

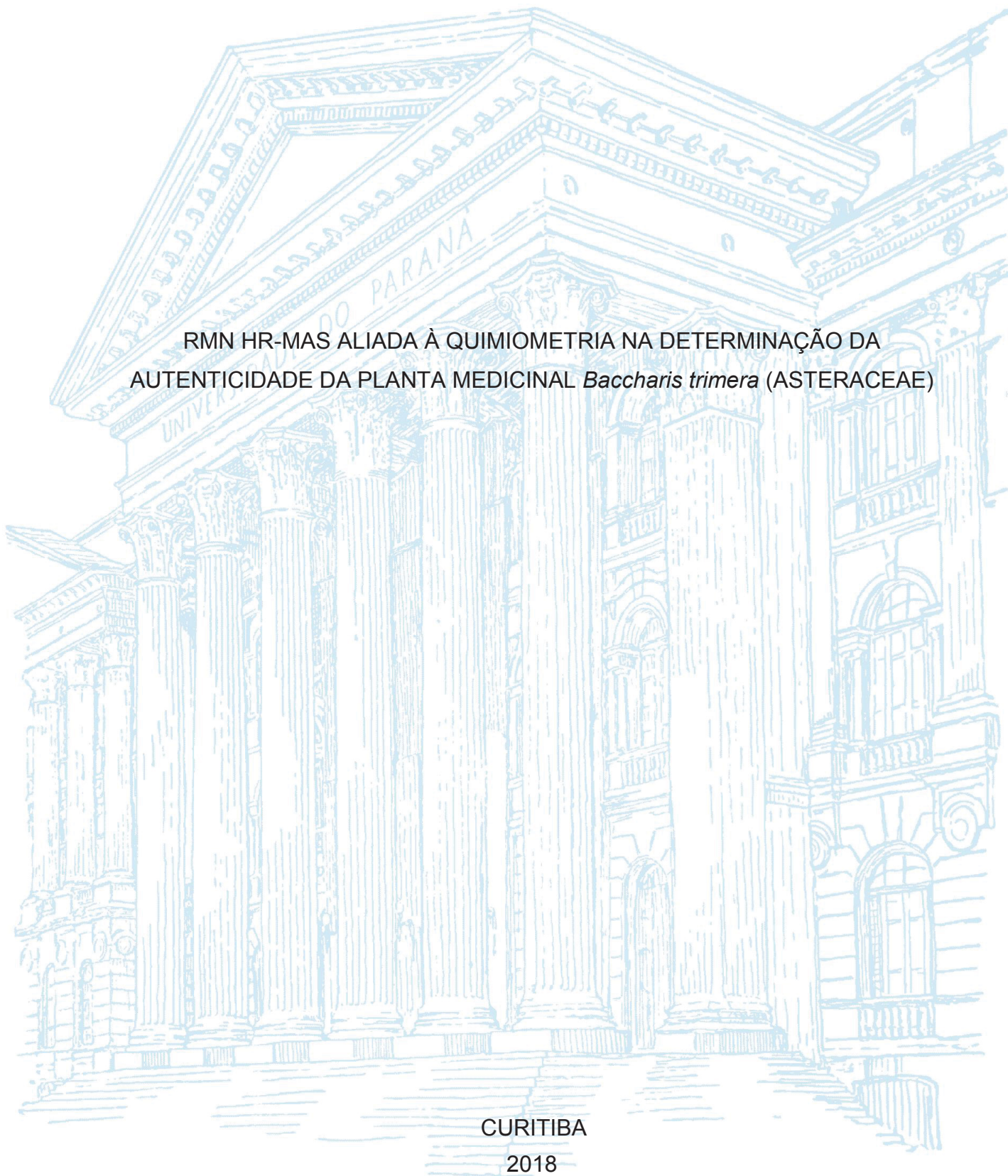
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LIVIA MACÊDO DUTRA

RMN HR-MAS ALIADA À QUIMIOMETRIA NA DETERMINAÇÃO DA
AUTENTICIDADE DA PLANTA MEDICINAL *Baccharis trimera* (ASTERACEAE)

CURITIBA

2018



LIVIA MACÊDO DUTRA

RMN HR-MAS ALIADA À QUIMIOMETRIA NA DETERMINAÇÃO DA
AUTENTICIDADE DA PLANTA MEDICINAL *Baccharis trimera* (ASTERACEAE)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Química – Área de Química Orgânica, do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Andersson Barison

Coorientadora: Prof. Dra. Francinete Ramos Campos

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

D978r

Dutra , Livia Macêdo

RMN HR-MAS aliada à quimiometria na determinação da autenticidade da planta medicinal Baccharis trimera (Asteraceae) / Livia Macêdo Dutra . – Curitiba, 2018.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas , Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientador: Andersson Barison – Coorientador: Francinete Ramos Campos. -

1. Baccharis. 2. RMN HR-MAS. 3. Quimiometria. 4. Controle de qualidade. I. Universidade Federal do Paraná. II. Barison, Andersson . III. Campos, Francinete Ramos. IV. Título.

CDD: 543.015195

Bibliotecária: Vanusa Maciel - CRB - 9/1928

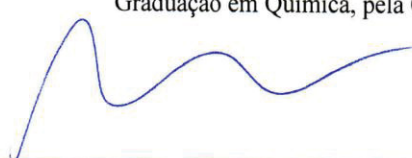
TERMO DE APROVAÇÃO

**RMN HR-MAS ALIADA A QUIMIOMETRIA NA DETERMINAÇÃO DA
AUTENTICIDADE DA PLANTA MEDICINAL *BACCHARIS TRIMERA*
(ASTERAECEAE)**


por

LIVIA MACÊDO DUTRA


Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:




Prof. Dr. Andersson Barison
Orientador
Dep. de Química – UFPR




Prof. Dr. Cláudio Francisco Tormena
Instituto de Química – UNICAMP



Prof. Dr. Luciano Morais Lião
Instituto de Química – UFG



Prof.ª Dr.ª Maria Élide Alves Stefanello
Dep. de Química – UFPR



Prof.ª Dr.ª Noemi Nagata
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 04 de maio de 2018.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria José Macedo Chaves Dutra e Jorge Dutra dos Santos por todo amor, dedicação, incentivo e apoio desde o início, sempre incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPR pela estrutura e suporte para a realização deste trabalho, concedendo oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro para que esse trabalho se concretizasse.

A Finep e Fundação Araucária pelo apoio financeiro que contribuíram para realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Dr. Andersson Barison por me aceitar como aluna de doutorado, acreditando e investindo em meu potencial e ensinamentos sobre RMN e ciência, além de possibilitar o alcance de oportunidades que jamais pensei em ter na vida. Agradeço a amizade construída e confiança, bem como por possibilitar liberdade de expressão no meio acadêmico e científico, algo incomum em muitas instituições. Obrigada por contribuir para minha formação científica e profissional.

À Professora Dra. Francinete Ramos Campos por gentilmente ter aceitado ser minha coorientadora e ter dado valiosas contribuições ao trabalho, bem como incentivo e amizade construída.

Aos professores Dr. Guilherme Sasaki, Dra. Maria Élide Alves Stefanello e Dra. Noemi Nagata pelas excelentes contribuições no exame de Qualificação.

Aos professores Dr. Claudio Francisco Tormena, Dr. Luciano Morais Lião e Dra. Maria Élide Alves Stefanello (mais uma vez) por gentilmente aceitarem participar da banca de defesa desta tese, pela dedicação na leitura do material e pelas valiosas contribuições.

À professora Dra. Noemi Nagata (mais uma vez) pela disponibilidade, dedicação e ensinamentos em quimiometria que foram de fundamental importância para execução deste trabalho, assim como por aceitar participar da banca de defesa

de tese. Nada que diga aqui expressará o quanto sou grata por ter aprendido um pouco do mundo da quimiometria com a senhora.

Ao Dr. Gustavo Heiden pelo auxílio na identificação das espécies de *Baccharis*.

Aos técnicos do Departamento de Química, em especial Grazielli da Rocha e Thiago J. dos Santos, pelo suporte para realização deste trabalho e amizade.

Aos amigos dos Centro de RMN da UFPR: Dr. Arquimedes Paixão, MSc. Ana Caroline Quallio, em especial a Dra. Fernanda Ocampos, MSc Katlin Rech, MSc Leice Novais e MSc Sher Ali, amigos de laboratório, e agora de vida pelo incentivo, parceria e amizade construída.

Aos meus “amigos-irmãos” Dr. Alan Diego, MSc. Leociley Menezes e MSc. Maria de Fátima Santos pela parceria, convivência, aprendizado e sobretudo, pela amizade. Nada do que for dito será suficiente para expressar o quanto sou grata por ter vocês ao meu lado.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida e pelo privilégio da realização deste trabalho, por sempre ter iluminado meu caminho e me dado forças para continuar e nunca desistir.

À minha família que sempre me deu o apoio necessário para seguir em frente. Em especial aos meus pais, Maria José e Jorge Dutra, por nunca terem desistido de mim, pelo apoio, incentivo, dedicação e esperança que depositaram em mim. Agradeço também aos meus irmãos Angélica, Diego e Thiago pela inestimável cumplicidade, respeito e carinho. Amo vocês!

Agradeço imensamente ao meu noivo, Jorge Costa, por estar presente, sendo afetuoso, compreensivo e companheiro. Obrigada pelas inúmeras demonstrações de carinho e por sempre acreditar que eu seria capaz.

Aos meus tios, Marta, João e Geraldo Macedo, pelo apoio incondicional, preocupação e conselhos nos momentos que mais necessitei.

Aos demais familiares, por todo incentivo durante minha vida pessoal e profissional.

Aos meus amigos do Departamento de Química, em especial MSc. Adson Santos, MSc. Tassy Matos, MSc. Luzia Lisboa, MSc. Magali Amorim, MSc. Yane Honorato e MSc. Mara Dalmolin. Ao longo dessa trajetória, laços fortes e amizades verdadeiras foram criadas.

RESUMO

As plantas medicinais e fitoterápicos são importantes fontes de tratamento a saúde, principalmente em países subdesenvolvidos. Consequentemente, torna-se essencial o controle de qualidade destes produtos, visando garantir sua segurança e eficácia. Entre as plantas medicinais utilizadas tradicionalmente pela população, têm-se as espécies de *Baccharis* (seção *Caulopterae*), conhecidas popularmente como “carqueja”. No entanto, somente *B. trimera* é reconhecida pelas agências de saúde por possuir propriedades medicinais. A alta similaridade morfológica desta com outras da mesma seção tem dificultado a identificação até mesmo para taxonomistas. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo aplicar a técnica de RMN HR-MAS aliada à quimiometria na determinação da autenticidade de amostras comerciais de “carqueja”, bem como, discriminar as amostras de *B. trimera* das outras espécies da seção, contribuindo para quimiotaxonomia do gênero *Baccharis*. Para isso, espectros de RMN HR-MAS de ¹H de amostras de referência de *Baccharis* (*B. articulata* – 26; *B. junciformis* – 10; *B. milleflora* – 9; *B. myriocephala* – 26 e *B. trimera* – 27) foram adquiridos em duplicata e utilizados para a determinação da autenticidade de amostras comerciais de carqueja (26 amostras) associado à análises quimiométricas (PCA, PLS-DA e SIMCA). A PCA permitiu discriminar *B. trimera* e *B. myriocephala* das demais espécies, principalmente pela presença do acetato de carquejila. Já estas duas espécies não foram discriminadas entre si, indicando que são quimicamente semelhantes e poderiam ser utilizadas para fins medicinais desde que testes biológicos sejam realizados com *B. myriocephala*. A aplicação de métodos de classificação para avaliar a autenticidade das amostras comerciais revelou que se tratavam de espécies de *Baccharis*. No entanto, apenas 11% das amostras comerciais foram classificadas como *B. trimera* ou *B. myriocephala*. Os modelos PLS-DA mostraram melhores resultados com uma capacidade de reconhecimento de 100% das amostras de validação externa, exceto para o modelo da *B. trimera* (96%), enquanto o SIMCA possibilitou uma capacidade preditiva de 71,43%. Assim como os modelos PLS-DA, 100% das amostras comerciais não foram classificadas como *B. trimera* no SIMCA, espécie recomendada pela Farmacopeia Brasileira e presente na RENISUS. Em resumo, este trabalho contribuiu para destacar as vantagens da aplicação da RMN HR-MAS associada à PCA, PLS-DA e SIMCA na discriminação e classificação de amostras de referência e comerciais de *Baccharis*, de forma a contribuir na autenticidade de ervas medicinais e fornecimento de subsídios para correta classificação taxonômica, considerando a composição química através dos dados de RMN HR-MAS, contribuindo assim para quimiotaxonomia do gênero *Baccharis*.

Palavras-chave: *Baccharis*. Autenticidade. Controle de Qualidade. RMN HR-MAS. Análises Quimiométricas.

ABSTRACT

Medicinal plants and herbal medicines are important sources of health treatment, especially in underdeveloped countries. Consequently, the quality control of these products is essential, in order to guarantee their safety and efficacy. Among the medicinal plants traditionally used by the population are the species of *Baccharis* (section *Caulopterae*), popularly known as "carqueja". However, only *B. trimera* is recognized by health agencies by having medicinal properties. The high morphological similarity of this with others of the same section has made it difficult to identify even by taxonomists. Thus, the objective of this work was to apply the HR-MAS NMR technique combined with chemometrics to determine the authenticity of commercial samples of "carqueja", as well as discriminating the *B. trimera* samples from other species of the section, contributing to chemotaxonomy of the genus *Baccharis*. For this, HR-MAS NMR spectra of reference samples of *Baccharis* (*B. articulata* - 26, *B. junciformis* - 10, *B. milleflora* - 9, *B. myriocephala* - 26 and *B. trimera* - 27) were acquired in duplicate and used for the determination of the authenticity of commercial samples of "carqueja" (26 samples) associated to the chemometric analysis (PCA, PLS-DA and SIMCA). The PCA allowed to discriminate *B. trimera* and *B. myriocephala* from other species, mainly due to the presence of carquejyl acetate. These two species have not been discriminated against each other, indicating that they are chemically similar and could be used for medicinal purposes, if biological tests are performed with *B. myriocephala*. The application of classification methods to evaluate the authenticity of the commercial samples revealed that they were *Baccharis* species. However, only 11% of the commercial samples were classified as *B. trimera* or *B. myriocephala*. The PLS-DA models showed better results with a 100% recognition capability of the external validation samples, except for the *B. trimera* model (96%), while SIMCA provided a predictive capacity of 71.43%. Like a PLS-DA models, 100% of commercial samples were not classified as *B. trimera* in SIMCA, species recommended by the Brazilian Pharmacopoeia and found in the RENISUS. In summary, this work contributed to highlight the advantages of applying HR-MAS NMR associated with PCA, PLS-DA and SIMCA in discriminating and classifying reference and commercial samples of *Baccharis*, in order to contribute to the authenticity of medicinal herbal and supply of subsidies for correct taxonomic classification, considering the chemical composition through HR-MAS NMR data, thereby aiding the chemotaxonomy of the genus *Baccharis*.

Keywords: *Baccharis*. Authenticity. Quality Control. HR-MAS NMR. Chemometric Analyses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Espécie <i>Baccharis trimera</i> evidenciando os cladódios (caule alado).	30
Figura 2 – Compostos fenólicos em espécies do gênero <i>Baccharis</i>	36
Figura 3 – Terpenoides identificados em espécies do gênero <i>Baccharis</i>	37
Figura 4 – Diterpenos identificados em espécies do gênero <i>Baccharis</i>	38
Figura 5 – Espécie <i>Baccharis articulata</i>	39
Figura 6 – Espécie <i>Baccharis junciformis</i>	40
Figura 7 – Espécie <i>Baccharis milleflora</i>	41
Figura 8 – Espécie <i>Baccharis myriocephala</i>	42
Figura 9 – Espécie <i>Baccharis trimera</i>	43
Figura 10 – Esquema de um estator de HR-MAS com gradiente no ângulo mágico ao longo do rotor.	49
Figura 11 – Esquema de análise dos parâmetros de aquisição.	66
Figura 12 – Esquema dos métodos utilizados para a avaliação da estabilidade e mobilidade da amostra.	67
Figura 13 – Esquema da metodologia utilizada para aquisição dos experimentos. .	68
Figura 14 – Esquema da metodologia utilizada para aquisição dos experimentos através de RMN de solução.	69
Figura 15 – Transformação dos espectros em buckets.	71
Figura 16 – Esquema da metodologia utilizada para otimização das análises quimiométricas.	72
Figura 17 – Esquema da metodologia utilizada para otimização da análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA).	74
Figura 18 – Espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de <i>B. trimera</i> (400 MHz, CD ₃ OD)...	79
Figura 19 – Espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de <i>Baccharis</i> utilizando diferentes solventes (400 MHz).	81
Figura 20 – Ampliação das regiões entre δ 11,00-5,50 e δ 3,00-0,50 dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de <i>Baccharis</i> utilizando diferentes solventes (400 MHz).	81
Figura 21 – Sequências de pulsos avaliadas.	83
Figura 22 – Espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de <i>B. trimera</i> utilizando as sequências de pulsos investigadas (400 MHz, CD ₃ OD).	84

Figura 23 – Ampliação das regiões entre δ 5,50-4,20 dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. trimera</i> , mostrando a qualidade de saturação do sinal residual de água empregando as sequências de pulsos investigadas (400 MHz, CD_3OD).	85
Figura 24 – Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. trimera</i> adquiridos com diferentes números de promediações (400 MHz, CD_3OD).	85
Figura 25 – Ampliação da região entre δ 8,00-6,00 dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de <i>Baccharis</i> adquiridos em diferentes números de promediações (400 MHz, CD_3OD).	86
Figura 26 – Ampliação da região entre δ 4,00-0,50 dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. trimera</i> adquiridos em diferentes tempos após retirada do freezer (400 MHz, CD_3OD).	87
Figura 27 – Ampliação da região entre δ 8,50-5,00 dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. trimera</i> adquiridos em diferentes tempos após retirada do freezer (400 MHz, CD_3OD).	87
Figura 28 – Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. trimera</i> adquiridos com diferentes tempos de encharcamento (400 MHz, CD_3OD).	88
Figura 29 – Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. trimera</i> adquiridos com diferentes velocidades de giro (400 MHz, CD_3OD).	88
Figura 30 – Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de diferentes espécies de <i>Baccharis</i> (400 MHz, CD_3OD).	90
Figura 31 – Espectros de RMN HR-MAS de ^1H das espécies de <i>Baccharis</i> investigadas neste trabalho (400 MHz, CD_3OD).	92
Figura 32 – Ampliação da região entre δ 11,50-6,00 dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de diferentes espécies de <i>Baccharis</i> (400 MHz, CD_3OD).	92
Figura 33 – Ampliação da região entre δ 4,50-0,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. trimera</i> (400 MHz, CD_3OD).	94
Figura 34 – Ampliação da região entre δ 11,50-4,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. trimera</i> (400 MHz, CD_3OD).	95
Figura 35 – Ampliação da região entre δ 4,50-0,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. milleflora</i> (400 MHz, CD_3OD).	95
Figura 36 – Ampliação da região entre δ 11,50-4,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. milleflora</i> (400 MHz, CD_3OD).	96

Figura 37 – Ampliação da região entre δ 4,50-0,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. articulata</i> (RS) (400 MHz, CD_3OD).....	97
Figura 38 – Ampliação da região entre δ 11,5-4,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. articulata</i> (RS) (400 MHz, CD_3OD).....	98
Figura 39 – Ampliação da região entre δ 4,50-0,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. articulata</i> (PR) (400 MHz, CD_3OD).....	98
Figura 40 – Ampliação da região entre δ 11,50-4,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. articulata</i> (PR) (400 MHz, CD_3OD).....	99
Figura 41 – Ampliação da região entre δ 4,50-0,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. junciformis</i> (400 MHz, CD_3OD).....	100
Figura 42 – Ampliação da região entre δ 11,50-5,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de <i>B. junciformis</i> (400 MHz, CD_3OD).....	100
Figura 43 – Espectro de RMN de ^1H de <i>B. trimera</i> (600 MHz, CD_3OD).	102
Figura 44 – Ampliação da região entre δ 5,50-0,50 do espectro de RMN de ^1H de <i>B. trimera</i> (600 MHz, CD_3OD).....	103
Figura 45 – Ampliação da região entre δ 6,60-5,60 do espectro de RMN de ^1H de <i>B. trimera</i> (600 MHz, CD_3OD).....	104
Figura 46 – Ampliação da região entre δ 8,20-6,60 do espectro de RMN de ^1H de <i>B. trimera</i> (600 MHz, CD_3OD).....	105
Figura 47 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY de <i>B. trimera</i> (^1H : 600 MHz; CD_3OD).	106
Figura 48 – Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC de <i>B. trimera</i> (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).....	106
Figura 49 – Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC de <i>B. trimera</i> (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).....	107
Figura 50 – Estrutura do acetato de carquejila.	107
Figura 51 – Estrutura da 3-O-metilquercetina.....	108
Figura 52 – Estrutura da quercetina.	109
Figura 53 – Estrutura do canferol.	110
Figura 54 – Espectro de RMN de ^1H de <i>B. milleflora</i> (600 MHz, CD_3OD).	111
Figura 55 – Ampliação da região entre δ 8,50-4,50 do espectro de RMN de ^1H de <i>B. milleflora</i> (600 MHz, CD_3OD).....	112
Figura 56 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY de <i>B. milleflora</i> (600 MHz, CD_3OD).	113

Figura 57 – Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC de <i>B. milleflora</i> (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).....	114
Figura 58 – Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC de <i>B. milleflora</i> (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).....	114
Figura 59 – Estrutura do ácido siríngico	115
Figura 60 – Estrutura do <i>trans</i> -melilotosídeo.....	116
Figura 61 – Estrutura do <i>cis</i> -melilotosídeo.	117
Figura 62 – Estrutura da apigenina.	118
Figura 63 – Espectro de RMN de ^1H de <i>B. articulata</i> (RS) (600 MHz, CD_3OD).....	119
Figura 64 – Ampliação da região entre δ 8,00-3,00 do espectro de RMN de ^1H de <i>B. articulata</i> (RS) (600 MHz, CD_3OD).....	120
Figura 65 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY de <i>B. articulata</i> (RS) (600 MHz, CD_3OD).	121
Figura 66 – Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC de <i>B. articulata</i> (RS) (^1H : 600 MHz; ^{13}C :150 MHz, CD_3OD).....	121
Figura 67 – Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC de <i>B. articulata</i> (RS) (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).	122
Figura 68 – Estrutura do cafeato de 4'- <i>O</i> - β -glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzila (BAII).	123
Figura 69 – Estrutura do carbonato de 4- <i>O</i> - β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-tetraidro-2H-piran-2-il-acetil (BAIII).....	124
Figura 70 – Estrutura do 4- <i>O</i> - β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-metanol (BAIV).125	
Figura 71 – Espectro de RMN de ^1H de <i>B. articulata</i> (PR) (600 MHz, CD_3OD).....	126
Figura 72 – Ampliação da região entre δ 8,20-6,00 do espectro de RMN de ^1H de <i>B. articulata</i> (PR) (600 MHz, CD_3OD).	127
Figura 73 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY de <i>B. articulata</i> (PR) (600 MHz, CD_3OD).	127
Figura 74 – Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC de <i>B. articulata</i> (PR) (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).....	128
Figura 75 – Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC de <i>B. articulata</i> (PR) (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).	128
Figura 76 – Estrutura do ácido 3,5-dicafeioilquínico.....	129
Figura 77 – Espectro de RMN de ^1H de <i>B. junciformis</i> (600 MHz, CD_3OD).	130

Figura 78 – Ampliação da região em δ 8,00-4,40 do espectro de RMN de ^1H de <i>B. junciformis</i> (600 MHz, CD_3OD).....	131
Figura 79 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY de <i>B. junciformis</i> (600 MHz, CD_3OD).	131
Figura 80 – Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC de <i>B. junciformis</i> (^1H : 600 MHz e ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).....	132
Figura 81 – Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC de <i>B. junciformis</i> (^1H :600 MHz e ^{13}C :150 MHz, CD_3OD).	132
Figura 82 – Estrutura do ácido cafeico.....	133
Figura 83 – <i>Buckets</i> de 0,05 ppm após normalização dos dados em PC1 utilizando diferentes pré-processamentos.	135
Figura 84 – Gráfico de <i>influence plot</i> e <i>hotelling T²</i> das amostras de referência de <i>Baccharis</i>	137
Figura 85 – Análise de PCA (PC1-67,86% versus PC2-11,68%) dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), <i>bucket</i> de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD_3OD), Dados Centrados na Média.	138
Figura 86 – Análise de PCA (PC1-67,86% versus PC2-11,68%) dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), <i>bucket</i> de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD_3OD), escalamento por Pareto.	139
Figura 87 – Análise de PCA (PC1-46,07% versus PC2-16,48%) dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando todo o espectro (δ 11,3-0,30), <i>bucket</i> de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD_3OD), utilizando autoescalamento.	140
Figura 88 – Análise de PCA (PC1-64,12% versus PC2-13,52%) dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando a região alifática (δ 4,80-0,30), <i>bucket</i> de δ 0,05 com exclusão da região δ 3,34-3,29 (sinal do CD_3OD), Dados Centrados na Média.	148
Figura 89 – Análise de PCA (PC1-29,64% versus PC2-18,89%) dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando a	

	região alifática (δ 4,80-0,30), <i>bucket</i> de δ 0,05 com exclusão da região δ 3,34-3,29 (sinal do CD ₃ OD), utilizando escalamento por Pareto.....	149
Figura 90	– Análise de PCA (PC1-60,06% <i>versus</i> PC2-14,28%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando a região aromática (δ 11,30-6,00), <i>bucket</i> de δ 0,05, Dados Centrados na Média.....	150
Figura 91	– Análise de PCA (PC1-64,07% <i>versus</i> PC2-9,65%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando a região aromática (δ 11,30-6,00), <i>bucket</i> de δ 0,05, utilizando escalamento por Pareto.....	151
Figura 92	– Análise de PCA (PC1 <i>versus</i> PC2) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando todo o espectro (δ 11,3-0,30), <i>bucket</i> de δ 0,05, sem exclusão de regiões e Dados Centrados na Média.....	153
Figura 93	– Expansão dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H adquiridos com a sequência de pulsos <i>zgpr</i> das amostras de referência de <i>Baccharis</i> evidenciando a região de supressão do sinal da água (δ 6,50-3,00).	154
Figura 94	– Análise de PCA (PC1-52,68% <i>versus</i> PC2-19,46%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), <i>bucket</i> de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD ₃ OD), Dados Centrados na Média.	156
Figura 95	– Análise de PCA (PC1-30,74% <i>versus</i> PC2-16,08%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), <i>bucket</i> de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD ₃ OD), Escalamento por Pareto.....	157
Figura 96	– Ampliação da região entre δ 2,50-0,60 dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H de <i>B. trimera</i> e <i>B. myriocephala</i> , destacando a presença do acetato de carquejila.	158
Figura 97	– Análise de PCA (PC1-44,96% <i>versus</i> PC2-13,34%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), <i>bucket</i> de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-	

4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD ₃ OD), utilizando autoescalamto.	159
Figura 98 – Análise de PLS-DA (PC1 <i>versus</i> PC2) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), <i>bucket</i> de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD ₃ OD).	162
Figura 99 – Classificação das amostras comerciais (PC1 <i>versus</i> PC2) utilizando o modelo de classificação construído a partir dos espectros de RMN HR-MAS DE ¹ H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), <i>bucket</i> de 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD ₃ OD), Dados Centrados na Média.	164
Figura 100 – Classificação das amostras comerciais (PC1 <i>versus</i> PC2) utilizando o modelo de classificação construído a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ¹ H das amostras de referência de <i>Baccharis</i> , utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), <i>bucket</i> de 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD ₃ OD), escalamento por Pareto.	165
Figura 101 – Gráfico de número de variáveis latentes (LVS) <i>versus</i> RMSECV utilizado na construção do modelo de classificação por PLS-DA para amostras de <i>B. trimera</i>	167
Figura 102 – Gráfico de leverage <i>versus</i> resíduos de Students utilizado na construção do modelo de classificação por PLS-DA para amostras de <i>B. trimera</i> . ..	168
Figura 103 – Gráfico de número de variáveis latentes <i>versus</i> RMSECV utilizado na construção do modelo de classificação por PLS-DA para amostras de <i>B. trimera</i> excluindo as amostras 81, 82 e 133.	168
Figura 104 – Gráfico de variáveis <i>versus</i> vetor de regressão com 4 LVS do modelo PLS-DA para as amostras de <i>B. trimera</i>	169
Figura 105 – Gráfico de Q <i>versus</i> T ² para as amostras projetadas no modelo para classe 1 (<i>B. articulata</i>).	174
Figura 106 – Gráfico de Q <i>versus</i> T ² para as amostras projetadas no modelo para classe 2 (<i>B. junciformis</i>).	174
Figura 107 – Gráfico de Q <i>versus</i> T ² para as amostras projetadas no modelo para classe 3 (<i>B. milleflora</i>).	175

Figura 108 – Gráfico de Q versus T^2 para as amostras projetadas no modelo para classe 4 (<i>B. myriocephala</i>).	176
Figura 109 – Gráfico de Q versus T^2 para as amostras projetadas no modelo para classe 5 (<i>B. trimera</i>).	176

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos identificados em espécies do gênero <i>Baccharis</i> (Seção Caulopterae).....	32
Tabela 2 – Amostras vegetais de diferentes espécies de <i>Baccharis</i>	63
Tabela 3 – Amostras comerciais de <i>Baccharis</i>	64
Tabela 4 – Quantidade de amostras empregadas nos PLS-DA.	73
Tabela 5 – Classes definidas para cada modelo PLS-DA.	73
Tabela 6 – Classes definidas para o modelo SIMCA.	75
Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do acetato de carquejila.	107
Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da 3-O-metilquercetina.....	108
Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da quercetina.....	109
Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do canferol.....	110
Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ácido siríngico.	115
Tabela 12 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do <i>trans</i> -melilotosídeo.	116
Tabela 13 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do <i>cis</i> -melilotosídeo.....	117
Tabela 14 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da apigenina.....	118
Tabela 15 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do cafeato de 4'-O- β -glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzila (BAII).....	123
Tabela 16 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do carbonato de 4-O- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-tetraidro-2H-piran-2-il-acetil (BAIII).....	124
Tabela 17 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do 4-O- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-metanol (BAIV).	125
Tabela 18 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ácido 3,5-dicafeoilquínico.	129
Tabela 19 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ácido cafeico.	133
Tabela 20 – Resultados obtidos para os modelos construídos com as amostras de <i>B. trimera</i> , <i>B. myriocephala</i> , <i>B. articulata</i> , <i>B. junciformis</i> e <i>B. milleflora</i>	170
Tabela 21 – Classificação de amostras comerciais utilizando os modelos construídos na PLS-DA.	172
Tabela 22 – Informações sobre o SIMCA.	173
Tabela 23 – Classificação de amostras da validação externa utilizando SIMCA....	178
Tabela 24 – Classificação de amostras comerciais utilizando SIMCA.....	179

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B₀	-	Campo magnético principal de um espectrômetro
CCDA	-	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CPMG	-	<i>Carr-Purcell-Meiboom-Gill</i>
<i>d</i>	-	Dupleto
<i>dd</i>	-	Duplo dupleto
<i>ddd</i>	-	Duplo duplo dupleto
Hz	-	Hertz
<i>J</i>	-	Constante de acoplamento em Hertz (Hz)
kHz	-	Quilohertz
L4	-	loop para o filtro do decaimento de T ₂
<i>m</i>	-	Multiplete
MHz	-	Megahertz
OMS	-	Organização Mundial de Saúde
PNPIC	-	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	-	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
R²	-	Coeficiente de correlação do modelo de calibração
RENISUS	-	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³C{¹H}	-	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13 desacoplado de Hidrogênio.
RMN de ¹H	-	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	-	Simpleto
S/R	-	Relação sinal/ruído
<i>sl</i>	-	Simpleto largo
SUS	-	Sistema Único de Saúde
<i>t</i>	-	Triplete
t₁	-	Intervalo de incrementos em um experimento NOESY
T₂	-	Tempo de relaxação transversal (spin-spin)

t_m	-	Tempo de mistura (D8)
TMS	-	Tetrametilsilano
δ	-	Deslocamento químico
T	-	Tempo intervalo de eco fixado para a eliminação dos efeitos de acoplamento (D20)

Abreviaturas e siglas em inglês com a tradução entre parênteses

AQ	-	<i>Acquisition Time</i> (Tempo de Aquisição)
COSY	-	<i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i> (Espectroscopia de Correlação Homonuclear)
D1	-	<i>Delay</i> (Tempo de espera antes de cada aquisição)
D8	-	<i>Mixing time</i> (Tempo de mistura)
DQF-COSY	-	<i>Double Quantum Filter – COrrrelation SpectroscopY</i> (Espectroscopia de Correlação com filtro de duplo-quantum)
FID	-	<i>Free induction decay</i> (Decaimento de indução livre)
GC-MS	-	<i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas)
HCA	-	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i> (Análises de Agrupamentos Hierárquicos)
HMBC	-	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> (Correlação Heteronuclear a Longa Distância)
HPLC	-	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).
HR-MAS	-	<i>High Resolution-Magic Angle Spinning</i> (Alta Resolução com Giro no Ângulo Mágico)
HSQC	-	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> (Correlação Heteronuclear a Ligação Direta)
KNM	-	<i>K-nearest neighbors</i> (K-ésimo vizinho mais próximo)
LB	-	<i>Line Broadening</i> (Multiplicação exponencial aplicada no FID)

		<i>Liquid Chromatography–Mass Spectrometry</i>
LC-MS	-	(Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas)
LDA	-	<i>Linear Discriminant Analysis</i> (Análise Linear Discriminante)
LV	-	<i>Latent Variable</i> (Variável Latente)
MAS	-	<i>Magic Angle Spinning</i> (Giro no Ângulo Mágico)
NIR	-	<i>Near-infrared</i> (Infravermelho próximo)
NS	-	<i>Number of Scans</i> (Número de promediações)
OPLS-DA	-	<i>Orthogonal Partial Least Squares-Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante pelo Método de Mínimos Quadrados Parciais Ortogonal)
PC	-	<i>Principal Components</i> (Componentes Principais)
PCA	-	<i>Principal Components Analysis</i> (Análise de Componentes Principais)
PLS	-	<i>Partial Least Squares</i> (Mínimos Quadrados Parciais) <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante pelo Método de Mínimos Quadrados Parciais)
PLS-DA	-	
RD	-	<i>Recycle Delay</i> (Tempo de espera entre os pulsos – D1)
RMSEC	-	<i>Root Mean Square Error of Calibration</i> (Raiz Quadrada do Erro Médio de Calibração)
RMSECV	-	<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i> (Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Validação Cruzada)
RMSEP	-	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i> (Raiz Quadrada do Erro Médio Quadrático de Previsão)
SIMCA	-	<i>Soft Independent Modelling by Class Analogy</i> (Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classe)
SW	-	<i>Spectral width</i> (Janela espectral)
TD	-	<i>Size of FID</i> (número de pontos utilizados para digitalização do FID)
TPPI	-	<i>Time-Proportional Phase Incrementation</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
1.1 O GÊNERO <i>Baccharis</i>	29
1.1.1 <i>Baccharis articulata</i> (Lam.) Pers.	39
1.1.2 <i>Baccharis junciformis</i> DC.	40
1.1.3 <i>Baccharis milleflora</i> (Less.) DC.	41
1.1.4 <i>Baccharis myriocephala</i> (Less.) DC.	42
1.1.5 <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	43
1.2 RMN NO CONTROLE DE QUALIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS	46
1.2.1 RMN HR-MAS E SUAS APLICAÇÕES	48
1.3 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	51
1.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)	53
1.3.2 Análise Discriminante pelo Método de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)	55
1.3.3. Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classes (SIMCA)	57
2. OBJETIVOS	61
2.1 GERAL	61
2.2 ESPECÍFICOS	61
3. PARTE EXPERIMENTAL	63
3.1 AMOSTRAS	63
3.1.1 Amostras de referência	63
3.1.2 Amostras comerciais	63
3.2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H	64
3.2.1 Estado da Amostra	65
3.2.2 Solvente Deuterado	65
3.2.3 Parâmetros de Aquisição	65

3.2.4 Estabilidade e Mobilidade da Amostra.....	66
3.3 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ¹ H	67
3.4 EXPERIMENTOS BIDIMENSIONAIS POR RMN EM SOLUÇÃO.....	68
3.5 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	70
3.5.1. Processamento, ajuste e transformação dos espectros	70
3.5.2 Análise de Componentes Principais (PCA).....	71
3.5.3 Classificação das amostras por PLS-DA	73
3.5.4. Classificação das amostras através do SIMCA	75
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1. OTIMIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE RMN HR-MAS DE ¹ H.....	78
4.1.1 Avaliação do Estado da Amostra	78
4.1.2 Avaliação do Solvente	79
4.1.3 Avaliação de Parâmetros de Aquisição	82
4.1.4 Avaliação da Estabilidade da Amostra.....	86
4.1.5 Avaliação do Preparo de Amostra	89
4.2 PERFIL ESPECTRAL DAS ESPÉCIES DE <i>Baccharis</i> (ASTERACEAE).....	91
4.3 CONFIRMAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR RMN HR-MAS.....	102
4.4 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS.....	134
4.4.1 Análise de Componentes Principais das espécies de referência de <i>Baccharis</i>	134
4.4.2 Análise de Componentes Principais das espécies <i>Baccharis trimera</i> e <i>B.</i> <i>myriocephala</i>	155
4.4.3 Classificação por PLS-DA das espécies <i>B. trimera</i> e <i>B. myriocephala</i> ..	161
4.4.4 Determinação da autenticidade das amostras comerciais de carqueja .	163
4.4.5 Classificação por PLS-DA das espécies de <i>Baccharis</i> e amostras comerciais	166

4.4.6 Classificação pelo SIMCA das espécies de <i>Baccharis</i> e amostras comerciais	173
5. CONCLUSÃO	182
6. REFERÊNCIAS	185

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são fontes de moléculas com extraordinário potencial terapêutico e desempenham um papel importante no desenvolvimento de novos medicamentos. O Acheflan®, por exemplo, foi o primeiro fitomedicamento brasileiro a ser produzido a partir do óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea* DC.), tendo em sua composição de 2,3 a 2,9% de α -humuleno, e sendo indicado para o tratamento de tendinite crônica e dores miofasciais (QUISPE-CONDORI et al., 2008).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 88% da população mundial utiliza plantas medicinais para o tratamento de doenças (OLIVEIRA et al., 2011). Nos países em desenvolvimento, essa prática é ainda mais efetiva em virtude do baixo poder aquisitivo da população, aliada a falta de acesso a medicamentos industrializados e ao contexto cultural de cada país (OLIVEIRA et al., 2010; JEELANI et al., 2018). No Brasil, estudos apontam que 66% da população não tem acesso aos medicamentos industrializados (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

Segundo DUTRA et al. (2016), embora o Brasil apresente abundante biodiversidade e grande interesse no uso da medicina tradicional, o mercado brasileiro de fitoterápicos ainda é considerado muito modesto, movimentando no ano de 2014 em torno de US\$ 261 milhões, representando somente menos de 5% do mercado global de medicamentos no Brasil, estimados em cerca de US\$ 28 bilhões no mesmo ano. No entanto, o mercado global de produtos fitoterápicos está projetado para atingir US\$ 115 bilhões até 2020, com a Europa liderando o mercado (RACLARIU et al., 2018).

Ao contrário dos medicamentos alopáticos que são submetidos a um processo rigoroso de controle de qualidade, os medicamentos fitoterápicos são produzidos empregando matérias-primas vegetais que dependem da correta identificação botânica. Além disso, são matrizes e formulações complexas, resultante de várias etapas de processamento. Este fato torna desafiadora a identificação e autenticação de suas matérias-primas utilizando somente características organolépticas, morfológicas ou microscópicas (KHAN; SMILLIE, 2012).

Os metabólitos secundários das plantas são propensos a variabilidade de fatores como idade, sazonalidade, latitude, altitude, condições do solo e herbivoria, com influência de marcadores químicos medidos em diferentes lotes de material vegetal bruto. Esta complexidade de fatores reflete na qualidade do produto

fitoterápico final (ZHANG et al., 2012). Dessa forma, cuidados são necessários ao determinar o método analítico a ser empregado para análises de autenticação e controle de qualidade desses produtos (RACLARIU et al., 2017).

A popularidade das plantas medicinais e dos fitoterápicos está relacionada com a preocupação dos consumidores com a saúde, fatores culturais e a crença de que estes são naturais e, portanto, seguros (LYNCH; BERRY, 2007). Em decorrência disso, um crescente número de irregularidades envolvendo estes produtos tem chamado atenção, resultando em impacto direto em sua eficácia e segurança (HEINRICH, 2015; LEONTI; CASU, 2013). Dessa maneira, avaliar sua segurança, efeitos farmacológicos e eficácia requer uma abordagem científica multidisciplinar (ATANASOV et al., 2015).

No Brasil, existem duas políticas atuais que favorecem a disseminação e uso de plantas medicinais e fitoterápicos, a saber, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), por meio da Portaria 971/2006 do Ministério da Saúde e do Decreto Federal 5813/2006, respectivamente (BRASIL, 2006; BRASIL, 2006a). O objetivo dessas políticas consiste em promover pesquisas com plantas medicinais e fitoterápicos com adequado grau de qualidade, segurança e eficácia para posterior uso pela população, bem como contribuir no desenvolvimento da cadeia produtiva e indústria nacional (BRASIL, 2016; CARVALHO et al., 2014).

Além disso, em 2009, o Ministério da Saúde lançou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), apresentando 71 espécies de plantas medicinais propensas à geração de fitoterápicos para futuro uso no SUS, concentrando esforços na comprovação de eficácia e segurança das mesmas (BRASIL, 2009; MAZZARI; PRIETRO, 2014). Dentre as espécies listadas na RENISUS, encontra-se *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae), popularmente conhecida como “carqueja” e descrita na 5ª Edição da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2009; ANVISA, 2010).

Uma característica morfoanatômica da *B. trimera* reside na presença de cladódios e caule com expansões laterais folhosas, conhecidos como caules alados. Tal particularidade confere similaridade morfológica com outras espécies da seção *Caulopterae* (*Baccharis articulata* (Lam.) Pers., *Baccharis junciformis* DC., *Baccharis milleflora* DC., *Baccharis myriocephala* DC., entre outras), acarretando na coleta errônea da planta pela população tradicional e ervateiros, além de oferecer dificuldade

de identificação das espécies morfológicamente semelhantes para especialistas (HEIDEN et al., 2009; SCHNEIDER; BOLDRINI, 2011).

Nas últimas décadas, iniciativas foram tomadas não só para melhorar a qualidade das plantas medicinais e seus produtos, como também para desenvolver métodos analíticos adequados e confiáveis para auxiliar nesse processo. Atualmente, as técnicas espectroscópicas associadas à quimiometria são os métodos mais reconhecidos na avaliação e controle de qualidade de muitos produtos à base de plantas (GAD et al., 2012).

Nesse contexto, é importante a avaliação da autenticidade de *B. trimera*, de forma que o produto comercializado tenha sua segurança e eficácia comprovada. Dessa forma, a obtenção de perfis espectrais pode fornecer uma abordagem qualitativa abrangente para fins de autenticação de espécies, avaliação de qualidade, eficácia e segurança de plantas medicinais e fitoterápicos, devido à complexidade e ação sinérgica da composição química desses produtos.

1.1 O GÊNERO *Baccharis*

O gênero *Baccharis* pertence à família Asteraceae e apresenta aproximadamente 500 espécies distribuídas exclusivamente no continente americano (HEIDEN; PIRANI, 2016). Destas, 179 foram catalogadas no Paraná, tornando este Estado um dos principais núcleos de biodiversidade de *Baccharis* no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2018).

Embora exista um elevado número de publicações sobre este gênero, existem grandes controvérsias sobre a nomenclatura correta e sinonímias de suas espécies, uma vez que a identificação botânica oferece dificuldade até mesmo para especialistas, principalmente em relação à seção *Caulopterae*, caracterizadas principalmente pela presença de caules alados ou cladódios que desempenham a função da folha (**Figura 1** – Pág. 30) (BUDEL et al., 2009; CAMPOS et al., 2016).

Nesta seção, 32 espécies ocorrem na América do Sul, das quais 23 são encontradas no Brasil (SCHNEIDER, 2009). Estas plantas são popularmente conhecidas como “carqueja”, e na língua guarani são chamadas de “djakare ruguai” e “tedju ruguai”, que significa “cauda de lagarto”, devido à semelhança dos caules

alados das plantas desta seção com a cauda desse animal (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1926).

Dentre as espécies encontradas no Brasil, *B. articulata* (sinonímia: *Baccharis gaudichaniana* DC.), *Baccharis microcephala* (Less.) DC., *Baccharis crispa* Spreng. (sinonímia: *B. trimera*), *Baccharis pentaptera* Baker. (sinonímia: *Baccharis stenocephala* Baker.) e *B. junciformis* (sinonímia: *Baccharis usterii* Heering.) são amplamente utilizadas pela população para o tratamento de problemas digestivos, inflamatórios, hepáticos e auxílio na perda de peso, sendo usadas indiscriminadamente devido à grande semelhança morfológica (ALONSO; DESMARCHELIER, 2006; BUDEL et al., 2009; SCHNEIDER, 2009).



Figura 1 –Espécie *Baccharis trimera* evidenciando os cladódios (caule alado).

Fonte: FUNEZ, L. A. Disponível em:

<https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/asteraceae/baccharis-crispa>

HEIDEN et al. (2009) destacaram as espécies *B. myriocephala*, *B. articulata*, *B. milleflora* e *B. junciformis* como similares a *B. trimera*. A dificuldade de identificação e similaridade morfológica das espécies da seção *Caulopterae* demonstram a importância de avaliar a autenticidade de *B. trimera*, uma vez que é a única espécie incluída na RENISUS e na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2009, ANVISA, 2010). Nesse contexto, o desenvolvimento de metodologias direcionados a avaliar a autenticidade de *B. trimera* por meio dos perfis espectrais é extremamente importante para assegurar a qualidade da planta medicinal comercializada, bem como,

reconhecer diferenças químicas entre espécies morfologicamente semelhantes, além de contribuir para a quimiotaxonomia do gênero.

As espécies de *Baccharis* também são relevantes economicamente, sendo utilizadas como plantas ornamentais, na apicultura, na indústria de perfumaria e cosméticos. Entretanto, algumas se apresentam como pragas, sendo tóxicas para o gado, como por exemplo, *Baccharis coridifolia* DC. (QUEIROGA et al., 1990; RISSI et al., 2005; HEIDEN et al., 2006).

Diversas espécies de *Baccharis* apresentam usos na medicina tradicional para o tratamento de ferimentos, úlceras, febre, doenças gastrintestinais, como diurético e analgésico (ANDRIÃO et al., 2010). Assim como atividades biológicas comprovadas, a exemplo de atividade anti-inflamatória (DOS SANTOS et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2011; ZALEWSKI et al., 2011) antioxidante (SOBRINHO et al., 2016; SABIR et al., 2017; VEIGA et al., 2017), citotóxica (JARAMILLO-GARCIA et al., 2018; PEREIRA et al., 2017), antimicrobiana (KURDELAS et al., 2012; SOBRINHO et al., 2016; VEIGA et al., 2017), alelopática (CESPEDES et al., 2002; XAVIER et al., 2012), leishmanicida (SILVA FILHO et al., 2009; YAMAMOTO et al., 2014; MOREIRA et al., 2014) e tripanocida (SILVA FILHO et al., 2004; GRECCO et al., 2012a).

Estas atividades podem ser atribuídas à presença de constituintes químicos de classes distintas, como flavonoides, ácidos fenólicos e terpenoides, justificando a utilização de inúmeras espécies de *Baccharis* na medicina popular para o tratamento de várias doenças (VERDI et al., 2005; CAMPOS et al., 2016).

A literatura recente tem concentrado estudos envolvendo espécies de *Baccharis* direcionados a análise de óleos essenciais e avaliação de atividades biológicas, em que uma grande variedade de compostos foi identificada em espécies desse gênero (**Tabela 1, Figuras 2, 3 e 4 – Pág. 32-38**).

Tabela 1 – Compostos identificados em espécies do gênero *Baccharis* (Seção *Caulopterae*).

(continua)

Classe	Compostos	Nº	Espécies encontradas	Referência
Flavonoides	5-hidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona (salvigenina)	1	<i>B. trinervis</i> ; <i>B. articulata</i>	SHARP et al., 2001; GIANELLO et al., 2000.
	5,4'-diidroxi-7-metoxiflavona (gencuanina)	2	<i>B. articulata</i> ; <i>B. trimera</i> ; <i>B. crispa</i> .	GIANELLO et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2013.
	5,4'-diidroxi-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina)	3	<i>B. articulata</i> ; <i>B. genistelloides</i> ; <i>B. trimera</i> .	SUTTISRI et al., 1994; NAGASUKI; KOMAI, 1998; GIANELLO et al., 2000.
	5,7- diidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina)	4	<i>B. articulata</i> ; <i>B. dracunculifolia</i> .	GIANELLO et al., 2000; ANDRADE et al., 2017
	5,3'-diidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (pilloina)	5	<i>B. crispa</i>	BANDONI et al., 1978
	5,6-diidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona	6	<i>B. trimera</i>	BORELA; FONTOURA, 2002
	5,3'-diidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona (eupatorina)	7	<i>B. genistelloides</i> ; <i>B. trimera</i> .	SUTTISRI et al., 1994; TORRES et al., 2000.
	5,4'-diidroxi-3,6,7-trimetoxiflavona (penduletina)	8	<i>B. trinervis</i> ; <i>B. pendunculata</i> .	SHARP et al., 2001; RAHALISON et al., 1995.
	5,7-diidroxi-6,3',4'-trimetoxiflavona (eupatilina)	9	<i>B. gaudichaudiana</i> ; <i>B. conferta</i> .	AKAIKE et al., 2003; WEIMANN et al., 2002.
	5,7,4'-triidroxiflavona (apigenina)	10	<i>B. articulata</i> ; <i>B. trimera</i> ; <i>B. crispa</i> ; <i>B. dentata</i> ; <i>B. retusa</i> ; <i>B. illinita</i> .	RODRIGUEZ et al., 2013; SARTOR et al., 2013; GRECCO et al., 2012b; VERDI et al., 2004.
	5,7,4'-triidroxi-6-metoxiflavona (hispidulina)	11	<i>B. trimera</i> ; <i>B. uncinela</i> ; <i>B. gaudichaudiana</i> .	NAGASUKI; KOMAI, 1998; GRECCO et al., 2012b; AKAIKE et al., 2003.
	5,3',4'-triidroxi-6,7-dimetoxiflavona (cirsilioi)	12	<i>B. rufescens</i> ; <i>B. genistelloides</i>	SIMIRGIOTIS et al., 2003; KUROYANAGI et al., 1985
	3,5,7,4'-tetraidroxiflavona (canferol)	13	<i>B. dentata</i> ; <i>B. retusa</i> ; <i>B. illinita</i> ; <i>B. genistelloides</i> .	SARTOR et al., 2013; GRECCO et al., 2012b;

(continua)

					FREITAS et al., 2008; DAILY et al., 1984.
	5,7,3',4'-tetraidroxiflavona (luteolina)		14	<i>B. trinervis</i> ; <i>B. trimera</i> ; <i>B. gaudichaudiana</i> ; <i>B. illinita</i> .	JARAMILLO-GARCIA et al., 2018; RODRIGUEZ et al., 2013; GUO et al., 2007; VERDI et al., 2004.
	5,7,3',4'-tetraidroxi-6-metoxiflavona (nepetina)		15	<i>B. trimera</i> ; <i>B. flabellata</i> ; <i>B. linearis</i> .	SOICKE; LENG-PESCHLOW et al., 1987; SAAAD et al., 1988; HE et al., 1996.
	5,7,3',4'-tetraidroxi-3-O-rutinosiflavona (rutina)		16	<i>B. trimera</i> ; <i>B. dentata</i> ; <i>B. gaudichaudiana</i> .	SABIR et al., 2017; SARTOR et al., 2013; AKAIKE et al., 2003.
	3',4',5,7-tetraidroxi-3-metoxiflavona (3-O-metilquercetina)		17	<i>B. trimera</i> ; <i>B. illinita</i> .	VERDI et al., 2004; MELLO; PETROVICK, 2000.
	3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona (quercetina)		18	<i>B. trimera</i> ; <i>B. articulata</i> ; <i>B. retusa</i> .	SABIR et al., 2017; BORGIO et al., 2010; GRECCO et al., 2012.
	5,4'-diidroxi-7-metoxiflavanona (sacuranetina)		19	<i>B. retusa</i> ; <i>B. saicifolia</i> .	TAGUSHI et al., 2015; DEL CORRAL et al., 2012;
	Ácido 5-O-[E]-cafeoilquinico		20	<i>B. trimera</i> ; <i>B. crispa</i> ; <i>B. usterii</i> .	SIMOES-PIRES et al., 2005
	Ácido 3,4-O-[E]-dicafeoilquinico		21	<i>B. trimera</i> ; <i>B. crispa</i> ; <i>B. usterii</i> ; <i>B. retusa</i> .	SIMOES-PIRES et al., 2005; GRECCO et al., 2012b; ABOY et al., 2012.
	Ácido 3,5-O-[E]-dicafeoilquinico		22	<i>B. trimera</i> ; <i>B. crispa</i> ; <i>B. usterii</i> ; <i>B. retusa</i> .	SIMOES-PIRES et al., 2005; GRECCO et al., 2012b; ABOY et al., 2012.
	Ácido 4,5-O-[E]-dicafeoilquinico		23	<i>B. trimera</i> ; <i>B. crispa</i> ; <i>B. usterii</i> ; <i>B. retusa</i> .	SIMOES-PIRES et al., 2005; GRECCO et al., 2012b; ABOY et al., 2012.
	Ácido 3,4,5-tricafeoilquinico		24	<i>B. trimera</i> .	ABOY et al., 2012.
	Ácido 4-O-[E]-cafeoil-1-metil-quinico		25	<i>B. trimera</i> ; <i>B. crispa</i> ; <i>B. usterii</i> .	SIMOES-PIRES et al., 2005.
Ácidos fenólicos					

		Ácido gálico		(continua)	
Monoterpenos		26	<i>B. trimera</i>	SABIR et al., 2017.	
	Acetato de carquejila	27	<i>B. trimera</i>	MINTEGUIAGA et al., 2017; TROMBIN-SOUZA et al., 2017.	
	Carquejol	28	<i>B. trimera</i>	MINTEGUIAGA et al., 2017; MINTEGUIAGA et al., 2018.	
	α -pineno	29	<i>B. calvescens</i> ; <i>B. uncinella</i> ; <i>B. trimera</i> ; <i>B. milleflora</i> ; <i>B. axillaris</i> ; <i>B. articulata</i> ; <i>B. mesoneura</i> ; <i>B. oblongifolia</i> ; <i>B. anomala</i> ; <i>B. myriocephala</i> .	MINTEGUIAGA et al., 2018; TROMBIN-SOUZA et al., 2017.	
	β -pineno	30	<i>B. calvescens</i> ; <i>B. uncinella</i> ; <i>B. trimera</i> ; <i>B. milleflora</i> ; <i>B. axillaris</i> ; <i>B. articulata</i> ; <i>B. mesoneura</i> ; <i>B. oblongifolia</i> ; <i>B. anomala</i> ; <i>B. myriocephala</i> .	MINTEGUIAGA et al., 2018; TROMBIN-SOUZA et al., 2017.	
	Mirceno	31	<i>B. calvescens</i> ; <i>B. uncinella</i> ; <i>B. trimera</i> ; <i>B. milleflora</i> ; <i>B. axillaris</i> ; <i>B. articulata</i> ; <i>B. mesoneura</i> ; <i>B. oblongifolia</i> ; <i>B. anomala</i> ; <i>B. myriocephala</i> .	MINTEGUIAGA et al., 2018; TROMBIN-SOUZA et al., 2017.	
	Biciclogermacreno	32	<i>B. trimera</i> ; <i>B. mesoneura</i> ; <i>B. anomala</i> .	MINTEGUIAGA et al., 2018; TROMBIN-SOUZA et al., 2017.	
	(<i>E</i>)-cariofileno	33	<i>B. calvescens</i> ; <i>B. uncinella</i> ; <i>B. milleflora</i> ; <i>B. axillaris</i> ; <i>B. articulata</i> ; <i>B. mesoneura</i> ; <i>B. oblongifolia</i> ; <i>B. anomala</i> ; <i>B. myriocephala</i> .	TROMBIN-SOUZA et al., 2017.	
	Espatuleno	34	<i>B. calvescens</i> ; <i>B. uncinella</i> ; <i>B. trimera</i> ; <i>B. milleflora</i> ; <i>B. axillaris</i> ; <i>B. articulata</i> ; <i>B. mesoneura</i> ; <i>B.</i>	TROMBIN-SOUZA et al., 2017.	
	Sesquiterpenos				

			(conclusão)
		<i>oblongifolia</i> ; <i>B. anomala</i> ; <i>B. myriocephala</i> .	
	Germacreno D	<i>B. calvescens</i> ; <i>B. trimera</i> ; <i>B. axillaris</i> ; <i>B. articulata</i> ; <i>B. mesoneura</i> ; <i>B. oblongifolia</i> ; <i>B. anomala</i> .	MINTEGUIAGA et al., 2018; TROMBIN-SOUZA et al., 2017.
	Ledol	<i>B. trimera</i>	MINTEGUIAGA et al., 2018; TROMBIN-SOUZA et al., 2017.
	Óxido de cariofileno	<i>B. calvescens</i> ; <i>B. uncinella</i> ; <i>B. trimera</i> ; <i>B. milleflora</i> ; <i>B. axillaris</i> ; <i>B. mesoneura</i> ; <i>B. oblongifolia</i> ; <i>B. myriocephala</i>	MINTEGUIAGA et al., 2018; TROMBIN-SOUZA et al., 2017.
	E-nerolidol	<i>B. trimera</i>	MINTEGUIAGA et al., 2018.
	Ácido hawtriwaico	<i>B. trimera</i> ; <i>B. crispa</i>	GIANELLO et al., 2000.
	Acetato de articulina	<i>B. articulata</i> ; <i>B. gaudichaniana</i>	FULLAS et al., 1994.
	Articulina	<i>B. gaudichaniana</i>	FULLAS et al., 1994.
	Bachariol	<i>B. gaudichaniana</i>	AKAIKE et al., 2003.
	Bacrispina	<i>B. trimera</i> ; <i>B. crispa</i>	GIANELLO et al., 2000.
	1-desoxibacrispina	<i>B. trimera</i> ; <i>B. crispa</i>	GIANELLO et al., 2000.
	Gaudichanolideo A	<i>B. gaudichaniana</i>	HAYASHI et al., 2005.
	Gaudichanolideo B	<i>B. gaudichaniana</i>	HAYASHI et al., 2005.
	Lactona do ácido hawtriwaico	<i>B. trimera</i> ; <i>B. crispa</i>	GIANELLO et al., 2000.
	Malonato de barticulidiol	<i>B. articulata</i>	GIANELLO et al., 2000.
	Ácido 17-hidroxi-ent-caur-15-en-19-oico	<i>B. illinita</i>	VERDI et al., 2004
	Ácido ent-caur-16-en-19-oico	<i>B. retusa</i>	UENO et al., 2018

*Optou-se por usar os nomes das espécies descritas nos artigos.

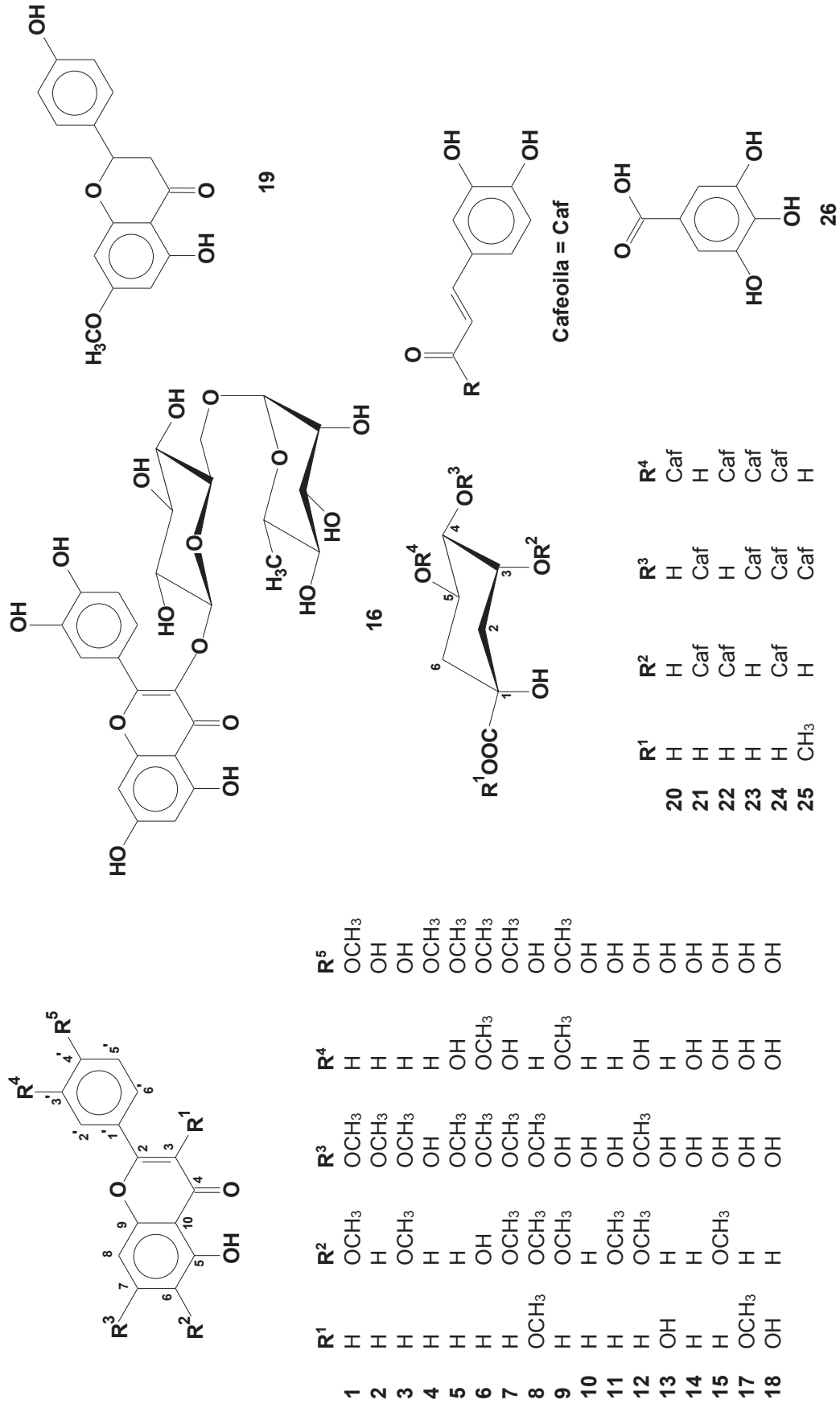


Figura 2 – Compostos fendólicos em espécies do género *Baccharis*.

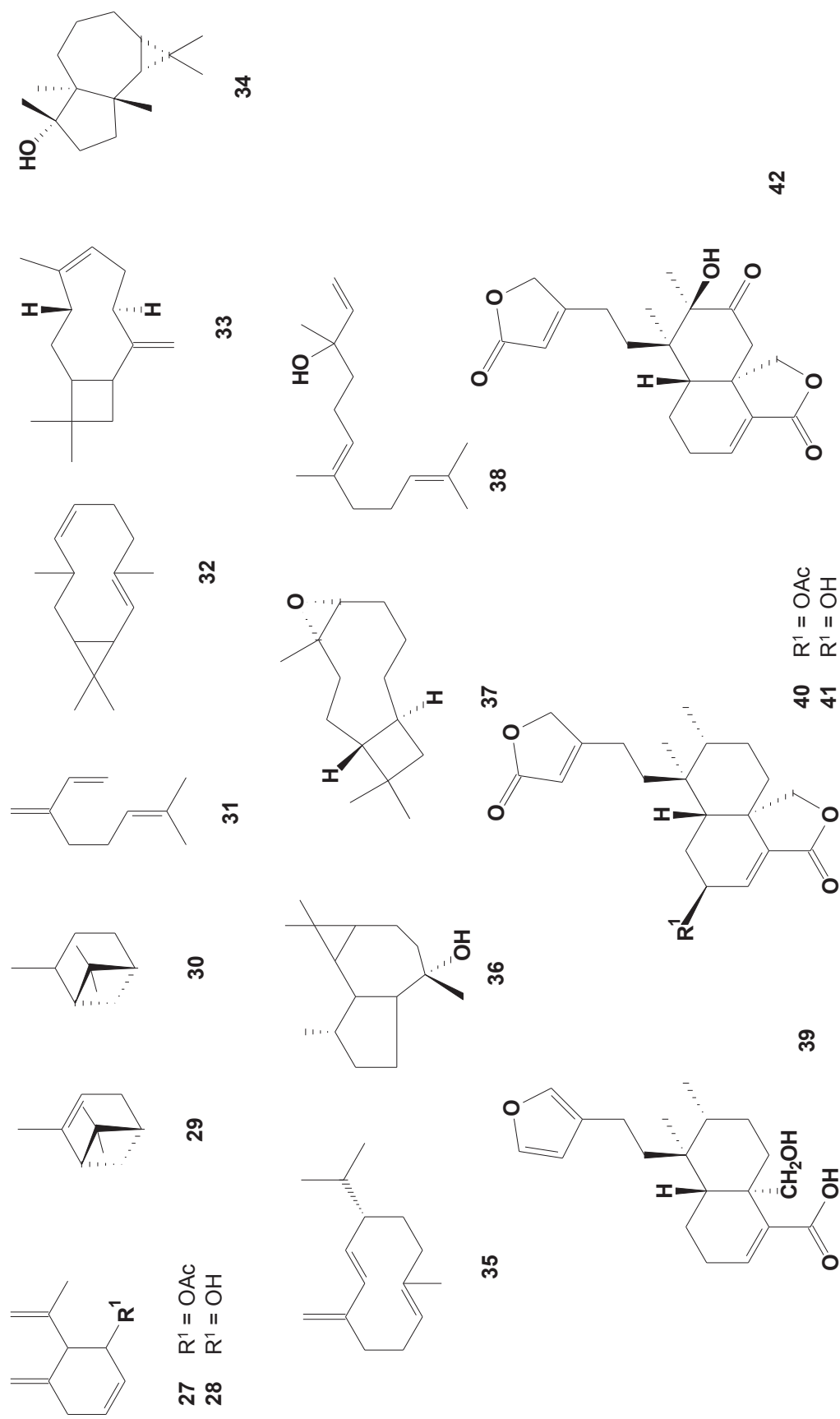


Figura 3 – Terpenoides identificados em espécies do gênero *Baccharis*.

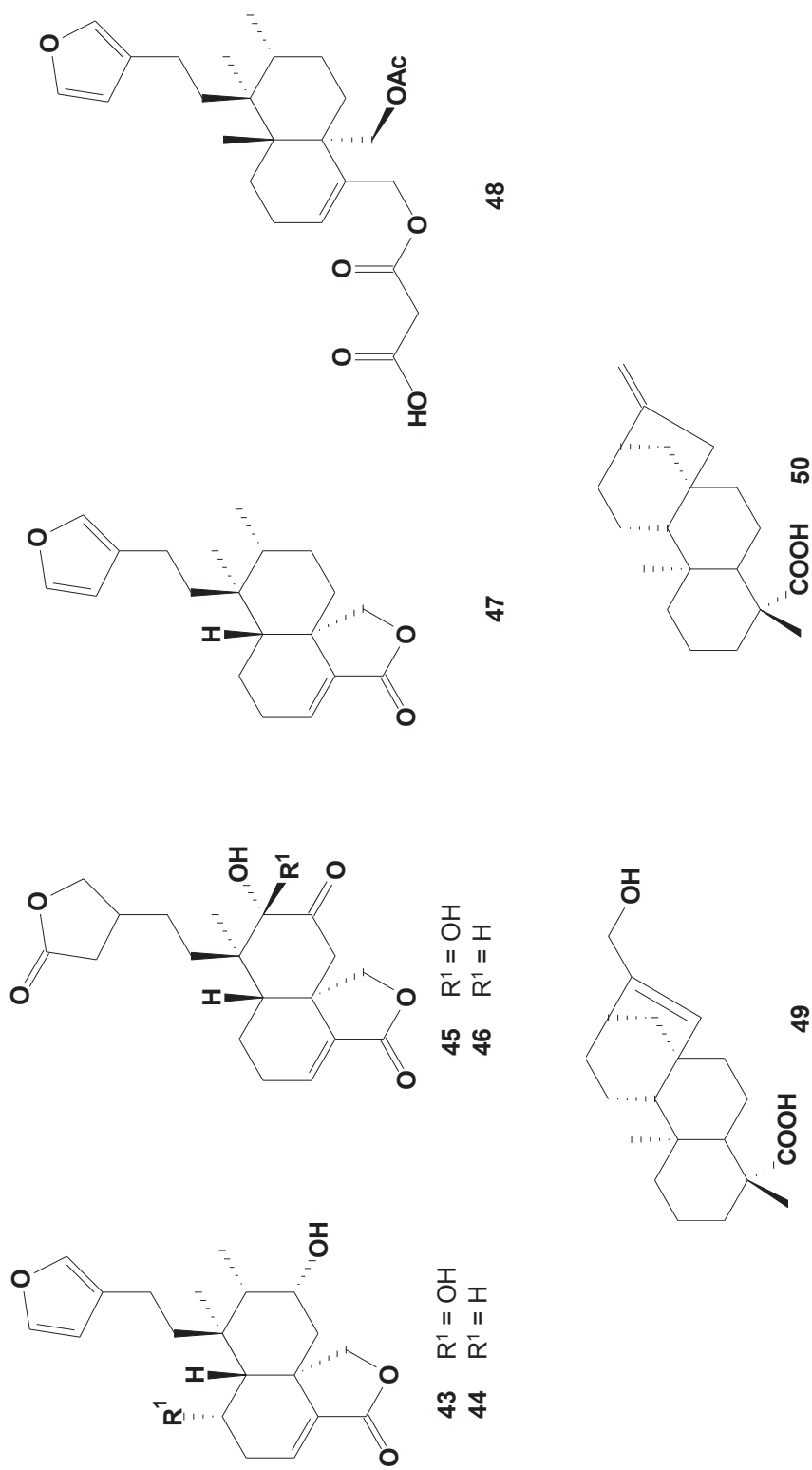


Figura 4 – Diterpenos identificados em espécies do género *Baccharis*.

1.1.1 *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.

A espécie *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. é um arbusto encontrado frequentemente nos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina e São Paulo, sendo comumente conhecida como "carquejinha", "carqueja-doce", "carqueja-branca e "carqueja-miúda". Possui como sinônimas: *Baccharis articulata* subsp. *gaudichaudiana* Malag. *Baccharis articulata* var. *gaudichaudiana* (DC.) Baker, *Baccharis diptera* Sch.Bip. ex Baker, *Baccharis gaudichaudiana* DC., *Baccharis parvifolia* DC., *Conyza articulata* Lam., *Molina articulata* (Lam.) Less., *Pingraea articulata* (Lam.) F.H.Hellw.) (**Figura 5** – Pág. 39) (FLORA DO BRASIL, 2018).



Figura 5 – Espécie *Baccharis articulata*.

Fonte: HEIDEN, 2014.

Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

Esta espécie é popularmente empregada em infusões, decocções e macerações, como digestivo, diurético, hepatoprotetor, no tratamento de doenças das vias respiratórias e de infecções urinárias (PEREZ; ANESINI, 1994), tendo sido comprovada suas atividades inseticida e repelente (DE CAMPOS et al., 2014), anti-inflamatória (GENE et al., 1992), antiviral (ZANON et al., 1999) e antioxidante (OLIVEIRA et al., 2014).

As propriedades biológicas dessa espécie estão estreitamente relacionadas a composição química caracterizada pela presença de compostos fenólicos (GUO et al., 2007; CARIDDI et al., 2012; RODRIGUEZ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014), diterpenos (FULLAS et al., 1994; GIANELLO et al., 2000; AKAIKE et al., 2003;

HAYASHI et al., 2005; GUO et al., 2007) e óleos essenciais (MINTEGUIAGA et al., 2015; TROBIM-SOUZA et al., 2017; TISCHER et al., 2017) (**Tabela 1, Figuras 2, 3 e 4** – Pág. 32-38).

1.1.2 *Baccharis junciformis* DC.

A espécie *Baccharis junciformis* DC. (sinonímias: *Baccharis brachystachys* (Baker) Malag. & Vidal, *Baccharis cordata* Malag., *Baccharis junciformis* var. *triptera* Baker, *Baccharis trimeroides* Malme, *B. usterii*, *Molina juncea* Less.) possui distribuição geográfica na região Sul e Sudeste do Brasil (**Figura 6** – Pág. 40) (FLORA DO BRASIL, 2018).



Figura 6 – Espécie *Baccharis junciformis*.

Fonte: HEIDEN, 2014.

Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

A composição química dessa espécie é pouco conhecida, apenas dois estudos químicos destacando a presença de ácidos fenólicos em *B. junciformis* (sinonímia *B. usterii*) e predominância de espatulenol e globulol em seu óleo essencial são descritos (SIMOES-PIRES et al., 2005a). As atividades biológicas mencionadas

a essa espécie são sua ação antioxidante (OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2014) e bactericida (OLIVEIRA et al., 2005).

1.1.3 *Baccharis milleflora* (Less.) DC.

Baccharis milleflora (Less.) DC. (sinonímias: *Molina milleflora* Less., *Baccharis genistelloides* var. *milleflora* (Less.) Baker) possui distribuição geográfica na região Sudeste e Sul do Brasil e frequentemente forma populações densas em áreas abertas e ensolaradas, onde é popularmente conhecida como “carqueja” e “carqueja-do-lajeado” (**Figura 7** – Pág. 41) (HEIDEN et al., 2009).



Figura 7 – Espécie *Baccharis milleflora*.

Fonte: HEIDEN, 2014.

Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

Esta espécie é utilizada na medicina popular como diurético, anti-inflamatório e no tratamento de problemas intestinais (HEIDEN et al., 2009). Os estudos envolvendo *B. milleflora* se restringem a revisões taxonômicas, a composição química e atividade biológica do óleo essencial (AGOSTINI et al., 2005; HEIDEN et al., 2009; SCHNEIDER, 2009; TROBIM-SOUZA et al., 2017, PEREIRA et al., 2017).

Quimicamente, estudos prévios do óleo essencial de *B. milleflora* tem mostrado que os metabólitos β -pineno, espatulenol (AGOSTINI et al., 2005), γ -

gurjuneno, α -selineno e β -cariofileno como principais compostos (SIMÕES-PIRES et al., 2005a). Recentemente, os compostos limoneno e viridiflorol têm sido relatados como compostos majoritários (**Tabela 1, Figura 3** – Pág. 32-35, 37) (TROBIM-SOUZA et al., 2017). Biologicamente, a atividade citotóxica do óleo essencial de *B. milleflora* tem sido destacada (PEREIRA et al., 2017).

1.1.4 *Baccharis myriocephala* (Less.) DC.

A espécie *Baccharis myriocephala* (Less.) DC. apresenta como sinonímia a espécie *Baccharis genistelloides* var. *myriocephala* Baker ex G.M.Barroso. (**Figura 8** – Pág. 42) (FLORA DO BRASIL, 2018).



Figura 8 – Espécie *Baccharis myriocephala*.

Fonte: HEIDEN, 2014.

Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

Esta espécie apresenta ampla distribuição no leste da América do Sul, ocorrendo no Paraguai, Brasil e Argentina. No Brasil, ocorre nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, nos biomas da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa (HEIDEN et al., 2012). As pesquisas envolvendo *B. myriocephala* estão limitadas a composição química do óleo essencial, apresentando globulol e epiglobulol (SIMOES-PIRES et al.,

2005a), limoneno e β -pineno como compostos majoritários (**Tabela 1, Figura 3** – Pág. 32-35, 37) (TROBIM-SOUZA et al., 2017).

1.1.5 *Baccharis trimera* (Less.) DC.

A espécie *Baccharis trimera* (Less.) DC. corresponde a uma das sinonímias de *B. crispa* (sinonímias: *Baccharis genistelloides* var. *crispa* (Spreng.) Baker, *Molina crispa* (Spreng.) Less., *Pingraea crispa* (Spreng.) F.H.Hellw., *Baccharis cylindrica* (Less.) DC., *Baccharis genistelloides* var. *cylindrica* (Less.) Baker, *Baccharis genistelloides* var. *myriocephala* Baker ex G.M.Barroso, *Baccharis genistelloides* var. *trimera* (Less.) DC., *Baccharis subcrispa* Malag., *Baccharis trimera* var. *carqueja* DC., *Baccharis triptera* Mart., *Molina trimera* Less., *Baccharis genistelloides* subsp. *crispa* (Spreng.) Joch.Müll.) (**Figura 9** – Pág. 43). De modo geral, *Baccharis crispa* é frequentemente referida pelos sinônimos *B. trimera* ou *B. cylindrica*. Sua ocorrência tem sido registrada nas regiões Sudeste, Sul e Nordeste do Brasil, assim como *B. myriocephala* (HEIDEN et al., 2012; FLORA DO BRASIL, 2018).



Figura 9 – Espécie *Baccharis trimera*.

Fonte: HEIDEN, 2014.

Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>

Além disso, esta espécie é geralmente confundida com *B. myriocephala*, táxon próximo morfológicamente e comumente tratado sob o nome *B. trimera*. Estes

táxons podem ocorrer em simpatria (espécies ou populações que ocorrem na mesma área geográfica), porém ocupando nichos ecológicos distintos. A espécie *B. crispa* é um subarbusto heliófilo e exclusivo de vegetação campestre, enquanto *B. myriocephala* ocorre preferencialmente como um arbusto apoiante, às vezes epífita (plantas que vivem sobre plantas, mas não possuem hábitos parasitas, não retirando nutrientes daquela que lhe fornece apoio), em bordas e interior de matas, ou em encostas úmidas e sombreadas, e quando raramente ocorre em áreas abertas e ensolaradas apresenta-se como subarbusto, com ramos decumbentes (ramos inclinados ao solo com o ápice ou extremidade levantados) (HEIDEN et al., 2012).

É popularmente conhecida como “carqueja”, “carqueja amarga” e “carqueja-amargosa”. No Brasil, esta espécie é utilizada no tratamento de diabetes, doenças inflamatórias e hepáticas (ABAD; BERMEJO, 2007). Diversos trabalhos científicos atribuem ação biológica a *B. trimera*, como atividades anti-inflamatória (NOGUEIRA et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2012), antioxidante (PADUA et al., 2010; SABIR et al., 2017), anti-hepatotóxica (SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987), gastroprotetora (BIONDO et al., 2011), entre outras.

Devido a estes usos medicinais, *B. trimera* foi incluída na 5ª Farmacopeia Brasileira, indicada como antidiarréico, e na RENISUS. Na Argentina, as “carquejas” também são reconhecidas pela 6ª Farmacopeia Argentina por suas propriedades medicinais, principalmente *B. crispa* e *B. articulata*, que são empregadas e comercializadas indistintamente como *B. trimera* na medicina tradicional (RODRIGUEZ et al., 2013).

A identificação de *B. trimera* é baseada na presença de flavonoides (quercetina e 3-O-metilquercetina), os quais podem ser facilmente adicionados ao material vegetal (ANVISA, 2010). Dessa forma, métodos direcionados a avaliar a autenticidade desta planta medicinal são de suma importância, pois podem contribuir para o controle de qualidade dessa erva medicinal.

A composição química dessa espécie foi extensivamente estudada por vários autores. Os principais compostos identificados são: mono e sesquiterpenos no óleo essencial (SIMÕES-PIRES et al., 2005a; MINTEGUIAGA et al., 2015; TROBIM-SOUZA et al., 2017; MINTEGUIAGA et al., 2018), flavonoides (SUSTTIRI et al 1994; TORRES et al., 2000; GIANELLO et al., 2000), ácidos fenólicos (SIMÕES-PIRES et al., 2005; ABOY et al., 2012; SABIR et al., 2017), saponinas (GENE et al., 1992) e

diterpenos (**Tabela 1, Figuras 2, 3 e 4** – Pág. 32-38) (GIANELLO et al., 2000; GARCIA et al., 2014).

Simões-Pires et al. (2005a) investigaram a composição do óleo essencial de oito espécies de *Baccharis* da seção *Caulopterae* (*B. articulata*, *B. crispa*, *B. microcephala*, *B. milleflora*, *B. myriocephala*, *B. stenocephala*, *B. trimera* e *B. usterii*), observando diferenças na composição química, tanto pela localização geográfica quanto pela sazonalidade. Os autores observaram a predominância de sesquiterpenos, bem como, a existência de diferenças químicas entre as espécies *B. crispa* e *B. trimera* pela presença do acetato de carquejila na segunda espécie (em torno de 35,5 a 68,0%). Este composto mostrou-se ausente em outras espécies de *Baccharis*, sendo por isso considerado marcador químico de *B. trimera*, uma vez que foi encontrado em todos os exemplares dessa espécie, independentemente da região que havia sido coletada (SIMÕES-PIRES et al., 2005a). Entretanto, este composto foi observado no óleo essencial de *Eupatorium buniifolium* Hooker et Arnott (Asteraceae) (LORENZO et al., 2005).

Da mesma forma que Simões-Pires et al. (2005a), Trobim-Souza et al. (2017) identificaram o acetato de carquejila somente em *B. trimera* ao investigar a composição química do óleo essencial de 10 espécies de *Baccharis* provenientes do estado do Paraná, realizando um estudo comparativo através da análise multivariada. Os autores reportaram o monoterpene limomeno como principal constituinte em todas as espécies. A análise de componentes principais dos cromatogramas obtido por GC-MS revelou alta similaridade entre *B. calvescens*, *B. myriocephala*, *B. trimera*, *B. milleflora*, *B. anomala*, *B. oblongifolia*, *B. articulata* e *B. uncinella*.

Uma breve revisão acerca do gênero permitiu evidenciar a existência de diversas sinonímias para uma mesma espécie, resultando em grande controvérsia e dificuldade de classificação botânica de espécies da seção *Caulopterae*. Além disso, observou-se a inexistência de estudos químicos recentes relacionados ao perfil químico ou até mesmo escassos, como por exemplo em *B. milleflora*, *B. myriocephala* e *B. junciformis*. Nesse sentido, as espécies do *Baccharis* necessitam ser mais estudadas cientificamente, considerando sua importância do ponto de vista químico, medicinal e econômico.

A atividade biológica de plantas pode estar associada ao efeito sinérgico entre os compostos existentes no material vegetal e não somente a um marcador químico. Desta forma, estudos baseados em perfis espectrais podem ser uma alternativa mais

eficiente para o controle de qualidade de *B. trimera*. É importante ressaltar que a maioria dos trabalhos envolvendo espécies de *Baccharis* empregam métodos clássicos de isolamento e identificação de substâncias em que são necessários preparo de amostra laborioso, grandes quantidades de solventes e material botânico.

Assim, o desenvolvimento de metodologias mais simples e rápidas direcionadas a avaliação da autenticidade poderia auxiliar no controle de qualidade de *B. trimera*, bem como, contribuir para a quimiotaxonomia do gênero *Baccharis* ampliando o conhecimento químico das espécies estudadas, além de fornecer subsídios em futuros estudos fitoquímicos. Nesse sentido, as técnicas espectroscópicas têm desempenhado importante contribuição em estudos direcionados a autenticidade e controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos.

1.2 RMN NO CONTROLE DE QUALIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS

Os perfis espectrais têm se tornado indispensáveis para avaliar a autenticidade de plantas medicinais, uma vez que, as propriedades biológicas são atribuídas ao efeito sinérgico de vários metabólitos existentes em sua composição, não restringindo somente a marcadores químicos. Nesse sentido, a busca de técnicas rápidas e metodologias modernas de obtenção do perfil químico de forma reprodutível, empregando métodos simples de preparo de amostra tem desempenhado um importante papel no controle de qualidade e autenticidade de plantas medicinais.

Dentre as alternativas para avaliar a autenticidade, bem como o controle de qualidade de plantas medicinais, estão sendo empregadas a espectroscopia na região do infravermelho (ABDULLAH et al., 2012; CHEN et al., 2015; QU et al., 2017, LOURENÇO, 2017) e região do ultravioleta (GAD et al., 2013; BITTNER et al., 2016), cromatografia líquida de alta eficiência (WANG et al., 2012; HE et al., 2015; RACLARIU et al., 2017), e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (ALIAKBARZADEH et al., 2016; ANDRADE et al., 2018), assim como métodos de análise multivariada associados as técnicas analíticas (GAD et al., 2013; SERESHTI et al., 2018; MONAKHOVA et al., 2018).

Além das técnicas analíticas mencionadas anteriormente, a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta com grande potencial na avaliação de autenticidade de diversas matrizes, uma vez que permite a análise de amostras de alta complexidade sem necessidade de isolamento de substâncias, tratando-se de uma técnica não destrutiva, que não necessita de métodos elaborados de preparo de amostra (FOTAKIS; SERVOU, 2016; KILLNER et al., 2017; RIBEIRO et al., 2017; KUBALLA et al., 2018).

No que se refere a autenticidade e controle de qualidade de plantas medicinais, Nguyen et al. (2016) utilizaram a RMN aliada à quimiometria para avaliar a autenticidade de *Panax ginseng* de diferentes origens geográficas, assim como misturas intencionais dessa planta medicinal de regiões da Coreia e da China. Os autores observaram que os compostos ácido glutárico, ácido málico, ácido succínico, colina, glicose e sacarose são altamente expressivos em amostras proveniente da Coreia, enquanto a glutamina é abundante em amostras da China. A análise das misturas intencionais revelou que as amostras apresentaram uma separação satisfatória de acordo com a proporção da mistura através de análises multivariadas OPLS-DA, consideradas promissoras no controle de qualidade de plantas medicinais, bem como, na detecção de possíveis falsificações (NGUYEN et al., 2016).

Da mesma forma, Zhao et al. (2015) utilizaram a RMN de ^1H combinada com a análise de componentes principais (PCA) propondo um método para o controle de qualidade do ginseng asiático e do ginseng americano cultivado e selvagem. Os autores observaram diferenças significativas na concentração dos metabólitos arginina, colina, 2-oxoglutarato e malato entre os ginsengs americano e asiático. Por sua vez, um menor teor de glutamato foi observado em cultivares de ginseng americano selvagem, enquanto o ginseng americano cultivado apresentou uma maior concentração de ginsenólídeo que o ginseng asiático. Dessa forma, a eficácia do uso de RMN de ^1H com PCA permitiu a diferenciação de tipos de ginseng revelando metabólitos-chave, bem como, o desenvolvimento de um protocolo padrão para controle de qualidade de ginseng americano selvagem e cultivado e ginseng asiático (ZHAO et al., 2015).

Em outro estudo, Preto et al. (2013) empregaram RMN de Baixo campo para determinar a autenticidade da planta medicinal *Maytenus ilicifolia* obtidas de diferentes produtores comerciais. Os resultados obtidos por RMN de baixo campo juntamente com a caracterização por análises termogravimétricas, espectroscopia de

infravermelho e RMN de solução revelaram similaridades entre o controle e apenas uma das amostras investigadas. Os autores constataram que as diferenças detectadas entre as amostras poderiam estar relacionadas à sua não autenticidade, devido ao não reconhecimento da planta e à similaridade de folhas entre plantas da mesma família e/ou contaminação em virtude da adição de outras partes de plantas semelhantes às comerciais.

Santos et al. (2012) obtiveram sucesso em diferenciar espécies de *Phyllanthus* por análises de PCA e HCA de dados obtidos de espectroscopia de Infravermelho, RMN HR-MAS de ^1H e RMN em solução. Segundo os autores, os modelos utilizando os métodos KNM, SIMCA e PLS-DA apresentaram boa confiabilidade. Entretanto, apesar de modelos confiáveis, os resultados observados para as amostras comerciais foram divergentes entre os métodos de classificação, onde os autores sugeriram que as amostras podem não pertencer a espécies estudadas no trabalho.

1.2.1 RMN HR-MAS E SUAS APLICAÇÕES

A RMN em solução corresponde a metodologia mais utilizada em análises rotineiras. No entanto, desvantagens são observadas no que se refere a quantidade de amostra necessária para alcançar uma boa relação sinal-ruído, aumento do tempo de análise e custo, assim como, a necessidade de extração de seus constituintes, que pode levar a perda de informação sobre o estado natural da amostra (SANTOS et al., 2015; SOUZA et al., 2016).

Nesse contexto, a RMN de alta resolução com giro no ângulo mágico (HR-MAS: *High Resolution Magic Angle Spinning*) surge como uma alternativa para superar esses inconvenientes, uma vez que permite obter um “*fingerprint*” da matriz, requerendo o mínimo de pré-tratamento das amostras, além de ser um método direto e não invasivo. Além disso, a RMN HR-MAS permite obter informações sobre os metabólitos em um único espectro sem a necessidade de isolamento das substâncias, minimizando extrações e eventuais decomposições e/ou alterações químicas que possam ocorrer durante o processo de extração química (SOUZA et al., 2016).

A obtenção de informações espectrais em amostras sólidas ou semissólidas é limitada ao empregar sondas convencionais devido ao alargamento dos sinais ocasionados pelo deslocamento químico anisotrópico, acoplamento dipolar e diferenças na susceptibilidade magnética em regiões diferentes da amostra, uma vez que estes materiais apresentam movimento molecular restrito (LIÃO et al., 2010).

Nesse sentido, a RMN HR-MAS emergiu como uma alternativa no estudo de amostras heterogêneas ou “semissólidas”, combinando as vantagens de RMN no estado sólido e em solução, no que se refere a simplicidade da preparação da amostra como ocorre em RMN de sólidos e resolução similar à de líquidos (SANTOS et al., 2015). Os princípios da técnica de RMN HR-MAS tem sido extensivamente discutido por diversos pesquisadores (BECKONERT et al., 2010; FAROOQ et al., 2013).

O sistema de giro a altas velocidades no ângulo mágico (MAS) permite suprimir as interações dipolares, deslocamento químico anisotrópico e diferenças de susceptibilidade magnética existente na interface entre amostras sólidas e líquidas. Estas interações são descritas em um hamiltoniano que apresenta dependência angular de $(3\cos^2\alpha - 1)/2$, onde α é o ângulo entre o campo magnético estático e o vetor internuclear responsáveis pelas interações (MAZZEI; PICCOLO, 2017). Assim, quando a amostra é girada em torno de um eixo inclinado a $54,74^\circ$ em relação ao campo magnético principal (B_0), todos os fatores que causam o alargamento dos sinais no espectro tendem a ser anulados (**Figura 10** – Pág. 49). Por isso este ângulo é denominado “ângulo mágico” (BECKONERT et al., 2010; ALAM; JENKINS, 2012; FAROOQ et al., 2013; MAZZEI; PICCOLO, 2017).

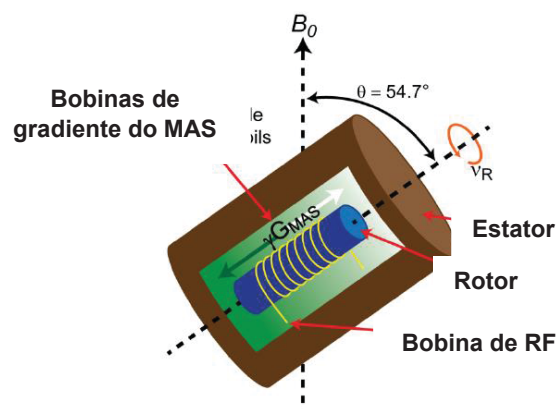


Figura 10 – Esquema de um estator de HR-MAS com gradiente no ângulo mágico ao longo do rotor.

Fonte: Adaptado de ALAM; JENKINS, 2012.

Assim como a RMN em solução, a RMN HR-MAS apresenta alta sensibilidade, pois permite adquirir espectros de RMN de ^1H de compostos presentes em poucos miligramas de amostra e a realização de experimentos bidimensionais convencionais (BECKONERT et al., 2010). Em contraste com a RMN de sólidos, a RMN HR-MAS não requer sequências especiais ou emprego de potências elevadas em seus pulsos (CHOZE et al., 2013).

Devido às vantagens observadas anteriormente, a RMN HR-MAS tem sido empregada em diversos estudos. É observada na literatura a aplicação da RMN HR-MAS em análises de tecidos animais (ALVES et al., 2015), variações metabólicas de plantas ocasionadas por vírus e bactérias (SIDHU et al., 2010; SILVA et al., 2012), perfis de cultivares de feijões (LIÃO et al., 2010; CHOZE et al., 2013), alimentos (CORSARO et al., 2015, SANTOS et al., 2015; SANTOS et al., 2018), em moléculas de grande massa molecular (GIL et al., 1997; BROBERG et al., 1998; WEYBRIGHT et al., 1998; BROBERG;KENNE, 2000), caracterização de nanopartículas (HENOUMONT et al., 2015). Além disso, esta técnica representa uma ferramenta poderosa quando aliada a outras técnicas de RMN, bem como, quando associada à análises quimiométricas (GIL et al., 2000; CHIN et al., 2000).

Em se tratando de controle de qualidade, Daolio et al. (2008) empregaram RMN HR-MAS, RMN em solução e HPLC aliados às análises quimiométricas na classificação botânica de *Anemopaegma arvense* ou *Trichilia catigua*, e amostras comerciais de catuaba. Os autores constataram que as indústrias de fitoterápicos no Brasil não empregam as raízes de *A. arvense* para comercializar o fitoterápico Catuaba, como recomendado pela Farmacopeia Brasileira, mas sim as cascas de *T. catigua*. Além disso, a RMN HR-MAS se mostrou eficiente em discriminar amostras com base em sua matéria-prima, bem como a importância de considerar o regionalismo das amostras. Da mesma forma, a RMN HR-MAS se mostrou eficiente em avaliar a autenticidade de espécies de *Phyllanthus* (SANTOS et al., 2012).

Flores et al. (2018) aplicaram a RMN HR-MAS de ^1H aliada às análises quimiométricas na investigação quimiotaxonômica de variedades de *Hancornia speciosa* (Apocynaceae). Os autores observaram que as folhas de *H. speciosa* var. *pubescens* são discriminadas das outras variedades devido à alta concentração de compostos fenólicos, enquanto *H. speciosa* var. *cuyabensis* apresentam características químicas similares a *H. speciosa* var. *gardineri* e *H. speciosa* var. *speciosa*. As duas últimas variedades foram diferenciadas pela presença de

hidrocarbonetos e carboidratos. Da mesma forma, Alcântara et al. (2007) utilizaram a RMN HR-MAS e espectroscopia de infravermelho associados a análises quimiométricas visando discriminar espécies de líquens com base na composição química, cujos carboidratos foram os principais responsáveis por sua distinção.

Jégou et al. (2010) empregaram a RMN HR-MAS de ^1H e LC/ESI-MS para discriminar 5 espécies do gênero *Cystoseira*. Os autores observaram que *C. baccata*, *C. nodicaulis* e *C. tamariscifolia* são quimicamente diferentes entre si, ao contrário de *C. foeniculacea* e *C. humilis*. Por sua vez, Bharti et al. (2011) utilizaram a RMN HR-MAS aliada a métodos quimiométricos para avaliar as variações de metabólitos primários de 4 quimiotipos de *Withania somnifera*, o que permitiu a identificação de 41 metabólitos nas folhas e raízes dos quimiotipos. Além disso, a análise de componentes principais revelou variações nos metabólitos primários entre os quimiotipos. Tais estudos comprovam que a RMN HR-MAS é um método eficiente podendo ser utilizado para análise de metabólitos primários e secundários em plantas importantes medicinalmente.

Diante do exposto, o perfil espectral obtido por RMN HR-MAS de ^1H poderia ser empregado na autenticidade de *B. trimera* auxiliando no controle de qualidade dessa planta medicinal, mostrando um perfil químico mais informativo em comparação com o controle de qualidade baseado em marcadores químicos. Dessa forma, este trabalho visa o emprego da RMN HR-MAS aliada a métodos quimiométricos na determinação da autenticidade da *B. trimera* propondo uma metodologia que possa atuar no controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos. Os resultados obtidos através desse estudo podem auxiliar na correta identificação botânica e discriminação de espécies similares morfológicamente, contribuindo na resolução de problemas taxonômicos.

1.3 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

A quimiometria envolve a aplicação de métodos matemáticos e estatísticos visando a resolução de dados de origem química. Além disso, possui a vantagem de analisar dados multivariados simultaneamente, reduzindo sua dimensionalidade sem

perda de informações relevantes sobre o conjunto de dados, obtendo o máximo de informação sobre o sistema.

Os métodos quimiométricos podem ser aplicados na análise multivariada de dados qualitativos e quantitativos, utilizando métodos de análise exploratória dos dados, calibração e reconhecimento de padrões, respectivamente. É inquestionável a importância da quimiometria na análise de dados espectrométricos e espectroscópicos em estudos direcionados à autenticidade e controle de qualidade de plantas medicinais (HUANG et al., 2016; MA et al., 2017; SERESHTI et al., 2018; SHI et al., 2018).

As análises quimiométricas são baseadas em métodos supervisionados e não supervisionados. Os métodos supervisionados são geralmente utilizados para classificação de amostras. Nesses, cada amostra analisada provém de uma classe pré-estabelecida e esta informação é utilizada durante a análise dos dados e na construção dos modelos de classificação. Os métodos supervisionados principalmente empregados em análises quimiométricas são Análise Discriminante Linear (LDA), Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classes (SIMCA) e Análise Discriminante pelo Método de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) (MCKENZIE et al., 2011).

Por sua vez, os métodos não supervisionados são utilizados para verificar a inter-relação entre as amostras. Eles não requerem nenhum conhecimento prévio a respeito da origem das amostras, ou seja, dividem o espaço dos dados em grupos sem qualquer conjunto de treinamento predefinido (MCKENZIE et al., 2011; BRERETON, 2015; FERREIRA, 2015). Os métodos comumente utilizados envolvem Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA).

Anteriormente à análise quimiométrica, pré-tratamentos nas matrizes de dados podem ser necessários visando facilitar a análise dos dados. Os pré-tratamentos transformam os dados de modo que sejam mais comparáveis, reduzindo variações indesejáveis que podem influenciar nos resultados. O primeiro pré-tratamento (denominado transformação) é realizado sobre os dados de cada uma das amostras, enquanto o segundo é aplicado sobre as variáveis (no caso da RMN, os deslocamentos químicos), sendo conhecido como pré-processamento.

As principais transformações observadas em espectros de RMN envolvem normalização e correção da linha de base que podem ser realizadas de forma manual

ou automática. Os pré-processamentos envolvem dados não escalados (dados centrados na média), escalamento por unidade de variância (autoescalamento) ou escalamento por Pareto, entre outros. Tais transformações possuem finalidades específicas e dependem da matriz investigada, de modo a obter melhores resultados (SMOLINSKA et al., 2012; FERREIRA, 2015).

1.3.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é um método de análise multivariada largamente utilizado, cujo objetivo é reduzir a dimensionalidade dos dados originais sem perdas de informações relevantes sobre as amostras (XIAO et al., 2017). A vantagem desta redução é a possibilidade de visualizar a distribuição espacial das amostras, influenciada pelas variáveis originais, em gráficos bi e tridimensionais. Para efetuar tal redução, sem perda de informações, a matriz original passa a ser representada por novas variáveis, agora ortogonais entre si e direcionadas em função da distribuição espacial dos dados. Na PCA, esse novo conjunto de variáveis ou componentes principais (PCs) corresponde a uma combinação linear das variáveis originais (BALLABIO, 2015; FERREIRA, 2015).

A conversão do conjunto de dados originais em componentes principais resulta em duas matrizes conhecidas como *scores* e *loadings*. Os *scores* são as projeções das amostras na direção da componente principal. Quando representados na forma de gráfico, cada ponto está associado a uma única amostra e a inter-relação dela com as demais amostras é evidenciada através de seu agrupamento ou não (MCKENZIE et al., 2011; SMOLINSKA et al., 2012; FERREIRA, 2015).

Por sua vez, os *loadings* representam os cossenos dos ângulos formados entre a componente principal e cada variável. Dessa forma, o *loadings* descreve como as variáveis antigas combinam-se linearmente para gerar novas PCs, indicando quais variáveis são responsáveis pela relação observada no *scores*. Por isso, as direções ressaltadas no gráfico de *scores* correspondem a mesma direção observada no gráfico de *loadings* (MCKENZIE et al., 2011; SMOLINSKA et al., 2012; FERREIRA, 2015). Em suma, a análise de componentes principais é um método que tem por

finalidade básica, a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais.

A PCA aplicada a RMN pode apresentar um inconveniente relacionado ao desalinhamento de sinais ocasionados por variações na frequência de Larmor das substâncias nas amostras. Este desalinhamento de sinais surge devido a variações em pH, temperatura, diferenças de susceptibilidade magnética da amostra e questões instrumentais. Nesse sentido, alguns métodos estão sendo desenvolvidos visando suplantam essa problemática. Um destes métodos de correção é conhecido como *binning* ou *bucketing* que além de contornar problemas de alinhamento também filtra ruídos (SOUSA; MAGALHÃES; FERREIRA, 2013; WORLEY; POWERS, 2014; FERREIRA, 2015).

As análises quimiométricas em associação a técnicas espectroscópicas oferecem uma abordagem inovadora em estudos de controle de qualidade e discriminação de plantas similares morfológicamente. A espectroscopia de ultravioleta-visível, assim como HPLC, combinadas com métodos quimiométricos (PCA, SIMCA e KNN) foi eficiente na discriminação e classificação correta das partes aéreas das espécies *Baccharis* (*B. genistelloides*, *B. milleflora* e *B. articulata*) (LONNI et al., 2003; LONNI et al., 2005).

Segundo Pan et al. (2015), o perfil espectral obtido por RMN aliada a quimiometria (PCA e HCA) permitiu distinguir *Lamiophlomis rotata* proveniente de diferentes origens geográficas chinesas. Os autores observaram que as amostras originárias de Gansu, Tibet e Qinghai são diferenciadas pela alta concentração de iridoides glicosilados, fenilpropanoides glicosilados, luteolina-7-O-glicosídeo e ácido palmítico. Por sua vez, RMN associada a PCA e PLS-DA possibilitou a diferenciação e classificação de espécies de *Crataegus* spp. (*C. okanaganensis*, *C. douglasii*, *C. monogyna* e *C. laevigata*) através da região de compostos fenólicos (LUND et al., 2017).

A RMN aliada à PCA e LDA foram empregados na discriminação de variedades de uvas de vinhos tinto (Cabernet Sauvignon, Mel de Rosas, Cabernet Gernischt) e branco chineses (Ugni Blanc, Long Yan, Chardonnay), destacando-a como ferramenta eficaz para avaliar a autenticidade de vinhos chineses (FAN et al., 2018). Por sua vez, Farag et al. (2018) utilizaram a RMN quantitativo associado a análises quimiométricas (PCA e OPLS-DA) para diferenciar duas espécies de canela, *Cinnamomum verum* e *Cinnamomum cassia* utilizadas largamente em produtos

alimentícios. A RMN associada a análise multivariada revelou a presença do eugenol em *C. verum* enquanto *C. cassia* é rica em ácidos graxos, sugerindo ainda que o eugenol pode ser utilizado como marcador para autenticação do extrato de *C. verum* (FARAG et al., 2018).

Esses achados demonstram o potencial das ferramentas quimiométricas em estudos de discriminação e autenticidade quando combinadas com a metodologia analítica adequada.

1.3.2 Análise Discriminante pelo Método de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA)

A Análise Discriminante pelo Método de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) é um método multivariado de classificação supervisionado mais utilizado e corresponde a uma variante do método de regressão, conhecido como PLS (WOLD et al., 2001; SMOLINSKA et al., 2012). Similarmente ao PCA, visa encontrar variáveis latentes no subespaço multivariado de forma a discriminar as classes do conjunto amostral usando o modelo de mínimos quadrados parciais (PLS).

O PLS encontra relações fundamentais entre as matrizes X (matriz preditora) e Y (matriz resposta) para modelar a covariância no espaço dessas matrizes por meio das variáveis latentes. Na PLS-DA, o termo componente principal é substituído por variáveis latentes (LVs). Após a construção do conjunto amostral, deve-se definir o pré-processamento adequado, o número de variáveis latentes apropriado, a avaliação da existência de *outliers*. O número de variáveis latentes é realizado utilizando o método de validação cruzada (*cross validation*) em que se determina o erro mínimo de previsão.

A detecção de amostras anômalas (*outliers*) é um fator importante, pois a presença dessas amostras no conjunto de calibração pode fornecer modelos com baixa capacidade de previsão. Através do gráfico de *leverage versus* resíduos de *Student* é possível determinar anomalias. Os valores de *leverage* são obtidos por meio da equação $3xVL/n$, onde n é o número de amostras utilizadas no conjunto de calibração. Os valores de *leverage* correspondem a uma medida da influência de uma amostra no modelo de regressão. Dessa forma, podemos dizer que uma amostra tem

pequena ou grande influência no desenvolvimento do modelo, caso ela possua baixo e altos valores de *leverage*, respectivamente.

Por outro lado, os Resíduos de *Student* correspondem aos desvios entre os dados de referência e os estimados pelo modelo que são definidos em unidades de desvio padrão do valor médio. Desta forma, amostras que apresentam altos valores de *leverage* e Resíduos de *Student* são consideradas anômalas, devendo ser retirada do modelo após inspeção visual. Além disso, a avaliação de previsão do modelo em classificar amostras desconhecidas é feita por meio do cálculo da raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (RMSECV, *Root Mean Squares Error of Cross Validation*) e da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP, *Root Mean Squares Error of Prediction*).

Após a construção e validação do modelo, a etapa de validação externa pode ser realizada. Na validação externa, as amostras de referência que não participaram do conjunto de calibração são empregadas no teste de previsão do modelo. Este teste é importante para avaliar a qualidade e sensibilidade do modelo na previsão de amostras externas ao conjunto de calibração para então ser utilizado na previsão de amostras desconhecidas, caso o modelo seja satisfatório.

Nesse caso, similarmente ao PLS, a matriz Y descreve a classe das amostras através de valores previstos para o modelo que descrevem aproximações entre as classes, cujo valor limite (*threshold*) tem o propósito de separar a classe à qual as amostras a serem modeladas pertencem (RIBEIRO et al., 2010). Por exemplo, uma matriz Y formada por duas classes (0 e 1) apresenta somente um valor de *threshold* que foi calculado a partir do Y previsto para o modelo. Dessa forma, as amostras que apresentarem um valor previsto abaixo desse *threshold*, será considerada como pertencente a classe 0, enquanto as amostras cujos valores estiverem acima do *threshold* pertencem a classe 1.

O uso da RMN associada a abordagens quimiométricas mostrou-se importante na determinação de variedades de vários medicamentos fitoterápicos, como catuaba e outros produtos farmacêuticos derivados de plantas das famílias *Glycyrrhiza* e *Coptis* (DAOLIO et al., 2008; FAN et al., 2012; KAZI et al., 2013). Por exemplo, o perfil químico de duas ervas próximas taxonomicamente (*Harpagophytum procumbens* (Pedaliaceae) e *Harpagophytum zeyheri*) obtidos por meio de duas técnicas complementares, UHPLC-MS e RMN de ^1H associados a análise multivariada revelou variações significativas entre as espécies por OPLS-DA,

mostrando que as duas espécies não são quimicamente e terapeuticamente equivalentes. Dessa forma, os autores sugeriram que essas espécies não devem ser empregadas para o mesmo propósito, contrariando a afirmação da Farmacopeia Britânica (MNCWANGI et al., 2014).

Por outro lado, Lourenço (2017) utilizou espectroscopia de infravermelho médio e próximo aliada a quimiometria visando discriminar espécies de *Baccharis* (*B. trimera*, *B. myriocephala*, *B. articulata*, *B. milleflora* e *B. junciformis*). Segundo o autor, foi observada uma discriminação entre as espécies *B. articulata*, *B. milleflora* e *B. junciformis*, enquanto as espécies *B. trimera* e *B. myriocephala* apresentaram uma separação parcial, resultando em modelos de classificação (PLS-DA) eficientes na previsão de *Baccharis* durante a validação externa.

A possibilidade de detectar adulterações em plantas por RMN combinada com quimiometria foi mostrada por Petrakis et al. (2015; 2017). Consonni et al. (2016) mostraram a aplicabilidade do infravermelho e RMN, combinado com PLS-DA na investigação da rastreabilidade do açafraão.

1.3.3. Modelagem Independente e Flexível por Analogia de Classes (SIMCA)

O método SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) foi introduzido por Svante Wold em 1970 e consistiu no primeiro pacote computacional quimiométrico desenvolvido para análise supervisionada de reconhecimento de padrões, inicialmente direcionado a análise de dados numéricos de duas espécies de flores (*Iris setosa* e *Iris versicolor*), cuja finalidade consistiu na resolução de problemas taxonômicos (WOLD, 1976).

O SIMCA é construído baseando-se no ajuste do modelo de componentes principais, dando uma origem a um classificador para cada uma das classes do conjunto de treinamento (FERREIRA, 2015). Dessa forma, um número independente de componentes principais para cada classe é definido e a modelagem SIMCA é obtida através da fronteira entre cada modelagem PCA. Consequentemente, hipercaixas com tantas dimensões quantas forem o número de PCs mais adequados para cada classe obtida são construídas, onde os limites das mesmas são definidos com um dado nível de confiança (BALABIN et al., 2010; DAVIS et al., 2015;

FERREIRA, 2015). Assim, o modelo resultante descreve uma linha, um plano ou hiperplano para cada classe.

Além disso, a distância ortogonal média do conjunto de treinamento a partir de uma linha, plano ou hiperplano para cada classe é calculada como um desvio padrão residual para determinar a distância crítica para classificação. As novas observações são projetadas em cada modelo de componente principal e a distância residual é calculada (BYLESJÖ et al., 2006; DAVIS et al., 2015; FERREIRA, 2015)

Uma vez definidas as hipercaixas, é importante verificar se existem classes com sobreposição, pois o poder de discriminação dos modelos SIMCA é baseado na inexistência de sobreposição entre duas classes diferentes, bem como na maior distância entre as classes. As amostras externas são classificadas empregando a modelagem SIMCA, baseando-se nas diferentes projeções possíveis no espaço dos escores, avaliando se a amostra se encontra dentro da fronteira definida para a respectiva classe em todas as projeções obtidas (DAVIS et al., 2015; FERREIRA, 2015).

O SIMCA fornece três possíveis respostas de previsão, dentre as quais pode-se salientar: (1) classificação da amostra em uma classe pré-definida, (2) a amostra pode se enquadrar em mais de uma classe ou (3) não se enquadrar em nenhuma das classes existentes. Quando uma previsão é realizada com o SIMCA, as amostras distantes do espaço da componente principal de uma determinada classe são consideradas como não pertencentes a aquela classe.

O SIMCA tem sido empregado em diversos estudos envolvendo discriminação de espécies. Wohlmeister et al. (2017) utilizaram infravermelho associado a PCA e SIMCA na diferenciação de espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*). Os autores observaram diferenças espectrais entre as espécies de *Candida* adequadas para a discriminação na PCA, enquanto a modelagem SIMCA permitiu a classificação das amostras de forma correta e inequívoca, permitindo identificar amostras de *Candida* com objetivo de melhorar as aplicações clínicas desta técnica.

Da mesma forma, Duca et al. (2016) empregaram a espectroscopia no infravermelho associado à SIMCA na discriminação entre madeira dura e macia, cujos resultados permitiram classificar corretamente 93 e 100% das amostras em madeira dura e macia, respectivamente. A análise de misturas revelou que 100% destas foram associadas a nenhuma classe, mostrando a capacidade de discriminação da técnica em reconhecer misturas no material. Segundo os autores, este método poderia ser

útil para verificar a conformidade das declarações do produtor sobre tipo e origem da madeira (DUCA et al., 2016).

Em outro estudo, amostras de *Lens culinaris* Medik. da Itália e do Canadá foram discriminadas pela origem geográfica através do *fingerprint* obtido por RMN de ^1H associado a quimiometria (SIMCA, k-NN, PCA-LDA e PLS-DA), cujos melhores resultados foram obtidos com modelo PCA-LDA, enquanto aqueles obtidos empregando o SIMCA não foram satisfatórios, sugerindo que a última abordagem não é adequada para o trabalho. As amostras canadenses são vendidas fraudulentamente como italianas, fraude comumente observada em relação às lentilhas italianas. (LONGOBARDI et al., 2017).

O uso de métodos quimiométricos visando o controle de qualidade de fitoterápicos é baseado principalmente em marcadores químicos que podem fornecer informações insuficientes sobre a erva medicinal, pois compostos considerados marcadores não são exclusivos de uma única espécie. Por exemplo, na espécie *B. trimera*, a Farmacopeia Brasileira estabelece sua identificação com base em flavonoides (quercetina e 3-O-metilquercetina) que são comumente encontrados em outras espécies de *Baccharis* (ANVISA, 2010). Dessa forma, a obtenção de perfis espectrais por RMN HR-MAS da erva medicinal pode ser uma metodologia mais adequada para o controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos.

Sendo assim, a RMN HR-MAS de ^1H aliada a métodos quimiométricos pode ser considerada uma ferramenta adequada para o desenvolvimento de uma metodologia que possa atuar na autenticidade e diferenciação de espécies de *Baccharis* morfológicamente semelhantes, uma vez que oferece uma abordagem mais eficiente que os métodos tradicionais, por se tratar de uma técnica não invasiva, com resultados rápidos e reprodutíveis.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Aplicar a técnica de RMN HR-MAS aliada a quimiometria para avaliar a autenticidade de *Baccharis trimera* (Less.) DC. através de um método rápido, direto e eficiente de controle de qualidade dessa planta medicinal, bem como, auxiliar na quimiotaxonomia do gênero.

2.2 ESPECÍFICOS

- Reconhecer as principais diferenças de composição química entre as espécies *Baccharis articulata* (Lam.) Pers, *Baccharis junciformis* DC., *Baccharis milleflora* (Less.) DC, *Baccharis myriocephala* DC. e *Baccharis trimera* (Less.) DC. usando a RMN HR-MAS de ^1H ;
- Identificar nos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , os principais metabólitos das espécies *B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora*, *B. myriocephala* e *B. trimera*;
- Realizar Análise de Componentes Principais (PCA) nos dados obtidos a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H para correlacionar diferenças ou semelhanças entre as espécies de referência de *Baccharis* e amostras comerciais;
- Identificar os principais compostos responsáveis pela discriminação entre as espécies observadas nas análises quimiométricas;
- Construir modelos de classificação empregando PLS-DA e SIMCA a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de referência visando verificar a capacidade destes métodos na classificação de amostras comerciais.

PARTE EXPERIMENTAL

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 AMOSTRAS

3.1.1 Amostras de referência

As partes aéreas (caules alados) floridas de cinco espécies de *Baccharis* (Asteraceae) foram coletadas em Curitiba-PR, Piraquara-PR e Pelotas-RS (**Tabela 2** – Pág. 63). A identificação botânica dos exemplares foi realizada pelo taxomista Dr. Gustavo Heiden, pesquisador da Embrapa Clima Temperado (Monte Bonito-RS), especialista em identificação botânica de espécies do gênero *Baccharis*. As amostras foram secas durante duas semanas a temperatura ambiente ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e armazenadas em freezer a -18°C

Tabela 2 – Amostras vegetais de diferentes espécies de *Baccharis*.

Espécie	Número de Amostras	Data da coleta	Localização
<i>Baccharis articulata</i> (Lam.) Pers.	26	Abril/2015 Julho/2016 Outubro/2016	Curitiba-PR Pelotas-RS
<i>Baccharis junciformis</i> DC.	10	Julho/2016	Pelotas-RS
<i>Baccharis milleflora</i> (Less.) DC.	9	Abril/2015 Outubro/2016	Piraquara-PR
<i>Baccharis myriocephala</i> DC.	26	Abril/2015 Outubro/2016	Curitiba-PR Piraquara-PR
<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	27	Julho/2016	Pelotas-RS

3.1.2 Amostras comerciais

As amostras comerciais da planta medicinal conhecida popularmente como carqueja foram adquiridas em farmácias, feiras, lojas de fitoterápicos e produtos naturais, assim como, em mercados de diferentes regiões do Brasil (**Tabela 3** – Pág. 64). Estas foram adquiridas secas e seus rótulos possuíam identificação botânica como *B. trimera*, *B. genistelloides*, *B. articulata*, carqueja e carqueja doce (**Tabela 3** –

Pág. 64). As amostras foram mantidas em suas embalagens originais e armazenadas em freezer a -18°C .

Tabela 3 – Amostras comerciais de *Baccharis*.

Código	Informação Especificada no Rótulo	Origem de Industrialização
BC1	Carqueja (<i>Baccharis trimera</i>)	PR
BC2	Carqueja	PR
BC3	Carqueja (<i>Baccharis genistelloides</i>)	PR
BC4	Carqueja (<i>Baccharis trimera</i>)	SP
BC5	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	MG
BC6	Carqueja	MG
BC7	Carqueja	MG
BC8	Carqueja	MG
BC9	Carqueja	MG
BC10	<i>Baccharis articulata</i>	MG
BC11	Carqueja	MG
BC12	Carqueja	MG
BC13	Carqueja	MG
BC14	Carqueja	MG
BC15	Carqueja	MG
BC16	Carqueja	MG
BC17	Carqueja (<i>Baccharis genistelloides</i>)	PR
BC18	Carqueja doce	MG
BC19	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	MG
BC20	Carqueja	MG
BC21	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	MG
BC22	Carqueja	MG
BC23	Carqueja	PR
CO01	Carqueja (<i>Baccharis trimera</i>)	PR
CO04	Carqueja (<i>Baccharis genistelloides</i>)	PR
CO05	Carqueja	PR

3.2 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA PARA AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H

O desenvolvimento da metodologia foi realizado avaliando parâmetros relacionados ao preparo da amostra (estado da amostra e escolha de solvente de encharcamento), sequências de pulsos e estabilidade da amostra.

3.2.1 Estado da Amostra

A condição em que as amostras seriam analisadas foi realizada através de três testes, em que as amostras foram submetidas a análises ainda frescas, secas em estufa de ar circulante a 45°C por dois dias ou a temperatura ambiente a 20°C ± 2°C durante duas semanas, respectivamente.

O propósito dessa avaliação é escolher uma condição de análise adequada das amostras, visando obter uma melhor resolução espectral e alta relação sinal/ruído (S/R). Em outras palavras, um melhor *fingerprint*.

3.2.2 Solvente Deuterado

A escolha do solvente de encharcamento (*swelling*) foi averiguada mediante análise de três solventes deuterados, CDCl₃, CD₃OD e D₂O, de forma a verificar qual destes permite uma maior mobilidade aos metabólitos e um perfil espectral mais informativo da matriz investigada.

3.2.3 Parâmetros de Aquisição

A análise dos parâmetros de aquisição foi realizada mediante a averiguação de três sequências de pulsos. As sequências de pulsos *zgpr*, *noesypr1d* e *cpmgpr1d* foram analisadas com tempo de espera (D1) de 1s entre a aquisição e próximo pulso. Avaliou-se ainda, o tempo de mistura (D8) na sequência *noesypr1d* variando-o de 50, 100 e 150 ms, enquanto na *cpmgpr1d* foi avaliado o número de vezes em que o experimento foi repetido (L4) alterando entre 4, 10 e 20 loops e o tempo τ empregando valores entre 1 e 2 ms.

Os melhores resultados foram observados considerando a eficiência de saturação do sinal de água, perfil espectral, resolução e S/R. Após seleção da sequência de pulsos adequada para análise, foi analisado o número de promediações entre 64 e 512 (**Figura 11** – Pág. 66).

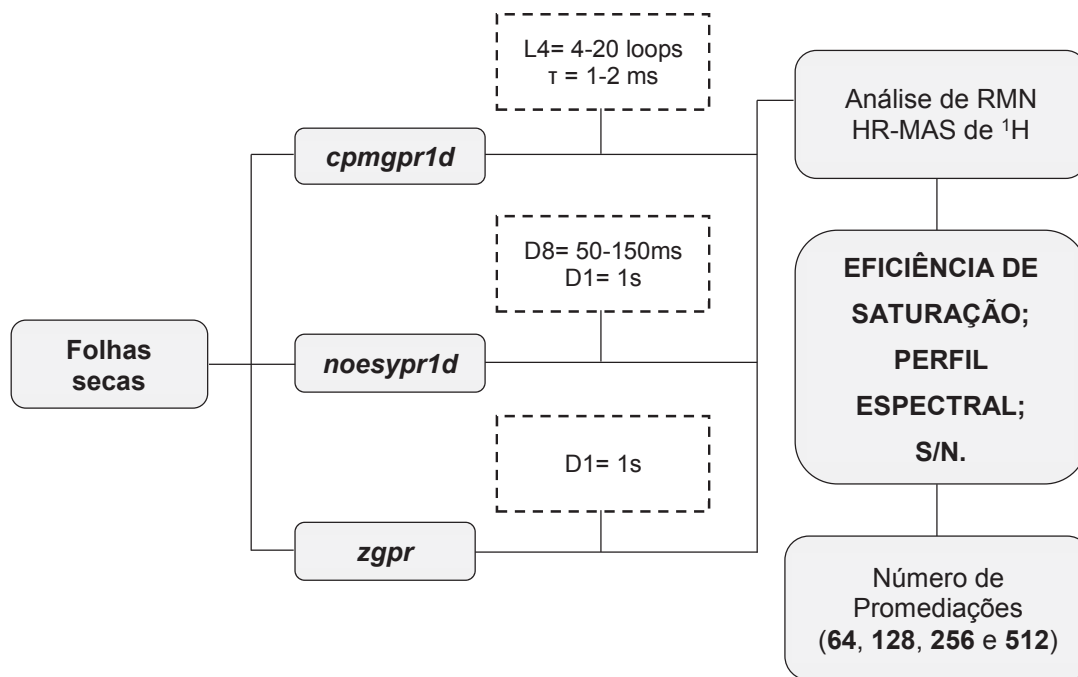


Figura 11 – Esquema de análise dos parâmetros de aquisição.

3.2.4 Estabilidade e Mobilidade da Amostra

A estabilidade e mobilidade das amostras foram avaliadas por meio de três métodos. O primeiro consistiu na análise de espectros de RMN HR-MAS de ^1H obtidos a 20°C com 0, 2 e 4 horas após retirada do freezer. O segundo método empregado foi por meio da aquisição de espectros de RMN HR-MAS de ^1H , variando a velocidade de giro do rotor (4, 5 e 6 kHz). Por fim, o terceiro método consistiu na aquisição de espectros de RMN HR-MAS de ^1H alterando o tempo de encharcamento (**Figura 12** – Pág. 67).

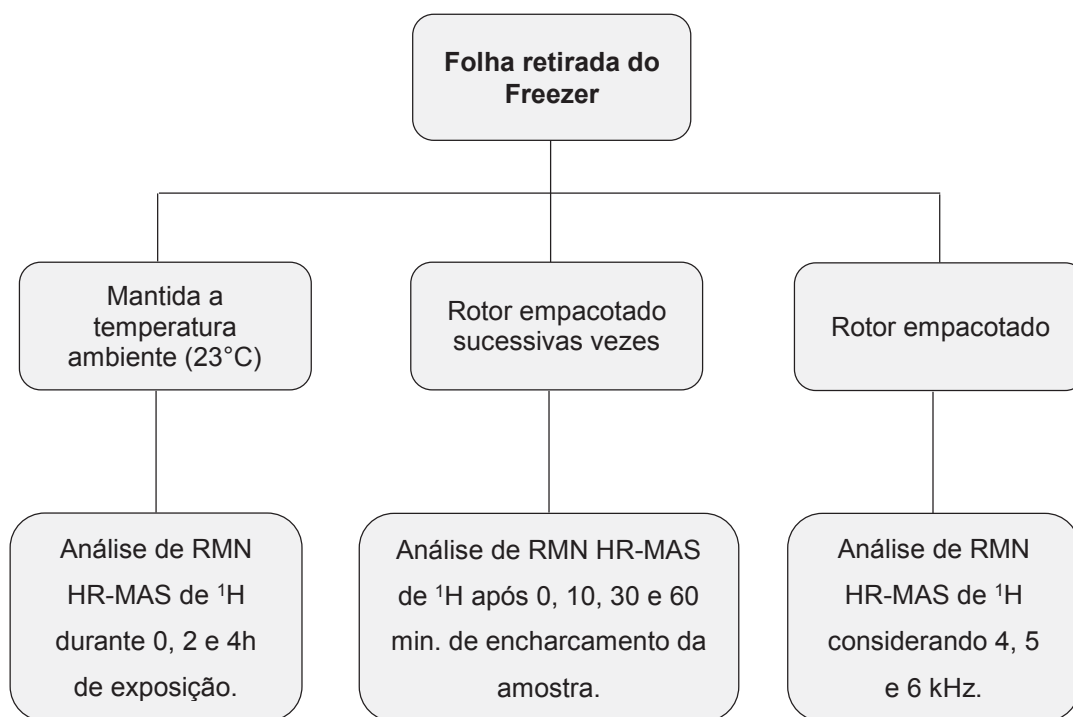


Figura 12 – Esquema dos métodos utilizados para a avaliação da estabilidade e mobilidade da amostra.

3.3 AQUISIÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN HR-MAS DE ^1H

Para a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H , as amostras foram submetidas ao congelamento com nitrogênio líquido e, posteriormente, moídas manualmente em almofariz de porcelana. Para cada análise, aproximadamente $10,0 \pm 0,5$ mg de amostra foram inseridas em um rotor de óxido de zircônio com volume semiesférico de $50 \mu\text{L}$, seguido da adição de $35 \mu\text{L}$ de CD_3OD (contendo 0,05% de TMS), evitando extravasamento de líquido (**Figura 13** – Pág. 68).

Os espectros de RMN HR-MAS de ^1H foram adquiridos em um espectrômetro de RMN Bruker AVANCE 400, operando a 9,4 Tesla, observando o núcleo de hidrogênio a 400,13 MHz, equipado com uma sonda quadrinuclear ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$) de alta resolução com giro no ângulo mágico ($\theta = 54,74^\circ$) de 4 mm e gradiente de campo na direção do ângulo mágico.

As melhores condições obtidas para a aquisição dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H consistiram em: sequência de pulsos *zgpr*, com tempo de espera (D1) de 1,0 s, 64k pontos (TD) distribuídos em uma janela espectral de 8503 Hz, resultando

em tempo de aquisição (AQ) de 3,85 s e temperatura de 293 K. Durante a aquisição, as amostras foram giradas a uma velocidade de 5 kHz, inclinadas no ângulo mágico de 54,74° (**Figura 13** – Pág. 68).

A sintonia (*matching e tuning*) para o ^1H e o ajuste da homogeneidade do campo magnético espacialmente (*shimming*) foram realizados para cada análise. O tempo experimental total foi de 35 min para cada amostra incluindo o tempo utilizado para o empacotamento do rotor. As análises foram realizadas em duplicata conferindo um conjunto amostral de 248 espectros.

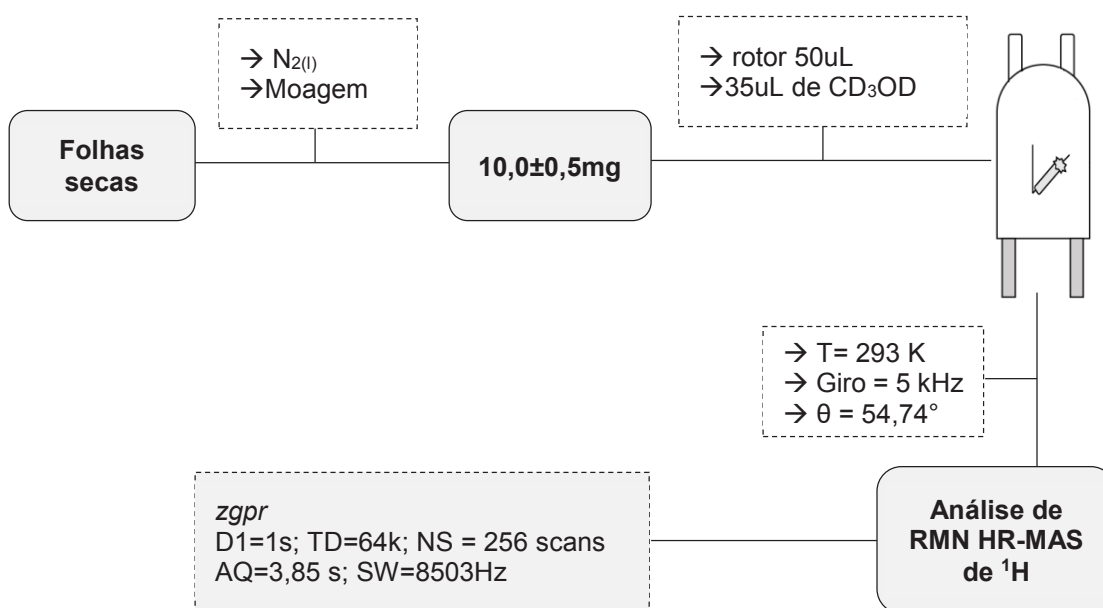


Figura 13 – Esquema da metodologia utilizada para aquisição dos experimentos.

3.4 EXPERIMENTOS BIDIMENSIONAIS POR RMN EM SOLUÇÃO

Para confirmação inequívoca dos constituintes químicos, experimentos bidimensionais foram realizados por meio de RMN em solução. Para isto, 50 mg de cada amostra de *Baccharis* (*B. articulata*, *B. junciformis*, *B. milleflora*, *B. myriocephala* e *B. trimera*) foram submetidos a microextração diretamente em 650 μL de CD_3OD (0,05% de TMS), sonicadas por 10 min, seguida de centrifugação por 10 min. O sobrenadante (600 μL) foi transferido a tubos de RMN de 5 mm para posterior análise (**Figura 14** – Pág. 69).

Os experimentos bidimensionais de correlação ^1H - ^1H (COSY), correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) e correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC) foram adquiridos em espectrômetro Bruker AVANCE III 600 operando a 14,1 Tesla, observando o núcleo de ^1H e ^{13}C a 600,13 e 150,13 MHz, respectivamente, equipado com uma sonda quadrinuclear de detecção inversa ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^{31}\text{P}$) de 5 mm e gradiente de campo no eixo z.

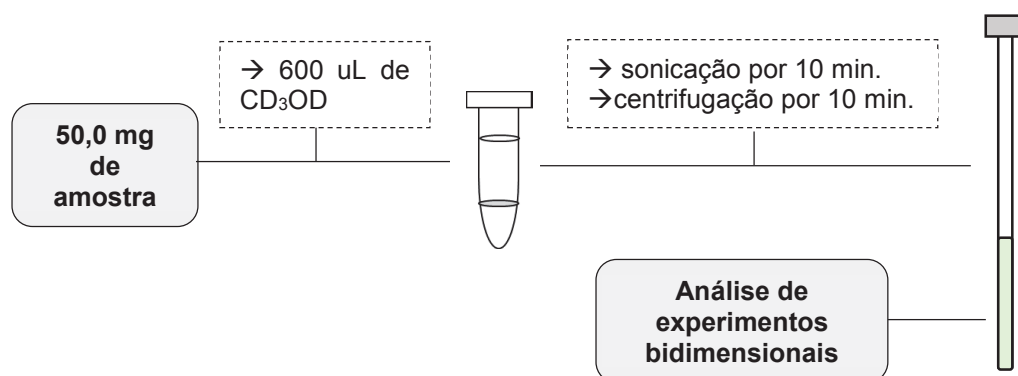


Figura 14 – Esquema da metodologia utilizada para aquisição dos experimentos através de RMN de solução.

O experimento de RMN bidimensional de correlação ^1H - ^1H (COSY) com filtro de duplo-quantum (DQF-COSY), foi realizado empregando a sequência de pulsos *cosygpqqf*. A aquisição foi feita com 2k de pontos em F2 com 8, 16 ou 32 transientes por cada um dos 128 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão e completado com zeros (*zero filling*) para 1k antes da transformada de Fourier. O tempo de espera entre os ciclos de pulsos sucessivos foi de 1,92 s.

Por sua vez, o experimento de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) foi realizado no modo sensível a fase empregando seleção de gradiente echo/antiecho-TPPI com sequência de pulsos *hsqcetgpsisp2.2* desacoplado durante a aquisição. Os experimentos de HSQC foram realizados com tempo de espera de 1,0 s entre os pulsos. Na dimensão F2 foram utilizados 2k pontos e 16 ou 32 aquisições por cada um dos 256 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão completado com zeros (*zero filling*) para 1k anteriormente a transformada de Fourier.

Já o experimento de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMBC) a longa distância (HMBC) foi adquirido com 2k pontos em F2, com 64 aquisições por cada um dos 312 incrementos em F1 para gerar a segunda dimensão, completados com zeros

(*zero filling*) para 2k anteriormente a transformada de Fourier. A sequência de pulsos *hmbcgpndqf* foi utilizada sem desacoplamento, porém com filtro de $^1J_{H,C}$ para eliminar acoplamentos a uma ligação e otimizado para observação de constante de acoplamento a longa distância de 8 Hz.

3.5 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Para análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) do conjunto amostral constituído pelos espectros de RMN HR-MAS de 1H , utilizou-se o programa computacional AMIX® (versão 3.9.12, Bruker BioSpin). Da mesma forma, foram realizadas análises PLS-DA e modelagem independente e flexível por analogia de classes (SIMCA) através da transposição dos espectros organizados no software Origin Pro 8 (OriginLab) exportados como ASCII para o software MATLAB® (versão 7.0.1, Math Work Inc.), empregando-se PLS-Toolbox 3.0 (Eigenvector Research).

3.5.1. Processamento, ajuste e transformação dos espectros

Inicialmente, os espectros foram processados no programa TopSpin (versão 3.1, Bruker BioSpin) aplicando uma multiplicação exponencial do tipo Lorentziana sobre os FIDs por um fator (LB) de 0,3 Hz, seguido da transformada de Fourier utilizando preenchimentos com zeros (*zero filling*) para 64k pontos. Em seguida, os deslocamentos químicos foram referenciados em relação ao sinal do TMS em δ 0,00. A fase e linha de base dos espectros foram corrigidas manualmente.

Posteriormente, os espectros foram convertidos em *buckets* com auxílio do software AMIX. Para isto, os espectros foram divididos em pequenos intervalos variando de 0,01, 0,02, 0,04 e 0,05 ppm. A área de cada intervalo foi calculada empregando o modo especial de integração do programa AMIX e normalizados em relação a área total dos sinais (**Figura 15** – Pág. 71).

Os *buckets* foram construídos com o propósito de reduzir a dimensionalidade dos dados, uma vez que os espectros foram construídos com 64k pontos e um mesmo sinal é representado por inúmeros pontos.

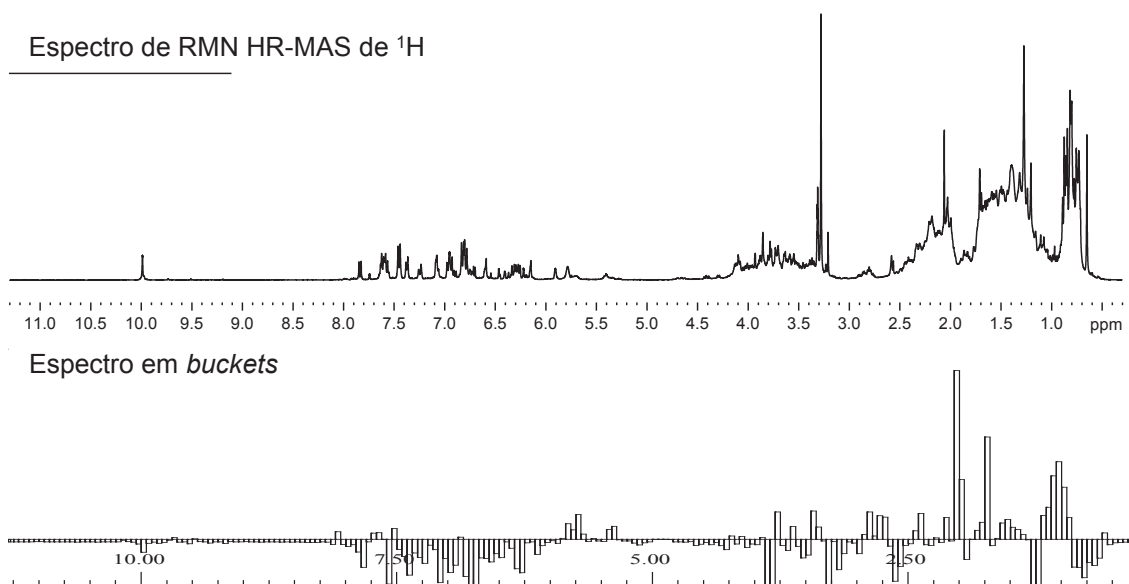


Figura 15 – Transformação dos espectros em *buckets*.

3.5.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

As análises quimiométricas foram realizadas avaliando toda a região espectral (δ 11,30-0,30), bem como, somente a região de hidrogênios alifáticos (δ 4,80-0,30) ou aromáticos (δ 11,30-6,00). Quando necessário, as regiões correspondentes aos sinais residuais de CHD_2OD (δ 3,34-3,29) e água (δ 5,00-4,80) foram excluídas.

Após a construção das matrizes de dados, os mesmos foram submetidos a análises de PCA avaliando-se três diferentes pré-processamentos, dados centrados na média, autoescalamento e escalamento por Pareto (**Figura 16** – Pág. 72). A qualidade do conjunto amostral foi realizada a partir da detecção de amostras anômalas através dos gráficos de *hotelling T²* e *influence plot*.

A discriminação ou agrupamento das amostras foram observados através dos gráficos de *scores*. A identificação dos metabólitos responsáveis pela separação entre os grupos foi realizada através dos gráficos de *loadings* que evidenciam a relação entre as variáveis através do peso ou importância relativa de cada *bucket*, isto é, de

cada deslocamento químico. Os metabólitos responsáveis pela variância dos dados foram atribuídos com base em experimentos bidimensionais de RMN em solução e comparação com dados da literatura.

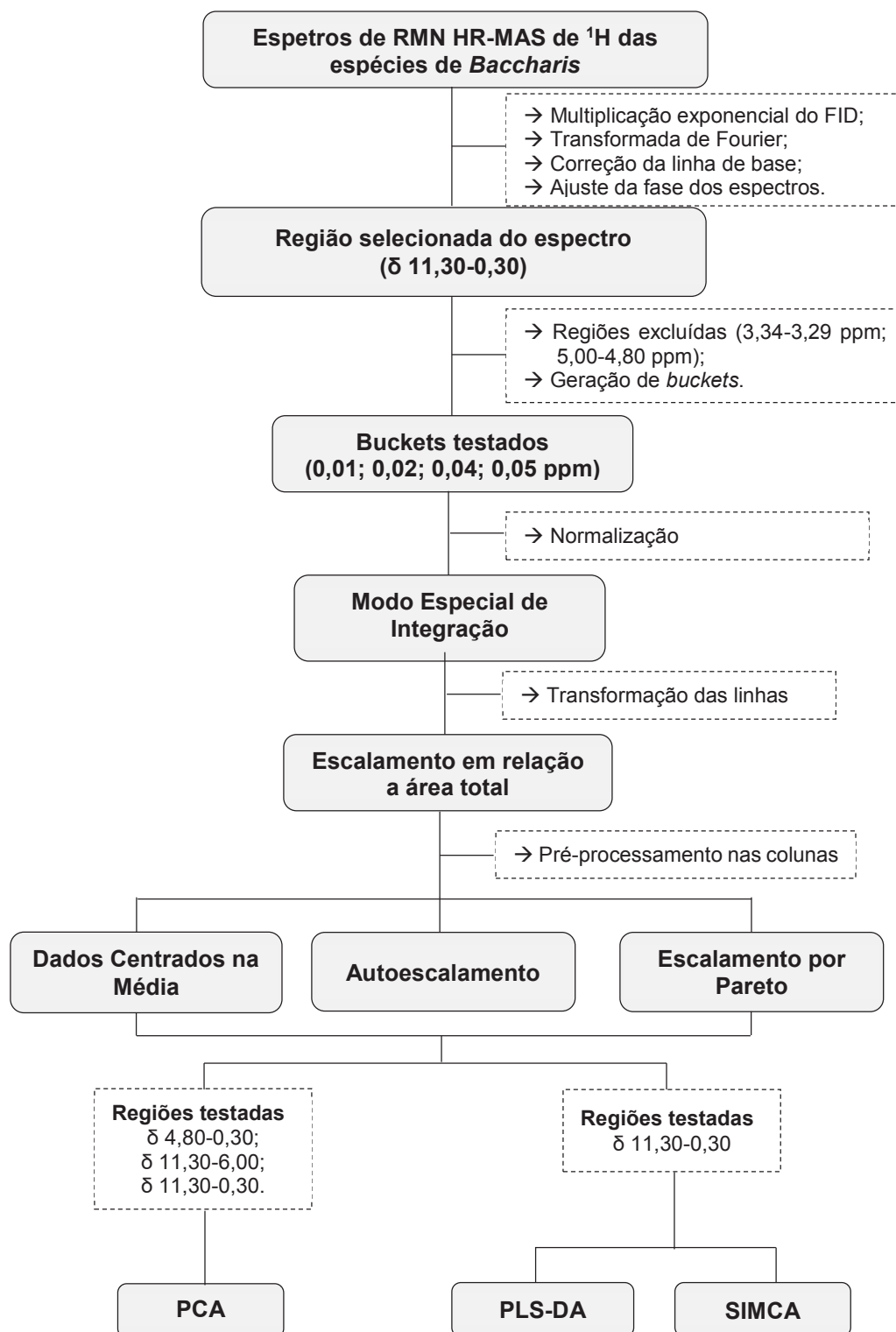


Figura 16 – Esquema da metodologia utilizada para otimização das análises quimiométricas.

3.5.3 Classificação das amostras por PLS-DA

O objetivo da PLS-DA foi criar modelos de classificação e verificar a capacidade preditiva destes em classificar novas amostras (conjunto de validação), assim como determinar a autenticidade das amostras comerciais. O estabelecimento de modelos através da PLS-DA foi realizado empregando 75% das amostras de *Baccharis* (147 espectros) para compor o conjunto de calibração e 25% (49 espectros) foram reservadas para validação externa (**Tabela 4, Figura 17** – Pág. 73-74).

Tabela 4 – Quantidade de amostras empregadas nos PLS-DA.

Espécie	Quantidade de amostras		
	Calibração	Validação	
<i>B. articulata</i>	39	13	(01-13)
<i>B. junciformis</i>	15	5	(14-18)
<i>B. milleflora</i>	14	4	(19-22)
<i>B. myriocephala</i>	39	13	(23-35)
<i>B. trimera</i>	40	14	(36-49)

Foram construídos cinco modelos por PLS-DA com o mesmo conjunto amostral, cuja diferença consistiu na alteração das classes (**Tabela 5** – Pág. 73). Nestes, a matriz X apresenta informações acerca das amostras (147 X 220) e a matriz Y possui o número de linhas igual ao número de amostras, enquanto a coluna representa as classes das amostras do conjunto de calibração (147 X 1) (**Figura 17** – Pág. 74).

Tabela 5 – Classes definidas para cada modelo PLS-DA.

Espectros/Modelos	Classes				
	M1	M2	M3	M4	M5
<i>B. trimera</i>	1	0	0	0	0
<i>B. myriocephala</i>	0	1	0	0	0
<i>B. articulata</i>	0	0	1	0	0
<i>B. junciformis</i>	0	0	0	1	0
<i>B. milleflora</i>	0	0	0	0	1

A construção dos modelos foi acompanhada por validação cruzada (*leave one out*). O número de variáveis latentes foi determinado pelo gráfico de número de LVs versus RMSECV a partir da matriz X do conjunto de calibração. Para garantir a qualidade dos conjuntos de calibração foi realizada a detecção de amostras anômalas através do gráfico de *leverage versus* resíduos de *Students*, cujo limite de resíduos é

igual a $\pm 2,5$ e limite de *leverage* foi determinado através da equação $3xLV/n$ explicada no item 1.3.2.

