R.	Verão C (%)	Outono C (%)	Inverno C (%)	Primavera C (%)
	MONOTERPENOS OXIGENADOS						
1	carquejol	150	1159	--	0,61	0,84	3,68
2	acetato de carquejila	192	1300	41,62	68,93	70,94	59,58
3	acetato de mirtenila	194	1323	--	0,33	0,45	--
	SESQUITERPENOS HIDROCARBONADOS						
4	β-elemeno	204	1394	1,65	1,05	0,90	1,15
5	γ –muuroleno	204	1478	--	0,35	--	--
6	germacreno D	204	1486	0,78	1,04	1,06	0,55
7	α-muuroleno	204	1501	--	0,35	0,36	--
8	δ-cadineno	204	1518	--	0,58	0,41	0,48
9	elemol	204	1551	1,07	0,55	0,40	0,41
	SESQUITERPENOS OXIGENADOS						
10	nerolidol	222	1564	--	0,43	--	--
11	ledol	222	1572	22,97	8,84	9,02	14,51
12	espatulenol	220	1580	4,7	1,81	1,53	2,28
13	óxido de cariofileno	220	1587	2,37	1,04	0,77	1,14
14	viridiflorol	222	1595	4,87	1,95	2,50	1,23
15	guaiol	222	1607	4,94	2,19	2,14	3,22
16	γ-eudesmol	222	1631	--	0,32	--	--
17	cubenol	222	1645	--	0,30	--	0,58
18	β-eudesmol	222	1653	5,02	3,87	2,95	1,59
19	α-cadinol	222	1657	1,22	1,00	0,77	1,22
	Monoterpenos não identificados			6,67	3,30	4,33	6,09
	Sesquiterpenos não identificados			2,05	1,03	0,51	1,94
	Total			**99,93**	**99,87**	**99,88**	**99,65**

C (%)=Concentração calculada em relação a área; I.R.=Índice de retenção calculado; (-)= não detectado

Na fração monoterpênica, diferente de Palácio e colaboradores (2007)[30] e Simões-Pires e colaboradores (2005)[103], não foram encontrados vestígios de β-pineno e limoneno por cromatografia monodimensional. No entanto as amostras de carqueja verde assinalaram a presença do carquejol em três estações e do acetato de carquejila como já citado.

Quanto à fração sesquiterpênica os resultados encontrados nessas condições de análise anunciaram o ledol como majoritário, semelhante ao relatado por Palacio e colaboradores (2007)[30] e Simões-Pires e colaboradores (2005)[103], diferente de Ferri e colaboradores (2007)[34] que identificaram o sesquiterpeno germacreno D como o de maior quantidade em suas amostras. Porém cabe salientar que essas pesquisas foram realizadas em distintas regiões do país e em diversas estações do ano.

A porcentagem relativa de monoterpenóides oxigenados variou na faixa de 0,33 a 70,94%. Já para os sesquiterpenóides hidrocarbonados, a concentração variou de 0,35 a 1,65%, enquanto que os sesquiterpenóides oxigenados se apresentaram em porcentagens que variaram de 0,30 a 22,97%.

Cabe salientar que os percentuais obtidos via GC-FID podem sofrer alteração devido a coeluição existente em muitos compostos, afirmando dessa forma a necessidade da aplicação da cromatografia bidimensional que graças a ortogonalidade favorece a separação desses componentes coeluídos.

Como já descrito para a *Baccharis articulata*, a influência sazonal foi observada na variação quantitativa e qualitativa na composição do óleo essencial da *B. trimera*. Apenas a amostra colhida no outono apresentou todos os componentes identificados, diferente das demais que tiveram sua composição alterada. A Figura 24 apresenta os cromatogramas das quatro estaçõesdo ano de 2008, destacando os picos que não foram encontrados em todas as estações do ano.

