

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação química e biológica de extratos de *Baccharis* pertencentes à seção
Caulopterae (carquejas)

CLÁUDIA AVELLO SIMÕES PIRES

PORTO ALEGRE, 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação química e biológica de extratos de *Baccharis* pertencentes à seção
Caulopterae (carquejas)

Dissertação apresentada por **Cláudia
Avello Simões Pires** para a obtenção
do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Amélia T. Henriques
Co-orientador: Profa. Dra. Célia G. Chaves

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e no Laboratório de controle de qualidade da Faculdade de Farmácia desta Universidade, bem como no Instituto de Fitoquímica e Farmacognosia da Universidade de Lausanne, Suíça.

Agradecemos a CAPES pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

*Aos meus pais e avós, alicerces de minha
formação, e ao meu filho que soube
entender todos os momentos de
ausência.*

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Amélia T. Henriques por sua orientação e estímulo constante.

À professora Dra. Célia G. Chaves por sua co-orientação.

Ao professor Dr. Kurt Hostettmann pela concessão de estágio junto ao Instituto de Fitoquímica e Farmacognosia da Universidade de Lausanne, Suíça.

Ao Dr. Nelson I. Matzenbacher pelas coletas e identificações botânicas, base deste trabalho.

À Dra. Lílian Mentz pela enorme contribuição nas questões taxonômicas desta dissertação.

À equipe do Instituto de Fitoquímica e Farmacognosia da Universidade de Lausanne pelas boas-vindas e auxílios prestados.

À Dra. Silvia Debenedetti pelos exemplares de *Baccharis* da Argentina.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS pelos conhecimentos transmitidos e às funcionárias Patrícia, Fátima, Liane e Dejanira por seus préstimos.

Aos professores Dra. Renata Limberger, Dra. Miriam Apel, Dra. Edna Suyenaga e Dr. José Angelo Zuanazzi pela amizade e apoio incondicional.

Aos amigos e colegas, Fabiane Farias, Diogo Pilger, Ricardo Silva, Marcos Sobral, Roger Drech, Tatiana Castilhos, Eduardo Konrath, Guilherme, Rafaela Marin, Márcia Vignolli e demais bolsistas pelo apoio, colaboração e pelos momentos de descontração.

Ao Emerson, pelo carinho, companheirismo e seus conhecimentos em fitoquímica.

Aos meus amigos, meus pais, meus avós, meus tios, minha irmã e meu filho, pelo estímulo, força e compreensão.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO I: SEÇÃO CAULOPTERAE, GÊNERO <i>Baccharis</i>: QUÍMICA E TAXONOMIA	7
I.1. Aspectos botânicos	8
I.1.1. O gênero <i>Baccharis</i>	8
I.1.2. Classificação infragenérica do gênero <i>Baccharis</i>	9
I.1.3. Seção Caulopterae	11
I.1.4. <i>Baccharis genistelloides</i> x <i>Baccharis trimera</i>	13
I.1.5. <i>Baccharis crispa</i> x <i>Baccharis cylindrica</i>	14
I.1.6. <i>Baccharis articulata</i> x <i>Baccharis gaudichaudiana</i>	14
I.2. Estudos químicos em Caulopterae	17
I.2.1. Compostos fenólicos	17
I.2.2. Terpenos	20
I.3. Material e Métodos	30
I.3.1. Material vegetal	31
I.3.2. Óleos voláteis e extratos hexânicos	35
I.3.3. Análise de extratos aquosos	37
I.4. Resultados e Discussão	41
I.4.1. Análise de óleos voláteis e extratos hexânicos	41
I.4.2. Análise dos extratos aquosos de <i>B. trimera</i> , <i>B. crispa</i> e <i>B. usterii</i>	52
CAPÍTULO II: AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS	60
II.1. Atividades biológicas na seção Caulopterae	61
II.2. Material e métodos	69
II.2.1. Determinação da atividade antimicrobiana em óleos voláteis	69

II.2.2. Determinação da atividade antiinflamatória <i>in vitro</i>	71
II.2.3. Determinação de DL ₅₀ do óleo volátil de <i>B. trimera</i>	74
II.2.4. Determinação da atividade anitoxidante em extrato aquoso	74
II.3 Resultados e discussão	75
II.3.1. Atividade antimicrobiana	75
II.3.2. Atividade antiinflamatória <i>in vitro</i>	77
II.3.3. DL ₅₀ do óleo volátil de <i>B. trimera</i>	78
II.3.4. Atividade antioxidante	79
DISCUSSÃO GERAL	81
CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS	100

LISTA DE TABELAS

Table I.1. Dados de coleta das espécies de <i>Baccharis</i> , Caulopterae utilizadas para avaliação química e biológica	31
Tabela I.2. Rendimento percentual em óleo volátil de espécies de <i>Baccharis</i>	41
Tabela I. 3. Composição percentual relativa dos constituintes voláteis de diferentes espécies de <i>Baccharis</i>	44
Tabela I.4. Composição percentual relativa dos constituintes voláteis de partes aéreas de <i>B. trimera</i> de diferentes locais de coleta.....	46
Tabela I.5. Composição percentual relativa dos constituintes voláteis de <i>B. trimera</i> em diferentes meses de coleta.....	47
Tabela I.6. Composição percentual relativa dos constituintes voláteis de <i>B. crispa</i> em diferentes locais e meses de coleta.....	48
Tabela I.7. Percentual de acetato de carquejila em extratos hexânicos de <i>B. trimera</i> e <i>B. crispa</i> coletadas no Brasil e Argentina.....	49
Tabela II.1. Atividade antimicrobiana dos óleos voláteis testados.....	75
Tabela II.2. Migração de neutrófilos pelo método da câmara de Boyden.....	77
Tabela II.3. Valores obtidos na determinação da DL ₅₀ do óleo volátil de <i>B. trimera</i>	78

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1. Origem de pequenas moléculas constituindo novas entidades químicas (NCE's) entre 1981 e 2002 (adaptado de NEWMAN et al., 2003).....	2
Figura I.2. Posição do gênero <i>Baccharis</i> L. na família Asteraceae.....	8
Figura I.3. Classificação infragenérica do gênero <i>Baccharis</i> em seções de acordo com diferentes autores.....	12
Figura I.4. Imagem digital do voucher: Soejarto et al., 6071, coletado no Paraguai. Fonte: Herbário John G. Searle, Field Museum of Natural History, Chicago.....	15
Figura I.5. Flavonóides identificados em espécies de Caulopterae. Ara = arabinose; Gli = glicose; Ram = ramnose	18
Figura I.6. Estruturas dos compostos ácido 3,5-O-[E]-dicafeoilquínico (22) e 4'-O-β-glicopiranosil-cafeato (23).....	19
Figura I.7. Diterpenos de núcleo clerodano isolados de <i>B. trimera</i> (ZDERO et al., 1989).....	21
Figura I.8. Diterpenos de <i>B. trimera</i> (HERZ et al., 1977; TORRES et al., 2000).....	22
Figura I.9. Diterpenos isolados de <i>B. sagittalis</i> (CIFUENTE et al., 2002).....	23
Figura I.10. Diterpenos da espécie classificada como <i>B. genistelloides</i> coletada na Bolívia (SUTTISRI et al., 1994).....	24
Figura I.11. Diterpenos de <i>B. articulata</i> , <i>B. crispa</i> e <i>B. trimera</i> (GIANELLO et al., 2000).....	25
Figura I.12. Diterpenos de <i>B. crispa</i> (CEÑAL et al, 1997).....	26
Figura I.13. Diterpenos de <i>B. gaudichaudiana</i> (FULLAS et al, 1994).....	26

Figura I.14. Diterpenos de núcleo labdano de <i>B. gaudichaudiana</i> (Fullas et al., 1991; 1992; 1994).....	27
Figura I.15. Diterpenos de <i>B. articulata</i> (DAI et al., 1993).....	28
Figura I.16. Estrutura dos compostos 67 , 68 e 69	29
Figura I.17. Mapa com os pontos de coleta de <i>Baccharis</i> avaliadas quanto a composição química e atividades biológicas.....	32
Figura I.18. Fotografia de um ramo de <i>B. crispa</i> coletada em Guaíba, RS.....	33
Figura I.19. Fotografia de um ramo de <i>B. trimera</i> coletada em Guaíba, RS.....	33
Figura I.20. Esquema representativo das bombas P1, P2 e P3 para análise CLAE/UV-DAD com adição pós-coluna de reagentes de deslocamento UV....	39
Figura I.21. Biossíntese de (-)-mentol e (-)-carvona a partir de (-)-limoneno. (Adaptado de BERTEA et al., 2003).....	51
Figura I.22. Estrutura química do acetato de carquejila.....	52
Figura I.23. Comparação do perfil cromatográfico dos extratos aquosos de <i>B. usterii</i> , <i>B. crispa</i> e <i>B. trimera</i> por CLAE/UV.....	53
Figura I.24. Estrutura dos compostos A a F	56
Figura I.25. Estrutura química dos compostos G a I	58
Figura I.26. Cromatograma do extrato de <i>B. trimera</i> , com os respectivos espectros de massas e deslocamentos UV para os flavonóides G a I	59
Figura II.1. Esquema representativo da montagem da câmara Boyden utilizada na determinação da atividade antiinflamatória <i>in vitro</i>	72
Figura II.2. Gráfico da reta obtido pelo método dos probitos na determinação de DL ₅₀ do óleo volátil de <i>B. trimera</i>	79
Figura II.3. Atividade antioxidante das microfrações de <i>B. usterii</i> em relação aos tempos de retenção de seu cromatograma.....	80

RESUMO

O gênero *Baccharis* pertence a subtribo Baccharidinae, tribo Astereae, família Asteraceae. Foram investigadas oito espécies de *Baccharis* pertencentes a seção Caulopterae, do ponto de vista químico e biológico. As espécies *B. articulata*, *B. crispa*, *B. cf. milleflora*, *B. microcephala*, *B. myriocephala*, *B. stenocephala*, *B. trimera* e *B. usterii* foram analisadas quanto a composição química de seu óleo volátil por CG e CG/EM. A maioria das espécies apresentou predominância de sesquiterpenos, com exceção das duas espécies bialadas estudadas, *B. articulata* e *B. stenocephala*, as quais apresentaram quantidades apreciáveis do monoterpeno β -pineno, e da espécie farmacopeica, *B. trimera*, com a predominância de acetato de carquejila. Devido a dificuldade na diferenciação das espécies *B. trimera* e *B. crispa* por meio de caracteres morfo-anatômicos, estas tiveram a composição química de seu volátil acompanhada ao longo de diferente épocas e locais de coleta. Os extratos hexânicos destas espécies foram também analisados por CG e CG/EM a fim de detectar a presença de acetato de carquejila em amostras coletadas no Brasil e Argentina. Os resultados sugerem a presença de acetato de carquejila como um marcador da espécie *B. trimera*. Os óleos voláteis de *B. articulata*, *B. crispa*, *B. microcephala*, *B. myriocephala*, *B. trimera* e *B. usterii* foram investigados quanto a atividade antimicrobiana pelo método da bioautografia e todas elas apresentaram alguma atividade. Os óleos voláteis de *B. articulata*, *B. crispa* e *B. trimera* apresentaram fraca atividade antiinflamatória in vitro pelo método da câmara de Boyden modificada. A DL₅₀ do óleo de *B. trimera* foi investigada via intraperitoneal em camundongos e calculada em 0,915 g/kg. A partir do extrato aquoso de *B. usterii*, foram isolados seis ácidos cafeoilquínicos. Quando comparados por CLAE acoplada a técnicas de identificação "on-line", os extratos aquosos de *B. trimera*, *B. crispa* e *B. usterii* apresentaram os seis ácidos em comum. O extrato aquoso de *B. trimera* diferenciou-se dos demais pela presença de flavonóides, em especial, nepetina. Os três extratos aquosos apresentaram atividade antioxidante frente a DPPH, sendo esta atividade também detectada nos seis ácidos cafeoilquínicos isoladamente.

Palavras-chave: Asteraceae, Baccharis, Caulopterae, taxonomia, óleos voláteis, ácidos cafeoilquínicos, antimicrobiano, antioxidante, DL₅₀.

ABSTRACT

The genus *Baccharis* belongs to subtribe Baccharidinae, family Asteraceae. Eight *Baccharis* species from section Caulopterae were investigated concerning their chemical composition and biological activities. *B. articulata*, *B. crispa*, *B. cf. milleflora*, *B. microcephala*, *B. myriocephala*, *B. stenocephala*, *B. trimera* and *B. usterii* had their volatile oil composition investigated by GC and GC/MS. Most of them showed the predominance of sesquiterpenes, except the two-winged species, *B. articulata* and *B. stenocephala*, with predominance of β -pineno, and the official species, *B. trimera*, with carquejyl acetate. Considering the difficult differentiation between *B. trimera* and *B. crispa* based on morphologic and anatomic aspects, both species had their volatile oils investigated in samples from different seasons and places of collection. Hexane extracts from these species were also analysed by GC and GC/MS in order to detect carquejyl acetate in samples collected in Brazil and Argentina. Results suggest carquejyl acetate as a marker compound for *B. trimera*. Volatile oils of *B. articulata*, *B. crispa*, *B. microcephala*, *B. myriocephala*, *B. trimera* and *B. usterii* were investigated for their antimicrobial activity using a bioautographic method, and all of them showed activity to some extent. Volatile oils of *B. articulata*, *B. crispa* and *B. trimera* presented slight anti-inflammatory activity *in vitro* through Boyden chamber assay. The LD₅₀ of the volatile oil of *B. trimera* was determined as 0.915 g/kg, after intraperitoneal injection in mice. Six caffeoylquinic acids were isolated from the aqueous extract of *B. usterii*. The aqueous extracts of *B. trimera*, *B. crispa* and *B. usterii* showed the six acids in common when compared by HPLC coupled to on-line identification techniques. The aqueous extract of *B. trimera* was different from the others due to the presence of flavonoids, especially nepetine. The three aqueous extracts showed antioxidant activity in DPPH assay, as well as the six caffeoylquinic acids isolated.

Keywords: Asteraceae, *Baccharis*, Caulopterae, taxonomy, volatile oils, caffeoylquinic acids, antimicrobial, antioxidant, LD₅₀.

INTRODUÇÃO GERAL

O uso das plantas medicinais remonta à história das civilizações humanas, constituindo o único recurso terapêutico até meados do século XIX. Porém, com o advento da Revolução Industrial e o desenvolvimento da Medicina, sua utilização passou a ser desacreditada pelos profissionais de saúde de um modo geral (DE PASQUALE, 1984).

Atualmente, o intenso desenvolvimento de áreas como a biologia molecular e a química combinatorial desencoraja a pesquisa de produtos naturais em empresas farmacêuticas, as quais passaram a realizar “screenings” extensivos em bibliotecas combinatoriais, na tentativa de acelerar seus resultados em relação à multiplicidade de novos fármacos. Estes, porém, nem sempre atingem os níveis esperados. Em contrapartida, a área de produtos naturais ainda é a responsável pela obtenção de aproximadamente 50% de pequenas moléculas que constituem novas entidades químicas (NCE's) aprovadas (Figura I.1), considerando as categorias: produtos naturais propriamente ditos (N), derivados de produtos naturais (DN), produtos sintéticos cujo farmacóforo foi desenvolvido a partir de um produto natural (SN) e produtos sintéticos (S). Estes dados retratam a contínua importância do papel exercido por produtos de origem natural, apesar da atual redução dos programas de pesquisa que visam a descoberta de novos fármacos de origem vegetal (NEWMAN *et al.*, 2003).

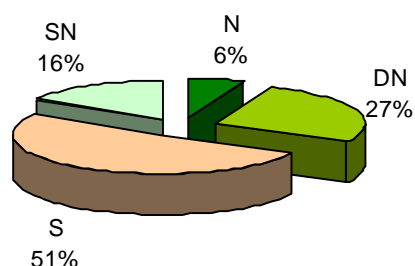


Figura I.1. Origem de pequenas moléculas constituindo novas entidades químicas (NCE's) entre 1981 e 2002 (adaptado de NEWMAN *et al.*, 2003).

As características do setor farmacêutico brasileiro têm levado ao encarecimento progressivo da produção de novos fármacos. Com a impossibilidade de competir nos segmentos de produtos patenteados, o segmento de fitoterápicos surge como uma possibilidade para a diversificação das empresas. Entre as plantas mais utilizadas para fins medicinais pela população brasileira estão babosa, boldo, hortelã, alho, calêndula e carqueja (CALLEGARI, 2001). Dentre elas, a carqueja era a única a não constar no Anexo I da Resolução-RDC nº 17, de 24 de fevereiro de 2000, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2000). Além disso, a carqueja não consta na lista de registro simplificado de fitoterápicos publicada pela legislação vigente (ANVISA, 2004a).

Popularmente, as carquejas são utilizadas para tratar distúrbios digestivos, diabete, reumatismo e ferimentos (CAMARGO, 1985; CORREA, 1985). Também têm sido utilizadas como diuréticas (CAMARGO, 1985), hepatoprotetoras (TOURSARKISSIAN, 1980), anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, na hemorragia cerebral, obesidade e desintoxicação (DI STASI *et al.*, 2002).

A espécie descrita pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2003) é *Baccharis trimera* (Less.) DC. Porém, existem outras espécies constituindo o chamado complexo “carquejas” que, por apresentarem ramos e caules alados, são utilizadas indiscriminadamente pelas populações como plantas medicinais (BARROSO E BUENO, 2002).

Sendo *Baccharis* um gênero complexo, classificações infragenéricas foram elaboradas por diversos autores. Estas classificações foram todas conduzidas de maneira artificial, considerando apenas espécies que ocorrem em determinadas regiões e não no gênero como um todo. O trabalho de classificação mais recente foi publicado por GIULIANO (2001), onde as espécies denominadas “carquejas” foram situadas na seção Caulopterae.

A identificação botânica das espécies de Caulopterae é complexa e a diferenciação entre *B. trimera* e *B. crispa* costuma ser a maior dificuldade dos taxonomistas. Encontram-se no mercado produtos industrializados a base de carqueja

utilizando como nome científico *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers., que não consta como válido para o Brasil.

Apesar dos numerosos estudos sobre estas espécies, as dificuldades de diferenciação botânica, a carência de dados sobre atividades biológicas e sua extensiva utilização popular, justificam o desenvolvimento de estudos químicos e biológicos que contemplem estas espécies.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é estabelecer diferenças na composição química e no “screening” biológico de extratos de espécies do gênero *Baccharis* que integram a seção Caulopterae, enfatizando a análise de óleos voláteis na tentativa de determinar marcadores químicos que possam diferenciar as espécies, em especial, *B. crispa* e *B. trimera*.

Os objetivos específicos incluem:

Óleo volátil:

- obtenção por hidrodestilação;
- determinação da composição percentual por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama CG/DIC;
- identificação dos constituintes por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM);
- comparação da variação da composição química de algumas espécies em função da época e local de coleta.
- avaliação da atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos;
- determinação da atividade antiinflamatória *in vitro* pela avaliação da inibição da migração leucocitária através da câmara de Boyden;
- determinação da DL₅₀ do óleo volátil de *B. trimera* em camundongos, via intraperitoneal.

Extrato aquoso:

- comparação do perfil cromatográfico dos extratos aquosos de *B. crispa*, *B. trimera* e *B. usterii*.
- determinação da atividade antioxidante frente a DPPH (difenilpicrilidrazila).

CAPÍTULO I
SEÇÃO CAULOPTERAE, GÊNERO *Baccharis* – TAXONOMIA E QUÍMICA

I.1. Aspectos botânicos

I.1.1. O gênero *Baccharis*

O gênero *Baccharis* L. pertence à subtribo Baccharidinae Hoffman, tribo Astereae, família Asteraceae. É o gênero mais rico da tribo, estimando-se seu número entre 400 e 500 espécies (BREMER, 1984; NESOM, 1990). Sua distribuição geográfica é exclusivamente americana, estendendo-se do sul dos Estados Unidos até o extremo sul do Chile e Argentina. A Figura I.2 apresenta a posição do gênero na família Asteraceae.

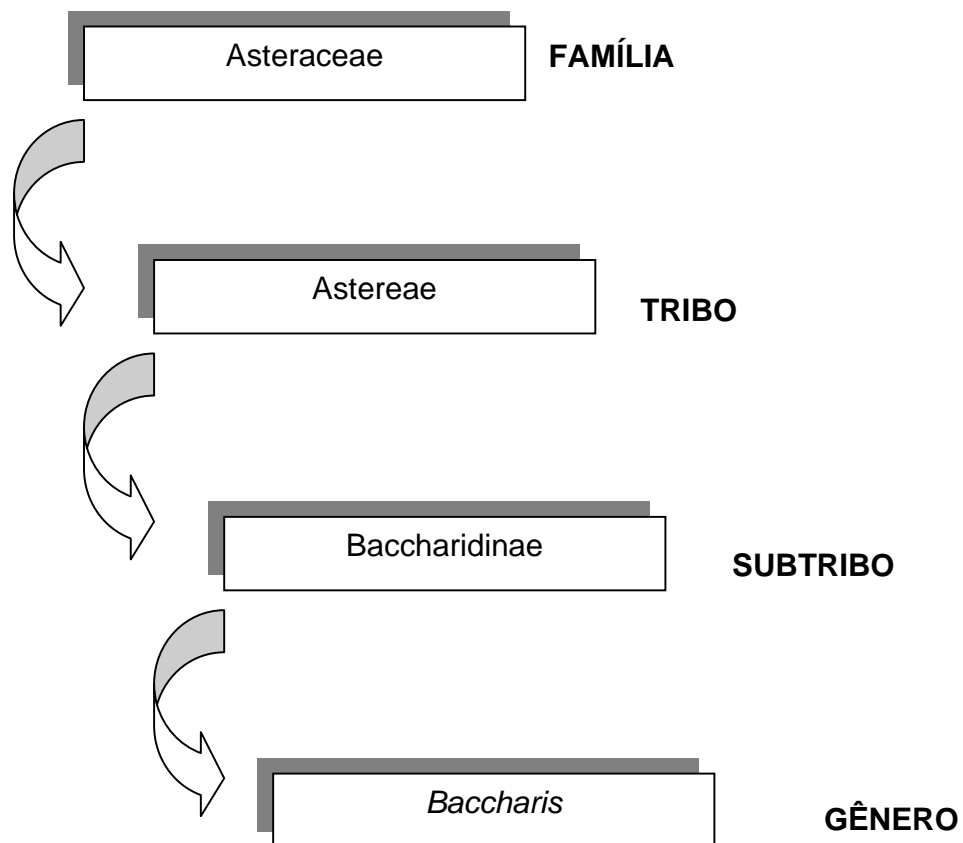


Figura I.2. Posição do gênero *Baccharis* L. na família Asteraceae.

O nome *Baccharis* foi dado por Linnaeus, que descreveu o gênero em 1753. Anos mais tarde, DE CANDOLLE (1836) relacionou 225 espécies para o gênero, sendo destas 95 para a flora do Brasil, enquanto BAKER (1882) mencionou 133 espécies, das quais 43 eram espécies novas. A maior contribuição para o conhecimento do gênero foi o estudo realizado por MALAGARRIGA HERAS (1976), com a elaboração de um catálogo que inclui a maioria dos nomes até então publicados, reconhecendo um total de 431 espécies e 80 entidades infraespecíficas.

Um estudo das espécies da subtribo Baccharidinae ocorrentes no Brasil foi publicado por BARROSO (1976), apresentando 120 espécies para o gênero *Baccharis*, distribuídas em maior concentração na região sul. Mais recentemente, um estudo realizado por BARROSO e BUENO (2002), relata a ocorrência de 73 destas espécies no estado de Santa Catarina.

As espécies que compreendem este gênero são subarbustos ou arbustos ramificados, dióicos, com caule e ramos cilíndricos, áfilos ou folhosos, ou ainda mais ou menos angulosos e então providos de alas foliáceas.

I.1.2. Classificação infragenérica do gênero *Baccharis*

Em função da grande diversidade observada no gênero, muitos autores tentaram elaborar uma classificação infragenérica, considerando características taxonômicas das folhas e inflorescências.

PERSOON (1807) reuniu algumas espécies de *Baccharis* empregando o nome *Molina* (Ruiz e Pav.) Pers., sem aplicar nenhum critério de uniformidade.

LESSING (1831) agrupou as espécies providas de caules alados (consideradas por ele como pertencentes ao gênero *Molina*) sob o nome *Alatae*, ainda que sem determinar uma categoria taxonômica.

DE CANDOLLE (1836) foi o primeiro autor a estabelecer uma subdivisão infragenérica de *Baccharis* em seções, levando em consideração a morfologia de suas folhas. Desta forma foram estabelecidas oito seções: Caulopterae DC., Cuneifoliae DC., Discolores DC., Distichae DC., Lepidophyllae DC., Oblongifoliae DC., Sergilae DC. e Trinervatae DC. (sendo Lepidophyllae e Distichae constituídas por espécies que não mais pertencem ao gênero *Baccharis*).

Utilizando critérios semelhantes, BAKER (1882) agrupou as espécies brasileiras, ao revisar quatro seções daquelas mencionadas por DE CANDOLLE (Caulopterae, Cuneifoliae, Discolores e Oblongifoliae), criando duas seções adicionais (Angustifoliae Baker e Aphyllae Baker).

HEERING (1902; 1904) propôs uma classificação diferente, enfatizando características das flores e o agrupamento dos capítulos. Desta maneira, reconheceu cinco subgêneros: *Stephananthus* (Lehm.) Heering., *Pteronioides* Heering, *Molina* (Ruiz e Pav.) Heering, *Tarchonanthoides* Heering e *Eubaccharis* Heering. Subdividiu também o subgênero *Molina* em três seções (Corymbosae Heering, Paniculatae Heering e Caulopterae) e *Eubaccharis* em outras seis seções (Cylindricae Heering, Glomeruliflorae Heering, Microphyllae Heering, Involucratae Heering, Macrophyllae Heering e Pedicellatae Heering).

CUATRECASAS (1967; 1969) agrupou as espécies colombianas em 16 seções, sendo 8 delas propostas por ele: Scuantentes Cuatrec., Serrulatae Cuatrec., Revolutae Cuatrec., Bogotenses Cuatrec., Tubulatae Cuatrec. e Gladiatae Cuatrec.

ARIZA ESPINAR (1973) agrupou 36 espécies da região central da Argentina em 13 seções, sendo uma delas (Racemosae Ariza) proposta por ele.

BARROSO (1976), em seu trabalho de revisão das espécies brasileiras, preferiu não empregar a classificação em seções e optou em organizar as espécies estudadas em 27 grupos, sem apontar uma categoria taxonômica para os mesmos.

NESOM (1988) sugeriu que o gênero *Baccharidastrum* Cabrera deveria ser incluído como uma seção de *Baccharis*. Além disso, NESOM (1990) analisou a

taxonomia infragenérica das espécies norte e centroamericanas, separando-as em seis seções, sendo duas delas novas (Aristidentes G.L. Nesom e Glandulocarpae G.L. Nesom).

O trabalho mais recente de classificação infragenérica em *Baccharis* foi realizado por GIULIANO (2001), no qual 96 espécies argentinas foram agrupadas em 15 seções, das quais uma foi por ele proposta (Subliguliflorae Giuliano).

A Figura I.3 apresenta um resumo da classificação infragenérica de *Baccharis* em seções, de acordo com os diversos autores.

I.1.3. Seção Caulopterae

As espécies da seção Caulopterae do gênero *Baccharis* caracterizam-se pela presença de alas longitudinais. As espécies com caule alado estiveram agrupadas em diferentes categorias infragenéricas, como por exemplo, seção Alatae Less., segundo ARIZA ESPINAR (1973), grupo Trimera, segundo BARROSO (1976) e seção Caulopterae, segundo DE CANDOLLE (1836), CUATRECASAS (1967) e GIULIANO (2001). O nome mais antigo para a categoria infragenérica das espécies aladas é Caulopterae, aqui aceito para designar as espécies estudadas.

Para o Rio Grande do Sul, BARROSO (1976) citou 16 espécies pertencentes à seção Caulopterae, então denominada grupo Trimera: *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., *B. crispa* Spreng., *B. cylindrica* (Less.) DC., *B. gaudichaudiana* DC., *B. microcephala* Baker, *B. milleflora* DC., *B. myriocephala* Baker, *B. phyteumoides* Klatt, *B. pseudovillosa* Teodoro e Vidal, *B. regnelli* Sch. Bip., *B. riograndensis* Teodoro e Vidal, *B. sagittalis* (Less.) DC., *B. stenocephala* Baker, *B. trimera* (Less.) DC., *B. usterii* Heering e *B. vincaefolia* Baker. IRGANG e GASTAL (1996) citam ainda a ocorrência de *B. penningtonii* Heering no Estado.

De acordo com GIULIANO (2001), ocorrem na Argentina 10 espécies desta seção: *B. articulata*, *B. crispa*, *B. gaudichaudiana*, *B. genistifolia* DC., *B. microcephala*, *B. penningtonii*, *B. phyteuma* Heering, *B. phyteumoides*, *B. sagittalis* e *B. trimera*.

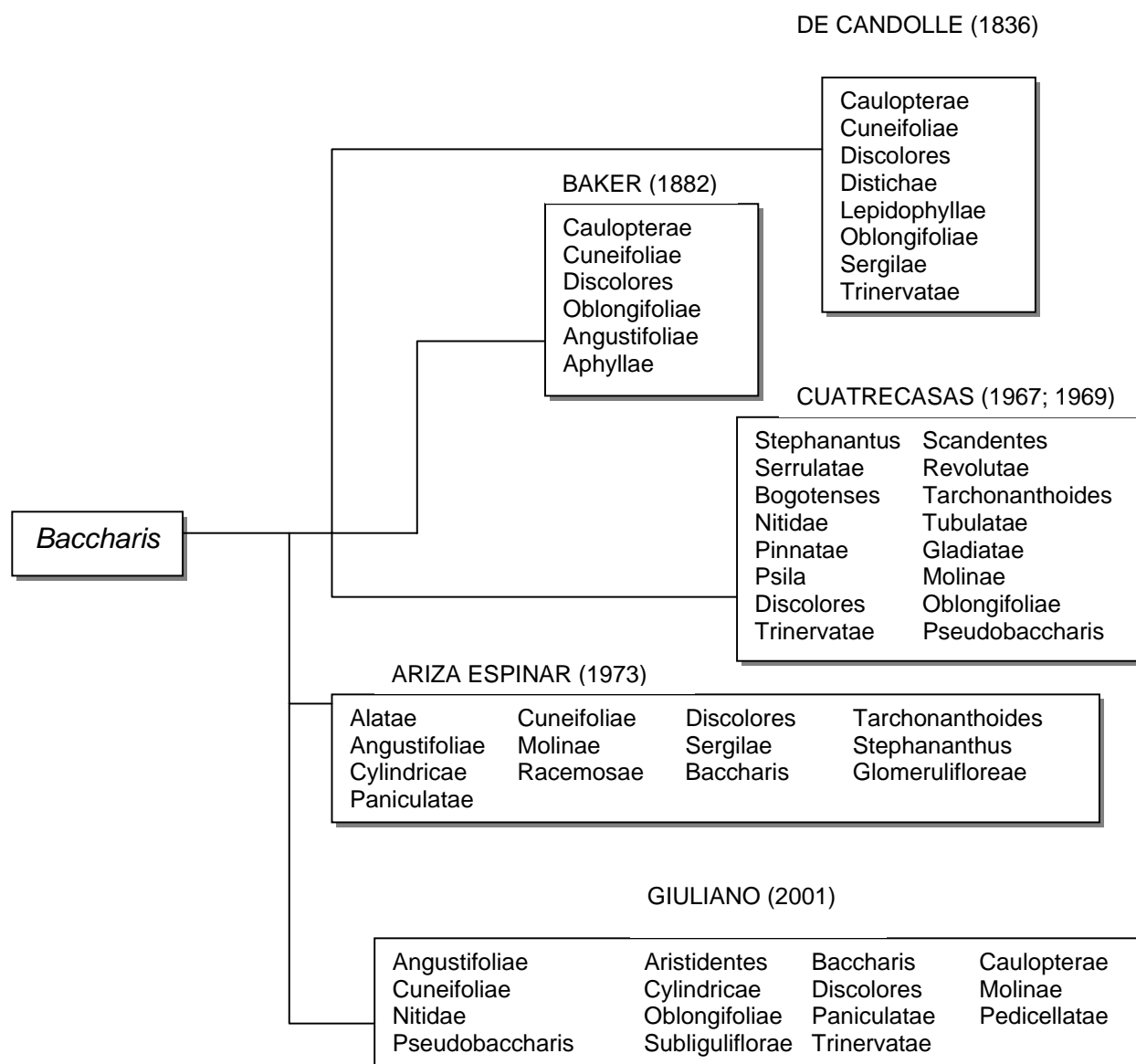


Figura I.3. Classificação infragenérica do gênero *Baccharis* em seções de acordo com diferentes autores.

A identificação botânica das espécies da seção Caulopterae é bastante complexa, dependendo de fatores como plasticidade fenotípica e estágio de desenvolvimento. Em especial, a diferenciação entre *B. crisper* e *B. trimera* é particularmente difícil, mesmo com a presença de inflorescências.

Apesar do grande número de publicações sobre a seção Caulopterae, ainda existem controvérsias em relação a sinonímia de algumas espécies, como ocorre para: *B. genistelloides* e *B. trimera*; *B. crisper* e *B. cylindrica*; *B. articulata* e *B. gaudichaudiana*.

1.1.4. *Baccharis genistelloides* x *Baccharis trimera*

O nome *B. genistelloides* (Lam.) Pers. foi uma nova combinação, estabelecida por Persoon, para o nome *Conyza genistelloides* Lam. DE CANDOLLE (1836), ao mencionar *B. genistelloides*, cita sua ocorrência para a Colômbia e Peru. CUATRECASAS (1967) amplia esta distribuição para o Equador, em altitudes acima 3000 m.

DE CANDOLLE (1836) considerava *B. genistelloides* como espécie distinta de *B. trimera* (Less.) DC., além de reconhecer outras espécies que BAKER (1882), posteriormente, mencionou como sendo variedades de *B. genistelloides*.

BAKER (1882), ao elaborar a *Flora Brasiliensis*, considerou seis variedades para *B. genistelloides* (Lam.) Pers.: *B. genistelloides* var. *trimera* (Less.) Baker, *B. genistelloides* var. *typica*, *B. genistelloides* var. *brachystachys* Baker, *B. genistelloides* var. *cylindrica* (Less.) Baker, *B. genistelloides* var. *crisper* (Spreng.) Baker e *B. genistelloides* var. *milleflora* (Less.) Baker. Possivelmente por essa razão, SILVA (1926) considerou o nome *B. genistelloides* var. *trimera* na primeira edição da Farmacopéia brasileira, sob o nome comum de carqueja-amarga. Na quarta edição da referida farmacopéia, consta como nome válido *B. trimera* (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003).

Com base nessas observações, é possível inferir que trabalhos fitoquímicos e farmacológicos conduzidos com a espécie denominada *B. genistelloides* coletada na Bolívia (SUTTISRI *et al.*, 1994; ABAD *et al.*, 1999), Brasil (BAUER *et al.*, 1978; SOICKE e LENG-PESCHLOW, 1987) e Chile (DAILY *et al.*, 1984) tenham sido realizados com *B. trimera* ou *B. crispa*. Portanto, todos os estudos realizados com a espécie identificada como *B. genistelloides* devem ser avaliados com cautela e levar em consideração o local de coleta do material vegetal.

I.1.5. *Baccharis crispa* x *Baccharis cylindrica*

Embora *B. crispa* não conste na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2003), é citada na FARMACOPÉIA NACIONAL ARGENTINA (1978), sob o nome popular de carqueja. De acordo com ARIZA ESPINAR (1973) e GIULIANO (2000; 2001), o nome *B. cylindrica* é um sinônimo de *B. crispa*. Porém, BARROSO (1976) menciona a ocorrência de duas entidades diferentes, *B. crispa* e *B. cylindrica*, tanto para o sul do Brasil quanto para a Argentina.

I.1.6. *Baccharis articulata* x *Baccharis gaudichaudiana*

DE CANDOLLE (1836) considerou *B. gaudichaudiana* como espécie distinta de *B. articulata*, enquanto que BAKER (1882) colocou *B. gaudichaudiana* como uma variedade de *B. articulata*. Mais tarde, BARROSO (1976) considerou as espécies *B. gaudichaudiana* e *B. articulata* como duas entidades distintas, levando em consideração a forma e a dimensão dos artículos e alas dos ramos, assim como a coloração que apresentam *in vivo*. Embora a autora não tenha feito menção ao número de alas em seu texto, as fotos e figuras publicadas apresentavam *B. articulata* com duas alas e *B. gaudichaudiana* com três alas.

GIULIANO (2000) considera estas duas espécies de maneira independente, descrevendo ambas como bialadas e diferenciando-as pela forma e tamanho das alas. Ainda que os trabalhos mais recentes considerem *B. articulata* e *B. gaudichaudiana* como espécies diferentes, a afirmação de BAKER (1882) levou alguns autores a investigarem a composição química destas duas espécies, corroborando sua distinção taxonômica (DAI *et al.*, 1993; FULLAS *et al.*, 1994). O exemplar da espécie classificada como *B. gaudichaudiana* utilizado por FULLAS e colaboradores (1991; 1992; 1994) é bialado. Esta informação pôde ser acessada pela análise da imagem digital do voucher Soejarto *et al.*, 6071, fornecida pelo Herbário John G. Searle, Field Museum of Natural History, Chicago (Figura I. 4).



Figura I.4. Imagem digital do voucher: Soejarto *et al.*, 6071, coletado no Paraguai. Fonte: Herbário John G. Searle, Field Museum of Natural History, Chicago.

Em seu trabalho para a flora de Santa Catarina, BARROSO e BUENO (2002) sugerem que o nome *B. gaudichaudiana* seja sinônimo de *B. milleflora* (uma espécie trialada), baseando-se na semelhança da fotografia do tipo de *B. milleflora* com a espécie previamente determinada como *B. gaudichaudiana* por BARROSO (1976). No entanto, esta determinação prévia não está de acordo com a descrição original de *B. gaudichaudiana*, onde fica claro a característica de caule bialado para a espécie, e sim com a descrição original de *B. milleflora* (DE CANDOLLE, 1836).

Para o desenvolvimento deste trabalho, foi possível coletar oito das 17 espécies de Caulopterae relatadas para o Rio Grande do Sul, sendo objeto de estudo: *B. articulata*, *B. crispa*, *B. cf. milleflora*, *B. microcephala*, *B. myriocephala*, *B. stenocephala*, *B. trimera* e *B. usterii*.

I.2. Estudos químicos em Caulopterae

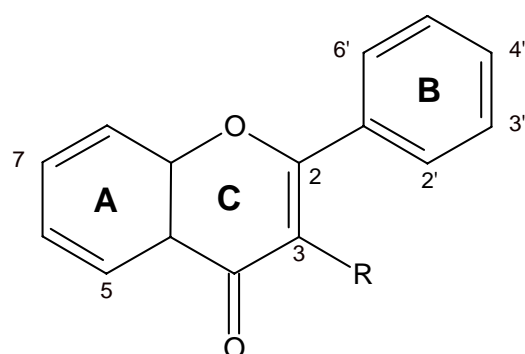
I.2.1. Compostos fenólicos

Muitos estudos de constituição química têm sido relatados para as espécies de carqueja, principalmente em relação à classe dos flavonóides. A figura I.5 apresenta um resumo dos flavonóides que ocorrem em Caulopterae.

Foram identificados em *B. trimeria* os flavonóides hispidulina (1), luteolina (2), apigenina (3), nepetina (4) (SOICKE e LENG-PESCHLOW, 1987), rutina (5), quercetina 3-O- α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicosídeo (6) (GENÉ *et al.*, 1996), eupatorina (7) (ZDERO *et al.*, 1989), quercetina (8) (SOICKE e LENG-PESCHLOW 1987; GENÉ *et al.*, 1996), gencuanina (9) e 7,4'-di-O-metilapigenina (10) (GIANELLO *et al.*, 2000).

Alguns flavonóides foram também relatados para a espécie designada como *B. genistelloides* coletada no Chile, apresentando quercetina, canferol (11) e hispidulinol (12) (DAILY *et al.*, 1984), e na Bolívia, eupatorina, cirsimaritina (13) e 5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxi-flavona (14) (SUTTISRI *et al.*, 1994). Como mencionado no item I.1.3, a espécie em questão é muito provavelmente *B. trimeria*.

Outras espécies da seção Caulopterae, tais como *B. crispa*, *B. articulata*, e *B. gaudichaudiana*, também foram estudadas quanto a presença de flavonóides. GIANELLO e colaboradores (2000) identificaram as flavonas gencuanina e 7,4'-di-O-metil-apigenina para *B. crispa* e *B. articulata* e ainda cirsimaritina e salvigenina (15) para *B. articulata*. A espécie *B. gaudichaudiana* coletada no Paraguai apresentou jaceosidina (16), desmetoxicentaureidina (17), hispidulina, quercetin-3-O-L- α -ramnosídeo (18), eupafolina (19), eupatilina (20), isoschaftosídeo (21) e rutina (AKAIKE *et al.*, 2003).



Nº	Flavonóide	Posição							
		R	5	6	7	8	3'	4'	5'
1	hispidulina	H	OH	OMe	OH	H	H	OH	H
2	luteolina	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H
3	apigenina	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
4	nepetina	H	H	OMe	H	H	H	OH	OH
5	rutina	O-Gli	OH	H	OH	H	OH	OH	H
6	quercetin-3-O- α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicosídeo	O-Ram	OH	H	OH	H	OH	H	H
7	eupatorina	H	OH	OMe	OMe	H	H	OMe	OH
8	quercetina	OH	OH	H	OH	H	OH	OH	H
9	gencuanina	H	OH	H	OMe	H	H	OH	H
10	7,4'-di-O-metilapigenina	H	OH	H	OMe	H	H	OMe	H
11	canferol	OH	OH	H	OH	H	H	OH	H
12	hispidulinol	OH	OH	OMe	OH	H	H	OH	H
13	cirsimaritina	H	OH	OMe	OMe	H	H	OH	H
14	5-hidroxi-3',4',6,7-tetrametoxiflavona	H	OH	OMe	OMe	H	OMe	H	H
15	salvigenina	H	OH	OMe	OMe	H	H	OMe	H
16	jaceosidina	H	OH	OMe	OH	H	OMe	OH	H
17	desmetoxicentaureidina	H	OH	H	OH	H	OH	H	H
18	quercetin-3-O-L- α -ramnosídeo	O-Ram	OH	H	OH	H	OH	OH	H
19	eupafolina	H	OH	OMe	OH	H	H	OH	OH
20	eupatilina	H	OH	OMe	OH	H	H	OMe	OMe
21	isoschaftosídeo	H	OH	Ara	OH	Gli	H	OH	H

Figura I.5. Flavonóides identificados em espécies de Caulopterae.
Ara = arabinose; Gli = glicose; Ram = ramnose

Entre outros compostos fenólicos, foi também relatada a presença do ácido 3,5-*O*-[*E*]-dicafeoilquínico (**22**) em *B. gaudichaudiana* (AKAIKE *et al.*, 2003) e 4'-*O*-β-glicopiranosil-cafeato (**23**), isolado a partir de uma fração butanólica do extrato aquoso de *B. articulata* por DE OLIVEIRA e colaboradores (2003) (Figura I.6). CASTRO e colaboradores (1999) demonstraram também a presença de taninos hidrolisáveis e não-hidrolisáveis na espécie *B. myriocephala*.

