

GRACIELA LEILA HEEP

**CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS E
FLORES DE *Senecio brasiliensis* (SPRENG.) LESS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Química Orgânica,
Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de
Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos
Co-orientadora: Profa. Dra. Beatriz H. L. de
Noronha Sales Maia

**CURITIBA
2007**

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve... e a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

Dedico este trabalho ao meu pai, Ataídes, e minha mãe, Eunice, que em nenhum momento mediram esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	II
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO.....	VIII
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – ÓLEOS ESSENCIAIS	2
1.2 – EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	4
1.2.1 – <i>Extração por Arraste a Vapor</i>	5
1.2.2 – <i>Extração por Fluido Supercritico</i>	7
1.3 – PRODUTOS NATURAIS DE <i>SENECIO SP.</i>	8
1.4 – <i>SENECIO BRASILIENSIS</i> (SPRENG.) LESS. (ASTERACEAE)	11
2 – OBJETIVOS.....	15
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 – MATERIAIS	16
3.2 – MÉTODOS	17
3.2.1 – <i>Extração</i>	17
3.2.1.1 – <i>Extração em Clevenger Convencional</i>	17
3.2.1.2 – <i>Extração em Larga Escala</i>	18
3.2.2 – <i>Cromatografia de Fase Gasosa</i>	20
3.2.2.1 – <i>Cromatografia de Fase Gasosa com Detecção de Ionização de Chama</i>	21
3.2.2.2 – <i>Cromatografia de Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas</i>	22
3.2.3 – <i>Identificação dos principais componentes presentes nos óleos essenciais</i>	22
3.2.4 – <i>Análises Físicas do Óleo Essencial – Densidade Relativa e Índice de Refração</i>	24
3.2.5 – <i>Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier</i>	25
3.2.6 – <i>Ensaio Biológicos - Atividade Antimicrobiana e Antifúngica</i>	25
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 – EXTRAÇÃO COM CLEVINGER CONVENCIONAL.....	27
4.2 – IDENTIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS E FLORES DE <i>S. BRASILIENSIS</i>	29
4.3 – CARACTERIZAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS E FLORES DE <i>S. BRASILIENSIS</i>	33
4.3.1 – <i>Caracterização do óleo essencial das folhas de S. brasiliensis</i>	34
4.3.2 – <i>Caracterização do óleo essencial obtido a partir das flores de S. brasiliensis</i>	38
4.4 – EFEITO DE SAZONALIDADE SOBRE O ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO A PARTIR DAS FOLHAS DE <i>S. BRASILIENSIS</i> COLETADAS TRIMESTRALMENTE.....	41
4.5 – ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E DO CAULE DE DIFERENTES ESPÉCIMES DE <i>S. BRASILIENSIS</i>	46
4.6 – AVALIAÇÃO DO ARMAZENAMENTO DAS FOLHAS SOBRE A COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	50
4.7 – EXTRATOR EM LARGA ESCALA	52
4.8 – ENSAIOS BIOLÓGICOS - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA	56
5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS 1	64
ESPECTROS DE MASSAS DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>S. BRASILIENSIS</i>.....	64

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais, Ataídes e Eunice, apenas por o serem; minha irmã Leonice, que sempre me incentivou e apoiou; minha sobrinha Gabriela, pelos momentos de grande alegria que proporciona.

Ao meu amigo, companheiro e confidente Leonardo, que mesmo estando longe durante estes dois anos, sempre esteve presente.

Ao professor Dr. Luiz Pereira Ramos, pela orientação, inestimável dedicação e determinação durante o decorrer de todo trabalho.

À professora Dra. Beatriz Helena L. N. Sales Maia, pela co-orientação, dedicação, paciência e compreensão.

Ao professor Aluízio de Abreu Marcondes, que sempre se mostrou prestativo na elucidação das mais variadas questões.

À Conceição de Fátima Alves Olguin, professora, orientadora e grande amiga, um exemplo a se seguir.

À Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA – UNICAMP), pela realização dos ensaios biológicos.

Ao professor Dr. Francisco de Assis Marques, pela disponibilização do CG/EM, e aos seus alunos, que sempre foram prestativos.

À Ana Paula, pela amizade, pelas conversas, desabafos, momentos de alegria e de tristeza que foram compartilhados.

Ao Thiago, pela grande ajuda e apoio durante a realização de algumas análises e à Heveline, que sempre foi muito prestativa. A amizade e ajuda de vocês foram essenciais.

Aos meus colegas de laboratório, que foram um pouco da minha família durante estes dois anos, Emir, Ricardo, Daniel, Érica, Carol, Caio e Claudiney.

À proprietária da RPPN Itáytyba, Sra. Regina Maura Gasparetto Arnt, pela colaboração e auxílio nas várias coletas de material que foram efetuadas na região de entorno da unidade de conservação.

À Universidade Federal do Paraná, em especial ao Departamento de Química, e a todos os professores e funcionários que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À Capes, pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	ROTA SINTÉTICA DOS TERPENOS VIA ÁCIDO MEVALÔNICO-ACETATO.....	3
FIGURA 2.	ROTA SINTÉTICA DOS TERPENOS VIA METIL ERITRITOL 4-FOSFATO.....	3
FIGURA 3.	ESTRUTURAS DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS.....	9
FIGURA 4.	ESPÉCIME DE <i>S. brasiliensis</i> EM FLORAÇÃO.....	12
FIGURA 5.	ESTRUTURAS DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS ENCONTRADOS NA ESPÉCIE DE <i>S. brasiliensis</i>	13
FIGURA 6.	DIAGRAMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA CARACTERIZAR OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS E FLORES DE <i>S. brasiliensis</i>	18
FIGURA 7.	ILUSTRAÇÃO DO EXTRATOR EM LARGA ESCALA.....	20
FIGURA 8.	CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE <i>n</i> -ALCANOS EMPREGADOS PARA O CÁLCULO DO ÍNDICE DE KOVÀTZ.....	23
FIGURA 9.	RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA FOLHAS (BARRAS SOMBREADAS) E FLORES (BARRAS TRANSPARENTES) DE <i>S. brasiliensis</i>	28
FIGURA 10.	MONOTERPENOS IDENTIFICADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS E FLORES DE <i>S. brasiliensis</i>	33
FIGURA 11.	SESQUITERPENOS IDENTIFICADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS E FLORES DE <i>S. brasiliensis</i>	34
FIGURA 12.	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>S. brasiliensis</i> QUE FORAM COLETADAS EM SETEMBRO DE 2006.....	35
FIGURA 13.	ESPECTRO NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>S. brasiliensis</i> COLETADAS EM SETEMBRO DE 2006.....	37
FIGURA 14.	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO	

	DAS FLORES DE <i>S. brasiliensis</i> QUE FORAM COLETADAS EM SETEMBRO DE 2006.....	38
FIGURA 15.	ESPECTROS NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IV) DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E FLORES DE <i>S. brasiliensis</i>	40
FIGURA 16.	PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>S. brasiliensis</i> COLETADAS TRIMESTRALMENTE.....	42
FIGURA 17.	AVALIAÇÃO DA ABUNDÂNCIA RELATIVA DE MONOTERPENOS (BARRAS AZUIS), MONOTERPENOS OXIGENADOS (BARRAS BORDOS), SESQUITERPENOS (BARRAS AMARELAS) E SESQUITERPENOS OXIGENADOS (BARRAS VERDES).....	43
FIGURA 18.	ESPECTROS NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF) GERADOS A PARTIR DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS DE <i>S. brasiliensis</i> COLETADAS TRIMESTRALMENTE.....	45
FIGURA 19.	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>S. brasiliensis</i> QUE FORAM COLETADAS EM JUNHO DE 2007.....	46
FIGURA 20.	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DO CAULE DE <i>S. brasiliensis</i>	48
FIGURA 21.	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE TRÊS ESPÉCIMES DE <i>S. brasiliensis</i>	49
FIGURA 22.	CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS CONGELADAS DE <i>S. brasiliensis</i>	51
FIGURA 23.	CROMATOGRAMA DA FASE ORGÂNICA OBTIDA DA PRIMEIRA EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA.....	53
FIGURA 24.	CROMATOGRAMA OBTIDO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>S. brasiliensis</i> DA EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	FRAGMENTOS DE MASSA E ÍNDICE DE KOVÀTZ DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS E DA LITERATURA DE SEUS RESPECTIVOS PADRÕES.....	30
TABELA 2.	ANÁLISES DE CG/EM E CG/DIC DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE <i>S. brasiliensis</i> COLETADAS EM SETEMBRO DE 2006.....	36
TABELA 3.	ANÁLISES DE CG/EM E CG/DIC DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FLORES DE <i>S. brasiliensis</i> COLETADAS EM SETEMBRO DE 2006.....	39
TABELA 4.	ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E FLORES DE <i>S. brasiliensis</i>	44
TABELA 5.	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS E FLORES DE <i>S. brasiliensis</i>	56

LISTA DE ABREVIATURAS

CG/EM = Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (do inglês GC/MS, “Gas Chromatography – Mass Spectrometry”)

CG/DIC = Cromatografia a gás com detecção de ionização de chama (do inglês FID, “Flame Ionization Detector”)

UV = Espectrometria no ultravioleta

IVTF = Espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês FTIR, “Fourier Transformed Infra Red spectrometry”)

RPPN = Reserva Particular de Patrimônio Natural

IK = Índice de Kovàtz

ATCC = “American Type Culture Collection”

CCT = Coleção de Culturas Tropicais

CMI = Concentração Mínima Inibitória (do inglês MIC, “Minimal Inhibitory Concentration”)

TTC = cloreto de trifetil-tetrazolium

RESUMO

A espécie *Senecio brasiliensis*, nativa da América do Sul, encontra-se bastante difundida nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Neste estudo folhas e flores de *S. brasiliensis* foram extraídos em Clevenger por 4 horas e posteriormente caracterizados. Os rendimento dos óleos essenciais obtidos para as folhas foi de 0,03%, 0,01%, 0,012% e 0,03% para as coletas trimestrais de junho, setembro e dezembro de 2006 e março de 2007, respectivamente e de 0,08% para as flores coletadas no único período de floração do período, em setembro de 2006. A identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais de *S. brasiliensis* foi realizada através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e por comparação com Índice de Kovatz. Através dessa metodologia, foi possível identificar 27 compostos entre mono e sesquiterpenos. Os monoterpenos identificados foram: α -pineno, sabineno, β -pineno, mirceno, p-cimeno, limoneno, (Z)- β -ocimeno, (E)- β -ocimeno, γ -terpineno, terpinoleno, cis- β -diidro-terpineol, isomentol e terpinen-4-ol, enquanto os sesquiterpenos identificados foram: β -cubebeno, β -elemeno, (E)-cariofileno, α -santaleno, α -humuleno, D-germacreno, valenceno, biciclogermacreno, δ -cadineno, viridiflorol, guaiol, cubenol, EPI- α -murulol e α -cadinol. Pode-se observar que a floração é o fator determinante para a variação da composição química e do rendimento do óleo essencial das folhas da espécie. Dentre as substâncias identificadas, somente o β -pineno, mirceno, limoneno, (E)- β -ocimeno, D-germacreno, biciclogermacreno e δ -cadineno foram comuns a todas as amostras de óleo essencial de *S. brasiliensis*. Apesar de diferentes órgãos de uma mesma planta acumular óleos essenciais de diferente composição química, a espécie de *S. brasiliensis* não demonstrou variação significativa neste sentido. A densidade relativa e o índice de refração foram determinados para o óleo essencial de folhas de *S. brasiliensis*, obtendo-se uma densidade relativa de 0,8546 e um índice de refração de 1,487. Testes antimicrobianos foram realizados para avaliar o potencial farmacológico do óleo, no entanto, para os microorganismos utilizados nestes ensaios, os óleos essenciais de folhas e flores de *S. brasiliensis* apresentaram uma baixa atividade microbiana, sendo que somente o óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis* coletado em junho de 2006 apresentou atividade de 700 μ L/mL contra um microorganismo patogênico ao trato gastrointestinal, *E. hirae*; enquanto a amostra obtida da coleta de setembro de 2006 apresentou atividade de 500 μ L/mL contra *R. equi*, um microorganismo patogênico ao trato respiratório.

Palavras-chave: óleos essenciais; cromatografia gasosa; *Senecio brasiliensis*.

ABSTRACT

The species *Senecio brasiliensis*, a native of South America, is widespread in the states of Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná and São Paulo. In this study, leaves and flowers of *S. brasiliensis* were extracted in Clevenger for 4 hours, and then characterized. The yield of the essential oils obtained from the leaves was 0.03 %, 0.01 %, 0.012 % and 0.03 % for the quarter captures of June, September and December 2006 and March 2007, respectively, and 0.08 % for flowers collected in single flowering period in September 2006. The identification of the chemical constituents of the essential oils of *S. brasiliensis* was performed by gas chromatography – mass spectrometry and by comparison with Kovatz indexes. Through this methodology, it was possible to identify 27 compounds between mono and sesquiterpenes. The monoterpenes were identified: α -pinene, sabinene, β -pinene, myrcene, p-cymene, limonene, (Z)- β -ocimene, (E)- β -ocimene, γ -terpinene, terpinolene, cis- β -dihydro-terpineol, isomentol and terpinen-4-ol, while sesquiterpenes identified were: β -cubebene, β -elemene, (E)-caryophyllene, α -santalene, α -humulene, D-germacrene, valencene, bicyclogermacrene, δ -cadinene, viridiflorol, guaiol, cubenol, EP- α -mumulol and α -cadinol. It can be observed that flowering is the determining factor for the variation of chemical composition and yield of essential oil from the leaves of the species. Among those identified, only the α -pinene, myrcene, limonene, (E)- β -ocimene, D-germacrene, bicyclogermacrene and α -cadinene were common to all samples of essential oil of *S. brasiliensis*. Although different parts in the same plant accumulate essential oils with different chemical composition, the *S. brasiliensis* species showed no significant change in this direction. The relative density and refractive index were determined for the essential oil from the leaves of *S. brasiliensis*, resulting in a relative density of 0.8546 and a refractive index of 1.487. Antimicrobial tests were performed to evaluate the pharmacological potential of the oil, however, for the microorganisms used in these experiments, the essential oils of leaves and flowers of *S. brasiliensis* showed a low microbial activity, and only the essential oil from the leaves of *S. brasiliensis* collected in June 2006 showed activity of 700 μ L/mL against a pathogenic microorganism to the gastrointestinal tract, *E. hirae*, while the sample obtained from the collection in September 2006 showed activity of 500 μ L/mL against *R. equi*, a microorganism that is pathogenic to the human respiratory tract.

Keywords: essential oils, gas chromatography; *Senecio brasiliensis*.

1 – INTRODUÇÃO

Sabe-se que o Brasil possui a maior diversidade genética vegetal do planeta, contando com cerca de 55.000 espécies catalogadas (DIAS, 1996) de um total estimado entre 350.000 a 550.000 espécies (SIMÕES *et al.*, 2003). No entanto, estima-se que somente 8% das espécies que compõem a nossa flora já foram estudadas quimicamente, e que apenas 1100 espécies foram até hoje testadas quanto a suas propriedades farmacêuticas e/ou medicinais (GARCIA *et al.*, 1996; SIMÕES *et al.*, 2003). É, portanto, indiscutível que tal biodiversidade ainda abrigue inúmeras oportunidades para a identificação e isolamento de produtos naturais com atividade biológica e possível viabilidade para exploração comercial.

Dentre as plantas superiores, estima-se que 250.000 a 500.000 espécies já foram descritas, sendo que apenas 5% destas foram motivo de algum estudo fitoquímico e uma porcentagem ainda menor foi avaliada sob aspectos de atividade biológica (DOBSON, 1996). Com cerca de 30% das florestas tropicais do planeta, o Brasil possui uma flora muito diversificada cujo acervo agrega cerca de 200 mil espécies vegetais. Na opinião de alguns autores, pelo menos a metade destas espécies pode ter alguma propriedade terapêutica útil à população, mas, infelizmente, menos de 1% dessa biodiversidade já foi motivo de estudos suficientemente aprofundados na linha da química de produtos naturais (MARTINS, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 1998)

Neste cenário, a biodiversidade brasileira tem sido constantemente reconhecida como fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos e, dentre estes, os óleos essenciais ocupam posição de destaque, pois servem como insumo para as

indústrias cosmética e de alimentos e como modelo para a síntese de grande número de fármacos (GUENTHER, 1959; GOTTLIEB *et al.*, 1997; MALONE, 1977).

1.1 – Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis extraídos de plantas, que normalmente evaporam na temperatura ambiente e são facilmente arrastados por vapor de água. Encontram-se na natureza fazendo parte de constituintes particulares do organismo de muitas espécies vegetais e podem apresentar função fisiológica especial (FOSTER, 1949; BUCHBAUER, 1993).

Os componentes químicos dos óleos essenciais são divididos em duas grandes categorias: os derivados terpênicos, oriundos da via do ácido mevalônico-acetato (Figura 1) ou do metileritritol 4-fosfato (Figura 2) (CVEJIÉ *et al.*, 2000) dos quais se obtêm unidades isoprênicas (pirofosfato de isopentenila e seu isômero, pirofosfato de dimetilalila), e os compostos aromáticos, oriundos da via do ácido chiquímico (fenilpropanóides) (GUENTHER, 1959). Destes, os terpenos figuram como os principais constituintes dos óleos essenciais, mas sua ocorrência se restringe a terpenos mais voláteis, como os monoterpenos (10 carbonos) e os sesquiterpenos (15 carbonos).

Os óleos essenciais podem ser estocados em certos órgãos, tais como nas flores (laranjeira, bergamoteira), nas folhas (capim-limão, eucalipto, louro), nas cascas dos caules (canelas), na madeira (sândalo, pau-rosa), nas raízes (vetiver), nos rizomas (curcuma, gengibre), nos frutos (anis-estrelado, funcho) ou nas sementes (noz moscada) das plantas (BRITO *et al.*, 1996).

FIGURA 1. ROTA SINTÉTICA DOS TERPENOS VIA ÁCIDO MEVALÔNICO-ACETATO

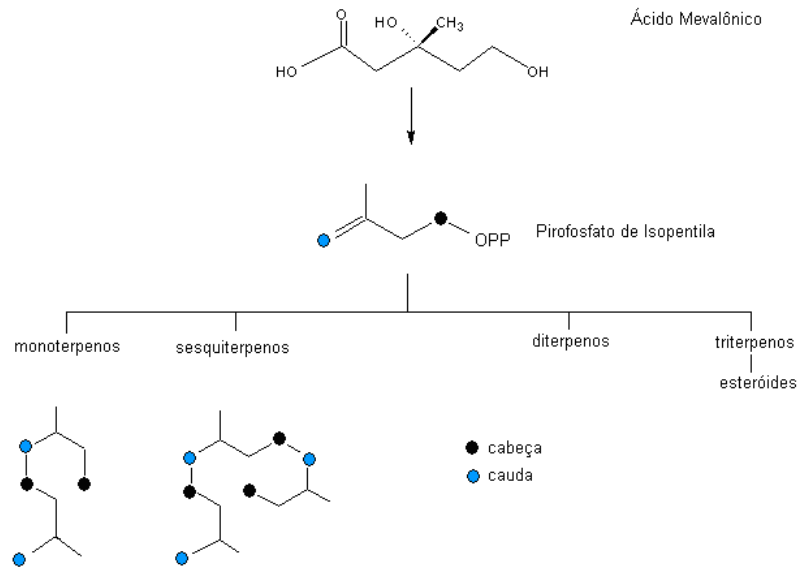
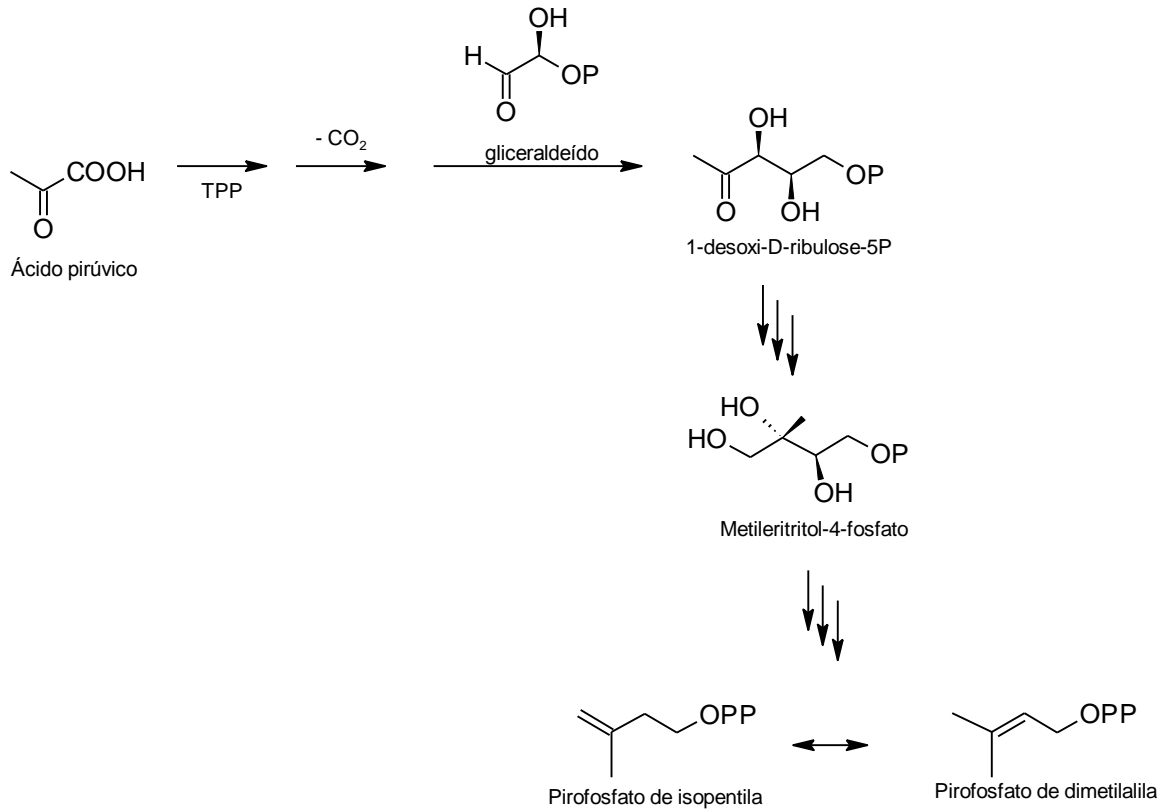


FIGURA 2. ROTA SINTÉTICA DOS TERPENOS VIA METILERITRITOL 4-FOSFATO



TPP = Pirofosfato de Tiamina

Embora todos os órgãos possam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar de acordo com a localização. Por exemplo, o óleo da casca da canela (*cinnamomum*) é rico em aldeído cinâmico, enquanto que os óleos das folhas e das raízes desse mesmo vegetal são ricos em eugenol e cânfora, respectivamente. Portanto, os óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, odor e características físico-químicas bem distintas (BERLYN *et al.*, 1976).

Dependendo da família, os óleos essenciais também podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares nas Lamiaceae, células parenquimáticas diferenciadas nas Lauraceae, Piperaceae e Peaceae, nos canais oleíferos nas Apiaceae ou em bolsas lisígenas ou esquizomógenas nas Pinaceae e Rutaceae. Também é importante lembrar que a composição química de um óleo essencial, extraído do mesmo órgão e/ou estrutura secretora de uma mesma espécie vegetal, pode variar significativamente de acordo com a época de coleta e com as condições edafoclimáticas (SIMÕES *et al.*, 2003)

1.2 – Extração de Óleos Essenciais

Atualmente, a produção e comercialização de óleos essenciais têm sido muito competitivas. Portanto, a busca por matérias-primas alternativas tem sido muito intensa, bem como pelo desenvolvimento de novas tecnologias que preservem a qualidade do óleo e que otimizem o seu rendimento de extração. Dentre os principais métodos de extração, podem ser citadas a extração por arraste a vapor e a extração por fluido supercrítico.

1.2.1 – Extração por Arraste a Vapor

A extração por arraste a vapor recebe o nome de co-destilação porque a água e o óleo essencial formam um sistema heterogêneo. A destilação a vapor é consequência do aumento do desvio positivo da lei de Raoult (pressão total de um sistema é igual à soma das pressões parciais). O ponto de ebulição de uma mistura de compostos imiscíveis é menor do que o ponto de ebulição do componente mais volátil. Se a co-destilação é realizada em uma pressão inferior à atmosférica, a proporção de água no condensado será maior; assim, o óleo arrastado é mais rico em compostos voláteis. Por outro lado, quando se deseja arrastar os componentes mais fixos, se torna necessário operar o sistema de extração em pressões superiores à pressão atmosférica.

Pelo fato de os óleos essenciais serem compostos por vários grupos químicos, a composição de um óleo essencial arrastado por vapor de água não é constante, já que cada componente tem uma massa molar característica e distinta. Portanto, é recomendável que a totalidade do óleo essencial arrastado seja recolhida apenas no tempo máximo de extração para que não haja a decomposição ou até mesmo rearranjo de alguns componentes do óleo essencial (CARNEY, 1949).

Na obtenção de óleos essenciais, dois tipos de vapor de água podem ser empregados: seco e úmido. O vapor seco é mais agressivo e não arrasta consigo as gotas de água geradas por formação de condensações parciais. Por outro lado, o calor, na presença de vapor de água úmido, incha as paredes celulares e facilita a saída por osmose dos óleos essenciais. Porém, a umidade do vapor é prejudicial a um grande número de óleos essenciais devido ao processo de ação hidrolítica dos ésteres, que geralmente constituem a parte nobre dos óleos essenciais (PERRY *et al.*, 1997).

Os nomes vulgares das extrações por arraste a vapor são: destilação aquosa em cocção, destilação aquosa em cocção com injeção de vapor e destilação com injeção de vapor, sendo que em todos os casos, o processo pode ser conduzido a pressões superiores ou inferiores à atmosférica. Desta forma, as técnicas de destilação de óleo essencial são divididas em três categorias distintas (CARNEY, 1949; PERRY *et al.*, 1997), conforme descrito a seguir.

Na destilação com água, a matéria-prima é carregada em vaso extrator e coberta com água, geralmente na relação água/matéria-prima de 3:1 (PERRY *et al.*, 1997). Neste procedimento, a destilação é contínua até o esgotamento do óleo essencial e, portanto, a ação química da água sobre o material vegetal é máxima, causando hidrólises e oxidações. Tal método é ideal para matérias-primas que têm a tendência de se aglomerar e/ou compactar, ou mesmo quando o aroma que se deseja isolar está ligado a glicídios inodoros. Para uma boa difusão, é necessário trabalhar com um teor de água mais elevado, para que ocorra agitação do material vegetal no vaso extrator. Como a velocidade de extração é baixa, aconselha-se a adição de água já quente para aumentar a eficiência do processo e evitar reações indesejadas.

Na destilação água/vapor, onde a relação água:matéria-prima é de duas a três vezes, a mistura ou suspensão é aquecida pela injeção de vapor vivo, saturado e de baixa pressão, causando pouca decomposição de compostos orgânicos porque o sistema não sofre grandes aumentos na temperatura de trabalho. A velocidade de extração é relativamente lenta, requerendo tempo para arrastar componentes com ponto de ebulição mais elevado. Apesar disso, esta é a técnica mais amplamente aplicada à grande maioria de espécies ricas em óleos essenciais.

Na destilação a vapor, a matéria-prima é disposta em camadas separadas por grades que guardam uma distância pré-determinada entre si. A injeção contínua de vapor vivo, superaquecido ou saturado, é feita por baixo sob pressões maiores do que a atmosférica e, por isso, o processo é bastante rápido e eficiente. Trata-se da técnica mais utilizada para a obtenção de óleos essenciais de especiarias (sementes, madeiras e raízes), mas exige instalações mais caras e pode causar o ressecamento da membrana vegetal, tornando-a impermeável e impedindo a difusão do óleo essencial.

São numerosos os aparelhos utilizados na extração de óleo essencial pelo método de arraste por vapor de água, todos originários do aparelho de Clevenger (1928), que sofreu várias modificações objetivando melhorar a qualidade e o rendimento do óleo essencial (GOTTLIEB, 1997). Assim, foram desenvolvidos os sistemas propostos por Cocking e Middleton (1932) e Wasicky e Akisue (1969), além das extrações via gases liquefeitos em condições subcríticas desenvolvidos por Oliveira *et al* (1998) e Bernard (1987).

1.2.2 – Extração por Fluido Supercrítico

A extração por gases supercríticos é um método que permite extrair, de modo bastante eficiente, uma grande variedade de produtos naturais, não se restringindo, portanto, aos óleos essenciais. Para este tipo de extração, o fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono (CO₂), cujas propriedades permitem a sua total remoção do extrato, tornando o produto mais complexo do que o obtido por outros métodos (SIMÕES *et al.*, 2003).

No processo de extração supercrítica de matrizes sólidas, o CO₂ é primeiramente liquefeito por compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a 31°C. Nessa temperatura, o CO₂ atinge um estado supercrítico no qual a sua viscosidade é semelhante à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Assim, uma vez efetuada a extração, o CO₂ pode retornar ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação do produto final, que é recuperado relativamente livre de contaminações (SIMÕES *et al.*, 2003).

A tecnologia de extração supercrítica tem evoluído muito nestas últimas décadas. Uma das principais limitações era a necessidade de um alto investimento de capital para a sua execução em escala piloto e as dificuldades inerentes às condições de trabalho, já que o sistema opera necessariamente a altas pressões (SUTTER, 1994). Atualmente os problemas com custos já foram superados e, o que ainda limita seu uso, é a solubilidade da amostra no fluido supercrítico (QUEIROZ *et al.*, 2001).