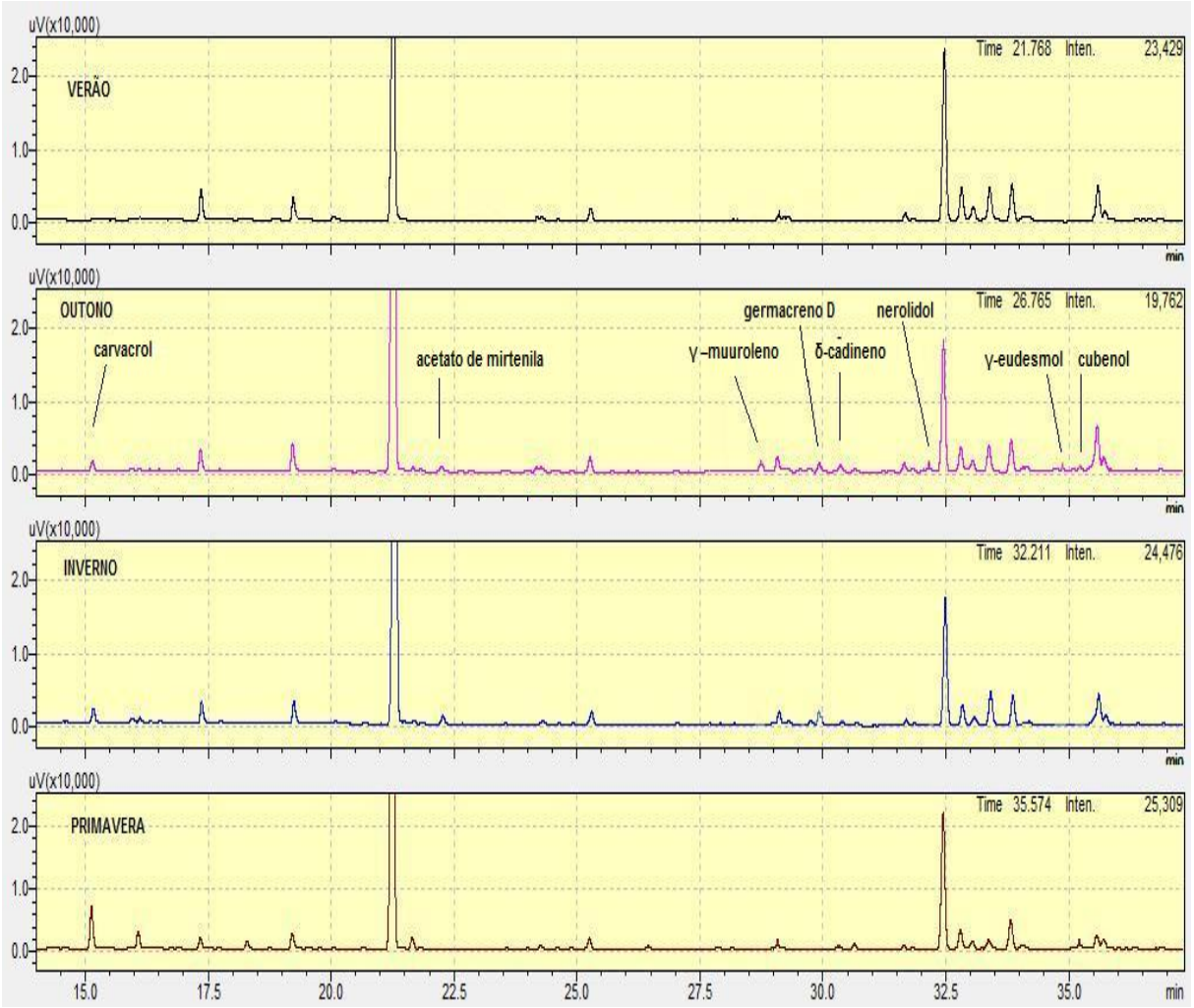


Figura 24. Cromatogramas do óleo essencial da *B. trimera* via GC-FID nas quatro estações do ano de 2008, com a identificação dos picos de compostos que não foram presentes ao longo de todo ano segundo o descrito na tabela 6.

Ressalta-se ainda a variação significativa na quantidade de ledol durante o ano, pois no verão alcançou seu ápice com concentração cerca de 22,97% e na estação seguinte caiu para 8,84%, fator esse que vem de encontro aos resultados alcançados anteriormente por Ferri e colaboradores (2007)[34] e que levam a relacionar esse alto valor do composto com a época de florescência dessa espécie que ocorre nessa estação. Observando a Figura 25 pode-se ainda notar que nas estações em que a quantidade de ledol é maior, as concentrações de acetato de carquejila diminuem significativamente.

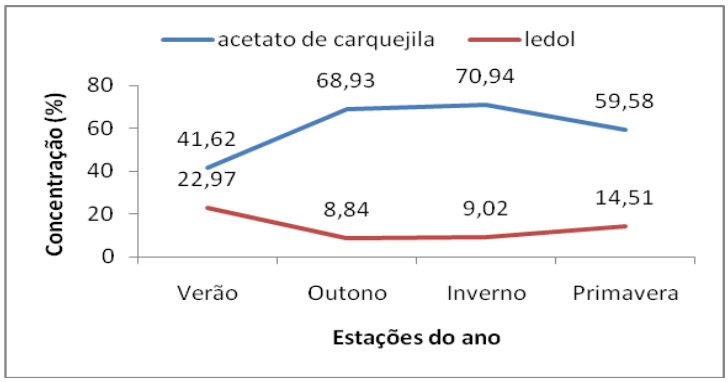


Figura 25. Perfil quantitativo dos componentes majoritários do óleo essencial da *Baccharis trimera* coletada em Piratini, RS, Brasil, nas diferentes estações de 2008.

No outono foi observado um aumento significativo de estruturas sesquiterpenoídicas, fato esse praticamente nulo na fração monoterpênica que se mantém relativamente constante (Figura 26). Segundo Heinzmann e colaboradores (2009)[108] este aumento pode ser atribuído à versatilidade catalítica das enzimas terpeno-sintetases, que freqüentemente produzem múltiplos produtos a partir de um único substrato. Coincidentemente, a estação em que ocorre a maior diversidade química no óleo essencial (outono) também corresponde ao período de maior floração observado para esta espécie.

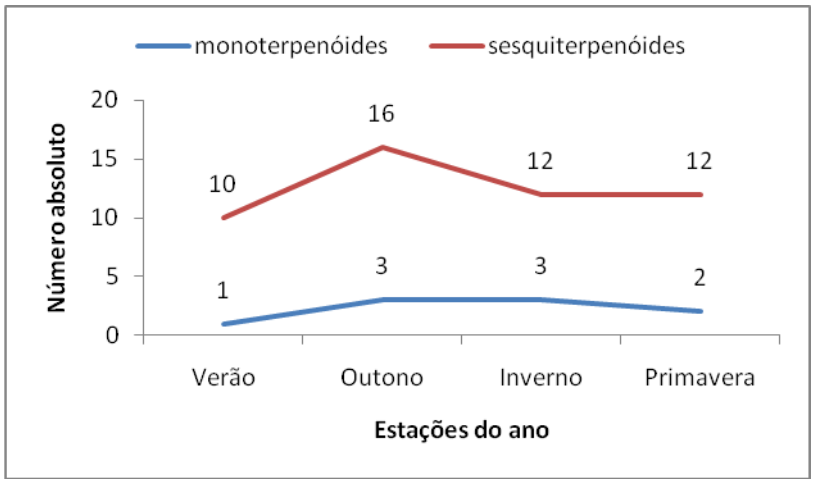


Figura 26. Variabilidade sazonal das principais classes constituintes do óleo essencial da *Baccharis trimera* coletada em Piratini, RS, Brasil, em 2008.

Ao analisar os óleos essenciais da *Baccharis trimera* por cromatografia bidimensional identificou-se 61 compostos (Tabela 7), quantidade essa significativamente superior ao encontrado via GC-FID principalmente em relação aos monoterpenos oxigenados e aos sesquiterpenos hidrocarbonados. Como mostra a figura 27 foi possível, através dessa análise, detectar a presença do β-pineno e do limoneno descritos em pesquisas anteriores[30,103] que provavelmente estavam coeluídos com outros compostos.

Tabela 7 – Compostos identificados no óleo essencial da *Baccharis trimera* coletada no outono via GC × GC. Os compostos já identificados via GC-FID estão destacados em negrito.