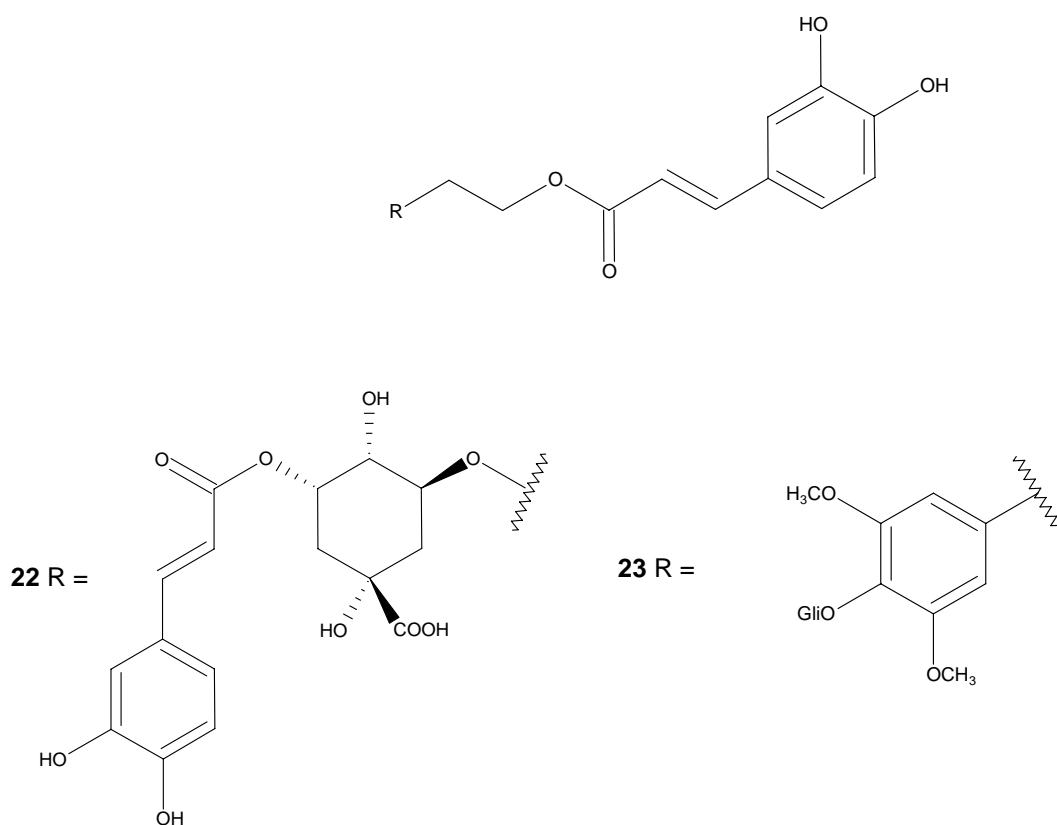


Figura I.6. Estruturas dos compostos ácido 3,5-*O*-[*E*]-dicafeoilquínico (**22**) e 4'-*O*-β-glicopiranosil-cafeato (**23**).

I.2.2. Terpenos

A classe dos terpenos é comumente encontrada na seção, sendo observada a ocorrência de mono e sesquiterpenos (constituintes de óleos voláteis), diterpenos, bem como triterpenos, incluindo saponinas triterpênicas e esteróides.

Óleos voláteis

A análise da composição química do óleo volátil de diferentes espécies desta seção tem sido realizada através de CG e CG/EM. Embora alguns trabalhos apresentem uma investigação extensiva do óleo volátil com um alto percentual de compostos identificados, outros relatam apenas a presença dos componentes principais do óleo. De forma geral, é comum a presença de sesquiterpenos provenientes de diferentes rotas de ciclização.

Para *B. articulata* foi relatada a presença de beta-cariofileno, trans-nerolidol (ZUNINO *et al.*, 1998), alfa-pineno, beta-guaieno, gama-elemeno, delta-cadineno e aromadendreno (GIANELLO *et al.*, 2000).

Segundo GIANELLO e colaboradores (2000), *B. trimera* e *B. crispa*, ambas coletadas na Argentina, apresentaram semelhante composição em seus óleos voláteis, sendo constituídos principalmente de alfa-pineno, beta-cariofileno, alfa-cariofileno, beta-cubebeno, alfa-elemeno e gama-elemeno. BAUER e colaboradores (1978) identificaram a presença de carquejol e acetato de carquejila, além de canfeno e nerolidol em espécie classificada como *B. genistelloides* coletada no Rio Grande do Sul. Para a espécie *B. crispa* também foram identificados os compostos beta-cariofileno, germacreno D e nerolidol, enquanto que *B. articulata* apresentou beta-cariofileno, nerolidol, tau-cadinol, alfa-cadinol e germacreno D (ZUNINO *et al.*, 1997). Uma série de cadinanos oxigenados foram isolados e identificados no óleo essencial de *B. myriocephala* por QUEIROGA e colaboradores (1996).

Diterpenos

ZDERO e colaboradores (1989) conduziram uma análise da ocorrência de diterpenos em diferentes espécies de *Baccharis* coletadas na Bolívia numa tentativa de correlacionar a classificação infragenérica ao tipo de núcleo diterpênico. Seus resultados mostraram que essa correlação foi, em parte, possível. Ao estudar a espécie *B. trimera*, representando a seção Caulopterae (então denominada Alatae), os autores observaram a ocorrência de dois diterpenos de núcleo clerodano (**24** e **25**) (Figura I.7).

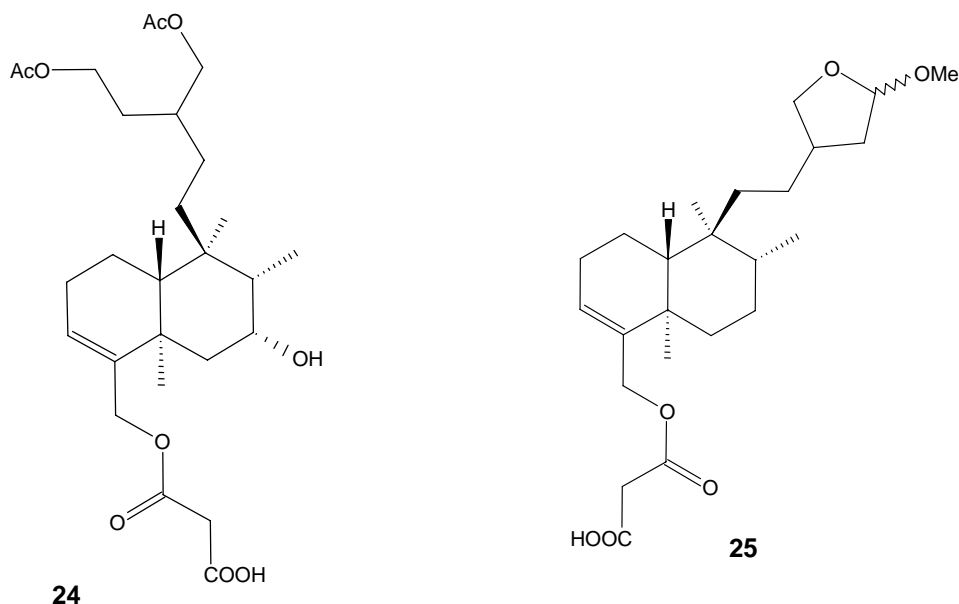


Figura I.7. Diterpenos de núcleo clerodano isolados de *B. trimera* (ZDERO *et al.*, 1989).

A espécie *B. trimera* apresentou outros diterpenos de núcleo clerodano (Figura I.8) como os compostos **26**, **27**, **28** (HERZ *et al.*, 1977).

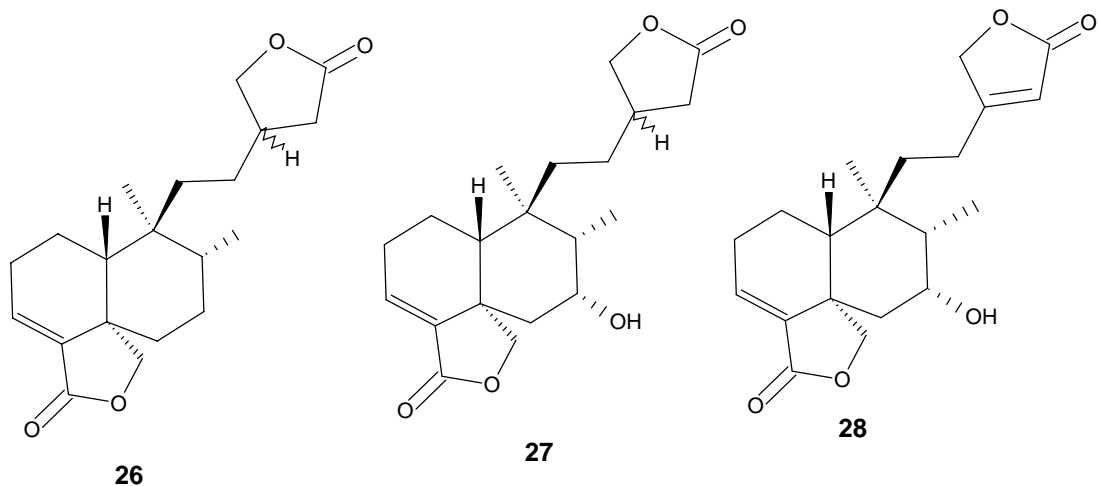


Figura I.8. Diterpenos de *B. trimera* (HERZ *et al.*, 1977).

CIFUENTE e colaboradores (2002) isolaram dois novos clerodanos, **29** e **30**, bem como marrubiagenina (**31**) a partir de *B. sagittalis* (Figura I.9). SUTTISRI e colaboradores (1994) isolaram da espécie classificada como *B. genistelloides*, coletada na Bolívia, dois diterpenos conhecidos (**32** e **33**) e três novos neo-clerodanos (**34** a **36**) (Figura I.10).

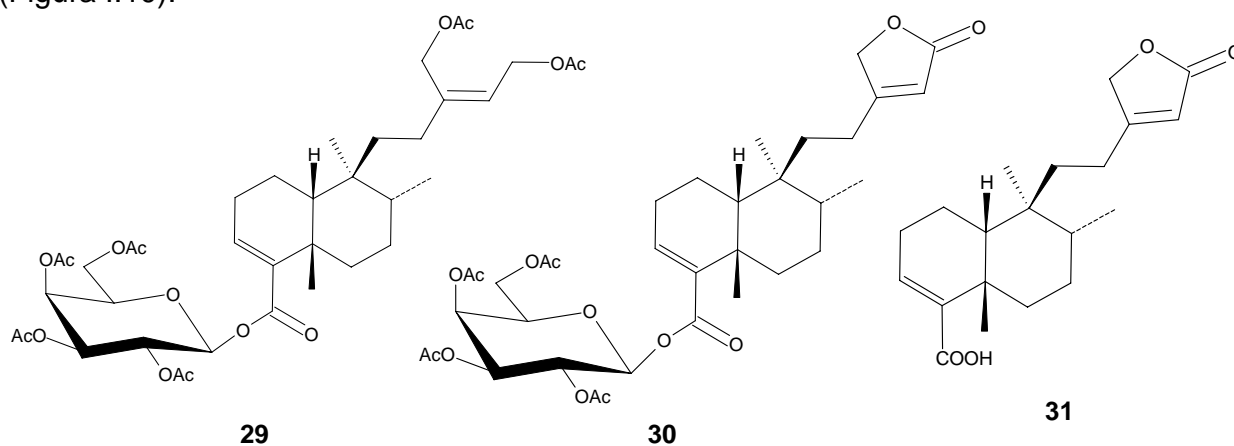
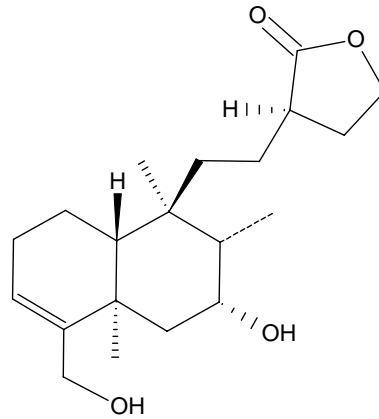
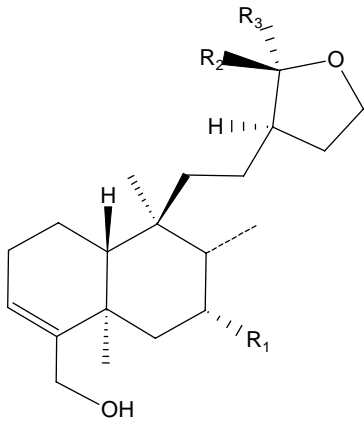


Figura I.9. Diterpenos isolados de *B. sagittalis* (CIFUENTE *et al.*, 2002).

Um estudo realizado por GIANELLO e colaboradores (2000) descreveu a ocorrência de ácido hawtriwaico (**37**), lactona do ácido hawtriwaico (**38**), bacrispina (**39**) e 1-desoxibacrispina (**40**) em *B. trimera* e *B. crispa*; diterpenos **41** e **42** em *B. crispa* e malonato de barticulidiol (**43**) e bacchotricuneatina A (**44**) em *B. articulata* (Figura I.11). CEÑAL e colaboradores (1997) já haviam relatado a ocorrência de bacrispina e desoxibacrispina, além dos diterpenos **45**, **46** e **47** em *B. crispa* (Figura I.12).

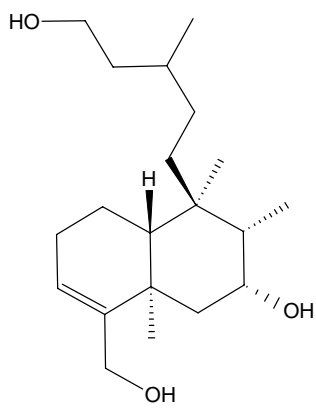
Outro clerodano, bacchariol (**48**), foi isolado pela primeira vez a partir de *B. gaudichaudiana*, espécie que também apresentou os compostos **49** e **50** (AKAIKE *et al.*, 2003), gaudichaudona (**51**), acetato de articulina (**52**) (FULLAS *et al.*, 1994), sendo este um derivado do articulinol (**53**) já isolado de *B. articulata* (STAPEL *et al.*, 1980) (Figura I.13).

Diterpenos de núcleo labdano também estão presentes em *B. gaudichaudiana*, como os gaudichaudiosídeos A – F (**54-59**) e gaudichaudóis A – C (**60 a 62**) (FULLAS *et al.*, 1991; 1992; 1994) (Figura I.14).

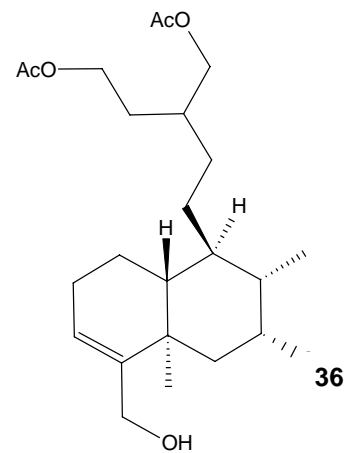


34

32 R₁=H R₂=H R₃=OMe
 33 R₁=OH R₂=H R₃=OMe



35



36

Figura I.10. Diterpenos da espécie classificada como *B. genistelloides* coletada na Bolívia (SUTTISRI *et al.*,1994).

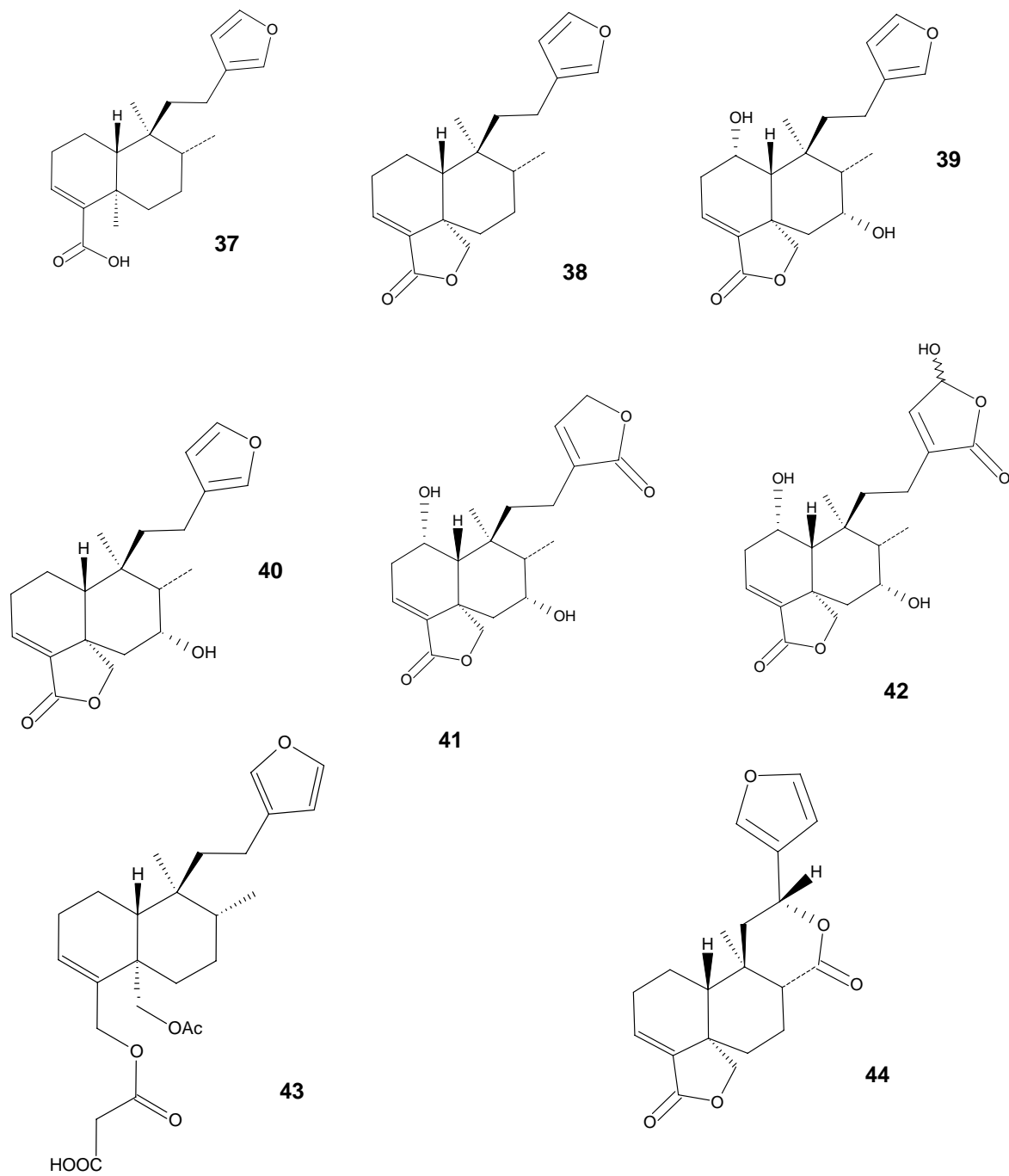


Figura I.11. Diterpenos de *B. articulata*, *B. crispa* e *B. trimera* (GIANELLO *et al.*, 2000).

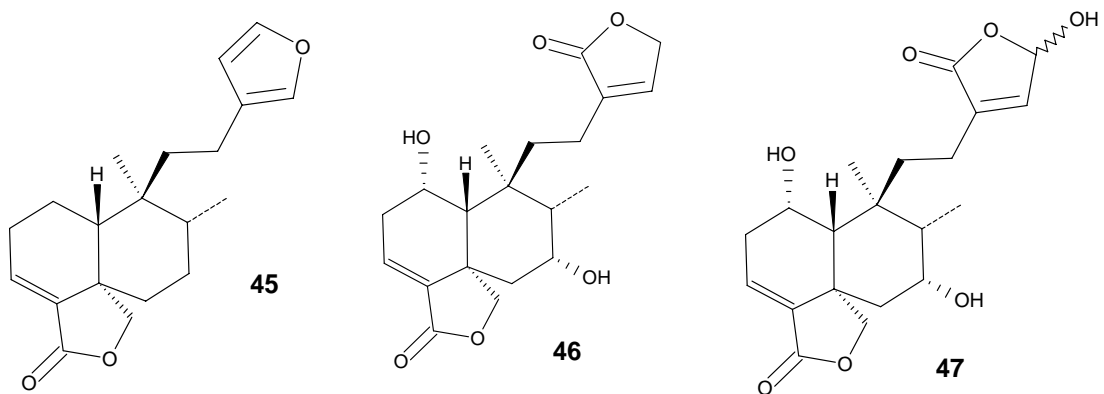


Figura I.12. Diterpenos de *B. crispa* (CEÑAL *et al*, 1997).

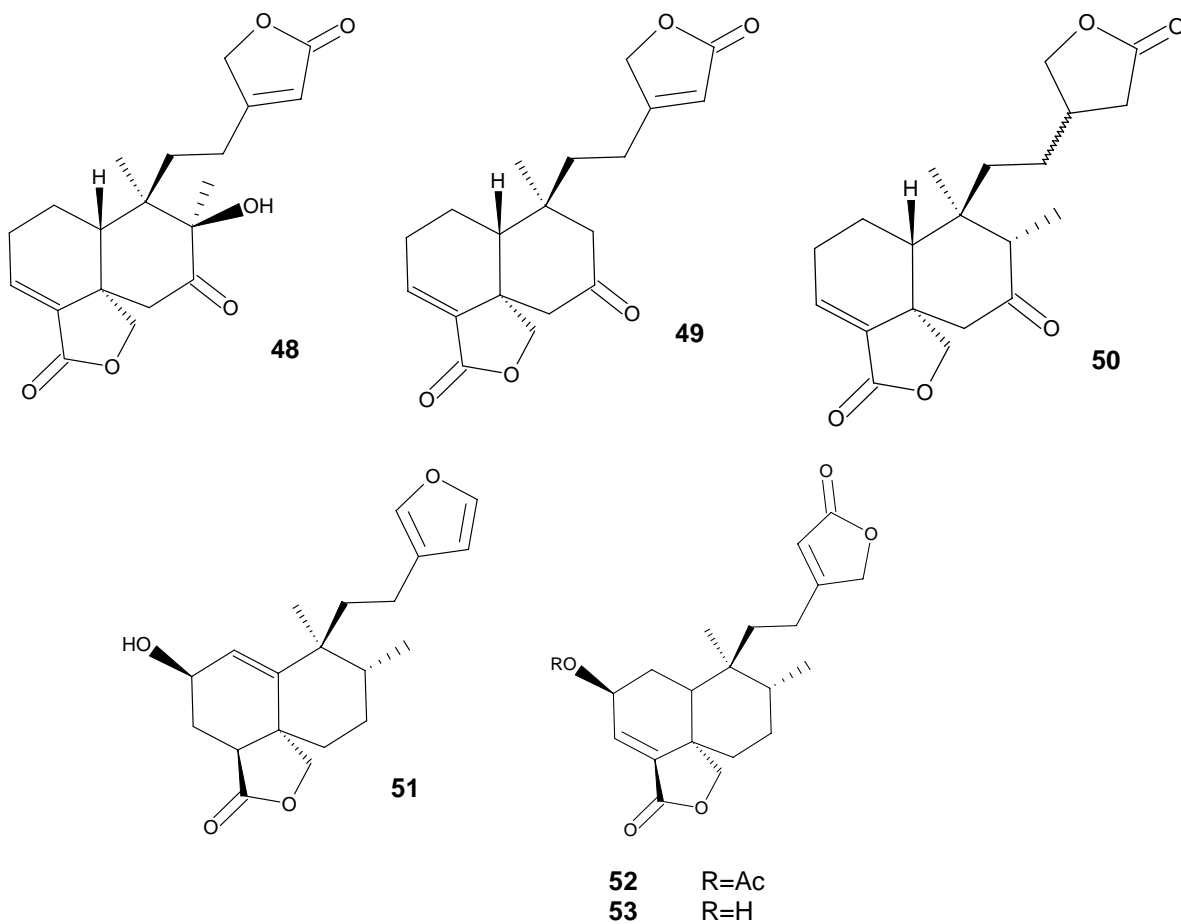


Figura I.13. Diterpenos de *B. gaudichaudiana* (FULLAS *et al*, 1994).

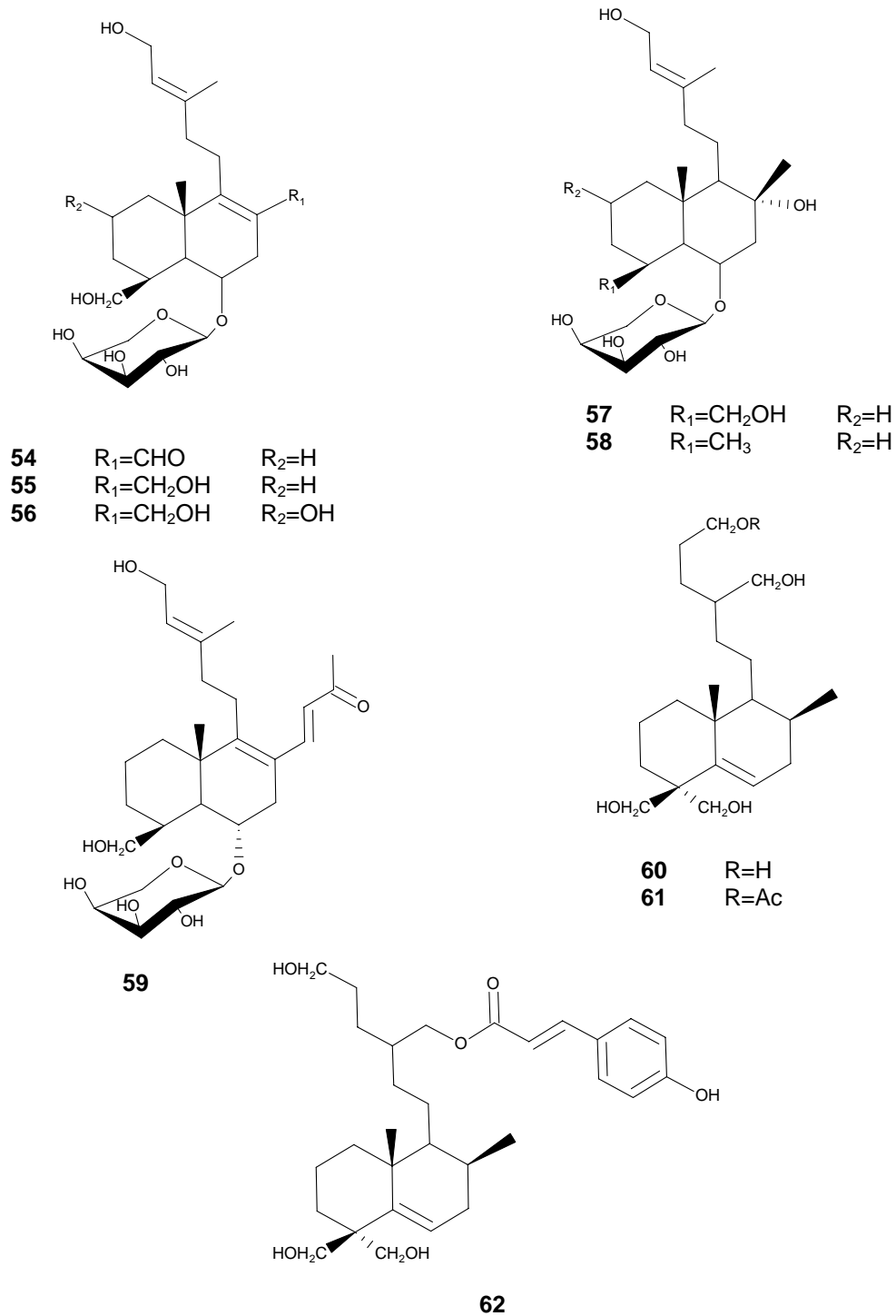


Figura I.14. Diterpenos de núcleo labdano de *B. gaudichaudiana* (FULLAS *et al.*, 1991; 1992; 1994).

A espécie *B. articulata*, além do diterpeno **50**, apresentou também os diterpenos clerodanos **63** – **65**, representados na Figura I.14 (DAI *et al.*, 1993).

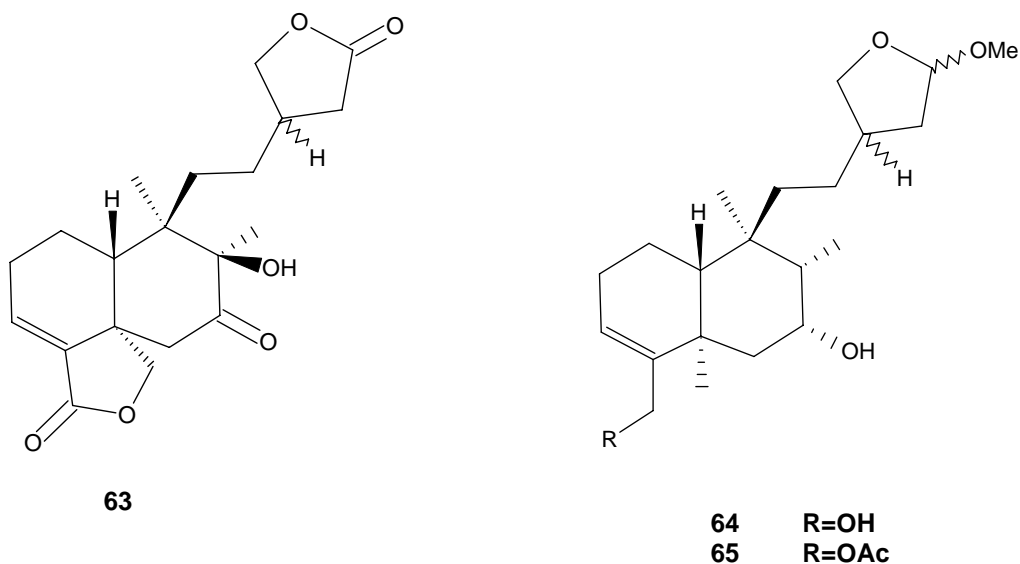


Figura I.15. Diterpenos de *B. articulata* (DAI *et al.*, 1993).

Triterpenos, saponinas e esteróides

O triterpeno óxido de baccharis (**66**) foi isolado de *B. myriocephala* por NURNBERG e colaboradores (1998). GENÉ e colaboradores (1996) isolaram três sapogeninas de uma fração hidrolisada de *B. trimera*, identificando a aglicona majoritária como ácido 3,16-di-hidroxi-olean-12-en-28-óico (**67**), com configuração relativa do ácido equinocístico ($3\beta,16\alpha,28\beta$). A espécie classificada como *B. genistelloides* coletada no Chile forneceu o esterol stigmasta-7,22-dien-3-ol (**68**), isolado a partir de seu extrato hexânico (DAILY *et al.*, 1984). As estruturas dos compostos **66**, **67** e **68** estão representadas na Figura I.16.

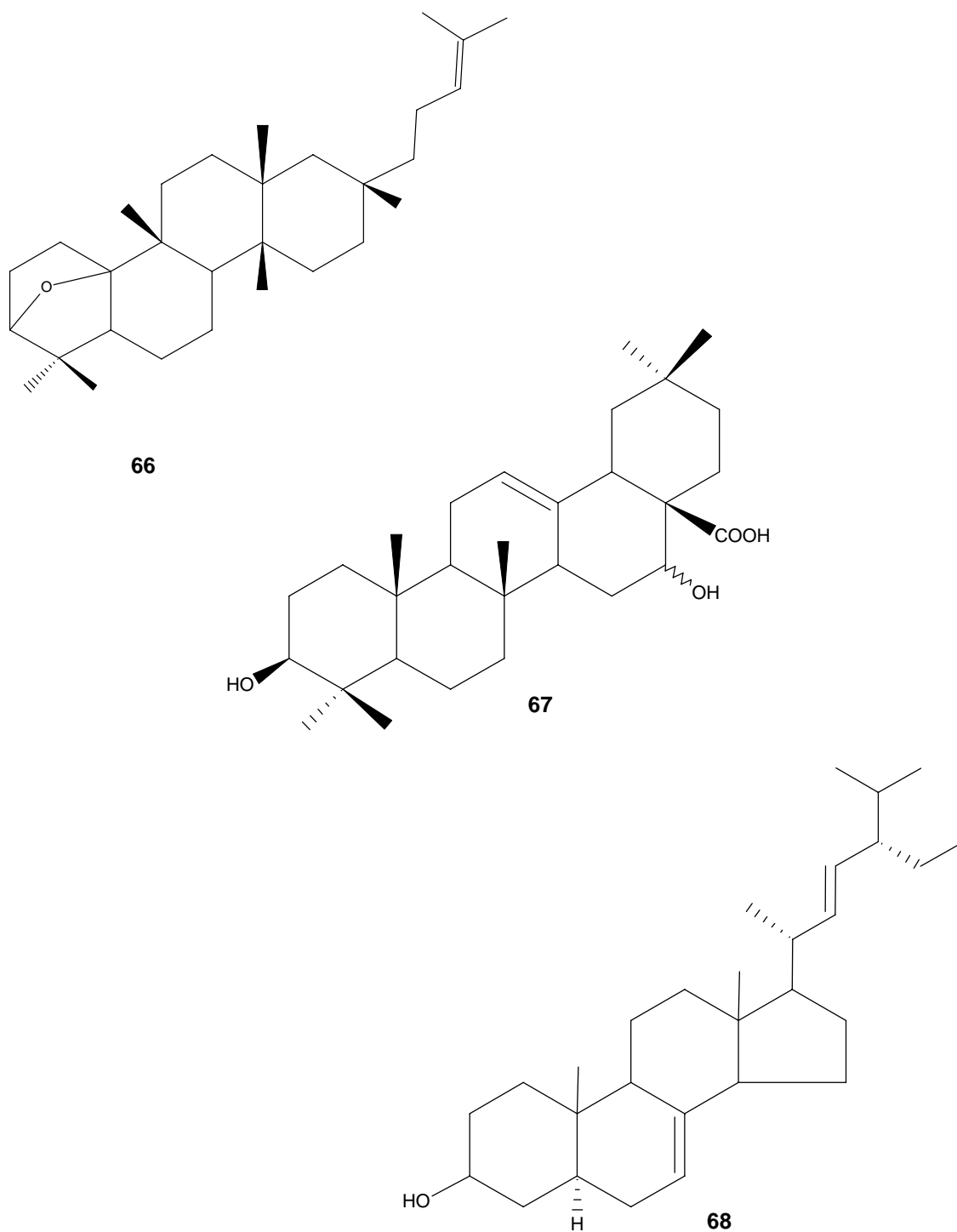


Figura I.16. Estrutura dos compostos **66**, **67** e **68**.

I.3. Material e métodos

I.3.1. Material vegetal

As amostras utilizadas para obtenção de óleo volátil, foram coletadas nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, identificadas por Nelson Ivo Matzenbacher e depositadas no Herbário ICN (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brasil). Algumas delas também foram utilizadas para a obtenção de extratos aquosos. *Baccharis crispa* e *B. trimera* foram coletadas em diferentes locais, sendo que indivíduos de cada uma destas duas espécies foram a coletados em julho, setembro e outubro de 2003.

Para o desenvolvimento de um método de análise rápido, visando identificar marcadores químicos que pudessem diferenciar *B. crispa* de *B. trimera*, estas duas espécies também foram coletadas em diferentes localidades da Argentina, identificadas por D. Giuliano, L. Ariza Espinar e E. Petenatti e depositadas no Herbário LPE (Herbario y Museo de Botánica y Farmacognosia “Carlos Spegazzini”, La Plata, Argentina).

Os dados de coleta, com o código de cada planta utilizada ao longo deste trabalho, a data de coleta e o número de registro nos herbários constam na Tabela I.1. Um mapa indicando os 11 diferentes pontos de coleta das espécies estudadas está representado na Figura I.17.

Table I.1. Dados de coleta das espécies de *Baccharis*, *Caulopterae* utilizadas para avaliação química e biológica.

Espécie	Código	Local de coleta	Mês/ano de coleta	Voucher
<i>Baccharis articulata</i>	Bart	Guaíba – RS, Brasil	julho/2003	ICN 128446
<i>Baccharis crispa</i>	BcGj	Guaíba – RS, Brasil	julho/2003	ICN 128451
<i>Baccharis crispa</i>	BcGa	Guaíba – RS, Brasil	agosto/2003	ICN 128451
<i>Baccharis crispa</i>	BcGs	Guaíba – RS, Brasil	setembro/2003	ICN 128451
<i>Baccharis crispa</i>	BcGo	Guaíba – RS, Brasil	outubro/2003	ICN 128451
<i>Baccharis crispa</i>	BcGf	Guaíba – RS, Brasil	Fevereiro/2004	ICN 128451
<i>Baccharis crispa</i>	BcPR	Castro – PR, Brasil	agosto/2003	ICN 129040
<i>Baccharis crispa</i>	Bc1004	Villarino – Buenos Aires, Argentina	junho/2003	LPE 1004
<i>Baccharis crispa</i>	Bc1007	Córdoba, Argentina	março/2003	LPE 1007
<i>Baccharis crispa</i>	Bc1008	San Luis, Argentina	maio/2003	LPE 1008
<i>Baccharis gaudichaudiana</i>	Bgau	São Francisco de Paula – RS, Brasil	agosto/2001	ICN 128461
<i>Baccharis microcephala</i>	Bmic	Guaíba – RS, Brasil	julho/2003	ICN 128441
<i>Baccharis myriocephala</i>	Bmyr	São Francisco de Paula – RS, Brasil	agosto/2001	ICN 128463
<i>Baccharis stenocephala</i>	Bste	Guaíba – RS, Brasil	julho/2003	ICN 128450
<i>Baccharis trimera</i>	Bt1	São Francisco de Paula – RS, Brasil	agosto/2001	ICN 128460
<i>Baccharis trimera</i>	Bt2	Rosário do Sul – RS, Brasil	janeiro/2002	ICN 128462
<i>Baccharis trimera</i>	Bt3	São Vicente – RS, Brasil	janeiro/2002	ICN 128459
<i>Baccharis trimera</i>	Bt4j	Guaíba – RS, Brasil	julho/2003	ICN 128440
<i>Baccharis trimera</i>	Bt4a	Guaíba – RS, Brasil	agosto/2003	ICN 128440
<i>Baccharis trimera</i>	Bt4s	Guaíba – RS, Brasil	setembro/2003	ICN 128440
<i>Baccharis trimera</i>	Bt4o	Guaíba – RS, Brasil	outubro/2003	ICN 128440
<i>Baccharis trimera</i>	Bt1005	Punta Lara – Buenos Aires, Argentina	março/2002	LPE 1005
<i>Baccharis trimera</i>	Bt1006	Bartolome Bavio – Buenos Aires, Argentina	abril/2003	LPE 1006
<i>Baccharis trimera</i>	Bt1010	Berazategui – Buenos Aires, Argentina	junho/2001	LPE 1010
<i>Baccharis trimera</i>	Bt1009	Córdoba, Argentina	setembro/1997	LPE 1009
<i>Baccharis usterii</i>	Bust	Guaíba – RS, Brasil	julho/2003	ICN 128444

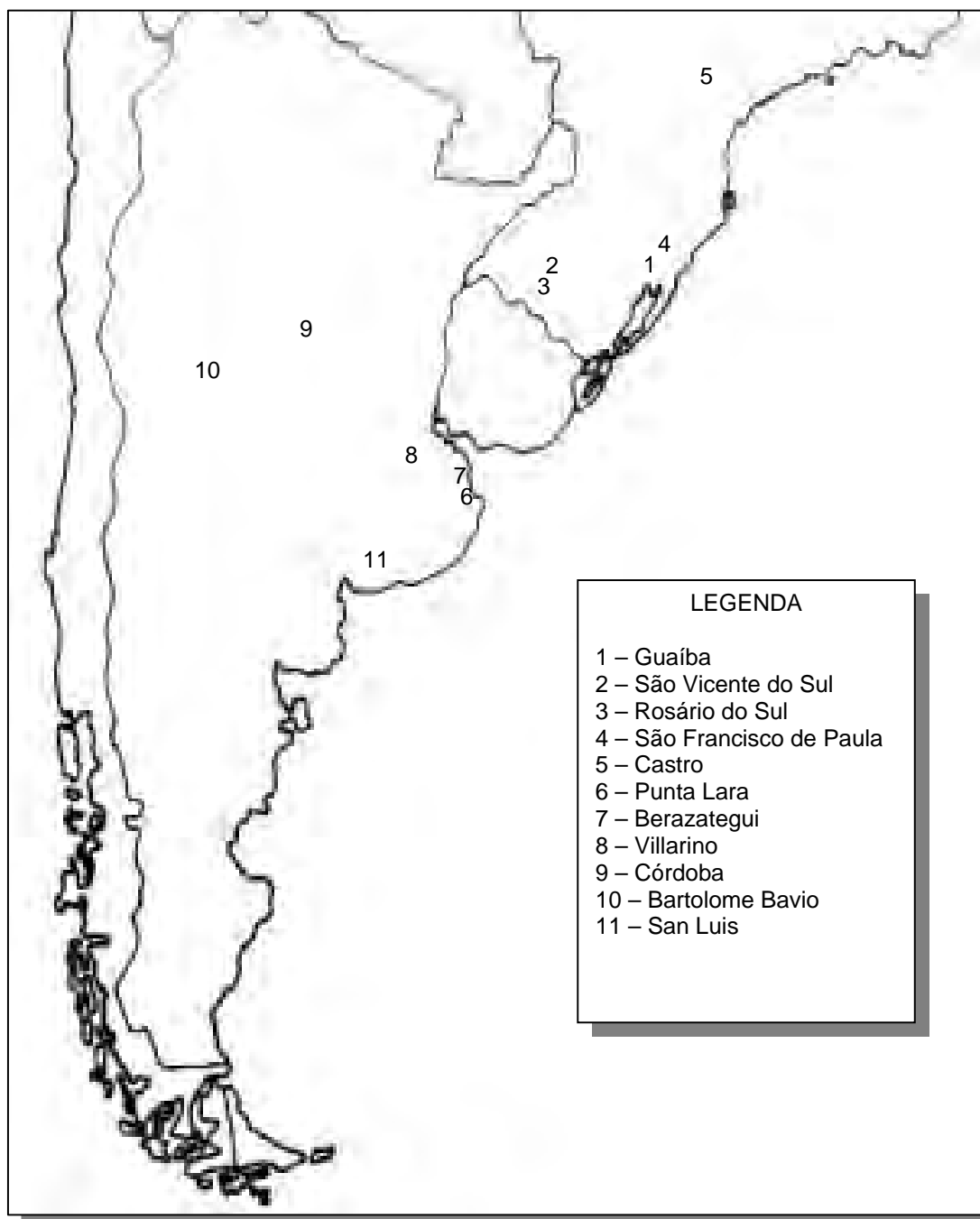


Figura I.17. Mapa com os pontos de coleta de *Baccharis* avaliadas quanto a composição química e atividades biológicas.