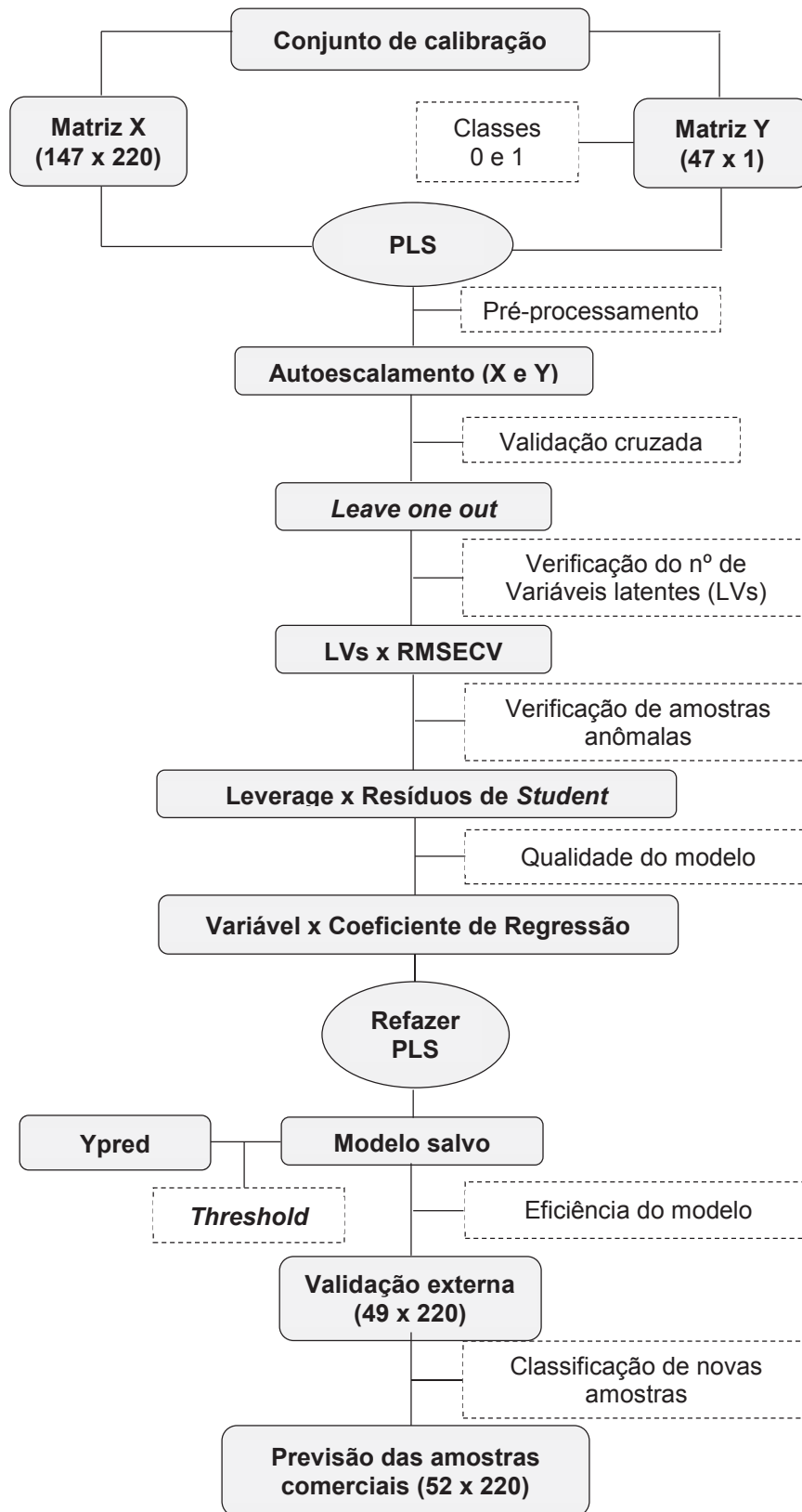


Figura 17 – Esquema da metodologia utilizada para otimização da análise discriminante pelo método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

A qualidade do modelo foi avaliada baseando-se na Raiz Quadrática do Erro Quadrático Médio de Calibração (RMSEC), Raiz Quadrática do Erro Quadrático Médio de Validação Cruzada (RMSECV) e no coeficiente de determinação (R^2). A eficiência dos modelos foi avaliada através da previsão das amostras da validação externa empregando o valor limite entre as classes (*threshold*) para classificar a amostra como pertencente ou não a uma determinada classe. Os modelos considerados satisfatórios foram utilizados para previsão das amostras comerciais.

3.5.4. Classificação das amostras através do SIMCA

A classificação pelo SIMCA é um método baseado no PCA modelado para cada classe do conjunto de calibração. A modelagem SIMCA foi realizada mediante a análise das matrizes utilizadas no PLS-DA mencionadas no **item 3.5.3**, empregando as mesmas amostras. No entanto, as classes foram determinadas considerando 5 classes diferentes (**Tabela 6** – Pág. 75). Os modelos foram construídos variando o pré-processamento dos dados, assim como, avaliando a habilidade dos modelos em classificar corretamente as amostras de validação.

Tabela 6 – Classes definidas para o modelo SIMCA.

Espécie	Classe	Quantidade de amostras		
		Calibração	Validação	
<i>B. articulata</i>	1	39	13	(01-13)
<i>B. junciformis</i>	2	15	5	(14-18)
<i>B. milleflora</i>	3	14	4	(19-22)
<i>B. myriocephala</i>	4	39	13	(23-35)
<i>B. trimera</i>	5	40	14	(36-49)

As amostras desconhecidas (comerciais) foram comparadas aos modelos de classes e atribuídas com base na similaridade entre estas e as amostras do conjunto de calibração. O número de componentes principais para cada classe foi escolhido levando em consideração a porcentagem de variância explicada para cada componente principal.

O poder de discriminação dos modelos SIMCA em distinguir as classes foi avaliado utilizando a “distância entre classes” (T^2) e os “resíduos entre classes” (Q). A atribuição de uma amostra teste a uma dada classe foi baseada na projeção da

mesma no gráfico dos escores e sua distância das fronteiras da classe em questão. Este procedimento foi repetido para todas as classes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OTIMIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE RMN HR-MAS DE ^1H

O desenvolvimento de uma metodologia direcionada a investigação da autenticidade de espécies morfológicamente semelhantes é extremamente importante para garantir a eficiência e qualidade de plantas medicinais utilizadas na saúde pública. Assim, a otimização dos experimentos de RMN HR-MAS de ^1H consistiu na avaliação de diversos parâmetros, como: solvente adequado para encharcamento (CDCl_3 , CD_3OD e D_2O), condições de secagem, sequências de pulsos (*cpmgpr1d*, *noesypr1d* e *zgpr*), otimização dos parâmetros da sequência de pulsos, números de promediações (NS igual a 64, 128, 256 e 512) e estabilidade da amostra (tempo de encharcamento e exposição da amostra ao ambiente).

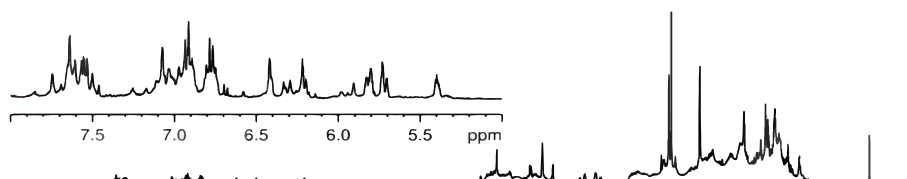
4.1.1 Avaliação do Estado da Amostra

Espera-se que uma planta medicinal apresente os princípios ativos e metabólitos responsáveis por suas propriedades biológicas. Desta forma, métodos de secagem são necessários para garantir que o produto comercializado apresente tais compostos, pois os princípios ativos podem diminuir em função do aumento do teor de umidade da planta. Além disso, a umidade pode facilitar a proliferação de microrganismos (fungos e bactérias) no material.

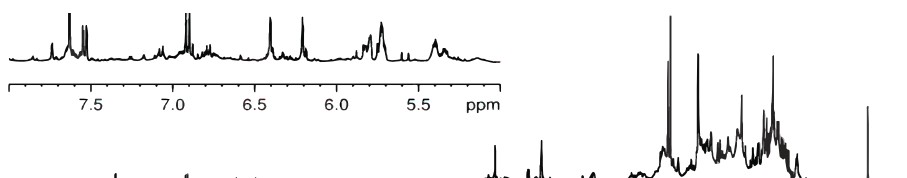
A redução da umidade ou desidratação inibe a atividade enzimática, retardando o processo de deterioração, preservando características como cor, aroma, composição química (teor de princípios ativos) indicando uma boa qualidade do material. A análise das amostras frescas (recém coletadas), secas a temperatura ambiente e a temperatura controlada não apresentou diferenças significativas na composição química entre as amostras. Isso significa que os processos de secagem são brandos o suficiente para não afetar as propriedades medicinais, isto é, não há degradação dos flavonoides, que correspondem aos princípios ativos (**Figura 18** – Pág. 79).

As amostras secas à temperatura ambiente apresentaram uma maior quantidade de metabólitos. Dessa forma, a secagem por duas semanas a temperatura ambiente foi a estratégia escolhida para secagem das amostras (**Figura 18** – Pág. 79). No entanto, a diferença observada pode ser relativa a presença de água nas amostras frescas, o que resultou em uma menor massa efetiva durante a amostragem.

Secas por duas semanas a temperatura ambiente



Secas em estufa a 45°C por dois dias



Amostra fresca

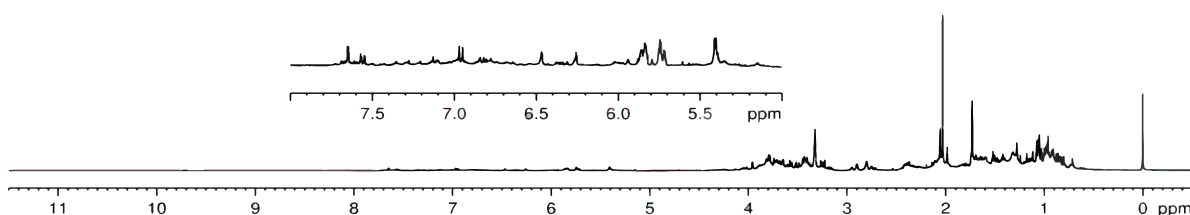


Figura 18 – Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de *B. trimera* (400 MHz, CD_3OD).

4.1.2 Avaliação do Solvente

A RMN HR-MAS é considerada como uma ferramenta rápida para detectar os principais metabólitos existentes em uma matriz heterogênea encharcados em solventes específicos cuja finalidade consiste em aumentar a mobilidade molecular. Quanto maior a mobilidade molecular maior a resolução espectral e interação dos metabólitos existentes na estrutura celular do material vegetal, o que pode aumentar a afinidade soluto-solvente. Sendo assim, nenhum processo de extração é necessário,

minimizando as reações químicas com o solvente, que podem ocorrer nos métodos de extração tradicionais (FLORES et al., 2018).

A escolha do solvente em análises de RMN HR-MAS depende do tipo de amostra e da informação requerida (FAROOQ et al., 2013). A composição química de espécies de *Baccharis* é descrita na literatura pela presença de flavonoides, diterpenos, bem como, mono e sesquiterpenos em óleos essenciais (VERDI et al., 2005; CAMPOS et al., 2016). Devido a composição química diversificada das espécies desse gênero foram avaliados solventes deuterados com diferentes polaridades (CDCl_3 , CD_3OD e D_2O).

A análise dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H permitiu observar espectros com maior quantidade de sinais, portanto, mais informativos utilizando os solventes D_2O e CD_3OD (**Figuras 19 e 20** – Pág. 81). Ampliando-se a regiões dos espectros em δ 11,50-5,50 e δ 3,00-0,50 nota-se que os espectros de amostras encharcadas com D_2O e CD_3OD apresentam resoluções semelhantes, devido a interação mais eficiente entre os metabólitos que estão presentes na estrutura celular e o solvente (**Figura 20** – Pág. 81).

No entanto, aqueles obtidos em CD_3OD apresentaram maior quantidade de sinais, bem como, maior dispersão dos sinais (**Figuras 19 e 20** – Pág. 81). Quanto maior a dispersão dos sinais nos espectros de RMN HR-MAS, mais fácil será a identificação dos metabólitos e, por consequência, das espécies de *Baccharis*. Da mesma forma, a dispersão dos sinais será importante para as análises quimiométricas.

Desta forma, o CD_3OD foi escolhido por apresentar espectros mais informativos acerca da matriz estudada (**Figuras 19 e 20** – Pág. 81).

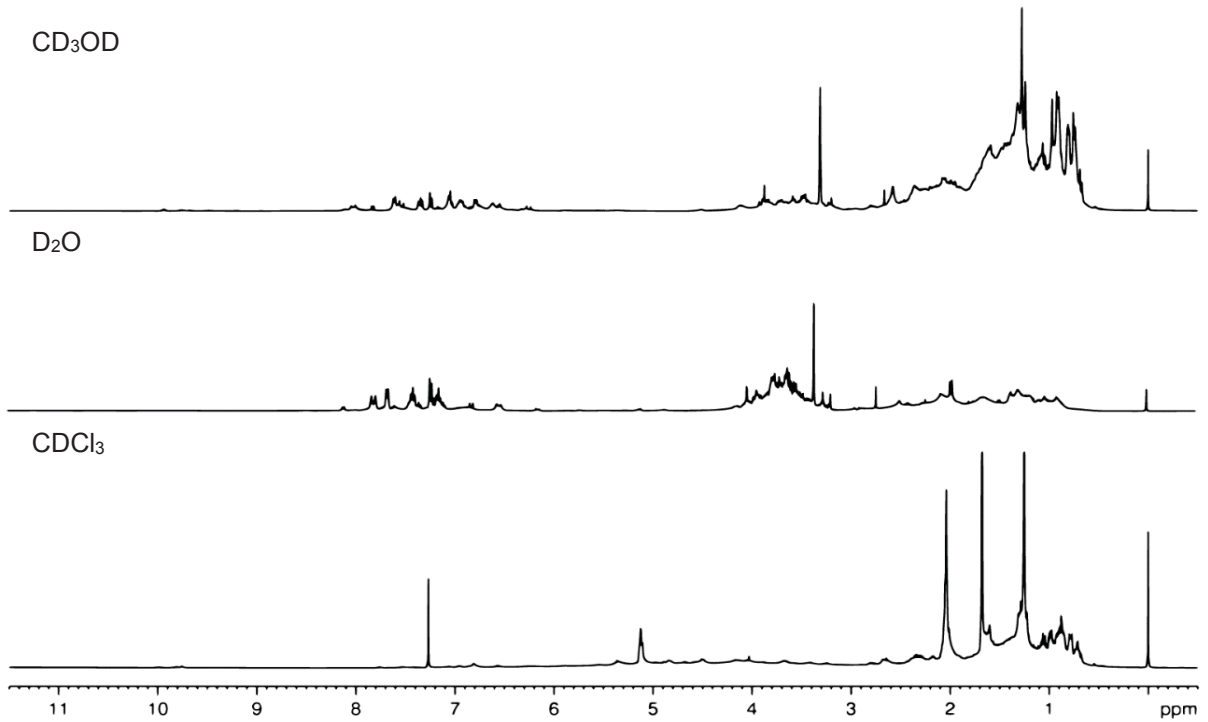


Figura 19 – Espectros de RMN HR-MAS de ¹H de *Baccharis* utilizando diferentes solventes (400 MHz).

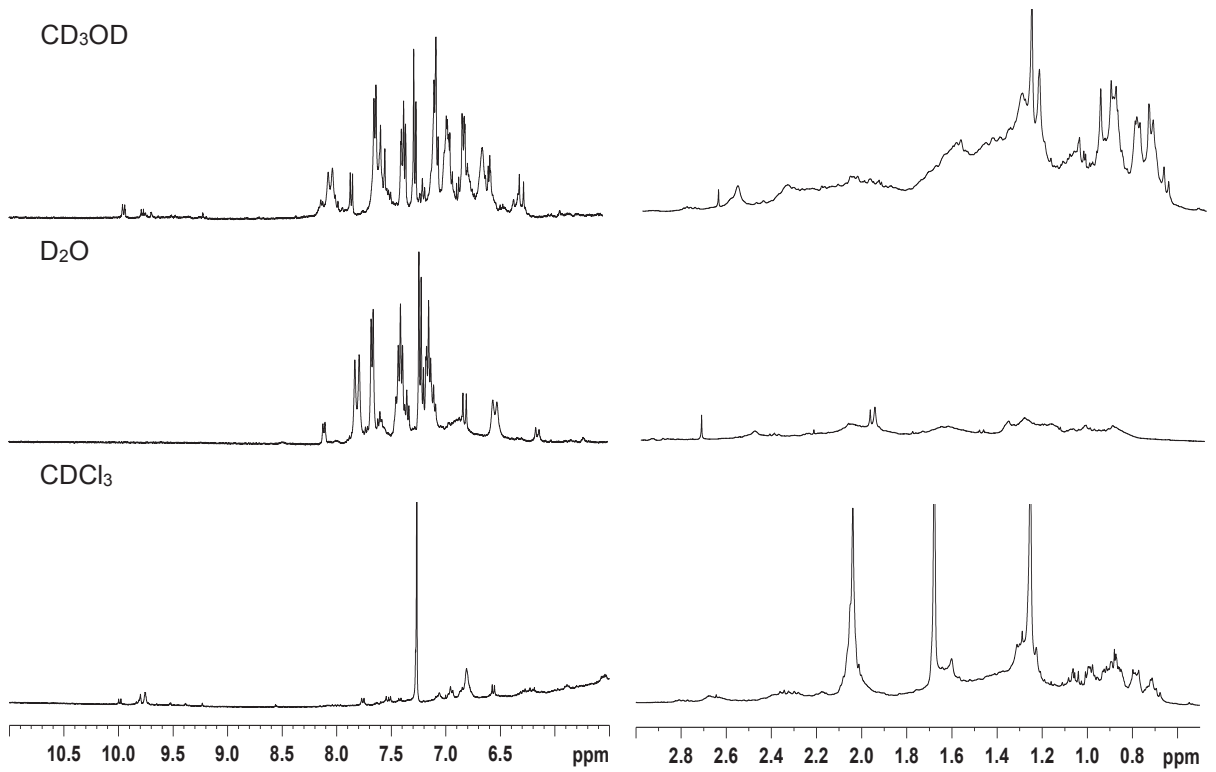


Figura 20 – Ampliação das regiões entre δ 11,00-5,50 e δ 3,00-0,50 dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H de *Baccharis* utilizando diferentes solventes (400 MHz).

4.1.3 Avaliação de Parâmetros de Aquisição

A obtenção de informações relevantes sobre a matriz e eliminação de sinais que obstruem o espectro, bem como sinais provenientes de troca química, por exemplo, entre D₂O e H₂O ou residuais de água pode ser obtida através da pré-saturação (LIÃO et al., 2010). A pré-saturação corresponde ao procedimento comumente utilizado para minimizar ou eliminar sinais intensos de solventes, sendo realizada através da aplicação de uma onda contínua de baixa potência na frequência de ressonância do sinal selecionado antes do registro do sinal ou FID.

Foram investigadas três sequências de pulsos para pré-saturação do sinal residual de H₂O: *cpmgpr1d*, *noesypr1d* e *zgpr*, cujo desempenho foi avaliado na eficiência de saturação, resolução dos sinais e perfil espectral (**Figura 21** – Pág. 83). A sequência de pulsos *zgpr* é compreendida por RD-90°-FID, cujo RD representa o tempo de espera D1. Trata-se de uma sequência considerada simples cujo sinal a ser suprimido é irradiado seletivamente durante o tempo de espera (**Figura 21** – Pág. 83).

Por sua vez, a sequência *noesypr1d* é dada por RD-90°-t₁-90°-t_m-90°-FID, onde t₁ corresponde ao primeiro incremento em um experimento NOESY e corresponde a um intervalo fixo de 4,0 μs, enquanto t_m é o tempo de mistura (D8). Na sequência *noesypr1d*, a frequência de ressonância do sinal a ser suprimido é irradiado seletivamente através de ondas contínuas tanto durante o tempo de relaxação, quanto no tempo de mistura (**Figura 21** – Pág. 83).

Já a *cpmgpr1d* consiste em uma sequência de ecos de spin [90°-(τ-180°-τ)n-FID], 2τn, onde τ representa os intervalos (D20) entre os pulsos de 180° e n o número de vezes (L4) em que a sequência é repetida, nesse caso, foram testados entre 4, 10 e 20 loops, e empregado valores de τ entre 1 e 2 ms (**Figura 21** – Pág. 83). A sequência *cpmgpr1d* corresponde a uma sequência *Carr-Purcell-Meiboom-Gill* (CPMG) modificada em que um pulso de pré-saturação foi incluído, cujo sinal que se deseja suprimir é irradiado seletivamente através de uma onda contínua propiciando um ajuste do ganho do receptor do equipamento. Já o trem de pulsos da CPMG permite a eliminação de sinais de moléculas com tempo de relaxação T₂ curto, geralmente macromoléculas, possibilitando visualizar sinais de moléculas com baixa massa molecular.

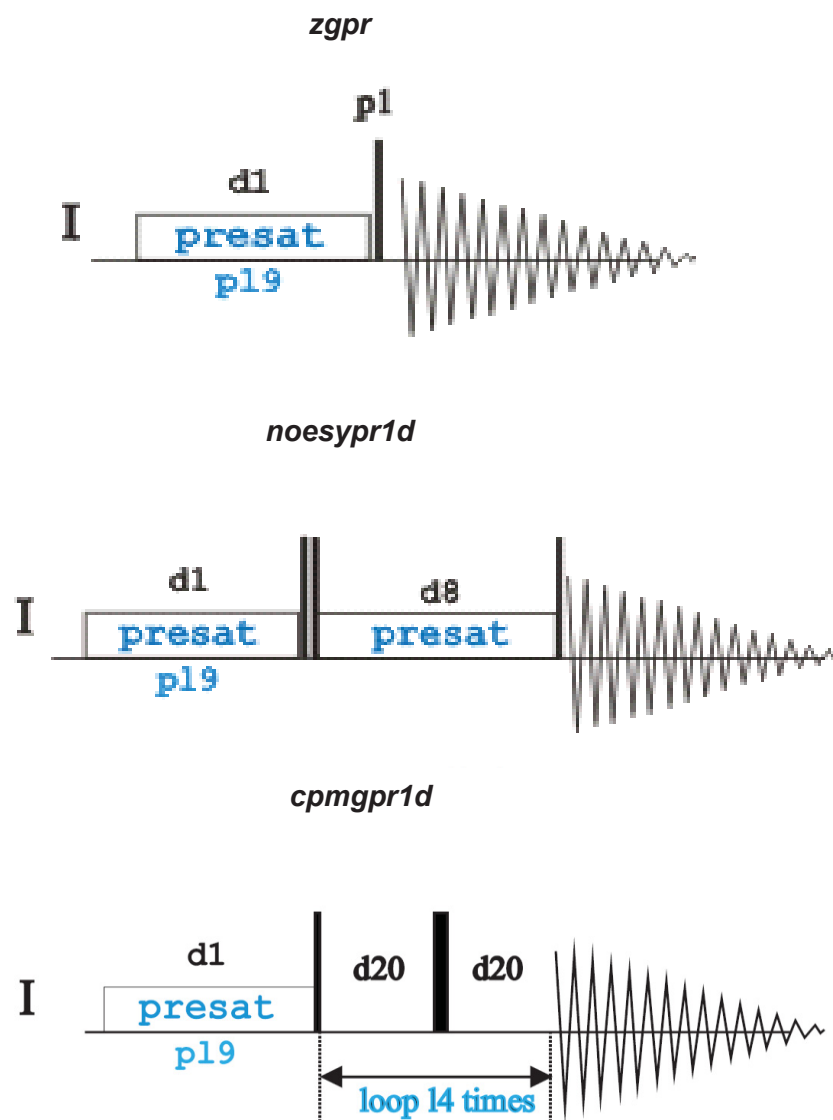


Figura 21 – Sequências de pulsos avaliadas.

As três sequências de pulsos investigadas foram eficientes na saturação do sinal da água (**Figura 22** – Pág. 84). No entanto, a sequência *noesypr1d* afetou os sinais próximos ao sinal residual de água (δ 5,00 a 4,60), bem como apresentou menor relação sinal/ruído ($S/R = 109,2$) (**Figuras 22 e 23** – Pág. 84-85). Esta menor relação S/R comparada às sequências *cpmgpr1d* ($S/R = 146,4$) e *zgpr* ($S/R = 172,0$) sugere que a força do campo magnético não estava uniforme em toda amostra e, como consequência, os diferentes núcleos alcançaram a condição de ressonância em diferentes frequências resultando em uma menor S/R . A sequência *cpmgpr1d* não apresentou ganho significativo a relação S/R quando comparada a sequência *zgpr*.

Dessa maneira, a sequência *zgpr* foi escolhida para o desenvolvimento do trabalho, pois apresentou resultados significativos permitindo a saturação do sinal da água efetivamente sem interferir nos sinais próximos do sinal residual da água, assim como maior relação S/R (**Figura 23** – Pág. 85).

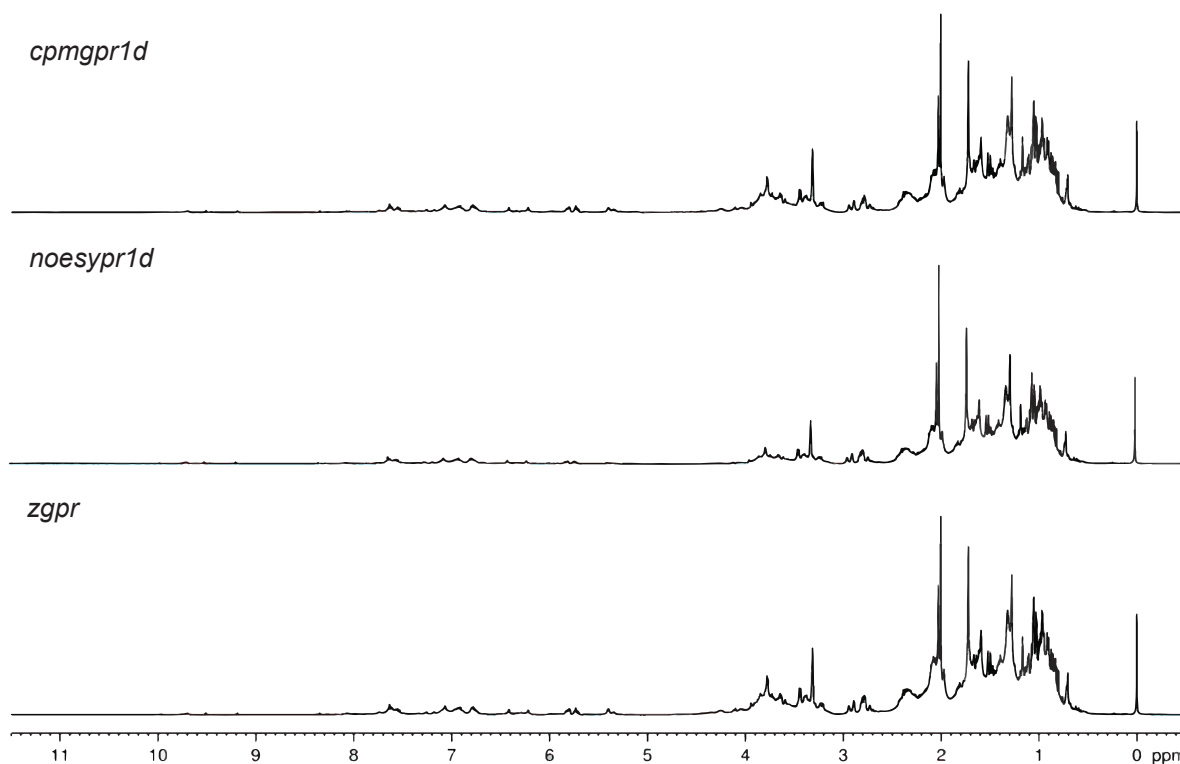


Figura 22 – Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de *B. trimera* utilizando as sequências de pulsos investigadas (400 MHz, CD_3OD).

Por fim, a avaliação do número de promediações foi realizada empregando 64, 128, 256 e 512 transientes, respectivamente (**Figura 24** – Pág. 85). Embora seja observada uma melhora na relação S/R quando se aumenta o número de transientes, nem sempre é vantajoso escolher a maior razão, uma vez que o aumento no tempo de análise é proporcional ao número de transientes. Desta maneira, foi escolhido o valor de 256 transientes por apresentar uma boa relação sinal/ruído e um tempo de aquisição de 22 minutos (**Figuras 24 e 25** – Pág. 85-86). Além disso, a intensidade do sinal obtido com 256 transientes é suficiente para permitir a atribuição dos sinais e apresenta perfil espectral semelhante ao observado ao espectro adquirido com 512 transientes.

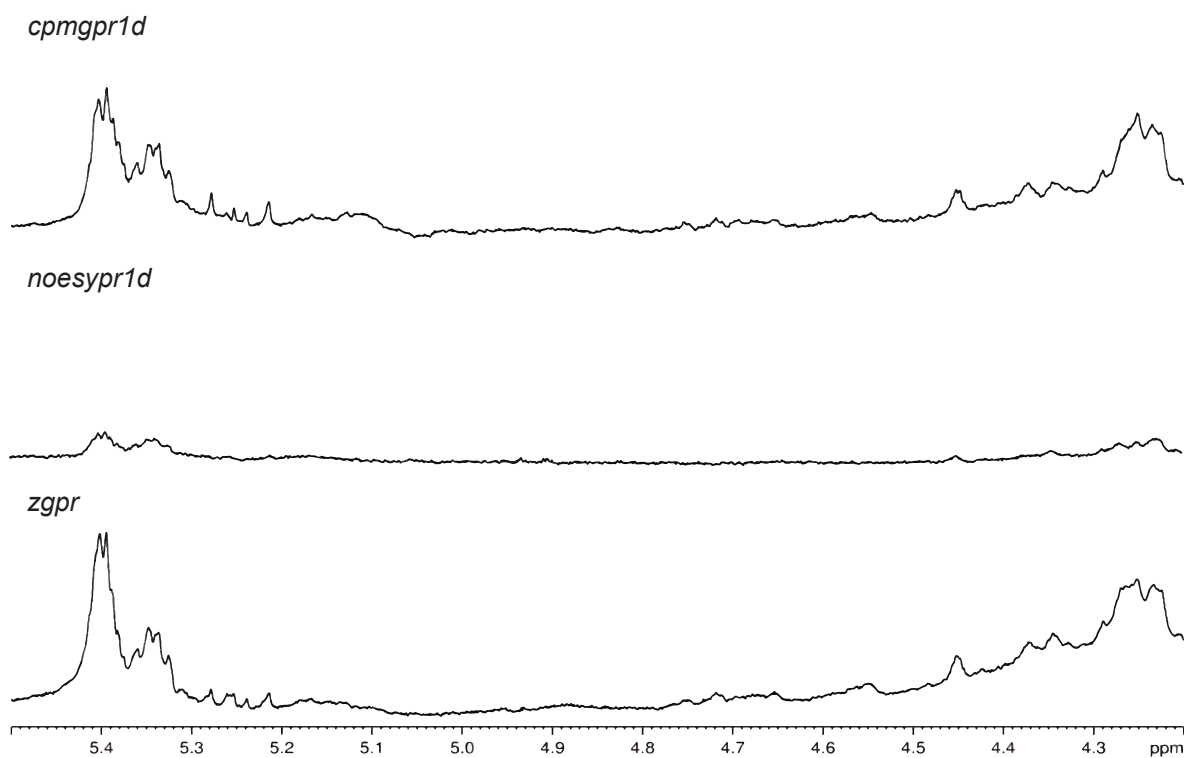


Figura 23 – Ampliação das regiões entre δ 5,50-4,20 dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de *B. trimera*, mostrando a qualidade de saturação do sinal residual de água empregando as sequências de pulsos investigadas (400 MHz, CD_3OD).

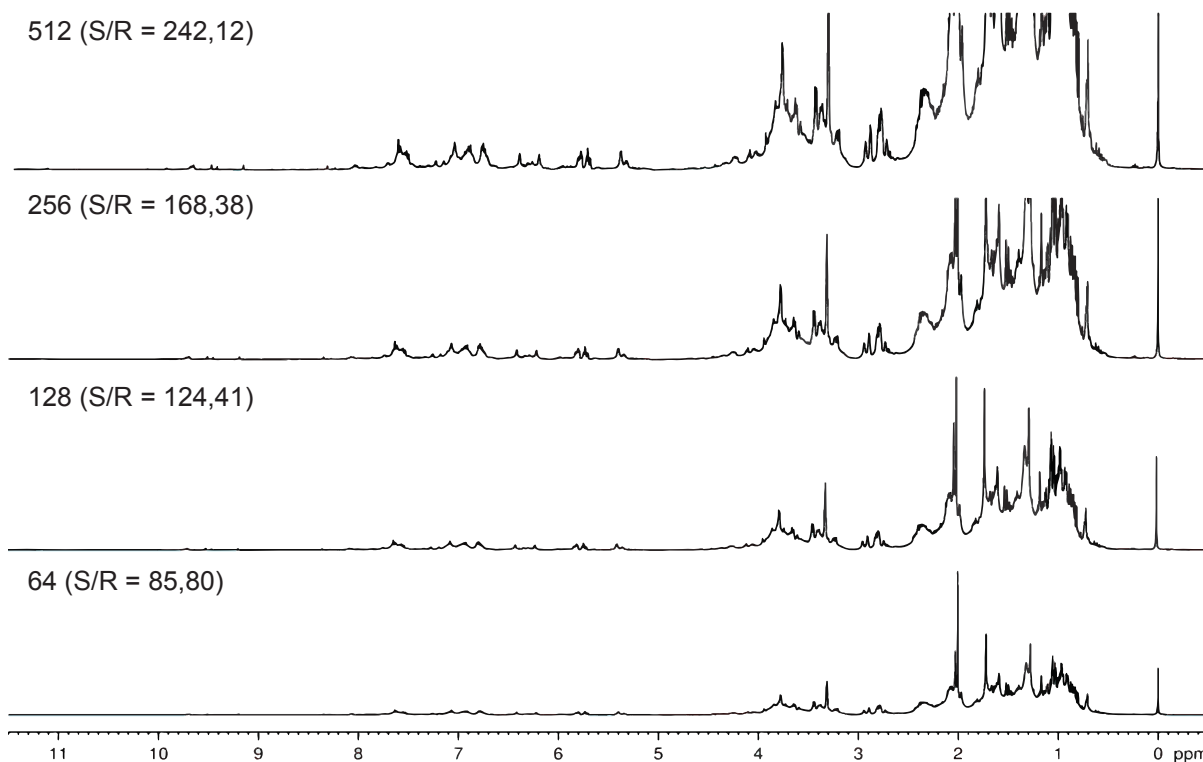


Figura 24 – Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de *B. trimera* adquiridos com diferentes números de promediações (400 MHz, CD_3OD).

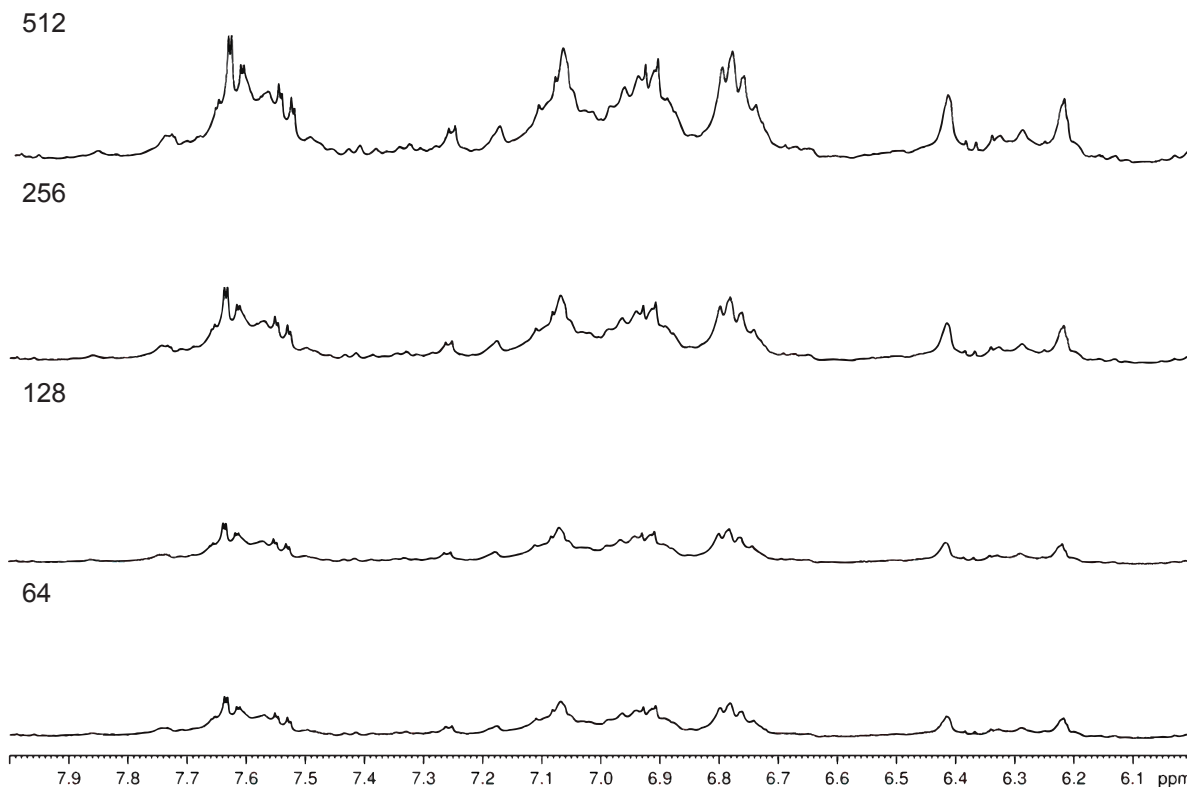


Figura 25 – Ampliação da região entre δ 8,00-6,00 dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de *Baccharis* adquiridos em diferentes números de promediações (400 MHz, CD_3OD).

4.1.4 Avaliação da Estabilidade da Amostra

A estabilidade da matriz foi analisada através da obtenção de espectros em 0, 2 e 4 h após a retirada do freezer, “*swelling*” (encharcamento) durante 0, 10, 30 e 60 min, assim como, mediante a aquisição de espectros de RMN HR-MAS de ^1H variando a velocidade de giro do rotor (4-6 kHz).

O encharcamento está relacionado ao tempo necessário para promover maior contato entre a amostra e o solvente visando garantir maior mobilidade molecular. Por sua vez, a avaliação da velocidade de giro do rotor é um parâmetro importante a ser investigado, pois a rotação a altas velocidades pode acarretar em danos mecânicos e aquecimento da amostra, resultando em problemas de reprodutibilidade dos espectros, podendo prejudicar as análises quimiométricas.

Os espectros adquiridos até 4h após a retirada do freezer não apresentaram alterações no perfil químico (**Figuras 26 e 27** – Pág. 87). Da mesma maneira, não foram verificadas variação do perfil químico entre os espectros adquiridos com encharcamento de 0, 10, 30 e 60 min e giro de 4-6 kHz (**Figuras 28 e 29** – Pág. 88).

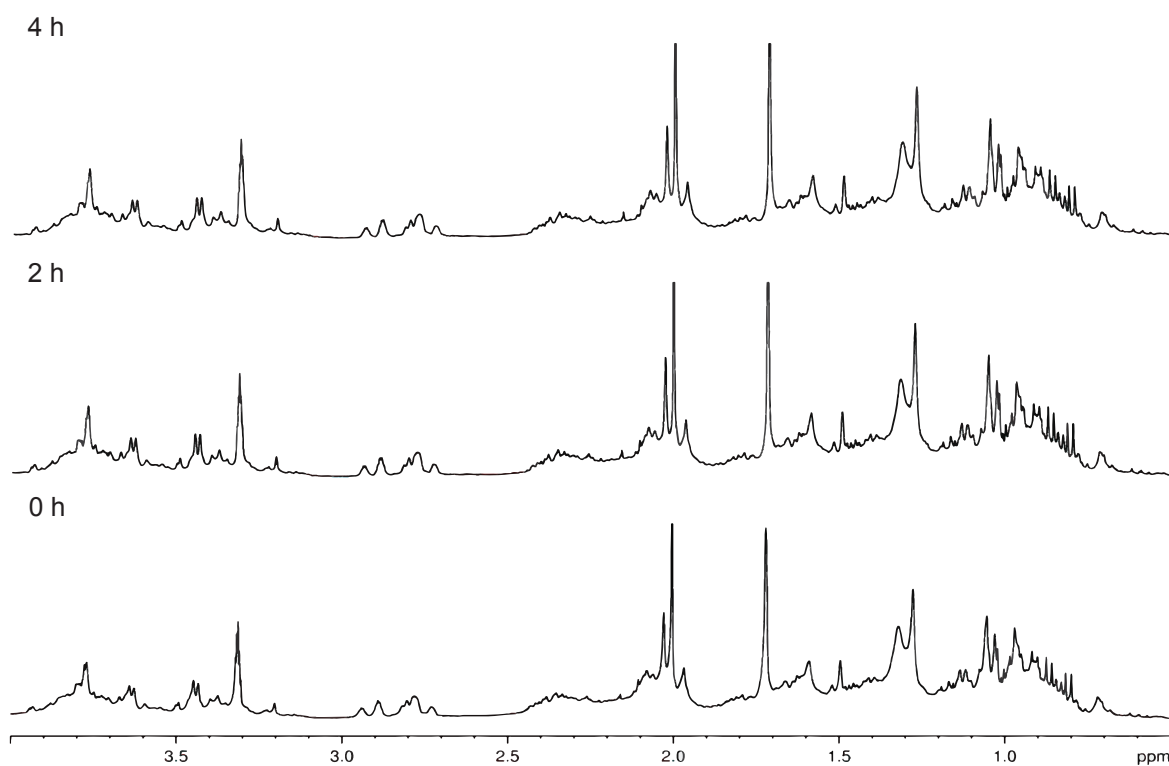


Figura 26 – Ampliação da região entre δ 4,00-0,50 dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H de *B. trimera* adquiridos em diferentes tempos após retirada do freezer (400 MHz, CD₃OD).

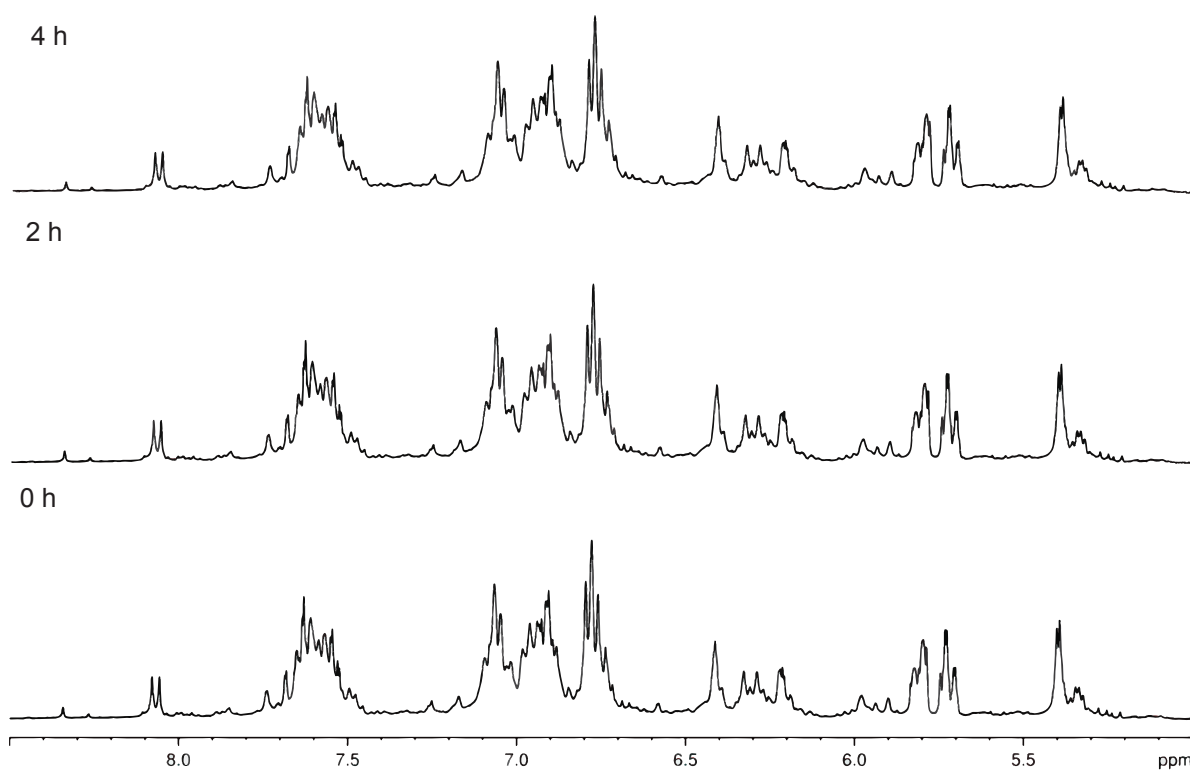


Figura 27 – Ampliação da região entre δ 8,50-5,00 dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H de *B. trimera* adquiridos em diferentes tempos após retirada do freezer (400 MHz, CD₃OD).

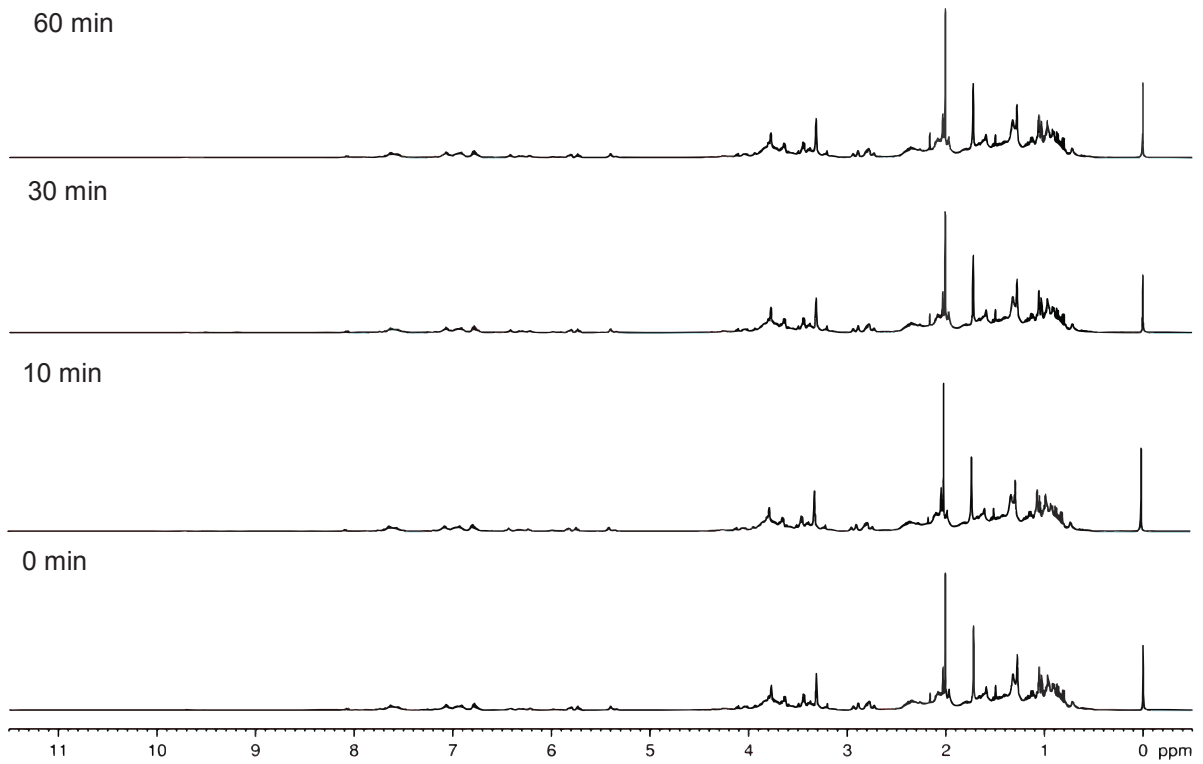


Figura 28 – Espectros de RMN HR-MAS de ¹H de *B. trimera* adquiridos com diferentes tempos de encharcamento (400 MHz, CD₃OD).

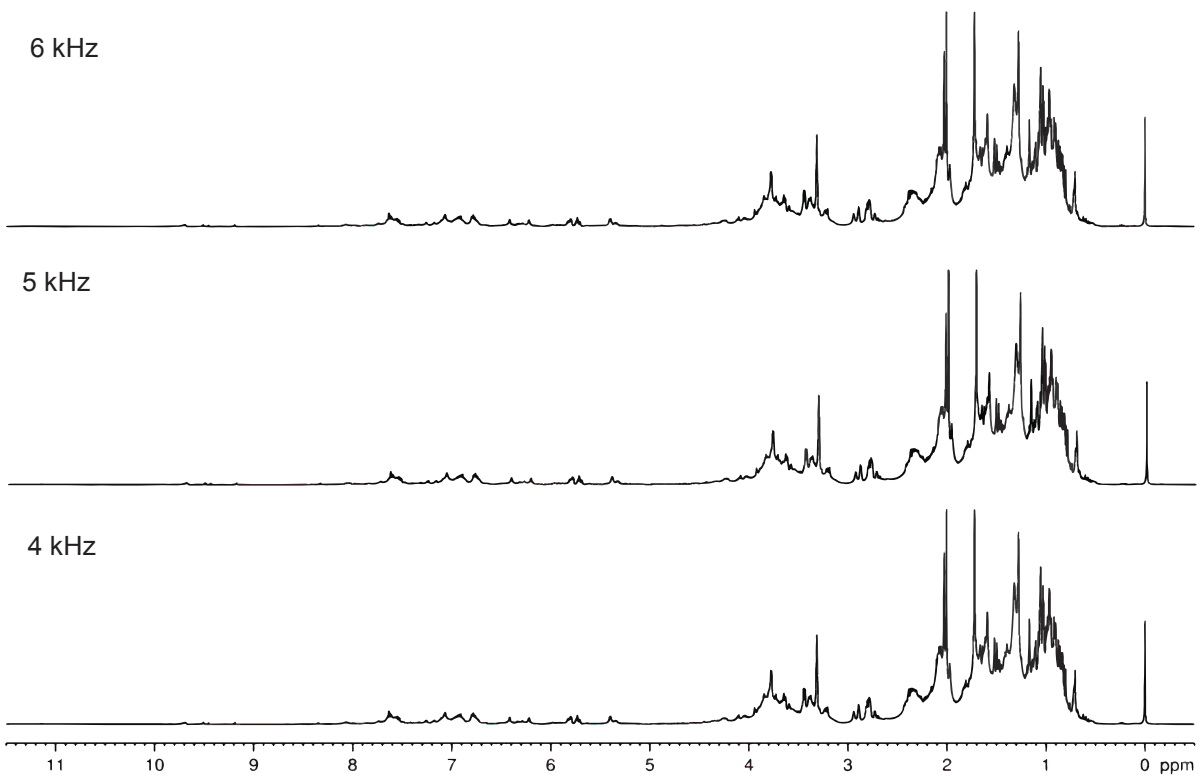


Figura 29 – Espectros de RMN HR-MAS de ¹H de *B. trimera* adquiridos com diferentes velocidades de giro (400 MHz, CD₃OD).

4.1.5 Avaliação do Preparo de Amostra

A etapa que envolve o preparo de amostra deve ser realizada com cautela e levando-se em consideração a matriz que está sendo investigada. O ideal é que o procedimento seja conduzido a baixas temperaturas para evitar alterações dos metabólitos devido ao estresse da planta (PONTES et al., 2017). Além disso, segundo Santos et al. (2015), a preparação de amostras para dados de HR-MAS para análises quimiométricas é desafiadora devido a dificuldades de reprodutibilidade durante o processo de empacotamento do rotor. Para contornar este problema, é importante determinar a quantidade de amostra e solventes de tal forma que o rotor fique bem preenchido, mas não haja extravasamento do material.

Visando obter resultados reprodutíveis, os espectros foram adquiridos de forma a obter perfis similares entre as espécies investigadas e um bom ajuste da homogeneidade do campo magnético (*shimming*), garantindo uma reprodutibilidade satisfatória. Na RMN HR-MAS existem regiões de conservação de susceptibilidade magnética na interface rotor/amostra, ao longo do eixo do rotor e nas interfaces superior e inferior. Como o rotor está sujeito a perturbações magnéticas, ao girar juntamente com a amostra, o efeito da susceptibilidade magnética torna-se ausente na mesma, devido ao giro no ângulo mágico a altas velocidades. Essa propriedade torna o *shimming* ideal na RMN HR-MAS independente da amostra e do solvente utilizado, contanto que o rotor esteja posicionado corretamente dentro da sonda e que o volume observado seja o mesmo (PIOTTO et al., 2005).

Dessa forma, os espectros de RMN HR-MAS de ^1H das diferentes amostras de *Baccharis* empregando a metodologia descrita na parte experimental permitiu-nos observar a qualidade dos espectros obtidos verificando a qualidade do *shimming* por meio do monitoramento do sinal do TMS (**Figura 30** – Pág. 90).

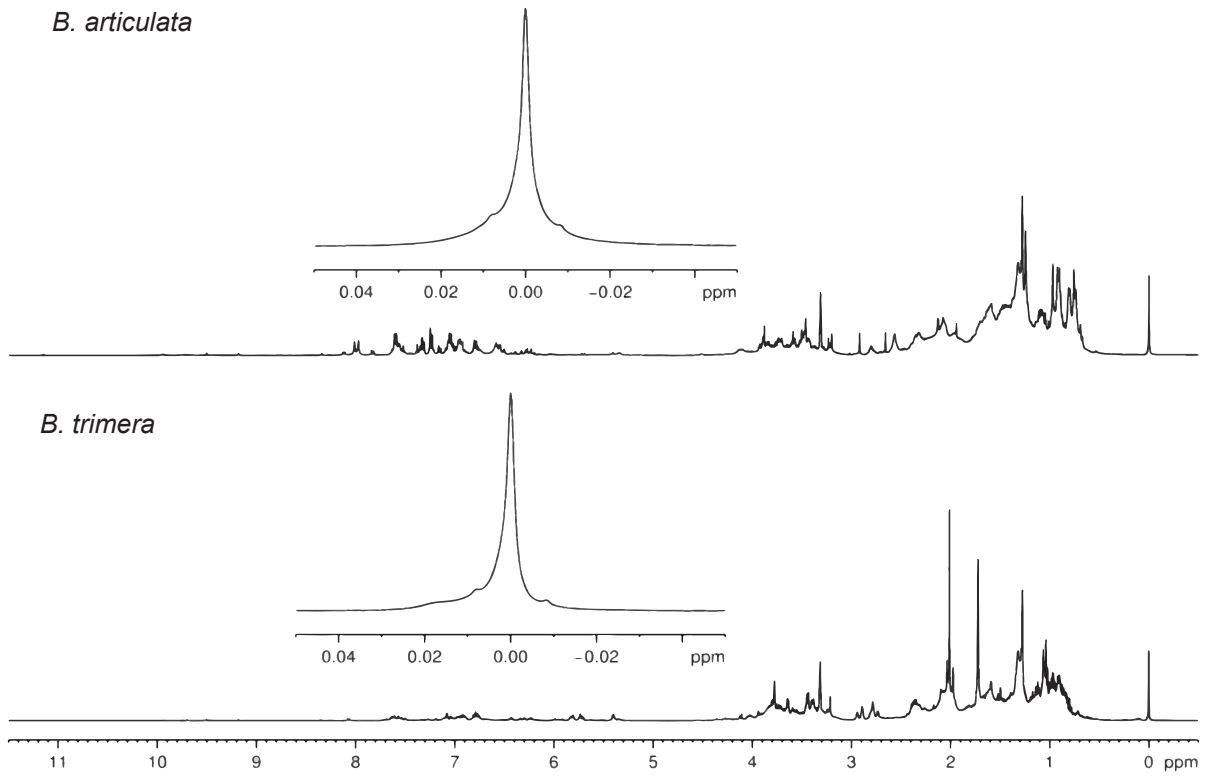


Figura 30 – Espectros de RMN HR-MAS de ^1H de diferentes espécies de *Baccharis* (400 MHz, CD_3OD).

4.2 PERFIL ESPECTRAL DAS ESPÉCIES DE *Baccharis* (ASTERACEAE)

A autenticidade e o controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos geralmente é baseado na observação de marcadores químicos. No entanto, nem sempre a existência de marcadores na planta é uma garantia da qualidade do produto, pois alguns compostos podem ser facilmente adicionados ao material vegetal. Além disso, dependendo da técnica analítica empregada para tal avaliação não se observa a existência de impurezas no material vegetal.

Assim, o perfil espectral obtido por RMN HR-MAS pode ser um método eficiente de avaliação da autenticidade e controle de qualidade, uma vez que é possível observar todos os metabólitos representativos da matriz investigada em um único espectro. A avaliação simplificada das características morfológicas de espécies vegetais pode levar a uma classificação botânica equivocada entre espécies morfológicamente similares, como ocorre com as espécies de *Baccharis*.

A identificação botânica de espécies vegetais é realizada em espécies floridas. No entanto, amostras coletadas fora da época de floração, bem como, a moagem do material impossibilita a identificação adequada do material vegetal. Neste sentido, a análise de espectros de RMN HR-MAS pode fornecer informações relevantes o suficiente para auxiliar na autenticidade de plantas medicinais comercializadas como de *B. trimera*.

Uma vez estabelecido o protocolo de análises, espectros de RMN de HR-MAS ^1H foram obtidos para as amostras de referência previamente identificadas por um especialista no gênero, bem como, amostras comerciais. O perfil espectral das diferentes espécies de *Baccharis* investigadas neste trabalho permitiu observar similaridades químicas entre elas, principalmente entre as espécies *B. trimera* e *B. myriocephala* (**Figuras 31 e 32** – Pág. 92). A análise visual permitiu-nos evidenciar que a composição química dessas espécies é rica em compostos alifáticos, ácidos graxos, aminoácidos, bem como, compostos aromáticos (**Figuras 31 e 32** – Pág. 92).

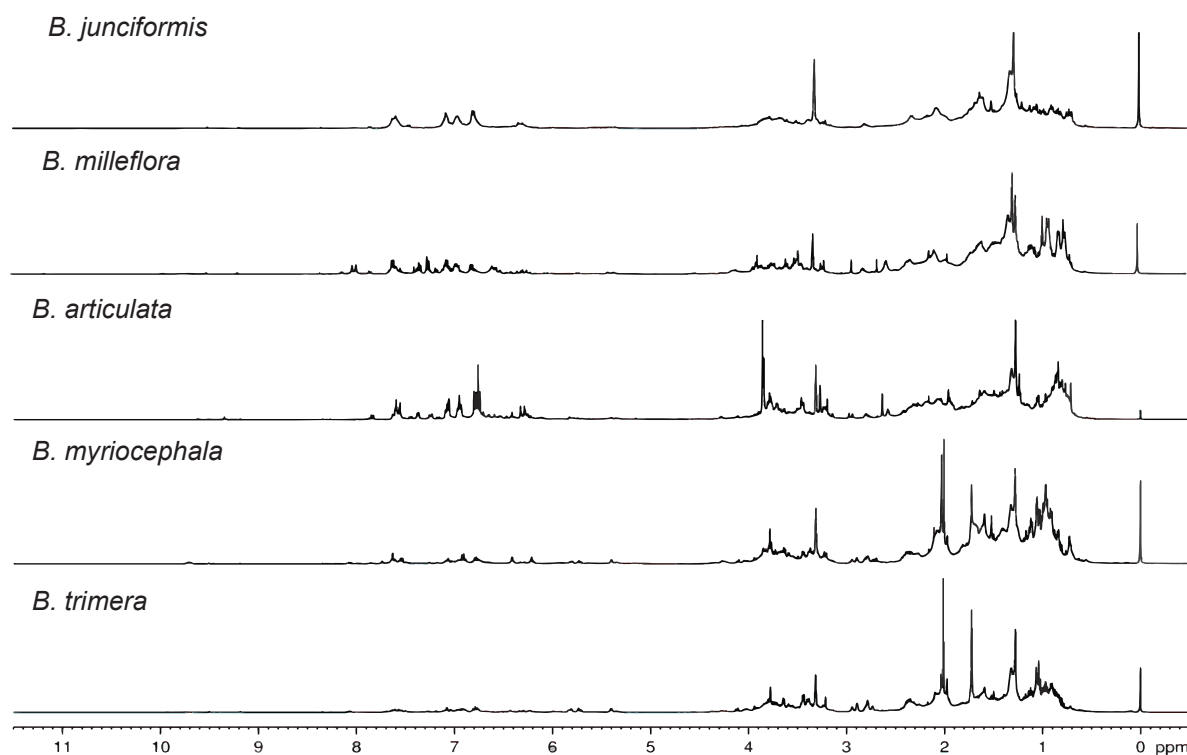


Figura 31 – Espectros de RMN HR-MAS de ^1H das espécies de *Baccharis* investigadas neste trabalho (400 MHz, CD_3OD).

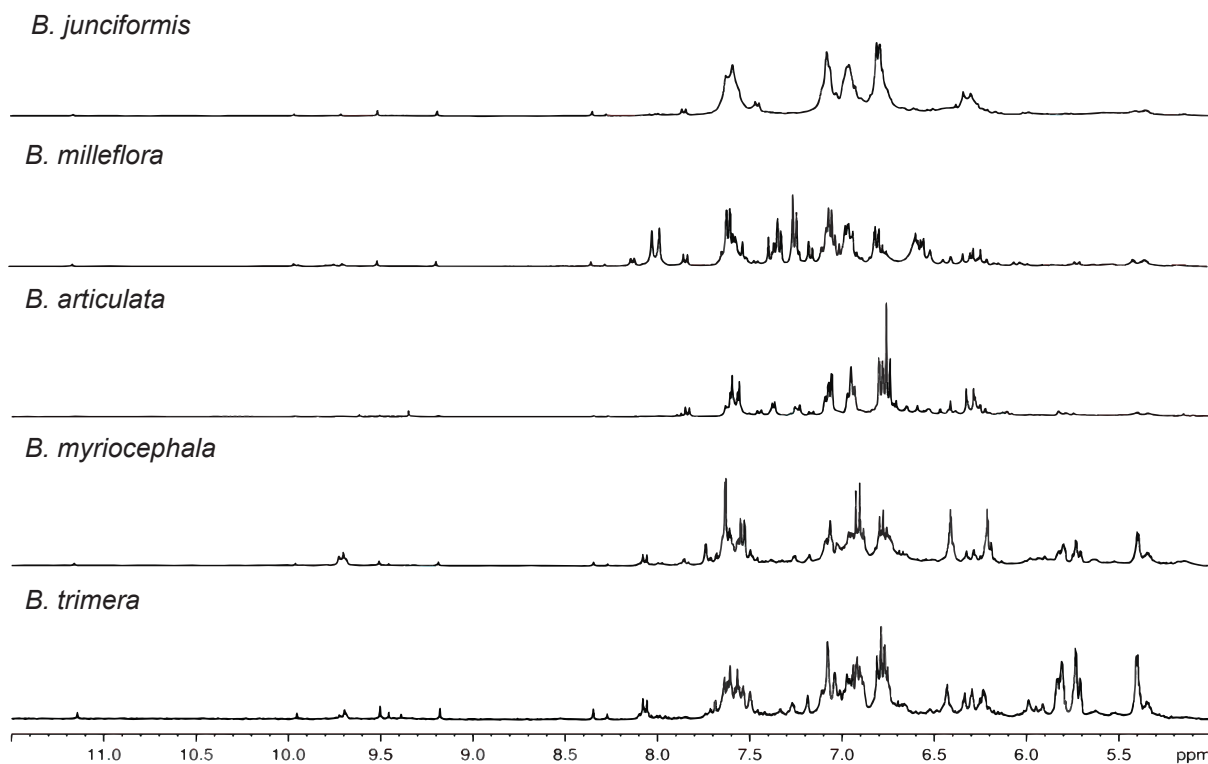


Figura 32 – Ampliação da região entre δ 11,50-6,00 dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de diferentes espécies de *Baccharis* (400 MHz, CD_3OD).

A análise visual dos espectros torna-se laboriosa e em muitos casos inconclusiva, devido à presença de muitos compostos, gerando informações de grande complexidade em virtude da grande quantidade de sinais. (**Figuras 31 e 32** – Pág. 92). Com a finalidade de analisar esses dados, a quimiometria tem se mostrado uma ferramenta útil, tornando possível verificar correlações entre as espécies investigadas e encontrar possíveis compostos que permitam diferenciar essas espécies, pois reduz a complexidade dos dados evidenciando informações relevantes. Além disso, somente *B. trimera* é reconhecida pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição e pela RENISUS por possuir propriedades medicinais.

O conhecimento da matriz investigada anteriormente a análise quimiométrica é de suma importância, pois pode facilitar a identificação de metabólitos que apresentam importância na discriminação observada na análise quimiométrica.

A análise do espectro de RMN HR-MAS revelou a presença de sinais em δ 5,72 e 5,80 (2H, *m*) atribuídos a hidrogênios olefínicos, bem com os simpletos representativos grupos metílicos em δ 1,73 (3H, *sl*) e δ 1,99 (3H, *s*) característicos do acetato de carquejila nas espécies *B. trimera* e *B. myriocephala*. Observou-se ainda a presença de sinais atribuídos aos hidrogênios metilênicos de ácidos graxos em δ 1,28 e 1,31 (**Figuras 33 e 34** – Pág. 94-95). O acetato de carquejila é constantemente encontrado nos óleos essenciais de *B. trimera* (SIMÕES-PIRES et al., 2005a; MINTEGUIAGA et al.; 2018). No entanto, é relatado pela primeira vez em *B. myriocephala*.

Por sua vez, a análise da região aromática das espécies *B. trimera* e *B. myriocephala* mostrou a presença de sinais característicos dos flavonoides 3-O-metilquercetina, quercetina e canferol devido à existência de três pares de dupletos condizentes com o anel A de flavonoides em δ 6,21 e 6,41 (*d*, $J = 2,2$ Hz), δ 6,18 e 6,39 (*d*, $J = 2,0$ Hz), δ 6,22 e 6,40 (*d*, $J = 2,0$ Hz), respectivamente. Além disso, foi observado dupletos em δ 6,90 (*d*, $J = 2,2$ Hz), 7,53 (*dd*, $J = 8,5$ e $2,2$ Hz), δ 7,62 (*d*, $J = 2,2$ Hz) e δ 6,90 (*d*, $J = 8,9$ Hz), típicos do anel B desses flavonoides. A diferença entre a 3-O-metilquercetina e quercetina reside no anel C, pois na quercetina é observada uma hidroxila em C-3, enquanto a 3-O-metilquercetina possui uma metoxila na referida posição (**Figuras 33 e 34** –Pág. 94-95).

A presença do duplete em δ 8,06 (2H, *d*, $J = 8,9$ Hz) pode ser atribuído ao hidrogênio do sistema para-substituído do canferol, enquanto a 3-O-metilquercetina e quercetina foram identificadas anteriormente na espécie *B. trimera* (VERDI et al.,

2004; SIMÕES-PIRES et al., 2005). Estes compostos não foram identificados nas outras espécies estudadas neste trabalho.

A presença da quercetina e 3-O-metilquercetina corrobora com a identificação de *B. trimera* recomendada pela Farmacopeia Brasileira através do método clássico baseado em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) (ANVISA, 2010). No entanto, a existência desses compostos nas amostras não significa que outras plantas não foram adicionadas, uma vez que estes flavonoides não são específicos de *B. trimera*. Desta maneira, identificar esses flavonoides em *B. trimera* não é garantia de autenticidade do produto.

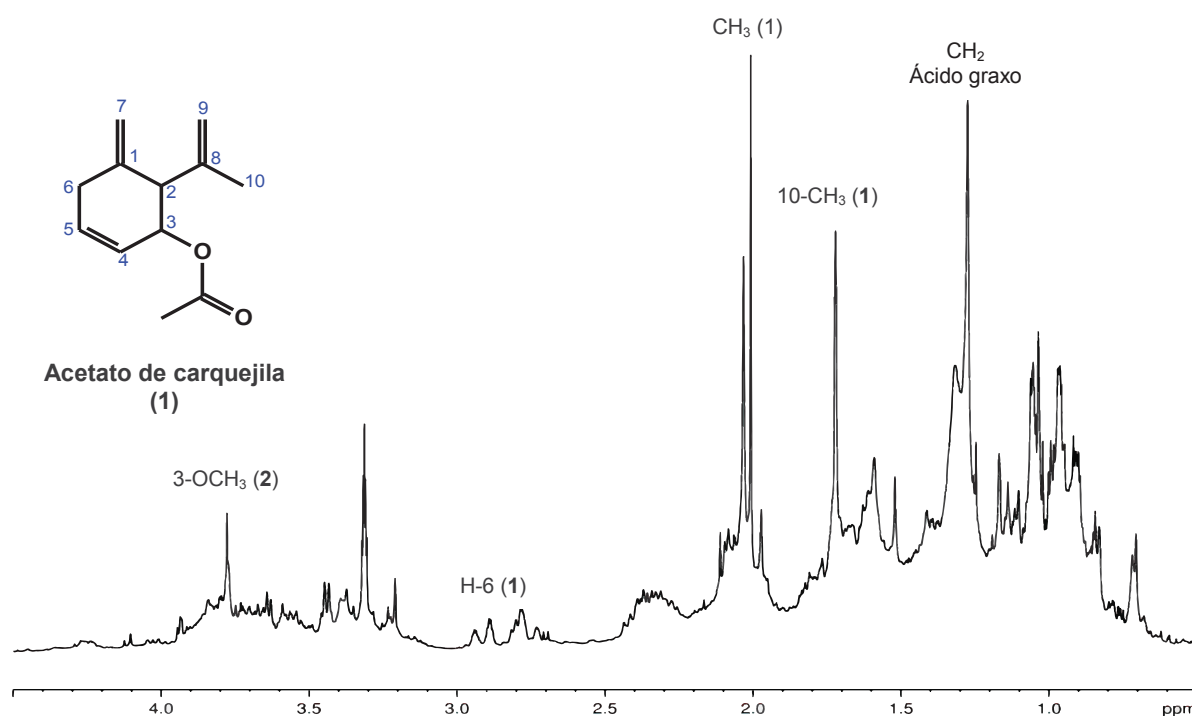


Figura 33 – Ampliação da região entre δ 4,50-0,50 dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H de *B. trimera* (400 MHz, CD₃OD).

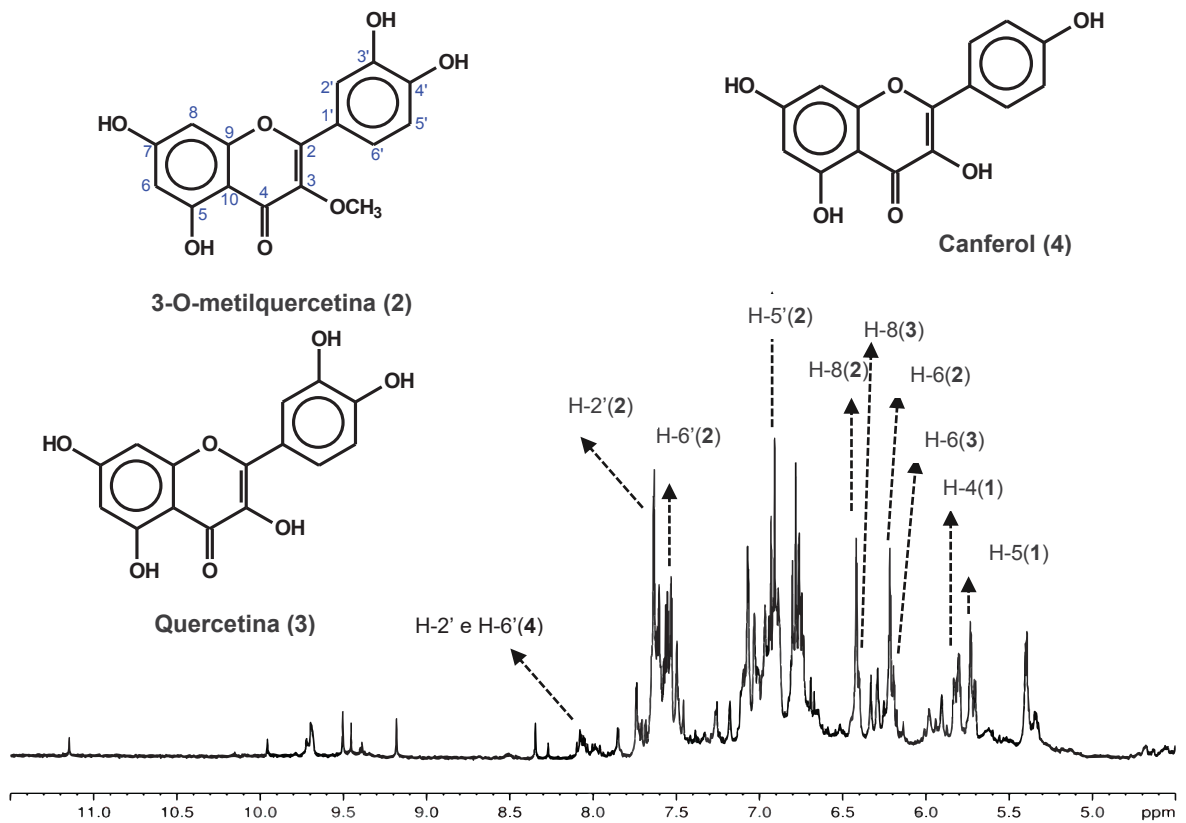


Figura 34 – Ampliação da região entre δ 11,50-4,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de *B. trimera* (400 MHz, CD_3OD).

