UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

JOÃO PAULO BARRETO DE SOUSA

Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosa e líquida.

Ribeirão Preto

2007

JOÃO PAULO BARRETO DE SOUSA

Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosa e líquida.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Sousa, João Paulo Barreto

Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosa e líquida. Ribeirão Preto, 2007.

164 p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1 - *Baccharis dracunculifolia*; 2 - Cultivo; 3 - Variação sazonal; 4 - cromatografia de fase gasosa; 5 - Própolis verde; 6 - Validação de metodologia analítica – CLAE.

FOLHA DE APROVAÇÃO

João Paulo Barreto de Sousa

Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosa e líquida.

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre. Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, *Maria Aparecida Barreto e Dimar José de Sousa*. Apesar do pouco tempo de convívio em nosso meio, tenho certeza que de alguma forma vocês acompanham minha vida e minhas decisões. Sei que durante esse curto período de tempo vocês fizeram tudo que podiam para que eu estivesse sempre feliz e conseguisse alcançar meus objetivos. Dentre os diversos ensinamentos, frases como “*Deus sabe o que faz; tudo tem sua hora; faça o bem sem olhar quem*” estarão sempre nos meus pensamentos e servirão como um lema de vida até o fim de meus dias.

Ao exemplar tio *Jesus José Ferreira*. Durante o tempo em que ficou ao nosso lado, ele sempre me incentivou e apoiou, principalmente em relação aos estudos. Mesmo não entendendo claramente sobre a Química dos Produtos Naturais, em nossas conversas, realizadas na sua inesquecível área de lazer, ele sempre finalizava: “*Meu filho o mais importante é que você está tentando*”.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

À Lidiane Cristina Silva, minha querida esposa, que às vezes, atua como grande conselheira, me passando lucidez e fé indicando os caminhos que devemos seguir, além de apoiar incondicionalmente o meu trabalho, entendendo minhas ausências e os meus estresses e, sobretudo, de estar sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins da vida.

À Maria Eleuza Ferreira de Sousa, minha maravilhosa avó que já suportou grandes perdas durante sua vida, mas mesmo assim, continua dando exemplo de força e determinação. Tenho certeza que tais exemplos nunca serão esquecidos e fico muito feliz de poder contar com sua presença até os dias atuais.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Nossa história começou durante a iniciação científica realizada no Laboratório de Pesquisa Química da Universidade de Franca. Naquele tempo eu era um aluno regular e não entendia praticamente nada sobre pesquisa. Mesmo assim, o Prof. Jairo assumiu o desafio e concordou em ser meu orientador. Resumindo, passaram-se dois anos e os resultados obtidos, relacionados à IC, foram regulares, apesar do empenho do orientador. Foi então que comecei a entender melhor a pesquisa e percebi que estava deixando escapar várias oportunidades, inclusive a de ter uma profissão interligada ao bem estar da humanidade. Mesmo com esse período de turbulência, o Prof. Jairo não fechou as portas e continuou me apoiando. Assim, expresso de forma singela os meus sinceros agradecimentos pela persistência, chances, ensinamentos, tanto científicos como de vida e, em especial, pela confiança ao longo desses anos.

Às “abelhas”

Diante de tantas dúvidas no período de IC, um dos fatores que me despertou enorme interesse pela pesquisa foi o comportamento das abelhas, especialmente as interações inseto-planta, ecologia química e os produtos derivados da colméia. Durante aproximadamente dezoito meses em viagens mensais, realizando trabalho de campo relacionado à manutenção de diversas colméias, pude aprender na prática alguns ensinamentos sobre essas comunidades extremamente organizadas. Estes ensinamentos juntamente com o acréscimo de novas informações foram pontos cruciais para prosseguir no caminho em que me encontro hoje. Desse modo, agradeço sinceramente, a oportunidade, os conselhos e a inovação de idéias as quais foram de suma importância para meu aprendizado.

À família

Todos os meus familiares, principalmente os que residem nas cidades de Uberaba-MG e Franca-SP, de forma geral, acompanham minha vida desde criança e todos me consideram uma pessoa especial. Fico muito feliz em perceber a existência desse sentimento comum entre nós. Por isso, fica difícil de citar nomes ou eventuais acontecimentos marcantes tendo em vista o grande número de páginas que seria necessário para expor algumas de nossas histórias. Assim, deixo registrado este agradecimento especial a todos.

AGRADECIMENTOS

- ✎ Aos exemplares Técnicos do Laboratório de Farmacognosia, Valter Lopes, Mário e José Luis, por apoiarem meu trabalho fornecendo assistência incondicional e pela forte amizade nesse período;
- ✎ Ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa pela, confiança, amizade e pela sinceridade que há em nossas reuniões;
- ✎ Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pelos conselhos e ensinamentos peculiares sobre IE nas aulas de RMN;
- ✎ Ao Prof. Dr. Luiz Alexandre P. Freitas pela preciosa colaboração na qualificação e por oferecer oportunidade de desenvolver novos trabalhos em conjunto;
- ✎ À Profa. Dra. Regina de Queiroz, pela suas valiosas dicas na qualificação e sua avaliação sobre o presente trabalho;
- ✎ Ao Prof. Airton José Carbi e seus familiares pela atenção e compreensão durante os ensinamentos nas aulas de inglês;
- ✎ Ao chegar ao Laboratório de Farmacognosia, encontrei estudantes de diferentes localidades com distintas personalidades. Eles me ensinaram diversas lições de vida e bancada. Hoje, estes estudantes são Mestres e Doutores e tenho enorme orgulho em dizer que continuo aprendendo com eles novos ensinamentos. Tenho certeza que o sentimento comum de grande amizade e companheirismo é um dos principais fatores que amplia nossos horizontes, bem como nossas esperanças. Agradeço aos amigos: Niede, Ademar, Luiz Elídio, Nilton, Gustavo, Sérgio Ambrósio, Sérgio Faloni., Ricardo, Juliana, Marley, Leonardo, Paulo, Fábio, Elizete, Karin e Mileide;
- ✎ Aos amigos, Paula Bueno, Ana Silvia, Renata, Wanessa, Iara, Willian e Patrícia pelos exemplos de força, amizade e o ótimo convívio durante as disciplinas e no dia-a-dia no laboratório;
- ✎ Ao amigo Alexandre Freire Pinto, por ter participado efetivamente no início dessa nova caminhada me incentivando e assessorando, principalmente nos momentos difíceis da vida;

- ✎ Ao amigo Mateus Freire Leite, pela confiança comum, adquirida em curto espaço de tempo e pelos ensinamentos marcantes de Farmacotécnica;
- ✎ Aos amigos que desenvolvem pesquisas em outros laboratórios, Warley, Denise, Luciano Michelle, Margaret, Denise (bioquímica), Laura, Fernando, Janice, Lívia, Gisele, Cristiane, Gobbo, Michel, Renato, Julierme, Neri, Luciana, Ana Paula e Ivan, a todos muito obrigado pelos exemplos de confiança, incentivo e solidariedade;
- ✎ Aos inesquecíveis amigos de graduação, Daniel P. de Aguirre, José Moisés C. Jr e Joana D'arc F. Paulino. Foram cinco anos bem aproveitados com diversas reuniões em mesas de plástico que ficarão marcadas em nossas memórias para sempre;
- ✎ A todos os professores da Universidade de Franca, em especial aos professores que fazem parte do Núcleo de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnológicas, bem como todos professores que fazem parte do programa de Pós-Graduação da FCFRP-USP, os quais vêm contribuindo de forma efetiva na minha formação, agradeço por todo incentivo, compreensão e aprendizado;
- ✎ Ao programa de Pós-Graduação da FCFRP – USP e aos funcionários Rosana, Eleni, Ana e Carlos pela colaboração e compreensão
- ✎ A todos os funcionários e ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, por toda infra-estrutura oferecida na realização do curso de Mestrado;
- ✎ Ao bom Deus, por todas as bençãos, inspirações e pela oportunidade de prosseguir no caminho em que me encontro hoje, com a possibilidade de ajudar ao próximo, nunca perdendo as esperanças frente aos obstáculos da vida.

Agradeço aos colaboradores do presente trabalho;

- ✎ Prof. Dr. Pedro Mellilo de Magalhães, CPQBA – UNICAMP, pelo estudo de cultivo;
- ✎ Prof. Dra. Carmen Lúcia Queiroga, CPQBA – UNICAMP, pela identificação dos voláteis;
- ✎ Prof. Dr. Nelson Ivo Matzenbacher, pela confirmação das espécies;
- ✎ Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho, UNIFRAN, pela identificação dos padrões cromatográficos;
- ✎ Ao aluno de Doutorado (FFCLRP) Luiz Elídio Gregório, pela participação nas análises de Precisão Intermediária;
- ✎ Ao aluno de Doutorado (FCFRP) Mateus Freire Leite, pela realização dos Estudos Estatísticos;
- ✎ À aluna de Mestrado (FCFRP) Paula C. P. Bueno, pelos ensinamentos sobre validação de método analítico e pela participação na confecção das Curvas Analíticas;
- ✎ À aluna de Iniciação Científica (FCFRP) Renata Fabiane Jorge, pela participação nas análises de Sazonalidade dos Óleos Essenciais;
- ✎ À FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; **Processo N° 04/13005-1**, pela bolsa concedida.

Resumo

Baccharis dracunculifolia é conhecida por sua interação com insetos, especialmente *Apis mellifera* L., por possuir ampla diversidade de metabólitos secundários, bem como, por apresentar várias atividades biológicas. Suas folhas são pontuadas por tricomas secretores ricos em metabólitos secundários e também apresentam dutos secretores, estruturas que produzem e armazenam os óleos essenciais. Os metabólitos secundários de *B. dracunculifolia* são usados pelas abelhas *A. mellifera* para a produção de própolis “verde”, que é extremamente valorizada pelas indústrias farmacêuticas, pois apresenta atividades antitumoral, antimicrobiana, antiinflamatória, antiulcerogênica, dentre outras. Considerando estas importantes atividades biológicas, e a necessidade de padronização da própolis, os objetivos do presente trabalho foram: desenvolver metodologia analítica por cromatografia gasosa para quantificar os constituintes majoritários presentes no óleo essencial da planta cultivada; desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE capaz de garantir a autenticidade dos extratos hidroalcoólicos de *B. dracunculifolia*, bem como de própolis verde; determinar o perfil de variabilidade dos componentes voláteis e fixos de 10 diferentes acessos cultivados durante o período de 12 meses. De acordo com os resultados obtidos, o cultivo da espécie foi eficiente, observando-se rápido crescimento, cerca de 1 m de altura a partir do quarto mês de plantio, obtendo-se boa quantidade de biomassa, em média de 400 g por acesso, no período de análise. Com a metodologia desenvolvida para os voláteis foi possível analisar 480 amostras nos 12 meses de amostragem e identificar 14 componentes presentes no óleo das folhas cultivadas. As análises semiquantitativas indicaram que o nerolidol é o volátil majoritário, correspondendo em aproximadamente 50 % do óleo, sendo detectado durante todo ano e, por isso, o mesmo deve ser o maior responsável pelas propriedades odoríferas intensas, as quais são extremamente valorizadas pelas indústrias de fragrâncias e cosméticos. Além disso, com base no perfil de variabilidade dos voláteis, a época de floração foi a menos produtiva em termos de óleo essencial, em média de 0,3 %. Por outro lado, o período de fevereiro a abril foi o mais produtivo, em média de 1 % de óleo a partir das folhas secas. Adicionalmente, dentre os acessos cultivados, somente o 4 não é viável para o cultivo em larga escala. Esta população apresentou diferenças morfológicas em relação às folhas e se destacou pela baixa produtividade de óleo ao longo do ano. A metodologia desenvolvida por CLAE, permitiu distinguir e quantificar simultaneamente 10 padrões cromatográficos (ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, aromadendrina-4'-metil éter, drupanina, isosakuranetina, artepelin C, bacarina e ácido 2,2-dimetilcarboxietenil-2H-1-benzopirânico), os quais podem ser encontrados tanto em amostras hidroetanólicas de alecrim do campo bem como em amostras hidroalcoólicas de própolis verde. Além disso, todas as características de desempenho do método apresentaram resultados aceitáveis, conforme sugeridos pela Anvisa e Inmetro, e podem garantir com segurança e confiabilidade a quantificação dos metabólitos de interesse. Na análise das substâncias fixas, observou-se que o ácido caféico é o componente majoritário, correspondendo em média de 60 % dos fenólicos em análise. O perfil de variabilidade do artepelin C e bacarina foi crescente no decorrer dos meses em estudo, demonstrando teores mais elevados no último trimestre de amostragem, correspondendo em média de 8 e 25 % respectivamente. O flavonóide aromadendrina-4'-metil éter demonstrou concentrações diferenciadas durante o ano. Todavia, este flavonóide juntamente com o ácido caféico podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos da planta cultivada, já que os mesmos foram detectados durante todo ano e em todas as populações. Contudo, considerando a produção, tanto dos voláteis como dos compostos fenólicos, todos os acessos cultivados, com exceção da população 4, podem ser cultivados em larga escala para estes propósitos.

Abstract

Baccharis dracunculifolia is well known for its interaction with insects, mainly *Apis mellifera* L., for bearing a wide range of secondary metabolites, as well as for displaying many biological activities. Its leaves are punctuated with secretory trichomes rich in secondary metabolites and secretory ducts, which produce and store essential oils. *B. dracunculifolia* secondary metabolites are used by *Apis mellifera* to produce “green” propolis, which is of great importance for pharmaceutical industry, since it displays anticancer, antibacterial, anti-inflammatory and antiulcer, among other activities. Considering the displayed biological activities by *B. dracunculifolia* and the need to standardize the green propolis raw material, the aims of the present work were: a) to develop a gas chromatography analytical methodology to quantify the major volatile constituents in its cultivated populations; b) to develop and validate a HPLC method to quantify the major phenolic compounds present in the aerial parts of *B. dracunculifolia*, and in the crude green propolis. The developed chromatographic tools were used to study the seasonal influence in the biosynthesis of both volatile oils and phenolic components in 10 different cultivated populations during one year period. All the cultivated populations grew quite well, since it achieved 1 m in height in the fourth month of growth, and it produced an average of 400 g of biomass per individual. Using the developed GC methodology it was possible to analyze 480 samples, and to quantify 14 volatile components of the leaves during one year of its cultivation. The GC analysis indicated that nerolidol was the major compound present in the volatile fraction, about 50 %, which was detected during the entire experiment, and it shall be the most responsible compound for its intense fragrance with importance for cosmetic industry. On one hand, it was observed that during the flowering period the volatile oil production was lower, about 0.3 % w/w, and on the other hand, during the months of February, March and April, its production was higher, about 1 % w/w in dry leaves. Besides, it was observed that population 4 stood out, since it was morphologically different from all others and produced lower yielding of volatile components during the entire year. The HPLC developed methodology allowed to separate and quantify 10 phenolic (caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid, cinnamic acid, aromadendrin-4'-methyl ether, drupanin, isosakuranetin, artepillin C, bacharin, 2,2-dimethylcarboxyethenyl-2H-1-benzopyran acid) compounds simultaneously in both *B. dracunculifolia* and green propolis ethanol extracts. Moreover, all the evaluated validation parameters displayed acceptable results, as established by Brazilian Governmental regulation agencies, Anvisa and Imetro, and it provide very good results for the accurate quantification of phenolic compounds of interest. The analysis indicated that caffeic acid was the major compound present in the analyzed samples, and it corresponded to 60 % of the total quantified phenolic compounds. The contents of artepelin C and bacharin varied greatly during the studied period, displaying higher contents during the last trimester of 8 e 25 %, respectively. The flavonoid aromadendrin-4'-methyl ether has not displayed a coherent pattern during the experiment, since it variable greatly. However, aromadendrin along with caffeic acid could be considered good chemical markers for the analysis of cultivated *B. dracunculifolia*, considering that both were found in all the samples. Overall, considering the production of both the volatile and phenolic compounds, all the cultivated populations, with exception of the population 4, could be cultivated in large scale for these purposes.

Lista de Figuras

Figura 1: Fotos ao microscópio eletrônico dos tricomas glandulares de <i>B. dracunculifolia</i>	31
Figura 2: Arbusto adulto de <i>B. dracunculifolia</i> cultivado no CPQBA-UNICAMP, Campinas-SP	33
Figura 3: Detalhe do ramo com sementes de <i>B. dracunculifolia</i>	33
Figura 4: (a) <i>Apis mellifera</i> coletando ápices foliares de <i>Baccharis dracunculifolia</i> ; (b) guardando o material coletado dentro de suas corbículas, nas patas; (c) em seguida o material será transportado para a colméia; (d) na colméia o material é misturado com a secreção salivar para a formação da (e) própolis verde	37
Figura 5: Esboço que representa o campo de cultivo e demonstra como foi realizada a plantação dos indivíduos, dividida entre acessos (01-10) e repetições (I, II, III, IV).....	43
Figura 6: Destilador por arraste a vapor d'água utilizado para a extração de óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> em escala piloto	45
Figura 7: Hidrodestilação utilizando-se aparelho de Clevenger	46
Figura 8: Cromatógrafo de fase gasosa HP 6890N plus	47
Figura 9: Cromatógrafo de fase líquida Shimadzu	52
Figura 10: Agitador mecânico tipo shaker.....	54
Figura 11: Cultivo de diferentes acessos de <i>B. dracunculifolia</i> a partir da produção de mudas em tubetes.....	63
Figura 12: <i>B. dracunculifolia</i> no intervalo de dois meses de cultivo.....	63
Figura 13: Acessos cultivados a partir do quarto mês de plantio.....	64
Figura 14: <i>B. dracunculifolia</i> com 12 meses de plantio	64
Figura 15: Foto da base do caule de <i>B. dracunculifolia</i> destacando a rebrota após corte aos 16 meses	65
Figura 16: Biomassa (g de folhas secas/planta) dos 10 acessos de <i>B. dracunculifolia</i> colhidos aos 16 meses, considerando o processamento total da repetição I.....	66

Figura 17: Rendimento de óleo essencial a partir de folhas secas dos 10 acessos (repetição I) de <i>B. dracunculifolia</i> colhidos aos 16 meses	66
Figura 18: Rendimento de óleo por planta de cada acesso cultivado	67
Figura 19: Fração A: g de óleo/acesso, após a 1ª hora de extração. Fração B: g de óleo/acesso, após 2ª hora de extração. Total: A + B.....	68
Figura 20: (A) Perfil do óleo essencial por CG – DIC, resolução e separação dos componentes; (B) Substâncias avaliadas para escolha do padrão interno: cineol (3,459 min); tetrametilbenzeno (4,149 min); piperonal (7,194 min); vanilina (8,649 min); cumarina (9,715 min); trimetoxibenzeno (15,742 min) e benzofenona (16,540 min). (C) Perfil do óleo com adição do piperonal (Tr 7,187 min)	71
Figura 21: Perfil cromatográfico por CG – EM do óleo de Alecrim do Campo cultivada	73
Figura 22: Perfil cromatográfico dos padrões de hidrocarbonetos C ₉ , C ₁₀ , C ₁₁ , C ₁₂ , C ₁₃ , C ₁₄ , C ₁₅ , C ₁₆ , e C ₁₇ por CG – EM.....	75
Figura 23: Co-injeção dos padrões de hidrocarbonetos com a adição do óleo de <i>B. dracunculifolia</i> por CG – EM	75
Figura 24: (A) Perfil cromatográfico dos padrões de hidrocarbonetos C ₉ , C ₁₀ , C ₁₁ , C ₁₃ , C ₁₄ , C ₁₅ , C ₁₆ , C ₁₇ , C ₁₈ , C ₁₉ , e C ₂₀ . (B) Co-injeção dos padrões de hidrocarbonetos com adição do óleo de Alecrim do Campo por CG – DIC	76
Figura 25: Estruturas químicas de α -pineno (1), β -pineno (2), limoneno (3), <i>trans</i> -cariofileno (4), aromadendreno (5), α -humuleno (6), germacreno D (7), biciclogermacreno (8), δ -cadineno (9), nerolidol (10), espatulenol (11), viridiflorol (12), guaíol (13), α -muurolol (14)	79
Figura 26: Perfil cromatográfico do óleo, obtido por CG –DIC. α -pineno (1), β -pineno (2), limoneno (3), <i>trans</i> -cariofileno (4), aromadendreno (5), α -humuleno (6), germacreno D (7), biciclogermacreno (8), δ -cadineno (9), nerolidol (10), espatulenol (11), viridiflorol (12), guaíol (13), α -muurolol (14) e piperonal (padrão interno)	80

Figura 27a: Perfis de variabilidade dos componentes voláteis a partir das folhas de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	82
Figura 27b: Perfis de variabilidade dos componentes voláteis a partir das folhas de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	83
Figura 27c: Perfis de variabilidade dos componentes voláteis a partir das folhas de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	84
Figura 27d: Perfis de variabilidade dos componentes voláteis e da produtividade de óleo mensal a partir das folhas de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	85
Figura 28a: Percentual relativo dos acessos 1, 2 e 3. Legenda: monoterpenos, sesquiterpenos, nerolidol, espatulenol e sesquiterpenos oxigenados minoritários, respectivamente	89
Figura 28b: Percentual relativo de classes e componentes dos acessos 4, 5, e 6.....	90
Figura 28c: Percentual relativo de classes e componentes dos acessos 7, 8 e 9	91
Figura 28d: Percentual relativo de classes e componentes do acesso 10 durante o período de amostragem. Legenda: monoterpenos, sesquiterpenos, nerolidol, espatulenol e sesquiterpenos oxigenados minoritários, respectivamente	92
Figura 29: (A) perfil cromatográfico dos padrões, (B) perfil da amostra e (C) ampliação de (A). Os números seguem a legenda mostrada na tabela 8	98
Figura 30a: Gráficos utilizados para a obtenção das faixas lineares dinâmicas	101
Figura 30b: Gráficos utilizados para a obtenção das faixas lineares dinâmicas	102
Figura 30c: Gráficos utilizados para a obtenção das faixas lineares dinâmicas. Todas as faixas são representadas pelos intervalos de 95 a 105 %, respeitando o erro relativo de ± 5 %	103
Figura 31a: Curvas analíticas dos respectivos fenólicos, respeitando a faixa linear de trabalho.....	104
Figura 31b: Curvas analíticas dos respectivos fenólicos, respeitando a faixa linear de trabalho	105
Figura 31c: Curvas analíticas dos respectivos fenólicos, respeitando a faixa linear de trabalho	106
Figura 32: Matriz previamente esgotada com auxílio de aparelho de Soxhlet	110
Figura 33: Curvas analíticas obtidas com os dados da tabela 13	113

Figura 34: Perfis cromatográficos de ácido caféico em aproximadamente 1,10 µg/mL	115
Figura 35: Rendimento total dos compostos fenólicos das folhas secas de alecrim do campo cultivado. Cada barra representa a média entre os 10 acessos e a soma dos componentes	122
Figura 36a: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	123
Figura 36b: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	124
Figura 36c: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	125
Figura 36d: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	126
Figura 36e: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	127
Figura 36f: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	128
Figura 36g: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	129
Figura 36h: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	130
Figura 36i: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	131
Figura 36j: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	132
Figura 37: (A) perfil cromatográfico dos padrões. 1-ácido caféico, 2-ácido cumárico, 3-ácido ferúlico, 4-ácido cinâmico, 5-aromadendrina-4'-metil éter, 6-drupanina, 7-isosakuranetina, 8-artepelin C, 9-bacarina e 10-ácido 2,2 dimetil-6-carbóxi-tenil-2H-1-benzopirano. (B) amostra de própolis verde. (C) ampliação de (A).....	164

Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros de desempenho, (INMETRO, ANVISA, ICH, USP, FDA e IUPAC) diferenças e similaridades	26
Tabela 2: Acessos e locais de coleta de <i>B. dracunculifolia</i>	42
Tabela 3: Programa de temperatura utilizado para o forno (CG – DIC).....	47
Tabela 4: Gradiente multi-linear de eluição utilizado na CLAE.....	53
Tabela 5: Parâmetros e equações utilizados para avaliar a adequabilidade do sistema	55
Tabela 6: Fatores e matriz de fatores para determinação da robustez do método de extração	59
Tabela 7: Pesos moleculares, tempos e índices de retenção, dos constituintes identificados	78
Tabela 8: Nomes, tempos de retenção, λ máximo e estruturas dos padrões cromatográficos.....	95
Tabela 9: Resultados que representam a adequabilidade do sistema	97
Tabela 10: Parâmetros das curvas analíticas de todos os compostos examinados	107
Tabela 11: Repetibilidade e precisão intermediária dos componentes em análise.....	108
Tabela 12: Determinação da exatidão e recuperação de ácido caféico	111
Tabela 13: Dados para obtenção das curvas analíticas.....	113
Tabela 14: Estudos estatísticos e os resultados para LD e LQ.....	114
Tabela 15: Resultados obtidos do teste de <i>Youden</i> * que representam a robustez do método	118
Tabela 16: Fórmulas para o cálculo das concentrações dos fixos.....	119
Tabela 17: Concentrações de α -pineno em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	143
Tabela 18: Concentrações de β -pineno em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	144
Tabela 19: Concentrações de limoneno em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	145
Tabela 20: Concentrações de trans-cariofileno em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	146

Tabela 21: Concentrações de aromadendreno em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	147
Tabela 22: Concentrações de α -humuleno em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	148
Tabela 23: Concentrações de germacreno D em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	149
Tabela 24: Concentrações de biciclogermacreno em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	150
Tabela 25: Concentrações de δ -cadineno em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	151
Tabela 26: Concentrações de nerolidol em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	152
Tabela 27: Concentrações de espatulenol em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	153
Tabela 28: Concentrações de viridiflorol em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	154
Tabela 29: Concentrações de guaíol em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada	155
Tabela 30: Concentrações de α -muurulol em mg/100g em <i>B. dracunculifolia</i> cultivada.....	156
Tabela 31: Concentrações de ácido caféico em % (g/100g)	157
Tabela 32: Concentrações de ácido cumárico em % (g/100g)	158
Tabela 33: Concentrações de ácido ferúlico em % (g/100g)	159
Tabela 34: Concentrações de aromadendrina-4'-metil éter em % (g/100g)	160
Tabela 35: Concentrações de isosakuranetina em % (g/100g).....	161
Tabela 36: Concentrações de artepelin C em % (g/100g).....	162
Tabela 37: Concentrações de bacarina em % (g/100g)	163

SUMÁRIO

1 Introdução	22
1.1 Considerações gerais	22
1.2 Validação de métodos analíticos	24
1.2.1 Características de desempenho: definições gerais	26
1.3 A família Asteraceae e o gênero <i>Baccharis</i>	29
1.3.1 Metabólitos secundários do gênero <i>Baccharis</i> e a presença de tricomas glandulares	30
1.4 <i>Baccharis dracunculifolia</i> De Candolle	32
1.5 A importância dos óleos essenciais e a composição química da fração volátil das partes aéreas de <i>Baccharis dracunculifolia</i>	34
1.6 Interação entre <i>Apis mellifera</i> e <i>B. dracunculifolia</i> na elaboração da própolis “verde”	35
1.7 Aspectos agronômicos e de cultivo no estudo de plantas medicinais	39
2 Objetivos	40
3 Materiais e métodos	41
3.1 Cultivo, coleta e processamento do material vegetal	41
3.1.1 Colheita de <i>B. dracunculifolia</i> e extração do óleo volátil em escala piloto	44
3.1.2 Obtenção do óleo essencial de cultivares de <i>B. dracunculifolia</i> para análise sazonal	45
3.2 Análise dos voláteis por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG – DIC)	46
3.3 Identificação dos principais componentes presentes na fração volátil	48
3.3.1 Determinação dos Índices de Retenção	48
3.4 Análises semiquantitativas dos voláteis obtidos das folhas de <i>B. dracunculifolia</i>	50
3.5 Estudos fitoquímicos realizados com <i>B. dracunculifolia</i>	50
3.6 Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizado para análises das substâncias fixas e validação da metodologia analítica	51

3.6.1 Preparação das amostras para análise por cromatografia líquida de alta eficiência	52
3.7 Características de desempenho para validação do método analítico por CLAE.....	54
3.7.1 Seletividade	54
3.7.2 Linearidade	55
3.7.3 Precisão.....	56
3.7.4 Exatidão.....	57
3.7.5 Limite de detecção e limite de quantificação (LD e LQ)	58
3.7.6 Robustez	59
3.8 Análises quantitativas das substâncias fixas presentes nos extratos hidroalcoólicos das partes aéreas de cultivares de <i>B. dracunculifolia</i>	60
3.9 Tratamento dos resultados e análise estatística.....	61
4 Resultados e discussão	62
4.1 Cultivo, coleta e processamento do material vegetal no estudo de sazonalidade	62
4.2 Extração do óleo essencial dos acessos cultivados	68
4.3 CG – DIC: Separação dos componentes voláteis e o uso de padrão interno	69
4.4 Identificação dos voláteis presentes no óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i>	72
4.4.1 Perfil cromatográfico do óleo por CG – EM	72
4.4.2 Índice de retenção por CG – EM e CG – DIC	74
4.5 Influência sazonal dos voláteis em estudo	80
4.5.1 Variabilidade dos componentes em relação às folhas	80
4.5.2 Variabilidade das classes e componentes em relação ao óleo	88
4.6 Padrões cromatográficos e composição química dos extratos hidroalcoólicos.....	94
4.7 Características de desempenho para validação do método por CLAE	96
4.7.1 Método cromatográfico e seletividade	96
4.7.2 Linearidade	100

4.7.3 Precisão (repetibilidade e intermediária)	108
4.7.4 Exatidão e recuperação	109
4.7.5 Sensibilidade.....	112
4.7.6 Robustez	116
4.8 Influência da sazonalidade na biossíntese das substâncias fixas	119
4.8.1 Avaliação dos componentes fixos das folhas em relação a sazonalidade.....	120
4.8.2 Perfil sazonal dos compostos fixos nos extratos hidroalcoólicos	122
5 Conclusões.....	135
6 Referências bibliográficas.....	137
7 Anexos	143
7.1 Concentrações obtidas para os voláteis.....	143
7.2 Concentrações para os componentes fixos.....	157
7.3 Perfis cromatográficos dos padrões e amostra de própolis verde	164

1 Introdução

1.1 Considerações gerais

O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza, pelos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador não somente pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado (VIEGAS Jr; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque à civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa (VIEGAS Jr; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Historicamente, a medicina e os produtos naturais têm sido associados através do uso tradicional de medicamentos e porções naturais (BUTLER, 2004). O uso de fontes naturais, predominantemente plantas, como medicamento desenvolveu-se a partir do início do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas, com base científica (KINGHORN, 2001). Isso possibilitou o isolamento de princípios ativos de plantas, já então conhecidas como medicinais. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, tais como aspirina, morfina, quinina e pilocarpina, as quais, até hoje, ainda são empregadas no tratamento de certas doenças (BUTLER, 2004).

No sentido de descobrir novos compostos ativos, técnicas de isolamento e caracterização química e farmacológica continuam sendo desenvolvidas até os dias atuais. Numerosos métodos, incluindo química sintética, química combinatória e modelagem molecular têm sido utilizados na busca de novas entidades químicas bioativas (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Paralelamente, ocorreu o desenvolvimento de métodos de ensaios biológicos automatizados (“high – throughput screening” – HTS), que passaram a permitir a identificação e a avaliação *in vitro* de milhares de substâncias capazes de interagirem com os alvos terapêuticos ensaiados em escala, inicialmente micromolar e, atualmente, nanomolar (BUTLER, 2004; VIEGAS Jr; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Apesar dos avanços tecnológicos para a pesquisa de novos compostos ativos, os produtos naturais, em especial plantas medicinais, permanecem como importantes fontes de novos fármacos, novos líderes e novas entidades químicas (BUTLER, 2004). Somente nos anos de 2001 e 2002, aproximadamente 25 % de fármacos consagrados e amplamente distribuídos em todo mundo eram de origem ou derivados naturais (BUTLER, 2004). Recentemente, Newman, Gragg e Snader (2003) concluíram que no período 1981-2002 cerca de 28 % de novas moléculas com atividades biológicas eram de fontes naturais. Durante este período 20 % de novas entidades químicas foram consideradas imitações de compostos naturais, significando que os compostos sintéticos eram derivados de estudos com produtos naturais. A combinação dessas categorias na pesquisa com fontes naturais contabilizaram aproximadamente 48 % de novas moléculas entre 1981-2002 (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Considerando estes aspectos, muitas plantas brasileiras, freqüentemente utilizadas pela população, ainda não foram estudadas e os seus princípios ativos ainda não foram identificados para validá-las como medicamentos ou para aproveitá-las economicamente (GUERRA; NODARI, 1999).

Neste contexto, o Brasil é um país privilegiado, pois conta com a maior biodiversidade genética vegetal do mundo, possuindo mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (GUERRA; NODARI, 1999).

Uma importante fonte de biodiversidade é o cerrado brasileiro, o qual ocupa cerca de 23 % do território do país numa área de 2 milhões de Km², apesar de ser ainda relativamente pouco valorizado (RATES, 2001).

Admitindo a enorme riqueza da flora do Brasil, que possui cerca de 22 % das espécies de plantas existentes no planeta, ainda há uma enorme e inexplorada fonte natural de metabólitos secundários com inúmeras propriedades químicas e medicinais ainda não reveladas (RATES, 2001).

Desse modo, o grande desafio para o aproveitamento racional da biodiversidade brasileira visando a produção e ou padronização de medicamentos é incrementar políticas de proteção, preservação e, sobretudo, pesquisas sobre fonte naturais com maior associação entre a química e a farmacologia, tendo em vista a possibilidade de transformar esse imenso patrimônio genético natural em riquezas no sentido de descobrir substâncias químicas e farmacologicamente ativas, a fim de se obter aplicações terapêuticas importantes o que pode favorecer a criação de novas indústrias de base tecnológica resultando na geração de empregos qualificados.

1.2 Validação de métodos analíticos

A validação de métodos analíticos visa assegurar a credibilidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade durante o uso rotineiro, sendo algumas vezes mencionado como o processo que fornece uma evidência documentada de que o método realiza aquilo para o qual é indicado para fazer (SHABIR, 2003).

A importância das medições químicas tem crescido nos últimos anos, principalmente nos países mais desenvolvidos, tendo em vista que tais medições possuem papel chave no diagnóstico de doenças, na identificação das tendências globais no estado da biosfera, na avaliação dos efeitos de contaminantes que acometem ao meio-ambiente, bem como na produção industrial, como exemplo, os alimentos, insumos agrícolas e medicamentos. No Brasil, o desenvolvimento de medições químicas encontra-se em seu estágio inicial, existindo muitas ações isoladas que precisam ser coordenadas no sentido de disseminar adequadamente parâmetros internacionais mais atualizados ampliando a magnitude da Metrologia Química (SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004).

Dentro do âmbito geral de Metrologia Química existem razões legais que justificam a implantação da validação de métodos analíticos. No Brasil, há duas agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes dois órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos (RIBANI et al., 2004). Na Europa, Estados Unidos e Japão, a ICH (International Conference on Harmonization) e a USP (The United States Pharmacopeia) definem parâmetros, requerimentos e, em alguns casos, também metodologias para processo de validação. Além destes, a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) e a FDA (Food and Drug Administration) também têm propostos guias sobre validação de métodos. Estes guias e/ou requerimentos, de forma geral, exibem os parâmetros de desempenho a serem seguidos para validação de um método. As similaridades e diferenças entre eles podem ser visualizadas de acordo com a tabela 1 (SHABIR, 2003; RIBANI et al., 2004).

Tabela 1: Parâmetros de desempenho, (INMETRO, ANVISA, ICH, USP, FDA e IUPAC) diferenças e similaridades.

INMETRO	ANVISA	ICH/USP	FDA/IUPAC
Especificidade/ Seletividade	Especificidade/ Seletividade	Especificidade	Adequabilidade do Sistema/Seletividade
Faixa de trabalho/ Faixa linear de trabalho	Intervalos da curva analítica	Faixa de variação	Estabilidade da amostra
Linearidade	Linearidade	Linearidade	-
-	Curva analítica	-	-
Limite detecção	Limite detecção	Limite detecção	-
Limite quantificação	Limite quantificação	Limite quantificação	-
Sensibilidade (inclinação da reta)	-	-	Sensibilidade
Exatidão	Exatidão	Exatidão	Recuperação/ Exatidão
Tendência (Bias)			
Precisão	Precisão	Precisão	Reprodutibilidade
Repetitividade	Intra-corrida	Repetibilidade	
Intermediária	Inter-corrida	Intermediária	
Reprodutibilidade	Inter-laboratorial	Reprodutibilidade	
Robustez	Robustez	Robustez	Robustez
Incerteza de medição	-	-	-

1.2.1 Características de desempenho: definições gerais

Seletividade/Especificidade: antes de programar qualquer experimento de validação, deve-se estabelecer que o equipamento e o procedimento a serem utilizados serão capazes de fornecer dados de qualidades aceitáveis (SHABIR, 2003). Para tanto, seletividade ou especificidade deve ser o primeiro passo a ser desenvolvido para validação de um método analítico (RIBANI, et al., 2004). A seletividade de um método refere-se a capacidade deste em

avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (VESSMAN, et al., 2001). A seletividade é baseada nos parâmetros de separação e detecção, sendo que as técnicas cromatográficas hinfenadas têm sido aplicadas em determinações de altíssima qualidade. Frequentemente, o mesmo significado colocado para seletividade tem sido atribuído ao termo especificidade. No entanto, um método que produz resposta para uma única substância de interesse pode ser chamado de específico e um método que consegue produzir resposta para vários compostos químicos, diferenciando-os entre si, pode ser chamado de seletivo (VESSMAN, et al., 2001).

Linearidade: corresponde à capacidade de uma metodologia analítica fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância na amostra, dentro de um faixa de aplicação, sendo obtida pela confecção de curva analítica utilizando padrões interno ou externo (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

Precisão: é a habilidade do método em reproduzir resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas (CASS; DEGANI, 2001; INMETRO, 2003). A avaliação da precisão em validação de métodos é dividida em três etapas: a repetibilidade que é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuado sob as mesmas condições de medição, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo (INMETRO, 2003). A precisão intermediária que expressa o grau de variação avaliada sobre a mesma amostra ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais condições devem variar, como por exemplo, diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes períodos de tempo (RIBANI et al., 2004; CASS; DEGANI, 2001). Finalizando, a reprodutibilidade, a qual refere-se ao grau de

concordância entre os resultados obtidos em estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser realizada em casos em que a padronização dos procedimentos analíticos deva ser incluída em, por exemplo, compêndios e farmacopéias, sendo que estes dados não são necessários para a concessão de registro (RIBANI et al., 2004).

A exatidão, Tendência, ou BIAS, de um método representa a concordância entre o resultado de um determinado ensaio em relação ao valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão quando aplicada a uma série de resultados de ensaio implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos – tendência – a qual é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos (INMETRO, 2003; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A sensibilidade é a habilidade do método em distinguir, com confiança, duas concentrações próximas. Esta avaliação compreende na determinação dos limites de detecção e quantificação. No procedimento de validação de metodologia analítica existe o termo limite de detecção do equipamento (LDE) que é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento, diferenciando-se do limite de detecção do método (LDM) que é definido como a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (RIBANI et al., 2004). O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão (CASS; DEGANI, 2001; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; RIBANI et al., 2004).

A robustez de um método mede a habilidade que este apresenta frente a pequenas variações (SHABIR, 2003). Diz-se que um método é robusto quanto ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (RIBANI, et al., 2004). As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando o método é transferido para outros

laboratórios sendo executado por diferentes analistas utilizando equipamentos e/ou materiais de consumo fornecidos por diferentes fabricantes (INMETO, 2003).

1.3 A família Asteraceae e o gênero *Baccharis*

A família Asteraceae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, compreendendo cerca de 1100 gêneros e 25000 espécies. São plantas de aspecto extremamente variado, incluindo principalmente pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Aproximadamente 98 % dos gêneros são constituídos por plantas de pequeno porte, e são encontradas em todos os tipos de habitats, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, dentre outros. Dentre inúmeras plantas da família Asteraceae utilizadas na medicina caseira está a *Artemisia absinthium*, uma erva de sabor amargo conhecida popularmente como losna, com benéficas funções digestivas, usada também na fabricação de bebidas (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Quimicamente esta família se destaca pela enorme diversidade de metabólitos secundários, sendo caracterizada pela presença de terpenóides e poliacetilenos com destaque para a classe do flavonóides, os quais podem ser considerados como importantes marcadores quimiotaxonômicos (EMERENCIANO, et al., 2001), além de sua reconhecida importância para a medicina, no tratamento e prevenção de certas doenças (HARBONE; WILLIAMS, 2000).

O gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae e à tribo Astereae, possui cerca de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. A grande

concentração de espécies no Brasil, principalmente no cerrado, indica que esta região é um provável centro de origem do gênero (FERRACINI, et al., 1995). No Brasil estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte delas localizada na região sudeste do país. As plantas deste gênero são em geral arbustos, como a vassoura e a carqueja, que medem até quatro metros de altura (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Todas as espécies do gênero *Baccharis* apresentam elevado valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais e Paraná, onde grande número delas, segundo Verdi, Brighente e Pizzolatti, (2005), é utilizado na medicina popular, consumida principalmente, na forma de chás com indicações para males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças na próstata, sendo também descritas como remédio para o processo de desintoxicação do organismo. Por exemplo, *B. genistelloides* é uma erva medicinal muito usada no Brasil para uma variedade de doenças, tais como desordens digestivas e do fígado, malária, úlceras, diabetes, anemia, diarreia, inflamações urinárias entre outras (MELO, et al., 2001).

Assim, devido a enormes importâncias medicinais, comerciais e ecológicas várias espécies de *Baccharis* têm atraído a atenção de muitos pesquisadores das áreas de química, farmacologia e biologia (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

1.3.1 Metabólitos secundários do gênero *Baccharis* e a presença de tricomas glandulares

Quimicamente, as espécies do gênero *Baccharis* são caracterizadas pela presença de triterpenos e diterpenos, principalmente dos tipos clerodano e labdano, bem como de compostos fenólicos, tais como: flavonóides e derivados do ácido cumárico (ZDERO et al., 1989; BOHLMANN et al., 1981).

Várias espécies de *Baccharis* possuem tricomas tectores e glandulares na epiderme de folhas e caules (HELLWING, 1992). Estas estruturas atuam como barreiras ao ataque de insetos e predadores que tentam se alimentar dos tecidos vegetais (SPRING, 2000).

Os tricomas glandulares são importantes não só do ponto de vista morfológico, mas principalmente por acumular micromoléculas com a função de proteger a planta contra parasitas, competidores e agentes predadores e, desse modo, possui papel fundamental dentro da ecologia química (SPRING, 2000). Terpenóides e muitos compostos aromáticos, como flavonóides e derivados do ácido cumárico, estão freqüentemente presentes nos tricomas glandulares (figura 1) de várias espécies vegetais da tribo Astereae (SPRING, 2000).

Várias espécies do gênero que são usadas na medicina popular possuem atividades biológicas comprovadas, como *B. trimera*, conhecida como carqueja, que é amplamente utilizada pela população para o tratamento de doenças hepáticas e processos inflamatórios, tendo sido inclusive recomendada pelo Programa de Plantas Medicinais da CEME (Central de Medicamentos) (TORRES et al., 2000).

Figura 1: Fotos ao microscópio eletrônico dos tricomas glandulares de *B. dracunculifolia*.

Além disso, os principais metabólitos relacionados ao gênero *Baccharis*, como os diterpenos dos tipos clerodano e labdano, possuem enorme diversidade estrutural e ampla

variedade de atividades biológicas, como as atividades antitumoral (ZANI et al., 2000), repelente de insetos (LÓPEZ-OLGUÍN et al., 1999), tripanocida (FREIBURGHHAUS et al., 1998), antiinflamatória (CARVALHO et al., 1996) e imunomodulatória (MISSIMA, et al., 2006).

1.4 *Baccharis dracunculifolia* De Candolle

Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae), conhecida popularmente como “alecrim do campo” e “vassoura”, é um arbusto lenhoso, nativo do Brasil, ocorrendo nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (BARROSO, 1976). Cresce principalmente em áreas de cerrado, pastagens abandonadas e áreas em processo de sucessão (BASTOS, 2001; FERRACINI, et al., 1995), onde se adapta facilmente a habitats pobres em nutrientes.

Esta planta (figuras 2 e 3) é uma espécie perene e dióica, que se reproduz por sementes, possuindo galhos bastante ramificados, nos quais as folhas e principalmente os ápices foliares são densamente povoados por tricomas glandulares (BASTOS, 2001). Estas estruturas são de enorme importância na interação desta espécie com insetos, especialmente com as abelhas.

Considerando seu emprego na medicina popular, Shuhama (1988), Queiroga, Fukai, e Marsaioli (1990), além de Fernandez, Sandi e Kokoska (2003) relatam o uso desta espécie no tratamento de feridas e processos inflamatórios, além de ser utilizada para combater doenças gastrintestinais e hepáticas. Além disso, o alecrim do campo tem sido objeto de numerosos estudos entomológicos, devido à sua riqueza de insetos herbívoros e galhadores (ESPÍRITO-SANTO; FARIA; FERNANDES, 2004; ESPÍRITO-SANTO; FERNANDES, 1998) destacando-se, principalmente por sua relação peculiar com as abelhas *Apis mellifera*. De acordo Bankova et al., (1999), Park et al., (2004) e Kumazawa et al., (2003), *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte botânica da própolis “verde” produzida no sudeste brasileiro.

Figura 2: Arbusto adulto de *B. dracunculifolia* cultivado no CPQBA-UNICAMP, Campinas-SP.

Figura 3: Detalhe do ramo com sementes de *B. dracunculifolia*.

1.5 A importância dos óleos essenciais e a composição química da fração volátil das partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia*

Os óleos voláteis ou essenciais, produtos do metabolismo secundário, são definidos como misturas complexas de mono, sesqui e diterpenos, os quais possuem grande valor agregado devido às suas aplicações em medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002). Apresentam como principais características o sabor acre e picante, quando recentemente extraídos são incolores ou ligeiramente amarelados e possuem baixa estabilidade na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. Os óleos essenciais já foram considerados como “desperdício fisiológico” (KNOBLOCH et al., 1986), ou mesmo como produto de desintoxicação (MOTHES, 1980). Hoje, sabe-se que o acúmulo dessas micromoléculas tem função de proteger a planta contra parasitas, competidores e agentes predadores e, desse modo, possuindo um papel fundamental dentro da ecologia química (SPRING, 2000).

Os estudos fitoquímicos dos óleos essenciais são também utilizados para resolver questões taxonômicas e filogenéticas. Terpenóides e muitos compostos aromáticos, como flavonóides e derivados do ácido cumárico, estão frequentemente presentes nos tricomas glandulares de várias espécies vegetais da tribo Astereae (SPRING, 2000).

No óleo volátil extraído das folhas nativas de *B. dracunculifolia* foram identificados os seguintes componentes: α -tujona, α -pineno, sabineno, β -pineno, mirceno, β -felandreno, α -terpineno, *p*-cimeno, limoneno, trans- β -ocimeno, γ -terpineol, terpinoleno, linalool, 4-terpineol, α -terpineol, carvona, geraniol, α -cubebeno, α -copaeno, β -elemeno, α -gurjuneno, β -cariofileno, calareno, aromadendreno, bumuleno, aloaromadendreno, β -selineno, β -cadineno, germacreno-D, α -muuroleno, γ -cadineno, δ -cadineno, epi-globulol, nerolidol, espatulenol, globulol, viridiflorol, undecano, guaiol, cadinol axial, α -cadinol. Destaca-se que os componentes majoritários

encontrados foram: β -selineno (10%), β -cariofileno (10%), germacreno-D (10%), espatulenol (10%) e nerolidol (20%) (FERRACINI, et al., 1995).

