



Universidade Federal de Pelotas  
Instituto de Química e Geociências  
Programa de Pós-Graduação em Química

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Identificação e comparação dos principais constituintes químicos  
da *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (marcela) através dos  
métodos extrativos hidrodestilação, maceração, Soxhlet, banho e  
sonda ultrassônicos.**

Danielle Alves Porto Lucas

Pelotas, 2011



Universidade Federal de Pelotas  
Instituto de Química e Geociências  
Programa de Pós-Graduação em Química

**Identificação e comparação dos principais constituintes químicos  
da *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (marcela) através dos  
métodos extrativos hidrodestilação, maceração, Soxhlet, banho e  
sonda ultrassônicos.**

Danielle Alves Porto Lucas

Dissertação realizada sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Regina Alves Rodrigues, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada “Identificação e comparação dos principais constituintes químicos da *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (marcela) através dos métodos extrativos maceração, Soxhlet, banho e sonda ultrassônicos”, de autoria de Danielle Alves Porto Lucas.

**Comissão Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Regina Alves Rodrigues – Orientadora - DQO/IQG/UFPel

---

Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho – DQO/IQG/UFPel

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luiza Placidina da Luz – IFSul/Campus Pelotas

À minha mãe, pelo seu amor infinito, apoio, compreensão e por me possibilitar que eu chegasse até aqui.

Ao meu grande amor, meu pai, que infelizmente não viu esta etapa ser concluída, agradeço por ter sempre acreditado em mim, por ter me amado tanto e ter me feito uma filha muito feliz.

Ao meu marido Rui Fernando, por todo apoio, compreensão, paciência e por estar ao meu lado em todos os momentos difíceis, te amo.

À minha filha amada por simplesmente existir na minha vida e fazer o meu mundo muito melhor.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar a vida, a força interior que precisei e ter colocado no meu caminho pessoas maravilhosas.

À Prof<sup>a</sup>. Maria Regina, minha orientadora, grande professora, minha mestre e amiga, agradeço pelos ensinamentos, incentivo, apoio e principalmente dedicação para que eu pudesse concluir este trabalho.

À minha mãe, meus irmãos e meu marido por estarem ao meu lado sempre disponíveis e me ajudado nos momentos que mais necessitei.

Aos meus sogros, Marísia e Rui por terem acreditado em mim e me ajudado a seguir em frente.

A todos os meus amigos pelo incentivo, orações e também por terem acreditado em mim.

Ao Sr. Hélio por toda ajuda que gentilmente me concedeu e pela amizade.

À Gabriela pela amizade, por todo seu trabalho e toda ajuda sempre que precisei.

Ao meu colega e amigo Marcelo, obrigada por toda atenção, ajuda, companheirismo e principalmente amizade durante todo este período.

A todos os meus colegas, professores e funcionários da Pós-graduação que de alguma maneira contribuíram para que eu concluísse meu trabalho.

À UFRGS, principalmente à Prof<sup>a</sup>. Elina Caramão que gentilmente concedeu que eu trabalhasse em seu laboratório e me possibilitou aprender um pouco mais.

Aos Prof. Rogério, Romeu e Geonir pelos ensinamentos e amizade.

Ao Marco Aurélio, meu amigo, por toda ajuda sempre que precisei.

Ao Prof. Perin e Prof. Cláudio pela colaboração em me ceder os equipamentos de seus laboratórios.

À Maraísa por ter me auxiliado em todos os momentos que precisei.

Ao Prof. e coordenador Éder pela paciência e ajuda para que eu pudesse concluir esta etapa.

A todos fica meu eterno agradecimento por colaborarem para que eu realizasse esta etapa da minha vida.

## RESUMO

**Título: Identificação e comparação dos principais constituintes químicos da *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (macela) através dos métodos extrativos hidrodestilação, maceração, Soxhlet, banho e sonda ultrassônicos.**

Autor: Danielle Alves Porto Lucas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Regina Alves Rodrigues

A *Achyrocline satureioides* (Lam) DC., mais conhecida como macela, é uma planta da família *Asteraceae*, muito utilizada na medicina popular, principalmente como antioxidante, antiespasmódica e antiinflamatória, sendo amplamente encontrada no Rio Grande do Sul. Este trabalho teve como objetivo comparar os rendimentos dos extratos das inflorescências da macela, obtidos através dos métodos maceração, Soxhlet, banho e sonda ultrassônicos, com os solventes orgânicos hexano e etanol. Também foi realizada uma comparação dos constituintes químicos obtidos por hidrodestilação das inflorescências coletadas nos anos de 2008 e 2009. Nesse estudo foi identificado os principais constituintes químicos dos extratos hexânicos e dos óleos essenciais, usando a cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID) e de espectrometria de massas (GC/MS) e, através do índice de Kovats. Observou-se um rendimento superior ao extrato obtido com etanol em relação ao hexano e constatou-se também uma maior eficiência do método Soxhlet em comparação a todas as outras extrações. Para todos os métodos extrativos o constituinte majoritário foi o *trans*-cariofileno, seguido de  $\alpha$ -copaeno e  $\delta$ -cadineno, apresentando somente variação na concentração da substância em relação ao método. As substâncias químicas extraídas a partir da hidrodestilação no ano de 2008 e 2009 mostraram grande semelhança química, havendo variação apenas na concentração dos constituintes principais, sendo o constituinte majoritário o óxido de cariofileno para as duas amostras.

## ABSTRACT

**Title:** Identification and comparison of main chemical constituents of *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (*marcela*) extract by the methods hydrodistillation, maceration, Soxhlet, ultrasonic bath and probe.

**Author:** Danielle Alves Porto Lucas

**Supervisor:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Regina Alves Rodrigues

The *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., known as “marcela”, is a plant of the *Asteraceae*, widely used in folk medicine, mainly as an antioxidant, antispasmodic and anti-inflammatory, and are widely found in Rio Grande do Sul. The aim of this study was to compare the yields of extracts from inflorescences of “marcela”, obtained by the methods maceration, Soxhlet, ultrasonic bath and probe with the organic solvents hexane and ethanol. It was also performed a comparison of the chemical constituents obtained by hydrodistillation of the flowers collected in the years 2008 and 2009. This study was identified the main chemical constituents the hexane extracts and essential oils using gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID) and mass spectrometry detector (GC/MS) and by the Kovats indices. The extract obtained with ethanol was a higher yield than with hexane and it was also a higher efficiency of the Soxhlet method in comparison to all other extractions. The major constituent was trans-caryophyllene, in all methods, followed by  $\alpha$ -copaene and  $\delta$ -cadinene, with some variation in the compound concentration. The constituents extracted from the hydrodistillation in 2008 and 2009 showed large chemical similarity, varying only the concentration of major constituents, being the major constituent caryophyllene oxide for both samples.

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Exemplar da espécie <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam) DC <sup>11</sup> .....	21
<b>Figura 2.</b>	Detalhes das folhas da <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam) DC <sup>11</sup> .....	22
<b>Figura 3.</b>	Detalhes das flores da <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam) DC <sup>11</sup> .....	23
<b>Figura 4.</b>	Formação dos terpenóides a partir do ácido mevalônico <sup>9</sup> .....	23
<b>Figura 5.</b>	Estrutura de alguns monoterpenos cíclicos e acíclicos.....	25
<b>Figura 6.</b>	Estrutura de alguns sesquiterpenos.....	25
<b>Figura 7.</b>	Estrutura de alguns monoterpenos e sesquiterpenos encontrados no óleo essencial da <i>A. satureioides</i> (Lam.) <sup>16</sup> .....	28
<b>Figura 8.</b>	Estrutura do núcleo fundamental dos flavonóides <sup>9</sup> .....	29
<b>Figura 9.</b>	Esquema simplificado da biossíntese dos flavonóides <sup>9</sup> .....	30
<b>Figura 10.</b>	Estrutura dos flavonóides quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina.....	32
<b>Figura 11.</b>	Aparelho do tipo Clevenger, utilizado na extração com hidrodestilação <sup>38</sup> .....	39
<b>Figura 12.</b>	Desenho esquemático do equipamento usado para maceração <sup>38</sup> .....	40
<b>Figura 13.</b>	Aparelho extrator Soxhlet, utilizado na extração com solventes <sup>39</sup> .....	40
<b>Figura 14.</b>	Desenho esquemático do equipamento de banho ultrassônico <sup>38</sup> .....	41

<b>Figura 15.</b>	Desenho esquemático do equipamento usado da sonda ultrassônica <sup>38</sup> .....	42
<b>Figura 16.</b>	Esquema básico de um cromatógrafo a gás <sup>54</sup> .....	49
<b>Figura 17.</b>	Equação para cálculo do índice de Kovats <sup>54,55</sup> .....	50
<b>Figura 18.</b>	Esquema de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa <sup>54</sup> .....	51
<b>Figura 19.</b>	Equipamento utilizado na hidrodestilação (Clevenger).....	55
<b>Figura 20.</b>	Extração por maceração das inflorescências da marcela.....	55
<b>Figura 21.</b>	Extração com Soxhlet das inflorescências da marcela.....	56
<b>Figura 22.</b>	Extração por ultrassom das inflorescências da marcela.....	57
<b>Figura 23.</b>	Extração com sonda ultrassônica das inflorescências da marcela.....	57
<b>Figura 24.</b>	Detalhe do óleo essencial extraído por Clevenger.....	61
<b>Figura 25.</b>	Comparação entre os métodos maceração, Soxhlet, banho e sonda ultrassônicos, utilizando etanol e hexano.....	65
<b>Figura 26.</b>	Estruturas químicas dos principais constituintes encontrados no óleo essencial da marcela.....	69
<b>Figura 27.</b>	Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB5, do óleo essencial da marcela, coletada em 2008.....	69
<b>Figura 28.</b>	Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB5, do óleo essencial da marcela, coletada em 2009.....	70
<b>Figura 29.</b>	Espectro de massas dos principais constituintes químicos encontrados no óleo essencial da marcela analisados por GC/MS, coluna DB-5.....	70
<b>Figura 30.</b>	Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB-5, do extrato obtido por maceração com hexano da	

	amostra de marcela, coletada em 2008.....	72
<b>Figura 31.</b>	Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB-5, do extrato obtido por Soxhlet com hexano da amostra de marcela, coletada em 2008.....	74
<b>Figura 32.</b>	Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB-5, do extrato obtido por banho ultrassônico com hexano da amostra de marcela, coletada em 2008.....	76
<b>Figura 33.</b>	Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB-5, do extrato obtido por sonda ultrassônica com hexano da amostra de marcela, coletada em 2008.....	77

## ÍNDICE DE TABELAS

		<b>Página</b>
<b>Tabela 1:</b>	Formação dos terpenóides a partir do isopreno <sup>9</sup> .....	24
<b>Tabela 2.</b>	Classificação e propriedades de alguns flavonóides <sup>9</sup> .....	31
<b>Tabela 3.</b>	Rendimento em massa (g) dos extratos obtidos na extração com hexano das inflorescências da marcela coletas em 2008.....	62
<b>Tabela 4.</b>	Rendimento em massa (g) dos extratos obtidos na extração com etanol das inflorescências de marcela, coletas em 2008.....	63
<b>Tabela 5.</b>	Relação das substâncias identificadas no óleo essencial obtidos por hidrodestilação da amostra de marcela, coletada em 2009, submetidos à GC/MS e GC/FID.....	68
<b>Tabela 6.</b>	Relação das substâncias identificadas no extrato da marcela coletado em 2008, obtidos por maceração, submetidos à GC/FID e GC/MS.....	72
<b>Tabela 7.</b>	Relação das substâncias identificadas no extrato obtido por Soxhlet com hexano da amostra de marcela, coletada em 2008.....	73
<b>Tabela 8.</b>	Relação das substâncias identificadas no extrato obtido por banho ultrassônico com hexano para amostra de marcela, coletada em 2008.....	75
<b>Tabela 9.</b>	Relação das substâncias identificadas no extrato obtido por sonda ultrassônica com hexano para a amostra de marcela, coletada em 2008.....	77
<b>Tabela 10.</b>	Relação dos compostos identificados nos extratos da marcela obtido por maceração, Soxhlet, banho e sonda ultrassônicos submetidos à GC/FID e GC/MS.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA	Acetilcoenzima A
ISO	<i>International Standard Organization</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, do inglês <i>Gas chromatography mass spectrometry</i>
GC/FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama, do inglês <i>Gas chromatography flame ionization detector</i>
IK	Índice de Kovats
GC	Cromatografia gasosa, do inglês <i>Gas chromatography</i>
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass spectrometry</i>
TIC	Cromatograma do íon total, do inglês <i>Total ion chromatogram</i>

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tabelas.....	11
Lista de abreviaturas.....	13
Resumo.....	7
Abstract.....	8
Capítulo 1. Introdução.....	17
Capítulo 2. Revisão Bibliográfica.....	20
2.1. A planta: <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam) DC (macela).....	21
2.1.1. Descrição botânica da planta.....	21
2.1.2. Principais constituintes químicos: terpenóides e substâncias fenólicas.....	13
2.1.2.1. Terpenóides.....	13
2.1.2.2. Flavonóides.....	28
2.1.3. Propriedades farmacológicas.....	33
2.1.3.1. Atividade antioxidante.....	33
2.1.3.2. Atividade citoprotetora e citotóxica.....	35
2.1.3.3. Atividade antiproliferativa.....	36
2.1.3.4. Atividade relaxante e antiespasmódica.....	36
2.1.3.5. Uso da planta na perda de peso.....	37
2.1.3.6. Atividade antiinflamatória e antibacteriana.....	37
2.1.3.7. Atividade antiviral.....	38
2.2. Métodos de extração.....	38
2.2.1. Arraste a vapor.....	38
2.2.2. Extração por maceração.....	39
2.2.3. Extração por Soxhlet.....	40
2.2.4. Extração com ultrassom (banho e sonda).....	41
2.2.5. Fatores que influenciam na extração com solventes orgânicos.....	43

2.2.6.	Extrações aplicadas a espécies do gênero <i>Achyrocline</i> .....	43
2.3.	Análise instrumental via cromatografia gasosa.....	48
2.3.1.	Cromatografia GC/MS.....	50
Capítulo 3. Parte Experimental.....		52
3.1.	Amostra.....	53
3.2.	Determinação da umidade.....	53
3.3.	Solventes, reagentes e padrões cromatográficos.....	54
3.4.	Extração com hidrodestilação.....	54
3.5.	Extração com maceração.....	55
3.6.	Extração com Soxhlet.....	56
3.7.	Extração com banho ultrassônico.....	56
3.8.	Extração com sonda ultrassônica.....	57
3.9.	Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID).....	58
3.10.	Cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas (GC/MS).....	58
Capítulo 4. Resultados e discussão.....		44
4.1.	Teor de umidade.....	45
4.2.	Rendimento da hidrodestilação.....	45
4.3.	Rendimento das extrações com solventes orgânicos.....	46
4.3.1.	Extração com hexano.....	46
4.3.2.	Extração com etanol.....	47
4.3.3.	Considerações gerais em relação aos métodos extrativos e aos solventes orgânicos utilizados.....	48
4.4.	Análise cromatográfica.....	51
4.4.1.	Extração por hidrodestilação.....	51
4.4.2.	Extração por maceração com hexano.....	56
4.4.3.	Extração por Soxhlet com hexano.....	57
4.4.4.	Extração por banho ultrassônico com hexano.....	58
4.4.5.	Extração por sonda ultrassônica com hexano.....	60

4.4.6. Consideração geral da análise cromatográfica em relação aos métodos extrativos.....	62
Capítulo 5. Conclusão.....	65
Capítulo 6. Referências.....	67

# **Capítulo 1**

## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

As plantas tem sido muito utilizadas pela população em geral, desde os primórdios da civilização, e hoje em dia tornou-se um complemento ou até mesmo uma alternativa aos medicamentos industrializados para o tratamento de diversas enfermidades.

Durante séculos as espécies vegetais representaram a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte para a produção de novos medicamentos. Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 120 substâncias de origem natural, obtidas a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapia moderna. De fato, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todos os novos fármacos<sup>1</sup>.

O Brasil é um país muito rico em diversidades vegetais e muitas destas espécies são pouco exploradas, merecendo um aprofundamento no estudo de seus constituintes químicos e atividades biológicas. Devido à crescente utilização destas plantas de forma indiscriminada, faz-se necessário um estudo com a finalidade da comprovação científica das propriedades medicinais e relacioná-las com a etnofarmacologia, assim como, promover a identificação e o isolamento dos constituintes químicos responsáveis pela ação farmacológica, devido ao grande interesse das indústrias farmacêuticas em produzir novos medicamentos.

Entre a grande diversidade de plantas brasileiras que são utilizadas pela população, a *Achyrocline satureioides* (Lam), conhecida como marcela, é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, sendo facilmente cultivada e encontrada em Pelotas. Destaca-se pelas suas propriedades medicinais relatadas cientificamente, principalmente sua ação antioxidante e antiespasmódica<sup>1-4</sup>. Existem muitos estudos quanto à atividade biológica e também comparando o uso tradicional das inflorescências e folhas da marcela com a comprovação científica, no entanto, pouco tem sido apresentado na literatura com relação à identificação de substâncias presentes na marcela obtidos, por extração com solventes orgânicos.

Diante disto, evidencia-se a necessidade de um estudo mais detalhado sobre o isolamento e identificação dos constituintes químicos e também uma abordagem sobre os métodos extrativos, visto que, a maior parte dos trabalhos relacionados à comprovação das propriedades terapêuticas e uso da cromatografia refere-se apenas à extração por maceração, infusão ou decocção aquosa ou alcoólica.

Este trabalho tem por objetivo principal realizar a identificação por GC/FID e GC/MS das substâncias químicas extraídas das inflorescências da *Achyrocline satureioides* (Lam) com o solvente orgânico hexano. A relevância deste objetivo está na identificação das substâncias químicas que exercem efeito terapêutico, comparando os extratos obtidos com os citados na bibliografia, bem como sua quantificação para uso na Indústria farmacêutica, além do uso da cromatografia gasosa como ferramenta de identificação, visto que não há trabalhos relacionando e comparando estes dois métodos na extração da marcela.

Um segundo objetivo é verificar a influência da coleta das inflorescências da marcela no ano de 2008 e 2009 nos constituintes químicos extraídos por hidrodestilação, além de realizar uma avaliação qualitativa e quantitativa destas substâncias e comparar com trabalhos descritos por outros autores.