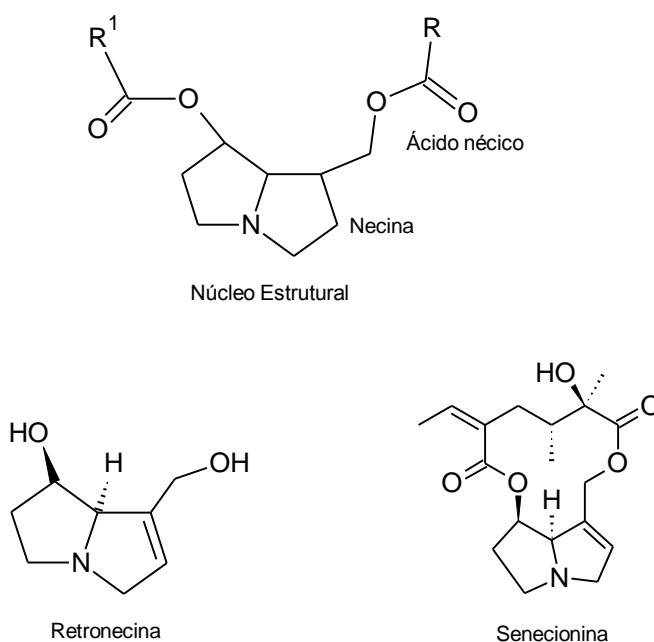
1.3 – Produtos Naturais de *Senecio* sp.

O gênero *Senecio* pertence à família Asteraceae. Também conhecida como Compositae, está entre as dicotiledôneas mais representativas da biosfera. São mais de 20.000 espécies divididas em cerca de 1535 gêneros, o que representa aproximadamente 10% da flora mundial (NAKAJIMA *et al.*, 2001).

O gênero *Senecio* é amplamente distribuído em todo mundo e é reconhecido por suas propriedades tóxicas. A toxicidade das plantas deste gênero se deve à presença de alcalóides pirrolizidínicos (Figura 3). Estes alcalóides pirrolizidínicos são ésteres de 1-

hidroximetilpirrolizidinas freqüentemente hidroxiladas em diversas posições do núcleo pirrolizidínico. A insaturação do núcleo pirrolizidínico é uma característica estrutural destes alcalóides e é aparentemente necessária para conferir toxicidade à estrutura (SIMÕES *et al.*, 2003).

FIGURA 3. ESTRUTURAS DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS



Os alcalóides pirrolizidínicos de *Senecio* sp. têm sido amplamente investigados desde o início do século passado (SIMÕES *et al.*, 2003). Tratam-se de ésteres de alquilaminas que, por hidrólise, produzem um componente básico denominado necina e um ácido néxico. As necinas são aminoálcoois derivados da pirrolizidina, cujo principal componente é a retronecina (Figura 3). Este composto está presente na estrutura da metade dos mais de 30 alcalóides presentes em *Senecio* sp., dentre os quais os mais

conhecidos são a equinatina (monoéster da heliotridina com o ácido veridiflórico), a equimidina (diéster da retronecina com os ácidos angélico e equimidínico), a dicrotalina e a senecionina (diésteres cíclicos da retronecina com os ácidos dicrotálico e senécico). Estes alcalóides vêm sendo utilizados como terapias alternativas para o tratamento de problemas gastrointestinais, incluindo gastrite e úlceras (TOMA *et al.*, 2004). No entanto, é importante observar que, embora comuns em extratos orgânicos das partes aéreas totais, estes alcalóides não têm ocorrência nos óleos essenciais da planta devido a sua grande labilidade química, além disso, são moléculas com alto peso molecular normalmente extraídas com solventes orgânicos e não arrastadas por vapor de água.

Apesar do grande número de investigações já realizadas sobre os alcalóides presentes no gênero *Senecio* sp., pouco se tem relatado na literatura sobre o óleo essencial das diferentes espécies deste gênero. A espécie *S. graveolens*, que ocorre na Argentina, teve seu óleo essencial investigado e caracterizado pela presença de 13 substâncias, sendo elas: α -pineno, α -felandreno, α -terpineno, *p*-cimeno, sabineno, γ -terpineno, terpinoleno, terminen-4-ol, α -eudesmol, β -eudesmol, acetona, piperitenona e isovaleraldeído (PÉREZ *et al.*, 1999). Além da caracterização do óleo essencial da espécie de *S. graveolens*, foram realizados testes para averiguar sua atividade antibacteriana através da concentração mínima inibitória (MIC), no entanto, o óleo essencial não apresentou atividade antibacteriana para as espécies estudadas (PÉREZ *et al.*, 1999).

Teibler e colaboradores (2001) identificaram indol, β -mirceno, α -cimeno, α -copaeno e α -cariofileno como substâncias voláteis da espécie *S. grisebachii*. Nesta investigação, também foi demonstrado que o óleo essencial de *S. grisebachii* apresenta

grande toxicidade química, revelada através da degeneração de células do fígado de ratos (ROMERO *et al.*, 2003).

1.4 – *Senecio brasiliensis* (Spreng.) Less. (Asteraceae)

A espécie *S. brasiliensis* é nativa da América do Sul e, no Brasil, encontra-se bastante difundida em campos e pastagens dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, onde é considerada como uma erva daninha e invasiva. Portanto, trata-se de uma planta rústica, pouco exigente em termos agronômicos, de grande adaptação territorial e ampla ocorrência natural, facilmente cultivável, de ciclo produtivo curto e de alta produtividade.

O *S. brasiliensis* é uma planta herbácea subfruticosa, perene, ereta e bastante ramificada, com caule liso e estriado que atinge de 1 a 2 metros de altura. As folhas são alternadas, pinadas e profundamente lobadas até a nervura central. A parte ventral da planta é lisa, enquanto que a parte superior é pilosa. As folhas são densamente agrupadas no ápice. As inflorescências são capítulos numerosos arranjados em corimbos densos. As flores são amarelas, de antera com base sagitada, providas de filamentos receptáculos sem pedúnculos (Figura 4), e podem ser encontradas de duas formas: com pétalas em discos, que possuem partes masculinas e femininas na mesma flor, e com pétalas radiadas, que são exclusivamente femininas. O fruto é pequeno e possui plumagem branca que ajuda a sua dispersão pelo vento.

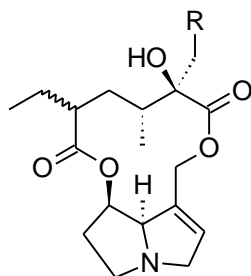
FIGURA 4. ESPÉCIME DE *S. brasiliensis* EM FLORAÇÃO.



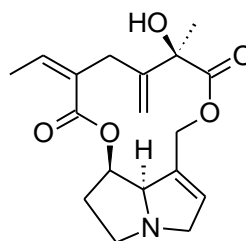
Popularmente, o *S. brasiliensis*, conhecido como maria-mole, aspelina, não-me-deixes, margaridinha e flor-das-almas, é muito utilizado pela medicina popular para o tratamento de dores estomacais (SIMÕES *et al.*, 2003). Há registros de que esta planta foi largamente utilizada por comunidades indígenas paranaenses e catarinenses para a cura de dores de ouvido, sarna e vermes do trato digestivo (lombrigas) (GOTTLIEB, 1997). Na medicina popular, suas folhas também já foram utilizadas na forma de cataplasma para curar feridas e existem informações de envenenamento humano por consumo acidental em produtos derivados do trigo (GOTTLIEB, 1997). Estudos fitoquímicos de seu extrato etanólico confirmaram a presença de alcalóides pirrolizidínicos anteriormente identificados em outras espécies, e esta característica é relatada como negativa para a pecuária brasileira, principalmente nos estados do Sul,

devido à ação que tais componentes exercem sobre o trato digestivo de bovinos e outros ruminantes (MÉNDEZ *et al.*, 1987; MÉNDEZ *et al.*, 1990). Apesar da hipótese de que os alcalóides pirrolizidínicos presentes na espécie de *S. brasiliensis* sejam causadores de danos à pecuária brasileira, testes realizados com ratos demonstraram que estes apresentam atividade antiulcerogênica gástrica e duodenal em uma dose (12,5 mg/kg) quase 20 vezes menor que a tóxica (234,4 mg/kg), além de apresentar mecanismos citoprotetores envolvendo aumento da produção de muco, prostaglanina e somatostatina (TOMA, 2004).

FIGURA 5. ESTRUTURAS DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS ENCONTRADOS NA ESPÉCIE DE *S. brasiliensis*.



1. Senecionina – Z, R = H
2. Integerrimina – E, R = H
3. Retrorsina – Z, R = OH
4. Usaramina – E, R = OH



5. Senecifilina

Os alcalóides pirrolizidínicos presentes na espécie *S. brasiliensis* são a senecionina (1), a integerrimina (2), a retrorsina (3), a usaramina (4) e a senecifilina (5), na proporção de 7:4:86:1:5 (Figura 5) (TOMA *et al.*, 2004).

Os alcalóides pirrolizidínicos presentes nas folhas de *S. brasiliensis* também são utilizados por insetos dos gêneros Hemiptera e Coleoptera para sua proteção contra predadores naturais (KLITZKE *et al.*, 2000). Além dos alcalóides pirrolizidínicos, esta espécie apresenta componentes derivados do tiofeno, que é uma classe de compostos comuns à família Asteraceae (Compositae). Esta classe de compostos demonstrou atividade biológica contra o mosquito *Aedes fluviatilis*; no entanto, o extrato etanólico de *S. brasiliensis* consumiu uma dose muito alta (100 mg/L) para matar 50% das larvas do mosquito (MACEDO *et al.*, 1997).

Como pode ser visto pelas informações descritas acima, espécimes de *S. brasiliensis* já foram bastante investigados em relação aos alcalóides pirrolizidínicos presentes em seu extrato etanólico. Porém, não há nenhum relato na literatura sobre a caracterização de seu óleo essencial. Portanto, a presente investigação torna-se interessante uma vez que os alcaloides pirrolizidínicos, responsáveis pela toxicidade da espécie, não são substâncias constituintes do óleo essencial. O óleo essencial é composto, basicamente, por monoterpenos e sesquiterpenos, moléculas que são facilmente arrastados por vapor devido a sua alta volatilidade.

2 – OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar os óleos essenciais extraídos de folhas e flores de *Senecio brasiliensis* (Spreng.) Less. (*Asteraceae*), avaliar sua sazonalidade e investigar sua atividade biológica.

As etapas necessárias para o desenvolvimento deste projeto estão descritas a seguir:

- Extrair o óleo essencial de folhas e flores de *S. brasiliensis* (Spreng.) Less por hidrodestilação em pequena escala;
- Construir um protótipo para a extração de óleos essenciais por hidrodestilação em larga escala e testar a sua eficiência com folhas de *S. brasiliensis* (Spreng.) Less;
- Caracterizar as propriedades físicas e a composição química dos óleos essenciais de *S. brasiliensis* (Spreng.) Less;
- Avaliar o efeito da sazonalidade sobre o rendimento de extração e a composição química do óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis* (Spreng.) Less;
- Investigar a atividade biológica dos óleos essenciais de *S. brasiliensis* (Spreng.) Less, visando avaliar a potencialidade desta matéria-prima para a indústria químico-farmacêutica.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

As coletas de *S. brasiliensis* foram realizadas na Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) Itaytyba, localizada no município de Tibagi (PR) a 1205 m de altitude, 24°30'S de latitude e 50°30'W de longitude. Realizaram-se coletas nos meses de junho, setembro e dezembro de 2006 e também em março de 2007. Após a coleta de junho, dezembro e março, as folhas da planta foram separadas do caule e submetidas à hidrodestilação ainda frescas. Extraíu-se óleo apenas das folhas da planta, visto que a mesma não se encontrava em período de floração. Na coleta realizada no mês de setembro, a planta encontrava-se florida. Portanto, flores e folhas foram separadas e então submetidas à hidrodestilação separadamente. Além das extrações realizadas com folhas e flores, realizou-se, também, uma extração do caule da planta coletada no mês de junho de 2007.

As plantas foram processadas assim que chegaram ao laboratório. As folhas foram separadas manualmente dos espécimes coletados, homogeneizadas e separadas em quantidades de 1500 gramas, sendo então submetidas à hidrodestilação. Para avaliar a susceptibilidade da matéria-prima ao armazenamento, foram realizadas extrações de folhas de *S. brasiliensis* que foram secas ao ar livre e, também, de folhas que foram congeladas a uma temperatura de -10 °C por uma semana.

No mês de setembro, as flores dos diferentes espécimes foram separadas e submetidas à hidrodestilação. No entanto, a quantidade de flores obtida foi relativamente pequena, o que possibilitou apenas uma única extração.

Para avaliar a possível ocorrência de quimiotipos na espécie, três espécimes de *S. brasiliensis* foram coletados e submetidos a extrações independentes para a caracterização e comparação da composição química dos óleos essenciais presentes das folhas.

3.2 – Métodos

A metodologia utilizada neste trabalho encontra-se descrita no diagrama da Figura 6. O óleo essencial obtido a partir das folhas e flores de *S. brasiliensis* foi analisado, enquanto que o hidrolato e a massa verde resultantes da extração foram descartados.

3.2.1 – Extração

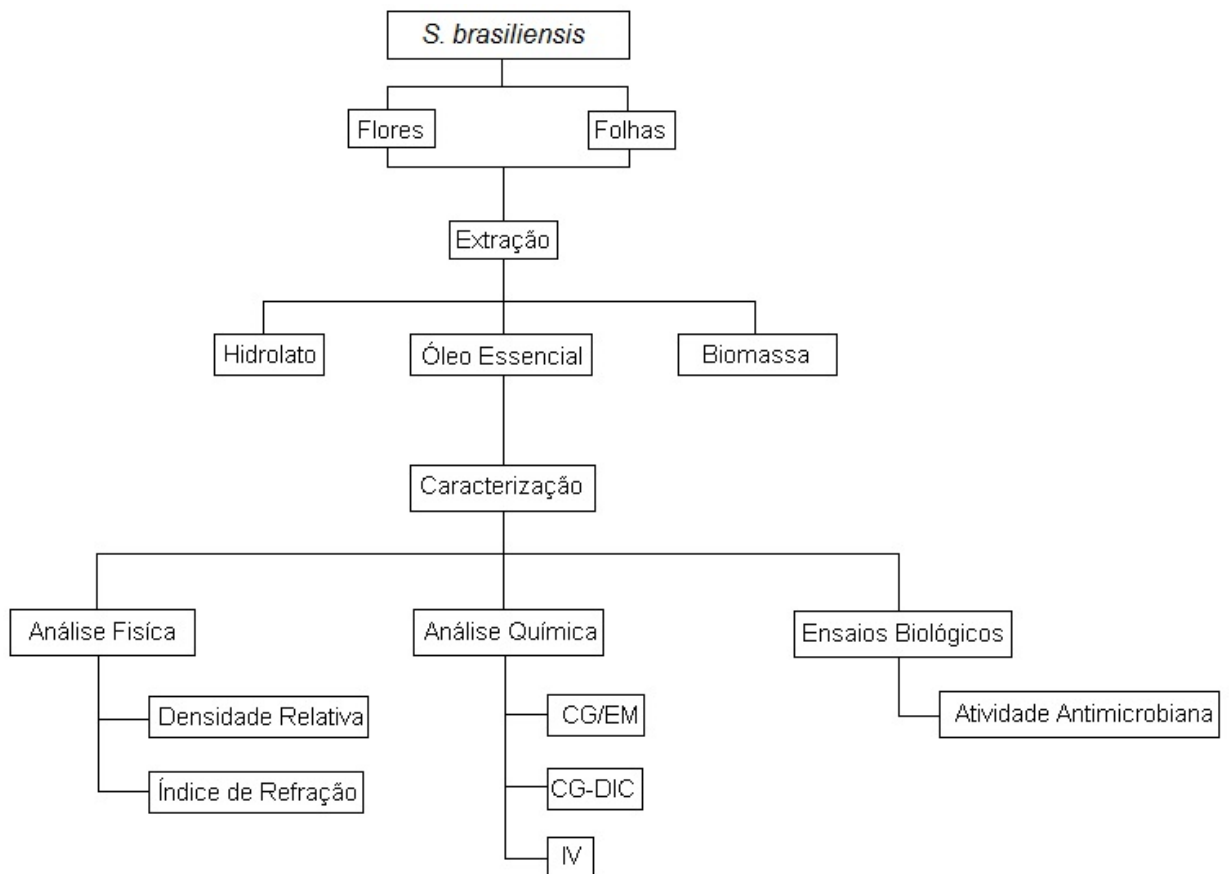
3.2.1.1 – Extração em Clevenger Convencional

O óleo essencial foi extraído das folhas e flores do vegetal através de hidrodestilação em aparelho Clevenger. O balão utilizado para a extração das folhas de *S. brasiliensis* tinha uma capacidade de 30 L, o que possibilitou processar amostras de até 1500 g de uma única vez. Em cada período de coleta foram feitas três extrações, cada uma com 1500 g de folhas, totalizando 4500 g de folhas em cada período de coleta. Por outro lado, a extração das flores foi realizada em balão de 3 L porque a massa total obtida foi de apenas 300 g. Tanto folhas quanto flores de *S. brasiliensis* foram submetidas ao processo de extração por arraste a vapor por 4 horas. O óleo resultante da extração de folhas e flores de *S. brasiliensis* foi seco com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro para

garantir a total ausência de água e, em seguida, ampolado e mantido sob refrigeração a -10°C.

O rendimento foi determinado em relação à massa de biomassa extraída (% , m/m) após o esgotamento do teor de óleo volátil das folhas e flores de *S. brasiliensis*.

FIGURA 6. DIAGRAMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA CARACTERIZAR OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS E FLORES DE *S. brasiliensis*.



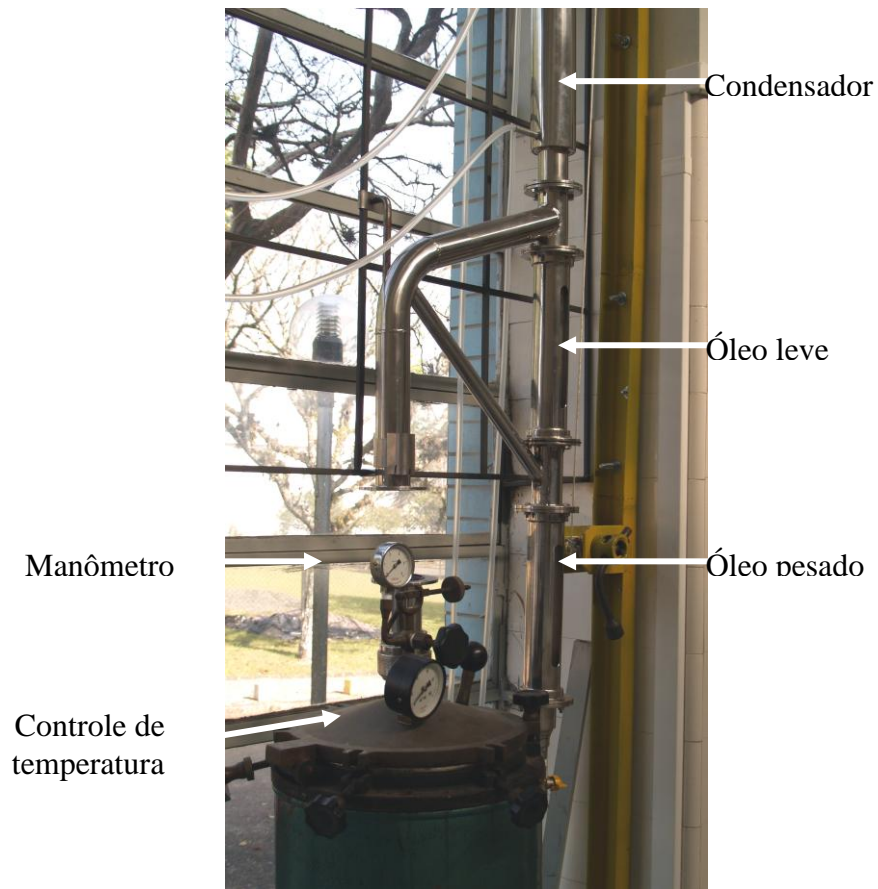
3.2.1.2 – Extração em Larga Escala

O extrator utilizado (Figura 7) para produção do óleo em maior escala tem o mesmo princípio de um aparelho Clevenger convencional. O condensador, o recipiente

de óleo leve e o recipiente de óleo pesado são construídos em aço inox, sendo que os recipientes de óleo leve e pesado possuem uma cápsula de vidro interna para observar a separação do óleo resultante da extração. A autoclave é de ferro e possui uma resistência interna para aquecer a água; a esta resistência foi adaptado um reostato para controlar a temperatura de aquecimento da água.

Para evitar o contato direto da amostra com a resistência e quaisquer outros problemas, como o entupimento da tubulação, foi confeccionado um saco de algodão para acomodar a amostra. Esta, com aproximadamente 5 kg, foi colocada no saco de algodão e submersa em água dentro da autoclave. A temperatura foi mantida entre 50 e 60°C durante o processo, já que o sistema bem fechado elevava a pressão e, sempre que necessário, o hidrolato obtido foi submetido a extrações com *n*-pentano para permitir a recuperação total do óleo retido na emulsão.

A circulação de água no condensador foi feita através de um sistema de bombeamento com fluxo ajustado em aproximadamente 5 L/min, que foi adaptado a um banho termostaticado. Vale observar que, devido ao seu projeto de construção, o extrator em larga escala possibilita a separação das frações leve e pesada do óleo essencial (em relação à densidade da água), uma vez que o recipiente de óleo pesado fica abaixo da linha de refluxo, de onde a água condensada volta para a extração. Neste caso, o óleo de densidade relativa maior do que a água (se existente) se acumula abaixo dela, não retornando para a autoclave durante o processo.

FIGURA 7. ILUSTRAÇÃO DO EXTRATOR EM LARGA ESCALA

3.2.2 – Cromatografia de Fase Gasosa

A cromatografia de fase gasosa é o método mais eficiente para separar e quantificar substâncias componentes de óleos essenciais. A identificação dos compostos pode ser realizada através da comparação do tempo de retenção dos componentes da amostra com padrões verdadeiros e, também, através do cálculo de seus respectivos índices de Kovatz (IK) (SIMÕES *et al.*, 2003; McLAFFERTY *et al.*, 1993).

3.2.2.1 – Cromatografia de Fase Gasosa com Detecção de Ionização de Chama

O óleo essencial de folhas e flores de *S. brasiliensis* foi analisado em cromatógrafo de fase gasosa (CG) com detecção por ionização de chama (DIC ou FID, da sigla em inglês “flame ionization detector”). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14B equipado com coluna capilar OV5 (5% fenilmetilsiloxano) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Como gás de arraste, utilizou-se hélio (99,99%) a uma vazão de 1 mL/min.

As amostras foram preparadas em diclorometano ultra puro em concentrações de 1 mg/mL e injetadas no volume de 1 µL em taxa de divisão 1:20. Os padrões de *n*-alcanos, necessários para o cálculo do índice de Kovatz, foram injetados com o mesmo volume e mesma taxa de divisão.

A análise das amostras e do padrão de *n*-alcanos foi realizada por programação de temperatura, iniciando com 50°C por 3 minutos, seguido por uma primeira rampa de aquecimento de 3°C por minuto até atingir 250°C e, em seguida, uma segunda rampa de 10°C por minuto até 280°C. O injetor foi mantido a 250°C e o detector a 300°C, sendo que o tempo total de análise foi de 75 minutos.

Os cromatogramas obtidos a partir da cromatografia de fase gasosa com detecção por ionização de chama (CG-DIC) permitiram realizar a análise quantitativa das amostras de óleos essenciais obtidos nas diferentes épocas do ano. Utilizou-se o método de normalização de área para obter uma expressão da abundância relativa de cada substância presente nos cromatogramas, sendo que foram contabilizadas as substâncias com resposta no detector igual ou superior a 300 mV.

3.2.2.2 – Cromatografia de Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

Os óleos essenciais de folhas e flores de *S. brasiliensis* foram analisados por cromatografia de fase gasosa com detecção de massas (CG/EM) em equipamento Varian[®] 3800 com coluna CP-Sil 8 Low Bleed MS/MS[®] (5% fenil-metilsiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), acoplado a um espectrômetro de massa Varian[®] GC/MS/MS Saturn 2000 (armadilha de íons ou *ion trap*) capaz de detectar fragmentos de 30 a 600 unidades de massa. Hélio (99,99%) foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL/min.

As amostras foram preparadas e injetadas nas mesmas condições utilizadas anteriormente. Os óleos essenciais de folhas e flores de *S. brasiliensis* foram preparados na concentração de 1 mg/mL em diclorometano ultra puro, tendo sido injetado 1 µL de amostra em razão de 1:20. Para a série homóloga de *n*-alcanos (C8 a C18 e C20), o mesmo volume foi injetado, mas em razão de split de 1:100.

Para efeito de comparação, a programação de temperatura utilizada foi a mesma descrita anteriormente, iniciando-se em análise isotérmica a 50°C por 3 minutos, seguida de uma primeira rampa de 3°C/min até atingir 250°C e de uma segunda rampa de 10°C/min até atingir 280°C. O injetor foi mantido a 250°C.

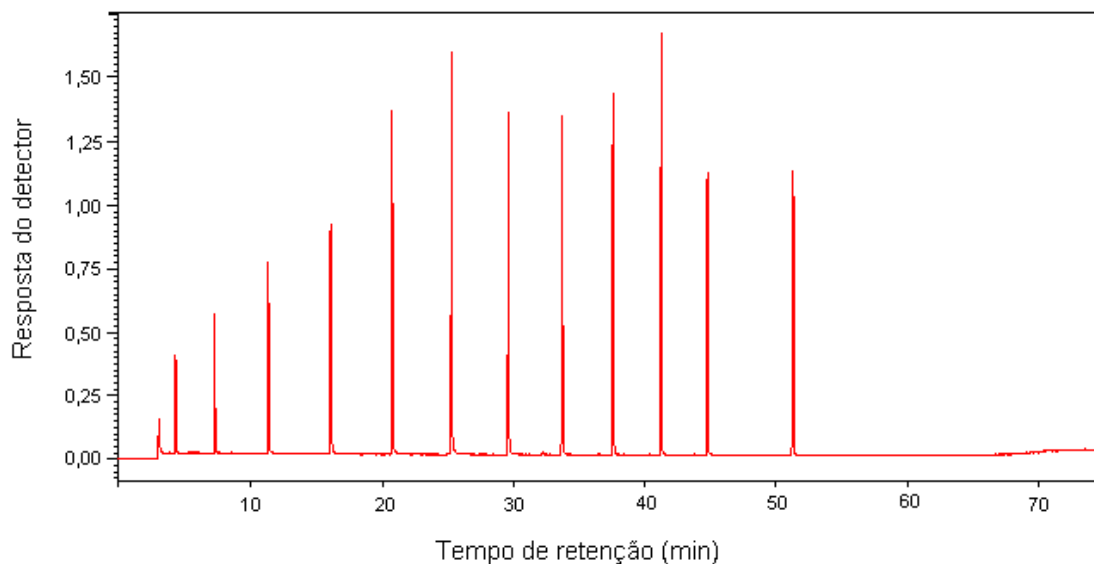
3.2.3 – Identificação dos principais componentes presentes nos óleos essenciais

A identificação dos principais componentes dos óleos essenciais foi realizada através do cálculo de seus respectivos índices de Kovàtz (IK) e de comparação com os

resultados de espectrometria de massas, oriundos das análises de CG/EM (SIMÕES *et al.*, 2003; McLAFFERTY *et al.*, 1993).

O índice de retenção de Kovàtz dos principais componentes das amostras foi calculado com base nos cromatogramas obtidos por CG/EM e CG/DIC de padrões de *n*-alcanos (Figura 8) de cadeia normal (C8 a C18 e C20).

FIGURA 8. CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE *n*-ALCANOS, EMPREGADO PARA O CÁLCULO DO ÍNDICE DE KOVÀTZ.



Com os tempos de retenção da série homóloga dos *n*-alcanos, foi possível calcular o índice de retenção através da seguinte equação (COLLINS *et al.*, 1997):

$$I = 100z + 100 \left\{ \frac{\log t_{R_x} - \log t_{R_z}}{\log t_{R_{(z+1)}} - \log t_{R_z}} \right\}$$

onde, t_{R_X} é o tempo de retenção ajustado do composto X, t_{R_Z} e $t_{R_{(Z+1)}}$ são os tempos de retenção ajustados de *n*-alcanos de cadeia normal (sendo que t_{R_X} deve ser intermediário a t_{R_Z} e $t_{R_{(Z+1)}}$), e z é o número de carbonos do *n*-alcano de cadeia normal anterior ao composto X.

Com os índices de retenção calculados e com os espectros de massa derivados das análises por CG/EM, com auxílio de biblioteca especializada Adams, 1995; foi possível caracterizar os principais componentes presentes no óleo essencial de folhas e flores de *S. brasiliensis*.

3.2.4 – Análises Físicas do Óleo Essencial – Densidade Relativa e Índice de Refração

Para calcular a densidade relativa do óleo essencial, utilizou-se um picnômetro de 2 mL. A determinação da densidade relativa se deu por meio da equação:

$$\rho_{\text{Óleo}, H_2O} = \frac{m_2 - m_1}{m_3 - m_1}$$

onde m_1 é a massa do picnômetro vazio, m_2 a massas do picnômetro cheio com o óleo essencial (cuja densidade relativa deseja-se determinar) e m_3 a massa do picnômetro cheio de água destilada.