O óleo volátil de *B. dracunculifolia* é considerado perfume exótico sendo exportado como matéria-prima para confecção de perfumes (QUEIROGA, 1989). Assim, considera-se de grande importância que os estudos para determinação dos componentes químicos de *B. dracunculifolia* continuem sendo desenvolvidos visando aproveitar o grande potencial destes produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos.

1.6 Interação entre *Apis mellifera* e *B. dracunculifolia* na elaboração da própolis “verde”

Própolis é um termo de origem grega que significa “em defesa da colméia”. É formada por material resinoso e balsâmico de composição química complexa, sendo este coletado pelas abelhas de brotos, exsudatos de árvores e de outras partes do tecido vegetal e modificado na colméia com adição de secreções salivares e enzimáticas (BANKOVA, 2005; SANTOS, et al., 2003;).

A própolis brasileira, conhecida internacionalmente como própolis verde, apresenta coloração característica devido à elevada concentração de clorofila. Segundo Bastos (2001), as abelhas (*Apis mellifera*) cortam os ápices vegetativos de *B. dracunculifolia* e com o auxílio de suas patas vão formando “bolotas verdes”, repletas de fragmentos epidérmicos e tricomas glandulares, as quais são acumuladas na corbícula e transportadas para a colméia e utilizadas na elaboração da própolis, denominada “verde”. Assim, quanto maior o número de fragmentos de *B. dracunculifolia* presentes na própolis mais intensa é a sua coloração verde. Tal característica é utilizada pelos japoneses para a sua rápida identificação no processo de comercialização (PARK, et al., 2004).

Vários trabalhos demonstram que a própolis possui diversas atividades biológicas, tais como: antibacteriana (SFORCIN, et al., 2000), antifúngica (MURAD, et al., 2002), antiinflamatória (REIS, et al., 2000), antioxidante (SIMÕES, et al., 2004), imunomodulatória (MISSIMA et al., 2006), antitumoral (BAZO, et al., 2002) e antiulcerogênica (BARROS, et al., 2006).

Recentemente, trabalhos têm demonstrado a importância de *B. dracunculifolia* como fornecedora de resina para a produção da própolis verde por *Apis mellifera*. Kumazawa et al., (2003) em trabalho de campo, descreveu o modo de coleta e o comportamento das abelhas durante a manufatura da própolis verde. Este estudo, realizado por meio de gravações em vídeo, mostrou que as abelhas cortam os ápices foliares de *B. dracunculifolia*, utilizando-os para produzir a própolis, como mostrado na figura 4.

Figura 4: (a) *Apis mellifera* coletando ápices foliares de *Baccharis dracunculifolia*; (b) guardando o material coletado dentro de suas corbículas, nas patas; (c) em seguida o material será transportado para a colméia; (d) na colméia o material é misturado com a secreção salivar para a formação da (e) própolis verde.

Esse modo de coleta da abelha é de fundamental importância quando se analisa a constituição química de *B. dracunculifolia*. Park et al., (2004), mostraram que há diferenças significativas entre a composição química das folhas jovens, presentes nos ápices foliares da planta, e folhas adultas presentes em ramos secundários. Corroborando com o modo de coleta da abelha, estes autores demonstraram que o perfil cromatográfico das folhas jovens dos ápices foliares é muito semelhante ao encontrado na própolis verde.

Após a descoberta de *B. dracunculifolia* como sendo a principal fonte botânica da própolis verde, muitos estudos vêm sendo realizados com a planta, demonstrando o grande interesse por esta espécie vegetal.

O interesse econômico e o alto valor agregado desta própolis verde é refletido no mercado mundial, principalmente no japonês, onde cada frasco de extrato alcoólico chega a ser vendido por US\$ 150,00, enquanto no Brasil o mesmo frasco custa cerca de R\$ 10 reais. Dados da federação de apicultores de Minas Gerais revelam que a própolis verde é considerada a mais valorizada do mundo, sendo que o quilograma do produto saltou de US\$ 5 para US\$ 200 nos últimos anos.

Dois pontos se destacam na preferência japonesa pela própolis verde, além das suas propriedades farmacológicas: as suas características organolépticas e ao menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais.

Atualmente, na comunidade de apicultores brasileiros existe a preocupação de o Brasil perder o mercado caso não haja uma padronização das características da própolis brasileira (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

Deste modo, os estudos fitoquímico e da influência da sazonalidade no metabolismo secundário da principal fonte da própolis não se limitam apenas ao interesse acadêmico, mas principalmente na criação de uma padronização química para a própolis “verde”. Através da

formação de “pastos apícolas” pelos apicultores, cultivando-se a principal espécie vegetal (*B. dracunculifolia*) utilizada pelas abelhas ao redor das colméias, aumentar-se-ia a produção desta própolis “verde”, de grande valor medicinal e comercial (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000).

1.7 Aspectos agronômicos e de cultivo no estudo de plantas medicinais

Um fato comprovado é que as plantas medicinais estão em ascensão dentro da área agronômica. Neste contexto, o conhecimento sobre a melhor forma de cultivo é um dos primeiros passos para viabilizar a produção, em escala comercial, destas espécies medicinais (VIEIRA, 1994). Além disso, a partir da matéria-prima padronizada tem-se a possibilidade de reprodutibilidade e de maior abrangência dos resultados das pesquisas químicas, farmacológicas e das próprias pesquisas agronômicas. Esse modelo tem sido inovador no mundo e algumas escolas de farmácia voltadas para o setor de produtos naturais possuem área agrícola para o estudo em paralelo da matéria-prima.

Apesar do volume considerável da exportação de várias espécies medicinais na forma bruta ou de seus subprodutos, pouquíssimas espécies são cultivadas, mesmo em pequena escala. O fato torna-se mais marcante quando se consideram as espécies nativas, cujas pesquisas básicas ainda são incipientes (VIEIRA, 1994).

Considerando estes fatores, os estudos agronômicos e de cultivo de *B. dracunculifolia* poderão viabilizar não somente a formação de “pastos apícolas” pelos apicultores ao redor das colméias (o que poderia aumentar a produção da própolis “verde” de grande valor comercial), mas também a padronização da matéria-prima vegetal, visando o desenvolvimento futuro de um fitoterápico com esta espécie vegetal.

2 Objetivos

Existe estreita relação entre *Apis mellifera* e *Baccharis dracunculifolia* na elaboração da própolis verde brasileira, bem como há grande potencial medicinal desta planta, haja vista a diversidade de metabólitos secundários que já foram isolados e identificados e que apresentam várias atividades biológicas. Neste contexto, avaliaram-se os aspectos de cultivo, as influências sazonais tanto nos constituintes voláteis quanto nos fixos, bem como foram desenvolvidas metodologias analíticas visando assegurar a qualidade e autenticidade da droga vegetal, bem como da própolis verde. Para tanto, foram estipulados os seguintes objetivos para este trabalho:

- a) Desenvolver metodologia utilizando-se a técnica de cromatografia em fase gasosa para análise dos voláteis;
- b) Desenvolver e validar metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar os principais componentes presentes nos extratos hidroalcoólicos das partes aéreas de *B. dracunculifolia*;
- c) Avaliar a influência da sazonalidade nos perfis dos óleos essenciais e dos extratos hidroalcoólicos a partir de amostras homogêneas de *B. dracunculifolia* de 10 diferentes acessos cultivados por um período de 12 meses;
- d) Sugerir, com base nos resultados obtidos, a melhor época de colheita visando a maior produtividade das substâncias de interesse para posterior desenvolvimento de técnicas de cultivo em larga escala para produção de matéria-prima para a indústria farmacêutica e de fragrâncias.

3 Materiais e métodos

3.1 Cultivo, coleta e processamento do material vegetal

Inicialmente, para a caracterização da variabilidade genética sobre parâmetros agronômicos e químicos foi conduzido ensaio preliminar de campo no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA-UNICAMP com três acessos (populações), a partir de sementes oriundas das regiões de Campinas-SP, Cajuru-SP e Ribeirão Preto-SP. Estas sementes foram germinadas em substrato orgânico (composto + húmus, tratados em coletor solar, e fertilizadas com biofertilizante) sendo as mudas desenvolvidas em viveiro de tela sombrite 50 %, visando determinar as condições para realizar os experimentos de cultivo em escala piloto.

Após a realização destes ensaios preliminares, foram realizadas viagens de coleta de sementes em regiões de cerrado nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, para a seleção dos acessos a serem cultivados. Destes, dez acessos foram selecionados (tabela 2), os quais foram cultivados em quatro repetições (parcelas) em um campo de cultivo com aproximadamente 1800m², instalado no CPQBA – UNICAMP, em Campinas-SP. Cada acesso continha 25 indivíduos, perfazendo 250 indivíduos por repetição e 1000 somando as quatro repetições (figura 5).

Tabela 2: Acessos e locais de coleta de *B. dracunculifolia*.

Acessos de <i>B. dracunculifolia</i>	Locais de coleta
01	Chave da Taquara / Franca – SP
02	Cajuru – SP
03	Paraguaçu / Alfenas – MG
04	Colombo 1 – PR
05	Colombo 2 – PR
06	Franca – SP
07	Córrego do Ouro / Alfenas – MG
08	Monte Sião - Ouro Fino / Jacutinga – MG
09	Ribeirão Preto (USP) – SP
10	CPQBA – SP

As coletas das amostras para as determinações mensais de rendimento e composição do óleo essencial foram realizadas sempre pelo mesmo coletor (Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães) adotando o seguinte procedimento: Todo dia 19 de cada mês, de maio de 2004 a abril de 2005 e em cada acesso, tomavam-se 10 plantas ao acaso cortando-se cinco ramos terminais com aproximadamente 20 cm de comprimento, de cada uma das 10 plantas. Este material seguia para estufa a 40°C, com circulação de ar, por 48 horas. Após esse período de tempo as amostras eram embaladas, rotuladas e enviadas por Sedex para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, onde se realizava a obtenção do óleo para o estudo sazonal. Importante ressaltar que a área de cultivo foi conduzida dentro de critérios de boas práticas agrícolas e com irrigação. Além disso, a área cultivada foi mantida limpa de invasores por capina manual e roçadeiras.

Figura 5: Esboço que representa o campo de cultivo e demonstra como foi realizada a plantação dos indivíduos, dividida entre acessos (01-10) e repetições (I, II, III, IV).

- Espaçamento horizontal entre os acessos: 1 m
- Espaçamento vertical entre os acessos: 2 m
- Largura total do campo de cultivo: 30 m
- Comprimento total do campo de cultivo: 60 m
- Área total de cada acesso: 25 m²

3.1.1 Colheita de *B. dracunculifolia* e extração do óleo volátil em escala piloto

O corte final, realizado quando se completou um ano de amostragens mensais e 16 meses de desenvolvimento das plantas foi realizado entre maio e junho de 2005. Devido ao grande volume de material a ser cortado naquela etapa, constituído de 25 plantas por acesso, foi necessária uma semana para a avaliação de cada repetição. O corte foi realizado com serrote manual e podões, cortando-se as plantas na altura de aproximadamente 30 cm, ou logo acima das ramificações principais para favorecer a brotação posterior. Ainda em campo, foram separadas as partes que não continham folhas levando-se para o secador apenas as hastes com folhas.

As parcelas foram secas em secador a gás a 40°C até peso constante e seguiram para a retirada das hastes restando praticamente somente folhas secas e hastes finas. Este material foi embalado em sacos de polipropileno, revestidos com duas folhas de papel Kraft, e pesados para obtenção do peso seco. Os resultados de biomassa foram expressos em peso seco por planta, tomando-se o cuidado de se descontar as plantas que morreram em cada parcela.

A extração de óleo foi conduzida em equipamento de arraste a vapor (figura 6), em dorna de 210 L, obtendo-se, para cada parcela processada, uma fração aos 60 minutos e outra aos 120 minutos de destilação. As condições da destilação foram: 75 Kg/vapor/m³/hora e pressão na saída da caldeira de 2,5 Kg. A cada extração limpava-se todo o equipamento, inclusive o condensador, passando-se vapor por uma hora. Todo o material seco de cada parcela foi pesado e destilado, obtendo-se o peso de óleo de cada fração em função do peso seco de folhas e o correspondente número de plantas.

Figura 6: Destilador por arraste a vapor d'água utilizado para a extração de óleo essencial de *B. dracunculifolia* em escala piloto.

3.1.2 Obtenção do óleo essencial de cultivares de *B. dracunculifolia* para análise sazonal

Conforme mostra a figura 5, foram cultivados 10 acessos divididos em quatro repetições. Uma alíquota de cada acesso foi coletada de cada repetição, o que resultou em quatro amostras de cada acesso. Como são 10 acessos, 40 amostras de *B. dracunculifolia* foram analisadas mensalmente.

Os óleos essenciais foram obtidos por hidrodestilação utilizando-se aparelho de Clevenger (figura 7) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988) a partir das 40 amostras. Cerca de 5 g de folhas secas de cada amostra de *B. dracunculifolia* foram transferidas para balões de fundo redondo de 1000 mL de capacidade, contendo 500 mL de água destilada. O sistema foi mantido em destilação por quatro horas e todo o volume destilado (~ 200 mL) foi coletado e submetido à partição com 3 x de 10 mL de hexano grau analítico. À uma alíquota de 20 mL do volume

resultante da fração hexânica acrescentaram-se 250 μL da solução de piperonal ($\sim 10 \text{ mg/mL}$), utilizado como padrão interno. Da fração orgânica obtida, 1 μL foi injetado e analisado no cromatógrafo para quantificação relativa dos componentes majoritários do óleo essencial.

Figura 7: Hidrodestilação utilizando-se aparelho de Clevenger.

3.2 Análise dos voláteis por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização de chama (CG – DIC)

As análises dos voláteis foram realizadas em cromatógrafo de fase gasosa da marca Hewlett Packard, modelo 6890N plus (figura 8), equipado com injetor operando no modo “split” (1:3), acoplado a detector de ionização de chama. Para as análises foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (5 % fenil-metil-siloxano) (comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,32 mm, filme líquido: 0,25 μm e temperatura limite: -60°C a 325°C (350°C)). O hidrogênio foi usado como gás de arraste. A tabela 3 mostra o programa de temperatura o qual foi utilizado para

o forno. As temperaturas do injetor e do detector foram de 210°C e 250°C, respectivamente. Os cromatogramas contendo dados como, tempos de retenção e áreas, foram obtidos injetando-se 1 µL da fração orgânica nas condições estabelecidas.

Figura 8: Cromatógrafo de fase gasosa HP 6890N plus.

Tabela 3: Programa de temperatura utilizado para o forno (CG – DIC).

Rampa	°C/min	Temperatura (°C)	Minutos (assegurado)	Tempo de corrida (min)
Inicial	-	55	0,00	0,00
Rampa 1	20,00	120	0,00	3,00
Rampa 2	1,50	150	0,00	24,00
Rampa 3	20,00	180	5,00	30,00
Final	-	55	0,00	30,00

3.3 Identificação dos principais componentes presentes na fração volátil

Os principais componentes da fração volátil foram identificados por análise cromatográfica de fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG – EM), determinação dos índices de retenção, banco de dados da biblioteca Wiley, e dados da literatura.

As análises utilizando CG-EM foram realizadas pela Profa. Dra. Carmen Lúcia Queiroga no CPQBA-UNICAMP. Para tanto, foi utilizado um cromatógrafo de fase gasosa da marca Hewlett Packard, modelo 5890/5971, acoplado com um detector seletivo de massas, equipado com sistema de dados HP e biblioteca de espectro de massas Wiley. Os espectros de massas foram obtidos no modo impacto eletrônico a 70 eV. O injetor trabalhou operando no mesmo modo da CG – DIC e a programação de aquecimento para o forno seguiram as condições mostradas na tabela 3. A coluna capilar usada foi da marca ZEBRON ZB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Para comparação dos tempos de retenção também foi realizada análise utilizando-se os mesmos parâmetros do item 3.2 (coluna ZEBRON ZB-5), empregando-se detector de ionização de chama no CPQBA, utilizando óleo de amostra processada em Ribeirão Preto (QUEIROGA; FUKAI; MARSAIOLI, 1990).

3.3.1 Determinação dos Índices de Retenção

Os índices de retenção dos principais componentes do óleo essencial de *B. dracunculifolia* foram determinados utilizando CG-DIC (FCFRP-USP; Ribeirão Preto-SP) e CG-EM (CPQBA-UNICAMP; Campinas-SP) de acordo com o seguinte procedimento:

Inicialmente, injetou-se 1 μ L da fração volátil, previamente preparada conforme o item 3.2, obtendo-se os tempos de retenção para cada componente;

Os hidrocarbonetos (*n*-alcanos), da marca Alltech, utilizados neste experimento foram: *n*-nonano C₉, *n*-decano C₁₀, *n*-undecano C₁₁, *n*-tridecano C₁₃, *n*-tetradecano C₁₄, *n*-pentadecano C₁₅, *n*-hexadecano C₁₆, *n*-heptadecano C₁₇, *n*-octadecano C₁₈, *n*-nonadecano C₁₉, e *n*-eicosano C₂₀. Estes padrões foram diluídos em hexano na concentração de 140 µg/mL. Em seguida, injetou-se 1 µL dessa solução de padrões, obtendo-se os tempos de retenção para cada hidrocarboneto;

Logo após, foi efetuada a co-injeção de 1 µL da fração volátil juntamente com 1 µL da solução de padrões de hidrocarbonetos. Desta forma, utilizando-se a equação descrita por Clement (1990) faz-se a relação entre os tempos de retenção dos padrões e componentes, calculando-se os índices de retenção.

As análises para a obtenção dos índices de retenção por CG – EM seguiram este mesmo procedimento com aparelho da marca HP 5890, já descrito no item 3.3, usando-se uma coluna capilar ZEBRON ZB-5 e os seguintes padrões de hidrocarbonetos: C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, e C₁₇.

$$IR = \left\{ \frac{[(tr_x - tr_{cn-1}) \times (C_n - C_{n-1}) \cdot 100]}{(tr_{cn} - tr_{cn-1})} \right\} + 100 \cdot C_{n-1}; \text{ (CLEMENT, 1990)}$$

Em que:

tr_x : tempo de retenção do analito;

tr_{cn} : tempo de retenção do *n*-alcano posterior ao analito;

tr_{cn-1} : tempo de retenção do *n*-alcano anterior ao analito;

C_n : número de carbono do *n*-alcano posterior;

C_{n-1} : número de carbono do *n*-alcano anterior.

3.4 Análises semiquantitativas dos voláteis obtidos das folhas de *B. dracunculifolia*

As análises semiquantitativas avaliaram somente os analitos identificados, presentes nos voláteis de *B. dracunculifolia*. Para tanto, as concentrações relativas de cada analito em cada acesso foram determinadas em função da relação área/concentração conforme a equação a seguir:

$$\text{Conc}_R = \frac{A(c)}{m(pl)} \cdot \frac{C(pi)}{A(pi)} \cdot V(fh) \cdot F \qquad F = \frac{100 \text{ g}}{m(pl)}$$

Em que:

Conc_R: concentração relativa do analito;

A(c): área do analito;

m(pl): massa do material vegetal;

C(pi): concentração do padrão interno;

A(pi): área do padrão interno;

V(fh): volume da fração hexânica

F: fator de correção.

3.5 Estudos fitoquímicos realizados com *B. dracunculifolia*

Dentre os diversos estudos fitoquímicos elaborados com *B. dracunculifolia* por toda comunidade científica mundial, três foram realizados pela nossa equipe de pesquisa (SOUSA, 1999, GREGÓRIO, 2003; DA SILVA FILHO et al., 2004) sob a coordenação do Prof. Dr Jairo K. Bastos. Estes estudos tiveram como um dos principais objetivos isolar e identificar os compostos majoritários presentes em extratos de folhas, caules, brotos, lavados glandulares e raízes. Para o isolamento desses constituintes foram utilizadas diferentes modalidades cromatográficas como camada delgada, cromatografia em colunas convencionais, “cromatotrom”

e cromatografia líquida de alta eficiência. Para o procedimento de identificação dos compostos isolados foram usadas técnicas espectrométricas, incluindo ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C . Além disso, os perfis cromatográficos de alguns compostos puderam ser comparados com perfis de padrões autênticos Acros Organic New Jersey-EUA. Durante todos os estudos fitoquímicos foram utilizadas sílicas com diferentes meshes da marca Merck e solventes P.A., grau cromatográfico e deuterado, provenientes de diferentes fornecedores. Os metabólitos de *B. dracunculifolia*, isolados no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, foram utilizados como padrões para o desenvolvimento da metodologia analítica em CLAE.

3.6 Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizado para análises das substâncias fixas e validação da metodologia analítica

Para as análises em cromatografia líquida de alta eficiência foram empregados solventes de grau cromatográfico e a água empregada na preparação das soluções foi purificada em sistemas de filtro MILLI-Q-PLUS da MILLIPORE (Bedford, USA). Todos os solventes e soluções empregados como fases móveis em CLAE foram filtrados em membrana de nitrato de celulose. As análises das substâncias fixas foram realizadas em cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência da marca Shimadzu (figura 9), equipado com controlador SCL-10A_{vp}, equipado com três bombas LC-10AD, detector de arranjo de diodos modelo SPD - M10A_{vp}, e sistema controlador computadorizado com software Shimadzu Class-VP versão 5.02. Também foi utilizada uma coluna cromatográfica analítica de fase reversa Shim-pack CLC - ODS (M), Shimadzu, 4,6 mm x 250 mm, diâmetro de partícula 5 μm e diâmetro de poro 100Å, protegida por pré-coluna C₁₈ SGE.

Figura 9: Cromatógrafo de fase líquida Shimadzu.

3.6.1 Preparação das amostras para análise por cromatografia líquida de alta eficiência

De cada acesso estudado foi separado 1 g do material vegetal de cada uma das quatro repetições, perfazendo o total de 480 amostras, considerando os 12 meses de coleta. As amostras de cada repetição coletadas mensalmente foram reunidas, submetidas à moagem em moinho de facas comum e peneiradas em tamis de 46 mesh. Uma porção homogênea de 500 mg de cada acesso foi separada para extração com utilização de padronização interna. O padrão interno selecionado foi o veratraldeído (3,4-dimetoxibenzaldeído). Para tanto, transferiram-se os 500 mg do material vegetal para frasco do tipo Erlenmeyer de 125 mL de capacidade e adicionaram-se 20 mL de solução hidroalcoólica na proporção de 9:1 contendo 300 µg de veratraldeído (Pi)/mL. As amostras foram mantidas em agitador mecânico do tipo shaker (figura 10) a 40°C, por duas horas e a 170 RPM. Após este período, o material foi filtrado em papel de filtro, obtendo-se o extrato hidroalcoólico de *B. dracunculifolia*. Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi

transferida para micro-tubos de polietileno da marca Ependorff de 1,5 mL de capacidade. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa de ar quente e circulante a 45°C. Após evaporação do solvente, acrescentou-se 1 mL de metanol em cada amostra, a qual foi transferida para frasco apropriado para injetor automático (1 mL), sendo que uma alíquota de 15 µL de cada amostra foi injetada no equipamento (CLAE) e analisada sob as condições, desenvolvidas por Sousa (1999), apresentadas na tabela 4. Todas as amostras foram previamente tratadas por centrifugação a 13000 RPM durante cinco minutos. Para isso foi utilizada uma micro-centrífuga com capacidade para doze micro-tubos de polietileno da marca Ependorff de 1,5 mL.

Tabela 4: Gradiente multi-linear de eluição utilizado na CLAE.