Para a identificação de *B. crispa* e *B. trimera*, os critérios descritos a seguir foram utilizados por N. I. Matzenbacher. As demais espécies foram identificadas de acordo com os caracteres determinados por BARROSO (1976) e BARROSO e BUENO (2002).

Baccharis crispa Spreng.

Hábito: subarbusto ereto e decumbente-ascendente; caules lenhosos áfilos, triados, com alas onduladas ou planas na base do caule, com até 0,5 cm de largura, diminuindo, gradativamente, até nulas no ápice dos ramos superiores, que formam panícula de espigas laxas com 1 – 2 (3) capítulos por nó. Capítulos de flores estaminadas com involúcro cilíndrico de 0,3 cm de diâmetro e 0,5 cm de altura; capítulos de flores pistiladas com involúcro campanulado de 0,2 cm na base e 0,1 cm no ápice e até 1,0 cm de altura. Fenologia: floresce e frutifica de fevereiro a abril, com predominância em março. Fotografia na Figura I.18.



Figura I.18. Fotografia de um ramo de *B. crispa* coletada em Guaíba, RS.

Baccharis trimera (Less.) DC.

Hábito: subarbusto ereto ramificado; caules lenhosos áfilos, trialados, alas na base do caule até a altura mediana atingem 1,2 cm de largura, diminuindo para o ápice dos ramos superiores até 0,2 cm de largura, em suas extremidades. As ramificações intermediárias do caule formam panículas congestas de espigas de glomérulos, de 2 – 5 capítulos nos nós dos ramos superiores, podendo, também, ocorrer capítulos isolados nos ramos inferiores. Capítulos de flores pistiladas com involúcro campanulado de 0,3 cm de diâmetro na base e 0,2 cm de diâmetro no ápice e 0,6 cm de altura. Fenologia: floresce e frutifica de janeiro a março, com predominância em fevereiro. Fotografia na Figura I.19.



Figura I.19. Fotografia de um ramo de *B. trimera* coletada em Guaíba, RS.

I.3.2. Óleos voláteis e extratos hexânicos

O material vegetal das oito espécies foi seco a sombra, triturado com o auxílio de um triturador mecânico e submetido à hidrodestilação em aparelho de Clevenger por 4 horas (FARMACOPÉIA, 2001; OMS, 1992). A utilização de material seco foi escolhida para possibilitar a investigação da composição química em matéria-prima vegetal. Apenas uma amostra de *B. crispera* sob o código BcGf foi processada na forma fresca.

Extratos hexânicos foram obtidos de *B. trimera* e *B. crispera* coletadas na Argentina e comparados aos extratos hexânicos das mesmas espécies coletadas no Rio Grande do Sul, com o objetivo de obter um método rápido de diferenciar as duas espécies. Para as amostras, 100 mg de partes aéreas foram triturados e extraídos com 5 ml de hexano com auxílio de Ultra-Turrax T8 (Ika[®]-Werke).

Tanto os óleos voláteis quanto os extratos hexânicos foram mantidos sob refrigeração até o momento de análise.

Análise química de óleos voláteis e extratos hexânicos

Os óleos voláteis foram diluídos em uma razão 2:100 (V/V) em éter etílico e os extratos hexânicos foram analisados diretamente. O material diluído foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) para a identificação dos constituintes presentes nas amostras e cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/DIC) para a quantificação.

Cromatografia gasosa

A análise quantitativa foi realizada em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 17 A equipado com coluna capilar de sílica fundida DB₅ (com 25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com polidimetildifenilsiloxano, contendo 5 % de grupamentos fenila com um filme de 0,25 µm de espessura) para a separação dos constituintes. O injetor foi programado para 220°C (com divisão de fluxo – split/splitless

– 1:20) e o programa de temperatura para a coluna operou de 60 a 300°C a 3°C/min. Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão de 80 kPa e velocidade linear de 1 ml/min. Nitrogênio, ar sintético e hidrogênio foram utilizados como gases auxiliares, na razão de 1:1:10, respectivamente. A composição percentual foi obtida por integração eletrônica utilizando o software CR10 (Shimadzu) e detector de ionização de chama (DIC, 250°C).

Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

Todas as amostras foram analisadas por CG/EM, utilizando aparelho Shimadzu QP 5000 com quadrupolo cilíndrico operando com energia de ionização de 70 eV e uma temperatura de interface de 250°C. Foram utilizadas duas colunas diferentes: coluna DB₅ (com 25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com polidimetildifenilsiloxano, contendo 5 % de grupamentos fenila com um filme de 0,25 µm de espessura) e coluna CARBOWAX (com 25 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, preenchida com carbowax 20M, filme de 0,25 µm de espessura). O programa de temperatura operou de 60 a 300°C a 3°C/min para a coluna DB₅ e de 60 a 250°C a 3°C/min para a coluna CARBOWAX, utilizando hélio como gás de arraste a um fluxo de 1 ml/min.

Identificação dos constituintes

A identificação dos constituintes dos óleos voláteis obtidos foi conduzida por comparação de seus respectivos espectros de massas e índices de retenção com amostras autênticas e dados obtidos na literatura (ADAMS, 2001), ou ainda por comparação com espectros de massas registrados em banco de dados como NIST 62 e NIST 12 (National Institute of Standards and Technology).

O índice de retenção utilizado corresponde ao índice de Kováts, o qual utiliza uma série homóloga de alcanos saturados, para evitar erro devido a variações do

tempo de retenção dos compostos. Este índice sofre poucas variações de maneira linear com a temperatura (SANDRA e BICCHI, 1987; COLLINS e BRAGA, 1988).

O índice de retenção de Kováts foi obtido utilizando a seguinte equação:

$$IK = 100 Z + 100 \frac{\log t'_{RX} - \log t'_{RZ}}{\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{RZ}}$$

Onde:

t'_{RX} = tempo de retenção do composto x, sendo que t'_{RX} é intermediário a t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$.

$t'_{R(Z+1)}$ e t'_{RZ} = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal.

Z = número de átomos de carbono com menor peso molecular.

1.3.3. Análise de extratos aquosos

Os extratos aquosos de três espécies, *B. crispa*, *B. trimera* e *B. usterii*, foram analisados. Em estudo preliminar, foram comparados os perfis cromatográficos, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência e detector UV-DAD (CLAE/UV-DAD). Em seguida, o extrato de *B. usterii* foi utilizado para o isolamento de 6 compostos, comuns aos três extratos, os quais foram identificados por meio de técnicas espectroscópicas.

B. trimera apresentou compostos adicionais com espectro UV característico de flavonóides, dos quais, três puderam ser identificados *on line* por meio de análises CLAE/UV/EM, adição pós-coluna de reagentes de deslocamento, e injeção de padrões.

Obtenção dos extratos

Para cada espécie foi preparado um decocto a partir de 50 g de partes aéreas trituradas em 500 ml de água destilada em ebulição por 30 min. Após este período, os extratos obtidos foram congelados e liofilizados.

Análise CLAE/UV-DAD

O extrato aquoso foi analisado em um cromatógrafo Hewlett-Packard série 1100 com detector UV-DAD. A separação foi realizada em coluna Nova-Pack C₁₈ (5 µm, 4,6 x 250 mm d.i., Waters) usando sistema MeOH:H₂O/TFA 0,05% (10:90 a 100:0; 70 min). O fluxo foi de 1 ml/min e os cromatogramas foram medidos em 210, 254 e 366 nm.

Análise CLAE/UV/EM

CLAE/EM foi realizado posteriormente ao registro UV-DAD em equipamento Finningan MAT com interface APCI nas seguintes condições: temperatura capilar de 150°C; temperatura do vaporizador 370°C; modo positivo; fluxo de gás 60 psi, corrente de 5 µA e energia de 15 eV.

Análise CLAE/UV-DAD com adição pós-coluna de reagentes de deslocamento em UV

O método usado para a adição pós-coluna de reagentes baseia-se em protocolo previamente estabelecido por WOLFENDER e HOSTETTMANN (1993). Para a análise de flavonóides presentes no extrato aquoso de *B. trimera* foram utilizados os seguintes reagentes: base fraca NaOAc, base forte KOH e NaOAc/H₃BO₃ a temperatura ambiente; AlCl₃ em meio ácido e não ácido a 90°C para assegurar as reações de complexação. As condições CLAE/UV foram as mesmas já descritas neste capítulo, porém duas bombas adicionais (P2 e P3) foram inseridas entre a saída da coluna e a entrada para o detector (Figura I.20). O fluxo total das bombas P2 e P3 foi subtraído do fluxo da bomba P1 (principal), de maneira que o fluxo final permanecesse em 1 ml/min.

Para a análise em base fraca, por meio da bomba P2 foi adicionado NaOAc (0,5 M; 0,2 ml/min) e de P3, NaOH (0,01 M; 0,2 ml/min), resultando em pH 7 para a fase móvel. Para a base forte, apenas uma bomba foi utilizada para a adição de KOH (0,3 M; 0,3 ml/min), resultando em pH 14. Para a análise com NaOAc/H₃BO₃, P2 foi utilizada para a adição de NaOAc 0,1 M – H₃BO₃ 0,7 M (1:1; 0,2 ml/min) e P3 para NaOH (0,01 M; 0,2 ml/min), fornecendo pH 5. Nas análises conduzidas com AlCl₃, P2 foi usada para acrescentar AlCl₃ (0,3 M; 0,2 ml/min) para meio ácido (pH 3,5) e P3 para NaOH (0,1 M;

0,2 ml/min) até pH 6. Antes do extrato ser analisado nestas condições, utilizou-se quercetina como teste para verificar os efeitos dos agentes de deslocamento UV.

Todas as soluções reagentes foram filtradas em membranas Millipore 0,5 μm e adicionadas pós-coluna com o auxílio de duas bombas Waters M-6000.

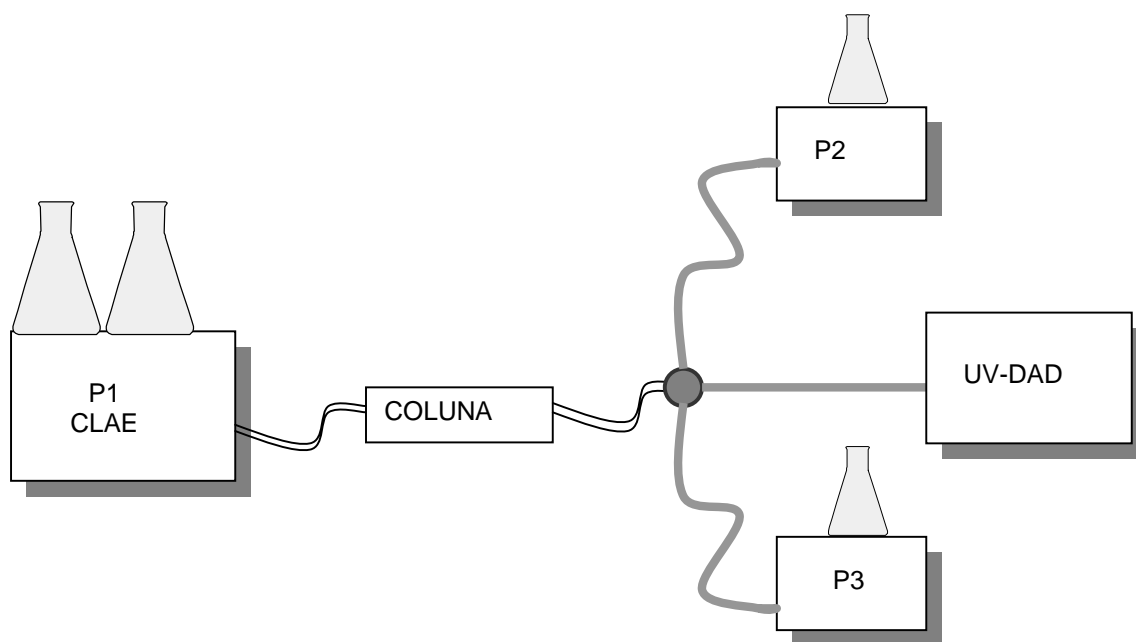


Figura I.20. Esquema representativo das bombas P1, P2 e P3 para análise CLAE/UV-DAD com adição pós-coluna de reagentes de deslocamento UV.

Isolamento

O extrato aquoso liofilizado de *B. usterii* (6 g) foi purificado por cromatografia líquida de média eficiência (CLME) com gradiente MeOH:H₂O (5:95 a 100:0) em coluna RP-18 (Lichoprep 40-63 μm , 270 x 25 mm d.i., Merck), resultando em 24 frações. A fração F6 (256 mg) foi purificada por CLAE semi-preparativa usando coluna $\mu\text{Bondapak}^{\text{®}}$ C18 (10 μm , 25 x 100 mm d.i., Waters, MeOH-H₂O, fluxo de 10 ml/min, UV 254 nm) fornecendo os compostos **A** (2,9 mg), **B** (9 mg) e **C** (4,2 mg). As frações F23, F19 e F17 forneceram respectivamente os compostos **D** (51,2 mg), **E** (50,2 mg) e **F** (52,4 mg).

Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN de ^1H e ^{13}C foram conduzidas em espectrômetro Varian Unity Inova 500 MHz, em CD_3OD e DMSO-d_6 ; deslocamentos químicos (δ) em ppm como δ relativo a Me_4Si (padrão interno).

I.4. Resultados e Discussão

I.4.1. Análise de óleos voláteis e extratos hexânicos

Os rendimentos em óleo volátil foram calculados para todas as amostras em porcentagem (v/m) e estão representados na Tabela I.2. Duas das oito espécies estudadas apresentaram bons rendimentos, *B. trimeria* (0,6 – 0,9%) e *B. stenocephala* (0,9%).

Tabela I.2. Rendimento percentual em óleo volátil de espécies de *Baccharis*.

Amostra	Rendimento percentual (v/m)
Bart (<i>B. articulata</i>)	0,3
Bt1 (<i>B. trimeria</i>)	0,9
Bt2 (<i>B. trimeria</i>)	0,9
Bt3 (<i>B. trimeria</i>)	0,9
Bt4 (<i>B. trimeria</i>)	0,6
Bt4j (<i>B. trimeria</i>)	0,6
Bt4a (<i>B. trimeria</i>)	0,6
Bt4s (<i>B. trimeria</i>)	0,6
Bt4o (<i>B. trimeria</i>)	0,6
BcGj (<i>B. crispa</i>)	0,2
BcGa (<i>B. crispa</i>)	0,2
BcGs (<i>B. crispa</i>)	0,2
BcGo (<i>B. crispa</i>)	0,2
BcGf (<i>B. crispa</i>)	0,2
BcGm (<i>B. crispa</i>)	0,2
BcPR (<i>B. crispa</i>)	0,2
Bmyr (<i>B. myriocephala</i>)	0,2
Bmil (<i>B. cf. milleflora</i>)	0,1
Bmic (<i>B. microcephala</i>)	0,2
Bste (<i>B. stenocephala</i>)	0,9
Bust (<i>B. usterii</i>)	0,2

Apesar da grande semelhança morfológica entre as espécies de *Baccharis Caulopterae*, algumas diferenças de constituição química puderam ser observadas no que se refere a seu óleo volátil (Tabela I.3).

A ocorrência de mono e sesquiterpenos dentro de uma mesma espécie de *Caulopterae*, com a predominância de sesquiterpenos parece ser comum. No entanto, foi possível observar um maior acúmulo de monoterpenos, principalmente β -pineno, em *B. articulata* (30,1%) e *B. stenocephala* (41,3%). É interessante o fato de que estas duas espécies de ramos bialados apresentam um padrão de distribuição entre mono e sesquiterpenos semelhante, com a predominância de β -pineno.

Para algumas espécies observou-se a ocorrência de sesquiterpenos da via biossintética do germacrano, como em *B. myriocephala* (globulol e epiglobulol), *B. cf. milleflora* (γ -gurjuneno e α -selineno), *B. usterii* (espatulenol e globulol) e também *B. crispa* (globulol, epiglobulol, α -selineno, germacreno D e espatulenol). A espécie *B. microcephala* teve o sesquiterpeno α -cadinol como constituinte majoritário do óleo volátil (13,5%).

Observou-se na maioria das análises de *B. crispa* (Tabela I.6), assim como em *B. usterii* (Tabela I.3), importante quantidade de espatulenol. A presença deste componente no óleo volátil poderia ser resultante da oxidação de biclogermacreno, durante o processo de secagem, conforme constatado anteriormente para algumas espécies (APEL, 2001). Por essa razão, realizamos ensaios com amostra de folhas frescas de *B. crispa* (BcGf, Tabela I.6). Os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas, sempre com ausência de biclogermacreno. Desta forma, há a possibilidade da transformação ocorrer mediada por sistemas enzimáticos constitutivos do vegetal e não ser possível sua detecção, ainda que em material fresco.

Outra substância que parece ser produto de oxidação é o “cluster” eudesmol, globulol e epiglobulol, derivados do germacreno D. Conforme analisado no material fresco de *B. crispa* (BcGf, Tabela I.6), este produto aparece em percentual importante (13,6%), enquanto que os demais produtos identificados na planta seca permanecem em proporções semelhantes na planta fresca. Adicionalmente, observou-se uma

proporção significativa de produtos não identificados, em algumas das amostras secas, os quais podem ser derivados de degradação. Na amostra seca coletada no Paraná (BcPR, Tabela I.6) constatou-se a presença de germacreno D em quantidades apreciáveis. Estas variações podem estar ligadas a variações edafo-climáticas. A questão da estabilidade de óleos voláteis tem despertado pouca atenção, mas devido a importância da manutenção da qualidade para utilização industrial, novos estudos relacionados à estabilidade destas espécies serão de grande importância.

Com o objetivo de facilitar a diferenciação entre *B. trimera* e *B. crispera*, foi realizada uma análise mais cautelosa destas duas espécies, considerando-se diferentes locais e épocas de coleta. Desta forma, a análise da composição química dos óleos voláteis de amostras de *B. trimera*, coletadas em diferentes localidades é dada na Tabela I.4; enquanto que os resultados referentes ao mesmo indivíduo coletado em diferentes meses consta na Tabela I.5. A Tabela I.6 apresenta a composição química de amostras de *B. crispera* provenientes de diferentes locais e épocas de coleta.

Tabela I.3. Composição percentual relativa dos constituintes voláteis de diferentes espécies de *Baccharis*.

IK*	Constituinte	Bart	Bmil	Bmic	Bmyr	Bste	Bust
928	α -pineno	3,1			0,3	1,5	
971	β -pineno	30,1	0,4		4,8	41,3	
983	mirreno	1,2				1,3	
1023	limoneno	7,1			0,7	27,3	2,4
1026	1,8-cineol				0,5		
1171	terpinen-4-ol				0,5		
1184	α -terpineol	2,6			1,4		
1370	α -copaeno			0,7			
1385	β -elemeno		1,7	1,7			6,0
1409	β -cariofileno	4,4	19,7	5,2		3,6	1,6
1442	α -humuleno		1,7				
1455	allo-aromadendreno			4,5			
1470	γ -gurjuneno	3,0	23,6	8,3		3,5	
1471	α -himachaleno			3,9			
1478	β -selineno		0,5				
1488	α -selineno		20,7			1,6	
1493	α -muuroleno			4,4			
1496	germacreno A		1,2				
1506	γ -cadineno		0,3				
1515	δ -cadineno	4,2	1,9	3,6			
1562	ledol		1,3	1,9	2,5		
1571	espatulenol	9,7	1,7	8,6	5,6	6,4	37,9
1576	óxido de cariofileno			6,5	6,6		
1580	globulol	4,1	2,9	8,8	14,5	5,7	18,4
1589	epiglobulol	10,5	2,3	4,5	45,8	4,3	5,7
1597	óxido de humuleno I				3,3		
1638	τ -cadinol	6,3	1,3	9,5	0,3		
1644	β -eudesmol				9,8		
1650	α -cadinol	7,3	2,7	13,5	1,8		10,1
Total		93,6	83,9	85,6	98,4	96,5	82,1
Monoterpenos hidrocarbonados		41,5	0,4		5,8	71,4	2,4
Monoterpenos oxigenados		2,6			2,4		
Sesquiterpenos hidrocarbonados		11,6	71,3	32,3		8,7	7,6
Sesquiterpenos oxigenados		37,9	12,2	53,3	90,2	16,4	72,1

* Índice de retenção de Kováts em coluna DB₅. Bart= *B. articulata*; Bmil = *B. cf. milleflora*; Bmic = *B. microcephala*; Bmyr = *B. myriocephala*; Bste = *B. stenocephala*; Bust = *B. usterii*.

Assim como observado nas espécies da Tabela I.3 (à exceção de *B. articulata*, *B. stenocephala* e *B. trimera*), há uma predominância de sesquiterpenos em *B. crispa*, quanto ao padrão de distribuição entre mono e sesquiterpenos.

Entretanto, *B. trimera* destacou-se por apresentar concentrações elevadas (35,5 – 68,0%) de acetato de carquejila (Figura I.6), composto incomum em óleos, que corresponde ao acetato do monoterpene oxigenado carquejol, também presente em amostras desta espécie. Outro fato interessante é a presença de ledol, já que este composto não costuma ser encontrado em óleos voláteis em concentrações tão elevadas quanto aquelas obtidas no óleo de *B. trimera* (5,9 – 24,2%). A presença de acetato de carquejila e ledol foi constatada em todas as amostras.

O isolamento de acetato de carquejila foi inicialmente relatado por NAVES (1959) a partir da espécie “*B. genistelloides*” coletada no estado de Santa Catarina (provavelmente *B. trimera*). Trinta anos depois, BOLDT (1989) publicou um trabalho de revisão sobre o gênero *Baccharis*, mencionando a importância comercial do óleo de carqueja produzido no Brasil (obtido de *B. genistelloides* e contendo de 50 a 55% de acetato de carquejila). De fato, BAUER e colaboradores (1978) já haviam investigado a composição química do óleo de carqueja fornecido pela mesma indústria citada por BOLDT (1989), encontrando acetato de carquejila como constituinte majoritário (69,2%).

Com base nas informações fornecidas no item I.1.3, muito provavelmente a espécie usada na obtenção industrial do óleo de carqueja é *B. trimera*. Portanto, a correta identificação botânica é crucial para a obtenção de produtos industrializados de qualidade, já que as demais espécies de *Caulopterae* sequer apresentaram traços de acetato de carquejila em seu óleo volátil.

Tabela I.4. Composição percentual relativa dos constituintes voláteis de partes aéreas de *B. trimera* de diferentes locais de coleta.

IK*	Constituinte	Bt1	Bt2	Bt3	Bt4j
927	α -pineno				0,8
967	sabineno		0,4		
970	β -pineno	2,4	5,7	1,4	5,6
983	mirreno				0,5
1023	limoneno	0,8	1,8	1,0	3,4
1039	<i>E</i> - β -ocimeno				1,4
1151	carquejol	3,7	5,5		1,5
1293	acetato de carquejila	36,2	65,8	35,5	68,0
1385	β -elemeno	0,4		2,3	
1409	β -cariofileno			1,6	0,5
1470	γ -gurjuneno				3,0
1488	α -selineno			1,0	2,2
1493	α -muuroleno			2,1	
1515	δ -cadineno				0,3
1543	elemol			1,4	
1562	ledol	19,6	10,9	24,2	5,9
1571	espatulenol	1,2		2,8	
1578	globulol	0,6			
1586	epiglobulol	8,3			
1597	óxido de humuleno I	5,1	1,9	4,7	1,2
1615	1-epi-cubenol				0,5
1644	β -eudesmol	13,8	2,3	14,8	2,3
1649	α -cadinol	1,8		5,7	0,8
Total		93,9	94,3	98,5	97,9
Monoterpenos hidrocarbonados		3,2	7,9	2,4	11,7
Monoterpenos oxigenados		39,9	71,3	35,5	69,5
Sesquiterpenos hidrocarbonados		0,4		7,0	6,0
Sesquiterpenos oxigenados		50,4	15,1	53,6	10,7

* Índice de retenção de Kováts em coluna DB₅. Locais de coleta: Bt1=São Francisco de Paula – RS, Brasil; Bt2=Rosário do Sul – RS, Brasil; Bt3=São Vicente – RS, Brasil; Bt4j=Guaíba – RS, Brasil.

Tabela I.5. Composição percentual relativa dos constituintes voláteis de *B. trimera* em diferentes meses de coleta.

IK*	Constituinte	Bt4j	Bt4a	Bt4s	Bt4o
927	α -pineno	0,8	0,4	0,3	0,4
967	sabineno		1,6	1,5	1,5
970	β -pineno	5,6	12,6	11,3	12,3
983	mirreno	0,5			
1023	limoneno	3,4	4,2	4,7	4,0
1039	<i>E</i> - β -ocimeno	1,4	2,6	2,4	2,5
1151	carquejol	1,5	0,6	2,6	1,9
1293	acetato de carquejila	68,0	42,3	60,0	58,5
1385	β -elemeno		1,0		1,0
1409	β -cariofileno	0,5			
1470	γ -gurjuneno	3,0	1,5	1,1	1,2
1476	γ -himachaleno			0,4	0,3
1488	α -selineno	2,2			
1490	biciclogermacreno		1,2	0,4	0,5
1515	δ -cadineno	0,3			
1543	elemol		0,5	0,3	0,4
1562	ledol	5,9	7,2	7,1	7,5
1578	globulol		2,3	0,9	1,2
1586	epiglobulol		1,7	1,8	1,9
1597	óxido de humuleno I	1,2			
1615	1-epi-cubenol	0,5			
1644	β -eudesmol	2,3	1,3	3,0	2,9
1649	α -cadinol	0,8		0,7	0,5
Total		97,9	81,0	98,5	98,5
Monoterpenos hidrocarbonados		11,7	21,4	20,2	20,7
Monoterpenos oxigenados		69,5	42,9	62,6	60,4
Sesquiterpenos hidrocarbonados		6,0	3,7	1,9	3,0
Sesquiterpenos oxigenados		10,7	13,0	13,8	14,4

* Índice de retenção de Kováts em coluna DB₅. Amostras coletadas em Guaíba – RS, Brasil nos meses: Bt4j = julho; Bt4a = agosto; Bt4s = setembro; Bt4o = outubro.

Tabela I.6. Composição percentual relativa dos constituintes voláteis de *B. crispa* em diferentes locais e meses de coleta.

IK*	Constituinte	BcGj	BcGs	BcGo	BcPR	BcGf
927	α -pineno	0,4				0,5
970	β -pineno	6,4				7,1
1039	<i>E</i> - β -ocimeno	1,0				1,1
1415	β -cariofileno	5,3	5,0	1,2	2,5	5,4
1442	α -humuleno	0,9	1,3	0,9		
1470	γ -muuroleno		1,1	0,8		
1475	germacreno D		0,8	5,4	16,5	13,6
1484	β -elemeno					1,2
1488	α -selineno	15,5	5,5	24,7	1,3	15,5
1493	α -muuroleno	0,5	1,0	0,6		0,3
1496	germacreno A	0,5	0,7	0,6		0,5
1506	γ -cadineno		0,6	0,4		
1515	δ -cadineno	1,8	2,5	2,2		1,2
1562	ledol	2,0	1,6	2,7		2,0
1571	espatulenol	13,8	31,3	2,9	23,6	13,8
1578	globulol	3,0	8,8	6,0	30,0	3,0
1586	epiglobulol	16,8	3,7	18,9	0,5	16,8
1596	eudesmol			3,3	2,7	
1597	óxido de humuleno I	1,5				1,6
1622	1-epi-cubenol			0,7		
1630	cedr-8(15)-en-9- α -ol				4,3	
1637	cubenol	2,6	4,7	2,0		2,6
1649	α -cadinol	4,6	6,5	3,1		4,7
1652	calamenenol ^a				5,1	
1666	calamenenol ^a				6,2	
Total		76,6	75,1	76,4	92,7	90,9
Monoterpenos hidrocarbonados		7,8				8,7
Sesquiterpenos hidrocarbonados		24,5	18,5	36,8	20,3	37,7
Sesquiterpenos oxigenados		44,3	56,6	39,6	72,4	44,5

* Índice de retenção de Kováts em coluna DB₅. ^a Isômero não identificado. Coletas: BcGj = Guaíba – RS, Brasil/julho; BcGs = Guaíba – RS, Brasil/setembro; BcGo = Guaíba – RS, Brasil/outubro; BcPR = Castro – Paraná/agosto; BcGf = Guaíba – RS, Brasil/fevereiro/amostra fresca.

A ocorrência de acetato de carquejila não foi detectada no óleo volátil de nenhum exemplar de *B. crispa*, e em nenhuma outra espécie além de *B. trimera* coletadas para este estudo. Procedeu-se a procura por acetato de carquejila avaliando-se o extrato hexânico das amostras de *B. trimera* (Bt4) e *B. crispa* (BcGj) coletadas no Rio Grande do Sul. Estes extratos foram comparados àqueles de amostras de herbário de *B. trimera* (Bt1005, Bt1006, Bt1009 e Bt1010) e *B. crispa* (Bc1004, Bc1007 e Bc1008) coletadas na Argentina (Tabela I.7). Esta avaliação só foi possível por exigir quantidades muito pequenas de material vegetal. Através deste método, confirmou-se a ocorrência de acetato de carquejila apenas em *B. trimera*, sendo este composto sugerido como marcador da espécie e uma ferramenta na diferenciação entre *B. trimera* e *B. crispa*.

Tabela I.7. Percentual de acetato de carquejila em extratos hexânicos de *B. trimera* e *B. crispa* coletadas no Brasil e Argentina.

Amostra	Acetato de carquejila (%)
Bt4j	30,7
Bt1005	43,2
Bt1006	76,3
Bt1009	85,1
Bt1010	30,7
BcGj	-
Bc1004	-
Bc1007	-
Bc1008	-

Locais de coleta de *B. trimera*: Bt4j = Guaíba – RS, Brasil; Bt1005 = Punta Lara – Buenos Aires, Argentina; Bt1006 = Bartolomé Bavio – Buenos Aires, Argentina; Bt1009 = Berazategui – Buenos Aires, Argentina; Bt1010 = Córdoba, Argentina. Locais de coleta de *B. crispa*: BcGj = Guaíba – RS, Brasil; Bc1004 = Villarino – Buenos Aires, Argentina; Bc1007 = Córdoba, Argentina; Bc1008 = San Luis, Argentina.

Segundo HARBORNE e TURNER (1984), em comparação com outras classes de metabólitos secundários, os terpenos voláteis são aqueles de menor utilidade taxonômica em angiospermas. Os autores afirmam que óleos voláteis ocorrem de maneira irregular: alguns grupos de plantas possuem óleos de química complexa, enquanto que plantas taxonomicamente próximas podem não apresentar óleo volátil. No entanto, estudos mais recentes de quimiotaxonomia em diferentes espécies têm sido realizados por meio desta classe de metabólitos secundários (ROUSSIS *et al.*, 2000). Os constituintes voláteis têm sido extensivamente estudados, já que a composição de monoterpenos mostrou-se dependente do genótipo da planta, podendo ser usada para fins taxonômicos (CROTEAU, 1987; BERTEA *et al.*, 2003).

No gênero *Mentha* observa-se a ocorrência de monoterpenos com função oxigenada exclusivamente na posição C-3, como mentol, para *M. piperita* L.; e exclusivamente na posição C-6, como carvona, em *M. spicata*. As bases genéticas dos padrões de oxigenação em C-3 e C-6 em espécies de *Mentha* foi extensivamente estudada por diversos autores e revisada por CROTEAU e GERSHENZON (1994). Estes padrões mostraram-se determinados por dois *loci* alélicos designados por *Lm* e *C*. Postulou-se que o alelo dominante *Lm* seria capaz de evitar a oxigenação em C-6, enquanto seu alelo recessivo *lm* seria capaz de promover esta conversão. Os dois alelos dominantes devem estar fortemente relacionados, já que os padrões de oxigenação em C-3 e C-6 são mutuamente exclusivos e de que C-6 é dominante sobre C-3. Sugeriu-se *Lm* como um gen regulador que controla a expressão da hidroxilação em C-3, enquanto *C* como um gen regulador ou estrutural que controla a hidroxilação em C-6. Ensaio bioquímicos do tipo "cell-free" correlacionaram os padrões de oxigenação com duas enzimas: limoneno-6-hidroxilase (oxigenação em C-6) levando a formação de carvona, e limoneno-3-hidroxilase (oxigenação em C-3) levando à formação de mentol (Figura I. 21).

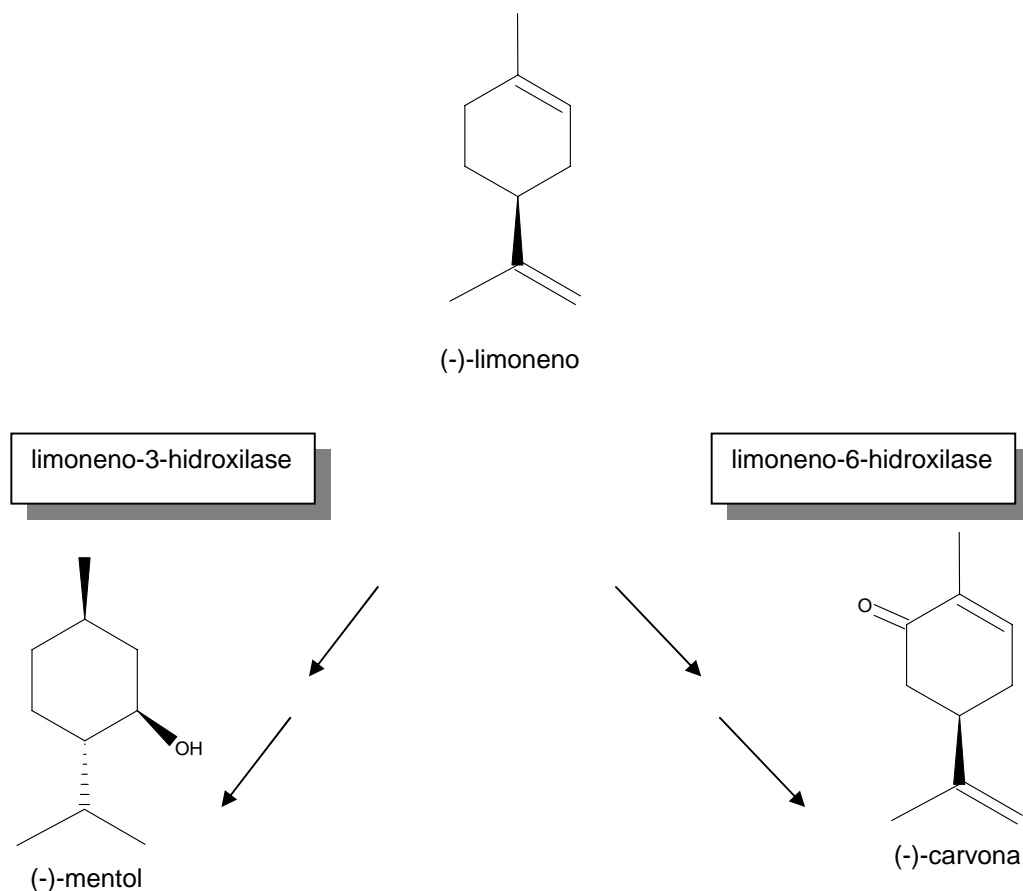


Figura I.21. Biossíntese de (-)-mentol e (-)-carvona a partir de (-)-limoneno. (Adaptado de BERTEA *et al.*, 2003).

Desta forma, o fato do monoterpene oxigenado acetato de carquejila (Figura I.22) ser um derivado com oxigenação em C-3 denota o envolvimento da expressão gênica diferenciada na espécie *B. trimeria* relacionada à produção deste composto pela planta, diminuindo a possibilidade de sua síntese ser dependente de fatores ambientais, o que o torna um bom marcador para a espécie. Além disso, apesar de ser derivado de duas unidades isoprênicas, o acetato de carquejila não parece seguir a condensação cabeça-cauda comum na formação de monoterpenos. Estas estruturas de monoterpenos irregulares parecem ser exclusivas de plantas da família Asteraceae (DEWICK, 1997), o que reforça a utilização do acetato de carquejila como um marcador químico.

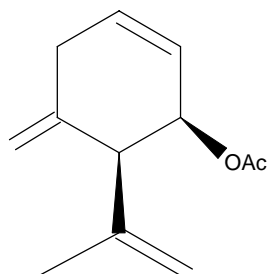


Figura I.22. Estrutura química do acetato de carquejila.

I.4.2. Análise dos extratos aquosos de *B. trimera*, *B. crispa* e *B. usterii*

A partir do extrato aquoso liofilizado obtido das espécies *B. trimera*, *B. crispa* e *B. usterii*, foram feitas análises CLAE/UV a fim de comparar o perfil cromatográfico das mesmas. Devido a presença de constituintes em comum entre as três espécies (apresentando mesmo íon molecular na análise CLAE/UV/EM, Figura I.23), iniciou-se o isolamento. Foram isolados os compostos **A** a **F**, os quais puderam ser identificados por técnicas espectroscópicas como ácidos cafeoilquínicos mono e dissustituídos.

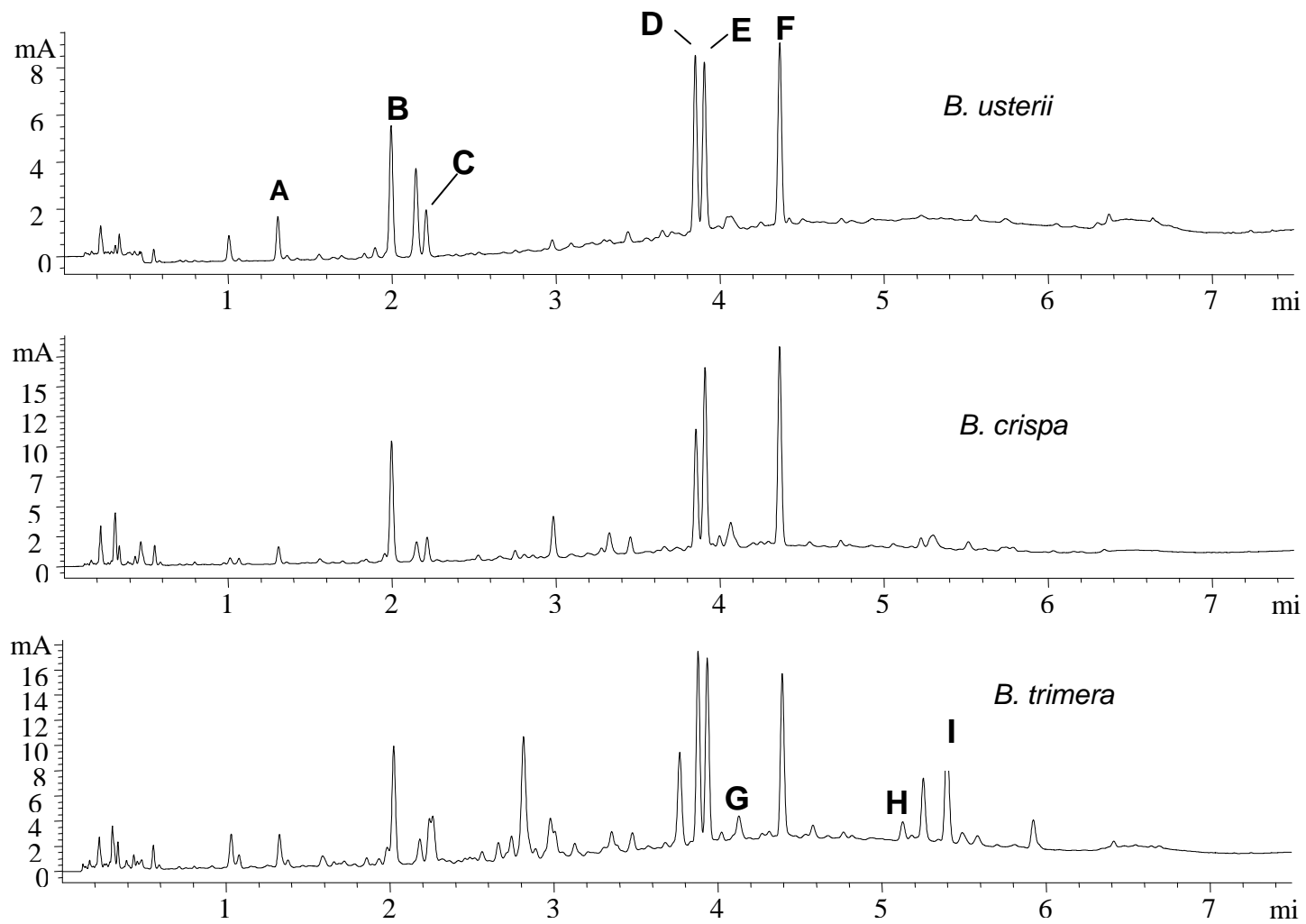


Figura I.23. Comparação do perfil cromatográfico dos extratos aquosos de *B. usterii*, *B. crispa* e *B. trimera* por CLAE/UV.

O composto **A** apresentou três sinais em δ 3,64; 4,12 e 5,35 em RMN de ^1H , atribuídos aos três prótons oxigenados do ácido quínico. A posição exata dos substituintes foi obtida a partir de análises 2D de RMN e comparação dos deslocamentos químicos àqueles publicados por PAULI e colaboradores (1998). Estes autores realizaram uma investigação detalhada de spin e valores de deslocamento em diferentes isômeros de posição de mono e oligoésteres do ácido cafeoilquínico. Composto **A** foi então identificado como o ácido 3-O-[*E*]-cafeoilquínico. O composto **B** também foi identificado como um ácido cafeoilquínico monossustituído. A posição da unidade cafeoil foi obtida pela mesma estratégia aplicada ao composto **A**, o que permitiu a identificação de **B** como o ácido 5-O-[*E*]-cafeoilquínico.