O índice de refração (η) foi medido em um refratômetro Bausch & Lomb modelo 7163VD. Utilizaram-se 2 a 3 gotas do óleo essencial bruto de folhas e flores de *S. brasiliensis*, aplicadas diretamente sobre o prisma do refratômetro com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Os dois parâmetros analisados, densidade e índice de refração,

foram determinados com a temperatura do óleo essencial de folhas de *S. brasiliensis* à 25°C.

3.2.5 – Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros no infravermelho do óleo essencial de folhas e flores de *S. brasiliensis* foram obtidos em equipamento Bio-Rad Excalibur FTS 3500GX, no intervalo de 500 a 4000 cm^{-1} , com aplicação da Transformada de Fourier. As amostras foram analisadas na forma de filme em uma cela de brometo de potássio (KBr) de dimensões apropriadas.

3.2.6 – Ensaios Biológicos - Atividade Antimicrobiana e Antifúngica

O óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis* foi submetido a testes antimicrobianos. Para os ensaios, foram utilizadas 10 bactérias, sendo elas: *Bacillus subtilis* ATCC 5061, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Rhodococcus equi* ATCC 6939, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Enterococcus faecium* CCT 5079, *Enterococcus hirae* ATCC 10541; e um fungo: *Candida albicans* ATCC 10231.

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da Concentração Mínima Inibitória (MIC) do óleo essencial, de acordo com o método da microdiluição (ELOFF, 1998). Em uma microplaca de 96 poços (8 colunas e 12 linhas), foram depositados 100 μL de caldo Mueller-Hilton na coluna 1 – linha A, enquanto que a coluna 12 foi

utilizada para os controles. Na coluna 1 – linha A foram acrescentados 50 µL de óleo essencial de concentração de 1,0 mg/mL. Em seguida, 100 µL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindo-se o procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis*. Os 100 µL finais foram desprezados. Terminada a preparação do meio, foram adicionados 100 µL de uma suspensão de microrganismos, de crescimento recente (24 horas), cuja turvação foi comparada à escala de McFarland nº. 0,5 e diluídos para concentração final de 10^4 células/mL. As placas foram seladas com Parafilm[®] e incubadas por 24 horas a 37°C. Após este período foram acrescentados 50 µL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium) a 0,5% e a placa re-incubada por 3 horas na referida temperatura. A MIC foi definida como a menor concentração do óleo essencial de folhas de *S. brasiliensis* capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha. Foram também incluídos nos testes controles dos antibióticos nistatina e cloranfenicol, para confirmação da esterilidade do meio de cultura e do crescimento do microrganismo.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

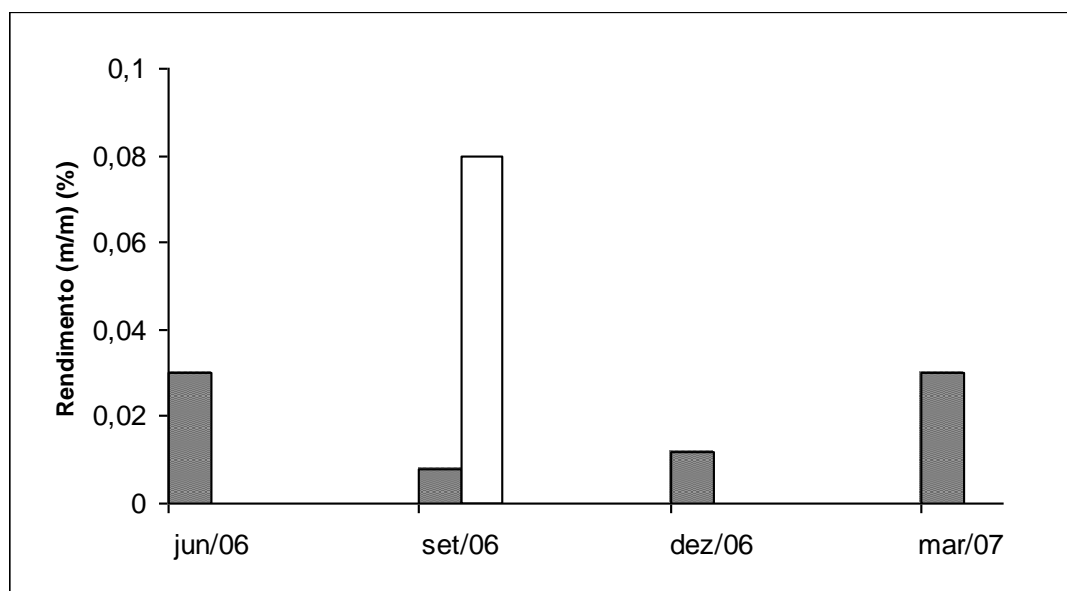
4.1 – Extração com Clevenger Convencional

As folhas e flores de *S. brasiliensis* foram separadas do caule manualmente e submetidas à hidrodestilação ainda frescas através de um aparelho Clevenger, durante quatro horas. O princípio do método consiste no arraste do óleo essencial presente no material vegetal juntamente com o vapor d'água; com a condensação do vapor, o óleo se separa da água (por ser nela imiscível) e é então recuperado por esgotamento do recipiente de coleta. Depois de feita a separação, o óleo essencial foi tratado com sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro para sua secagem.

O teor de óleos essenciais das folhas de *S. brasiliensis* sofreu uma evidente variação sazonal, conforme demonstram os dados da Figura 9. No entanto, o clima não parece ter sido fator determinante para o rendimento de extração, pois este permaneceu inalterado dentre as amostras coletadas nos meses de março e junho, quando se verificam variações significativas na temperatura e no índice pluviométrico da região. Variações na composição química do solo também parecem não ter interferido nos rendimentos de extração, visto que a coleta nem sempre foi realizada exatamente no mesmo local. Por outro lado, o fator determinante para o rendimento de extração dos óleos essenciais das folhas de *S. brasiliensis* foi o período de floração (setembro), quando estes naturalmente se acumulam nas flores por razões fisiológicas da própria planta.

Com o objetivo de avaliar a susceptibilidade da matéria-prima ao armazenamento, foram realizadas extrações de folhas de *S. brasiliensis* que foram secas ao ar livre e, também, de folhas que foram congeladas por um período de uma semana.

FIGURA 9. RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS (BARRAS SOMBREADADAS) E FLORES (BARRA TRANSPARENTE) DE *S. brasiliensis*



Das folhas secas, não se observou nenhum acúmulo de óleo essencial durante o período de extração ou após, já que o hidrolato obtido foi submetido a extração com solvente *n*-pentano. Como os óleos essenciais são substâncias voláteis e a quantidade de óleo presente na planta fresca é pequena, é provável que a maior parte ou até mesmo a totalidade do óleo essencial de *S. brasiliensis* tenha se volatilizado durante a secagem. Nas folhas que foram congeladas, obteve-se o mesmo rendimento característico de folhas verdes e frescas. Para poder realmente considerar o congelamento como um meio de conservar a matéria-prima, o óleo extraído das folhas congeladas foi analisado por cromatografia de fase gasosa (CG/DIC). Tais resultados encontram-se registrados na

seção 4.6 deste trabalho, onde a composição química dos óleos essenciais se encontra discutida em detalhe.

4.2 – Identificação dos principais componentes dos óleos essenciais de folhas e flores de *S. brasiliensis*

As amostras de óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis* coletadas trimestralmente e a amostra de óleo essencial das flores coletadas em setembro de 2006 foram analisadas por CG/EM. Para a identificação das substâncias presentes no óleo, utilizou-se a comparação de seus respectivos índices de retenção de Kovatz, calculados através da equação citada no subitem 3.2.3 da página 23, com aqueles tabelados na literatura especializada (ADAMS, 1995). A identificação de cada um dos compostos foi então confirmada por espectrometria de massas (ANEXO 1), comparando-se os espectros da substância com os espectros de massa da biblioteca NIST e da literatura especializada (ADAMS, 1995).

A Tabela 1 traz os principais fragmentos de massa de cada uma das substâncias identificadas, juntamente com os principais fragmentos dos respectivos compostos de referência. Além disso, também os índices de Kovatz calculados e da literatura especializada. Observando os valores nas tabelas, percebe-se que os fragmentos de massa das substâncias encontradas e os índices de Kovatz calculados estão bem próximos aos dos respectivos padrões.

TABELA 1. FRAGMENTOS DE MASSA E ÍNDICE DE KOVÀTZ DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS E DA LITERATURA DE SEUS RESPECTIVOS PADRÕES

Substância	Tempo de retenção	Índice de Kovàtz Médio	Índice de Kovàtz literatura*	Fragmentos de massa/carga (M/Z) obtidos	Fragmentos de massa literatura*
α -Pinoeno	8,650	941	939	39 – 77 – 93	39 – 77 – 93
Sabineno	10,632	979	976	77 – 93	77 – 93
β -Pinoeno	10,834	983	980	39 – 77 – 93	39 – 77 – 93
Mirceno	11,364	992	991	39 – 69 – 93	39 – 69 – 93
<i>p</i> -Cimeno	12,989	1030	1026	49 – 83	47 – 86
Limoneno	13,184	1034	1031	67 – 93	67 – 93
(<i>Z</i>)- β -Ocimeno	13,525	1042	1040	41 – 79 – 93	41 – 79 – 93
(<i>E</i>)- β -Ocimeno	14,004	1052	1050	41 – 79 – 93	41 – 79 – 93
γ -Terpineno	14,536	1063	1062	49 – 86 – 149	47 – 86 – 149
Terpinoleno	15,826	1088	1088	93 – 121 – 136	93 – 121 – 136
Cis- β -Diidro-terpineol	18,088	1137	1136	39 – 105 – 129	39 – 105 – 133
Terpinen-4-ol	20,369	1185	1177	71 - 93	71 – 93
Isomentol	20,413	1185	1182	43 – 71 – 152	41 – 71 – 147
β -Cubebeno	29,583	1390	1390	67 – 93	67 – 93

TABELA 1. Continuação.

Substância	Tempo de retenção	Índice de Kovàtz Médio	Índice de Kovàtz literatura*	Fragmentos de massa obtidos	Fragmentos de massa literatura*
β -Elemeno	29,652	1391	1391	67 – 79 – 93	67 – 79 – 91
(<i>E</i>)-Cariofileno	30,400	1419	1418	41 – 79 – 91 – 105 – 133	39 – 77 – 91 – 105 – 133 – 166
α -Santaleno	30,909	1421	1420	41 – 93 – 133 – 161	39 – 91 – 133 – 166
α -Humuleno	31,889	1457	1454	67 – 93 – 147	67 – 93 – 147
D-Germacreno	33,449	1482	1480	91 – 105 – 161	91 – 105 – 161
Valenceno	33,793	1491	1491	43 – 97 – 119	41 – 93 – 121
Biciclogermacreno	34,077	1496	1494	67 – 79 – 93 – 105 – 121 – 161	67 – 79 – 93 – 105 – 121 – 161
δ -Cadineno	34,967	1520	1524	105 – 119 – 134 – 161 – 204	105 – 119 – 134 – 161 – 204
Viridiflorol	37,292	1583	1590	49 – 84 – 159 – 207	47 – 86 – 161 – 204
Guaiol	37,975	1596	1595	40 – 67 – 105 – 131 – 161	41 – 67 – 105 – 134 – 161
Cubenol	39,232	1632	1627	47 – 83 – 147 – 207	47 – 86 – 147 – 204
EPI- α -Murolol	39,436	1637	1641	51 – 98 – 123 – 209	47 – 95 – 121 – 204
α -Cadinol	40,277	1661	1653	41 – 91 – 105 – 119 – 161 – 204	43 – 95 – 121 – 161 – 204

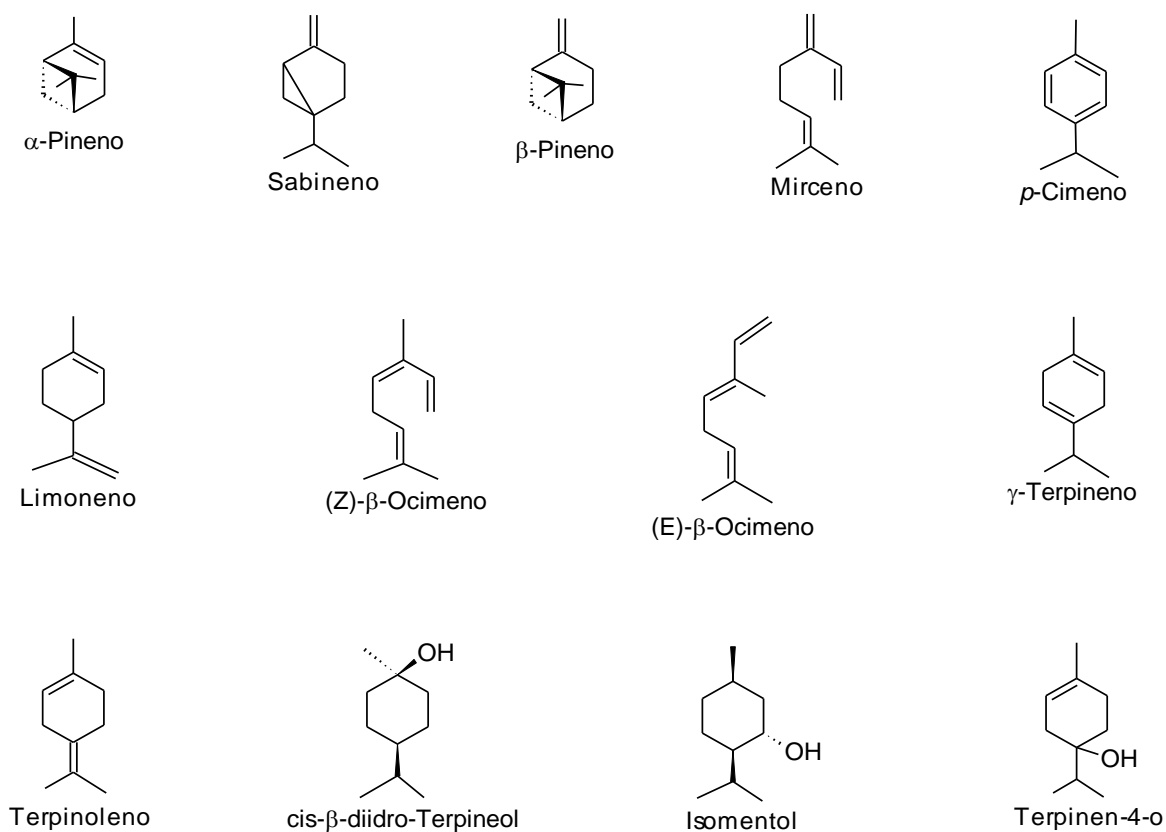
* Fonte: ADAMS (1995)

As análises realizadas por CG/EM possibilitaram, além da obtenção dos espectros de massas (ANEXO 1) de cada substância, o cálculo de seus respectivos índices de Kovàtz. Portanto, a identificação das substâncias foi baseada nestes dois parâmetros e isto se mostrou de fundamental importância para alguns casos. Por exemplo, os compostos α -pineno e β -pineno são isômeros e possuem espectros de massas idênticos; portanto, para confirmação da ocorrência destas substâncias baseou-se nos seus índices de Kovàtz. Por outro lado, ao analisar os compostos sabineno e β -pineno, cujos índices de Kovàtz são muito próximos (976 e 980, respectivamente), os espectros de massas foram absolutamente indispensáveis para assegurar a correta atribuição.

Foram contabilizadas 32 substâncias diferentes para o óleo essencial de folhas e flores de *S. brasiliensis*, das quais 27 foram identificadas, correspondentes a 13 monoterpenos (Figura 10) e 14 sesquiterpenos (Figura 11). Baseando-se nos respectivos índices de retenção de Kovàtz e também nos espectros de massas obtidos por CG-EM, é provável que as substâncias não identificadas correspondam a um monoterpeno e quatro sesquiterpenos.

As amostras de óleo essencial das folhas dos meses de junho e setembro de 2006 tiveram todas as substâncias identificadas, correspondendo a um total de 16 e 18 substâncias, respectivamente. A amostra do mês de dezembro de 2006 apresentou um total de 16 substâncias, sendo que 2 não foram identificadas. Já para as amostras de março de 2007, 3 substâncias, de um total de 17, não foram identificadas. O óleo essencial das flores de *S. brasiliensis* apresentou 20 substâncias diferentes, das quais 18 foram identificadas.

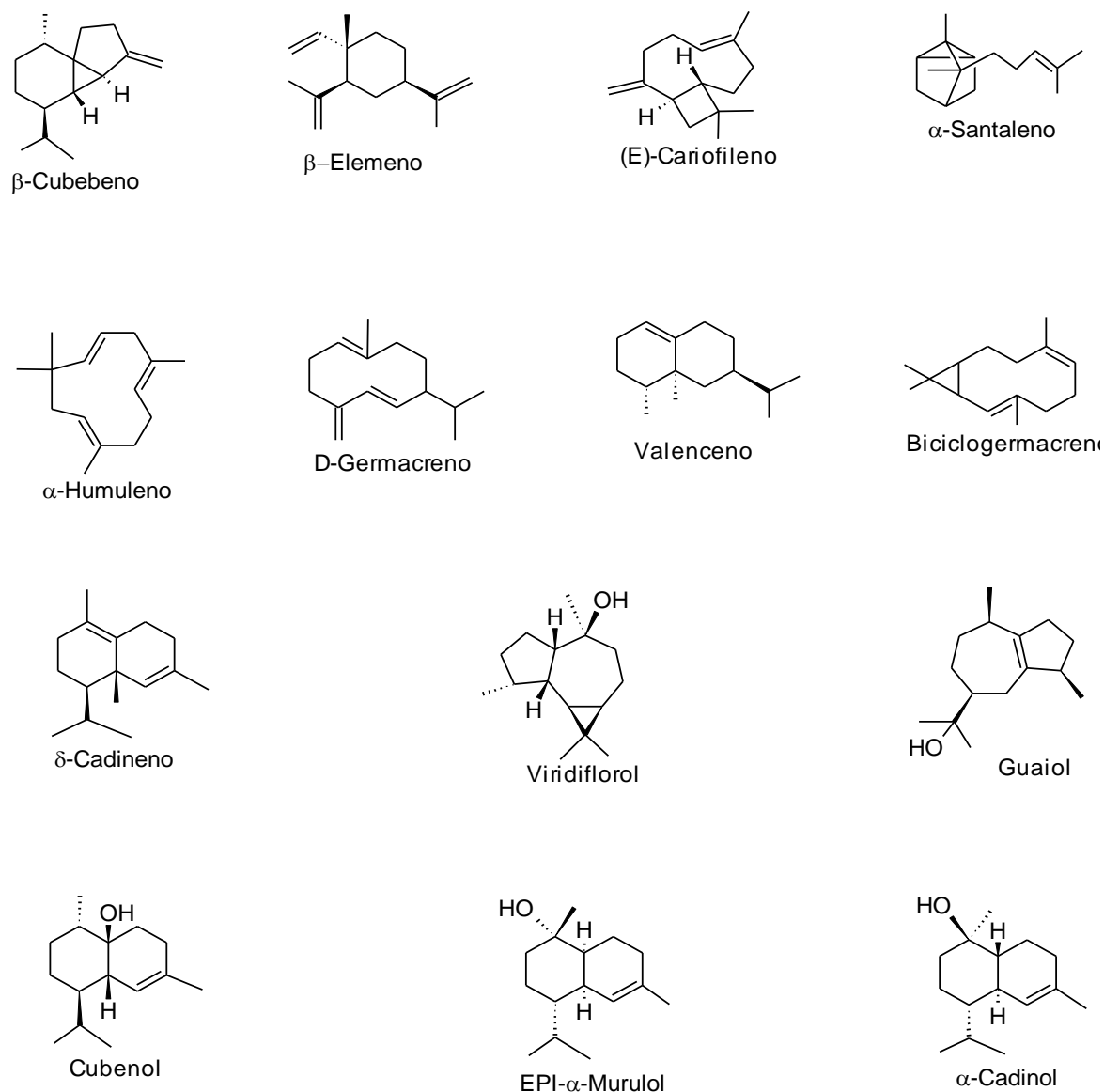
FIGURA 10. MONOTERPENOS IDENTIFICADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS E FLORES DE *S. brasiliensis*



4.3 – Caracterização dos óleos essenciais de folhas e flores de *S. brasiliensis*

Para caracterizar isoladamente os óleos essenciais das folhas e flores de *S. brasiliensis*, foram utilizados materiais coletados no mês de setembro, já que a floração da espécie ocorre apenas neste mês. No entanto, amostras de folhas também foram coletadas em outras épocas do ano, para avaliar o efeito da sazonalidade sobre o rendimento e composição química do óleo.

FIGURA 11. SESQUITERPENOS IDENTIFICADOS NOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS E FLORES DE *S. brasiliensis*

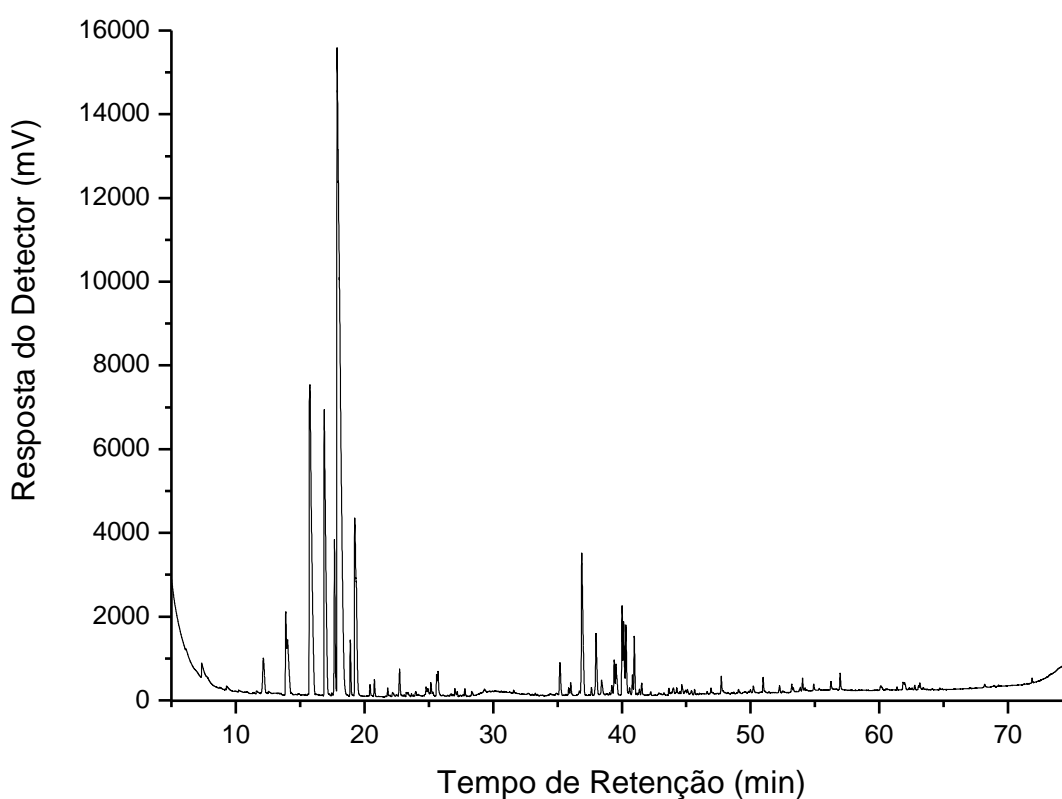


4.3.1 – Caracterização do óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis*

Amostras das folhas de *S. brasiliensis* foram coletadas no mês de setembro, submetidas à extração por hidrodestilação e o óleo essencial assim obtido foi caracterizado por CG/DIC (Figura 12). Os cromatogramas do óleo essencial das folhas

revelaram a presença de 31 picos, dos quais 18 foram caracterizados e identificados, representando 90,06% da área total do cromatograma. O limoneno foi identificado como o principal componente (24,67%) e o α -santaleno apresentou a menor abundância relativa, de 0,94%. A Tabela 2 apresenta os compostos identificados, suas respectivas abundâncias relativas, tempos de retenção e índices de Kovàtz, conforme os parâmetros analíticos citados acima.

FIGURA 12. CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE *S. brasiliensis* QUE FORAM COLETADAS EM SETEMBRO DE 2006



Os óleos essenciais das folhas de *S. brasiliensis* apresentaram uma densidade relativa de 0,8546, enquanto que o índice de refração foi de 1,487. Segundo Simões *et*

al. (2003), tais valores se encontram dentro dos intervalos que caracterizam óleos essenciais em geral, que é de 0,69 a 1,118 para a densidade relativa e de 1,450 a 1,590 para o índice de refração.

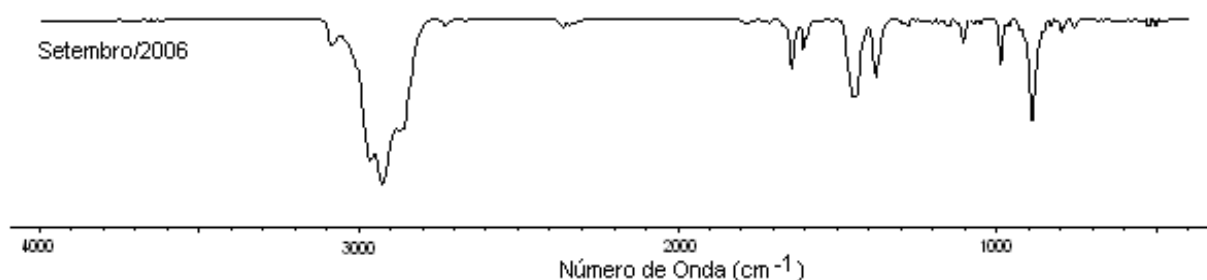
TABELA 2. ANÁLISES DE CG/EM E CG/DIC DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE *S. brasiliensis* COLETADAS EM SETEMBRO DE 2006

Número do Pico	Tempo de Retenção (min)	Índice de Kovàtz Calculado	Índice de Kovàtz *	Nome da Substância	Teor (%)
1	8,65	939	939	α -Pinoeno	1,33
2	10,63	980	976	Sabineno	3,16
3	10,83	984	980	β -Pinoeno	11,81
4	11,36	993	991	Mirceno	10,90
5	12,99	1030	1026	<i>p</i> -Cimeno	5,93
6	13,18	1034	1031	Limoneno	24,67
7	14,00	1052	1050	(<i>E</i>)- β -Ocimeno	2,13
8	20,40	1185	1182	Isomentol	6,77
9	29,65	1391	1390	β -Cubebeno	1,04
10	30,91	1421	1420	α -Santaleno	0,94
11	33,45	1482	1480	D-Germacreno	1,23
12	33,79	1491	1491	Valenceno	5,40
13	34,08	1496	1494	Biciclogermacreno	2,34
14	34,97	1521	1524	δ -Cadineno	1,33
15	37,29	1580	1590	Viridiflorol	3,40
16	37,97	1596	1595	Guaiol	2,80
17	39,44	1637	1641	EPI- α -Murolol	2,66
18	40,28	1660	1653	α -Cadinol	2,22

*Fonte: ADAMS (1995)

O espectro no infravermelho com transformada de Fourier (IVTF) do óleo essencial de folhas de *S. brasiliensis* encontra-se na Figura 13 (ANEXO 2). Sabe-se que a composição do óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis* é predominantemente composta por vários mono- e sesquiterpenos, sendo alguns deles oxigenados (Figuras 10 e 11). Portanto, estas substâncias se caracterizam pela presença de ligações duplas isoladas ou, em alguns casos, conjugadas, além de funções oxigenadas como álcoois primários, secundários e terciários. Tais atribuições estruturais puderam ser confirmadas nos espectros no IVTF, através da identificação das seguintes bandas: deformações axiais de =C-H em 3090 cm^{-1} ; deformações axiais simétricas e assimétricas de C=C-C=C em 1640 e 1606 cm^{-1} , respectivamente; deformações angulares de C-H no plano em 1400 cm^{-1} ; deformações axiais de C-O de álcoois secundários e terciários em 1105 e 1157 cm^{-1} , respectivamente; e deformações angulares de C-H fora do plano em 990 e 892 cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al*, 1994).

