

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
(UNIRIO)

VANESSA MARIA FERREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO VOLÁTIL TERPÊNICA DE AMOSTRAS DE
CARQUEJA AMARGA (*Baccharis trimera*)**

Rio de Janeiro

2018



UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO BIOMÉDICO
DEPARTAMENTO DE SAÚDE COLETIVA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

VANESSA MARIA FERREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO TERPÊNICA VOLÁTIL DE AMOSTRAS DE
CARQUEJA AMARGA (*Baccharis trimera*)**

Monografia apresentada ao Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

ORIENTADOR: Prof. Ricardo Felipe Alves Moreira
COORIENTADORA: Profa. Cristiane Barbosa Rocha

Rio de Janeiro
2018

S231 Santos, Vanessa Maria Ferreira dos
Caracterização da fração volátil terpênica de
amostra de Carqueja Amarga (*Baccharis trimera*) /
Vanessa Maria Ferreira dos Santos. -- Rio de
Janeiro, 2018.
34 p.

Orientador: Ricardo Felipe Alves Moreira.
Coorientadora: Cristiane Barbosa Rocha.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro,
Graduação em Biomedicina, 2018.

1. Carqueja amarga. 2. Fração volátil terpênica.
3. Hidrodestilação. 4. Extração em fase sólida. 5.
Cromatografia gasosa. I. Moreira, Ricardo Felipe
Alves, orient. II. Rocha, Cristiane Barbosa,
coorient. III. Título.

VANESSA MARIA FERREIRA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DA FRAÇÃO TERPÊNICA VOLÁTIL DE AMOSTRAS DE
CARQUEJA AMARGA (*Baccharis trimera*)**

Monografia apresentada ao Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Monografia apresentada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Felipe Alves Moreira (DSC/IB/UNIRIO)

Coorientadora: Profa. Dra. Cristiane Barbosa Rocha (DCF/IB/UNIRIO)

1° Examinador: Profa. Dra. Patrícia Cristina dos Santos Costa
(Departamento de Ciências Fisiológicas / IB / UNIRIO)

2° Examinador: Prof. MSc Thiago Vieira de Moraes
(PPGAN / UNIRIO)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela proteção, força e por me guiar em todos os dias de minha vida.

Aos meus pais Alice e Jorge e minha irmã Elizabeth, por não medirem esforços para que eu pudesse ter a oportunidade de estudar, sempre me cobrindo de amor, carinho, solidariedade, incentivo e por acreditarem sempre no meu sucesso.

Aos meus avós Maria do Carmo, Olympio, Nair e Renato, que mesmo do céu me protegem e me fortalecem.

Ao meu orientador Ricardo Felipe Alves Moreira e a minha coorientadora Cristiane Barbosa Rocha, pela orientação e confiança depositada em mim. Obrigada pelo exemplo de dedicação, seriedade e paixão pela pesquisa.

Aos meus colegas, em especial Iara e João, companheiros de experimentos, do Laboratório de Avaliação da Composição e do Aroma de Produtos Alimentícios (LACAPA), pelas dicas e convivência durante todo esse tempo.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

RESUMO

A carqueja amarga (*Baccharis trimera* (Less.) DC) possui grande utilização na medicina tradicional e na produção de fitoterápicos. Ela é usada para a solução de problemas hepáticos, disfunções estomacais e intestinais, para diabetes, obesidade e reumatismo. Essas propriedades estão, obviamente, associadas à composição química de suas folhas. Alguns dos componentes da fração terpênica volátil dessas folhas têm potencial para figurarem entre os princípios ativos mais importantes dessa erva e também podem servir como marcadores químicos dessa espécie. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi caracterizar quimicamente a fração terpênica volátil de amostras de carqueja amarga *in natura* e comercializadas na forma de sachês, usando hidrodestilação, extração em fase sólida e técnicas cromatográficas. Quarenta compostos terpênicos foram identificados nos óleos essenciais e onze nos chás estudados. O 3-careno, isoforona, eucarvona, -gurjuneno, (E)- -farneseno, -copaeno, -cadineno, *trans*-longipinocarveol, -eudesmol, fitol, cis-muurola-3,5-dieno e isobutirato de nerolidol foram identificados pela primeira vez como componentes da fração terpênica volátil da erva carqueja amarga. O perfil químico dos óleos essenciais tem mais potencial para uso na autenticação de amostras comerciais do que o perfil químico da fração terpênica volátil dos chás.

Palavras-chave: *Baccharis trimera*, composição química, óleos essenciais, chás, fração volátil.

ABSTRACT

The bitter carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC) has great use in traditional medicine and in the production of herbal medicines. It is used to treat liver problems, stomach and intestinal disorders, diabetes, obesity and rheumatism. The above mentioned properties are obviously associated with the chemical composition of its leaves. Some compounds present in the volatile terpenic fraction of these leaves are among the most important active ingredients of this herb and also can be used as chemical markers of this specie. Thus, the objective of this study was to characterize the volatile terpenic fraction of *in natura* and commercial samples of bitter carqueja that were sold as sachets, using hydrodistillation, solid phase extraction and chromatographic techniques. A total of forty compounds were identified as components of the essential oils and eleven as components of the volatile terpenic fraction of the teas of these samples. The compounds 3-carene, isophorone, eucarvone, -gurjunene, (E)- -farnesene, -copaene, -cadinene, *trans*-longipinocarveol, -eudesmol, phytol, *cis*-muurola-3,5-diene and nerolidol isobutyrate were identified by the first time as components of the volatile terpenic fraction of bitter carqueja. The chemical profile of the essential oils appears to be more effective to be used in the authentication of commercial samples than the chemical profile of the volatile terpenic fraction of the teas.

Key words: *Baccharis trimera*, chemical composition, essential oils, teas, volatile fraction.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** – Compostos voláteis terpênicos já identificados na *Baccharis trimera* _ 15
- Quadro 2** – Principais componentes do óleo essencial da *B. trimera* e seus respectivos efeitos fisiológicos _ 16

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos voláteis identificados nos óleos essenciais provenientes das amostras de <i>Baccharis trimera in natura</i> (grupo 1) ou vendidas na cidade do Rio de Janeiro na forma de sachês (grupo 2)	_	23
Tabela 2 - Compostos majoritários dos óleos essenciais das amostras de <i>Baccharis trimera</i> do grupo 1	_	25
Tabela 3 - Compostos majoritários dos óleos essenciais das amostras de <i>Baccharis trimera</i> do grupo 2	_	25
Tabela 4 - Compostos voláteis terpênicos identificados nos chás provenientes das amostras de <i>Baccharis trimera in natura</i> (grupo 1) ou vendidas na cidade do Rio de Janeiro na forma de sachês (grupo 2)	_	27
Tabela 5 - Compostos voláteis identificados nos chás e óleos essenciais provenientes das amostras de <i>Baccharis trimera in natura</i> ou vendidas na cidade do Rio de Janeiro na forma de sachês	_	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Extração do óleo essencial	_____	19
Figura 2 -	Passagem do chá de carqueja amarga pela coluna com Porapak Q	_____	20

LISTA DE ABREVIATURAS

BT	– Amostra <i>in natura</i> de <i>Baccharis trimera</i>
CG/DIC	– Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama
CG/EM	– Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DO	– Diterpeno oxigenado
DP	– Desvio padrão
ECT	– Embrapa Clima Temperado
IK	– Índice de Kovats modificado
IKL	– Índice de Kovats da literatura
Med	– Média
M	– Monoterpeno
MO	– Monoterpeno oxigenado
Nd	– Não disponível
nd	– Não detectado
S	– Sesquiterpeno
S1	– Amostra comercial de sachê 1
S2	– Amostra comercial de sachê 2
S3	– Amostra comercial de sachê 3
SO	– Sesquiterpeno oxigenado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. METODOLOGIA	18
3.1 AMOSTRAS	18
3.2 MATERIAIS	18
3.3 ISOLAMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS AMOSTRAS DE CARQUEJA	18
3.4 ISOLAMENTO DA FRAÇÃO VOLÁTIL DOS CHÁS DE CARQUEJA	19
3.5 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO EM CHAMAS (CG/DIC)	20
3.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)	22
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÕES	30
6. AGRADECIMENTOS	30
7. REFERÊNCIAS	30