Tempo (min)	Bomba A (%)	Bomba B (%)
0 - 5.0	75	25
10.0	65	35
15.0	62	38
20.0	60	40
45.0	55	45
50.0	30	70
55.0	20	80
60.0	0	100

Bomba A: 93,9 % água + 0,8 % de ácido acético + 0,3 % de acetato de amônio + 5 % metanol.

Bomba B: acetonitrila

Fluxo: 1mL/min

Deteção: UV a 280nm.

Figura 10: Agitador mecânico tipo shaker.

3.7 Características de desempenho para validação do método analítico por CLAE

3.7.1 Seletividade

A seletividade foi obtida pela comparação do perfil cromatográfico de padrões autênticos com o perfil da amostra, preparada conforme o item 3.6.1. Por meio desta estratégia foi possível comparar os espectros de UV e os tempos de retenção dos padrões e amostra sob as mesmas condições cromatográficas (ANVISA, 2003). Além disso, com o objetivo de avaliar a adequabilidade do sistema, determinaram-se os seguintes parâmetros: resolução, fator de retenção e fator cauda, utilizando-se as equações apresentadas na tabela 5 (LANÇAS, 1993).

Tabela 5: Parâmetros e equações utilizados para avaliar a adequabilidade do sistema.

Parâmetros	Equações
Resolução (Rs)	$Rs = [(\sqrt{N})/4].[k/(k+1)].[(\alpha-1)/\alpha]$
Fator de retenção (k)	$k = [(V_r - V_m)/V_m]$
Fator cauda (T)	$T = W_b.0,05/2f$

Em que:

N: número de pratos teóricos, calculados por $N = 16.(V_r/W_b)^2$;

α : fator de separação, calculados por $\alpha = (Tr_2/Tr_1)$. Tr , tempo de retenção;

W_b : medida da base do pico;

f: Distância do máximo do pico até o início deste, medido a um ponto de 5% da altura em relação à linha de base;

V_m : volume morto;

V_r : volume de retenção.

3.7.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada por meio da elaboração de curvas analítica dos padrões cromatográficos isolados e identificados de acordo com o item 3.5. Estas curvas foram obtidas a partir de diluições seriadas de soluções-mãe de cada padrão, com os valores expressos em $\mu\text{g/mL}$, contendo de cinco a onze concentrações diferentes (ANVISA, 2003).

As faixas lineares de cada padrão cromatográfico foram calculadas pelas respostas relativas fornecidas pelo sinal do detector, nesse caso, área do pico dividido pelas respectivas concentrações. Para tanto, gráficos foram construídos com as repostas relativas no eixo das ordenadas e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo das abscissas para cada padrão externo. Foram desenhadas linhas paralelas em cada gráfico, as quais correspondem a 95 % e 105 % da linha da faixa linear conforme descrito por Augusto, Valente e Riedo (2006).

Conforme os resultados encontrados, na determinação das faixas dinâmicas de cada composto, foram reconstruídas curvas analíticas obedecendo tais faixas, relacionando área do pico no eixo das ordenadas *versus* suas respectivas concentrações no eixo das abscissas. As análises estatísticas dos dados foram obtidas pelo método de regressão linear por mínimos quadrados e expressa pela equação de primeira ordem $y = ax + b$, em que, **y**: corresponde à resposta medida (área do pico), **x**: concentração (μmL), **a**: corresponde ao coeficiente angular, dado pela inclinação da reta e **b**: corresponde ao coeficiente linear, dado pelo ponto de interseção da reta com o eixo das ordenadas. Além disso, o coeficiente de correlação, R^2 , também foi calculado (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

3.7.3 Precisão

A repetitividade ou repetibilidade ou precisão intra-ensaio, conforme definida no item 1.2.1 ou tabela 1, foi determinada por meio da preparação de seis amostras seguindo as condições do item 3.6.1.

A precisão intermediária ou inter-ensaio, também definida na tabela 1 ou item 1.2.1, foi determinada utilizando as mesmas condições para repetibilidade, porém realizada em diferentes dias e por dois analistas.

O cálculo para ambos os níveis de precisão foi expresso em função do coeficiente de variação ou estimativa do desvio padrão relativo (CV %) (RIBANI et al., 2004). Assim, a precisão é dada pela equação $CV (\%) = (S/X).100$, em que, **CV %**: corresponde ao coeficiente de variação, **S**: é a estimativa do desvio padrão e **X**: é a média das medidas em replicatas ($n = 6$). Importante relatar que **S** é dado por:

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Em que:

x_i : valor individual de uma medição;

$\bar{x}$: média aritmética de um pequeno número de determinações;

n : número de medições.

3.7.4 Exatidão

A determinação da exatidão foi realizada avaliando-se a recuperação do componente majoritário, presente nos extratos das folhas de acessos cultivados de *B. dracunculifolia*, quando estes foram submetidos ao processo de extração.

Os estudos de recuperação foram feitos com fortificação da amostra em três níveis de concentração diferentes, alto, médio e baixo, em quintuplicata (RIBANI, et al., 2004).

Para tanto, cerca de 20 g de folhas desidratadas de *B. dracunculifolia* foram pulverizadas e o tamanho da partícula uniformizado com o auxílio de um tamis de 46 mesh. Em seguida, com a finalidade de se extrair todos os compostos, para posterior enriquecimento da amostra, o material vegetal foi submetido ao processo de extração exaustiva utilizando-se aparelho de Soxhlet durante um período de 48 horas. Nesse processo foram usados 400 mL de etanol 96 % como solvente extrator. Ao final de todo procedimento, o material vegetal esgotado foi mantido em estufa de ar circulante a 40°C por um período de 3 horas.

Logo após este período, em 15 frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL de capacidade, pesaram-se 500 mg da planta seca e esgotada, sendo que estes foram divididos em três grupos. No primeiro grupo (cinco replicatas correspondentes à concentração baixa) adicionou-se 1 mL de uma solução padrão a 3 mg/mL de ácido caféico em metanol grau cromatográfico, no segundo grupo (concentração média) adicionaram-se 2 mL da solução padrão e finalmente no terceiro

grupo (concentração alta) adicionaram-se 4 mL da solução padrão. Após homogeneização e incorporação do padrão de ácido caféico nas amostras, evaporou-se o metanol à temperatura ambiente. A seguir adicionaram-se 20 mL de uma solução de veratraldeído 300 µg/mL em etanol-água (9:1) e procedeu-se à extração utilizando-se a metodologia descrita no item 3.6.1. Terminado o processo de extração, a amostra foi filtrada e alíquotas de 5 mL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de solução de benzofenona 880 µg/mL usada como padrão secundário, totalizando as seguintes concentrações finais de ácido caféico: 107,14 µg/mL (baixa), 214,29 µg/mL (média) e 428,57 µg/mL (alta). Os padrões interno e secundário tiveram concentrações finais de 214,28 µg/mL e 251,43 µg/mL respectivamente. Os cálculos da exatidão, segundo Causon (1997) e Anvisa (2003), normalmente são expressos em função da porcentagem do erro relativo, por meio da seguinte equação:

$$\text{Exatidão (\% erro)} = [(\text{valor medido} - \text{valor real})/\text{valor real}].100$$

3.7.5 Limite de detecção e limite de quantificação (LD e LQ)

Para obtenção dos limites de detecção e quantificação foram elaboradas curvas analíticas com o componente de interesse respeitando a faixa dinâmica de trabalho próxima ao limite de detecção. Após a elaboração destas curvas, obteve-se a regressão linear por mínimos quadrados, a qual foi expressa pela equação de primeira ordem ($y = ax + b$), determinando-se, então, a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e a média do coeficiente angular. Em seguida, estes dados foram aplicados às seguintes equações: $LD = 3,3.(s/S)$ e $LQ = 10.(s/S)$, obtendo-se os limites de detecção e quantificação, respectivamente (RIBANI, et al., 2004), nas quais s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e S é a média do coeficiente angular.

3.7.6 Robustez

A robustez do método de extração foi determinada utilizando-se o teste de *Youden* com cinco fatores distintos, conforme Inmetro (2003). Para tanto, foi elaborada uma matriz de fatores contendo cinco experimentos para oito combinações. Todos os fatores e a matriz de fatores são apresentados na tabela 6.

Neste teste, os fatores nominais são codificados pelas letras maiúsculas e as variações pelas letras minúsculas. O procedimento de avaliação funciona da seguinte forma: realizando a combinação 1, o resultado será **s**; realizando a combinação 2 o resultado será **t** e assim, sucessivamente.

Para determinar a variação de um fator, encontram-se as quatro combinações correspondentes às letras maiúsculas e as quatro combinações que representam as letras minúsculas. Em seguida, calcula-se a diferença das médias dos dois grupos. Por exemplo, ao calcular as variações de A, o cálculo do fator de A/a será: $A/a = \{[(s + t + u + v)/4] - [(w + x + y + z)/4]\}$ (INMETRO, 2003).

Tabela 6: Fatores e matriz de fatores para determinação da robustez do método de extração.

Fatores	Código – nominal					Código – variação		
Tamanho da amostra	A – 500 mg					a – 450 mg		
Tamanho da partícula	B – 42 mesh					b – 16 mesh		
Frequência de agitação	C – 170 RPM					c – 150 RPM		
Temperatura de extração	D – 40°C					d – 30°C		
Tempo de extração	E – 2 h					e – 1,5 h		
	Matriz de fatores							
Combinações	1	2	3	4	5	6	7	8
Nº Experimentos								
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
Resultados	s	t	u	v	w	x	y	z

Aplicando-se o procedimento de avaliação, seguindo a matriz de fatores, obtêm-se as seguintes combinações:

s: nenhuma variação; (utiliza-se a metodologia desenvolvida);

t: variações de frequência de agitação e tempo de extração;

u: variações do tamanho da partícula e temperatura de extração;

v: variações do tamanho da partícula, frequência de agitação, temperatura de extração e tempo de extração;

w: variações do tamanho da amostra, temperatura de extração e tempo de extração;

x: variações do tamanho da amostra, frequência de agitação e temperatura de extração;

y: variações do tamanho da amostra, tamanho da partícula e tempo de extração;

z: variações do tamanho da amostra, tamanho da partícula e frequência de agitação.

3.8 Análises quantitativas das substâncias fixas presentes nos extratos hidroalcoólicos das partes aéreas de cultivares de *B. dracunculifolia*

Todos os componentes fixos identificados presentes nos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das folhas de alecrim do campo, conforme o item 3.6.1, foram quantificados com base nos dados das curvas analíticas, as quais foram elaboradas com os devidos padrões cromatográficos autênticos como descrito no item 3.7.2. Além disso, para minimizar eventuais erros de quantificação foram utilizadas padronizações interna (pi) e secundária (ps). Assim, obteve-se a concentração de cada composto, calculando-se a razão das áreas: componente em análise/pi, sendo que o padrão secundário foi utilizado para calcular a concentração do padrão interno seguindo a mesma razão pi/ps.

3.9 Tratamento dos resultados e análise estatística

Inicialmente, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado com o objetivo de verificar se os dados amostrais seguiam uma distribuição normal. Após a realização deste teste, as variações inter-grupo de diferentes parâmetros foram estimadas pela análise estatística de variância (ANOVA). Tratamentos qualitativos foram comparados usando o teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95 % e nível de significância de 5 % ($p < 0,05$). Os cálculos estatísticos, bem como todas as representações gráficas foram elaboradas por meio do programa GraphPad Prism® versão 4.0 e cálculos adicionais foram realizados com auxílio do programa Microsoft® Excel 2000.

4 Resultados e discussão

4.1 Cultivo, coleta e processamento do material vegetal no estudo de sazonalidade

Os estudos de cultivo, coleta e processamento do material vegetal foram realizados pelo Prof. Dr. Pedro Melillo de Magalhães (CPQBA).

A avaliação final dos acessos cultivados evidenciou expressiva variabilidade morfológica entre os acessos. As plantas femininas do acesso de número 4, proveniente de Colombo, Paraná, apresentaram inclusive aspectos morfológicos bastante distintos, tais como folhas maiores que o padrão da espécie. Diante desta diferença, enviaram-se exsicatas de todos os acessos para especialista (Dr. Nelson Ivo Matzenbacher), o qual confirmou que todos os acessos se tratavam de *Baccharis dracunculifolia*. Amostras destas exsicatas também foram depositadas no herbário do CPQBA – UNICAMP, Campinas-SP.

O plantio se desenvolveu rapidamente a partir da produção de mudas em tubetes (Figura 11). Em seguida, notou-se o rápido crescimento da espécie e a diferença do “stand” num intervalo de dois meses (Figura 12). A partir do quarto mês de plantio (Figura 13) foi possível iniciar a coleta das amostras para o estudo de sazonalidade. Assim, optou-se em realizar a colheita dos indivíduos aos 16 meses para que pudesse completar um período de 12 meses de amostragens, viabilizando o estudo sazonal. A figura 14 mostra *B. dracunculifolia* cultivada com 12 meses de plantio.

Figura 11: Cultivo de diferentes acessos de *B. dracunculifolia* a partir da produção de mudas em tubetes.

Figura 12: *B. dracunculifolia* no intervalo de dois meses de cultivo.

Figura 13: Acessos cultivados a partir do quarto mês de plantio.

Figura 14: *B. dracunculifolia* com 12 meses de plantio.

Embora os tratamentos (acessos) sejam comparáveis entre si, do ponto de vista de cultivo, o corte aos 16 meses não seria indicado na prática, pois neste estágio algumas folhas haviam caído e algumas plantas encontravam-se com folhas apenas nos ponteiros das hastes. Também neste estágio as plantas estavam muito altas e a base do caule engrossada (figura 15), dificultando o corte e provavelmente não favorecendo a rebrota. Porém, como se estava monitorando o teor e a composição do óleo essencial mês a mês, optou-se por completar as amostragens mensais.

Figura 15: Foto da base do caule de *B. dracunculifolia* destacando a rebrota após corte aos 16 meses.

Considerando a biomassa formada (figura 16) observa-se que o acesso 4 foi o mais produtivo, enquanto que o acesso 3 (Alfenas-MG) apresentou a menor produtividade. A figura 17 apresenta os resultados de rendimento para cada acesso considerando a repetição I. Esses valores são provenientes do processamento total de toda a parcela e permitem uma comparação entre os acessos. Importante relatar que o estudo de rendimento do óleo realizado no CPQBA foi obtido

por meio de destilação por arraste a vapor d'água em escala piloto de acordo com o item 3.1.2, tendo em vista a grande quantidade de biomassa analisada. Assim, conforme a figura 17, nota-se que o teor de óleo varia de 0,31 % (justamente o acesso mais produtivo em biomassa) a 0,70 %, do acesso 9 (Ribeirão Preto).

Figura 16: Biomassa (g de folhas secas/planta) dos 10 acessos de *B. dracunculifolia* colhidos aos 16 meses, considerando o processamento total da repetição I.

Figura 17: Rendimento de óleo essencial a partir de folhas secas dos 10 acessos (repetição I) de *B. dracunculifolia* colhidos aos 16 meses.

Os resultados obtidos nas análises de cultivo em conjunto com estudo de regressão linear indicam uma tendência de correlação negativa entre a produtividade em biomassa e o teor de óleo essencial, quando comparado o acesso 3 (rendimento 0,67 %) com o acesso 4 (rendimento 0,31 %). O acesso mais produtivo em termos de óleo por planta, foi o 10 (CPQBA), com 3,66 g de óleo/planta como mostra a figura 18.

Figura 18: Rendimento de óleo por planta de cada acesso cultivado.

Nota-se também, de acordo com a figura 19, que aproximadamente 60 % do óleo são extraídos na primeira hora de destilação, constituindo-se predominantemente de monoterpenos, enquanto que na segunda hora praticamente todo óleo é extraído (40 %) sendo esta fração composta de moléculas mais pesadas (principalmente sesquiterpenos) e de maior interesse comercial. Além disso, teste de combustão realizado com as sementes (aquênios) de *B. dracunculifolia* mostrou que tais sementes são altamente inflamáveis/combustíveis. Este teste, registrado em vídeo, encontra-se nos arquivos do CPQBA.

Figura 19: Fração A: g de óleo/cesso, após a 1ª hora de extração. Fração B: g de óleo/cesso, após 2ª hora de extração. Total: A + B.

4.2 Extração do óleo essencial dos acessos cultivados

O método de extração por hidrodestilação utilizando-se o aparelho de Clevenger é um procedimento clássico, amplamente usado para obter óleos voláteis em escala analítica. Este método é caracterizado pela matéria-prima ficar imersa na água sob elevada temperatura. Por isso, parâmetros como massa do material vegetal, controle de temperatura, quantidade de água e tempo de extração, devem ser bem definidos para eliminar riscos como a queima do material vegetal ou reações de pirólise, as quais podem degradar os componentes voláteis. Contudo, a extração por hidrodestilação trabalhando em condições adequadas é um método versátil, permite singelas mudanças durante o procedimento, é facilmente disponível e de baixo custo. Além disso, a fração volátil obtida é capaz de atender uma ampla variedade de análises, como por exemplo, experimentos relacionados aos ensaios biológicos. Por apresentar essas vantagens, a hidrodestilação foi o método escolhido para ser utilizado neste trabalho. Considera-se importante explicar que a extração por arraste a vapor d'água utilizada pelo Prof. Dr. Pedro (CPQBA) é um

método no qual a planta se encontra fora do contato com água, mas sob fluxo de vapor constante. Após o procedimento, o óleo e a água são separados em um compartimento específico do equipamento. Este método é bastante utilizado em indústrias justamente por comportar grandes quantidades de matéria-prima.

Considerando que as partes aéreas de *B. dracunculifolia* fornecem aproximadamente 0,6 % m/m de óleo em relação à planta seca, foi necessário o desenvolvimento de método para preparação da amostra para análise, uma vez que foram utilizados cerca de 5 g de material vegetal seco em todas as análises. Para tanto, optou-se por coletar todo o volume destilado no período de quatro horas. Os volumes obtidos variaram entre 180 e 210 mL para todas as amostras analisadas. A extração do óleo por partição com hexano propiciou ótima recuperação dos voláteis em comparação com outros solventes, tais como éter etílico, diclorometano e acetato de etila. Portanto, o hexano foi escolhido para preparação das amostras, considerando-se tanto a segurança quanto à facilidade para injeção no equipamento de cromatografia a gás.

4.3 CG – DIC: Separação dos componentes voláteis e o uso de padrão interno

A cromatografia gás-líquido é uma potente ferramenta utilizada para a separação de compostos, preferencialmente presentes em matrizes complexas como os óleos essenciais. A base para esta separação consiste na partição do soluto entre duas fases, uma fase líquida estacionária e uma fase gasosa móvel. Quando os solutos interagem fortemente com a fase líquida as rampas de temperaturas do forno podem ser alteradas com a finalidade de obter cromatogramas com boa separação e resolução dos constituintes da amostra. A cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama é usualmente o método de escolha para separar e quantificar componentes de óleos voláteis. Como estes óleos são suficientemente

voláteis o preparo e a injeção da amostra são relativamente simples e rápido. O detector de ionização de chama é um dispositivo que tem seu funcionamento baseado no princípio de que a condutividade elétrica de um gás é diretamente proporcional à quantidade de partículas carregadas, nele presentes. Portanto, compostos suscetíveis à combustão como, por exemplo, compostos orgânicos, geram partículas portadoras de carga, as quais conduzem corrente elétrica que é medida e convertida na forma de picos. Este dispositivo é capaz de acusar a presença e medir traços de componentes no efluente da coluna. Tendo em vista a disponibilidade do CG – DIC em nosso laboratório e a gama de vantagens oferecidas por esta técnica os óleos essenciais de acessos cultivados de *B. dracunculifolia* foram estudados ao longo de 12 meses.

O método cromatográfico empregado se mostrou eficiente quanto à separação dos componentes do óleo de *B. dracunculifolia*, no tempo de análise de 25 minutos. Para a análise semiquantitativa, é de fundamental importância a adição de um padrão interno. O uso de padronização interna na quantificação de amostras complexas é extremamente útil, pois neste caso as interferências sofridas pelo padrão e amostra serão as mesmas, o que pode minimizar eventuais erros. Além disso, este método foi capaz de aceitar pequenas mudanças em variáveis experimentais como temperatura da coluna e fluxo de gás de arraste, qualidades que tornam esta metodologia previamente robusta para análise de compostos que sejam considerados cromatograficamente estáveis. Para a escolha do padrão interno, foram testados alguns compostos a fim de se encontrar aquele que atendesse aos requisitos básicos, ou seja, alto grau de pureza, eluição em tempo de retenção diferente dos componentes da amostra, baixo custo, disponibilidade no mercado. Desse modo o padrão interno mais adequado foi o aldeído aromático piperonal, o qual aparece no cromatograma após a eluição dos monoterpenos e antes da eluição dos sesquiterpenos. Na figura 20 apresenta-se o perfil do óleo essencial destacando a resolução e

a separação dos componentes, o perfil das substâncias que foram avaliadas para a escolha do padrão interno e o perfil do óleo com a adição do piperonal.

Figura 20: (A) Perfil do óleo essencial por CG – DIC, resolução e separação dos componentes; (B) Substâncias avaliadas para escolha do padrão interno: cineol (3,459 min); tetrametilbenzeno (4,149 min); piperonal (7,194 min); vanilina (8,649 min); cumarina (9,715 min); trimetoxibenzeno (15,742 min) e benzofenona (16,540 min). (C) Perfil do óleo com adição do piperonal (Tr 7,187 min).

4.4 Identificação dos voláteis presentes no óleo essencial de *B. dracunculifolia*

4.4.1 Perfil cromatográfico do óleo por CG – EM

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas é utilizada especialmente para auxiliar com elevada eficiência à confirmação e ou identificação de componentes de uma amostra. Este método permite, como a CG – DIC, a separação dos constituintes e fornece, ainda, um espectro de massas para cada pico. A espectrometria de massas se diferencia dos outros métodos de análise (RMN ^{13}C , ^1H , etc), pois não está envolvido o processo de radiação eletromagnética. O princípio básico é dado pela produção de íons relativamente estáveis, através de um processo de ionização molecular, os quais serão posteriormente fragmentados. Os íons formados são separados de acordo com a relação carga-massa e a abundância relativa de cada íon é determinada. Por meio da análise dos fragmentos encontrados pode-se determinar o peso e a fórmula molecular, informações importantes que podem ajudar na confirmação da estrutura química de uma substância.

Conforme já mencionado, as análises por CG – EM (figuras 21, 22 e 23) foram feitas pela Profa. Dra. Carmem Lúcia Queiroga (CPQBA). De acordo com a metodologia já descrita, os componentes presentes na fração volátil das partes aéreas de *B. dracunculifolia* foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massa, índice de retenção, banco de dados da biblioteca Wiley e dados da literatura.

Figura 21: Perfil cromatográfico por CG – EM do óleo de alecrim do campo cultivado.

A origem do material vegetal utilizado para obter as frações voláteis, as quais foram analisadas pela equipe do CPQBA-UNICAMP e por nossa equipe FCFRP-USP, é proveniente do mesmo campo de cultivo o que pode justificar certa similaridade entre os cromatogramas apresentados nas figuras 20A e 21. Entretanto, nota-se que os valores numéricos dos tempos de retenção (Tr) dos constituintes analisados por CG – EM não são coincidentes aos Tr obtidos por CG – DIC, como pode ser verificado, comparando as mesmas figuras. Isto pode ser explicado pela singela diferença nas dimensões das colunas e ou pequenas variações na composição da fase estacionária. No entanto, como as fases móveis das colunas e as condições de análise são similares, as eluições dos constituintes são também similares.