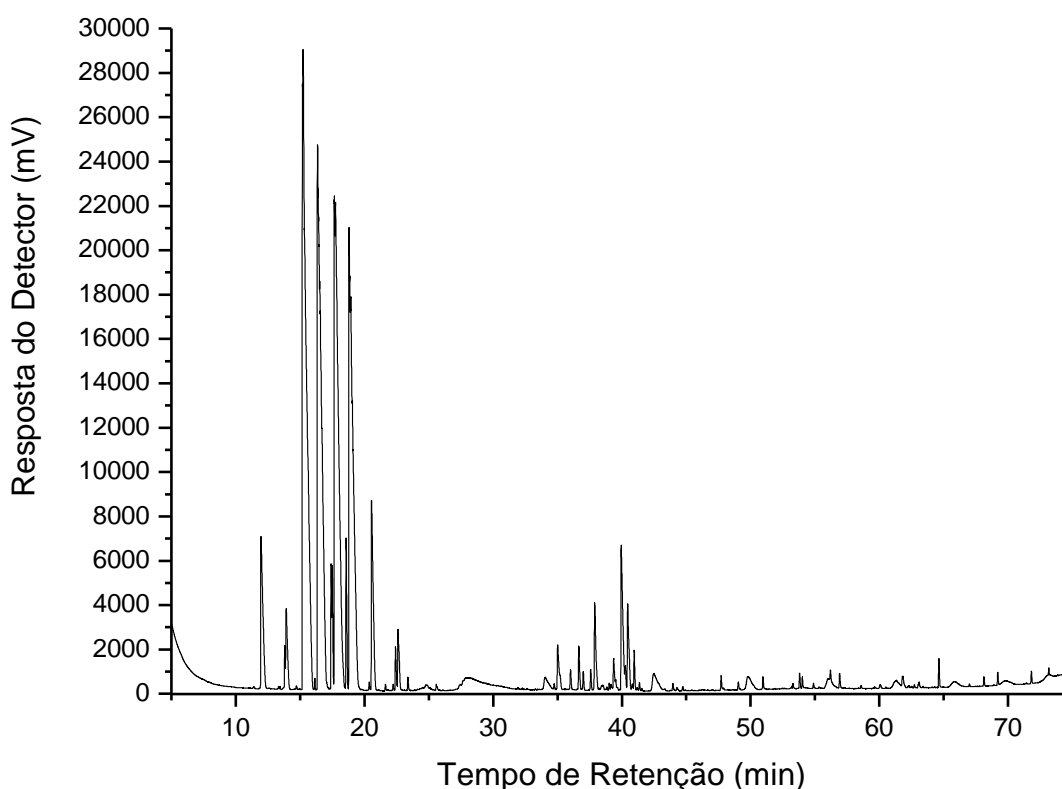
FIGURA 13. ESPECTRO NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER, DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *S. brasiliensis* COLETADAS EM SETEMBRO DE 2006



4.3.2 – Caracterização do óleo essencial obtido a partir das flores de *S. brasiliensis*

Para o óleo essencial obtido das flores de *S. brasiliensis* coletadas em setembro de 2006, o cromatograma obtido (Figura 14) apresentou 55 picos, dos quais 20 foram caracterizados e, destes, apenas 3 não foram identificados, representando 5,64% da área total do cromatograma. As 20 substâncias caracterizadas apresentaram uma abundância relativa de 89,94%.

FIGURA 14. CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FLORES DE *S. brasiliensis* QUE FORAM COLETADAS EM SETEMBRO DE 2006



De acordo com a Tabela 3, o sabineno foi identificado como o principal componente (16,65%) do óleo essencial das flores, enquanto que o teor de limoneno

caiu para 12,84%, o β -pineno passou a ser o segundo componente em abundância relativa (14,01%) e o β -cubebeno foi o composto identificado em menor teor (0,51%).

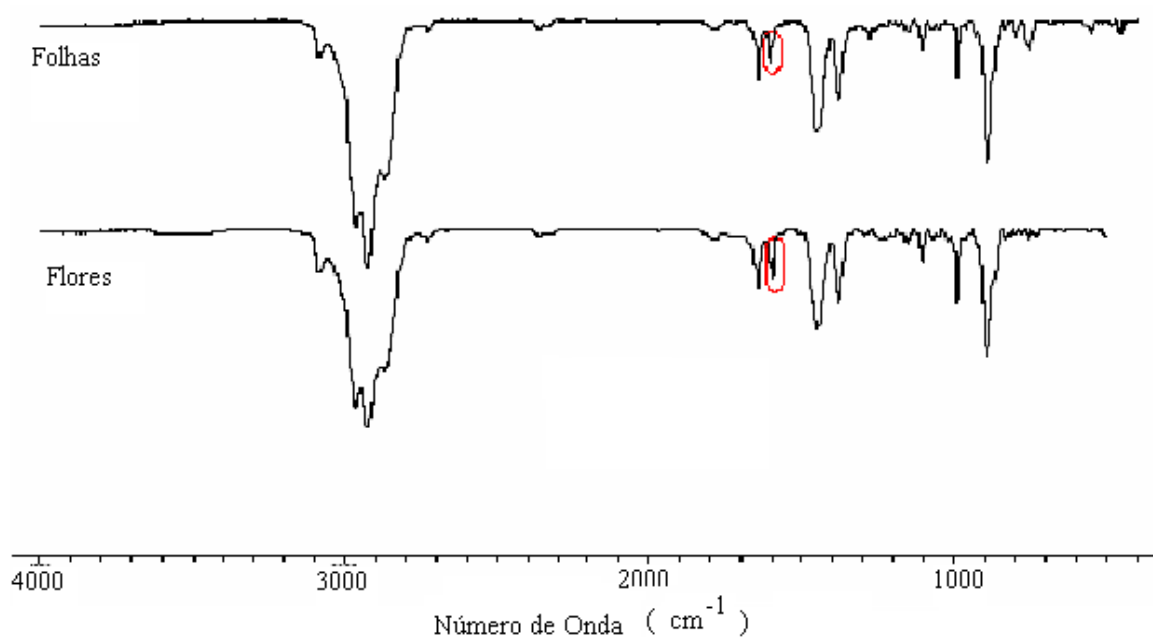
TABELA 3. ANÁLISES DE CG/EM E CG/DIC DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FLORES DE *S. brasiliensis* COLETADAS EM SETEMBRO DE 2006

Número do Pico	Tempo de Retenção (min)	Índice de Kovàtz Calculado	Índice de Kovàtz *	Nome da Substância	Teor(%)
1	7,27	905	--	--	3,95
2	8,93	945	939	α -Pineno	2,10
3	10,62	980	976	Sabineno	16,65
4	10,83	984	980	β -Pineno	14,01
5	11,37	993	991	Mirceno	3,27
6	13,18	1034	1031	Limoneno	12,84
7	14,00	1052	1050	(<i>E</i>)- β -Ocimeno	3,94
8	14,54	1063	1062	γ -Terpineno	12,02
9	15,83	1088	1088	Terpinoleno	4,94
10	18,09	1137	1136	Cis - β -diidro-terpineol	1,14
11	20,37	1184	1177	Terpinen-4-ol	1,59
12	25,75	1301	--	--	1,15
13	29,58	1389	1390	β -Cubebeno	0,51
14	30,90	1421	1420	α -Santaleno	1,14
15	32,75	1466	--	--	0,54
16	33,46	1483	1480	D-Germacreno	2,26
17	34,06	1496	1494	Biciclogermacreno	0,82
18	34,95	1519	1524	δ -Cadineno	3,77
19	37,29	1581	1590	Viridiflorol	2,25
20	39,23	1632	1627	Cubenol	1,05

*Fonte: ADAMS, 1995.

Os óleos essenciais das flores de *S. brasiliensis* (Figura 15) apresentaram praticamente o mesmo perfil espectral por IVTF, confirmando a presença de mono- e sesquiterpenos em sua composição. Percebe-se, no entanto, uma pequena inversão nas bandas localizadas em 1595 e 1606 cm^{-1} , o que é provavelmente decorrente da predominância de compostos cíclicos no óleo essencial das flores de *S. brasiliensis* (SILVERSTEIN *et al*, 1994).

FIGURA 15. ESPECTROS NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS E FLORES DE *S. brasiliensis*



As propriedades físico-químicas do óleo essencial das flores também ficaram dentro dos intervalos esperados e bem próximo ao óleo essencial das folhas. A densidade relativa foi 0,8548, enquanto que o índice de refração foi de 1,475.

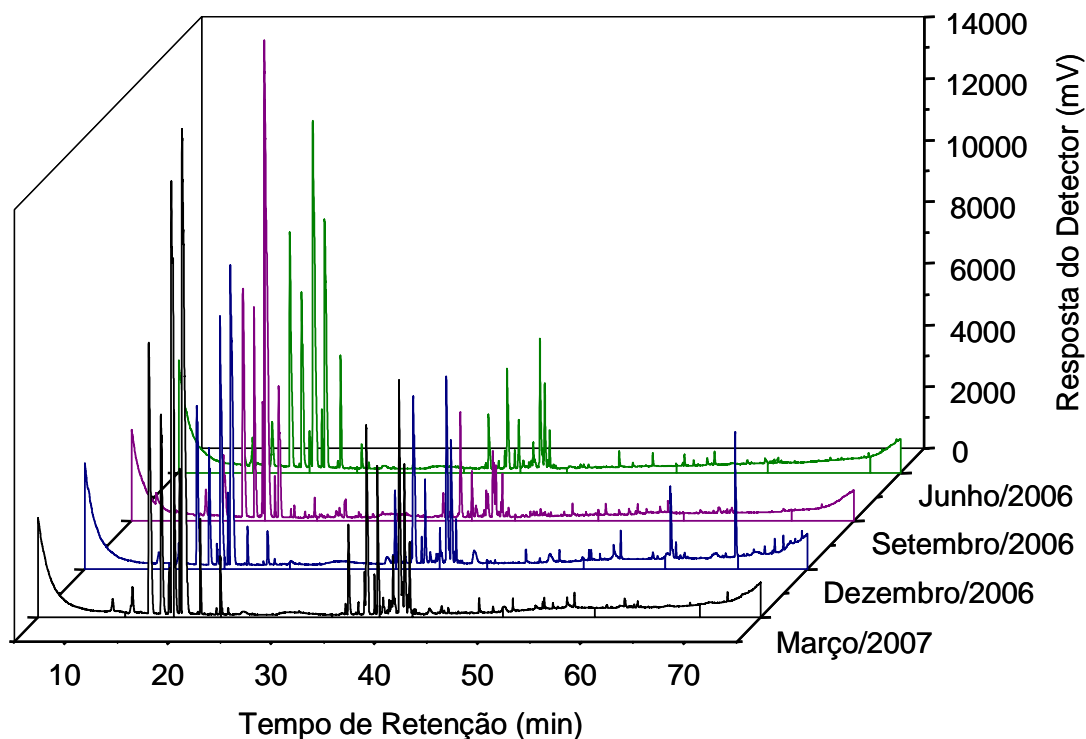
4.4 – Efeito de sazonalidade sobre o óleo essencial obtido a partir das folhas de *S. brasiliensis* coletadas trimestralmente

Amostras de óleo essencial, obtidas a partir de coletas trimestrais das folhas de *S. brasiliensis* no período de um ano, foram caracterizadas individualmente através de CG/EM e CG/DIC. As coletas foram realizadas nos meses de junho, setembro, dezembro e março, sendo que setembro correspondeu ao mês de floração da espécie. Além da análise cromatográfica, também foram determinadas as principais propriedades físicas dos óleos essenciais (densidade relativa e índice de refração) e o perfil espectral das diferentes amostras por IVTF.

A análise da composição química dos óleos essenciais de *S. brasiliensis* foi realizada por cromatografia de fase gasosa empregando, para análise quantitativa, um detector de ionização de chama (CG/DIC). A Figura 16 apresenta os cromatogramas obtidos através desta análise, onde se vê claramente a presença de dois conjuntos de picos.

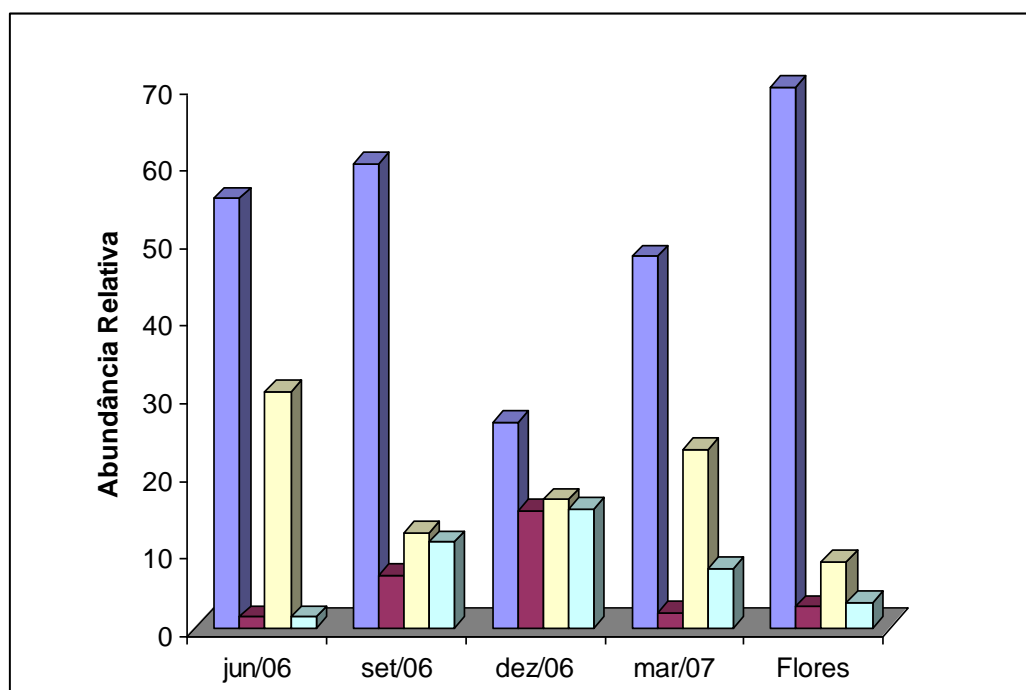
Os monoterpenos, que são compostos voláteis de baixa massa molar, são detectados com um tempo de retenção máximo de 30 minutos. Por outro lado, os sesquiterpenos, cuja massa molar é maior, começam a ser detectados a partir de aproximadamente 35 minutos. Tanto os monoterpenos quanto os sesquiterpenos estão presentes em todos cromatogramas. Porém, houve uma variação significativa entre as suas respectivas abundâncias relativas e, em alguns casos, um número maior de picos foi detectado, provavelmente em decorrência da época em que a coleta da planta foi realizada.

FIGURA 16. PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS AMOSTRAS DE ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *S. brasiliensis* COLETADAS TRIMESTRALMENTE



Nos meses de junho e dezembro de 2006 e março de 2007, o perfil cromatográfico dos óleos essenciais foi bastante semelhante. No entanto, ao avaliar a abundância relativa de monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados (Figura 17), percebe-se uma variação principalmente em relação aos compostos oxigenados. Na coleta de setembro de 2006, que é o mês do início da floração da espécie de *S. brasiliensis*, o grupo de sesquiterpenos apresentou uma abundância relativa inferior, e a presença de compostos oxigenados aumentou significativamente, chegando praticamente a se igualar aos sesquiterpenos do mês de dezembro. Por outro lado, no cromatograma obtido a partir do óleo essencial das flores, observa-se que os monoterpenos estão presentes em uma abundância relativa maior do que a dos sesquiterpenos e dos compostos oxigenados.

FIGURA 17. AVALIAÇÃO DA ABUNDÂNCIA RELATIVA DE MONOTERPENOS (EM AZUL), MONOTERPENOS OXIGENADOS (EM BORDÔ), SESQUITERPENOS (EM AMARELO) E SESQUITERPENOS OXIGENADOS (EM VERDE)



A Tabela 4 apresenta a abundância relativa de cada substância identificada para os óleos essenciais de folhas e flores de *S. brasiliensis* coletado trimestralmente. O teor de cada substância variou consideravelmente no decorrer do ano. Algumas das substâncias identificadas foram detectadas apenas no óleo da flor (γ -terpineno, cubenol e *n*-tetracosano), enquanto que outras foram comuns às amostras do óleo essencial das folhas e das flores de *S. brasiliensis*, como β -pineno, mirceno, limoneno, (*E*)- β -ocimeno, D-germacreno, biciclogermacreno e δ -cadineno.

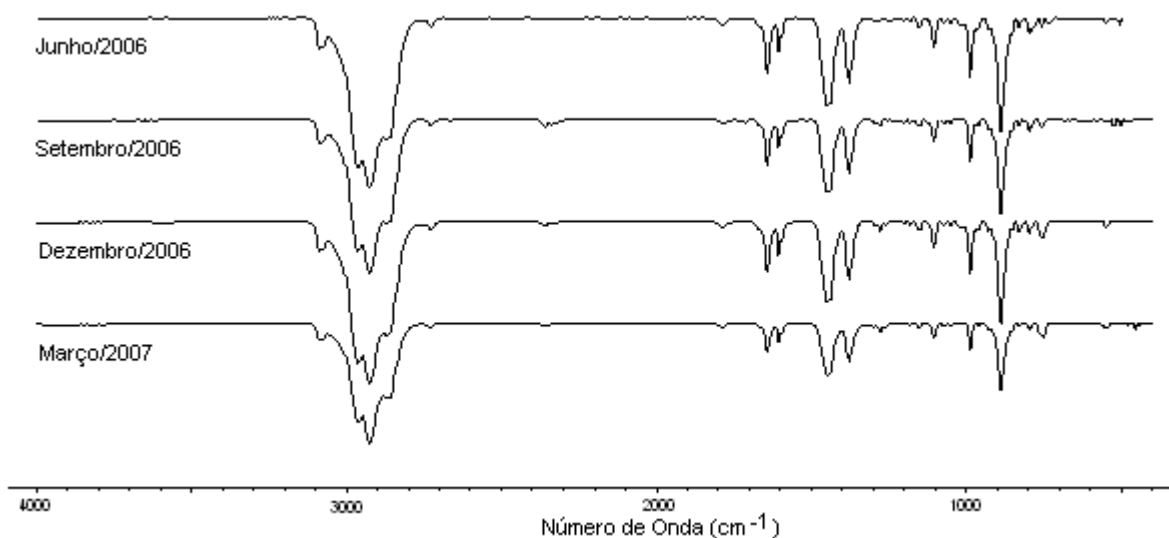
TABELA 4. ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E FLORES DE *S. brasiliensis*

Substâncias	Abundância Relativa (%)				
	Folhas				Flores
	Junho, 2006	Setembro, 2006	Dezembro, 2006	Março, 2007	Setembro, 2006
α -Pino	1,72	1,33	*	*	2,10
Sabineno	2,92	3,16	*	*	16,65
β -Pino	10,66	11,81	7,73	6,82	14,01
Mirceno	4,99	10,90	5,72	1,57	3,27
<i>p</i> -Cimeno	*	5,93	*	*	*
Limoneno	18,92	24,67	12,14	14,84	12,84
(<i>Z</i>)- β -Ocimeno	1,12	*	*	4,97	*
(<i>E</i>)- β -Ocimeno	12,21	2,13	3,50	16,46	3,94
γ -Terpineno	*	*	*	*	12,02
Terpinoleno	2,92	*	*	3,27	4,94
Cis- β -diidro-Terpineol	*	*	14,63	*	1,14
Terpinen-4-ol	1,38	*	1,85	*	1,59
Isomentol	*	6,77	*	1,97	*
β -Cubebeno	*	1,04	*	*	0,51
β -Elemeno	5,85	*	3,55	1,44	*
(<i>E</i>)-Cariofileno	2,49	*	*	*	*
α -Santaleno	*	0,94	1,06	6,46	1,14
α -Humuleno	0,96	*	*	*	*
D-Germacreno	10,58	1,23	8,11	5,09	2,26
Valenceno	*	5,40	*	*	*
Biclogermacreno	9,11	2,34	1,28	1,99	0,82
δ -Cadineno	1,55	1,33	4,06	8,00	3,77
Viridiflorol	*	3,40	1,68	*	2,25
Guaiol	*	2,80	9,08	5,13	*
Cubenol	*	*	*	*	1,05
EPI- α -Murolol	*	2,66	*	*	*
α -Cadinol	1,38	2,22	5,97	2,47	*
Não identificadas	-	-	3,97	13,72	3,41

* Substâncias ausentes ou não contabilizadas

Os espectros no IVTF, obtidos a partir do óleo essencial de folhas de *S. brasiliensis* coletadas trimestralmente (Figura 18, ANEXO 2), também apresentaram perfis bastante semelhantes entre si. Conforme discutido anteriormente (Figuras 10 e 11), as atribuições do espectro confirmam que o óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis* é predominantemente formado por mono- e sesquiterpenos, e que a sazonalidade não exerce qualquer efeito sobre esta composição química.

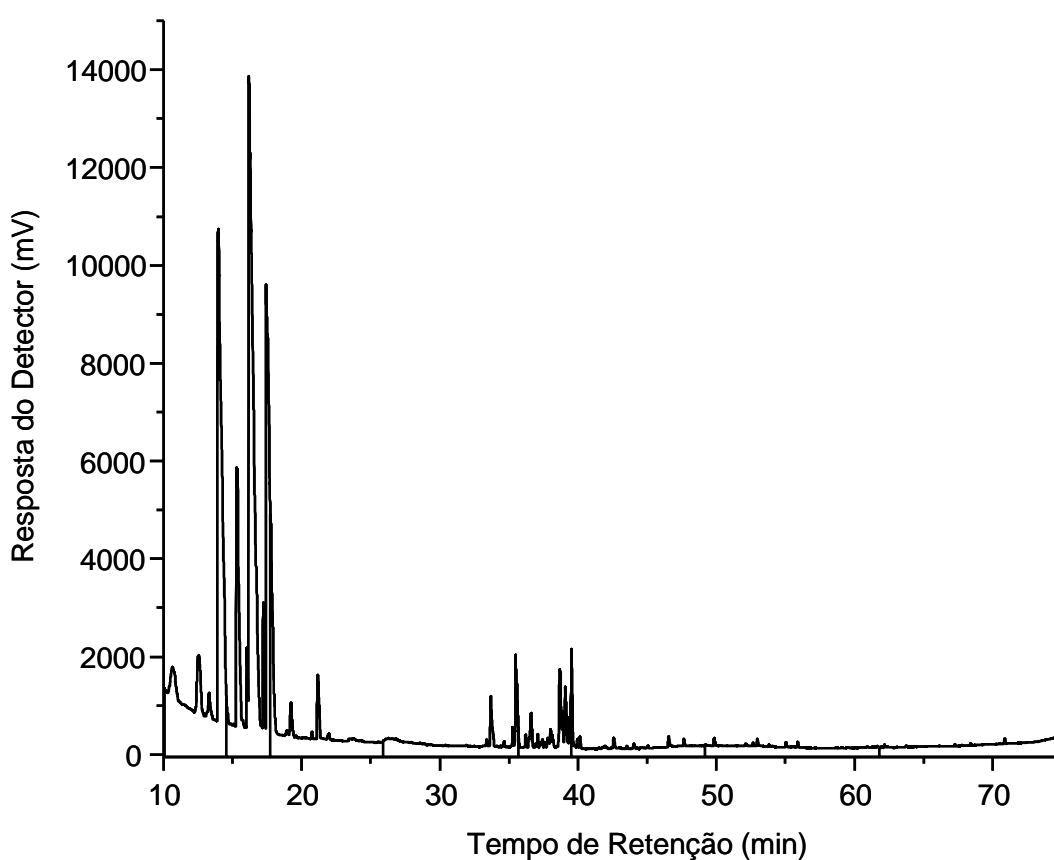
FIGURA 18. ESPECTROS NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (IVTF), GERADOS A PARTIR DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE FOLHAS DE *S. brasiliensis* COLETADAS TRIMESTRALMENTE



Para fechar o estudo de sazonalidade do óleo essencial de folhas de *S. brasiliensis*, uma nova coleta de matéria-prima foi realizada em junho de 2007 buscando avaliar se o seu óleo essencial seria equivalente ao obtido em junho de 2006, ou seja, na mesma época do ano. O perfil cromatográfico desta nova amostra de óleo

essencial (Figura 19) foi bastante semelhante ao observado para o período de junho de 2006, revelando que a composição química do óleo essencial das folhas cumpre um ciclo anual e que, provavelmente está associado às alterações decorrentes das diferentes estações do ano.

FIGURA 19. CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE *S. brasiliensis* QUE FORAM COLETADAS EM JUNHO DE 2007



4.5 – Análise do óleo essencial das folhas e do caule de diferentes espécimes de *S. brasiliensis*

Além das amostras coletadas trimestralmente, foram analisados, ainda, os óleos essenciais das folhas de três espécimes diferentes de *S. brasiliensis* e, também, do

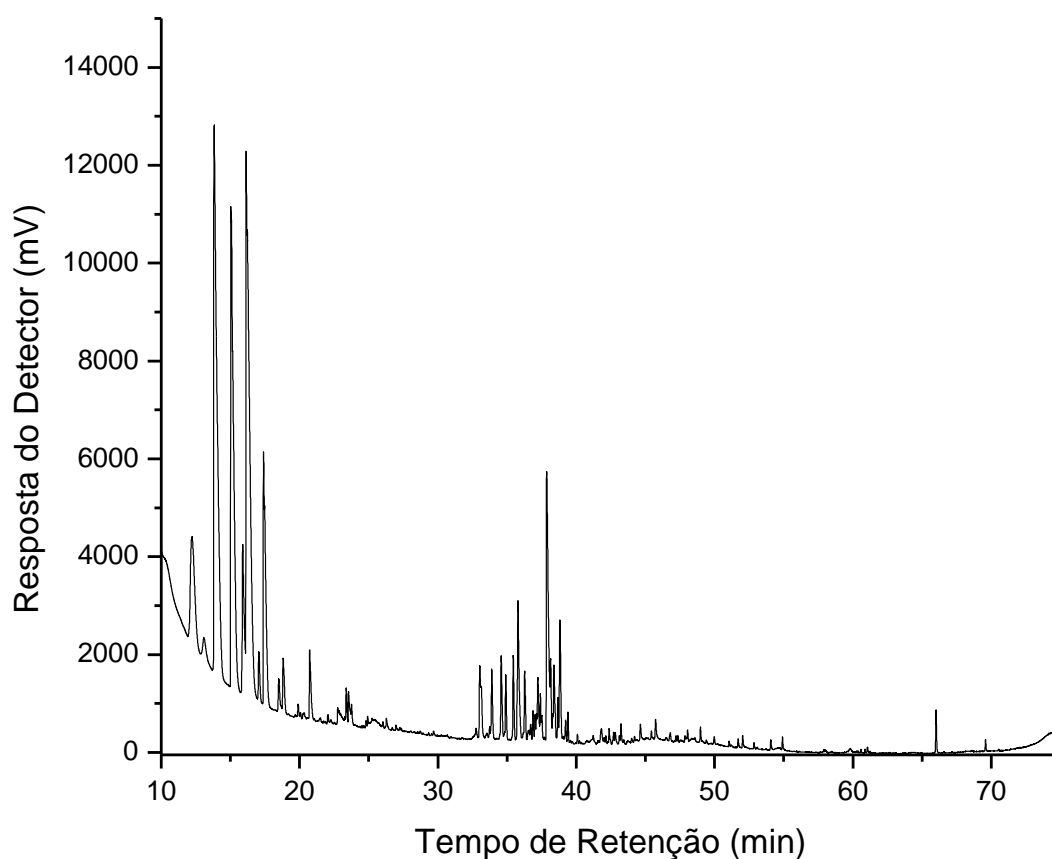
caule de um espécime coletado em junho de 2007. O caule foi avaliado para verificar o seu conteúdo em óleos essenciais e a natureza química deste óleo em relação ao extraído das folhas e flores. A extração obtida a partir do caule apresentou um rendimento de 0,02%, enquanto que a extração de folhas resultou em um rendimento médio de 0,03% para a época em que a coleta foi realizada (junho de 2007).

O cromatograma obtido (Figura 20) demonstrou que o óleo obtido a partir do caule de *S. brasiliensis*, assim como o de folhas e flores, apresenta os mesmos grupos de monoterpenos e sesquiterpenos. Portanto, dependendo dos objetivos do processo, seria possível proceder à extração da planta inteira, sem a necessidade da separação das folhas e/ou flores. No entanto, a composição química do óleo essencial do caule, aparentemente mais complexa pelo número de picos observados no cromatograma, não foi investigada em detalhe neste estudo, podendo, portanto, apresentar diferenças significativas em relação ao óleo essencial de outras regiões da planta.

Como as coletas de *S. brasiliensis* nem sempre foram realizadas no mesmo local, os resultados apresentados até então se referem à espécie, e não a espécimes tratados isoladamente. A composição de óleos essenciais de uma planta é determinada geneticamente e, normalmente, é específica para um determinado órgão e característica para seu estágio de desenvolvimento. No entanto, as condições ambientais também podem causar mudanças significativas. A ocorrência de quimiotipos ou raças químicas é frequente em plantas ricas em óleo essencial (SIMÕES *et al.*, 2003). Os quimiotipos seriam idênticos botanicamente, mas diferem quimicamente. Portanto, para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos nos estudos de sazonalidade, e permitir uma avaliação ainda que preliminar de variações genéticas na espécie de *S. brasiliensis*,

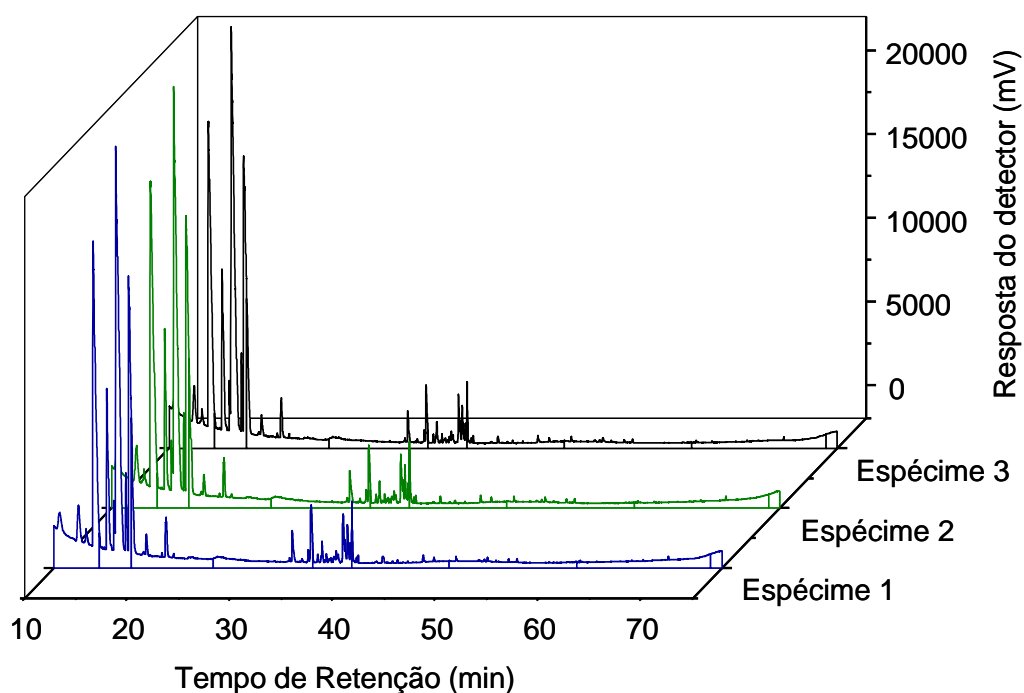
fez-se a extração e a subsequente análise comparativa dos óleos essenciais das folhas de espécimes diferentes. Estes espécimes foram coletados na mesma época do ano (junho de 2007), seguindo os seguintes critérios: três exemplares de porte relativamente equivalente, dois deles em uma mesma área e outro em área a cerca de 10 km de distância, para evidenciar diferenças que pudessem ser atribuídas a fatores genéticos.