O composto **C** apresentou os mesmos sinais característico do ácido 4-O-[*E*]-cafeoilquínico. No entanto, um sinal em δ 3,80 integrando em três prótons sugeriu a presença de um grupamento metoxila. O espectro HMBC mostrou a correlação entre os sinais δ 3,80 e 174,2, sugerindo a esterificação do ácido quínico por um grupamento metila. As correlações observadas em COSY entre os sinais δ 4,66 (H-4) com ambos os prótons em δ 3,95 (H-3) e 3,97 (H-5) sugeriram uma disposição simétrica das hidroxilas do ácido quínico. Portanto, o composto **C** foi identificado como o ácido 4-O-[*E*]-cafeoil-1-metóxi-quínico.

O espectro de RMN de ^1H do composto **D** apresentou três prótons oxigenados em δ 4,29; 5,10 e 5,69, atribuídos aos prótons do ácido quínico. A posição exata destes prótons foi obtida por COSY e por comparação dos deslocamentos a valores previamente publicados (PAULI *et al.*, 1998). Os deslocamentos químicos do composto **D** estavam de acordo com aqueles do ácido 4,5-O-[*E*]-dicafeoilquínico. Utilizando a mesma estratégia, o composto **F** foi identificado como o ácido 3,5-O-[*E*]-dicafeoilquínico. A estratégia utilizada para o composto **E** foi diferente daquela utilizada para os compostos **D** e **F**. O composto **E** apresentou três prótons oxigenados em δ 5,62; 5,20 e 4,18. O espectro COSY mostrou as correlações entre os sinais δ 5,62 e 4,18, com os prótons de dois CH_2 em δ 2,08-2,2 ($\text{CH}_2 - 2$) e 2,10-2,18 ($\text{CH}_2 - 6$), respectivamente. O próton em δ 5,20 correlacionou com os prótons δ 5,62 e 4,18. Estes

dados sugeriram uma disposição assimétrica dos prótons do ácido quínico. Desta forma, foi possível concluir uma disposição contrária àquela observada para o composto **D**. O composto **E** foi identificado com o ácido 3,4-*O*-[*E*]-dicafeoilquínico.

As estruturas químicas dos compostos **A** a **F** estão representadas na Figura I.24 e seus dados espectroscópicos são descritos a seguir.

Composto **A** (ácido 3-*O*-[*E*]-cafeoilquínico): RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ 2,15-2,18 (2H, m, H-2), 5,35 (1H, m, H-3), 3,64 (1H, m, H-4), 4,12 (1H, m, H-5), 1,95-2,10 (1H, m, H-6), 7,03 (1H, broad s, H-2'), 6,76 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), 6,93 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6'), 7,57 (1H, d, $J=15$ Hz, H-7'), 6,29 (1H, d, $J=15$ Hz, H-8'). APCI-EM m/z 354.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ESI-EM m/z 377.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

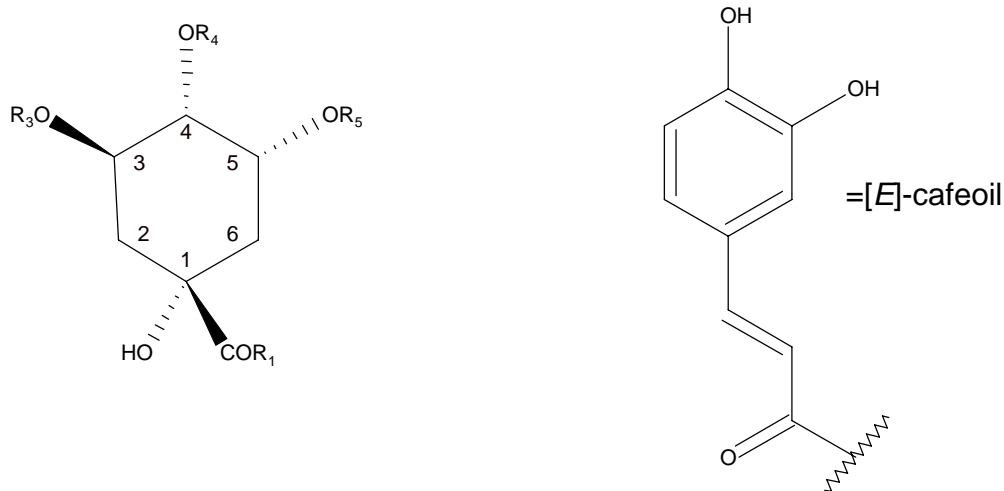
Composto **B** (ácido 5-*O*-[*E*]-cafeoilquínico): RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ 2,04-2,16 (2H, m, H-2), 4,16 (1H, m, H-3), 3,72 (1H, m, H-4), 5,33 (1H, m, H-5), 2,06-2,23 (1H, m, H-6), 7,02 (1H, broad s, H-2'), 6,77 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), 6,92 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6'), 7,56 (1H, d, $J=15$ Hz, H-7'), 6,28 (1H, d, $J=15$ Hz, H-8'). APCI-EM m/z 354.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$. ESI-EM m/z 377.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Composto **C** (ácido 4-*O*-[*E*]-cafeoil-1-metoxi-quínico): RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) δ 1,81-1,89 (2H, m, H-2), 3,80 (3H, s, OCH_3), 4,01 (1H, m, H-3), 4,66 (1H, m, H-4), 4,08 (1H, m, H-5), 1,86-2,02 (1H, m, H-6), 7,04 (1H, broad s, H-2'), 6,75 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), 6,99 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6'), 7,47 (1H, d, $J=15$ Hz, H-7'), 6,25 (1H, d, $J=15$ Hz, H-8'). APCI-EM m/z 354.4 $[\text{M}-15]^+$. ESI-EM 391.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Composto **D** (ácido 4,5-*O*-[*E*]-dicafeoilquínico): RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ 2,15-2,24 (2H, m, H-2), 4,29 (1H, m, H-3), 5,10 (1H, m, H-4), 5,69 (1H, m, H-5), 2,17-2,27 (1H, m, H-6), 6,92 (1H, broad s, H-2'), 6,71 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), 6,89 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6'), 7,50 (1H, d, $J=15$ Hz, H-7'), 6,17 (1H, d, $J=15$ Hz, H-8'), 7,01 (1H, broad s, H-2''), 6,74 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5''), 6,90 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6''), 7,57 (1H, d, $J=15$ Hz, H-7''), 6,27 (1H, d, $J=15$ Hz, H-8''). APCI-EM m/z 516.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Composto **E** (ácido 3,4-O-[*E*]-dicafeoilquínico): RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ 2,08-2,2 (2H, m, H-2), 5,62 (1H, m, H-3), 5,20 (1H, m, H-4), 4,18 (1H, m, H-5), 2,10-2,18 (1H, m, H-6), 7,01 (1H, broad s, H-2'), 6,74 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), 6,87 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6'), 7,52 (1H, d, $J=15$ Hz, H-7'), 6,22 (1H, d, $J=15$ Hz, H-8'), 7,03 (1H, broad s, H-2''), 6,72 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5''), 6,90 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6''), 7,61 (1H, d, $J=15$ Hz, H-7''), 6,29 (1H, d, $J=15$ Hz, H-8''). APCIMS m/z 516.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Composto **F** (ácido 3,5-O-[*E*]-dicafeoilquínico): RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ 2,04-2,28 (2H, m, H-2), 5,52 (1H, m, H-3), 3,90 (1H, m, H-4), 5,37 (1H, m, H-5), 2,07-2,25 (1H, m, H-6), 7,04 (1H, broad s, H-2'), 6,76 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5'), 6,95 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6'), 7,56 (1H, d, $J=15$ Hz, H-7'), 6,25 (1H, d, $J=15$ Hz, H-8'), 7,04 (1H, broad s, H-2''), 6,76 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-5''), 6,96 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-6''), 7,61 (1H, d, $J=15$ Hz, H-7''), 6,32 (1H, d, $J=15$ Hz, H-8''). APCI-EM m/z 516.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$.



- A** $\text{R}_1=\text{OH}$ $\text{R}_3=\text{cafeoil}$ $\text{R}_4=\text{H}$ $\text{R}_5=\text{H}$
- B** $\text{R}_1=\text{OH}$ $\text{R}_3=\text{H}$ $\text{R}_4=\text{H}$ $\text{R}_5=\text{cafeoil}$
- C** $\text{R}_1=\text{OCH}_3$ $\text{R}_3=\text{H}$ $\text{R}_4=\text{cafeoil}$ $\text{R}_5=\text{H}$
- D** $\text{R}_1=\text{OH}$ $\text{R}_3=\text{H}$ $\text{R}_4=\text{cafeoil}$ $\text{R}_5=\text{cafeoil}$
- E** $\text{R}_1=\text{OH}$ $\text{R}_3=\text{cafeoil}$ $\text{R}_4=\text{cafeoil}$ $\text{R}_5=\text{H}$
- F** $\text{R}_1=\text{OH}$ $\text{R}_3=\text{cafeoil}$ $\text{R}_4=\text{H}$ $\text{R}_5=\text{cafeoil}$

Figura I.24. Estrutura dos compostos **A** a **F**.

Além dos compostos **A** a **F**, três compostos adicionais puderam ser identificados “on line” no extrato de *B. trimera*. Estes compostos conhecidos (**G** a **I**) não foram detectados nos extratos de *B. crispa* e *B. usterii* (Figura 1.23). Informações complementares a estes compostos puderam ser obtidas pela análise CLAE/EM e CLAE/UV com adição pós-coluna de reagentes de deslocamento UV, seguindo protocolo já estabelecido para a análise de flavonóides e xantonas (HOSTETTMANN *et al.*, 1984; WOLFENDER e HOSTETTMANN, 1993) Os deslocamentos observados foram interpretados de acordo com regras previamente estabelecidas na análise de polifenóis (MARKHAM, 1982).

O espectro UV do composto **G** sugeriu um esqueleto de flavonol. A análise CLAE/EM mostrou um íon molecular em m/z 464,8 $[M+H]^+$ de acordo com o peso molecular de 464 uma. Foi também observado um íon em m/z 303,1 $[M+H]^+$, correspondente a perda de um açúcar. O composto **G** foi identificado como isoquercitrina após comparação de seu tempo de retenção com aquele de um padrão. Este composto já havia sido identificado no gênero *Baccharis* por MOREIRA e colaboradores (2003).

O composto **H** apresentou espectro UV e padrão de hidroxilação muito semelhantes aos da quercetina já isolada anteriormente de *B. trimera* (SOICKE e LENG-PESCHLOW, 1987). Esta hipótese foi confirmada por análise CLAE/EM e comparação de seu tempo de retenção com substância de referência.

O composto **I** apresentou espectro UV típico de uma flavona. A posição dos três grupamentos hidroxila foi deduzida utilizando-se dados complementares de deslocamento UV. A 5,7-di-hidroxilação do anel A foi inferida a partir do deslocamento UV observado após adição de $AlCl_3$ e NaOAc (MARKHAM, 1982). Os deslocamentos batocrômicos das bandas II e I com $AlCl_3$ devem-se a formação de um complexo entre a hidroxila da posição 5 e a carbonila da posição 4, e de um segundo complexo entre as hidroxilas das posições 4' e 5'. De outra forma, o deslocamento das bandas I e II após a adição de base fraca sugeriram a presença de OH nas posições mais ácidas, 7 e 4'. O espectro EM apresentou um intenso íon em m/z 317 $[M+H]^+$ de acordo com o

peso molecular de 316 uma. Estes dados foram muito semelhantes àqueles da nepetina, previamente isolada de *B. trimera* (SOICKE e LENG-PESCHLOW, 1987).

As estruturas químicas dos compostos **G** a **I** estão representadas na Figura I.25 enquanto seus deslocamentos UV constam da Figura I.26.

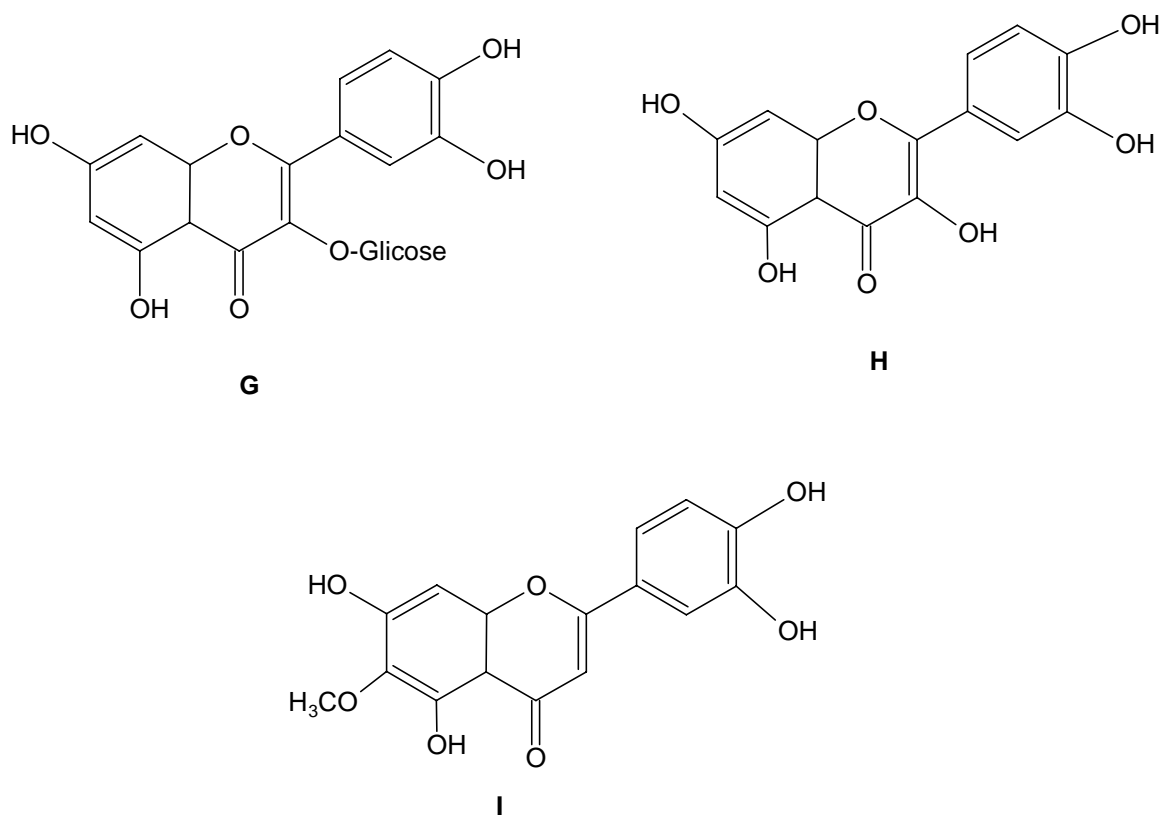


Figura I.25. Estrutura química dos compostos **G** a **I**.

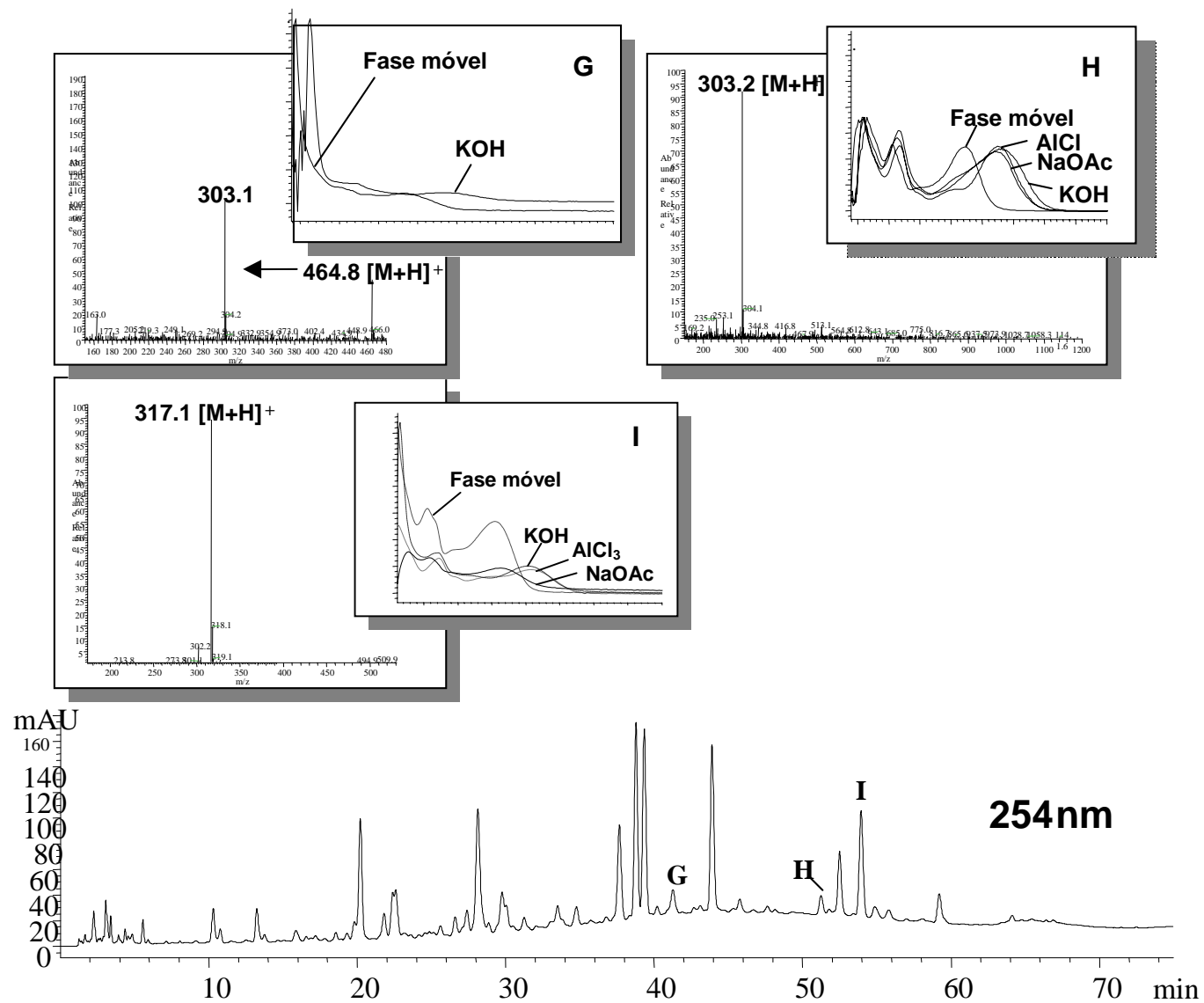


Figura I.26. Cromatograma do extrato de *B. trimera*, com os respectivos espectros de massas e deslocamentos UV para os flavonóides **G** a **I**.

CAPÍTULO II
AVALIAÇÕES BIOLÓGICAS

II.1. Atividades biológicas na seção Caulopterae

As espécies da seção Caulopterae – conhecidas como carqueja, carquejinha, carqueja-do-banhado, carqueja-crespa, yaguaretéka e chirca-melosa – têm seu uso popular disseminado por toda a América Latina, sendo utilizadas principalmente como estomáquicas, antidiabéticas, anti-reumáticas, em ferimentos e ulcerações da pele (SIMÕES *et al.*, 1986). Também são utilizadas como hepatoprotetoras, estimulantes da fertilidade feminina, anti-helmínticas, abortivas, inseticidas, afrodisíacas, antitérmicas (GUPTA, 1995) e diuréticas (ALICE *et al.*, 1995). DI STASI e colaboradores (2002) mencionam o uso popular dessas plantas como antiinflamatórias, em casos de hipertensão, hemorragia cerebral, obesidade e detoxificação.

Diferentes tipos de extratos das diversas espécies de *Baccharis* Caulopterae já foram avaliados quanto a suas atividades biológicas ou farmacológicas, entre elas, atividade antiviral, antiinflamatória, citotóxica, antioxidante, antihepatotóxica, antimicrobiana, analgésica, entre outras.

Baccharis articulata

Estudos comprovam a atividade antioxidante de uma fração butanólica do extrato aquoso de *B. articulata* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2003). Os autores demonstraram a atividade *in vitro*, estimada pelo parâmetro antioxidante TRAP (“total radical-trapping antioxidant parameter”), e *ex vivo*, estimada pela prevenção de formação de TBARS e pela determinação da viabilidade celular em cultura de células de Sertolli de ratos, exposta a peróxido de hidrogênio. A partir da fração butanólica foi isolado o composto Ball (**23**) que apresentou atividade antioxidante *in vitro* semelhante ao controle positivo (Trolox), de maneira dose-dependente, quando testado nas concentrações de 0,1; 0,2 e 2,0 mM. As concentrações de 0,2 e 2,0 mM deste composto também apresentaram

resultados positivos no teste *ex vivo*, apresentando maior efeito de proteção celular que o controle positivo.

GENÉ e colaboradores (1992) constataram que a atividade antiinflamatória *in vivo* do extrato aquoso de *B. articulata*, administrado via intra-peritoneal, não foi significativa no ensaio de inibição do edema de pata induzido pela carragenina em ratos Wistar.

O extrato etanólico desta espécie apresentou atividade antiviral, sendo capaz de inibir a infectabilidade do vírus Vero Celis-pseudorabies RC/79 (vírus da herpes suis) (ZANON *et al.*, 1999).

O efeito abortivo do extrato aquoso foi observado após sua administração em animais durante 10 a 15 dias consecutivos. O aborto foi causado pela ação direta sobre o útero (GUPTA, 1995).

Baccharis crispera

PALACIOS e colaboradores (1983) descrevem a atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*, por bioautografia do decocto obtido de acordo com o uso popular. O flavonóide gencuanina (**9**) foi identificado como o principal componente ativo do extrato. As atividades de gencuanina e apigenina (**3**) foram testadas isoladamente sendo positivas a 380 e 750 µg, respectivamente, pelo método de impregnação em discos.

GENÉ e colaboradores (1992) demonstraram não ser significativa a atividade antiinflamatória *in vivo* de seu extrato aquoso via intra-peritoneal no ensaio de inibição do edema de pata induzido pela carragenina em ratos Wistar.

O diterpeno bacrispina (**39**) isolado desta espécie apresentou atividade deterrente contra larvas de *Tenebrio molitor*, na concentração de 100 ppm. O composto **41**, também investigado, mostrou-se inativo na mesma concentração (CIFUENTE *et al.*, 2002).

Baccharis gaudichaudiana

Testes de citotoxicidade foram realizados na espécie coletada no Paraguai. FULLAS e colaboradores (1994) demonstraram que gaudichaudol C (**62**), gaudichaudona (**51**) e acetato de articulina (**52**), isolados a partir desta planta apresentaram atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células cancerosas. Gaudichaudol C apresentou atividade significativa em células P-388 (ED₅₀ 2,4 µg/ml), sendo inativo em células KB e ativo em células KB-V1 resistentes (ED₅₀ 4,7 µg/ml). Gaudichaudona não apresentou atividade em células epiteliais e apresentou fraca atividade sobre células P-388 (ED₅₀ 11,7 µg/ml). Um padrão semelhante de atividade foi constatado para o acetato de articulina com ED₅₀ de 1,7 µg/ml sobre P-388.

AKAIKE e colaboradores (2003) demonstraram a atividade antioxidante frente a DPPH (difenilpicrilidrazila) para os compostos isolados quercetina-3-O-L- α -ramnosídeo (**18**), eupafolina (**19**), rutina (**5**) e ácido 3,5-di-O-[*E*]-cafeoilquínico (**22**). Os flavonóides jaceosidina (**16**), desmetoxicentaureidina (**17**), hispidulina (**1**), eupatilina (**20**) e isoschaftosídeo (**21**) não demonstraram atividade, fato que os autores atribuíram à ausência do grupamento catecol. Os diterpenos clerodanos isolados também não foram ativos.

Baccharis sagittalis

O diterpeno marrubiagenina (**31**) isolado desta espécie apresentou atividade deterrente contra larvas de *T. molitor*, semelhante à atividade observada para bacrispina (CIFUENTE *et al.*, 2002).

Baccharis trimera

Estudos mostraram a atividade inibitória do extrato aquoso da espécie determinada como *B. genistelloides*, coletada na Bolívia, contra os vírus HSV-1 e VSV,

apresentando atividade em concentrações que variaram de 25 a 50 µg/ml. O limite de 50 µg/ml adotado em tal estudo deve-se ao resultado de citotoxicidade obtido sobre cultura de células HeLa, sendo 50 µg/ml a concentração não tóxica limite para seu extrato aquoso (ABAD *et al.*, 1999).

O extrato aquoso de *B. trimera*, coletada no Uruguai e sua fração butanólica BT-II apresentou atividade anti-flogística via intra-peritoneal em ratos Wistar fêmeas. BT-II foi capaz de inibir o edema induzido por carragenina de forma dose-dependente ($ED_{50} = 26,7$ mg/kg), alcançando valores próximos a 100 % de inibição da inflamação (GENÉ *et al.*, 1992). A mesma fração BT-II, testada frente a diferentes agentes flogísticos, produziu inibição da inflamação induzida por carragenina e dextran em doses que variaram de 40 a 100 mg/kg. Além disso, a fração butanólica BT-II (ressuspensa em água), apresentou ação ulcerogênica, via intraperitoneal, em ratos. A incidência de úlcera foi de 2/6 a 50 mg/kg e 6/6 a 100 mg/kg. Os autores sugerem que o mecanismo da ação antiinflamatória seja mediado pela inibição da síntese de prostaglandinas. Este mecanismo está associado à incidência de úlceras, um efeito colateral conhecido dos antiinflamatórios não esteroidais (GENÉ *et al.*, 1996).

O extrato aquoso (5%, 72 °C, 30 min) da planta coletada no Brasil apresentou atividade antiúlcera em ratos submetidos à imobilização a 4 °C. Da mesma forma, o tratamento com o extrato aquoso (2,0 g/kg, via oral) reduziu o índice de ulceração em 56% e o número de úlceras induzidas por etanol 75 °GL, em 87%. A administração intraduodenal do extrato aquoso (2,0 g/kg) em ratos com piloro ligado reduziu o volume da secreção gástrica em 61%, aumentou o pH em 3 unidades e reduziu a acidez total em 42%. Os autores particionaram o extrato sucessivamente em H₂O/CHCl₃ e H₂O/BuOH. A fração hidrossolúvel resultante, FA-II, quando administrada previamente a betanecol e pentagastrina, foi capaz de inibir a acidez gástrica. Esta inibição não foi observada quando da administração prévia a histamina. Desta forma, a fração hidrossolúvel apresentou atividade anti-ácida, bloqueando a ação de dois agonistas fisiológicos da secreção gástrica. Os autores sugerem que o mecanismo desta ação esteja relacionado com a mobilização de cálcio intracelular (GAMBERINI e LAPA, 1992).

Um estudo conduzido com a espécie identificada como *B. genistelloides* (coletada no Brasil) mostrou eficácia de seu extrato aquoso (5,3%) contra a ação letal de SnCl₂ (agente redutor) sobre *Escherichia coli*. Segundo os autores, a ação protetora do extrato contra a ação letal de SnCl₂ pode estar relacionada a sua atividade antioxidante. Os compostos do extrato aquoso poderiam (1) exercer ação quelante sobre os íons estanho, protegendo-os contra sua oxidação e evitando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), (2) agir como "scavengers" das espécies reativas de oxigênio geradas por SnCl₂ e/ou (3) apresentar compostos capazes de oxidar os íons estanho, diminuindo o efeito de SnCl₂ (MELO *et al.*, 2001).

Os flavonóides isolados de *B. trimera* mostraram pronunciada atividade antihepatotóxica em camundongos intoxicados com faloidina. Esta atividade pôde ser observada tanto na fração constituída por uma mistura de flavonóides quanto nos flavonóides isolados, dentre os quais, hispidulina mostrou-se o composto mais ativo (SOICKE E LENG-PESCHLOW, 1987).

Alguns estudos foram feitos na tentativa de detectar a atividade analgésica da espécie. DI STASI e colaboradores (1988) demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* foi capaz de produzir atividade analgésica na dose de 1g/kg, pelo ensaio de inibição de contorções induzidas com peróxido de benzoíla, em camundongos. Os autores não observaram atividade pelo teste "tail flick". Em outro estudo, uma fração butanólica do extrato aquoso (BT-II) desta mesma espécie reduziu o número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos em doses de 50 mg/kg (67,4% de inibição) e 100 mg/kg (95,1% de inibição) (GENÉ *et al.*, 1996).

O extrato obtido com acetato de etila foi capaz de exercer proteção contra infecção pela cercária de *Schistosoma mansoni* (HERZ *et al.*, 1977) e pelo *Tripanosoma cruzi*, agente causador do mal de Chagas (SIMOES *et al.*, 1986).

DOS SANTOS FILHO e colaboradores (1980) descreveram a atividade moluscicida sobre *Biomphalaria glabrata* a partir de lactonas diterpênicas e flavonas isoladas da espécie.

O extrato bruto etanólico demonstrou boa atividade inseticida contra pragas que afetam diversos cultivos, tais como *Triboleum castaneum* (60% de mortalidade) e *Rhizopertha dominica* (70% de mortalidade) (CRUZ *et al.*, 1997).

Efeitos cardiovasculares também foram observados para a espécie *B. trimera*. Um fracionamento monitorado por bioensaio a partir do extrato clorofórmico desta espécie permitiu evidenciar, para a fração correspondente a uma mistura de diterpenos, a atividade bloqueadora de contração induzida por Ca^{2+} em preparações de veia porta de rato, despolarizadas por KCl. Testes realizados com dois constituintes isolados da mistura indicaram um diterpeno de núcleo clerodano dilactônico (**29**) como sendo o constituinte ativo (TORRES *et al.*, 2000).

SILVA e colaboradores (1992) investigaram o efeito do tratamento crônico com extrato de *B. trimera* na fertilidade e na capacidade reprodutora de ratas. Os animais foram tratados por 15 dias com dose de 272 mg/kg/dia (20 vezes maior que aquela empregada popularmente), via oral. Após esse período as ratas foram acasaladas. O tratamento foi continuado até a interrupção da prenhez no 17º dia de gestação ou até o nascimento dos conceptos. Os resultados indicaram que o tratamento crônico (30 dias) com o extrato aquoso da planta não interferiu com a fertilidade, a nidação e a capacidade reprodutora das ratas, mas influenciou o peso dos recém nascidos. No entanto, esta diferença de peso não foi detectada após uma semana do nascimento.

PEDRAZZI e colaboradores (1997) realizaram um estudo duplo-cego de toxicidade oral em ratas, por meio de avaliação hematológica após a administração de infusões de 2 g de planta em 40 ml. Após a administração do extrato em dose única (fase aguda) e administração por 30 dias (fase crônica), os seguintes parâmetros foram avaliados: glicose, colesterol, triglicérides, ácido úrico, proteínas totais, albumina, uréia, creatinina, alanina e aspartato aminotransferase (ALT, AST), γ -glutamyl-transferase (GGT), fosfatase alcalina (ALP) e bilirrubina total. Pela análise estatística, os resultados não apresentaram sinais de toxicidade e nem alterações no perfil hematológico dos animais estudados.

Testes de toxicidade aguda foram realizados para o extrato aquoso de *B. trimera*, por meio de dois bioensaios distintos. No ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina*, o extrato causou mortalidade de 8, 20 e 90% nas concentrações 0,1; 0,5 e 1,0%, respectivamente. Para o teste da inibição de crescimento das raízes de trigo, o extrato foi capaz de inibir o crescimento em 52 e 88% nas concentrações 0,5 e 5,0 %, respectivamente (GONZÁLEZ *et al.*, 1993).

RODRIGUES (1994) realizou um estudo utilizando espécie classificada como *B. triptera* (sinônimo de *B. trimera*) a fim de avaliar possíveis efeitos tóxico-colaterais da carqueja, preparada na forma de chá, de acordo com o uso popular. O estudo foi conduzido em fase aguda (24 h) e sub-crônica (30 dias), em ratos Wistar, com a avaliação dos seguintes parâmetros: glicose, creatinina, uréia, proteínas totais, albumina, colesterol total, triglicerídeos, enzimas hepáticas, contagem de hemácias, contagem global de leucócitos, contagem diferencial de leucócitos, hematócrito, hemoglobina e índices eritrocitométricos. O autor concluiu que nenhum efeito tóxico-colateral foi evidenciado para o chá de carqueja na concentração utilizada popularmente.

GAMBERINI e LAPA (1996) demonstraram que a administração do extrato aquoso bruto de *B. trimera* (1g/kg/7 dias/via oral) reduziu a pressão arterial de ratos normotensos de 119 ± 1 mm Hg para 110 ± 3 mm Hg.

HNATYSZYN e colaboradores (2003) investigaram o efeito relaxante sobre a musculatura lisa do corpo cavernoso em cobaias, utilizando extratos de plantas argentinas. Foram observados valores significativos (cerca de 70% de relaxamento a 10 mg/ml) com os extratos metanólico e diclorometano de *B. trimera*. Segundo os autores, estes resultados parecem validar o uso popular da planta e abre novos caminhos na busca de produtos naturais com efeito vasodilatador.

NAKASUGI e KOMAI (1998) demonstraram a atividade antimutagênica do extrato metanólico de *B. trimera* frente a 3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-*b*]-indol, com a utilização de *Salmonella typhimurium* na presença de fração microsossomal de fígado de

rato. A atividade foi atribuída às flavonas hispidulina (1) , apigenina (3), gencuanina (9) e cirsimarina (13).

Não foram encontrados na literatura, trabalhos de ensaios biológicos envolvendo o óleo essencial de espécies de *Caulopterae*. Porém, CAUJOLLE e MEYNIER (1959) estudaram efeitos farmacológicos do carquejol, um constituinte presente no óleo volátil de *B. trimera*. Neste estudo foram realizados ensaios de toxicidade, em camundongos, em função dos efeitos de irritação observados sobre a nasofaringe e os olhos, a partir dos vapores deste constituinte. A DL₅₀ do carquejol foi determinada como sendo 0,46 g/kg de animal quando investigada via intraperitoneal, e 1,80 g/kg quando administrado via oral. Também foi observada a capacidade do carquejol em potencializar efeitos narcóticos de morfina e codeína em doses inferiores à dose letal.

Devido à ausência de estudos envolvendo a classe de óleos voláteis, como um todo, para as espécies da seção *Caulopterae* do gênero *Baccharis*, evidencia-se a importância da realização de ensaios biológicos.

II.2. Material e métodos

II.2.1. Determinação da atividade antimicrobiana em óleos voláteis

A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método da bioautografia (HAMBURGER e CORDELL, 1987; RAHALISON *et al.*, 1991), sobre cromatofolhas dispostas em placas de Petri e cobertas por ágar inoculado. No entanto, o método foi utilizado com aplicação direta dos óleos voláteis sobre a placa, sem o desenvolvimento da mesma, com o objetivo de executar apenas um screening comparativo. Em se tratando de óleos voláteis, geralmente constituídos por mistura complexa, com a presença de inúmeros isômeros, o número de manchas detectadas sobre a placa após a migração é geralmente muito menor que número de picos observado no cromatograma obtido por CG/EM. Desta forma, a bioautografia dificilmente poderia detectar compostos ativos de maneira inequívoca.

Foram investigados os óleos voláteis de *B. articulata*, *B. crispa*, *B. microcephala*, *B. myriocephala*, *B. trimera* e *B. usterii*. A fração F10 obtida a partir do óleo de *B. trimera* também foi investigada.

Fracionamento do óleo volátil de *B. trimera*

O óleo volátil de *B. trimera* foi submetido a fracionamento para obtenção de fração enriquecida em acetato de carquejila. Utilizou-se coluna (30 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro) preenchida com gel de sílica 60 para coluna, com tamanho de partícula de 0,063 a 0,200 mm. Como fase móvel foi utilizado sistema pentano:éter etílico, de acordo com o seguinte gradiente:

pentano (15 ml)
pentano:éter etílico (95:5) (15 ml)
pentano:éter etílico (90:10) (15 ml)
pentano:éter etílico (85:15) (15 ml)
pentano:éter etílico (80:20) (15 ml)
pentano:éter etílico (75:25) (15 ml)
pentano:éter etílico (70:30) (15 ml)

Foram recolhidas 18 frações (F1-F18) em intervalos de 5 min. As frações foram acompanhadas por CG e CG/EM. A fração F10 constituiu-se de 90% acetato de carquejila e 10% de ledol.

Atividade antibacteriana

Foram realizados repiques de cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), para meio n^o 1 de Grove-Randall em tubos inclinados e incubados a 35 °C, por 24 horas. A partir destas sementeiras, foram realizados novos repiques para 5 ml de soro fisiológico a fim de obter a suspensão de bactérias para o preparo dos inóculos a 0,5% (v/v) em meio n^o 11 de Grove-Randall.

As amostras testadas, branco e controle foram aplicados em cada cromatofolha em um volume de 5 µl. Água estéril foi utilizada como branco e cloranfenicol (200 µg/ml) como controle. Foram utilizados 20 ml de meio inoculado para a cobertura das cromatofolhas dispostas nas placas de Petri.

As placas foram incubadas por 24 horas, a 37 °C. Para a visualização, as placas receberam solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio a 200 mg/ml em água estéril, seguido de incubação a 37 °C por 1 hora. Após este período observou-se a presença ou ausência do halo de inibição.

Atividade antifúngica

Foram utilizadas cepas de *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 1600), as quais foram desenvolvidas em ágar Sabouraud (tubo inclinado) por 48 horas, a 25 °C. A partir destas sementeiras, foram realizados novos repiques para 5 ml de caldo Sabouraud a fim de obter a suspensão de fungos para o preparo dos inóculos a 0,5% (v/v) em ágar Sabouraud.

As amostras testadas, branco e controle foram aplicados em cada cromatofolha em um volume de 5 µl. Água estéril foi utilizada como branco e nistatina (1,5 mg/ml) como controle. Foram utilizados 20 ml do meio inoculado para a cobertura das cromatofolhas dispostas em placas de Petri.

As placas foram incubadas por 24 horas, a 25 °C. Para a visualização, as placas receberam solução de 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio a 20 mg/ml em água estéril, seguido de incubação a 25 °C por 1 hora. Após este período observou-se a presença ou ausência do halo de inibição.

II.2.2. Determinação da atividade antiinflamatória *in vitro*

Foram utilizados ratos Wistar, machos, adultos de peso entre 180 e 220 g.

A atividade antiinflamatória *in vitro* foi realizada pela investigação da inibição da quimiotaxia de leucócitos através da câmara de BOYDEN (1962), modificada por ZIGMOND e HIRSCH (1973). Os detalhes experimentais desta técnica foram descritos por MELLO e colaboradores (1992). Foram empregadas câmaras cilíndricas, construídas em acrílico transparente, consistindo de dois compartimentos, com capacidade de 0,5 ml de capacidade cada: o compartimento inferior foi preenchido com uma solução contendo o fator quimiotáxico, e o compartimento superior com amostra dispersa em suspensão de neutrófilos peritoneais (100 µg/ml). Os compartimentos

superior e inferior foram separados por um filtro de nitrato de celulose com 13 mm de diâmetro e poros de 8 μm de diâmetro (Figura II.1). Assim, a migração das células através do filtro foi avaliada, no gradiente de concentração do fator quimiotático, que se estabeleceu entre os dois compartimentos. Como controle, utilizou-se a suspensão de neutrófilos sem adição de amostra.

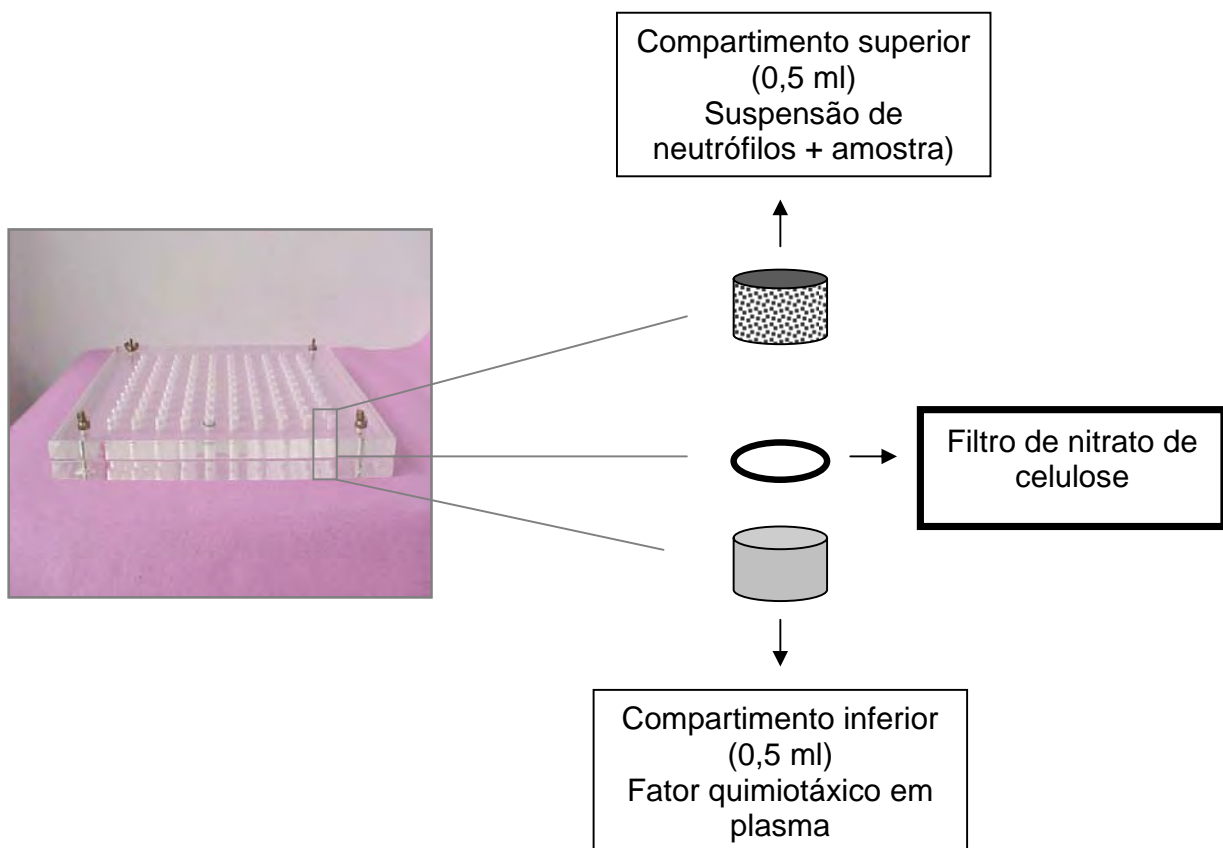


Figura II.1. Esquema representativo da montagem da câmara Boyden utilizada na determinação da atividade antiinflamatória *in vitro*.