1 - INTRODUÇÃO

A variedade do clima e a riqueza da flora brasileira garantem uma quantidade enorme de ervas com diferentes propriedades terapêuticas. Nesse grupo podemos destacar as ervas do gênero *Baccharis*, conhecidas como carquejas. No Brasil, estão descritas cento e vinte espécies de *Baccharis* distribuídas majoritariamente na região sul (BARROSO, 1976; VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005). Entretanto, apenas cerca de trinta dessas espécies tiveram suas atividades biológicas estudadas, destacando-se as atividades alelopática, analgésica, antidiabética, antifúngica, anti-inflamatória, antileucêmica, antimicrobiana, antimutagênica, antioxidante, antiviral, citotóxica, espasmolítica, gastroprotetora, hepatoprotetora, inseticida e vasorrelaxante (KUPCHAN *et al.*, 1976; SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987; HE *et al.*, 1996; DE LAS HERAS *et al.*, 1998; NAKASUGI; KOMAI, 1998; TORRES *et al.*, 2000; WEIMANN *et al.*, 2002; FERESIN *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Das trinta espécies mencionadas anteriormente, a mais importante é a *Baccharis trimera* (Less.) DC, também denominada *Baccharis genistelloides* var. *trimera* (Less.) Baker, que possui grande utilização na medicina tradicional e na produção de fitoterápicos (BORELLA *et al.*, 2006). No Brasil, as amostras de carqueja comercializadas no varejo, embaladas em sacos plásticos ou em caixas contendo sachês para a confecção de chás, são normalmente designadas como pertencentes a essa espécie (*Baccharis trimera*). Essa erva faz parte de uma lista conhecida como RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), na qual figuram as espécies vegetais com potencial para o desenvolvimento da cadeia produtiva a fim de gerar produtos de interesse ao SUS (Sistema Único de Saúde) (BRASIL, 2008).

A infusão das folhas e ramos de *Baccharis trimera* já foi indicada para o tratamento da esterilidade feminina e da impotência sexual masculina. Além disso, já se atribuiu a esse tipo de infusão propriedades tônicas, febrífugas e estomáticas (LORENZI; MATOS, 2002). O uso medicinal dessa planta tem aumentando nas últimas décadas, principalmente para o tratamento de problemas hepáticos, disfunções estomacais e intestinais, para diabetes, obesidade e reumatismo (AULER, 2004; CARREIRA, 2007). Essa espécie de carqueja, mais conhecida como carqueja amarga, também é usada como anti-helmíntico, contra anorexia, gripe, resfriado, assim como em feridas e ulcerações, entre outras funções (DRESCH *et al.*, 2006).

Os flavonoides (quercetina, luteolina, genisteína, naringenina, cianidina, epicatequina) estão entre os metabólitos secundários encontrados em maior quantidade na *Baccharis trimera*

ra e são indicados como potencialmente responsáveis por boa parte de suas atividades terapêuticas. Outro grupo de destaque com relação ao potencial bioativo é aquele formado por alguns compostos diterpênicos (não constituintes do óleo essencial dessa erva) e suas lactonas: bacrispina, 1-desóxi-bacrispina, ácido hautriwaico e sua lactona e malonil clerodanos. Por último, podemos destacar o grupo bioativo dos compostos voláteis terpênicos. Esses compostos estão presentes, por exemplo, no óleo essencial das folhas dessa planta (MARQUES, 2008).

Os óleos essenciais são conhecidos desde a antiguidade, onde eram utilizados como essências. Atualmente encontram aplicação em diferentes seguimentos industriais, como o farmacêutico, de alimentos e de cosméticos. Os métodos de extração mais comumente utilizados para sua obtenção são a destilação, compressão e extração com solventes. Desses métodos, destaca-se o processo de destilação conhecido como hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor. Esse método consiste na imersão do material vegetal em água fervente, resultando na formação de vapores de água que carregam os compostos voláteis do óleo essencial. Após condensação, esses compostos se separam da fase aquosa por decantação. Para o desenvolvimento dessa técnica é frequente o uso do aparelho de Clevenger. O processo é de baixo custo e oferece grande praticidade (PRINS; LEMOS; FREITAS, 2006).

Os estudos sobre os componentes do óleo essencial da *Baccharis trimera* são bem menos abundantes do que os estudos sobre, por exemplo, sua fração flavonoide. Em comparação com outros grupos de substâncias podemos dizer que esses compostos terpênicos têm sido relativamente negligenciados, apesar de alguns possuírem ação farmacológica cientificamente comprovada e, também, potencial tóxico. A carqueja amarga (*Baccharis trimera*) possui vários compostos terpênicos bioativos em seu óleo essencial: -pineno, -pineno, palustrol, ledol, nerolidol, espatulenol, carquejol, acetato de carquejila, dentre outros (AMARAL *et al.*, 2010) (Quadro 1). O espatulenol, por exemplo, possui ação citotóxica e bactericida (LIMBERGER *et al.*, 2004). O -pineno e -pineno também possuem ação bactericida (MOOK-DASANIT *et al.*, 2003). O carquejol, administrado em ratos de forma intraperitoneal, foi capaz de reduzir os níveis de colesterol sanguíneo de 5 – 10% (ABREU, 1994). Além disso, esse composto (carquejol) e seu éster (acetato de carquejila) também são considerados marcadores químicos importantes da *Baccharis trimera* (Quadro 2) (SILVA *et al.*, 2013).

A principal forma de consumo da carqueja amarga pela população brasileira é a forma de chá (extrato aquoso), normalmente produzido a partir de suas folhas. Nesse caso, não foi

possível encontrar na literatura informações sobre o perfil e a concentração dos supracitados compostos terpênicos voláteis nessas bebidas. Ao compararmos os óleos essenciais com as infusões (chás) teremos pelo menos e muito provavelmente variações significativas nas concentrações desses componentes bioativos voláteis, o que poderá influenciar as ações terapêuticas desses produtos (TSCHIGGERL; BUCAR, 2012).

Quadro 1: Compostos voláteis terpênicos já identificados na *Baccharis trimera*.

Monoterpenos			
<i>p</i> -cimeno	limoneno	-mirceno	<i>E</i> - -ocimeno
<i>trans</i> -ocimeno	-pineno	-pineno	Sabineno
-terpineno	-tujeno		
Monoterpenos oxigenados			
acetato de carquejila	acetato de sabinila	Borneol	Carenol
carquejol	<i>trans</i> -carveol	Geranial	Mirtenol
neral	neril acetato	-terpineol	terpinen-4-ol
Sesquiterpenos			
aloaromandreno	aromadendreno	biciclogermacreno	-bisaboleno
-cadineno	-cadineno	-cadineno	-calacoreno
-cariofileno	-copaeno	1- <i>epi</i> -cubeno	-elemeno
-germacreno	germacreno-B	germacreno-D	<i>trans</i> - -guaiaeno
-guaiaeno	-gurjuneno	-gurjuneno	-himachaleno
-humuleno	-muuroleno	-selineno	-selineno
Sesquiterpenos oxigenados			
-cadinol	elemol	Epiglobulol	Espatuleno
-eudesmol	globulol	Guaiol	Ledol
<i>epi</i> - -muurolol	óxido de cariofileno	óxido de humuleno	Palustrol
viridiflorol			

SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005; AMARAL *et al.*, 2010; DELLA TORRE, 2013; GARCIA, 2013; COUTO, 2014; SANTO *et al.*, 2015; MOSSI *et al.*, 2015; TROMBIN-SOUZA *et al.*, 2017.

Quadro 2: Principais componentes do óleo essencial da *B. trimera* e seus efeitos fisiológicos.

Compostos	Concentração (%)	Efeitos fisiológicos	Classificação
-pineno	0,72 – 23,4 ^{1,2,3,4,5,6,7}	Atividade miorelaxante; antimicrobiana; antidepressiva; antiespasmódica; anti-inflamatória; ansiolítica, anticonvulsante e hipotensiva ^{8,9,10,11}	M
Limoneno	2,03 – 5,9 ^{1,2,6,7}	Atividade antibacteriana; atividade antifúngica; atividade antitumoral; atividade acaricida; atividade inseticida ^{12,13,14,15,16,17}	M
Carquejol	0,4 – 73,64 ^{1,6}	Hipocolesterolêmico ¹⁸	MO
Germacreno-D	0,74 – 11,44 ^{1,2,3,4,5,6,7}	Inseticida contra mosquitos; repelente contra afídeos e carrapatos; ação antibacteriana; fungicida ^{22,23,24,25}	S
Espatuleno	0,54 – 10,63 ^{1,2,3,4,5,6,7}	Propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica ¹⁹	SO
Ledol	2,29 – 4,6 ^{1,5,7}	Fungicida, anti-inflamatório ^{26,27,28}	SO
Globulol	1,83 – 6,9 ^{1,3,5}	Propriedade fungistática ²⁰	SO
Acetato de carquejila	19 – 60,5 ^{1,2,7}	Nd	MO
-elemeno	0,15 – 1,83 ^{1,2,3,6,7}	Atividade antiproliferativa em células HeLa em humanos, atividade antioxidante ²¹	S
Biciclogermacreno	0,15 – 20,92 ^{1,2,3,5,6,7}	Nd	S
Aloaromadendreno	0,23 – 2,06 ^{2,3,5}	Nd	S
Palustrol	5,48 – 11,16 ^{1,6,7}	Nd	SO
Viridiflorol	1,15 – 4,22 ^{2,5,6,7}	Nd	SO
-cadineno	0,26 – 6,44 ^{3,5,6}	Nd	S
-cadinol	1,39 - 3,34 ^{3,5,6}	Fungicida ²¹	SO