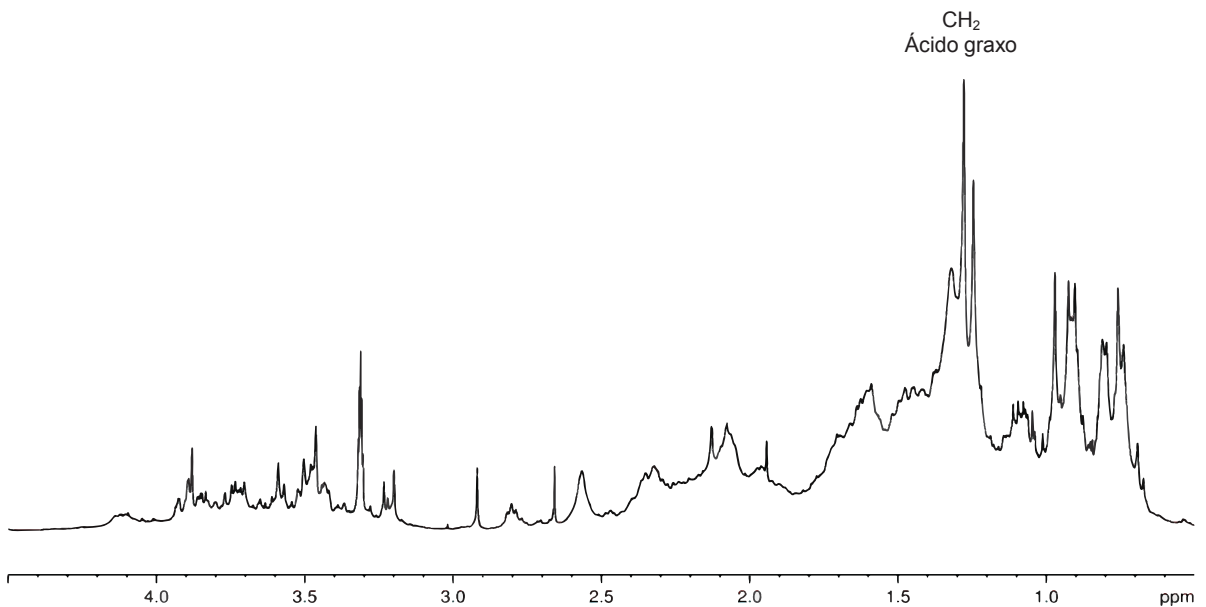


Figura 35 – Ampliação da região entre δ 4,50-0,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de *B. milleflora* (400 MHz, CD_3OD).

A análise do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de *B. milleflora* revelou a presença de dois pares de dupletos em δ 6,52 e 7,97 (d , $J = 16,2$ Hz), e δ 6,02 e 6,96 (d , $J = 12,6$ Hz), relacionados aos hidrogênios em C-7 e C-8 do *trans* e *cis*-melilotosídeo, respectivamente (**Figura 36** – Pág. 96). Observou-se ainda a existência de um sistema para-substituído em δ 6,95 e 7,83 (d , $J = 8,8$ Hz), bem como, um simpleto em δ 6,58 atribuídos a apigenina, enquanto o simpleto em δ 7,34 pode ser atribuído ao ácido siríngico (**Figura 36** – Pág. 96).

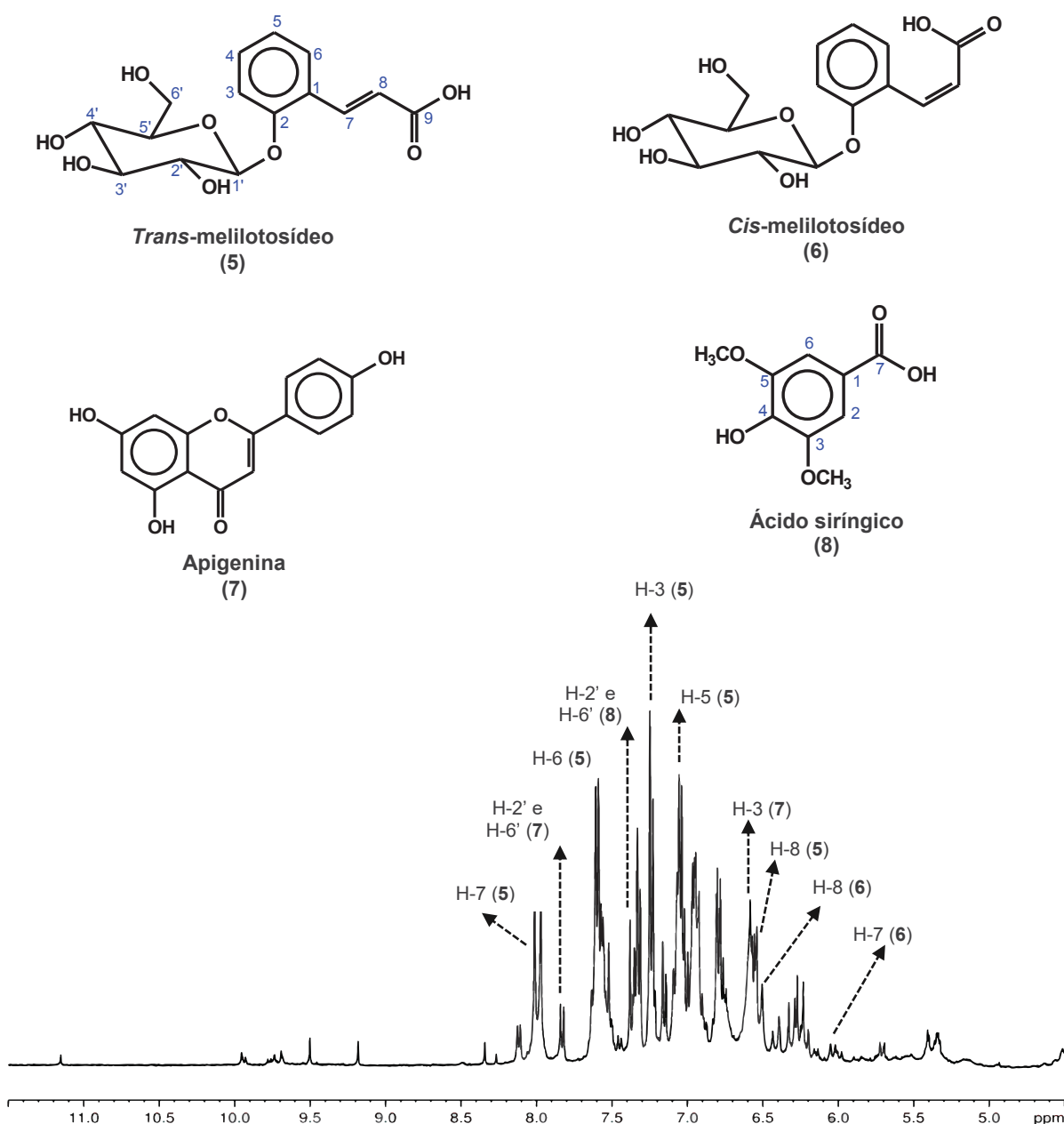


Figura 36 – Ampliação da região entre δ 11,50-4,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de *B. milleflora* (400 MHz, CD_3OD).

As amostras de *B. articulata* provenientes do Rio Grande do Sul apresentaram sinais intensos em toda a região espectral (**Figuras 31 e 32** – Pág. 92). Foram observados simpletos em δ 3,85, 3,84 e 3,83, representativos de grupos metoxílicos (**Figura 36** – Pág. 96). Verificou-se ainda, a presença de sinais típicos de ligações duplas *trans* em δ 6,30 e 7,58 (*d*, $J = 15,9$ Hz) atribuídos ao H-7 e H-8 do cafeato de 4'-*O*- β -glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzila (Ball), bem como três simpletos em δ 6,75, 6,73 e 6,70, cuja integração refere-se a 2 hidrogênios, respectivamente (**Figuras 37 e 38** – Pág. 97-98). Diante das observações verificadas no espectro em comparação com dados da literatura foi possível a presença dos compostos cafeato de 4'-*O*- β -glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzila (Ball), carbonato de 4-*O*- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-tetraidro-2H-piran-2-il-acetil (BallI) e 4-*O*- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-metanol (BaIV) (**Figuras 37 e 38** – Pág. 97-98) (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA, 2008).

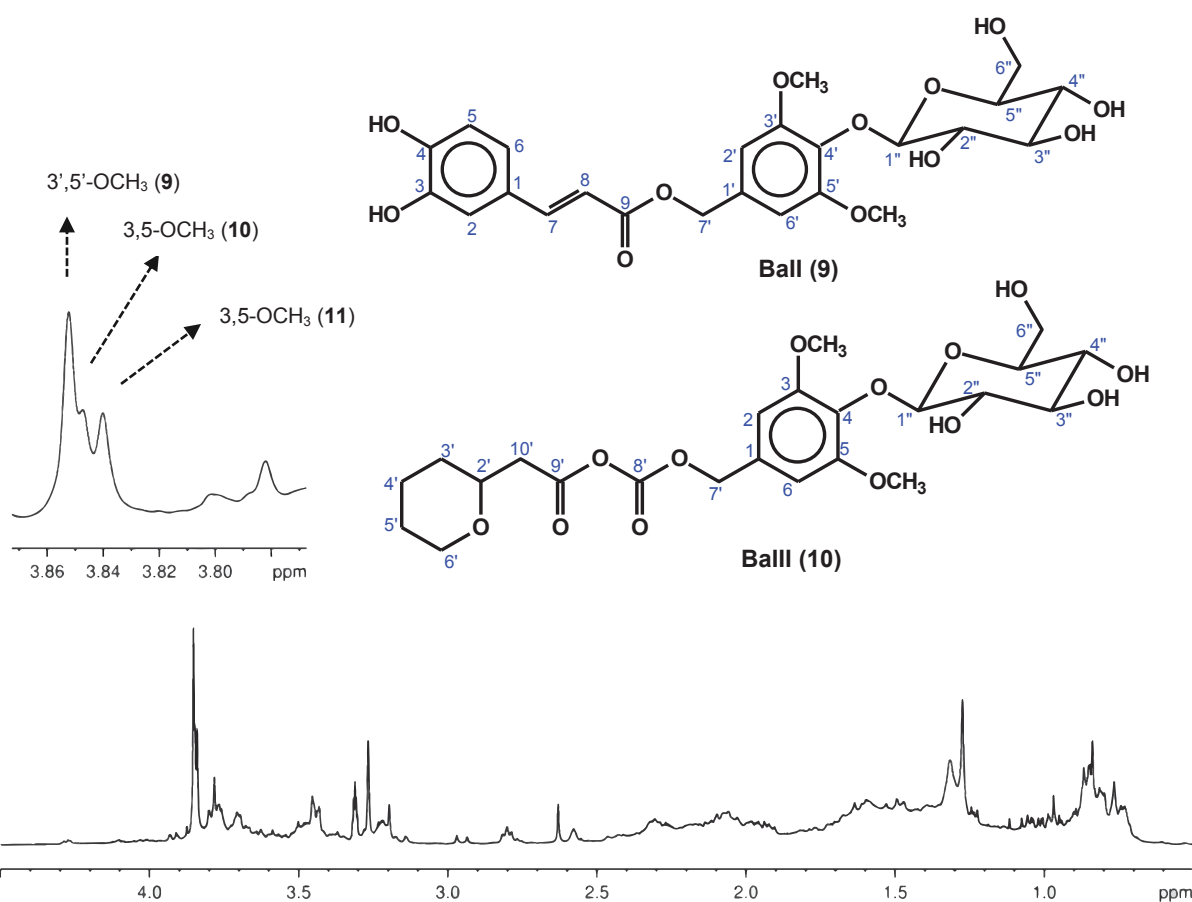


Figura 37 – Ampliação da região entre δ 4,50-0,50 do espectro de RMN HR-MAS de ¹H de *B. articulata* (RS) (400 MHz, CD₃OD).

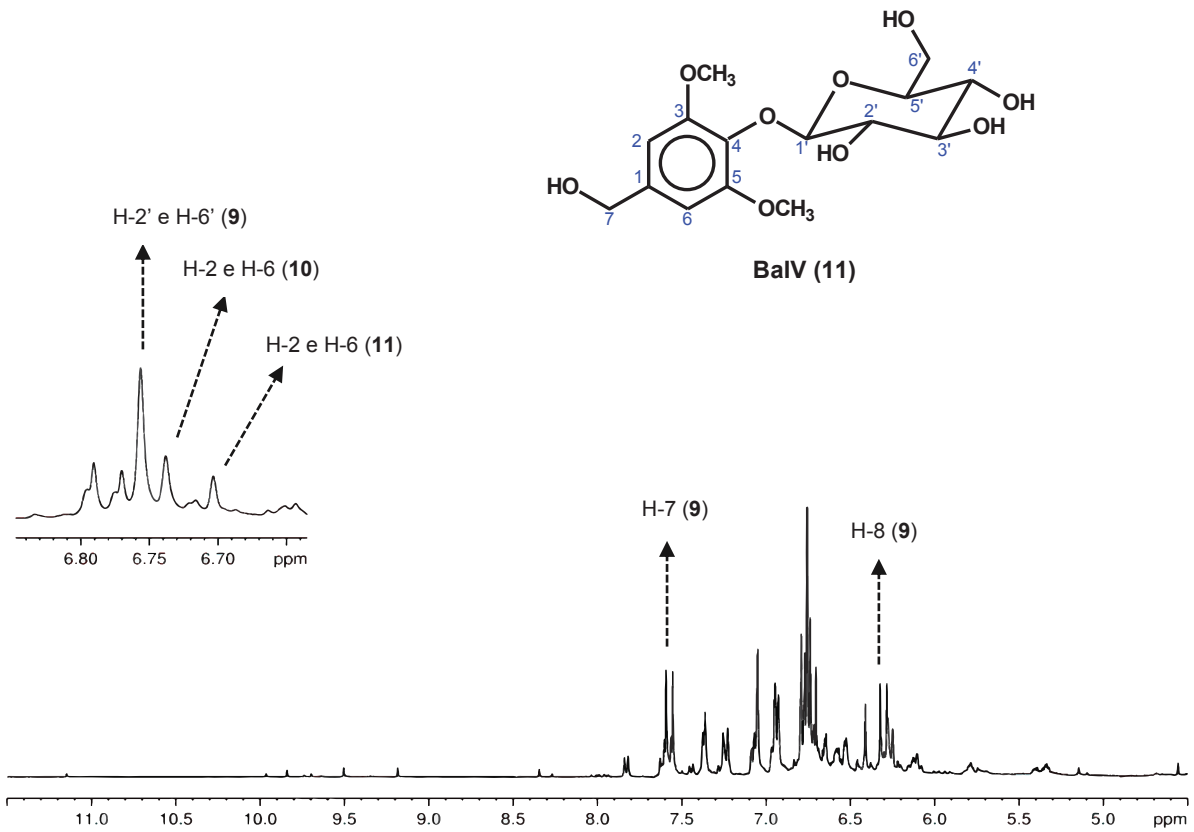


Figura 38 – Ampliação da região entre δ 11,5-4,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de *B. articulata* (RS) (400 MHz, CD_3OD).

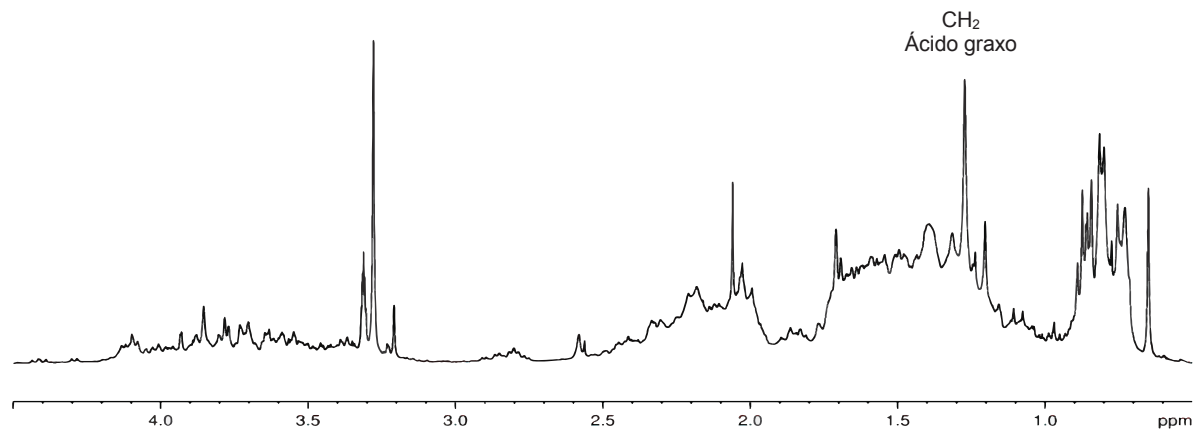


Figura 39 – Ampliação da região entre δ 4,50-0,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de *B. articulata* (PR) (400 MHz, CD_3OD).

Da mesma forma que a espécie *B. milleflora*, a espécie *B. articulata* proveniente do estado do Paraná revelou sinais característicos de sistema para-substituído em δ 6,93 e 7,84 (*d*, $J = 8,8$ Hz), típico do anel C, assim como um simpleto em δ 6,59, atribuído ao hidrogênio em C-3 da apigenina (**Figuras 40** – Pág. 99). Além da apigenina, observou-se a existência de sinais relativos às ligações duplas *trans* em δ 7,28 e 7,58 (*d*, $J = 15,9$ Hz), e δ 6,38 e 7,61 (*d*, $J = 15,9$ Hz), característicos do ácido 3,5-dicafeoilquínico.

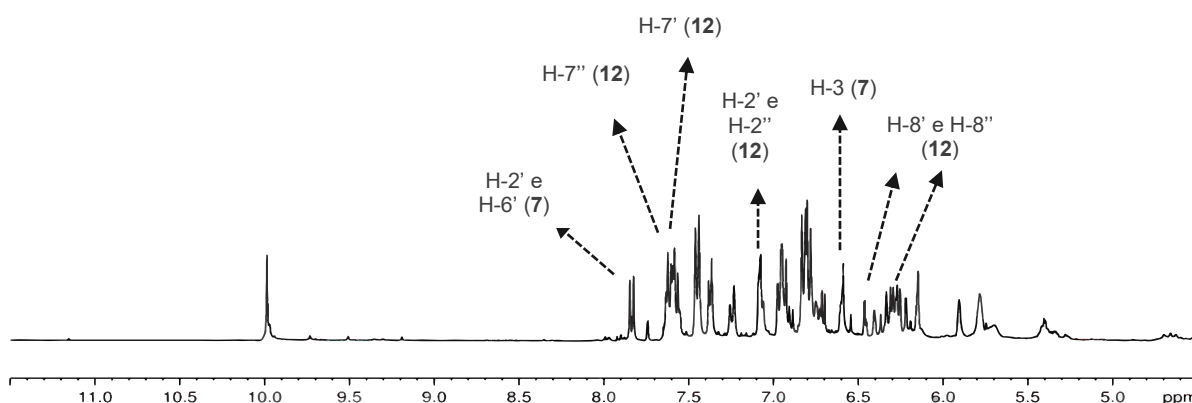
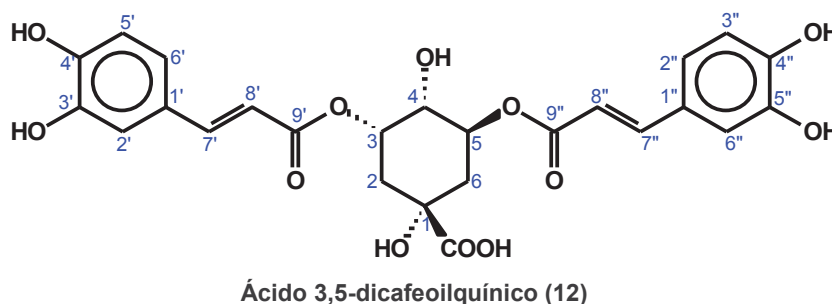


Figura 40 – Ampliação da região entre δ 11,50-4,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de *B. articulata* (PR) (400 MHz, CD_3OD).

A análise do espectro de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de *B. junciformis* permitiu observar menor presença de sinais que nas espécies mencionadas anteriormente. Da mesma forma que constatado em *B. articulata*, foi verificada a presença do ácido 3,5 dicafeoilquínico (**Figuras 41 e 42** – Pág. 100). Verificou-se ainda a presença dos sinais em δ 6,76 e 6,92 atribuídos aos hidrogênios em C-5 e C-6 do ácido cafeico (**Figura 42** – Pág. 100).

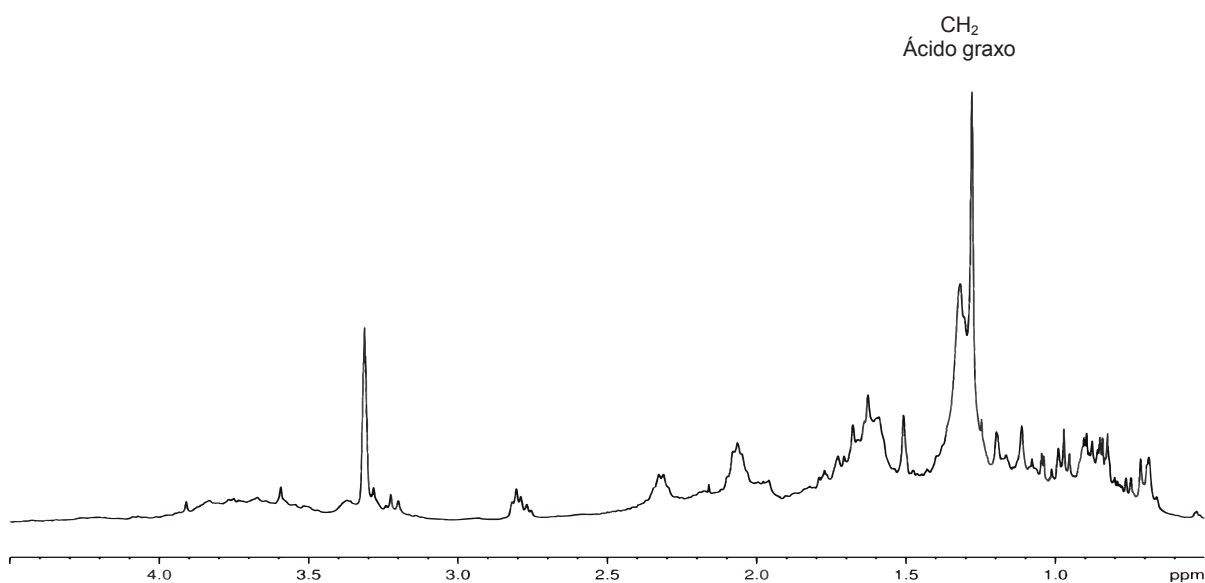
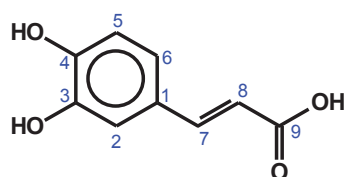


Figura 41 – Ampliação da região entre δ 4,50-0,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de *B. junciformis* (400 MHz, CD_3OD).



Ácido cafeico
(13)

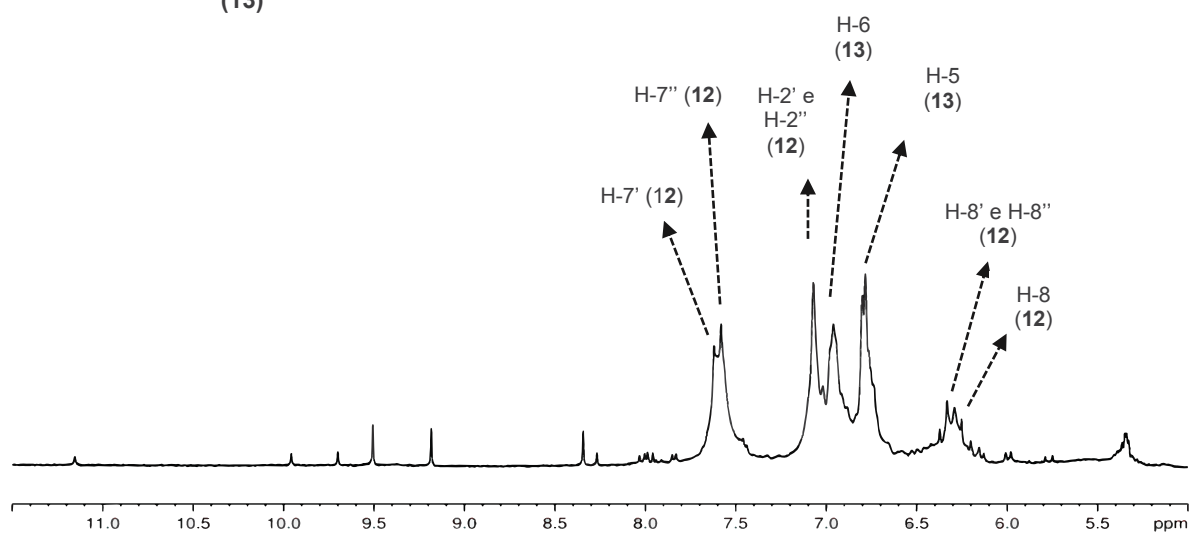


Figura 42 – Ampliação da região entre δ 11,50-5,50 do espectro de RMN HR-MAS de ^1H de *B. junciformis* (400 MHz, CD_3OD).

Dessa forma, a análise do perfil espectral das espécies de *Baccharis* investigadas neste trabalho permitiu observar que estas são caracterizadas por apresentar sinais nas regiões aromática e alifática. As espécies de *B. trimeria* e *B. myriocephala* podem ser caracterizadas pela presença do monoterpene acetato de carquejila, e dos flavonoides quercetina, 3-O-metilquercetina e canferol. Estes compostos não foram observados nas outras espécies.

A presença do *trans* e *cis*-melilotosideo, assim como do ácido siríngico foi constatada somente em *B. milleflora*. Por sua vez, o flavonoide apigenina foi observado em *B. articulata* e *B. milleflora*. No entanto, os compostos cafeato de 4'-O- β -glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzila (BaII), carbonato de 4-O- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-tetrahydro-2H-piran-2-il-acetil (BaIII) e 4-O- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-metanol (BaIV) foram identificados unicamente em *B. articulata*. Já o ácido 3,5-dicafeoilquínico foi observado em *B. junciformis* e *B. articulata*, enquanto o ácido cafeico foi identificado somente em *B. junciformis*. Os metabólitos identificados confirmam que estas espécies correspondem a uma fonte rica de compostos fenólicos e alifáticos (monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos), corroborando com o que tem sido observado na literatura.

4.3 CONFIRMAÇÃO ESTRUTURAL DOS METABÓLITOS IDENTIFICADOS POR RMN HR-MAS

Os metabólitos identificados através dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H foram atribuídos com auxílio de experimentos bidimensionais obtidos por RMN em solução, tais como, ^1H - ^1H (COSY), mapas de correlação direta ^1H - ^{13}C (HSQC) e correlação a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC). O espectro de RMN de ^1H em solução permitiu verificar a presença de sinais além dos observados no perfil espectral obtido por RMN HR-MAS de ^1H , como resultado do processo de extração realizado em solução (**Figura 43** – Pág. 102).

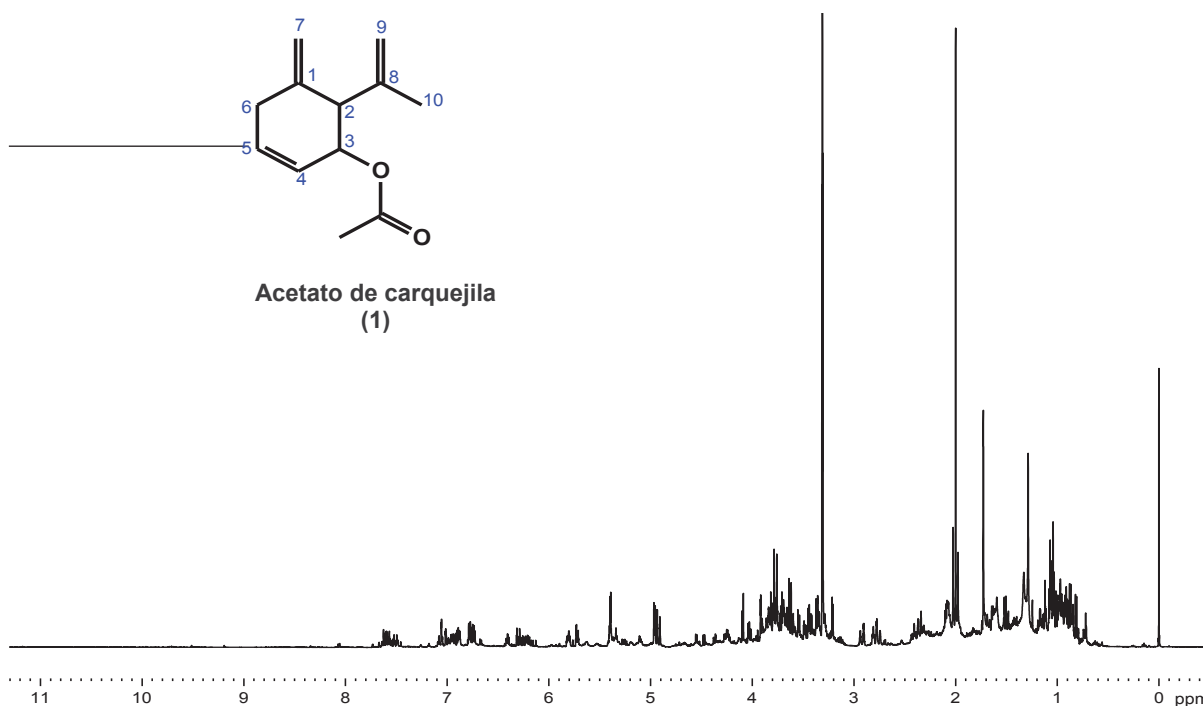


Figura 43 – Espectro de RMN de ^1H de *B. trimera* (600 MHz, CD_3OD).

A existência do acetato de carquejila em *B. trimera* e *B. myriocephala* foi confirmada devido à presença dos simpletos em δ 1,73 (3H, *s*) e δ 2,01 (3H, *s*), relativos aos grupos metílicos ligados em C-10 e ao substituinte acetato, devido a correlação a longa distância ^1H - ^{13}C com o carbono em δ 173,2, respectivamente (**Figura 44** e **49** – Pág. 103, 107). O primeiro simpleto apresentou correlação a longa

distância ^1H - ^{13}C com os carbonos em C-2, C-8 e C-9 em δ 53,2 142,8 e 113,7 (**Figura 49** – Pág. 107), respectivamente. Observou-se ainda, a existência de hidrogênios metilênicos em δ 4,59, 4,90, 4,93 e 4,96 caracterizados por simpletos largos relativos a um hidrogênio cada, os quais apresentaram correlação direta com os carbonos em C-7 e C-9, cujos sinais mostraram correlação a longa distância com C-2 (**Figura 44, 48 e 49** – Pág. 103, 106-107). Os multipletos em δ 5,72 e 5,80 foram atribuídos aos hidrogênios metínicos ligados a C-4 e C-5 do acetato de carquejila devido a correlação direta com os carbonos em δ 127,6 e 130, 3, respectivamente (**Figura 45 e 48, Tabela 7** – Pág. 104, 106-107).

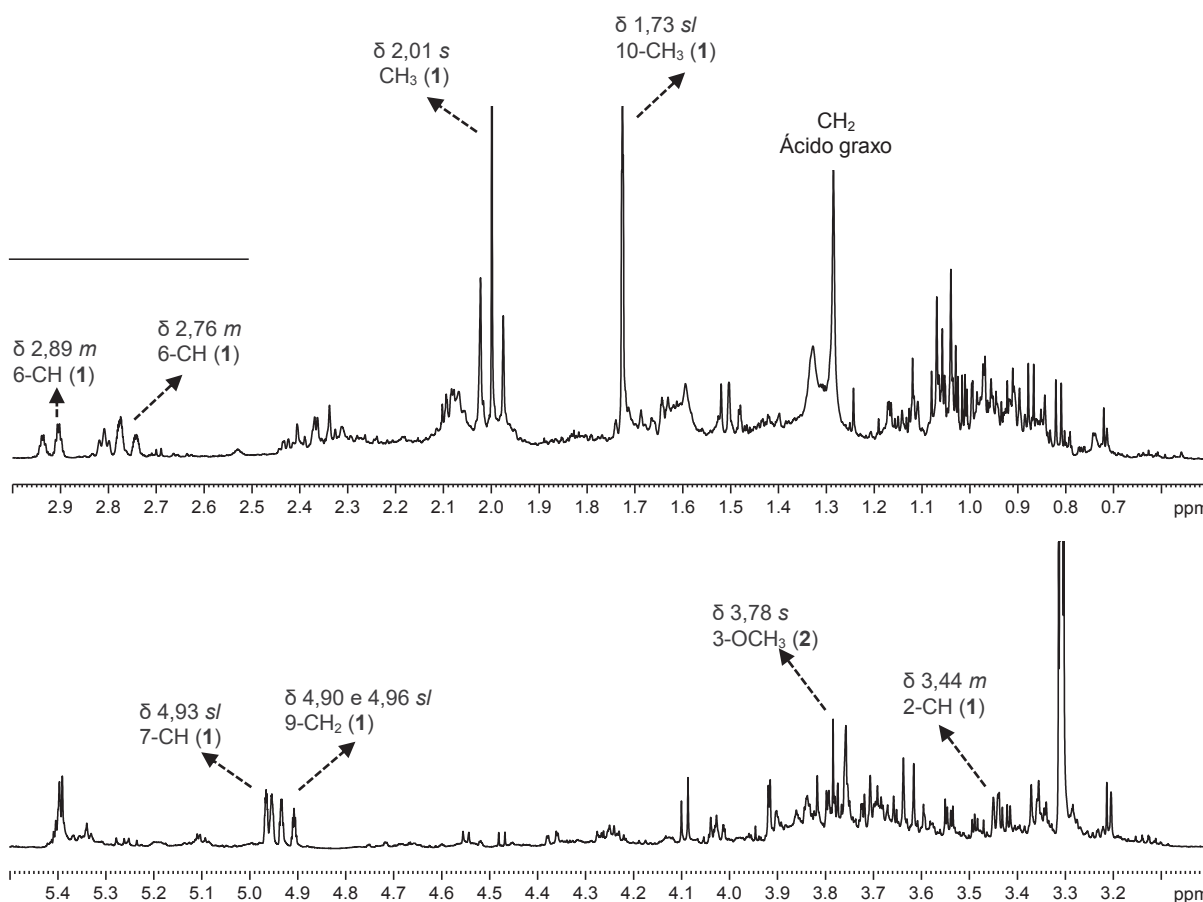


Figura 44 – Ampliação da região entre δ 5,50-0,50 do espectro de RMN de ^1H de *B. trimera* (600 MHz, CD_3OD).

Nos espectros de *B. trimera* e *B. myriocephala* foi possível observar ainda quatro pares de dupletos em δ 6,18 e 6,38 (2H, *d*, $J = 2,0$ Hz), δ 6,21 e 6,41 (2H, *d*, $J = 2,1$ Hz), característicos dos hidrogênios aromáticos de acoplamento meta dos flavonoide quercetina e 3-*O*-metilquercetina (**Figura 45** – Pág. 104), cujos hidrogênios

em δ 6,18 e 6,38 apresentaram correlação direta com os carbonos em δ 94,6 e 99,5, enquanto os hidrogênios em δ 6,21 e 6,41 mostraram correlação direta com os carbonos em δ 94,9 e 100,0, atribuídos como sendo os carbonos nas posições 6 e 8 dessas substâncias (**Figuras 48 – Pág. 106**). A presença da metoxila em δ 3,78 (3H, s) foi confirmada devido a correlação a longa distância com o sinal em δ 139,6 (C-3) (**Figura 49 – Pág. 107**). Os dados espectrais analisados em comparação com a literatura confirmaram a presença da 3-O-metilquercetina (**Figura 51, Tabela 8 – Pág. 108**) e quercetina (**Figura 52, Tabela 9 – Pág. 109**).

Foram observados a presença de dois dupletos em δ 7,62 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz) e 6,90 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz;), e um duplo duplete em δ 7,53 (1H, *dd*, $J = 8,5; 2,2$ Hz), relativos aos hidrogênios em C-2', C-5' e C-6', correlacionando diretamente com os carbonos em δ 116,6, 116,2 e 122,6, respectivamente (**Figuras 46 e 48 – Pág. 105-106**), sendo estes atribuídos a 3-O-metilquercetina (**Figura 51, Tabela 8 – Pág. 108**).

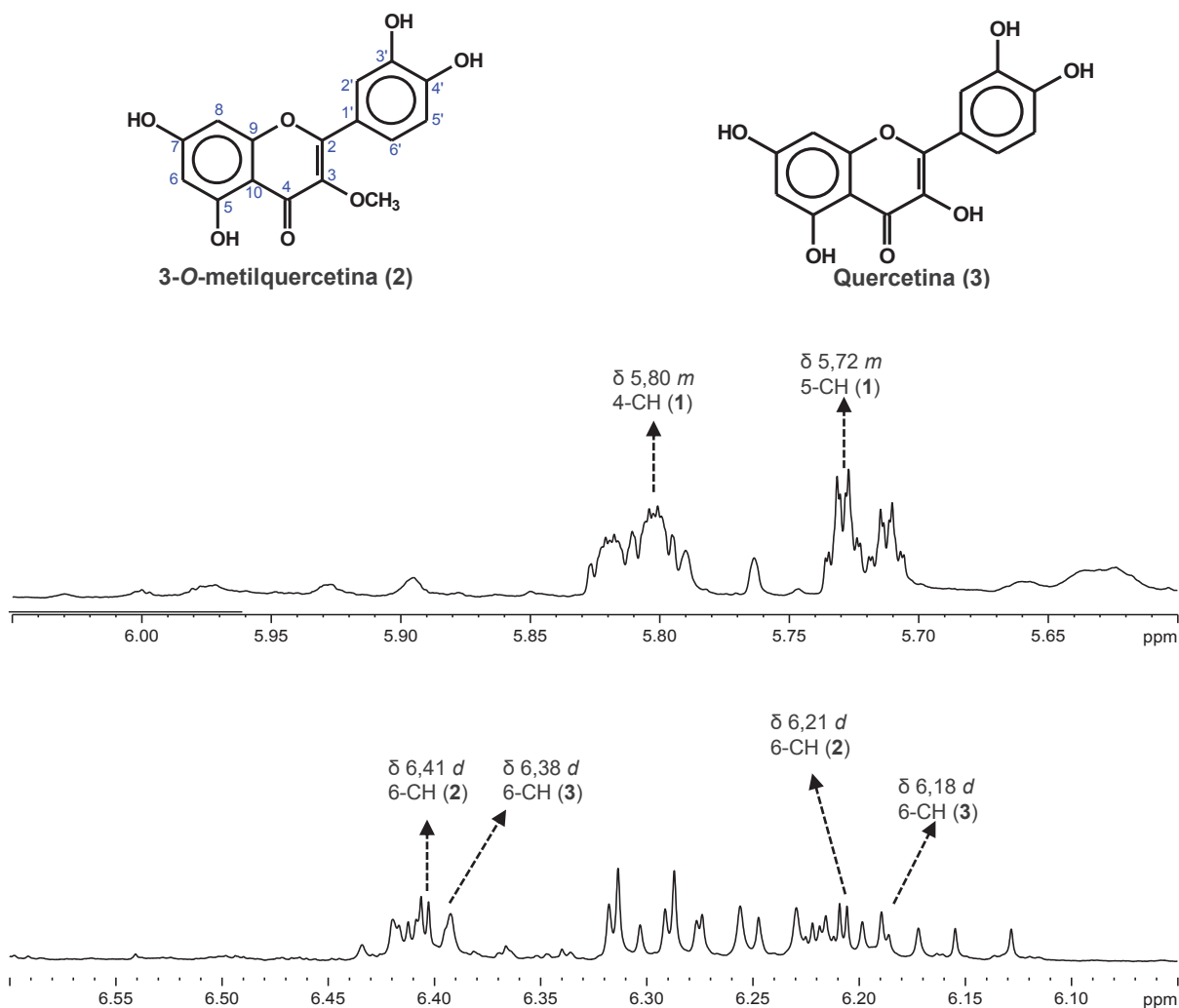


Figura 45 – Ampliação da região entre δ 6,60-5,60 do espectro de RMN de ^1H de *B. trimera* (600 MHz, CD_3OD).

Verificou-se a presença de um composto com estrutura similar ao flavonoide quercetina, cuja diferença residiu no anel B, devido a existência de dois dupletos em δ 8,06 (2H, *d*, $J = 8,9$ Hz) e δ 6,91 (2H, *d*, $J = 8,9$ Hz) que apresentaram correlação ^1H - ^1H COSY, sendo estes característicos de acoplamento de segunda ordem do sistema para-substituído do flavonoide canferol (**Figura 47 e 48** – Pág. 106). Os dados de RMN de ^1H , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC e comparações com dados da literatura confirmaram a presença do canferol nas amostras de *B. trimera* e *B. myriocephala* (**Figura 53, Tabela 10** – Pág. 110).

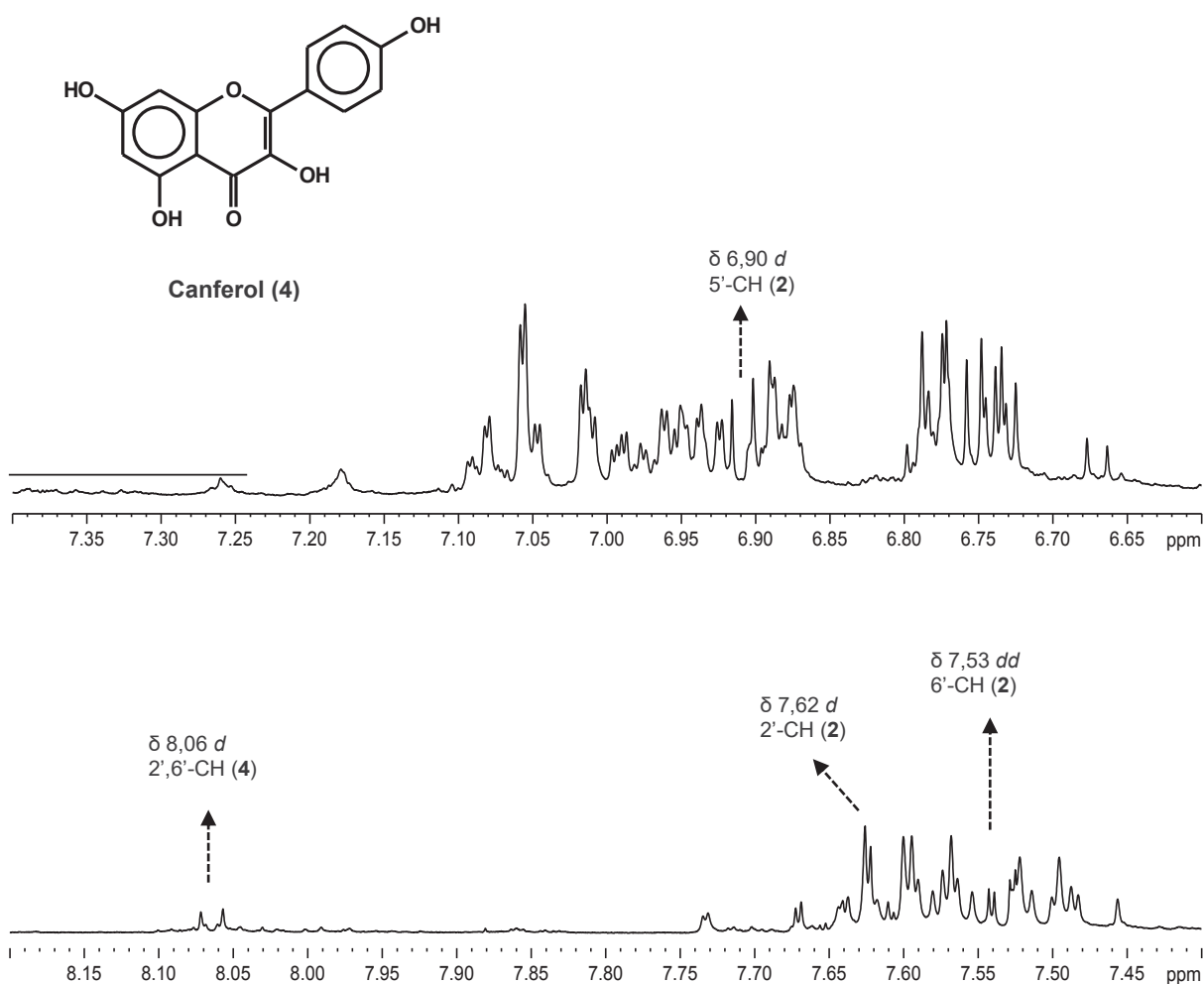


Figura 46 – Ampliação da região entre δ 8,20-6,60 do espectro de RMN de ^1H de *B. trimera* (600 MHz, CD_3OD).

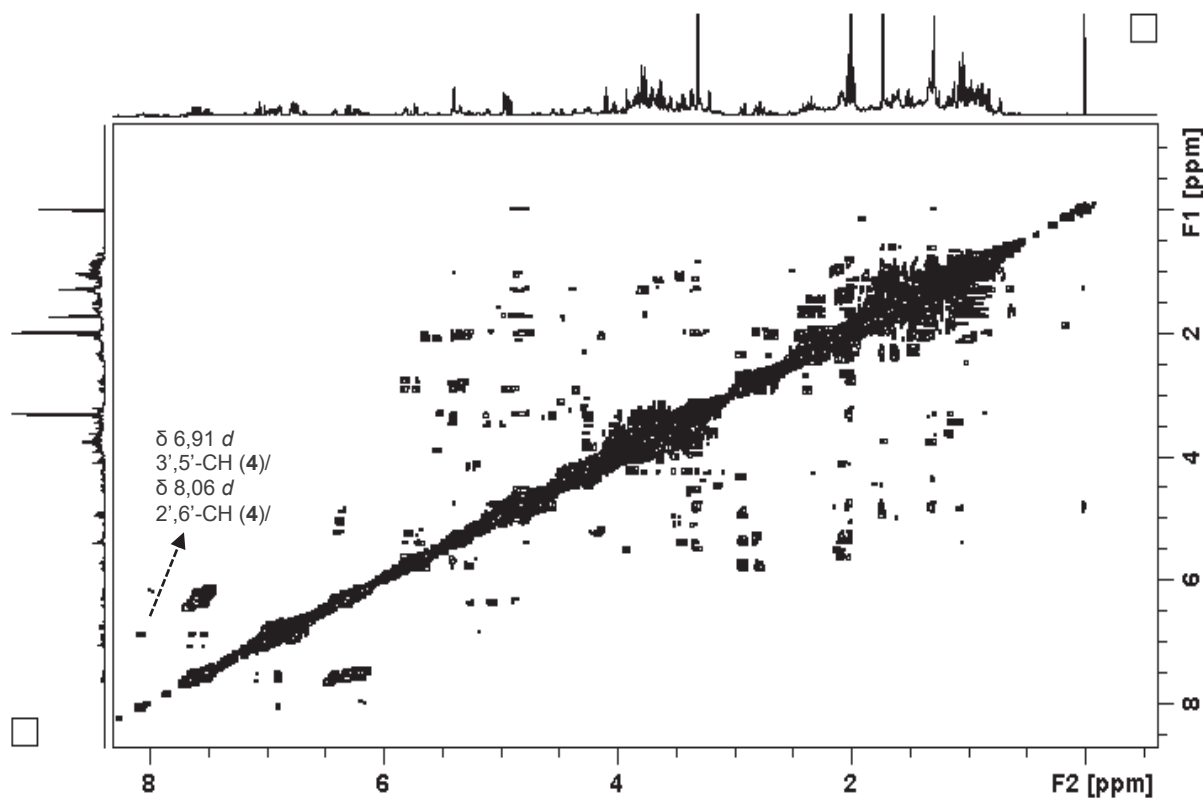


Figura 47 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY de *B. trimera* (^1H : 600 MHz; CD_3OD).

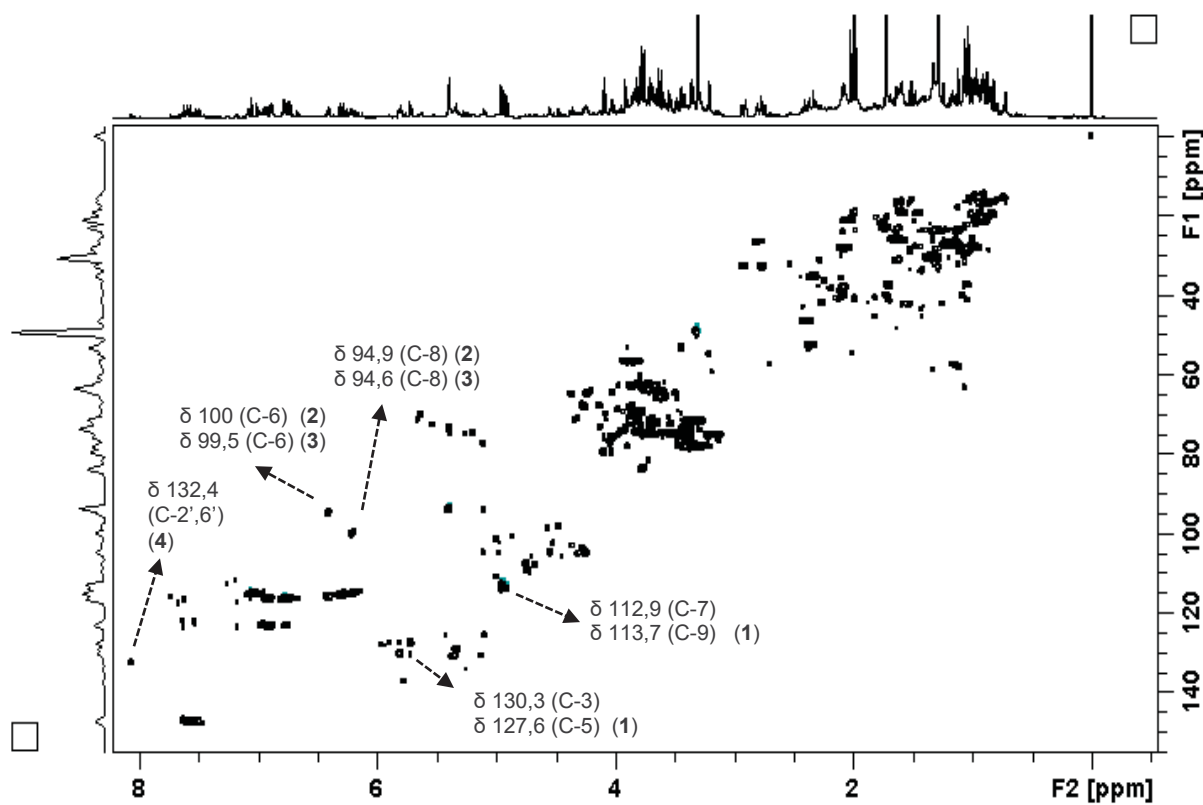


Figura 48 – Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC de *B. trimera* (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).

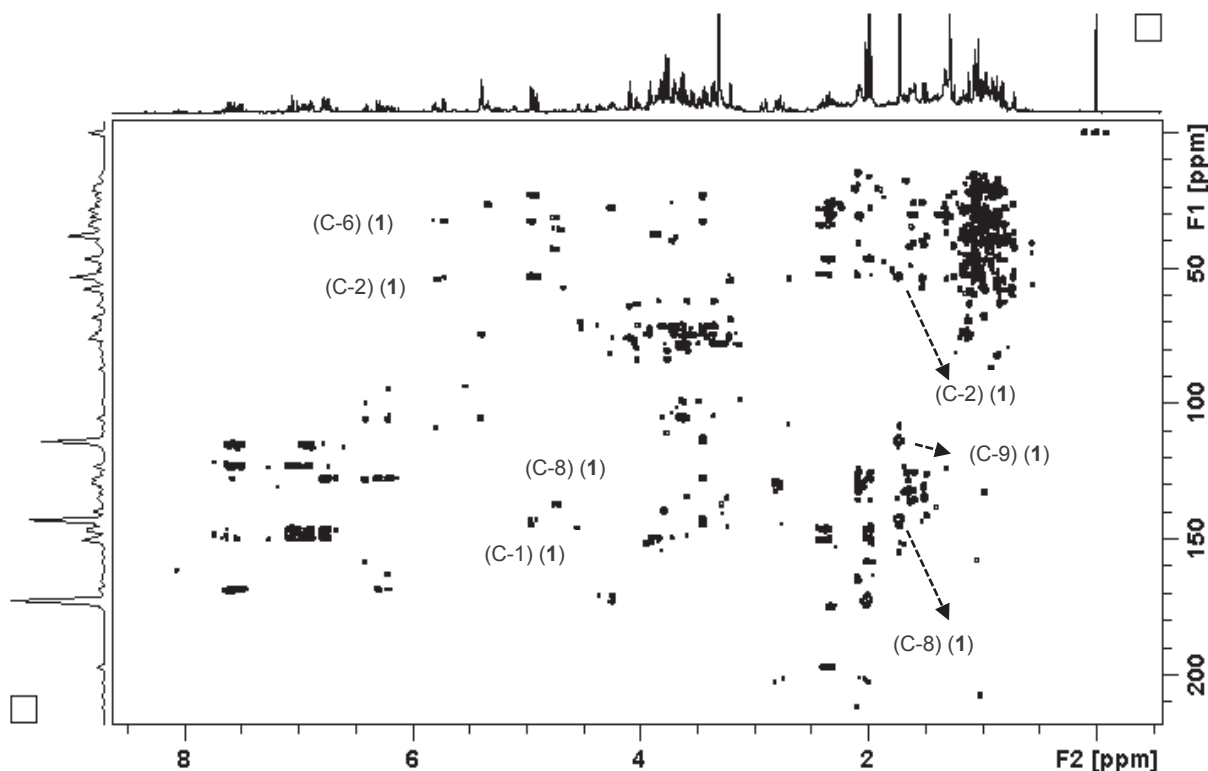


Figura 49 – Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC de *B. trimera* (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).

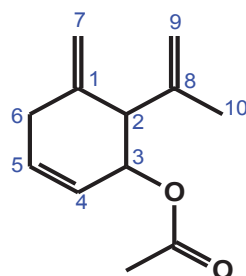


Figura 50 – Estrutura do acetato de carquejila.

Tabela 7 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do acetato de carquejila.

Posição	Acetato de Carquejila		
	δ ^1H (mult.) ^a	δ ^{13}C ^a	HMBC
1		144,7	
2	3,44 (1H, <i>m</i>)	53,2	1 e 8
3	4,24 (1H, <i>m</i>)	68,3	COOCH_3
4	5,80 (1H, <i>m</i>)	130,3	2 e 6
5	5,72 (1H, <i>m</i>)	127,6	
6	2,76 (1H, <i>m</i>) e 2,80 (1H, <i>m</i>)	33,0	4 e 5
7	4,59 (1H, <i>m</i>) e 4,93 (1H, <i>m</i>)	112,9	2 e 6
8		142,8	
9	4,90 (1H, <i>m</i>) e 4,96 (1H, <i>m</i>)	113,7	2, 8 e 10
10	1,73 (3H, <i>sl</i>)	23,1	2 e 9
COOCH_3	2,01 (3H, <i>sl</i>)	20,1	COOCH_3
COOCH_3		173,2	

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. (δ) Deslocamento químico em ppm.

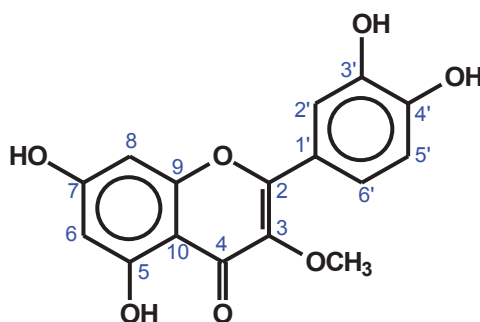


Figura 51 – Estrutura da 3-O-metilquercetina.

Tabela 8 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da 3-O-metilquercetina

Posição	3-O-metilquercetina			Literatura (SAITO et al., 2005)	
	δ ^1H (mult., J em Hz) ^a	δ $^{13}\text{C}^a$	HMBC	δ ^1H (mult., J em Hz) ^b	δ $^{13}\text{C}^b$
2		158,0			158,0
3		139,6			139,5
4					180,0
5		163,0			163,0
6	6,21 (1H, d, 2,2)	100,0	5, 7, 8 e 10	6,19 (1H, d, 2,4)	99,7
7		166,0			165,9
8	6,41 (1H, d, 2,2)	94,9	6, 9 e 10	6,38 (1H, d, 2,4)	94,7
9		158,6			158,4
10		105,9			105,8
1'		123,0			122,3
2'	7,62 (1H, d, 2,2)	116,6	2, 3', 4' e 6'	7,62 (1H, d, 2,4)	116,4
3'		146,6			146,5
4'		149,9			149,9
5'	6,90 (1H, d, 8,5)	116,2	1' e 3'	6,90 (1H, d, 8,4)	116,5
6'	7,53 (1H, dd, 8,5 e 2,2)	122,6	2, 2' e 4'	7,53 (1H, dd, 8,4 e 2,4)	122,9
3-OCH ₃	3,78 (3H, s)	60,7	3	3,78 (3H, s)	60,5

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados comparados com a literatura Saito et al. (2005) (^1H , 300 MHz e ^{13}C , 75 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

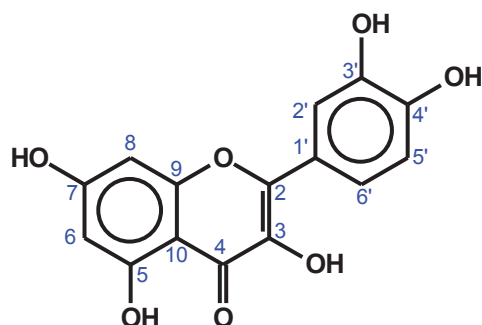


Figura 52 – Estrutura da quercetina.

Tabela 9 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da quercetina.

Posição	Quercetina			Literatura (SA et al., 2017)	
	δ ^1H (mult., J em Hz) ^a	δ ^{13}C ^a	HMBC	δ ^1H (mult., J em Hz) ^b	δ ^{13}C ^b
2					147,1
3					137,8
4					175,3
5					163,4
6	6,18 (1H, <i>d</i> , 2,0)	99,5		6,18 (1H, <i>d</i> , 1,9)	97,8
7					166,1
8	6,38 (1H, <i>d</i> , 2,0)	94,9		6,39 (1H, <i>d</i> , 1,9)	93,1
9					159,6
10					102,7
1'					122,2
2'	7,73 (1H, <i>d</i> , 2,3)	116,2	3', 4' e 6'	7,73 (1H, <i>d</i> , 2,1)	114,6
3'		146,3			144,0
4'		148,7			147,1
5'	6,88 (1H, <i>d</i> , 8,5)	116,3	3' e 4'	6,88 (1H, <i>d</i> , 8,4)	114,7
6'	7,63 (1H, <i>dd</i> , 8,5 e 2,3)	121,7	2' e 4'	7,61 (1H, <i>dd</i> , 8,4 e 2,1)	120,4

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados comparados com a literatura Sa et al. (2017) (^1H , 500 MHz e ^{13}C , 125 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm

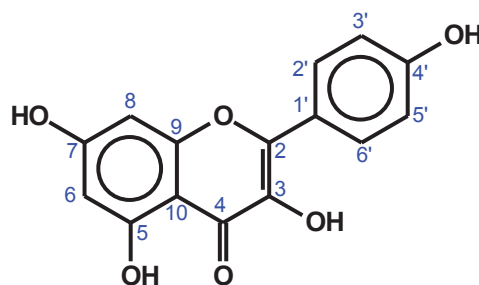


Figura 53 – Estrutura do canferol.

Tabela 10 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do canferol.

Posição	Canferol			Literatura (ZUCCOLOTTO, 2017)	
	δ ^1H (mult., J em Hz) ^a	δ $^{13}\text{C}^a$	HMBC	δ ^1H (mult., J em Hz) ^b	δ $^{13}\text{C}^b$
2		159,4			158,8
3					137,2
4					177,4
5		163,0			163,0
6	6,22 (1H, d, 2,2)	99,8	5, 7, 8 e 10	6,22 (1H, d, 2,1)	99,7
7		166,0			166,0
8	6,41 (1H, d, 2,2)	94,9	6, 7, 9 e 10	6,40 (1H, d, 2,1)	95,0
9		158,5			163,8
10		105,7			106,0
1'		123,0			122,8
2'	8,06 (1H, d, 8,9)	132,4	2, 4' e 6'	8,06 (1H, d, 8,8)	132,5
3'	6,91 (1H, d, 8,9)	116,4	1' e 5'	6,91 (1H, d, 8,8)	116,4
4'		161,7			161,3
5'	6,91 (1H, d, 8,9)	116,4	1' e 3'	6,91 (1H, d, 8,8)	116,4
6'	8,06 (1H, d, 8,9)	132,4	2, 2' e 4'	8,06 (1H, d, 8,8)	132,5

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados comparados com a literatura Zuccolotto, (2017) (^1H , 600 MHz e ^{13}C , 150 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

A análise do perfil espectral de *B. milleflora* (Figura 54 e 55 – Pág. 111-112) revelou a presença de um simpleto em δ 7,34 (2H, s) correlacionando diretamente com o carbono em δ 108,6 (Figuras 57 – Pág. 114) e, a longa distância, com os carbonos em δ 108,6, 142,3, 149,6 e 170,0, sugerindo a presença de um sistema 1,3,4,5-tetrassubstituído atribuído ao ácido siríngico devido à presença de um simpleto em δ 3,85 (6H, s), característico de grupos metoxila (Figura 58 – Pág. 114), correlacionando a longa distância ^1H - ^{13}C com o sinal em δ 149,6 relativo aos carbonos C-3 e C-5 deste composto (Figuras 58 e 59, Tabela 11 – Pág. 114-115).

Além disso, verificou-se a existência no espectro de RMN de ^1H de *B. milleflora* de dois pares de dupletos em δ 6,52 (1H, d, J = 16,2 Hz), δ 7,97 (1H, d, J =

16,2 Hz) e δ 6,02 (1H, *d*, $J = 12,6$ Hz), δ 6,96 (1H, *d*, $J = 12,6$ Hz) característicos do *trans*-melilotosídeo e *cis*-melilotosídeo (**Figuras 55 e 56** – Pág. 112-113), respectivamente. Os sinais correspondentes a dupla *cis* foram confirmados através de experimento de correlação ^1H - ^1H COSY, pois foi evidenciada correlação do hidrogênio em C-8 com o hidrogênio ligado ao C-7 do *cis*-melilotosídeo (**Figuras 56** – Pág. 113), uma vez que a extração desse composto não foi tão eficiente quando comparada ao *trans*-melilotosídeo.

Observou-se ainda dupletos em δ 4,92 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz), relativos ao hidrogênio anomérico de unidade de glicose ligada do *trans*- e *cis*-melilotosídeo, devido a correlação direta com o carbono em δ 102,8, indicando que a ligação da molécula de glicose ocorreu por meio de uma ligação O-glicosídica (**Figura 57** – Pág. 114). Este sinal apresentou correlação a longa distância com os sinais em δ 77,8 e 157,4, relativos aos carbonos C-2 e C-5' do *trans*-melilotosídeo (**Figuras 58, 60, Tabela 12** – Pág. 114, 116), bem como os sinais em δ 78,8 e 156,3, referentes aos carbonos C-2 e C-5' do *cis*-melilotosídeo, respectivamente (**Figuras 58, 61, Tabela 13** – Pág. 114, 117). O valor característico da constante de acoplamento do hidrogênio, assim como sua multiplicidade, sugerem a presença de uma unidade de β -D-glicose. (ROSLUND et al., 2008).

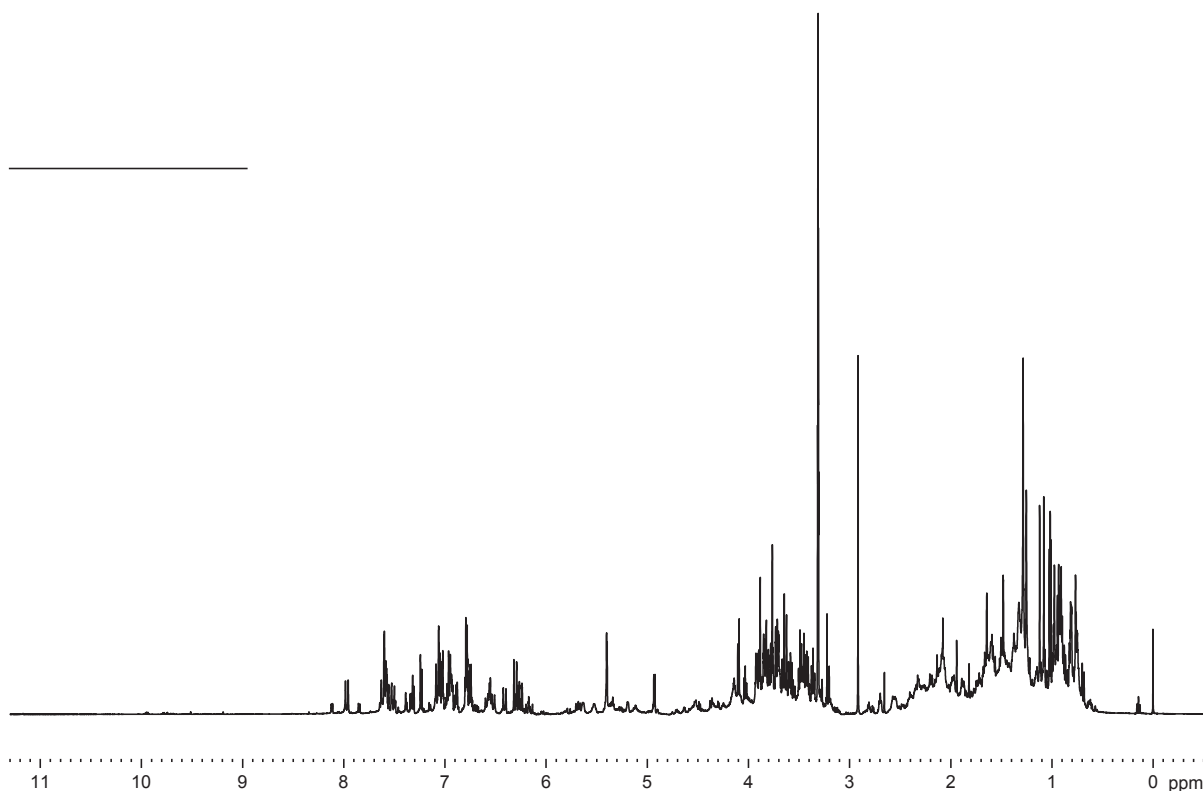
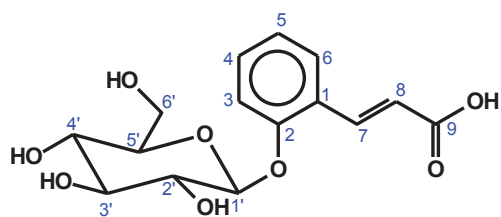
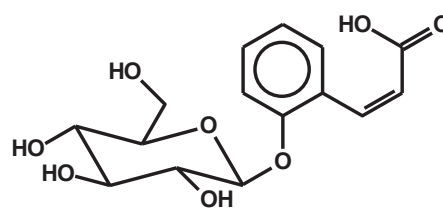


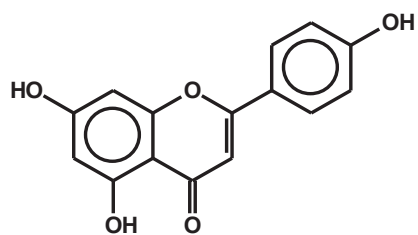
Figura 54 – Espectro de RMN de ^1H de *B. milleflora* (600 MHz, CD_3OD).



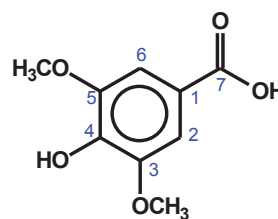
Trans-melilotosídeo
(5)



Cis-melilotosídeo
(6)



Apigenina
(7)



Ácido siríngico
(8)

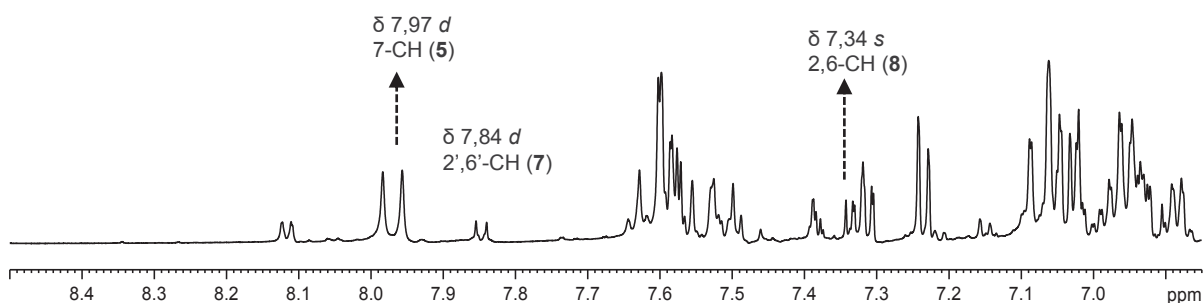
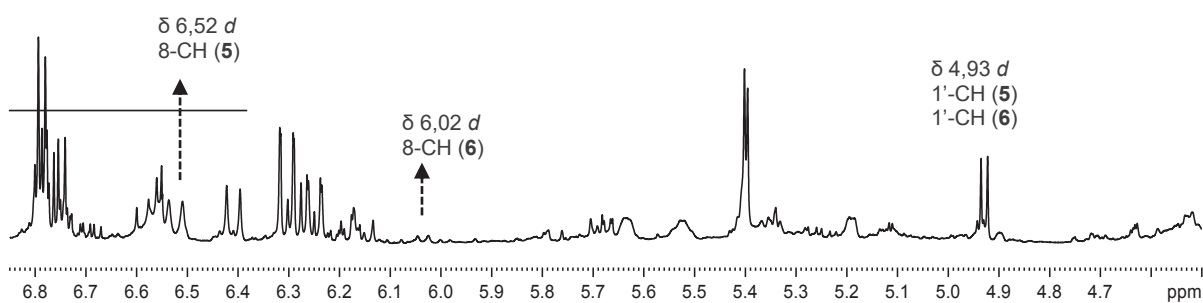


Figura 55 – Ampliação da região entre δ 8,50-4,50 do espectro de RMN de ^1H de *B. milleflora* (600 MHz, CD_3OD).

A apigenina foi confirmada em *B. milleflora* e *B. articulata* devido à presença de um simpleto em δ 6,59 (1H, s) relativo ao hidrogênio olefínico em C-3 do anel C deste flavonoide (**Figura 55, 57 e 72** – Pág. 112, 114 e 127), que apresentou correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC com o sinal em δ 104,0 (**Figura 57** – Pág. 114). Observou-se ainda, a correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC desse simpleto com os sinais em δ 105,5, 123,3, 166,6 e 184,2, relativos aos carbonos C-10, C-1', C-2 e C-4, respectivamente (**Figura 58** – Pág. 114). Estas correlações são mais evidentes no mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C de *B. articulata* (**Figura 75** – Pág. 128). A existência de dois dupletos em δ 7,84 (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) e δ 6,93 (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz), característicos de sistema de acoplamento de segunda ordem do anel para-substituído relativo ao anel B em comparação com a literatura confirmou a presença da apigenina (**Figura 62, Tabela 14** – Pág. 118).

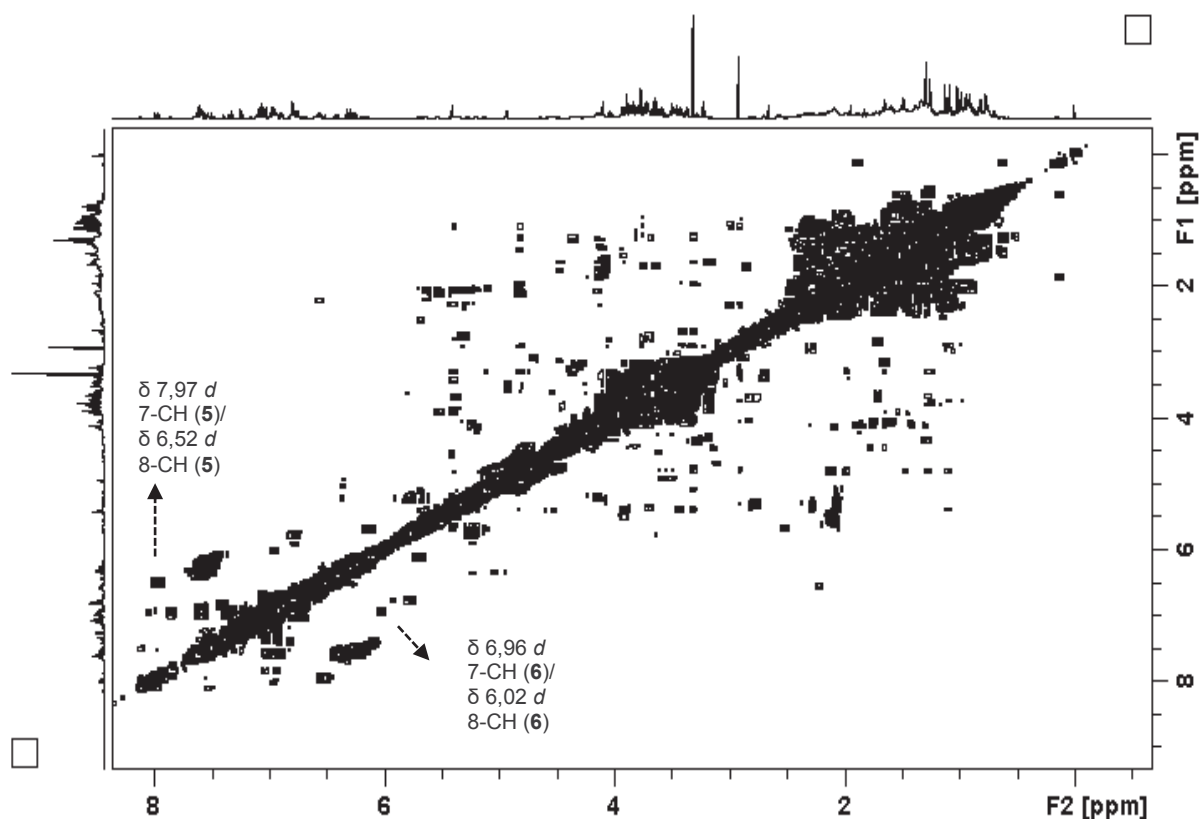


Figura 56 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY de *B. milleflora* (600 MHz, CD_3OD).