Outro objetivo é realizar um estudo comparativo entre os métodos extrativos maceração, Soxhlet, banho e sonda ultrassônicos, visto que não há nenhuma descrição na bibliografia científica, utilizando uma comparação entre estes métodos para extratos da marcela e também uma avaliação qualitativa destes, analisando o índice de retenção, com obtenção de rendimentos para a constatação da eficiência na extração das substâncias de interesse em comparação às técnicas descritas como infusão e decocção. Esta finalidade possui relevância industrial, pois se faz necessário a obtenção de maiores rendimentos das substâncias que exercem ação terapêutica, através de um método mais adequado, para posterior uso como medicamento.

## ***Capítulo 2***

### ***REVISÃO BIBLIOGRÁFICA***

## 2.1. A planta: *Achyrocline satureioides* (Lam) DC (marcela)

A *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC, mais popularmente conhecida como losna-do-mato, camomila-nacional, alecrim-da-parede, macela-amarela, macela-da-terra, macela-do-sertão, macelinha, chá-de-lagoa, marcela-do-campo, é uma angiosperma, pertencente à família *Asteraceae* e é uma das oito espécies do gênero *Achyrocline*<sup>5,6</sup>.

É uma planta nativa do Brasil, sendo predominantemente no Rio Grande do Sul, mas aparecendo também nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Possui ocorrência em toda América do Sul como Uruguai, Argentina e Paraguai<sup>2,5,7-9</sup>.

A marcela (Figura 1) é encontrada em pastos nativos, pastagens em geral, beira de estrada e terrenos baldios; possui reprodução por sementes, sendo uma planta invasora, muito resistente e pouco exigente em termos de solo e de água<sup>2,5,7-9,10</sup>.



**Figura 1.** Exemplar da espécie *Achyrocline satureioides* (Lam) DC<sup>11</sup>.

### 2.1.1. Descrição botânica da planta

É uma planta herbácea ou subarborescente, monóica, anual, perene, ereto, que atinge até 1,5 m de altura, coberta de pilosidade branca, formando touceiras de

grande extensão. Possui caule membranáceo, cilíndrico, tênue-alvo-tomentoso, ápice copioso ramoso, raminhos ascendentes<sup>12,13</sup>.

As folhas são distantes patentes, sésseis, lineares ou lanceoladas, as maiores apresentam até 12 cm de comprimento e 18 mm de largura, internas, supra-tênuas, embaixo apresso-alvo-tomentosas, em cima tênues (Figura 2). Os capítulos são numerosos com dois tipos de flores, reunidos em panícula corimbosa, denso agregados; involúcro cilíndrico, 6,5 mm de comprimento, escamas 10-12, ruivas ou amarelo-ruivas, as internas lanceoladas-agudas, as externas gradativamente menores, oblongas ou agudas; aquênio pequenino, oblóide, glabro, pardo, papiloso; pappus alvo, uniseriado, cerdas com 20 mm, gráceis, ciliadas e com 4,5 mm de comprimento<sup>5,9,12,13</sup>.



**Figura 2.** Detalhes das folhas da *Achyrocline satureioides* (Lam) DC<sup>11</sup>.

O fruto é um aquênio muito pequeno, glabro, pardo e as flores são amarelo-douradas, as centrais hermafroditas, de corola tubulosa, em número de uma a duas e as flores marginais, quatro ou cinco, femininas, de corola filiforme; pappus branco<sup>5</sup>.

A colheita da planta toda deve ser feita quando surgirem as inflorescências (Figura 3), ou seja, antes de estarem completamente maduras, aproveitando assim suas qualidades terapêuticas. Seu florescimento ocorre nos meses de março a maio e nessa época chama muito a atenção por sua coloração amarela-pálida característica<sup>5,13</sup>.

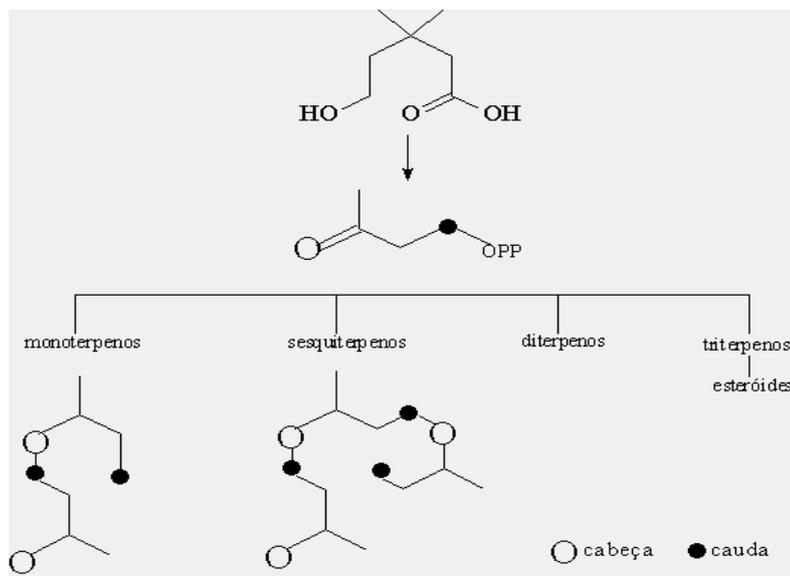


**Figura 3.** Detalhes das flores da *Achyrocline satureioides* (Lam) DC<sup>11</sup>.

## 2.1.2. Principais constituintes químicos: terpenóides e substâncias fenólicas

### 2.1.2.1. Terpenóides

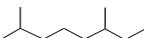
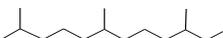
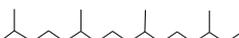
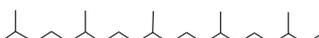
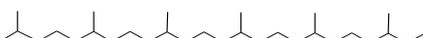
Os terpenóides distribuem-se amplamente na natureza e são encontrados em abundância nas plantas superiores, sendo definidos como produtos naturais, cuja estrutura pode ser dividida em unidades de isopreno. Essas unidades originam-se biogeneticamente do acetato por via do ácido mevalônico e tem cadeias ramificadas, com cinco unidades de carbono que contém duas ligações duplas (Figura 4)<sup>9,14,15</sup>.



**Figura 4.** Formação dos terpenóides a partir do ácido mevalônico<sup>9</sup>.

Seus esqueletos carbonados (Tabela 1) são formados pela condensação de um número variável de unidades pentacarbonadas (unidades isoprênicas), de acordo com a regra do isopreno<sup>9,14</sup>.

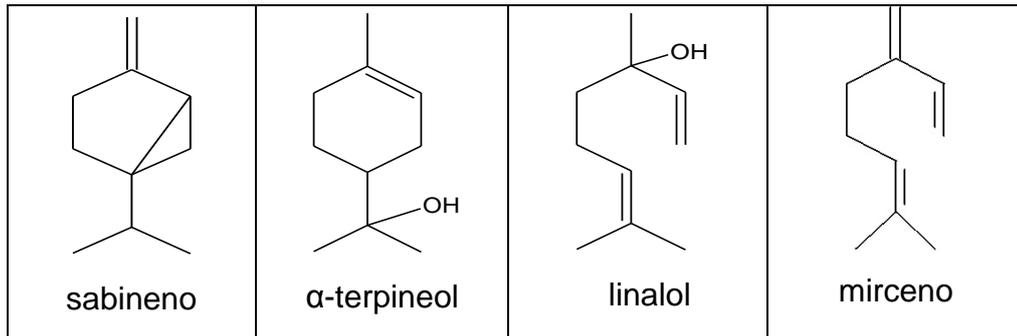
**Tabela 1:** Formação dos terpenóides a partir do isopreno<sup>9</sup>.

Nº Unid	Nº de C	FM	Esqueleto	Nome ou Classe
1	5	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>		Isopreno
2	10	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>		Monoterpenóide
3	15	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>		Sesquiterpenóides
4	20	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>		Diterpenóides
5	25	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub>		Sesterpenóides
6	30	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>		Triterpenóides
8	40	C <sub>40</sub> H <sub>64</sub>		Tetraterpenóides
n	n	C <sub>5n</sub> H <sub>8n</sub>		Polisoprenos

Durante a formação dos terpenóides, as unidades isoprênicas em geral se ligam de cima para baixo, e o número de unidades incorporadas em determinado terpeno hidrocarbônico insaturado serve de base para a classificação dessas substâncias, segundo a Tabela 1<sup>14</sup>.

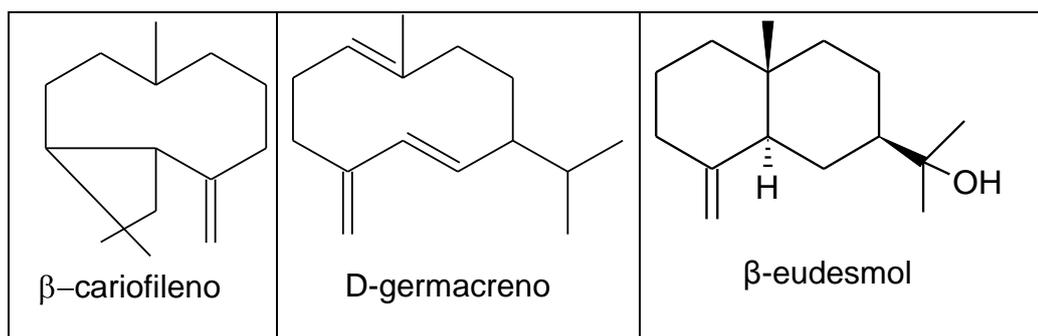
Os monoterpenóides são substâncias de duas unidades (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>) e hoje em dia são conhecidos mais de mil monoterpenos de origem natural, a maioria isolado de plantas superiores.

As características fundamentais são a volatilidade e o odor intensamente pungente, sendo eles os componentes mais comuns da plantas responsáveis por fragrâncias e aromas. Nesta classe estão o  $\alpha$ -pineno, cânfora, mentol, limoneno, geraniol entre outros. A Figura 5 apresenta algumas estruturas de monoterpenos acíclicos e cíclicos<sup>14,15</sup>.



**Figura 5.** Estrutura de alguns monoterpenos cíclicos e acíclicos.

Os sesquiterpenóides ( $C_{15}H_{24}$ ) contêm três unidades de isopreno e tem grande distribuição na natureza e formam a maior classe de terpenos. As lactonas sesquiterpênicas são quimicamente distintas dos outros membros do grupo, devido à presença de um sistema  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona. Muitas delas também contêm carbonilas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas, bem como epóxidos. Esses grupos funcionais representam sítios receptores reativos para nucleófilos biológicos. Em vista disso, documentou-se um amplo espectro de atividades biológicas nessas substâncias, como por exemplo, antimicrobiana e antitumoral<sup>14</sup>. Nessa classe encontram-se cadineno,  $\beta$ -cariofileno, germacreno-D, entre outros<sup>14,15</sup>. A Figura 6 apresenta algumas estruturas de sesquiterpenóides (hidrocarbonetos e oxigenados).



**Figura 6.** Estrutura de alguns sesquiterpenos.

Os diterpenóides ( $C_{20}H_{32}$ ) tem quatro unidades de isopreno e compreendem um grande grupo de substâncias não voláteis. Conhecem-se alguns acíclicos, mas a

grande maioria é de substâncias carbocíclicas que contém até 5 anéis. Há substâncias em diferentes estados de oxidação, que vão desde os hidrocarbonetos até substâncias muito oxigenadas<sup>14,15</sup>.

Os triterpenóides ( $C_{30}H_{48}$ ) são compostos por seis unidades de isopreno<sup>14,15</sup>. Foram isolados mais de quatro triterpenóides naturais e identificados mais de quarenta tipos de esqueletos. A maioria é constituída por alcoóis que pode combinar-se com açúcares para formar glicosídeos. Os triterpenóides livres muitas vezes são componentes de resinas ou do látex<sup>14,15</sup>.

Os terpenóides também podem ser classificados em acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos, etc., e podem ser não só oligômeros de isopreno, mas também, isômeros saturados ou parcialmente saturados, bem como derivados oxigenados que podem produzir-se naturalmente, conforme indica a presença de alcoóis, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres fenólicos, ésteres e óxidos<sup>3,14</sup>.

O número de diferentes terpenóides isolados de fontes naturais é de aproximadamente vinte mil, muito superiores ao de qualquer outro grupo de produtos naturais. Os terpenóides vegetais tem papel importante, pois desempenham funções como fitoalexinas, insetífugos, repelentes de insetos, agentes de atração polínica, agentes de defesa contra herbívoros, feromônios, aleloquímicos, hormônios vegetais. As moléculas de terpenóides estão implicadas em quase todas as interações possíveis entre plantas e animais e entre plantas e microrganismos<sup>14</sup>.

Os óleos voláteis são constituídos por substâncias terpênicos variados, sendo mais frequentes os monoterpenóides (cerca de 90%) e os sesquiterpenóides. Outros terpenos, como os diterpenóides, são encontrados apenas em substâncias extraídos com solventes orgânicos<sup>9,14</sup>.

O número de substâncias descritas em óleos voláteis é estimado um número superior a 150 monoterpenóides e 1000 sesquiterpenóides<sup>9</sup>. Além dos terpenóides, os óleos são constituídos por alcoóis simples, aldeídos, cetonas, fenóis, éteres, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até substâncias com enxofre. Na mistura, tais substâncias apresentam-se em diferentes concentrações; normalmente um deles é o substância majoritário, existindo outros em menores teores e baixíssimas quantidades (traços)<sup>3</sup>.

Pela utilização crescente nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, o cultivo de espécies aromáticas e a obtenção de óleos voláteis constituem importantes atividades econômicas<sup>9</sup>.

Os óleos essenciais são definidos pela ISO (*International Standard Organization*) como produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também podem ser chamadas de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como por exemplo, a de serem geralmente líquidas de aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo, daí, a designação de óleo. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo-se, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes. Outra característica importante é o aroma agradável e intenso da maioria dos óleos voláteis, sendo, por isso, também chamado de essências. Eles também são solúveis em solventes orgânicos apolares, como éter, recebendo, por isso, a denominação de óleos etéreos. Em água, os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, que são denominadas hidrolatos<sup>3,9</sup>.

A qualidade da essência é variável de um gênero a outro, de uma a outra espécie, encontrando-se vegetais que possuam essências quimicamente diferentes em várias de suas partes<sup>3</sup>.

Podem ser encontradas em qualquer uma das partes do vegetal, em órgãos especiais, de acordo com a família, especialmente nas pétalas das flores (rosas), nas folhas (eucalipto), nas sementes (baunilha), no caule e tronco (terebentina), nas cascas do caule (canela), na raiz (patichouli), nas cascas dos frutos (laranja)<sup>3,9</sup>.

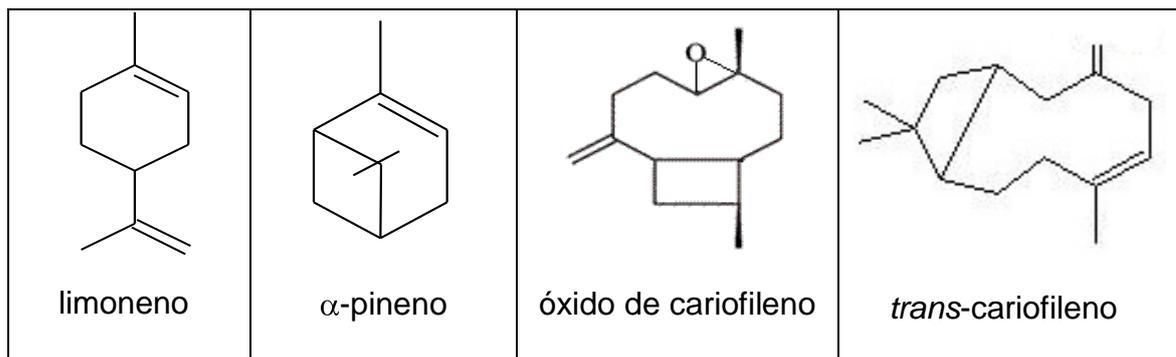
Localizam-se em estruturas secretoras especializadas, obedecendo à seguinte classificação: bolsas secretoras, tubos lactíferos, vasos resiníferos, glândulas, células secretoras<sup>3,9</sup>.

Considera-se a existência de funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de

polinizadores, na proteção contra perda de água e aumento da temperatura, entre outras<sup>9</sup>.

Gillij e colaboradores<sup>16</sup> extraíram o óleo essencial da *A. saturoioides* (Lam) através da técnica de hidrodestilação e encontraram 30 hidrocarbonetos, sendo 7 monoterpenos, 6 monoterpenos oxigenados, 9 sesquiterpenos e 8 sesquiterpenos oxigenados, sendo o componente majoritário o *trans*-cariofileno. Na Figura 7 são apresentadas algumas estruturas dos hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos encontradas pelos autores.

Retta e colaboradores<sup>6</sup> analisaram o óleo essencial das inflorescências de outra espécie do gênero *Achyrocline*, a *A. flaccida* (weinm.) DC. Os pesquisadores encontraram cerca de 30 hidrocarbonetos, dos quais 9 monoterpenos, 4 monoterpenos oxigenados, 14 sesquiterpenos e 7 sesquiterpenos oxigenados, analisados em onze amostras da planta, sendo a substância majoritária o  $\alpha$ -pineno.



**Figura 7.** Estrutura de alguns monoterpenos e sesquiterpenos encontrados no óleo essencial da *A. saturoioides* (Lam)<sup>16</sup>.

### 2.1.2.2. Flavonóides

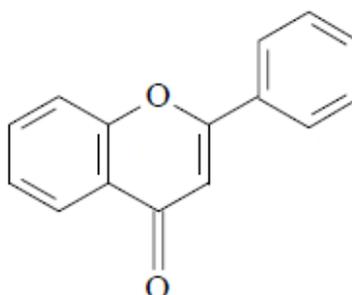
Os flavonóides representam uma das estruturas fenólicas mais importantes e diversificadas, formando um grupo muito extenso pelo número de seus constituintes naturais e distribuição ampla no Reino Vegetal<sup>3,9</sup>. São conhecidos como “pigmentos

das flores”, por participarem da coloração das pétalas, das cascas dos frutos e ocasionalmente em outras regiões da planta, desde as raízes às sementes<sup>3</sup>.

Encontram-se nas folhas, flores, caules, ramos, raízes ou frutos e apresentam diferenças dependendo do local de onde são retirados. A mesma substância ainda pode ocorrer em diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal em que se encontra<sup>9</sup>.

Esta classe de constituintes apresenta diversas funções nas plantas. Dentre elas podem-se citar: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; antioxidantes; controle de ação de hormônios vegetais; agentes alelopáticos; e inibidores de enzimas<sup>9</sup>.