COUTO, 2014¹; AMARAL *et al.*, 2010²; GARCIA, 2013³; PAROUL, 2016⁴; DELLA TORRE, 2013⁵; MOSSI *et al.*, 2015⁶; SANTO *et al.*, 2015⁷; SILVA *et al.*, 2013⁸; GUZMÁN-GUTIÉRREZ *et al.*, 2012⁹; ALMEIDA *et al.*, 2003¹⁰; MENEZES *et al.*, 2009¹¹; KIM; MARSHALL; WEI, 1995¹²; ARRUDA *et al.*, 2006¹³; IBRAHIM *et al.*, 2001¹⁴; VANDERSEN *et al.*, 2014¹⁵; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006¹⁶; UEDO *et al.*, 1999¹⁷; ABREU, 1994¹⁸; LIMBERGER *et al.*, 2004¹⁹; ALEU, 2001²⁰; GONG *et al.*, 2015²¹; NOGE; BECERRA, 2009²²; SAHIN *et al.*, 2004²³; ZARAI *et al.*, 2011²⁴; SIMÕES-PIRES *et al.*, 2005²⁵; BAANANOU *et al.*, 2014²⁶; PINHEIRO *et al.*, 2011²⁷; KAPLAN *et al.*, 2000²⁸. Nd – não disponível. M – Monoterpeno; MO - Monoterpeno oxigenado; Sesquiterpeno (S); Sesquiterpeno oxigenado (SO).

Com tudo que foi exposto acima, fica fácil entender a necessidade de caracterização das diferentes espécies de ervas brasileiras através de análises químicas em suas frações volátil e não volátil. Particularmente, a caracterização da fração volátil terpênica de amostras de carqueja amarga (*Baccharis trimera*) pode permitir identificá-las de maneira inequívoca, detectar possíveis fraudes, viabilizar ou facilitar a criação de novas formulações (medicamentos e alimentos sensorialmente mais atrativos) e, por último, pode fornecer dados para um uso mais consciente desse tipo de erva como medicamento por parte dos consumidores, uma vez que muitos desses compostos terpênicos voláteis apresentam bioatividade.

2 – OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse estudo foi caracterizar quimicamente a fração volátil terpênica de amostras de carqueja amarga (*Baccharis trimera*) *in natura* e comercializadas na forma de sachês.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o óleo essencial das amostras de carqueja amarga com o auxílio de técnica de hidrodestilação em aparelho de Clevenger.
- Isolar a fração volátil terpênica dos chás das amostras de carqueja amarga com o auxílio de técnica de extração em fase sólida.
- Identificar e quantificar os compostos voláteis terpênicos constituintes desses óleos essenciais e chás através das técnicas de cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG/DIC) e de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).
- Realizar análise estatística de variância para comparar o perfil químico dos óleos essenciais e das frações voláteis terpênicas dos chás dos diferentes grupos de carqueja amarga em estudo: grupo 1 – amostras *in natura*; grupo 2 – amostras comercializadas dentro de caixas contendo sachês.

3 - METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS

As amostras de carqueja amarga *in natura* foram cedidas e caracterizadas botanicamente pelo pesquisador Gustavo Heiden da Embrapa Clima Temperado (ECT), localizada no Estado do Rio Grande do Sul. Excicatas dessas amostras foram depositadas sob o número de tombo ECT0004301 *Baccharis trimera* (Less.) DC no Herbário da ECT. Essas amostras *in natura* foram secas em estufa (FANEM, S.P., Brasil) durante 24 horas a uma temperatura de 60°C, tornando-se, assim, droga vegetal (Resolução ANVISA RDC nº 48, de 16 de março de 2004). Em seguida, essas amostras foram moídas com o auxílio de um moinho analítico de bancada (Quimis, modelo 0298A21, Brasil).

O estudo também foi desenvolvido com amostras comercializadas sob a designação de *Baccharis trimera* provenientes das três principais marcas disponíveis na forma de sachês (S1, S2 e S3) em supermercados, lojas de produtos naturais e farmácias da cidade do Rio de Janeiro. Dentro desses sachês, o material se apresentava seco e finamente moído. Amostras de cada uma dessas três marcas foram coletadas em três diferentes pontos de comercialização durante o ano de 2017.

3.2 MATERIAIS

O solvente acetato de etila (99,9% de pureza), o solvente acetona (99,9%), o padrão interno ácido pentanóico (99%) e os padrões externos dos compostos voláteis terpênicos [- cariofileno (98,5%), farnesol (95%), fitol (97%), limoneno (97%) e linalol (97%)] foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). O adsorvente Porapak Q (malha - 50/80) e a mistura de alcanos saturados de C₉-C₂₆, usada como marcadora de índice de retenção, foram adquiridos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

3.3 ISOLAMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS AMOSTRAS DE CARQUEJA

Antes da extração do óleo essencial, o método do quarteamento (VIANA; AVELAR, 2010) foi realizado em todas as amostras (dos dois grupos) para garantir a homogeneização das quantidades que seriam analisadas.

A extração do óleo foi realizada por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger em um balão de 2.000 mL, contendo 70 g de droga vegetal ou de amostra comercial e 700 mL de

água destilada, por duas horas a uma temperatura de 100°C. O sistema utilizado está ilustrado na Figura 1. Depois que a água foi eluída do aparelho de Clevenger, o óleo essencial foi captado através de lavagem com 10 mL de acetato de etila. Esse solvente foi eliminado por arraste com nitrogênio industrial. Os óleos essenciais foram armazenados e identificados em temperatura de cerca de 4°C até a realização das análises cromatográficas.



Figura 1: Extração do óleo essencial.
Fonte: o autor.

3.4 ISOLAMENTO DA FRAÇÃO VOLÁTIL DOS CHÁS DE CARQUEJA

Antes da preparação dos chás de carqueja amarga, 100 μL de uma solução aquosa do padrão interno ácido pentanóico ($2,5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) foram adicionados aos 2,0 g de amostra de droga vegetal ou amostra comercial separados para análise. A infusão aquosa representativa dos chás caseiros foi, então, preparada através da extração (durante 10 minutos) desses 2,0 g da erva (adicionados do padrão interno) com 50 mL de água destilada em ebulição. Em seguida, a infusão foi resfriada sobre água corrente e transferida quantitativamente por filtração para balão volumétrico de 100 mL. Por último, o volume do balão foi completado com água destilada e a solução foi homogeneizada por agitação manual. O isolamento da fração volátil dessas soluções foi realizado pelo método de extração em fase sólida proposto por SHIMODA; WU; OSAJIMA, 1996 e modificado por MOREIRA *et al.* em 2002. Foi montada uma coluna de vidro (14,0 cm x 1,0 cm d.i.) contendo 700 mg do adsorvente Porapak Q. A ativação desse adsorvente foi feita durante um período de três horas a uma temperatura de 220°C e com um

fluxo de gás nitrogênio de 0,9 – 1,0 L minuto⁻¹. Os 100 mL da supracitada solução (contendo o padrão interno) foram forçados a atravessar a coluna com o adsorvente ativado, impulsionados por uma bomba peristáltica (Modelo P-3, Pharmacia, Suécia) (Figura 2).



Figura 2: Passagem do chá de carqueja amarga pela Coluna com Porapak Q. Fonte: o autor.

A coluna foi, então, invertida e lavada com 20 mL de água destilada para a retirada de açúcares, a fim de evitar a decomposição dos mesmos durante as análises cromatográficas, com a produção indesejada de artefatos na fração volátil. Depois disso, os compostos voláteis adsorvidos na coluna foram extraídos pela passagem de 100 mL de acetona.

O extrato em acetona foi concentrado até próximo da secura com o auxílio de um sistema de rota-evaporação a vácuo, sem aquecimento e em ambiente climatizado (temperatura de 20°C). Esse extrato concentrado foi ressuspenso em 2 mL de acetona, transferido para um *vial* apropriado e concentrado sob fluxo de nitrogênio até 50 µL, ficando pronto para ser analisado pelos métodos cromatográficos empregados nesse estudo.