Nº.	Composto	^1t_R	^2t_R	Similaridade
1.	α-pineno	14,20	2,66	794
2.	β-pineno	15,66	2,93	752
3.	β-mirceno	15,85	3,03	868
4.	α-felandreno	16,58	3,12	885
5.	cis-β-terpineol	16,95	3,17	779
6.	limoneno	17,50	3,27	940
7.	eucaliptol	17,68	3,35	897
8.	γ-terpineno	19,88	3,68	865
9.	óxido cis linalol	19,88	5,76	711
10.	óxido cis-limoneno	22,26	5,25	903
11.	óxido trans-limoneno	22,45	5,41	846
12.	cânfora	23,18	6,45	829
13.	**carquejol**	25,01	7,62	861
14.	criptona	25,38	9,71	867
15.	α–terpineol	25,75	10,15	878
16.	mirtenal	25,93	8,33	734
17.	cis-verbenol	29,78	6,23	791
18.	**acetato de carquejila**	32,35	9,11	855
19.	**acetato de mirtenila**	32,71	7,33	852
20.	trans- acetato de pinocarnila	33,81	7,75	874
21.	α-cubebeno	36,93	4,22	828
22.	α-longipineno	37,48	4,42	816
23.	α-amorfeno	39,13	4,45	806
24.	α-copaeno	39,50	4,44	891
25.	α-fencheno	39,50	8,13	816
26.	trans-acetato de mirtenila	39,68	8,26	805
27.	**β-elemeno**	40,78	5,29	895
28.	α-gurjuneno	42,43	4,62	879
29.	β-sesquifelandreno	43,35	5,10	767
30.	β-cubebeno	44,45	5,13	839
31.	aromadendreno	45,36	5,25	892
32.	β-patchuleno	46,10	5,06	792
33.	β-farneseno	46,28	5,44	900
34.	α-himachaleno	46,46	5,62	836
35.	aloaromadendreno	47,38	5,52	876
36.	γ-gurjuneno	48,48	5,48	887

Tabela 7 – Compostos identificados no óleo essencial da *Baccharis trimera* coletada no outono via GC × GC. Os compostos já identificados via GC-FID estão destacados em negrito. (continuação)

Nº.	Composto	^1t_R	^2t_R	Similaridade
37.	α-gurjuneno	48,48	5,67	772
38.	**γ-muuroleno**	48,66	5,81	870
39.	trans-α-bergamoteno	48,66	5,91	810
40.	β-cariofileno	49,21	5,96	821
41.	α-selineno	50,13	6,22	907
42.	**α-muuroleno**	50,86	6,01	889
43.	**germacreno D**	52,33	6,43	859
44.	**δ-cadineno**	52,88	6,22	828
45.	calameneno	53,25	7,50	848
46.	α-calacoreno	55,08	7,39	757
47.	**elemol**	55,45	9,98	880
48.	**cis-nerolidol**	56,36	6,85	856
49.	palustrol	56,91	5,33	921
50.	**espatulenol**	57,28	7,09	885
51.	**óxido de cariofileno**	57,65	5,30	893
52.	**virififlorol**	58,20	5,55	885
53.	**ledol**	58,56	4,82	903
54.	**cubenol**	58,75	5,89	821
55.	**γ-eudesmol**	59,48	5,03	860
56.	**guaiol**	59,48	5,15	791
57.	δ-cadinol	60,03	4,78	866
58.	**α-cadinol**	60,21	4,93	833
59.	**β-eudesmol**	60,21	5,01	908
60.	γ-bisabolol	61,13	4,09	895
61.	óxido de ledeno (II)	61,31	5,02	802

^1t_R : tempo de retenção na primeira dimensão; ^2t_R : tempo de retenção na segunda dimensão