Obtenção do fator quimiotático

A interação de plasma com antígenos bacterianos ativa as vias clássica e alternativa do sistema complemento, com conseqüente formação de fatores quimiotáticos para leucócitos. O material quimiotático utilizado nos experimentos foi obtido incubando plasma homólogo por 30 min a 37 °C, com solução de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), na concentração de 65 µg/ml. O plasma foi então diluído (v:v) em solução de Hanks a 4 %.

Coleta e preparo da suspensão de neutrófilos

Neutrófilos foram obtidos a partir da cavidade intraperitoneal de ratos, quatro horas após a injeção de 20 ml de uma solução de glicogênio a 1%. Para a coleta das células, os animais foram sacrificados por exposição ao éter etílico, injetando-se a seguir, na cavidade peritoneal, 60 ml de solução de Hanks contendo 1 UI/ml de heparina. As células obtidas foram lavadas com solução de Hanks. A quantidade de células adicionadas ao compartimento superior correspondeu à contagem de $1,5 \times 10^6$ células, em câmara de Neubauer.

Determinação da atividade migratória dos leucócitos

As câmaras foram preparadas em duplicata para cada amostra e incubadas a 37 °C durante 1 hora em atmosfera úmida. Os filtros foram a seguir removidos, fixados, corados e diafanizados e montados entre lâmina e lamínula. A leitura dos filtros foi realizada sob microscopia óptica, com objetiva de 40 vezes. Com o foco no plano superior do filtro, o plano de observação do microscópio foi aprofundado até a visualização de apenas duas células em foco. Esta distância, medida em micrômetros, permitiu avaliar a capacidade migratória dos neutrófilos (ZIGMOND e HIRSH, 1973). A leitura foi realizada em cinco campos de cada filtro e o resultado expresso como a

média \pm erro padrão da média (epm) e analisados estatisticamente pelo teste “t” de Student (SNEDECOR e COCHRAN, 1974).

II.2.3. Determinação de DL₅₀ do óleo volátil de *B. trimera*

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, com peso entre 18 e 22 g.

As doses de óleo volátil testadas via intraperitoneal foram de 0,5; 0,7; 0,9; 1,2 e 1,4 g/kg de animal. Estas doses foram obtidas a partir de uma solução de óleo volátil em salina e Tween 80. Para cada dose foi utilizado um grupo de 7 animais. Os grupos foram observados por 2 h após a administração. O efeito de toxicidade aguda foi inferido com base na mortalidade e o resultado expresso em DL₅₀, obtida através do método dos probitos (GADDUM, 1955).

II.2.4. Determinação da atividade antioxidante em extrato aquoso

Os extratos aquosos de *B. crispera*, *B. trimera* e *B. usterii*, bem como microfrações obtidas a partir de *B. usterii* foram analisados quanto à atividade antioxidante frente a difenilpicrilidrazila (DPPH).

Para a análise de cada extrato aquoso (obtido conforme item I.3.3), foram aplicados 15 μ l de solução a 10 mg/ml sobre cromatofolha. O extrato de *B. usterii* foi microfracionado, através da coleta de picos a 1 ml/min após injeção em CLAE/UV-DAD descrita no item I.3.3. Cada fração de 1 ml foi concentrada sob pressão reduzida, ressuspensa em 10 μ l de metanol, os quais foram aplicados sobre cromatofolha.

As cromatofolhas foram reveladas com solução metanólica de DPPH a 0,2%. A atividade antioxidante evidencia-se com a presença de manchas amarelas contra a coloração púrpura de fundo (CAVIN *et al.*, 1998).

II.3 Resultados e discussão

II.3.1. Atividade antimicrobiana

Foram analisados os óleos voláteis das espécies *B. articulata*, *B. crispa*, *B. microcephala*, *B. myriocephala*, *B. trimera*, *B. usterii* e uma fração obtida do óleo de *B. trimera* (F10), contendo 90% de acetato de carquejila e 10% de ledol. Os resultados são apresentados na Tabela II.1.

Tabela II.1. Atividade antimicrobiana dos óleos voláteis testados.

	Atividade antibacteriana	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	Atividade antifúngica	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>B. articulata</i>		+	+	+	+		+	+
<i>B. crispa</i>		+	+	-	-		+	+
<i>B. microcephala</i>		+	+	+	+		-	NT
<i>B. myriocephala</i>		+	-	-	-		NT	NT
<i>B. trimera</i>		+	+	+	+		+	+
<i>B. usterii</i>		+	+	-	-		-	+
F10		+	+	+	+		+	+

O resultado é caracterizado pela presença (+) ou ausência (-) de halo de inibição.

NT = não testado. Volume aplicado = 5 µl

O óleo volátil de *B. articulata* apresentou resultados positivos de atividades antibacteriana e antifúngica frente a todos os microorganismos testados. Esta atividade

pode estar relacionada a alta concentração de β -pineno (30,1%) no óleo. APEL (2001) demonstrou a atividade antifúngica do óleo volátil de *Siphoneugena reitzii* contendo 19,3% de beta-pineno e deste composto isolado.

Outra espécie a apresentar atividades antibacteriana e antifúngica de seu óleo contra todos os microorganismos foi *B. trimera*. No entanto, sua composição química é diferenciada, apresentando como principais constituintes acetato de carquejila (68,0%), ledol (5,9%) e β -pineno (5,6%). Para a fração F10 obtida deste óleo, contendo acetato de carquejila (90%) e ledol (10%) identificou-se resultado positivo frente aos mesmos microorganismos, indicando a contribuição destes compostos para a atividade do óleo de *B. trimera*.

O óleo volátil de *B. crispa* apresentou atividade antibacteriana contra *M. luteus* e *S. aureus*, bem como atividade antifúngica contra *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Os principais constituintes encontrados no óleo desta espécie foram epiglobulol (16,8%), α -selineno (15,5%) e espatulenol (13,8%). Constam na literatura relatos de atividade antimicrobiana de óleos voláteis contendo espatulenol entre seus principais constituintes como em *Melaleuca styphelioides* (FARAG *et al.*, 2004) e *Baccharis notoserigila* (COBOS *et al.*, 2001).

A espécie *B. microcephala* apresentou como principais constituintes de seu óleo volátil alfa-cadinol (13,5%), globulol (8,8%), espatulenol (8,6%) e γ -gurjuneno (8,3%). Este óleo apresentou atividade antibacteriana contra todas as bactérias testadas, porém não apresentou atividade antifúngica frente a *C. albicans* e não foi testado para *S. cerevisiae*.

O óleo volátil de *B. myriocephala* somente apresentou atividade antibacteriana contra *M. luteus* e não foi testado para atividade antifúngica. Seus principais constituintes foram epiglobulol (45,8%) e globulol (14,5%).

O óleo volátil de *B. usterii* apresentou atividades antibacteriana contra *M. luteus* e *S. aureus* e antifúngica frente a *S. cerevisiae*. Este resultado foi muito semelhante ao obtido para o óleo de *B. crispa*. Além da semelhança quanto à atividade, essas duas

espécies apresentaram espatulenol entre seus constituintes majoritários. O óleo de *B. usterii* caracterizou-se pela presença de espatulenol (37,9%), globulol (18,4%) e alfa-cadinol (10,1%).

II.3.2. Atividade antiinflamatória *in vitro*

Os efeitos sobre a migração de neutrófilos foram investigados para os óleos voláteis das espécies *B. articulata*, *B. crispa*, *B. myriocephala*, *B. trimera* e para a fração F10 obtida conforme descrito na seção II.2.1.

O óleo volátil das espécies *B. articulata*, *B. crispa*, *B. trimera* e F10 inibiram fracamente ($p < 0,05$) a migração de neutrófilos em relação ao controle. Os resultados de migração foram expressos em média \pm epm (μm) e são apresentados na Tabela II.2.

Tabela II.2. Migração de neutrófilos pelo método da câmara de Boyden.

Amostra	Média \pm epm (μm)
<i>B. articulata</i>	120,0 \pm 3,37*
<i>B. crispa</i>	115,4 \pm 3,16*
<i>B. myriocephala</i>	128,0 \pm 1,19
<i>B. trimera</i>	124,6 \pm 1,76*
F10	122,6 \pm 1,43*
Controle	133,0 \pm 1,44

* $p < 0,05$ (teste "t" de Student)

Um estudo de inibição da migração de neutrófilos conduzido para óleo volátil de *Siphoneugena reitzii* mostrou uma migração de $20,67 \pm 1,03 \mu\text{m}$, comparado à migração de $124,0 \pm 5,03 \mu\text{m}$ para o controle. Este óleo volátil apresentou também atividade antiedematogênica em doses acima de 50 mg/kg, via oral (APEL, 2001).

Pela análise dos dados da Tabela II.2, pode-se verificar que, apesar de significativas, as inibições de *B. articulata*, *B. crispa*, *B. trimera* e F10 (fração com 90%

de acetato de carquejila) não são tão consistentes quanto às da literatura, para o mesmo tipo de ensaio em óleos voláteis.

II.3.3. DL₅₀ do óleo volátil de *B. trimera*

Conforme mencionado no item II.1, espécie *B. trimera* foi estudada quanto a seus efeitos tóxicos, tanto em ensaios de toxicidade aguda quanto crônica. Estes relatos estão relacionados a seu extrato aquoso, que constitui a forma de uso popular, ou a alguns compostos isoladamente.

A fim de obter dados de toxicidade aguda de um extrato apolar da planta, a DL₅₀ do óleo volátil de *B. trimera* foi determinada em camundongos via intraperitoneal. Os resultados de mortalidade em relação às doses são apresentados na Tabela II.3 e o gráfico da reta obtida utilizando-se o método dos probitos consta na Figura II.2.

Tabela II.3. Valores obtidos na determinação da DL₅₀ do óleo volátil de *B. trimera*.

dose (g/kg)	log da dose	n	†	%†	Probitos
0,5	2,70	7	1	14,29	3,92
0,6	2,78	7	1	14,29	3,92
0,7	2,84	7	3	42,86	4,82
0,8	2,90	7	3	42,86	4,82
0,9	2,95	7	3	42,86	4,82
1,2	3,08	7	5	71,43	5,55
1,4	3,15	7	5	71,43	5,55

n = número de animais em cada grupo; † = número de mortos em cada grupo; %† = percentual de mortos em cada grupo

Utilizando a equação da reta apresentada na Figura II.2, a DL₅₀ do óleo volátil de *B. trimera* foi calculada em 0,915 g/kg, via intraperitoneal em camundongos. O óleo apresentou apenas 1,5% de carquejol, sendo constituído principalmente pelo seu acetato (68,0%). Ao comparar a DL₅₀ do óleo volátil de *B. trimera* com aquela obtida para o carquejol isolado (0,46 g/kg) (CAUJOLLE e MEYNIER 1959), e considerando a alta concentração de acetato de carquejila no óleo volátil, o carquejol parece ser mais efeitos tóxico na forma livre que na forma de acetato. No entanto, para que essa suposição pudesse ser comprovada, os dois compostos deveriam ser ensaiados sob as mesmas condições.

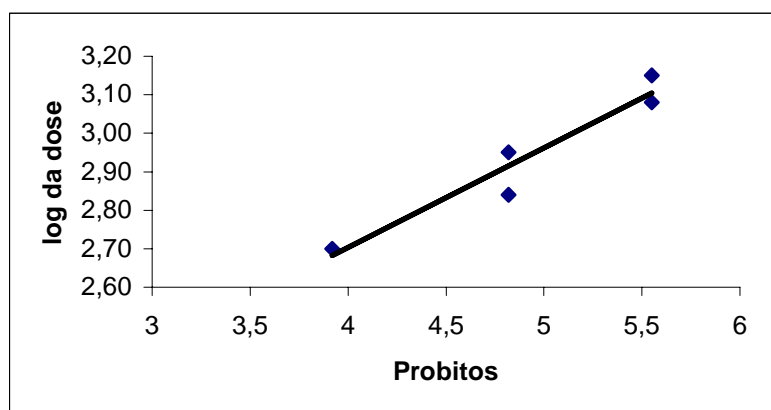


Figura II.2. Gráfico da reta obtido pelo método dos probitos na determinação de DL₅₀ do óleo volátil de *B. trimera*.

II.3.4. Atividade antioxidante

Os extratos aquosos de *B. crispa*, *B. trimera* e *B. usterii* apresentaram atividade antioxidante frente a DPPH quando 150 µg (15 µl de solução metanólica a 10 mg/ml) foram aplicados sobre a cromatofolha. A avaliação da atividade antioxidante das microfrações obtidas de *B. usterii* permitiu direcionar o isolamento dos compostos ativos deste extrato, descrito na seção I.3.3. A Figura II.3 apresenta os resultados de atividade antioxidante obtidos para cada microfração, correlacionando-as a seu respectivo tempo

de retenção no cromatograma do extrato aquoso de *B. usterii*. Os compostos isolados **A-F** (15 µg) foram testados separadamente e todos apresentaram atividade.

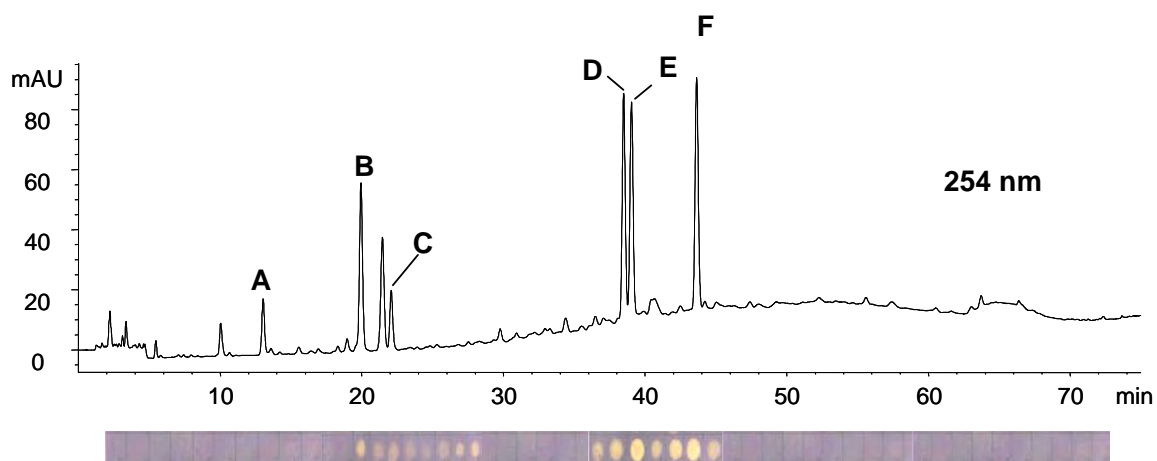


Figura II.3. Atividade antioxidante das microfrações de *B. usterii* em relação aos tempos de retenção de seu cromatograma.

Considerando que os compostos ativos **A-F** predominam nos extratos aquosos das três espécies, pode-se inferir que estes compostos exercem algum papel nas atividades já descritas para o extrato aquoso bruto de carqueja.

DISCUSSÃO GERAL

As espécies de carqueja (*Baccharis* Caulopterae) têm sido amplamente estudadas do ponto de vista químico e biológico. A grande quantidade de estudos envolvendo este grupo de plantas está relacionada a sua vasta utilização popular.

Conforme pode ser observado na revisão de literatura, nem todos os estudos referentes às espécies de Caulopterae têm sido criteriosos na classificação botânica. A ocorrência de erros de nomenclatura é bastante comum como, por exemplo, a designação *B. genistelloides* para plantas coletadas em regiões onde a espécie não ocorre.

O gênero *Baccharis* é bastante complexo e diferentes autores discordam tanto em relação aos caracteres que determinam seções dentro do gênero quanto aos caracteres que estabelecem limites entre algumas das espécies aladas. Todos os estudos de classificação infragenérica até então conduzidos, incluem somente as espécies de uma determinada região, o que torna qualquer divisão do gênero incompleta.

Devido a grande dificuldade no estabelecimento de limites entre as espécies de Caulopterae, alguns estudos de caráter quimiotaxonômico foram anteriormente desenvolvidos. Desta forma, a classe dos diterpenos foi amplamente estudada por diversos autores (HERZ *et al.*, 1977; ZDERO *et al.*, 1989; FULLAS *et al.*, 1991; 1992; 1994; TORRES *et al.*, 2000). Foram identificados diterpenos de núcleo clerodano e labdano, porém não foi possível utilizar estes compostos como marcadores de espécies ou de seções, pois não foi observado um padrão homogêneo na ocorrência dos mesmos (ZDERO *et al.*, 1989). Da mesma forma, a presença de flavonóides é comum entre as espécies já estudadas, porém sua distribuição não parece ser específica (SOICKE e LENG-PESCHLOW, 1987; GENÉ *et al.*, 1996; GIANELLO *et al.*, 2000).

Dentre as principais dificuldades de classificação, do ponto de vista morfo-anatômico, encontra-se a diferenciação entre *B. crispa* e *B. trimera*. Ambas constam na FARMACOPÉIA NACIONAL ARGENTINA (1978), onde não são apresentados critérios que possibilitem a diferenciação destas duas espécies. Na FARMACOPÉIA

BRASILEIRA (2003) são apresentados critérios morfo-anatômicos bem definidos para *B. trimera*, porém os dados não permitem diferenciá-la com segurança de *B. crispa*, ainda que esta não conste no referida Farmacopéia.

Neste sentido, o presente trabalho teve como um de seus objetivos comparar a composição química de carquejas, visando identificar um possível marcador. Para tanto, investigou-se a composição do óleo volátil de oito das espécies ocorrentes no estado do Rio Grande do Sul. O composto acetato de carquejila, encontrado apenas no óleo volátil de *B. trimera*, é sugerido como um marcador químico adequado para esta matéria-prima vegetal. A presença do marcador torna possível a diferenciação de *B. trimera* em relação às demais espécies, uma vez que amostras coletadas em diferente épocas e regiões sempre revelam a presença desta substância como componente majoritário no óleo volátil.

Por outro lado, a transformação da matéria-prima vegetal em diferentes tipos de extratos para utilização industrial poderia dificultar a manutenção de um marcador volátil nestes produtos. Por esse motivo, o perfil químico de extratos aquosos de *B. trimera* e *B. crispa*, além de *B. usterii* foram comparados por CLAE acoplada a técnicas de identificação "on-line". Foram isolados e identificados, a partir de *B. usterii*, seis ácidos cafeoilquínicos, os quais foram também identificados "on-line" nos extratos das outras duas espécies. O extrato aquoso de *B. trimera* diferenciou-se do extrato de *B. crispa* e *B. usterii*, pela presença de flavonóides, dentre os quais, destaca-se a nepetina. Este fato é importante, porém para sua validade são necessárias análises em maior número de amostras e em extratos processados, uma vez que as condições empregadas na obtenção dos mesmos poderiam alterar sua composição química.

Paralelamente às questões botânica, quimiotaxonômica e de controle de qualidade, existe a questão relacionada à segurança e à eficácia da utilização das carquejas para fins terapêuticos. Este fato tem levado a diversas investigações biológicas, especialmente em *B. trimera*, quanto a diferentes atividades, tais como antiviral (ABAD *et al.*, 1999), antiinflamatória (GENÉ *et al.*, 1992; 1996), antiúlcera (GAMBERINI e LAPA, 1992), antioxidante (MELO *et al.*, 2001), antihepatotóxica (SOICKE e LENG-PESCHLOW, 1987), analgésica (DI STASI, 1998; GENÉ *et al.*,

1996), moluscicida (DOS SANTOS FILHO *et al.*, 1980), cardiovasculares (TORRES *et al.*, 2000; GAMBERINI e LAPA, 1996), além de estudos de toxicidade em animais (RODRIGUES *et al.*, 1994; PEDRAZZI *et al.*, 1997).

Ao comparar os extratos aquosos de *B. trimera* e *B. crispa*, GENÉ e colaboradores (1992) verificaram que apenas *B. trimera* apresentou atividade antiinflamatória. Pela comparação dos extratos aquosos, realizada ao longo deste trabalho, a principal diferença observada entre estas duas espécies foi a presença de determinados flavonóides em *B. trimera*, uma vez que ambas apresentaram ácidos cafeoilquínicos majoritários em comum.

Embora existam relatos de atividade antiinflamatória *in vitro* para ácidos cafeoilquínicos (GONGORA, 2002), estes não parecem ser responsáveis por tal atividade *in vivo*, já que o extrato aquoso de *B. crispa* aqui estudado também apresenta grande quantidade destes compostos (Figura I.1.7).

Portanto, é mais provável que a atividade antiinflamatória relatada na literatura deva-se a presença dos flavonóides isoquercitrina (**G**), quercetina (**H**) e nepetina (**I**) detectados no extrato aquoso. Todos os três flavonóides apresentam o grupo catecol (Figura I.19), fato relacionado com a atividade antiinflamatória de flavonóides, conforme determinado previamente (PELZER *et al.*, 1998).

Em contrapartida, várias outras atividades já foram atribuídas anteriormente aos ácidos cafeoilquínicos, entre elas a atividade hepatoprotetora (BASNET *et al.*, 1996), antibacteriana (SHOLZ *et al.*, 1994), antiviral (MATSINGOU *et al.*, 2000) e citoproteção gástrica (OH *et al.*, 2001). Algumas destas atividades podem estar relacionadas a sua ação antioxidante, uma vez que compostos que atuam como "scavengers" exercem efeito protetor a diferentes danos biológicos (MATSINGOU *et al.*, 2000). No presente trabalho, mostrou-se que os extratos aquosos de *B. trimera*, *B. crispa* e *B. usterii* apresentaram atividade antioxidante frente a DPPH, relacionada à presença de ácidos cafeoilquínicos, os quais mostraram-se igualmente ativos.

O fato da atividade antioxidante estar relacionada a uma série de outras atividades, incluindo antiinflamatória (ALVAREZ-GUERRA *et al.*, 2003), anticancerígena (STONER e MUKHTAR, 1995) e hepatoprotetora (QLUSCHENG *et al.*, 2004), pode justificar a utilização popular e algumas das atividades pré-estabelecidas para extratos polares das espécies estudadas.

Assim sendo, os compostos antioxidantes estudados neste trabalho podem estar contribuindo de maneira parcial para a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *B. crispa* (PALACIOS,1983), para a atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *B. trimera* e para a atividade antimutagênica do extrato metanólico de *B. trimera* (NAKASUGI e KOMAI, 1998).

Apesar do extensivo uso popular das carquejas e das diversas atividades biológicas já constatadas, especialmente para *B. trimera*, a Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, através da Resolução SES/RJ N ° 1757 de 18 de fevereiro de 2002, contra-indica o uso da carqueja (mencionada como *Baccharis sp.*) e de outras plantas medicinais no âmbito do estado do Rio de Janeiro, levando em consideração seu potencial tóxico e abortivo de acordo com a literatura citada (TORRES *et al.*, 2000; ALONSO, 1998). Ao analisarmos esta literatura, podemos observar que TORRES e colaboradores (2000) estudaram um extrato purificado de *B. trimera* e identificaram a ação relaxante na musculatura lisa vascular em ratos, sem fazer alusão ao seu potencial tóxico ou abortivo. Por sua vez, ALLONSO (1998) cita o efeito abortivo da carqueja em ratos, sem mencionar doses e sem deixar claro a qual espécie foi atribuído este efeito. A espécie referida por ALLONSO (1998) como abortiva parece ser *B. articulata*, conforme relatos adicionais (GUPTA, 1995).

Por outro lado, diversos autores demonstraram a ausência de toxicidade de extratos de *B. trimera* em animais (SILVA *et al.*, 1992; PEDRAZZI *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 1994), tendo sido relatada apenas alguma toxicidade *in vitro* sobre *Artemia salina* e raízes de trigo (GONZALEZ *et al.*, 1993).

Considerando-se todas estas informações, pode-se dizer que não existem argumentos suficientes para a proibição da utilização da espécie farmacopéica de carqueja, *B. trimerá*, como planta medicinal.

Ainda assim, a legislação vigente em âmbito federal não facilita o registro de fitoterápicos a base de carqueja como medicamento tradicional (ANVISA, 2004a). Ou seja, para que um medicamento fitoterápico a base desta planta possa ser registrado, os critérios estabelecidos pela RDC 48 (ANVISA, 2004b) devem ser seguidos. De acordo com estes critérios, são necessários relatórios de produção, controle de qualidade da droga vegetal e do produto acabado, além de comprovação de segurança e indicação terapêutica.

Desta forma, este trabalho contribuiu para estabelecer parâmetros de controle de qualidade da droga vegetal da espécie farmacopéica, *B. trimerá*, sugerindo a utilização de acetato de carquejila como marcador presente no óleo volátil e no extrato hexânico da planta seca. Além disso, sugere investigações sistemáticas na espécie *B. trimerá* e *B. crispá* visando confirmar a presença do flavonóide nepetina exclusivamente na espécie oficial, como critério de controle de qualidade em diferentes tipos de extratos, a fim de contornar o problema de processos extrativos nos quais compostos voláteis possam estar ausentes. Finalmente, este trabalho aponta a necessidade de uma revisão taxonômica aprofundada na seção Caulopterae, com utilização de marcadores moleculares.

CONCLUSÕES

- As oito espécies de *Caulopterae* estudadas apresentaram óleo volátil, variando de 0,1%, para *Baccharis cf. milleflora*, a 0,9%, para *B. trimera* e *B. stenocephala*.
- Constatou-se a ocorrência de sesquiterpenos da via do germacrano para as espécies *B. myriocephala*, *B. milleflora*, *B. usterii* e *B. crispa*.
- As duas espécies bialadas estudadas, *B. articulata* e *B. stenocephala*, caracterizaram-se pelo acúmulo de monoterpenos, em especial β -pineno.
- A espécie *B. trimera* apresentou acetato de carquejila como constituinte majoritário em seu óleo volátil.
- O acompanhamento da composição química do óleo volátil de *B. trimera* e *B. crispa*, coletadas em diferentes locais e épocas, permitiu sugerir acetato de carquejila como um marcador da espécie *B. trimera*.
- Um método rápido e com a utilização de pequenas quantidades de material vegetal para a investigação de acetato de carquejila, a partir do extrato hexânico, foi determinado.
- Os extratos aquosos de *B. trimera*, *B. crispa* e *B. usterii* foram comparados quanto ao seu perfil cromatográfico, identificando-se seis ácidos cafeoilquínicos comuns aos três extratos.
- O extrato aquoso de *B. trimera* diferenciou-se de *B. crispa* e *B. usterii* pela presença de flavonóides, em especial, nepetina.
- Todos os óleos voláteis ensaiados pelo método de bioautografia, apresentaram atividade antimicrobiana. Os óleos voláteis de *B. trimera* e *B. articulata* foram ativos frente a todos os microorganismos testados.
- Os óleos voláteis de *B. articulata*, *B. crispa* e *B. trimera* apresentaram fraca atividade antiinflamatória *in vitro*.

- Os extratos aquosos de *B. trimera*, *B. crispa* e *B. usterii* apresentaram atividade antioxidante frente a DPPH, assim como os seis ácidos cafeoilquínicos isolados.
- A DL₅₀ de óleo volátil de *B. trimera* foi de 0,915 g/kg em camundongos via intraperitoneal.
- A seção Caulopterae do gênero *Baccharis* necessita a realização de um trabalho de revisão taxonômica, incluindo todas as suas espécies e não somente as de uma região isolada.
- A ausência de estudos clínicos de eficácia e segurança constituem o principal empecilho para a aprovação de registro de fitoterápicos a base de carqueja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.J.; BERMEJO, P.; GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; IRURZUN, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology*, v.32, n.4, p. 499-503, 1999.

ADAMS, R.P. *Identification of essential oils by ion trap mass spectrometry*. New York: Academic Press, 2001.

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

ALICE, C.B.; SIQUEIRA, N.C.S. MENTZ, L.A.; SILVA, G.A.A.B.; JOSÉ, K.F.D. *Plantas medicinais de uso popular: Atlas farmacognóstico*. Canoas: Editora Ulbra, 1995.

ALONSO, J.R. *Tratado de fitomedicina: bases clínicas e farmacológicas*. Buenos Aires: Isis, 1998.

ALVAREZ-GUERRA, M.; HANNAERT, P.; HILDER, H.; CHIAVAROLI, C.; GARAY, R.P. Vascular permeabilization by intravenous arachidonate in the rat peritoneal cavity: antagonism by antioxidants. *European Journal of Pharmacology*, v. 466, p. 199-205, 2003.

ANVISA. RDC 17, de 24 de fevereiro de 2000, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (<http://www.anvisa.gov.br>), 2000.

ANVISA. RE 89, de 16 de março de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (<http://www.anvisa.gov.br>), 2004a.

ANVISA. RDC 48 de 16 de março de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (<http://www.anvisa.gov.br>), 2004b.

APEL, M.A. *Óleos voláteis de espécies da subtribo Eugeninae (Myrataceae): composição química e atividades antimicrobiana e antiinflamatória*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

ARIZA ESPINAR, L. Las especies de *Baccharis* de Argentina Central. *Boletín de la academia nacional de ciencias*, v. 50, p. 175-305, 1973.

BAKER, J.G. Compositae. In: Martius, C.F. (ed.) *Flora Brasiliensis: enumeratio plantarum*. Weinheim: J. Cramer, 1882. v. 6, parte III.

BARROSO, G.M. Subtribo Baccharidinae Hoffman. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. *Separata da Revista "Rodriguésia"*, n. 40, 1976.

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

BASNET, P.; MATSUSHIGE, K. HASE, K.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury model. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 19, p. 1479-1484, 1996.

BAUER, L.; SILVA, G.; SIQUEIRA, N.; BACHA, C.; SANT'ANA, B. Os óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* e *Baccharis genistelloides* Pers. Do Rio Grande do Sul. *Revista do Centro de Ciências da Saúde*, v.6, p. 7-12, 1978.

BERTEA, C.; SCHALK, M.; MAU, C.J.D.; KARP, F.; WILDUNG, M.R.; CROTEAU, R. Molecular evaluation of a spearmint mutant altered in the expression of limonene hydroxylases that direct essential oil monoterpene biosynthesis. *Phytochemistry*, v. 64, p. 1203-1211, 2003.

BOLDT, P.E. *Baccharis (Asteraceae). A review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status, natural enemies and the potential for its biological control in the United States*. Temple: USDA, Agricultural Research Service, 1989.

BOYDEN, S. The chemotatic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, v. 15, p.453-466, 1962.

BREMER, K. *Asteraceae. Cladistics and classification*. Timber Press: Portland, 1984.

CALLEGARI, L. *Análise setorial: a indústria farmacêutica*. São Paulo: Gazeta Mercantil, 2001. v 1.

CAMARGO, M.T.A. *Medicina popular: aspectos metodológicos para pesquisa*. São Paulo: Almed, 1985.

CASTRO, H.G.; CASALI, V.W.D.; BARBOSA, L.C.A.; CECON, P.R. Rendimento de tanino em dois acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* D.C.), em diferentes épocas de colheita em Viçosa – MG. *Revista brasileira de plantas medicinais*, v. 1, p. 29-33, 1999.

CAUJOLLE, F.; MEYNIER, D. Effets pharmacodynamiques du carquéjol. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*, p. 585-587, 1959.

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

CIFUENTE, D.A.; BORKOWSKI, M.E.S.; GIANELLO, J.C.; GIORDANO, O.S.; TONN, C.E. Clerodane diterpenes from *Baccharis sagittalis*: insect antifeedant activity. *Phytochemistry*, v. 61, p. 899-905, 2002.

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

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. *Introdução a métodos cromatográficos*. 3 ed., Campinas: Editora da UNICAMP, 1988.

CORREA, M.P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: IBDF, 1985.

CROTEAU, R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. *Chemical Reviews*, v. 87, p. 929-954, 1987.

CROTEAU, R.; GERSHENZON, J. Genetic control of monoterpene biosynthesis in mints (*Mentha*: Lamiaceae). In: Ellis, B.E. (ed.). *Genetic engineering of plant secondary metabolism*. New York: Plenum Press, 1994.

CRUZ, E.; RASLAN, D.; SOUZA FILHO, J.; SANTOS, J. Evaluation of ethanolic extracts of *Baccharis genistelloides* against plagues of stored grains. In: *II Congresso Internacional de Plantas Aromáticas y Medicinales para el Bien de la Humanidad*. Mendoza, novembro, 1997.

CUATRECASAS, J. Revisión de las especies Colombianas del género *Baccharis*. *Revista de la academia Colombiana de ciencias exactas*, v. 13, p. 5-102, 1967.

CUATRECASAS, J. *Baccharis*. In: *Prima Flora Colombiana. Compositae-Astereae*. *Webbia*, v. 24: 233-299, 1969.

DAI, J.; SUTTISRI, R.; BORDAS, E.; SOEJARTO, D.D.; KINGHORN, D. Clerodane diterpenoids from *Baccharis articulata*. *Phytochemistry*, v. 34, p. 1087-1090, 1993.

DAILY, A.; WAGNER, H.; SELIGMANN, O. Hispidolin and stigmasta-7,22-dien-3-ol from *Baccharis genistelloides*. *Fitoterapia*, v. 55, n.4, p.236-238, 1984.

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

DE LAS HERAS, B.; SLOWING, K.; BENEDÍ, J.; CARRETERO, E.; ORTEGA, T.; TOLEDO, C.; BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M.J.; GÓMEZ-SERRANILLOS, P.; LISO, P.A.; VILLAR, A.; CHIRIBOGA, X. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, v.61, p. 161-166, 1998.

DE OLIVEIRA, S.Q.; DAL-PIZZOL, F.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; MOREIRA, J.C.F; SCHENKEL, E.P. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. *Free Radical Research*, v. 37, p. 555-559, 2003.

DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: the oldest modern science. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 11, p. 1-16, 1984.

DEWICK, P.M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. England: John Willy and Sons, 1997.

DI STASI, L.C.; COSTA, M.; MENDAÇOLLI, S.L.J.; KIRIZAWA, M.; GOMES, C.; TROLIN, G. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 24, p. 205-211, 1988.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA G.C.; CARVALHES, M.A. Medicinal plants popularly used in the Brazilian tropical atlantic forest. *Fitoterapia*, v. 73, p. 69-91, 2002.

DOS SANTOS FILHO, D.; SARTI, S.; VICHNEWSKI W. Moluscicidal activity on *Biomphalaria glabrata* of a diterpene lactone and a flavone isolated from *Baccharis trimera*. *Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto*, v. 17, p. 43-47, 1980.

FARAG, R.S.; SHALABY, A.S.; EL-BAROTY, G.A.; IBRAHIM, N.A.; ALL, M.A.; HASSAN, E.M. Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 30-35, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4^a ed. Parte II, Fascículo 2. In: Diário Oficial, Suplemento ao nº 1 de 10/01/2001, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4^a ed. Parte II, Fascículo 4. In: Diário Oficial, Suplemento ao nº 1 de 10/01/2001, 2003.

FARMACOPÉIA NACIONAL ARGENTINA, Codex medicamentarius Argentino, 6^a ed. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, 1978.

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

FULLAS, F.; SOEJARTO, D.D.; KINGHORN, D. A bitter-tasting trihomolabdane arabinoside from *Baccharis gaudichaudiana*. *Phytochemistry*, v. 31, p. 2543-2545, 1992.

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

GADDUM, J.H. *Farmacologia*. Barcelona: Editorial Reverte, 1955.

GAMBERINI, M.T.; LAPA, J.A. Ações antiúlcera e antiácida do extrato aquoso e das frações de *Baccharis trimera* Mart. In: *XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Curitiba, 15-17 de setembro, 1992.

GAMBERINI, M.T.; LAPA, J.A. Estudio da atividade hipotensora do extrato bruto aquoso e das frações semi-purificadas de *Baccharis trimera* Mart. In: *XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. 1996.

GENÉ, R.M.; MARIN, E.; ADZET, T. Antiinflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. *Planta Medica*, v. 58, p. 565-566, 1992.

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

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

GIULIANO, D.A. Subtribu Baccharinae: *Baccharis*. In: Hunziker A.T. (ed.), *Flora fanerogámica Argentina*. Fascículo 66. Cordoba: Pro Flora (Conicet), 2000.

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

GONZÁLEZ, A.; FERREIRA, F.; VÁZQUEZ, A.; MOYNA, P.; ALONSO PAZ, E. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 39, p. 217-220, 1993.

GONGORA, L.; GINER, R.M.; MAÑEZ, S.; RECIO, M.C.; SCHINELLA, G.; RIOS, J.L. Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl-hidroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function. *Life Sciences*, v. 71, p. 2995-3004, 2002.

GUPTA, M.P. *270 Plantas medicinales iberoamericanas*. Bogotá: CYTED/SECAB, 1995.

HAMBURGER, A.O.; CORDELL G.A. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*, v. 50, p. 19-22, 1987.

HARBORNE, J.B.; TURNER, B.L. *Plant chemosystematics*. London: Academic Press, 1984.

HEERING, W.C. Compuestas: *Baccharis*. In: Reiche K.F. (ed.). Estudios criticos sobre la flora de Chile. Anales de la Universidad de Chile, v. 111, p. 153-183, 1902.

HEERING, W.C. Die *Baccharis*-Arten des Hamburger Herbars. *Jahrb. Hamburg. Wiss. Anst. Beih.*, v. 21, p. 1-46, 1904.

HERZ, W.; PILLOTI, A.M.; SODERHOLM, A.C.; SHUHAMA, I.K.; VICHNEWSKI, W. 1977; New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. *Journal of Organic Chemistry*, v. 42, p. 3913-3917, 1977.

HNATYSZYN, O.; MOSCATELLI, V.; GARCIA, J.; RONDINA, R.; COSTA, M.; ARRANZ, C.; BALASZCZUK, A.; FERRARO, G.; COUSSIO, J.D. Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the corpus cavernosum of guinea pig. *Phytomedicine*, v. 10, p. 669-674, 2003.

HOSTETTMANN, K.; DOMON, B.; SCHAUFELBERGER, D.; HOSTETTMANN, M. On-line high performance liquid chromatography. Ultra-violet-visible spectroscopy of phenolic compounds in plant extracts using post-column derivatization. *Journal of Chromatography*, v. 283, p. 137-147, 1984.

IRGANG, B.E.; GASTAL, C.V.S. *Macrófitas aquáticas da planície costeira do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: CPG-Botânica/UFRGS.

LESSING, C.F. Synanthereae: *Molina-Alatae*. *Linnaea*, v. 6, p. 140-147, 1831.

MALAGARRIGA HERAS, R.P. Nomenclator Baccharidinarum Omnium. *Memórias da Sociedade de Ciências Naturais La Salle*, v. 37, p. 129-224, 1976.

MARKHAM, K.R. *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press, 1982.

MATSINGOU, T.C.; KAPSOKEFALOU, M.; SALIFOGLU, A. In vitro antioxidant activity of black tea and Mediterranean herb infusions toward iron under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Sciences*, v. 65, p. 1060-1065, 2000.

MELLO, S.B.V.; FARSKY, S.H.P.; SANNOMIYA, P.; GARCIA-LEME, J. Inhibition of neutrophil chemotaxis and chemokinesis associated with plasma protein in aging rats: selective depression of cell responses mediated by complement-derived chemoattractants. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 51, p. 46-52, 1992.

MELO, S.F.; SOARES, S.F.; COSTA, R.F.; SILVA, C.; OLIVEIRA, N.B.M.; BEZERRA, R.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A.; BERNARDO-FILHO, M. Effect of the *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. *Mutation Research*, v. 496, p. 33-38, 2001.

MOREIRA, F.D.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G.; DELLE MONACHE, F. Flavonoids and triterpenes from *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioactivity on *Artemia salina*. *Química Nova*, v. 26, p. 309-311, 2003.

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

NAVES, Y.R. Études sur les matières végétales volatiles CLIX (I). Sur l'huile essentielle de carquéja de l'État de Santa Catarina (Brésil). *Bulletin de la Société de Chimie de France*, p. 1871, 1959.

NESOM, G.L. *Baccharis* sect. *Baccharidastrium* (Compositae: Astereae), including two monoecious and one dioecious species. *Phytologia*, v. 65, p. 169-173, 1988.

NESOM, G.L. Infrageneric taxonomy of North and Central American *Baccharis* (Asteraceae: Astereae). *Phytologia*, v. 68, p. 40-46, 1990.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural Products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

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

OH, T.; LEE, J.; AHN, B.; CHO, H.; KIM, W.; SUHR, Y.; CHO, S.; HAHM, K. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment. *Free Radical and Biological Medicine*, v. 30, p. 905-915, 2001.

OMS – ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. *Quality control methods for medicinal plant materials*. Geneva, 1992. (Série de Informes Técnicos)

PALACIOS, P.; GUTKIND, G.; RONDINA, R.V.; DE TORRES, R.; COUSSIO, J.D. Genus *Baccharis*. II. Antimicrobial activity of *B. crispa* e *B. notoserjila*. *Planta Medica*, v. 49, p. 128, 1983.

PAULI, G.F.; POETSCH, F.; NAHSTEDT, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochemical Analyses*, v. 7, p. 177-185, 1998.

PEDRAZZI, A.H.P.; RODRIGUES, E.R.; ZANARDO-FILHO, A.; FRANCO, J.J. Hematological evaluation of "Carqueja" (*Baccharis trimera*) infusion. *Fitoterapia*, v. 68, p. 26-28, 1997.

PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; OSVALDO JUAREZ, A.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco*, v. 53, p. 421-424, 1998.

PERSOON, C.H. Syngenesia superflua: *Baccharis*. *Synopsis plantarum*, v. 2, p. 423-425, 1807.

QLUSHENG, Z.; XILING, S.; XUBO MENG, S. CHANGHAI, W. Protective effects of luteolin-7-glucoside against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. *Die Pharmazie*, v. 59, p. 286-289, 2004.

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

RAHALISON, L. *et al.* A bioautographic agar overlay method for the detection of fungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis*, v. 2, p. 199-203. 1991.

RODRIGUES, Toxicologia pré-clínica de *Baccharis triptera*. In: *XIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Fortaleza, 20-23 de setembro, 1994.

ROUSSIS, V.; TSOUKATOU, M.; PETRAKIS, P.V.; CHINOU, I.; SKOULA, M.; HARBORNE, J.B. Volatile constituents of four *Helichrysum* species growing in Greece. *Biochemical Systematics and Evolution*, v. 28, p. 163-175, 2000.

SANDRA, P.; BICCHI, C. *Capillary gas chromatography in essential oil analysis*. New York: Huething, 1987.

SHOLZ, E.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D. Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*. *Planta Medica*, v. 60, p. 360-364, 1994.

SILVA, R.D.S. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Nacional, 1926.

SILVA, C.O.; SILVA, G.M.M.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; SOUCAR, C.; LAPA, A.J. Efeitos do tratamento crônico do extrato de *Baccharis trimera* Mart. na fertilidade e na capacidade reprodutora de ratas. In: *XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Curitiba, 15-17 de setembro, 1992.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1986.