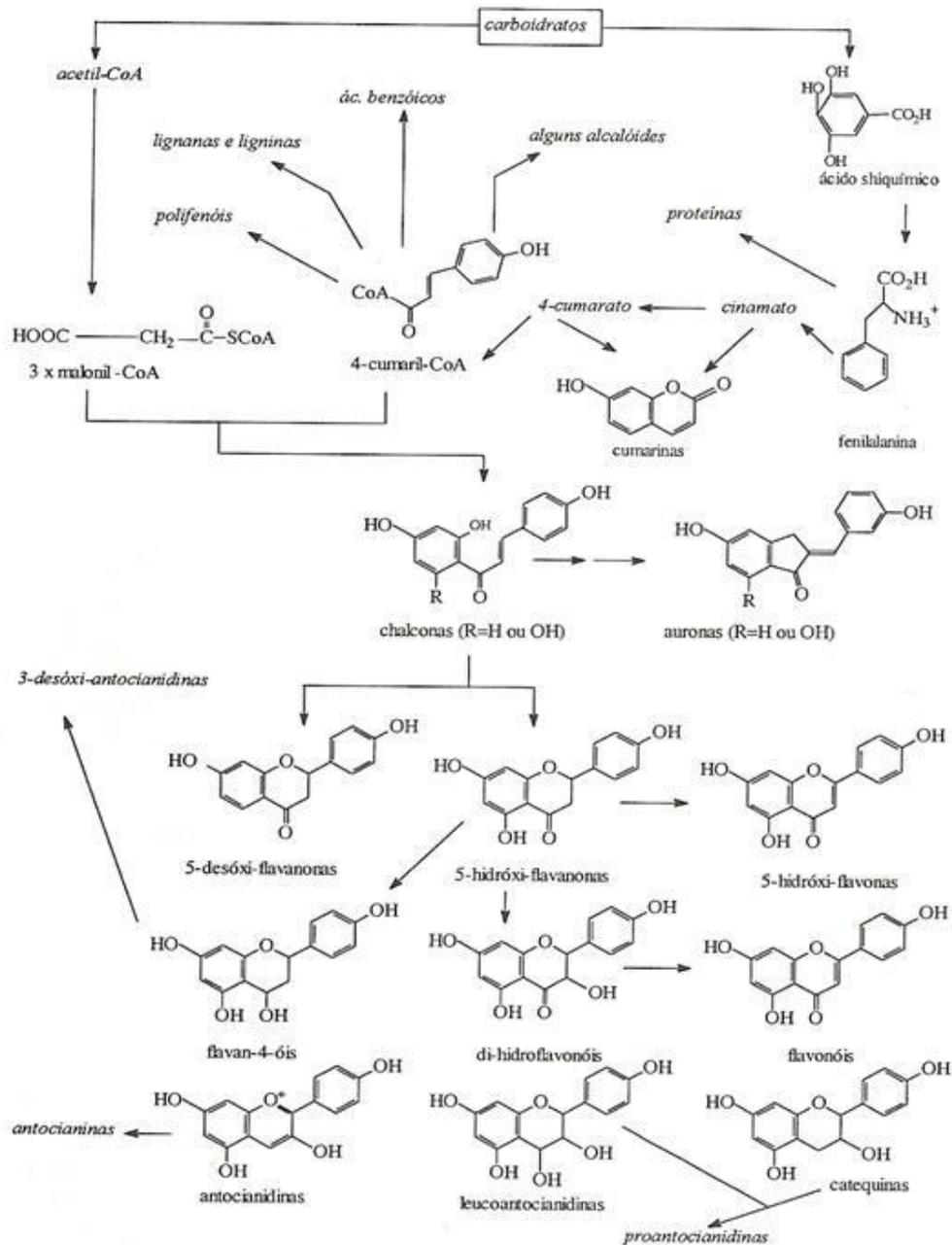
Quimicamente possuem diversas formas estruturais. Entretanto, a maioria dos representantes dessa classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, cujo núcleo fundamental é chamado de benzopirano (Figura 8), ao qual se encontra ligado um anel aromático, isto é, o 2-fenil-benzopirano<sup>3,9</sup>.



**Figura 8.** Estrutura do núcleo fundamental dos flavonóides<sup>9</sup>.

No entanto, uma definição levando em conta somente a estrutura química não é apropriada, uma vez que existem substâncias contendo hidroxilas fenólicas, que fazem parte de outras classes de metabólitos. Dessa forma, é mais conveniente empregar-se uma definição que leva em conta também a origem biogenética (Figura 9)<sup>9</sup>.

Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais. São conhecidos, até o presente, mais de 4.200 flavonóides diferentes, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos<sup>3,9</sup>.



**Figura 9.** Esquema simplificado da biossíntese dos flavonóides<sup>9</sup>.

Os flavonóides de origem natural apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares. Esta forma, chamada conjugada, também é conhecida como heterosídeo.

São denominados de O-heterosídeos quando a ligação se dá por intermédio de uma hidroxila e de C-heterosídeos quando a ligação se dá com um átomo de carbono. Quando o metabólito encontra-se sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina, sendo geralmente denominado de forma livre<sup>3,9</sup>.

Na Tabela 2 estão apresentadas as principais classes de flavonóides e um resumo de suas propriedades biológicas mais importantes<sup>3,9</sup>.

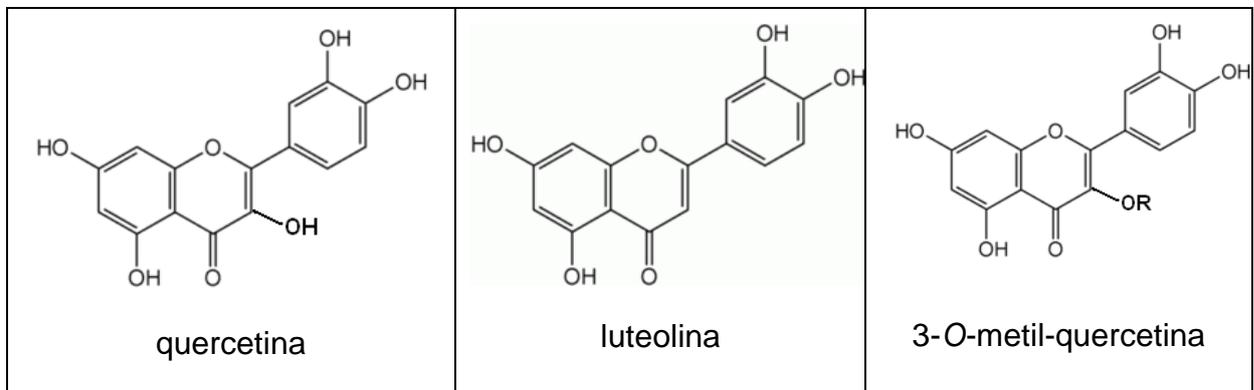
**Tabela 2.** Classificação e propriedades de alguns flavonóides<sup>9</sup>.

<b>Classes</b>	<b>Nº aproximado de estruturas conhecidas</b>	<b>Características</b>
Flavonas, flavonóides e seus O-heterosídeos	1660	Co-pigmentação em flores, protetores contra raios UV
C-heterosídeos	303	
Antocianos	256	Pigmentação do vermelho ao azul
Chalconas	197	Pigmentação amarela
Auronas	29	Pigmentação amarela
Di-hidro-falvonóis	110	Estão presentes em tecidos de madeiras
Flavanonas	319	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	71	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	309	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonóides	630	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngica
Neoflavonóides	70	
Biflavonóides	134	Propriedades antifúngicas
Outras estruturas	100	

O interesse econômico pelos flavonóides é decorrente de suas diferentes propriedades, como, por exemplo, o fato de alguns poderem ser usados como pigmentos<sup>3,9</sup>.

Pereira e colaboradores<sup>17</sup> quantificaram os flavonóides totais e a quercetina na marcela, utilizando diferentes métodos extrativos.

Polydoro e colaboradores<sup>18</sup> identificaram e quantificaram os principais flavonóides das inflorescências da marcela: quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina (Figura 10) e obtiveram uma concentração superior da primeira substância em relação às demais.



**Figura 10.** Estrutura dos flavonóides quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina

Os flavonóides livres e glicosilados quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina, foram encontrados na *A. saturoioides* (Lam) em maior concentração por Arredondo e colaboradores<sup>19</sup> em comparação com os extratos das infusões da *Gingko Biloba* e *Epilobium parviflorum*.

Souza e colaboradores<sup>20</sup> desenvolveram uma metodologia para separar e quantificar a quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina utilizando HPLC e constataram um maior rendimento para a quercetina no extrato etanólico a 80% em comparação ao extrato etanólico a 40% e ao aquoso.

Sonaglio e colaboradores<sup>21</sup> também identificaram os três flavonóides principais das inflorescências da marcela utilizando cromatografia em papel e HPLC e tendo como padrão a quercetina.

### 2.1.3. Propriedades farmacológicas

A marcela é conhecida na medicina popular pelo uso de suas inflorescências através de infusão e decocção aquosa, devido suas atividades terapêuticas, como atividades antioxidante, antibacteriana, antiespasmódica, antiinflamatória, analgésica e sedativa. Também há relatos do uso das folhas, além do óleo essencial que também apresenta ação biológica<sup>2,5,7-9</sup>.

Os principais constituintes químicos isolados das inflorescências da marcela tem sido relatados como sendo os flavonóides quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina, sendo a quercetina o princípio ativo com maior concentração e o principal responsável pela atividade terapêutica da planta, visto que, a marcela é comumente utilizada pela população para auxiliar nas disfunções gástricas e digestivas atribuídas a esses constituintes.

#### 2.1.3.1. Atividade antioxidante

A propriedade antioxidante da *Achyrocline satureioides* (Lam) foi estudada por Polydoro e colaboradores<sup>18</sup> que comparou a atividade através de extrato obtido por decocção aquosa, outros dois macerados com etanol a 40% e a 80% e outro enriquecido com flavonóides, sendo a ação mais pronunciada nestas duas últimas frações. Este efeito pode ser explicado pela presença de uma concentração mais elevada de quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina quando comparado aos outros dois extratos, confirmando o efeito antioxidante destes flavonóides.

Embora o extrato a 40% contenha concentrações de flavonóides similares àquelas ao extrato a 80%, a proporção mais elevada da quercetina neste último produz um aumento significativo no efeito antioxidante. Este resultado pode indicar que não é somente o índice total de flavonóides que determina a capacidade antioxidante, mas igualmente a relação entre as substâncias. Com isto, constata-se

que a proporção de solvente e o método extrativo possuem influência na ação antioxidante da planta<sup>18</sup>.

A atividade antioxidante e captora de radicais livres foi avaliada por Zampieron e colaboradores<sup>22</sup> a partir de extrato aquoso da *A. saturoioides* (Lam) e *A. alata*. As duas plantas mostraram-se igualmente antioxidante, comprovando que as duas espécies tem seu uso comprovado na medicina popular.

Ferraro e colaboradores<sup>23</sup> também investigaram a atividade antioxidante do extrato metanólico da marcela coletada em diversas regiões da Argentina. Os autores relataram uma grande diversidade no conteúdo total de flavonóides e constataram que a atividade antioxidante é proporcional à quantidade dos constituintes.

Pereira e colaboradores<sup>17</sup> igualmente estudaram a atividade antioxidante da marcela através de extratos etanólicos das folhas por diferentes métodos extrativos, como centrifugação, Soxhlet, extração com solvente à baixa pressão e fluido supercrítico e constataram uma maior atividade para a metodologia extrativa com Soxhlet. Este não era o extrato com maior rendimento, mas apresentava grande concentração de quercetina, indicando ser esta substância responsável pela atividade antioxidante.

Morquio e colaboradores<sup>24</sup> analisaram o extrato etanólico da marcela com o objetivo de avaliar a eficácia antioxidante de uma aplicação tópica como preventiva do fotoenvelhecimento e câncer, provocado pelos radicais livres em excesso produzidos pela radiação ultravioleta. Observou-se uma significativa fotoproteção atribuída, principalmente, às formas de aglicona dos flavonóides (quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina).

A atividade antioxidante, também foi estudada por Desmarchelier e colaboradores<sup>25</sup> através do extrato metanólico da *A. saturoioides* (Lam) Os autores trabalharam com o extrato aquoso e metanólico das inflorescências e constataram que ambos apresentam significativa atividade antioxidante, *in vitro*.

Para o estudo toxicológico das folhas, flores e caules da marcela, Rivera e colaboradores<sup>26</sup> avaliaram a toxicidade aguda em ratos fêmeas e machos através da infusão aquosa da planta nas doses de 30, 60, 90, 180 e 300 mg Kg<sup>-1</sup>, por administração oral e intraperitoneal. Os resultados mostram que o extrato aquoso em

concentrações maiores as utilizadas pela população, indicou que a *A. satureioides* (Lam) não apresenta toxicidade.

### 2.1.3.2. Atividade citoprotetora e citotóxica

Arredondo e colaboradores<sup>19</sup> investigaram a atividade citoprotetora e citotóxica dos flavonóides livres e glicosilados comparando as infusões da *Achyrocline satureioides* (Lam), *Gingko Biloba* e *Epilobium parviflorum*. Foram testados os flavonóides individuais quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 250  $\mu\text{M}$  e os flavonóides totais nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os autores obtiveram como resultado um aumento significativo na atividade quando utilizada a concentração de 75 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de flavonóides totais e efeito tóxico na concentração de 250  $\mu\text{M}$  demonstrada pela quercetina. Dessa forma, concluíram que a *A. satureioides* (Lam) obteve uma atividade citoprotetora maior que as outras duas plantas testadas devido ao fato de apresentar uma concentração de princípios ativos 10 vezes maior e, ainda que a atividade poderia ser devido a quantidade de flavonóides livres que se apresentam maior se comparado aos outros extratos.

Para o estudo da ação citotóxica em células de carcinoma hepatocelular (linha HEP G2), Ruffa e colaboradores<sup>27</sup> realizaram estudo *in vitro* com extratos metanólicos da *Achyrocline satureioides* (Lam), *Aristolochia macroura*, *Celtis spinosa*, *Chenopodium ambrosioides*, *Lithraea molleoides*, *Petiveria alliacea*, *Plantago major* e *Schinus molle*. As células foram incubadas com concentrações diferentes de cada extrato da planta durante 48 h e apenas *A. satureioides* (Lam), *A. macroura*, (L.) *molleoides* e *S. molle* apresentaram inibição do crescimento celular. E entre estas a ação da *A. satureioides* demonstrou-se dependente da dose, quando testada para 500 e 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 2.1.3.3. Atividade antiproliferativa

Fachinetto e colaboradores<sup>28</sup> investigaram efeito antiproliferativo do extrato aquoso da marcela sobre o ciclo de *Allium cepa* e concluíram que esta planta apresentou significativa inibição na divisão celular, portanto, possui capacidade citotóxica, mas não mutagênica no ciclo celular da *Allium cepa*.

### 2.1.3.4. Atividade relaxante e antiespasmódica

Hnatyszyn e colaboradores<sup>29</sup> analisaram o efeito relaxante em músculo liso para combater a impotência masculina, utilizando extrato etanólico da planta. Foi testado em corpos cavernosos de porcos *Guinea* e constatado importante efeito vasodilatador dependente da concentração (2,5; 5,0; 10,0 e 25 mg mL<sup>-1</sup>). O trabalho também comparou os constituintes químicos principais encontrados com os sintéticos 3,7,3',4'-tetrametil-éter-quercetina e 3,5,7,3',4'-pentametil-éter-quercetina e concluiu que o número de metilas no núcleo da quercetina não influencia significativamente no aumento da ação biológica.

Langeloh e Schenkel<sup>30</sup> estudaram a ação antiespasmódica do extrato etanólico da marcela, *in vitro*, sobre as contrações da musculatura lisa genital de ratos e observaram um efeito significativo na dose de 16,1 µg mL<sup>-1</sup>, justificando seu emprego na medicina popular.

A investigação farmacológica do extrato aquoso das folhas e caules da *A. saturoioides* (Lam) foi estudada por Simões e colaboradores<sup>31</sup> com o objetivo de analisar a atividade antiespasmódica. Os extratos nas concentrações de 100 a 700 mg Kg<sup>-1</sup> foram administrados em camundongos adultos e na concentração de 1000 mg Kg<sup>-1</sup> em ratos adultos, via intraperitoneal. Os resultados observados sugerem uma ação depressora central, ação sedativa, ação espasmolítica e miorelaxante dependente da dose, nas condições experimentais utilizadas.

### 2.1.3.5. Uso da planta na perda de peso

Dickel e colaboradores<sup>32</sup> realizaram levantamento bibliográfico sobre o uso de plantas com efeito sobre a perda de peso pela população de Porto Alegre. Os dados científicos foram analisados com o objetivo de estabelecer uma correlação entre o uso popular e as propriedades biológicas de diversas plantas utilizadas. Em relação à *A. saturioides* (Lam), concluíram que alguns dados clínicos poderiam indicar o uso associado aos altos níveis de glicose no sangue, contudo, os dados científicos encontrados são insuficientes para garantir a eficácia e segurança dessa planta para o tratamento da obesidade.

### 2.1.3.6. Atividade antiinflamatória e antibacteriana

Em outro trabalho, Simões e colaboradores<sup>33</sup> investigaram a ação antiinflamatória dos extratos aquoso, etanólico e dos flavonóides individuais quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina através de indução de edema na pata de rato. Os efeitos foram comparados com o medicamento controle, indometacina, e os resultados demonstraram efeito relevante ao extrato etanólico e aos flavonóides individuais.

Souza e colaboradores<sup>34</sup> testaram a atividade antiinflamatória em ratos *Wistar* por administração oral. Utilizaram 6 extratos obtidos com água e etanol a 40% e 80%, secos por liofilização e *spray-dried* e também a quercetina individualmente. Constataram que o extrato etanólico a 80% liofilizado foi o que mais obteve efeito, assim como o extrato individual da quercetina.

Wiest e colaboradores<sup>35</sup> determinaram, *in vitro*, a intensidade da atividade antibacteriana e da inativação bacteriana frente à *Salmonella* spp. A marcela apresentou ação em diferentes concentrações.

Mota<sup>10</sup> comprovou a atividade antibacteriana do extrato etanólico das inflorescências da marcela utilizando as bactérias *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Enteritidis*.

Calvo e colaboradores<sup>36</sup> investigaram a ação antimicrobiana da marcela e observaram que o extrato aquoso da *A. satureioides* (Lam) inibiu 95% das cepas de *Staphylococcus* spp.