3.5 CROMATOGRAFIA GASOSA COM DETECTOR DE IONIZAÇÃO EM CHAMA (CG/DIC)

As análises de CG/DIC foram realizadas em um cromatógrafo Carlo Erba modelo FTV 4300 (Itália). Os cromatogramas foram obtidos com o auxílio de um integrador do tipo Shimadzu Chromatopak C-R6A (Japão). Os compostos voláteis terpênicos contidos nos óleos essenciais ou nos extratos em acetona (provenientes da extração em fase sólida dos chás) foram separados em uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) revestida de

dimetil poli-siloxano (100%), com espessura de filme de 0,25 μm (SPB-1, Supelco, EUA).

A temperatura do forno cromatográfico foi programada inicialmente para permanecer a 60°C por cinco minutos. Depois, a temperatura aumentou de 60°C para 120°C a uma taxa constante de 2°C/minuto, sendo mantida por dez minutos nessa última temperatura. Finalmente, a temperatura foi programada para subir novamente a uma taxa de 5°C/minuto até a temperatura final de 230°C, na qual o forno foi mantido por 30 minutos. A temperatura do injetor foi fixada em 230°C, enquanto a temperatura do detector foi mantida em 240°C. O gás hélio foi usado como gás carreador em um fluxo de 1,0 mL minuto⁻¹. As injeções dos óleos essenciais foram realizadas em *split* de 1:20 e dos extratos em acetona foram realizadas em *splitless*.

Os índices de retenção dos compostos na coluna foram estimados pelo método de Kovats modificado (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963), com o auxílio da mistura de alcanos saturados mencionada anteriormente (1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada componente em hexano). As concentrações dos compostos voláteis terpênicos dos óleos essenciais foram estimadas com base na área percentual relativa de seus picos cromatográficos em relação à área total do cromatograma e, além disso, também foram estimadas por padronização externa. As concentrações dos compostos voláteis nos chás foram estimadas pelo método de padronização interna, no qual uma quantidade específica do padrão interno é introduzida em cada amostra (e nas soluções padrões) e a razão entre a área do pico do analito e a área do pico do padrão interno é determinada.

No caso dos compostos tentativamente identificados nos chás e óleos essenciais, o processo de quantificação foi desenvolvido usando-se como referência os compostos voláteis estruturalmente mais similares disponíveis em nosso laboratório: o α -pineno, 3-careno e cis- β -ocimeno foram quantificados usando-se como referência o padrão externo de D-limoneno; a isoforona, pinocarveol, isomentona, artemisia cetona, carquejol, DL-mentol, eucarvona e acetato de carquejila foram quantificados usando-se como referência o padrão externo de linalol; o α -copaeno, β -elemeno, β -gurjuneno, desidroaromadendreno, cis-muurolo-3,5-dieno, β -muuroleno, (E)- β -farneseno, ledeno, α -copaeno, germacreno D, β -eudesmeno, β -bisaboleno, β -cadineno e β -calacoreno foram quantificados usando-se como referência o padrão externo de β -cariofileno; o palustrol, espatulenol, óxido de cariofileno, globulol, viridiflorol, ledol, epóxido de isoaromadendreno, óxido de aloaromadendreno, cedrenol, *tau*-cadinol, cubenol, β -eudesmol, β -epi-muurolol, selina-6-en-4-ol, β -eudesmol, *trans*-longipinocarveol, β -eudesmol,

longifolenaldeído e isobutirato de nerolidol foram quantificados usando-se como referência o padrão externo de farnesol.

3.6 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

As análises de espectrometria de massas por impacto de elétrons foram desenvolvidas em um sistema de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas do tipo GC-2010Plus/GCMS-QP2010 da Shimadzu (Japão). A coluna e as condições cromatográficas foram as mesmas descritas para as análises de CG/DIC. O espectrômetro de massas operou em uma voltagem de ionização de 70 eV, realizando varreduras nos fragmentos na faixa de 30 a 400 m/z , em ciclos de 3 décimos de segundo. As temperaturas da fonte de íons e da interface com o CG foram mantidas em 240°C. No caso dos extratos em acetona, o tempo de corte do solvente foi de 5 minutos e, no caso dos óleos essenciais, não houve necessidade de estabelecer tempo de corte para o solvente, pois o óleo essencial foi injetado puro.

A identificação dos espectros de massas dos compostos em análise baseou-se na comparação com os dados disponíveis nas bibliotecas NIST12.lib e NIST62.lib, disponíveis no software gerenciador desse sistema de CG/EM. A identificação foi complementada com a coeluição com padrões externos disponíveis no laboratório e pela comparação dos índices de Kovats calculados com aqueles disponíveis na literatura. Só foram considerados definitivamente identificados aqueles compostos voláteis identificados simultaneamente pela coeluição com padrões e pelos dados de espectrometria de massas.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Graph Pad Prism 6.0. Os dados de rendimento de extração dos óleos e de concentração dos compostos foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Para os parâmetros que passaram no teste de normalidade, a existência de diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os grupos foi avaliada pelo emprego do teste t paramétrico. Para os índices que não passaram no teste de normalidade, foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para verificação de diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos voláteis constituintes dos óleos essenciais das amostras *in natura* ou comerciais de carqueja avaliadas nesse estudo estão listados na Tabela 1. O rendimento de extração do óleo essencial das amostras classificadas como *droga vegetal* (grupo 1) no processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger foi de $(1,57 \pm 0,40)$ g/100 g de amostra seca de carqueja. Já o rendimento de extração do óleo essencial das amostras comercializadas na forma de sachês (grupo 2) foi de $(0,13 \pm 0,02)$ g/100 g. O rendimento médio de extração do óleo no grupo 1 foi estatisticamente superior ao do grupo 2 ($p < 0,001$).

Dos quarenta compostos terpênicos listados na Tabela 1 como componentes dos óleos essenciais das amostras analisadas, vinte e sete (27) apareceram em ambas as amostras do grupo 1 e vinte e seis (26) em uma ou mais amostras do grupo 2. Treze compostos eram comuns aos dois grupos, aparecendo em pelo menos uma das amostras de cada um deles. Os compostos terpênicos encontrados no grupo 1 foram classificados como monoterpenos (4), monoterpenos oxigenados (4), sesquiterpenos (9), sesquiterpenos oxigenados (9), diterpeno oxigenado (1). Já os compostos do grupo 2 foram classificados como monoterpenos oxigenados (5), sesquiterpenos (6) e sesquiterpenos oxigenados (15). Os monoterpenos só foram detectados nos óleos essenciais das amostras da droga vegetal (grupo 1).

Tabela 1. Compostos voláteis identificados nos óleos essenciais provenientes das amostras de *Baccharis trimera in natura* (grupo 1) ou vendidas na cidade do Rio de Janeiro na forma de sachês (grupo 2)

Compostos	IK	IKL	In natura (G1)		Sachês (G2)		
			BT1 (%)	BT2 (%)	S1 (%)	S2 (%)	S3 (%)
-Pineno ^{(M)b,c}	963	966 ³	2,82	1,52	Nd	nd	Nd
3-Careno ^{(M)b,c}	1015	1006 ³	2,02	1,06	Nd	nd	Nd
D-Limoneno ^{(M)a,b,c}	1017	1017 ³	0,60	0,31	Nd	nd	Nd
cis- -Ocimeno ^(M)	1036	1035 ²	1,24	0,03	Nd	nd	Nd
Isoforona ^{(MO)b,c}	1082	1082 ¹	0,36	0,95	Nd	nd	Nd
Pinocarveol ^{(MO)b,c}	1112	1128 ¹	Nd	nd	Nd	nd	0,95
Carquejol ^{(MO)b,c}	1134	1151 ¹	4,29	3,03	0,48	1,34	1,03
DL-Mentol ^{(MO)b,c}	1151	1173 ²	Nd	nd	2,56	nd	Nd
Eucarvona ^{(MO)b,c}	1182	1223 ¹	0,24	1,44	0,98	nd	Nd
Acetato de carquejila ^{(MO)b,c}	1281	1293 ⁵	27,93	22,90	3,80	4,82	3,64