SNEDECOR, G.W.; COCHRAN, W.G. *Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology*. Ames: The Iowa State University Press, 1974.

SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Medica*, v.1, p. 37-39, 1987.

STAPEL, G.; MENBEN, H.G.; SNATZKE, G. Isolation and structure elucidation of two diterpenes from *Baccharis articulata*. *Planta Medica*, v. 39, p. 366, 1980.

STONER, G.D.; MUKHTAR, H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *Journal of Cell Biochemistry Supplement*, v. 22, p. 169-180, 1995.

SUTTISRI, R.; KGHORN, A.D.; WRIGHT, A.; STICHER, O. Neo-clerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. *Phytochemistry*, v.3, p.443-446, 1994.

TORRES, L.M.; GAMBERINI, M.T.; ROQUE, N.F.; LIMA-LANDMAN, M.T.; SOUCCAR, C.; LAPA, A.J. Diterpene from *Baccharis trimera* with relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*, v. 55, p. 517-519, 2000.

TOURSARKISSIAN, M. *Plantas medicinales de la Argentina*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1980.

WOLFENDER, J.L.; HOSTETTMANN, K. Liquid chromatographic-UV detection and liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric analysis of *Chironia* (Gentianaceae) species: a rapid method for the screening of polyphenols in crude extracts. *Journal of Chromatography A*, v. 647, p. 191-202, 1993.

ZANON, S.M.; CERIATTI, F.S.; ROVERA, M.; SABINI, L.J., RAMOS, B.A. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Cordoba, Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, v. 41, p. 59-62, 1999.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; SOLOM, J.C.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Ent-clerodanes and other constituents from Bolivian *Baccharis* species. *Phytochemistry*, v. 28, p.531-542, 1989.

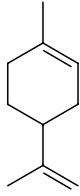
ZIGMOND, S.H.; HIRSCH, J.G. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotatic factor. *Journal of Experimental Medicine*, v.137, p.387-410, 1973.

ZUNINO, M.P.; NOVILLO-NEWTON, M.; MAESTRI, D.M.; ZYGADLO, J.A. Composition of the essential oil of *Baccharis crispa* Spreng. e *Baccharis salicifolia* Pers. grown in Cordoba (Argentina). *Flavour and Fragrance Journal*, v. 12, p. 405-407, 1997.

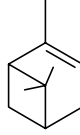
ZUNINO, M.P.; NEWTON, M.N.; MAESTRI, D.M.; ZYGADLO, J.A. Essential oils of three *Baccharis* species. *Planta Medica*, v. 64, 1998.

ANEXOS

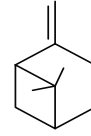
MONOTERPENOS HIDROCARBONADOS



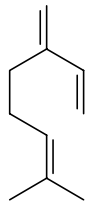
limoneno



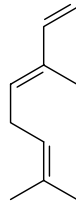
α -pineno



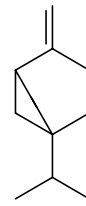
β -pineno



mirceno

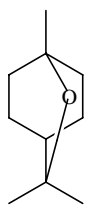


(E)- β -ocimeno

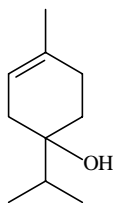


sabineno

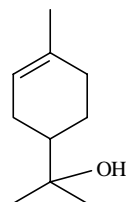
MONOTERPENOS OXIGENADOS



1,8-cineol

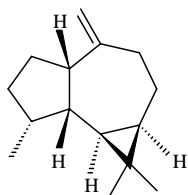


terpinen-4-ol

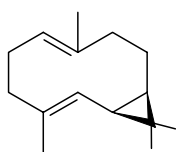


α -terpineol

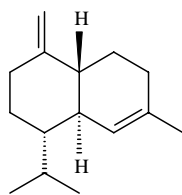
SESQUITERPENOS HIDROCARBONADOS



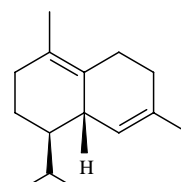
alo-aromadendreno



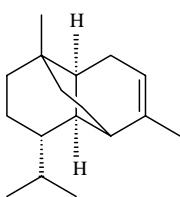
biciclogermacreno



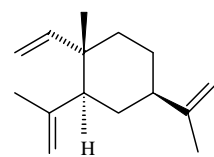
γ -cadineno



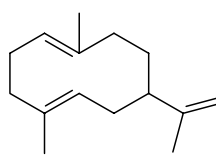
δ -cadineno



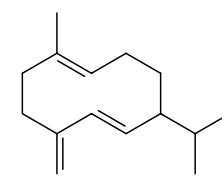
α -copaeno



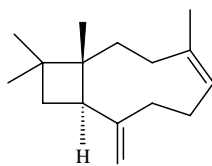
β -elemeno



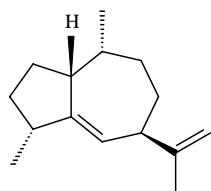
germacreno A



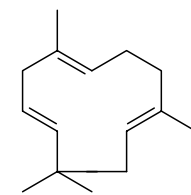
germecreno D



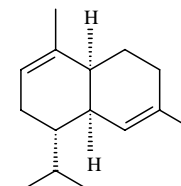
β -cariofileno



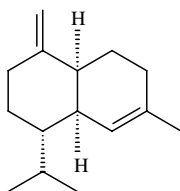
γ -gurjuneno



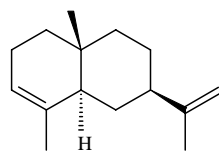
α -humuleno



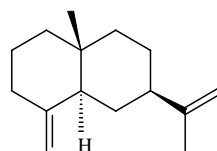
α -muuroleno



γ -muuroleno

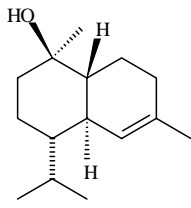


α -selineno

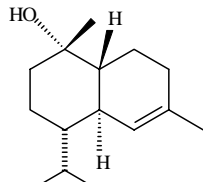


β -selineno

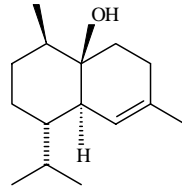
SESQUITERPENOS OXIGENADOS



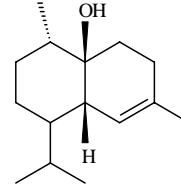
α -cadinol



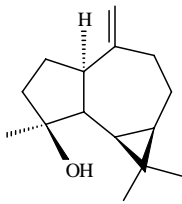
τ -cadinol



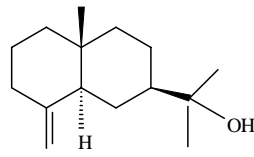
cubenol



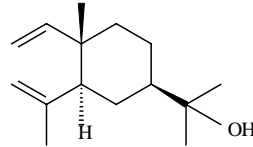
1-epi-cubenol



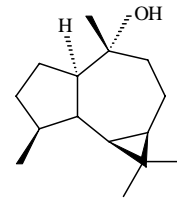
espatulenol



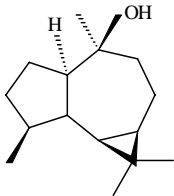
β -eudesmol



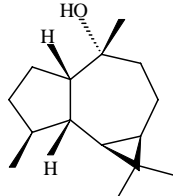
elemol



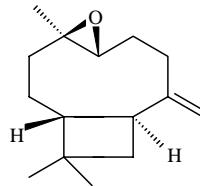
globulol



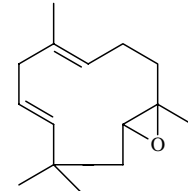
epi-globulol



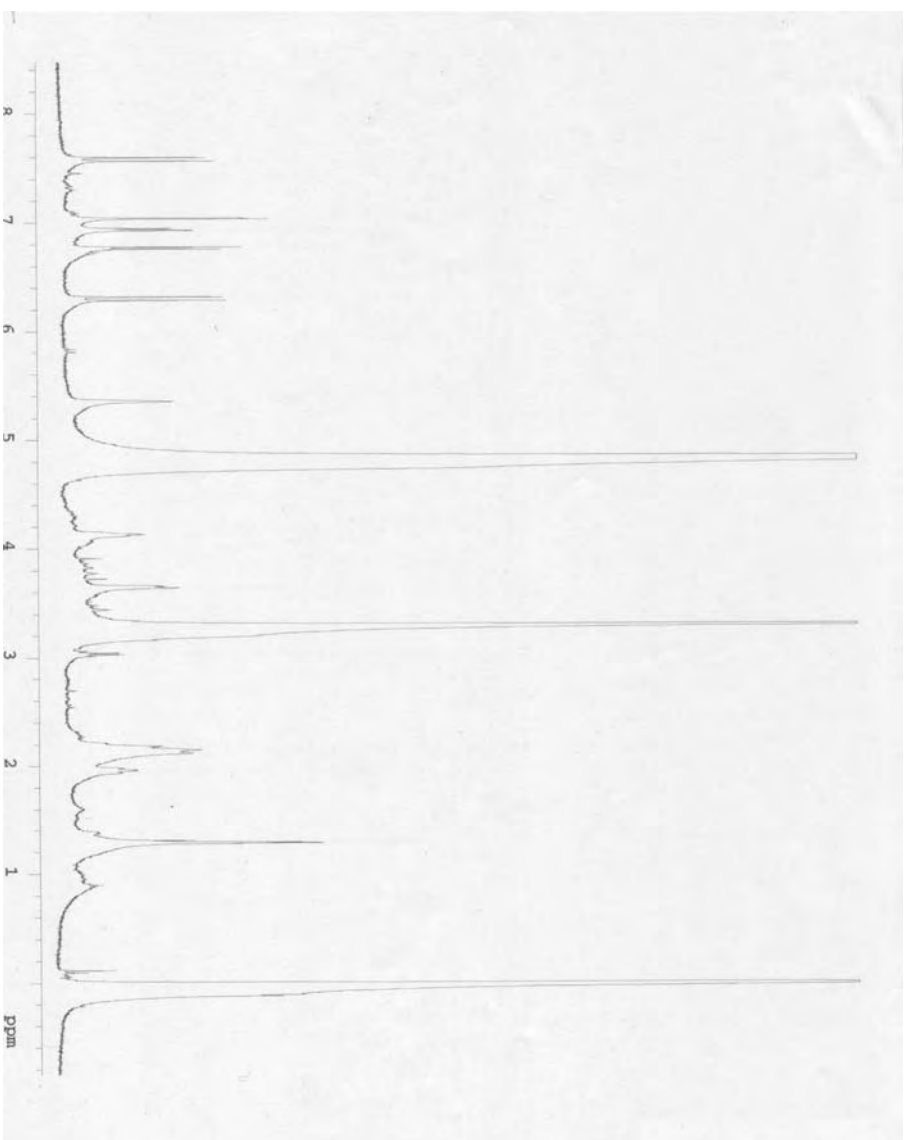
ledol



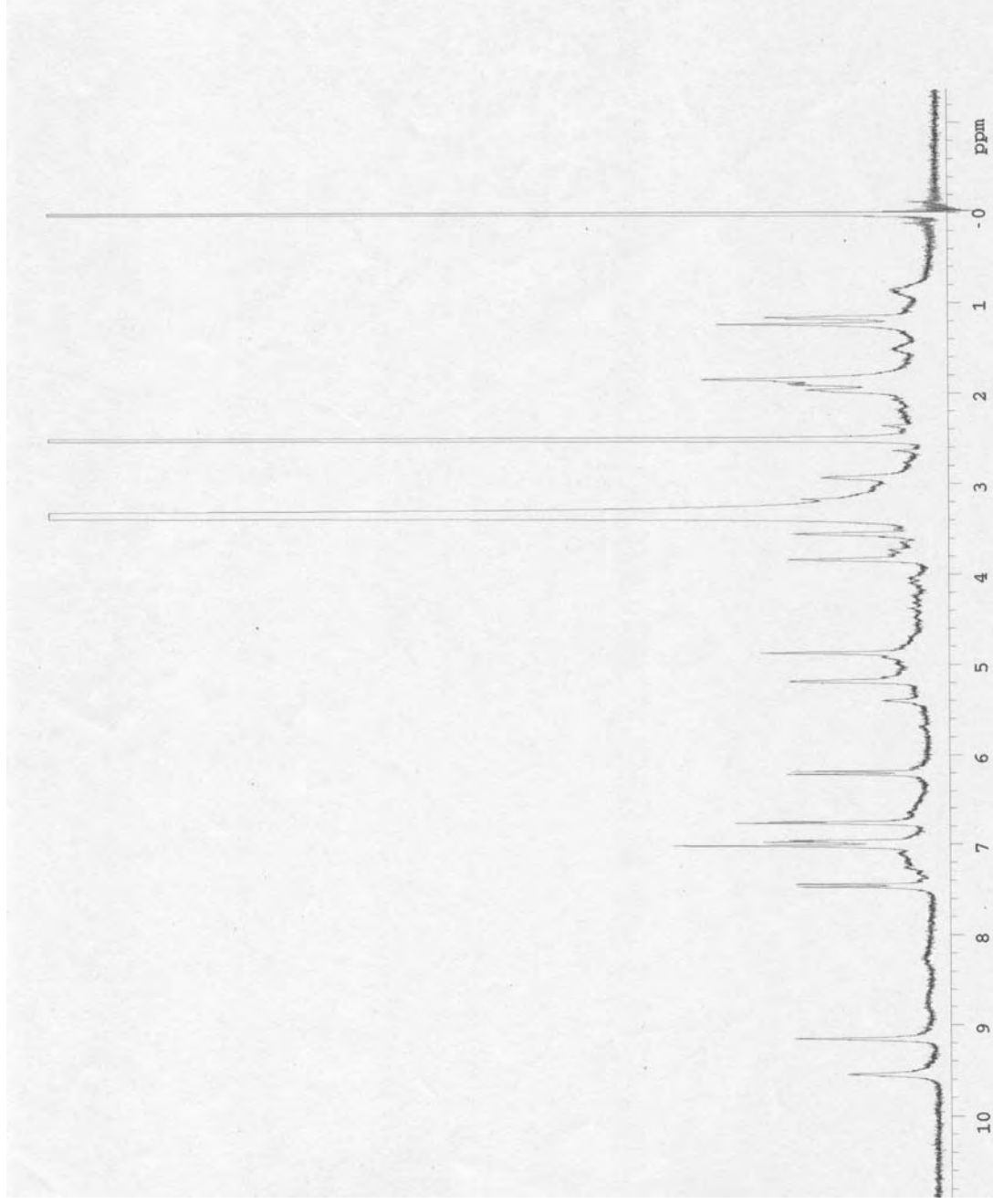
óxido de cariofileno



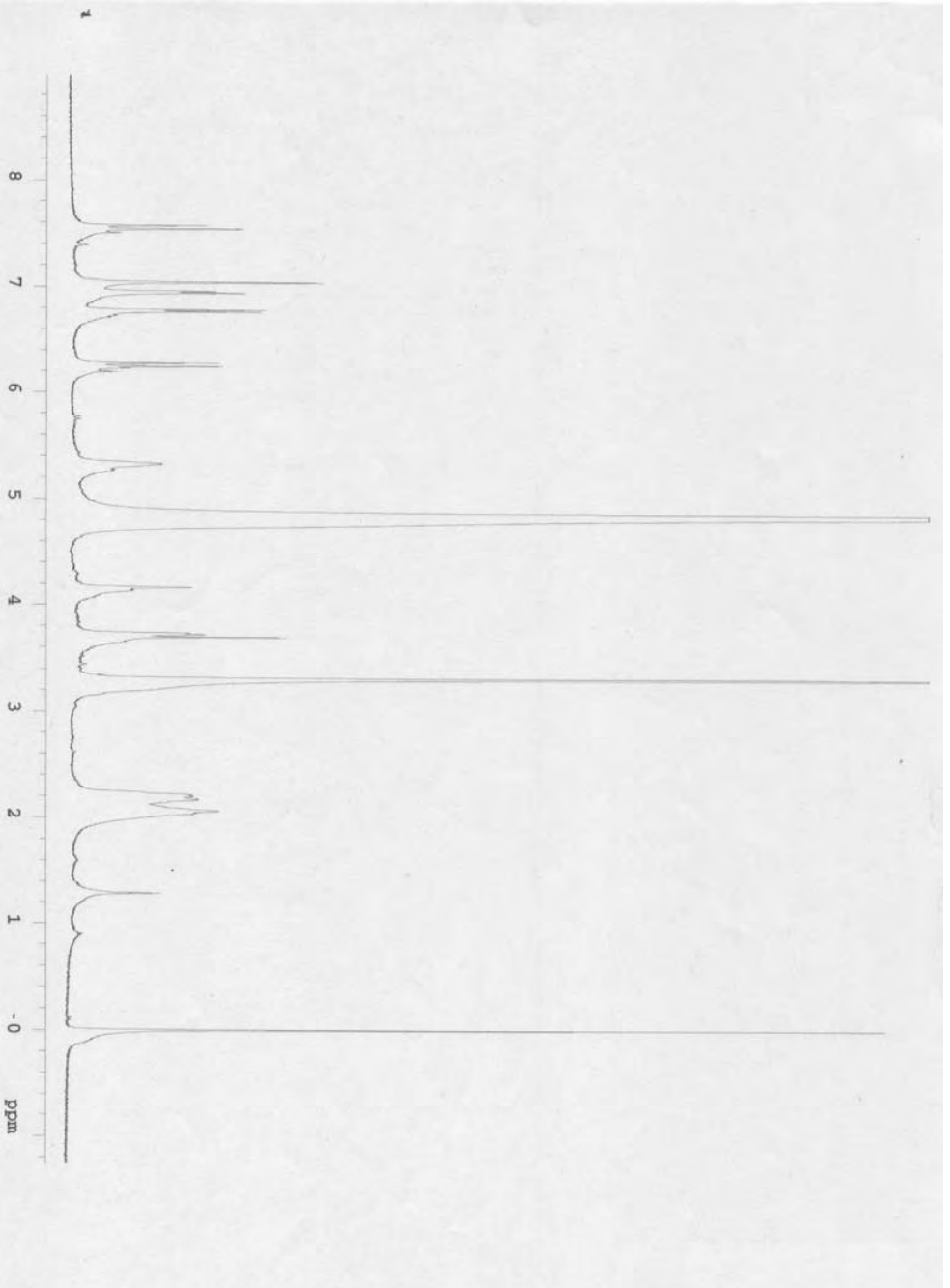
óxido de humuleno I



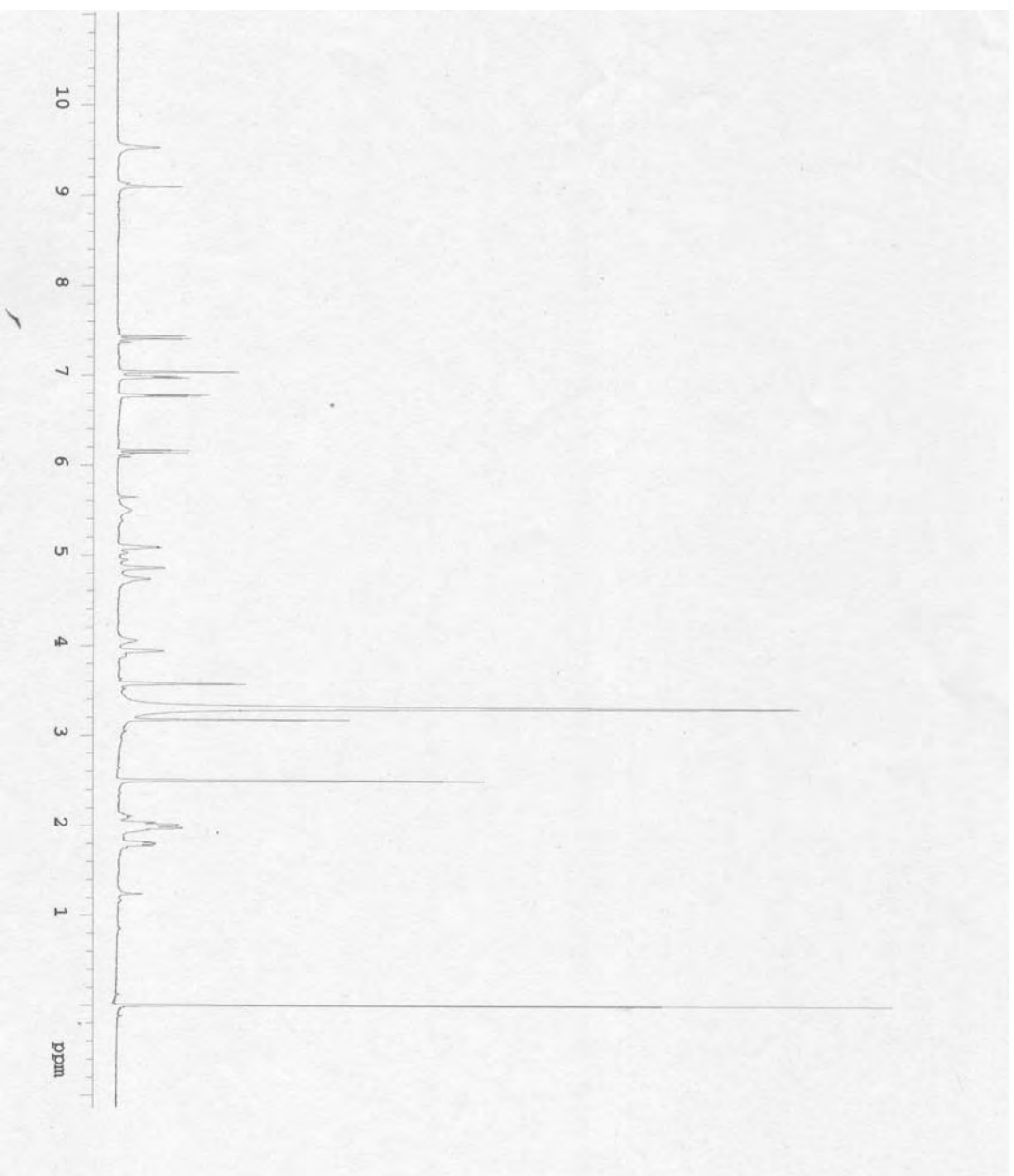
Espectro de ^1H RMN do composto **A** em CD_3OD , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



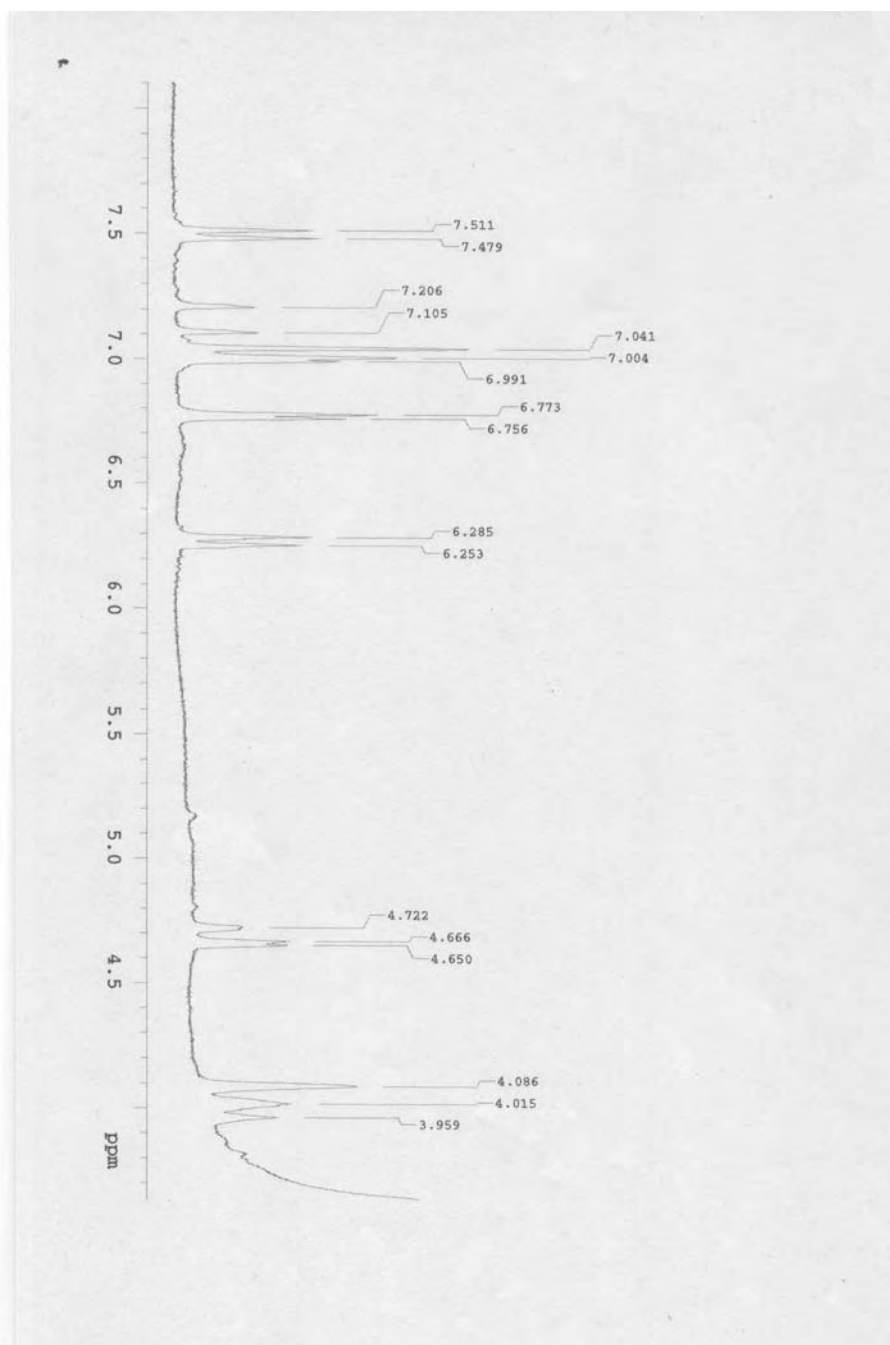
Espectro de ^1H RMN do composto **A** em DMSO-d_6 , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



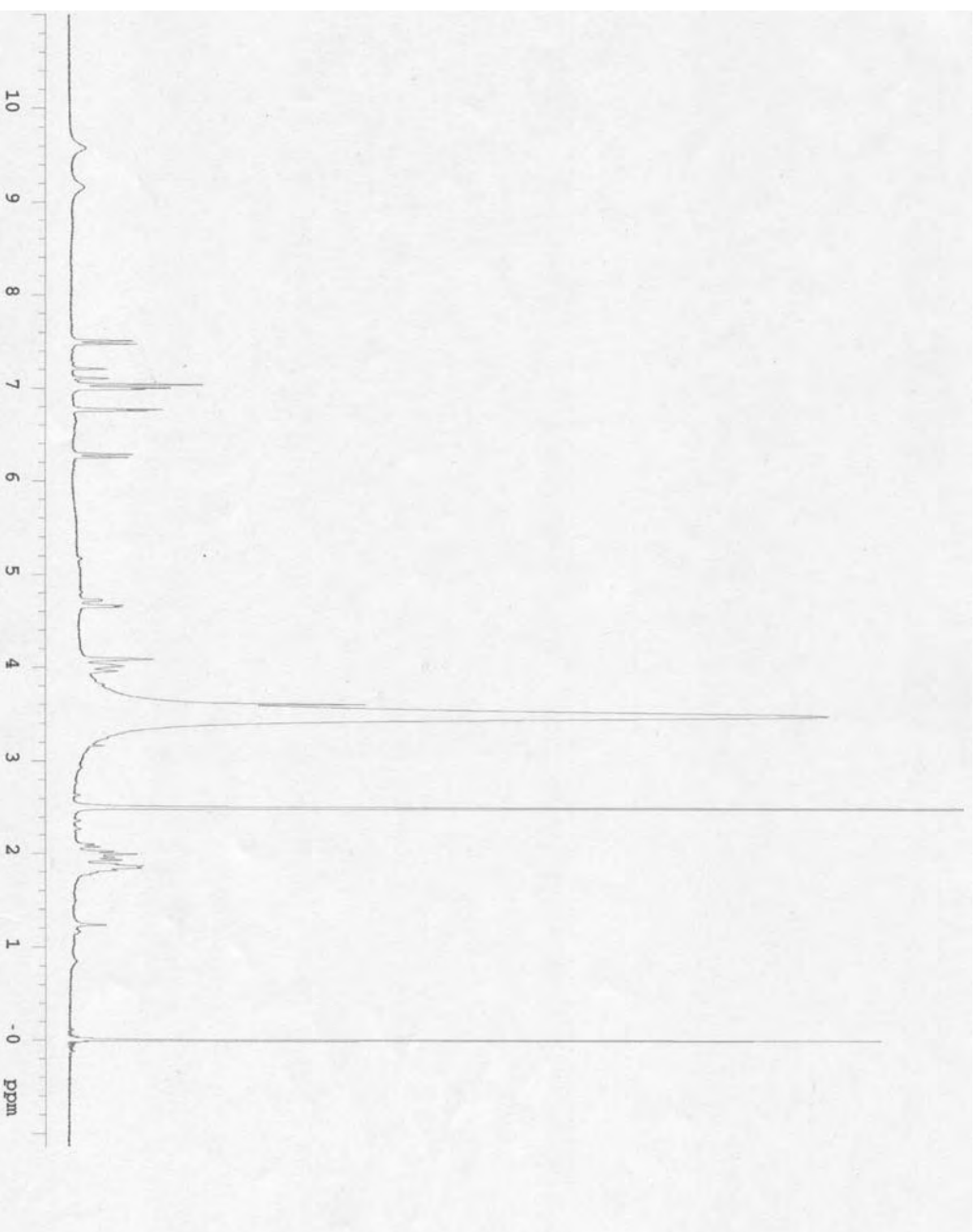
Espectro de ^1H RMN do composto **B** em CD_3OD , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



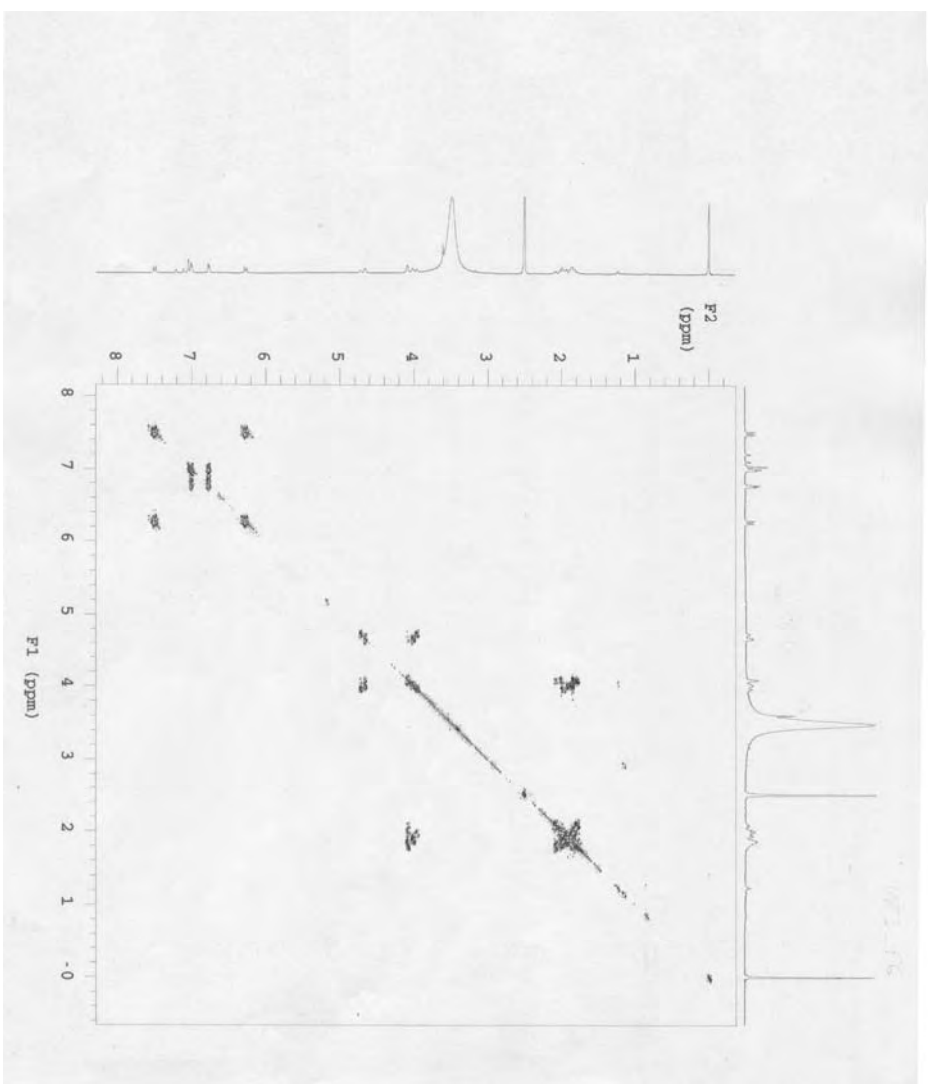
Espectro de ^1H RMN do composto **B** em DMSO-d_6 , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



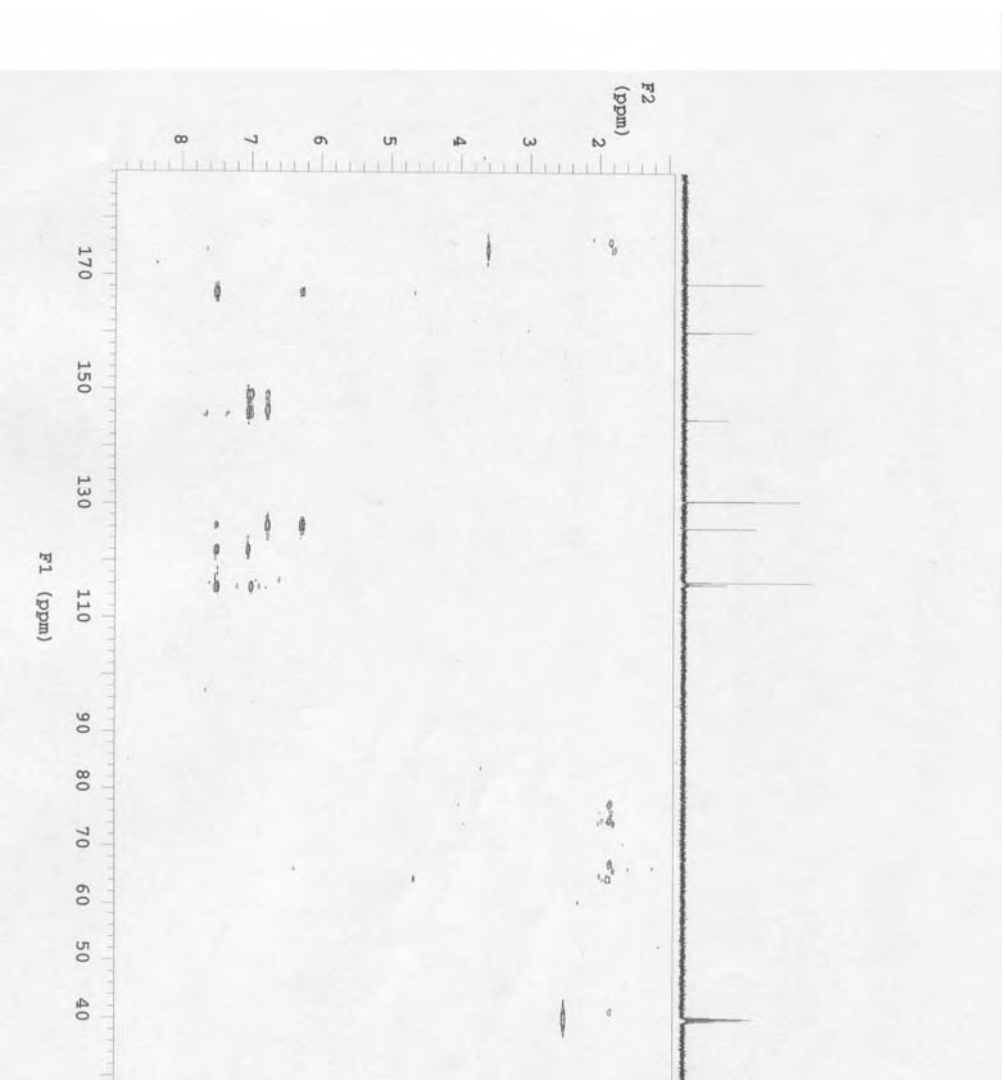
Espectro de ^1H RMN do composto **C** em CD_3OD , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



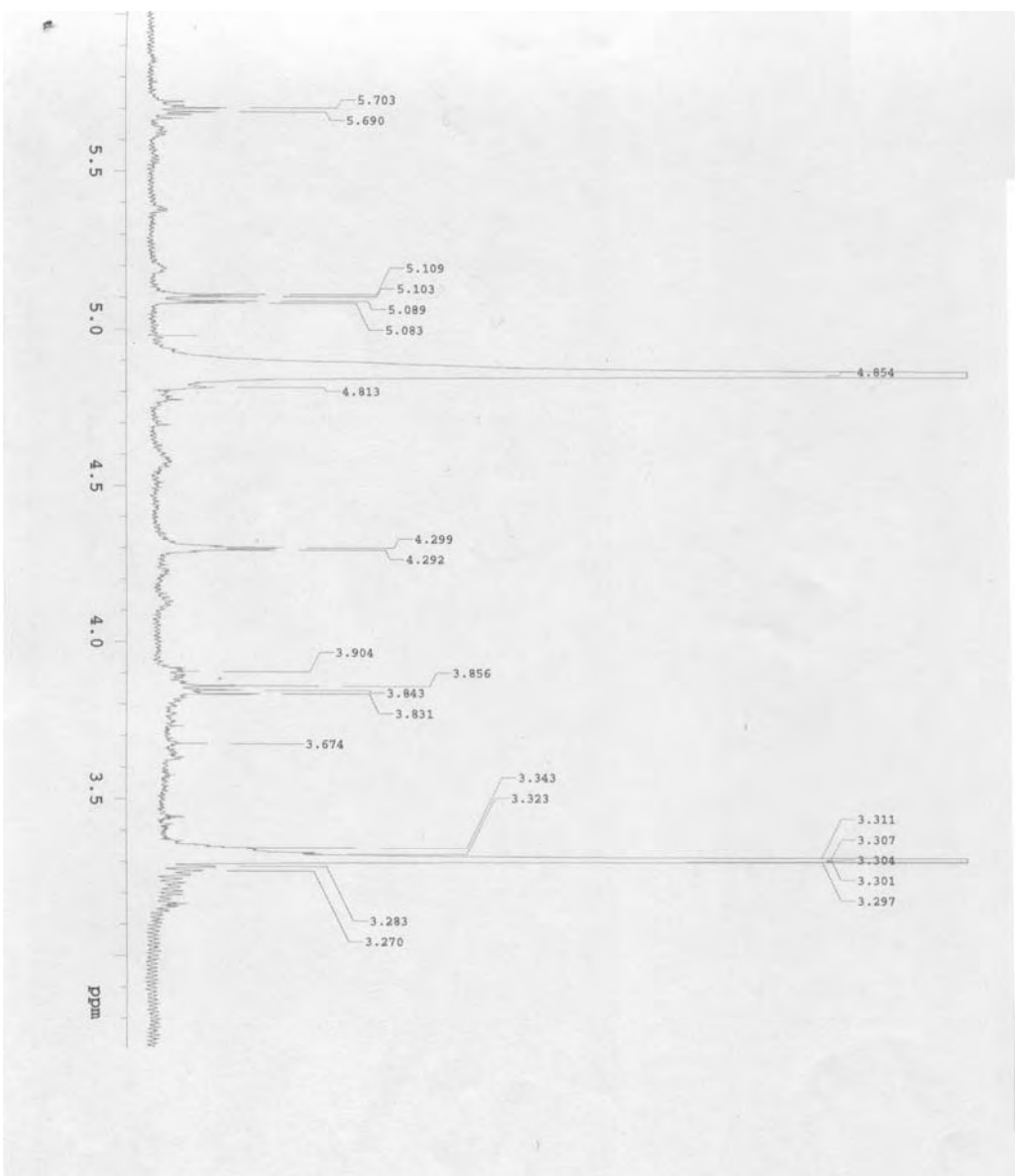
Espectro de ^1H RMN do composto **C** em DMSO-d_6 , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



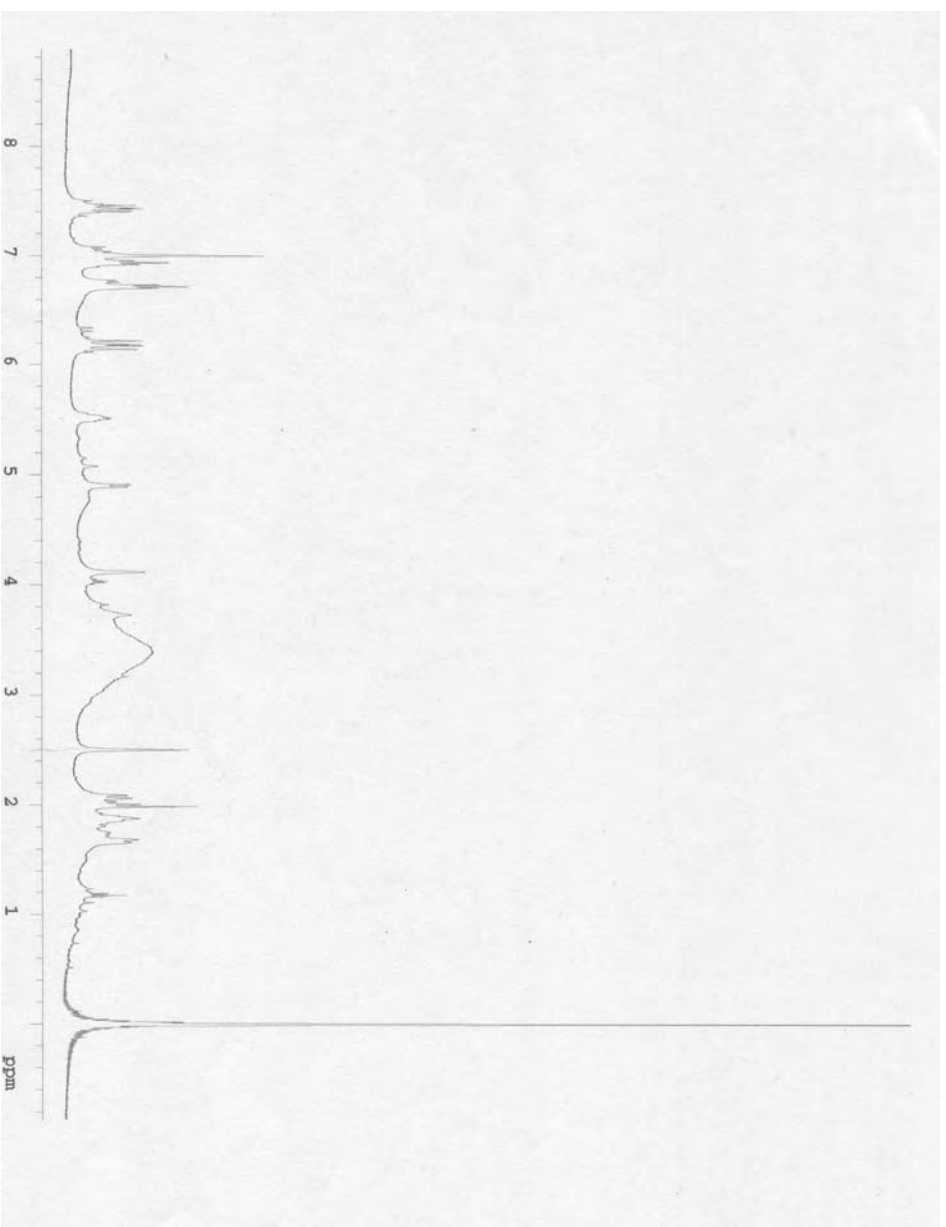
Análise COSY do composto **C** em DMSO-d₆, 500 MHz, δ relativo a Me₄Si.