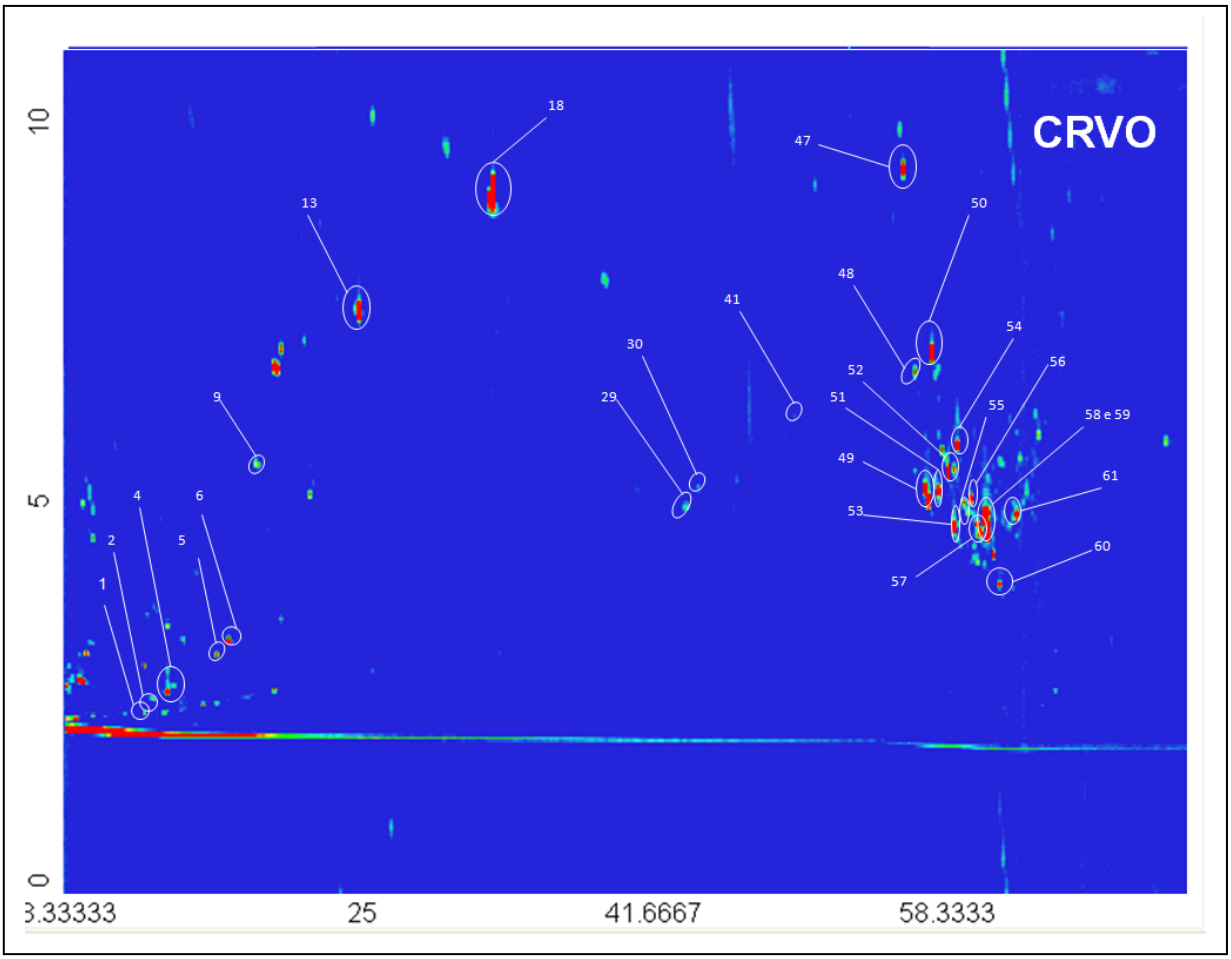


Figura 27. Diagrama de cores da separação obtida por GC × GC/TOFMS para o óleo de *B. trimera* coletada no outono. Os compostos estão identificados na Tabela 7.

Confirmando os dados obtidos pelo GC/MS, os diagramas de cores dos óleos essenciais da *B. trimera* (Figura 28) apontam a amostra colhida no outono como a rica em componentes mono e sesquiterpênicos, e o óleo produzido no verão como o de menor variedade de compostos, fato esse que demonstra que embora o verão

seja a época em que produziu-se maior quantidade de óleo, a composição do mesmo seja mais menos diversificada que nas demais estações.

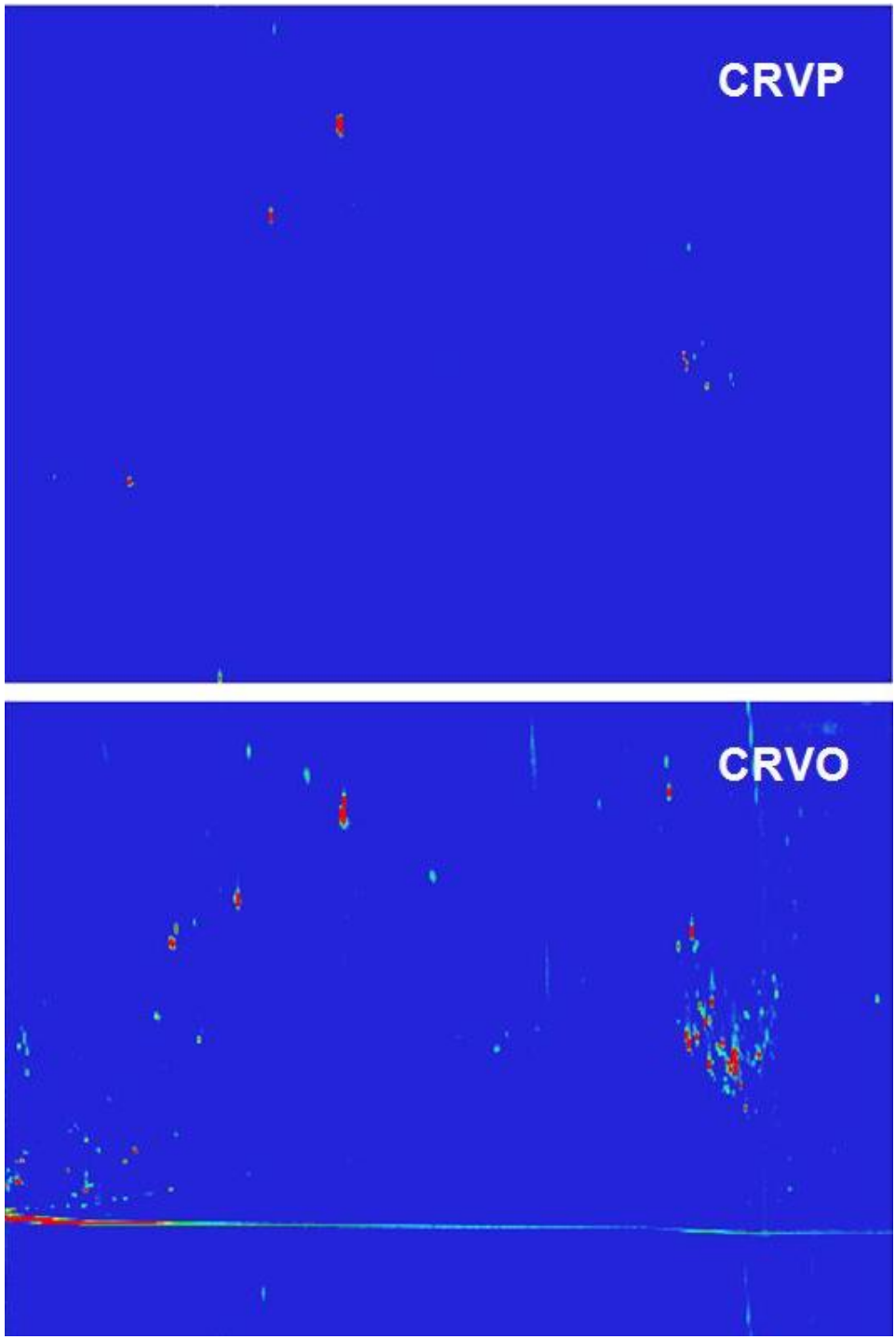


Figura 28a. Diagrama de cores do GC × GC das amostras de óleo essencial da *B. trimera* obtido na primavera e outono do ano de 2008. (CRVP-Primavera e CRVO-Outono)