alfa-copaeno ^{(S)b,c}	1363	1366 ³	0,61	0,58	Nd	nd	Nd
-elemeno ^{(S)b,c}	1381	1380 ³	2,62	0,58	Nd	nd	Nd
-Gurjuneno ^{(S)b,c}	1398	1400 ³	1,72	1,12	Nd	nd	Nd
Cariofileno ^{(S)a,b,c}	1405	1409 ¹	1,46	1,13	Nd	nd	1,42
desidroaromadendreno ^{(S)b,c}	1427	1466 ²	Nd	nd	1,14	nd	Nd
(E)- -Farneseno ^{(S)b,c}	1456	1459 ³	1,12	0,57	Nd	nd	Nd
Ledeno = viridifloreno ^{(S)b,c}	1474	1478 ³	Nd	nd	1,24	1,29	Nd
-copaeno ^{(S)b,c} + germacreno D ^{(S)b,c}	1475	1418 ³ 1477 ³	9,75	2,40	Nd	nd	Nd
-eudesmeno = -silineno ^{(S)b,c}	1477	1477 ¹	0,17	0,39	Nd	nd	Nd
beta-Bisaboleno ^{(S)b,c}	1492	1490 ³	Nd	nd	1,04	nd	Nd
beta-Cadineno ^{(S)b,c}	1499	1509 ³	2,74	1,86	1,54	1,06	1,17
alfa-Calacoreno ^{(S)b,c}	1512	1517 ³	Nd	nd	1,05	nd	Nd
Palustrol ^{(SO)b,c}	1557	1557 ²	11,09	18,53	13,15	8,39	6,09
Espatuleno ^{(SO)b,c}	1561	1575 ²	0,90	3,45	1,65	10,64	16,49
Óxido de Cariofileno ^{(SO)b,c}	1563	1560 ³	0,22	0,30	11,14	nd	2,62
Globulol ^{(SO)b,c}	1573	1576 ²	0,11	0,01	3,72	nd	4,10
Viridiflorol ^{(SO)b,c}	1574	1590 ²	2,03	1,76	Nd	12,16	Nd
Ledol ^{(SO)b,c}	1576	1582 ¹	4,55	4,59	4,69	4,45	6,62
Epóxido de isoaromadendreno ^{(SO)b,c}	1582	1590 ¹	Nd	nd	1,19	nd	1,18
Óxido de aloaromadendreno ^{(SO)b,c}	1602	1595 ³	Nd	nd	1,13	nd	1,46
Cedrenol ^{(SO)b,c}	1603	1604 ³	Nd	nd	1,23	nd	1,94
tau-Cadinol ^{(SO)b,c}	1612	1611 ³	Nd	nd	Nd	nd	1,26
Cubenol ^{(SO)b,c}	1615	1616 ³	Nd	nd	Nd	nd	1,94
beta-Eudesmol ^{(SO)b,c}	1620	1622 ³	6,57	8,07	4,01	3,96	4,15
alfa-epi-muurolool = tau-muurolool ^{(SO)b,c}	1625	1625 ¹	Nd	nd	Nd	nd	2,26
trans-Longipinocarveol ^{(SO)b,c}	1629	1634 ¹	0,25	1,33	Nd	nd	2,21
alfa-Eudesmol ^{(SO)b,c}	1640	1649 ²	0,95	0,86	Nd	nd	Nd
Longifolenaldeído ^{(SO)b,c}	1641	1631 ²	Nd	nd	2,41	1,06	1,97
Fitol ^{(DO)a,b,c}	2090	2098 ³	0,13	0,32	Nd	nd	Nd
Total			86,49	79,09	58,15	49,17	62,50

a - identificado por coeluição com compostos voláteis padrões; b - identificado pelos dados de espectrometria de massas; c - identificado pela comparação do índice de Kovats calculado com o índice de Kovats teórico (literatura); IK – índice de Kovats modificado (Van Den Dool; Kratz, 1963); IKL – índice de Kovats da literatura; BT1- amostra 1 de *Baccharis trimera in natura*; BT2 - amostra 2 de *Baccharis trimera in natura*; S1 – amostra comercial 1 de sachê; S2 – amostra comercial 2 de sachê; S3 – amostra comercial 3 de sachê; nd – não detectado; M – Monoterpeno; MO – Monoterpeno oxigenado; S – Sesquiterpeno; SO – Sesquiterpeno oxigenado; DO – diterpeno oxigenado. Referências: 1 - PubChem; 2- Pherobase; 3 - NIST; 4 - ChemSpider; 5 - Simões-Pires *et al.*, 2005; 6 - Tawaha and Hudaib, 2010.

Os compostos carquejol, acetato de carquejila, -cadineno, palustrol, espatulenol, ledol e -eudesmol foram os únicos compostos encontrados em todas as amostras de óleo essencial analisadas. Avaliando estatisticamente como o teor de cada um destes sete compostos variou individualmente de um grupo para o outro, foi possível notar diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) apenas ao compararmos o conteúdo de acetato de carquejila do grupo 1 com o conteúdo do grupo 2.

As Tabelas 2 e 3 mostram os cinco compostos de maior concentração em cada uma das cinco amostras analisadas. Nessas tabelas, todas as amostras apresentaram de três a cinco compostos que estavam listados no Quadro 2, no qual estão indicados os principais componentes do óleo essencial de *Baccharis trimera* já identificados até o momento na literatura científica da área.

Tabela 2. Compostos majoritários dos óleos essenciais das amostras de *Baccharis trimera* do grupo 1

BT1	(%)	BT2	(%)
Acetato de carquejila	27,93	Acetato de carquejila	22,90
Palustrol	11,09	Palustrol	18,53
-Eudesmol	6,57	-Eudesmol	8,07
Ledol	4,55	Ledol	4,59
Carquejol	4,29	Carquejol	3,03

BT1 – droga vegetal 1; BT2 – droga vegetal 2

Tabela 3. Compostos majoritários dos óleos essenciais das amostras de *Baccharis trimera* do grupo 2

S1	(%)	S2	(%)	S3	(%)
Palustrol	13,15	Viridiflorol	12,16	Espatulenol	16,49
Óxido de cariofileno	11,14	Espatulenol	10,64	Ledol	6,62
Ledol	4,69	Palustrol	8,39	Palustrol	6,09
-Eudesmol	4,01	Acetato de carquejila	4,82	-Eudesmol	4,15
Acetato de carquejila	3,80	Ledol	4,45	Globulol	4,10
Globulol	3,72	-Eudesmol	3,96	Acetato de carquejila	3,64

S1 – amostra comercial 1 de sachê; S2 - amostra comercial 2 de sachê; S3 - amostra comercial 3 de sachê.

Como mencionado anteriormente, o carquejol e o acetato de carquejila são considerados marcadores químicos da espécie *Baccharis trimera* (SILVA *et al.*, 2013). A presença desses dois compostos costuma ser interpretada como um forte indicativo de que as amostras de carqueja são da espécie *Baccharis trimera*. Analisando a Tabela 1, foi possível perceber que tanto o carquejol quanto o acetato de carquejila estavam presentes em todas as amostras analisadas. As amostras do grupo 2 apresentaram os menores valores para as concentrações de carquejol e acetato de carquejila, entretanto, como já mencionado anteriormente, só foi possível observar diferença estatística significativa entre os grupos com relação às concentrações de acetato de carquejila. Não podemos afirmar que as amostras comerciais (S1, S2 e S3) não sejam autênticas, pois elas apresentaram os dois marcadores químicos. Entretanto, é possível que essas amostras estejam misturadas a outra(s) espécie(s) de planta(s). Isso poderia explicar as menores concentrações desses marcadores químicos e, também, a presença de compostos incomuns a essa espécie como, por exemplo, o DL-mentol na amostra S1. Seria interessante avaliar a presença de outros marcadores químicos da carqueja amarga, como a 3-o-metilquercetina, nessas amostras (BELTRAME *et al.*, 2009).

Como nossas amostras da droga vegetal de *Baccharis trimera* foram cedidas e caracterizadas botanicamente por um especialista da área (Dr. Gustavo Heiden), foi possível utilizá-las como referência de carqueja amarga. Dessa forma, comparando o Quadro 1 com as colunas destinadas às amostras da droga vegetal da Tabela 1, fomos capazes de identificar pela primeira vez como componentes do óleo essencial de *Baccharis trimera* dez (10) compostos: 3-careno, isoforona, eucarvona, -gurjuneno, (E)- -farneseno, -copaeno, -cadineno, *trans*-longipinocarveol, -eudesmol e fitol.

Os compostos terpênicos voláteis dos chás de carqueja amarga caracterizados nesse estudo estão listados na Tabela 4. É a primeira vez que se avalia a composição química da fração volátil terpênica desse tipo de chá. Onze (11) compostos voláteis foram identificados como componentes das bebidas analisadas. Os compostos químicos voláteis dos chás do grupo 1 foram classificados como monoterpenos oxigenados (4), sesquiterpeno (1) e sesquiterpenos oxigenados (5). Já os compostos do grupo 2 foram classificados como monoterpenos oxigenados (5) e sesquiterpeno oxigenado (1).