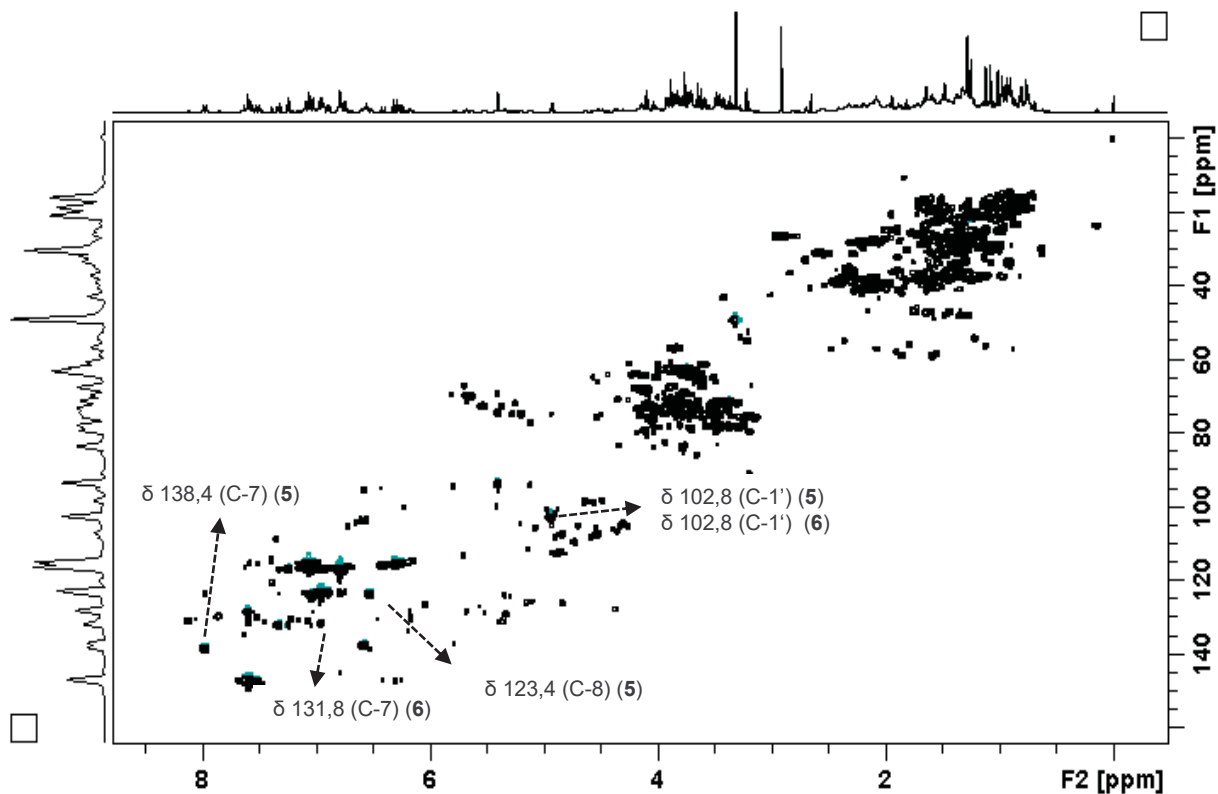


Figura 57 – Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC de *B. milleflora* (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).

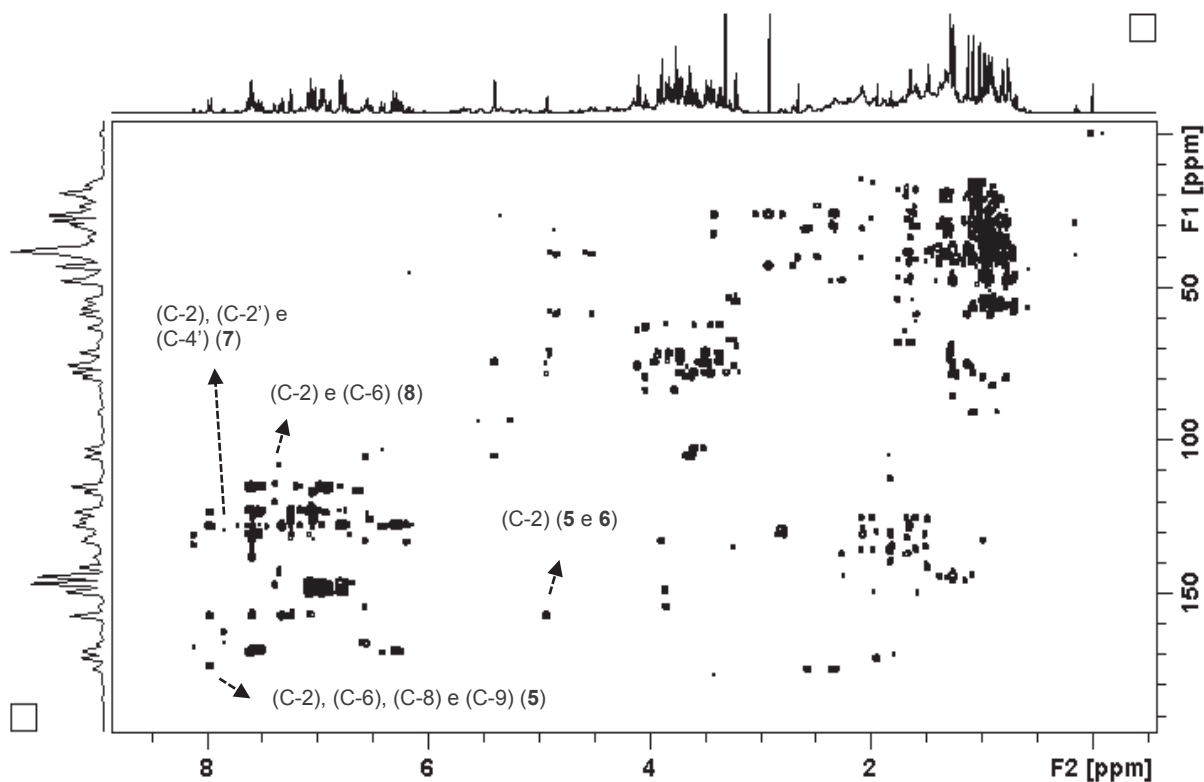


Figura 58 – Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC de *B. milleflora* (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).

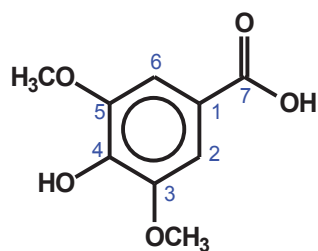


Figura 59 – Estrutura do ácido siríngico

Tabela 11 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ácido siríngico.

Posição	Ácido siríngico			Literatura (HONG et al., 2016)	
	δ ^1H (mult., J em Hz) ^a	δ ^{13}C ^a	HMBC	δ ^1H (mult., J em Hz) ^b	δ ^{13}C ^b
1					121,9
2	7,34 (1H, s)	108,6	2, 4, 5 e 7	7,33 (1H, s)	108,3
3		149,2			148,8
4		142,3			141,7
5		149,2			148,8
6	7,34 (1H, s)	108,6	3, 4, 6, e 7	7,33 (1H, s)	108,3
7		170,0			169,9
3-OCH ₃	3,85 (3H, s)	56,9	3	3,88 (3H, s)	56,7
5-OCH ₃	3,85 (3H, s)	56,9	5	3,88 (3H, s)	56,7

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados comparados com a literatura Hong et al. (2016) (^1H , 700 MHz e ^{13}C , 175 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

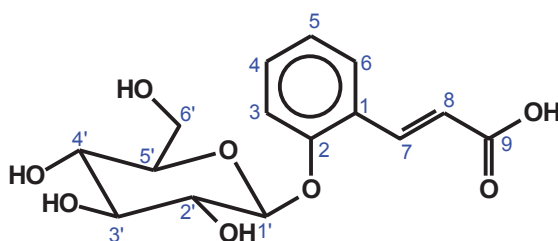


Figura 60 – Estrutura do *trans*-melilotosídeo.

Tabela 12 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do *trans*-melilotosídeo.

Posição	<i>Trans</i> -melilotosídeo			Literatura (SADATI et al., 2012)	
	δ ^1H (mult., <i>J</i> em Hz) ^a	δ ^{13}C ^a	HMBC	δ ^1H (mult., <i>J</i> em Hz)	δ ^{13}C
1		126,3			
2		157,4			
3	7,23 (1H, <i>dd</i> , 8,5 e 1,2)	116,9	1 e 5	7,26 (1H, <i>m</i>)	
4	7,32 (1H, <i>ddd</i> , 8,5, 7,3 e 1,7)	132,1	2 e 6	7,42 (1H, <i>m</i>)	
5	7,03 (1H, <i>ddd</i> , 7,9, 7,3 e 1,2)	123,7	1 e 3	7,07 (1H, <i>t</i> , 7,5 Hz),	
6	7,59 (1H, <i>dd</i> , 7,9 e 1,7)	128,4	2 e 4	7,64 (1H, <i>d</i> , 7,7)	
7	7,97 (1H, <i>d</i> , 16,2)	138,4	2, 6 e 9	8,14 (1H, <i>d</i> , 16,2)	
8	6,52 (1H, <i>d</i> , 16,2)	123,4	1 e 9	6,54 (1H, <i>d</i> , 16,2)	
9		173,6			
1'	4,92 (1H, <i>d</i> , 7,8)	102,8	2 e 5'	5,00 (1H, <i>d</i> , 7,7)	
2'	3,43 (1H, <i>m</i>)	73,3			
3'	3,58 (1H, <i>m</i>)	74,9			
4'	3,44 (1H, <i>m</i>)	71,5			
5'	3,39 (1H, <i>m</i>)	77,8			
6'	3,71 (1H, <i>m</i>) 3,90 (1H, <i>m</i>)	62,5			

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em MeOD-*d*₄. Utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados comparados com a literatura Sadati et al. (2012) (^1H , 400 MHz e ^{13}C , 100 MHz, CD₃OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

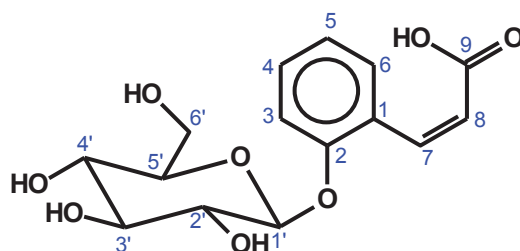


Figura 61 – Estrutura do *cis*-melilotosídeo.

Tabela 13 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do *cis*-melilotosídeo.

Posição	<i>cis</i> -melilotosídeo			Literatura (SADATI et al., 2012)	
	δ ^1H (mult., <i>J</i> em Hz) ^a	δ ^{13}C ^a	HMBC	δ ^1H (mult., <i>J</i> em Hz) ^b	δ ^{13}C ^b
1		127,8			
2		156,3			
3	7,15 (1H, <i>dd</i> , 8,5 e 1,5)	116,2	1 e 5	7,18 (1H, <i>d</i> , 8,3)	115,3
4	7,21 (1H, <i>dd</i> , 8,5 e 1,5)	130,4	2 e 6	7,28 (1H, <i>dd</i> , 8,5 e 1,2)	130,5
5	6,94 (1H, <i>m</i>)	123,3	1 e 3	6,95 (1H, <i>t</i> , 7,5 Hz),	121,6
6	7,58 (1H, <i>m</i>)	130,9	2 e 4	7,52 (1H, <i>d</i> , 7,5)	130,6
7	6,96 (1H, <i>d</i> , 12,6)	131,8	2, 6 e 9	7,31 (1H, <i>d</i> , 12,5)	138,4
8	6,02 (1H, <i>d</i> , 12,6)	126,2	1 e 9	5,95 (1H, <i>d</i> , 12,5)	120,0
9		174,4			
1'	4,93 (1H, <i>d</i> , 7,4)	102,8	2 e 5'	4,93 (1H, <i>d</i> , 7,2)	101,4
2'	3,43 (1H, <i>m</i>)	73,3		3,45 (1H, <i>m</i>)	73,7
3'	3,58 (1H, <i>m</i>)	74,9		3,47 (1H, <i>m</i>)	76,9
4'	3,44 (1H, <i>m</i>)	71,5		3,40 (1H, <i>m</i>)	70,0
5'	3,41 (1H, <i>m</i>)	78,2		3,40 (1H, <i>m</i>)	77,0
6'	3,71 (1H, <i>m</i>) 3,90 (1H, <i>m</i>)	62,5		3,68 (1H, <i>m</i>) 3,87 (1H, <i>m</i>)	61,3

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados comparados com a literatura Sadati et al. (2012) (^1H , 400 MHz e ^{13}C , 100 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

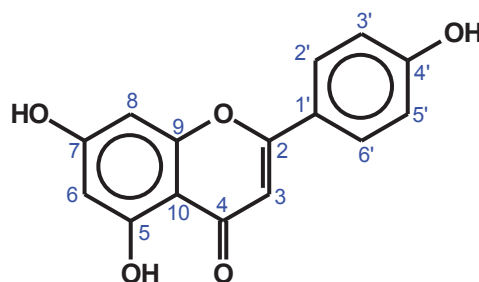


Figura 62 – Estrutura da apigenina.

Tabela 14 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ da apigenina.

Posição	Apigenina			Literatura (ZUCCOLOTTO, 2017)	
	δ ^1H (mult., J em Hz) ^a	δ ^{13}C ^a	HMBC	δ ^1H (mult., J em Hz) ^b	δ ^{13}C ^b
2		166,6			166,2
3	6,59 (1H, s)	104,0	2, 4 e 10	6,57 (1H, s)	103,8
4		184,2			184,1
5					166,6
6	6,21 (1H, <i>d</i> , 2,1)	100,1		6,20 (1H, <i>d</i> , 2,1)	100,1
7					163,0
8	6,46(1H, <i>d</i> , 2,1)	94,9		6,44 (1H, <i>d</i> , 2,1)	95,2
9					159,4
10		105,5			105,3
1'		123,3			123,3
2'	7,84 (1H, <i>d</i> , 8,8)	129,7	2, 4' e 6'	7,83 (1H, <i>d</i> , 8,8)	129,7
3'	6,93 (1H, <i>d</i> , 8,8)	116,9	1' e 5'	6,92 (1H, <i>d</i> , 8,8)	117,0
4'		162,3			162,8
5'	6,93 (1H, <i>d</i> , 8,8)	116,9	1' e 3'	6,92 (1H, <i>d</i> , 8,8)	117,0
6'	7,84 (1H, <i>d</i> , 8,8)	129,7	2, 2' e 4'	7,83 (1H, <i>d</i> , 8,8)	129,6

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em MeOD- d_4 . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados comparados com a literatura Zuccolotto, (2017) (^1H , 600 MHz e ^{13}C , 150 MHz, CD₃OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

As amostras de *B. articulata* provenientes do Rio Grande do Sul apresentaram sinais intensos em toda a região espectral (Figura 63 e 64 – Pág. 119-120). Foram observados sinais típicos de ligações duplas *trans* em δ 6,30 e 7,58 (2H, *d*, J = 15,9 Hz), atribuídos ao H-8 e H-7 do 4-*O*- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-cafeato (BaII) (Figura 64 – Pág. 120), respectivamente. Além desses, verificou-se a presença de três simpletos em δ 6,76, 6,74 e 6,70 cuja integração refere-se a 2 hidrogênios cada, respectivamente, assim como três simpletos em δ 3,86, 3,84 e 3,83 característicos de grupos metoxílicos, atribuídos ao (BaII), carbonato de 4-*O*- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-tetrahydro-2H-piran-2-il-acetil (BaIII) e 4-*O*- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-metanol (BaIV), respectivamente (Figura 64 – Pág. 120). Os

experimentos bidimensionais permitiram observar correlação direta HSQC dos sinais em δ 4,89, 4,88 e 4,29 com carbonos em δ 105,3, 105,4 e 104,8, característicos de glucose ligada (**Figura 66** – Pág. 121).

Observou-se ainda a presença de três simpletos em δ 5,15 (2H, s/), 5,10 (2H, s/) e 4,55 (2H, s), integrando para dois hidrogênios cada, característicos de hidrogênios carbinólicos (**Figura 63** e **64** – Pág. 119-120). O primeiro simpleto (δ 5,15) pode ser atribuído ao Ball por apresentar correlação a longa distância ^1H - ^{13}C com os sinais em δ 107,5, 134,5 e 169,2, relativos aos C-2' e C-6', C-1' e C-9, respectivamente (**Figura 67** – Pág. 122). O segundo simpleto (δ 5,10) apresentou correlação a longa distância ^1H - ^{13}C com os sinais em δ 107,4, 134,3 e 171,8 relativos aos C-2 e C-6, C-1 e C-8', respectivamente, sendo atribuído ao Balll (**Figura 67** – Pág. 122), enquanto o sinal em δ 4,55 foi atribuído aos BalV por apresentar correlação a longa distância com os sinais em δ 105,8 e 139,8 (**Figura 67** – Pág. 122). A partir da comparação dos dados espectrais obtidos com a literatura foi possível confirmar a presença das substâncias 4-O- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-cafeato (Ball) (**Figura 68, Tabela 15** – Pág. 123), 4-O- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-tetrahydro-2H-piran-2-il-acetil carbonato (Balll) (**Figura 69, Tabela 16** – Pág. 124) e 4-O- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-metanol (BalV) (**Figura 70, Tabela 17** – Pág. 125) (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA, 2008).

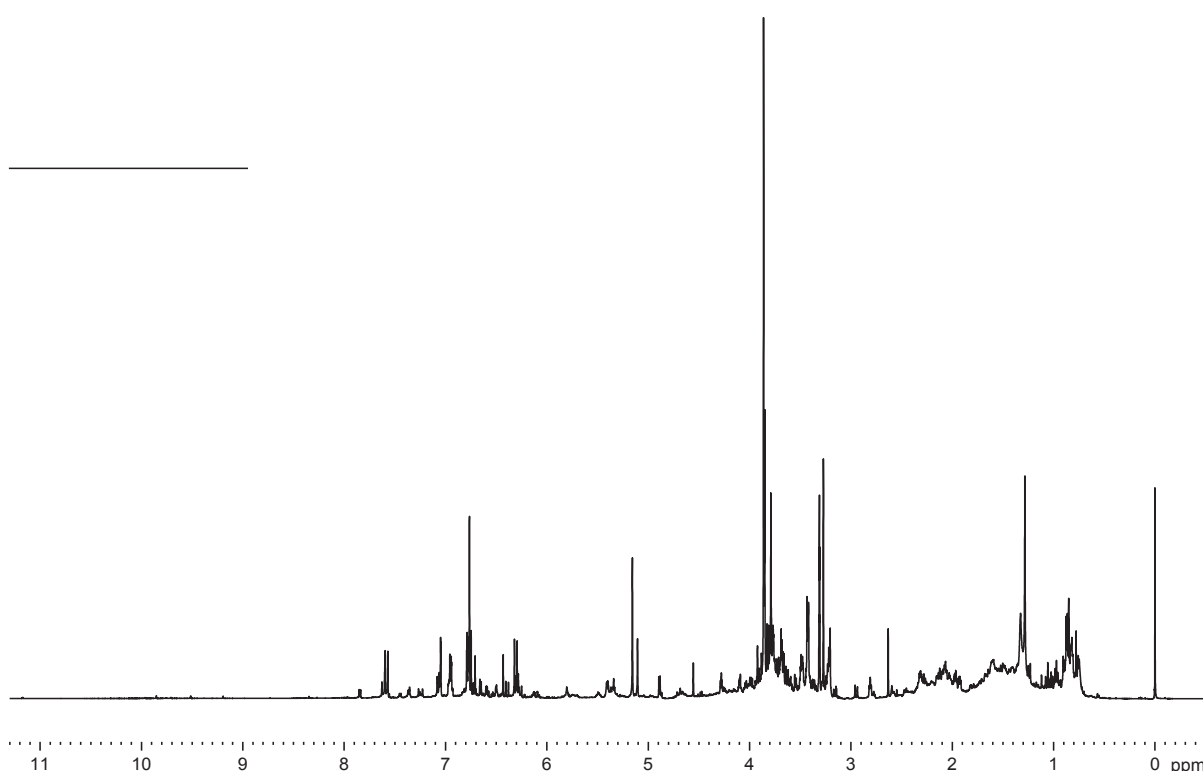


Figura 63 – Espectro de RMN de ^1H de *B. articulata* (RS) (600 MHz, CD_3OD).

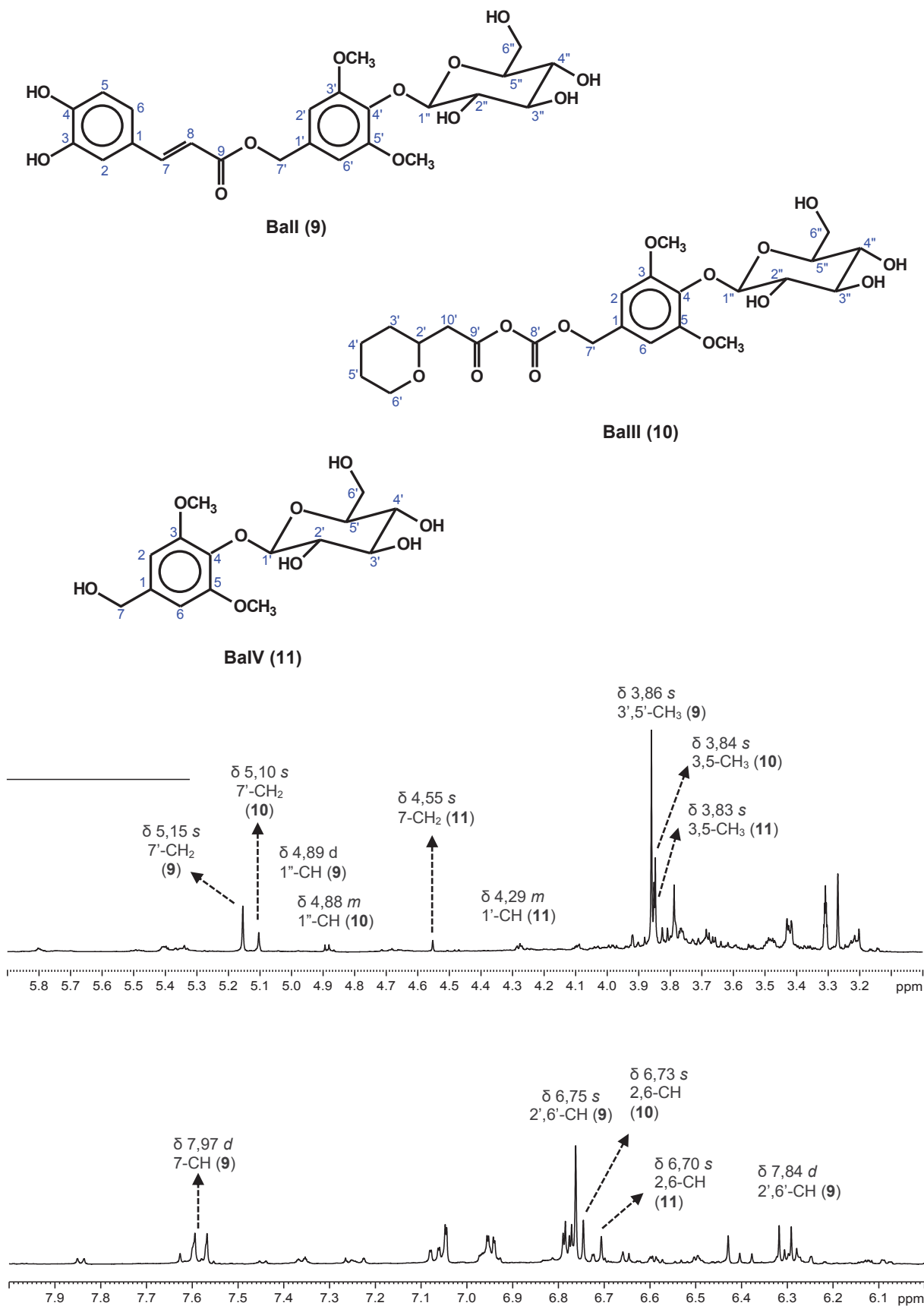


Figura 64 – Ampliação da região entre δ 8,00-3,00 do espectro de RMN de ^1H de *B. articulata* (RS) (600 MHz, CD_3OD).

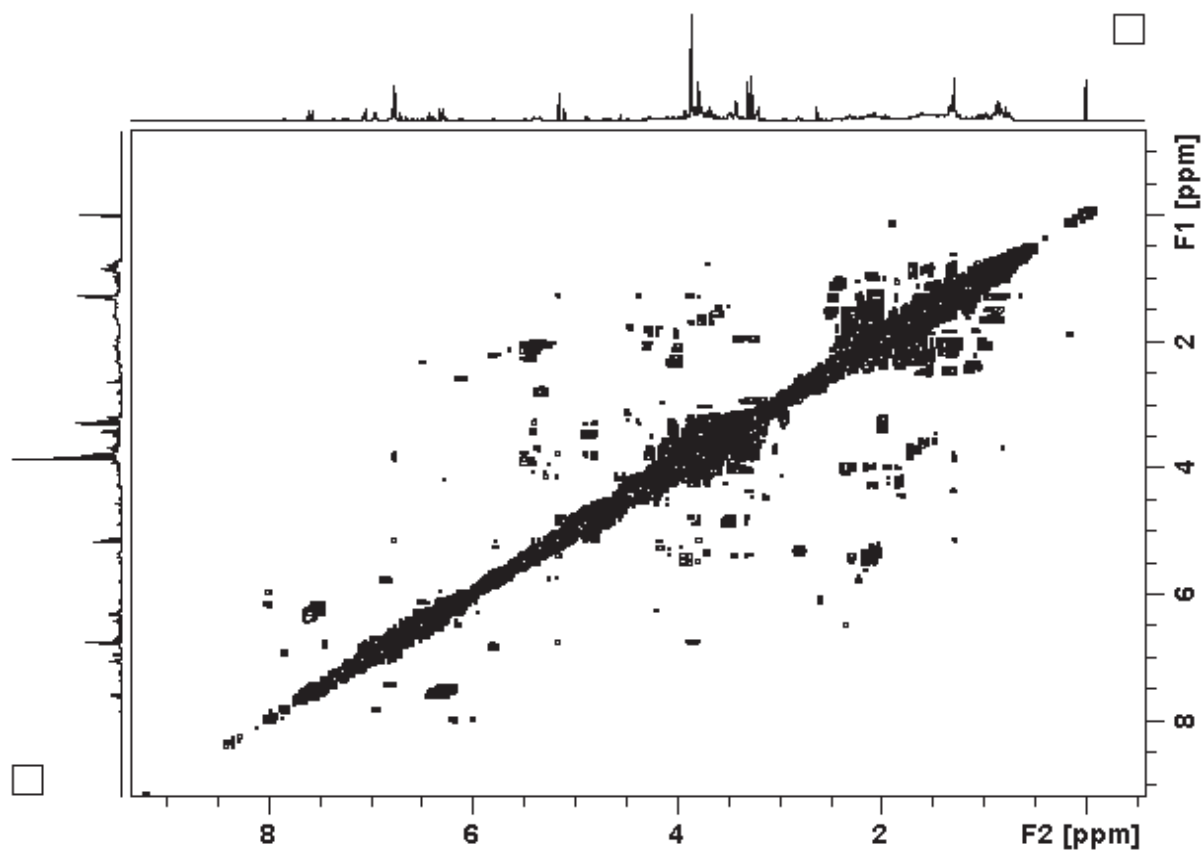


Figura 65 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY de *B. articulata* (RS) (600 MHz, CD_3OD).

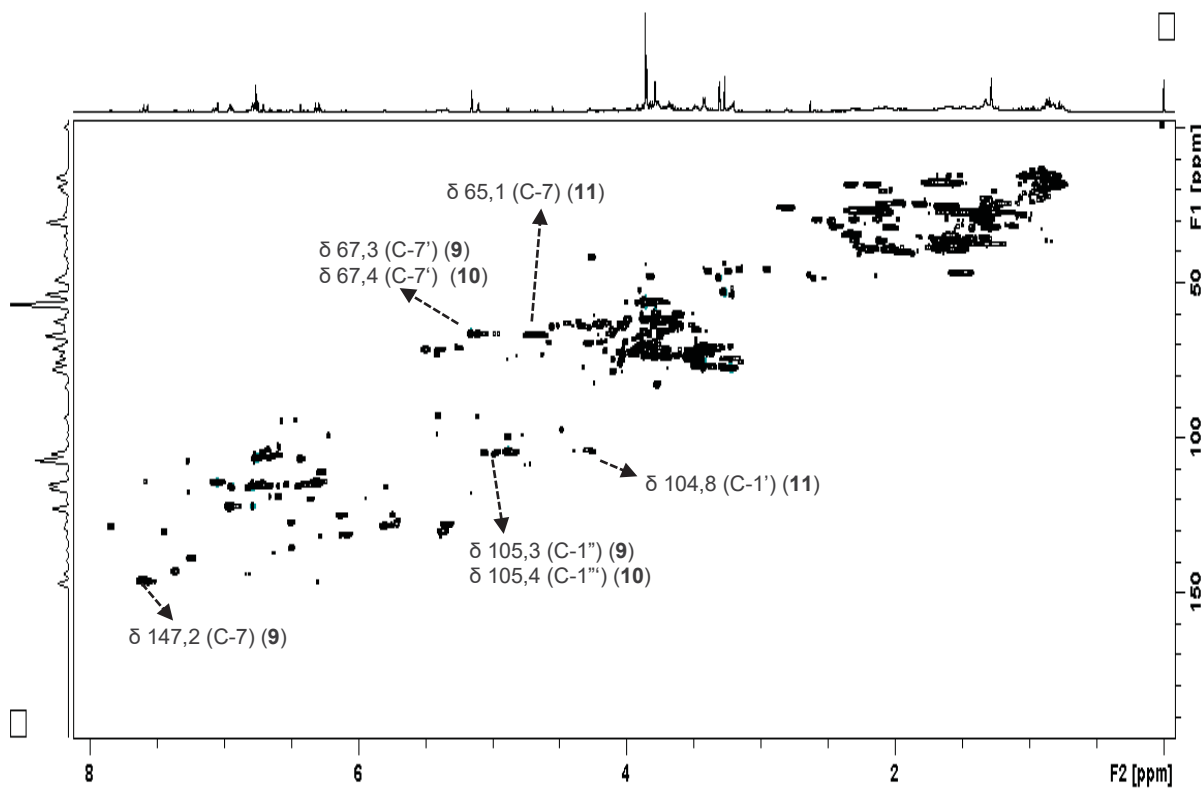


Figura 66 – Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC de *B. articulata* (RS) (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).

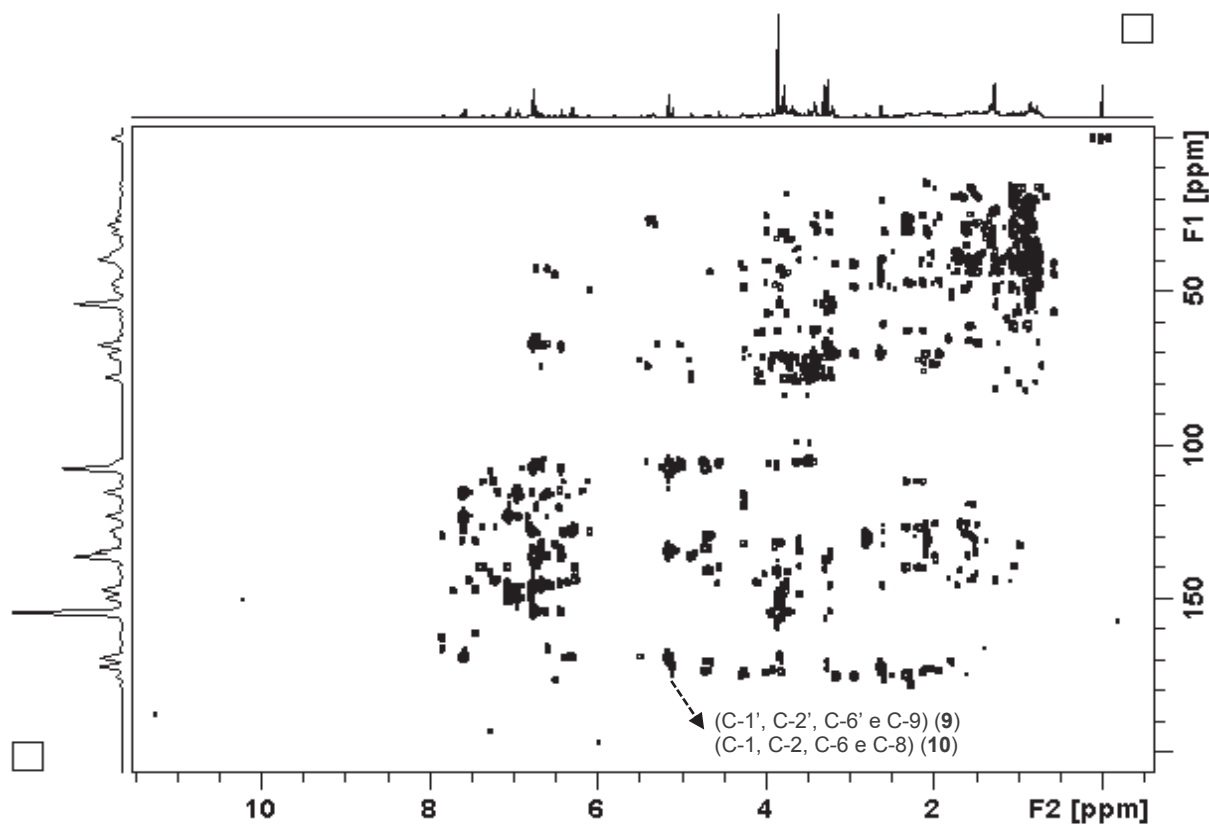


Figura 67 – Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC de *B. articulata* (RS) (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).

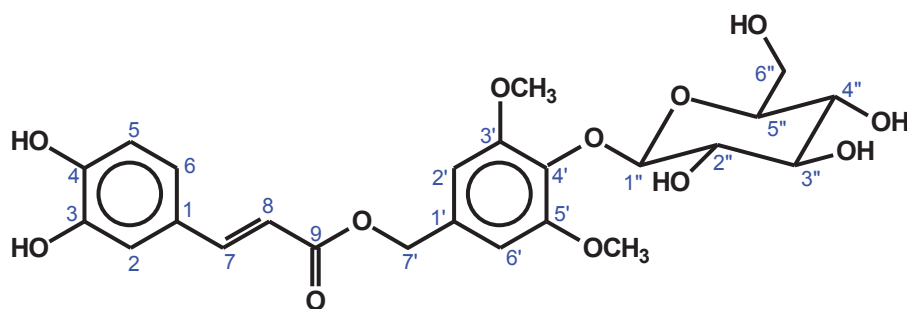


Figura 68 – Estrutura do cafeato de 4'-O- β -glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzila (BAII).

Tabela 15 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do cafeato de 4'-O- β -glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzila (BAII).

Posição	Cafeato de 4'-O- β -glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzila (Ball)		
	δ ^1H (mult., J em Hz) ^a	δ ^{13}C ^a	HMBC
1		128,0	
2	7,04 (1H, <i>d</i> , 2,1)	115,4	3, 4 e 6
3		146,8	
4		149,8	
5	6,77 (1H, <i>d</i> , 8,2)	116,6	1, 3 e 4
6	6,94 (1H, <i>dd</i> , 8,2 e 2,1)	123,2	2, 4 e 7
7	7,58 (1H, <i>d</i> , 15,9)	147,2	2, 6 e 9
8	6,30 (1H, <i>d</i> , 15,9)	115,0	1 e 9
9		169,2	
1'		134,5	
2'	6,76 (1H, <i>s</i>)	107,5	
3'		154,4	
4'		136,3	
5'		154,4	
6'	6,76 (1H, <i>s</i>)	107,5	
7'	5,15 (1H, <i>s</i>)	67,3	1', 2' e 6'
1''	4,89 (1H, <i>d</i> , 7,7)	105,3	
2''	3,48 (1H, <i>m</i>)	75,9	
3''	3,58 (1H, <i>m</i>)	75,8	
4''	3,42 (1H, <i>m</i>)	71,2	
5''	3,42 (1H, <i>m</i>)	77,9	
6''	3,68 (1H, <i>m</i>) 3,78 (1H, <i>m</i>)	62,6	
3'-OCH ₃	3,86 (3H, <i>s</i>)	57,1	3'
5'-OCH ₃	3,86 (3H, <i>s</i>)	57,1	5'

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. (δ) Deslocamento químico em ppm.

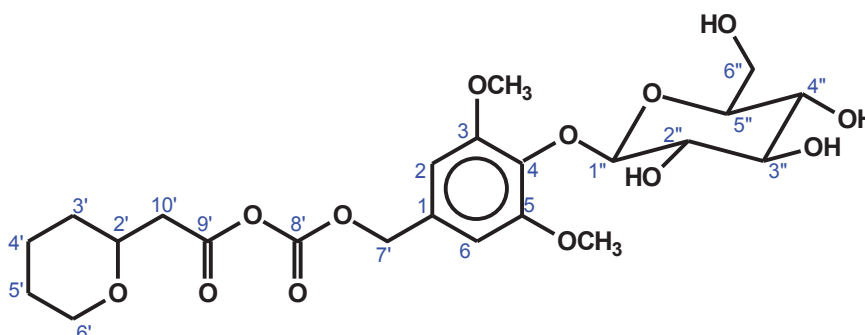


Figura 69 – Estrutura do carbonato de 4-*O*- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-tetraidro-2H-piran-2-il-acetil (BAIII).

Tabela 16 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do carbonato de 4-*O*- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-tetraidro-2H-piran-2-il-acetil (BAIII).

Posição	Carbonato de 4- <i>O</i> - β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-tetraidro-2H-piran-2-il-acetil (BAIII).			Literatura (OLIVEIRA, 2008)	
	δ ^1H (mult., <i>J</i> em Hz) ^a	δ $^{13}\text{C}^a$	HMBC	δ ^1H (mult., <i>J</i> em Hz) ^b	δ $^{13}\text{C}^b$
1		134,3			133,1
2	6,74 (1H, s)	107,4	4, 6 e 7'	6,77 (1H, s)	106,2
3		154,4			153,2
4		136,0			135,6
5		154,4			153,2
6	6,74 (1H, s)	107,4	2, 4 e 7'	6,77 (1H, s)	106,2
2'	3,41 (1H, m)	49,6		3,40 (1H, s)	49,0
3'	2,63 (2H, s)	48,7		2,60 (2H, s)	47,2
4'	1,82 (1H, m) 2,09 (1H, m)	25,5		1,80 (1H, m) 2,10 (1H, m)	24,4
5'	2,00 (2H, m)	40,3		2,00 (2H, m)	39,9
6'	3,15 (1H, m) 2,94 (1H, m)	46,5		3,20 (1H, m) 3,00(1H, m)	45,3
7'	5,10 (2H, s)	67,4	1, 2, 6 e 8'	5,10 (1H, s)	66,4
8'		171,8			170,8
9'					174,0
10'	4,27 (2H, s)	70,3		4,30 (2H, s)	69,2
1''	4,88 (1H, m)	105,4		4,90 (1H, d, 7,5)	104,1
2''	3,54 (1H, m)	74,0		3,50 (1H, m)	74,0
3''	3,43 (1H, m)	75,8		3,40 (1H, m)	76,9
4''	3,42 (1H, m)	71,4		3,40 (1H, m)	70,6
5''	3,20 (1H, m)	78,1		3,20 (1H, m)	77,1
6''	3,67 (1H, m) 3,78 (1H, m)	62,6		3,70 (1H, m) 3,80 (1H, m)	61,7
3-OCH ₃	3,84 (3H, s)	57,1	3	3,90 s	56,0
5-OCH ₃	3,84 (3H, s)	57,1	5	3,90 s	56,0

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CD_3OD . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados comparados com a literatura Oliveira et al. (2008) (^1H , 500 MHz e ^{13}C , 125 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

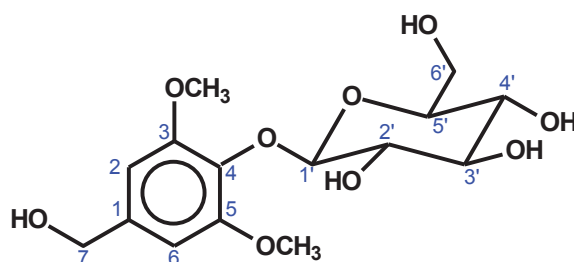


Figura 70 – Estrutura do 4-O- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-metanol (BAIV).

Tabela 17 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do 4-O- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-metanol (BAIV).

Posição	4-O- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-metanol (BaIV)			Literatura (OLIVEIRA, 2008)	
	δ ^1H (mult., J em Hz) ^a	δ $^{13}\text{C}^a$	HMBC	δ ^1H (mult., J em Hz) ^b	δ $^{13}\text{C}^b$
1		139,8			
2	6,70 (1H, s)	105,8	4, 6 e 7	6,70 s	104,0
3		154,3			
4		135,2			
5		154,3			
6	6,70 (1H, s)	105,8	2, 4 e 7	6,70 s	104,0
7	4,55 (2H, m)	65,1	1, 2 e 6	4,60 s	65,0
1'	4,29 (1H, m)	104,8		4,30 d (7,7)	103,1
2'				3,15 m	74,0
3'				3,30 - 3,40 (1H, m)	76,9
4'				3,30 - 3,40 (1H, m)	70,6
5'				3,30 - 3,40 (1H, m)	77,1
6'				3,72 (1H, m) 3,85 (1H, m)	61,7
3-OCH ₃	3,83 (3H, s)	56,9	3	3,85 s	55,9
5-OCH ₃	3,83 (3H, s)	56,9	5	3,85 s	55,9

^a Experimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em MeOD- d_4 . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados comparados com a literatura Oliveira et al. (2008) (^1H , 500 MHz e ^{13}C , 125 MHz, CD₃OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

Além da apigenina observada em *B. articulata* (Figura 71 e 72 – Pág. 126-127), o espectro de RMN de ^1H das amostras de *B. articulata* provenientes do Paraná permitiu verificar a presença de sinais relativos a hidrogênios olefínicos característicos de duplas ligações *trans* em δ 7,58 e 7,61 (*d*, $J = 15,9$ Hz) e δ 6,28 e 6,38 (*d*, $J = 15,9$ Hz), correlacionando a longa distância com os carbonos em δ 168,9 e 169,2 característicos de carbonilas de ácidos dicafeoilquínicos (Figura 72 e 75 – Pág. 127-128).

Observaram-se ainda quatro dupletos em δ 6,78 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz), 6,79 (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz), 7,06 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) e 7,07 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz), bem como dois duplos dupletos em δ 6,96 (1H, *dd*, $J = 8,4$ e 2,0 Hz) e δ 6,96 (1H, *dd*, $J = 8,4$ e 2,0 Hz), indicando a ocorrência de dois anéis aromáticos 1,3,4-trissubstituídos, o que permitiu sugerir a presença de duas unidades cafeoila (**Figuras 72 e 73** – Pág. 127).

As correlações diretas ^1H - ^{13}C dos sinais em δ 5,40 e 5,41 (*m*) com carbonos em δ 73,6 e 71,9, bem como, os hidrogênios metilênicos em δ 2,01 e 2,16, e dos hidrogênios em δ 1,53 e 2,03, os quais se correlacionam diretamente com os carbonos em δ 40,0 e 37,6, em C-4 e C-3, sugere a presença do ácido quínico (**Figuras 72 e 74** – Pág. 127-128). Os dados de RMN de ^1H , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC e comparações com dados da literatura permitiu identificar o ácido 3,5-dicafeoilquínico (**Figuras 72, 73, 74, 75 e 76, Tabela 18** – Pág. 127-129).

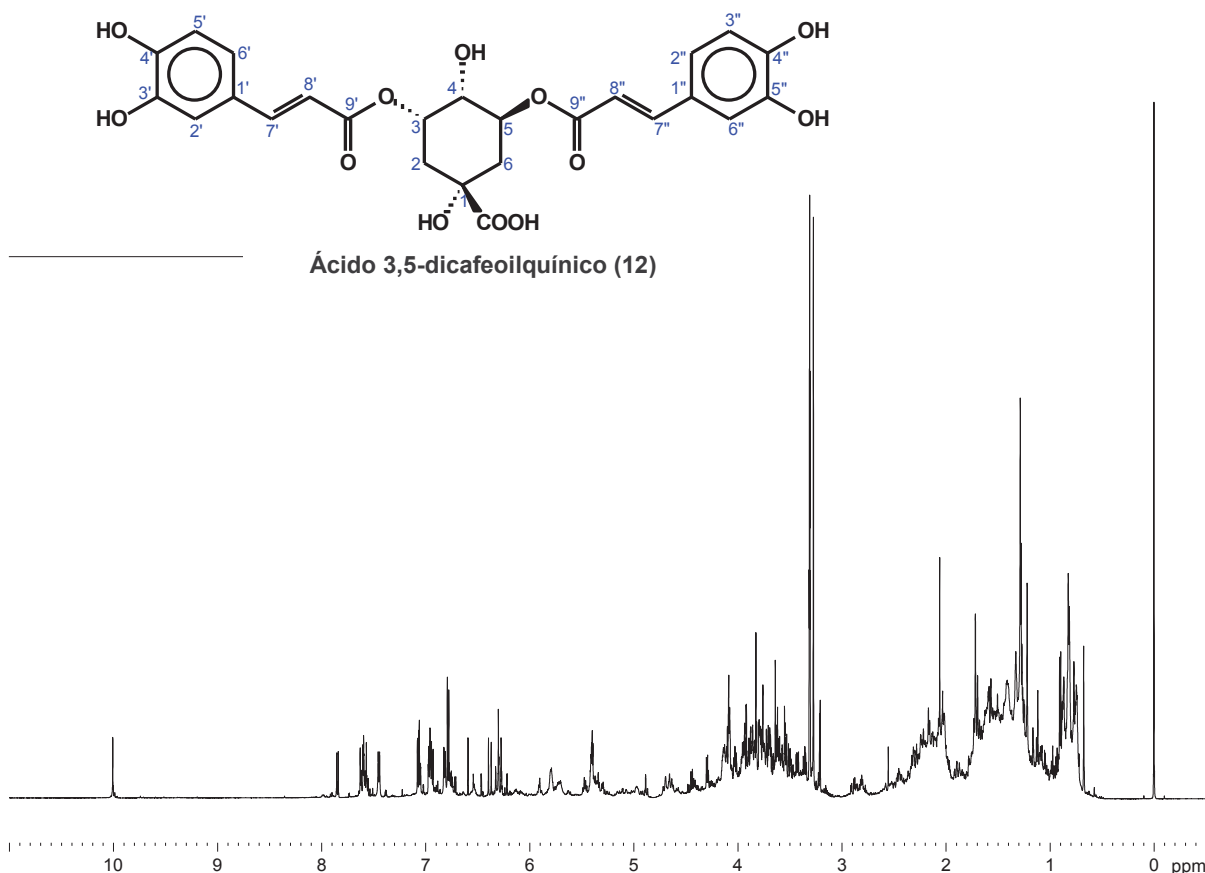


Figura 71 – Espectro de RMN de ^1H de *B. articulata* (PR) (600 MHz, CD_3OD).

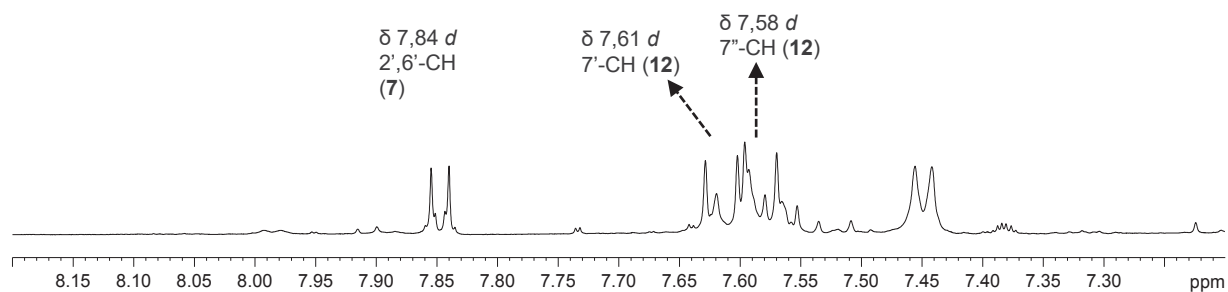
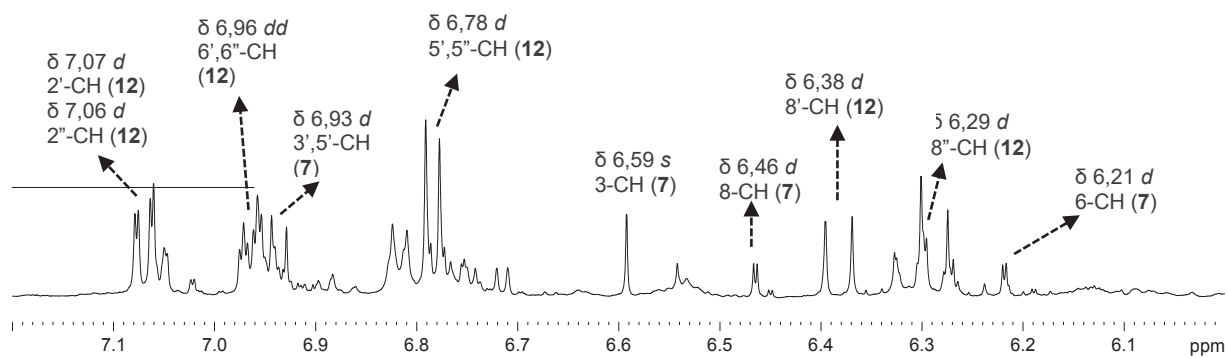


Figura 72 – Ampliação da região entre δ 8,20-6,00 do espectro de RMN de ^1H de *B. articulata* (PR) (600 MHz, CD_3OD).

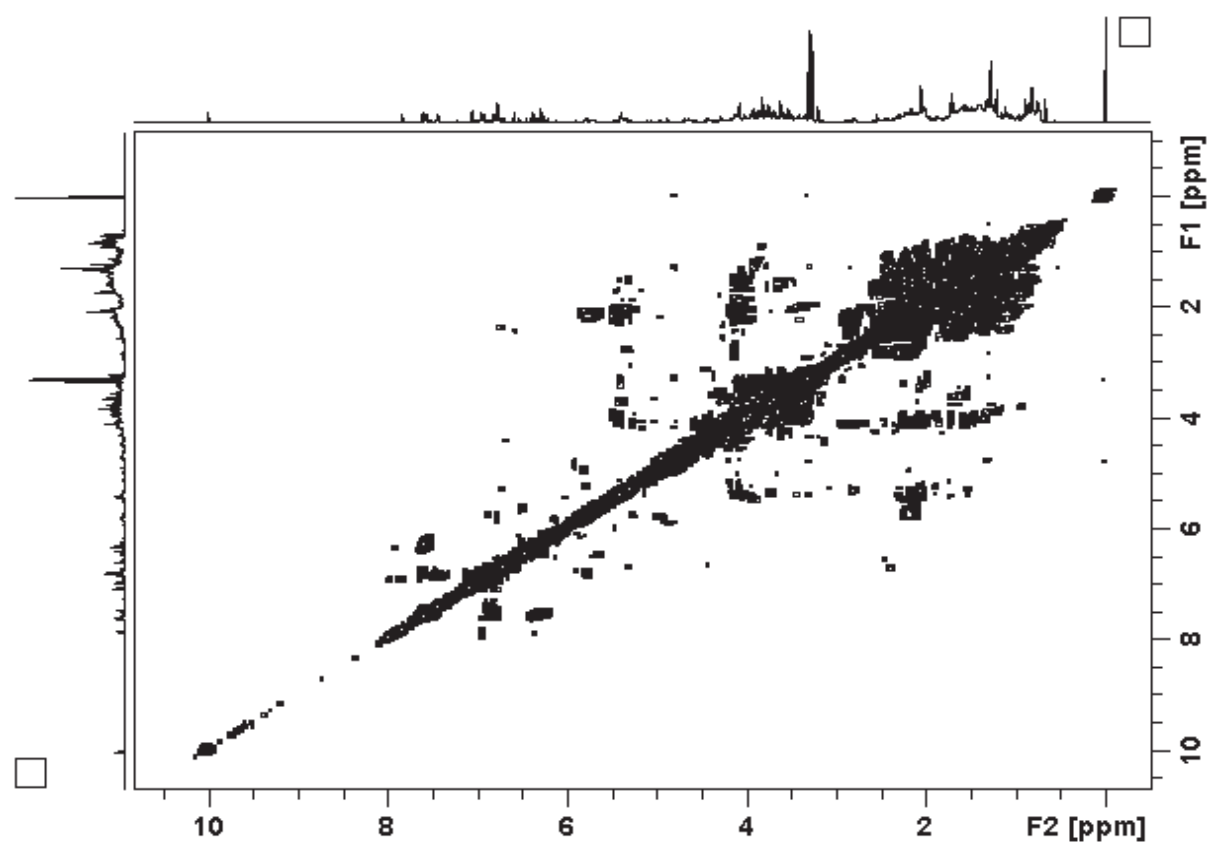


Figura 73 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY de *B. articulata* (PR) (600 MHz, CD_3OD).

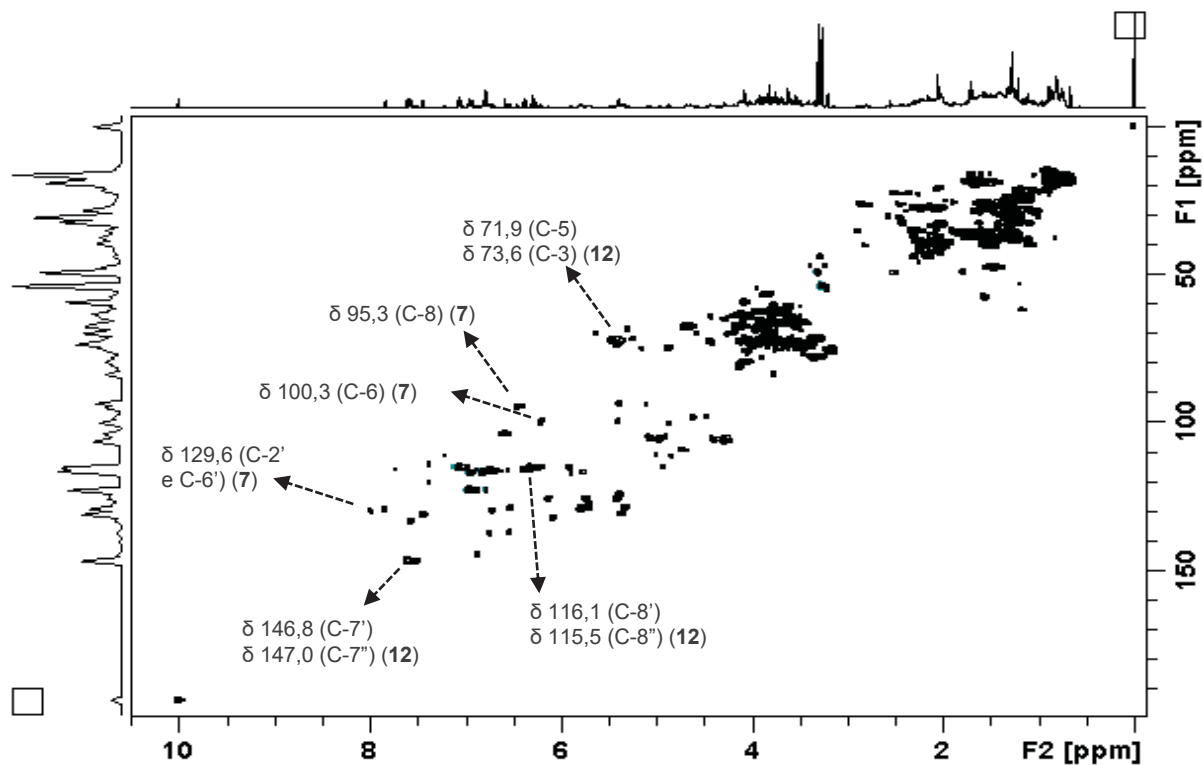


Figura 74 – Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC de *B. articulata* (PR) (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).

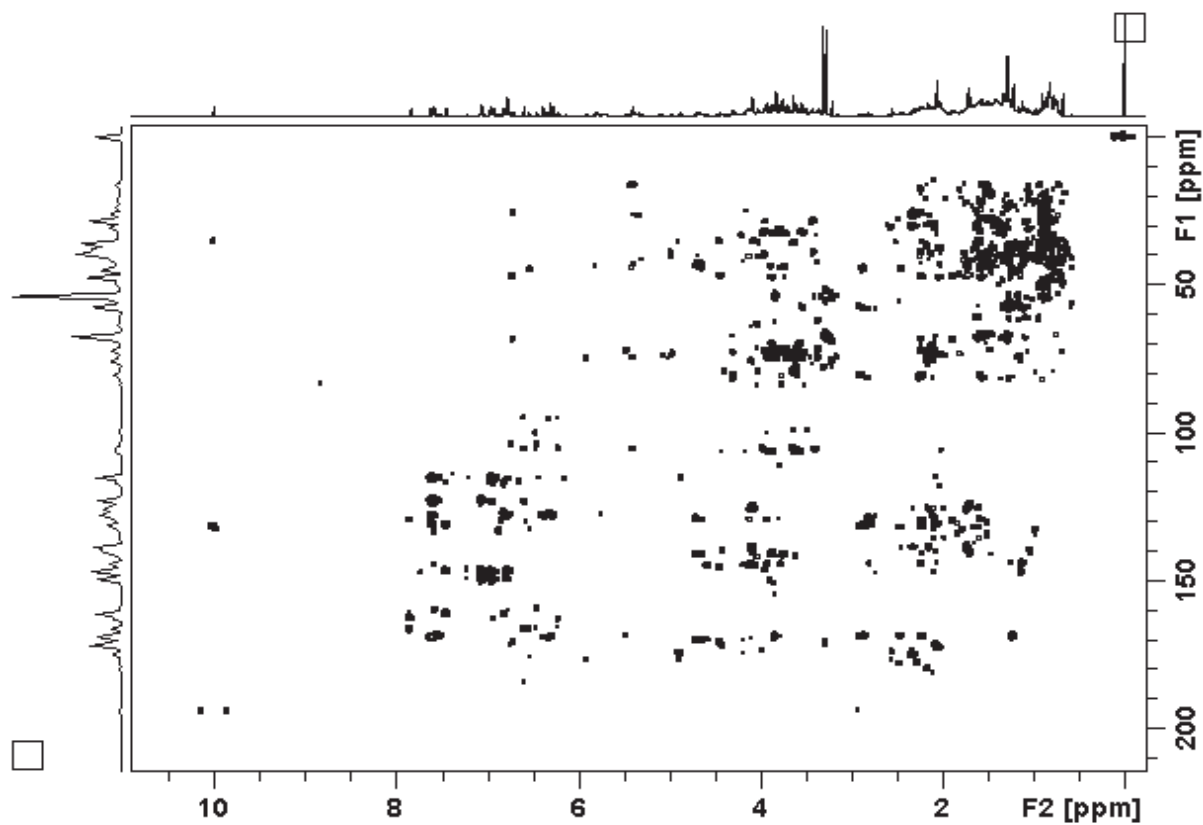


Figura 75 – Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC de *B. articulata* (PR) (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).

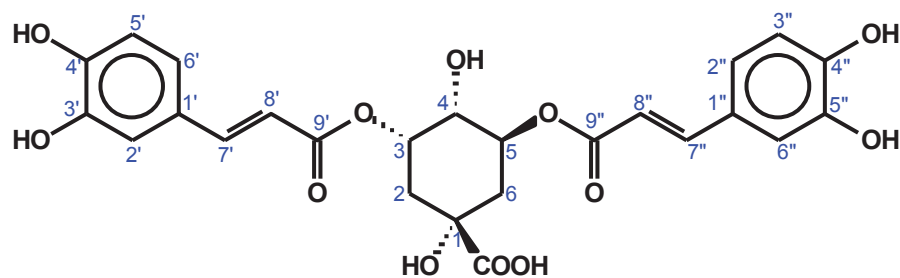


Figura 76 – Estrutura do ácido 3,5-dicafeoilquínico

Tabela 18 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ácido 3,5-dicafeoilquínico.

Posição	Ácido 3,5-dicafeoilquínico			Literatura (PULIDO et al., 2017)	
	δ ^1H (mult., J em Hz) ^a	δ ^{13}C ^a	HMBC	δ ^1H (mult., J em Hz) ^b	δ ^{13}C ^c
1					74,7
2	1,53 (1H, <i>m</i>) 2,02 (1H, <i>m</i>)	37,6		2,12 (1H, <i>m</i>) 2,28 (1H, <i>m</i>)	35,9
3	5,40 (1H, <i>m</i>)	73,6		5,45 (1H, <i>dd</i> , 5,9 e 3,3)	72,5
4	3,92 (1H, <i>m</i>)	73,7		3,95 (1H, <i>dt</i> , 8,7 e 3,3)	70,8
5	5,41 (1H, <i>m</i>)	71,9		5,40 (1H, <i>dd</i> , 5,7 e 3,5)	71,9
6	2,01 (1H, <i>m</i>) 2,16 (1H, <i>m</i>)	40,06	7	2,17 (2H, <i>m</i>)	37,7
7		179,5			
1'		128,2			127,8
2'	7,07 (1H, <i>d</i> , 2,0)	115,2	3', 4' e 6'	7,07 (1H, <i>dd</i> , 1,4 e 0,4)	115,3
3'		146,8			146,5
4'		149,5			149,3
5'	6,78 (1H, <i>d</i> , 8,4)	116,5	1', 3' e 4'	6,78 (1H, <i>d</i> , 8,3)	116,4
6'	6,96 (1H, <i>dd</i> , 8,4 e 2,0)	122,9	2', 4' e 7'	6,97 (1H, <i>dd</i> , 8,3 e 1,4)	122,9
7'	7,61 (1H, <i>d</i> , 15,9)	146,8	2', 6' e 9'	7,62 (1H, <i>d</i> , 15,9)	147,0
8'	6,38 (1H, <i>d</i> , 15,9)	116,1	1' e 9'	6,38 (1H, <i>d</i> , 15,9)	115,4
9'		169,2			168,9
1''		127,9			127,7
2''	7,06 (1H, <i>d</i> , 2,0)	115,4	3'', 4'' e 6''	7,06 (1H, <i>dd</i> , 1,4 2,0)	115,1
3''		146,8			146,5
4''		149,5			149,4
5''	6,78 (1H, <i>d</i> , 8,4)	116,6	1'', 3'' e 4''	6,78 (1H, <i>d</i> , 8,3)	116,4
6''	6,96 (1H, <i>dd</i> , 8,4 e 2,0)	123,1	2'', 4'' e 7''	6,97 (1H, <i>dd</i> , 8,3 e 1,4)	123,0
7''	7,58 (1H, <i>d</i> , 15,9)	146,8	2'', 6'' e 9''	7,58 (1H, <i>d</i> , 15,9)	147,2
8''	6,28 (1H, <i>d</i> , 15,9)	115,5	1'' e 9''	6,28 (1H, <i>d</i> , 15,9)	115,0
9''		168,9			168,4

^a Experimento realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em $\text{MeOD}-d_4$. Utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados comparados com a literatura Pulido et al. (2017) e ^cSatake et al. (2007) (^1H , 400 MHz e ^{13}C , 100 MHz, CD_3OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

A presença do ácido cafeico em *B. junciformis* foi confirmada pela existência dos dupletos observados nos espectros de RMN HR-MAS de ^1H característicos de duplas *trans* em δ 6,28 e 7,56 (2H, *d*, $J = 16,0$ Hz), relativos aos hidrogênios em C7 e C8, devido a correlação direta com os carbonos em δ 115,0 e 147,0 (**Figura 78 e 80** – Pág. 131-132), bem como correlação a longa distância com os carbonos em δ 115,0, 122,9 e 170,0 referentes aos carbonos e C-2, C-6 e C-9 do ácido cafeico, respectivamente (**Figura 81 e 82, Tabela 19** – Pág. 132-133).

Foram observados ainda, a presença de dois dupletos δ 7,04 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) e 6,77 (1H, *d*, $J = 8,3$ Hz;), e um duplo duplete em δ 7,93 (1H, *dd*, $J = 8,3$ e 2,2 Hz), relativos aos hidrogênios em C-2, C-5 e C-6, correlacionando diretamente com os carbonos em δ 115,0, 116,4 e 122,9, respectivamente (**Figura 81 e 82** – Pág. 132-133). Os dados de RMN de ^1H , ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HSQC e ^1H - ^{13}C HMBC e comparações com dados da literatura permitiram identificar o ácido cafeico (**Figura 82, Tabela 19** – Pág. 133).

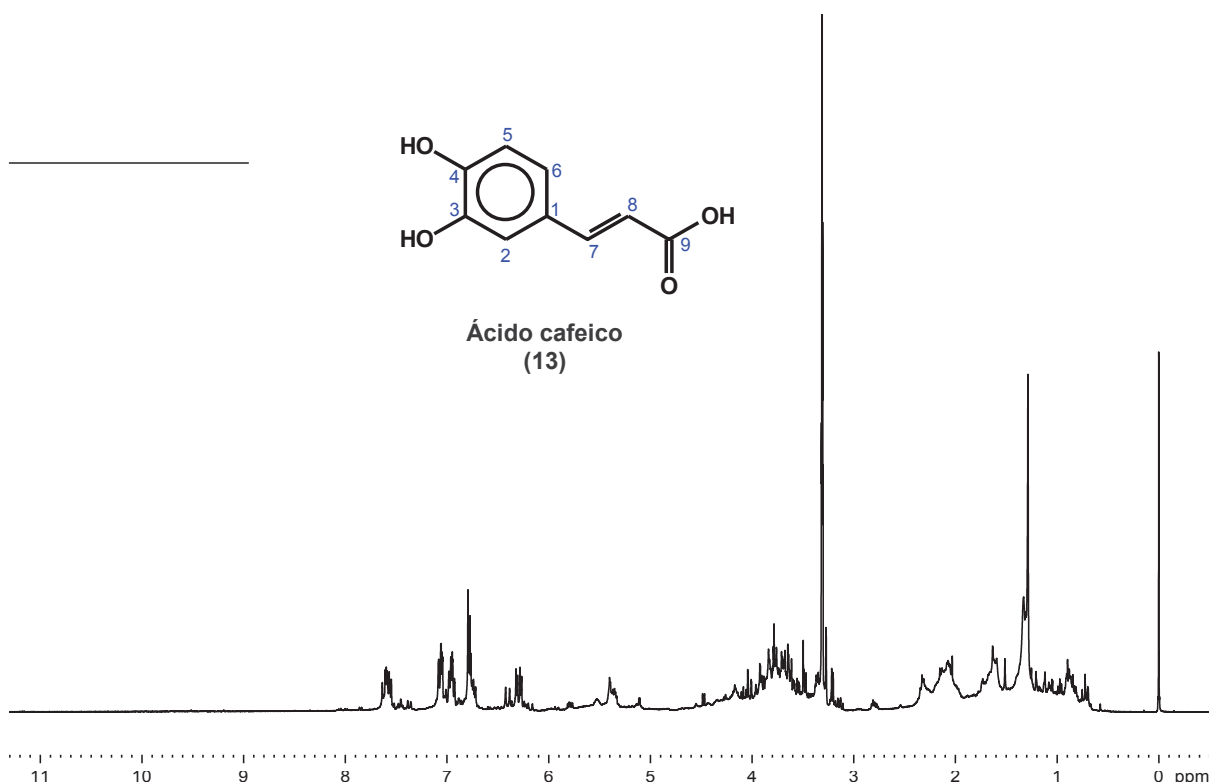


Figura 77 – Espectro de RMN de ^1H de *B. junciformis* (600 MHz, CD_3OD).

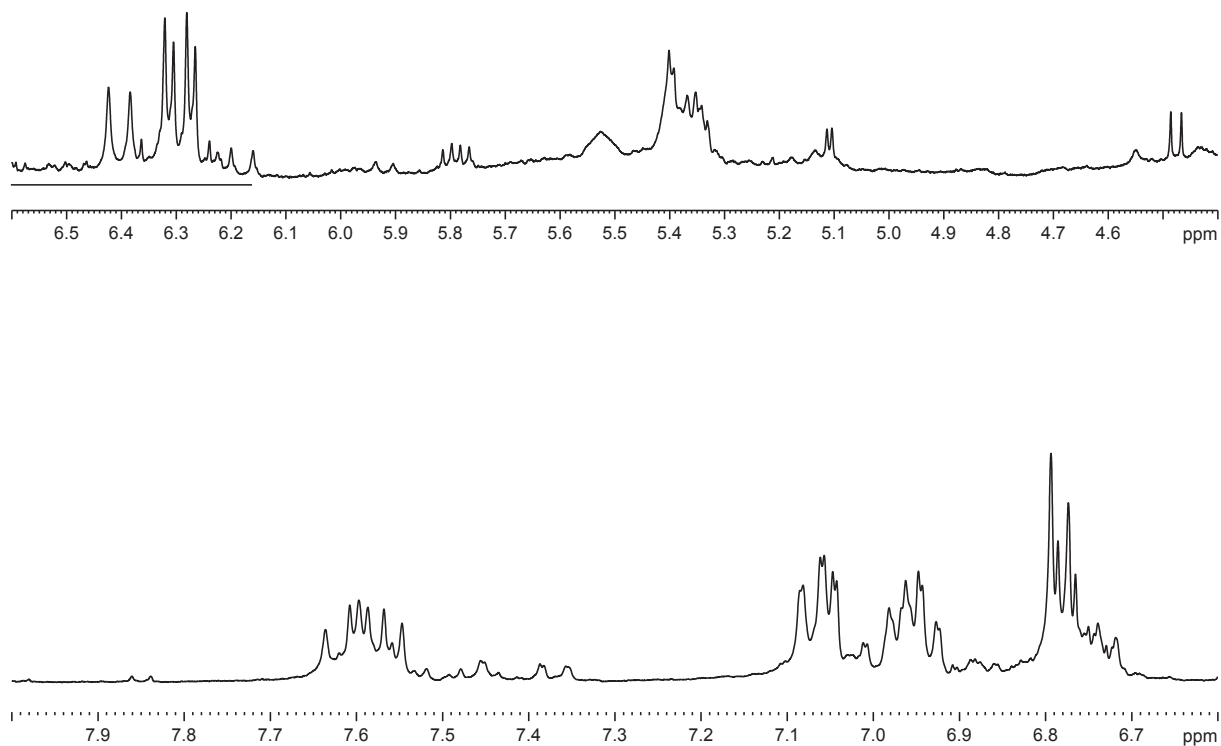


Figura 78 – Ampliação da região em δ 8,00-4,40 do espectro de RMN de ^1H de *B. junciformis* (600 MHz, CD_3OD).

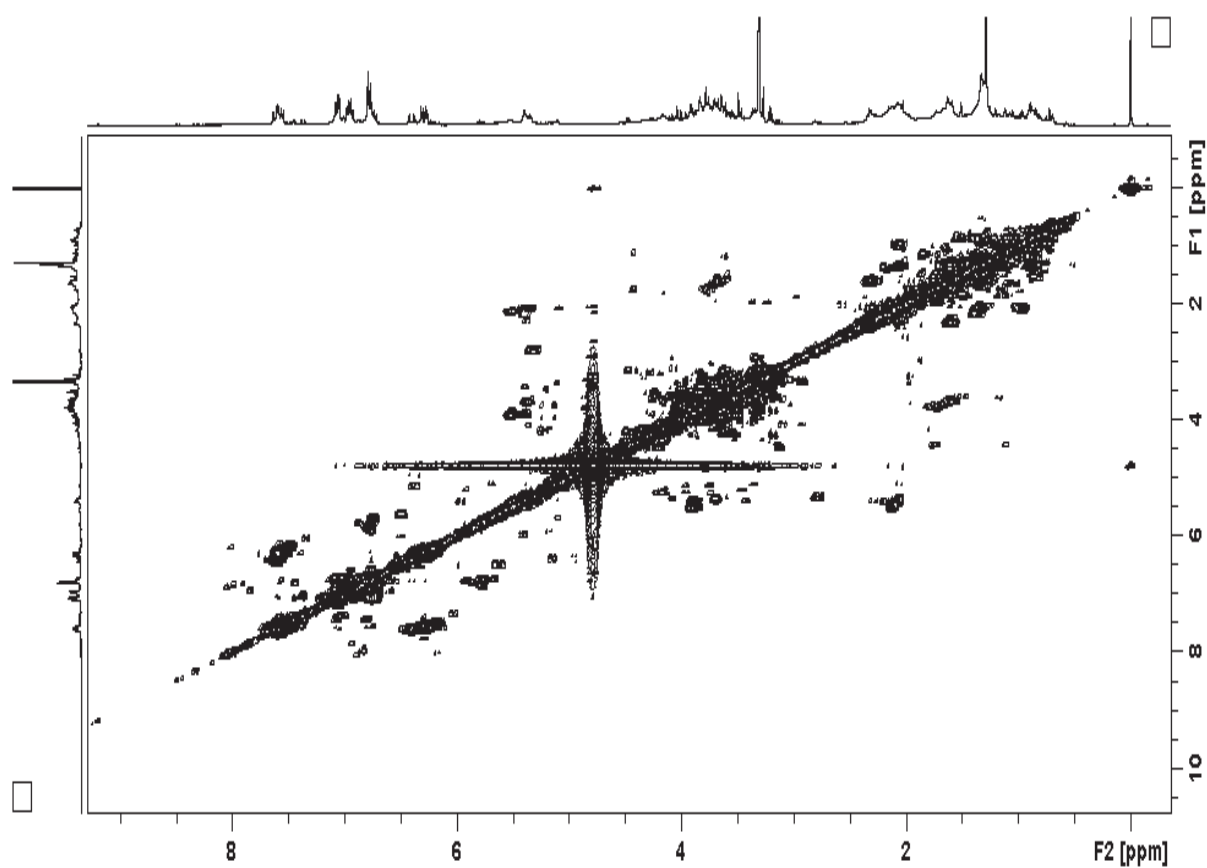


Figura 79 – Mapa de correlação ^1H - ^1H COSY de *B. junciformis* (600 MHz, CD_3OD).