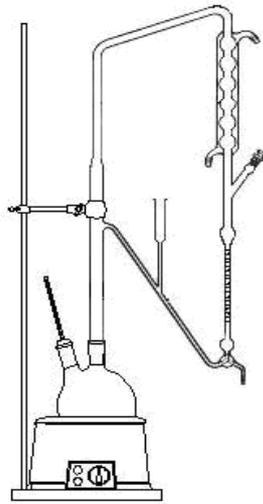
#### **2.1.3.7. Atividade antiviral**

A atividade antiviral foi relatada por Zanon e colaboradores<sup>37</sup> para o extrato metanólico das folhas da *A. satureioides* (Lam). Foi utilizado o vírus da herpes e os resultados demonstraram uma relevante atividade em comparação com outras plantas utilizadas no estudo.

## **2.2. Métodos de extração**

### **2.2.1. Arraste a vapor**

O processo é baseado na propriedade que possuem as essências de serem miscíveis com a água em estado de vapor. Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a água, sendo, por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho Clevenger (Figura 11). O óleo volátil obtido, após separar-se da água, deve ser seco com sulfato de sódio anidro. Esse procedimento, embora clássico, pode levar à formação de artefatos em função da alta temperatura empregada. Preferencialmente, esse método é utilizado para extrair óleos de plantas frescas. Depende de uma série de fatores, tais como: a sua localização no vegetal, das suas propriedades físico-químicas e da finalidade a que se destina<sup>3,9</sup>.

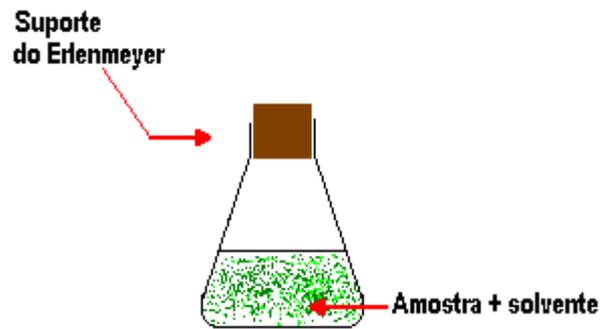


**Figura 11.** Aparelho do tipo Clevenger, utilizado na extração com hidroddestilação<sup>38</sup>.

Os óleos voláteis facilmente se alteram pelo calor, por esse motivo, nem todos podem sofrer o mesmo processo extrativo<sup>3,9</sup>.

### 2.2.2. Extração por maceração

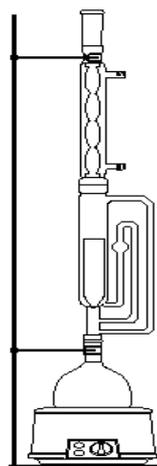
Maceração (Figura 12) designa a operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em diversas temperaturas, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Diversas variações conhecidas desta operação objetivam, essencialmente, o aumento da eficiência de extração, entre elas<sup>9,15</sup>.



**Figura 12.** Desenho esquemático do equipamento usado para maceração<sup>38</sup>.

### 2.2.3. Extração por Soxhlet

É utilizada, sobretudo, para extrair sólidos com solventes voláteis, exigindo o emprego do aparelho de Soxhlet (Figura 13). Em cada ciclo da operação, o material vegetal entra em contato com o solvente renovado; assim, o processamento possibilita uma extração altamente eficiente, empregando uma quantidade reduzida de solvente, em comparação com as quantidades necessárias nos outros processos extrativos, para se obter os mesmos resultados quantitativos e qualitativos<sup>9,39,40</sup>.



**Figura 13.** Aparelho extrator Soxhlet, utilizado na extração com solventes<sup>38</sup>.

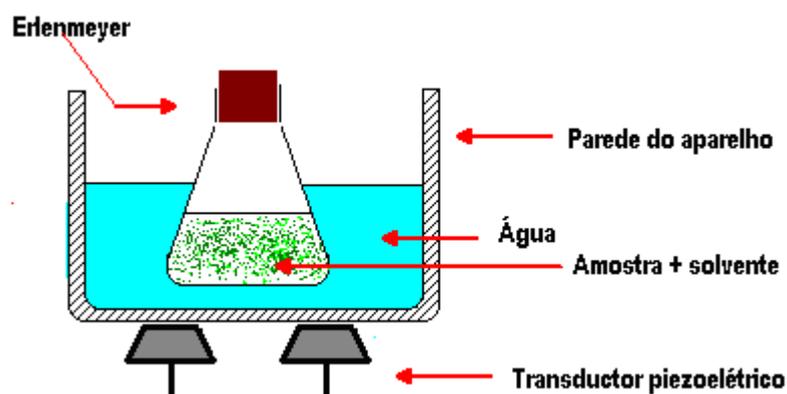
#### 2.2.4. Extração com ultrassom (banho e sonda)

O ultrassom é um processo que utiliza a energia das ondas sonoras que são transmitidas em frequência superior à da capacidade auditiva, acima de 20 kHz<sup>41,42</sup>.

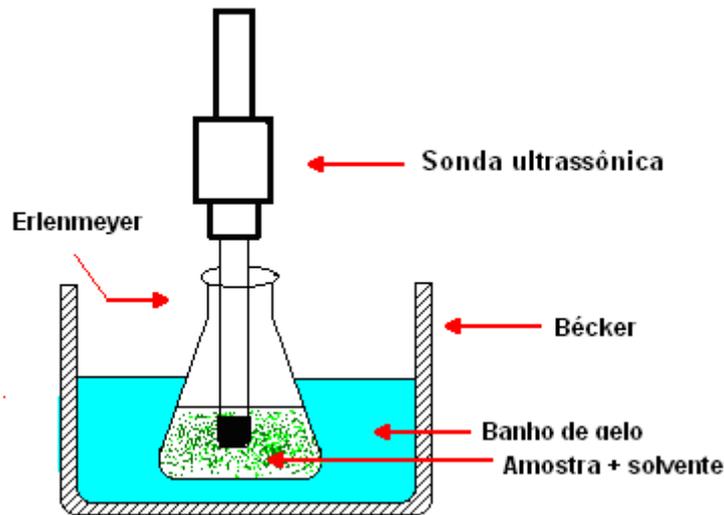
Estas ondas sonoras criam uma variação de pressão no líquido gerando cavitação, a qual pode facilitar a hidratação e a dilatação do material da planta e causar alargamento dos poros da parede celular. Por conseqüência, melhora a transferência de massa e, ocasionalmente, uma quebra na parede celular, resultando no aumento da eficiência de extração e/ou redução do tempo de extração<sup>43,44</sup>.

Os principais efeitos do ultrassom na extração de plantas são: aumento da permeabilidade das paredes celulares, produção de cavitações (formação espontânea de bolhas em um líquido abaixo do seu ponto de ebulição, resultando num forte estresse dinâmico) e aumento do estresse mecânico das células, o que é também chamado de fricção interfacial. Entretanto, é proporcional à frequência, potência e tempo de extração<sup>45-47</sup>.

Existem dois tipos distintos de aparelhos geradores de ondas ultrassônicas: o banho (Figura 14) e a sonda ultrassônicas (Figura 15)<sup>41,42</sup>.



**Figura 14.** Desenho esquemático do equipamento de banho ultrassônico<sup>38</sup>.



**Figura 15.** Desenho esquemático do equipamento usado da sonda ultrassônica<sup>38</sup>.

No banho de ultrassom, o transdutor é diretamente preso no fundo da cuba do aparelho e a energia ultrassônica é transmitida através de um líquido, usualmente a água. A energia é irradiada verticalmente pelas ondas sonoras geradas na base do banho e transmitidas através das paredes do vaso para o frasco com a mistura extratora<sup>41,42</sup>.

O banho de ultrassom apresenta como vantagem uma melhor distribuição de energia através das paredes do vaso de extração e o fato de não requerer adaptação especial para o frasco extrator. Apresenta como desvantagem o fato de que a quantidade de energia fornecida para o frasco extrator não é facilmente quantificável, porque depende do tamanho do banho, do tipo de recipiente, da espessura das paredes do recipiente e da posição do frasco de extração no banho. É difícil controlar a temperatura do sistema, pois o equipamento tende a aquecer quando usado por longos períodos<sup>41,42</sup>.

A sonda por outro lado encontra-se fixada na extremidade do amplificador do transdutor, em contato direto com o sistema extrator. Apresenta como vantagens a potência totalmente disponível (não há transferência de radiação ultrassônica pelas paredes do vaso) e a possibilidade de ser sintonizada para fornecer um melhor desempenho a diferentes potências. Como desvantagem apresenta: frequência fixa, dificuldade de controle da temperatura em sistemas sem refrigeração e o fato de que espécies radiculares podem ser formadas na ponta da sonda, conseqüentemente

apresentando problemas relacionados à contaminação do meio extrator com a ponteira<sup>41</sup>.

### **2.2.5. Fatores que influenciam na extração com solventes orgânicos**

Os principais fatores que influenciam a eficiência dos processos extrativos estão vinculados ao material vegetal, ao líquido ou misturas de líquidos extratores e às condições do sistema, em conjunto<sup>9</sup>.

Os fatores vinculados ao material vegetal são a quantidade, a natureza, o teor de umidade, tamanho de partícula, capacidade de intumescimento. Por outro lado, os fatores vinculados ao líquido extrator levam em conta a seletividade e quantidade do solvente orgânico e a efetividade em relação a mistura de dois ou mais líquidos extratores. Também tem que se levar em consideração os fatores vinculados ao sistema extrator, ou seja, proporção droga/líquido extrator, temperatura, agitação, pH, tempo de extração<sup>9</sup>.

### **2.2.6. Extrações aplicadas a espécies do gênero *Achyrocline***

Arredondo e colaboradores<sup>19</sup> compararam a quantificação dos flavonóides livres e glicosilados nas espécies *Achyrocline satureioides* (Lam), *Epilobium parviflorum* e *Ginkgo biloba*, através da extração por infusão com 1 g das partes aéreas e 50 mL de água fervente para as duas primeiras plantas e 3 g com 25 mL de água fervente para a outra. Todas permaneceram por 10 min e após foram filtradas para serem utilizadas na realização da atividade citoprotetora, a qual se apresentou com uma ação satisfatória, de acordo com o uso popular.

Cosentino e colaboradores<sup>48</sup> também realizaram extração por infusão, porém, utilizando as folhas, flores e partes aéreas da marcela. Foram extraídos com 50 mL

de água fervente para 1 g da planta por 10 min. O extrato foi filtrado e utilizado 6 h mais tarde na avaliação da atividade imunomodulatória.

Com a finalidade de avaliação de um estudo toxicológico da marcela, Rivera e colaboradores<sup>26</sup> extraíram por infusão 1 g das folhas, flores e partes aéreas com 50 mL de água fervente por 10 min. Esta metodologia foi realizada seguindo indicação popular para o uso desta planta.

Zampieron e colaboradores<sup>22</sup> compararam os extratos da *A. saturoides* (Lam) e *A. alata* para a atividade antioxidante, usando extratos das inflorescências feitos com 5 g da planta por infusão com 100 mL de água fervente com tempo de 20 min e, também por maceração com 50 mL de diclorometano. O resíduo deste foi macerado por 24 h com 50 mL de metanol. Também obtiveram extratos por percolação com etanol 70% por 6 h.

Fachinetto e colaboradores<sup>28</sup> avaliação o efeito antiproliferativo da infusão das inflorescências da marcela, colocando-as em contato com água quente por 10 min.

As inflorescências da marcela também foram estudadas por Desmarchelier e colaboradores<sup>25</sup> através da infusão de 5 g do material vegetal com 100 mL de água fervente por 20 min e liofilizado para avaliação da atividade antioxidante, seguindo o uso popular desta planta.

Para uma comparação entre métodos extrativos, Pereira e colaboradores<sup>17</sup> fizeram a extração das folhas e galhos da *A. saturooides* (Lam) com etanol utilizando os métodos: extração á frio com centrífuga, hidrodestilação, Soxhlet, extração com solvente à baixa pressão, extração com fluido supercrítico e por ultrassom. Para o processo de centrifugação, foram utilizados aproximadamente 1,04 g do material vegetal com 0,2 mL de etanol á 7500 rpm por 5 min; na hidrodestilação, foram utilizados 25 g com 250 mL de água durante 3 h; na extração com solvente à baixa pressão, 2,93 g da planta foram colocados com etanol numa concentração de 1:10 durante 3 h; cerca de 10 g das folhas e galhos foram extraídos por Soxhlet com 300 mL de etanol durante 3 h e para a extração com ultrassom foi utilizado uma concentração dez vezes menor com o mesmo solvente por 30 min. E para extração com fluido supercrítico, foi feito com 4,8 g por cerca de 90 min, até exaustiva extração.

No trabalho de Polydoro e colaboradores<sup>18</sup>, os autores extraíram a quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina através de decocção com água, maceração com etanol a 40% e maceração com etanol a 80%.

Os autores também fizeram uma fração enriquecida com flavonóides, utilizando Soxhlet através de sucessivas extrações com hexano e acetato de etila para avaliação da atividade antioxidante. Todos os extratos foram filtrados e 5 mg do pó seco foram dissolvidos em 100 mL de metanol:água (53:47 v/v) até concentração de 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para as três primeiras extrações e para a fração enriquecida com flavonóides foram dissolvidos com 10 mL da mesma solução até concentração de 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Constataram uma concentração de 3 a 4 vezes maior de quercetina no extrato etanólico a 40% e de 5 a 6 vezes maior no extrato etanólico a 80% em comparação ao extrato aquoso. Com relação aos constituintes luteolina e 3-O-metil-quercetina, notou-se uma concentração de 6 a 7 vezes maior no extrato a 40% e também no extrato a 80% em comparação ao aquoso. Isto demonstra que a proporção de solvente e o método extrativo são significativos para extração de maior quantidade destes princípios ativos.

Com o objetivo de testar a influência dos excipientes e processos tecnológicos na ação antiinflamatória das inflorescências da *A. saturoioides* (Lam), Souza e colaboradores<sup>34</sup> realizaram a extração por decocção aquosa, maceração com etanol a 40% e maceração com etanol a 80%. Todos estes extratos passaram por dois processos: liofilização e *spray-dried*, resultando em seis amostras. Comprovaram que a maior concentração de quercetina, luteolina e 3-O-metil-quercetina foram obtidas na amostra feita por maceração com etanol a 80% e liofilizada.

Ferraro e colaboradores<sup>23</sup> visaram à determinação das substâncias fenólicas da marcela extraída na Argentina e para isto, obtiveram o extrato através de decocção com metanol 70% por 10 min.

As folhas e galhos da marcela foram utilizados por Calvo e colaboradores<sup>36</sup> na extração também por decocção com 10 g da planta em 200 mL de água por 20 min,

a qual rendeu uma concentração de 11 mg mL<sup>-1</sup> para a utilização na atividade antimicrobiana.

Através da maceração também foram extraídas as inflorescências da marcela por Ruffa e colaboradores<sup>27</sup>. Testaram a atividade citotóxica, juntamente com outras sete plantas extraídas na Argentina, onde obtiveram um extrato metanólico extraído por maceração com 5 g da planta por 3 vezes com 40 mL do solvente por 24 h.

Para atividade antiespasmódica, Langeloh e Schenkel<sup>30</sup> extraíram por maceração 110 g de inflorescências com 2 L de etanol durante 8 dias com agitação ocasional. Após, foram concentrados até *secura* e o resíduo ressuspendido em solução hidroalcoólica (2:1).

Além da extração, Sonaglio e colaboradores<sup>21</sup> fizeram uma purificação de todos os extratos com o objetivo de uma padronização quantitativa comparando HPLC e cromatografia em papel com uso de espectrometria no ultravioleta. Para isto, fizeram a extração por maceração de 2,5; 5,0; 7,5 e 10 g das inflorescências da marcela com 100 mL de etanol a 60% por 16 dias. Após, estes foram secos em banho-maria e purificados com 25 mL de acetato de etila, filtrados, secos novamente em banho-maria e o resíduo foi retomado com metanol.

Simões e colaboradores<sup>32</sup> também realizaram maceração com etanol, mas diferentes dos outros autores, utilizaram folhas e caules da *A. satureioides* (Lam) com o tempo de 18 h, havendo renovação do solvente a cada 6 h.

Hnatyszyn e colaboradores<sup>29</sup> extraíram cerca de 50 g das partes aéreas da marcela duas vezes por maceração com álcool etílico (100 mL cada) durante 24 h em temperatura ambiente. Ambos os extratos foram secos sob pressão reduzida. Os extratos foram fracionados através de cromatografia em coluna e formaram duas faixas detectáveis por UV, as quais foram eluídas com metanol, obtendo os flavonóides quercetina e 3-O-metil-quercetina. Os autores tinham como objetivo demonstrar o efeito relaxante em músculo liso e comprovaram ser proporcional à concentração testada.

Oliveira e colaboradores<sup>49</sup> objetivaram a obtenção de extratos com baixo teor alcoólico e alta concentração de flavonóides adicionando  $\beta$ -ciclodextrina que confere

maior solubilidade a estas substâncias. Para isto, foram realizadas oito macerações: com etanol a 40%, com etanol a 80% e outras duas adicionando  $\beta$ -ciclodextrina nas mesmas em dois tempos diferentes de 4 e 8 dias. Concluíram que o uso da  $\beta$ -ciclodextrina, para os macerados com maior teor etanólico e menor tempo, obteve uma maior eficiência na extração dos flavonóides o que demonstra uma vantagem tecnológica interessante.

Para a investigação farmacológica da marcela, Simões e colaboradores<sup>33</sup> extraíram por maceração suas inflorescências com água e etanol e por decocção com água.

Morquio e colaboradores<sup>24</sup> também extraíram por maceração as inflorescências da *A. satureioides* (Lam) com 30 g da planta e 500 mL de etanol 95% por 7 dias, após foi filtrado e o solvente evaporado. O resíduo foi dissolvido em etanol:água (7:3) e misturado em base de creme para uso tópico na pele como fotoprotetor.

No estudo da propriedade antiviral da marcela, Zanon e colaboradores<sup>37</sup> fizeram um extrato por maceração com etanol a 80% utilizando 5 g das folhas e 30 mL do solvente por 24 h.