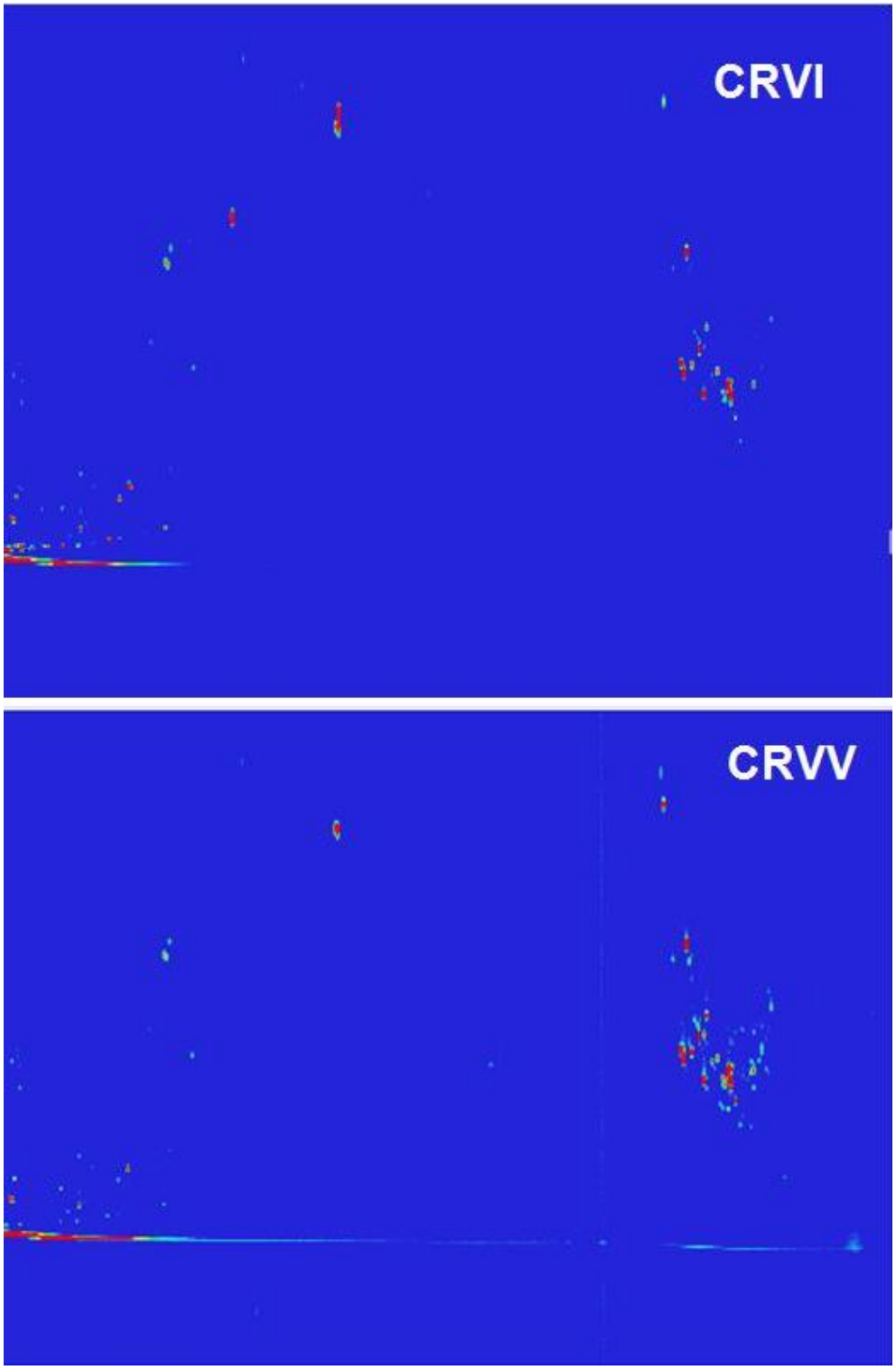


Figura 28b. Diagrama de cores do GC × GC das amostras de óleo essencial da *B. trimera* obtido no inverno e verão do ano de 2008. (CRVI-Inverno e CRVV-Verão)

Comparando os dados obtidos via cromatografia gasosa seja monodimensional ou bidimensional de ambas as espécies, *B. articulata* e *B. trimera* verifica-se que não existe um padrão definido na proporção entre mono e sesquiterpenos, sejam hidrocarbonados ou oxigenados.

O aumento significativo do número de compostos identificados pela GC × GC bem como a sinalização da presença de componentes como o β-pineno, o limoneno e o acetato de carquejila, ausentes segundo a técnica monodimensional, comprovam que o uso do GC × GC/TOFMS fornece elevados espectros de massas por pico, tornando possível a deconvolução espectral de picos que coeluem na ^{1}D e na ^{2}D, aumentando a capacidade de separação dos componentes.

O uso da técnica bidimensional favoreceu ainda a identificação de quatro classes de compostos presentes nos óleos essenciais das espécies analisadas (monoterpenos hidrocarbonados e oxigenados; sesquiterpenos hidrocarbonados e oxigenados) graças a ortogonalidade, existente no uso de duas colunas de separação diferentes, que aglomera os compostos quimicamente relacionados em um espaço de separação produzindo o chamado efeito “telhado”.

Os resultados encontrados nesse trabalho possuem caráter inédito no que tange a aplicação da cromatografia gasosa bidimensional abrangente, pois muitos pesquisadores analisaram as plantas do gênero *Baccharis* porém utilizaram-se apenas da técnica monodimensional, logo, muitos dos compostos identificados nas análises aqui descritas sequer foram sinalizados anteriormente.