FIGURA 20. CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DO CAULE DE *S. brasiliensis*



A Figura 21 demonstra que o óleo essencial dos três espécimes de *S. brasiliensis* apresenta o mesmo perfil cromatográfico. Esta semelhança sugere que a produção de óleos essenciais por esta espécie não sofre grande influência devido ao local de coleta e ao número de espécimes processados. No entanto, é importante ressaltar que esta conclusão é válida apenas para amostras coletadas na região dos campos gerais do Estado do Paraná.

FIGURA 21. CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS DE TRÊS ESPÉCIMES DE *S. brasiliensis*



Avaliando os resultados obtidos em todas as análises, percebe-se que, dentre as vinte e sete substâncias identificadas, sete são comuns a todas as amostras: β -pineno, mirceno, limoneno, (*E*)- β -ocimeno, D-germacreno, biciclogermacreno e δ -cadineno. Em paralelo, estes foram os compostos que apresentaram maior abundância relativa

em todas as amostras de óleos essenciais. Tratam-se, portanto, de compostos insaturados e/ou oxigenados cuja importância está relacionada à rota biossintética de metabólitos secundários da planta. Esta composição sugere que são susceptíveis a oxidações, ciclizações, isomerizações, racemizações e rearranjos.

Comparando a composição química do óleo essencial de *S. brasiliensis* com aquela disponível na literatura para o óleo essencial de outras espécies deste mesmo gênero, nota-se uma pequena semelhança com o óleo essencial de *S. graveolens* (PÉREZ *et al.*, 1999). Seis componentes em comum foram identificados nos óleos essenciais destas duas espécies: α -pineno, *p*-cimeno, sabineno, α -terpineno, terpinoleno e terpinen-4-ol. Por outro lado, o óleo essencial de *S. brasiliensis* não apresentou nenhuma semelhança química com aquele isolado de *S. grisebachii* por outros autores (TEIBLER *et al.*, 2001).

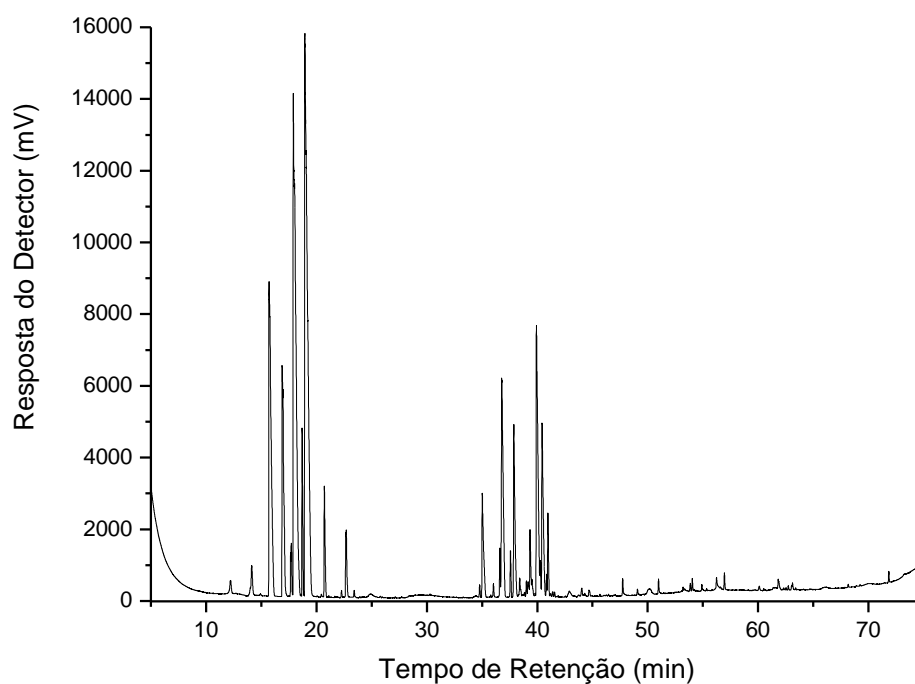
4.6 – Avaliação do armazenamento das folhas sobre a composição do óleo essencial

Com o objetivo de avaliar a susceptibilidade da matéria-prima ao armazenamento, foram realizadas extrações de folhas de *S. brasiliensis* que foram secas ao ar livre e, também, de folhas que foram congeladas por um período de uma semana.

As folhas que foram congeladas por uma semana apresentaram o mesmo rendimento que as folhas verdes e frescas. O óleo essencial resultante desta extração foi analisado por CG/DIC e o seu perfil cromatográfico (Figura 22) foi semelhante ao do óleo essencial das folhas verdes e frescas coletadas no mesmo período (março de

2007), exceto por um aparente aumento na proporção relativa de sesquiterpenos. O congelamento é uma técnica de conservação bastante utilizada para alimentos. Em geral, o desenvolvimento de microorganismos é inibido e o processo de deterioração é retardado, fazendo com que o alimento mantenha as suas propriedades por mais tempo (ZHENGFU *et al.*, 2007).

FIGURA 22. CROMATOGRAMA DO ÓLEO ESSENCIAL EXTRAÍDO DAS FOLHAS CONGELADAS DE *S. brasiliensis*



As folhas secas ao ar livre, quando submetidas à hidrodestilação, não apresentaram nenhum teor mensurável de óleo essencial. Pelas extrações realizadas, sabe-se que a concentração de óleo essencial nas folhas verdes e frescas de *S.*

brasiliensis é baixa; além disso, os compostos presentes (a maioria monoterpenos) são bastante voláteis. Com a secagem ao ar das folhas, é provável que estes compostos tenham sido parcialmente perdidos por volatilização.

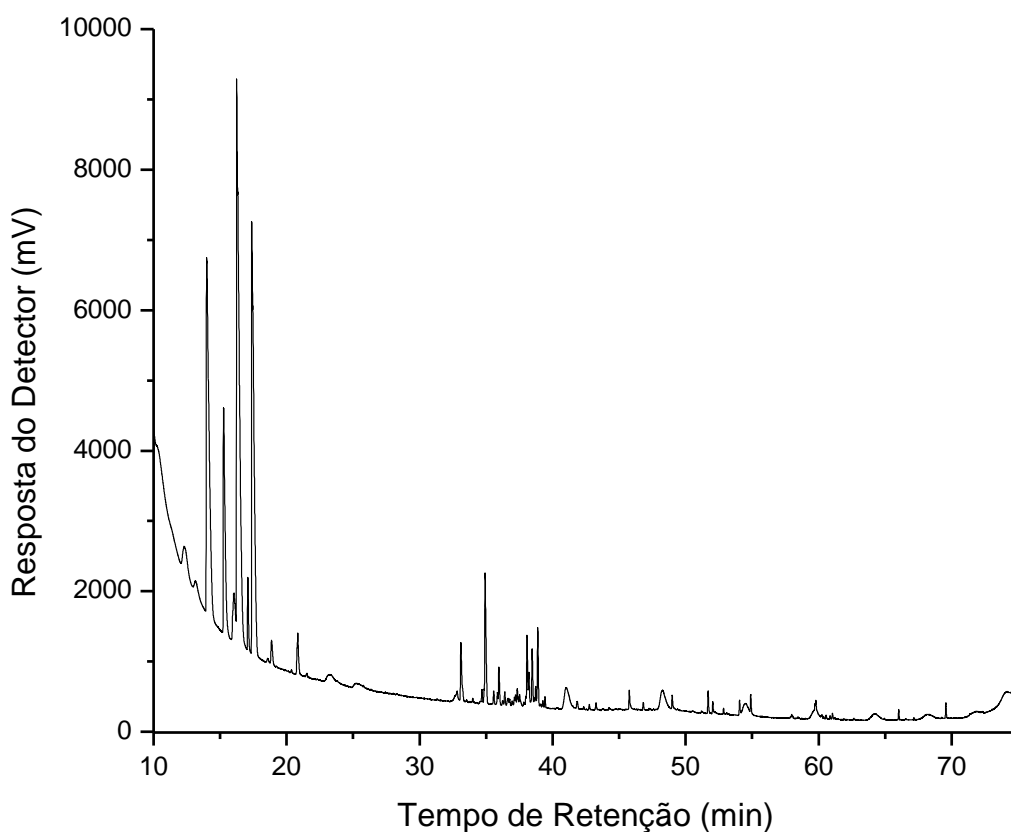
Para a espécie de *S. brasiliensis*, o congelamento se revelou como uma boa alternativa para o armazenamento da matéria-prima, pois tal procedimento não interferiu no rendimento do óleo essencial das folhas e nem na sua composição química, conforme demonstrado pela análise cromatográfica.

4.7 – Extrator em larga escala

A extração do óleo essencial em maiores quantidades foi tentativamente realizada em um novo equipamento, construído especialmente para este fim. Na realização dos primeiros testes, não houve uma separação adequada entre o vapor condensado e o óleo essencial, cuja emulsão foi submetida a uma extração com solvente orgânico (pentano, 3 x 50 mL) para recuperar o óleo essencial disperso em água. As fases orgânicas foram então combinadas e concentradas em evaporador rotativo sob temperatura ambiente, de onde foi possível obter uma recuperação parcial do óleo essencial, útil apenas para uma avaliação qualitativa do processo. O óleo essencial resultante das extrações foi analisado por CG/DIC e o perfil cromatográfico, registrado na Figura 23, apresentou-se equivalente ao verificado anteriormente para os óleos essenciais extraídos em Clevenger convencional. No entanto, a concentração foi bem menos significativa do que a observada nas análises anteriores. Como o procedimento de injeção foi mantido constante em todas as análises, este resultado

sugere que o processo de extração gerou perdas de massa ou causou alguma contaminação residual do óleo essencial.

FIGURA 23. CROMATOGRAMA DA FASE ORGÂNICA OBTIDA DA PRIMEIRA EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA



Para contornar os problemas descritos acima, eventualmente provenientes da má eficiência térmica do extrator, o sistema foi provido de um reostato para melhor controle da temperatura de extração, e de um banho termostaticado, para melhorar a eficiência do condensador. Feito isto, dois novos experimentos de extração foram conduzidos, mas, apesar das adaptações realizadas no sistema, persistiu a dificuldade de se visualizar a separação entre o óleo essencial e o hidrolato. Essa dificuldade na

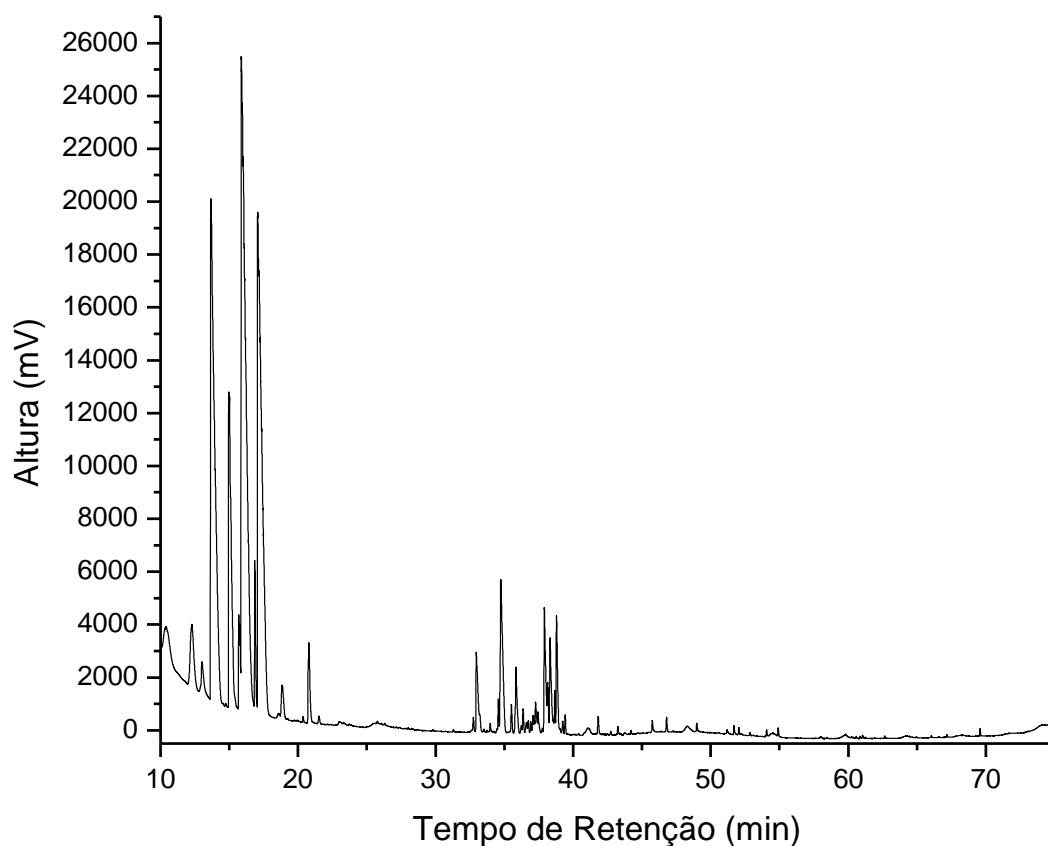
separação pode ser consequência de uma temperatura de extração muito elevada, fazendo com que as moléculas do óleo essencial fiquem dispersas na água, formando uma solução coloidal.

Das extrações realizadas em Clevenger convencional, sabe-se que a quantidade de óleo essencial presente na espécie de *S. brasiliensis* é pequena (0,03%). Portanto, para que houvesse suficiente acúmulo de óleo essencial nos recipientes de coleta, cujo diâmetro interno é relativamente grande (aproximadamente 7 cm), seria necessário proceder a extração de várias bateladas seqüenciais de matéria-prima, o que não foi possível por dificuldades encontradas na coleta. Sendo assim, os hidrolatos obtidos, ainda na forma de emulsão, foram novamente submetidos ao procedimento de extração com solvente para recuperação do óleo essencial e o rendimento obtido foi de 0,024%, ou seja, 20% inferior ao observado em Clevenger convencional. Para avaliar a integridade do óleo essencial isolado, o mesmo foi avaliado por CG/DIC e o cromatograma resultante encontra-se registrado na Figura 24.

Comparando os cromatogramas das Figuras 21 e 22, fica evidente que não houve alteração no perfil cromatográfico dos óleos essenciais extraídos das folhas verdes e frescas de *S. brasiliensis* e que os ajustes realizados no equipamento foram de extrema importância para o acúmulo de quantidades apreciáveis de óleo essencial nos recipientes de coleta. Por outro lado, as Figuras 21 e 22, demonstram que o óleo essencial derivado do extrator é quimicamente equivalente ao produto derivado da extração em Clevenger convencional. Portanto, conclui-se que o sistema instalado em nosso laboratório não é apropriado para o processamento de matérias-primas cujo teor de óleo seja muito baixo, mas que, mediante a extração com solventes orgânicos (*n*-

pentano), é possível recuperar um óleo cuja composição não apresenta qualquer alteração química em relação à extração em Clevenger. Portanto, o extrator proposto neste trabalho mostrou-se adequado para a extração de óleos essenciais, particularmente para situações em que o isolamento de grandes quantidades de óleo seja necessário, já que a quantidade de matéria-prima utilizada é pelo menos cinco vezes maior do que a empregada em Clevenger convencional, onde o volume do balão determina a quantidade de massa verde empregada no processo.

FIGURA 24. CROMATOGRAMA OBTIDO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *S. brasiliensis* DA EXTRAÇÃO EM LARGA ESCALA



4.8 – Ensaios Biológicos - Atividade Antimicrobiana e Antifúngica

Os resultados obtidos (Tabela 5) em ensaios de atividade biológica demonstraram que os óleos essenciais das flores de *S. brasiliensis* não apresentaram qualquer atividade antimicrobiana, para os organismos testados.

TABELA 5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS E FLORES DE *S. brasiliensis*

Microorganismos	Concentração Mínima Inibitória, CMI ($\mu\text{L}/\text{mL}$)					Drogas de Referências
	Óleo essencial de <i>S. brasiliensis</i>					
	Folhas				Flores	
	06/06	09/06	12/06	03/07	09/06	
<i>B. subtilis</i> ATCC 5061	*	*	*	*	*	20 ^a
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	*	*	*	*	*	50 ^b
<i>E. faecium</i> CCT 5079	*	*	*	*	*	70 ^a
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	700	*	*	*	*	120 ^a
<i>E. coli</i> ATCC 11775	*	*	*	*	*	40 ^a
<i>M. luteus</i> ATCC 4698	*	*	*	*	*	50 ^a
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 13388	*	*	*	*	*	125 ^a
<i>R. equi</i> ATCC 6939	*	500	*	*	*	40 ^a
<i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708	*	*	*	*	*	60 ^a
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	*	*	*	*	*	20 ^a
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	*	*	*	*	*	40 ^a

* $\geq 1,0$ mg/mL; ^a Cloranfenicol; ^b Nistatina

Os óleos essenciais das folhas de *S. brasiliensis* também não apresentaram atividade antifúngica mensurável, visto que não apresentaram inibição contra o fungo (*Candida albicans*) presente nos testes. Por outro lado, este óleo essencial forneceu resultados positivos para pelo menos duas das bactérias avaliadas no estudo.

A mistura de componentes presentes no óleo essencial, coletado das folhas de *S. brasiliensis* em junho de 2006, apresentou atividade contra um microrganismo patogênico ao trato gastrointestinal (*Enterococcus hirae*), enquanto que a amostra obtida em setembro de 2006 apresentou atividade contra *Rhodococcus equi*, que é um microrganismo patogênico ao trato respiratório.

Analisando os resultados derivados das folhas de *S. brasiliensis* coletadas em junho e setembro de 2006, percebe-se que, na amostra de setembro, a abundância relativa de sesquiterpenos corresponde a praticamente à metade daquela do mês de junho. Alguns compostos como o D-germacreno e o biciclogermacreno, tiveram uma redução expressiva nos teores, passando de 10,58 para 1,23 e 9,11 para 2,34, respectivamente. Outros compostos, como *p*-cimeno, β -cubebeno, valenceno e epi- α -murulol foram detectados apenas na amostra de setembro. Estas variações observadas podem estar relacionadas à atividade antimicrobiana frente a diferentes microrganismos (*Enterococcus hirae* e *Rhodococcus equi*). De uma forma geral, os resultados obtidos nestes ensaios caracterizam o óleo essencial de *S. brasiliensis* como de atividade biológica fraca frente aos 11 microrganismos envolvidos no ensaio.

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

As extrações realizadas das folhas e flores de *S. brasiliensis*, permitiram avaliar a composição química dos óleos, suas propriedades físicas e a atividade biológica. No decorrer do trabalho, as coletas das folhas de *S. brasiliensis* realizadas trimestralmente demonstraram que o rendimento e a composição química do óleo essencial são afetados principalmente pelo período de floração da espécie. A caracterização dos óleos essenciais obtidos dos diferentes órgãos da planta (folhas, flores e caules) demonstrou a presença de um grupo de mono e sesquiterpenos. No decorrer do ano, o óleo essencial das folhas sofreu algumas variações, principalmente em relação aos compostos oxigenados. O óleo obtido a partir das flores de *S. brasiliensis* apresentou, predominantemente, monoterpenos não oxigenados e, das vinte e sete substâncias identificadas nas diferentes amostras de óleo, sete foram comuns a todas elas (β -pineno, mirceno, limoneno, (*E*)- β -ocimeno, D-germacreno, biciclogermacreno e δ -cadineno).

As propriedades físicas (densidade relativa e índice de refração) dos óleos essenciais de folhas e flores de *S. brasiliensis* mostraram-se equivalentes aos valores esperados para óleos desta natureza. Por outro lado, os espectros no infravermelho dos óleos essenciais de folhas e flores de *S. brasiliensis* diferiram muito pouco entre si, apresentando perfis espectrais típicos de alcenos.

Os ensaios biológicos realizados demonstraram que os óleos essenciais de folhas e flores de *S. brasiliensis* apresentam baixa atividade bacteriana. No entanto, as bactérias às quais o óleo demonstrou atividade são patogênicas a dois sistemas de extrema importância para o organismo humano. A atividade demonstrada à bactéria *E.*

hirae vem confirmar o uso da planta pela cultura popular para problemas gastrointestinais. Vale ressaltar que o número de microorganismos testado nestes ensaios foi relativamente limitado e que apenas um fungo foi utilizado como referência.

O projeto de construção de um extrator em larga escala foi executado e instalado no laboratório. Vários testes e ajustes foram necessários para se obter o máximo de eficiência do equipamento e os resultados obtidos foram satisfatórios. Mesmo tendo sido necessária extração do hidrolato com solvente para recuperação do óleo essencial, sua composição química não variou em relação ao observado para amostras extraídas em escala de bancada. Portanto, o extrator proposto neste trabalho mostrou-se eficiente para a extração de óleos essenciais e apresenta grande vantagem sobre o Clevenger convencional, uma vez que a massa verde utilizada chega a ser pelo menos cinco vezes maior. Além disso, o desenho do extrator permite a separação das frações leve e pesada do óleo, o que poderá ser útil para a investigação de outros tipos de matérias-primas que apresentem esta peculiaridade.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, Illinois: Allured, 1995. 469p.
- BERLYN, G.P.; MIKSCHE, J.P.P., Botanical Microtechnique and Citochemistry, Iowa: State University Press, 1976
- BERNARD, T.; DELMAS, W.; GASSET,A., Process for extracting essential oils from aromatic plants using 1,1,2-trichloro-1,2,2-trifluoroethane, Toulouse: Institute National Polytechnique de Toulouse, 1987. 26 p.
- BRITO, J.F.A.; ALQUINI, Y., Arquivos de Biologia e Tecnologia, v.39, p.949-951, 1996
- BUCHBAUER, G.L.; JAGER, W.; JIROVETZ, L.; DIETRICH, H.; PLANK, C., Journal of Essential Oil Research, v.53, p.311-313, 1993
- CARNEY, T.P. Laboratory fractional distillation, New York: The Macmillan Company, 359p., 1949.
- COCKING, T.T.; MIDDLETON, G. An improved method for the estimation of the essential oil content of drugs. Journal Pharmacia Pharmacology London, v.5, p.521, 1932
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S., Introdução a Métodos Cromatográficos, Campinas: UNICAMP, 1997. 279p.
- CVEJIÉ, J. H.; ROHMER, M., Phytochemistry, v. 53, p. 21-28, 2000.
- DIAS, B.F.S., A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades, Campinas: André Tosello, 1996. p.10
- DOBSON, A.P., Conservation and Biodiversity, New York: Scientific American Library, 1996, p.12
- ELOFF, J.N., Journal of Ethnopharmacology, v. 60, p. 1-8, 1998
- FOSTER, A.S., Practical Plant Anatomy, New York: Van Nostrand, 1949

- GARCIA, E.S.; SILVA, A.C.P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C.B.V.; CAVALHEIRO, M.V.S.; SANTOS, R.R.; TOMASINI, T., **Fitoterápicos**, Campinas: André Tosello, 1996. p.17
- GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R.; DE, M.B., **Ciência e Cultura**, v.49, n.5/6, p.315-332, 1997
- GUENTHER, E., **The Essential Oils**, 3 ed. New York: D. Van Nostrand Company, 1959
- KLITZKE, C. F.; TRIGO, J. R. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 313-318, 2000
- MACEDO, M. E.; CONSOLI, L. A.; GRANDI, T. S.; ANJOS, A. M.; OLIVEIRA, A. B. MENDES, N. M.; QUEIROZ, R. O.; ZANI, C.L., **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 565-570, 1997
- MALONE, M. H., Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: **New Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**, WAGNER, H.; WOLF, P. (eds.). Springer-Verlag, Berlin, 1977. p.24-53
- MARTINS, R.E.; CASTRO, M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Mediciniais**, 2 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- McLAFERTY, F.W.; TURECEK, F., **Interpretation of Mass Spectra**, 4.ed. New York: University Science Books, 1993. 371p.
- MÉNDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v.7, p. 51-56, 1987
- MÉNDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MARTZ, W. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v.10, p.63-69, 1990
- NAKAJIMA, J.N.; SEMIR, J.. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.24, nº.4, p.471-478, 2001
- OLIVEIRA, S.J.; GONÇALVES, D.; MARCONDES, A.A., Caracterização química por GC-MS-MSD de alguns componentes do extrato de *Michelia champaca* Linn. obtido com gases liquefeitos no estado subcrítico como uma alternativa á utilização da extração via arraste por vapor. **Apresentado no Colacro VII - 7th**

- Latin-American Congress on Chromatography and Related Techniques**, p. 287, 1998
- PÉREZ, C.; AGNESE, A. M.; CABRERA, J. L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 91-96, 1999
- PERRY, R.H.; GREEN, D.W.; MALONEY, J.O. **Perry's Chemical Engineer's Handbook**, 7^a ed. New York: McGraw-Hill, 1997
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. **Química Nova**, v.24, n^o.1, p.68 - 76, 2001
- ROMERO, A.; ZEINTEGER, P.; TEIBLER, P.; MONTENEGRO, M.; RUIZ, R.; RIOS, E.; PÉREZ, O. A. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, v.17, 2003
- ROSSATO, M.; SANTOS, A. C. A.; SERAFINI, L. A.; AGOSTINI, F.; PANSERA, M. R.; WASUM, R.; BARBIERI, R. L. **Química Nova**, v.29, n^o.2, p.200-202, 2006
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5^a. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1994. 387p.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5^a ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Federal de Santa Catarina, 2003
- SUTTER, L.E.D.N.; SILVA, M.F.F.; CASSEL, E. Extração supercrítica, uma nova tecnologia industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.14, p.3-10, 1994
- TEIBLER, P. G.; RIOS, E.; ZEINTEGER, P. A.; PÉREZ, O. A. de; CASTELLANOS, M. G.; LEIVA, L.; JORGE, N. L.; GOMEZ, M. E.. **Acta Toxicológica Argentina**, v.9, n^o.2, 2001
- TOMA, W.; TRIGO, J. R.; PAULA, A. C. B.; BRITO, A. R. M. S.. **Journal of Ethno-Pharmacology**, v.95, p.345-351, 2004
- WASICKY, R., **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica**, São Paulo, v.1, p.77-81, 1963

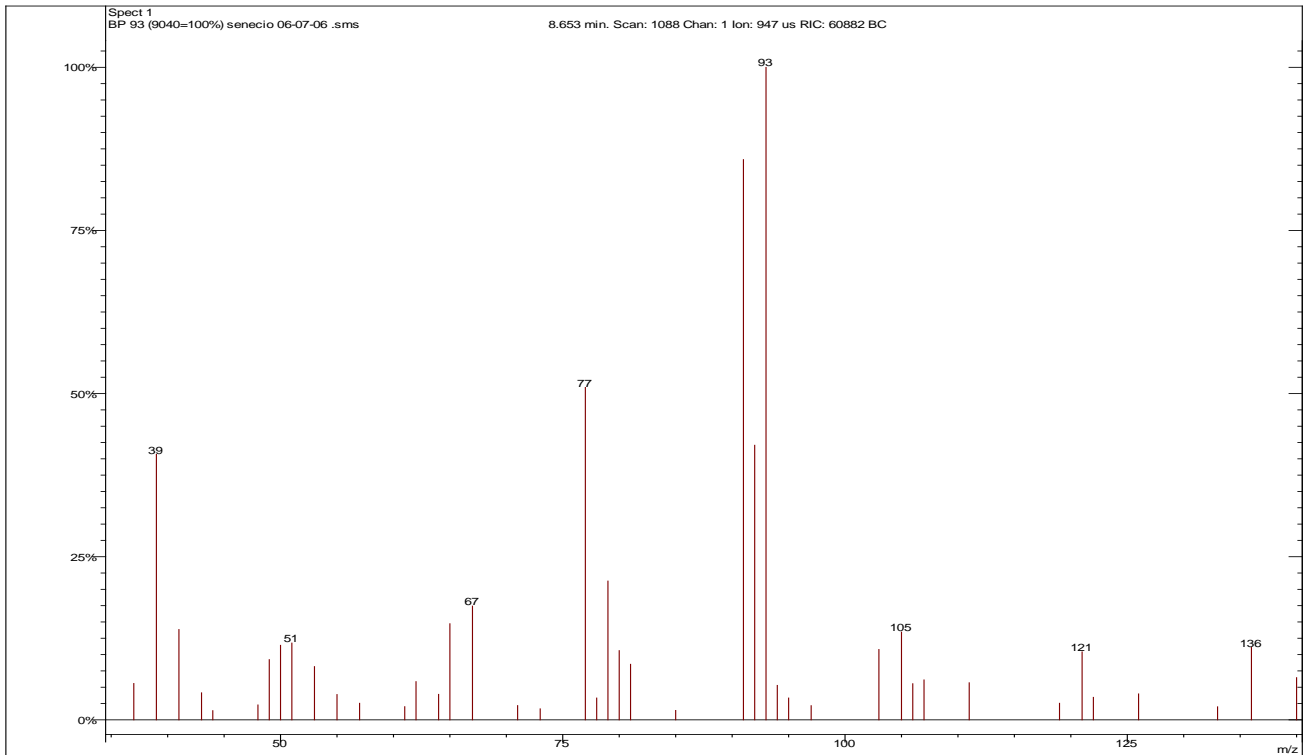
WASICKY, R.O.; AKISUE, G., Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica, São Paulo, v.2, p.7, 1969