4.4.2 Índice de retenção por CG – EM e CG – DIC

A identificação prévia de compostos individuais pode ser realizada através da comparação do tempo de retenção relativo da amostra com o tempo de retenção de padrões cromatográficos. No entanto, com o objetivo de ser mais independente das variações do tempo de retenção, optou-se em determinar o índice de retenção (Índice de Kovats). Este índice relaciona o tempo de retenção dos compostos de uma determinada amostra ao tempo de retenção de uma série homóloga de hidrocarbonetos. Tais índices permitem uma melhor avaliação dos dados obtidos podendo ser realizadas comparações de resultados entre diferentes laboratórios, com tabelas citadas na literatura (ADAMS, 2001) e com bibliotecas como a Wiley do sistema HP. Na figura 22 é apresentado o perfil cromatográfico dos padrões de hidrocarbonetos obtidos por CG – EM e na figura 23 apresenta-se a co-injeção desses padrões com adição do óleo utilizando a mesma técnica analítica. Já a figura 24 apresenta-se o perfil dos padrões e a co-injeção por CG – DIC.

Figura 22: Perfil cromatográfico dos padrões de hidrocarbonetos C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, e C₁₇ por CG – EM.

Figura 23: Co-injeção dos padrões de hidrocarbonetos com a adição do óleo de *B. dracunculifolia* por CG – EM.

Figura 24: (A) Perfil cromatográfico dos padrões de hidrocarbonetos C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, e C₂₀. (B) Co-injeção dos padrões de hidrocarbonetos com adição do óleo de alecrim do campo por CG – DIC.

Na análise dos dados obtidos pelas co-injeções, aplicados à equação descrita por Clement (1990) foi possível a determinação dos índices de retenção utilizando a técnica de cromatografia gás-líquido hinfenada em ambos os detectores, massas e ionização de chama. Os espectros de massas forneceram os pesos moleculares e por meio de estudo comparativo detalhado com os dados da biblioteca Wiley e referências bibliográficas como Adams (2001), Ferracine et al., (1995), Loayza et al., (1995), Queiroga, Fukai, Marsaioli, (1990) e Queiroga, Ferracini, Marsaioli (1996) foi possível identificar 14 componentes presentes no óleo essencial de acessos cultivados de *B. dracunculifolia*. Os quais são: α -pineno, β -pineno, limoneno, *trans*-cariofileno, aromadendreno, α -humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadineno, nerolidol, espatulenol, viridiflorol, guaíol e α -muurolol.

Na tabela 7 apresentam-se os resultados obtidos em relação aos índices de retenção e pesos moleculares. Os tempos de retenção (Tr 1) e os índices de retenção (IR₁), são provenientes da análise por CG – EM, já os tempos de retenção (Tr 2) e os índices de retenção (IR₂), são aqueles obtidos por CG – DIC. Na figura 25 estão as fórmulas estruturais de todos os componentes identificados.

Tabela 07: Pesos moleculares, tempos e índices de retenção, dos constituintes identificados.

Componentes	Tr 1 (min)	Tr 2 (min)	IR₁	IR₂	IR_{lit.}	PM
α -pineno	4,03	2,820	942	941	932	136
β -pineno	4,49	3,103	989	987	981	136
Limoneno	5,03	3,431	1034	1033	1031	136
Trans-cariofileno	15,25	9,258	1419	1423	1419	204
Aromadendreno	16,08	9,784	1439	1440	1439	204
α -humuleno	16,75	10,203	1455	1454	1454	204
Germacreno D	18,13	11,042	1483	1482	1481	204
Biciclogermacreno	18,90	11,658	1498	1489	1494	204
δ -cadineno	20,10	12,471	1522	1523	1524	204
Nerolidol	22,31	14,089	1566	1564	1564	222
Espatulanol	23,19	14,542	1584	1575	1576	220
Viridiflorol	23,50	15,055	1591	1588	1590	222
Guaiol	23,86	15,294	1597	1594	1595	222
α -muurolol	25,40	17,778	1645	1648	1645	222

IR_{lit.}: Índice de retenção encontrado na literatura.

PM: Peso molecular fornecido pelos espectros de massas.

Figura 25: Estruturas químicas de α -pineno (1), β -pineno (2), limoneno (3), *trans*-cariofileno (4), aromadendreno (5), α -humuleno (6), germacreno D (7), biciclogermacreno (8), δ -cadineno (9), nerolidol (10), espatulenol (11), viridiflorol (12), guaïol (13), α -muurolol (14).

Na figura 26 é apresentado o perfil cromatográfico do óleo de acesso cultivado, mostrando a presença de todos componentes identificados. Destaca-se que este cromatograma foi obtido na análise do mês de fevereiro de 2005, sendo uma forma representativa de mostrar o perfil do óleo essencial demarcando os componentes citados na figura 25.

Figura 26: Perfil cromatográfico do óleo, obtido por CG –DIC. α -pineno (1), β -pineno (2), limoneno (3), *trans*-cariofileno (4), aromadendreno (5), α -humuleno (6), germacreno D (7), biciclogermacreno (8), δ -cadineno (9), nerolidol (10), espatulenol (11), viridiflorol (12), guaiol (13), α -muurolol (14) e piperonal (padrão interno).

4.5 Influência sazonal dos voláteis em estudo

4.5.1 Variabilidade dos componentes em relação às folhas

Visando selecionar os cultivares mais produtivos considerando os voláteis em estudo, foram calculadas as concentrações de cada componente para cada acesso no período de maio de 2004 a abril de 2005. Estes valores foram calculados utilizando-se a equação descrita no item 3.4, na qual, os valores resultantes são dados em mg/100g de planta seca. Conforme as tabelas apresentadas no item 7.1 em anexos, com exceção do acesso 04, os valores obtidos não

apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) na avaliação dos componentes individuais relacionando todos cultivares no mesmo período, refletindo a qualidade dos critérios de boas práticas agrícolas no estudo de cultivo. Assim, não foi possível escolher o acesso mais produtivo baseando-se nas variações de concentrações dos componentes individuais.

Durante o estudo de cultivo, o acesso 4 apresentou características morfológicas bastante distintas em comparação com os demais acessos. Além disso, este acesso foi o menos produtivo em termos de óleo essencial, pois se destacou de todos os demais, apresentando concentrações muito menores de todos os metabólitos analisados. Estes dados avaliados em conjunto com os estudos estatísticos permitem afirmar que dentre as populações cultivadas, somente o acesso 4 não é indicado para o cultivo em larga escala, visando à produção de óleos essenciais.

Contudo, optou-se por avaliar tais componentes calculando-se a média aritmética entre repetições e populações e desta forma considerando o campo de cultivo como um todo. O objetivo desta estratégia foi definir o perfil de variabilidade dos voláteis para os acessos de *B. dracunculifolia* indicando a época mais produtiva para os óleos essenciais. Para tanto, foram elaborados gráficos mostrando a variabilidade de cada componente ao longo do período de estudo, conforme apresentado nas figuras 27a-d. Nos gráficos que se referem aos componentes, cada barra representa o cálculo da média considerando as dez populações. No gráfico referente ao rendimento total dos voláteis, cada barra representa a média entre as dez populações e a somatória dos 14 componentes.

Figura 27a: Perfis de variabilidade dos componentes voláteis a partir das folhas de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 27b: Perfis de variabilidade dos componentes voláteis a partir das folhas de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 27c: Perfis de variabilidade dos componentes voláteis a partir das folhas de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 27d: Perfis de variabilidade dos componentes voláteis e da produtividade de óleo mensal a partir das folhas de *B. dracunculifolia* cultivada.

Avaliando o percentual de cada componente em relação à planta seca (figuras 27a-d), nota-se que os sesquiterpenos oxigenados nerolidol e espatulenol apresentaram elevados teores estatisticamente significativos ($p < 0,0001$), diferenciando de todos os demais componentes. Na análise da classe dos sesquiterpenos (trans-cariofileno, aromadendreno, germacreno D, biciclogermacreno e δ -cadineno) o aromadendreno distinguiu-se dos demais por apresentar baixos teores, os quais foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$). Na classe dos sesquiterpenos oxigenados minoritários (α -humuleno, guaiol, viridiflorol e α -muurulol), somente α -muurulol apresentou diferença estatística significativa ($p < 0,001$), apresentando concentrações mais elevadas em relação aos componentes que compõem sua classe. Os monoterpenos α -pineno, β -pineno e limoneno foram detectados somente a partir do mês de setembro, não apresentando teores estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), distinguindo de todos os outros voláteis. Esta classe é composta por constituintes mais leves e, portanto, mais voláteis, o que pode justificar este comportamento.

Visando determinar a época mais produtiva, a partir das folhas, em termos de óleos essenciais, considerou-se que a somatória das concentrações dos 14 componentes analisados representa o rendimento total do campo de cultivo para cada mês estudado (figuras 27d). Assim, de forma geral, com base nos estudos estatísticos comparando as variações mensais, tanto para os componentes como para o rendimento total, os valores para os meses de maio, junho, julho e fevereiro, março e abril apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$).

Avaliando todos os perfis das figuras 27a-d percebe-se que há aumento de produtividade dos teores a partir do mês de agosto com um leve decréscimo em janeiro, atingindo níveis elevados em fevereiro, o qual é mantido até o mês de abril. Observou-se que a partir do mês de maio houve decréscimo significativo nos teores, os quais se mantiveram baixos até o mês de julho. Considera-se importante relatar que no período de maio a julho ocorreu a floração.

Todavia, houve outro período de floração nos meses de dezembro e janeiro. Esta segunda floração foi rápida (entre 10 a 20 dias) e menos intensa, o que pode justificar o leve decréscimo de produtividade neste período. O campo de cultivo em estudo foi mantido em irrigação durante todo o período de estiagem. Possivelmente, por esta razão, tenha havido duas florações no ano. Todavia, em relação às plantas nativas o período de floração ocorre nos meses de maio e junho. Portanto, do ponto de vista da produção de óleos essenciais, considerando os acessos cultivados de alecrim do campo e a análise dos 14 componentes, o período de maio a julho foi o menos produtivo. Entre os meses de agosto a janeiro, não há variações estatisticamente significantes. No entanto, houve aumento dos teores, resultando em rendimento médio de 0,6 % no teor de voláteis. No período de fevereiro a abril a produtividade de óleo foi a mais elevada, sugerindo que este período pode ser considerado a melhor época de colheita, em relação aos cultivares de *B. dracunculifolia*.

Nota-se que o estudo de rendimento com base nas concentrações de cada componente foi eficiente, uma vez que o valor do rendimento médio de 0,6 % encontrado no período de agosto a janeiro, correspondente à somatória dos 14 componentes analisados, é semelhante ao obtido no estudo de rendimento de cada acesso, considerando o processamento de toda a parcela após a colheita aos 16 meses de desenvolvimento das plantas, o qual foi realizado pelo Prof. Dr. Pedro Mellilo (CPQBA - UNICAMP).

4.5.2 Variabilidade das classes e componentes em relação ao óleo

Para determinar as variações entre as classes e componentes, optou-se em obter o percentual relativo com base no perfil cromatográfico do óleo essencial das populações em estudo. Desse modo, admitiu-se que a soma das concentrações dos 14 picos identificados fosse equivalente a 100 %, calculando, posteriormente, para cada acesso cultivado os percentuais relativos das classes e dos componentes individualmente. Para tanto, com o objetivo de tornar a análise das variações mais eficiente, optou-se em determinar o perfil sazonal das classes dos monoterpenos, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados minoritários, juntamente com os componentes nerolidol e espatulenol. A seguir, nas figuras 28a-d, são apresentados os percentuais das variações destas classes e componentes de cada cultivar em análise durante o período de amostragem.

Figura 28a: Percentual relativo dos acessos 1, 2 e 3. Legenda: monoterpênos, sesquiterpenos, nerolidol, espatulenol e sesquiterpenos oxigenados minoritários, respectivamente.

Figura 28b: Percentual relativo de classes e componentes dos acessos 4, 5, e 6.

Figura 28c: Percentual relativo de classes e componentes dos acessos 7, 8 e 9.

Figura 28d: Percentual relativo de classes e componentes do acesso 10 durante o período de amostragem. Legenda: monoterpenos, sesquiterpenos, nerolidol, espatulenol e sesquiterpenos oxigenados minoritários, respectivamente.

A análise da sazonalidade de todos os acessos, como apresentado nas figuras 28a-d, revela informações importantes sobre o percentual relativo de classes e componentes em relação à composição do óleo essencial.

Inicialmente, nota-se que o percentual da classe dos monoterpenos (α -pineno, β -pineno e limoneno) varia de 1 a 5 %, considerando, principalmente o segundo semestre em estudo. A classe dos sesquiterpenos oxigenados minoritários (α -humuleno, guaiol, viridiflorol e α -muurulol) apresentou, na avaliação geral, variações lineares na proporção de 10 a 15 % independentemente da época do ano em que foram analisados. Dentre as classes avaliadas, a classe dos sesquiterpenos (trans-cariofileno, aromadendreno, germacreno D, biciclogermacreno e δ -cadineno) foi a que apresentou a maior faixa de variação podendo oscilar de 5 a 25 % da composição do óleo. Destaca-se que o perfil de variabilidade desta classe é semelhante ao perfil

de produtividade de óleos essenciais (figura 27d), apresentando teores mais elevados no período de fevereiro a abril.

O espatulenol foi o componente que apresentou o perfil de sazonalidade decrescente, distinguindo-se dos demais em análise. O percentual relativo deste sesquiterpeno oxigenado foi de aproximadamente 35 % no primeiro mês de análise, o qual se manteve decrescente até cerca de 25 %, nos meses de junho e julho atingindo em média 18 % no mês de abril de 2005. Nota-se que o percentual de espatulenol no óleo das folhas foi mais elevado nos meses de floração, diferenciando-se do rendimento de produtividade dos demais componentes, os quais foram menores neste período. Portanto, caso o objetivo principal seja obter óleo volátil rico em espatulenol, supõe-se que a colheita deva ser realizada justamente no período de maio a julho. Além disso, avaliando de forma geral, observa-se que os níveis de sesquiterpenos elevam-se na medida em que o percentual de espatulenol diminui, sendo que em alguns cultivares, o percentual desta classe em relação a este componente apresenta-se igual ou levemente superior no último trimestre em estudo. Assim, preliminarmente, pode-se inferir que há a possibilidade de correlação inversa comparando a classe dos sesquiterpenos em relação ao espatulenol. Todavia, ao comparar, individualmente, os níveis de concentração deste composto em relação às concentrações de cada componente volátil, o espatulenol pode ser considerado um dos majoritários presentes no óleo de cultivares de alecrim do campo.

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* possui aroma exótico e propriedades odoríferas intensas. Na avaliação do nerolidol, percebe-se que o percentual relativo deste componente foi o mais elevado em relação aos demais, com cerca de 40 a 50 % da composição do óleo, considerando todos os acessos cultivados durante todo período de amostragem. Nota-se também, que a partir do mês de agosto há uma leve tendência de aumento do teor de nerolidol, ocorrendo

pequenas variações no mesmo período. Assim, com base neste perfil de variabilidade tais propriedades podem ser atribuídas principalmente à presença deste sesquiterpeno oxigenado.

Destaca-se, ainda, que tais resultados são de grande relevância, pois este metabólico é de interesse para indústria de fragrâncias, pois o mesmo é componente majoritário no óleo e deve ser o maior responsável pelas propriedades odoríferas intensas e, por isso, é utilizado como matéria-prima na produção de perfume exótico. Portanto, este trabalho traz grande contribuição para a seleção de acesso ideal para o cultivo em larga escala de *B. dracunculifolia*, bem como a melhor época de colheita, tendo em vista a produção dos princípios ativos de interesse com o melhor rendimento possível, podendo ser utilizados na confecção de perfumes na indústria de cosméticos.

4.6 Padrões cromatográficos e composição química dos extratos hidroalcoólicos

Na determinação da composição química dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim do campo cultivado, foram utilizados padrões cromatográficos (tabela 8). As análises de identificação das substâncias presentes nas amostras estudadas foram realizadas por meio da comparação entre os dados correspondentes aos padrões e amostras, considerando tempo de retenção, λ máximo (comprimento de onda máximo) e espectro de UV. Além disso, procedimentos de análises por ressonância magnética nuclear também foram usados, conforme citados no item 3.5.

O projeto inicial para análise das substâncias fixas em amostras de acessos de *B. dracunculifolia* foi o de realizar o estudo quantitativo ao longo de 12 meses, baseando-se em dados obtidos de curvas analíticas construídas com tais padrões cromatográficos.

Tabela 8: Nomes, tempos de retenção, lâmbda máximo e estruturas dos padrões cromatográficos.

Legenda	Nomes	Tempo de ret.	UV- λ_{max}	Estruturas químicas
1	Ácido caféico R = OH	4,21	325
2	Ácido ferúlico R = H ₃ CO	6,17	320	
3	Ácido cumárico R = OH	5,81	307
4	Ácido cinâmico R = H	15,06	272	
5	AME; Aromadendrina R = OH	20,04	289
6	Isosakuranetina R = H	33,95	275	
7	Ácido 3-prenil- <i>p</i> -cumárico (Drupanina)	25,20	312
8	Ácido 3,5-diprenil- <i>p</i> -cumárico (Artepin C)	54,41	311
9	Ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxi- cinâmico (Bacarina)	55,57	289
10	2,2-dimetil-6-carbóxi-etenil-2H-1- benzopirânico (DCBEN)	58,65	267

Para tanto, optou-se por desenvolver e validar método analítico que pudesse quantificar fidedignamente tais compostos presentes nos extratos hidroalcoólicos em análise. Segundo Gregório, (2003) e Da Silva Filho, et al., 2004 todos estes componentes (tabela 8) podem ser encontrados no extrato hidroalcoólico de *Baccharis dracunculifolia* nativa em diferentes épocas do ano, bem como em amostras de própolis. No entanto, durante o estudo de sazonalidade e na validação da metodologia analítica, a drupanina, o ácido cinâmico e o ácido 2,2 dimetil-6-carbóxi-tenil-2H-1-benzopirânico não foram detectados nos extratos hidroalcoólicos de amostras cultivadas. Todavia, os outros sete componentes foram encontrados durante o período de amostragem e foram avaliados com base nas características de desempenho do método analítico desenvolvido.

4.7 Características de desempenho para validação do método por CLAE

4.7.1 Método cromatográfico e seletividade

Durante o desenvolvimento da metodologia por CLAE foram investigadas diferentes condições cromatográficas (colunas, gradientes, fases móveis e taxa de fluxo) para otimizar a separação dos principais compostos com um tempo de análise rápido e eficiente. Contudo, a melhor separação e resolução dos picos capaz de quantificar os principais componentes presentes em amostras de *B. dracunculifolia*, de forma simples e reprodutível, foram obtidas com as condições descritas no item 3.6 com o tempo de análise de 60 minutos. As figuras 29A e 29B apresentam os perfis cromatográficos dos padrões e da amostra de cultivares de alecrim do campo, respectivamente. Nota-se que no perfil cromatográfico da amostra, como já mencionado, não são detectados a drupanina, o ácido cinâmico e o ácido 2,2 dimetil-6-carbóxi-tenil-2H-1-benzopirânico, o que ocorreu durante todo o período de estudo.

Para padronização interna por cromatografia de fase líquida, foram avaliados compostos como piperonal, cumarina, tetrametilbenzeno e benzofenona. Entretanto, o padrão interno (pi) selecionado foi o veratraldeído (3,4-dimetoxibenzaldeído) (figura 29). Sua escolha foi baseada nos mesmos requisitos adotados na análise dos voláteis por cromatografia gasosa. Apesar de eventualmente serem detectados traços de algumas impurezas próximas ao seu tempo de retenção, o veratraldeído foi o padrão que mais se aproximou das condições ideais considerando o perfil cromatográfico dos componentes em análise.

A seletividade foi determinada através da comparação do perfil cromatográfico dos padrões em relação ao perfil obtido da amostra. Também foi realizado o estudo comparativo entre os tempos de retenção e espectros de UV, considerando estes dois perfis. Após a obtenção dos perfis cromatográficos, parâmetros de adequabilidade do sistema, como resolução, fator cauda e fator de retenção (tabela 9) foram calculados para assegurar a qualidade do método.

Tabela 9: Resultados que representam a adequabilidade do sistema*

Componentes	Resolução $\pm$ DP	CV (%)	F. cauda $\pm$ DP	CV (%)	F. retenção $\pm$ DP	CV (%)
Ác. caféico	1,47 $\pm$ 0,13	8,66	0,031 $\pm$ 0,0021	6,96	3,00 $\pm$ 0,14	4,71
Ác. cumárico	0,95 $\pm$ 0,09	9,73	0,033 $\pm$ 0,0035	10,88	4,25 $\pm$ 0,35	8,32
Ác.ferúlico	0,65 $\pm$ 0,07	10,88	0,034 $\pm$ 0,0035	10,55	4,50 $\pm$ 0,42	9,43
AME	2,76 $\pm$ 0,08	2,82	0,024 $\pm$ 0,0014	5,89	18,55 $\pm$ 0,78	4,19
Isosakuranetina	11,72 $\pm$ 0,54	4,65	0,031 $\pm$ 0,0014	4,56	32,50 $\pm$ 0,71	2,18
Artepin C	26,18 $\pm$ 0,81	3,08	0,019 $\pm$ 0,0007	3,82	53,25 $\pm$ 0,35	0,66
Bacarina	14,84 $\pm$ 0,35	2,38	0,021 $\pm$ 0,0007	3,45	56,35 $\pm$ 0,49	0,88

* Valores recomendados; resolução > 2 , fator cauda < 2 e fator de retenção > 2 . (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

Figura 29: (A) perfil cromatográfico dos padrões, (B) perfil da amostra e (C) ampliação de (A). Os números seguem a legenda mostrada na tabela 8.

Avaliando o perfil cromatográfico dos padrões, percebe-se que somente os ácidos cumárico e ferúlico (figura 29C) apresentam tempos de retenção bastante próximos, distinguindo-se dos outros componentes. Nota-se que a metodologia analítica apresenta alta eficiência, haja vista que de dez componentes em análise simultâneos (figura 29A), oito apresentam fatores de separação adequados, demonstrando a qualidade do método desenvolvido.

Na análise do perfil cromatográfico da amostra, nota-se também a proximidade dos tempos de retenção dos ácidos cumárico e ferúlico. Além disso, percebe-se que algumas impurezas eluem próximas ao ácido caféico. Avaliando os parâmetros de adequabilidade do sistema, verifica-se que estes três ácidos não apresentam valores adequados para resolução. Todavia, a concentração do ácido caféico, durante todo o estudo de sazonalidade, foi muito superior tanto em relação a impurezas quanto aos outros componentes e, por isso, o método consegue diferenciá-lo com excelente performance. Por outro lado, conforme os dados da tabela 9, e o cromatograma mostrado na figura 29B, o método foi capaz de separar com eficiência quatro componentes: aromadendrina-4'-metil éter, isosakuretina, artepelin C e bacarina. Considerando que se trata de uma matriz complexa e os ácidos cumárico e ferúlico são componentes minoritários, tornou-se inviável modificar o método, tendo em vista que o mesmo pode selecionar eficientemente cinco compostos simultaneamente.

Importante ressaltar, que paralelamente, esta mesma metodologia, com singelas alterações, foi aplicada para amostras de própolis verde. Como esta resina não apresenta ácido ferúlico na sua composição química, o método desenvolvido no presente trabalho é capaz de analisar duas amostras quimicamente complexas e de fontes naturais distintas. No item 7.3 em anexos, é apresentado o perfil cromatográfico ilustrativo da própolis verde demonstrando a resolução e separação de seus constituintes químicos.

Apesar de o método não ser seletivo para os ácidos cumárico e ferúlico, em relação às amostras de *B. dracunculifolia*, durante as análises quantitativas foi possível quantificá-los, tendo em vista que o ácido cumárico é considerado precursor para biossíntese de artepelin C e bacarina. na planta. Assim, o ácido ferúlico apresenta variações leves na sua concentração e, por isso, há a possibilidade de diferenciá-lo quando comparado com ácido cumárico.