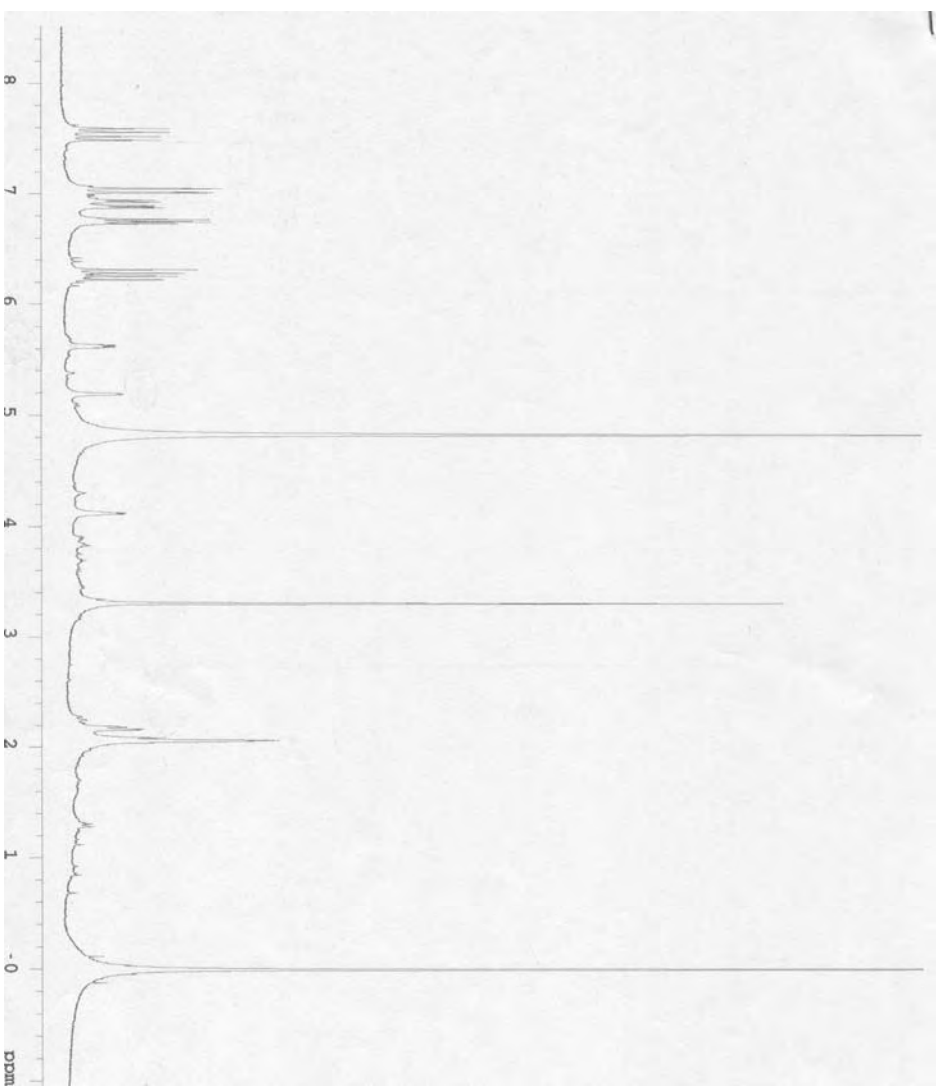
Análise HMBC do composto **C** em DMSO-d_6 , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



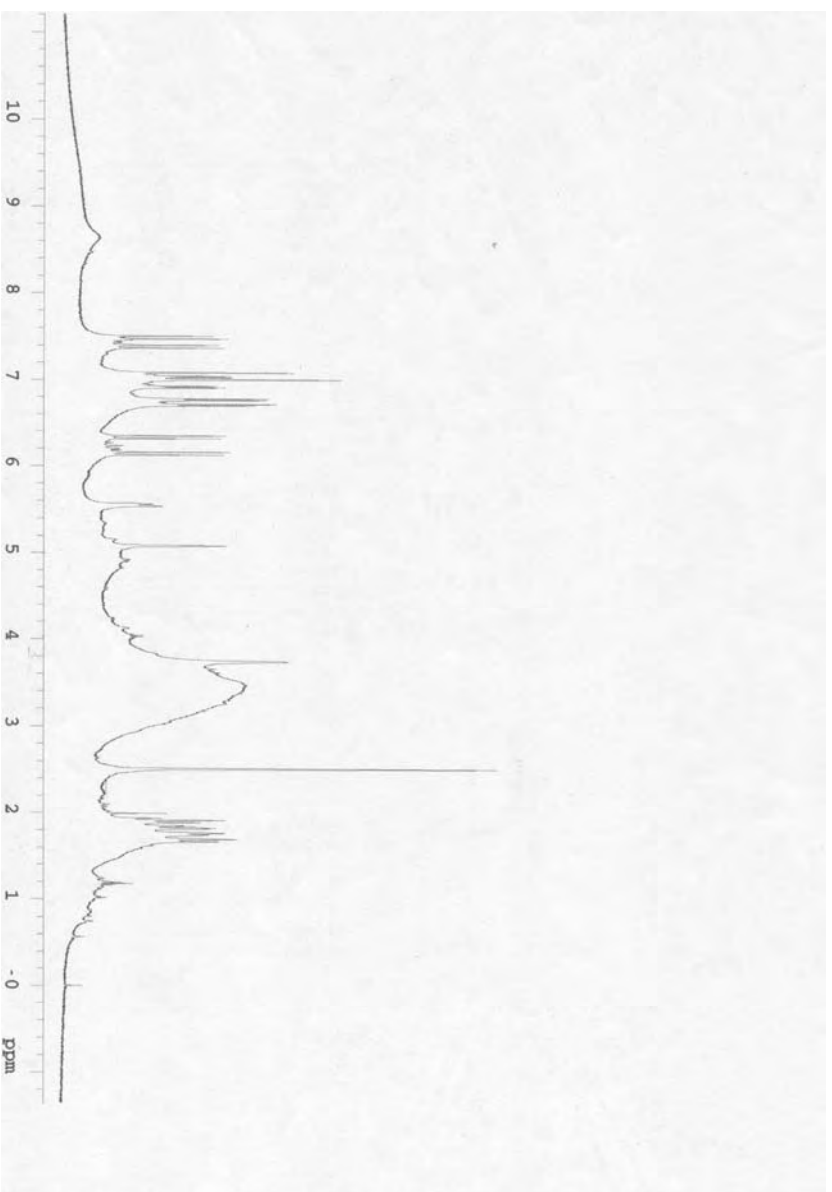
Espectro de ^1H RMN do composto **D** em CD_3OD , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



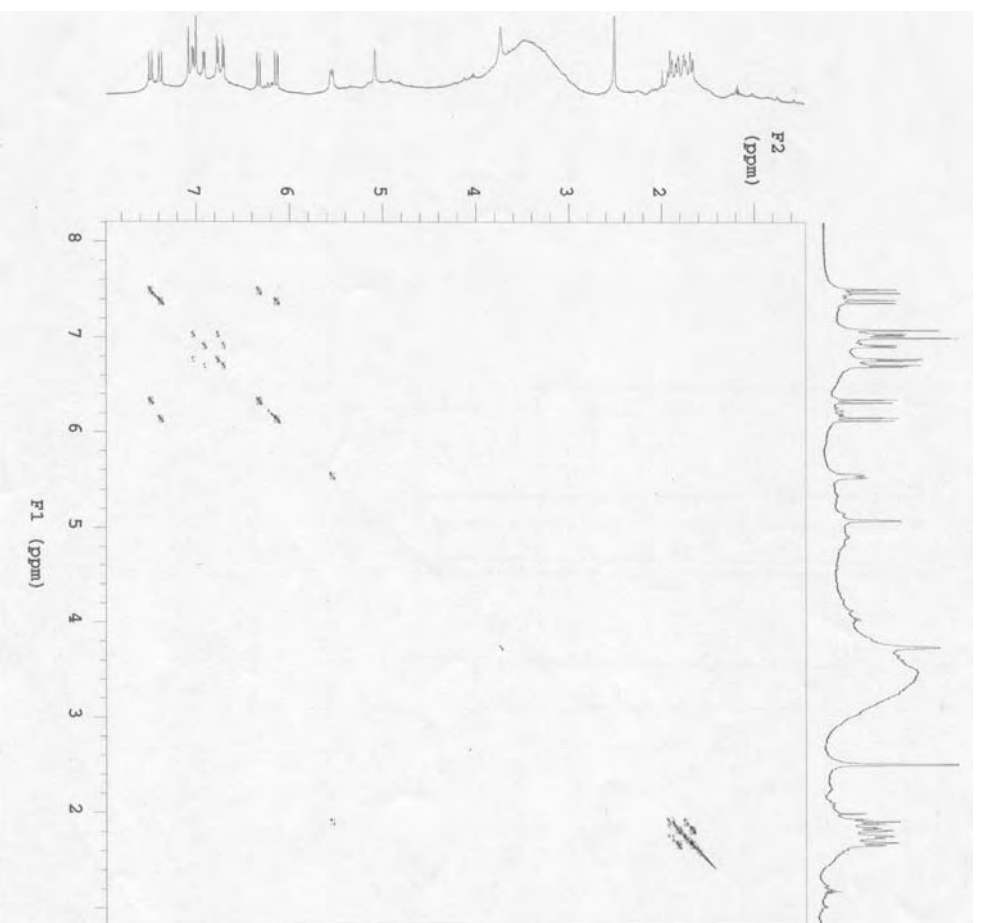
Espectro de ^1H RMN do composto **D** em DMSO-d_6 , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



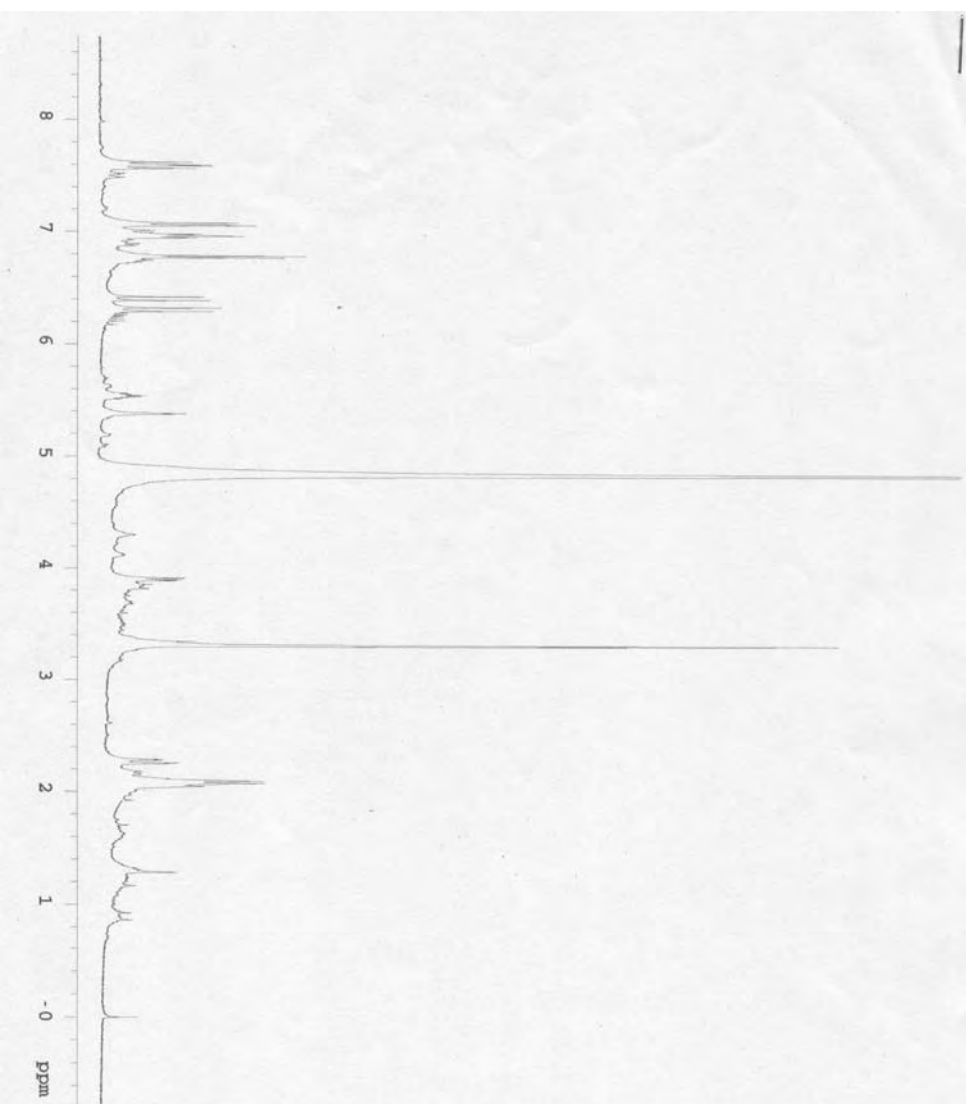
Espectro de ^1H RMN do composto **E** em CD_3OD , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



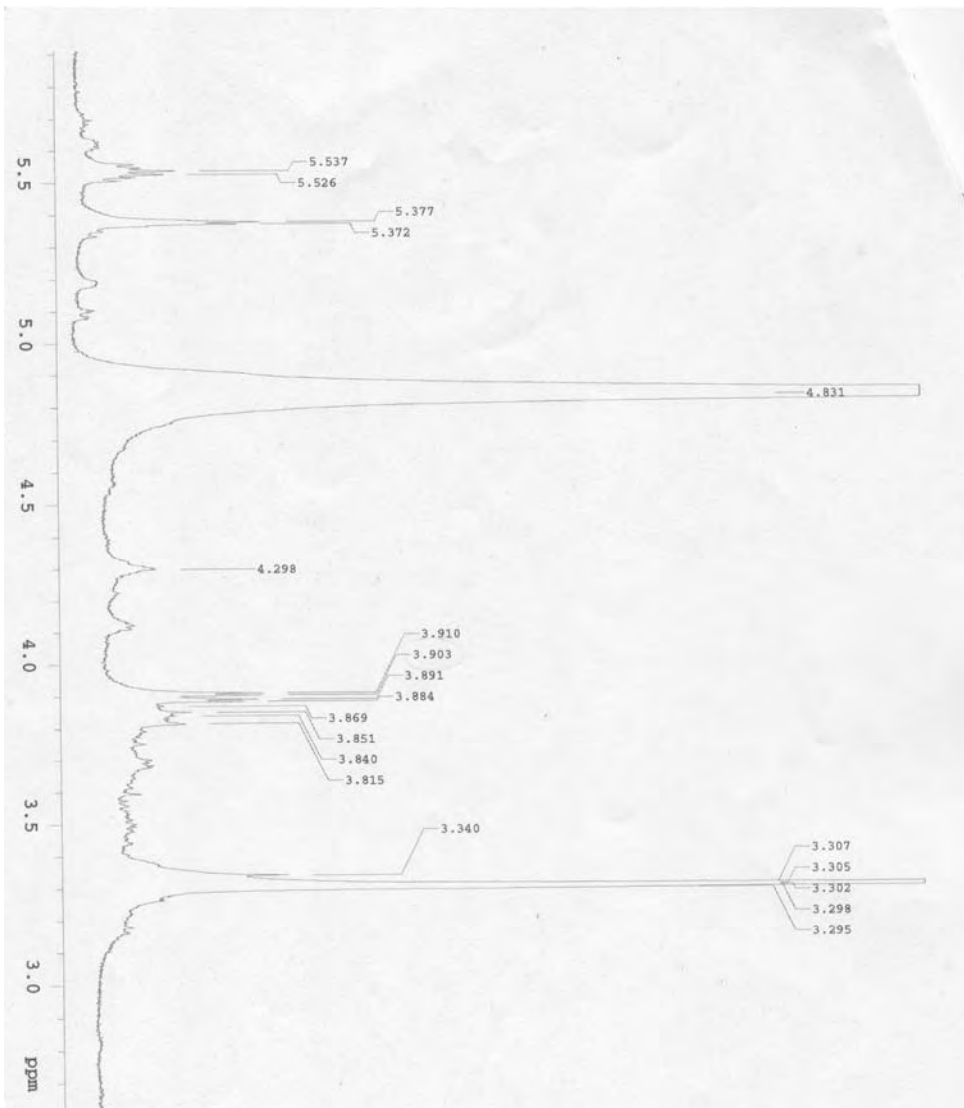
Espectro de ^1H RMN do composto **E** em DMSO-d_6 , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



Análise COSY do composto **E** em DMSO-d₆, 500 MHz, δ relativo a Me₄Si.



Espectro de ^1H RMN do composto **F** em CD_3OD , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si .



Espectro de ^1H RMN do composto **F** em CD_3OD , 500 MHz, δ relativo a Me_4Si (em detalhe)

Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatization

Cláudia A. Simões-Pires¹, Emerson F. Queiroz,² Amélia T. Henriques¹
and Kurt Hostettmann^{2*}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Institute of Pharmacognosy and Phytochemistry, University of Lausanne, BEP, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

* To whom correspondence should be addressed. Tel.: ++ 41 21 692 4561. Fax.: ++ 41 21 692 4565. Email : kurt.hostettmann@ipp.unil.ch

Abstract

The aqueous extracts of aerial parts of *Baccharis trimera* (Less.) DC., *B. crispa* Spreng. and *B. usterii* Heering (Asteraceae) displayed significant radical scavenging activity in a DPPH TLC assay. In order to rapidly identify the active principles, the crude extracts were analysed by LC/UV, and LC/microfractionation of *B. usterii* extract was performed. Six quinic acids derivatives (**1-6**) were isolated from *B. usterii* by MPLC. The fractions were monitored by DPPH TLC assay. A series of radical-scavenging quinic acid derivatives could be identified. The comparison of the HPLC profiles of the extracts of *B. usterii*, *B. trimera* and *B. crispa* was performed. In order to obtain complementary on-line structural information for all peaks of interest, LC/MS/MS together with LC/UV involving post-column addition of UV shift reagents was undertaken on the crude extract. The interpretation of these data permitted the on-line identification of known compounds, some of which were reported for the first time in this plant.

Keywords : *Baccharis trimera*, *Baccharis crispa*, *Baccharis usterii*, Asteraceae, DPPH assay, bioautography screening, quinic acid derivatives, LC/MS, LC/UV-DAD post-column derivatization.

INTRODUCTION

The genus *Baccharis* L. belongs to the subtribe Asterinae which has the largest number of species within the tribe Astereae, family Asteraceae, with more than 400 species (Bremer, 1984) The present study refers to *Baccharis trimera* (Less.) DC., *Baccharis crispa* Spreng., and *Baccharis usterii* Heering, which all belong to section Cauloptarae DC (Giuliano, 2001), and are popularly known as Carquejas in Brazil.

In spite of the large number of publications on *Baccharis* species, there are still some controversies concerning the correct nomenclature and synonyms of its species, especially those of to section Caulopterae. In fact, botanical differentiation of these species, when they are no flowers, is difficult to achieve, especially between *B. crispa* and *B. trimera*, which leads people to use them as medicinal plants, indifferently (Gianello *et al.*, 2000).

Moreover, the species *Baccharis genistelloides* Persoon has also been mentioned in pharmacological and phytochemical works conducted with plant material collected in Bolivia (Suttisri *et al.*, 1994; Abad *et al.*, 1999; Gonzales *et al.*, 2000), Brazil (Bauer *et al.*, 1978; Soicke *et al.*, 1987; Melo *et al.*, 2001) and Chile (Daily *et al.*, 1984). However, such works were probably conducted with *B. trimera* since *B. genistelloides* was described based on a specimen collected in Equator as *Conyza genistelloides* Lam., occurring only in Colombia, Equator and Peru, in altitudes higher than 3000 meters (Cuatrecasas *et al.*, 1967).

This nomenclature misunderstanding has probably arisen from the elaboration of *Flora brasiliensis* when Baker (Baker *et al.*, 1882) considered 6 varieties of *B. genistelloides* Persoon, including: *Baccharis genistelloides* var *trimera* Baker.

Carquejas have been extensively used in Latin America as digestive, diuretic (Correa, 1984), for protective effect towards liver disorders (Toursarkissian, 1980), and as anti-inflammatory (Di Stasi *et al.*, 2002). Several phytochemical studies were conducted for species belonging to section Caulopterae, specially regarding flavonoids and their anti-inflammatory, analgesic and antihepatotoxic activity (Soicke *et al.*, 1987; Gene *et al.*, 1992). Nevertheless, there are no reports of the HPLC profile of their aqueous extracts which are the main usage forms of these plants in folk medicine.

In a preliminary biological screening, the aqueous extracts from the aerial parts of *B. trimera*, *B. crispa* and *B. usterii* were inactive in antifungal and antibacterial assays. However, the same extracts showed radical scavenging activity in a diphenylpicrylhydrazole (DPPH) assay (Cavin *et al.*, 1998; Cuendet *et al.*, 1997). Activity-guided isolation was undertaken for *B.*

usterii using LC/UV microfractionation and MPLC and six caffeoyl quinic acid derivatives could be identified.

EXPERIMENTAL

Plant material. Aerial parts were collected in Guaiba, Rio Grande do Sul, Brazil and identified by N. I. Matzenbacher (UFRGS). Voucher specimens were deposited in the ICN Herbarium (UFRGS, Porto Alegre) for *Baccharis trimera* (Less.) DC. (ICN: 128440), *Baccharis crispa* Spreng. (ICN: 128451) and *Baccharis usterii* Heering (ICN: 128444).

Extraction and isolation. Powdered aerial parts (50 g) of each species were extracted with H₂O and boiled for 30 min and freeze dried to give 4 g (*B. trimera*), 5 g (*B. crispa*) and 6 g (*B. usterii*). The aqueous extract of *B. usterii* (6 g) was fractionated by medium pressure liquid chromatography (MPLC) with a stepwise gradient of MeOH:H₂O (95:5 to 100 of MeOH) using RP-18 column (Lichroprep 40-63 μ m, 270x25 mm i.d., Merck), giving 24 fractions (F1 to F24). Fraction F6 (256 mg) was purified by semi-preparative HPLC using a μ Bondapak[®] C₁₈ pre-packed column (10 μ m, 25x100 mm i.d., Waters, MeOH-H₂O(20:80), flow rate 10 mL/min, UV 254 nm) yielding **1** (Rt 13 min; 2.9 mg) and **2** (Rt 24.5 min; 9 mg) and **3** (Rt 21.8 min; 4.2 mg). Fraction 23 was purified by semi-preparative HPLC using a mBondapak[®] C18 pre-packed column (10 mm, 25x100 mm i.d., Waters), MeOH-H₂O (25:75), flow rate 10 mL/min, UV 254 nm) yielded compound **4** (Rt 12.6 min; 51.2 mg). Fraction 19 yielded directly compound **5** (Rt 7.5 min; 50.2 mg). Fraction 17 was purified by semi-preparative HPLC using a mBondapak[®] C18 pre-packed column (10 mm, 25x100 mm i.d., Waters), MeOH-H₂O (30:70), flow rate 10 mL/min, UV 254 nm yielded compound **6** (Rt 7.5 min; 52.4 mg).

3-*O*-[*E*]-caffeoylquinic acid (**1**). ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 2.15-2.18 (2H, m, H-2), 5.35 (1H, m, H-3), 3.64 (1H, m, H-4), 4.12 (1H, m, H-5), 1.95-2.10 (1H, m, H-6), 7.03 (1H, broad s, H-2'), 6.76 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5'), 6.93 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-6'), 7.57 (1H, d, *J*=15 Hz, H-7'), 6.29 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8'). APCIMS *m/z* 355 [M+H]⁺. ESIMS *m/z* 377 [M+Na]⁺.

5-*O*-[*E*]-caffeoylquinic acid (**2**). ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 2.04-2.16 (2H, m, H-2), 4.16 (1H, m, H-3), 3.72 (1H, m, H-4), 5.33 (1H, m, H-5), 2.06-2.23 (1H, m, H-6), 7.02 (1H, broad s, H-2'), 6.77 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5'), 6.92 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-6'), 7.56 (1H, d, *J*=15 Hz, H-7'), 6.28 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8'). APCIMS *m/z* 355 [M+H]⁺. ESIMS *m/z* 377 [M+Na]⁺.

4-*O*-[*E*]-caffeoyl-1-methyl-quinic acid (**3**). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ 1.81-1.89 (2H, m, H-2), 3.80 (3H, s, OCH₃), 4.01 (1H, m, H-3), 4.66 (1H, m, H-4), 4.08 (1H, m, H-5), 1.86-2.02 (1H, m, H-6), 7.04 (1H, broad s, H-2'), 6.75 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5'), 6.99 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-6'), 7.47 (1H, d, *J*=15 Hz, H-7'), 6.25 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8'). APCIMS *m/z* 354.4 [MH-15]⁺. ESIMS *m/z* 391.0 [M+Na]⁺.

4,5-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic acid (**4**). ^1H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 2.15-2.24 (2H, m, H-2), 4.29 (1H, m, H-3), 5.10 (1H, m, H-4), 5.69 (1H, m, H-5), 2.17-2.27 (1H, m, H-6), 6.92 (1H, broad s, H-2'), 6.71 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5'), 6.89 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-6'), 7.50 (1H, d, *J*=15 Hz, H-7'), 6.17 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8'), 7.01 (1H, broad s, H-2''), 6.74 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5''), 6.90 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-6''), 7.57 (1H, d, *J*=15 Hz, H-7''), 6.27 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8''). APCIMS *m/z* 517 [M+H]⁺.

3,4-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic acid (**5**). ^1H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 2.08-2.2 (2H, m, H-2), 5.62 (1H, m, H-3), 5.20 (1H, m, H-4), 4.18 (1H, m, H-5), 2.10-2.18 (1H, m, H-6), 7.01 (1H, broad s, H-2'), 6.74 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5'), 6.87 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-6'), 7.52 (1H, d, *J*=15 Hz, H-7'), 6.22 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8'), 7.03 (1H, broad s, H-2''), 6.72 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5''), 6.90 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-6''), 7.61 (1H, d, *J*=15 Hz, H-7''), 6.29 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8''). APCIMS *m/z* 517 [M+H]⁺.

3,5-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic acid (**6**). ^1H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 2.04-2.28 (2H, m, H-2), 5.52 (1H, m, H-3), 3.90 (1H, m, H-4), 5.37 (1H, m, H-5), 2.07-2.25 (1H, m, H-6), 7.04 (1H, broad s, H-2'), 6.76 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5'), 6.95 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-6'), 7.56 (1H, d, *J*=15 Hz, H-7'), 6.25 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8'), 7.04 (1H, broad s, H-2''), 6.76 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-5''), 6.96 (1H, d, *J*=8.3 Hz, H-6''), 7.61 (1H, d, *J*=15 Hz, H-7''), 6.32 (1H, d, *J*=15 Hz, H-8''). APCIMS *m/z* 517 [M+H]⁺.

NMR analyses. ^1H - and ^{13}C -NMR were recorded on a Varian Unity Inova 500 spectrometer (500 MHz and 125 MHz, respectively) in CD₃OD and DMSO-*d*₆; chemical shifts in ppm as δ rel. to TMS (int. std.).

Solvents and reagents. Methanol (MeOH) was HPLC-grade (Maechler, Basel, Switzerland). Water was purified on a Reinstwasser-System (SG, Switzerland). Both solvents were passed

through Millipore filters (Water: 0.45 μm HA; MeOH: 0.50 μm FH) (Bedford, MA, USA). Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland).

Standard compounds. Quercetin was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) and isoquercetin was purchased from Roth GmbH (Karlsruhe, Germany).

LC/UV-DAD analysis. LC/UV analysis of the aqueous extract was performed on a Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany) Series 1100 photodiode array detector (DAD) liquid chromatograph system. The separation was achieved on a Nova-Pak C₁₈ column (5 μm , 4.6 x 250 mm i.d.; Waters) with MeOH/H₂O with TFA 0.05%, (10:90 to 100:0 in 70 min). The flow rate was 1 mL/min; the UV traces were measured at 210, 254 and 366 nm and UV spectra (DAD) were recorded between 200 and 500 nm.

LC/UV/APCI-MSⁿ analysis. LC/MSⁿ was performed directly after UV-DAD measurements. A Finnigan LCQ ion trap (MAT, San Jose, CA, USA) with APCI interface was used with the following conditions: capillary temp. 150°C; vaporizer temp. 370°C; positive mode; sheath gas flow: 60 psi (1psi = 6894.76 Pa), corona needle current 5 μA . MSⁿ experiment were performed by programming dependent scan events. The first event was a full MS scan Mr (150.0-1500.0) (MS¹); during the second event the main ion recorded was isolated and selectively fragmented in the ion trap (MS²). The collision energy was set to 15 V.

HPLC microfractionation. Collection of the different peaks after the LC/UV analysis was performed on a Gilson collector (FC204). Fractions were collected every 1 min (1 ml) in Eppendorf tubes. After collection, all fractions were evaporated to dryness on a speedvac system (RCT 90, Jouan). The content of each fraction was suspended in 20 μl of MeOH and then used for the DPPH bioassay.

LC/UV-DAD analysis with post-column addition of UV shift reagents. The method used for post-column addition of UV shift reagents is based on a previously reported protocol (Wolfender and Hostettmann, 1993). For flavonoid analysis the following reagents were used: the weak base NaOAc, the strong base KOH, and NaOAc/H₃BO₃ at room temperature; AlCl₃ in acidic and non-acidic conditions at 90°C to ensure complexation reactions. The extracts were analysed by HPLC using a Nova-Pak C₁₈ column (5 μm , 4.6 x 250 mm i.d.; Waters)

with MeOH/H₂O with TFA 0.05%, (10:90 to 100:0 in 70 min). The flow rate was 0.6 mL/min; the UV traces were measured at 210, 254 and 366 nm and UV spectra (DAD) were recorded between 200 and 500 nm. For the LC/UV-DAD analysis under weak base conditions, a first pump was used for the addition of NaOAc (0.5 M, 0.2 mL/min) and a second for NaOH (0.01 M, 0.2 mL/min). The resulting pH in the eluent was 7. For strong base addition, the first pump was used to carry KOH (0.3 M, 0.3 mL/min) resulting in solution pH 14. For the analysis with NaOAc/H₃BO₃, the first pump carried NaOAc 0.1 M-H₃BO₃ 0.7 M (1:1, 0.2 mL/min) and the second pump carried NaOH (0.01 M, 0.2 mL/min) giving pH 5). For the analysis with AlCl₃, the first pump delivered AlCl₃ (0.3 M, 0.2 mL/min) for acidic condition (pH 3.5) and a second pump was used to carry NaOH (0.01 M, 0.2 mL/min) for non-acidic condition (pH 6). Before analysing the extract, quercetin was used for testing the effect of the UV shift reagents. All the reagent solutions were filtered through a 0.50 µm filter (Millipore, Bedford, MA, USA). Post-column addition of the bases (for neutralization of the mobile phase) and of the "shift reagents", was achieved by two M-6000 pumps from Waters (Bedford, MA, USA). Neutralization of the mobile phase was done in an Upchurch mixer (Oak Harbor, WA, USA) while reaction with the shifts reagent was carried out in a 10 µl visco mixer from Lee (Westbrook, CO, USA) followed by a reaction coil. UV spectra were recorded on a photodiode array detector HP-1050 and data were processed on Chemstation from Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA).

DPPH assay. After developing and drying, TLC plates (Silica gel 60 F₂₅₄, Merck) were sprayed with a 0.2% diphenylpicrylhydrazole (DPPH) solution in MeOH. The plates were examined 30 min after spraying. Active compounds appear as yellow spots against a purple background.

Acknowledgements.

The Swiss National Science Foundation (grant n° 2000-063670.00 to K. Hostettmann) is gratefully acknowledged for supporting this work. CAPES is acknowledged for scholarship.

RESULTS AND DISCUSSION

In order to rapidly identify the active principles in *B. usterii*, the crude aqueous extract was analysed by LC/UV/MS, with an atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) interface (Bruins *et al.*, 1987). All compounds showed the same UV spectra in the LC/UV/DAD analysis characteristic of phenolic compounds (Waldron *et al.*, 1996) (Figure 1). Compounds **1**, **2**, and **3** presented the same ion at m/z 355 $[M+H]^+$, while compounds **4**, **5**, and **6** presented the same molecular ion at m/z 517 $[M+H]^+$ (Figure 1). The UV and the MS data were insufficient for on-line identification of these compounds. LC microfractionation was performed under the same conditions and a DPPH TLC assay (Cavin *et al.*, 1998) for radical scavenging activity was conducted for all peaks collected. By this means, radical scavenging properties could be rapidly linked to some of the LC peaks (Fig. 1).

A fractionation of the crude extract by MPLC, guided by the direct TLC bioautography assay afforded compounds **1-6**. The structures of the isolated compounds were determined using ^1H and ^{13}C CNMR data. Assignments of the proton and carbon signals were based on DQF-COSY, HSQC and HMBC experiments. According to our analysis, compounds **1**, **2** and **3** consist of mono caffeoyl ester derivatives of the quinic acid, while compounds **4**, **5**, and **6** consist of isomers possessing two caffeoyl units.

Compounds 3-*O*-[*E*]-caffeoylquinic acid (**1**), 5-*O*-[*E*]-caffeoylquinic acid (**2**), 4-*O*-[*E*]-caffeoyl-1-methyl-quinic acid (**3**), 4,5-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic acid (**4**), 3,4-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic acid (**5**) and 3,5-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic acid (**6**) were identified by comparison of their physical and spectroscopic data (^1H NMR, ^{13}C NMR, Dept, 2D NMR, MS) with those reported in the literature (Pauli *et al.*, 1998).

The LC/UV/MS comparison between the three *Baccharis* aqueous extracts were performed (Figure 2). The comparison showed an important similarity between *B. usterii* and *B. crispa* while the chemical profile of *B. trimera* presented some differences. For all species it was possible to observe the quinic acid esters as major compounds. In the case of *B. trimera*, other major compounds could also be observed.

Using the LC/MSⁿ and the LC/UV data of compounds previously isolated from *B. trimera* and other species of *Baccharis*, it was possible to identify three known compounds in *B. trimera* extract (Figure 3). Complementary information was obtained using the LC/UV-DAD analysis of the extract with post-column addition of UV shift reagents according to a protocol

already tested for flavonoids or xanthenes (Hostettmann *et al.*, 1984; Wolfender *et al.*, 1993). For each peak, the shifted DAD UV spectrum and the original DAD UV spectrum were overlaid and compared (Figure 3). The shifts observed were interpreted according to the rules previously established for the analysis of pure polyphenols (Markham, 1982). These analyses provided useful complementary information for the on-line identification of the peaks of interest as discussed below.

The UV spectrum of compound **7** suggested a flavonol skeleton (Markham, 1982). The LC/MS analysis showed a molecular ion at m/z 465 $[M+H]^+$ in agreement with a molecular weight of 464 amu. The LC/MSⁿ analysis showed fragmental ion at m/z 303 $[M-162]^+$, corresponding to the loss of a sugar unit. Compound **7** was identified as isoquercetin after comparison of its retention time with the one of a standard. This compound has already been reported in the genus *Baccharis* (Moreira *et al.*, 2003).

The UV spectra of compound **8** resembled those of quercetin previously described from *B. trimera* (Soicke *et al.*, 1987). This hypothesis was confirmed by the LC/MS analysis and comparison of its retention time with standard. Compound **8** presented a signal at m/z 303 $[M+H]^+$ in agreement with the molecular weight of quercetin (302 amu).

Compound **9** presented a typical UV spectra of a flavone skeleton (Markham, 1982). The positions of the three hydroxyl groups were deduced from the complementary UV shifted spectra. The 5,7-dihydroxylation of the A-ring was deduced from the UV shifts observed upon addition of AlCl₃ and NaOAc (Markham, 1982). The bathochromic shift of band II and I with AlCl₃ were due to the formation of a complex between the OH in position 5 and the carbonyl in 4 and a second complex between the hydroxyl groups in positions 4' and 5'. On the other hand, the shift of bands I and II upon addition of the weak base suggested the presence of OH in the most acidic positions 7 and 4'. The MS spectrum showed an intense ion at m/z 317 $[M+H]^+$ in agreement with the molecular weight of 316 amu. These data are strongly similar to those of nepetin, which has previously been isolated from *B. trimera* (Soicke *et al.*, 1987).

Radical-scavenging properties of pure compounds **1-6** were evaluated against the DPPH radical. Quercetin and BHT [2,6-di(*tert*-butyl)-4-methylphenol] were used as reference compounds (Cavin *et al.*, 1998; Cuendet *et al.*, 1997). When using DPPH as a TLC spray reagent, compounds **1-6** (1.5 µg) were active and reduced the radical. Our results demonstrated that the aqueous extracts of *B. trimera*, *B. crispa* and *B. usterii* possess antioxidant activity partially due to the presence of quinic acid derivatives and in the specific case of *B. trimera* also due to the presence of flavonoids. Quinic acid derivatives are present

in a sort of natural sources (Timmermann *et al.*, 1983; Chuda *et al.*, 1996; Basnet *et al.*, 1996) and are responsible for a large number of pharmacological properties including antioxidant (Chuda *et al.*, 1996), hepatoprotective (Basnet *et al.*, 1996), antibacterial (Sholz *et al.*, 1994), anti-inflammatory (Gongora, 2002), and antiviral (Matsingou *et al.*, 2000). In fact, the presence of quinic acid derivatives as major compounds in the crude aqueous extracts of *B. trimera* could partially contribute for its previously described activities such as antiviral (Matsingou *et al.*, 2000), gastric cytoprotection (Oh *et al.*, 2001), and anti-inflammatory (Gene *et al.*, 1992). Some of them are often linked to antioxidant activity since free radical scavengers exert a protective effect towards different biological damages (Matsingou *et al.*, 2000), including gastric and esophageal injuries (Oh *et al.*, 2001), and liver protection (Speroni *et al.*, 2003). Moreover, the similar profiles of the aqueous extracts of the three species may justify their popular use without a differentiation among species.

To our knowledge it is the first time that these 6 derivatives are found in carquejas (section Caulopterae of the genus *Baccharis*). Particularly, 3,4-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic acid, 3-*O*-[*E*]-caffeoylquinic acid, 5-*O*-[*E*]-caffeoylquinic acid and 4-*O*-[*E*]-caffeoyl-1-methoxyl-quinic acid are first reported in this genus, while 3,5-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic acid and 4,5-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic acid have previously been isolated from *Baccharis thesioides* as the active compounds against HIV-1 and HIV-2 (Miketova *et al.*, 1999)

REFERENCES AND NOTES

Abad MJ, Bermejo P, Gonzales E, Iglesias I, Irurzun A, Carrasco L. 1999. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *Gen Pharmacol* **32**: 499-503.

Baker, JG. 1882. Compositae. In *Flora brailiensis.: enumeratio plantarum*, v. 6, part III, Martius CF (ed.). J. Cramer: Weinhem.

Basnet P, Matsushige K, Hase K, Kadota S, Namba T. 1996. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury model *Biol Pharm Bull* **19**: 1479-1484.

Bauer L, Silva G, Siqueira N, Bacha C, Sant'Ana B. 1978. Os óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* e *Baccharis genistelloides* Pers. do Rio Grande do Sul. *Rev Cen Cienc Saude* **6**: 7-12.

Bremer K. 1984. *Asteraceae. Cladistics and classification*. Portland: Timber Press.

Bruins AP, Covey TR, Henion JT. 1987. Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass-spectrometry. *Anal Chem* **59**: 2642-2646.

Cavin A, Potterat O, Wolfender JL, Hostettmann K. 1998. LC-UV-MS and LC-NMR of an anti-oxidant fraction from *Orophea enneandra* and the isolation of a polyacetylene, lignans and a tocopherol derivative. *J Nat Prod* **6**: 1497-1501.

Cuatrecasas J. 1967. Revisión de las especies colombianas del genero *Baccharis*. *Rev Acad Colomb Cienc Exac Fis Natural* **13**: 5-102.

Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O, Dyatmiko, W. 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta* **80**: 1144-1152.

Chuda Y, Ono M, Ohnishi-Kameyama M, Nagata T, Tsushida T. 1996. Structural identification of two antioxidant quinic acid derivatives from Garland (*Chrysanthemum coronarium* L.) *J Agric Food Chem* **44**: 2037-2039.

Correa MP. 1984. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. IBDF: Rio de Janeiro.

Daily A, Wagner H, Seligmann O. 1984. Hispidolin and stigmasta-7,22-dien-3-ol from *Baccharis genistelloides*. *Fitoterapia* **55**: 236-238.

Di Stasi LC, Oliveira GC, Carvalhaes MA. 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* **73**: 69-91.

Gene RM, Marin E, Adzet T. 1992. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. *Planta Med* **58**: 565-566.

Gene RM, Cartaña C, Adzet T, Marin E, Parellha T, Cañigüeral S. 1996. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of its active constituents. *Planta Med* **62**: 232-235.

Giuliano DA. 2001. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana* **39**: 131-154.

Gianello JC, Ceñal JP, Giordano OS, Tonn CE, Petenatti ME, Petenatti EM, Del Vitto LA. 2000. Medicamentos herbários em el centro-oeste argentino II. Carquejas: control de calidad de las drogas oficiales y sustituyentes. *Acta Pharm Bonaer* **19**: 99-103.