ZHENGFU W.; HAN W.; GUANGHUA Z.; XIAOJUN L.; FANG C.; JIHONG W.; XIAOSONG H., Journal of Food Engineering, v. 79, n. 2, p. 502-510, 2007

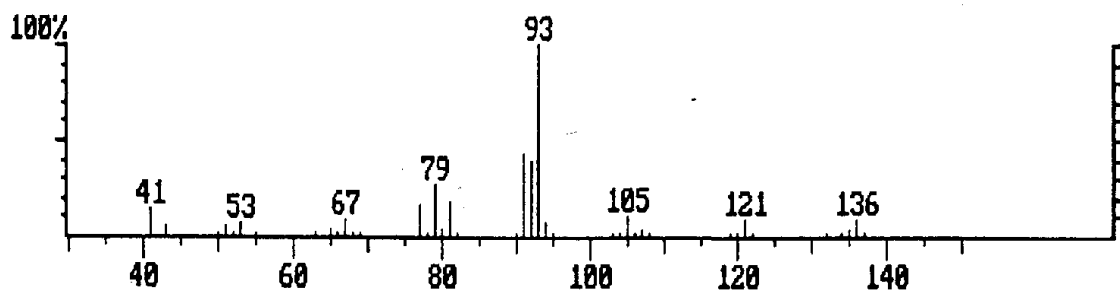
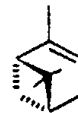
ANEXOS 1**ESPECTROS DE MASSAS DOS PRINCIPAIS COMPONENTES DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *S. brasiliensis***

α -Pineno

Scan 1088 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

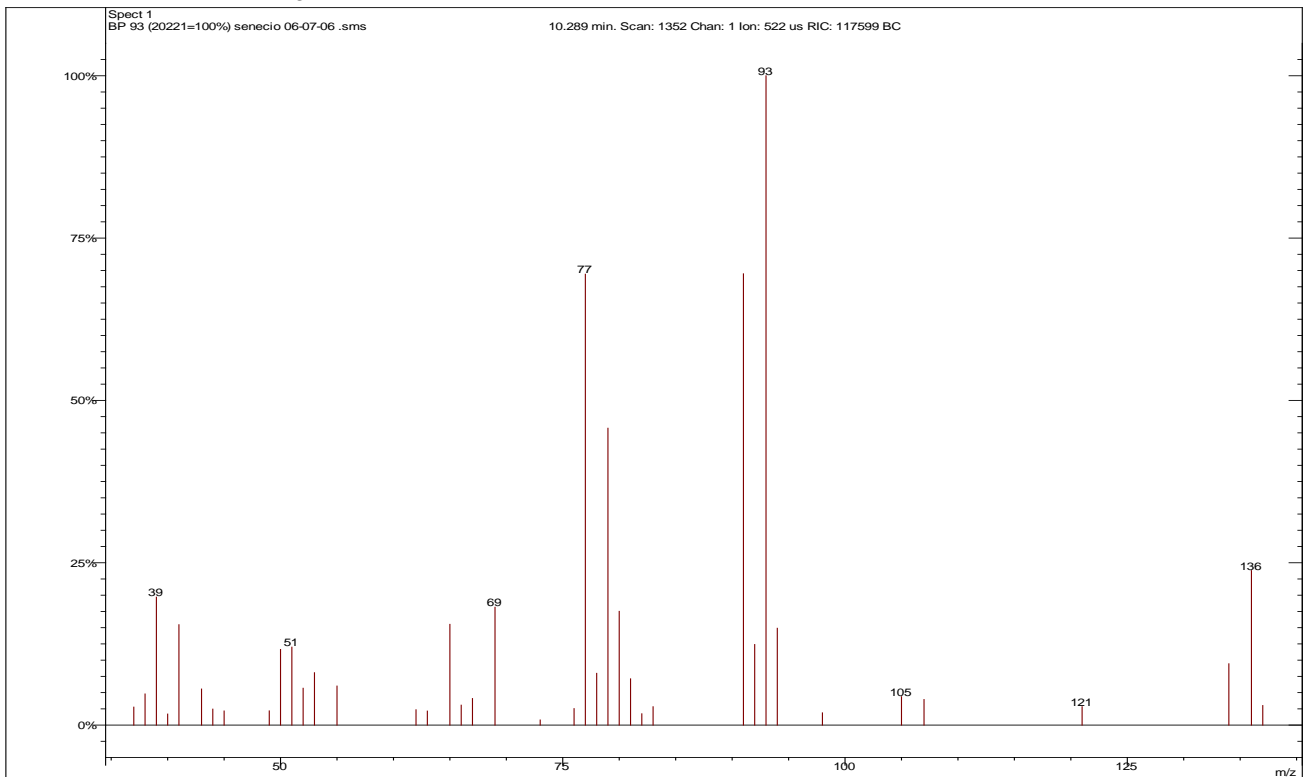


DB5-0319 KI-939 **PINENE <ALPHA->**
 CAS# 80-56-8 MF C₁₀H₁₆ FW 136 L0159
 CN Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl- (9CI)
 SYNONYMS: 2-Pinene. 2,6,6-Trimethylbicyclo [3.1.1]hept-2-ene. α -(+)-Pinene.

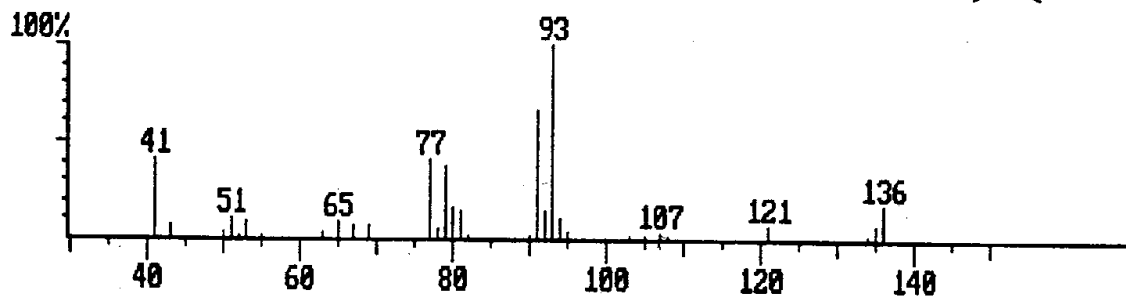


Sabineno

Scan 1352 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

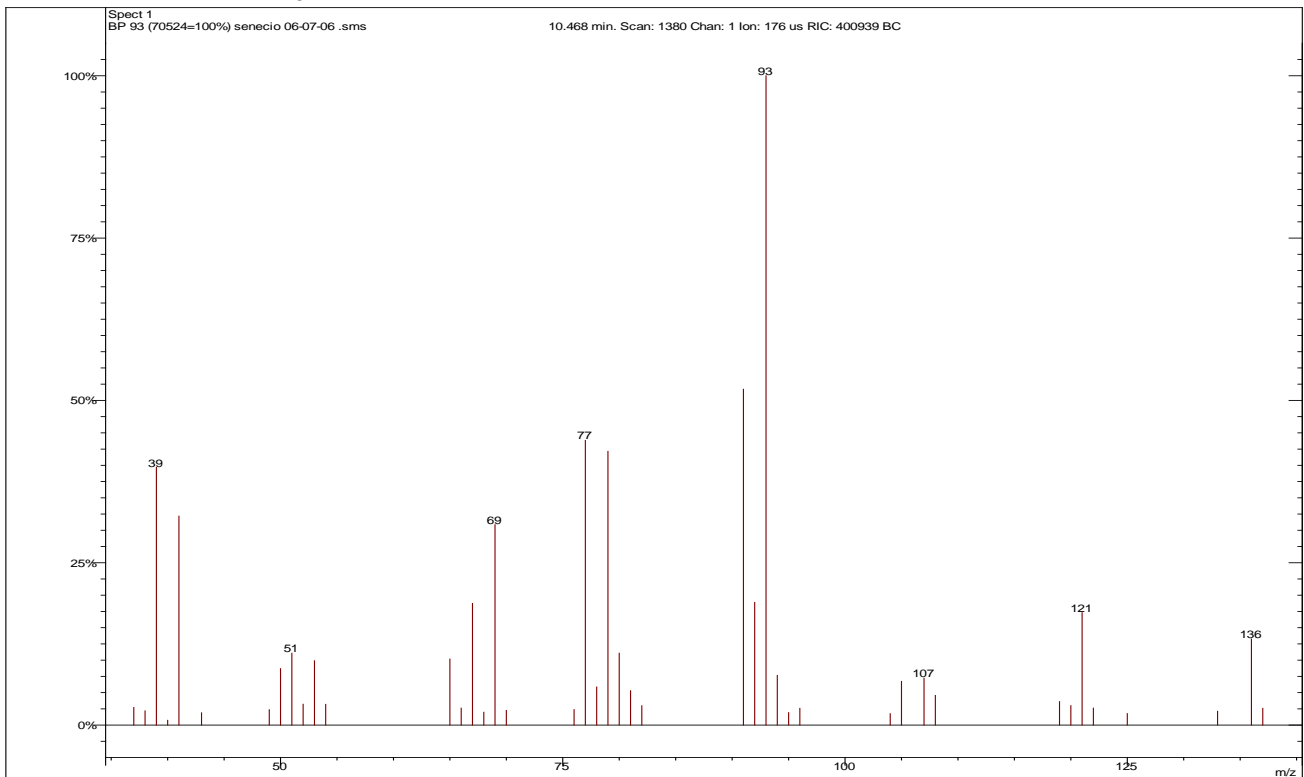


DB5-0379 KI-976 **SABINENE**
 CAS# 3387-41-5 MF C₁₀H₁₆ FW 136 L0160
 CN Bicyclo[3.1.0]hexane, 4-methylene- 1-(1-methylethyl)-(9CI)
 SYNONYMS: 4(10)-Thujene.

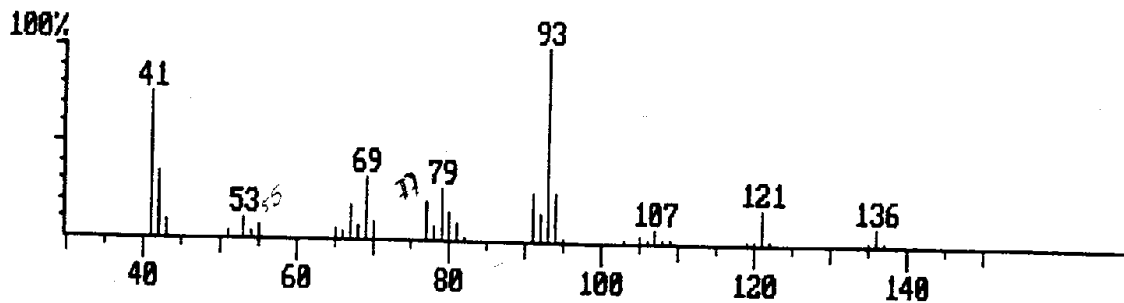
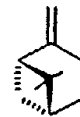


β -Pineno

Scan 1380 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

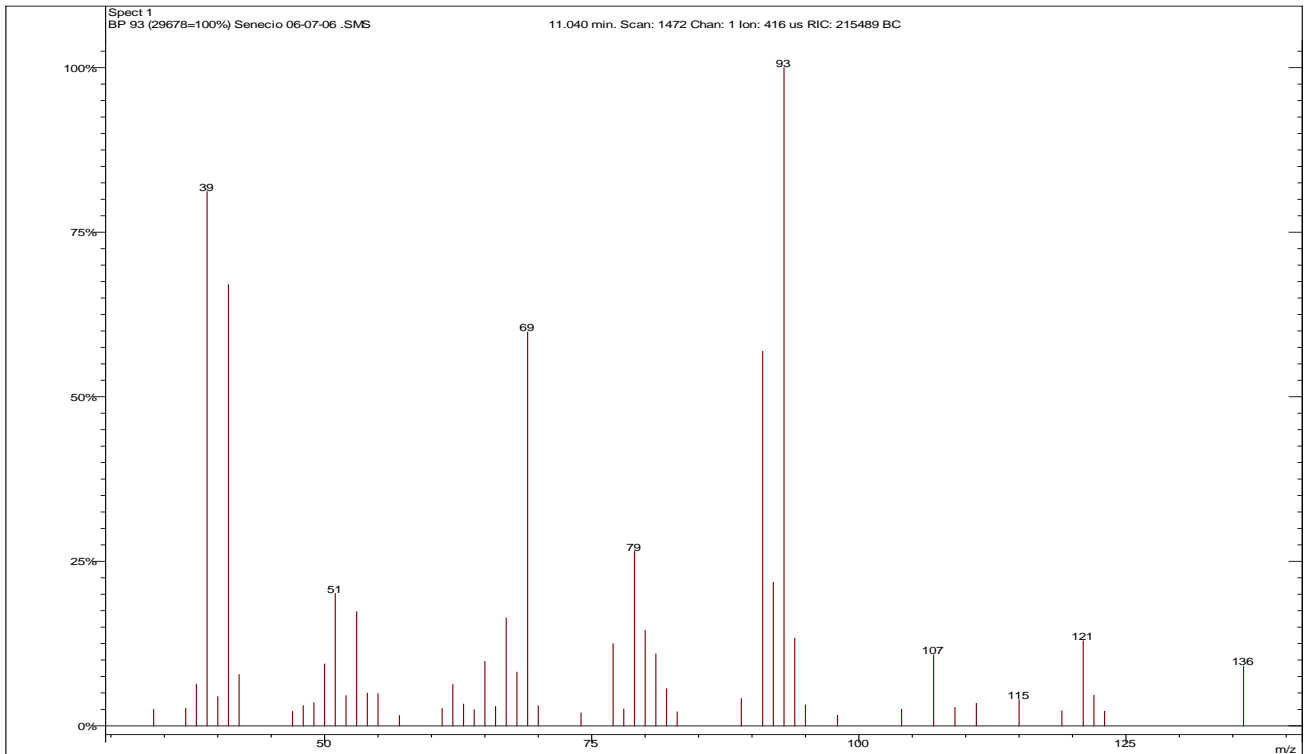


DB5-0386 KI-980 **PINENE <BETA->**
 CAS# 127-91-3 MF C₁₀H₁₆ FW 136 L0161
 CN Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl- 2-methylene-(9CI)
 SYNONYMS: Nopinene. Terebenthene. 2(10)-Pinene. Pseudo
 pinen. Pseudopinene. Nopinen.

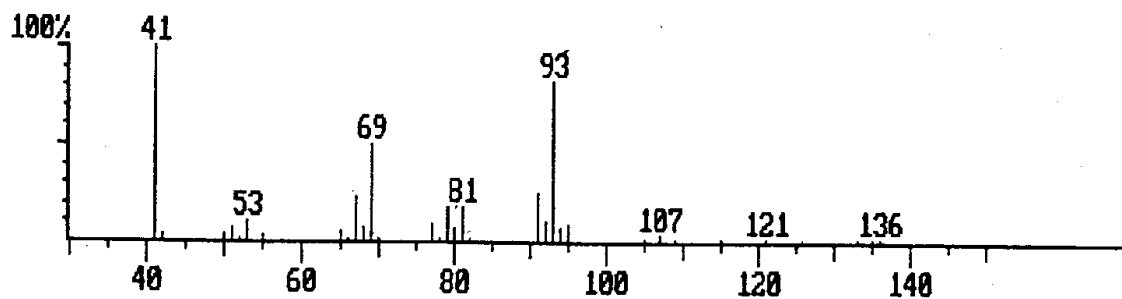


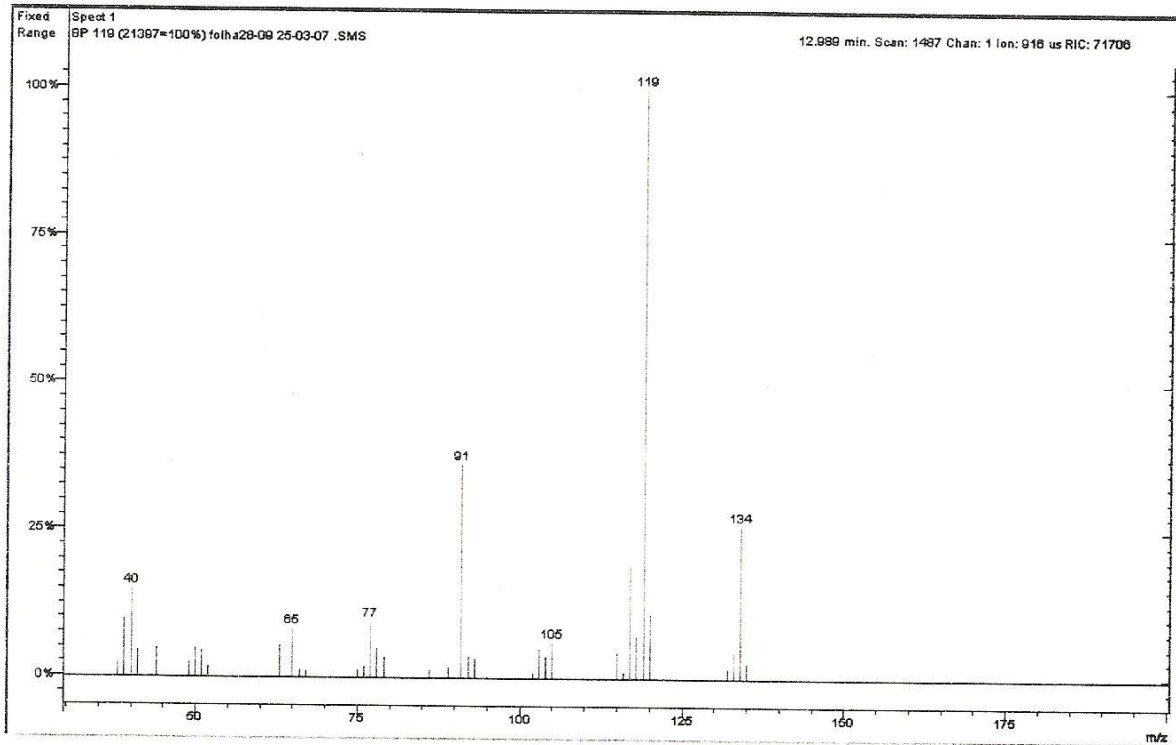
Mirceno

Scan 1472 from C:\Mus documentos\Graciela\Senecio 06-07-06 .SMS

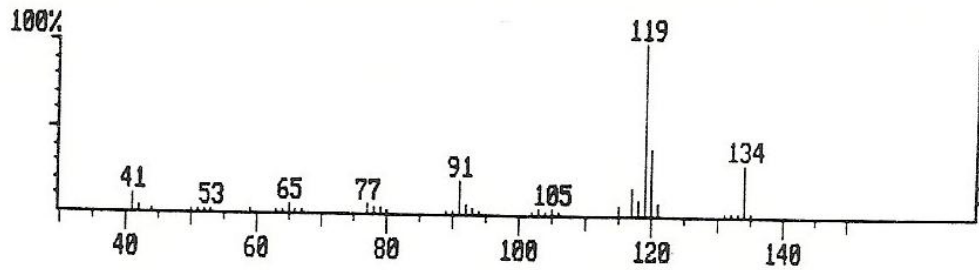
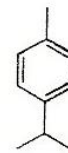


DB5-0408 KI-991 **MYRCENE**
 CAS# 123-35-3 MF C₁₀H₁₆ FW 136 L0174
 CN 1,6-Octadiene, 7-methyl-3-methylene- (9CI)
 SYNONYMS: .beta.-Myrcene.



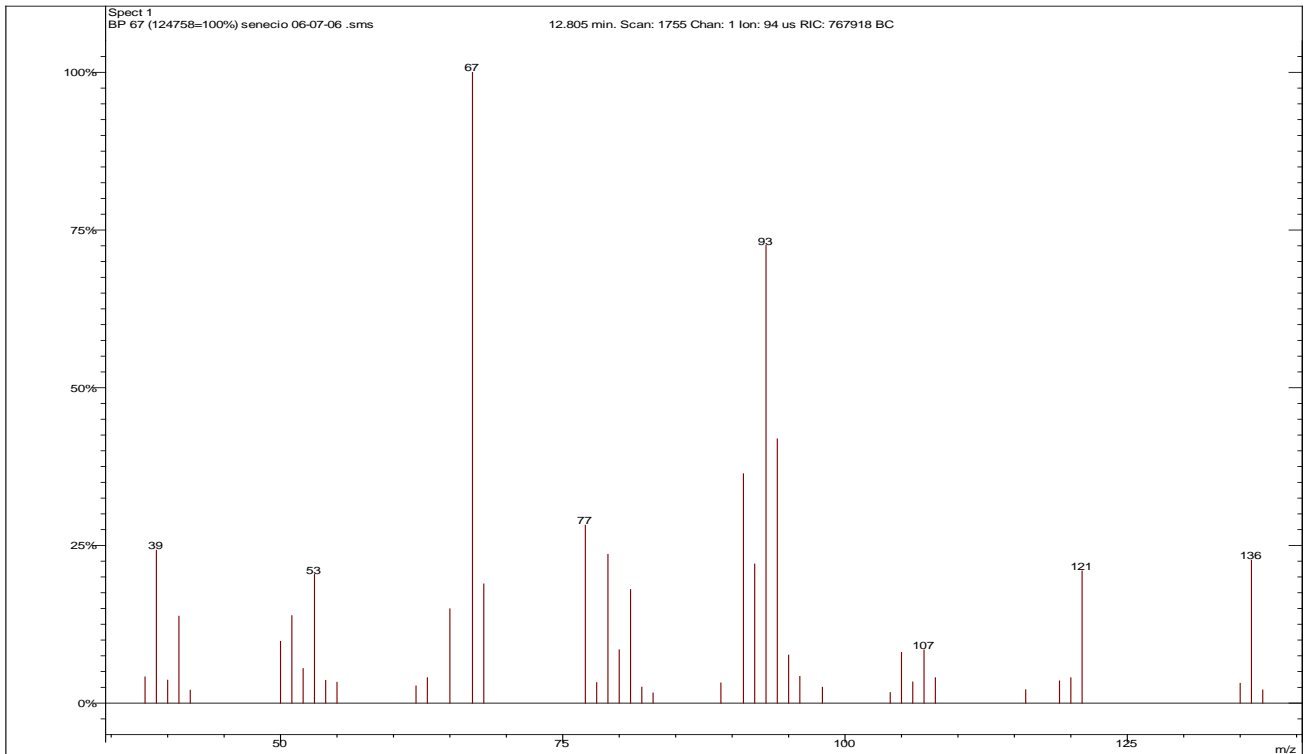
p-Cimeno

DB5-0471 KI-1026 CYMENE <PARA->
 CAS# 99-87-6 MF C10 H14 FW 134 L0165
 CN Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (9CI)
 SYNONYMS: *p*-Isopropyltoluene. *p*-Cymol. 1-Isopropyl-4-methylbenzene. 2-*p*-Tolylpropane. 4-Methylisopropylbenzene.



Limoneno

Scan 1755 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

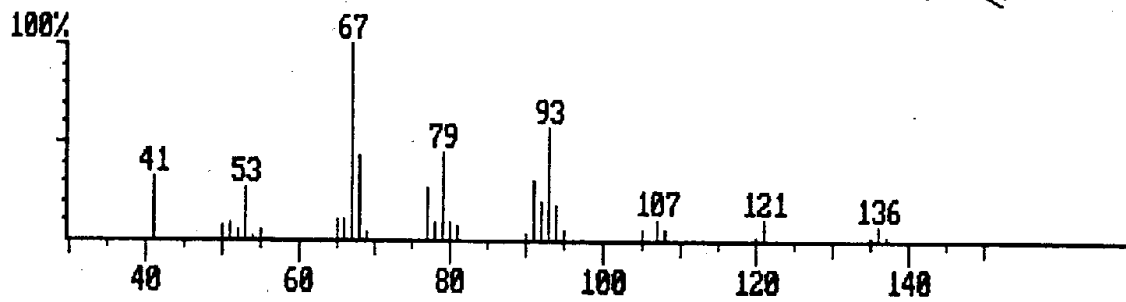
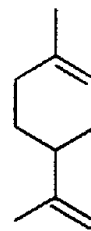


DB5-0481 KI-1031 LIMONENE

CAS# 138-86-3 MF C₁₀H₁₆ FW 136 L0113

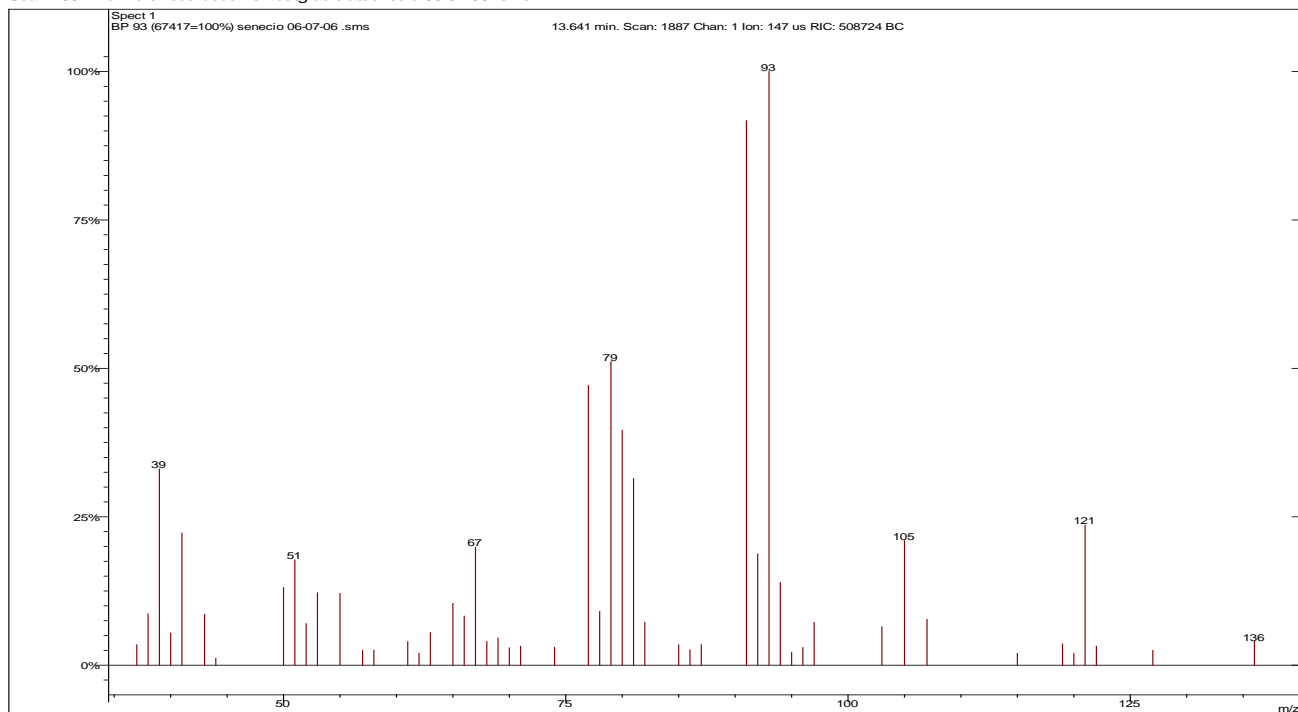
CN Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)- (9CI)

SYNONYMS: Cajeputene. Cinene. Kautschin. Nesol. p-Mentha-1,8-diene. Dipenetene. 1,8-p-Menthadiene. Eulimen.