A variedade de resultados obtidos pode sim ser reflexo da ação de diversos fatores ambientais, entre eles a sazonalidade, que circundam a planta no metabolismo secundário do ser vivo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Baseado nos objetivos propostos neste trabalho e analisando os resultados obtidos, podemos concluir que:

- As espécies de *Baccharis* pesquisadas apresentam perfil fitoquímico diferente o que comprova a diversidade nos produtos do metabolismo secundário da planta de acordo com seu tipo;

- As plantas apresentaram maior rendimento na produção de óleos voláteis justamente na época de floração das mesmas indicando a melhor época de colheita quando o interesse é óleo como um todo;

- Os compostos majoritários da *Baccharis articulata* não estão presentes em maior quantidade quando se dá maior produção de óleo, mostrando que não há relação direta entre o rendimento do óleo e a quantidade individual de seus componentes;

- Os resultados obtidos via cromatografia bidimensional mostraram o aumento impressionante de resolução e sensibilidade em relação à GC convencional. A GC x GC confirmou os dados já obtidos e proporcionou um conhecimento mais detalhado da composição dos óleos voláteis pois mais compostos foram identificados graças ao emprego da ortogonalidade dentre outras características. Mas não há como não destacar, que por ser uma técnica relativamente nova, abre-se uma infinidade de oportunidades de pesquisa tanto na metodologia empregada quanto na diversidade de amostras a serem analisadas.

- Ao relacionar todos os dados obtidos confirmou-se a influência direta de vários fatores sejam eles ambientais ou analíticos na composição química das plantas, afirmando assim a infinita possibilidade de estudos na área de produtos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Heiden, G.; **O gênero *Baccharis* L. secção *Caulopterae* DC. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul,** Monografia, Universidade Federal de Pelotas, Brasil, 2005, 238p.
2. Alice, C.B.; Mentz, L.; Siqueira, N.C.S.; Silva, G.A.A.B.; Jose, K.F.; **Plantas medicinais de uso popular: Atlas Farmacognóstico**, Canoas: ULBRA, 1995, 208p.
3. De Bona, C.M.; Biasi, L.A.; Zanette, F.; Nakashima, T.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2005**, *7*, 26.
4. Lorenzi, H.; Matos, F.J.; **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**, 2.ed.; Nova Odessa/SP: Instituto Plantarum, 2008, 576p.
5. Budel, J.M.; Duarte, M.R.; Santos, C.A.M.; Farago, P.V.; Matzenbacher, N.I.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 268.
6. Carreira, R.C.; ***Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica,** Tese de Doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, Brasil, 2007, 191p.
7. Onofre, S.B.; Fabiane, K.C.; Ferronatto, R.; Santos, A.C., *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, *18*, 197.
8. Borella, J.C.; Fontoura, A.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2002**, *12*, 63.
9. Rodrigues-das-Dores, R.G.; Casali, V.W.D.; Finger, F.L.; Cecon, P.R.; *Rev. Bras. Pl. Med*. **2006,** *8,* 175.
10. Budel, J.M.; Duarte, M.R.; Santos, C.A.M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2004**, *14*, 41.
11. Borella, J.C.; Duarte, D.P.; Novaretti, A.A.G.; Menezes, A.; França, S.C.; Rufato, C.B.; Santos, P.A.S.; Veneziani, R.C.S.; Lopes, N.P.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006**, *16*, 557.
12. Abad, M.J.; Bermejo, P.; *Arkivoc* **2007**, *7*, 76.
13. Murakami, D.M.; Borges Silva, A.L.; Bizão, N.; *Rev. Bras. Pl. Med*. **2008,** *10,* 97.

14. Florão, A.; **Avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *Baccharis*, Asteraceae,** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2006, 97p.
15. Rodriguez, M.V.; Gattuso, S.; Gattuso, M.; *Lat. Am. J. Pharm.* **2008**, *27*, 387.
16. Gosmann, G.; Oliveira, S.Q.; Dal-Pizzol, F.; Moreira, J.C.F.; Schenkel, E.P.; *Acta Farm. Bonaerense* **2004,** *23*, 365.
17. Agra, M.F.; Silva, K.N.; Basílio, I.J.L.D.; Freitas, P.F.; Barbosa-Filho, J.M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008,** *18,* 472.
18. Falkenberg, M.; Mendes, B.G.; Machado, M.J.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2006,** *16,* 568.
19. Budel, J.M.; Duarte, M.R.; Santos, C.A.M.; Cunha, L.M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2003,** *14,* 42.
20. Borella, J.C.; Fontoura, A.; Menezes Jr., A.; França, S.C.; *Rev. Bras. Pl. Med*. **2001,** *4,* 99.
21. Verdi, L.G.; Brighente, I.M.C.; Pizzolatti, M.G. *Quim. Nova* **2005**, *28*, 85.
22. Onofre,S. B.; Ferronatto, R.; Marchesan, E.D.; Pezenti, E.; Bednarski, F.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 224.
23. Figueira, G.M.; Duarte, M.C.T.; Pereira, B.; Magalhães, P.M.; Delarmelina, C.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2004**, *14*, 6.
24. Silva, F.G.; Pinto, J.E.B.P.; Cardoso, M.G.; Nascimento, E.A.; Nelson, D.L.; Sales, J.F.; Mol, D.J.S.; *Rev. Bras. Pl. Med*. **2006,** *8,* 19.
25. Simionatto, E.; Ilha, V.; Mallmann, A.S.; Porto, C.; Dalcol, I.I.; Morel, A.F.; *J. Essent. Oil Res.* **2008**, *20*, 366.
26. Biavatti, M.W.; Marensi, V.; Leite, S.N.; Reis, A.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 640.
27. http://picasaweb.google.com/lh/photo/8Ea1psMt3tLib-T6EhtNRQ, acessada em: fevereiro, 2010.
28. Auler, N.M.F.; Battistin, A.; Reis, M.S.; *Rev. Bras. Pl. Med*. **2006,** *8,* 55.
29. Biasi, L.A.; De Bona, C.M.; *Rev. Bras. Pl. Med*. **2000,** *2,* 37.
30. Palácio, C.P.A.M.; Biasi, L.A.; Nakashima, T.; Serrat, B.M.; *Rev. Bras. Pl. Med*. **2007,** *9,* 58.