4.7.2 Linearidade

Inicialmente, para determinar a linearidade foram elaboradas curvas analíticas de cada padrão externo como descrito no item 3.7.2. Nestas curvas não foi omitida nenhuma das concentrações, pois o objetivo foi utilizá-las para verificar quais concentrações estavam dentro da faixa linear de trabalho. Assim, para melhorar a organização dos resultados, neste item, tais curvas (contendo todos os pontos) não serão apresentadas.

Os cálculos das faixas lineares, utilizando as curvas analíticas com todos os pontos, foram dados pela elaboração de gráficos seguindo o item 3.7.2. Por meio da análise destes gráficos determinaram-se as faixas lineares de cada componente. Depois de definidas tais faixas, novas curvas analíticas foram plotadas, excluindo as concentrações que estavam acima e abaixo do erro relativo permitido de $\pm 5\%$. Os gráficos que se referem aos cálculos das faixas dinâmicas e as curvas analíticas obtidas por meio destes cálculos estão apresentados a seguir nas figuras 30a-c e 31a-c.

Figura 30a: Gráficos utilizados para a obtenção das faixas lineares dinâmicas.

Figura 30b: Gráficos utilizados para a obtenção das faixas lineares dinâmicas.

Figura 30c: Gráficos utilizados para a obtenção das faixas lineares dinâmicas. Todas as faixas são representadas pelos intervalos de 95 a 105 %, respeitando o erro relativo de ± 5 %.

Figura 31a: Curvas analíticas dos respectivos fenólicos, respeitando a faixa linear de trabalho.

Figura 31b: Curvas analíticas dos respectivos fenólicos, respeitando a faixa linear de trabalho.

Figura 31c: Curvas analíticas dos respectivos fenólicos, respeitando a faixa linear de trabalho.

O coeficiente de correlação R^2 permite estimar a qualidade das curvas obtidas, pois quanto mais próximo de 1, menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A Anvisa, (2003) recomenda que o coeficiente de correlação seja igual ou maior a 0,99. Além disso, de

acordo com esta agência, a faixa linear de trabalho deve compreender entre 80 e 120 % do valor esperado do componente de interesse. Conforme os dados de regressão apresentados na tabela 10, os coeficientes de correlação de todas as curvas analíticas, bem como todas as faixas dinâmicas mencionadas neste item estão atendendo as recomendações preconizadas pela Anvisa, demonstrando ótima linearidade para cada componente em estudo. Importante destacar que as curvas dos padrões interno, veratraldeído, e secundário, benzofenona, também foram plotadas (figuras 31c) e ambas também atenderam bons níveis de qualidade em relação aos seus respectivos coeficientes de correlação e faixas de trabalho.

Tabela 10: Parâmetros das curvas analíticas de todos os compostos examinados.

Dados das regressões*

Componentes	Escala linear dinâmica (µg/mL)	a	b	Coeficiente de correlação R²	n
Ác. caféico	37,50 – 1200	57478	723389	0,9981	10
Ác cumárico	20,83 – 333,33	141468	737750	0,9986	9
Ác ferúlico	20,83 – 500	69449	-62813	0,9998	9
AME	31,25 – 500	49860	-202706	0,9998	8
Drupanina	23,44 – 375	43221	-166293	0,9992	9
Isosakuranetina	41,67 – 500	29105	-528169	0,9990	7
Artepelin C	50 – 533,33	29886	130851	0,9997	8
Bacarina	20,83 – 500	10904	-27952	0,9998	8
DCBEN	25 – 400	27821	-28878	0,9998	8
pi	20,83 – 500	72904	-183190	0,9997	9
ps	41,67 – 500	24486	-431417	0,9996	7

AME; aromadendrina-4'-metil éter, DCBEN; ácido 2,2 dimetil-6-cabóxi-etenil-2H-1-benzopirânico, pi; padrão interno, ps: padrão secundário. * Equação de primeira ordem; $y = ax + b$, em que, **y**: corresponde à área do pico, **x**: concentração em µ/mL, **a**: coeficiente angular e **b**: coeficiente linear.

4.7.3 Precisão (repetibilidade e intermediária)

Tabela 11: Repetibilidade e precisão intermediária dos componentes em análise.

Componentes	Repetibilidade	CV (%)	Intermediária	CV (%)	M. Tempo de CV (%)	
	M. (µg/mL) ± DP		M. (µg/mL) ± DP		retenção ± DP	
Ác. Caféico	390,28 ± 0,14	0,04	354,24 ± 1,50	0,42	4,36 ± 0,001	0,03
	391,49 ± 1,28	0,33	357,51 ± 0,12	0,03	4,35 ± 0,006	0,13
	387,65 ± 7,54	1,95	368,69 ± 16,70	4,53	4,37 ± 0,032	0,73
	391,59 ± 0,29	0,07	357,38 ± 1,32	0,37	4,36 ± 0,004	0,10
	380,92 ± 6,44	1,69	376,41 ± 4,67	1,24	4,34 ± 0,025	0,57
	388,69 ± 0,60	0,15	371,87 ± 13,31	3,58	4,36 ± 0,011	0,26
AME	65,85 ± 0,20	0,31	68,68 ± 1,49	2,17	20,01 ± 0,073	0,37
	68,61 ± 3,30	4,81	69,46 ± 3,37	4,85	19,96 ± 0,031	0,16
	69,77 ± 0,97	1,39	67,50 ± 4,74	7,03	19,96 ± 0,046	0,23
	69,95 ± 2,10	3,00	65,86 ± 3,61	5,48	19,90 ± 0,056	0,28
	69,67 ± 0,28	0,40	62,83 ± 1,46	2,32	19,86 ± 0,064	0,32
	68,66 ± 0,05	0,08	66,91 ± 0,60	0,90	19,99 ± 0,077	0,38
Isosakuranetina	132,19 ± 7,53	5,69	95,64 ± 1,94	2,03	33,53 ± 0,009	0,03
	152,77 ± 6,54	4,28	107,17 ± 10,48	9,78	33,54 ± 0,003	0,01
	138,95 ± 12,85	9,25	120,34 ± 13,47	11,19	33,53 ± 0,018	0,05
	150,62 ± 11,20	7,44	99,77 ± 2,60	2,60	33,53 ± 0,006	0,02
	156,42 ± 12,69	8,11	106,71 ± 1,29	1,21	33,47 ± 0,025	0,07
	155,68 ± 8,89	5,71	113,08 ± 11,97	10,58	33,58 ± 0,080	0,24
Artepin C	32,09 ± 0,61	1,90	34,48 ± 0,93	2,70	54,84 ± 0,006	0,01
	33,07 ± 0,44	1,32	32,43 ± 0,10	0,30	54,82 ± 0,021	0,04
	30,83 ± 0,34	1,10	32,06 ± 0,37	1,16	54,83 ± 0,014	0,03
	29,41 ± 1,06	3,59	33,01 ± 0,12	0,35	54,83 ± 0,010	0,02
	32,47 ± 1,18	3,64	32,17 ± 0,50	1,57	54,83 ± 0,004	0,01
	31,93 ± 0,41	1,30	32,87 ± 0,05	0,14	54,84 ± 0,013	0,02
Bacarina	122,39 ± 2,32	1,89	152,37 ± 3,97	2,60	57,95 ± 0,019	0,03
	130,48 ± 4,49	3,44	148,25 ± 6,07	4,09	57,95 ± 0,030	0,05
	133,30 ± 0,12	0,09	152,34 ± 8,17	5,36	57,92 ± 0,018	0,03
	131,39 ± 3,60	2,74	149,01 ± 2,89	1,94	57,91 ± 0,030	0,05
	134,79 ± 1,89	1,40	144,01 ± 3,80	2,64	57,92 ± 0,004	0,01
	130,12 ± 0,26	0,20	150,87 ± 1,32	0,88	57,94 ± 0,015	0,03

AME; aromadendrina-4'-metil éter, M.; média.

A precisão intra-ensaio ou repetibilidade foi dada pelo coeficiente de variação de seis amostras preparadas no mesmo dia e pelo mesmo analista, seguindo o procedimento do item 3.7.3. A precisão inter-ensaio ou intermediária seguiu os mesmos parâmetros utilizados na determinação da repetibilidade, porém foi realizada por dois analistas, sendo um deles, o aluno de doutorado Luiz Elídio Gregório (FFCLRP-USP) e em dias diferentes.

Nota-se que os coeficientes encontrados (tabela 11) para cada componente estão abaixo de 15 %, tanto para repetibilidade quanto para precisão intermediária. Conforme Ribani, et al., (2004) métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem CV (%) de 1 a 2 %. Em métodos de análise de micro quantidades, envolvendo matrizes complexas, são aceitos coeficientes de até 20 %. Com base nestes resultados, pode-se afirmar que o método empregado apresenta boa precisão.

4.7.4 Exatidão e recuperação

No presente trabalho, a exatidão foi determinada pelo procedimento de ensaio de recuperação. A recuperação (ou fator de recuperação R) é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (THOMPSON, et al., 1999).

Assim, a recuperação do método foi realizada com a fortificação de matriz de *B. dracunculifolia* previamente esgotada com o auxílio de aparelho de Soxhlet. A figura 32 mostra o perfil cromatográfico desta matriz após ser totalmente esgotada.

Este procedimento permite avaliar com elevado nível de confiabilidade o quanto do composto é possível recuperar durante o processo analítico, possibilitando os cálculos para a determinação da exatidão do método. Os cálculos da exatidão, dados pela tabela 12, foram

expressos em função da percentual do erro relativo, de acordo com a equação citada no item 3.7.4.

Figura 32: Matriz previamente esgotada com auxílio de aparelho de Soxhlet.

No perfil cromatográfico da amostra esgotada notam-se ruídos relacionados a algum distúrbio do solvente ou a presença de traços de impurezas. Isto foi comprovado pela análise comparativa dos espectros de UV relacionando os picos dos ruídos e componentes. Todavia, este fato não prejudicou os ensaios de recuperação.

Na avaliação dos resultados da tabela 12, observa-se que o método de extração empregado é capaz de recuperar ácido caféico em valores entre 91,87 a 109,13 %, CV % menores que 2 % e erro relativo menor que 10 %. Os intervalos aceitáveis de recuperação geralmente estão entre 70 a 120 %, com exatidão de até ± 15 % (RIBANI, et al., 2004). Portanto pode-se concluir que o método fornece ótima exatidão, refletindo a criteriosa definição do método de extração, destacando a escolha do solvente extrator, tempo e temperatura de extração.

Tabela 12: Determinação da exatidão e recuperação de ácido caféico.

Conc. teóricas de ácido caféico ($\mu\text{g/mL}$)	Conc. obtidas de ácido caféico ($\mu\text{g/mL}$)	Recuperação (%)	Erro relativo (%)	Média $\pm$ DP	CV(%)
Baixa (107,14)	99,96	93,29	-6,71	99,98 $\pm$ 0,99	0,99
	98,43	91,87	-8,13		
	100,79	94,07	-5,93		
	100,91	94,18	-5,82		
	99,81	93,16	-6,84		
Média (214,29)	210,62	98,29	-1,71	212,89 $\pm$ 1,89	0,89
	215,76	100,68	0,68		
	212,89	99,35	-0,65		
	211,96	98,91	-1,09		
	213,22	99,5	-0,5		
Alta (428,57)	467,68	109,13	9,13	458,83 $\pm$ 7,26	1,58
	460,26	107,4	7,4		
	459,21	107,15	7,15		
	459,55	107,23	7,23		
	447,43	104,4	4,4		
pi; Baixa (214,28)	201,88	94,21	-8,21	196,42 $\pm$ 3,31	1,68
	193,11	90,12	-8,37		
	195,05	91,02	-8,34		
	195,38	91,18	-8,92		
	196,65	91,77	-9,29		
pi; Média (214,28)	195,67	91,31	-9,79	193,51 $\pm$ 3,81	1,97
	189,14	88,27	-9,63		
	189,63	88,50	-9,69		
	197,18	92,02	-10,76		
	195,94	91,44	-11,17		
pi; Alta (214,28)	184,23	85,98	-12,64	181,17 $\pm$ 6,21	3,43
	184,76	86,22	-14,69		
	173,92	81,16	-15,45		
	175,16	81,75	-15,81		
	187,76	87,62	-15,16		

pi; recuperação do padrão interno, veratraldeído.

Outro parâmetro que justifica a exatidão encontrada são os dados obtidos na avaliação do padrão interno. Utilizando o padrão secundário benzofenona foi possível determinar a recuperação do veratraldeído, na qual, os valores ficaram entre 81,16 a 94,21 %, com CV % de 1,68 a 3,43 % e erro relativo médio de -11,19 %.

Importante ressaltar que todo o estudo para determinação da exatidão do método foi realizado somente com o ácido caféico, tendo em vista que os outros padrões envolvidos no processo de validação foram isolados de fontes naturais em quantidades insuficientes para viabilizar os ensaios de recuperação. Destaca-se, ainda, que para os objetivos do trabalho e do método, a utilização de um dos componentes é satisfatória.

4.7.5 Sensibilidade

A sensibilidade do método foi representada pela determinação dos limites de detecção e quantificação. Inicialmente, foram obtidos perfis cromatográficos utilizando ácido caféico em concentrações a partir de 0,03 µg/mL. A partir destes perfis, observou-se que a área do pico referente a tal componente era capaz de ser integrada com teores iguais ou acima de 0,3 µg/mL. Desse modo, após ser determinada a menor concentração possível de ser medida pelo aparelho, os limites de detecção e quantificação foram determinados com base em parâmetros da curva analítica. Para tanto, a partir de solução-mãe (8 µg/mL de ácido caféico) foi realizada uma série de seis diluições de forma que o primeiro ponto ficasse com uma concentração próxima ou igual à 0,3 µg/mL. Na tabela 13 apresentam-se as diluições seriadas e suas respectivas áreas.

Tabela 13: Dados para obtenção das curvas analíticas.

Conc. (µg/mL)	Área 1	Área 2	Área 3	(Média ± DP) x 10 ²	CV (%)
8,00	613776	656062	698347	656,06 ± 42,29	6,45
5,60	449982	441129	462027	451,05 ± 10,49	2,33
3,36	256716	275820	262446	264,99 ± 9,80	3,70
2,02	169781	166961	162702	166,48 ± 3,56	2,14
0,45	64474	66240	65357	65,36 ± 0,88	1,35
0,31	59706	60183	60850	60,25 ± 0,57	0,95

Figura 33: Curvas analíticas obtidas com os dados da tabela 13.

A partir dos resultados da tabela 13 foi possível a construção das curvas analíticas apresentadas na figura 33. As curvas analíticas forneceram as equações de primeira ordem com os respectivos coeficientes de correlação R^2 . Nota-se que para todos os coeficientes obtidos, os valores estão acima de 0,99, conforme recomendado pela Anvisa (2003). Após a obtenção desses dados, estudos estatísticos foram aplicados e os limites de detecção e quantificação foram determinados (tabela 14) de acordos com as equações descritas no item 3.7.5.

Tabela 14: Estudos estatísticos e os resultados para LD e LQ.

Curvas	Coeficiente Linear	$\pm DP \times 10^2$	Coeficiente Angular	Média $\times 10^2$	Limite de Detecção (LD)	Limite de Quantificação (LQ)
1	28649		73114			
2	24675	7,44	76956	77,49	0,32 $\mu\text{g/mL}$	0,96 $\mu\text{g/mL}$
3	14237		82428			

Dentre as distintas maneiras para a determinação da sensibilidade do método, segundo Ribani, et al., (2004), o método com base em parâmetros da curva analítica é o mais adequado por permitir a aplicação de análises estatísticas e, por isso, o mesmo apresenta resultados mais confiáveis em relação à determinação dos limites de detecção e quantificação. Os parâmetros da curva analítica resultaram na estimativa do tamanho da amostra que pode ser detectada e quantificada. Todavia, com o objetivo de avaliar os níveis de precisão de uma concentração próxima ao limite de quantificação foi realizada uma análise em triplicata demonstrando o perfil cromatográfico de ácido caféico na concentração de 1,10 $\mu\text{g/mL}$ (figura 34).

Figura 34: Perfis cromatográficos de ácido caféico em aproximadamente 1,10 µg/mL.

Avaliando a figura 34, observa-se que os perfis cromatográficos obtidos apresentam picos com áreas bem semelhantes, em média de 120160, com desvio padrão de ± 1592 e CV % 1,33. Esta mesma análise foi realizada com concentração próxima ao LD (0,31 $\mu\text{g/mL}$), na qual apresentou áreas em média de 60246, com desvio padrão de $\pm 574,44$ e CV % 0,95 (tabela 13). Estes dados indicam que os teores propostos para LD e LQ mostrados na tabela 14 podem ser detectados e quantificados com excelente precisão.

4.7.6 Robustez

No teste de *Youden* (INMETRO, 2003), o qual foi utilizado para determinar a robustez do método, quanto menor o valor numérico obtido (tabela 15), menor é o erro relativo. Portanto, a influência do fator modificado também é mínima. Este teste foi aplicado para todos compostos examinados.

Conforme a tabela 15, as variações C (frequência de agitação), D (temperatura de extração) e E (tempo de extração) pouco influenciaram nos resultados para os componentes aromadendrina-4'-metil éter e isosakuranetina. Todos os valores, considerando todas as variações, em relação ao ácido caféico, foram extremamente robustos respeitando o limite máximo de erro relativo de 10 %. Em relação a bacarina, os resultados para as variáveis C, D e E apresentaram-se próximos ao limite máximo de erro, sendo que os valores de A (tamanho da amostra) e B (tamanho da partícula) foram de 13,46 % e 1,95 %, respectivamente. O componente atepelin C mostrou-se o mais sensível frente a todas as variáveis em análise. Possivelmente, pelos baixos níveis de concentrações encontradas para este composto, pode-se justificar tamanha instabilidade em relação a pequenas modificações no método. Esta justificativa pode ser reforçada quando se comparam os dados de robustez obtidos para própolis verde, a qual também

foi submetida ao mesmo procedimento de validação, em que os erros relativos para o artepelin C foram de no máximo 1,42 %, com exceção da variável A, que foi de 23,64 %. Na própolis verde, as concentrações encontradas para este componente foi em média 375 µg/mL, cerca de 45 vezes maior do que as concentrações encontradas nas partes aéreas de *B. dracunculifolia*.

Avaliando de forma geral os dados da tabela 15, os efeitos mais drásticos, considerando que se trata de uma amostra complexa, são observados quando se alteram o tamanho da amostra e o tamanho da partícula. Portanto os resultados são condizentes e permitem inferir que é imprescindível manter o tamanho da amostra e o tamanho da partícula durante a execução da metodologia.

Importante relatar que durante o desenvolvimento da metodologia analítica foram utilizados solventes de diferentes marcas como Mallinckrodt, J. T. Baker e Fisher Scientific. Além disso, nesse período, o pH da fase móvel foi medido semanalmente e os valores variaram em média de 4,21 a 4,33. A metodologia foi avaliada com pH da fase móvel em torno de 4, mas não ocorreram variações significativas considerando os parâmetros de resolução, tempo de retenção e área do pico. Portanto, com base nessas informações pode-se afirmar que o método é robusto e reproduz com eficiência os resultados para o qual foi desenvolvido.

Tabela 15: Resultados obtidos do teste de *Youden** que representam a robustez do método.

Variáveis	Área do pico (Média $\pm$ DP) $\times 10^5$	CV (%)	Valor numérico ($\mu\text{g/mL}$)	Erro Relativo (%)	Valor encontrado ($\mu\text{g/mL}$)
Ác. caféico					
A	16,02 $\pm$ 0,17	0,83	12,49	3,60	347,02
B	16,62 $\pm$ 0,03	0,18	8,88	2,47	359,40
C	17,17 $\pm$ 0,10	0,57	0,09	0,02	382,64
D	17,11 $\pm$ 0,23	2,04	1,29	0,34	382,18
E	17,09 $\pm$ 0,16	1,03	3,79	1,02	371,54
AME					
A	1,82 $\pm$ 0,01	0,54	4,67	9,15	51,06
B	0,98 $\pm$ 0,02	2,08	13,28	45,22	29,37
C	2,10 $\pm$ 0,04	1,71	1,10	1,84	59,74
D	2,00 $\pm$ 0,09	4,43	2,37	4,34	54,59
E	2,06 $\pm$ 0,04	2,02	0,21	0,37	57,30
Isosakuranetina					
A	0,68 $\pm$ 0,04	6,38	4,79	9,96	48,07
B	0,82 $\pm$ 0,01	1,40	3,30	6,29	52,48
C	0,79 $\pm$ 0,01	1,13	2,46	4,55	54,09
D	0,82 $\pm$ 0,01	1,40	2,92	5,46	53,51
E	0,82 $\pm$ 0,02	2,59	2,29	4,20	54,56
Artepelin C					
A	0,24 $\pm$ 0,004	1,62	2,41	40,44	5,96
B	0,23 $\pm$ 0,007	2,98	2,68	48,03	5,58
C	0,30 $\pm$ 0,010	3,49	1,35	15,54	8,69
D	0,30 $\pm$ 0,006	1,99	1,83	22,48	8,14
E	0,30 $\pm$ 0,005	1,83	1,41	16,59	8,50
Bacarina					
A	0,57 $\pm$ 0,01	1,76	9,32	13,46	69,23
B	0,73 $\pm$ 0,02	2,20	1,73	1,95	88,75
C	0,61 $\pm$ 0,03	4,37	7,07	9,23	76,56
D	0,61 $\pm$ 0,02	3,20	7,43	10,15	73,21
E	0,62 $\pm$ 0,01	2,34	7,31	9,63	75,91

* Sugerido pelo Inmetro, (2003).

4.8 Influência da sazonalidade na biossíntese das substâncias fixas

A avaliação da influência sazonal nos compostos fixos foi realizada conforme o procedimento descrito no item 3.8. Com base nesta metodologia foram obtidas curvas analíticas com padrões cromatográficos e, por meio destas, obtiveram-se as equações de primeira ordem. A partir destas equações foram deduzidas as fórmulas (tabela 16) para o cálculo das concentrações de cada componente fixo em análise.

Tabela 16: Fórmulas para o cálculo das concentrações dos fixos.

Componentes	Fórmulas*
Ácido caféico	$xc = \{[(72904 \cdot pi - 183190) \cdot R] - 723389\}/57478$
Ácido cumárico	$xc = \{[(72904 \cdot pi - 183190) \cdot R] - 737750\}/141468$
Ácido ferúlico	$xc = \{[(72904 \cdot pi - 183190) \cdot R] + 62813\}/69449$
AME	$xc = \{[(72904 \cdot pi - 183190) \cdot R] + 202706\}/49860$
Isosakuranetina	$xc = \{[(72904 \cdot pi - 183190) \cdot R] + 528169\}/29105$
Artepin C	$xc = \{[(72904 \cdot pi - 183190) \cdot R] - 130851\}/29886$
Bacarina	$xc = \{[(72904 \cdot pi - 183190) \cdot R] + 27952\}/10904$
Veratraldeído#	$xc = \{[(24486 \cdot ps - 431417) \cdot R] + 183190\}/72904$

* **xc:** concentração do componente (a ser calculada) em µg/mL; **pi:** concentração do padrão interno em µg/mL; **R:** razão da área do componente/área do pi e razão# da área do pi/área do ps; **ps:** concentração do padrão secundário em µg/mL; **AME:** aromadendrina-4'-metil éter.

4.8.1 Avaliação dos componentes fixos das folhas em relação a sazonalidade

Em anexo, no item 7.2, são apresentados todos os valores de cada composto fixo para cada cultivar durante o período de estudo. Estes valores foram obtidos utilizando-se as fórmulas da tabela 16, os quais foram convertidos em percentuais em g/100g de folhas secas.