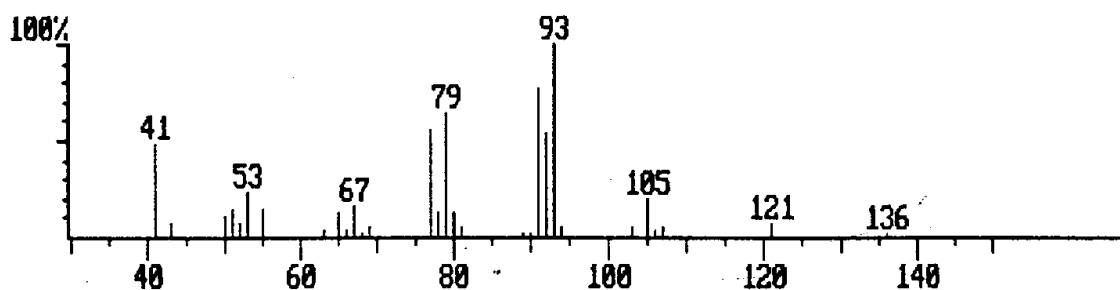
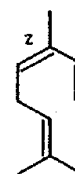


(Z)- β -Ocimeno

Scan 1887 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

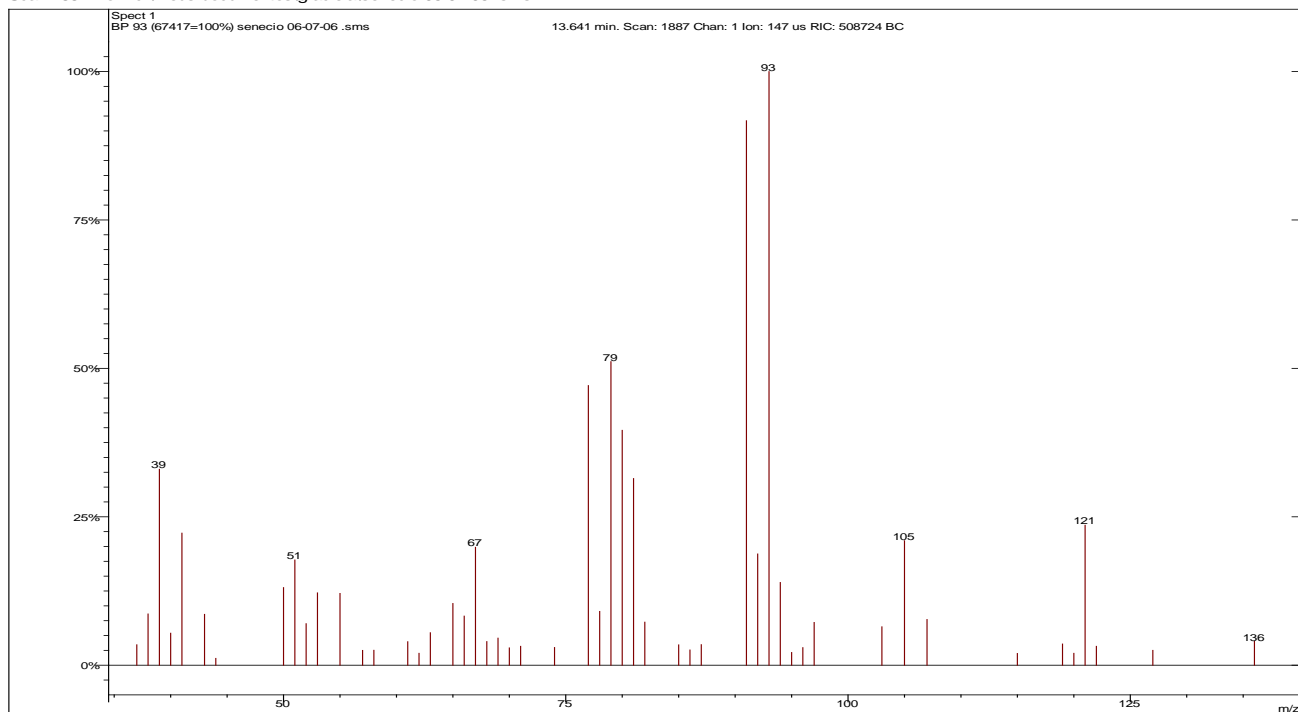


DB5-0498 KI-1040 OCIMENE <(Z)-BETA->
 CAS# 27400-71-1 MF C₁₀H₁₆ FW 136 L0296
 CN Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)- (9CI)
 SYNONYMS: Ocimene, cis-

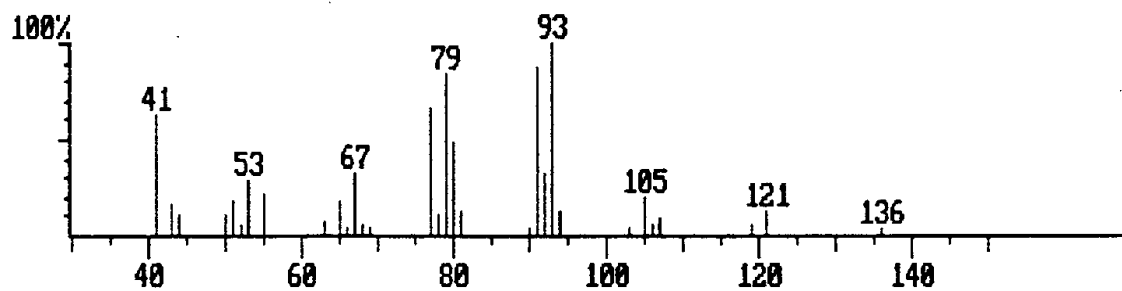
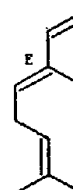


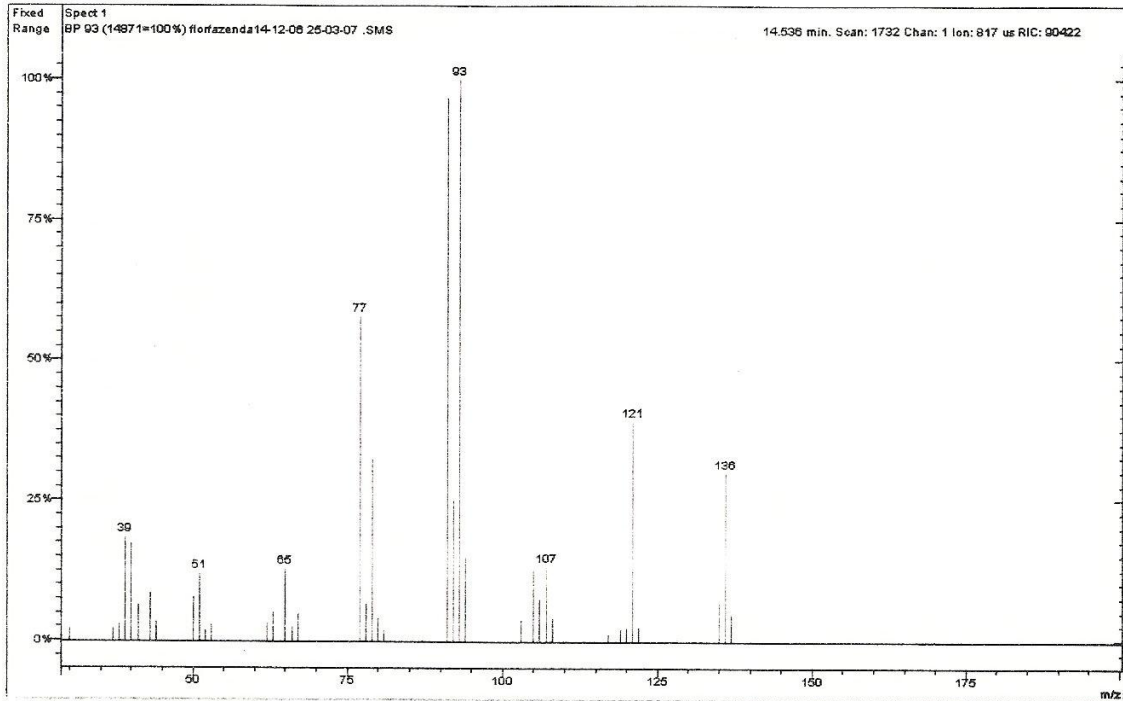
(E)- β -Ocimeno

Scan 1887 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

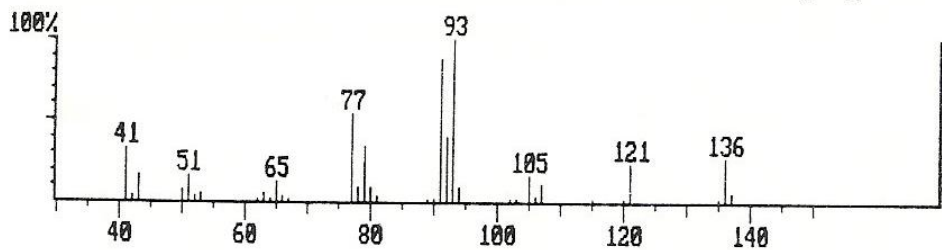
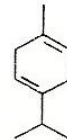


DB5-0519 KI-1050 OCIMENE <(E)-BETA->
 CAS# 27400-72-2 MF C₁₀H₁₆ FW 136 L0187
 CN Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)- (9CI)
 SYNONYMS: Ocimene, trans-



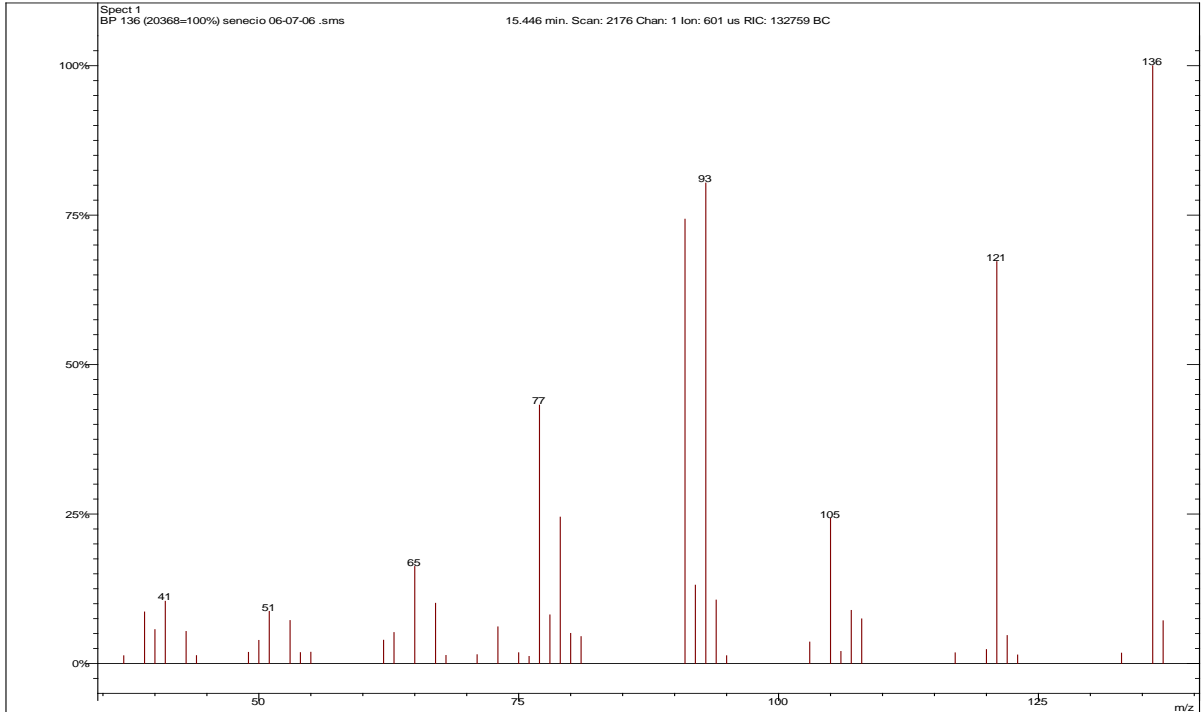
γ -Terpineno

DB5-0545 KI-1062 TERPINENE <GAMMA->
 CAS# 99-85-4 MF C₁₀H₁₆ FW 136 L0180
 CN 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-(9CI)
 SYNONYMS: Crithmene. Moslene. p-Mentha-1,4-diene.



Terpinoleno

Scan 2176 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

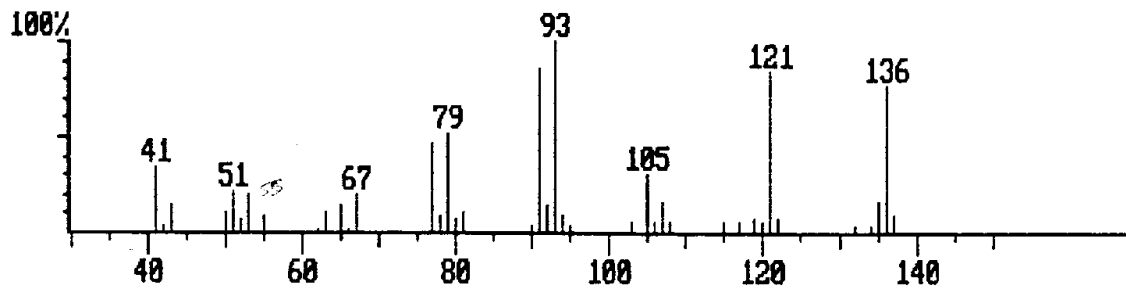
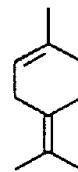


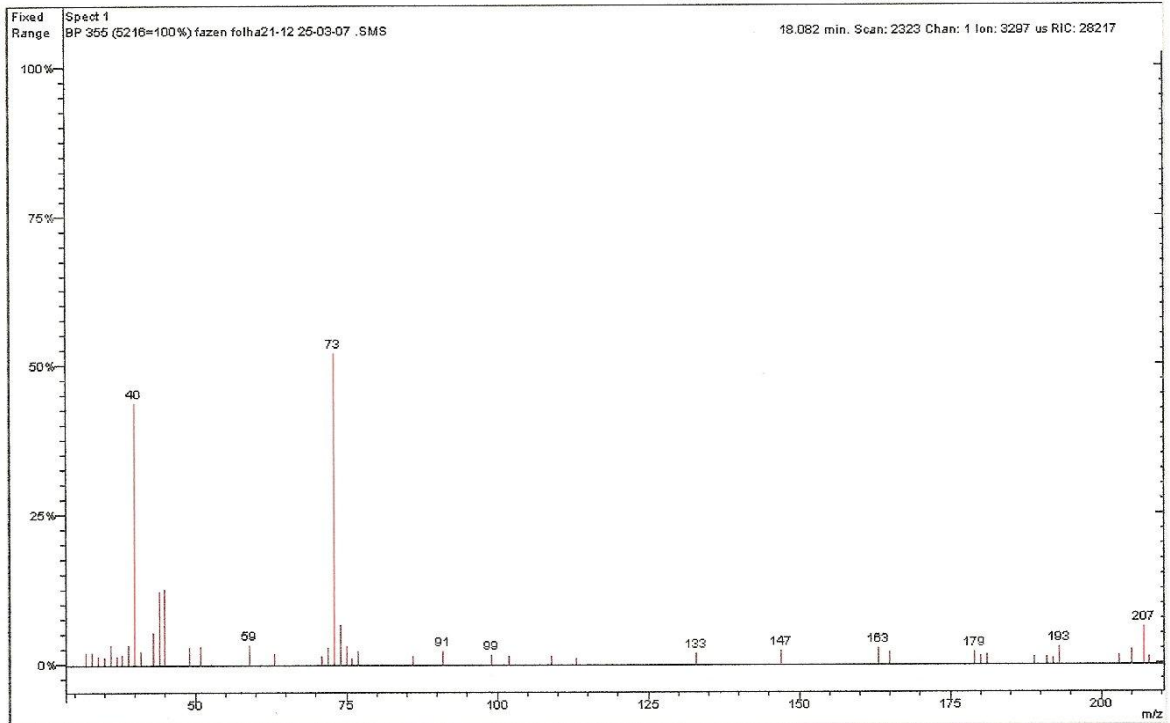
DB5-0608 KI-1088 TERPINOLENE

CAS# 586-62-9 MF C₁₀H₁₆ FW 136 L0251

CN Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)- (9CI)

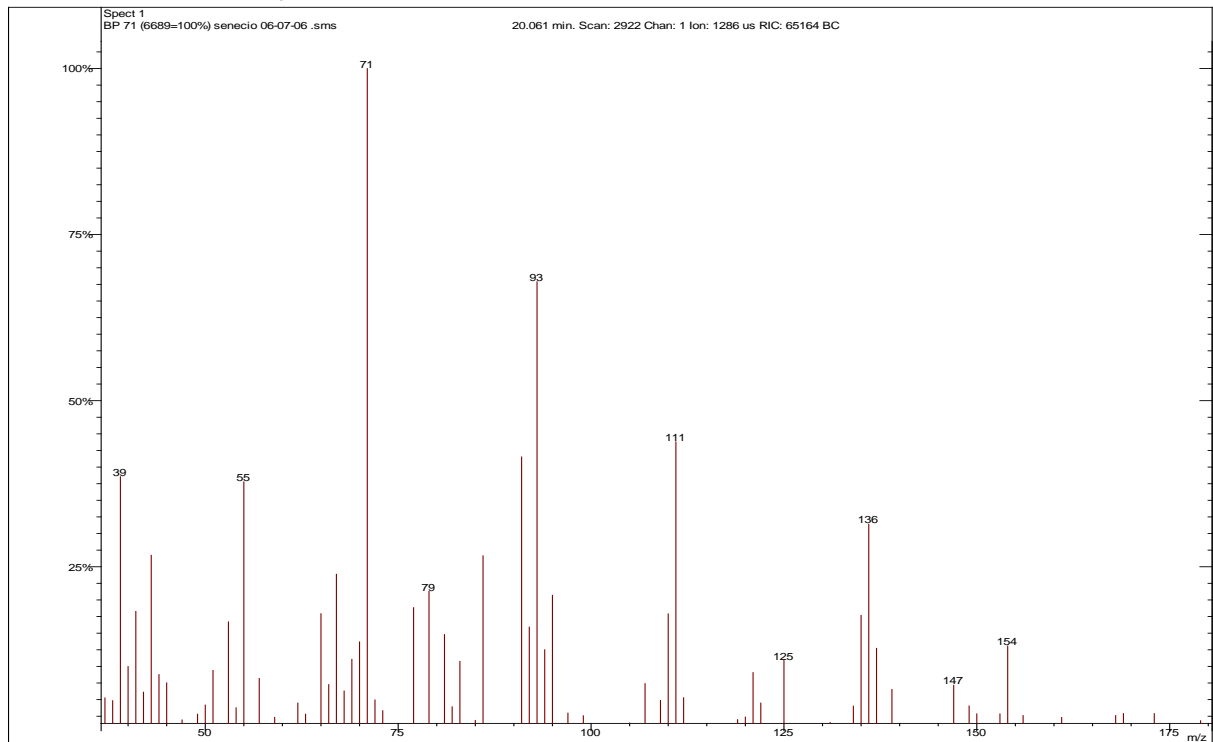
SYNONYMS: p-Mentha-1,4(8)-diene. 4-Isopropylidene- 1-methylcyclohexene. Isoterpinene.



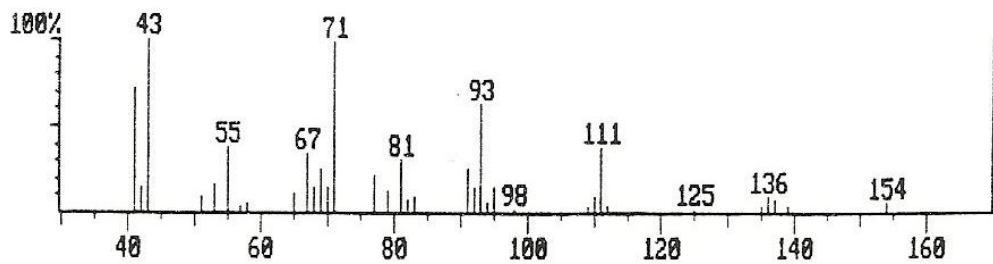
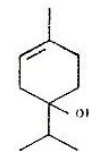
Cis- β -diidro-Terpineol

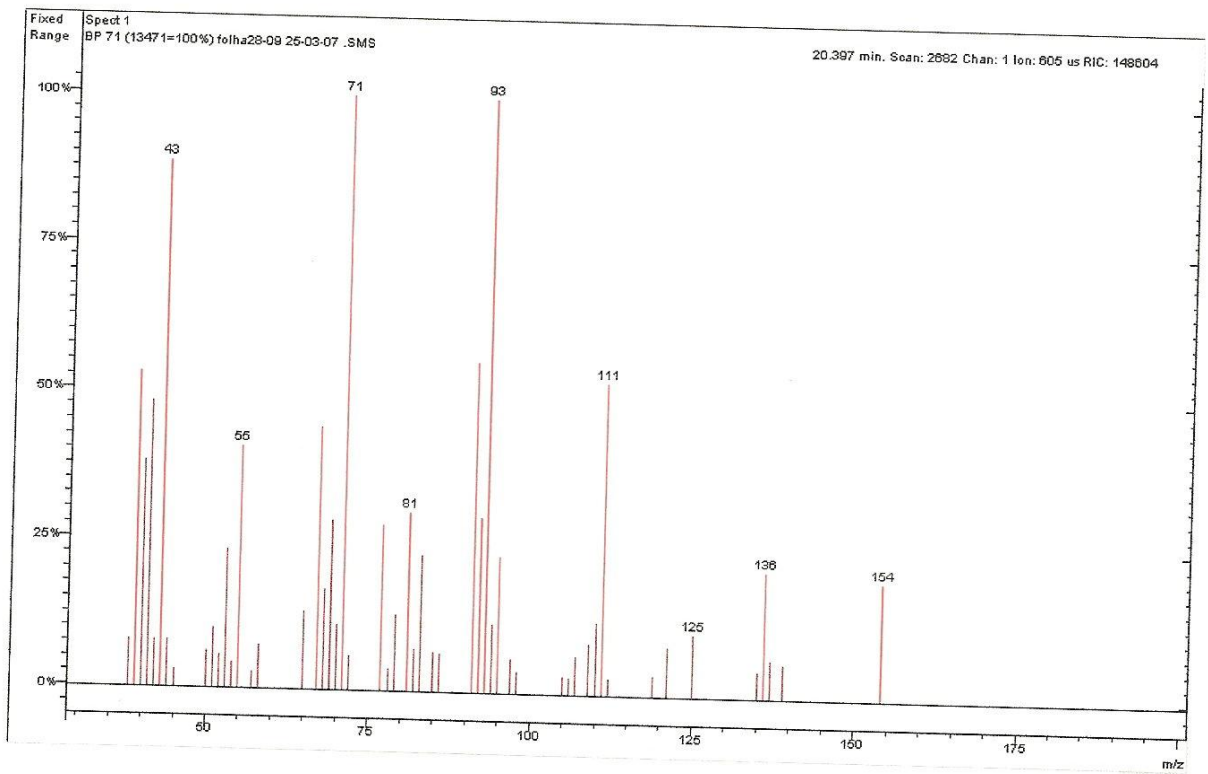
Terpinen-4-ol

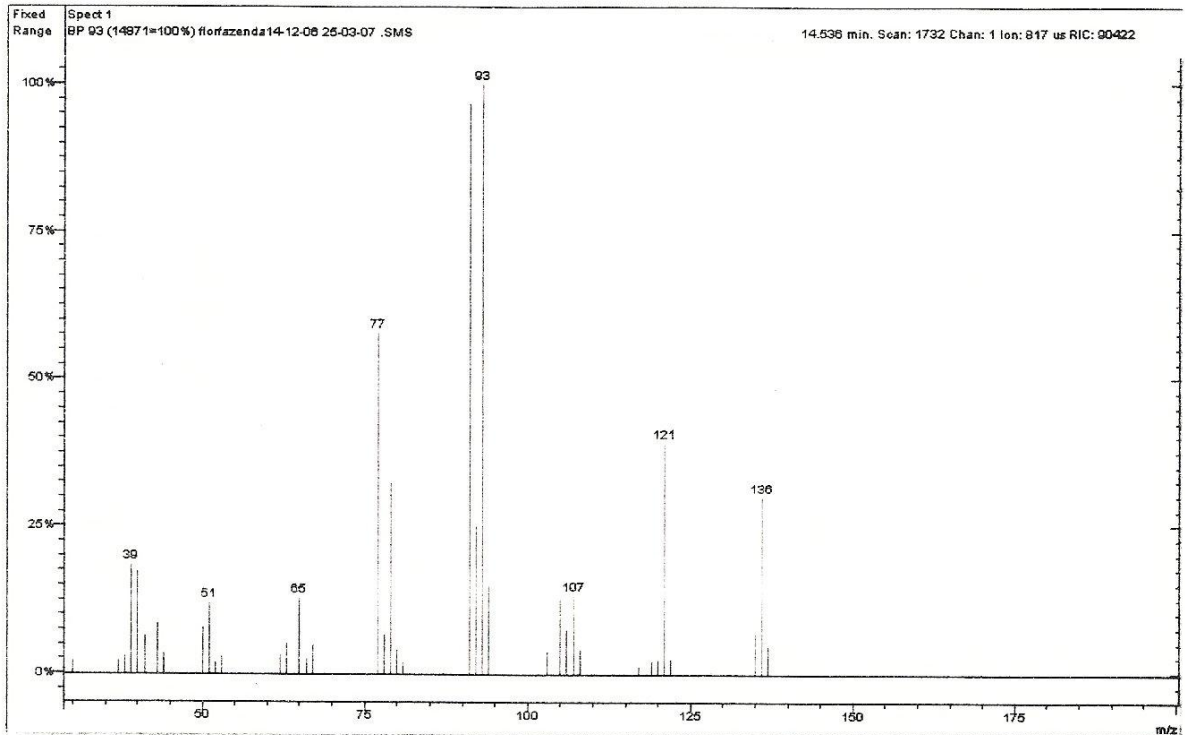
Scan 2922 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms



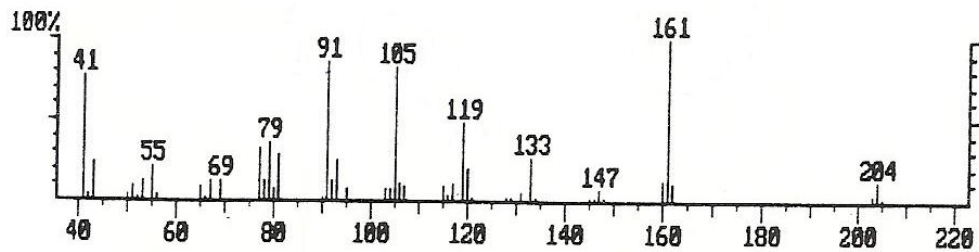
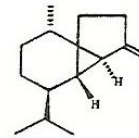
DB5-0820 KI-1177 **TERPIN-4-OL**
 CAS# 562-74-3 MF C₁₀H₁₈O FW 154 L0118
 CN 3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)- (9CI)
 SYNONYMS: Menth-1-en-4-ol, p-. Carvomethenol, 4-
 Terpeneol <4->.



Isomentol

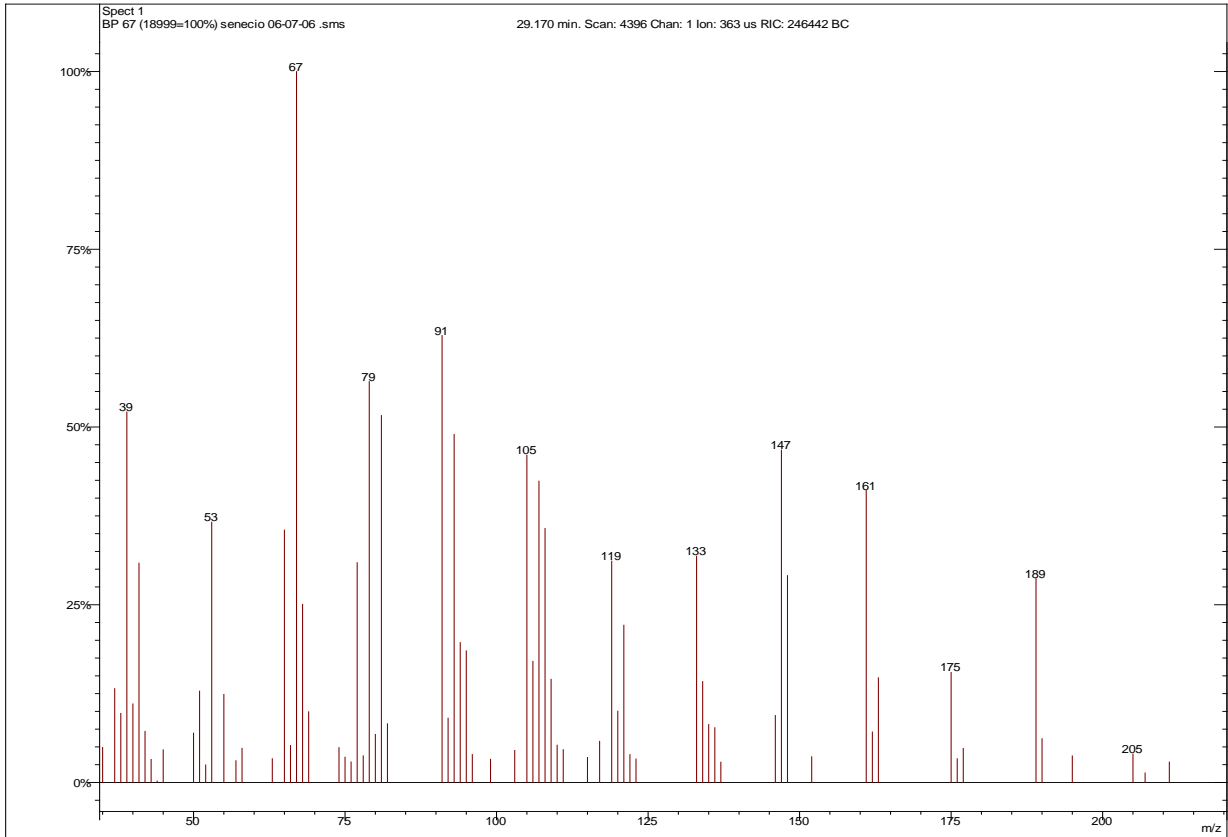
γ -Terpineno

DB5-1371 KI-1390 **CUBEBENE <BETA->**
 CAS# 13744-15-5 MF C₁₅H₂₄ FW 204 L0311
 CN 1H-Cyclopenta[1,3]cyclopropa[1,2]benzene, octahydro-7-
 methyl-3-methylene-4-(1-methylethyl)-, [3aS-
 (3a.alpha.,3b.beta.,4.beta.,7.alpha.,7aS*)]- (9CI)
 SYNONYMS: None known.