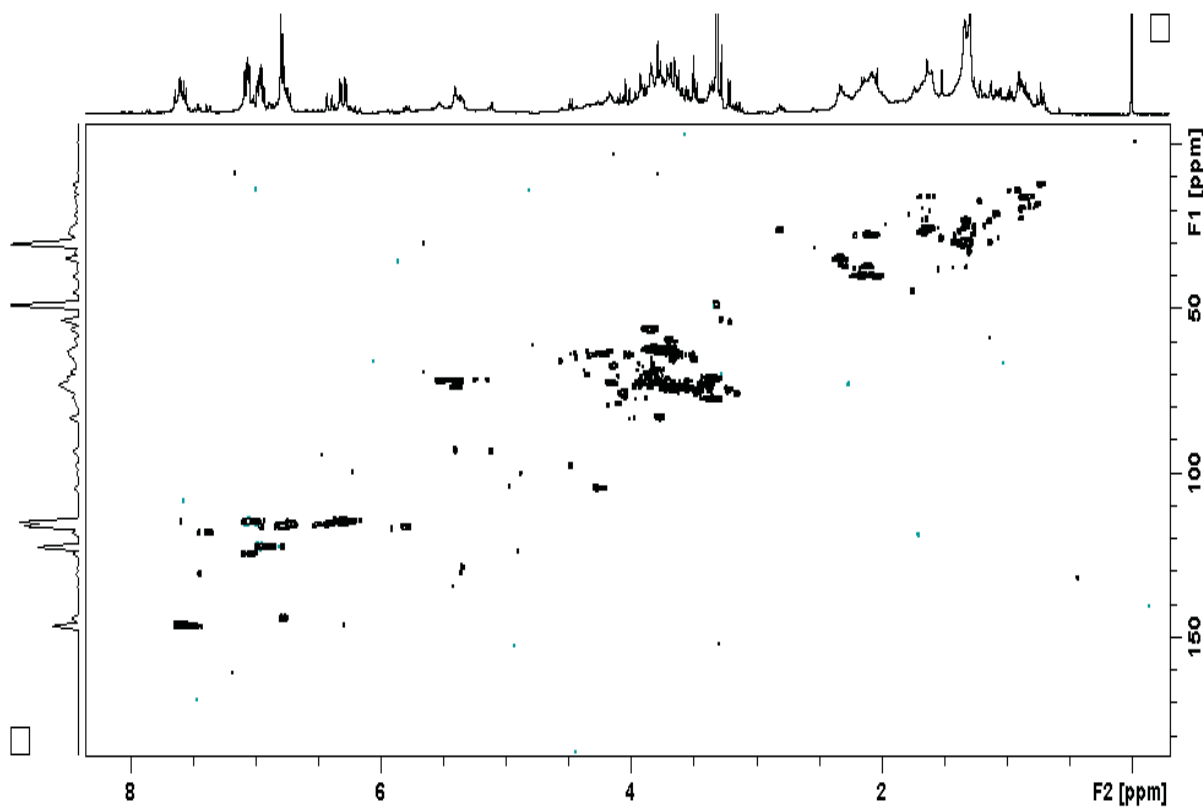


Figura 80 – Mapa de correlação direta ^1H - ^{13}C HSQC de *B. junciformis* (^1H : 600 MHz e ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD).

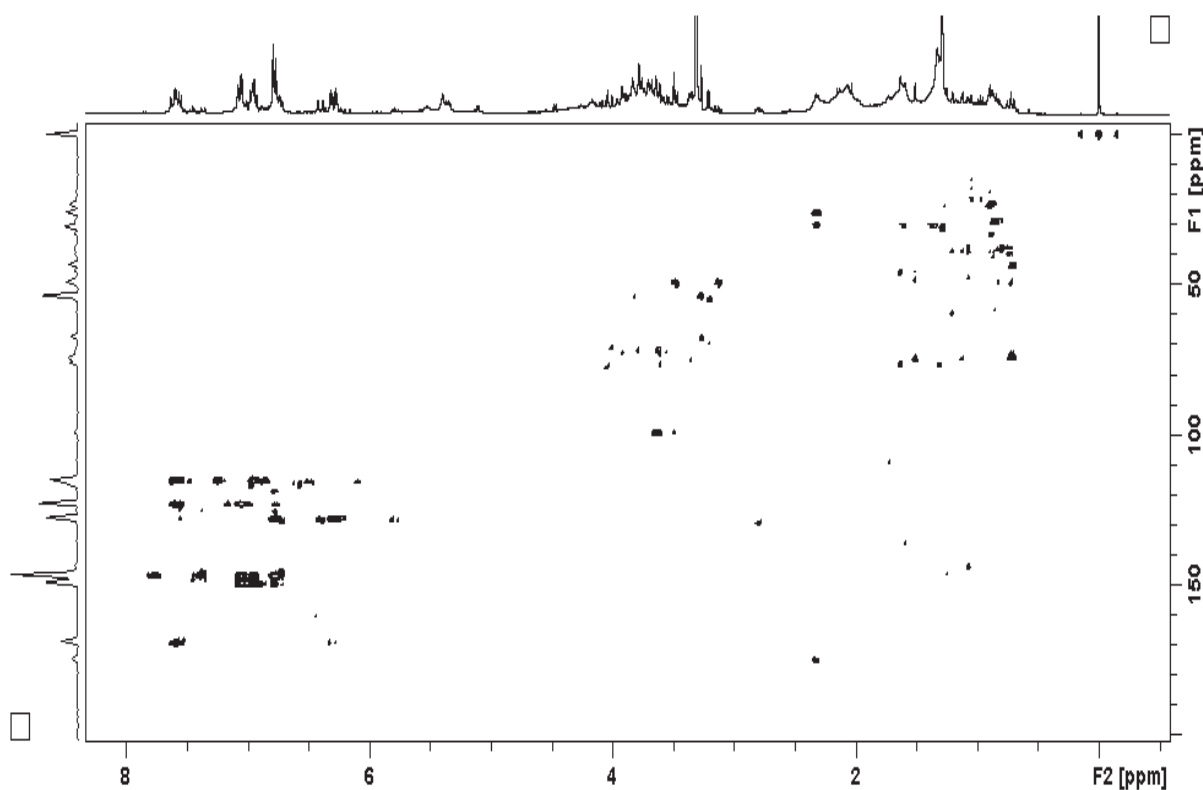


Figura 81 – Mapa de correlação a longa distância ^1H - ^{13}C HMBC de *B. junciformis* (^1H :600 MHz e ^{13}C :150 MHz, CD_3OD).

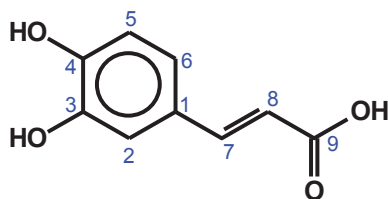


Figura 82 – Estrutura do ácido cafeico.

Tabela 19 – Dados de RMN de ^1H e $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ do ácido cafeico.

Posição	Ácido cafeico			Literatura (HONG et al., 2016)	
	δ ^1H (mult., J em Hz) ^a	δ $^{13}\text{C}^a$	HMBC	δ ^1H (mult., J em Hz) ^b	δ $^{13}\text{C}^b$
1		127,9			
2	7,04 (1H, <i>d</i> , 2,0)	115,0	3, 4 e 6	7,03 (1H, <i>d</i> , 2,1)	115,0
3		147,0			146,7
4		149,5			149,4
5	6,77 (1H, <i>d</i> , 8,3)	116,4	1, 3 e 4	6,77 (1H, <i>d</i> , 8,4)	116,5
6	6,93 (1H, <i>dd</i> , 8,3 e 2,0)	122,9	2 e 4	6,92 (1H, <i>dd</i> , 8,4 e 2,1)	122,8
7	7,56 (1H, <i>d</i> , 16,0)	146,8	2, 6 e 9	7,51 (1H, <i>d</i> , 16,1)	146,8
8	6,28 (1H, <i>d</i> , 16,0)	115,2	1 e 9	6,22 (1H, <i>d</i> , 16,1)	116,1
9		170,0			171,6

^aExperimento realizado a 600MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em MeOD- d_4 . Utilizando o TMS como padrão de referência. ^bDados comparados com a literatura Hong et al. (2016) (^1H , 700 MHz ^{13}C , 175 MHz, CD₃OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.

4.4 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

4.4.1 Análise de Componentes Principais das espécies de referência de *Baccharis*

A análise de componentes principais (PCA) foi empregada com a finalidade de verificar a possibilidade de discriminação das espécies *B. articulata*, *B. trimera*, *B. junciformis*, *B. milleflora* e *B. myriocephala* em função da sua composição química observada através dos experimentos de RMN HR-MAS de ^1H do material vegetal. Especificamente, objetivou-se verificar se seria possível discriminar a espécie *B. trimera* das demais espécies de *Baccharis* analisadas, uma vez que os critérios de qualidade mínimos exigidos para esta espécie estão descritos na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira como planta medicinal, além de compor a RENISUS como planta medicinal propensa a se tornar um fitoterápico (BRASIL, 2009; ANVISA, 2010).

Os espectros de RMN são construídos com uma grande quantidade de pontos, ou seja, uma imensa quantidade de variáveis para serem manipuladas. Além disso, um mesmo sinal, que seria uma única variável é representado por inúmeros pontos. Desta forma, os espectros são construídos em *buckets* que se tornam as novas variáveis utilizadas nas análises quimiométricas. Este processo consiste na divisão dos espectros em pequenos intervalos de tamanhos previamente definidos, minimizando assim a dimensionalidade dos dados (**Figura 83** – Pág. 135). Neste procedimento, as áreas de cada *bucket* são determinadas, de modo que a área sob cada região espectral é usada ao invés das intensidades. Além disso, a conversão dos espectros em *buckets* permite superar variabilidade normal do deslocamento químico das frequências de ressonância em função das diferenças de concentração, pH e susceptibilidade magnética da amostra (SOUSA et al., 2013).

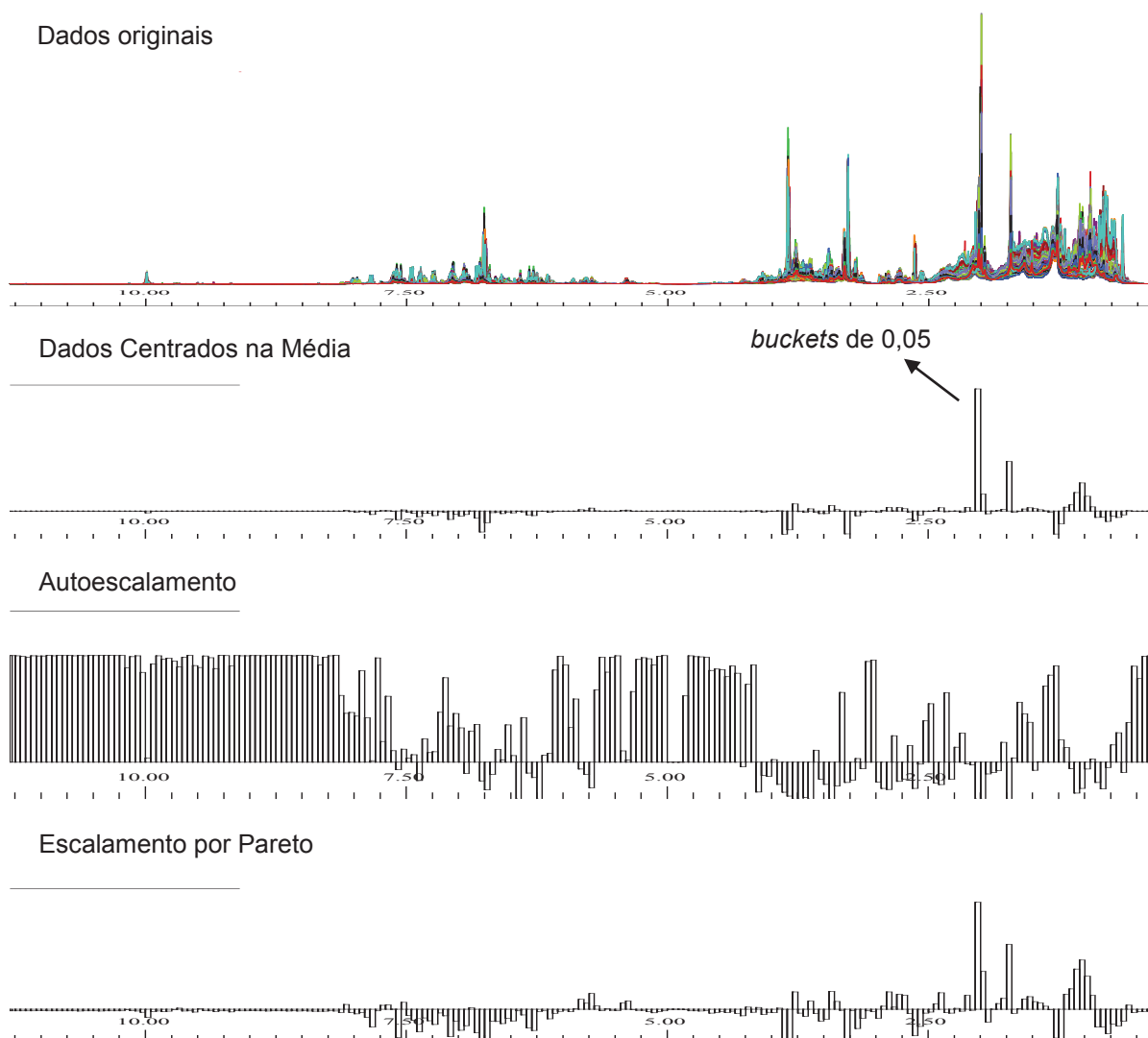


Figura 83 – *Buckets* de 0,05 ppm após normalização dos dados em PC1 utilizando diferentes pré-processamentos.

A área dos sinais foi determinada através do modo de integração especial do programa AMIX, método amplamente empregado na literatura, que dispensa a necessidade de corrigir a linha de base e a fase dos espectros. Mesmo assim, para evitar quaisquer anomalias foi realizada a correção manual da fase e linha de base de todos os espectros. Em seguida, as áreas dos *buckets* foram normalizadas em relação a área total de cada espectro, de forma que não haja influência nos resultados nas quantidades de massa de cada amostra, inserida no rotor de RMN HR-MAS, dispensando assim a necessidade de fixar a quantidade de amostra analisada (AMIX, 2008). Entretanto, foi utilizado sempre a mesma quantidade de amostra ($10,0 \pm 0,5$ mg) para evitar maiores desvios desse fator.

Neste trabalho, os espectros de RMN HR-MAS de ^1H foram analisados de três formas: dados centrados na média, escalamento por Pareto e autoescalamento. Quando os dados centrados na média é utilizado, o valor médio de cada coluna (i.e., *buckets*) é calculado e posteriormente subtraído de cada um dos valores da coluna. Dessa forma, a média torna-se zero e as diferenças entre metabólitos majoritários e minoritários são mais evidentes (**Figura 83** – Pág. 135) (VAN DER BERG et al., 2006).

Por sua vez, o escalamento dos espectros por unidade de variância, também denominado autoescalamento, emprega o desvio padrão como um fator de escalamento. Neste processamento, o valor médio de cada variável do conjunto de dados é subtraído seguida da divisão do desvio padrão de cada variável (VAN DER BERG et al., 2006; FERREIRA, 2015). Dessa maneira, a importância dos sinais majoritários é drasticamente reduzida, enquanto os sinais minoritários são aumentados. Assim, todos os metabólitos comportam-se como se fossem igualmente importantes, inclusive o ruído espectral.

O escalamento por Pareto corresponde a um compromisso entre os dois, sendo assim, reduz a importância relativa dos sinais intensos. No escalamento por Pareto, após os dados serem centrados na média, estes são divididos pela raiz quadrada do desvio padrão. Assim, os sinais mais intensos decrescem mais que os sinais menos intensos comparados aos dados centrados na média. Dessa forma, ao utilizar o escalamento por Pareto, a estrutura dos dados torna-se parcialmente intacta (**Figura 83** – Pág. 135) (VAN DER BERG et al., 2006).

A PCA, além de verificar a inter-relação entre as amostras, possibilita o reconhecimento de amostras com comportamento anômalo, denominadas *outliers*. Para isso, o AMIX oferece dois gráficos: *influence plot* e *Hotelling T²*. No primeiro, é plotado no eixo Y a posição de cada amostra em relação à variância explicada pelas PCs consideradas, também chamado “espaço do modelo”, enquanto no eixo X a posição de cada amostra em relação ao “centro do modelo”. Neste trabalho foi considerado um limite de 95% de confiança. Assim, as amostras que estiverem fora das linhas de confiança de 95% podem ser consideradas *outliers* em potencial. Por sua vez, no *Hotelling T²* é fornecido um contorno do gráfico de escores, representando o limite de confiança desejado, onde as amostras devem estar contidas (**Figura 84** – Pág. 137) (AMIX, 2008).

Considerando o limite de confiança de 95%, é observada a presença de amostras anômalas (**Figura 84** – Pág. 137). No entanto, para que a amostra seja

considerada de fato *outlier*, foi realizada a inspeção visual dos espectros. Neste processo foi verificada a largura dos sinais, se os sinais adjacentes ao sinal da água foram afetados pela pré-saturação, bem como, a presença de sinais, como acetona e outros solventes. Uma vez encontrada uma justificativa plausível, pode-se realizar a exclusão dos dados. Dessa maneira, a observação dos espectros permitiu constatar que as amostras não representam *outliers*, sendo, portanto, mantidas no conjunto amostral (**Figura 84** – Pág. 137).

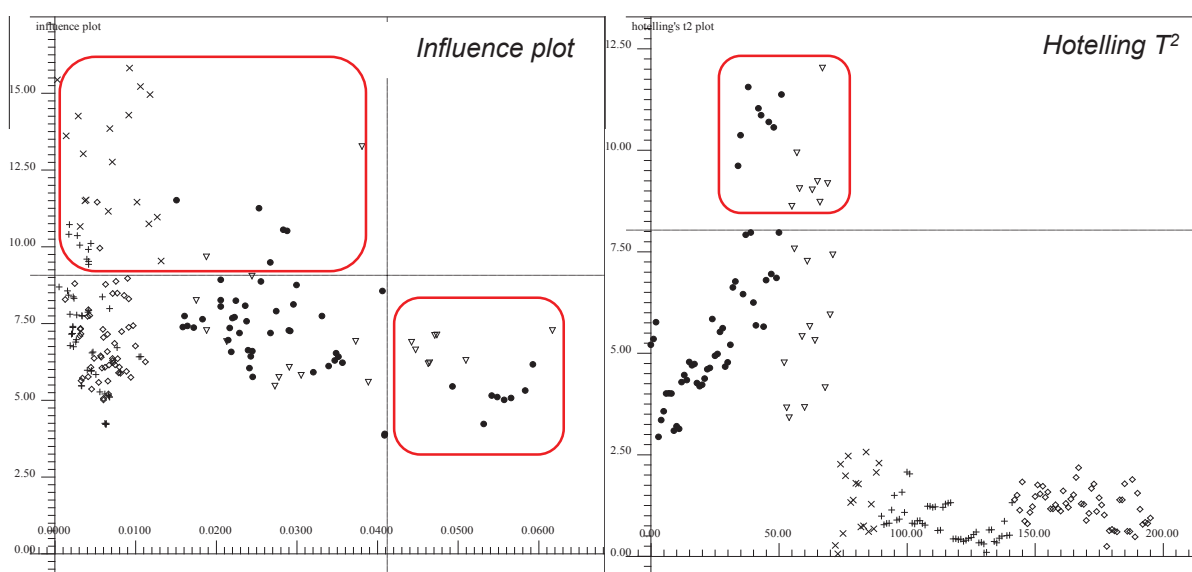


Figura 84 – Gráfico de *influence plot* e *hotelling T²* das amostras de referência de *Baccharis*.

A análise de componentes principais conduzida considerando toda a região espectral dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H (δ 11,30-0,30), dados centrados na média (**Figura 85** – Pág. 138) e escalamento por Pareto como pré-processamento (**Figura 86** – Pág. 139) permitiu discriminar as amostras de referência de acordo com a espécie de *Baccharis*, exceto as espécies *B. trimera* e *B. myriocephala*. Quando comparado aos outros pré-processamentos, a discriminação empregando o autoescalamento dos espectros não foi satisfatória (**Figura 87** – Pág. 140). Dessa forma, torna-se evidente que os sinais mais intensos são responsáveis pela discriminação.

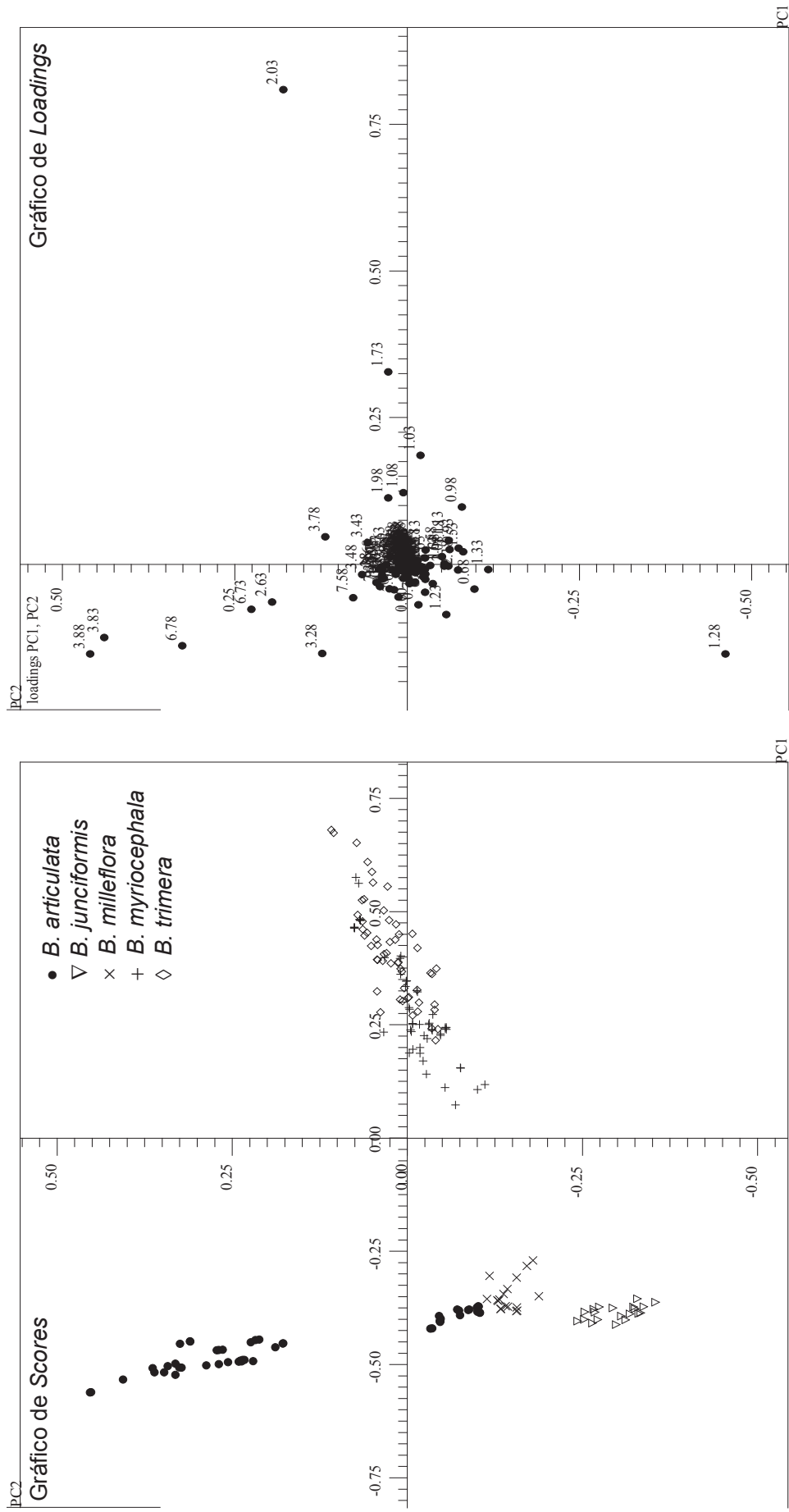


Figura 85 – Análise de PCA (PC1-67,86% versus PC2-11,68%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), *bucket* de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD₃OD), Dados Centrados na Média.

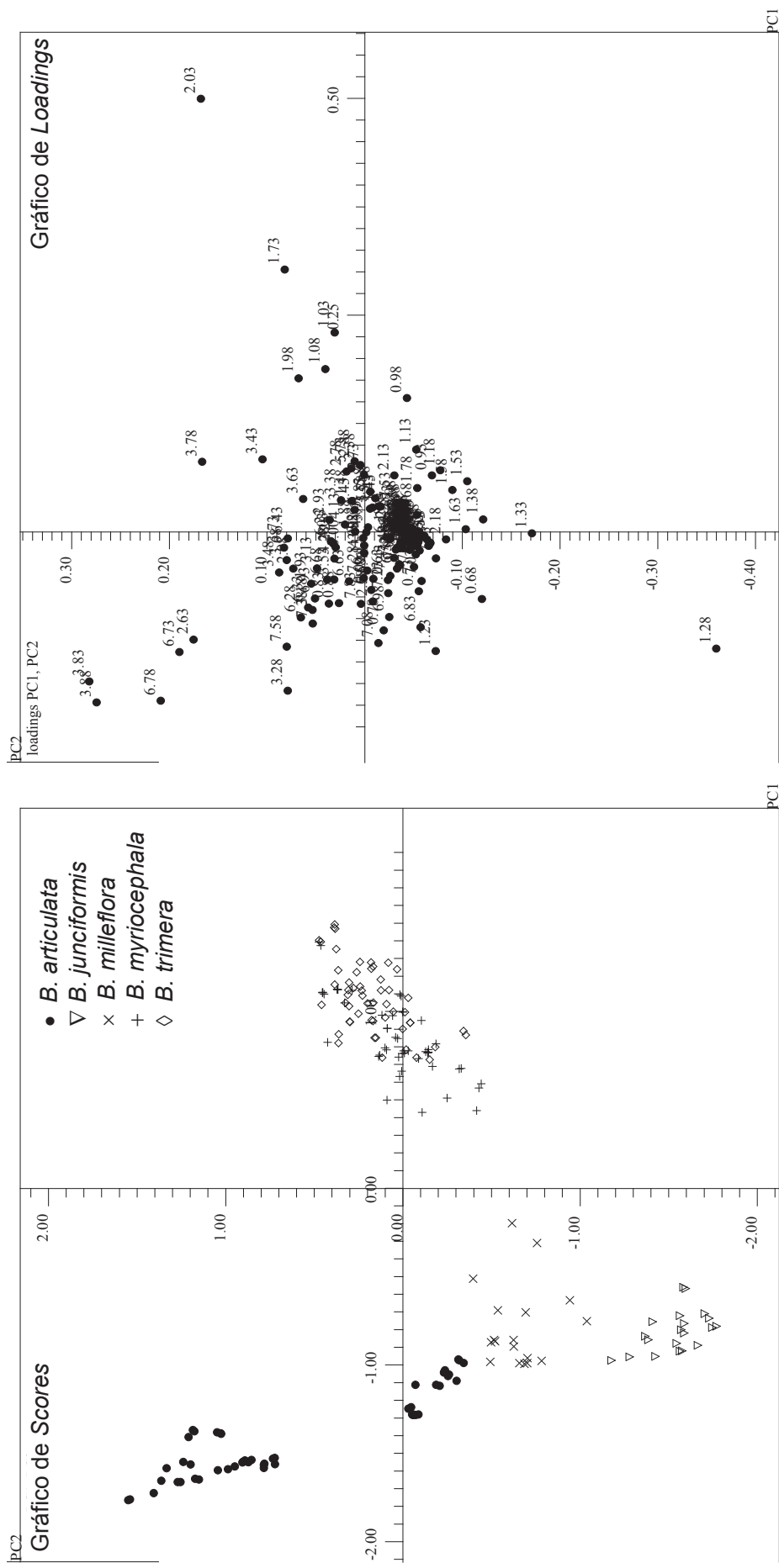


Figura 86 – Análise de PCA (PC1-67,86% versus PC2-11,68%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), *bucket* de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD₃OD), escalamento por Pareto.

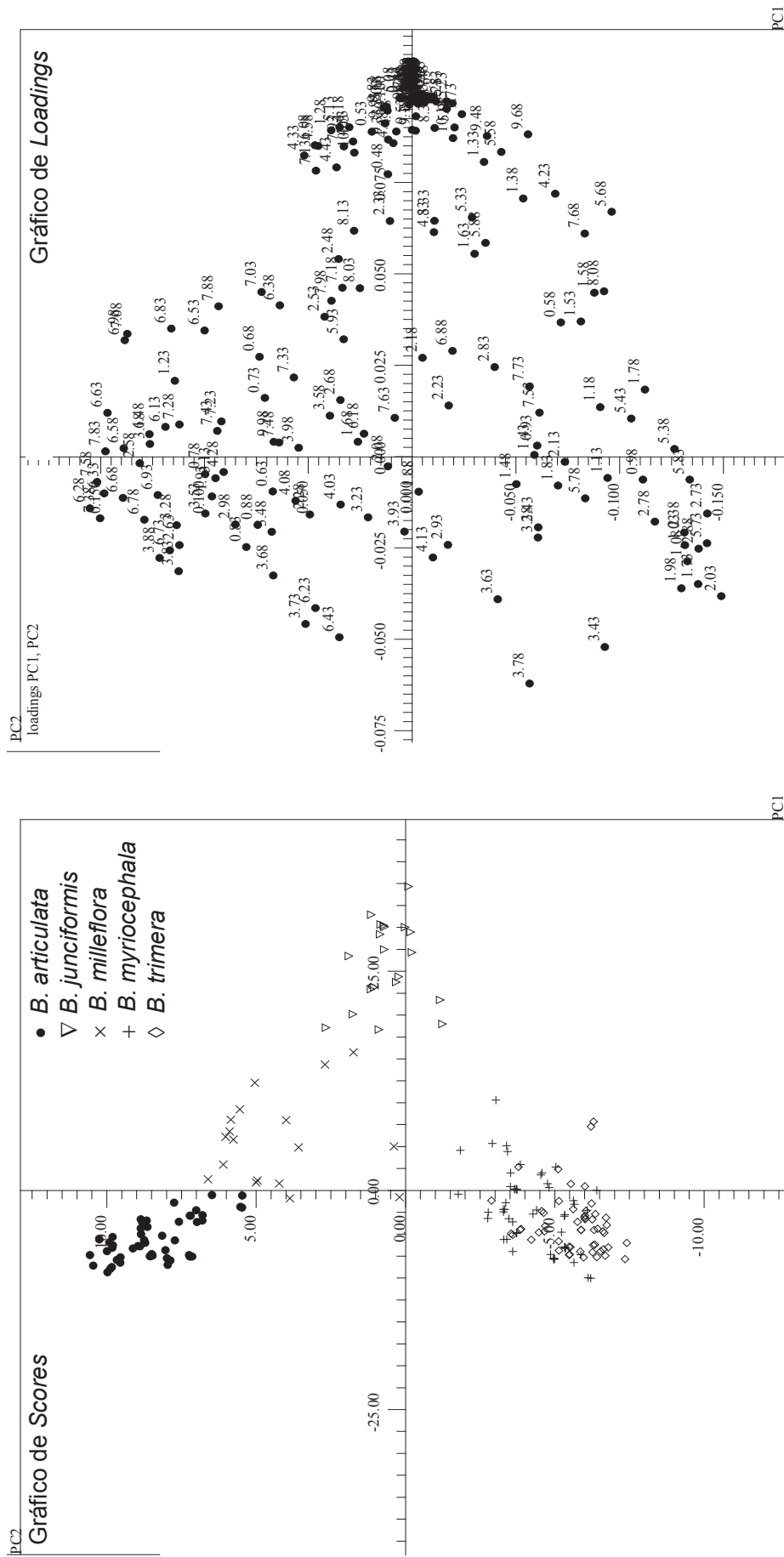


Figura 87 – Análise de PCA (PC1-46,07% versus PC2-16,48%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando todo o espectro (δ 11,3-0,30), bucket de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD₃OD), utilizando autoescalamto.

Os gráficos de *scores* e *loadings* relativos à PCA das amostras de referência de *Baccharis* considerando as duas primeiras componentes principais explicam 79,54% e 58,00% da variância total dos dados empregando dados centrados na média e escalamento por Pareto, respectivamente. (**Figura 85 e 86**– Pág. 138-139). Em todos os casos, as amostras de *B. trimeria* e *B. myriocephala* foram discriminadas das demais espécies e agrupadas no lado positivo de PC1, enquanto as demais ficam distribuídas no lado negativo de PC1. A não discriminação de *B. trimeria* e *B. myriocephala* sugere que estas espécies apresentam composição química muito similares, apesar de serem classificadas botanicamente como espécies diferentes (**Figura 85 e 86**– Pág. 138-139).

Por sua vez, as amostras de *B. articulata* provenientes do estado do Rio grande do Sul foram agrupadas no lado positivo de PC2, enquanto as provenientes do estado do Paraná ocuparam o lado negativo de PC2, o que sugere diferença de composição entre amostras da mesma espécie coletadas em regiões diferentes. As amostras de *B. milleflora* coletadas no Paraná ocuparam o lado negativo de PC2, o que sugere que compostos similares as amostras de *B. articulata* adquiridas no estado do Paraná (**Figura 85 e 86**– Pág. 138-139).

Outro fator preponderante é a regionalidade, pois dependendo da região coletada da amostra, pode-se haver diferença de composição química, pois as condições edafoclimáticas pode variar de uma região para outra. A influência da regionalidade é discutida em diversos estudos envolvendo as mais variadas técnicas espectroscópicas. Lee et al. (2014) empregaram quatro ferramentas analíticas (NIR, RMN de ^1H , LC-MS e GC-MS) na avaliação de duas plantas medicinais (*Gastrodia elata* e *Rehmannia glutinosa*) cultivadas na China e Coreia. Os autores observaram que RMN de ^1H e LC-MS foram eficientes para diagnosticar origem de *G. elata* e *R. glutinosa* quando aliados a quimiometria, sendo verificados resultados mais promissores ao utilizar a RMN de ^1H .

Da mesma forma, a RMN HR-MAS de ^1H e RMN de solução combinadas com análises quimiométricas foram utilizadas para as origens geográficas de grãos de cacau secos e fermentados de 23 países diferentes três principais áreas de cultivo (África, América do Sul, Ásia/Oceania). Todas as abordagens empregadas mostraram discriminação das origens do cacau (MARSEGLIA et al., 2016).

Os resultados apresentados neste estudo estão em consonância com os descritos na literatura ao empregar espectroscopia de ultravioleta-visível e HPLC na

tentativa de discriminar taxonomicamente as espécies *B. milleflora*, *B. articulata* e *B. genistelloides* var *trimera* (sinonímia: *B. trimera*) aliado à análises quimiométricas, como PCA, SIMCA e KNN (LONNI et al., 2003; LONNI et al., 2005).

A análise dos gráficos de *loadings* permitiu identificar os metabólitos responsáveis pela discriminação das espécies de *Baccharis*. Ao utilizar dados centrados na média e escalamento por Pareto observou-se que apenas os compostos majoritários influenciaram na diferenciação das espécies, como era esperado (**Figura 85 e 86**– Pág. 138-139). Neste contexto, as espécies *B. trimera* e *B. myriocephala* foram agrupadas em PC1 positivo e diferenciadas das demais, principalmente pela presença dos *buckets* 1,73 e 2,03 relativos aos sinais em δ 1,73 (3H, *sl*) e δ 2,02 (3H, *s*), característicos dos hidrogênios do grupo metila em C-10 e do grupo acetato COOCH₃ do acetato de carquejila, respectivamente (**Figura 85 e 86**– Pág. 138-139).

O acetato de carquejila é comumente encontrado como constituinte majoritário nos óleos essenciais de *B. trimera*, tornando essa planta valiosa na indústria de fragrâncias pela presença desse composto que combinado ao carquejól e outros álcoois sesquiterpênicos contribuem para seu aroma característico que faz lembrar jacarandá (MINTEGUIAGA et al., 2018). Além disso, o acetato de carquejila é considerado o marcador químico de *B. trimera* (SIMOES-PIRES et al., 2005a; MINTEGUIAGA et al., 2015; MINTEGUIAGA et al., 2018), confirmado neste trabalho. Simões-Pires et al. (2005a) demonstraram que os compostos acetato de carquejila e carquejól são encontrados em *B. trimera* independente da região coletada.

No entanto, os resultados mostraram a presença do acetato de carquejila em *B. myriocephala* (**Figura 31**– Pág. 92). O acetato de carquejila nunca tinha sido identificado na espécie *B. myriocephala*, o que nos leva a questionar se as espécies coletadas em estudos publicados anteriormente foram corretamente identificadas. Estas espécies são muito similares morfológicamente, de modo que poucos taxonomistas conseguem discriminá-las. Alguns taxonomistas tratam *B. myriocephala* como uma subespécie ou variedade de *B. trimera* (HEIDEN et al., 2012). Este trabalho suporta esta evidência, uma vez que mostra que elas são espécies similares quimicamente, mas não idênticas. Segundo Heiden et al. (2009 e 2012), *B. myriocephala* é um táxon próximo morfológicamente de *B. trimera*, sendo somente possível diferenciar as duas espécies pela presença de inflorescências.

Por sua vez, *B. articulata* proveniente do estado do Paraná, *B. milleflora* e *B. junciformis* foram discriminadas das outras espécies pela elevada concentração do

sinal relativo aos hidrogênios metilênicos de ácidos graxos (compostos alifáticos de cadeia longa) em δ 1,27 (*sl*) representado no gráfico de *loadings* pelo *bucket* 1,28 (**Figura 85 e 86**– Pág. 138-139). Os ácidos graxos são compostos lipídicos que se encontram distribuídos em tecidos animais e vegetais, principalmente nas membranas celulares e em células de gordura. Esses compostos desempenham importante função na estrutura da membrana celular e em processos metabólicos (WANTEN; CALDER, 2007).

Os metabólitos responsáveis por agrupar as amostras de *B. articulata* coletadas no Rio Grande do Sul agrupadas em PC1 negativo e PC2 positivo foram atribuídos ao *buckets* 3,88 e 6,78 relativos as metoxilas em C-3' e C-5' e aos hidrogênios em C-5, C-2' e C-6' do composto Ball. Da mesma forma, os *buckets* 2,63, 3,83 e 6,73 são relativos aos sinais em δ 2,63 (2H, *sl*), δ 3,84 (6H, *s*) e δ 6,74 (2H, *s*), relacionados aos hidrogênios metilênicos em C-10', metoxílicos em C-3 e C-5 e aromáticos em C-2 e C-6 do composto Balll. Observou-se ainda que os *buckets* em 3,83 e 6,73 podem ser atribuídos aos sinais em δ 3,83 (6H, *s*) e δ 6,70 (2H, *s*) relacionados ao BalV (**Figura 85 e 86**– Pág. 138-139). Estes compostos foram identificados somente em *B. articulata*, sendo considerados marcadores químicos dessa espécie e são reconhecidos por apresentarem promissora atividade antioxidante (OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2014).

A PCA empregando o autoescalamento e utilizando toda região espectral PC1 e PC2 explicam 62,55% das variâncias dos dados. Foi possível observar a presença de *buckets* relativos aos metabólitos mencionados anteriormente ao analisar os outros métodos de pré-processamento. Além disso, foi constatada a existência de compostos minoritários influenciando na discriminação, uma vez que o autoescalamento permite que as variáveis provenientes de sinais de menor intensidade tenham igual significância comparada aos de maior intensidade (**Figura 87**– Pág. 140).

Dessa forma, o gráfico de *loadings* empregando o autoescalamento mostrou que diversos *buckets*, entre eles 3,78, 6,88 e 7,53 associados aos hidrogênios metoxílicos em C-3 e aromáticos em C-5' e C-6' do flavonoide 3-O-metilquercetina são responsáveis por discriminar *B. trimera* e *B. myriocephala* em PC2 negativo das demais espécies. Da mesma maneira, os *buckets* 6,88 e 7,73 foram relacionados aos sinais em δ 6,88 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz) e δ 7,73 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) do flavonoide quercetina (**Figura 87**– Pág. 140), bem como o *bucket* em 8,08 foi relacionado aos dupletos em δ 8,06 (2H, *d*, $J = 8,9$ Hz) em C-2' e C-6' do flavonoide canferol (**Figura 87**– Pág. 140).

A 3-O-metilquercetina e quercetina são metabólitos secundários comumente encontrados em diversas famílias de plantas, como por exemplo Asteraceae (MELLO; PETROVICK et al., 2000; VERDI et al., 2004), Menispermaceae (TIAM et al., 2017), Apocynaceae (BASTOS et al., 2017), Leguminosae (LUO et al., 2015), entre outras. Além disso, são reconhecidos por apresentarem atividade antioxidante, antimicrobiana (WANG et al.; 2012), hepatoprotetora (HUBERT et al., 2011) e anti-inflamatória (DE SOUZA; BASSANI; SCHAPOVAL, 2007).

A identificação da espécie *B. trimera*, de acordo com a monografia descrita na Farmacopeia Brasileira, se baseia na presença desses dois metabólitos (ANVISA, 2010). Embora estes compostos sejam empregados pela Farmacopeia na identificação da planta por meio de métodos clássicos, estes flavonoides podem ser facilmente adicionados ao material vegetal, além de serem comumente encontrados em diversas plantas. Dessa forma, de modo a minimizar adulterações e evitar erros taxonômicos sugere-se a identificação de *B. trimera* através do perfil espectral obtido por RMN HR-MAS de ^1H levando em consideração a presença do acetato de carquejila. No entanto, é importante ressaltar que este composto é um monoterpene volátil.

A presença de compostos voláteis pode ser considerada não só como uma indicação da qualidade da planta medicinal, mas também da sua estabilidade durante o armazenamento. Estudos mostram um teor de óleo essencial de *B. trimera* de 3,13%, em que diferentes processos de secagem não alteraram seu rendimento. Por sua vez, o armazenamento sob condições ambientais causou uma diminuição significativa na quantidade de compostos voláteis, atingindo a estabilidade após o quinto mês de armazenamento, numa concentração de cerca de 0,68% (MELLO; PETROVICK, 2000).

O canferol foi isolado em espécies vegetais, como por exemplo em *Baccharis dentata* (SARTOR et al., 2013), *B. organensis* (ZUCCOLOTTO, 2017), *B. retusa* (GRECCO et al., 2012b) e *Ginkgo biloba* L. (BECK; STENGEL, 2016), *Hydrolea zeylanica* (L.) Vahl. (BORKAR et al., 2015). Na literatura, o canferol é descrito por apresentar propriedades biológicas, como atividade antimicrobiana (ESCANDÓN et al., 2016), e hipoglicemiante. (AL-NUMAIR et al., 2015).

Os metabólitos responsáveis por agrupar as amostras de *B. milleflora* em PC1 e PC2 positivo foram atribuídos aos *buckets* em 6,53, 7,03, 7,23, 7,33, 7,98 relacionados aos sinais em δ 6,52 (1H, d, $J = 16,2$ Hz), δ 7,03 (1H, ddd, $J = 7,9; 7,3$ e

1,2 Hz), δ 7,23 (1H, *dd*, $J = 8,5$ e 1,2 Hz), δ 7,33 (1H, *ddd*, $J = 8,5$; 7,3 e 1,7 Hz) e δ 7,97 (1H, *d*, $J = 16,2$ Hz) dos hidrogênios em C-8, C-5, C-3, C-4 e C-7 do *trans*-melilotosídeo, respectivamente. Da mesma maneira, os sinais em δ 7,15 (1H, *dd*, $J = 8,5$ e 1,5 Hz) e δ 6,96 (1H, *d*, $J = 12,6$ Hz) característicos dos hidrogênios em C-3 e C-7 do *cis*-melilotosídeo puderam ser atribuídos aos *buckets* em 7,18 e 6,98, respectivamente (**Figura 87**– Pág. 140).

O *trans*- e *cis*-melilotosídeo foram identificados em espécies de *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum* (YANG et al., 2007), *Artemisia annua* (MOUTON; VAN DER KOOY, 2014) e *Mikania laevigata* (FERREIRA; OLIVEIRA, 2010) e exibem atividade antioxidante (YANG et al., 2007). Este é o primeiro relato do *trans* e *cis*-melilotosídeo em espécie de *Baccharis*.

Foi possível observar ainda que o *bucket* 7,33 foi atribuído ao simpleto em δ 7,34, relativo aos hidrogênios em C-2 e C-6 do ácido siríngico (**Figura 87**– Pág. 140). De acordo com a literatura, o ácido siríngico tem sido relatado em muitas espécies, dentre elas *Stryphnodendron obovatum* Benth (DA COSTA et al., 2016), *Cichorium alatum* Hochst. & Steud. (SAHAN et al., 2017), *Kalimeris integrifolia* (WANG et al., 2017), *Adonidia merrillii* (VAF AEI et al., 2018), *Avena sativa* L. (MULTARI et al., 2018) e *Teucrium pseudoscorodonia* Desf. (BELARBI et al., 2018) apresentando atividades antioxidante (MIAO et al., 2018), antiosteoporótica (TANAKA et al., 2017) e hepatoprotetora (ITOH et al., 2009).

Por sua vez, os *buckets* em 6,58 e 7,83 foram atribuídos aos sinais em δ 6,58 (1H, *s*) e δ 7,83 (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) dos hidrogênios em C-3, C-2' e C-6' do flavonoide apigenina (**Figura 87**– Pág. 140). Este composto tem sido relatado em *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pad.) Pers. (DEL CORRAL et al., 2012), *B. illinita* (VERDI et al., 2004), *B. pseudotenuifolia* Malag. (MOREIRA et al., 2003), *B. retusa* (GRECCO et al., 2012b) e *B. trimera* (NAGASUKI; KOMAI, 1998). Dentre as atividades biológicas atribuídas a apigenina, destacam-se atividades hepatoprotetora (SOICKE; LENG-PESCHLOW, 1987), citotóxica (FULLAS et al., 1994), antioxidante (AGATI et al., 2012) e antimicrobiana (TOFIGHI et al., 2015).

As amostras de *B. articulata* foram agrupadas em PC1 negativo e PC2 positivo pela presença dos *buckets* em 6,28, 6,78 e 7,58 relativos ao ácido 3,5-dicafeoilquínico devido aos sinais em δ 6,28 (1H, *d*, $J = 15,9$ Hz), δ 6,78 (2H, *d*, $J = 8,4$ Hz) e δ 6,50 (1H, *d*, $J = 15,9$ Hz) característicos desse composto (**Figura 87**– Pág. 140). Embora

este composto esteja presente nas outras espécies de *Baccharis*, sua menor concentração se mostrou relevante no gráfico de *loadings* para demais espécies.

O ácido 3,5-dicafeoilquínico tem sido relatado em muitas espécies vegetais, como *Blumea balsamifera* (SUN et al., 2018), *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. (LIMA et al., 2016), *Lonicera japonica* Thunb (YU et al., 2015), *Tussilago farfara* L. (WU et al., 2016), *Salicornia herbacea* L. (CHO et al., 2016), bem como em *Baccharis chilco* Kunth (ARGOTI et al., 2013), *B. gaudichaudiana* (AKAIKE et al., 2003), *B. retusa* (GRECCO et al., 2012b) e *B. trimeria* (ABOY et al., 2012). Além disso, são atribuídas a ele inúmeras atividades biológicas, dentre as quais pode-se citar, as atividades citoprotetora (STOJAKOWSKA et al., 2016), vasodilatadora (PUEBLA et al., 2011), antitrombótica (SATAKE et al., 2007), hipoglicemiante (OLENNIKOV; KASHCHENKO, 2014), analgésica (SANTOS et al., 2005), antimicrobiana (ZHU et al., 2004) e antioxidante (HUSSAIN et al., 2014).

Os compostos fenólicos são reconhecidos por apresentarem capacidade antioxidante devido as suas propriedades redutoras, cuja intensidade da ação antioxidante depende do número e posição de hidroxilas presentes na molécula (RICE-EVANS; MILLER; PÁGANGA, 1997). A presença de compostos fenólicos em plantas está associada, principalmente com a proteção e conferem alta resistência a microrganismos e pragas.

Os flavonoides são formados pela combinação de compostos derivados da fenilalanina a partir da via metabólica do ácido chiquímico e do ácido acético Os flavonoides protegem plantas de diferentes estresses bióticos e abióticos e sua formação é acelerada pela luz, além de funcionarem como moléculas sinalizadoras, compostos alelopáticos, fitoalexinas, agentes desintoxicantes e compostos defensivos antimicrobianos (SAMANTA; DAS; DAS, 2011). Além disso, são responsáveis pela cor e aroma das flores e frutas, atração de polinizadores, e auxiliar na produção de sementes, germinação de esporos, crescimento e desenvolvimento de mudas, e desempenham papéis contra a resistência à geada, à seca, na aclimação de calor de plantas e tolerância ao congelamento (SAMANTA; DAS; DAS, 2011).

No que se refere aos pré-processamentos, o escalamento por Pareto e autoescalamento são mais empregados em dados de RMN. O escalamento por Pareto é mais apropriado quando sinais mais intensos são menos suscetíveis ao ruído. Este escalamento reduz a importância dos sinais intensos, mas não tão

drasticamente quanto o autoescalamento, tornando a estrutura dos dados parcialmente inalterada (FERREIRA, 2015).

Neste trabalho, o escalamento por Pareto e dados centrados na média foram mais promissores na discriminação das espécies de *Baccharis*. Entretanto, os compostos fenólicos reconhecidos pela Farmacopeia Brasileira para identificação de *B. trimera* foram evidenciados somente ao empregar o autoescalamento, pois a concentração destes no material vegetal é baixa em comparação com o composto acetato de carquejila.

Resultados similares foram observados considerando somente a região de compostos alifáticos (δ 4,80-0,30), tanto dados centrados na média (**Figura 88** – Pág. 148), quanto utilizando escalamento por Pareto (**Figura 89** – Pág. 149), o que sugere que esta região é relevante para discriminação das espécies de *Baccharis*. Já utilizando a região aromática (δ 11,30-6,00), ao empregar diferentes pré-processamentos não foi observada uma discriminação entre as espécies (**Figura 90** e **91** – Pág. 150-151). Isto demonstra que a composição química de compostos aromáticos é bastante similar entre as espécies investigadas. Por outro lado, estas análises evidenciam que as espécies apresentam diferentes composições químicas de compostos alifáticos, ao menos aqueles observados por RMN HR-MAS de ^1H .

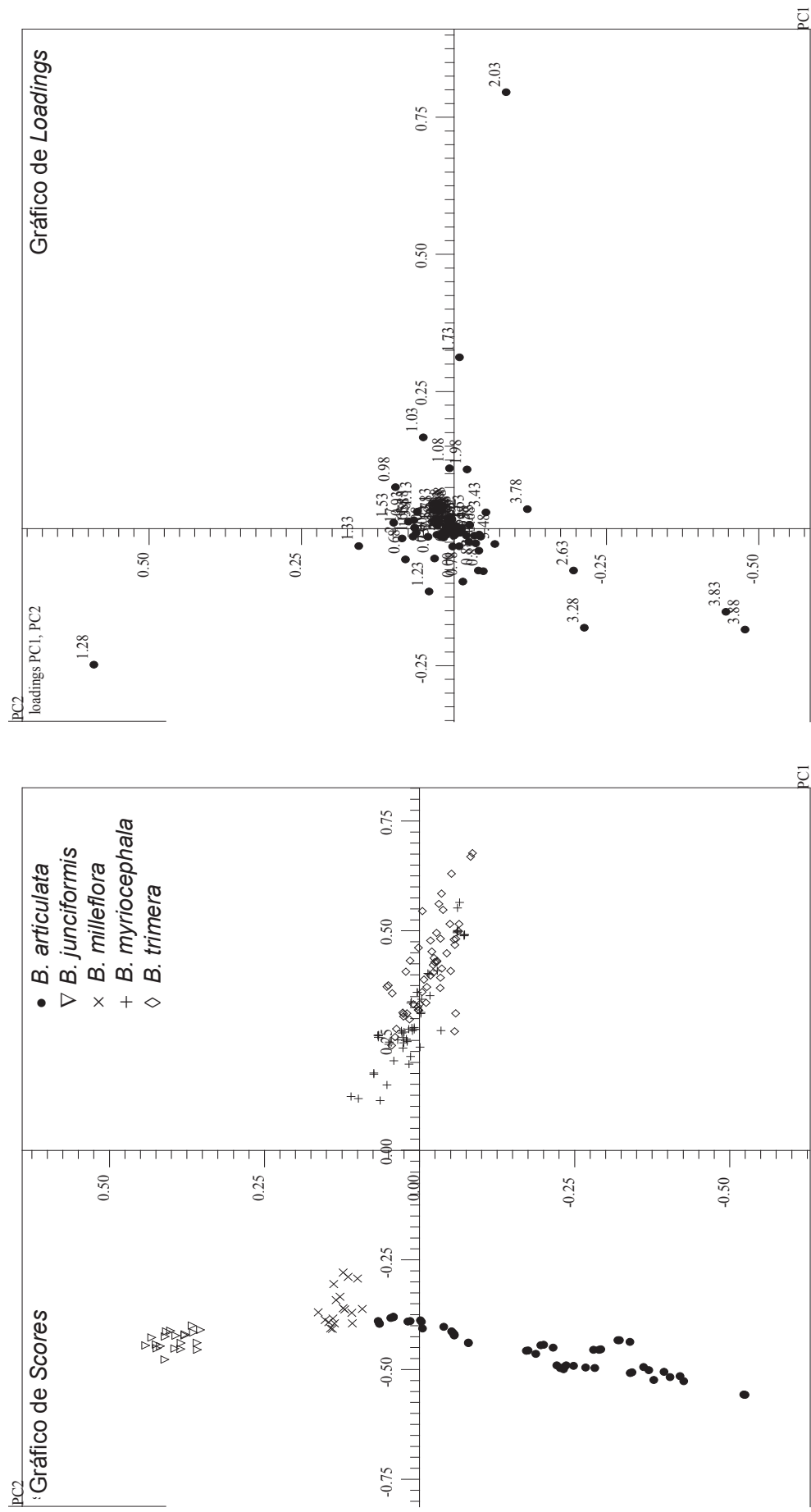


Figura 88 – Análise de PCA (PC1-64,12% versus PC2-13,52%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando a região alifática (δ 4,80-0,30), bucket de δ 0,05 com exclusão da região δ 3,34-3,29 (sinal do CD₃OD), Dados Centrados na Média.

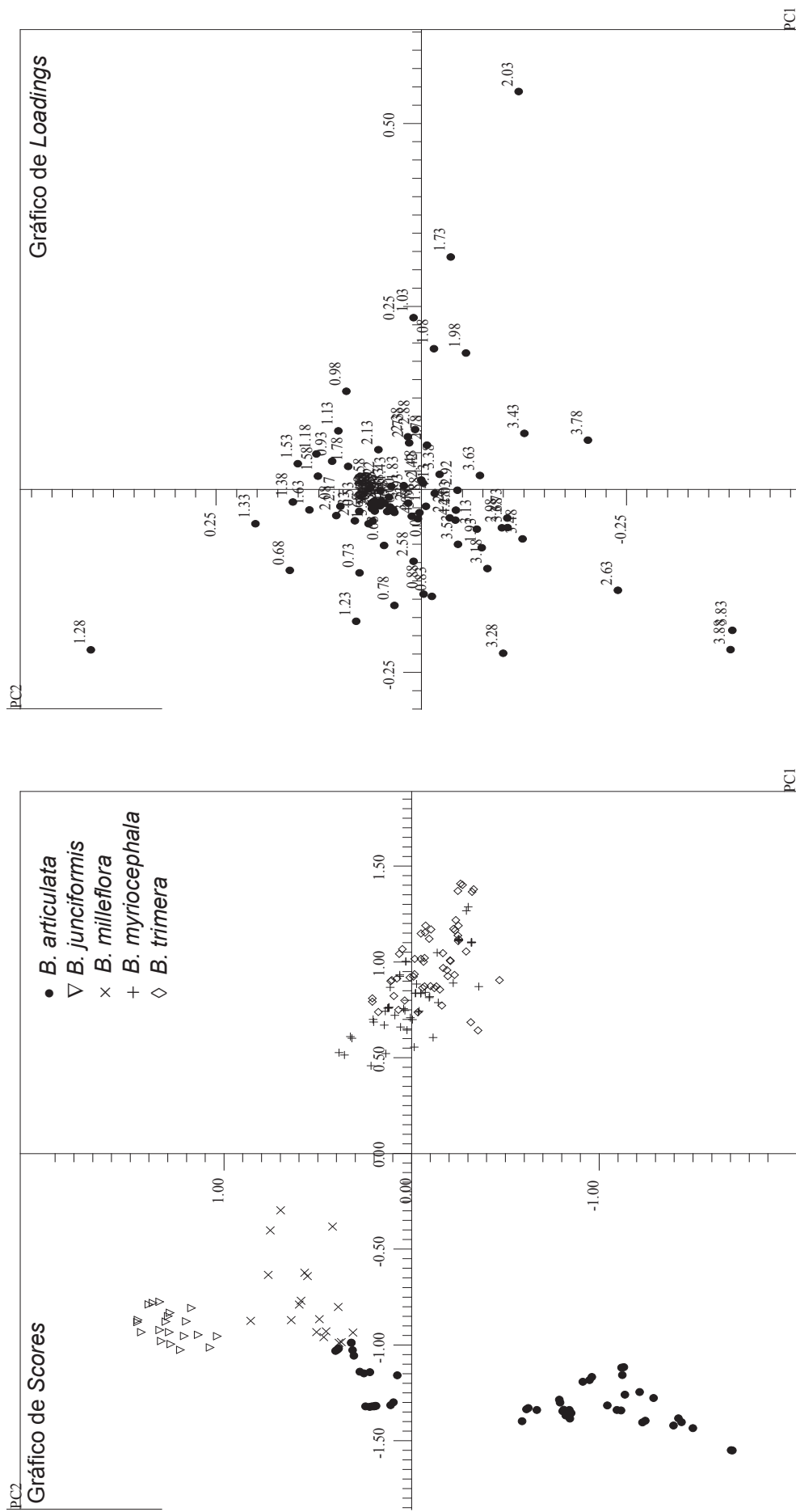


Figura 89 – Análise de PCA (PC1-29,64% versus PC2-18,89%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando a região alifática (δ 4,80-0,30), bucket de δ 0,05 com exclusão da região δ 3,34-3,29 (sinal do CD₃OD), utilizando escalamento por Pareto.

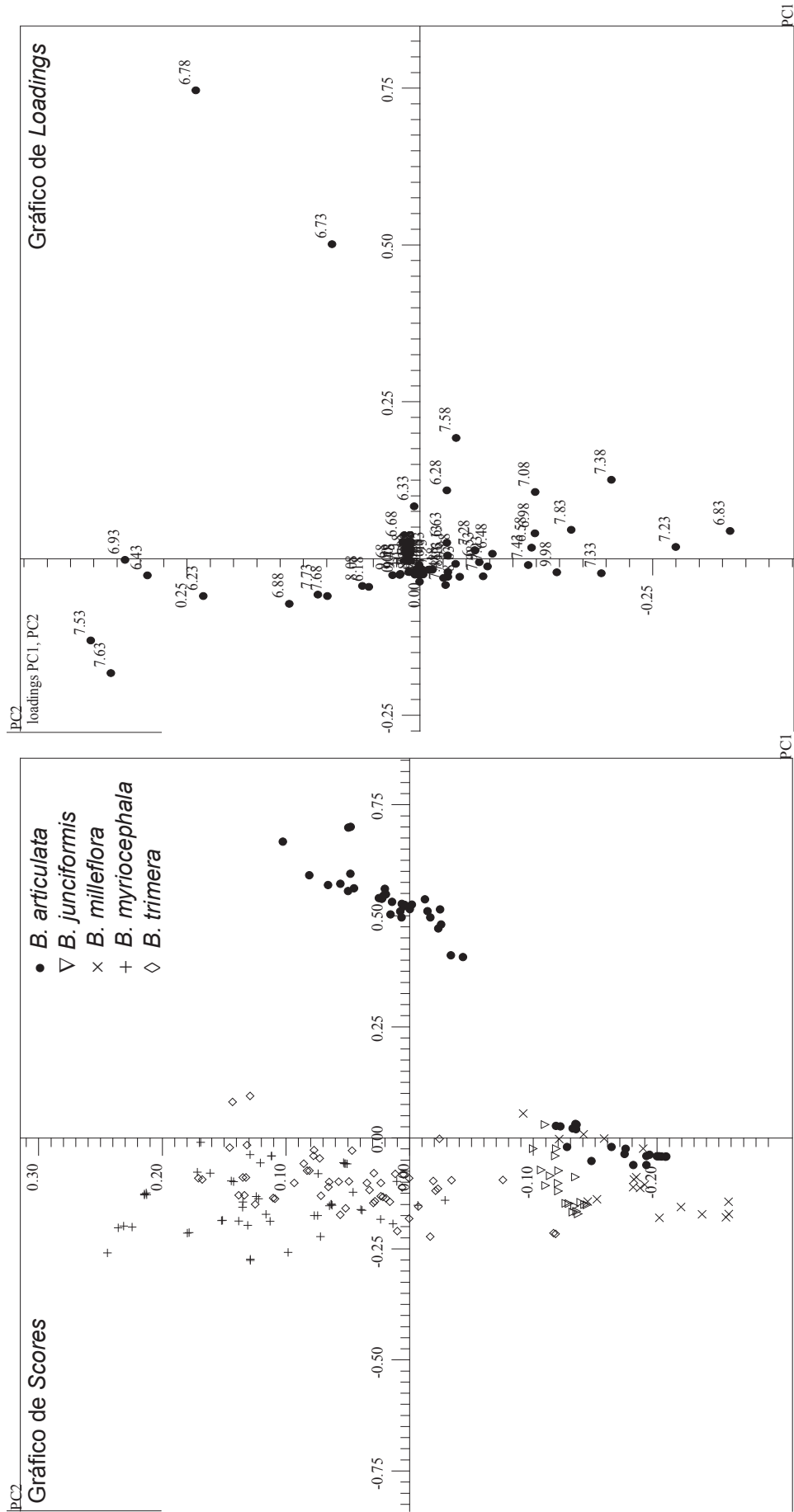


Figura 90 – Análise de PCA (PC1-60,06% versus PC2-14,28%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando a região aromática (δ 11,30-6,00), bucket de δ 0,05, Dados Centrados na Média.

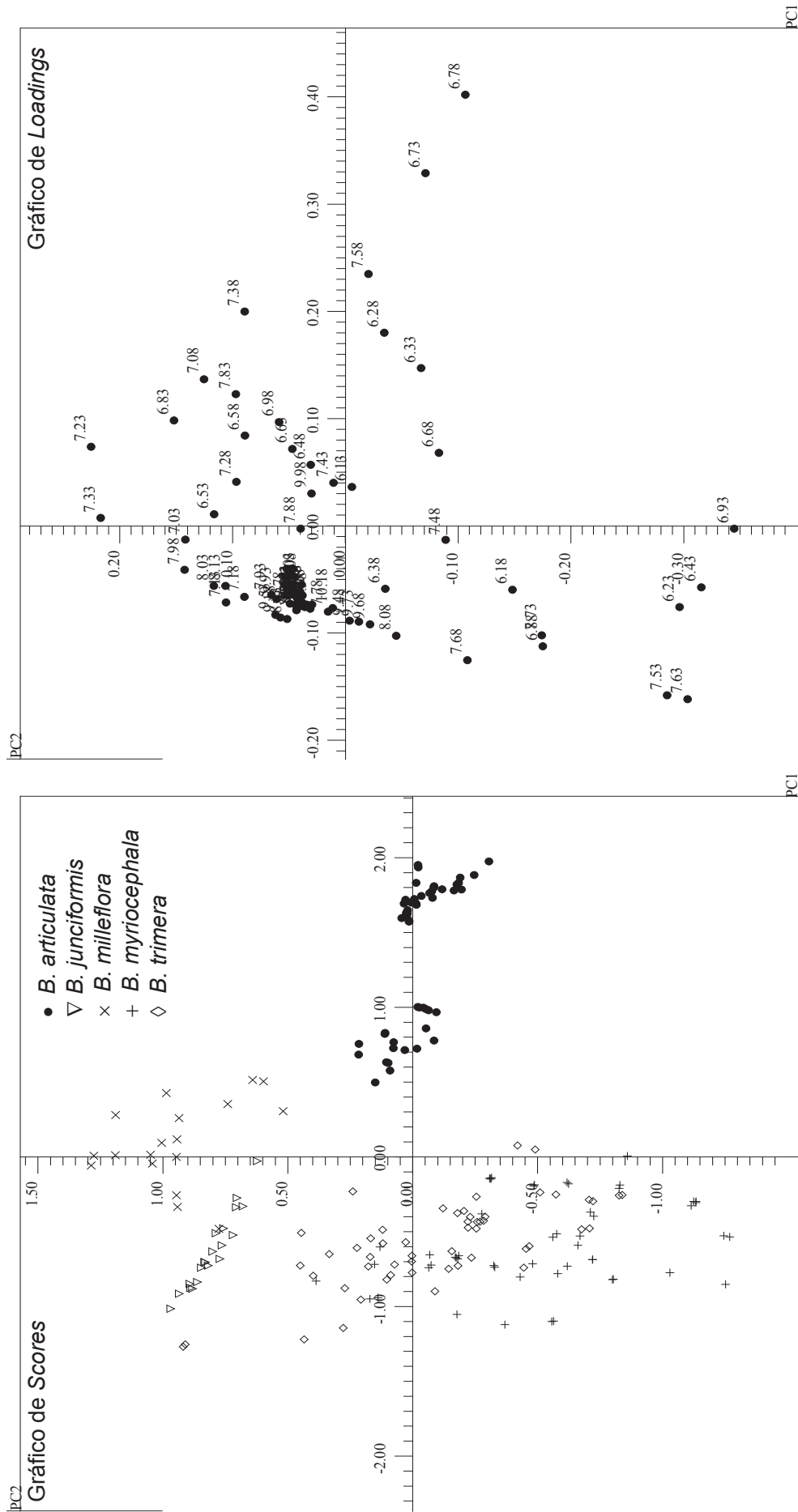


Figura 91 – Análise de PCA (PC1-64,07% versus PC2-9,65%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando a região aromática (δ 11,30-6,00), bucket de δ 0,05, utilizando escalamento por Pareto.

As análises quimiométricas considerando toda a região espectral (δ 11,3 a 0,3) incluindo as regiões referentes ao sinal de pré-saturação do sinal da água e do solvente foram realizadas de modo a verificar se realmente seria necessário excluir essas regiões (**Figuras 92 e 93** – Pág. 153-154).

A análise quimiométrica utilizando dados centrados na média e sem exclusão alguma de regiões permitiu observar uma discriminação idêntica à verificada ao excluir as regiões relacionadas ao sinal de pré-saturação do sinal da água e do solvente (**Figura 92** – Pág. 153). Esse resultado foi alcançado devido a dois fatores: (1) Eficiência e reprodutibilidade na pré-saturação do sinal da água utilizando a sequência *zgpr* observada na sonda de HR-MAS (**Figura 93** – Pág. 154); (2) Utilização da mesma quantidade de amostra e solvente deuterado no rotor de HR-MAS. Em suma, se estes dois cuidados forem adotados, a metodologia discutida torna-se mais simples, o que permite sua ampla utilização, inclusive para não especialistas em RMN.

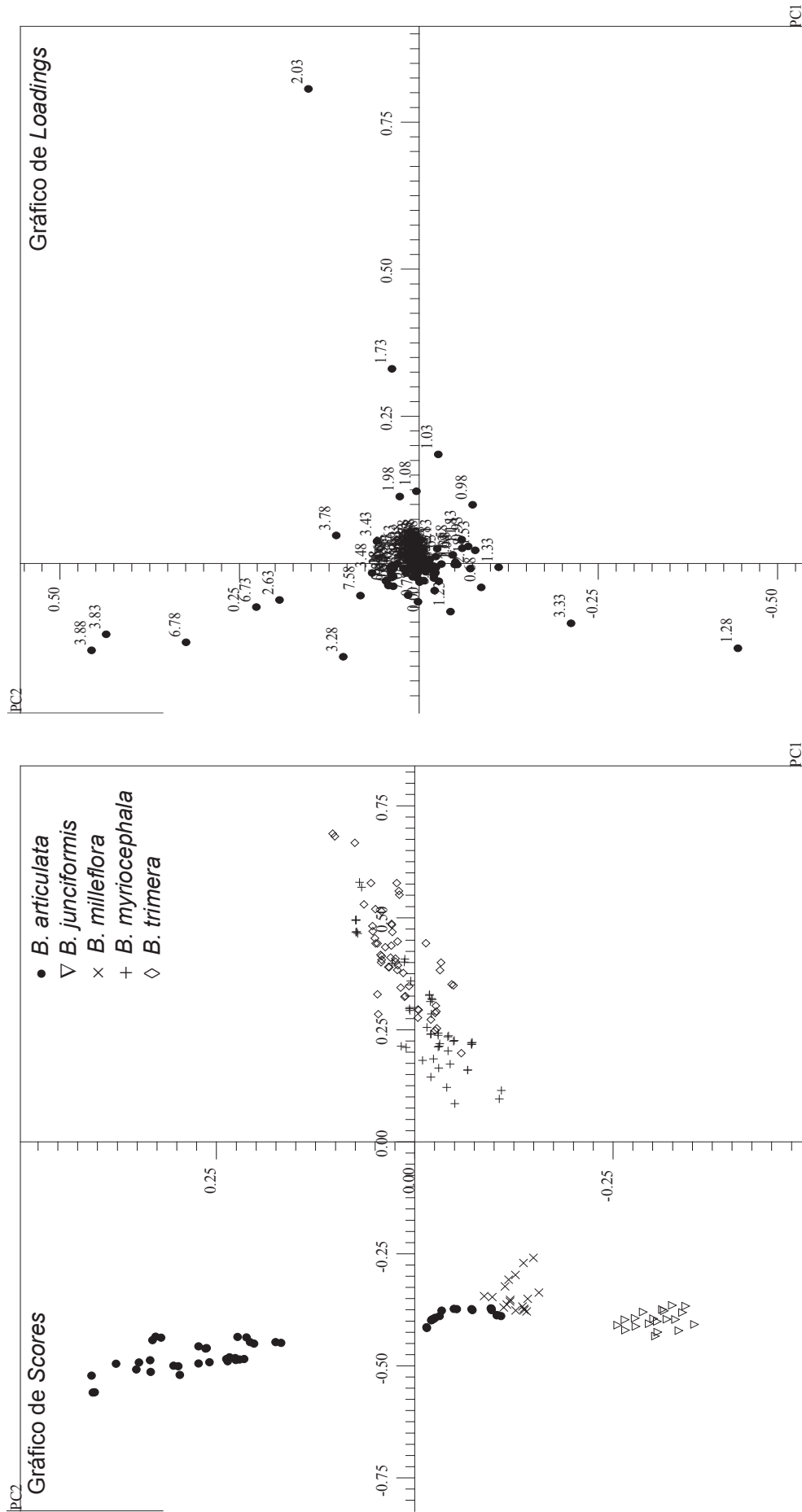


Figura 92 – Análise de PCA (PC1 versus PC2) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando todo o espectro (δ 11,3-0,30), bucket de δ 0,05, sem exclusão de regiões e dados centrados na média.