Conforme os estudos estatísticos aplicados para estes valores, o ácido caféico não apresentou variações significativas ($p > 0,05$), relacionando-se todos os acessos cultivados e em todos os meses examinados, destacando-se pelos elevados teores, em média de 4,0 %. As concentrações do ácido cumárico também não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$), considerando-se os acessos cultivados no mesmo período. Porém, os teores deste componente foram os mais baixos, correspondendo à média de 0,046 %. Dentre os acessos analisados, somente o acesso 4 apresentou variações significantes na avaliação dos seguintes compostos: ácido ferúlico ($p < 0,01$), artepelin C ($p < 0,05$), aromadendrina-4'-metil éter ($p < 0,001$) e bacarina ($p < 0,05$). Nestas variações, por um lado os teores do flavonóide aromadendrina-4'-metil éter foram elevados, comparando-se o acesso 4 com os outros acessos e, por outro lado, os derivados ácidos apresentaram diminuição na mesma comparação. A isosakuranetina mostrou diferenças estatísticas para os acesso 3 e 4 ($p < 0,05$), pois as concentrações deste flavonóide no acesso 3 foram as maiores e para o acesso 4 foram as menores. Na avaliação geral dos acessos, com exceção do ácido caféico e aromadendrina-4'-metil éter, somente o acesso 4 apresentou baixos teores em relação aos outros metabólitos, corroborando com os resultados obtidos com relação à produtividade do óleo essencial.

Avaliando-se a variabilidade mensal, excluindo-se os perfis do ácido caféico, do ácido cumárico e da aromadendrina-4'-metil éter, nota-se, em geral, que para todos os outros metabólitos em análise, as variações de concentração são similares, iniciando-se com baixos

teores nos três meses iniciais e finalizando com teores mais elevados no último trimestre de amostragem. Assim, seguindo as tabelas do item 7.2, percebe-se que as concentrações do ácido ferúlico variam em média de 0,4 a 0,7 % no período de maio de 2004 a abril de 2005. Neste mesmo período, os teores de isosakuranetina foram em média de 0 a 0,6 %. Para o artepelin C as concentrações ficaram entre 0,03 a 0,7 % e para a bacarina os teores foram de 0,27 a 2,1 %. Considera-se importante destacar que o perfil de variabilidade destes componentes foi semelhante ao perfil determinado para os voláteis na escolha da época mais produtiva de óleo. Estes resultados são interessantes, pois são coincidentes com a proposição da melhor época de colheita em relação aos acessos de *B. dracunculifolia*, tanto para os componentes fixos quanto para os voláteis.

As concentrações de aromadendrina-4'-metil éter variaram de forma diferente em relação a todos os outros metabólitos. Os teores para este flavonóide foram em média de 0,7 % no mês de maio, decrescendo para 0,4 % até agosto. Em setembro houve novamente aumento dos teores para 0,75 %, os quais sofreram nova diminuição para 0,30 % até janeiro, atingindo 0,65 % no mês de fevereiro, o qual foi mantido até abril de 2005.

Seguindo o mesmo procedimento de cálculos aplicados aos voláteis, somaram-se as médias dos sete componentes fixos quantificados obtendo-se os valores entre 5 e 10 % por 100 g de material vegetal seco. Considerando-se o teor de extrato bruto que é de aproximadamente 30g/100g, os compostos quantificados correspondem a aproximadamente de 15 a 30 % do extrato bruto. Com base nestes resultados foi possível demonstrar a variabilidade do rendimento dos extratos durante o período de amostragem. Considerando-se os cinco meses iniciais, verifica-se leve aumento dos teores dos compostos fenólicos a partir de outubro, observando-se tendência crescente até o mês de abril de 2005, no qual o rendimento atingiu cerca de 10 %. Todavia, com

base nos estudos estatísticos relacionando estes valores mês a mês, não foi verificada diferença significativa ($p > 0,05$), (figura 35).

Figura 35: Rendimento total dos compostos fenólicos das folhas secas de alecrim do campo cultivado. Cada barra representa a média entre os 10 acessos e a soma dos componentes.

4.8.2 Perfil sazonal dos compostos fixos nos extratos hidroalcoólicos

O perfil sazonal dos componentes fixos (figuras 36a-j) foi obtido seguindo-se a mesma metodologia adotada para as classes e componentes dos óleos essenciais, obtendo-se o percentual relativo com base no perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos. Nestas análises, as variações de todos os compostos foram avaliadas individualmente para cada acesso ao longo do ano em estudo.

Figura 36a: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 36b: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 36c: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 36d: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 36e: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 36f: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 36g: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 36h: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 36i: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de *B. dracunculifolia* cultivada.

Figura 36j: Influência da sazonalidade nos componentes fixos de *B. dracunculifolia* cultivada.

Na avaliação geral da figura 36a-j, excetuando-se os acessos 3 e 4, percebe-se a variabilidade dos compostos fixos em relação aos extratos hidroalcoólicos ao longo dos 12 meses de amostragem. Neste contexto, observa-se novamente que o ácido caféico foi o fenólico majoritário. Todavia, este componente apresentou concentrações que variaram de forma decrescente, em média de 70 a 45 %, considerando o período de maio de 2004 a abril de 2005. Por outro lado, o artepelin C e a bacarina apresentaram teores crescentes no mesmo período, sendo que as concentrações de artepelin C iniciaram-se em aproximadamente 1 %, finalizando em 8 % e os teores de bacarina ficaram entre 5 a 25 %. Considerando-se as variações para estes três derivados ácidos, nota-se leve tendência de correlação inversa, uma vez que os teores de ácido caféico diminuem, elevam-se os níveis de concentração dos outros dois ácidos. Contudo, deve-se utilizar ferramenta estatística apropriada para comprovar esta correlação. Os ácidos cumárico e ferúlico mostraram variações bem distintas. Em geral, as concentrações de ácido ferúlico foram decrescentes em média de 10 a 6 %. Já os teores de ác. cumárico, em média de 2 %, foram encontrados somente no período intermediário do ano em estudo, entre agosto e janeiro. O ácido cumárico é precursor para produção dos demais ácidos em análise no processo de biossíntese, realizado pela planta, o que pode justificar os baixos níveis de concentração para este fenólico. Em relação aos flavonóides, a aromadendrina-4'-metil éter apresentou variabilidade diferenciada, na qual, as concentrações iniciaram-se em média de 12 % no mês de maio, diminuindo-se para aproximadamente 6 % em agosto, atingindo em média 15 % em setembro, seguida de nova diminuição dos teores para cerca de 2 a 4 % nos meses de dezembro e janeiro, os quais elevaram-se novamente para 8 % no último trimestre de análise. Para a isosakuranetina, os teores foram em média de 6 % entre os meses de agosto a outubro, elevando-se para aproximadamente 8 % até o fim do período de amostragem. Nota-se, em geral, que estes dois flavonóides apresentaram uma relação peculiar, pois em alguns períodos seus teores foram

diretamente proporcionais e, em outros, os mesmos foram inversamente proporcionais. Todavia, as concentrações de aromadendrina-4'-metil éter mostrou-se com melhor regularidade ao longo do ano.

As variações dos acessos 3 e 4 foram as que mais se diferenciaram em relação aos outros perfis de variabilidade. Nestes acessos, somente os teores de ácido caféico foram similares aos acessos restantes. No acesso 4 percebe-se que os teores de artepelin C e baccarina foram, no máximo, de 5 e 10 %, respectivamente. As concentrações dos ácidos ferúlico e cumárico variaram similarmente ficando entre 1 e 3 %. Neste acesso, a isosakuranetina não foi encontrada durante o período de estudo e a aromadendrina-4'-metil éter apresentou teores relativamente crescentes, considerando o período de maio a fevereiro, os quais variaram em aproximadamente 15 a 30 %. No acesso 3, foram observadas diferenças em relação às concentrações de ácido ferúlico, as quais foram em média 10 % durante os onze meses de amostragem, atingindo 25 % em abril de 2005. Considerando-se os dois flavonóides estudados no acesso 3, aromadendrina e isosakuranetina, observou-se que de maio a julho a isosakuranetina não foi detectada e, de julho a setembro atingiu 15 %, mantendo-se na faixa de 10 a 20 % até abril. Com relação a aromadendrina, os teores iniciaram-se em 10 % em maio, tendo atingido 2 % em janeiro e o máximo de 12 % em fevereiro, o qual coincidiu com o máximo observado para isosakuranetina, o qual foi de 20 %. Portanto, os maiores teores de flavonóides no acesso 3 foram obtidos em fevereiro.

5 Conclusões

- a) Os estudos de cultivo e processamento do material vegetal forneceram resultados muito satisfatórios em relação às determinações de biomassas, rendimentos dos acessos individuais e das quantidades totais de óleo produzidas cada indivíduo;
- b) Os protocolos de extração e análises desenvolvidos, tanto para os voláteis quanto para os componentes fixos, atenderam as expectativas, uma vez que foram realizadas 480 extrações e 480 análises para os voláteis e 120 extrações e 120 análises para os fixos durante o período de 12 meses, utilizando-se CG e CLAE, respectivamente;
- c) As metodologias utilizadas para a identificação dos metabólitos secundários, presentes no óleo volátil e no extrato bruto, foram satisfatórias, permitindo a identificação dos principais componentes;
- d) A composição química do óleo essencial dos acessos cultivados de alecrim do campo apresentou expressiva variabilidade ao longo de 1 ano, tendo sido observado, através das análises semiquantitativas, que a época de floração é imprópria para produção dos voláteis. Além disso, tais análises indicaram que o nerolidol e o espatulenol são os componentes majoritários do óleo, sendo detectados durante todo ano. Com base na quantificação dos voláteis foi possível propor a melhor época de colheita (fevereiro a abril), bem como verificar que somente o acesso 4 não é viável para o cultivo em larga escala visando à produção de óleos essenciais;
- e) Destaca-se que o nerolidol apresentou teores elevados ao longo do período de amostragem, em média de 50 % da composição do óleo. Este resultado é de grande relevância, pois este metabólico é de interesse para indústria de fragrâncias e deve ser o

maior responsável pelas propriedades odoríferas intensas e, por isso, é utilizado como matéria-prima na produção de perfume exótico e na indústria de cosméticos;

- f) As características de desempenho, na etapa de validação demonstraram bons resultados, os quais atendem com ótima segurança as necessidades para quantificação confiável dos metabólitos de interesse em amostras de *B. dracunculifolia*, bem como em amostras de própolis verde. Assim, esta metodologia poderá ser utilizada como ponto de referência no controle de qualidade dos produtos derivados da droga vegetal ou de amostra de própolis verde bruta, nos processos de produção;
- g) O perfil dos compostos fixos dos extratos hidroalcoólicos das folhas cultivadas foi bastante variado. Todavia, o ácido caféico é o componente majoritário, correspondendo em média a 60 % dos fenólicos em análise. Neste contexto, os teores de ácido cumárico foram os mais baixos, em média de 2 %. As concentrações dos outros compostos fixos, de forma geral, ficaram na faixa de 5 a 25 %. Durante o período de amostragem observou-se que os teores de artepelin C e bacarina foram crescentes no último trimestre de análise, os quais coincidem com a época mais produtiva de óleo essencial. Além disso, a aromadendrina-4'-metil éter juntamente com o ácido caféico podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos da planta cultivada, haja vista que os mesmos foram detectados durante todo ano e em todos os acessos estudados.

6 Referências bibliográficas

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography Quadupole Mass Spectroscopy**. Illions, USA: Allures Publishing Coorporation, 451 p., 2001.

ANVISA – **Resolução – RE nº 899**, 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P.; RIEDO, C. R. F. **Análise quantitativa por cromatografia**. Disponível em: <http://www.chemkeys.com>. Acessada em abril de 2006.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BANKOVA, V. S. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, p. 29-32, 2005.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V. S.; BRASTEVA, G. B.; SFORCIN, J. M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; RODELLA, R. M.; POPOV, J. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 54 (5-6), p. 401-405, 1999.

BARROSO, G. Compositae: subtribo *Bacchariridinae* Hoffman. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguesia**, v. 40, p. 7-273, 1976.

BARROS, M. P.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, (No prelo), 2006.

BASTOS, E. M. A. F. **Origem Botânica e Indicadores de Qualidade da “Própolis Verde” Produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil**. Tese (Doutorado) Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 137 p., 2001.

BAZO, A. P.; RODRIGUES, M. A. M.; SFORCIN, J. M.; VIANA DE CAMARGO, J. L.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 22, p. 183-194, 2002.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; GRENZ, M.; DHAR, A. K.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Five diterpenes and other constituents from nine *Baccharis species*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 281-286, 1981.

BUTLER, M. S.; The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67 p. 2141-2153, 2004.

CARVALHO, J.C.T.; SILVA, M. F. C.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; NUNES, D. S.; LIMA, R. M. L.; BASTOS, J. K.; SARTI, S. J. Investigation of antiinflammatory and antinoceptive activities of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-*nor*-clerodane diterpene from *C. cajucara*. **Planta Medica**, v. 62, p. 402-404, 1996.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. I. G. **Desenvolvimento de método para HPLC, fundamentos estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar., 2001

CAUSON, R. Validation of Chromatographic Methods in Biomedical Analysis. Viewpoint and Discussion. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 175-180, 1997.

CLEMENT, R. E. **GAS Chromatography: Biocchemical, Biomedical and Clinical applications**. Ed. John Wiley and Sons, Inc. Nova York. 393 p., 1990.

DA SILVA FILHO, A. A., BUENO, P. C. P., GREGÓRIO, L. E., SILVA, M. L. A., ALBUQUERQUE, S., BASTOS, J. K. *In Vitro* Trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1195-1199, 2004.

EMERENCIANO, V. P.; MILITÃO, J. S. L. T., CAMPOS, C. C.; ROMOFF, P.; KAPLAN M. A. C.; ZAMBON, M.; BRANT, A. J. C. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 947-957, 2001

ESPÍRITO-SANTO, M. M.; FARIA, M. L.; FERNANDES, G. W. Parasitoid attack and its consequences to the development of the galling psyllid *Baccharopelma dracunculifoliae*. **Basic and Applied Ecology**, v. 5 p. 475-484, 2004.

ESPÍRITO-SANTO, M. M.; FERNANDES, G. W. Abundance of *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae) galls on the dioecious shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Environmental Entomology**, v. 27 p. 860-867, 1998.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. Parte II. São Paulo, Atheneu, 1988

FERNANDEZ , E. C.; SANDI, Y. E.; KOKOSKA. L. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used in the Bustillo Province of the Potosi Department, Bolivia. **Fitoterapia**, v.74, p. 407-416, 2003.

FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L.C.; LEITÃO FILHO, H. F.; DA SILVA, A. G.; NASCIMENTO, L. R.; MARSAIOLI, A. J. Essencial oils of seven brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essencial Oil Research**, v. 7, p. 355-367, 1995.

FREIBURGHHAUS, F.; STECK, A.; PFANDER, H.; BRUN, R. Bioassay-guided isolation of a diastereoisomer of kolavenol from *Entada abyssintica* active on *Trypanossoma brucei rhodesiense*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p.179-183, 1998.

GREGÓRIO, L. E. **Influência da sazonalidade na composição polínica, no perfil químico e na atividade antimicrobiana da própolis produzida em Cajurú-SP.** Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 174 p., 2003.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento.** 5^a Ed. Rev. e Ampl.; Porto Alegre, Editora da universidade/ UFRGS, Cap. 1, p. 13-28, 2003.

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

HELLWING, F. H. Studies on the trichomes of some Asteraceae(compositae). **Flora**, v. 186 (5-6), p. 425-444, 1992.

HIGASHI, K. O.; DE CASTRO, S. L. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with hosts cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23 p. 49-155, 1994.

INMETRO – **DOQ-CGCRE – 008**, 01 de março de 2003. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.

KIMOTO, T. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. **Virchows Archiv**, v. 438, p. 259-270, 2001.

KINGHORN, A. D.; Pharmacognosy in the 21st century. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 135-148, 2001.

KNOBLOCK, K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, M.; VIGENSCHOW, H. Action of terpenoids on energy metabolism. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento.** 5^a Ed. Rev. e Ampl.; Porto Alegre, Editora da universidade/ UFRGS, Cap. 18, p. 473-474, 2003.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANARDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51 p. 740-742, 2003.

LANÇAS, F. M.; **Cromatografia em fase gasosa.** São Carlos: Acta, 254 p. 1993.

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

LÓPEZ-OLGUÍN, J.; TORRE, M. C.; ORTEGO, F.; CASTAÑERA, P.; RODRÍGUEZ, B. Structure-activity relationships of natural and synthetic *neo*-clerodane diterpenes from *Teucrium* against Colorado potato beetle larvae. **Phytochemistry**, v. 50, p. 749-753, 1999.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19 (5), p. 529-536, 1996.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H.; PAULINO, N. Phenolics compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74 (2), p. 105-112, 2001.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26 p. 83-99, 1995.

MELO, S. F.; SOARES, S. F.; DA COSTA, R. F.; DA SILVA, C. R.; DE OLIVEIRA M. B. N.; BEZERRA, R. J. A. C.; 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.

MISSIMA, F.; DA SILVA FILHO, A. A.; NUNES, G. A.; BUENO, P. C. P.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, (No prelo), 2006.

MOTHES, K. Historical introduction. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**. 5ª Ed. Rev. e Ampl.; Porto Alegre, Editora da universidade/ UFRGS, Cap. 18, p. 473-474, 2003.

MURAD, J. M.; CALVI, S. A.; SOARES, A. M. V. C.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 331-334, 2002.

NEWMAN, D. J.; GRAGG, 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

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, v. 52 p. 1100-1103, 2004.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25 p. 321-326, 2002.

PINTO, C. A.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25 (1), p. 45-61 2002.

QUEIROGA, C. L. **Estudo fitoquímico do Óleo Essencial de *Baccharis dracunculifolia***. Dissertação (Mestrado) UNICAMP – Instituto de Química, Campinas, 193 p., 1989.

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

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

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p.603-613, 2001.

REIS, C. M. F.; CARVALHO, J. C. T.; CAPUTO, L. R. G.; PATRÍCIO, K. C. M.; BARBOSA, M. V. J., CHIEFF, A. L., BASTOS, J. K. Atividade Antiinflamatória, Antiúlcera Gástrica e Toxicidade Subcrônica do Extrato Etanólico de Própolis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.10, p. 43-52, 2000

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p. 771-780, 2004.

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

SHABIR, G. A.; Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SHUHAMA, I. K. **Presença de atividade antiedematogênica no extrato bruto e frações obtidas por purificação parcial de *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim-do-campo)**. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 91 p., 1988.

SIMÕES, L. M. C.; GREGORIO, L. E.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 59-65, 2004.

SOUSA, M. L. **Isolamento dos constituintes de amostra de Própolis e caracterização do seu perfil químico através de cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 113 p., 1999.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A. Jr.; LOPES, C. A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 243-252, 2000.

SPRING, O. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. **Advance in Botanical Research**, v. 31, p. 153-174, 2000.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R. FAJGELJ, A.; WILLETTS, P.; WOOD, R. Harmonized guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p. 337 – 348, 1999.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R. WOOD, R. Harmonized guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835 – 855, 2002.

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

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

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V. DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. Selectivity in Analytical Chemistry (IUPAC recommendation). **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 8, p. 1381 – 1386, 2001.

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

VIEIRA, R. F. Coleta e Conservação de Recursos Genéticos de Plantas Medicinais. In: **Congresso Brasileiro de Medicina e Terapias Naturais**, Brasília. Trabalhos. São Paulo, Instituto Médico Serphis, p. 44-49, 1994.

ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A.; QUEIRÓZ, R.; FONTES, E. S.; SHIN, Y. G.; CORDELL, G.A. A cytotoxic diterpene from *Alomia myriadenia*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 877-880, 2000.

ZDERO, F. C.; BOHLMANN, J. C.; SOLOMON, R. M.; ROBINSON, K.; ROBINSON, H. Entclerodanes and other constituents from bolivian *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 28 (2), p. 531-542, 1989.

7 ANEXOS

7.1 Concentrações obtidas para os voláteis

Nas tabelas 17 a 30 são apresentadas as concentrações de cada componente identificado presente no óleo, para cada acesso ao longo do ano em estudo. Estes resultados foram obtidos calculando-se a média aritmética entre as quatro repetições.

Tabela 17: Concentrações de α -pineno em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0	0	0	0	0	0	0	1,30	0	0	8,54	9,06
Acesso 2	0	0	0	0	0	0	1,51	5,14	1,28	8,86	11,61	11,85
Acesso 3	0	0	0	0	0	0	1,95	1,09	0	1,31	5,39	4,87
Acesso 4*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,00	0
Acesso 5	0	0	0	0	0	0	0	2,28	0	7,99	13,55	4,01
Acesso 6	0	0	0	0	0	0	0	1,34	0	3,91	3,45	0
Acesso 7	0	0	0	0	0	0	0	4,28	1,31	8,94	3,95	16,86
Acesso 8	0	0	0	0	0	1,17	1,46	6,95	1,17	8,53	8,85	12,69
Acesso 9	0	0	0	0	0	0	0	2,08	0	1,73	6,64	3,54
Acesso10	0	0	0	0	0	0	0	3,81	0	6,28	6,93	2,50

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 18: Concentrações de β -pineno em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0	0	0	0	0	0	1,91	3,43	5,52	6,18	13,63	20,30
Acesso 2	0	0	0	0	0	0	1,77	7,63	10,02	10,52	14,01	17,09
Acesso 3	0	0	0	0	0	1,16	4,23	8,93	3,71	5,05	13,46	17,51
Acesso 4*	0	0	0	0	0	0	0	1,46	0	0	5,97	0
Acesso 5	0	0	0	0	4,65	2,03	8,18	13,66	12,29	28,54	50,98	21,52
Acesso 6	0	0	0	0	0	1,42	5,82	12,50	8,39	16,89	14,02	12,08
Acesso 7	0	0	0	0	0	0	3,61	11,02	11,12	13,50	9,27	34,34
Acesso 8	0	0	0	0	0	2,24	2,73	20,70	7,99	18,67	17,10	32,46
Acesso 9	0	0	0	0	0	0	0	11,51	6,98	3,04	9,11	8,55
Acesso10	0	0	0	0	0	0	2,99	7,09	4,35	14,44	13,76	8,14

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 19: Concentrações de limoneno em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0	0	0	0	0	0	6,13	6,63	7,79	8,39	19,03	21,57
Acesso 2	0	0	0	0	3,75	3,83	5,53	12,94	11,89	18,74	22,77	22,28
Acesso 3	0	0	0	0	0	1,23	4,37	8,74	2,94	3,70	10,87	10,77
Acesso 4*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,19	0
Acesso 5	0	0	0	0	1,27	1,00	4,09	6,33	6,66	13,82	22,93	10,86
Acesso 6	0	0	0	0	4,36	8,30	9,97	19,43	9,95	18,21	20,36	13,09
Acesso 7	0	0	0	0	1,42	4,74	5,97	15,98	10,77	13,82	13,91	35,22
Acesso 8	0	0	0	0	3,62	3,94	4,63	16,31	6,20	14,59	14,84	19,43
Acesso 9	0	0	0	0	0,89	0	2,99	9,87	6,13	4,64	9,71	7,76
Acesso10	0	0	0	0	0	1,61	5,89	12,33	6,58	17,20	17,82	9,94

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 20: Concentrações de trans-cariofileno em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	2,95	7,48	5,92	15,43	20,98	17,95	21,22	17,03	17,96	24,98	35,93	35,10
Acesso 2	2,51	8,37	5,08	16,46	20,02	22,21	21,45	22,14	22,07	53,63	39,77	42,59
Acesso 3	13,10	9,06	5,99	21,08	19,82	28,11	24,43	25,26	21,99	50,77	50,34	45,83
Acesso 4*	0	0	0,58	9,52	6,66	9,60	9,29	10,81	12,52	35,04	22,43	24,92
Acesso 5	7,39	4,20	2,84	13,12	14,11	14,94	20,46	18,63	20,21	51,16	74,36	42,08
Acesso 6	9,81	6,89	5,32	13,47	18,60	20,59	21,06	25,31	19,94	52,00	39,41	37,22
Acesso 7	11,10	7,38	5,03	15,35	17,16	19,07	22,89	24,21	18,44	51,18	36,80	40,62
Acesso 8	8,07	4,19	4,54	12,22	16,42	15,79	18,42	21,64	20,32	47,30	30,71	34,62
Acesso 9	6,83	5,18	4,28	14,28	10,83	16,89	16,91	20,54	15,80	38,12	28,14	27,12
Acesso10	8,20	5,45	4,42	15,96	20,48	22,68	21,87	21,50	20,35	51,25	34,44	33,88