Na determinação dos ácidos caféico, clorogênico e isoclorogênico, López e colaboradores<sup>50</sup> estudaram as partes aéreas das espécies *A. satureioides* (Lam), *A. tomentosa*, *A. alata* e *A. flaccida* através da extração por refluxo, três vezes, com metanol a 70% por 2 h. Após, foram secas e o resíduo solubilizado com metanol:água (1:1), lavado com éter de petróleo:éter etílico (1:2) e liofilizado.

Com o objetivo de validação do método de quantificação dos flavonóides principais da *A. satureioides* (Lam) de origem argentina, Retta e colaboradores<sup>51</sup> extraíram cerca de 4 g das inflorescências em refluxo por 3 h com 150 mL de etanol 80%. Após, foi filtrado, o resíduo evaporado, ajustado o volume com o mesmo solvente para 10 mL e, então, levado à banho ultrassônico durante 5 min. Foi filtrado e uma alíquota de 5 mL desta solução foi diluída a 25 mL.

Meireles e Peruchi<sup>52</sup> realizaram a extração dos flavonóides da marcela através da tecnologia supercrítica com CO<sub>2</sub>, utilizando um modificador de polaridade, o co-solvente etanol, com o objetivo de obter maior rendimento do flavonóide

quercetina, responsável pela ação antioxidante da planta, o qual foi comprovado através de análise cromatográfica.

### **2.3. Análise instrumental via cromatografia gasosa**

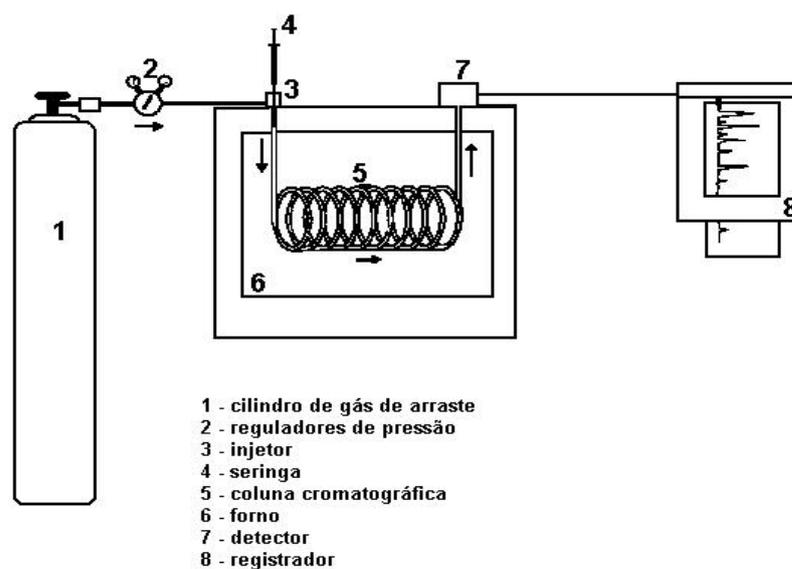
A cromatografia gasosa é o método de escolha para separar e quantificar substâncias componentes de misturas complexas. Apesar do seu alto poder de diferenciação, é um método muito simples de usar. As amostras devem ser gases ou substâncias que possam ser volatilizadas<sup>3,9,38,53</sup>.

Considerando-se o processo de um modo geral, podemos verificar que, no sistema cromatográfico, a fase fixa está sempre ligada, de algum modo, a um suporte permeável, imóvel, por onde flui a fase móvel líquida ou gasosa. Dependendo da natureza do suporte e da fase móvel, definem-se subclasses de cromatografia ditas, em papel, em coluna, gás, líquido, etc<sup>4,53,54</sup>.

O método cromatográfico destaca-se entre os diversos métodos de análise como um dos mais frutíferos em resultados satisfatórios e mais rico em número de variadas técnicas. Como processo de análise imediata, tem permitido o fracionamento de misturas em seus componentes, com maior precisão e com menor consumo de tempo e trabalho, à medida que vem sendo desenvolvidos novos materiais e novas técnicas<sup>4,54</sup>.

Pode-se definir a cromatografia como um processo de análise imediata por migração diferencial das substâncias de uma mistura, dentro do sistema cromatográfico<sup>4</sup>.

A Figura 16 apresenta um esquema básico de um cromatógrafo a gás. Nele, a amostra é introduzida em uma coluna que contém uma fase estacionária, através de um injetor. A determinada temperatura as substâncias vaporizam e, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas em determinados tempos, chegando à saída da coluna em tempos diferentes. Um detector adequado, colocado na saída da coluna, permite a detecção e quantificação dessas substâncias<sup>3,38</sup>.



**Figura 16.** Esquema básico de um cromatógrafo a gás<sup>54</sup>.

A identificação dessas substâncias é feita geralmente comparando o tempo de retenção relativo da amostra com o de padrões. Outra maneira, é através do Índice de Kovats<sup>9,55</sup>.

O Índice de Kovats (IK) é a identificação das substâncias individuais realizada através da comparação do tempo de retenção relativo da amostra com padrões, como os hidrocarbonetos saturados lineares C9-C24. Foi introduzido para ser mais independente das variações do tempo de retenção, sob condições diferentes da medida. Relaciona o tempo de retenção das substâncias ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos. Alguns autores tabelaram grandes listas de Índice de Kovats para substâncias voláteis que permitem uma comparação com componentes da amostra, cujo valor é determinado usando-se um gráfico, que relaciona o número de átomos de carbono de alcanos saturados normais com o logaritmo dos tempos de retenção ajustados desses alcanos, ou pelo cálculo, aplicando-se a equação (Figura 17)<sup>54,55</sup>. Recomenda-se utilizar mais de uma coluna cromatográfica de polaridades diferentes para a confirmação da substância comparada com o padrão<sup>9</sup>.

$$IR = [(TR - TRN) / (TRN - TRM)] \times 100 + 100 \times C$$

**Figura 17.** Equação para cálculo do índice de Kovats. IR=índice de retenção; TR= Tempo de retenção da amostra; TRN= Tempo de retenção do alcano menor; TRM= Tempo de retenção do alcano maior; C= nº de carbonos do alcano menor<sup>54,55</sup>.

Para quantificar a composição de uma amostra, é usado o método de normalização ou método do 100%: o valor total das áreas do cromatograma é considerado como 100% e cada pico apresenta um percentual relativo<sup>9</sup>.

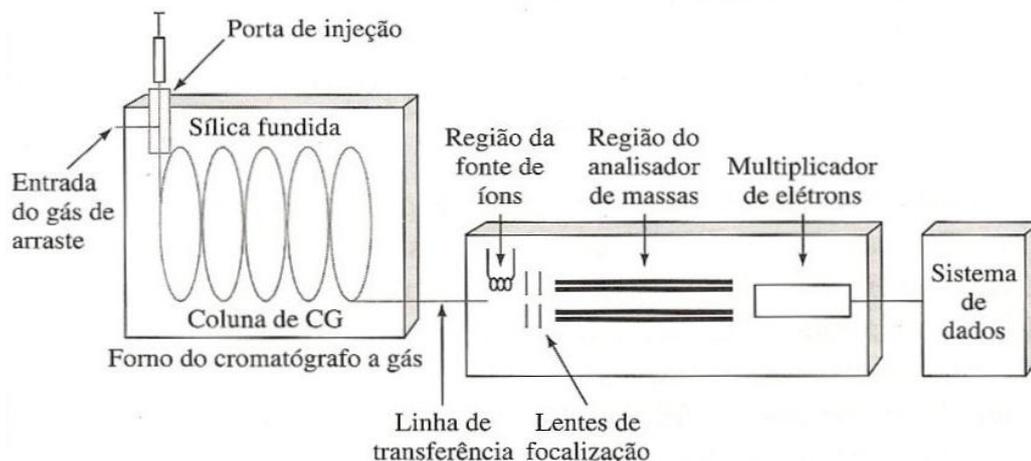
Para ter mais segurança na identificação dos picos individuais e controlar a pureza de um pico cromatográfico, é recomendável analisar a amostra também por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas<sup>9</sup>.

### 2.3.1. Cromatografia GC/MS

Esse método permite a separação dos componentes e fornece, ainda, um espectro de massas para cada pico. O espectro de massa geralmente indica a massa molecular e o padrão de fragmentação. O padrão de fragmentação pode ser comparado com aqueles constantes da biblioteca de espectros de massas, que, normalmente, é instalada no computador. Em alguns segundos, o espectro da amostra é comparado com os das substâncias da biblioteca e o computador faz propostas de probabilidade quanto à identidade da substância analisada. Esse espectro indica a massa molecular e o padrão de fragmentação. Pela massa molecular obtem-se dados sobre a classe de substâncias (por exemplo,  $m/z = 136$  corresponde a monoterpenos de fórmula molecular  $C_{10}H_{16}$ ), enquanto que o padrão de fragmentação serve para comparar com os dados constantes na biblioteca de espectros de massas do computador. Uma vez feita a comparação, o computador mostra as probabilidades quanto à identidade da substância analisada<sup>9,38</sup>.

O equipamento (Figura 18) consta de um cromatógrafo, usualmente com coluna capilar, uma interface para ligação dos dois sistemas, uma câmara de ionização onde os íons são formados, uma câmara mantida sob vácuo onde ocorre

a separação destes e um sistema para a detecção dos íons, acoplado a um sistema de registro com um programa para a interpretação dos dados obtidos<sup>54</sup>.



**Figura 18.** Esquema de um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa<sup>54</sup>.

O acoplamento GC/MS combina as vantagens de ambas técnicas: o alto poder de resolução e a velocidade de análise do GC, enquanto que o MS prevê identificação das substâncias e análises quantitativas em nível de ppb<sup>38</sup>.

Quando se usa índices de retenção e espectros de massas, extraídos da literatura especializada como a tabela descrita por Adams<sup>55</sup>, ou das bases de dados (NIST, Wiley, Adams, entre outras), e se comparam com os parâmetros espectroscópicos e cromatográficos da substância problema, a coincidência conduz a um reconhecimento de sua estrutura, embora não haja uma identificação absoluta, inequívoca<sup>38</sup>.

O uso da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas difundiu-se em todo mundo, de maneira que seus resultados são aceitos nas mais diversas instâncias e aplicação do método acaba ocorrendo tanto na indústria quanto nos laboratórios de pesquisa<sup>38,56</sup>.

## ***Capítulo 3***

***PARTE EXPERIMENTAL***

### 3.1. Amostra

Duas amostras de marcela (*Achyrocline satureioides* Lam DC.) foram coletadas às 17 h, em um sítio, nas proximidades do Passo do Salso, na cidade de Pelotas-RS, no Km 84/BR 392 no período de floração em abril de 2008 e de 2009. O local apresentava vegetação rasteira, mato e capim, não havendo outro tipo de vegetação ao redor, em cerca de 10 m. O dia estava nublado e a temperatura era em torno de 25°C.

As plantas tinham cerca de 1 m de altura e foram coletadas com caule, folhas e inflorescências, transportadas em sacos de estopa até ficarem armazenadas em uma sala específica para plantas no Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal de Pelotas. Após, foram separadas as suas inflorescências e uma excicata foi identificada no Herbariopel pertencente à Universidade Federal de Pelotas.

As flores da marcela foram secas em estufa com controle de temperatura, circulação e renovação de ar (Marconi MA035), por sete dias seguidos à 40°C, após a secagem as amostras foram armazenadas, em sala específica para plantas, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pelotas. A umidade foi controlada a 20% (desumidificador ARSEC 160) e a temperatura mantida a 25°C.

### 3.2. Determinação da umidade

Para determinação da umidade foram utilizados cerca de 3 g de inflorescência da planta (balança analítica - BIOPRECISA FA 2104A) e colocados em estufa com controle de temperatura e com circulação de ar durante 5 h, a 105°C, em triplicata. Para isto, foram utilizados cadinhos de alumínio, previamente secos em

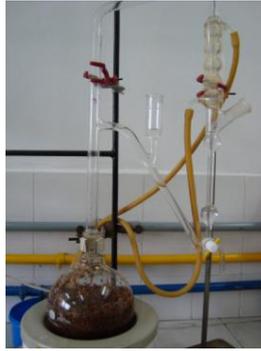
estufa por 30 min a 105°C. As amostras foram retiradas da estufa, colocadas em dessecador por 30 min e pesadas até peso constante.

### 3.3. Solventes, reagentes e padrões cromatográficos

Os solventes hexano, etanol e dicloro-metano (LABSYNTH) foram bidestilados, o reagente Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> grau de pureza 99% (LABSYNTH) e os gases H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He e ar sintético, todos com grau de pureza 99,99%, fornecidos pela White Martins. Os padrões utilizados na cromatografia gasosa, hidrocarbonetos alifáticos (C<sub>9</sub> a C<sub>24</sub>), foram adquiridos da Supelco.

### 3.4. Extração com hidrodestilação

Foram pesados cerca de 30 g de inflorescências das duas amostras de marcela, colocadas separadamente em balão com água destilada em aparelho para extração por arraste de vapor do tipo Clevenger (Figura 17) por 4 h em triplicata. Após extração, o óleo obtido foi retirado do equipamento com o auxílio de diclorometano e colocado em recipiente de vidro, seco com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrado para retirada deste. O óleo seco foi colocado em recipiente de vidro com o auxílio de pipeta de *Pasteur*, pesado e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração até as análises cromatográficas<sup>38,57</sup>.



**Figura 19.** Equipamento utilizado na hidrodestilação (Clevenger).

### 3.5. Extração com maceração

Para maceração foram pesados 5 g de inflorescências da amostra de marcela coletada em 2008, colocados em erlenmeyer de 1 L, adicionados 250 mL de hexano ou etanol (proporção 1:50), coberto com rolha e papel alumínio, armazenados ao abrigo da luz por 7 dias em triplicata, com agitação esporádica (Figura 18). Após este tempo, o extrato foi filtrado a vácuo, concentrado em evaporador rotatório (Quimisul, modelo Q-344B2) até peso constante, colocado em frasco âmbar sob refrigeração até as análises cromatográficas<sup>9,15</sup>. Estas proporções foram estimadas de acordo com trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa e por artigos referentes às mesmas extrações<sup>27,38,41,42,57,58</sup>.



**Figura 20.** Extração por maceração das inflorescências da marcela.

### 3.6. Extração com Soxhlet

Foram pesados 5 g de inflorescências de marcela coletadas em 2008, colocados em cartuchos de papel filtro e, submetidos à extração com Soxhlet (Figura 19), com 250 mL de hexano ou etanol (proporção 1:50) durante 4 h em triplicata. Após este tempo, o extrato foi filtrado a vácuo, concentrado em evaporador rotatório até peso constante, colocado em frasco âmbar sob refrigeração até as análises cromatográficas<sup>39,40</sup>.



**Figura 21.** Extração com Soxhlet das inflorescências da marcela.

### 3.7. Extração com banho ultrassônico

Para a extração com ultrassom foram pesados 5 g de inflorescências da amostra de marcela coletada em 2008, colocados em erlenmeyer de 1 L, adicionados 250 mL de hexano ou etanol (proporção 1:50) e coberto com rolha e papel alumínio. O equipamento utilizado foi um banho ultrassônico (UNIQUE - USC 1800 A), com 40 KHz de frequência, 120 W de potência, mantido a 30°C durante 90 min em triplicata (Figura 20). Após este tempo, o extrato foi filtrado a vácuo,

concentrado em evaporador rotatório até peso constante, colocado em frasco âmbar sob refrigeração até as análises cromatográficas<sup>41-44</sup>.



**Figura 22.** Extração por ultrassom das inflorescências da marcela.

### 3.8. Extração com sonda ultrassônica

Foram pesados 5 g de inflorescências de marcela coletadas em 2008, colocados em um bécker de 1 L e, submetidos a extração com sonda ultrassônica (SONICS VIBRACELL), amplitude 27%, processador ultrassônico potência 500 W (Figura 21), com 250 mL de hexano ou etanol (proporção 1:50), durante 1h e 30 min (com intervalos de 5 min a cada 30 min), em triplicata. Após este tempo, o extrato foi filtrado a vácuo concentrado em evaporador rotatório até peso constante, colocado em frasco âmbar sob refrigeração até as análises cromatográficas<sup>42</sup>.



**Figura 23.** Extração com sonda ultrassônica das inflorescências da marcela.

### 3.9. Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID)

As análises cromatográficas foram realizadas no equipamento GC/FID (Schimadzu 2014), equipado com um detector de ionização em chama utilizando-se de uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ), e a seguinte programação de temperatura: o forno a 60°C aquecendo a uma taxa de 3°C  $\text{min}^{-1}$ , até 250°C, depois a 10°C  $\text{min}^{-1}$  até 280°C, permanecendo por 20 min; temperaturas do injetor e detector a 280°C; razão split 1:10; gás de arraste  $\text{N}_2/\text{ar}$  sintético (89,8 kPa). As soluções dos extratos foram preparadas a 1000  $\text{mg L}^{-1}$  e as soluções dos padrões de *n*-alcanos, a 100  $\text{mg L}^{-1}$ , em hexano, sendo injetados 1  $\mu\text{L}$  de cada. Os constituintes químicos foram identificados por comparação do índice de retenção de Kovats, utilizando-se uma solução padrão de hidrocarbonetos  $\text{C}_9$  a  $\text{C}_{24}$  e, com dados da literatura<sup>55</sup>.

### 3.10. Cromatografia gasosa acoplado com espectrometria de massas (GC/MS)

As análises cromatográficas foram realizadas num cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MS - Shimadzu QP 2010 plus), equipado com duas colunas capilares, uma de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) e outra de polietilenoglicol, Carbowax HP 20M (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ). Com a coluna DB-5 foi usada a mesma programação do GC/FID e com a Carbowax a programação foi a seguinte: iniciando em 40°C, aquecendo a 3°C  $\text{min}^{-1}$  até 220°C, permanecendo por 20 min, a interface permaneceu 280°C; razão de split 1:10; gás de arraste He (57,5 kPa); fluxo 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ ; energia de ionização 70 eV. As soluções dos extratos analisados e o volume injetado foram os mesmos utilizados na análise do GC/FID. Os constituintes químicos foram identificados por comparação de seus espectros de massas com aqueles das bibliotecas Wiley e NIST do equipamento. O óleo essencial da marcela coletada em 2008 foi analisado

num equipamento GC/MS – Shimadzu 5050A, mas mantendo a mesma programação e usando também as mesmas colunas capilares.

## ***Capítulo 4***

### ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

#### 4.1. Teor de umidade

A média do teor de umidade foi determinada em 7,8%, realizado em triplicata. Este valor se encontra dentro do estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO), para drogas vegetais. Tendo como matriz as flores, o resultado encontra-se adequado, visto que uma porcentagem de umidade superior pode causar deterioração por contaminação bacteriana e transformações químicas.