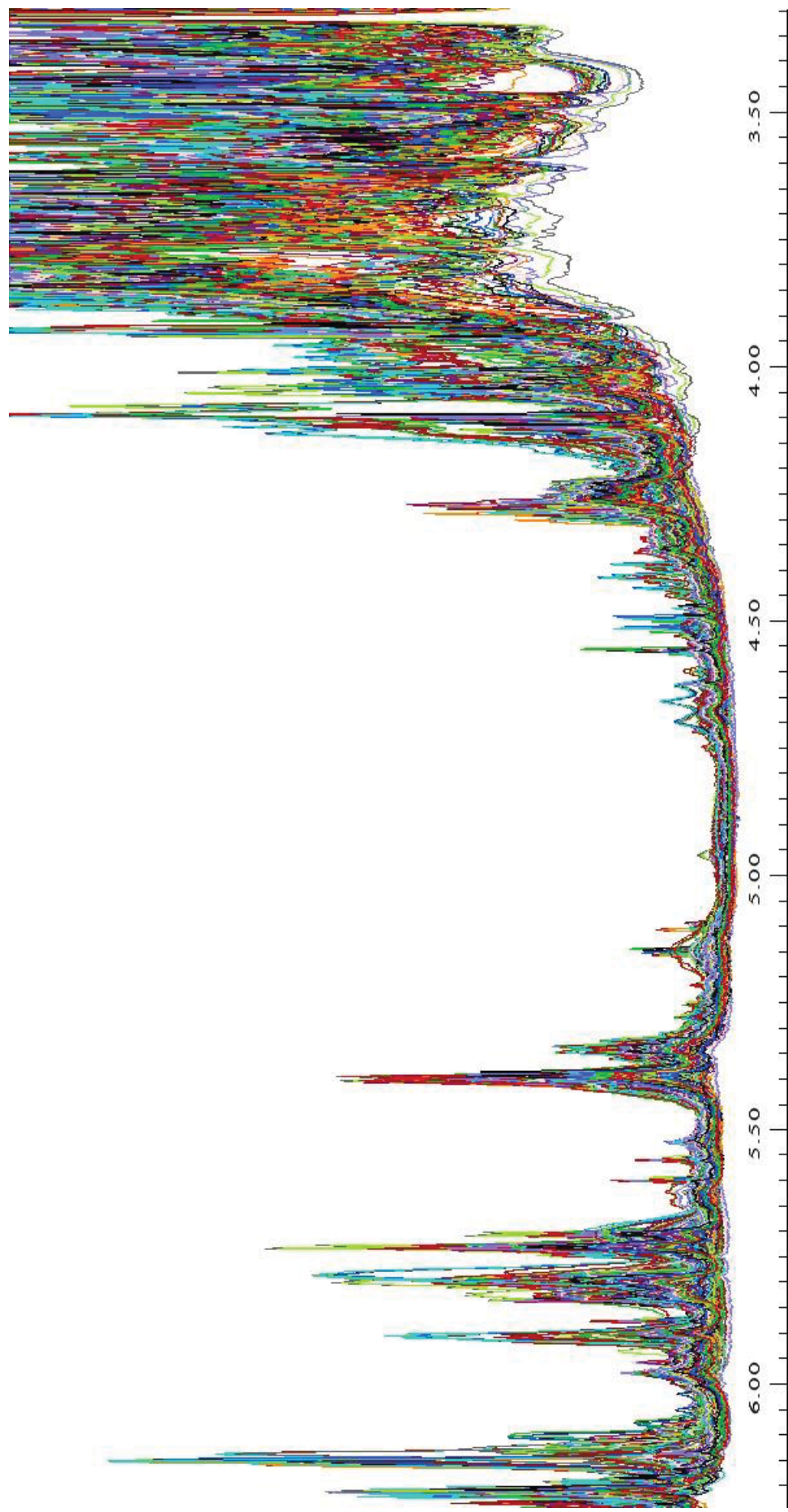


Figura 93 – Expansão dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H adquiridos com a sequência de pulsos *zgpr* das amostras de referência de *Baccharis* evidenciando a região de supressão do sinal da água (δ 6,50-3,00).

4.4.2 Análise de Componentes Principais das espécies *Baccharis trimera* e *B. myriocephala*

A análise de componentes principais empregando todas as amostras de referência não evidenciou discriminação entre as espécies *B. trimera* e *B. myriocephala*, independentemente do pré-processamento ou região espectral utilizada. Como destacado anteriormente, *B. trimera* é a única espécie de *Baccharis* incluída na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira e RENISUS por apresentar reconhecidas propriedades medicinais. Desta maneira, análises de componentes principais considerando somente as espécies *B. trimera* e *B. myriocephala* foram realizadas.

A PCA do gráfico de PC1 versus PC2 explicam 72,14% e 46,82% da variância explicada dos dados utilizando dados centrados na média e escalamento por Pareto, respectivamente (**Figuras 94 e 95** – Pág. 156-157). No entanto, mesmo considerando somente as duas espécies, não foi possível discriminar em dois grupos distintos, independentemente do pré-processamento utilizado. Foi observada apenas uma tendência de separação entre as espécies ao longo de PC1 (**Figuras 94 e 95** – Pág. 156-157), onde essa pequena diferença pode ser devido a fatores edafoclimáticos.

Os gráficos de *loadings* evidenciaram que os *buckets* 1,73 e 2,03 foram os principais responsáveis pela a discriminação parcial. Desta forma, é possível concluir que a espécie *B. trimera* apresenta uma maior quantidade de acetato de carquejila quando comparada a *B. myriocephala*, o que foi confirmado através da análise visual (**Figuras 94, 95 e 96** – Pág. 156-158). No entanto, seria interessante validar essa informação através de outra técnica, como o HPLC, por exemplo, visando confirmar a similaridade química entre essas espécies.

Como não foi evidenciada separação empregando dados centrados na média e escalamento por Pareto, a análise quimiométrica empregando o autoescalamento foi conduzida, uma vez que neste pré-processamento todos os sinais contribuem igualmente para discriminação, sendo assim, os sinais minoritários são também considerados (VAN DER BERG et al, 2006).

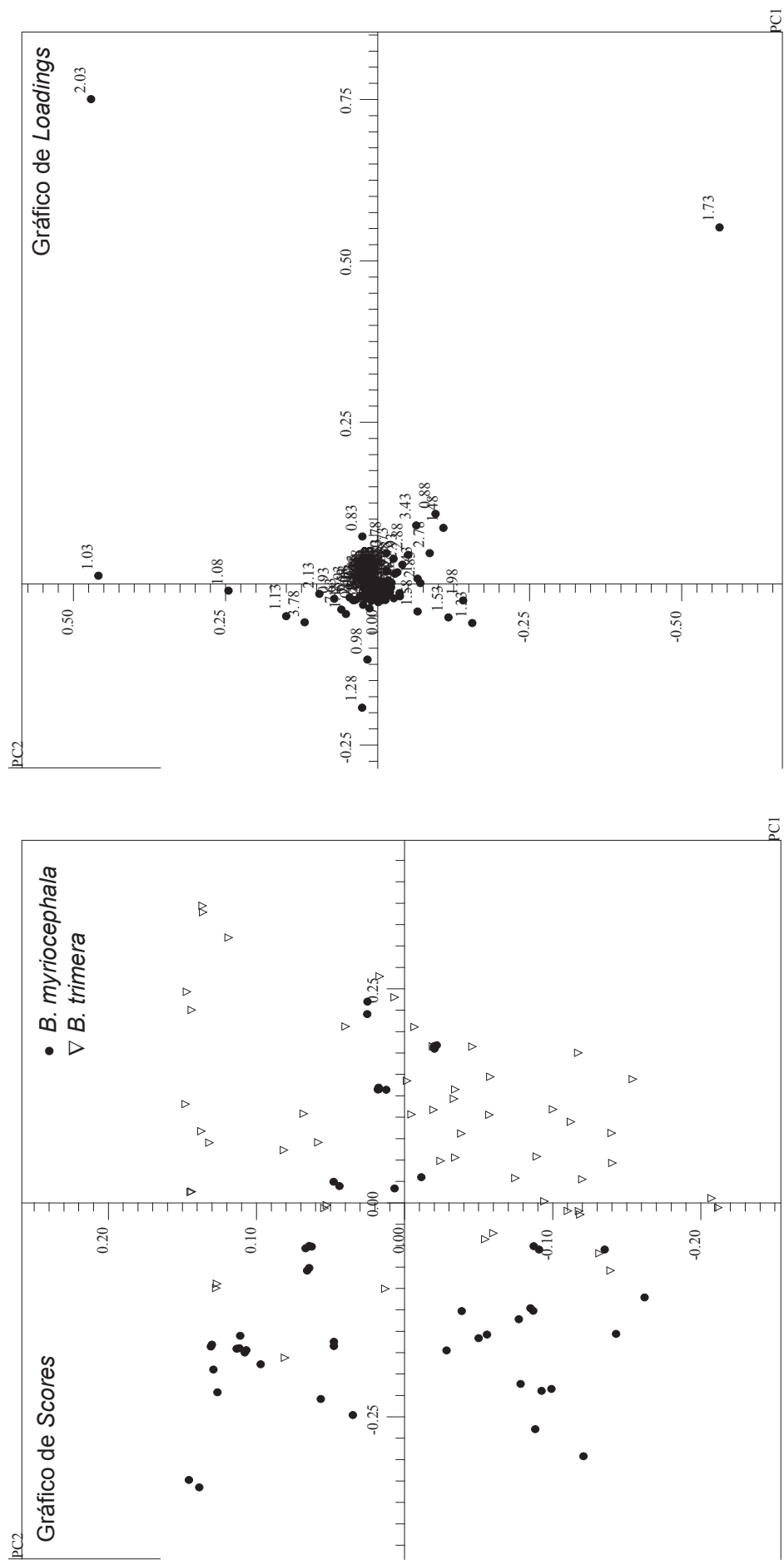


Figura 94 – Análise de PCA (PC1-52,68% versus PC2-19,46%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), *bucket* de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD₃OD), Dados Centrados na Média.

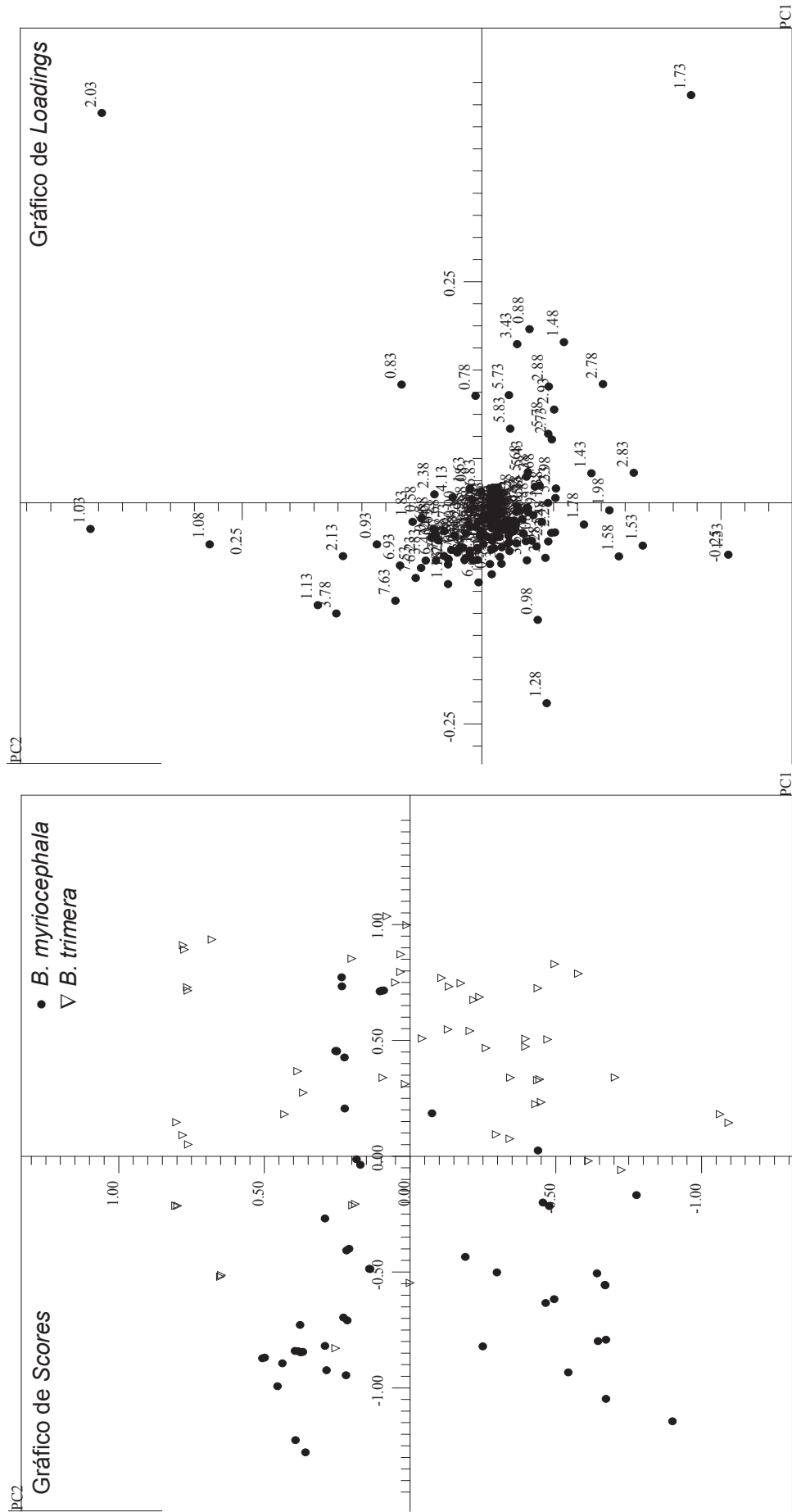


Figura 95 – Análise de PCA (PC1-30,74% versus PC2-16,08%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), *bucket* de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD₃OD), Escalamento por Pareto.

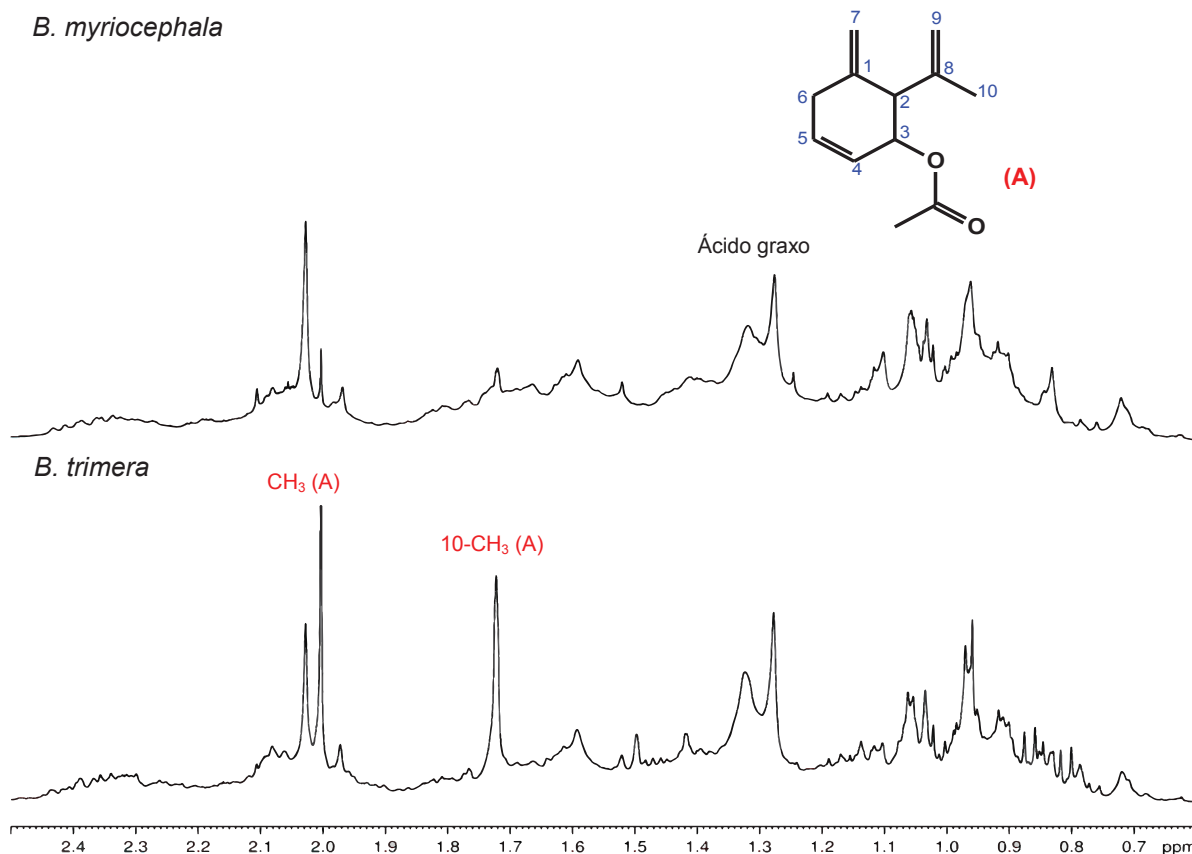


Figura 96 – Ampliação da região entre δ 2,50-0,60 dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H de *B. trimera* e *B. myriocephala*, destacando a presença do acetato de carquejila.

A PCA com autoescalamento englobando PC1 *versus* PC2 explicam 44,96% e 13,35% da variância dos dados, totalizando 58,30% da variância total (**Figura 97** – Pág. 159). Novamente, a análise do gráfico de *scores* permitiu observar uma tendência de separação entre as espécies, porém menos efetiva comparada ao dados centrados na média ou escalamento por Pareto. A maioria das amostras de *B. myriocephala* estão distribuídas em PC2 positivo, por sua vez, as amostras de *B. trimera* ocupam PC2 negativo, ou seja, foi necessária uma componente principal a mais para discriminar as espécies (**Figura 97** – Pág. 159).

O gráfico de *loadings* empregando o autoescalamento corrobora com os resultados já mencionados, em que o acetato de carquejila, compostos alifáticos contribuem para disposição de *B. trimera* em PC2 negativo, enquanto compostos fenólicos e ácidos graxos auxiliam na distribuição da maioria das amostras de *B. myriocephala* e algumas de *B. trimera* em PC1 positivo (**Figura 97** – Pág. 159).

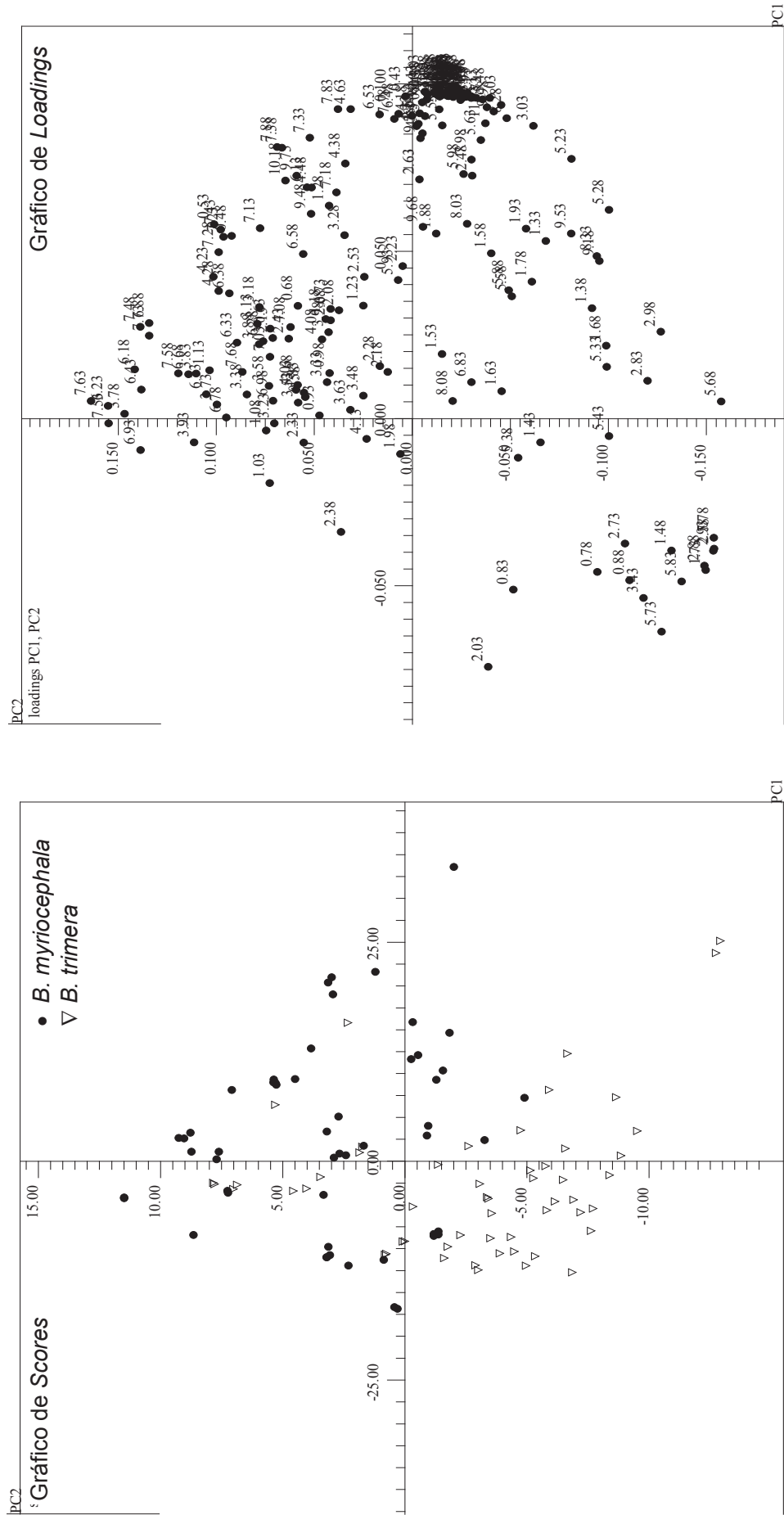


Figura 97 – Análise de PCA (PC1-44,96% versus PC2-13,34%) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), *bucket* de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD₃OD), utilizando autoescalamento.

Os resultados obtidos empregando autoescalamento confirmam aqueles apresentados por Lourenço (2017), cuja análise de PCA dos dados de espectros de infravermelho da região do infravermelho próximo foi observada uma discriminação parcial entre as amostras *B. trimera* e *B. myriocephala* por PC2.

Os resultados confirmam que a composição química das espécies *B. trimera* e *B. myriocephala* são bastante similares, indicando assim que ambas as espécies poderiam ser utilizadas para fins medicinais e incluídas na Farmacopeia Brasileira. No entanto, esta conclusão deverá ser corroborada por ensaios de atividade biológica, a fim de evidenciar a eficácia e segurança quanto ao uso dessa outra espécie de *Baccharis*, o que é extremamente importante para inclusão na Farmacopeia.

4.4.3 Classificação por PLS-DA das espécies *B. trimera* e *B. myriocephala*

As análises quimiométricas realizadas anteriormente foram baseadas em métodos não supervisionados, PCA. Desta forma, na tentativa de discriminar essas espécies, realizou-se uma análise supervisionada através da análise discriminante por mínimos quadrados parciais em que mais uma informação é introduzida no conjunto de dados. Neste método de classificação, a informação sobre a origem das amostras é considerada.

Mesmo utilizando uma análise supervisionada, foi observada somente uma discriminação parcial, apenas um pouco mais efetiva comparada a PCA (**Figura 98** – Pág. 162). Os resultados apresentados neste trabalho estão em consonância com os apresentados na literatura, onde a dificuldade de discriminação entre as espécies *B. trimera* e *B. myriocephala* é observada através da PCA realizada em dados de infravermelho médio e próximo (LOURENÇO, 2017).

A dificuldade de identificação botânica e reclassificações de espécies da seção *Caulopterae* tem sido relatada na literatura, em que *B. myriocephala* é comumente confundida com *B. trimera* devido ao táxon próximo morfológicamente no estado do Rio de Janeiro, por exemplo (HEIDEN et al., 2012). Apesar disso, Heiden et al. (2009) classificam *B. trimera* e *B. myriocephala* como táxons distintos ao nível de espécie. A identificação equivocada de espécies morfológicamente semelhantes dificulta estudos químicos, pois a composição química pode estar sendo descrita em espécies identificadas erroneamente.

Dessa forma, o perfil espectral obtido por RMN HR-MAS de ^1H pode fornecer subsídios para auxiliar na correta classificação taxonômica de espécies da seção *Caulopterae*, uma vez que fornece um perfil mais informativo da matriz comparado aos métodos convencionais. Além disso, os resultados apresentados enfatizam novamente que a composição química entre as duas espécies é realmente muito semelhante.

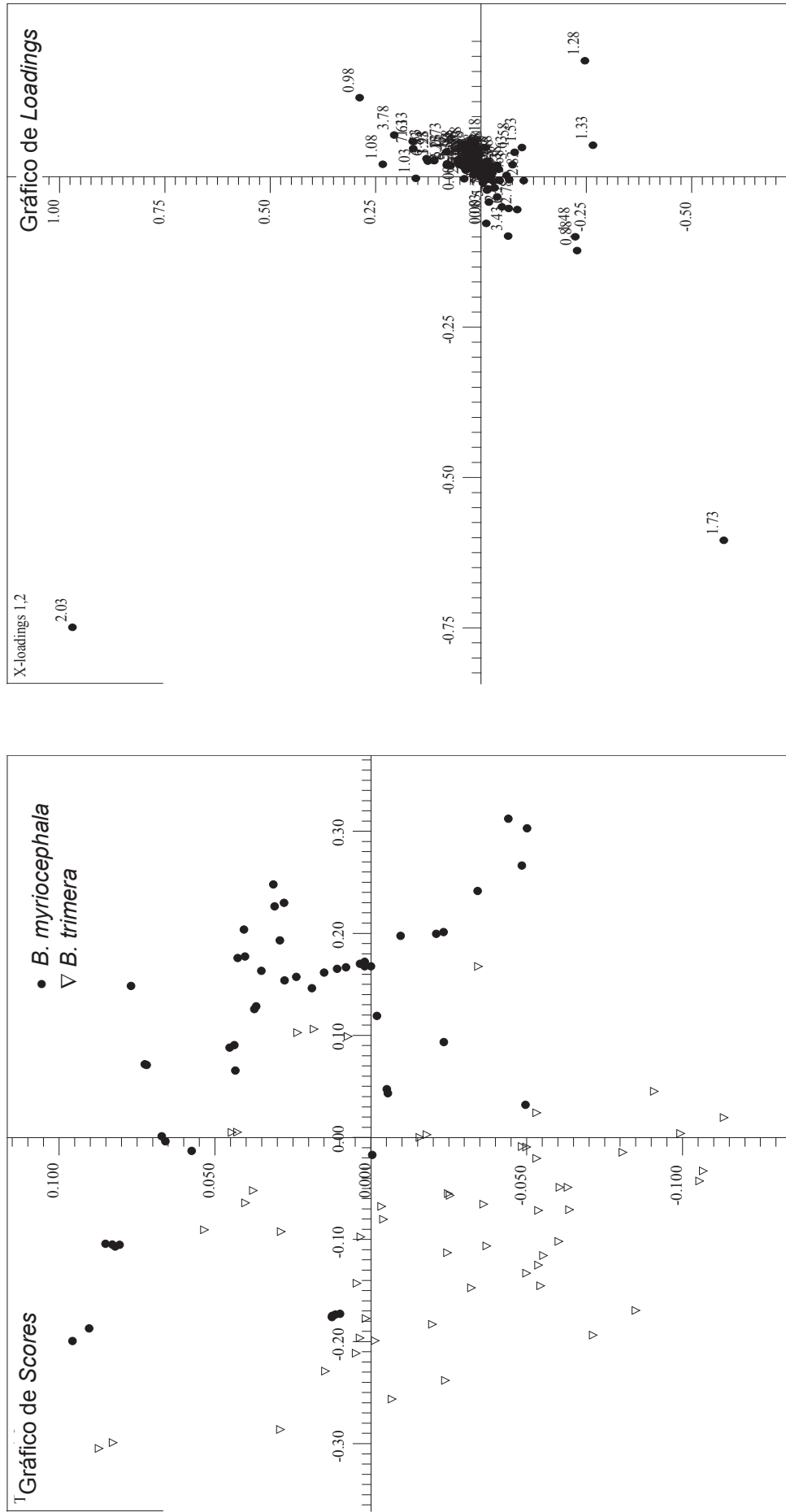


Figura 98 – Análise de PLS-DA (PC1 versus PC2) dos espectros de RMN HR-MAS de ¹H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), *bucket* de δ 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD₃OD).

4.4.4 Determinação da autenticidade das amostras comerciais de carqueja

As análises quimiométricas de PCA que apresentaram melhor separação entre as espécies das amostras foram utilizadas como modelo de classificação para prever as espécies das amostras comerciais de carqueja. Sendo assim, os modelos de classificação foram construídos utilizando toda região espectral utilizando dados centrados na média e escalamento por Pareto. O uso desses modelos permitiu classificar somente três amostras (11,5 %) e suas replicatas como pertencentes ao grupo das espécies *B. myriocephala* e *B. trimera* em PC1 positivo (**Figuras 99 e 100** – Pág. 164-165). As outras amostras comerciais foram dispostas em PC1 negativo próximas as espécies *B. junciformis*, *B. milleflora* e *B. articulata* do Paraná.

Além disso, observou-se ainda que as amostras BC1, BC2, BC3, BC4, BC10, BC17, BC18, BC22, CO04 e CO05 e suas replicatas apresentam-se próximas a *B. milleflora* e *B. articulata* proveniente do estado do Paraná. As amostras BC5, BC6, BC7, BC8, BC9, BC11, BC12, BC13, BC14, BC15, BC16, BC20 e BC21 ficaram agrupadas e mostraram uma tendência de separação em relação as demais espécies, o que pode estar relacionado a regionalidade, pois essas amostras foram adquiridas no estado de Minas Gerais. Dessa forma, seria interessante incluir amostras de referência de *B. myriocephala* e *B. trimera* cultivadas em MG cobrindo assim, uma faixa mais ampla.

Os resultados apresentados mostram a existência de inconstância na composição química das amostras comerciais, o que pode estar atrelado a falta de um controle de qualidade rigoroso em relação a sua comercialização. Além disso, os dados sugerem que a maioria das amostras não pertencem a *B. trimera*.

No entanto, vale ressaltar que todas as amostras comerciais foram classificadas como *Baccharis*, apenas não foram classificadas como *B. myriocephala* e *B. trimera*, o que é justificável pela grande dificuldade de reconhecimento das espécies pelos ervateiros. As três amostras identificadas como *B. myriocephala* ou *B. trimera* possuem a descrição da espécie nas embalagens como *B. trimera* e apresentam registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Assim, fica claro a importância e urgência de um maior rigor no controle de qualidade desses produtos que estão sendo consumidos de forma indiscriminada pela população.

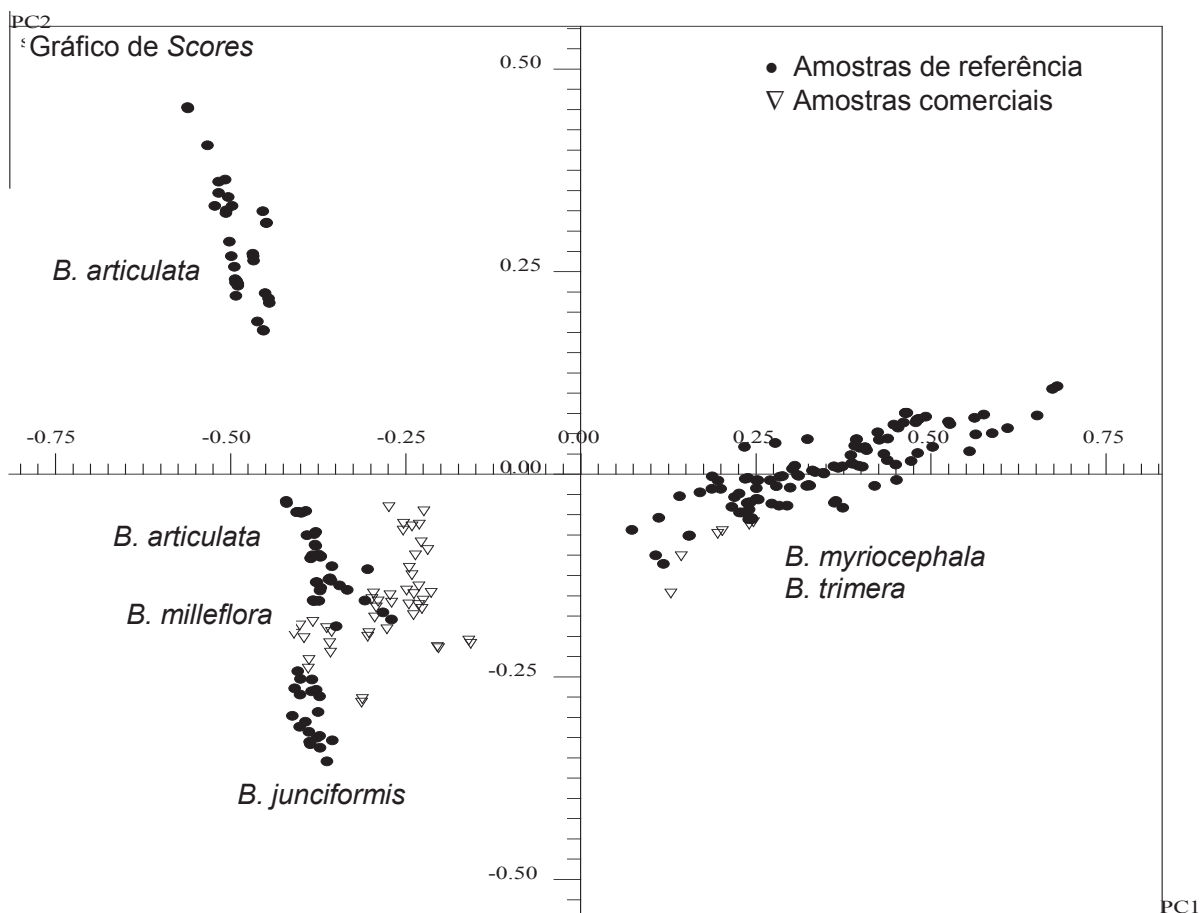


Figura 99 – Classificação das amostras comerciais (PC1 versus PC2) utilizando o modelo de classificação construído a partir dos espectros de RMN HR-MAS DE ^1H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), *bucket* de 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD_3OD), Dados Centrados na Média.

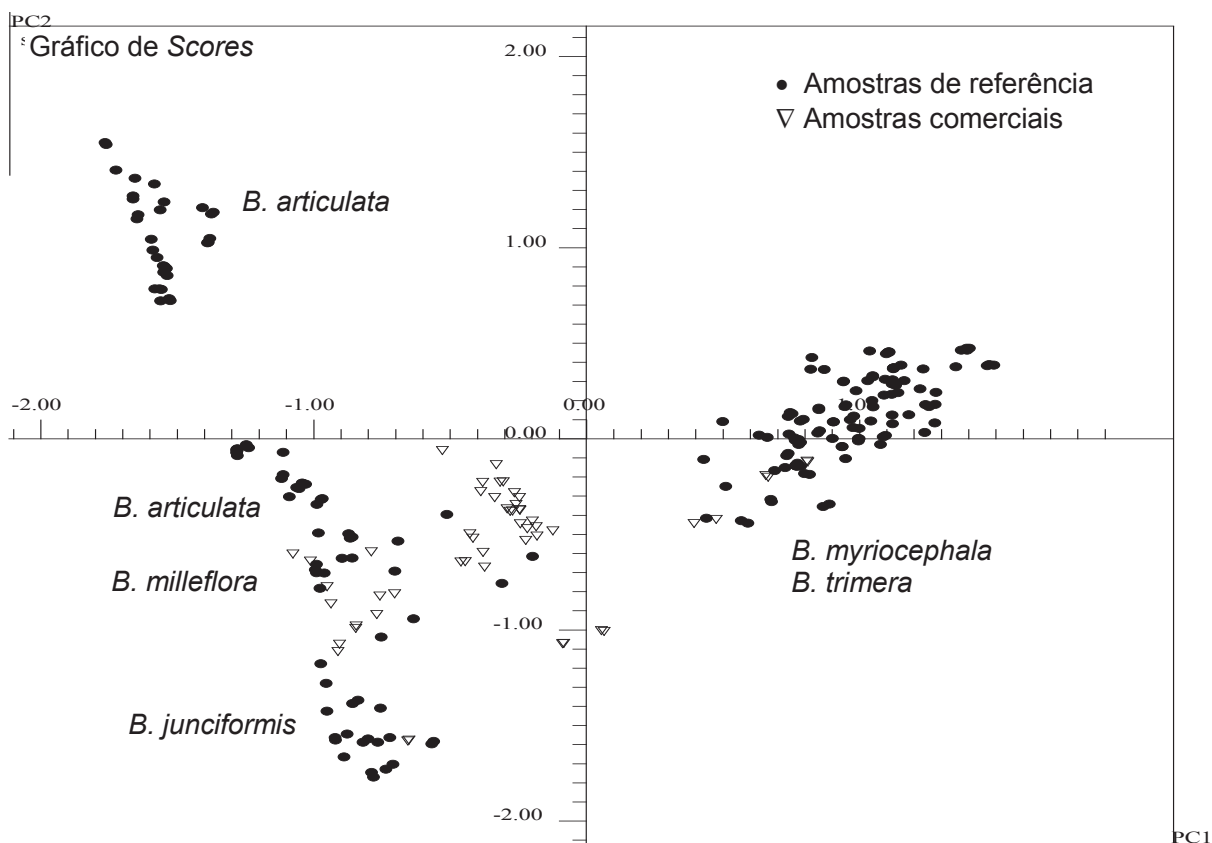


Figura 100 – Classificação das amostras comerciais (PC1 versus PC2) utilizando o modelo de classificação construído a partir dos espectros de RMN HR-MAS de ^1H das amostras de referência de *Baccharis*, utilizando todo o espectro (δ 11,30-0,30), *bucket* de 0,05, exclusão da região δ 5,00-4,80 (supressão do sinal da água), δ 3,34-3,29 (sinal do CD_3OD), escalamento por Pareto.

4.4.5 Classificação por PLS-DA das espécies de *Baccharis* e amostras comerciais

Com o propósito de verificar a discriminação das espécies investigadas neste trabalho foi realizada a análise discriminante por PLS-DA e SIMCA, visando comparar a capacidade destes métodos de reconhecimento de padrões na classificação de novas amostras, bem como gerar dados que indiquem se as amostras comerciais de *B. trimera* realmente são de fato desta espécie. Estes métodos utilizam informações prévias das amostras direcionando a classificação e discriminação. Sendo assim, nesta seção serão apresentados os resultados obtidos para os modelos de classificação por PLS-DA de *B. trimera*, *B. myriocephala*, *B. articulata*, *B. junciformis* e *B. milleflora*.

Para a construção do modelo PLS-DA, o conjunto de calibração foi submetido a diferentes pré-processamentos. No entanto, os melhores resultados foram obtidos utilizando pré-processamento autoescalamento na matriz X e Y devido ao mesmo peso a todas as variáveis, regressão NIPLS e validação cruzada *leave one out*. Nesta validação cruzada, uma amostra é deixada de fora durante a construção do modelo e a seguir, esta é prevista pelo modelo construído. Esse processo é repetido até que todas as amostras tenham sido previstas e possa então ser calculada a raiz quadrada da soma dos erros médios da validação cruzada (RMSECV – *Root Mean Square Error of Cross Validation*) (BRERETON, 2000).

A escolha do número de variáveis latentes utilizadas em um modelo é de extrema importância nos resultados a serem obtidos. A seleção do número LVs inferior ao ideal pode resultar no subajuste do modelo, pois não são consideradas todas as informações contidas no conjunto amostral. Por outro lado, a seleção de um número de LVs maior pode aumentar o ruído e os erros de modelagem, acarretando em um sobreajuste do modelo (GEMPERLINE, 2006). Dessa forma, o número de LVs considerado adequado será aquele em que se observa uma diminuição do RMSECV.

A seleção do número de LVs para compor cada modelo foi realizada pelo gráfico de número de LVs *versus* RMSECV. A análise deste gráfico para o modelo de classificação das amostras de *B. trimera* sugeriu testes com 3, 4, 5 e 6 LVs, pois apresentaram valores de RMSECV 0,2456, 0,2277, 0,2125 e 0,1942, respectivamente (**Figura 101** – Pág. 167).

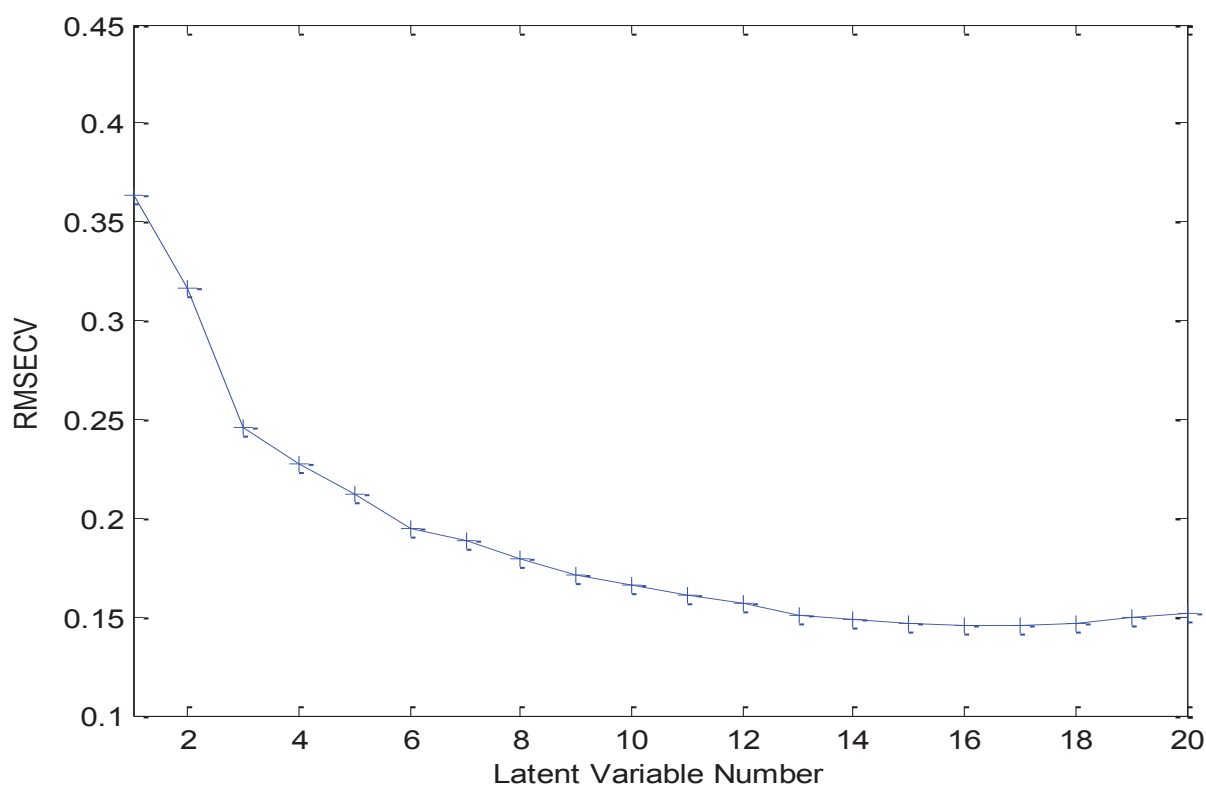


Figura 101 – Gráfico de número de variáveis latentes (LVS) versus RMSECV utilizado na construção do modelo de classificação por PLS-DA para amostras de *B. trimera*.

As falhas na manipulação de amostras, bem com, erros instrumentais podem gerar amostras anômalas no conjunto de calibração. A presença destas amostras pode prejudicar o desenvolvimento do modelo e influenciar na previsão de novas amostras. A existência de amostras anômalas no conjunto de calibração foi verificada através do gráfico de *leverage* versus resíduos de *Students*. Os modelos testados para *B. trimera* sugeriram que as amostras 81, 82 e 133 estavam dentro do limite de *leverage*, mas apresentam altos resíduos de *Students*, podendo ser consideradas anomalias (**Figura 102** – Pág. 168). A realização de testes retirando tais amostras do modelo não acarretou na diminuição do número de variáveis latentes (**Figura 103** – Pág. 168). Desta forma, as amostras foram mantidas no conjunto de calibração do modelo.

Uma vez que a variação nos valores de RMSECV considerando 3, 4, 5 e 6 LVs não foi significativa, optou-se por desenvolver o modelo considerando o menor número de variáveis latentes, de modo que não ocasionasse um superajuste do mesmo.

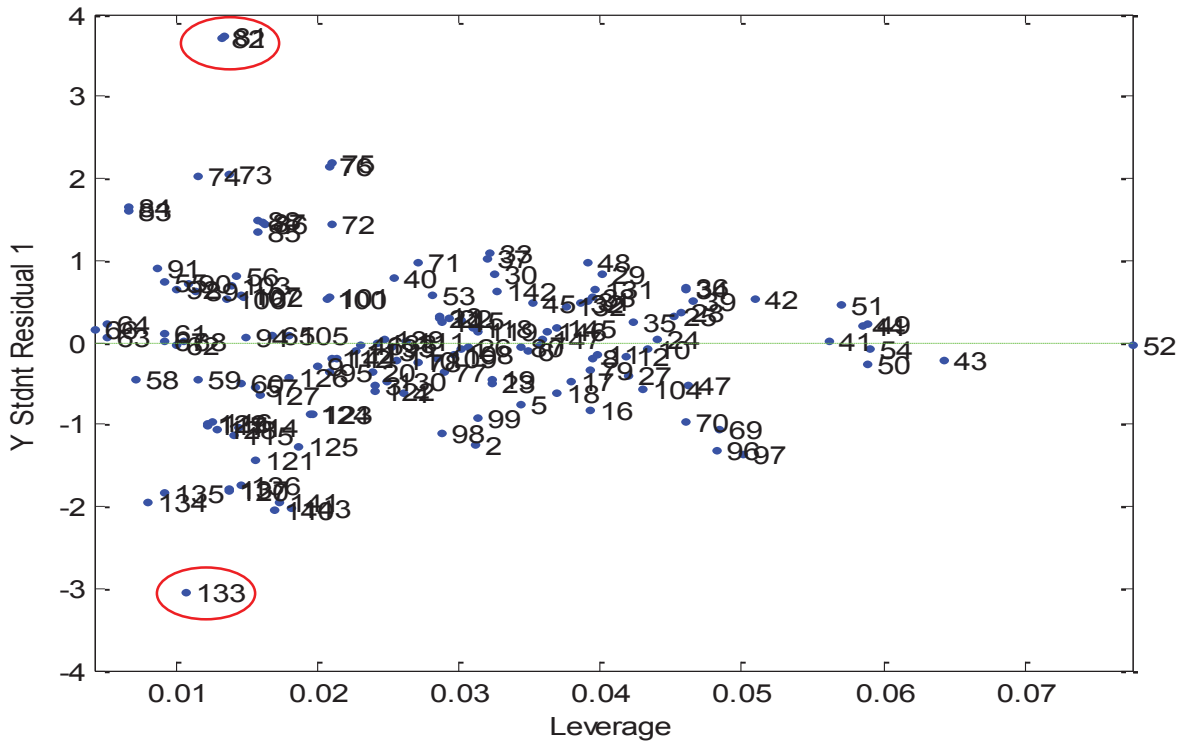


Figura 102 – Gráfico de *leverage* versus resíduos de *Students* utilizado na construção do modelo de classificação por PLS-DA para amostras de *B. trimera*.

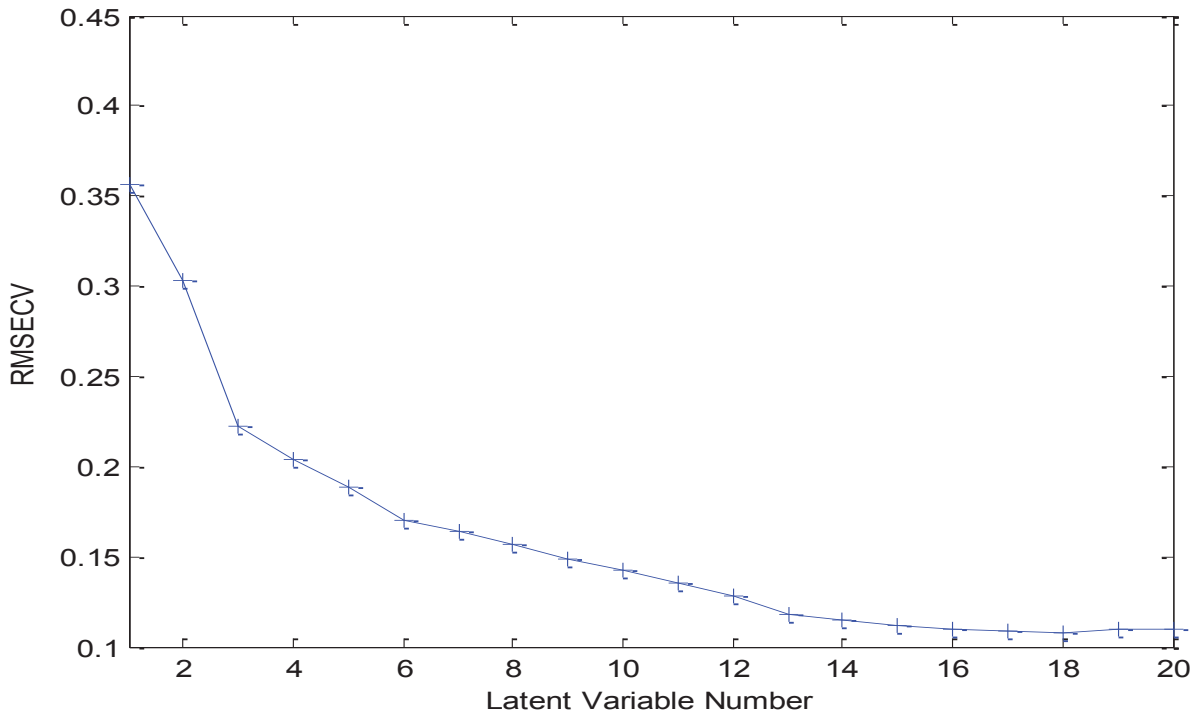


Figura 103 – Gráfico de número de variáveis latentes versus RMSECV utilizado na construção do modelo de classificação por PLS-DA para amostras de *B. trimera* excluindo as amostras 81, 82 e 133.

De forma a verificar as variáveis (deslocamentos químicos) mais significativas na construção do modelo, o gráfico de variáveis *versus* vetor de coeficiente de regressão foi construído (**Figura 104** – Pág. 169). As variáveis 65 e 85 correspondem aos sinais atribuídos ao flavonoide canferol em δ 8,06 (2H, *d*, 8,9 Hz) e 6,91 (2H, *d*, 8,9 Hz), respectivamente. Além disso, foi observada que as variáveis 72 e 74 correspondem aos sinais em δ 7,63 (1H, *dd*, 8,9 e 2,3 Hz) e 7,73 (1H, *d*, 2,3 Hz) da quercetina, enquanto as variáveis 76 e 89 foram atribuídas aos sinais em δ 7,53 (1H, *dd*, 8,5 e 2,2 Hz) e δ 6,90 (1H, *d*, 8,5 Hz) do flavonoide 3-O-metilquercetina. Da mesma forma, as variáveis 98, 99 e 102 são representativas do anel A de flavonoides (**Figura 104** – Pág. 169).

Por outro lado, as variáveis 189 e 192 foram atribuídas aos sinais em 1,73 (3H, *s*) e 2,02 (3H, *s*) do acetato de carquejila (**Figura 104** – Pág. 169). A presença de outras variáveis correspondentes a região alifática desempenhando importante influência no modelo corroboram com os resultados observados nas análises quimiométricas realizadas anteriormente.

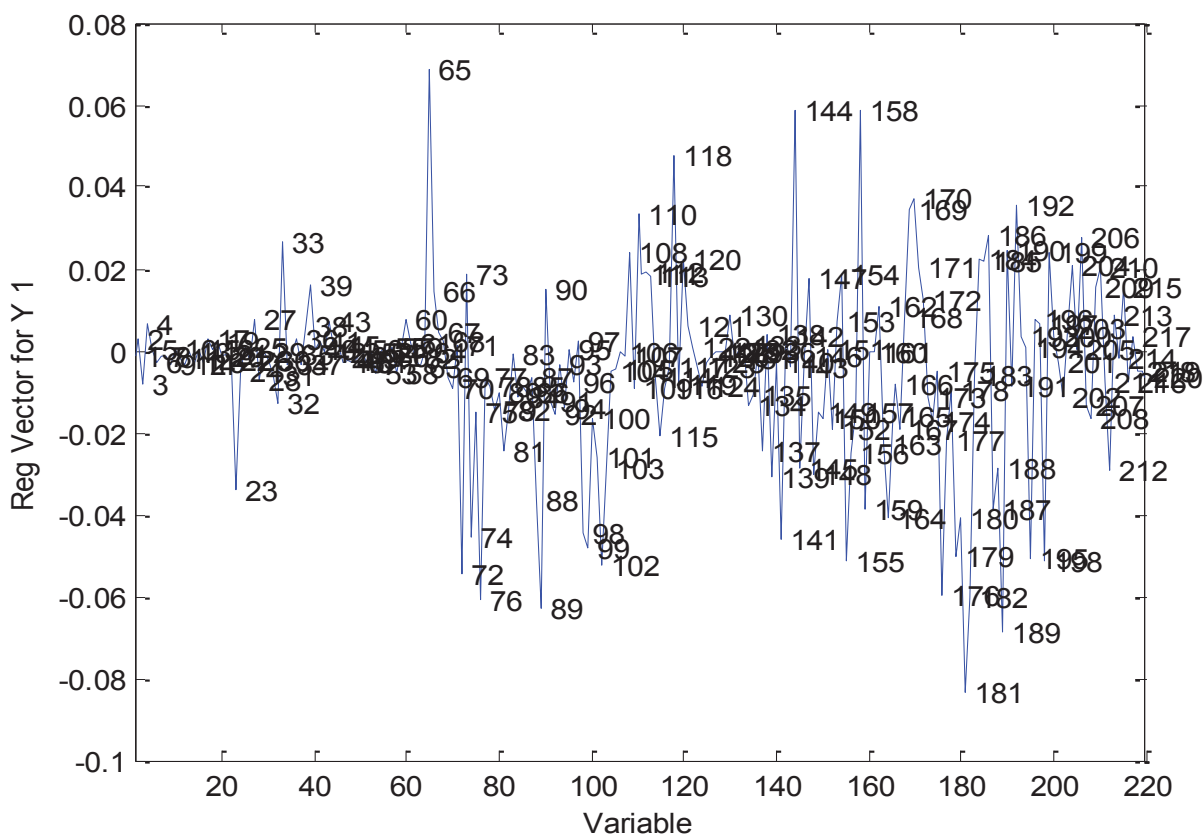


Figura 104 – Gráfico de variáveis *versus* vetor de regressão com 4 LVS do modelo PLS-DA para as amostras de *B. trimera*.

Após a construção do modelo, a previsão das amostras do conjunto de validação foi realizada. Assim como para *B. trimera*, foram construídos modelos para as amostras de *B. myriocephala*, *B. articulata*, *B. junciformis* e *B. milleflora*, cujos resultados são apresentados na **Tabela 20** em que são descritas a porcentagem de classificação dos conjuntos de validação externa, o número de LVs, RMSECV e R² dos modelos empregados para posterior previsão das amostras comerciais.

Os resultados apresentados na **Tabela 20** mostram que os modelos apresentam uma eficiente capacidade preditiva utilizando um número de variáveis latentes menor para explicar os modelos que o trabalho desenvolvido por Lourenço (2017) em que foi empregada a espectroscopia no infravermelho médio e próximo. Os resultados sugerem que os modelos construídos neste trabalho apresentam menores erros de previsão, o que pode estar relacionado a maior sensibilidade da técnica.

A previsão das amostras existentes na validação permitiu observar 100% de acertos durante a previsão das amostras de *Baccharis*, exceto para *B. trimera* (**Tabela 20**, Pág. 170), o que foi relacionado a composição química semelhante em comparação a *B. myriocephala*.

Tabela 20 – Resultados obtidos para os modelos construídos com as amostras de *B. trimera*, *B. myriocephala*, *B. articulata*, *B. junciformis* e *B. milleflora*.

Espécie	LVs	RMSECV	R²	Validação externa
<i>B. articulata</i>	4	0,058	0,991	100%
<i>B. junciformis</i>	4	0,069	0,973	100%
<i>B. milleflora</i>	4	0,077	0,964	100%
<i>B. myriocephala</i>	4	0,220	0,866	100%
<i>B. trimera</i>	4	0,220	0,859	96%

A aplicação dos modelos construídos por PLS-DA para previsão das amostras comerciais é apresentada na **Tabela 21**. Apesar da utilização de um número de variáveis latentes menor, os resultados da classificação das amostras comerciais, permitiu constatar que nenhuma das amostras comerciais foi classificada como *B. trimera*, estando de acordo com os resultados observados por Lourenço (2017).

As amostras BC3, CO04 e suas replicatas não foram classificadas em nenhum dos modelos avaliados, sugerindo que estas amostras podem ser alguma

espécie que não foi investigada neste trabalho. Por sua vez, as amostras BC5, BC6, BC7, BC8, BC9, BC11, BC12, BC13, BC14, BC15, BC16, BC20, BC21 e BC22 foram classificadas em dois (*B. myriocephala* e *B. articulata*) ou três modelos (*B. myriocephala*, *B. milleflora* e *B. articulata*), o que pode estar relacionado a misturas de espécies no produto comercializado.

Os resultados da classificação das amostras comerciais podem estar relacionados a combinação de espécies, identificação botânica equivocada, bem como, comércio inadequado deste fitoterápico (BONA et al., 2003; HEIDEN et al., 2006). Além disso, a regionalidade é um fator preponderante a ser considerado, uma vez que a maioria das amostras com resultados de classificação divergentes são provenientes do estado de Minas Gerais, pois condições de solo e clima diferentes alteram o conteúdo dos metabólitos.

Tabela 21 – Classificação de amostras comerciais utilizando os modelos construídos na PLS-DA.

Amostra	Origem	Classificação dos modelos					Amostra	Origem	Classificação dos modelos				
		Btri	Bmyr	Bart	Bjun	Bmil			Btri	Bmyr	Bart	Bjun	Bmil
BC1_R1	PR	N	N	C	N	N	BC14_R1	MG	N	C	C	N	N
BC1_R1	PR	N	N	C	N	N	BC14_R2	MG	N	C	C	N	N
BC2_R1	PR	N	N	N	N	C	BC15_R1	MG	N	C	C	N	N
BC2_R3	PR	N	N	N	N	C	BC15_R2	MG	N	C	C	N	N
BC3_R1	PR	N	N	N	N	N	BC16_R1	MG	N	C	C	N	N
BC3_R2	PR	N	N	N	N	N	BC16_R2	MG	N	C	C	N	N
BC4_R1	SP	N	N	N	N	C	BC17_R1	PR	N	N	N	C	N
BC4_R2	SP	N	N	N	N	C	BC17_R2	PR	N	N	N	C	N
BC5_R1	MG	N	C	C	N	N	BC18_R1	MG	N	N	N	N	C
BC5_R2	MG	N	C	C	N	N	BC18_R2	MG	N	N	N	N	C
BC6_R1	MG	N	C	C	N	N	BC19_R1	MG	N	C	N	N	N
BC6_R2	MG	N	C	C	N	N	BC19_R2	MG	N	C	N	N	N
BC7_R1	MG	N	C	C	N	N	BC20_R1	MG	N	C	C	N	C
BC7_R2	MG	N	C	C	N	N	BC20_R2	MG	N	C	C	N	C
BC8_R1	MG	N	C	C	N	N	BC21_R1	MG	N	C	C	N	N
BC8_R2	MG	N	C	C	N	N	BC21_R2	MG	N	C	C	N	N
BC9_R1	MG	N	C	C	N	N	BC22_R1	MG	N	C	C	N	N
BC9_R2	MG	N	C	C	N	N	BC22_R2	MG	N	C	C	N	N
BC10_R1	MG	N	N	N	N	C	BC23_R1	PR	N	C	N	N	N
BC10_R2	MG	N	N	N	N	C	BC23_R2	PR	N	C	N	N	N
BC11_R1	MG	N	C	C	N	N	CO01_R1	PR	N	C	N	N	N
BC11_R2	MG	N	C	C	N	N	CO01_R2	PR	N	C	N	N	N
BC12_R1	MG	N	C	C	N	C	CO04_R1	PR	N	N	N	N	N
BC12_R2	MG	N	C	C	N	C	CO04_R2	PR	N	N	N	N	N
BC13_R1	MG	N	C	C	N	N	CO05_R1	PR	N	N	N	N	C
BC13_R2	MG	N	C	C	N	N	CO05_R2	PR	N	N	N	N	C

C: Classificada; N: Não classificada; Btri: *B. trimera*; Bmyr: *B. myriocephala*; Bart: *B. articulata*; Bjun: *B. junciformis* e Bmil: *B. milleflora*.

4.4.6 Classificação pelo SIMCA das espécies de *Baccharis* e amostras comerciais

sendo novas amostras como pertencentes a uma ou mais classes ou nenhuma classe.

Na construção do modelo SIMCA são ajustados modelos de PCA para cada uma das classes. Neste caso, foram utilizados o mesmo conjunto amostral descrito na avaliação do PLS-DA. Foram avaliados diferentes pré-processamentos. Entretanto, optou-se por utilizar o autoescalamamento, pois neste as variáveis apresentam a mesma importância. O número de componentes principais selecionados para cada classe, bem como a variância capturada são apresentados na **Tabela 22**. As PCs escolhidas para cada classe foram estabelecidas, através da análise de gráficos dos valores de Q versus T^2 , pois através deles é possível observar a distância das amostras entre as classes bem como a distribuição das amostras dentro de cada classe.

Tabela 22 – Informações sobre o SIMCA.

Classe	Espécies	PC	Variância capturada (%)	% Classificação da Validação externa
1	<i>B. articulata</i>	4	77,08	71,43
2	<i>B. junciformis</i>	4	79,81	
3	<i>B. milleflora</i>	4	88,42	
4	<i>B. myriocephala</i>	5	81,13	
5	<i>B. trimeria</i>	5	75,75	

Os resíduos (Q) indicam quão diferentes as amostras são das utilizadas no modelo. Dessa forma, altos valores de resíduos sugerem que as espécies são diferentes das demais amostras, enquanto valores baixos indicam que as amostras são similares entre si. Já a distância entre uma classe e outra sugere que quanto maiores forem os valores mais confiável é o modelo.

Dessa forma, a análise dos gráficos de Q versus T^2 para cada classe considerando as componentes principais estabelecidas permitiu observar que os números de componentes principais selecionados para as amostras de referência de

B. articulata, *B. junciformis* e *B. milleflora* foram eficientes em separá-las das demais espécies (**Figuras 105, 106 e 107, Tabela 22** – Pág. 174-175).

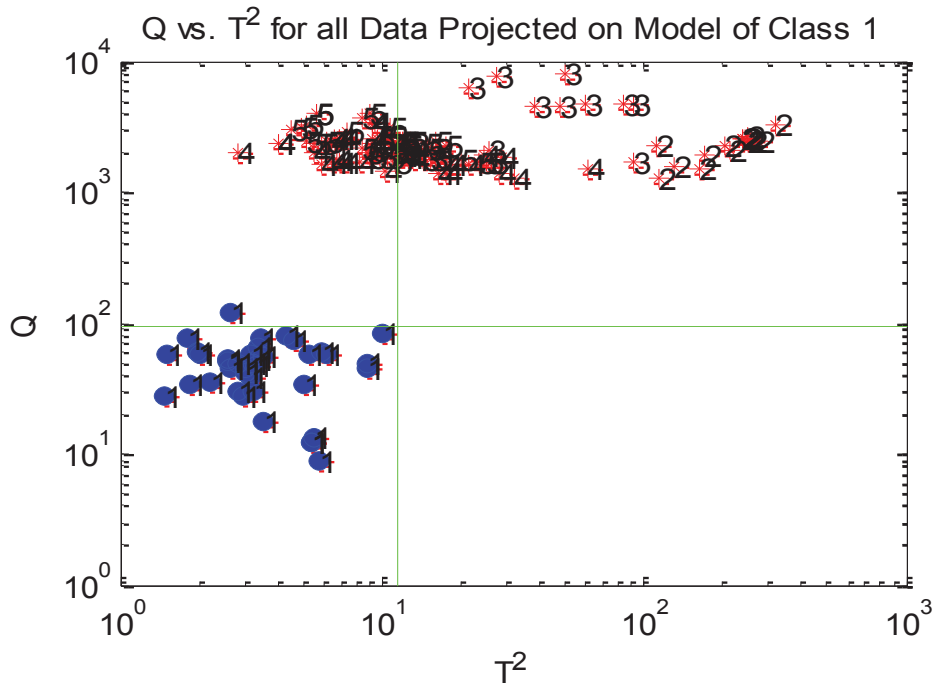


Figura 105 – Gráfico de Q versus T^2 para as amostras projetadas no modelo para classe 1 (*B. articulata*).

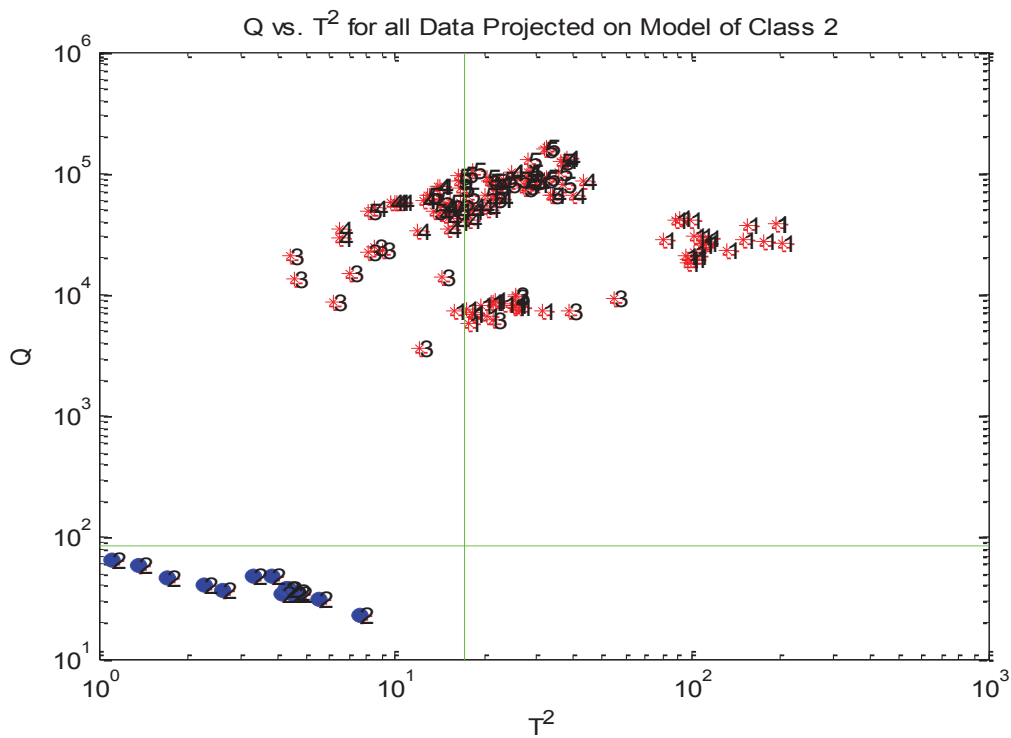


Figura 106 – Gráfico de Q versus T^2 para as amostras projetadas no modelo para classe 2 (*B. junciformis*).

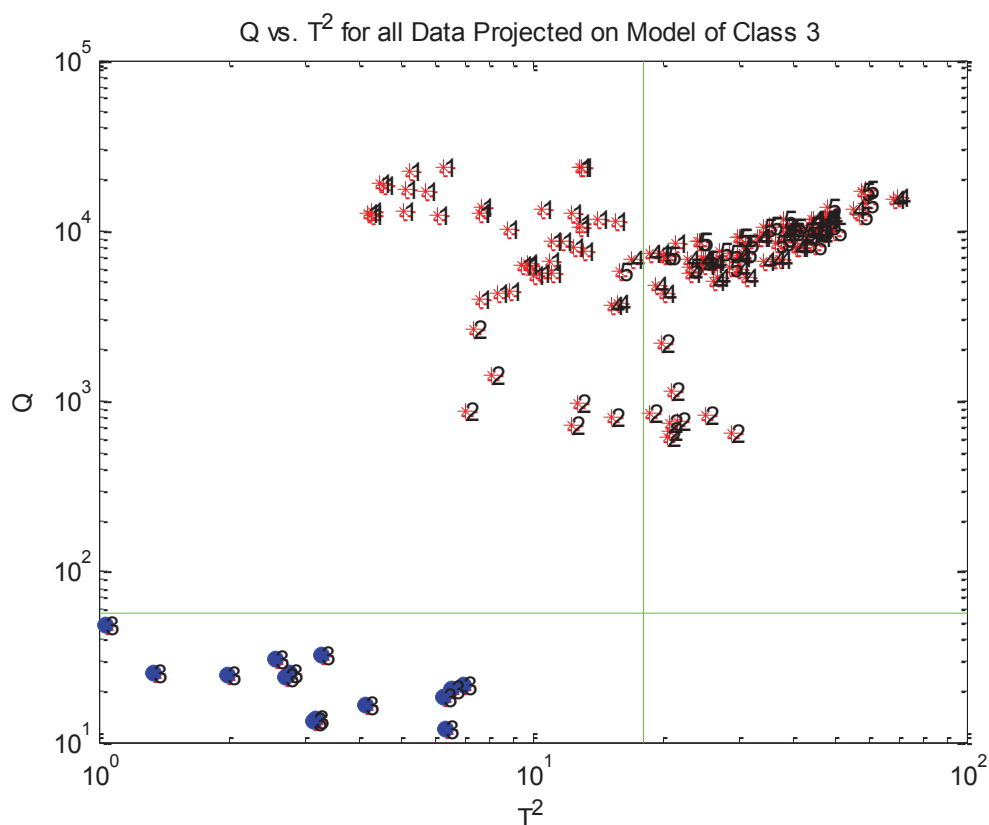


Figura 107 – Gráfico de Q versus T^2 para as amostras projetadas no modelo para classe 3 (*B. milleflora*).

Por sua vez, nas espécies *B. myriocephala* e *B. trimera* é observada uma proximidade entre as classes, acarretando em um modelo com sobreposição de hipercaixas, fato este relacionado à similaridade química entre estas espécies (**Figura 108 e 109, Tabela 22** – Pág. 173, 176). Apesar disso, o modelo foi utilizado na validação externa.

É possível observar que o modelo construído através do SIMCA apresenta uma boa condição para que possa ser utilizado na previsão, considerando as % de classificação do conjunto de validação externa (**Tabelas 22 e 23** – Pág. 173,178).

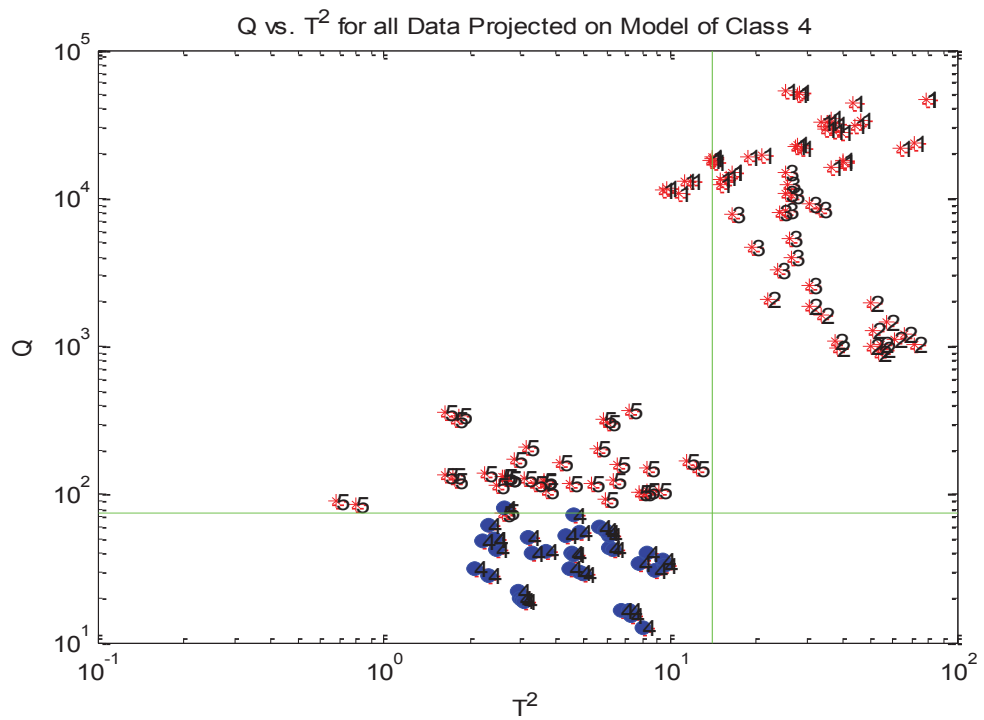


Figura 108 – Gráfico de Q versus T^2 para as amostras projetadas no modelo para classe 4 (*B. myriocephala*).