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 21: Concentrações de aromadendreno em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0	0,89	2,70	6,48	8,55	8,69	7,32	7,72	7,32	8,87	11,18	8,77
Acesso 2	0	3,26	0,75	5,91	9,52	9,42	7,76	10,23	8,94	17,56	12,65	13,27
Acesso 3	4,64	0	0,82	6,40	7,91	10,43	7,43	9,61	7,09	14,97	13,90	10,98
Acesso 4*	0	0	0	0	0	1,21	0	3,88	4,30	9,55	6,24	4,60
Acesso 5	0	0	0,65	3,43	6,18	5,36	5,81	6,09	6,16	15,78	26,37	9,98
Acesso 6	4,02	0	2,81	6,19	8,69	8,76	8,02	10,98	8,12	19,00	14,24	11,13
Acesso 7	4,57	2,81	2,88	5,82	8,53	7,73	8,02	9,84	6,75	17,30	12,49	12,39
Acesso 8	0,88	0	1,35	3,73	7,63	6,75	6,46	8,68	7,37	14,76	10,39	9,75
Acesso 9	1,16	0	0	5,23	4,60	6,31	6,14	8,18	5,21	12,50	9,66	7,78
Acesso10	0	0	2,50	4,10	9,21	7,91	6,68	8,22	7,22	16,73	11,04	8,01

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 22: Concentrações de α -humuleno em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0	1,02	0	6,12	7,00	6,85	7,62	7,19	7,03	9,16	12,97	11,26
Acesso 2	0	0	0	6,26	7,79	8,47	7,85	9,13	9,02	19,06	14,09	16,51
Acesso 3	4,61	0	0	8,04	7,64	11,11	9,63	10,28	8,78	17,72	17,62	16,28
Acesso 4*	0	0	0	0	0	2,29	1,18	4,75	5,06	12,96	9,13	9,37
Acesso 5	0	0	0	3,89	4,01	4,85	6,22	6,74	7,12	18,57	24,78	12,53
Acesso 6	0	0	0	4,34	6,53	7,59	7,65	10,29	7,87	18,50	13,95	13,34
Acesso 7	1,02	0,84	0,58	1,65	6,30	6,69	8,24	9,65	7,39	18,32	13,04	16,09
Acesso 8	1,00	0	0	5,13	6,66	6,42	7,14	9,74	8,77	18,27	12,71	13,97
Acesso 9	0	0	0	3,67	3,55	6,18	6,18	8,01	6,46	14,27	11,23	9,85
Acesso10	0	0	1,13	5,70	6,98	7,78	6,89	8,12	7,90	18,18	11,99	10,60

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 23: Concentrações de germacreno D em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	1,66	6,97	4,29	17,90	16,95	16,53	19,46	15,13	17,43	20,80	33,93	30,80
Acesso 2	0	8,57	5,36	21,76	20,33	25,38	22,27	19,31	24,13	42,56	38,19	49,23
Acesso 3	12,64	8,58	6,00	29,84	16,71	29,72	25,85	24,62	26,98	42,56	53,28	52,15
Acesso 4*	0	0	0	8,34	1,28	6,30	5,67	7,72	10,40	24,60	18,73	19,68
Acesso 5	6,50	4,04	2,87	13,60	12,10	14,35	18,42	17,43	16,53	30,94	42,46	34,30
Acesso 6	8,95	6,79	4,55	18,95	14,23	21,34	20,25	27,19	21,37	40,59	34,79	40,18
Acesso 7	9,87	7,42	4,65	17,66	14,53	17,99	20,72	21,94	23,12	39,42	35,92	43,45
Acesso 8	6,56	1,52	3,58	16,64	15,66	18,06	18,16	25,40	24,54	43,37	35,14	43,45
Acesso 9	7,26	5,55	4,06	17,79	11,88	23,62	21,69	27,07	23,23	35,71	36,97	30,68
Acesso10	3,68	4,64	3,67	16,59	13,69	23,32	17,71	23,74	23,41	37,30	33,53	29,45

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 24: Concentrações de biciclogermacreno em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	3,26	9,06	6,30	22,00	30,93	30,18	25,99	22,71	27,27	30,55	49,42	42,01
Acesso 2	4,80	12,82	9,36	27,66	37,65	43,75	32,37	30,88	35,52	63,38	57,76	73,56
Acesso 3	22,26	11,62	8,59	30,40	29,53	46,02	32,00	34,55	35,45	60,69	74,70	67,99
Acesso 4*	0	0	0	13,15	9,74	15,51	10,46	14,01	16,29	41,60	32,94	32,12
Acesso 5	13,97	7,74	5,26	19,82	24,93	26,29	32,49	27,28	32,50	51,04	89,36	60,32
Acesso 6	18,21	11,88	6,33	28,29	28,30	38,59	32,31	41,88	34,07	68,94	61,59	61,50
Acesso 7	18,40	12,66	8,39	25,78	29,71	32,04	33,20	34,27	33,14	62,60	58,28	61,80
Acesso 8	15,71	2,92	6,70	22,78	27,95	30,09	27,67	35,53	35,41	65,23	56,14	62,91
Acesso 9	14,16	9,39	6,47	23,76	21,75	38,89	32,97	38,53	31,82	55,73	57,79	46,24
Acesso10	10,18	7,14	4,28	22,44	29,33	38,45	25,59	32,67	32,58	57,81	51,73	40,27

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 25: Concentrações de δ -cadineno em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	12,41	25,20	21,39	33,04	30,06	32,63	35,63	30,20	30,53	35,26	46,59	43,23
Acesso 2	12,67	31,88	19,38	38,90	34,32	43,47	36,39	43,45	44,08	65,70	57,95	70,42
Acesso 3	37,33	25,69	22,90	41,04	32,19	49,81	42,91	43,51	37,31	84,92	64,64	59,69
Acesso 4*	9,69	10,11	4,95	17,23	10,00	16,95	13,56	16,38	18,04	26,95	22,12	21,04
Acesso 5	17,68	14,96	10,41	20,79	19,22	20,14	23,77	22,75	31,16	43,49	91,64	35,26
Acesso 6	26,20	22,48	16,37	34,11	26,26	36,14	37,54	41,70	36,64	63,67	55,85	52,93
Acesso 7	25,10	25,40	15,84	29,73	26,14	30,56	35,16	39,35	31,85	55,25	49,65	57,03
Acesso 8	22,31	18,71	16,39	29,42	25,02	29,01	28,60	37,17	36,13	51,73	45,89	47,36
Acesso 9	22,96	19,87	15,98	31,98	18,28	31,24	31,18	34,57	27,57	45,71	44,31	39,80
Acesso10	21,47	20,71	16,22	32,31	29,98	36,96	32,73	34,06	34,88	60,13	48,20	39,05

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 26: Concentrações de nerolidol em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	124,16	134,13	131,11	214,28	264,47	281,52	346,11	368,42	322,59	352,28	554,40	523,70
Acesso 2	86,10	125,90	88,89	178,83	214,30	233,23	226,18	329,08	327,11	407,23	395,46	434,65
Acesso 3	270,03	154,48	146,02	239,59	333,61	426,96	412,24	427,79	369,96	520,99	604,47	654,94
Acesso 4*	72,99	57,71	43,50	105,06	86,82	137,98	148,15	134,66	168,23	189,76	180,53	175,03
Acesso 5	140,04	89,54	71,38	130,97	202,01	193,64	252,00	233,13	366,45	452,72	654,47	406,24
Acesso 6	183,40	125,29	102,89	236,83	270,77	331,58	384,79	466,99	430,89	643,52	619,98	634,30
Acesso 7	201,46	158,13	102,97	229,93	334,37	305,47	365,07	493,72	377,32	571,74	675,46	789,22
Acesso 8	183,12	120,89	127,84	222,57	304,01	324,35	320,15	455,87	487,17	701,46	685,28	703,58
Acesso 9	166,66	107,02	88,69	179,04	184,60	244,72	284,44	316,04	280,51	492,39	523,78	413,68
Acesso10	151,45	111,89	97,52	191,24	252,22	276,75	313,96	322,09	353,18	589,93	566,85	379,75

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 27: Concentrações de espatulenol em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	91,17	96,37	86,88	117,97	149,66	146,66	124,57	137,09	127,30	136,15	160,86	182,41
Acesso 2	93,48	106,70	75,44	131,30	168,10	135,10	140,30	180,35	161,84	220,21	182,18	227,01
Acesso 3	179,35	102,96	83,99	127,79	141,13	147,77	127,59	153,05	113,68	173,58	154,02	187,78
Acesso 4*	61,95	48,39	36,77	73,89	71,80	91,43	82,34	84,96	81,83	113,25	95,92	100,84
Acesso 5	145,09	87,74	53,59	105,44	138,85	125,59	143,20	140,44	206,82	263,40	325,48	203,63
Acesso 6	130,83	89,54	62,76	141,73	131,14	134,83	135,03	197,40	153,36	228,85	205,95	215,41
Acesso 7	125,92	94,51	59,01	138,96	138,94	119,30	137,15	179,98	136,34	214,83	188,69	251,70
Acesso 8	123,07	83,01	70,18	114,54	128,22	133,86	126,64	170,50	171,92	226,85	184,61	201,20
Acesso 9	137,93	79,32	58,96	115,35	108,83	124,32	116,05	140,18	125,18	209,53	177,88	150,03
Acesso10	130,50	81,65	60,98	122,84	146,50	141,93	119,70	152,91	160,17	261,50	184,32	180,56

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 28: Concentrações de viridiflorol em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	4,69	6,39	3,03	10,03	14,32	12,52	10,06	8,25	8,67	10,11	15,82	15,92
Acesso 2	0	8,63	5,36	11,02	16,81	14,86	11,71	14,60	12,40	19,21	18,82	22,51
Acesso 3	20,66	12,87	8,49	13,01	17,63	17,35	17,84	17,15	14,74	20,44	23,95	23,62
Acesso 4*	2,05	0	0	4,41	4,81	9,41	7,59	8,20	7,75	12,19	12,46	13,11
Acesso 5	20,82	11,23	6,47	14,84	17,30	17,14	22,55	17,20	21,19	40,74	47,36	33,50
Acesso 6	8,01	1,47	4,27	8,93	12,40	11,77	10,51	13,38	9,43	17,24	18,19	17,04
Acesso 7	7,74	4,36	3,27	9,17	13,73	11,41	13,07	13,75	8,74	18,33	17,81	23,50
Acesso 8	4,18	0	3,53	5,72	13,30	10,95	12,21	13,32	12,53	18,99	19,88	18,70
Acesso 9	3,35	0	0	4,68	7,46	8,34	8,37	8,50	5,39	14,95	14,63	12,16
Acesso10	0	0	3,18	5,05	11,82	10,66	8,48	9,45	8,40	18,89	13,62	11,56

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 29: Concentrações de guaiol em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0	0	3,50	7,01	9,07	7,45	10,66	4,33	5,26	5,58	9,73	9,74
Acesso 2	0	0	0	1,60	1,75	2,61	4,91	6,48	3,23	8,90	6,92	8,91
Acesso 3	7,95	0	0	4,59	9,93	9,57	10,05	9,13	6,36	9,02	10,64	11,98
Acesso 4*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acesso 5	0	1,56	1,28	1,05	4,15	7,57	8,18	4,60	3,59	11,84	30,85	9,20
Acesso 6	11,05	0	5,62	12,02	10,94	17,14	18,62	13,84	10,05	18,16	18,22	17,79
Acesso 7	6,04	4,84	4,41	7,64	10,74	11,76	16,08	13,70	7,97	13,87	14,19	16,20
Acesso 8	6,77	0	5,05	9,96	13,15	12,03	14,32	12,65	12,06	16,71	15,15	15,25
Acesso 9	2,03	0	0	6,74	4,42	9,52	9,69	7,95	5,09	11,22	12,42	11,39
Acesso10	0	0	1,84	0	1,71	6,17	5,50	5,94	4,41	7,80	7,70	7,32

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Tabela 30: Concentrações de α -muurulol em mg/100g em *B. dracunculifolia* cultivada.

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	24,09	28,38	25,62	52,74	53,32	49,43	52,17	48,87	34,93	39,40	58,11	61,30
Acesso 2	25,06	32,88	24,02	59,29	61,29	58,05	52,43	55,60	46,11	71,06	74,96	80,19
Acesso 3	53,30	32,81	29,30	62,03	63,93	65,42	60,50	54,01	39,29	55,84	70,32	73,36
Acesso 4*	3,80	2,29	6,43	22,62	15,93	24,45	20,80	17,47	15,99	24,65	24,64	25,22
Acesso 5	22,63	18,13	11,74	22,74	30,69	31,50	33,19	25,83	26,30	49,25	80,98	41,51
Acesso 6	36,26	26,87	18,30	52,69	46,05	49,88	54,27	59,14	42,08	71,49	68,79	67,95
Acesso 7	33,54	27,69	17,01	52,20	51,62	42,38	53,54	55,35	35,99	59,88	61,79	76,74
Acesso 8	29,64	21,02	19,61	42,79	44,65	41,17	41,18	45,42	43,17	61,45	58,63	59,29
Acesso 9	32,79	20,93	14,00	45,16	31,04	40,55	40,70	37,08	29,44	50,51	54,74	46,19
Acesso10	30,48	23,32	17,96	53,15	50,64	49,13	47,68	42,96	40,73	69,63	58,26	51,62

*Os valores apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

7.2 Concentrações para os componentes fixos

Nas tabelas 31 a 37 são apresentadas as concentrações de cada composto fenólico, presentes nos extratos hidroalcoólicos de *B. dracunculifolia* cultivadas..

Tabela 31: Concentrações de ácido caféico em % (g/100g).

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	3,70	4,32	5,07	4,37	3,40	4,29	4,18	3,86	5,35	4,65	5,58	4,23
Acesso 2	3,41	4,14	4,09	3,40	3,12	4,35	4,05	3,47	4,70	3,76	5,06	4,34
Acesso 3	3,45	4,68	4,41	3,74	3,58	5,68	4,41	4,02	4,31	1,57	4,87	4,07
Acesso 4	4,09	3,99	4,90	4,57	3,81	6,50	5,14	3,70	4,76	1,42	3,97	3,67
Acesso 5	3,51	4,14	4,67	3,34	2,53	3,71	3,33	3,34	4,02	4,06	5,06	3,78
Acesso 6	3,57	3,96	4,42	4,10	3,25	5,57	4,49	3,44	5,24	3,32	5,58	4,36
Acesso 7	3,70	3,99	4,66	4,24	2,94	4,11	4,02	3,96	5,17	5,30	5,62	4,39
Acesso 8	3,45	4,07	3,53	3,54	2,71	4,55	4,32	3,73	5,00	4,47	5,03	4,20
Acesso 9	3,50	3,95	3,58	4,09	3,03	4,82	3,58	3,41	4,85	4,60	5,09	5,03
Acesso10	3,15	4,29	4,01	4,24	3,99	6,00	4,24	3,60	5,87	5,66	5,81	5,27

Tabela 32: Concentrações de ácido cumárico em % (g/100g).

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0	0	0	0,11	0	0	0,13	0,18	0,17	0,16	0	0
Acesso 2	0	0	0	0,07	0	0	0,15	0,14	0,13	0	0	0
Acesso 3	0	0	0	0,08	0	0,14	0,16	0,16	0,15	0	0	0
Acesso 4	0	0	0	0	0	0,11	0,10	0	0	0	0	0
Acesso 5	0	0	0	0	0	0,12	0,10	0,16	0,17	0	0	0
Acesso 6	0	0	0	0	0	0,16	0,10	0,13	0,15	0	0	0
Acesso 7	0	0	0	0	0	0,18	0,12	0,17	0,17	0	0	0
Acesso 8	0	0	0,07	0	0	0,17	0,11	0,14	0,14	0	0	0
Acesso 9	0	0	0,08	0	0	0,20	0,15	0,15	0	0	0	0
Acesso10	0	0	0,08	0	0	0,17	0,15	0,12	0	0	0	0

Tabela 33: Concentrações de ácido ferúlico em % (g/100g).

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0,47	0,50	0,73	0,42	0,69	0,37	0,49	0,56	0,47	0,55	0,82	0,80
Acesso 2	0,42	0,53	0,50	0,35	0,68	0,36	0,60	0,52	0,45	0,53	0,49	0,51
Acesso 3	0,54	0,57	0,60	0,37	0,65	0,57	0,65	0,54	0,39	0,50	0,49	3,41
Acesso 4*	0,05	0	0	0,16	0,05	0,13	0,16	0,04	0	0	0	0
Acesso 5	0,39	0,33	0,46	0,35	0,23	0,30	0,28	0,25	0,23	0,23	0,56	0,28
Acesso 6	0,50	0,53	0,60	0,65	0,43	0,53	0,58	0,49	0,47	0,61	0,52	0,62
Acesso 7	0,51	0,50	0,66	0,68	0,54	0,51	0,48	0,51	0,41	1,12	0,81	0,61
Acesso 8	0,47	0,49	0,39	0,60	0,45	0,54	0,60	0,50	0,45	0,85	0,49	0,53
Acesso 9	0,50	0,49	0,37	0,74	0,37	0,56	0,45	0,49	0,65	0,82	0,71	0,49
Acesso10	0,31	0,50	0,45	0,60	0,49	0,61	0,63	0,57	0,77	1,03	0,93	0,62

*Os valores apresentam diferenças significantes ($p < 0,01$).

Tabela 34: Concentrações de aromadendrina-4'-metil éter em % (g/100g).

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0,64	0,30	0,32	0,39	0,91	0,51	0,38	0,22	0,20	0,81	0,61	0,67
Acesso 2	0,73	0,30	0,29	0,38	0,69	0,29	0,32	0,27	0,35	0,64	0,54	0,45
Acesso 3	0,49	0,29	0,20	0,18	0,37	0,43	0,24	0,24	0,13	0,81	0,66	0,72
Acesso 4*	0,79	0,45	0,56	0,72	1,11	0,92	0,90	0,88	0,92	0,91	0,86	0,90
Acesso 5	0,47	0,27	0,27	0,50	0,80	0,63	0,49	0,56	0,44	0,06	0,37	0,47
Acesso 6	0,78	0,40	0,29	0,42	0,79	0,59	0,32	0,33	0,45	0,81	0,66	0,79
Acesso 7	0,80	0,39	0,31	0,38	0,76	0,46	0,30	0,24	0,15	0,85	0,58	0,75
Acesso 8	0,83	0,56	0,32	0,37	0,89	0,46	0,25	0,21	0,14	0,67	0,71	0,67
Acesso 9	0,60	0,29	0,26	0,34	0,62	0,43	0,27	0,20	0,29	0,49	0,55	0,57
Acesso10	0,72	0,30	0,25	0,20	0,59	0,45	0,32	0,39	0,32	0,67	0,56	0,57

*Os valores apresentam diferenças significantes ($p < 0,001$).

Tabela 35: Concentrações de isosakuranetina em % (g/100g).

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0	0	0	0,49	0,53	0	0,61	0,92	0,74	1,11	0,89	0,16
Acesso 2	0	0	0	0	0	0	0,50	0,55	0,52	0,75	0,80	0,67
Acesso 3*	0	0	0	0,71	1,01	0,86	1,19	1,18	0,78	1,27	1,32	1,40
Acesso 4*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acesso 5	0	0	0	0	0	0,26	0,26	0,25	0,26	0,35	0,36	0,47
Acesso 6	0	0	0	0	0,37	0,34	0,56	0,49	0,50	0,81	0,69	0,60
Acesso 7	0	0	0	0,34	0,69	0,48	0,68	0,79	0,58	1,16	0,87	0,86
Acesso 8	0	0	0	0,35	0,62	0,45	0,65	0,65	0,58	0,78	0,77	0,74
Acesso 9	0	0	0	0,37	0,50	0,48	0,56	0,59	0,47	0,81	0,86	0,75
Acesso10	0	0	0	0	0,45	0,40	0,57	0,61	0,53	0,86	0,83	0,79

*Os valores apresentam diferenças significantes ($p < 0,05$).

Tabela 36: Concentrações de artepelin C em % (g/100g).

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0,04	0,11	0,15	0,10	0,10	0,13	0,26	0,41	0,46	0,53	0,46	0,72
Acesso 2	0,04	0,08	0,05	0,09	0,11	0,19	0,31	0,32	0,49	0,47	0,47	0,71
Acesso 3	0,04	0,11	0,12	0,10	0,17	0,28	0,35	0,36	0,36	0,50	0,53	0,77
Acesso 4*	0	0	0	0	0	0	0,06	0,05	0,05	0,08	0,10	0,16
Acesso 5	0	0,03	0,06	0	0,04	0,13	0,06	0,15	0,18	0,26	0,37	0,45
Acesso 6	0,03	0,15	0,15	0,10	0,13	0,26	0,45	0,38	0,50	0,71	0,55	0,87
Acesso 7	0,03	0,14	0,12	0,10	0,17	0,23	0,29	0,37	0,38	0,71	0,55	0,96
Acesso 8	0,04	0,10	0,12	0,09	0,19	0,22	0,30	0,26	0,31	0,46	0,45	0,65
Acesso 9	0	0,08	0,10	0,11	0,09	0,21	0,20	0,23	0,18	0,44	0,51	0,73
Acesso10	0,04	0,10	0,16	0,13	0,14	0,20	0,31	0,23	0,29	0,58	0,59	1,09

*Os valores apresentam diferenças significantes ($p < 0,05$).

Tabela 37: Concentrações de bacarina em % (g/100g).

	mai/04	jun/04	jul/04	ago/04	set/04	out/04	nov/04	dez/04	jan/05	fev/05	mar/05	abr/05
Acesso 1	0,31	0,41	0,59	0,60	0,57	0,59	1,08	1,60	1,71	1,91	1,74	2,39
Acesso 2	0,30	0,40	0,33	0,48	0,56	0,71	1,23	1,27	1,66	1,69	1,74	2,10
Acesso 3	0,42	0,58	0,59	0,69	0,94	1,16	1,59	1,56	1,49	1,91	2,01	2,37
Acesso 4*	0	0	0	0	0,20	0,17	0,31	0,27	0,23	0,30	0,36	0,43
Acesso 5	0,20	0,18	0,27	0,25	0,34	0,54	0,66	0,72	0,87	1,11	1,49	1,57
Acesso 6	0,28	0,48	0,54	0,53	0,66	0,96	1,47	1,36	1,62	2,22	1,84	2,54
Acesso 7	0,31	0,41	0,47	0,54	0,78	0,86	1,10	1,39	1,37	2,34	1,85	2,65
Acesso 8	0,35	0,40	0,52	0,60	0,99	0,93	1,30	1,22	1,41	1,80	1,98	2,25
Acesso 9	0,26	0,36	0,47	0,68	0,56	0,91	0,81	1,08	0,90	1,61	1,83	2,11
Acesso10	0,30	0,40	0,62	0,71	0,73	0,89	1,26	1,18	1,30	2,21	2,22	3,03

*Os valores apresentam diferenças significantes ($p < 0,05$).

7.3 Perfis cromatográficos dos padrões e amostra de própolis verde

Figura 37: (A) perfil cromatográfico dos padrões. 1-ácido caféico, 2-ácido cumárico, 3-ácido ferúlico, 4-ácido cinâmico, 5-aromadendrina-4'-metil éter, 6-drupanina, 7-isosakuranetina, 8-artepelin C, 9-bacarina e 10-ácido 2,2 dimetil-6-carbóxi-tenil-2H-1-benzopirano. (B) amostra de própolis verde. (C) ampliação de (A).