Mais uma vez, considerando as amostras *in natura* como referência, dois novos compostos químicos foram identificados pela primeira vez como componentes da fração volátil terpênica da carqueja amarga: cis-muuro-la-3,5-dieno e isobutirato de nerolidol. A descoberta

desses novos compostos, não encontrados nos óleos essenciais das drogas vegetais, pode estar associada ao emprego de um método de isolamento diferente da hidrodestilação, ou seja, ao uso do método de extração em fase sólida descrito anteriormente. Cada método de isolamento da fração volátil de uma determinada matriz possui certa seletividade. Dessa forma, só poderemos conhecer efetivamente todos os compostos presentes na fração terpênica volátil de um determinado produto ao empregarmos diferentes técnicas de isolamento.

Tabela 4. Compostos voláteis terpênicos identificados nos chás provenientes das amostras de *Baccharis trimera in natura* (grupo 1) ou vendidas na cidade do Rio de Janeiro na forma de sachês (grupo 2)

Compostos			In natura (G1)		Sachês (G2)		
	KI	KIL	BT1 (ppb)	BT2 (ppb)	S1 (ppb)	S2 (ppb)	S3 (ppb)
Isoforona ^{(MO)b,c}	1082	1082 ¹	10,41	12,01	0,70	nd	Nd
Artemisia cetona ^{(MO)b,c}	1119	1039 ¹	nd	nd	nd	nd	6,02
Carquejol ^{(MO)b,c}	1134	1151 ¹	103,37	110,85	0,89	nd	Nd
Eucarvona ^{(MO)b,c}	1182	1223 ¹	3,68	3,66	0,95	nd	Nd
Acetato de carquejila ^{(MO)b,c}	1281	1293 ⁵	142,66	155,80	1,24	nd	Nd
cis-Muuroala-3,5-dieno ^{(S)b,c}	1428	1438 ²	4,38	nd	nd	nd	Nd
Palustrol ^{(SO)b,c}	1557	1557 ²	24,63	25,71	nd	nd	Nd
Espatuleno ^{(SO)b,c}	1561	1575 ²	25,80	26,90	0,90	nd	Nd
Ledol ^{(SO)b,c}	1576	1582 ¹	7,06	7,12	nd	nd	Nd
beta-Eudesmol ^{(SO)b,c}	1620	1622 ³	25,96	24,19	nd	nd	Nd
Isobutirato de nerolidol ^{(SO)b,c}	1802	1836 ⁶	7,61	5,47	nd	nd	Nd

a - identificado por coeluição com compostos voláteis padrões; b - identificado pelos dados de espectrometria de massas; c - identificado pela comparação do índice de kovats calculado com o índice de Kovats teórico (literatura); IK – índice de Kovats modificado (Van Den Dool; Kratz, 1963); IKL – índice de Kovats da literatura; BT1- amostra 1 de droga vegetal de *Baccharis trimera*; BT2 - amostra 2 de droga vegetal de *Baccharis trimera*; S1 – amostra comercial 1 de sachê; S2 – amostra comercial 2 de sachê; S3 – amostra comercial 3 de sachê; nd – não detectado; MO – Monoterpeno oxigenado; S – Sesquiterpeno; SO – Sesquiterpeno oxigenado; Referências: 1 - PubChem; 2 - Pherobase; 3 - NIST; 4 - ChemSpider; 5 - Simões-Pires *et al.*, 2005; 6 – Tawaha; Hudaib, 2010

O uso do método de extração em fase sólida permitiu que avaliássemos a diversidade e a quantidade desses compostos voláteis terpênicos transferidos das folhas da carqueja amarga para os chás durante o processo de preparação dessas infusões. A variedade de compostos presentes nos chás (11 compostos) é menor do que a variedade presente em seus óleos essenciais (40 compostos). Além disso, esses compostos estão presentes nos chás em concentrações

extremamente menores do que nos óleos essenciais (vide Tabela 5). Por exemplo, a concentração média estimada para o carquejol nos chás das amostras da droga vegetal foi cerca de 98.423 vezes inferior à encontrada em seus óleos essenciais. No caso do acetato de carquejila, a concentração média nos chás foi aproximadamente 485.842 vezes menor do que a concentração média desse composto nos óleos essenciais das amostras da droga vegetal. A hidrodestilação dos óleos essenciais foi realizada durante um período de duas horas, envolvendo a volatilização, o arraste por vapor e a condensação de seus compostos. Nesse caso, o processo de isolamento dos compostos voláteis contidos nas folhas de carqueja pode ser considerado exaustivo. No caso do chá, esses compostos são isolados inicialmente das folhas de carqueja por extração (10 minutos) com água fervendo. Esses compostos terpênicos possuem majoritariamente característica apolar, sendo pouco solúveis em água. Sendo assim, essa extração aquosa, mesmo sendo realizada com a água fervendo, é pouco eficiente para a extração desses compostos. Por último, é importante informar que a análise da composição dos óleos essenciais é uma ferramenta mais poderosa para a avaliação da autenticidade das amostras comerciais do que a análise da composição da fração volátil dos chás e, dessa forma, deve ser priorizada. Por exemplo, se nos baseássemos na composição das frações voláteis terpênicas dos chás S2 e S3, indicaríamos essas amostras como não autênticas, pois os marcadores químicos carquejol e acetato de carquejila não foram detectados nos chás dessas amostras (vide Tabela 4). Entretanto, nos óleos essenciais de ambas as amostras esses marcadores químicos foram encontrados e, dessa forma, não podemos dizer que não há carqueja amarga em seus sachês.

Tabela 5. Compostos voláteis identificados nos chás e óleos essenciais provenientes das amostras de droga vegetal de *Baccharis trimera in natura* ou vendidas na cidade do Rio de Janeiro na forma de sachês

Compostos	<i>In natura</i>	<i>Sachês</i> (Chás)	<i>In natura</i>	<i>Sachês</i>
	(Chás)		(Óleos essenciais)	(Óleos essenciais)
	Med ± DP	Med ± DP	Med ± DP (ppb)	Med ± DP (ppb)
	(ppb)	(ppb)		
-pineno ^{(M)b,c}	Nd	Nd	6.329.196 ± 3.506.665	Nd
3-careno ^{(M)b,c}	Nd	Nd	4.505.231 ± 2.560.214	Nd
D-limoneno ^{(M)a,b,c}	Nd	Nd	1.328.532 ± 753.790	Nd
cis- -Ocimeno ^{(M)b,c}	Nd	Nd	1.973.216 ± 2.693.466	Nd
Isoforona ^{(MO)b,c}	11,21 ± 1,13	0,23 ± 0,40	1.772.837 ± 911.398	Nd
Pinocarveol ^{(MO)b,c}	Nd	Nd	nd	219.741 ± 380.603
Isomentona ^{(MO)b,c}	Nd	Nd	nd	Nd