#### 4.2. Rendimento da hidrodestilação

O óleo extraído apresentou-se com aspecto viscoso, de cor amarelo claro, conforme a Figura 24. Os volumes dos óleos essenciais das amostras de marcela coletadas em abril de 2008 e de 2009, obtidos por hidrodestilação, foram respectivamente  $0,12 \pm 0,02$  mL e  $0,15 \pm 0,01$  mL, representando um rendimento de  $0,46 \pm 0,08\%$  e  $0,54 \pm 0,08\%$  (v/p) em base seca.



**Figura 24.** Detalhe do óleo essencial extraído por Clevenger

Pode-se observar que não houve variação significativa na quantidade de óleo obtido para as duas amostras, indicando que na mesma época de floração o rendimento do óleo não sofreu alteração de um ano para outro.

Gillij e colaboradores<sup>16</sup> extraíram o óleo essencial da *Achyrocline satureioides* Lam DC. com a finalidade de investigar a ação repelente, sem descrever o rendimento do óleo. Entretanto, Retta e colaboradores<sup>6</sup> analisando o óleo essencial de outra espécie de *Achyrocline* (*Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC.) coletada na Argentina, encontraram uma avaliação semelhante em rendimento (0,1 a 0,8% v/p em base seca).

### 4.3. Rendimento das extrações com solventes orgânicos

#### 4.3.1. Extração com hexano

Os rendimentos dos extratos das amostras de marcela coletadas em abril de 2008, obtidos por maceração, Soxhlet, banho e sonda ultrassônicos são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Rendimento em massa (g) dos extratos obtidos na extração com hexano das inflorescências da marcela coletas em 2008.

<b>Tipo de extração</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Média</b>	<b>DPR</b>
Maceração	0,253 g	0,251 g	0,279 g	0,261 g	5,985
Soxhlet	0,298 g	0,284 g	0,264 g	0,282 g	6,056
Banho Ultrassônico	0,161 g	0,154 g	0,149 g	0,155 g	3,897
Sonda Ultrassônica	0,139 g	0,127 g	0,149 g	0,138 g	7,963

1,2,3=triplicata; DPR=desvio padrão relativo

Observando-se os resultados apresentados na Tabela 3, verificou-se que a extração por Soxhlet obteve um maior rendimento em relação a todos os outros métodos. Entre o Soxhlet e a maceração a diferença entre os rendimentos não foi significativa, como também entre o banho e a sonda ultrassônicos, apesar de que estes dois últimos métodos tiveram uma diferença bem significativa em relação aos dois primeiros.

No levantamento bibliográfico realizado não foi encontrado nenhum trabalho da marcela com extrato hexânico, portanto, não foi possível uma comparação de trabalhos com o mesmo material vegetal e solvente extrativo. Em relação a outras plantas, Rodrigues<sup>38</sup> comparou os métodos extrativos maceração, Soxhlet e banho ultrassônico da manjerona e orégano com hexano e obteve um rendimento maior para o Soxhlet em comparação aos outros métodos.

Para Melecchi e colaboradores<sup>42</sup>, também foi obtido um rendimento maior para extração das flores do *Hibiscus tiliaceus* (L.) utilizando Soxhlet em comparação com ultrassom, maceração, fluido supercrítico e líquido pressurizado com hexano como solvente extrativo.

Em outro estudo, Jacques e colaboradores<sup>41</sup> realizaram uma comparação de rendimento dos extratos das folhas da *Ilex paraguariensis* (erva-mate) extraídas por maceração e ultrassom com hexano, demonstrando o primeiro método ter um maior rendimento em relação ao segundo.

Estes resultados demonstram concordância com o rendimento encontrado para *Achyrocline satureioides* (Lam), utilizando os métodos descritos e também o hexano como solvente extrativo.

#### 4.3.2. Extração com etanol

Os rendimentos dos extratos das amostras de marcela coletadas em abril de 2008, obtidos por maceração, Soxhlet, banho e sonda ultrassônicos com etanol são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Rendimento em massa (g) dos extratos obtidos na extração com etanol das inflorescências de marcela coletas em 2008.

<b>Tipo de extração</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>Média</b>	<b>DPR</b>
Maceração	0,606 g	0,644 g	0,588 g	0,613 g	4,666
Soxhlet	1,129 g	0,996 g	1,059 g	1,061 g	6,269
Banho Ultrassônico	0,306 g	0,334 g	0,312 g	0,317 g	4,646
Sonda Ultrassônica	0,375 g	0,364 g	0,325 g	0,355 g	7,408

1,2,3=triplicata; DPR=desvio padrão relativo

De acordo com os resultados, verificou-se que, do mesmo modo, a extração por Soxhlet obteve um rendimento superior aos outros métodos utilizando etanol como solvente extrativo. Comparando-se o Soxhlet à maceração, observa-se quase

o dobro de rendimento do primeiro em relação ao segundo, demonstrando uma diferença significativa na extração dos constituintes químicos. Igualmente ocorreu entre a maceração e a sonda ultrassônica, sendo o primeiro mais eficiente que o segundo. Em relação à extração entre banho e sonda ultrassônicos, nota-se que não houve diferença significativa, e diferentemente da extração com hexano, o banho ultrassônico obteve um rendimento inferior a todos os outros.

Alguns autores que estudaram a *A. saturoioides* (Lam) realizaram a extração com etanol e verificaram o rendimento e a concentração dos constituintes. Um exemplo é o trabalho de Pereira e colaboradores<sup>17</sup> que estudaram a extração com etanol das folhas da marcela, utilizando centrífuga, Soxhlet, hidrodestilação, ultrassom, extração com fluido supercrítico e à baixa pressão. Obtiveram um maior rendimento para extração à baixa pressão, seguido por Soxhlet, comprovando que este método pode não ser o melhor na extração dos constituintes químicos das folhas da marcela, mas se mostra eficiente na obtenção de rendimentos elevados para esta planta.

Ruffa e colaboradores<sup>27</sup> analisaram o rendimento de 5 g das inflorescências da marcela extraídas com 40 mL de metanol (proporção 1:8) e obtiveram um rendimento cerca de 6 vezes menor através da extração por maceração, portanto, muito inferior ao encontrado neste trabalho. Este resultado comprova que a quantidade de solvente utilizada é relevante, pois pode-se retirar mais substâncias químicas com maior quantidade de líquido extrator. Mesmo sendo o metanol um pouco mais polar que o etanol demonstra que a pouca diferença de polaridade não é significativa para uma maior extração destas substâncias.

Em relação a outras plantas, Rodrigues<sup>38</sup> analisou o rendimento dos extratos obtidos por maceração, Soxhlet e banho ultrassônico da manjerona e orégano com etanol e igualmente comprovou maior rendimento para o método de Soxhlet.

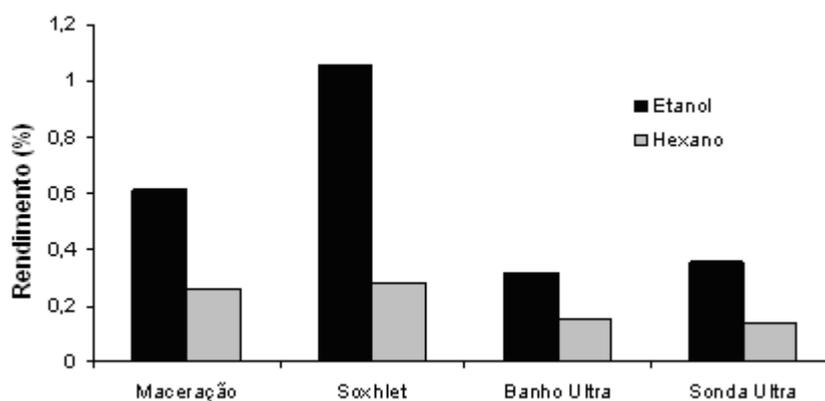
#### **4.3.3. Considerações gerais em relação aos métodos extrativos e aos solventes orgânicos utilizados**

Deve-se levar em consideração uma série de fatores para extração de substâncias quando se utiliza plantas, tais como: características do material vegetal (folha, flor, raiz...), o seu grau de divisão, o meio extrator (solvente) e a metodologia extrativa. Além disso, de acordo com a finalidade do extrato, deve-se avaliar o objetivo e a eficiência da extração, a estabilidade das substâncias extraídas e o custo do método<sup>9</sup>.

No processo extrativo leva-se em conta a agitação, a temperatura e o tempo de extração que também dependem, em grande parte, de fenômenos de difusão e de renovação do solvente em contato com as substâncias a dissolver, visto que, estes fatores desempenham um papel de grande influência na velocidade da dissolução<sup>9</sup>.

O tempo de extração pode variar em função da rigidez do tecido do material vegetal e do seu estado de divisão, da natureza das substâncias a extrair, do solvente, temperatura e agitação. Igualmente, a temperatura é de grande importância, pois provoca um aumento da solubilidade de qualquer substância, motivo pelo qual os métodos de extração a quente são sempre mais rápidos do que aqueles realizados à temperatura ambiente, desde que as substâncias não sejam instáveis em altas temperaturas<sup>9</sup>.

Na Figura 25 encontra-se a comparação dos rendimentos obtidos com todos os métodos extrativos e os solventes orgânicos utilizados.



**Figura 25.** Comparação entre os métodos maceração, Soxhlet, banho e sonda ultrassônicos, utilizando etanol e hexano.

Com relação ao solvente orgânico utilizado pode-se observar um rendimento maior na extração com etanol comparado ao hexano para todos os métodos estudados. Isto se justifica pela maior polaridade em relação ao hexano, pois, um grande número de constituintes presentes na marcela possui afinidade com este solvente, como as classes dos flavonóides, pigmentos, ceras, taninos, inclusive substâncias sem interesse farmacológico.

A pouca diferença de rendimento encontrado entre os métodos de Soxhlet e maceração utilizando hexano como solvente extrativo, provavelmente, é porque este solvente é totalmente apolar e não extrai muito mais substâncias da planta e, que mesmo empregando o fator temperatura, no caso da extração por Soxhlet, este não teve uma influência muito maior para extração. Outro fator pode ter sido devido ao solvente permanecer em contato com a planta por mais tempo e, considerando o tipo de material vegetal (inflorescências), que é uma estrutura frágil e muito permeável, não necessita de condições drásticas para extração, sendo a maceração suficiente para extrair as substâncias com afinidade ao hexano, não necessitando da temperatura, que pode promover a degradação dos constituintes da planta e favorecer a formação de artefatos.

A diferença significativa entre banho e sonda ultrassônico em relação aos outros métodos para os dois solventes extrativos, demonstra que estes não foram eficientes na extração da planta, pois um fator que pode ter causado a influência no processo é o tempo de extração. Segundo Hemwiimol e colaboradores<sup>43</sup>, a comparação entre maceração e banho ultrassônico comprovou-se mais eficiente para o segundo método devido ao fato da execução um tempo de 90 min, bem inferior, para maceração e de tempo igual para ultrassom. Além disso, os autores utilizaram as raízes da *Morinda citrifolia* para o estudo, que é um material vegetal mais resistente e não tão permeáveis como as inflorescências, tendo as condições do ultrassom uma influência significativa.

Yang e colaboradores<sup>44</sup> estudaram maceração e banho ultrassônico e obtiveram um rendimento superior ao segundo método, devido à renovação do solvente no banho ultrassônico, o qual usou 3 tempos de 30 min e apenas 6 h para maceração.

Na comparação entre os métodos banho e sonda ultrassônicos, estes não tiveram uma diferença significativa indicando que, neste estudo, a sonda não teve influência no processo extrativo. O que se pode notar é um rendimento um pouco maior da sonda em relação ao banho apenas para extração com etanol, demonstrando que houve uma pequena diferença na capacidade extrativa devido ao tipo de solvente empregado, sendo influenciado pelo método de extração.

#### **4.4. Análise cromatográfica**

##### **4.4.1. Extração por hidrodestilação**

O óleo essencial obtido, tanto na amostra de marcela coletada em 2008 quanto na amostra de 2009, apresentaram o mesmo perfil químico na análise cromatográfica em GC/MS e em GC/FID. A Tabela 5 apresenta a relação dos principais constituintes químicos identificados com base nos padrões de *n*-alcanos (C9-C24) visando a determinação do Índice de Kovats em coluna DB-5 no GC/FID e colunas DB-5 e Carbowax no GC/MS, confirmando estas substâncias com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley e NIST.

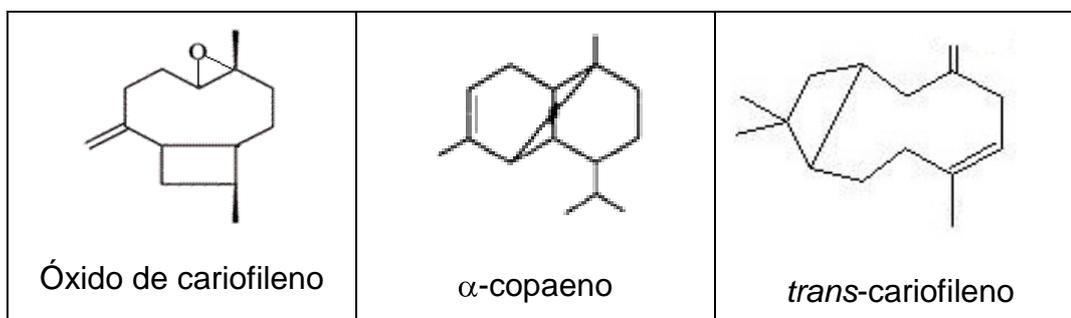
A concentração das substâncias encontradas na amostra de marcela foi calculada em relação à área normalizada dos picos. Essa concentração não é expressa em massa, mas sim porcentagem em área.

**Tabela 5.** Relação das substâncias identificadas no óleo essencial obtidos por hidrodestilação da amostra de marcela coletada em 2008 e 2009, submetidos à GC/MS e GC/FID.

Pico	Substância*	FM	T retenção (min)		IK calculado		IK literatura	C (%)		Similaridade (%)	
			1	2	1	2		1	2	1	2
			1	$\alpha$ -copaeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	21,97	21,94	1379	1379	1377	12,56
2	<i>trans</i> -cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	23,83	23,73	1422	1423	1419	12,37	23,18	95	96
3	aromadendreno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	24,63	24,52	1442	1442	1441	3,66	4,71	91	96
4	$\alpha$ -humuleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	25,23	25,11	1457	1457	1455	7,60	9,26	96	94
5	alloaromadendreno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	25,53	25,41	1464	1464	1460	2,22	2,88	92	92
6	germacreno-D	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	26,15	26,05	1479	1479	1485	5,07	2,69	90	90
7	$\beta$ -selineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	26,57	26,43	1490	1489	1490	4,46	2,06	90	90
8	$\alpha$ -muuroleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	27,11	26,79	1503	1503	1500	3,35	2,02	90	90
9	$\gamma$ -cadineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	27,67	27,54	1517	1517	1514	5,87	3,35	90	92
10	$\delta$ -cadineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	28,02	27,91	1526	1526	1523	3,66	2,81	86	82
11	óxido de cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	30,42	30,21	1587	1587	1583	39,19	29,60	92	94

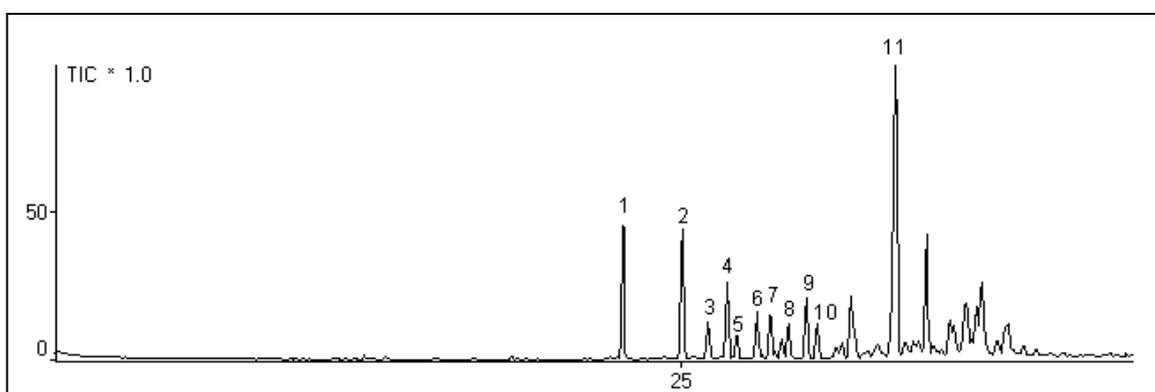
\* Substâncias identificadas com base nos padrões cromatográficos de *n*-alcanos (C9-C24) no GC/FID em coluna DB-5 e, confirmadas com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley e NIST do GC/MS; C%: Concentração calculada em relação à área normalizada; IK: Índice de Kovats; 1: amostra coletada em 2008; 2: amostra coletada em 2009.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 5 pode-se notar a presença somente de hidrocarbonetos sesquiterpenos e apenas um sesquiterpeno oxigenado (óxido de cariofileno). As estruturas químicas das principais substâncias estão apresentadas na Figura 26.



**Figura 26.** Estruturas químicas dos principais constituintes encontrados no óleo essencial da marcela.

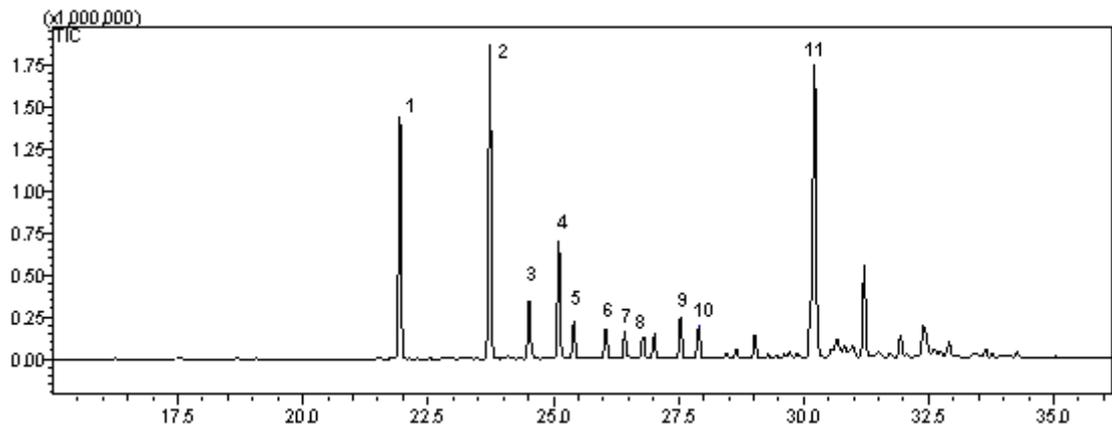
Observando-se o cromatograma do óleo essencial, via GC/MS da amostra 1 (Figura 27), o constituinte majoritário é o óxido de cariofileno, seguido do  $\alpha$ -copaeno e *trans*-cariofileno.