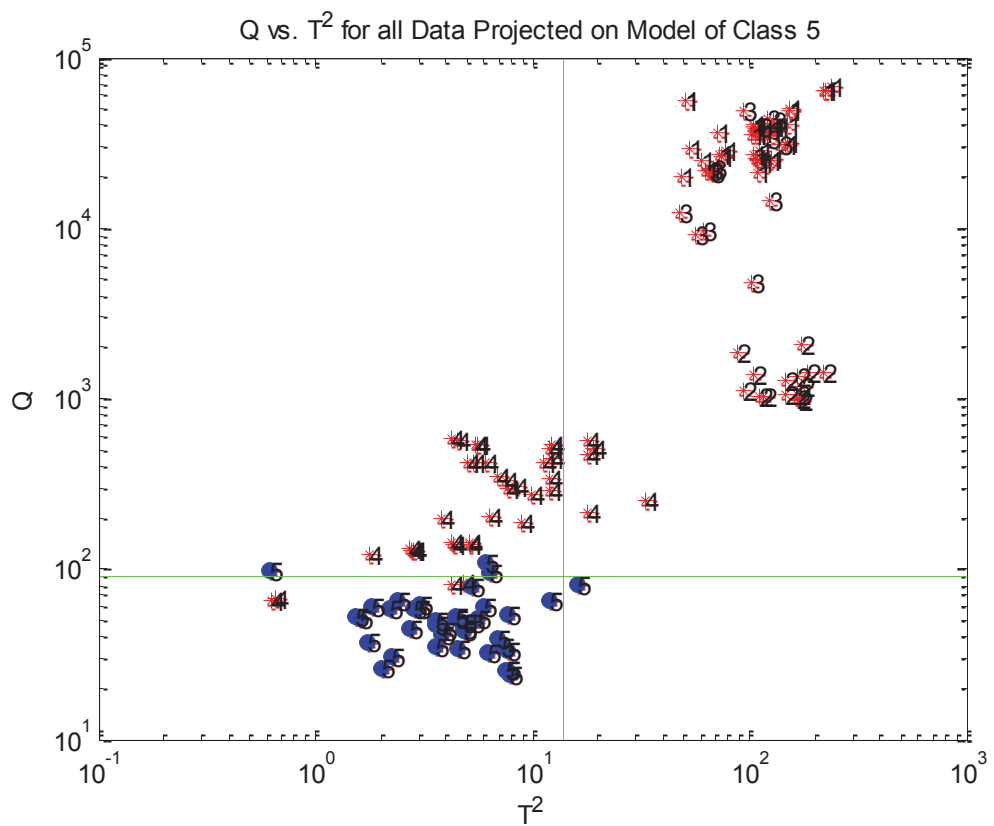


Figura 109 – Gráfico de Q versus T^2 para as amostras projetadas no modelo para classe 5 (*B. trimera*).

A análise das amostras da validação cruzada permitiu observar que 10 amostras apresentaram problemas de previsão (**Tabela 23** – Pág. 178). Destas, as amostras 1, 2, 14, 15, 18, 20, 38 e 39 foram previstas como pertencente a classe mais próxima da correta, devido a pequenos valores de resíduos. Por outro lado, as amostras 44 e 45 foram previstas em classes erradas. Observou-se ainda que as amostras 23, 27, 28, 29 e 30 foram classificadas como pertencente a duas classes, mas no centro da classe 4, o que mostra a dificuldade de classificação entre *B. trimera* e *B. myriocephala* e separação como observado na PCA (**Tabela 23** – Pág. 178).

Após obtenção de um modelo significativo considerando a eficiente capacidade de previsão das amostras do conjunto de validação externa, este foi empregado na previsão das amostras comerciais, cujos resultados são apresentados na **Tabela 24** (Pág. 179).

Assim como evidenciado no PLS-DA, nenhuma das amostras comerciais foram classificadas como pertencente a classe 5, correspondente a *B. trimera*. Observou-se ainda que, somente a amostra CO01 e sua replicata foram classificadas como pertencentes a classe da *B. myriocephala* (**4**), enquanto as amostras remanescentes foram classificadas como não pertencente as classes existentes e próximas das classes relativas as espécies *B. articulata* (**1**), *B. milleflora* (**3**) e *B. myriocephala* (**4**). Além disso, as amostras comerciais mostraram altos valores de resíduos, o que pode indicar que as espécies comerciais podem não pertencer as espécies investigadas.

Os métodos de classificação SIMCA mostraram resultados inferiores para as amostras da validação externa quando comparado ao PLS-DA. Apesar disso, tais resultados foram similares em ambos os métodos, onde nenhuma das amostras foi classificada como *B. trimera*, espécie recomendada pela Farmacopeia Brasileira.

Tabela 23 – Classificação de amostras da validação externa utilizando SIMCA.

Amostra	Classe Real	Classe prevista	Classe mais próxima	Centro da Classe	Q	T ²	Amostra	Classe Real	Classe prevista	Classe mais próxima	Centro da Classe	Q	T ²
1	1	0	1	0	1,77	0,29	26	4	4	0	0	0	0
2	1	0	1	0	1,94	0,36	27	4	2C	0	4	0	0
3	1	1	0	0	0	0	28	4	2C	0	4	0	0
4	1	1	0	0	0	0	29	4	2C	0	4	0	0
5	1	1	0	0	0	0	30	4	2C	0	4	0	0
6	1	1	0	0	0	0	31	4	4	0	0	0	0
7	1	1	0	0	0	0	32	4	4	0	0	0	0
8	1	1	0	0	0	0	33	4	4	0	0	0	0
9	1	1	0	0	0	0	34	4	4	0	0	0	0
10	1	1	0	0	0	0	35	4	4	0	0	0	0
11	1	1	0	0	0	0	36	5	5	0	0	0	0
12	1	1	0	0	0	0	37	5	5	0	0	0	0
13	1	1	0	0	0	0	38	5	0	5	0	2,05	0,25
14	2	0	2	0	2,88	0,50	39	5	0	5	0	2,12	0,36
15	2	0	2	0	3,44	0,58	40	5	5	0	0	0	0
16	2	2	0	0	0	0	41	5	5	0	0	0	0
17	2	2	0	0	0	0	42	5	5	0	0	0	0
18	2	0	2	0	4,94	0,32	43	5	5	0	0	0	0
19	3	3	0	0	0	0	44	5	0	4	0	1,67	0,99
20	3	0	3	0	1,50	0,01	45	5	0	4	0	1,68	1,03
21	3	3	0	0	0	0	46	5	5	0	0	0	0
22	3	3	0	0	0	0	47	5	5	0	0	0	0
23	4	2C	0	4	0	0	48	5	5	0	0	0	0
24	4	4	0	0	0	0	49	5	5	0	0	0	0
25	4	4	0	0	0	0							

0: Nenhuma das classes; 2C: classificação em duas classes; 1: *B. articulata*; 2: *B. junciformis*; 3: *B. milleflora*; 4: *B. myriocephala*; 5: *B. trimeria*.

Tabela 24 – Classificação de amostras comerciais utilizando SIMCA.

Amostra	Origem	Classe prevista	Classe mais próxima	Q	T ²	Amostra	Origem	Classe prevista	Classe mais próxima	Q	T ²
BC1_R1	PR	0	1	12,74	8,30	BC14_R1	MG	0	1	32,26	0,77
BC1_R1	PR	0	1	15,27	7,55	BC14_R2	MG	0	1	37,31	0,69
BC2_R1	PR	0	3	2,70	0,04	BC15_R1	MG	0	1	19,71	2,41
BC2_R3	PR	0	3	2,95	0,04	BC15_R2	MG	0	1	21,65	1,64
BC3_R1	PR	0	3	17,61	0,67	BC16_R1	MG	0	1	37,14	0,77
BC3_R2	PR	0	3	17,40	0,68	BC16_R2	MG	0	1	37,10	0,48
BC4_R1	SP	0	3	5,26	0,32	BC17_R1	PR	0	3	15,35	2,08
BC4_R2	SP	0	3	4,53	0,18	BC17_R2	PR	0	3	14,46	2,01
BC5_R1	MG	0	1	28,53	0,93	BC18_R1	MG	0	3	7,00	0,002
BC5_R2	MG	0	1	31,52	0,62	BC18_R2	MG	0	3	11,17	0,06
BC6_R1	MG	0	1	37,95	0,62	BC19_R1	MG	0	4	2,05	0,24
BC6_R2	MG	0	1	36,30	0,53	BC19_R2	MG	0	4	7,01	0,46
BC7_R1	MG	0	1	27,96	1,50	BC20_R1	MG	0	4	89,40	1,34
BC7_R2	MG	0	1	27,16	1,07	BC20_R2	MG	0	1	46,53	1,32
BC8_R1	MG	0	1	32,34	0,62	BC21_R1	MG	0	1	40,85	0,23
BC8_R2	MG	0	1	28,92	0,52	BC21_R2	MG	0	1	39,29	0,50
BC9_R1	MG	0	1	28,50	0,78	BC22_R1	MG	0	1	34,64	0,38
BC9_R2	MG	0	1	28,53	0,51	BC22_R2	MG	0	1	34,71	0,73
BC10_R1	MG	0	3	6,28	0,10	BC23_R1	MG	0	4	4,48	0,32
BC10_R2	MG	0	3	6,58	0,16	BC23_R2	MG	0	4	4,23	0,32
BC11_R1	MG	0	1	47,91	0,78	CO01_R1	PR	4	0	0	0
BC11_R2	MG	0	1	48,58	0,51	CO01_R2	PR	4	0	0	0
BC12_R1	MG	0	1	41,91	0,37	CO04_R1	PR	0	4	14,36	2,02
BC12_R2	MG	0	1	40,46	0,41	CO04_R2	PR	0	4	14,31	2,00
BC13_R1	MG	0	1	40,81	2,20	CO05_R1	PR	0	3	15,06	0,37
BC13_R2	MG	0	1	28,76	3,48	CO05_R2	PR	0	3	15,97	0,28

0: Nenhuma das classes; 2C: classificação em duas classes; 1: *B. articulata*; 2: *B. junciformis*; 3: *B. milleflora*; 4: *B. myriocephala*; 5: *B. trimeria*

O uso de espectros de RMN HR-MAS de amostras de referência de *Baccharis* como modelo na classificação das amostras comerciais permitiu verificar que todas se tratavam de espécies de *Baccharis*. Porém, somente 11% das amostras foram consideradas *B. trimera* ou *B. myriocephala* quando submetidas a classificação ao utilizar o AMIX, enquanto a classificação das amostras por meio do PLS-DA e SIMCA através do software MATLAB mostrou resultados semelhante em que nenhuma das amostras comerciais foram classificadas como *B. trimera*.

Dessa forma, seria importante implantar o uso de novos métodos para avaliar a autenticidade de *B. trimera*, como o perfil espectral obtido por RMN HR-MAS, pois este fornece uma impressão digital da planta medicinal.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

A espectroscopia de RMN HR-MAS de ^1H revelou-se uma excelente ferramenta no controle de qualidade de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, bem como, na classificação taxonômica de espécies morfologicamente semelhantes quando aliada às análises quimiométricas. Além de possuir a vantagem de permitir a obtenção de informações relevantes sobre a composição química diretamente das amostras, em seu ambiente natural, de forma simples e direta.

A análise de espectros de RMN HR-MAS uni e bidimensionais e comparações com dados da literatura permitiu identificar 13 metabólitos: acetato de carquejila, 3-*O*-metilquercetina, quercetina, canferol, apigenina, ácido siríngico, *trans*-melilotosídeo, *cis*-melilotosídeo, ácido 3,5-dicafeoilquínico, cafeato de 4'-*O*- β -glucopiranosil-3',5'-dimetoxibenzila (BaI), carbonato de 4-*O*- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-tetraidro-2H-piran-2-il-acetil (BaIII) e 4-*O*- β -glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-metanol (BaIV) e ácido cafeico. Os compostos *trans*-melilotosídeo e *cis*-melilotosídeo foram relatados pela primeira vez na espécie *B. milleflora*.

A RMN HR-MAS aliada à quimiometria possibilitou a discriminação das amostras de *B. trimera* e *B. myriocephala* das demais espécies de *Baccharis* estudadas (*B. articulata*, *B. milleflora* e *B. junciformis*). A análise de componentes principais revelou a diferenciação das espécies, bem como, a inter-relação entre *B. trimera* e *B. myriocephala*, distinguidas das demais espécies pela presença do acetato de carquejila. Já estas duas espécies não puderam ser discriminadas entre si, indicando que ambas são quimicamente semelhantes e poderiam ser utilizadas para fins medicinais, desde que teste biológicos sejam realizados em *B. myriocephala*.

A aplicação de métodos de classificação para avaliar a autenticidade das amostras comerciais revelou que se tratavam de espécies de *Baccharis*, porém poucas foram classificadas como de *B. trimera* ou *B. myriocephala*. Em particular, os modelos PLS-DA através do MATLAB mostraram melhores resultados com uma capacidade de reconhecimento de 100% das amostras de validação externa, exceto para o modelo da *B. trimera* (96%), o que foi relacionado a composição química semelhante em comparação a *B. myriocephala*. Por sua vez, a classificação das amostras comerciais permitiu constatar que nenhuma das amostras comerciais foi

classificada como *B. trimera*, o que sugere mistura de espécies na erva medicinal comercializada.

Devido à similaridade química entre *B. trimera* e *B. myriocephala*, o SIMCA classificou corretamente 71,43% das amostras de referência de *Baccharis*. Assim como os modelos PLS-DA, o SIMCA mostrou que 100% das amostras comerciais não foram classificadas como *B. trimera*, espécie recomendada pela Farmacopeia Brasileira e presente na RENISUS. Além disso, somente 3,84% foi classificada como *B. myriocephala*.

Os resultados da classificação das amostras comerciais podem estar relacionados a combinação de espécies, identificação botânica equivocada atrelado ao comércio inadequado deste fitoterápico. Assim, há a necessidade de um controle de qualidade mais rigoroso em relação a comercialização de ervas medicinais, uma vez que podem ser espécies não recomendadas para uso, cujos efeitos toxicológicos ainda não foram avaliados, bem como, pode haver mistura de espécies no produto comercializado.

Este trabalho apresentou um indicativo das diferenças e semelhanças químicas entre as amostras e a sua relação com a qualidade das plantas medicinais comercializadas. Para obter um método eficaz de controle de qualidade é necessário incluir um maior número de amostras e considerar outras variáveis, como sazonalidade e regionalidade abrangendo uma faixa bem maior da estudada. No entanto, os resultados deste trabalho fornecem subsídios para pesquisas mais aprofundadas, como a realização de teste biológicos e de validação em *B. myriocephala* para sua inclusão na Farmacopeia Brasileira.

Dessa forma, o perfil espectral obtido por RMN HR-MAS de ^1H pode fornecer subsídios para auxiliar na correta classificação taxonômica de espécies da seção *Caulopterae*, uma vez que fornece um perfil mais informativo da matriz comparado aos métodos convencionais. Assim, este trabalho contribuiu para destacar as vantagens da aplicação da RMN HR-MAS associada ao PCA, PLS-DA e SIMCA na discriminação e classificação de amostras de referência e comerciais de *Baccharis*, de forma a contribuir na autenticidade de ervas medicinais, considerando a composição química através dos dados de RMN HR-MAS.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v. 7, n. 7, p. 76–96, 2007.
- ABDULLAH, F.; LING, S. K.; MAN, S.; TAN, A. L.; TAN, H. P.; ABDULLAH, Z. Characterization and identification of *Labisia pumila* by multi-steps infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p. 200–206, 2012.
- ABOY, A. L.; APEL, M. A.; DEBENEDETTI, S.; FRANCESCATO, L.; ROSELLA, M. A.; HENRIQUES, A. T. Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1219, p. 147-153, 2012.
- AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67–76, 2012.
- AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M. R. F.; ZATTERA, R.; WASUM, R.; SERAFINI, L. A. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 215-220, 2005.
- AKAIKE, S.; SUMINO, M.; SEKINE, T.; SEO, S.; KIMURA, N.; IKEGAMI, F. A New *ent*-Clerodane Diterpene from the Aerial Parts of *Baccharis gaudichaudiana*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, n. 2, p. 197-199, 2003.
- ALAM, T. A.; JENKINS, J. E. **HR-MAS NMR spectroscopy in material science**. In Farrukh M. A, Editor. *Advanced aspects of spectroscopy*. Intech Open; 2012. p. 279–306.
- ALCANTARA, G. B.; HONDA, N. K.; FERREIRA, M. M. C.; FERREIRA, A. G. Chemometric analysis applied in ¹H HR-MAS NMR and FT-IR data for chemotaxonomic distinction of intact lichen samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 595, p. 3-8, 2007.
- ALIAKBARZADEH, G.; PARASTAR, H.; SERESHTI, H. Classification of gas chromatographic fingerprints of saffron using partial least squares discriminant analysis together with different variable selection methods. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 158, p. 165-173, 2016.

- AL-NUMAIR, K. S.; VEERAMANI, C.; ALSAIF, M. A.; CHANDRAMOHAN, G. Influence of kaempferol, a flavonoid compound, on membrane-bound ATPases in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 9, p. 1372– 1378, 2015.
- ALONSO, J.; DESMARCHELIER, C. **Plantas medicinales autóctonas de la Argentina – bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud**. Buenos Aires: Fitociencia. 2006, p. 663.
- ALVES, M. G.; MARTINS, A. D.; MOREIRA, P. I.; CARVALHO, R. A.; SOUSA, M.; BARROS, A.; SILVA, J.; PINTO, S.; SIMOES, T.; OLIVEIRA, P. F. Metabolic fingerprints in testicular biopsies from type 1 diabetic patients. **Cell & Tissue Research**, v. 362, n.2, p. 431-440, 2015.
- ANDRADE, C. G.; MESQUITA, L. M. S.; MURADOR, D. C.; BRAGA, A. R. C.; DE ROSSO, V. V.; DE ALMEIDA, O. J. G.; VILEGAS, W. Application of electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting associated with macroscopic and histological analysis for *Plantago major* herbal infusions quality control. **Food Research International**, v. 107, p. 314-324, 2018.
- ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129-138, 2017.
- ANDRIÃO, M. A.; PEREIRA, F. C. S.; MARTINS, M. I. E. G.; SACRAMENTO, L. V. S. Estimativas de custo de produção e rentabilidade de plantas medicinais: carqueja cultivada no município de Cajuru, Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v. 40, n. 2, p. 16-26, 2010.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.
- ARGOTI, J. C.; LINARES-PALOMINO, P. J.; SALIDO, S.; et al. On-Line Activity Screening for Radical Scavengers from *Baccharis chilco*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 2, p. 189–197, 2013.
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.-M.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-

- derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1582–1614, 2015.
- BALABIN, R. M.; SAFIEVA, R. Z.; LOMAKINA, E. I. Gasoline classification using near infrared (NIR) spectroscopy data: Comparison of multivariate techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, p 27-35, 2010.
- BALLABIO, D. A. MATLAB toolbox for Principal Component Analysis and unsupervised exploration of data structure. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 149, p. 1-9, 2015.
- BANDONI, A. L.; MEDINA, J. E.; RONDINA, R. V. D.; COUSSIO, J. D. Genus *Baccharis* L. I: Phytochemical analysis of a non-polar fraction from *B. crispa* Sprengel. **Planta Medica**, v. 34, n. 3, p 328-331, 1978.
- BASTOS, K. X.; DIAS, C. N.; NASCIMENTO, Y. M.; DA SILVA, M. S.; LANGASSNER, S. M. Z.; WESSJOHANN, L. A.; TAVARES, J. F. Identification of Phenolic Compounds from *Hancornia speciosa* (Apocynaceae) Leaves by UHPLC Orbitrap-HRMS. **Molecules**, v. 22, n. 143, p. 1-11, 2017
- BECK, S.; STENGEL, J. Mass spectrometric imaging of flavonoid glycosides and biflavonoids in *Ginkgo biloba* L. **Phytochemistry**, v. 130, p. 201–206, 2016.
- BECKONERT, O.; COEN, M.; KEUN, H. C.; WANG, Y.; EBBELS, T. M. D.; HOLMES, E.; LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K. High-resolution magic-angle-spinning NMR spectroscopy for metabolic profiling of intact tissues. **Nature**, v.5, p. 1019, 2010.
- BELARBI, K.; ATIK-BEKKARA, F.; EL HACI, I. A.; BENSAID, I.; BEKHECHI, C. Identification of phenolic compounds from the leaf part of *Teucrium pseudo-Scorodonia* Desf. collected from Algeria. **Natural Products Research**, v. 32, n. 3, p. 350-353, 2018.
- BHARTI, S. K.; BHATIA, A. TEWARI, S. K.; SIDHU, O. P.; ROY, R. Application of HR-MAS NMR spectroscopy for studying chemotype variations of *Withania somnifera* (L.) Dunal. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. 659-657, 2011.
- BIONDO, T. M. A.; TANAE, M. M.; COLETTA, E. D.; LANDMAN, M. T. L.-; LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 368-373, 2011.

- BITTNER, M.; SCHENK, R.; MELZIG, M. F. Alternative approach to species identification of *Actaea racemosa* L. (syn. *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt., black cohosh) herbal starting material: UV spectroscopy coupled with LDA. **Phytochemistry Letters**, v. 18, p. 220-225, 2016.
- BONA, C.M.; BIASI, L.A.; COSTA, G.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Calagem e sombreamento na produção de biomassa e rendimento de óleo essencial em carqueja (*Baccharis trimera* A.P. de Candolle). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, p. 28-32. 2003.
- BORELLA, J. C.; FONTOURA, A. Avaliação do perfil cromatográfico e o teor de flavonóides em amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC., Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 63-67, 2002.
- BORGIO, J.; XAVIER, C. A. G.; MOURA, D. J.; RICHTER, M. F.; SUYENAGA, E. S. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoids e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 12-17, 2010.
- BORKAR, V.; KUMARAN, S.; SENTHIL, K.; HEMANT, G. Antidiabetic activity and isolation of bioactive. *Indonesian Journal Pharmaceutical*, v. 26, n. 4, p. 185–191, 2015.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília, 2016, 192 p.
- BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, p. 2, 23 jun. de 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. DAF/SCTIE/MS – **Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS** – RENISUS, Brasília – DF, 06 de março de 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 971, de 03 de Maio de 2006. **Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção 1, Col. 2, p. 20, 04 maio de 2006. 2006a.
- BREWER, R. G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. **Analyst**, v. 125, p. 2125-2154, 2000.

- BRETERON, R. G. Populations and samples. **Journal of Chemometrics**, v. 29, p. 325–328, 2015.
- BROBERG, A.; KENNE, L. Use of high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy for *in situ* studies of low-molecular-mass compounds in red algae. **Analytical Biochemistry**, v. 284, p. 367-374, 2000.
- BROBERG, A.; KENNE, L.; PEDENSEN, M. In-situ identification of major metabolites in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis* using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Planta**, v. 206, p. 300-307, 1998.
- BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, C. A. M. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera* (Less.) DC., Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 75-85, 2009.
- BYLESJÖ, M.; RANTALAINEN, M.; CLOAREC, O.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; TRYGG, J. OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. **Journal of Chemometrics**, v. 20, p. 341-351, 2006.
- CAMPOS, F. R.; BRESSAN, J.; JASINSKI, V. C. G.; ZUCCOLOTTO, T.; SILVA, L. E.; CERQUEIRA, L. B. *Baccharis* (Asteraceae): Chemical constituents and biological activities. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, p. 1-17, 2016.
- CARIDDI, L.; ESCOBAR, F.; SABINI, C.; TORRES, C.; REINOSO, E.; CRISTOFOLINI, A.; COMINI, L.; MONTOYA, S. N.; SABINI, L. Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 155-161, 2012.
- CARVALHO, A. C. B.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. O.; PERFEITO, J. P. S. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 503-506, 2014.
- CESPEDES, C. L.; UCHOA, A.; SALAZAR, J. R.; PERICH, F.; PARDO, F. Plant Growth Inhibitory Activity of *p*-Hydroxyacetophenones and Tremetones from Chilean Endemic *Baccharis* Species and Some Analogous: A Comparative Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2283-2292, 2002.
- CHEN, N.-D.; CHEN, N.-F.; LI, J.; CAO, C.-Y.; WANG, J.-M. Rapid authentication of different ages of tissue-cultured and wild *Dendrobium huoshanense* as well as

- wild *Dendrobium henanense* using FTIR and 2D-COS IR. **Journal of Molecular Structure**, v. 1101, p. 101-108, 2015.
- CHIN, J. A.; CHEN, A. D.; SHAPIRO, M. J. Speedy: Spin-Echo Enhanced Diffusion Filtered Spectroscopy. A New tool for High Resolution MAS NMR. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 293-296, 2000.
- CHO, J.-Y.; KIM, J. Y.; LEE, Y. G.; LEE, H. J.; SHIM, H. J.; LEE, J. H.; KIM, S.-J.; HAM, K.-S.; MOON, J.-H. Four New Dicafeoylquinic Acid Derivatives from Glasswort (*Salicornia herbacea* L.) and Their Antioxidative Activity. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1-13, 2016.
- CHOZE, R.; ALCANTARA, G. B.; FILHO, E. G. A.; SILVA, L. M. A.; FARIA, J. C.; LIÃO, L. M. Distinction between a transgenic and a conventional common bean genotype by ¹H HR-MAS NMR. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2841–2847, 2013.
- CONSONNI, R.; ORDOUDI, S. A.; CAGLIANI, L. R.; TSIANGALI, M.; TSIMIDOU, M. Z. On the traceability of commercial saffron samples using ¹H NMR and FT-IR metabolomics. **Molecules**, n. 21, v. 286, p. 1-13, 2016.
- CORSARO, C.; MALLAMACE, D.; VASI, S.; FERRANTELLI, V.; GIACOMO, D.; CICERO, N. ¹H HR-MAS NMR Spectroscopy and the Metabolite Determination of Typical Foods in Mediterranean Diet. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, p. 1-14, 2015.
- DA COSTA, M. F.; GALAVERNA, R. S.; PUDENZI, M. A.; RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, C. DOS. Profiles of phenolic compounds by FT-ICR MS and antioxidative and antiproliferative activities of *Stryphnodendron obovatum* Benth leaf extracts. **Analytical Methods**, v. 8, n. 31, p. 6056-6063, 2016.
- DAILY, A.; WAGNER H.; SELIGMANN, O. Hispidolin and stigmasta-7,22-dien-3-ol from *Baccharis genistelloides*. **Fitoterapia**, v. 55, p. 236-238, 1984.
- DAOLIO, C.; BELTRAME, F. L.; FERREIRA, A. G.; CASS, Q. B.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, M. M. C. Classification of Commercial Catuaba Samples by NMR, HPLC and Chemometrics. **Phytochemical Analysis**, v. 19, p. 218-228, 2008.
- DAVIS, C. B.; BUSCH, K. W.; RABBE, D. H.; BUSCH, M. A.; LUSK, J. R. Rapid, non-destructive, textile classification using SIMCA on Diffuse Near-Infrared Reflectance spectra. **Journal of Modern Physics**, v. 6, p. 711-718, 2015.
- DE CAMPOS, A. C. T.; RADUNZ, L. L.; RADUNZ, A. L.; MOSSI, A. J.; DIONELLO, R. G.; ECKER, S. L. Atividade repelente e inseticida do óleo essencial de

- carqueja doce sobre o caruncho do feijão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 8, p. 861-865, 2014.
- DE OLIVEIRA, R. N.; REHDER, V. L. G.; OLIVEIRA, A. S. S.; JUNIOR, I. M.; DE CARVALHO, J. E.; DE RUIZ, A. L. T. G.; JERALDO, V. L. S.; LINHARES, A. X.; ALLEGRETTI, S. M. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 135–143, 2012.
- DE SOUZA, K. C. B.; BASSANI, V. L.; SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. **Phytomedicine**, v. 14, p. 102-108, 2007.
- DEL CORRAL, A.; CUFFINI, S. L.; CARDOSO, S. C.; BORTOLUZZID, A. J.; PALACIOS, S. M. Phytotoxic halimanes isolated from *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pad.) Pers. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 280-283, 2012.
- DOS SANTOS, D. A.; FUKUI, M. DE J.; NANAYAKKARA, N. P. D.; KHAN, S. I.; SOUSSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F.; SILVA FILHO, A. A. DA; QUINTÃO, N. L. M. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 543 -550, 2010.
- DUCA, D.; MANCINI, M.; ROSSINI, G.; MENGARELLI, C.; PEDRETTI, E. F.; TOSCANO, G.; PIZZI, A. Soft Independent Modelling of Class Analogy applied to infrared spectroscopy for rapid discrimination between hardwood and softwood. **Energy**, v. 117, p. 251-258, 2016.
- DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.
- ESCANDÓN, R. A.; CAMPO, M. DEL; LÓPEZ-SOLIS, R.; OBREQUESLIER, E.; TOLEDO, H. Antibacterial effect of kaempferol and (-)-epicatechin on *Helicobacter pylori*. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 9, p. 1495–1502, 2016.
- FAN, G.; ZHANG, M. Y.; ZHOU, X. D.; LAI, X. R.; YUE, Q. H.; TANG, C.; LUO, W. Z.; ZHANG, Y. Quality evaluation and species differentiation of *Rhizoma coptidis* by using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 747, p. 76–83, 2012.

- FAN, S.; ZHONG, Q.; HASSEK, C. F.-; PFISTER, M. K.-H.; HORN, B.; HUANG, Z. Classification of Chinese wine varieties using ^1H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. **Food Control**, v. 88, p. 113-122, 2018.
- FARAG, M. A.; LABIB, R. M.; NOLETO, C.; PORZELD, A.; WESSJOHANN, L. A. NMR approach for the authentication of 10 cinnamon spice accessions analyzed via chemometric tools. **Food Science and Technology**, v. 90, p. 491-498, 2018.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1. ed. São Paulo: Atheneu, 1926.
- FAROOQ, H.; MURIAS, D. C.; SOONG, R.; BERMEL, W.; KINGERY, W. M.; SIMPSON, A. J. HR-MAS NMR Spectroscopy: A practical guide for natural samples. **Current Organic Chemistry**, v. 17, p. 3013-3031, 2013.
- FERREIRA, F. P.; OLIVEIRA, D. C. R. New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip.ex Baker. **Tetrahedron Letters**, v. 51, p. 6856–6859, 2010.
- FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria – Conceitos, métodos e aplicações**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, p.107-238, 2015.
- FLORA DO BRASIL. **Baccharis in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB5151>>. Acesso: 08/01/2018.
- FLORES, I. S.; SILVA, A. K.; FURQUIM, L. C.; CASTRO, C. F. S.; CHAVES, L. J.; COLLEVATTI, R. G.; LIÃO, L. M. HR-MAS NMR Allied to Chemometric on *Hancornia speciosa* Varieties Differentiation. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 4, p. 708-714, 2018.
- FOTAKIS, C.; ZERVOU, M. NMR metabolic fingerprinting and chemometrics driven authentication of Greek grape marc spirits. **Food Chemistry**, v. 196, p. 760-768, 2016.
- FREITAS, C. S.; BAGGIO, C. H.; FINAU, J.; ANGINONI, M.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; MARQUES, M. C. A. Inhibition of H^+/K^+ ATPase in the gastroprotective effect of *Baccharis illinita* DC. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 1105-1110, 2008.
- FULLAS, F.; HUSSAIN, R. A.; CHAI, H.-B.; PEZZUTO, J. M. Cytotoxic Constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 801-807, 1994.
- GAD, H. A., EL-AHMADY, S. H., ABOU-SHOER, M. I., & AL-AZIZI, M. M. A modern approach to the authentication and quality assessment of thyme using UV

- spectroscopy and chemometric analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 6, p. 520–526, 2013.
- GAD, H. A.; EL-AHMADY, S. H.; ABOU-SHOER, M. I.; AL-AZIZI, M. M. Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 1, p. 1–24, 2012
- GARCIA, F. A. O.; TANAE, M. M.; TORRES, L. M. B.; LAPA, A. J.; LANDMAN, M. T. R. DE L.-; SOUCCAR, C. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. on the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1021-1025, 2014.
- GEMPERLINE, P. **Practical guide to chemometrics**, 2nd ed., New York: CRC Press Taylor & Francis, p. 140-145, 2006.
- GENE, R. M.; MARIN, E.; ADZET, T. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. **Planta Medica**, v. 58, p. 656–666, 1992.
- GIANELLO, J. C.; CEÑAL, J. P.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E.; PETENATTI, M. E.; PETENATTI, E. M.; DEL VITTO, L. A. Medicamentos Herbarios en el Centro-Oeste Argentino. II. “Carquejas”: Control de Calidad de las Drogas Oficiales y Substituentes. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 19, p. 99-103, 2000.
- GIL, A. M.; ALBERTI, E.; TATHAM, A. S.; BELTON, P.S.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. Magic Angle Spinning NMR Study of the Hidration of the Wheat seed Storage Protein Omega-Gliadins. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 35, p. 101-111, 1997.
- GIL, A. M.; DUARTE, I. F. DELGADILHO, I.; CASUSCELLI, F.; HUMPFER, E.; SPRAUL, M. Study of the Compositional Changes of Mango during Ripening by Use of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, p. 1524-1536, 2000.
- GRECCO, S. S.; FERREIRA, M. J. P.; ROMOFF, P.; FAVERO, O. A.; LAGO, J. H. G. Phenolic derivatives from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 42, p. 21-24, 2012b.
- GRECCO, S. S.; REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G.; SARTORELLI, P.; CUNHA, R. L. O.; ROMOFF, P.; FERREIRA, M. J. P.; FÁVERO, O. A.; LAGO, J. H. G. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 141-145, 2012a.

- GUO, Y.; LI, Y.; XU, J.; LI, N.; YAMAKUNI, T.; OHIZUMI, Y. Clerodane diterpenoids and flavonoids with NGF-potentiating activity from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 10, p. 1532-1534, 2007.
- HAYASHI, K.-I.; KANAMORI, T.; YAMAZOE, A.; YAMADA, M.; NOZAKI, H. Gaudichanolides A and B, Clerodane Diterpenes from *Baccharis gaudichaudiana*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1121-1124, 2005.
- HE, K.; MONTENEGRO, G.; HOFFMANN, J. J.; TIMMERMANN, B. N. Diterpenoids from *Baccharis linearis*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1123-1127, 1996.
- HE, X.; LI, J.; ZHAO, W.; LIU, R.; ZHANG, L.; KONG, X. Chemical fingerprint analysis for quality control and identification of Ziyang green tea by HPLC. **Food Chemistry**, v. 171, p. 405-411, 2015.
- HEIDEN, G.; BAUMGRATZ, J. F. A.; ESTEVES, R. L. *Baccharis* subgen. *Molina* (Asteraceae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 3, p. 649-687, 2012.
- HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; MACIAS, L. *Baccharis* sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 60, p. 943-983, 2009.
- HEIDEN, G.; IGANCI, J. R. V.; STEIN, V.; BOBROWSKI, V. L. Número cromossômico de *Baccharis riograndensis* malag. & j. e. vidal (Asteraceae). **Pesquisa, Botânica**, v. 57, p. 121-136, 2006.
- HEIDEN, G.; PIRANI, J. R. Taxonomy of *Baccharis* subgen. *Tarchonanthoides* (Asteraceae: Astereae: Baccharidinae), a group from the southeastern South American grasslands and savannas. **Phytotaxa**, v. 241, n.1, p. 01-70, 2016.
- HEINRICH, M. Quality and safety of herbal medical products: Regulation and the need for quality assurance along the value chains. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 80, p. 62-66, 2015.
- HENOUMONT, C.; LAURENT, S.; MULLER, R. N.; ELST, L. V. HR-MAS NMR Spectroscopy: An Innovative Tool for the Characterization of Iron Oxide Nanoparticles Tracers for Molecular Imaging. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 1701-1710, 2015.
- HONG, S. S.; CHOI, C. W.; CHOI, Y.-H.; OH, J. S. Coixlachryside A: A new lignan glycoside from the roots of *Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf. **Phytochemistry Letters**, v. 17, p. 152-157, 2016.

- HUANG, Y.; WU, Z.; SU, R.; RUAN, G.; DU, F.; LI, G. Current application of chemometrics in traditional Chinese herbal medicine research. **Journal of Chromatography B**, v. 1026, p. 27-35, 2016.
- HUBERT, D. J.; DAWE, A.; FLORENCE, N. T.; GILBERT, K. D. W. F.; ANGELE, T. N.; BUONOCORE, D.; FINZI, P. V.; VIDARI, G.; BONAVENTURE, N. T.; MARZATICO, F.; PAUL, M. F. In vitro hepatoprotective and antioxidant activities of crude extract and isolated compounds from *Ficus gnaphalocarpa*. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 1, p. 35-43, 2011.
- HUSSAIN, S. H.; LATIF, A.; COX, R. J.; SIMPSON, T. J.; ALI, M.; ARFAN, M.; UDDIN, G. Phytochemicals from the aerial parts of *Ligularia thomsonii* and their radical scavenging activity. **Phytochemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 6–10, 2014.
- ITOH, A.; ISODA, K.; KONDOH, M.; KAWASE, M.; KOBAYASHI, M.; TAMESADA, M.; YAGI, K. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 32, n. 7, p. 1215–9, 2009.
- JARAMILLO-GARCIA, V.; TRINDADE, C.; LIMA, E.; GUECHEVA, T. N.; VILLELA, I.; MARTINEZ-LOPEZ, W.; CORREA, D. S.; FERRAZ, A. B. F.; MOURA, S.; SOSA, M. Q.; DA SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. P. Chemical characterization and cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of *Baccharis trinervis* (Lam, Persoon) from Colombia and Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 210-220, 2018.
- JEELANI, S. M.; RATHER, G. R.; SHARMA, A., LATTO, S. K. LATTOO. In perspective: Potential medicinal plant resources of Kashmir Himalayas, their domestication and cultivation for commercial exploitation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plant**, v. 8, p. 10-25, 2018.
- JÉGOU, C.; CULIOLI, G.; KERVAREC, N.; SIMON, G.; STIGER-POUVREAU, V. LC/ESI-MSⁿ and ¹H HR-MAS NMR analytical methods as useful taxonomical tools within the genus *Cystoseira* C. Agardh (Fucales; Phaeophyceae). **Talanta**, v. 83, p. 613-622. 2010.
- KAZI, T.; HUSSAIN, N.; BREMNER, P.; SLATER, A.; HOWARD, C. The application of a DNA-based identification technique to over-the-counter herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 87, p. 27–30, 2013.

- KHAN, I. A.; SMILLIE, T. Implementing a “quality by design” approach to assure the safety and integrity of botanical dietary supplements. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1665–1673, 2012.
- KILLNER, M. H. M.; DANIELI, E.; CASANOVA, F.; ROHWEDDER, J. J. R.; BLÜMICH, B. Mobile compact ¹H NMR spectrometer promises fast quality control of diesel fuel. **Fuel**, v. 203, p. 171-178, 2017.
- KUBALLA, T.; BRUNNER, T. S.; THONGPANCHANG, T.; WALCH, S. G.; LACHENMEIER, D. W. Application of NMR for authentication of honey, beer and spices. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 57-62, 2018.
- KURDELAS, R. R.; LOPEZ, S.; LIMA, B.; FERESIN, G. E.; ZYGADLOC, J.; ZACCHINO, S.; LOPEZ, M. L.; TAPIA, A.; FREILE, M. L. Chemical composition, anti-insect and antimicrobial activity of *Baccharis darwinii* essential oil from Argentina, Patagonia. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 261– 267, 2012.
- KUROYANAGI, M.; FUJITA, K.; KAZAOKA, M.; MATSUMOTO, S.; UENO, A.; FUKUSHIMA, S.; KATSUOKA, M. Studies on the constituents of *Baccharis genistelloides*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 11, p 5075-5078, 1985.
- LEE, D. K.; LIM, D. K.; UM, J. A.; LIM, C. J.; HONG, J. Y.; YOON, Y. A.; RYU, Y.; KIM, H. J.; CHO, H. J.; PARK, J. H.; SEO, Y. B.; KIM, K.; LIM, J.; KWON, S. W., LEE, J. Evaluation of four different analytical tools to determine the regional origin of *Gastrodia elata* and *Rehmannia glutinosa* on the basis of metabolomics study. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6294-6308, 2014.
- LEONTI, M.; CASU, L. Traditional medicines and globalization: Current and future perspectives in ethnopharmacology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 1-13, 2013.
- LIÃO, L. M.; CHOZE, R.; CAVALCANTE, P. P. A.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERREIRA, A. G. Perfil químico de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) pela técnica de High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 634-638, 2010.
- LIMA, T. C.; SOUZA, R. J.; SANTOS, A. D.; MORAES, M. H.; BIONDO, N. E.; BARISON, A.; STEINDEL, M.; BIAVATTI, M. W. Evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of phenolic compounds from *Calea uniflora* Less. **Natural Product Research**, v. 30, n. 5, p. 551–557, 2016.

- LONGOBARDI, F., INNAMORATO, V.; DI GIOIA, A.; VENTRELLA, A.; LIPPOLIS, V.; LOGRIECO, A. F.; CATUCCI, L.; AGOSTIANO, A. Geographical origin discrimination of lentils (*Lens culinaris* Medik.) using ¹H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses. **Food Chemistry**, v. 237, p. 743-748, 2017.
- LONNI, A. A. S. G.; SCARMINIO, I. S.; SILVA, L. M. C. S.; FERREIRA, D. T. Differentiation of species of the *Baccharis* Genus by HPLC and Chemometric Methods. **Analytical Sciences**, v.19, p. 1013-1017, 2003.
- LONNI, A. A. S. G.; SCARMINIO, I. S.; SILVA, L. M. C. S.; FERREIRA, D. T. Numerical Taxonomy Characterization of *Baccharis* Genus by Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. **Analytical Sciences**, v.21, p. 235-239, 2005.
- LORENZO, D.; PAZ, D.; DAVIES, P.; VILLAMIL, J.; VILA, R.; CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E. Application of Multidimensional Gas Chromatography to the Enantioselective Characterisation of the Essential Oil of *Eupatorium buniifolium* Hooker et Arnott. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 39-44, 2005.
- LOURENÇO, A. V. F. **Discriminação de espécies de *Baccharis* L. da seção *Caulopterae* por espectroscopia de infravermelho aliada à quimiometria**. 99f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.
- LUND, J. A.; BROWN, P. N.; SHIPLEY, P. R. Differentiation of *Crataegus* spp. guided by nuclear magnetic resonance spectrometry with chemometric analyses. **Phytochemistry**, v. 141, p. 11-19, 2017.
- LUO, C.; WANG, A.; WANG, X.; LI, J.; LIU, H.; WANG, M.; WANG, L.; LAI, D.; ZHOU, L. A new proline-containing flavonol glycoside from *Caragana leucophloea* Pojark. **Natural Product Research**, v. 29, n. 19, v. 1811-1819, 2015.
- LYNCH, N.; BERRY, D. Differences in perceived risks and benefits of herbal, over-the-counter conventional, and prescribed conventional, medicines, and the implications of this for the safe and effective use of herbal products. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 15, p. 84–91, 2007.
- MA, H.; WANG, J.; CHEN, Y.; CHENG, J.; LAI, Z. Rapid authentication of starch adulterations in ultrafine granular powder of Shanyao by near-infrared spectroscopy coupled with chemometric methods. **Food Chemistry**, v. 215, p. 108-115, 2017.
- MARASCHIN, M.; ZEGGIO, A. S.-; OLIVEIRA, S. K.; KUHNEN, S.; TOMAZZOLI, M. M.; RAGUZZONI, J. C.; ZERI, A. C. M.; CARREIRA, R.; CORREIA, S.;

- COSTA, C.; ROCHA. Metabolic Profiling and Classification of Propolis Samples from Southern Brazil: An NMR-Based Platform Coupled with Machine Learning. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 13-23, 2016.
- MARSEGLIA, A.; ACQUOTTI, D.; CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R.; PALLA, G.; CALIGIANI, A. HR MAS ^1H NMR and chemometrics as useful tool to assess the geographical origin of cocoa beans – Comparison with HR ^1H NMR. **Food Research International**, v. 85, p. 273–281, 2016.
- MAZZARI, A. L. D. A.; PRIETO, J. M. Herbal medicines in Brazil: pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p.1-12, 2014.
- MAZZEI, P.; PICCOLO, A. HRMAS NMR spectroscopy applications in agriculture. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 11, p. 01-13, 2017.
- MCKENZIE, J. S.; DONARSKI, J. A.; WILSON, J. C.; CHARLTON, A. J. Analysis of Complex Mixtures Using High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Chemometrics. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 59, p. 336–359, 2011.
- MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) D.C. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.19, n.3, p.211-215, 2000.
- MIAO, J.; LI, X.; ZHAO, C.; GAO, X.; WANG, Y.; GAO, W. Active compounds, antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory activity of different varieties of *Chaenomeles* fruits. **Food Chemistry**, v. 248, p. 248-339, 2018.
- MINTEGUIAGA, M.; DELLACASSA, E.; IRAMAIN, M. A.; CATALÁN, C. A. N.; BRANDÁN, S. A. A structural and spectroscopic study on carquejol, a relevant constituent of the medicinal plant *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae). **Journal of Molecular Structure**, v. 1150, p. 08-20, 2017.
- MINTEGUIAGA, M.; MERCADO, M. I.; PONESSA, G. I.; CATALÁN, C. A. N.; DELLACASSA, E.; Morphoanatomy and essential oil analysis of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) from Uruguay. **Industrial Crops & Products**, v. 112, p. 488-498, 2018.
- MINTEGUIAGA, M.; UMPIÉRREZ, N.; FARIÑA, L.; FALCÃO, M. A.; XAVIER, V. B.; CASSEL, E.; DELLACASSA, E. Impact of gas chromatography and mass spectrometry combined with gas chromatography and olfactometry for the sex

- differentiation of *Baccharis articulata* by the analysis of volatile compounds. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 17, p. 3038-3046, 2015.
- MNCWANGI, N. P.; VILJOEN, A. M.; ZHAO, J.; VERMAAK, I.; CHEN, W.; KHAN I. What the devil is in your phytomedicine? Exploring species substitution in *HarPágophytum* through chemometric modeling of ¹H NMR and UHPLC-MS datasets. **Phytochemistry**, v. 106, p. 104–115, 2014.
- MONAKHOVA, Y. B.; HOLZGRABE, U.; DIEHL, B. W. K. Current role and future perspectives of multivariate (chemometric) methods in NMR spectroscopic analysis of pharmaceutical products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 147, p. 580-589, 2018.
- MOREIRA, C. P. S.; OLIVEIRA, D. M.; SANTOS, C. N.; ZANI, C. L.; ALVES, T. M. A. Platypodiol a novel clerodane diterpene from *Baccharis platypoda*. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 4898-4900, 2014.
- MOREIRA, F. DE P. M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A. B. P.; CARO, I. M. B.; PIZZOLATI, M. G.; MONACHE, F. D. Flavonoides e Triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* - Bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 309–311, 2003.
- MOUTON, J.; VAN DER KOOY, F. Identification of cis- and trans-melilotoside within an *Artemisia annua* Tea Infusion. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n.1, p. 52-63, 2014.
- MULTARI, S.; PIHLAVA, J.-M.; CHUASAM, P. O.-; HIETANIEMI, V.; YANG, B.; SUOMELA, J.-P. Identification and Quantification of Avenanthramides and Free and Bound Phenolic Acids in Eight Cultivars of Husked Oat (*Avena sativa* L) from Finland. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 66, n. 11, p. 2900–2908, 2018.
- NAKASUKI, T.; KOMAI, K. Antimutagens in the Brazilian folk medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2560-2564, 1998.
- NGUYEN, H. T.; LEE, D.-K.; CHOI, Y.-G.; MIM, J.-E.; YOON, S.-J.; YU, Y. H.; LIM, J.; LEE, J.; KWON, S. W.; PARK, J. H. A ¹H NMR-based Metabolomics Approach to Evaluate the Geographical Authenticity of Herbal Medicine and Its Application in Building a Model Effectively Assessing the Mixing Proportion of Intentional Admixtures: A Case Study of *Panax Ginseng*: Metabolomics for the

- Authenticity of Herbal Medicine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 124, p. 120-128, 2016.
- NOGUEIRA, N. P. A.; REIS, P. A.; LARANJA, G. A. T.; PINTO, A. C.; AIUB, C. A. F.; FELZENSZWALB, I.; PAES, M. C.; BASTOS, F. F.; BASTOS, V. L. F. C.; SABINO, K. C. C.; COELHO, M. G. P. In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 513-522, 2011.
- OLENNIKOV, D. N.; KASHCHENKO, N. I. Componential Profile and Amylase Inhibiting Activity of Phenolic Compounds from *Calendula officinalis* L. Leaves. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–9, 2014.
- OLIVEIRA, A. K. M.; OLIVEIRA, N. A.; RESENDE, U. M.; MARTINS, P. F. R. B.; Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 71, n. 1, p. 283-289, 2011.
- OLIVEIRA, G. L.; OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 2, p. 571-577, 2010.
- OLIVEIRA, S. Q. **Composição química e análise biológica de espécies do gênero *Baccharis***. 127F. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul– Porto Alegre, 2008.
- OLIVEIRA, S. Q.; DAL PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, p. 365-368, 2004.
- OLIVEIRA, S. Q.; DAL-PIZZOL, F.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; MOREIRA, J. C. M.; SCHENKEL, E. P. Antioxidant Activity of *Baccharis articulata* Extracts: Isolation of a New Compound with Antioxidant Activity. **Free Radical Research**, v. 37, n. 5, p. 555-559, 2003.
- OLIVEIRA, S. Q.; KAPPEL, V. D.; PIRES, V. S.; LENCINA, C. L.; SONNET, P.; MOREIRA, J. C.; GOSMANN, G. Antioxidant properties of phenolic compounds from *Baccharis articulata* and *B. usterii*. **Natural Product Communications**, v. 9, n.7, p. 941-942, 2014.

- OLIVEIRA, S. Q.; TRENTIN, V. H.; KAPPEL, V. D.; BARELLI, C.; GOSMANN, G.; REGINATTO, F. H. Screening of antibacterial activity of South Brazilian *Baccharis* species. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p. 434-438, 2005.
- PÁDUA, B. C.; SILVA, L. D.; JÚNIOR, J. V. R.; HUMBERTO, J. L.; CHAVES, M. M.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; COSTA, D. C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 381–386, 2010.
- PAN, Z.; FAN, G.; YANG, R.-P.; LUO, W.-Z.; ZHOU, X.-D.; ZHANG, Y. Discriminating *Lamiophlomis rotata* According to Geographical Origin by ¹H-NMR Spectroscopy and Multivariate Analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 26, p. 247-252, 2015.
- PEREIRA, C. B.; KANUNFRE, C. C.; FARAGO, P. V.; BORSATO, D. M.; BUDEL, J. M.; MAIA, B. H. L. N. S.; CAMPESATTO, E. A.; SARTORATTO, A.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Cytotoxic mechanism of *Baccharis milleflora* (Less.) DC. essential oil. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 214-221, 2017.
- PEREZ, C.; ANESINI, C. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Argentinean medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 65, p. 169–172, 1994.
- PETRAKIS, E. A.; CAGLIANI, L. R.; POLISSIOU, M. G.; CONSONNI, R. Evaluation of saffron (*Crocus sativus* L.) adulteration with plant adulterants by ¹H NMR metabolite fingerprinting. **Food Chemistry**, v. 173, p. 890-896, 2015.
- PETRAKIS, E. A.; CAGLIANI, L. R.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M. G.; CONSONNI, R. Sudan dyes in adulterated saffron (*Crocus sativus* L.): identification and quantification by ¹H NMR. **Food Chemistry**, v. 217, p. 418-424, 2017.
- PIOTTO, M.; ELBAYED, K.; WIERUSZESKI, J.; LIPPENS, G. Practical aspects of shimless a high resolution magic angle spinning probe. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 173, n. 1, p. 84-89, 2005.
- PONTES, J. G. M.; BRASIL, A. J. M.; CRUZ, G. F. C.; SOUZA, R. N.; TASIC, L. NMR-based metabolomics strategies: plants, animals and humans. **Analytical Methods**, v. 9, p. 1078-1095, 2017.
- PRETO, M. S. M.; TAVARES, M. I. B.; SEBASTIÃO, P. J. O.; AREREDO, R. B. V. Determination of herb authenticity by low-field NMR. **Food Chemistry**, v. 136, p. 1272-1276, 2013.

- PUEBLA, P.; ARANGUREN, N.; RINCÓN, J.; ROJAS, M.; GUERRERO, M.; FELICIANO, A. S. Polar compounds isolated from the leaves of *Calea prunifolia* H.B.K. and their anti-adrenergic related vasodilator activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 12, p. 9153–9160, 2011.
- PULIDO, K. D. P.; DULCEY, A. J. C.; MARTINEZ, J. H. I. New caffeic acid derivative from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray butanolic extract and its antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1079-1085, 2017.
- QU, L.; CHEN, J.; ZHANG, G.; SUN, S.; ZHENG, J. Chemical profiling and adulteration screening of Aquilariae Lignum Resinatum by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and two-dimensional correlation infrared (2D-IR) spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 174, p. 177–182, 2017.
- QUEIROGA, C. L.; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A. J. Composition of the Essential Oil of Vassoura. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 1, p. 105-109, 1990.
- QUISPE-CONDORI, S.; FOGGIO, M. A.; ROSA, P. T. V.; MEIRELES, M. A. A. Obtaining β -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, p. 27-32, 2008.
- RACLARIU, A. C.; HEINRICH, M.; ICHIM, M. C.; DE BOER, H. Benefits and Limitations of DNA Barcoding and Metabarcoding in Herbal Product Authentication. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 2, p. 123-128, 2017.
- RACLARIU, A. C.; MOCAN, A.; POPA, M. O.; VLASE, L.; ICHIM, M. C.; CRISAN, G.; BRYSTING, A. K.; DE BOER, H. *Veronica officinalis* product authentication using DNA metabarcoding and HPLC-MS reveals widespread adulteration with *Veronica chamaedrys*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. 378, p. 01-13, 2017.
- RAHALISON, L.; BENATHAN, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; GUPTA, M. P.; SOLIS, P. N.; FUZZATI, N.; HOSTETTMANN, K. Antifungal principles of *Baccharis pedunculata*. **Planta Medica**, v. 61, p. 360-362, 1995.
- RIBEIRO, J. S.; SALVA, T. J. FERREIRA M. M. C. Chemometric studies for quality control of processed Brazilian coffees using drifts. **Journal of Food Quality**, v. 33, p. 212-227, 2010.

- RIBEIRO, M. V. M.; BORALLE, N.; PEZZA, H. R.; PEZZA, L.; TOCI, A. T. Authenticity of roasted coffee using ^1H NMR spectroscopy. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 57, p. 24-30, 2017.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PÁGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v.4, p.304-309, 1997.
- RISSI, D. R.; RECH, R. R.; FIGHERA, R. A.; CAGNINI, D. Q.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Intoxicação espontânea por *Baccharis coridifolia* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 111-114, 2005.
- RODRIGUES, M. T.; ALVES, T. L. S.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 155-163, 2012.
- RODRIGUEZ, M. V.; SORTINO, M. A.; IVANCOVICH, J. J.; PELLEGRINO, J. M.; FAVIER, L. S.; RAIMONDI, M. P.; GATTUSO, M. A.; ZACCHINO, S. A. Detection of synergistic combinations of *Baccharis* extracts with Terbinafine against *Trichophyton rubrum* with high throughput screening synergy assay (HTSS) followed by 3D graphs. Behavior of some of their components. **Phytomedicine**, v. 20, p. 1230-1239, 2013.
- ROSLUND, M. U.; TÄHTINEN, P.; NIEMITZ, M.; SJÖHOLM, R. Complete assignments of the ^1H and ^{13}C chemical shifts and $J_{\text{H,H}}$ coupling constants in NMR spectra of d-glucopyranose and all d-glucopyranosyl-d-glucopyranosides. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 1, p. 101–112, 2008.
- SA, F. A. S.; DE PAULA, J. A. M.; DOS SANTOS, P. A.; OLIVEIRA, L. A. R.; OLIVEIRA, G. A. R.; LIÃO, L. M.; DE PAULA, J. R.; SILVA, M. R. R. Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Myrcia tomentosa* (Aubl.) DC. Leaves. **Molecules**, v. 22, p. 1100-1110, 2017.
- SAAD, J. R.; DAVICINO, J. G.; GIORDANO, O. S. A diterpene and flavonoids of *Baccharis flabellata*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1884-1887, 1988.
- SABIR, S. M.; ATHAYDE, M. L.; BOLIGON, A. A.; ROCHA, J. B. T. Antioxidant activities and phenolic profile of *Baccharis trimera*, a commonly used medicinal plant from Brazil. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 318-323, 2017.
- SADATI, N.; SIEMS, K. J.-; SIEMS, K.; ARDEKANI, M. R. S.; HADJIAKHOONDI, A.; AKBARZADEH, T.; OSTAD, S. N.; KHANAVI, M. Major Constituents and Cytotoxic Effects of *Ajuga chamaecistus* ssp. *Tomentella*. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 67, p. 275-281, 2012.

- SAHAN, Y.; GURBUZ, O.; GULDAS, M.; DEGIRMENCIOGLU, N.; BEGENIRBAS, A. Phenolics, antioxidant capacity and bioaccessibility of chicory varieties (*Cichorium* spp.) grown in Turkey. **Food Chemistry**, v. 217, p. 483–489, 2017.
- SAITO, E.; FURLAN, C.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. A cromatografia líquida a vácuo na análise qualitativa e quantitativa de flavonoides em *Achyrocline satureioides*. **Revista Fitos**, v.1, n1, p. 57-59, 2005.
- SAMANTA, A.; DAS, G.; DAS, S. K. Roles of flavonoids in plants. **International Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 6, n.1, p. 12-35, 2011.
- SANTOS, A. D. C.; FONSECA, F. A.; DUTRA, L. M.; SANTOS, M. F. C.; MENEZES, L. R. A.; CAMPOS, F. R.; NAGATA, N.; AYUB, R.; BARISON, A. ¹H HR-MAS NMR-based metabolomics study of different persimmon cultivars (*Diospyros kaki*) during fruit development. **Food Chemistry**, v. 239, p. 511-519, 2018.
- SANTOS, A. D. C.; FONSECA, F. A.; LIÃO, L. M.; ALCANTARA, G. B.; BARISON, A. High-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance in foodstuff analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 73, p. 10-18, 2015.
- SANTOS, M. D. DOS; GOBBO-NETO, L.; ALBARELLA, L.; SOUZA, G. E. P. DE; LOPES, N. P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 545–549, 2005.
- SANTOS, M. S.; PEREIRA-FILHO, E. R.; FERREIRA, A. G.; BOFFO, E. F.; FIGUEIRA, G. M. Authenticity study of *Phyllanthus* species by NMR and FT-IR techniques coupled with chemometric methods. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2210-2217, 2012.
- SARTOR, T.; XAVIER, V. B.; FALCÃO, M. A.; MONDIN, C. A.; SANTOS, M. A.; CASSEL, E.; ASTARITA, L. V.; SANTAREM, E. R. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 355-359, 2013.
- SATAKE, T.; KAMIYA, K.; AN, Y.; OISHI, N. T. T.; YAMAMOTO, J. The anti-thrombotic active constituents from *Centella asiatica*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 5, p. 935-940, 2007.
- SCHNEIDER, A. A. **Estudo Taxonômico de *Baccharis* L. Sect. *Caulopterae* DC. (Asteraceae) no Brasil**. 203 f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

- SCHNEIDER, A. A.; BOLDRINI, I. I. Microsculpture of cypselae surface of *Baccharis* sect. *Caulopterae* (Asteraceae) from Brazil. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, v. 68, n. 1, p. 107-116, 2011.
- SERESHTI, H.; POURSORKH, Z.; ALIAKBARZADEH, G.; ZARRE, S. Quality control of saffron and evaluation of potential adulteration by means of thin layer chromatography-image analysis and chemometrics methods. **Food Control**, v. 90, p. 48-57, 2018.
- SHARP, H.; BARTHOLOMEW, B.; BRIGHT, C.; LATIF, Z.; SARKER, S. D.; NASH, R. J. 6-Oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v 29, p. 105-107, 2001.
- SHI, T.; ZHU, M.; CHEN, Y.; YAN, X.; CHEN, Q.; WU, X.; LIN, J.; XIE, M. ¹H NMR combined with chemometrics for the rapid detection of adulteration in camellia oils. **Food Chemistry**, v. 242, p. 308-315, 2018.
- SIDHU, O. P.; ANNARAO, S.; PATHRE, U.; SNEHI, S. K.; RAJ, S. K.; ROY, R.; TULI, R.; KHETRAPAL, C. L. Metabolic and histopathological alterations of *Jatropha* mosaic begomovirus-infected *Jatropha curcas* L. by HR-MAS NMR spectroscopy and magnetic resonance imaging. **Planta**, v. 232, n. 1, p. 85-93, 2010.
- 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.
- SILVA FILHO, A. A.; RESENDE, D. O.; FUKUI, M. J.; SANTOS, F. F.; PAULETTI, P. M.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; GREGÓRIO, L. E.; BASTOS, J. K.; NANAYAKKARA, N. P. D. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, p. 478-482, 2009.
- SILVA, L. M. A.; FILHO, E. G. A.; CHOZE, R.; LIÃO, L.; ALCANTARA, G. B. ¹H HRMAS NMR spectroscopy and chemometric for evaluation of metabolic changes in *Citrus sinensis* caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.23, n. 6, p. 1054-1061, 2012.

- SIMIRGIOTIS, M. J.; GARCIA, M.; SOSA, M. E.; GIORDANO, O. S.; TONN, C. E. An *ent*-kaurene derivative from aerial parts of *Baccharis rufescens*. **Anales des la Asociacion Quimica Argentina**, v. 91, n. 4, p. 109-116, 2003.
- SIMÕES-PIRES, C. A.; DEBENEDETTI, S.; SPEGAZZINI, S.; MENTZ, L. A.; MATZENBACHER, N. I.; LIMBERGER, R. P.; HENRIQUES, A. T. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. **Plant Systematics and Evolution**, v. 253, p. 23-32, 2005a.
- SIMÕES-PIRES, C. A.; QUEIROZ, E. F.; HENRIQUES, A. T.; HOSTETTMANN, K. Isolation and On-line Identification of Antioxidant Compounds from three *Baccharis* Species by HPLC-UV-MS/MS with Post-column derivatisation. **Phytochemical Analyses**, v. 16, p. 307-314, 2005.
- SMOLINSKA, A.; BLANCHET, L.; BUYDENS, L. M. C., WIJMENGA, S. S. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 82-97, 2012.
- SOBRINHO, A. C. N.; DE SOUZA, E. B.; ROCHA, M. F. G.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; BANDEIRA, P. N.; DOS SANTOS, H. S.; CAVALCANTE, C. S. P.; OLIVEIRA, S. S.; ARAGÃO, P. R.; MORAIS, S. M.; FONTENELLE, R. O. S. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 108-115, 2016.
- SOICKE, H.; LENG-PESCHLOW, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, n. 1, p. 37-39, 1987.
- SOUSA, S. A. A.; MAGALHÃES, A.; FERREIRA, M. M. C. Optimized bucketing for NMR spectra: Three case studies. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 122, p. 93-102, 2013.
- SOUZA, L. F.; VIEIRA, T. S.; ALCANTARA, G. B.; LIÃO, L. M. HR-MAS NMR for Rapid Identification of Illicit Substances in Tablets and Blotter Papers Seized by Police Department. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 11, p. 2141-2148, 2016.

- STOJAKOWSKA, A.; MALARZ, J.; KISS, A. K. Hydroxycinnamates from elecampane (*Inula helenium* L.) callus culture. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, n. 2, p. 41, 2016.
- SUN, X.; YAO, C.; XIONG, D.; ZHANG, B.; SUN, J.; LIAO, S.; WANG, A.; LAN, Y.; LI, Y. Simultaneous Quantification of Seven Caffeoylquinic Acids in Ecotypes of *Blumea balsamifera* at Various Life Stages by High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Letters**, v. 51, p. 1642-1653, 2018.
- SUTTISRI, R.; KINGHORN, A. D.; WRIGHT, A. D.; STICHER, O. Neo-clerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 2, p. 443-446, 1994.
- TAGUCHI, L.; PINHEIRO, N. M.; OLIVO, C. R.; CHOQUETA-TOLEDO, A.; GRECCO, S. S.; LOPES, F. D. T. Q. S.; CAPERUTO, L. C.; MARTINS, M. A.; TIBERIO, I. F. L. C.; CÂMARA, N. O.; LAGO, J. H. G.; PRADO, C. M. A flavanone from *Baccharis retusa* (Asteraceae) prevents elastase-induced emphysema in mice by regulating NF- κ B, oxidative stress and metalloproteinases. **Respiratory Research**, v. 16, n. 79, p. 01-15, 2015.
- TANAKA, T.; KAWAGUCHI, N.; ZAIMA, N.; MORIYAMA, T.; FUKUTA, Y.; SHIRASAKA, N. Antiosteoporotic activity of a syringic acid diet in ovariectomized mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, n.4, p. 632-641, 2017.
- TIAM, E. R.; BIKOBO, D. S. N.; ZINTCHEM, A. A. A.; NYEMECK, N. M.; MONI, E. D. F. N.; DIBOUÉ, P. H. B.; NYEGUE, M. A.; ATCHADÉ, A. T.; PGNYEMB, D. E.; BOCHET, C. G.; KOERT, U. Secondary metabolites from *Triclisia gillettii* (De Wild) Staner (Menispermaceae) with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Natural Product Research**, v. 16, p. 1-9, 2017.
- TISCHER, B.; VENDRUSCOLO, R. G.; WAGNER, R.; MENEZES, C. R.; BARIN, C. S.; GIACOMELLI, S. R.; BUDEL, J. M.; BARIN, J. S. Effect of grinding method on the analysis of essential oil from *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. **Chemical Papers**, v. 71, n. 4, p. 753-761, 2017.
- TOFIGHI, Z.; MOLAZEM, M.; DOOSTDAR, B.; et al. Antimicrobial Activities of Three Medicinal Plants and Investigation of Flavonoids of *Tripleurospermum disciforme*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 1, p. 225–31, 2015.

- 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.
- TROJAN-RODRIGUES, M.; ALVES, T. L. S.; SOARES, G. L. G.; RITTER, M. R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 155-163, 2012.
- TROMBIN-SOUZA, M.; TROMBIN-SOUZA, M.; AMARAL, W.; PASCOALINO, J. A. L.; OLIVEIRA, R. A.; BIZZO, H. R.; DESCHAMPS, C. Chemical composition of the essential oils of *Baccharis* species from southern Brazil: a comparative study using multivariate statistical analysis. **Journal of Essential Oil Research**, p. 01-07, 2017.
- UENO, A. K.; BARCELLOS, A. F.; COSTA-SILVA, T. A.; MESQUITA, J. T.; FERREIRA, D. D.; TEMPONE, A. G.; ROMOFF, P.; ANTAR, G. M.; LAGO, J. H. G. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 125, p. 55-58, 2018.
- VAF AEI, A.; MOHAMAD, J. B.; KARIMI, E. HPLC profiling of phenolics and flavonoids of *Adonidia merrillii* fruits and their antioxidant and cytotoxic properties. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2018.
- VAN DER BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; VAN DER WERF, M. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMG Genomics**, v. 7, p. 142-157, 2006.
- VEIGA, R. S.; MENDONÇA, S.; MENDES, P. B.; PAULINO, N.; MIMICA, M. J.; LAGAREIRO NETO, A. A.; LIRA, I. S.; LOPEZ, B. G.-C.; NEGRÃO, V.; MARCUCCI, M. C. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, p. 911-920, 2017.
- VERDI, L. G. BRINGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATE, M. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

- VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ FILHO, R.; PIZZOLATTI, M. G. Kaurene diterpenes and flavonoids from *Baccharis illinita* flowers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 837-840, 2004.
- WANG, G.-K.; WANG, Z.; YU, Y.; ZHANG, N.; ZHOU, Z.-Y.; WANG, G.; LIU, J.-S. A new sesquiterpene from *Kalimeris integrifolia*. **Natural Product Research**, v. 32, p. 1004-1009, 2017.
- WANG, J.; LOU, J.; LUO, C.; ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, L. Phenolic compounds from *Halimodendron halodendron* (Pall.) Voss and their antimicrobial and antioxidant activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 11349-11364, 2012.
- WANG, L.; WANG, X.; KONG, L. Automatic authentication and distinction of *Epimedium koreanum* and *Epimedium wushanense* with HPLC fingerprint analysis assisted by pattern recognition techniques. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 40, p. 138-145, 2012.
- WANTEN, G. J. A.; CALDER, P. C. Immune modulation by parenteral lipid emulsions. **American Journal of Nutrition**, v. 85, n. 5, p. 1171-1184, 2007.
- WEIMANN, C.; GORANSSON, U.; PONGPRAYOON-CLAESON, U.; CLAESON, P.; BOHLIN, L.; RIMPLER, H.; HEINRICH, M. Spasmolytic effects of *Baccharis conferta* and some of its constituents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 54, p. 99-104, 2002.
- WEYBRIGHT, P.; MILLIS, K.; CAMPBELL, N.; CORY, D. G.; SINGER, S. Gradient, high-resolution magic angle spinning ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy of intact cell. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 39, n. 3, p. 337-345, 1998.
- WOHLMEISTER, D.; VIANNA, D. R. B.; HELFER, V. E.; CALIL, L. N.; BUFFON, A.; FUENTEFRIA, A. M.; CORBELLINI, V. A.; PILGER, D. A. Differentiation of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei* by FT-IR and chemometrics by CHROMagar™ Candida. **Journal of Microbiological Methods**, v. 141, p. 121-125, 2017.
- WOLD, S. Pattern recognition by means of disjoint principal component models. **Pattern Recognition**, v. 8, p. 127-139, 1976.
- WOLD, S.; SJÖSTROM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, p.109-130, 2001.

- WORLEY, B.; POWER, R. MVAPACK: A complete data handling package for NMR metabolomics. **ACS Chemical Biology**, v. 9, p. 1138-1144, 2014.
- WU, Q.; ZHAO, D.; XIANG, J.; ZHANG, M.; ZHANG, C. F.; XU, X. H. Antitussive, expectorant, and anti-inflammatory activities of four caffeoylquinic acids isolated from *Tussilago farfara*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 7, p. 1117–1124, 2016.
- XAVIER, M. V. A.; BRITO, S. S. S.; OLIVEIRA, C. R. F.; MATOS, C. H. C.; PINTO, M. A. D. S. C. Óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. sobre o potencial fisiológico de sementes de feijão caupi. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 14, p. 214-217, 2012.
- XIAO, S.; LU, Z.; XU, L.; Multivariate sensitivity analysis based on the direction of eigen space through principal component analysis. **Reliability Engineering and System Safety**, v. 165, p. 1-10, 2017.
- YAMAMOTO, E. S.; CAMPOS, B. L. S.; LAURENTI, M. D.; LAGO, J. H. G.; GRECCO, S. S.; CORBETT, C. E. P.; PASSERO, L. F. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. **Parasitology Research**, v. 113, p. 333-339, 2014.
- YANG, L.; HAN, H.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; WANG, Z.; XU, L. Bio-guided isolation of antioxidants from the stems of *Dendrobium aurantiacum* var. *denneanum*. **Phytoterapy Research**, v. 21, p. 696-698, 2007.
- YU, Y.; JIANG, Z.; SONG, W.; YANG, Y.; LI, Y.; JIANG, J.; SHI, J. Glucosylated caffeoylquinic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera japonica*. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v.5, n.3, p.210-214, 2015.
- ZALEWSKI, C. A.; PASSERO, L. F.; MELO, A. S. R. B.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; ROMOFF, P.; FÁVERO, O. A.; LAGO, J. H. Evaluation of anti-inflammatory activity of derivatives from aerial parts of *Baccharis uncinella*. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 6, p. 602-607, 2011.
- ZANON, S. M.; CERIATTI, F. S.; ROVERA, M.; SABINI, L. I.; RAMOS, B. A. Search for antiviral activity of certain medicinal plants from Córdoba, Argentina. **Revista Latinoamericana De Microbiologia**, v. 41, p. 59–62, 1999.

- ZHANG, J.; WIDER, B.; SHANG, H.; LI, X.; ERNST, E. Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 20, p. 100–106, 2012
- ZHAO, H.; XU, J.; GHEBREZADIK, H.; HYLANDS, P. J. Metabolomic quality control of commercial Asian ginseng, and cultivated and wild American ginseng using ^1H NMR and multi-step PCA. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 114, p. 113-120, 2015.
- ZHU, X.; ZHANG, H.; LO, R. Phenolic Compounds from the Leaf Extract of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Their Antimicrobial Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7272–7278, 2004.
- ZUCCOLOTTO, T. **Identificação de constituintes químicos de *Baccharis organensis* Baker e avaliação das atividades biológicas dos extratos e frações das partes aéreas de *Baccharis arcatubaensis* Malag. e *Baccharis organensis* Baker (Asteraceae)**. 189f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 2017.