Artemisia cetona ^{(MO)b,c}	Nd	2,01 ± 3,48	nd	Nd
Carquejol ^{(MO)b,c}	107,11 ± 5,29	0,30 ± 0,51	10.542.093 ± 4.023.445	676.916 ± 618.095
DL-mentol ^{(MO)b,c}	Nd	Nd	nd	655.897 ± 1.136.048
Eucarvona ^{(MO)b,c}	3,67 ± 0,01	0,32 ± 0,55	2.205.129 ± 2.059.257	250.222 ± 433.397
Acetato de carquejila ^{(MO)b,c}	149,23 ± 9,29	0,41 ± 0,72	72.502.274 ± 20.450.956	3.261.297 ± 958.457
alfa-copaeno ^{(S)b,c}	Nd	Nd	1.696.294 ± 308.270	Nd
-elemeno ^{(S)b,c}	Nd	Nd	4.830.593 ± 4.745.452	Nd
-Gurjuneno ^{(S)b,c}	Nd	Nd	4.107.411 ± 1.785.424	Nd
Cariofileno ^{(S)a,b,c}	Nd	Nd	3.703.535 ± 1.183.488	327.123 ± 566.594
desidroaromadendreno ^{(S)b,c}	Nd	Nd	nd	292.367 ± 506.395
cis-Muurolo-3,5-dieno ^{(S)b,c}	2,19 ± 3,10	nd	nd	Nd
-Muurolo ^{(S)b,c}	Nd	nd	nd	Nd
(E)- -Farneseno ^{(S)b,c}	Nd	nd	2.469.651 ± 1.430.029	Nd
Ledeno = viridifloreno ^{(S)b,c}	Nd	nd	nd	769.788 ± 697.447
-copaeno ^{(S)b,c} + germacreno D ^{(S)b,c}	Nd	nd	18.253.224 ± 17.198.996	Nd
-eudesmeno = -silineno ^{(S)b,c}	Nd	nd	762.445 ± 323.547	Nd
beta-Bisaboleno ^{(S)b,c}	Nd	nd	nd	267.546 ± 463.404
beta-Cadineno ^{(S)b,c}	Nd	nd	6.627.720 ± 2.712.991	978.448 ± 190.014
alfa-Calacoreno ^{(S)b,c}	Nd	nd	nd	267.837 ± 463.908
Palustrol ^{(SO)b,c}	25,17 ± 0,76	nd	40.813.839 ± 8.810.759	7.267.787 ± 2.951.140
Espatuleno ^{(SO)b,c}	26,35 ± 0,78	nd	5.782.514 ± 4.207.544	7.294.993 ± 5.335.357
Óxido de Cariofileno ^{(SO)b,c}	Nd	nd	719.174 ± 52.960	3.459.448 ± 4.514.520
Globulol ^{(SO)b,c}	Nd	nd	182.459 ± 234131	1.899.768 ± 1.645.270
Viridiflorol ^{(SO)b,c}	Nd	nd	5.450.448 ± 1.348.060	3.665.180 ± 6.348.278
Ledol ^{(SO)b,c}	7,09 ± 0,04	nd	12.943.178 ± 1.767.000	4.075.582 ± 489.559
Epóxido de isoaromadendreno ^{(SO)b,c}	Nd	nd	nd	576.091 ± 501.202
Óxido de aloaromadendreno ^{(SO)b,c}	Nd	nd	nd	627.043 ± 547.391
Cedrenol ^{(SO)b,c}	Nd	nd	nd	763.012 ± 690.194
tau-Cadinol ^{(SO)b,c}	Nd	nd	nd	290.508 ± 503.175
Cubenol ^{(SO)b,c}	Nd	nd	nd	448.492 ± 776.810
beta-Eudesmol ^{(SO)b,c}	25,08 ± 1,25	nd	20.485.887 ± 17.723	3.214.312 ± 424.541
alfa-epi-muurolo = tau-muurolo ^{(SO)b,c}	Nd	nd	nd	522.386 ± 904.800
Selina-6-en-4-ol ^{(SO)b,c} + gama-eudesmol ^{(SO)b,c}	Nd	nd	nd	Nd
trans-Longipinocarveol ^{(SO)b,c}	Nd	nd	2.080.960 ± 1.808.174	509.195 ± 881.952
alfa-Eudesmol ^{(SO)b,c}	Nd	nd	2.592.534 ± 576.564	Nd
Longifolenaldeído ^{(SO)b,c}	Nd	nd	nd	1.414.363 ± 415.896
Nerolidol isobutirato ^{(SO)b,c}	6,54 ± 1,51	nd	nd	Nd
Fitol ^{(DO)a,b,c}	Nd	nd	207.599 ± 292.456	Nd

a - identificado por coeluição com compostos voláteis padrões; b - identificado pelos dados de espectrometria de massas; c - identificado pela comparação do índice de Kovats calculado com o índice de Kovats teórico (literatura); IK – índice de Kovats modificado (Van Den Dool; Kratz, 1963); IKL – índice de Kovats da literatura; Med - média; DP - desvio padrão; nd – não detectado; M – Monoterpeno; MO – Monoterpeno oxigenado; S – Sesquiterpeno; SO – Sesquiterpeno oxigenado; DO – diterpeno oxigenado; Referências: 1 - PubChem; 2- Pherobase; 3 - NIST; 4 - ChemSpider; 5 - Simões-Pires *et al.*, 2005; 6 – Tawaha; Hudaib, 2010

5- CONCLUSÕES

Estabeleceu-se o perfil químico dos óleos essenciais de amostras de droga vegetal de carqueja amarga e, também, das três principais marcas comercializadas como carqueja amarga (*Baccharis trimera* ou *Baccharis genistelloides*) na forma de sachês na cidade do Rio de Janeiro, através do isolamento dos compostos voláteis contidos em suas folhas. Os compostos carquejol, acetato de carquejila, -cadineno, palustrol, espatulenol, ledol e -eudesmol foram os únicos compostos terpênicos encontrados nos óleos essenciais de todas as amostras analisadas. As amostras comerciais vendidas na forma de sachês apresentaram baixas concentrações dos marcadores químicos carquejol e acetato de carquejila.

A composição da fração volátil terpênicada dos chás de carqueja amarga foi determinada pela primeira vez. Esses chás foram preparados por extração não exaustiva em água fervendo, mimetizando as condições caseiras de preparação desse tipo de bebida. O perfil químico estabelecido para os chás apresentou diferenças qualitativas e quantitativas em relação ao perfil encontrado para os óleos essenciais dessa erva. Dessa forma, podemos inferir que as propriedades químicas e medicinais do óleo essencial de carqueja amarga não se reproduzem por completo nos chás. O perfil químico da fração volátil terpênicada dos chás de carqueja amarga tem menos potencial para ser usado como ferramenta para verificação da autenticidade de amostras comerciais do que o perfil químico de seus óleos essenciais.

Por último, vale destacar que doze (12) compostos terpênicos foram identificados pela primeira vez como componentes da fração volátil da erva carqueja amarga: 3-careno, isoforona, eucarvona, -gurjuneno, (*E*)- -farneseno, -copaeno, -cadineno, *trans*-longipinocarveol, -eudesmol, fitol, *cis*-muurolo-3,5-dieno e isobutirato de nerolidol.

6 - AGRADECIMENTOS:

Agradecemos ao CNPq, FAPERJ, CAPES e UNIRIO pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho de conclusão de curso (TCC). Agradecemos ao pesquisador Dr. Gustavo Heiden da Embrapa Clima Temperado (ECT) pela cessão, caracterização botânica e depósito no herbário da ECT das amostras de carqueja amarga *in natura* utilizadas nesse estudo.

7- REFERÊNCIAS

- ABREU, M. F. J. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades.** Fortaleza: Edições UFC, 1994.
- AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. **Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer.** *Biochemical Pharmacology.* v. 71, n. 10, p.1397-1421, maio 2006.
- ALEU, J. et al. **Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoids patchoulol, ginsenos, cedrol and globulol by Botrytis cinerea.** *J. Mol. Catal. B: Enzym.* v. 11, n. 4-6, p.329-334, 2001.
- ALMEIDA, L.F.R. et al. **Atividade alelopática de extratos e frações de folhas de Leonurus sibiricus na germinação e desenvolvimento inicial de pepino.** *Brazilian Journal of Plant Physiology,* v.13, p.351, 2003.
- AMARAL, A. S. et al. **Rendimento de matéria seca e de óleo essencial de Baccharis trimera com adubação química e orgânica.** *Revista de Ciências Agroveterinárias.* Lages, v.9, n.1, p. 20-28, 2010.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 48, 16 de março de 2004.** Disponível em:
<<https://www.cpqba.unicamp.br/plmed/docs/Resolucao%20RDC%2048%20de%2016032004.PDF>>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- ARRUDA, T. A. et al. **Preliminary study of the antimicrobial activity of Mentha x villosa Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues.** *Rev Bras Farmacogn.* v. 16, p. 307-311, 2006.
- AULER, N. M. F. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de Baccharis trimera (Less) DC. (carqueja) no Sul do Brasil.** 2004. 198f. Tese de Doutorado (Programa de Pós-graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, 2004.
- BAANANOU, S. et al. **Extracto de CO2 supercrítico e óleo essencial da parte aérea de Ledum palustre L. - Composição química e atividade anti-inflamatória.** *Nat Prod Res.* p. 1-7, 2014.
- BARA, M. T. F., VANETTI, M. C. D. **Estudo da atividade antibacteriana de plantas medicinais, aromáticas e corantes naturais.** *Revista Brasileira de Farmacognosia,* v.7/8, n.1, p.22-34, 1998.
- BARROSO, G. M. **Compositae – Subtribo Baccharidinae Hoffmann – Estudo das espécies ocorrentes no Brasil.** *Rodriguésia,* v.28, p.1-273, 1976.
- BELTRAME, F. L. et al. A. **Avaliação da qualidade das amostras comerciais de Baccharis trimera L. (Carqueja) vendidas no Estado do Paraná.** *Acta Scientiarum. Health Sciences,* v. 31, n. 1, p. 37-43, 2009.

BORELLA, J. C. et al. **Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, n.4, p.557-61, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Fitoterápicos e o Impacto nas Farmácias.** 2008. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/palestras/cancer/politica_nacional_fititerapicos.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2017.

CARREIRA, R. C. ***Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata Atlântica.** 2007. 191f. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, 2007.

CHEMSPIDER. Search and share chemistry. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 07 fev. 2018.