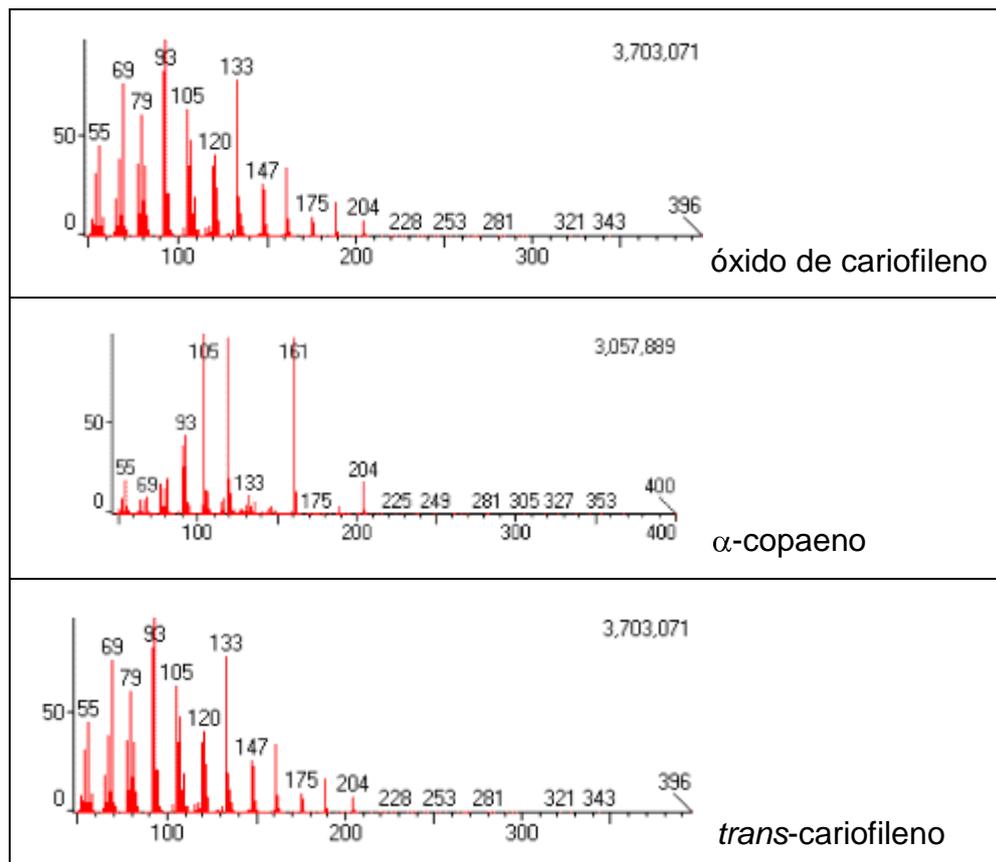
**Figura 27.** Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB5, do óleo essencial da marcela, coletada em 2008. Condições de análise: 60°C - 3°C min<sup>-1</sup> - 250°C - 10°C min<sup>-1</sup> - 280°C (20 min). Identificação dos picos: ver Tabela 5.

Para a amostra 2 (Figura 28), igualmente o constituinte majoritário é o óxido de cariofileno, seguido pelo *trans*-cariofileno e  $\alpha$ -copaeno. As diferenças que se observam nas concentrações em área, provavelmente são devido ao fato que as amostras foram analisadas em equipamentos diferentes, pois não são significativas.

A Figura 28 apresenta os espectros de massas das principais substâncias encontradas no óleo essencial da marcela.



**Figura 28.** Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB5, do óleo essencial da marcela, coletada em 2009. Condições de análise: 60°C - 3°C min<sup>-1</sup> - 250°C - 10°C min<sup>-1</sup> - 280°C (20 min). Identificação dos picos: ver Tabela 5.



**Figura 29.** Espectro de massas dos principais constituintes químicos encontrados no óleo essencial da marcela analisados por GC/MS, coluna DB-5. Condições de análise: 60°C - 3°C min<sup>-1</sup> - 250°C - 10°C min<sup>-1</sup> - 280°C (20 min). Identificação dos picos: ver Tabela 5.

Estes resultados não estão de acordo com os encontrados para Gillij e colaboradores<sup>16</sup> que relatam o estudo do óleo essencial das inflorescências da marcela com o objetivo de investigar a repelência aos mosquitos. Foi encontrado, como constituinte majoritário, o *trans*-cariofileno e cerca de 3 vezes menor, o  $\alpha$ -copaeno, sendo o óxido de cariofileno encontrado em uma concentração cerca de 26 vezes menor do que o primeiro substância. Além disso, não foram encontrados os sesquiterpenos allo-aromadendreno, germacreno-D,  $\alpha$ -muuroleno e  $\beta$ -selineno.

Em comparação com o trabalho de Retta e colaboradores<sup>6</sup>, os constituintes majoritários de outra espécie do Gênero *Achyrocline*, a *Achyrocline flaccida* (Weinm.), foram  $\alpha$ -pineno, após,  $\beta$ -cariofileno com cerca de metade da concentração do primeiro. O óxido de cariofileno, constituinte principal da *A. satureiodes* (Lam) neste estudo, foi encontrado em torno de 100 vezes menor do que a primeira substância.

Essa diferença entre os constituintes está associada a fatores como sazonalidade, ciclo de crescimento vegetativo, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes do solo, altitude, poluição atmosférica, indução por estímulos mecânicos e o ataque de patógenos, além da localização geográfica e tempo de colheita<sup>56</sup>.

#### 4.4.2. Extração por maceração com hexano

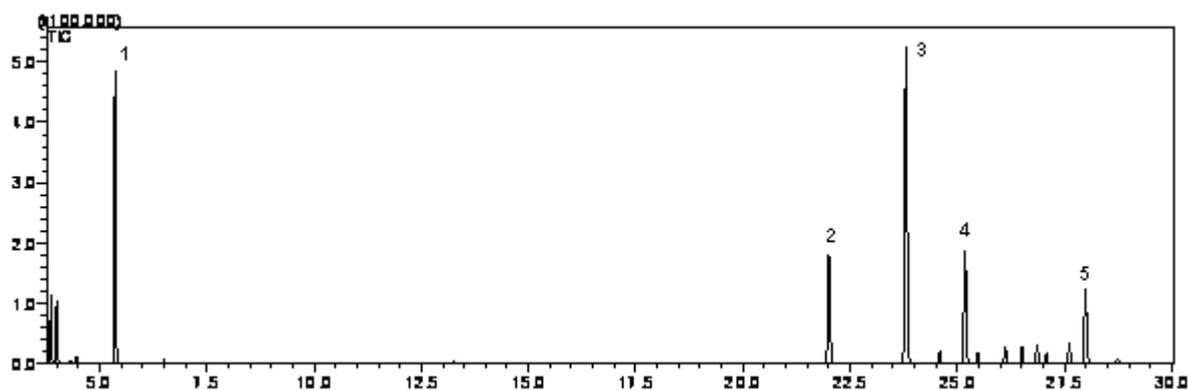
A Tabela 6 apresenta a relação dos principais constituintes encontrados na amostra de marcela coletada em 2008 extraídos por maceração com hexano. Esses constituintes foram identificados com base nos padrões de *n*-alcanos (C9-C24) visando à determinação do Índice de Kovats em coluna DB-5 no GC/FID e colunas DB-5 e Carbowax no GC/MS, confirmando estas substâncias com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley e NIST. A concentração das substâncias encontradas na amostra de marcela foi calculada em relação à área normalizada dos picos, expressa em porcentagem em área.

**Tabela 6.** Relação das substâncias identificadas no extrato da marcela coletado em 2008, obtidos por maceração, submetidos à GC/FID e GC/MS.

Pico	T retenção (min)	IK calculado	IK Adams	C (%)	Substância*	FM	Similaridade
1	5,36	934	939	22,87	$\alpha$ -pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	96%
2	22,00	1378	1377	13,30	$\alpha$ -copaeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	94%
3	23,80	1422	1419	40,12	<i>trans</i> -cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	95%
4	25,18	1457	1455	14,25	$\alpha$ -humuleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	95%
5	27,98	1526	1523	9,46	$\delta$ -cadineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	90%

\* Substâncias identificadas com base nos padrões cromatográficos de *n*-alcanos (C9-C24) no GC/FID em coluna DB-5 e, confirmadas com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley e NIST do GC/MS; C%: Concentração calculada em relação à área normalizada; IK: Índice de Kovats.

Observando-se os resultados da Tabela 6 verifica-se a presença de hidrocarbonetos sesquiterpenos e um monoterpene ( $\alpha$ -pineno). A Figura 30 apresenta o cromatograma via GC/MS da amostra de marcela extraída por maceração com hexano, coletada em 2008, cujo constituinte majoritário é o *trans*-cariofileno (40,12%), seguido do  $\alpha$ -pineno (22,87%).



**Figura 30.** Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB-5, do extrato obtido por maceração com hexano da amostra de marcela, coletada em 2008. Condições de análise: 60°C - 3°C min<sup>-1</sup> - 250°C - 10°C min<sup>-1</sup> - 280°C (20 min). Identificação dos picos: ver Tabela 6.

No estudo realizado não foi encontrado nenhum trabalho referente à extração por maceração utilizando hexano como solvente extrativo com o objetivo de identificação dos constituintes para nenhuma espécie de *Achyrocline*, portanto, não foi possível uma comparação.

#### 4.4.3. Extração por Soxhlet com hexano

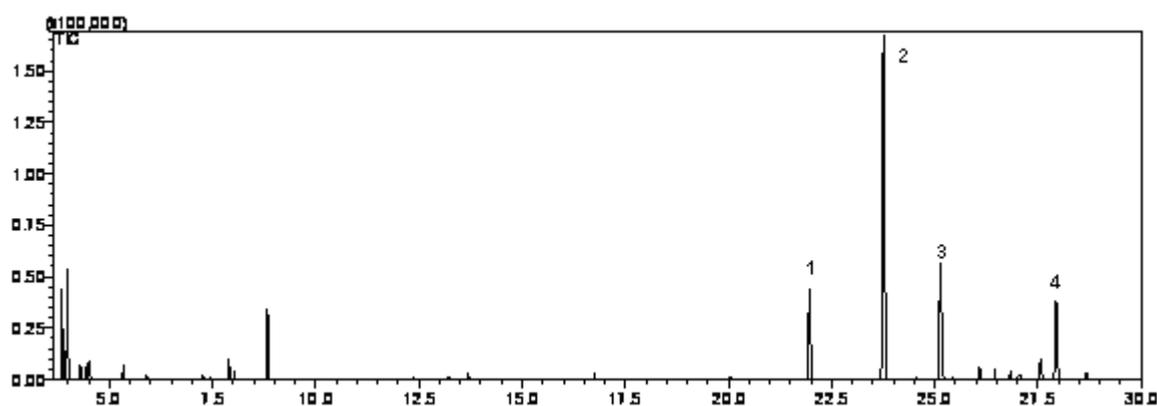
A relação dos principais constituintes encontrados na amostra de marcela coletada em 2008, extraídos por Soxhlet com hexano, estão apresentados na Tabela 7. Esses constituintes foram identificados com base nos padrões de *n*-alcanos (C9-C24) visando à determinação do Índice de Kovats em coluna DB-5 no GC/FID e colunas DB-5 e Carbowax no GC/MS, confirmando estas substâncias com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley e NIST. A concentração das substâncias encontradas na amostra de marcela foi calculada em relação à área normalizada dos picos, expressa em porcentagem em área.

**Tabela 7.** Relação das substâncias identificadas no extrato obtido por Soxhlet com hexano da amostra de marcela, coletada em 2008.

Pico	T retenção (min)	IK calculado	IK Adams	C (%)	Substância*	FM	Similaridade
1	21,96	1378	1377	13,47	$\alpha$ -copaeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	90%
2	23,75	1422	1419	56,69	<i>trans</i> -cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	92%
3	25,13	1457	1455	18,01	$\alpha$ -humuleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	90%
4	27,94	1526	1523	11,83	$\delta$ -cadineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	85%

\* Substâncias identificadas com base nos padrões cromatográficos de *n*-alcanos (C9-C24) no GC/FID em coluna DB-5 e, confirmadas com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley e NIST do GC/MS; C%: Concentração calculada em relação à área normalizada; IK: Índice de Kovats.

Pode-se observar na Tabela 7 que os constituintes encontrados foram apenas hidrocarbonetos sesquiterpenos. A Figura 31 apresenta o cromatograma via GC/MS da amostra de marcela extraída por Soxhlet com hexano, coletada em 2008, cujo constituinte majoritário é o *trans*-cariofileno (56,69%), seguido do  $\alpha$ -humuleno (18,01%).



**Figura 31.** Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB-5, do extrato obtido por Soxhlet com hexano da amostra de marcela, coletada em 2008. Condições de análise: 60°C - 3°C min<sup>-1</sup> - 250°C - 10°C min<sup>-1</sup> - 280°C (20 min). Identificação dos picos: ver Tabela 7.

No estudo realizado não foi encontrado nenhum trabalho referente à extração por Soxhlet, utilizando hexano como solvente extrativo com o objetivo de identificação dos constituintes para nenhuma espécie de *Achyrocline*, portanto, não foi possível uma comparação.

#### 4.4.4. Extração por banho ultrassônico com hexano

A relação dos principais constituintes encontrados na amostra de marcela coletada em 2008, extraídos por banho ultrassônico com hexano, estão apresentados na Tabela 8. Esses constituintes foram identificados com base nos padrões de *n*-alcanos (C9-C24) visando à determinação do Índice de Kovats em coluna DB-5 no

GC/FID e colunas DB-5 e Carbowax no GC/MS, confirmando estas substâncias com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley e NIST.

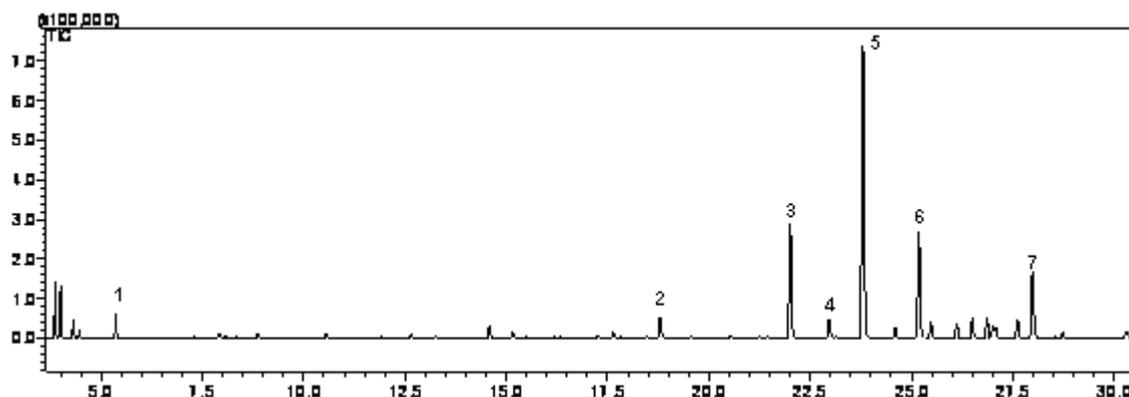
A concentração encontrada na amostra de marcela foi calculada em relação à área normalizada dos picos, expressa em porcentagem em área.

**Tabela 8.** Relação das substâncias identificadas no extrato obtido por banho ultrassônico com hexano para amostra de marcela, coletada em 2008.

Pico	T retenção (min)	IK calculado	IK Adams	C (%)	Substância*	FM	Similaridade
1	5,36	934	939	2,05	$\alpha$ -pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	92%
2	18,80	1300	1300	3,01	tridecano	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	92%
3	22,00	1379	1377	17,64	$\alpha$ -copaeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	93%
4	22,97	1400	1400	2,77	tetradecano	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	92%
5	23,80	1423	1425	47,11	<i>trans</i> -cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	96%
6	25,18	1457	1455	16,61	$\alpha$ -humuleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	96%
7	27,98	1526	1523	10,81	$\delta$ -cadineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	91%

\* Substâncias identificadas com base nos padrões cromatográficos de *n*-alcanos (C9-C24) no GC/FID em coluna DB-5 e, confirmadas com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley e NIST do GC/MS; C%: Concentração calculada em relação à área normalizada; IK: Índice de Kovats.

Pode-se observar na Tabela 8 que os constituintes encontrados foram hidrocarbonetos sesquiterpenos e um monoterpeneo ( $\alpha$ -pineno), além de 2 hidrocarbonetos saturados (C<sub>13</sub> e C<sub>14</sub>). A Figura 32 apresenta o cromatograma via GC/MS da amostra de marcela extraída por banho ultrassônico com hexano, coletada em 2008, cujo constituinte majoritário é o *trans*-cariofileno (47,11%), seguido do  $\alpha$ -copaeno (17,64%).



**Figura 32.** Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB-5, do extrato obtido por banho ultrassônico com hexano da amostra de marcela, coletada em 2008. Condições de análise: 60°C - 3°C min<sup>-1</sup> - 250°C - 10°C min<sup>-1</sup> - 280°C (20 min). Identificação dos picos: ver Tabela 8.

No estudo realizado não foi encontrado nenhum trabalho referente à extração por banho ultrassônico utilizando hexano como solvente extrativo com o objetivo de identificação dos constituintes para nenhuma espécie de *Achyrocline*, portanto, não foi possível uma comparação.

#### 4.4.5. Extração por sonda ultrassônica com hexano

A relação dos principais constituintes encontrados na amostra de marcela coletada em 2008, extraídos por sonda ultrassônica com hexano, estão apresentados na Tabela 27. Esses constituintes foram identificados com base nos padrões de *n*-alcanos (C9-C24) visando à determinação do Índice de Kovats em coluna DB-5 no GC/FID e colunas DB-5 e Carbowax no GC/MS, confirmando estas substâncias com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley e NIST.

A concentração das substâncias encontradas na amostra de marcela foi calculada em relação à área normalizada dos picos, expressa em porcentagem em área.