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

Gongora L, Giner, RM, Mañez S, Recio MC, Schinella G, Rios JL. 2002. Effects of caffeoyl conjugates of isoprenyl hydroquinone glucoside and quinic acid on leukocyte function. *Life Sci* **71**: 2995-3004.

Hostettmann K, Domon B, Schaufelberger D, Hostettmann M. 1984. On-line high performance liquid chromatography. Ultra-violet-visible spectroscopy of phenolic compounds in plant extracts using post-column derivatization. *J Chromatogr* **283**:137-147.

Markham KR. 1982. *Techniques of flavonoid identification*. Academic Press: London.

Matsingou TC, Kapsokefalou M, Salifoglou A. 2000. In vitro antioxidant activity of black tea and Mediterranean herb infusions toward iron under simulated gastrointestinal conditions. *J Food Sci* **65**: 1060-1065.

Melo SF, Soares SF, Costa RF, Silva CR, Oliveira MBN, Bezerra RJAC, Caldeira-de-Araujo A, Bernardo-Filho M. 2001. Effect of *Cymbopogon citratus*, *Maytenus ilicifolia* and *Baccharis genistelloides* extracts against the stannous chloride oxidative damage in *Escherichia coli*. *Mutat Res* **496**: 33-38.

Miketova P, Schram KH, Whitney J, Kearns EH, Timmermann BN. 1999. Mass spectrometry of 3,5- and 4,5-dicaffeoylquinic acids and selected derivatives. *J Mass Spectrom* **34**: 1240-1252.

Moreira FD, Coutinho V, Montanher ABP, Caro MSB, Brighente IMC, Pizzolatti MG, Delle Monache F. 2003. Flavonoids and triterpenes from *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioactivity on *Artemia salina*. *Quim Nova* **26**: 309-311.

Oh T, Lee J, Ahn B, Cho H, Kim W, Kim Y, Surh Y, Cho S, Hahm K. 2001. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis: implication of antioxidants in its treatment. *Free Radic Biol Med* **30**: 905–915.

Pauli GF, Poetsch F, Nahstedt A. 1998. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochem Anal* **7**: 177-185.

Sholz E, Heinrich M, Hunkler D 1994. Caffeoylquinic acids and some biological activities of *Pluchea symphytifolia*. *Planta Med* **60**: 360-364.

Soicke H, Leng-Peschlow E. 1987. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Med* **1**: 37-39.

Speroni E, Cervellati R, Govoni P, Guizzardi S, Renzulli C, Guerra M. 2003. Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. *J Ethnopharmacol* **86**: 203-211.

Suttisri R, Kinghorn AD, Wright AD, Sticher O. 1994. Neo-clerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. *Phytochemistry* **35**: 443-446.

Timmermann BN, Hoffmann JJ, Jolad SD, Schram KH, Klenck RE, Bates RB. 1983. Constituents of *Chrysothamnus paniculatus* 3,4,5-*O*-[*E*]-tricaffeoylquinic acid (a new shikimate prearomatic) and 3,4-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic, 3,5-*O*-[*E*]-dicaffeoylquinic and 4,5-dicaffeoylquinic acids. *J Nat Prod* **46**: 365-368.

Toursarkissian M. 1980. *Plantas Medicinales de la Argentina*. Hemisferio Sur: Buenos Aires.

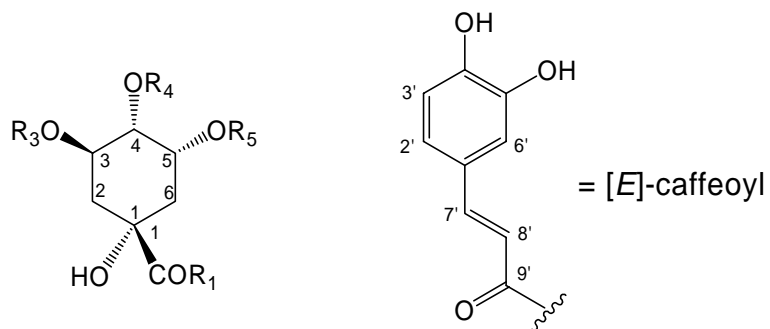
Waldron KW, Parr AJ, Ralph J. 1996. Cell wall esterified phenolic dimers: identification and quantification by RP HPLC and DAD. *Phytochem Anal* **7**: 305-312.

Wolfender JL, Hostettmann K. 1993. Liquid chromatographic-UV detection and liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric analysis of *Chironia* (Gentianaceae) species: A rapid method for the screening of polyphenols in crude plant extracts. *J Chromatogr A* **647**: 191-202

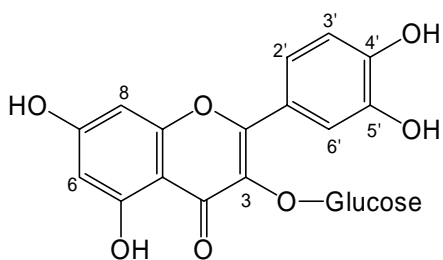
Figure 1. (A) LC/UV/APCIMS analysis of the aqueous extract of the aerial parts of *B. usterii*. UV and mass spectra of compounds **1-6**. (B) TLC bioautography with DPPH assay of the microfractionation collected after LC/UV analysis. (LC/UV/MS conditions: see Experimental section).

Figure 2. Comparative LC/UV of the water extract of *B. usterii*, *B. crispa*, and *B. trimera*.

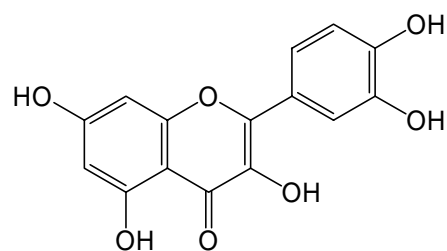
Figure 3. LC/UV/APCIMS of the water extract of *B. trimera*.



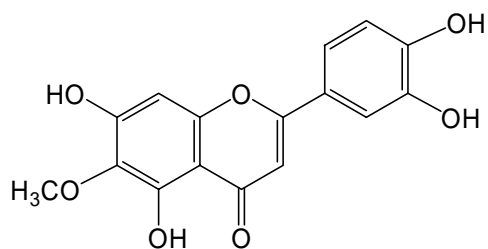
- 1** R₁= OH R₃=caffeoyl R₄=H R₅=H
- 2** R₁= OH R₃=H R₄=H R₅=caffeoyl
- 3** R₁= OCH₃ R₃=H R₄=caffeoyl R₅=H
- 4** R₁= OH R₃=caffeoyl R₄=caffeoyl R₅=H
- 5** R₁= OH R₃=caffeoyl R₄=H R₅=caffeoyl
- 6** R₁= OH R₃=H R₄=caffeoyl R₅=caffeoyl



7



8



9

Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to section Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach.

Simões-Pires, C. A.¹; Debenedetti, S.²; Spegazzini, E.²; Mentz, L. A.³; Matzenbacher, N. I.³; Limberger, R. P.¹; Henriques, A. T.¹.

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, Brazil.

2. Cátedra de Farmacognosia and Farmacobotánica Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

3. Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

B. articulata, *B. crispa*, *B. microcephala*, *Baccharis milleflora*, *B. myriocephala*, *B. stenocephala*, *B. trimera* and *B. usterii*, all of section Caulopterae, had their essential oils analysed by GC and GC/MS. Despite the morphological similarity among these species, differences in composition of their essential oil obtained by hydrodistillation and hexane extract could be observed. Special attention was given to *Baccharis trimera* and *B. crispa* since their differentiation during early stages is not possible due to the absence of synflorescences. Carquejyl acetate is suggested as a marker for *Baccharis trimera*, and a fast method of detection of this compound is given.

Keywords: essential oil composition, *Baccharis*, Caulopterae, Astereae, Asteraceae, carquejyl acetate, carqueja.

Running title: Essential oil from *Baccharis* species (section Caulopterae) and taxonomy

The genus *Baccharis* L. belongs to the subtribe Baccharidinae which has the largest number of species within the tribe Astereae, family Asteraceae. According Hellwig (1996), *Baccharis* sensu lato had more than 300 species grouped into 40 sections partly defined in an extremely artificial manner. Some taxonomic characteristics of leaves and capitulescences are considered a useful tool for systematics and many authors have attempted to use these characteristics to provide an infrageneric classification for this genus. De Candolle (1836) was the first author to establish a subdivision of *Baccharis* into 8 sections, taking into account the morphology of their leaves. Using similar criteria, Baker (1882-1884) classified Brazilian species into 6 series, by reviewing 4 sections of those delimited by de Candolle. More recently, Giuliano (2001) subdivided 96 Argentinean species from *Baccharis* into 15 sections. Among them, Caulopterae DC. is characterized by the presence of longitudinal wings. The same species group was previously named Alatae Less. (Ariza Espinar, 1973) and Trimeria (Barroso, 1976).

In spite of the large number of publications on *Baccharis*, there are still some controversies concerning the correct nomenclature and synonyms of its species, specially those belonging to section Caulopterae.

Baker (1882-1884) considered 6 varieties of *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. when elaborating Flora brasiliensis: var. *trimera* (Less.) Baker, var. *typica*, var. *brachystachys* Baker, var. *cylindrica* (Less.) Baker, var. *crispa* (Spreng.) Baker, and var. *milleflora* (Less.) Baker. Possibly because of this, Silva (1926) considered the name *Baccharis genistelloides* var. *trimera* in the first edition of Brazilian Pharmacopea, under the common name of “carqueja-amarga”. Nevertheless, the fourth edition considers the name *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Farmacopéia Brasileira, 2001). In fact, *Baccharis genistelloides* was described

based on a specimen collected in Ecuador as *Conyza genistelloides* Lam., occurring in Colombia, Ecuador and Peru at altitudes higher than 3000 m (Cuatrecasas, 1967).

Taking this into account, phytochemical and pharmacological works conducted with samples referenced as *Baccharis genistelloides* collected in Bolivia (Suttisri et al., 1994; Abad et al. 1999), Brazil (Bauer et al., 1978; Soicke and Leng-Peschlow, 1987), and Chile (Daily et al., 1984) were possibly conducted with *B. trimera* or *B. crispa* Spreng.

Baccharis crispa and *B. articulata* (Lam.) Pers. are mentioned in the Argentinean Pharmacopea (Farmacopea Nacional Argentina, 1978) under the common name of “carqueja”, neglecting *B. trimera*. According to Ariza Espinar (1973), *Baccharis cylindrica* (Less.) DC. is a synonym of *B. crispa*; however, the existence of two different entities (*B. crispa* and *B. cylindrica*) has been mentioned in Argentina and southern Brazil (Barroso, 1976; Diesel, 1987) as well as in Paraguay (Soria, 1993). In addition to this, authors from Brazil (Barroso, 1976) and Argentina (Giuliano, 2000) used different characters for *Baccharis trimera* and *B. crispa* and it seems that *B. crispa* from these authors belong to different taxa. Since there is still doubt on the existence of two different species – which present strongly similar herbarium samples – we have considered *Baccharis cylindrica* as a synonym of *B. crispa* in this study.

As a matter of fact, botanical differentiation of some species of Caulopterae, even at flowering time, is difficult to achieve, especially between *Baccharis crispa* and *B. trimera*, and depends on factors such as phenotypical plasticity and developing stage. Since all of them are morphologically and anatomically similar and are popularly used as “carquejas”, without a differentiation among species (Gianello et al., 2000), it is important to find alternative methods of chemical identification other than morphological and anatomical characteristics.

“Carquejas” are extensively used in folk medicine for stomach disorders, in diabetes, in rheumatism and skin wounds (Correa, 1985; Camargo, 1985; Martínez Corvetto, 1981). They

have also been used to obtain a diuretic effect (Camargo, 1985), for protective effect towards liver disorders (Toursarkissian, 1980), as anti-inflammatory, in hypertension cases and brain hemorrhage, in obesity and for body detoxification (di Stasi et al., 2002).

Considering the use of “carquejas” for medicinal purposes, Gianello et al. (2000) provided quality control methods for *Baccharis crispa* and *B. trimera*, as medicinal herbs, in an attempt to determine significant differences. However, these authors concluded through chemical composition analyses, that it was not possible to differentiate *Baccharis crispa* from *B. trimera*. Many other phytochemical studies were conducted for species belonging to section Caulopterae, especially regarding flavonoids (Soicke and Leng-Peschlow, 1987; Gene et al., 1992, 1996; Herrera et al., 1996; Pallazo de Mello and Petrovick, 2000), but no chemical markers could be identified for the identification of these species.

This work refers to 8 species of Caulopterae, occurring in southern Brazil and Argentina. Considering the difficult identification of species on morphological basis, we have tried to determine differences between *Baccharis trimera* and *B. crispa* essential oil and hexane extract. The chemical composition of essential oils of *B. articulata*, *B. microcephala* (Less.) Baker, *B. milleflora* DC., *B. myriocephala* DC., *B. stenocephala* Baker and *B. usterii* Heering is also presented.

Material and methods

Plant material

All samples collected for this work were gathered at flowering time in order to obtain the correct botanical identification.

Collection data of plant samples used for essential oil and hexane extract analysis are given in Table 1. All voucher specimens deposited at ICN were identified by N. I. Matzenbacher, while those deposited at BAF were identified by D. Giuliano, L. Ariza Espinar and E. Petenatti.

The criteria used by N.I. Matzenbacher to differentiate *Baccharis crispa* from *B. trimera* is stated as follows. *B. milleflora* was identified according to its original description provided by de Candolle (1836), while the other five species were identified using the key of Barroso (1976).

Baccharis crispa. Decumbent-ascending erect subshrub, with branches of 30 – 55 cm of height; woody stems without leaves, with the presence of three wings which can be waved or not at the basis of the stem. The wings are up to 0.5 cm of width lowering their size towards zero at the apex. Superior branches form a panicle of lax spikes with 1 – 2 (3) heads per node. Male heads with a cylindrical involucre of 0.5 x 0.3 cm; female heads with a campanulate involucrum of 0.2 cm of diameter at the basis and 0.1 cm of diameter at the apex and up to 1.0 cm of height. The flowering and fruit period is from February to April, with predominance in March.

Baccharis trimera. Erect branched subshrub of 45 – 95 cm of height in adult phase; woody stems without leaves, with three wings. The wings from the basis of the stem until its medium height are up to 1.2 cm wide, lowering towards the apex until 0.2 cm of width. Intermediate branches of the stem form panicles of glomerule spikes crowded together. There are 2 – 5 heads per node in superior branches and possibly isolated heads in inferior branches. Male heads with a cylindrical involucrum of 0.3 cm of diameter and 0.5 cm of height, female

heads with a campanulate involucre of 0.3 cm of diameter at the basis and 0.2 cm of diameter at the apex and 0.6 cm of height. The flowering and fruit period is from January to March, with predominance in February.

A map with the collection sites of the eight species of *Baccharis* herein studied are depicted in Figure 1.

Extraction procedures

The essential oils were obtained from dried aerial parts of the plant material collected in Brazil by hidrodistillation using a Clevenger-Type apparatus, for 4 h.

In order to develop a fast analysis seeking for the presence of marker compounds in the plant material, hexane extracts were obtained for all samples of *Baccharis trimera* and *B. crispa* collected in Argentina and compared to hexane extracts from Bt4 (*B. trimera*, Guaíba – RS, Brazil) and Bcj (*B. crispa*, Guaíba – RS, Brazil) which were previously analysed for their essential oil composition. Hexane extracts were obtained using 100 mg of dried aerial parts of the plant in hexane 5 ml for 5 min with Ultra-Turrax T8 (Ika[®]-Werke).

Chemical analysis

Quantitative and qualitative analyses of the oils and hexane extracts were performed by GC and GC/MS, using a chromatograph (Shimadzu GC 17-A) equipped with a fused silica capillary column (30 m x 0.25mm x 0.25 µm, coated with DB-5). Injector and detector temperatures were set at 220°C and 250°C, respectively; the oven temperature was

programmed from 60 – 300°C at 3°C /min and helium was employed as carrier gas. The GC apparatus was equipped with a flame ionization detector, while GC/MS had a quadrupole MS system (QP 5000), operating at 70 eV. The percentage composition of the oil was obtained from electronic integration, without taking into account relative response factors. The identification of compounds was based on a comparison of retention indices (determined relatively to the retention times of an n-alkane homologous series) and mass spectra with those of authentic samples and with data from the literature (Adams, 2001).

Results

Essential oil yields are given in table 2. Chemical composition of the essential oil of different collections of *Baccharis trimera* in different sites is given in table 3, while the results for the same specimen collected in different months is shown in table 4.

Table 5 shows the results for the essential oil of *Baccharis crispa* collected in different months and sites of Brazil. Essential oil composition for the six other species is given in table 6.

The content of carquejyl acetate in hexane extracts from *Baccharis crispa* and *B. trimera* collected in Brazil and Argentina is given in table 7.

Discussion

Despite morphological similarity among species of *Baccharis* section Caulopterae, differences in their essential oil composition and yield could be observed.

Regarding essential oil yield, *Baccharis trimera* ranged from 0.6 to 0.9% (v/w). This yield differed from the other seven species which provided lower volumes of oil, ranging from 0.1 to 0.3% (Table 2).

The predominance of sesquiterpenes from the germacrane pathway (Bell and Charlwood, 1980) observed in *Baccharis myriocephala* (epiglobulol and globulol), *B. milleflora* (gama-gurjunene and alfa-selinene) and *B. usterii* (spathulenol and globulol) is remarkable. The essential oil from *Baccharis microcephala* had the oxygenated sesquiterpene alfa-cadinol as major compound. In a different way, *Baccharis articulata* and *B. stenocephala* oils showed predominance of monoterpene hydrocarbons, mainly beta-pinene (30.1% and 41.3%, respectively). It is remarkable that these two species, which are the only ones presenting stems with two-winged stems, have also a different pattern of chemical distribution regarding the occurrence of mono- and sesquiterpenes.

Special attention was given to *Baccharis trimera* and *B. crispa* because their differentiation is not possible without capitulescences. As observed for the other species (except *Baccharis stenocephala* and *B. articulata*), there is a predominance of sesquiterpenes over monoterpenes.

Moreover, all samples of *Baccharis trimera* even when collected in different places of southern Brazil (table 3), differed from the samples of *B. crispa* (table5), by the presence of an unusual compound, carquejyl acetate (35.5 to 68.0%), which corresponds to the acetate of the oxygenated monoterpene carquejol, also present in some of the essential oils of *Baccharis trimera* (figure 2). The presence of ledol in oil samples is also remarkable, because this compound is rarely found as concentrated as we found in *Baccharis trimera* (5.9 to 24.2%). Carquejyl acetate and ledol were found consistently in material collected all over the year (table 4). The isolation of carquejyl acetate from "*Baccharis genistelloides*" collected in Santa

Catarina, Brazil (probably *B. trimera*), was first reported by Naves (1959). Boldt (1989) mentioned the importance of “carqueja” oil produced in Brazil (obtained from “*Baccharis genistelloides*”, having 50 to 55% carquejyl acetate) as a commercial fragrance reminiscent of rosewood. In fact, Bauer et al. (1978) had already investigated the chemical composition of “carqueja” oil provided by the same industry mentioned by Boldt (1989) and had found carquejyl acetate as its major compound (69.2%). Hence, the species used to obtain this industrial oil is very probably *Baccharis trimera* and the correct botanical identification is crucial for industries, because the use of other species would be responsible for changes in fragrance and for lower oil quality.

Baccharis crispa showed different chromatographic profiles and compound concentrations according to collection time and locality. The predominance of sesquiterpenes, specially those from the germacrane pathway (globulol, epiglobulol, alfa-selinene, germacrene D and spathulenol), seems to be a constant (table 4), while the presence of small amounts of monoterpenes was observed only in the sample collected in July.

We did not find carquejyl acetate in any other species of section Caulopterae than *Baccharis trimera*. Moreover, this compound was present in hexane extracts of *B. trimera* collected not only in Brazil but also at different places in Argentina; whereas *B. crispa* from both countries lacked carquejyl acetate in the hexane extract (table 6). Therefore, carquejyl acetate is suggested as a marker compound for *Baccharis trimera* and its investigation in hexane extracts by GC/MS using small amounts of plant material is a useful tool to differentiate *B. trimera* from *B. crispa*.

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

REFERENCES

- Abad M. J., Bermejo P., Gonzales E., Iglesias I., Irurzun A., Carrasco L. (1999) Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *Gen. Pharmacol.* 32(4): 499-503.
- Adams R. P. (2001) Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Carol Stream, Allured.
- Ariza Espinar L. (1973) Las especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central. *Bol. Acad. Nac. Ci.* 50: 175-305.
- Baker J. G. (1882-1884) Compositae in: Martius C. F. (ed.), *Fl. bras.: enumeratio plantarum* 6 (3). Weinheim, J. Cramer.
- Barroso G. M. (1976) Subtribo Baccharidinae Hoffman. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. *Rodriguésia* 28(40): 3-273.
- Bauer L., Silva G., Siqueira N., Bacha C., Sant'Ana B. (1978) Os óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* e *Baccharis genistelloides* Pers. do Rio Grande do Sul. *Rev. Cent. Cienc. Saude* 6(3): 7-12.
- Bell E. A., Charlwood B. V. (1980) Secondary plant products. New York, Springer-Verlag.
- Boldt P. E. (1989) *Baccharis* (Asteraceae). A review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status, natural enemies and the potential for its biological control in the United States. Temple, USDA, Agricultural Research Service, Grassland, Soil and Water Research Laboratory.
- Camargo M. T. A. (1985) *Medicina popular: aspectos metodológicos para pesquisa*. São Paulo, Almed.
- Correa M. P. (1985) *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro, IBDF.

- Cuatrecasas J. (1967) Revisión de las especies colombianas del género *Baccharis*. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exac. Fís. Nat. 13(49): 5-102.
- Daily A., Wagner H., Seligmann O. (1984) Hispidolin and stigmasta-7,22-dien-3-ol from *Baccharis genistelloides*. Fitoterapia 55(4): 236-238.
- De Candolle A. P. (1836) *Baccharis*. Prodrum systematis naturalis regni vegetalis. Vol. 5. Paris: Treuttel & Wirtz.
- Diesel S. (1987) Contribuição ao estudo taxonômico do gênero *Baccharis* Linnaeus (grupo *Trimera*) no Rio Grande do Sul – Brasil. Pesquisas, Bot. 38: 91-126.
- Di Stasi L. C., Oliveira G. C., Carvalhaes M. A. (2002) Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. Fitoterapia 73: 69-91.
- Farmacopéia Brasileira (2001) 4 ed. São Paulo, Atheneu.
- Farmacopea Nacional Argentina (1978) Codex Medicamentarius Argentino, 6 ed. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina.
- Gene R. M., Marin E., Adzet T. (1992) Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. Planta Med. 58: 565-566.
- Gene R. M., Cartaña C., Adzet T., Marin E., Parellha T., Cañigüeral S. (1996) Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: Identification of its active constituents. Planta Med. 62: 232-235.
- Gianello J. C., Ceñal J. P., Giordano O. S., Tonn C. E., Petenatti M. E., Petenatti E. M., Del Vitto L. A. (2000) Medicamentos herbários en el centro-oeste argentino II. “Carquejas”: control de calidad de las drogas oficiales e sustituyentes. Acta Farmaceutica Bonaerense 19(2): 99-103.

- Giuliano D. A. (2000) Asteraceae, parte 15, Tribu III: Astereae, parte A, Subtribu c: Baccharinae. In: Hunziker A. T. (ed.) Flora Fanerogámica Argentina. Córdoba, Proflora (Conicet), pp. 1-73.
- Giuliano D. A. (2001) Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). Darwiniana 39: 131-154.
- Hellwig F. H. (1996) Taxonomy and evolution of Baccharidinae (Compositae). In Hind D.J.N., Beentje H. J. Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew 1: 575-590.
- Herrera J. C., Rosas Romero A. J., Crescente O. E., Acosta M., Pekerar S. (1996) Analysis of 5-hydroxy-7-methoxyflavones by normal-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatography A 740: 201-206.
- Martínez Crovetto R. (1981). Plantas utilizadas en medicina en el NO de Corrientes. Fund. Miguel Lillo. Tucumán. Miscelan. 69.
- Naves Y. R. (1959) Études sur les matières végétales volatiles CLIX (I). Sur l'huile essentielle de carquéja de l'État de Santa Catarina (Brésil). Bull. Soc. Chim. Fr. 292: 1871.
- Pallazo de Mello J. C., Petrovick P. R. (2000) Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. Acta Farm. Bonaerense 19(3): 211-215.
- Silva R. D. S. (1926) Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional.
- Soicke H., Leng-Peschlow E. (1987) Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. Planta Med. 1: 37-39.
- Soria N. (1993) Las especies aladas de *Baccharis* utilizadas como medicinales en Paraguay. Rojasiana 1: 3-12.
- Suttisri R., Kinghorn A. D., Wright A. D., Sticher O. (1994) Neo-clerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. Phytochemistry 35: 443-446.

Toursarkissian M. (1980). *Plantas Medicinales de la Argentina*. Hemisferio Sur. Buenos Aires.

Adresses of authors:

Simões-Pires, C. A.; Limberger, R. P.; Henriques, A. T. (e-mail: amelia@farmacia.ufrgs.br): Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 2752, CEP: 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Debenedetti, S.; Spegazini E.: Cátedra de Farmacognosia and Farmacobotánica Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 115. 1900. La Plata, Prov. de Buenos Aires. Argentina.

Mentz, L. A.; Matzenbacher, N. I.: 3. Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500, prédio 43433, Campus do Vale, CEP: 915001-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Table 1. Collection data of analyzed *Baccharis* species.

Species	Code	Site	Month/year	Voucher
<i>Baccharis articulate</i> (Lam.) Pers.	Bart	Guaíba – RS, Brazil	VII/03	ICN 128446
<i>Baccharis crispa</i> Spreng.	BcGj	Guaíba – RS, Brazil	VII/03	ICN 128451
<i>Baccharis crispa</i>	BcGa	Guaíba – RS, Brazil	VIII/03	ICN 128451
<i>Baccharis crispa</i>	BcGs	Guaíba – RS, Brazil	IX/03	ICN 128451
<i>Baccharis crispa</i>	BcGo	Guaíba – RS, Brazil	X/03	ICN 128451
<i>Baccharis crispa</i>	BcPR	Castro – PR, Brazil	VIII/03	ICN 129040
<i>Baccharis crispa</i>	Bc1004	Villarino – Buenos Aires, Argentina	VI/03	BAF Villamil ^a
<i>Baccharis crispa</i>	Bc1007	Córdoba, Argentina	III/03	BAF Filipa ^a
<i>Baccharis crispa</i>	Bc1008	San Luis, Argentina	V/03	BAF Del Vitto ^a
<i>Baccharis milleflora</i> DC.	Bmil	São Francisco de Paula – RS, Brazil	VIII/01	ICN 128461
<i>Baccharis microcephala</i> (Less.) DC.	Bmic	Guaíba – RS, Brazil	VII/03	ICN 128441
<i>Baccharis myriocephala</i> DC.	Bmyr	São Francisco de Paula – RS, Brazil	VIII/01	ICN 128463
<i>Baccharis stenocephala</i> Baker	Bste	Guaíba – RS, Brazil	VII/03	ICN 128450
<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	Bt1	São Francisco de Paula – RS, Brazil	VIII/01	ICN 128460
<i>Baccharis trimera</i>	Bt2	Rosário do Sul – RS, Brazil	I/02	ICN 128462
<i>Baccharis trimera</i>	Bt3	São Vicente – RS, Brazil	I/02	ICN 128459
<i>Baccharis trimera</i>	Bt4j	Guaíba – RS, Brazil	VII/03	ICN 128440
<i>Baccharis trimera</i>	Bt4a	Guaíba – RS, Brazil	VIII/03	ICN 128440
<i>Baccharis trimera</i>	Bt4s	Guaíba – RS, Brazil	IX/03	ICN 128440
<i>Baccharis trimera</i>	Bt4o	Guaíba – RS, Brazil	X/03	ICN 128440
<i>Baccharis trimera</i>	Bt1005	Punta Lara – Buenos Aires, Argentina	III/02	BAF Lara ^a
<i>Baccharis trimera</i>	Bt1006	Bartolomé Bavio – Buenos Aires,	IV/03	BAF Rivas ^a

		Argentina		
<i>Baccharis trimera</i>	Bt1010	Berazategui Buenos Aires, Argentina	– VI/01	BAF Ringuelet ^a
<i>Baccharis trimera</i>	Bt1009	Córdoba, Argentina	IX/97	BAF Reyna ^a
<i>Baccharis usterii</i> Heering	Bust	Guaíba – RS, Brazil	VII/03	ICN 128444

^aNames of collectors, numbers not provided by the Herbarium.

Table 2. Essential oil yields from *Baccharis* species.

Sample	Percentage yield (v/w)
Bt1 (<i>B. trimera</i>)	0.9
Bt2 (<i>B. trimera</i>)	0.9
Bt3 (<i>B. trimera</i>)	0.9
Bt4 (<i>B. trimera</i>)	0.6
Bt4j (<i>B. trimera</i>)	0.6
Bt4a (<i>B. trimera</i>)	0.6
Bt4s (<i>B. trimera</i>)	0.6
Bt4o (<i>B. trimera</i>)	0.6
BcGj (<i>B. crispa</i>)	0.2
BcGa (<i>B. crispa</i>)	0.2
BcGs (<i>B. crispa</i>)	0.2
BcGo (<i>B. crispa</i>)	0.2
BcPR (<i>B. crispa</i>)	0.2
Bmyr (<i>B. myriocephala</i>)	0.2
Bmil (<i>B. milleflora</i>)	0.1
Bmic (<i>B. microcephala</i>)	0.2
Bste (<i>B. stenocephala</i>)	0.9
Bust (<i>B. usterii</i>)	0.2
Bart (<i>B. articulata</i>)	0.3

Table 3. Relative composition of the volatile constituents in dried aerial parts of *B. trimera* in different collection sites.

R.I.^a	Compound	Bt1	Bt2	Bt3	Bt4
927	alpha-pinene				0.8
967	sabinene		0.4		
970	beta-pinene	2.4	5.7	1.4	5.6
983	myrcene				0.5
1023	limonene	0.8	1.8	1.0	3.4
1039	E-beta-ocimene				1.4
1151	carquejol	3.7	5.5		1.5
1293	carquejyl acetate	36.2	65.8	35.5	68.0
1385	beta-elemene	0.4		2.3	
1409	beta-caryophyllene			1.6	0.5
1470	gamma-gurjunene				3.0
1488	alpha-selinene			1.0	2.2
1493	alpha-muurolene			2.1	
1515	delta-cadinene				0.3
1543	elemol			1.4	
1562	ledol	19.6	10.9	24.2	5.9
1571	espatulenol	1.2		2.8	
1578	globulol	0.6			
1586	epiglobulol	8.3			
1597	humulene oxide I	5.1	1.9	4.7	1.2
1615	1-epi-cubenol				0.5
1644	beta-eudesmol	13.8	2.3	14.8	2.3
1649	alpha-cadinol	1.8		5.7	0.8
Total		93.9	94.3	98.5	97.9
Monoterpene hydrocarbons		3.2	7.9	2.4	11.7
Oxygenated monoterpenes		39.9	71.3	35.5	69.5
Sesquiterpene hydrocarbons		0.4		7.0	6.0
Oxygenated sesquiterpenes		50.4	15.1	53.6	10.7

^aRetention indices on DB-5 column.

Table 4. Relative composition of the volatile constituents in dried aerial parts of *B. trimera* in different months of collection.

R.I.^a	Compound	Bt4j	Bt4a	Bt4s	Bt4o
927	alpha-pinene	0.8	0.4	0.3	0.4
967	sabinene		1.6	1.5	1.5
970	beta-pinene	5.6	12.6	11.3	12.3
983	myrcene	0.5			
1023	limonene	3.4	4.2	4.7	4.0
1039	E-beta-ocimene	1.4	2.6	2.4	2.5
1151	carquejol	1.5	0.6	2.6	1.9
1293	carquejyl acetate	68.0	42.3	60.0	58.5
1385	beta-elemene		1.0		1.0
1409	beta-caryophyllene	0.5			
1470	gamma-gurjunene	3.0	1.5	1.1	1.2
1476	gamma-himachalene			0.4	0.3
1488	alpha-selinene	2.2			
1490	bicyclogermacrene		1.2	0.4	0.5
1515	delta-cadinene	0.3			
1543	elemol		0.5	0.3	0.4
1562	ledol	5.9	7.2	7.1	7.5
1572	espatulenol				
1578	globulol		2.3	0.9	1.2
1587	epiglobulol		1.7	1.8	1.9
1597	humulene oxide I	1.2			
1615	1-epi-cubenol	0.5			
1645	beta-eudesmol	2.3	1.3	3.0	2.9
1649	alpha-cadinol	0.8		0.7	0.5
Total		97.9	81.0	98.5	98.5
Monoterpene hydrocarbons		11.7	21.4	20.2	20.7
Oxygenated monoterpenes		69.5	42.9	62.6	60.4
Sesquiterpene hydrocarbons		6.0	3.7	1.9	3.0
Oxygenated sesquiterpenes		10.7	13.0	13.8	14.4

^aRetention indices on DB-5 column.

Table 5. Relative composition of the volatile constituents in dried aerial parts of *B. crispa* in different sites and months of collection.

I.R.^a	compound	BcGj	BcGa	BcGs	BcGo	BcPR
927	alpha-pinene	0.4				
970	beta-pinene	6.4				
1039	(<i>E</i>)-beta-ocimene	1.0				
1415	beta-caryophyllene	5.3	0.8	5.0	1.2	2.5
1442	alpha-humulene		0.9		1.3	0.9
1470	gamma-muurolene			1.1	0.8	
1475	germacrene D		13.6	0.8	5.4	16.5
1488	alpha-selinene	15.5		5.5	24.7	1.3
1493	alpha-muurolene	0.5		1.0	0.6	
1496	germacrene-A	0.5		0.7	0.6	
1506	gamma-cadinene			0.6	0.4	
1515	delta-cadinene	1.8		2.5	2.2	
1562	ledol	2.0	1.5	1.6	2.7	
1571	spathulenol	13.8	54.2	31.3	2.9	23.6
1579	globulol	3.0	18.6	8.8	6.0	30.0
1588	epiglobulol	16.8	6.8	3.7	18.9	0.5
1596	eudesmol				3.3	2.7
1597	humulene oxide II	1.5				
1622	1-epi-cubenol				0.7	
1630	cedr-8(15)-en-9-alpha-ol					4.3
1637	cubenol	2.6		4.7	2.0	
1649	alpha-cadinol	4.6	1.5	6.5	3.1	
1652	calamemenol ^b					5.1
1666	calamemenol ^b		1.6			6.2
Total		76.6	98.6	75.1	76.4	92.7
Monoterpene hydrocarbons		7.8				
Sesquiterpene hydrocarbons		24.5	14.4	18.5	36.8	20.3
Oxygenated sesquiterpenes		44.3	84.2	56.6	39.6	72.4

^aRetention indices on DB-5 column; ^b isomers not identified.

Table 6. Relative composition of the volatile constituents in dried aerial parts of *Baccharis* species belonging to section Caulopterae other than *B. trimera* and *B. crispa*.

I.R.^a	compound	Bmyr	Bmil	Bmic	Bste	Bust	Bart
928	alpha-pinene	0.3			1.5		3.1
971	beta-pinene	4.8	0.4		41.3		30.1
983	myrcene				1.3		1.2
1023	limonene	0.7			27.3	2.4	7.1
1026	1,8-cineol	0.5					
1171	terpin-4-ol	0.5					
1184	alpha-terpineol		1.4				2.6
1370	alpha-copaene			0.7			
1385	beta-elemene		1.7	1.7		6.0	
1409	beta-caryophyllene		19.7	5.2	3.6	1.6	4.4
1442	alpha-humulene			1.7			
1455	allo-aromadendrene			4.5			
1470	gamma-gurjunene		23.6	8.3	3.5		3.0
1471	alpha-himachalene			3.9			
1478	beta-selinene		0.5				
1488	alfa-selinene		20.7		1.6		
1493	alpha-muurolene			4.4			
1496	germacrene-A		1.2				
1503	gamma-cadinene		0.3				
1515	delta-cadinene		1.9	3.6			4.2
1562	ledol	2.5	1.3	1.9			
1572	spathulenol	5.6	1.7	8.6	6.4	37.9	9.7
1576	caryophyllene oxide	6.6		6.5			
1580	globulol	14.5	2.9	8.8	5.7	18.4	4.1
1589	epiglobulol	45.8	2.3	4.5	4.3	5.7	10.5
1597	humulene oxide I	3.3					
1638	tau-cadinol	0.3	1.3	9.5			6.3
1644	beta-eudesmol	9.8					
1650	alpha-cadinol	1.8	2.7	13.5		10.1	7.3

Total	98.4	83.9	85.6	96.5	82.1	93.6
Monoterpene hydrocarbons	5.8	0.4		71.4	2.4	41.5
Oxygenated monoterpenes	2.4					2.6
Sesquiterpene hydrocarbons		71.3	32.3	8.7	7.6	11.6
Oxygenated sesquiterpenes	90.2	12.2	53.3	16.4	72.1	37.9

^aRetention indices on DB-5 column.

Table 7. Percentage amount of carquejyl acetate in hexane extract from *B. trimera* and *B. crispera* collected in Brazil and Argentina.

Sample	Carquejyl acetate (%)
Bt4	30.7
Bt1005	43.2
Bt1006	76.3
Bt1009	85.1
Bt1010	30.7
BcGj	-
Bc1004	-
Bc1007	-
Bc1008	-

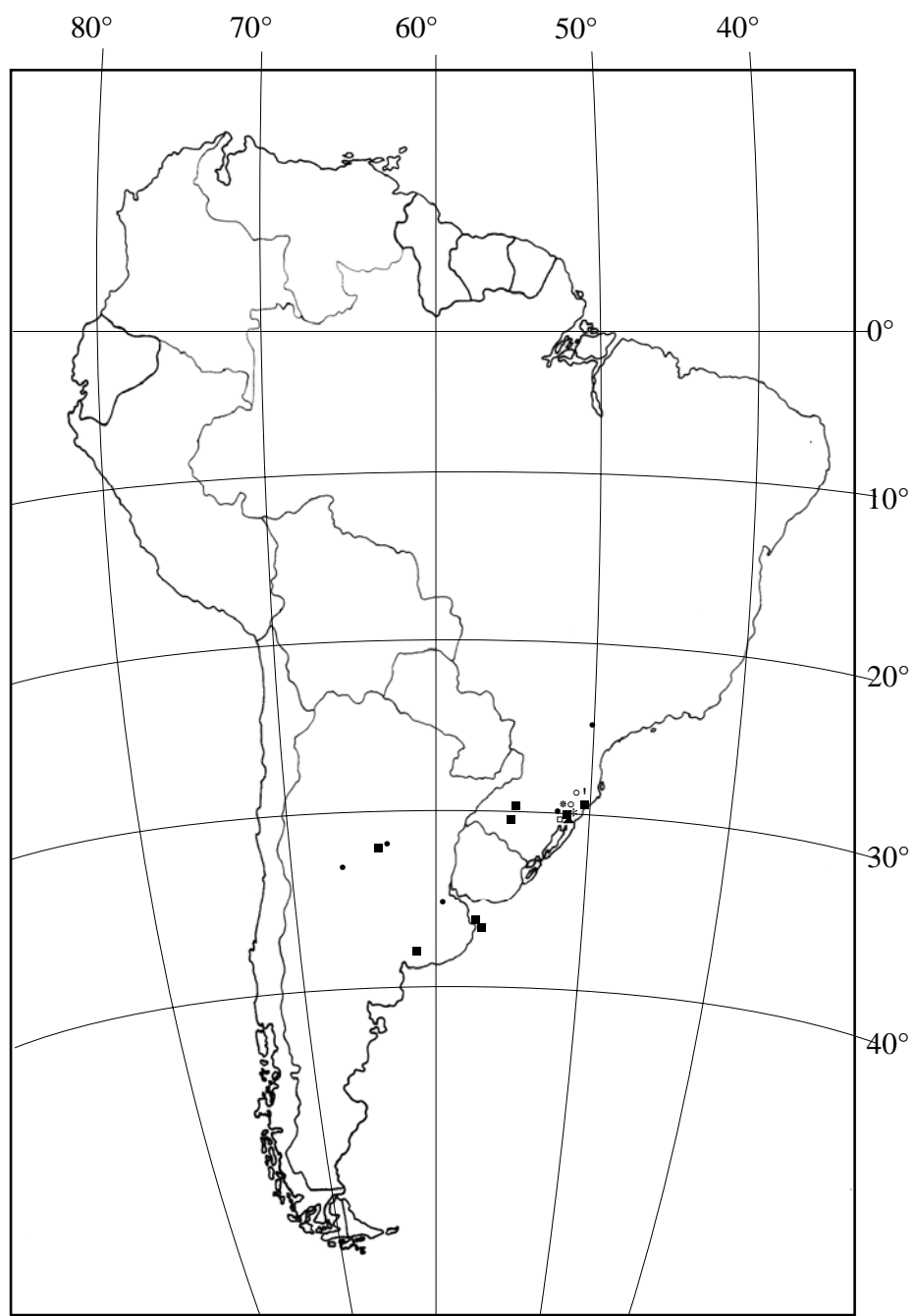


Figure1. Map with the collection sites of the eight species of *Baccharis* investigated (■ *B. trimera*, • *B. crispera*, ◻ *B. stenocephala*, ◦ *B. milleflora*, ▲ *B. usterii*, * *B. articulata*, * *B. microcephala*, * *B. myriocephala*).

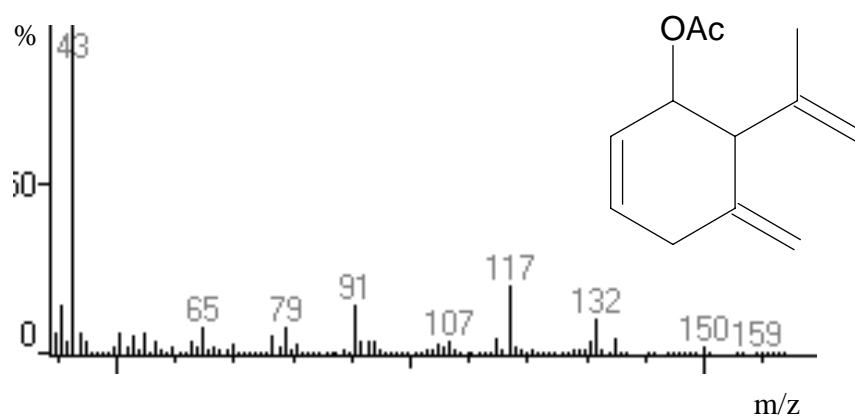


Figure 2. Chemical structure and mass spectrum of carquejyl acetate, a marker compound for identification of *Baccharis trimera*.