31. De Bona, C.M.; Biasi, L.A.; Zanette, F.; Nakashima, T.; *Sem.Cienc.Agrarias* **2004,** *25,* 179.
32. http://static.panoramio.com/photos/original/24230019.jpg, acessada em: fevereiro, 2010.
33. Torres, L.M.B.; Gamberini, M.T.; Roque, N.F.; Lima-Landman, M.T.; Souccar, C.; Lapa, A.J.; *Phytochemistry* **2000,** *55*, 617.
34. Ferri, P.H.; Silva, F.G.; Oliveira, C.B.A.; Pinto, J.E.B.P.; Nascimento, V.E.; Santos, S.C.; Seraphin, J.C.; *J.Braz. Chem. Soc.* **2007,** 18, 990.
35. Schimdt, F.B.; Marques, L.M.; Mayworm, M.A.S.; *Rev. Bras. Pl. Med*. **2008,** *10,* 1.
36. Franco, L.L.; **As sensacionais 50 plantas medicinais: campeãs de poder curativo,** 5.ed., Curitiba: Lobo Franco Ltda, 2000, 99p.
37. Vasconcelos, E.C.; Ferrante, L.M.S.; Mayer, B.; Oliveira, C.M.R.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 356.
38. Leite, C.E.; Lunardelli, A.; Castaman, T.A.; Paul, E.L.; Oliveira, J.R.; RBAC **2007,** *39,* 29.
39. Freitas, M.S.M.; Martins, M.A.; Carvalho, A.J.C.; Carneiro, R.F.V.; *Rev. Bras. Pl. Med*. **2004,** *6,* 30.
40. Robbers, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.E.; **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**, São Paulo: Premier, 1997, 372p.
41. Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R.; **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4.ed.; Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2002, 824p.
42. Rodrigues, M.R.A.; **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano,** Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002, 163p.
43. Von Mühlen, C.; **Caracterização química de compostos nitrogenados de petróleo brasileiro e de óleos voláteis de plantas brasileiras usando cromatografia gasosa bidimensional abrangente,** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2007, 186p.
44. Ehlert, P.A.D.; Blank, A.F.; Arrigoni-Blank, M.F.; Paula, J.W.A.; Campos, D.A.; Alviano, C.S.; *Rev. Bras. Pl. Med*. **2006,** *8,* 79.

45. Bruneton, J.; **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**, 1.ed.; Zaragoza/ES: Editorial ACRIBIA S.A., 1991, 544p.
46. Poletto, F.; **Farmacognosia I,** Porto Alegre: UFRGS, 2002, 120p.
47. Silva, F.G.; Pinto, J.E.B.P.; Nascimento, V.E.; Souchie, E.L.; Bertolucci, S.K.V.; *Rev. Bras. Pl. Med*. **2007,** *9,* 52.
48. Cowan, M.M.; *Clin.Microbiol.Rev.* **1999**, *12*, 564.
49. Sainto, M.L.; Scramin, S.; **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura,** São Paulo:EMPRAPA, 2000, 48p.
50. Caredda, A.; Marongiu, B.; Porcedda, S.; Soro,C.; *J.Agric.Food Chem.* **2002**, *50*, 1492.
51. Zini, C.A.; Schossler, P.; Schneider, G.L.; Wunsch, D.; Soares, G.L.G.; *J.Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20,* 277.
52. Busatta, Cassiano. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**, Dissertação de Mestrado, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Brasil, 2006, 94p.
53. Costa, A.F.; **Farmacognosia**, 5.ed., Lisboa:Fundação Calouste Gulbekian, 1994. 1038p.
54. Agostini, F.; Santos, A.C.A.; Rossati, M.; Pansera, M.R.; Zattera, F.; Wasum, R.; Serafini, L.A.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 215.
55. Adams, R. P.; **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy,** Ilinois: Allured Publishing Corporation, 2001, 455p.
56. Lopes, N.P.; Gobbo-Neto, L.; *Quim. Nova* **2007**, *30,* 374.
57. Calixto, J.B.; Yunes, R.A.; **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna,** 1.ed. Santa Catarina: Argos, 2001. 524p.
58. Valmorbida, J.; Boaro, C.S.F.; Marques, M.O.M.; Ferri, A.F. *Rev.Bras.Pl.Med.* **2006**, *8*, 56.
59. Hess, S.C.; Peres, M.T.L.P.; Batista, A.L.; Rodrigues, J.P.; Tiviroli, S.C.; Oliveira, L.G.L.; Santos, C.W.C.; Fedel, L.E.S.; Crispim, S.M.A.; Smania, A.; Smania, E.F.A.; Flach, A.; Pantaroto, S.; *Quim. Nova* **2007**, *30,* 370.
60. Johnson, C.B.; Ioannidis, D.; Bonner, L.; *Annals of Botany* **2002**, *90*, 453.

61. Palá-Paúl, J.; Pérez-Alonso, M.J.; Velasco-Negueruela, A.; Palá-Paúl, R.; Sanz, J.; Conejero, F.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2001,** *29*, 663.
62. Zidorn, C.; Stuppner, H.; *Taxon* **2001,** *50,* 115.
63. Vázquez-Flota, F.; Carrilo-Pech, M.; Minero-Garcia, Y.; Miranda-Ham, M. L.; *Plant Phys. Biochem.* **2004,** *42*, 623.
64. Silva, M.G.V.; Craveiro, A.A.; Matos, F.J.A.; Machado, M.I.L.; Alencar, J.W.; *Fitoterapia* **1999,** *70*, 32.
65. Garlet, T.M.B.; Santos, O.S.; Medeiros, S.L.P.; Manfron, P.A.; Garcia, D.C.; Borcioni, E.; Fleig, V.; *Rev. Ciência Rural* **2007,** *37,* 956.
66. Lopes, J.L.C.; Lopes, N.P.; Sakamoto, H.T.; Gobbo-Neto, L.; Cavalheiro, A.J.; *J.Braz. Chem. Soc.* **2005,** *16,* 1396.
67. McNair, H.M.; Miller, J.M.; **Basic gas chromatography**, EUA: Wiley-Interscience, 1997, 200p.
68. Matos, F.J.A.; **Introdução à fitoquímica experimental**, 2.ed.; Fortaleza: UFC, 1997. 141p.
69. Harris, D.C.; **Análise química quantitativa**, 6.ed.; Rio de Janeiro: LTC, 2005, 876p.
70. Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S.; **Fundamentos de cromatografia**, São Paulo: Editora da UNICAMP, 2006, 453p.
71. Degani, A.L.G.; Cass, Q.B.; Vieira, P.C.; *Quim. Nova na Escola,* **1998,** *7*, 21.
72. Alencar, J.W.; Craveiro, A.A.; Matos, F.J.A.; Machado, M.I.L.; *Quim. Nova* **1990,** *13,* 282.
73. Stashenko, E.E.; Martinez, J.R.; *Rev. Scient.Chromatog.* **2009**, *1*, 31.
74. Marriott, P.; Song, S.M.; Kotsos, A.; Drummer, O.H.; Wynne, P.; *Forensic Sci. Int.* **2004,** *143*, 87.
75. Von Mühlen, C.; Zini, C.A.; Caramão, E.B.; *Quim. Nova* **2007**, *30,* 682.
76. Zini, C.A.; Von Mühlen, C.; Caramão, E.B.; Marriott, P.J. *Quim. Nova* **2006**, *29,* 765.
77. Pursch, M.; Sun, K.; Winniford, B.; Cortes, H.; Weber, A.; McCabe, T.; Luong, J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2002,** *373*, 356.
78. Augusto, F.; Pedroso, M.P.; Godoy, L.A.F.; Fidélis, C.H.V.; Ferreira, E.C.; Poppi, R.J.; *Quim. Nova* **2009**, *32,* 421.