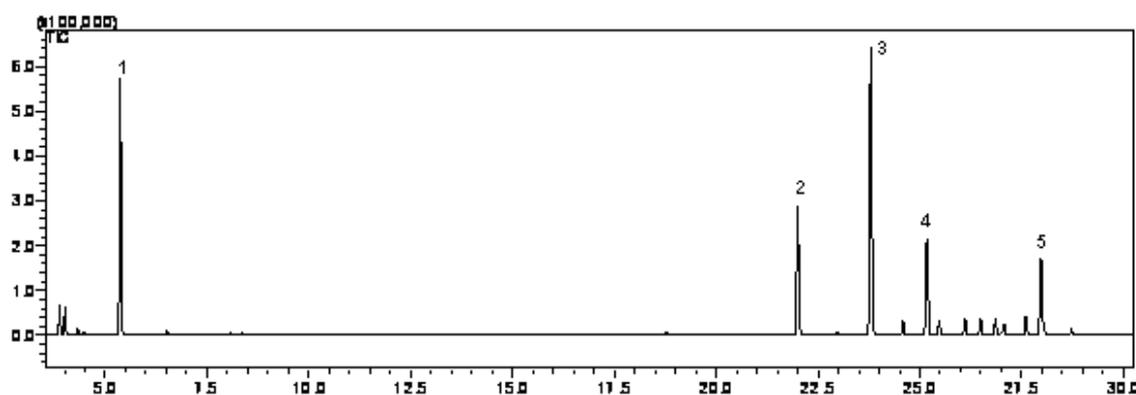
A Tabela 9 apresenta os constituintes encontrados como sendo hidrocarbonetos sesquiterpenos e apenas um monoterpreno ( $\alpha$ -pineno).

**Tabela 9.** Relação das substâncias identificadas no extrato obtido por sonda ultrassônica com hexano para a amostra de marcela, coletada em 2008.

Pico	T retenção (min)	IK calculado	IK Adams	C (%)	Substância*	FM	Similaridade
1	5,37	935	939	23,25	$\alpha$ -pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	93%
2	22,00	1379	1377	16,02	$\alpha$ -copaeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	95%
3	23,79	1422	1419	37,94	<i>trans</i> -cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	96%
4	25,17	1457	1455	12,73	$\alpha$ -humuleno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	96%
5	27,98	1526	1523	10,06	$\delta$ -cadineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	92%

\* Substâncias identificadas com base nos padrões cromatográficos de n-alcacos (C9-C24) no GC/FID em coluna DB-5 e, confirmadas com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley e NIST do GC/MS; C%: Concentração calculada em relação à área normalizada; IK: Índice de Kovats.

Na Figura 33 está representado o cromatograma via GC/MS da amostra de marcela extraída por banho ultrassônico com hexano, coletada em 2008.



**Figura 33.** Cromatograma do íon total (TIC) obtido via GC/MS, coluna DB-5, do extrato obtido por sonda ultrassônica com hexano da amostra de marcela, coletada em 2008. Condições de análise: 60°C - 3°C min<sup>-1</sup> - 250°C - 10°C min<sup>-1</sup> - 280°C (20 min). Identificação dos picos: ver Tabela 9.

Observando-se o cromatograma da Figura 33, verifica-se que o constituinte majoritário é o *trans*-cariofileno (37,94%), seguido do  $\alpha$ -pineno (23,25%).

No estudo realizado não foi encontrado nenhum trabalho referente à extração por sonda ultrassônica utilizando hexano como solvente extrativo com o objetivo de identificação dos constituintes para nenhuma espécie de *Achyrocline*, portanto, não foi possível uma comparação.

#### **4.4.6. Consideração geral da análise cromatográfica em relação aos métodos extrativos**

As condições ambientais, como temperatura, luminosidade, sazonalidade e umidade relativa atuam diretamente em processos como a fotossíntese e a respiração, podendo influenciar indiretamente a produção de metabólitos secundários, alterando a composição e concentração dos constituintes das plantas. Outros fatores também podem influenciar na composição química dos extratos, tais como: tipo de cultivo, ciclo de crescimento vegetativo, a disponibilidade hídrica, a radiação ultravioleta, os nutrientes do solo, a altitude, a poluição atmosférica, além da localização geográfica, tempo de colheita<sup>56</sup>.

Além disso, as plantas respondem diferentemente às condições ambientais que lhe são impostas, através de mecanismos de controle da rota biossintética, podem favorecer a produção de determinados constituintes, dependendo de suas necessidades<sup>56</sup>.

Contudo, o óleo essencial da marcela coletada em 2008 (amostra 1) apresentou grande semelhança em relação ao óleo da amostra de marcela coletado em 2009 (amostra 2). Pode-se notar uma pequena diferença apenas na concentração dos constituintes como, por exemplo, o *trans*-cariofileno com 12,37% na amostra 1 e 23,18% na amostra 2; e óxido de cariofileno com 39,19% na amostra 1 e 29,60% na amostra 2.

O óxido de cariofileno foi encontrado somente na extração por hidrodestilação, isto é possível devido ao fato do vapor d'água possibilitar a maior difusão através das membranas do material vegetal e, desse modo, extrair a substância oxigenada.

Os extratos cromatografados foram apenas os hexânicos, visto que, os metanólicos apresentam grande polaridade de seus constituintes, havendo a necessidade do procedimento de derivatização das amostras.

Os resultados observados nos cromatogramas de cada análise, com o solvente hexano, demonstram grande similaridade em relação aos constituintes químicos extraídos das inflorescências da *A. saturoioides* (Lam). Na Tabela 10 estão os compostos identificados por cada tipo de processo extrativo.

**Tabela 10.** Relação dos compostos identificados nos extratos da marcela obtidos por maceração, Soxhlet, banho e sonda ultrassônicos submetidos à GC/FID e GC/MS.

Composto*	Maceração (C%)	Soxhlet (C %)	Banho ultra. (C%)	Sonda ultra. (C%)
$\alpha$ -pineno	22,87	----	2,05	23,25
tridecano	----	----	3,01	----
$\alpha$ -copaeno	13,30	13,47	17,64	16,02
tetradecano	----	----	2,77	----
<i>trans</i> -cariofileno	40,12	56,69	47,11	37,94
$\alpha$ -humuleno	14,25	18,01	16,61	12,73
$\delta$ -cadineno	9,46	11,83	10,81	10,06

\* Compostos identificados com base nos padrões cromatográficos de n-alcenos (C9-C24) no GC/FID em coluna DB-5 e, confirmados com base nos espectros de massas da biblioteca Wiley e NIST do GC/MS; C%:Concentração calculada em relação à área normalizada.

Um exemplo é a presença de sesquiterpenos, onde a substância majoritária é o *trans*-cariofileno. No entanto, algumas diferenças podem ser notadas em

comparação aos métodos extrativos. Pode-se observar a existência de  $\alpha$ -pineno, um monoterpene, em todas as extrações, com exceção do método Soxhlet. Provavelmente, o aquecimento possa ter causado formação de reações secundárias, uma degradação ou a perda por volatilização desta substância, visto que, igualmente, no processo de hidrodestilação, o qual utiliza aquecimento, o  $\alpha$ -pineno também não foi encontrado.

## Capítulo 5

### CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados e discutidos nos capítulos anteriores, foram elaboradas as seguintes conclusões sobre o trabalho desenvolvido:

a) Pode-se concluir que as técnicas extrativas foram eficientes no que se refere à extração dos constituintes químicos das inflorescências da *Achyrocline satureioides* (Lam).

b) Com relação ao rendimento dos extratos, observou-se uma similaridade entre a extração do óleo essencial extraído das inflorescências coletadas em 2008 e 2009. As extrações realizadas com etanol obtiveram um rendimento superior as extrações com hexano.

c) O método extrativo Soxhlet mostrou-se mais eficiente na extração com hexano e com etanol em comparação aos demais métodos.

d) As substâncias químicas extraídas a partir da hidrodestilação no ano de 2008 e 2009 mostraram grande semelhança química, havendo variação apenas na concentração dos constituintes principais. Foram extraídas 11 substâncias, sendo o constituinte majoritário o óxido de cariofileno com concentração de 39,19 e 29,60 % respectivamente na amostra 1 e 2; após observou-se o  $\alpha$ -copaeno com 12,56% para a mostra 1 e o *trans*-cariofileno para a amostra 2 com 23,18%.

e) Sobre os métodos extrativos se observou que para maceração e sonda ultrassônica foram identificadas as substâncias  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -copaeno, *trans*-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e  $\delta$ -cadineno; para o método Soxhlet obteve-se  $\alpha$ -copaeno, *trans*-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\delta$ -cadineno; no banho ultrassônico foram identificadas as substâncias  $\alpha$ -copaeno, tridecano, *trans*-cariofileno, tetradecano,  $\alpha$ -humuleno e  $\delta$ -cadineno. Observou-se que apenas no método Soxhlet e banho ultrassônico não foi identificado o  $\alpha$ -pineno e, para este último método, foi possível a identificação de duas outras substâncias, o tridecano e o tetradecano.

f) Para todos os métodos extrativos com solvente orgânico, o constituinte majoritário foi o *trans*-cariofileno.

g) As ferramentas de identificação GC/FID e GC/MS mostraram-se eficientes na identificação dos constituintes químicos das inflorescências da *A. satureioides* (Lam), juntamente com o índice de Kovats.

## Capítulo 6

### REFERÊNCIAS

1. Hostettmann, K.; Queiroz, E.F.; Vieira, P.C.; *Princípios ativos de plantas superiores*, EDUFSCAR: São Carlos, 2003, 140 p.
2. Simões, C.M.; *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*, 5ª. ed; UFRGS: Porto Alegre, 1998, 152 p.
3. Matos, J.M.D.; Matos, M.E.O.; *Farmacognosia, curso teórico-prático*, UFC: Fortaleza, 1989, 256 p.
4. Matos, F.J.A.; *Introdução à fitoquímica experimental*, UFC: Fortaleza, 1997, 208 p.
5. Alice, C.B. et al.; *Plantas medicinais de uso popular: Atlas Farmacognóstico*, ULBRA: Canoas, 1995, 208p.
6. Retta, D.; Gattuso, M.; Gattuso, S.; Lira, P.D.L.; Baren, C.V.; Ferraro, G.; Bandoni, A.; *Biochemical Systematics and Ecology*, **2009**, 36.
7. Corrêa, M.P.; *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Ministério da Agricultura: São Paulo; 1984, V 5, 514 p.
8. Campos, J.M.; *Plantas que ajudam o homem. Guia prático para época atual*, Cultrix/Pensamento: São Paulo, 1991, 544 p.
9. Simões, C.M.O. et al.; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 4ª.ed.; UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 2002. 824 p.
10. Mota, F.M.; *Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. – Asteraceae – (“macela, macela”) como fator de proteção de zoonoses*, Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2008.
11. Site: <http://www.rain-tree.com/> acessado em fevereiro de 2011.
12. Gattuso, S.; Gattuso, M.; *Acta Farm. Bonaerense*, **1998**, 17, 4.
13. Silva, R.E.; Machado, R.; Ritter, M.R.; *Espécies de “Macela” utilizadas como medicinais no Rio Grande do Sul*, Instituto Anchieta de Pesquisas, UFRGS: Porto Alegre, 2007.
14. Robbers, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.E.; *Farmacognosia e Farmacobiotechnology*, Premier: São Paulo, 1997, 372 p.

15. Di Stasi, L.C.; *Plantas medicinais, arte e ciência - Um guia de estudo interdisciplinar*; UNESP: São Paulo, 1996, 230 p.
16. Gillij, Y.G.; Gleiser, R.M.; Zygadlo, J.A.; *Bioresource Technology*, **2008**, 99.
17. Pereira, C.G.; Gualtieri, I.P.; Meireles, M.A.A.; *Separation Science and Technology*, **2008**, 43.
18. Polydoro, M.; Souza, K.C.B.; Andrades, M.E.; Silva, E.G.; Bonatto, F.; Heydrich, J.; Dal-Pizzol, F.; Schapoval, E.E.S; Bassani, V.L.; Moreira, J.C.F; *Life Science*, **2004**, 74.
19. Arredondo, M.F.; Blasina, F.; Echeverry, C.; Morquio, A.; Ferreira, M.; Abin-Carriquiry, J.A.; Lafon, L.; Dajas, F.; *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 91.
20. Souza, K.C.B; schapoval, E.E.S.; Bassani, V.L.; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 28.
21. Sonaglio, D.; Petrovick, P.R.; Bassani, V.L.; *Caderno de Farmácia*, **1986**, 2.
22. Zampieron, R.F.G.; Vieira, M.C.; Siqueira, J.M.; *Revista Brasileira de farmacognosia*, **2009**, 19.
23. Ferraro, G.; Anesini, C.; Ouviaña, A.; Retta, D.; Filip, R.; Gattuso, M.; Gattuso, S.; Hnatyszyn, O.; Bandoni, A; *Latin American Journal of Pharmacy*, **2008**, 27, 4.
24. Morquio, A.; Megret, F.R.; Dajas, F.; *Phytotherapy Research*, **2005**, 19.
25. Desmarchelier, C; Coussio, J.; Ciccía, G.; *Brasílian Journal of Medical and Biological Research*, **1998**, 31, 9.
26. Rivera, F.; Gervaz, E.; Dajas, F.; *Journal of Ethnopharmacology*, **2004**, 95.
27. Ruffa, M.J.; Ferraro, G.; Wagner, M.L.; Calcagno, M.L.; Campos, R.H.; Cavallaro, L.; *Journal Ethnopharmacology*, **2002**, 79.
28. Fachinetto, J.M.; Bagatini, M.D. ; Durigon, J. ; Silva, A.C.F.; Tedesco, S.B.; *Revista Brasileira de Farmacologia*, **2007**, 17.
29. Hnatyszyn, O.; Moscatelli, V.; Rondina, R.; Costa, M.; Arranz, C.; Balaszczuk, A.; Coussio, J.; Ferraro, G.; *Phytomedicine*, **2004**, 11.
30. Langeloh, A.; Schenkel, E.P.; *Caderno de Farmácia*, **1985**, 1.
31. Simões, C.M.O.; Rech, N.; Lapa, A.J.; *Caderno de Farmácia*, **1986**, 2.
32. Dickel, M.L.; Rates, S.M.K.; Ritter, M.R.; *Journal of Ethnopharmacology*, **2007**, 109.

33. Simões, C.M.O.; Schenkel, e.P.; Bauer, L.; Langeloh, A.; *Journal of Ethnopharmacology*, **1988**, 22.
34. Souza, K.C.B.; Bassani, V.L.; Schapoval, E.E.S.; *Phytomedicine*, **2007**, 14.
35. Wiest, J.M.; Carvalho, H.H.C.; Avancini, C.A.M.; Gonçalves, A.R.; *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **2009**, 61.
36. Calvo, D.; Cariddi, L.N.; Grosso, M.; Demo, M.S.; Maldonado, A.M.; *Revista Latino Americana de Microbiologia*, **2006**, 48, 3-4.
37. Zanon, S.M.; Ceriatti, F.S.; Rovera, M.; Sabini, L.J.; Ramos, B.A.; *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, **1999**, 41.
38. Rodrigues, M.R.A.; **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**, Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.
39. Soares, B.G.; Souza, N.A. de; Pires, D.X.; *Química Orgânica, Teoria e Técnicas de Preparação, Purificação e Identificação de Compostos Orgânicos*, Editora Guanabara: Rio de Janeiro, **1988**, 65 p.
40. Araújo, J.M.A.; *Química de Alimentos – Teoria e Prática – Óleos Essenciais*; Ed. Impr. Univ. UFV: Viçosa, MG, **1995**.
41. Jacques, R.A.; Freitas, L.S.; Pérez, V.F.; Dariva, C.; Oliveira, A.P. ; Oliveira, J.V. ; Caramão, E.B.; *Ultrasonics Sonochemistry*, **2007**, 14.
42. Melecchi, M.I.S.; Pérez, V.F.; Dariva, C.; Zini, C.A.; Abad, F.C.; Martinez, M.M.; Caramão, E.B.; *Ultrasonics Sonochemistry*, **2006**, 13.
43. Hemwimol, S.; pavasant, P.; Shotipruk, A.; *Ultrasonics Sonochemistry*, **2006**, 13.
44. Yang, Y; Zhang, F.; *Ultrasonics Sonochemistry*, **2008**, 15.
45. Shinor, E.C.; Salvador, M.J.; Turatti, I.C.C.; Zucchi, O.L.A.D.; Dias, D.A.; *Ultrasonics Sonochemistry*, **2004**, 11.
46. Li, H.; Chen, B.; Yao, S.; *Ultrasonics Sonochemistry*, **2005**, 12.
47. Jerkovic, I. ; Mastelic ; J. ; Marijanovic, Z. ; Klein, Z. ; Jelic, M. ; *Ultrasonics Sonochemistry*, **2007**, 14.
48. Cosentino, M. ; Bombelli, R. ; Carcano, E. ; Luini, A.; Marino, F.; Crema, F.; Dajas, F.; Lecchini, S.; *Journal of Ethnopharmacology*, **2008**, 116.
49. Oliveira, A.L.; Padilha, C.D.; Ortega, G.G; Petrovick, P.R.; *Caderno de Farmácia*, **2001**, 17.

50. López, P.G.; Ferraro, G.E.; Broussalis, A.M.; *Acta Farm. Bonaerense*, **2006**, 25, 4.
51. Retta, D.S.; López, P.; Gattuso, M.; Gattuso, S.; Ferraro, G.; Bandoni, A.L.; *IX Simpósio Argentino y XII Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica*, Buenos Aires, Argentina, **2007**.
52. Peruchi, M.P.; Meireles, M.A.; *XIV Congresso Interno de Iniciação Científica/CNPQ*, Campinas, Brasil, 2006.
53. Mendham, J.; Denney, J.R.C.; Barnes, J.D.; Thomas, M.J.K.; *Vogel, Análise Química Qualitativa*, 6ª ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2002, 446 p.
54. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Fundamentos de Cromatografia*; UNICAMP: Campinas, **2006**, p.
55. Adams, R. P.; *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001, 456 p.
56. Alves, M.M.; *Avaliação da influência sazonal na composição química do óleo essencial de duas espécies do gênero Baccharis: B. articulata e B. trimera via cromatografia gasosa mono e bidimensional*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Brasil, 2010.
57. Farmacopéia Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2002.
58. Porto, D.A.; *Estudo dos constituintes químicos e propriedades farmacológicas da Maytenus ilicifolia Mart.*, Monografia de Especialização, Universidade Federal de Pelotas, Brasil, 2005.