COUTO, C. S. F. **Atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Baccharis trimera* Less (D.C.) e de *Origanum vulgare* Linnaes frente as linhas de esporotricose.** 2014. 72 f. Dissertação Mestrado (Curso de Farmácia, Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

DE LAS HERAS, B. et al. **Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador.** Journal of Ethnopharmacology, v. 61, n.2, p.161-6, 1998.

DELLA TORRE, A. **Óleo essencial de *Baccharis trimera* (less.) Dc.: estudo fitoquímico e avaliação in vitro das atividades antiproliferativa e mutagênica.** 2013. 110 f. Dissertação Mestrado (Curso de Biociência e Tecnologia de Produtos Naturais) -Unicamp, Instituto de Biologia, Campinas, 2013.

DRESCH, A. P. et al. **Controle de qualidade de espécies do gênero *Baccharis* L. (Asteraceae) por CCD a partir de extratos rápidos.** Infarma, n. 18, p. 37-40, 2006.

FERESIN, G.E. et al. **Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity.** J. Ethnopharmacol., n. 89, p.73-80, 2003.

GARCIA, D. **Desenvolvimento, rendimento, teor e componentes do óleo essencial em função de adubação orgânica e rebroto de *Baccharis trimera* (Less.) DC.** cv. CPQBA-1. 2013. 99 f. Dissertação Mestrado (Curso de Agronomia, Ciências Agrônômicas) - Unesp, Botucatu, 2013.

GONG, M. et al. **-Elemene Inhibits Cell Proliferation by Regulating the Expression and Activity of Topoisomerases I and II in Human Hepatocarcinoma HepG-2 Cells.** Biomed Research International. v. 2015, p.1-10, 2015.

GUZMÁN-GUTIERREZ, S.L. et al. **Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: Identification of b-pinene and linalool as active principles.** Journal of Ethnopharmacology. n. 143, p. 673–679, 2012.

HE, K.. et al. **Diterpenoids from Baccharis linearis**. Phytochemistry, v.41, n.4, p.1123-7, 1996.

IBRAHIM, M. A. et al. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. Agricultural and Food Science in Finland. V.10, p.243-259, 2001.

KAPLAN et al. **A estereoquímica do ledol de Renealmia chrysotrycha: um estudo de RMN**. Phytochemistry. v. 55, p. 749-53, 2000.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. **Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens**. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. v. 43, n. 11, p.2839-2845, nov. 1995.

KUPCHAN, S.M. et al. **Structure and stereochemistry of Jatrophone, a novel macrocyclic diterpenoid tumor inhibitor**. Journal of the American Chemical Society. v.98, n.8, p.2295-300, 1976.

LIMBERGER, R.P, SOBRAL, M. & HENRIQUES, A.T. **Óleos voláteis de espécies de Myrcia nativas do rio grande do sul**. Quimica Nova. v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

LORENZI, H. E.; MATOS, F.J. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa:, . 512 p, 2002.

MARQUES, O. C. P. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de Uncaria tomentosa com atividade antioxidante**. 2008. 210p. Dissertação Mestrado (Área de Concentração em Farmácia) - Universidade de Coimbra, Departamento de Farmácia Coimbra, Coimbra, 2008.

MENEZES, T.O.A et al. **Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de Candida albicans**. Ver Odontol UNESP. v.38, p.184-191, 2009.

MOOKDASANIT, J. et al. **Trace Volatile Components in Essential Oil of Citrus sudachi by Means of Modified Solvent Extraction Method**. Food Science Technology Research, v.9, n. 1, p.54–61, 2003.

MOREIRA, R.F.A.. et al. **Flavor composition of cashew (*Anacardium occidentale*) and marmeleiro (*Croton Species*) honeys**. Journal Agriculture Food Chemistry. v. 50, p. 616-621, 2002.

MOSSI, A. J. et al. Efeito repelente e inseticida de Baccharis trimera (Less) de no controle de insetos (*Acanthoscelides obtectus*) em grãos de feijão armazenados. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, [s.l.], Editora Edgard Blücher . 2015. p.1-6.

NAKASUGI, T.; KOMAI, K. **Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.)**. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.46, n.7, p.2560-4, 1998.

NIST. National Institute of Standards and Technology. Disponível em: <<http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C821556&Units=SI&Mask=3069#Gas-Chrom>>. Acesso em: 11 fev. 2018.

NOGE, K.; BECERRA, J. X. **Germacrene D, A Common Sesquiterpene in the Genus *Bursera* (Burseraceae).** Molecules Journal, v.14, p.5289-5297, 2009.

OLIVEIRA, A. C. P. et al. **Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice.** J. Ethnopharmacol., n. 102, p. 465-469, 2005.

PAROUL, N. et al. **Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Baccharis trimera* Pers and *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae).** Perspectiva. Erechim, v. 151, n. 40, p.55-64, 2016.

PHEROBASE. Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <www.pherobase.com>. Acesso em 10 fev. 2018.

PINHEIRO, B. G. et al. **Composição química, efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em roedores do óleo essencial de *Peperomia serpens* (Sw.) Ruidosamente.** J Ethnopharmacol. n. 138, p. 479-86, 2011.

PRINS, C. L.; LEMOS, C. S. L.; FREITAS, S. P. **Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*).** Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu, v.8, n.4, p.92-95, 2006.

PUBCHEM. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 05 fev. 2018.

RODRIGUES, V. E. G. AND DE CARVALHO, D. A. **Etnobotanical survey of medicinal plants in the dominion of meadows in the region of the Alto Rio Grande.** Revista Ciência e Agrotecnologia. Minas Gerais, n. 25, p. 102-123, 2001.

SAHIN, F. et al. **Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey.** Food Control. n. 15, p. 549-557, 2004.

SANTO, A. T. E. et al. Extração do óleo essencial de espécies de baccharis nativas do sul do Brasil: análise olfatométrica e modelagem matemática. **Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química.** p.1-8, fev. 2015. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br/s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1041-21410-144008.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2018.

SHIMODA, M.; WU, Y.; OSAJIMA, Y. **Aroma compounds from aqueous solution of haze (*Rhus succedanea*) honey determined by adsorptive column chromatography.** Journal of Agricultural and Food Chemistry. n. 44, p.3913-3918, 1996.

SILVA, F. et al. **Avaliação do teor de óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em diferentes embalagens durante o armazenamento.** Revista Brasileira de Plantas Medici-

nais. v. 15, n. 1, p.54-58, 2013.

SIMÕES-PIRES, C. A. et al. **Investigation of the essential oil from eight species of Baccharis belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach.** Pl. Syst. Evol. p.253: 23–32, 2005.

SOICKE, H.; LENG PESCHLOW, E. **Characterization of flavonoids from baccharis trimera and their antihepatotoxic properties.** Planta Medica. v. 53, n.1, p. 37-39, 1987.

TAWAHA, K.; HUDAIB, M. **Volatile oil profiles of the aerial parts of Jordanian garland, Chrysanthemum coronarium.** Pharmaceutical Biology. v. 48, n. 10, p.1108–1114, 2010.

TORRES, L. M. B. et al. **Diterpene from Baccharis trimera with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle.** Phytochemistry, v.55, n.6, p.617-9, 2000.

TROMBIN-SOUZA, M. et al. **Chemical composition of the essential oils of Baccharis species from southern Brazil: a comparative study using multivariate statistical analysis.** Journal of Essential Oil Research. v. 29,n. 5, p. 400 - 406, 2017

TSCHIGGERL, C.; BUCAR, F. **Guaianolides and Volatile Compounds in Chamomile Tea.** Plant Foods Human Nutrition. v. 6, p.129–135, 2012.

UEDO, N.; TATSUTA, M.; IISHI, H.; BABA, M.; SAKAI, N.; YANO, H.; OTANI, T. **Inhibition by D-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats.** Cancer Lett. v. 137, n. 2, p. 131-6, 1999.

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

VANDERSEN et al. **Novel R-(+)-limonene-based thiosemicarbazones and their anti-tumor activity against human tumor cell lines.** European Journal of Medicinal Chemistry, [s.l.], v. 79, p.110-116, maio 2014.

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

VIANA, M.P.; AVELAR, W.E.P. **Ocorrência da espécie invasora Corbicula flumínea (Bivalvia, Corbiculidae) no rio Sapucaí (São Paulo, Brasil).** Revista Biotemas, v.23, n.3, p. 59-66, 2010.

WEIMANN, C. et al. **Spasmolytic effects of Baccharis conferta and some of its constituentes.** J. Pharm. Pharmacol. n. 54, p. 99-104, 2002.

ZARAI, Z. et al. **The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of Marrubium vulgare L. essential oil grown in Tunisia.** Lipids in Health and Disease. v. 10, n. 161, p. 2 – 8, 2011.