79. Zini, C.A. et al.; *Scient. Chromatogr.* **2009,** *1,* 31.
80. Gorecki, T.; Harynuk, J.; Panic, O.; *J. High Resol. Chromatogr.* **2004,** *27,* 359.
81. Frysinger, G.S.; Gaines, R.B.; *J. High Resol. Chromatogr.* **1999,** *22,* 251.
82. Frysinger, G.S.; Gaines, R.B.; Reddy, C.M.; *Environm. Forensics* **2002,** *3,* 27.
83. Blomberg, J.; Beens, J.; Schoenmakers, P.J.; *J. High Resol. Chromatogr.* **2000,** *23,* 182.
84. Blomberg, J.; Beens, J.; Schoenmakers, P.J.; Tijssen, R.; *J. High Resol. Chromatogr.* **2005,** *20,* 539.
85. Blomberg, J.; Beens, J.; Schoenmakers, P.J.; *J. High Resol. Chromatogr.* **2000,** *23,* 197.
86. Dimandja, J.M.D.; Stanfill, S.B.; Grainger, J. Patterson Jr., D.G.; *J. High Resol. Chromatogr.* **2000,** *23,* 208.
87. Shellie, R.; Mondello, L.; Marriott, P.; Dugo, G.; *J. Chromatogr. A* **2002,** *970*, 225.
88. Shellie, R.; Xie, L.; Marriot, P.; *J. Chromatogr. A* **2002,** *968*, 161.
89. Eyres, G.; Dufour, J.P.; Hallifax, G.; Sotheeswaran, S.; Marriott, P.; *J. Sep. Sci.* **2005,** *28,* 1061.
90. Dufour, J.P.; Eyres, G. Marriott, P.; *J. Chromatogr. A* **2007,** *1150*, 70.
91. Xu, G.; Qiu, Y.; Lu, X.; Pang, T.; Zhu, S.; Kong, H.; *J. Pharm. Biom. Anal.* **2007,** *43*, 1721.
92. Wu, C.; Zhu, S.; Lu, X.; Dong, L.; Xing, J.; Su, X.; Kong, H.; Xu, G.; *J. Chromatogr. A* **2005,** *1086*, 107.
93. Liu, B.; Ma, C.; Wang, H.; Lu, X.; Li, H.; Xu, G.; *J. Chromatogr. A* **2007,** *1150*, 50.
94. Özel, M.; Gögüs, F.; Lewis, A.C.; *J. Chromatogr. A* **2006,** *1114*, 164.
95. Marriott, P.; Mühlen, C.; Zini, C.; Caramão, E.; *J. Chromatogr. A* **2008,** *1200*, 34.
96. Holadová, K.; Klimánková, E.; Hajslová, J.; Cajka, T.; Poustka, J.; Koudela, M.; *Food Chem.* **2008,** *107,* 464.
97. Mateus, E.; Barata, R.C.; Zrostilíková, J.; Gomes da Silva, M.D.R.; Paiva, M.R.; *J. Chromatogr. A* **2010,** *1217*, 1845.
98. Özel, M.; Gögüs, F.; Lewis, A.C.; *Anal. Chim. Acta* **2006,** *566,* 172.

99. Farmacopéia Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2002.
100. Damasceno, F.C.; **Microextração em fase sólida no modo headspace aplicada ao estudo de substâncias voláteis de plantas infestadas por gralhas foliares entomógenas**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2007, 125p.
101. Pocá, A.M.P.C.; **Biomassa, óleo essencial, perfil fitoquímico e nutrientes da carqueja sob influência de fontes e doses de nitrogênio,** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2005, 69p.
102. Zunino, M.P.; López, A.G.; López, M.L.; Zygadlo, J.A.; *J. Essent. Oil Res.* **2004,** *16*, 29.
103. Simões-Pires, C.A.; Debenedetti, S.; Spegazzini, E.; Mentz, L.A.; Matzenbacher, N.I.; Limberger, R.P.; Henriques, A.T.; *Pl.Syst.Evol.* **2005**, *253*, 23.
104. Ferreira, S.R.S.; Silva, D.C.M.N.; Bresciani, L.F.V.; Dalagnol, R.L.; Danielski, L.; Yunes, R.A.; *Food Bioprod. Proc.* **2009,** *87,* 317.
105. Berger, B.M.; Müller-Riebau, F.J.; Yegen, O.; Cakir, C.; *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4821.
106. Maia, J.G.S.; Taveira, F.S.N.; de Lima, W.N.; Andrade, E.H.A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 69.
107. Taveira, F.N.; Andrade, E.A.; Waterloon, L.; Maia, J.G.S.; *An. Acad. Bras. Cienc.* **2003**, *75*, 27.
108. Heinzmann, B.M.; Barros, F.M.C.; Zambarda, E.O.; *Quim. Nova* **2009,** *32,* 861.
109. Lago, J.H.G.; Romoff, P.; Fávero, O.A.; *Quim. Nova* **2008,** *31,* 737.