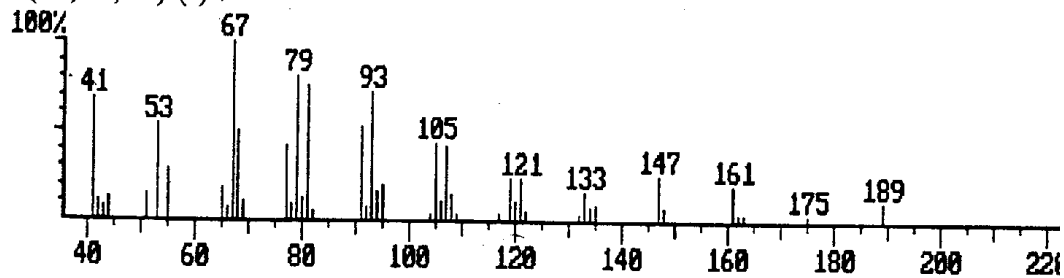
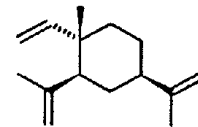


β -Elemeno

Scan 4396 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

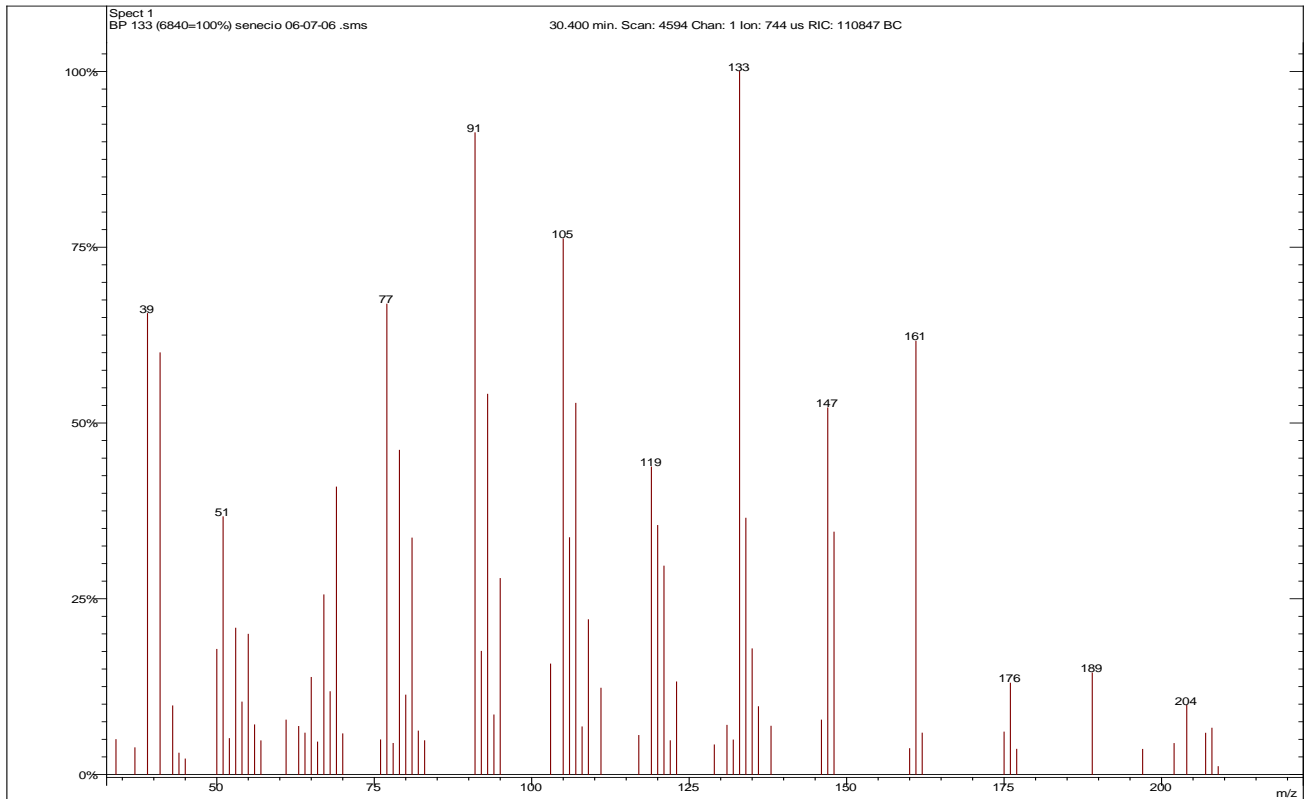
DB5-1375 KI-1391 **ELEMENE <BETA->**

CAS# 515-13-9 MF C15 H24 FW 204 L0169

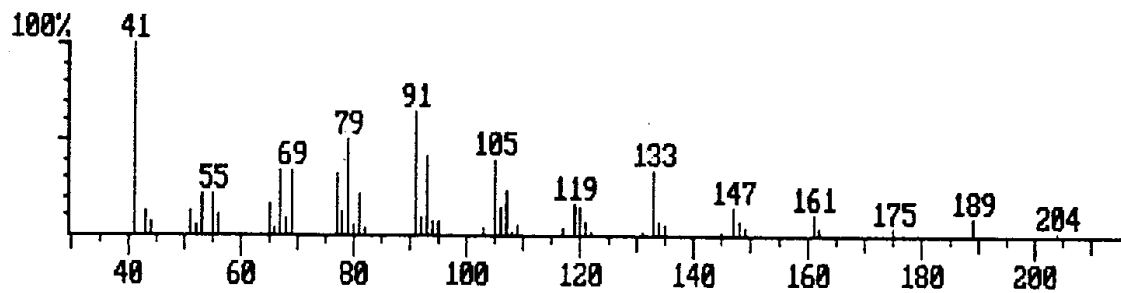
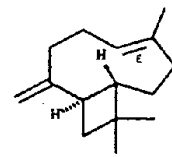
CN Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis (1-methylethenyl)-,
{1S-(1.alpha.,2.beta.,4.beta.)}- (9CI)SYNONYMS: Cyclohexane,2,4-diisopropenyl-1-methyl-1-vinyl,-
(1S,2R,4R)-(-)-.

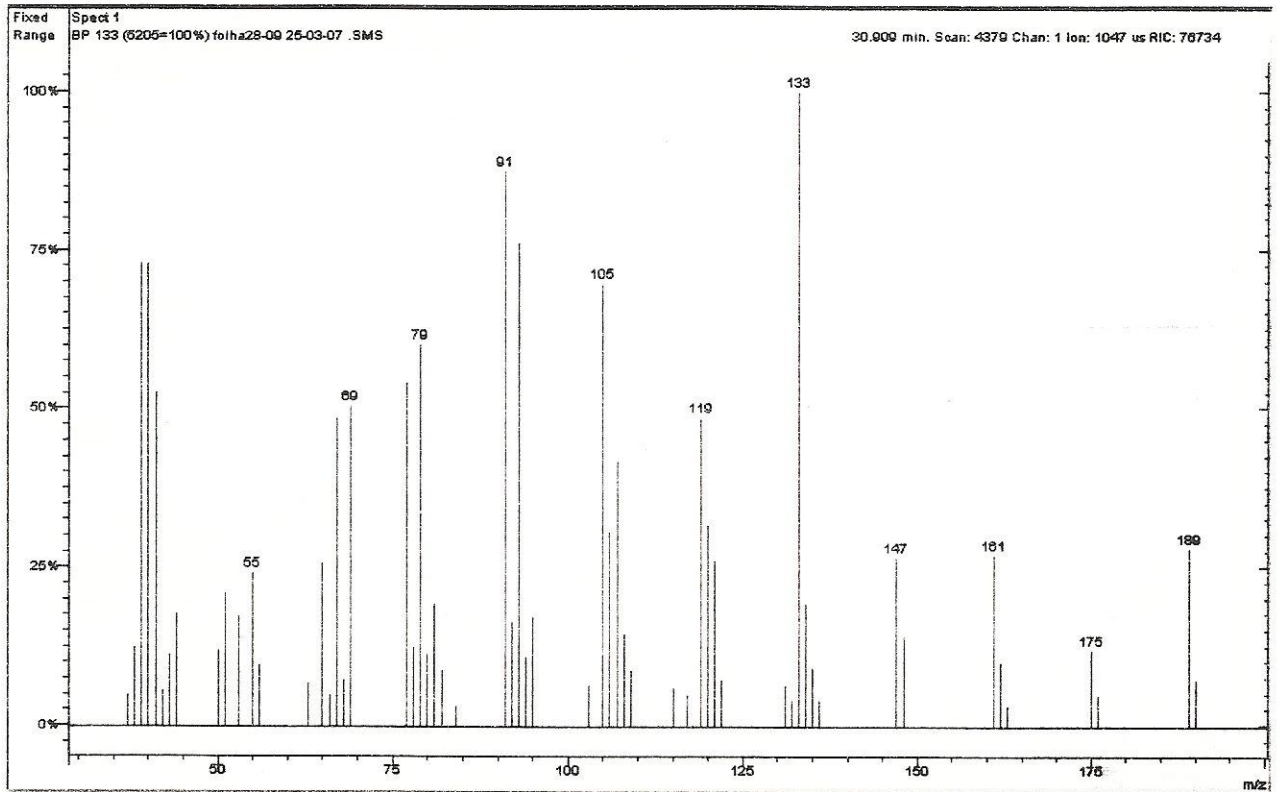
(E)-Cariofileno

Scan 4594 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

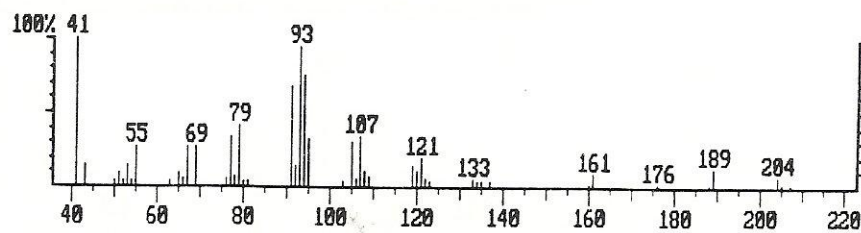


DB5-1442 KI-1418 **CARYOPHYLLENE <(E)->**
 CAS# 87-44-5 MF C₁₅H₂₄ FW 204 L0096
 CN Bicyclo[7.2.0]undec-4-ene, 4,11,11-trimethyl- 8-methylene-,
 [1R-(1R*,4E,9S*)]- (9CI)
 SYNONYMS: trans-Caryophyllene. .beta.-Caryophyllene.
 (-)-Caryophyllene.



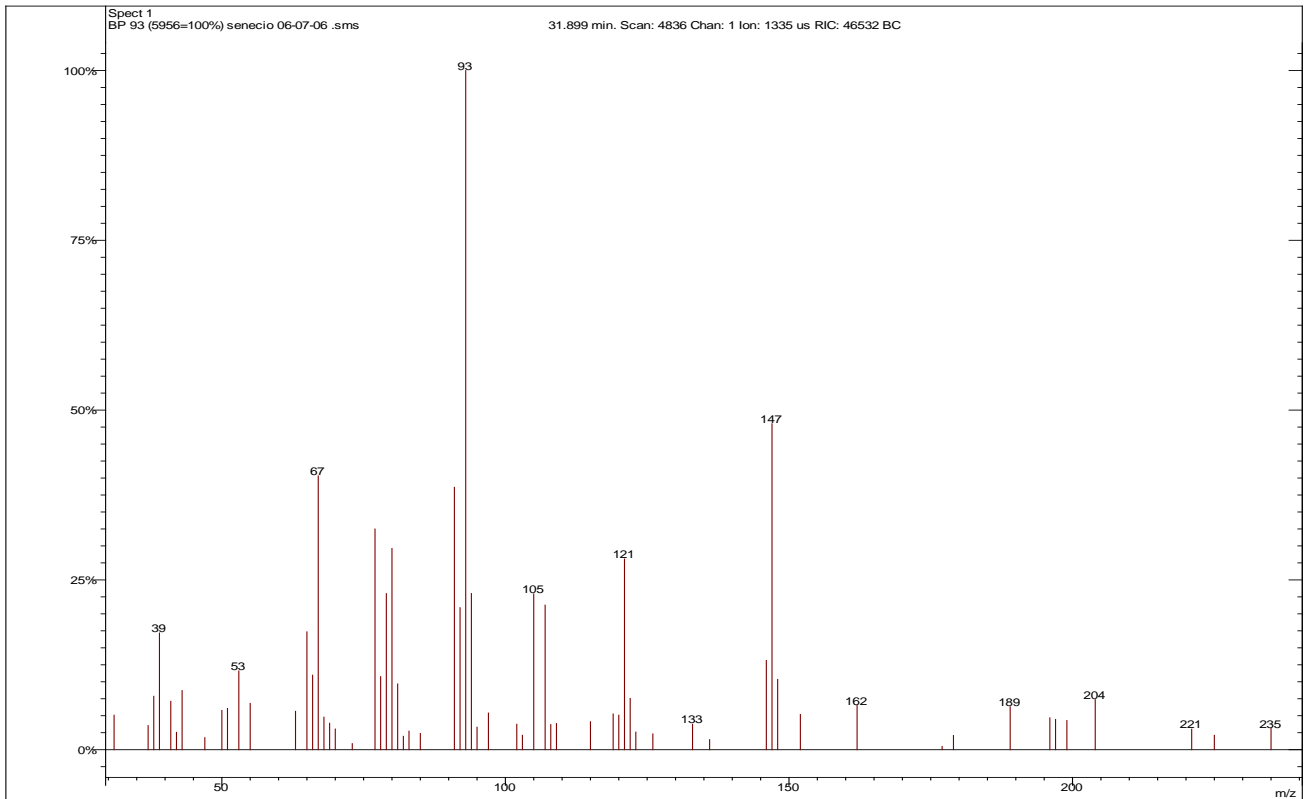
α -Santaleno

DB5-1447 KI-1420 SANTALENE <ALPHA->
 CAS# 512-61-8 MF C₁₅H₂₄ FW 204 L0221
 CN Tricyclo[2.2.1.0^{2,6}]heptane, 1,7-dimethyl-7-(4-methyl-3-pentenyl)-, (-)- (9CI)
 SYNONYMS: None known.

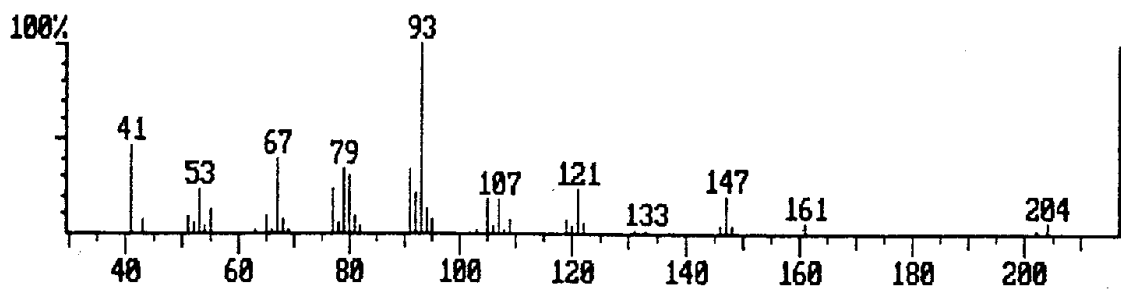
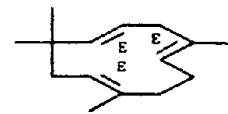


α -Humuleno

Scan 4836 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

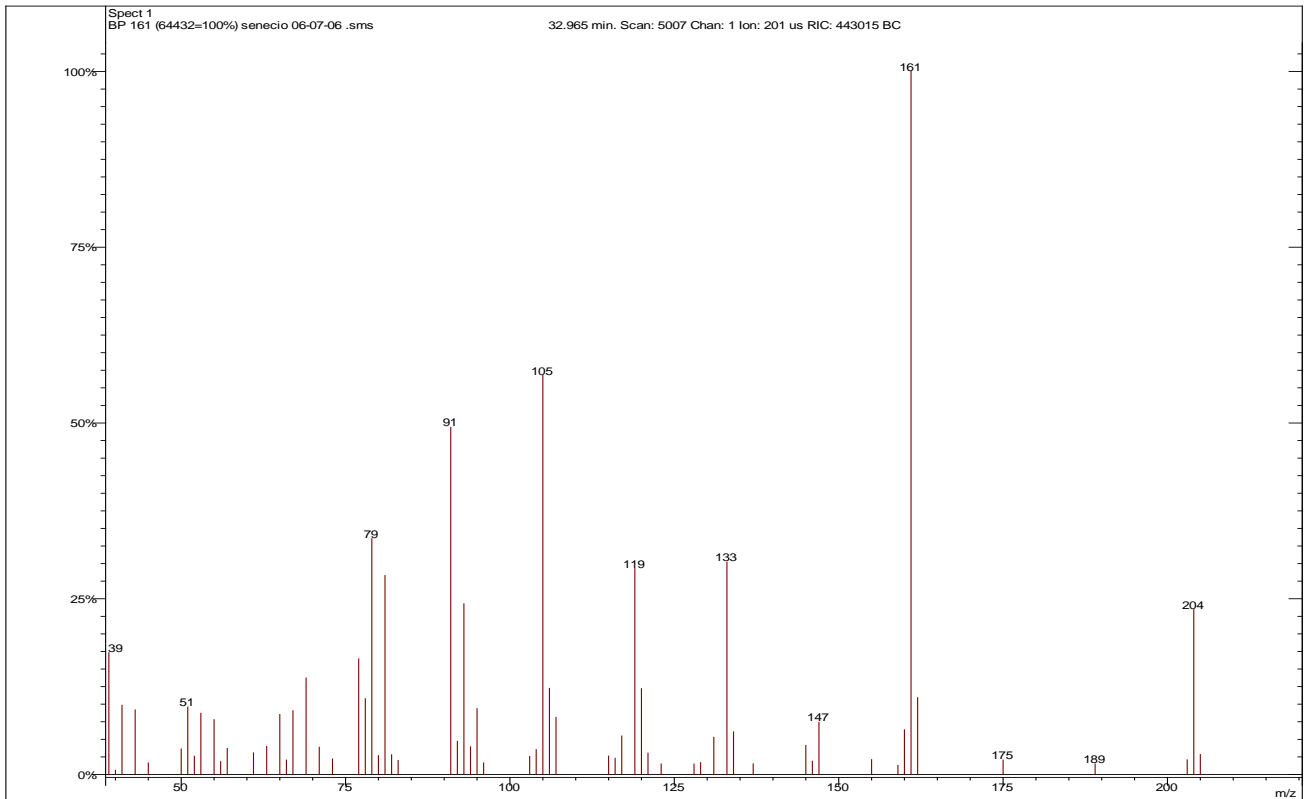


DB5-1527 KI-1454 HUMULENE <ALPHA->
 CAS# 6753-98-6 MF C₁₅H₂₄ FW 204 L0098
 CN 1,4,8-Cycloundecatriene, 2,6,6,9-tetramethyl-, (E,E,E)-
 (9CI)
 SYNONYMS: Humulene. .alpha.-Caryophyllene.

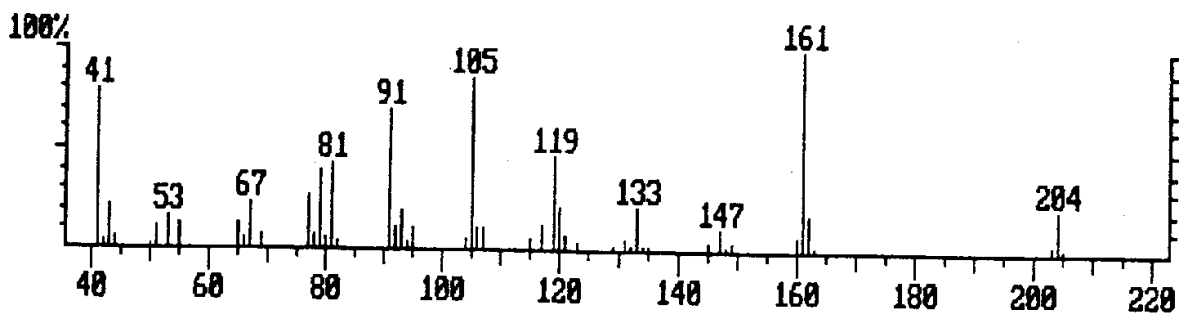
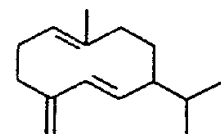


D-Germacreno

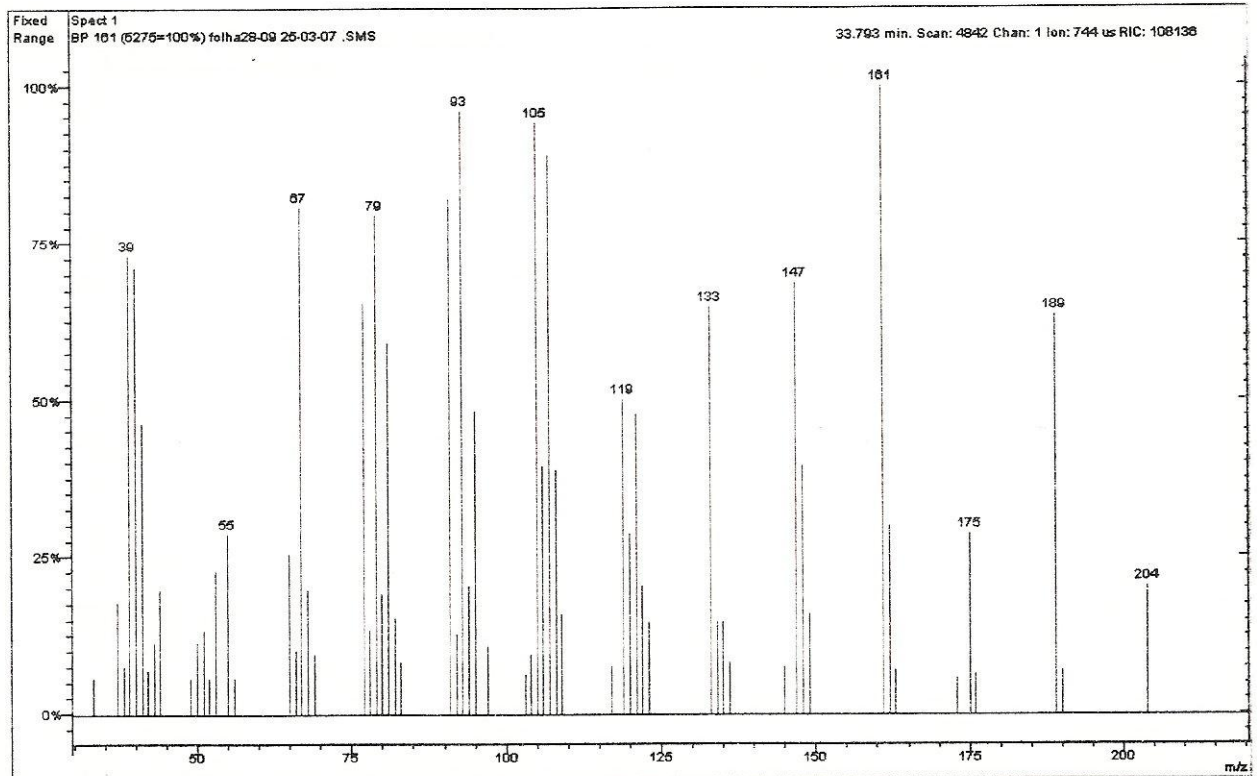
Scan 5007 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms



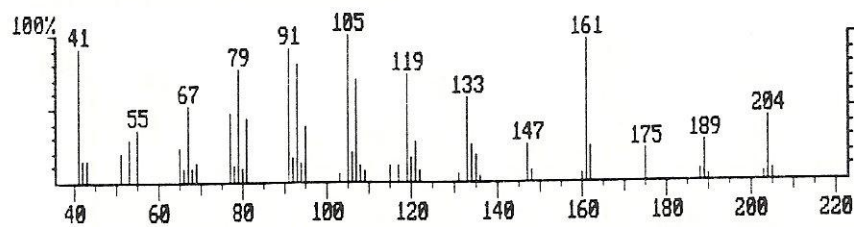
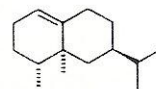
DB5-1594 KI-1480 **GERMACRENE D**
 CAS# 23986-74-5 MF C₁₅H₂₄ FW 204 L0102
 CN 1,6-Cyclodecadiene, 1-methyl-5-methylene- 8-(1-methylethyl)-, [S-(E,E)]- (9CI)
 SYNONYMS: Germacra-1(10),4(15),5-triene, (-)-.



Valenceno

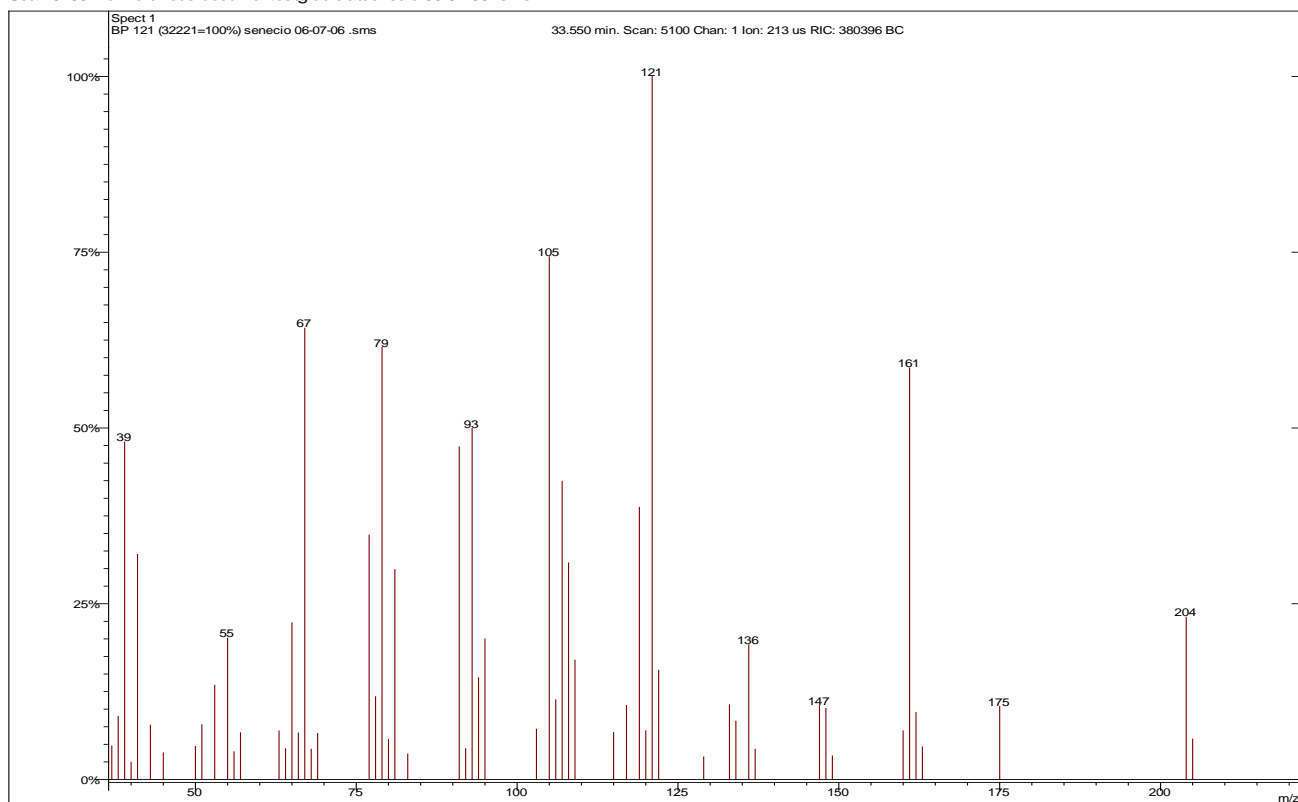


DB5-1624 KI-1491 VALENCENE
 CAS# 4630-07-3 MF C₁₅H₂₄ FW 204 L0415
 CN Naphthalene, 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-1,8a-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1R-(1.alpha.,7.beta.,8a.alpha.)] (9CI)
 SYNONYMS: Eremophila-1(10), 11-diene, 4.beta.H,5.alpha.-.

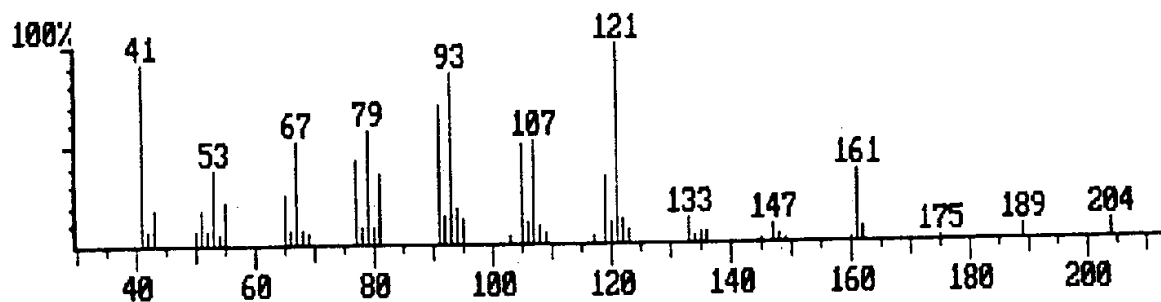
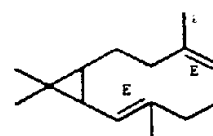


Biclogermacreno

Scan 5100 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

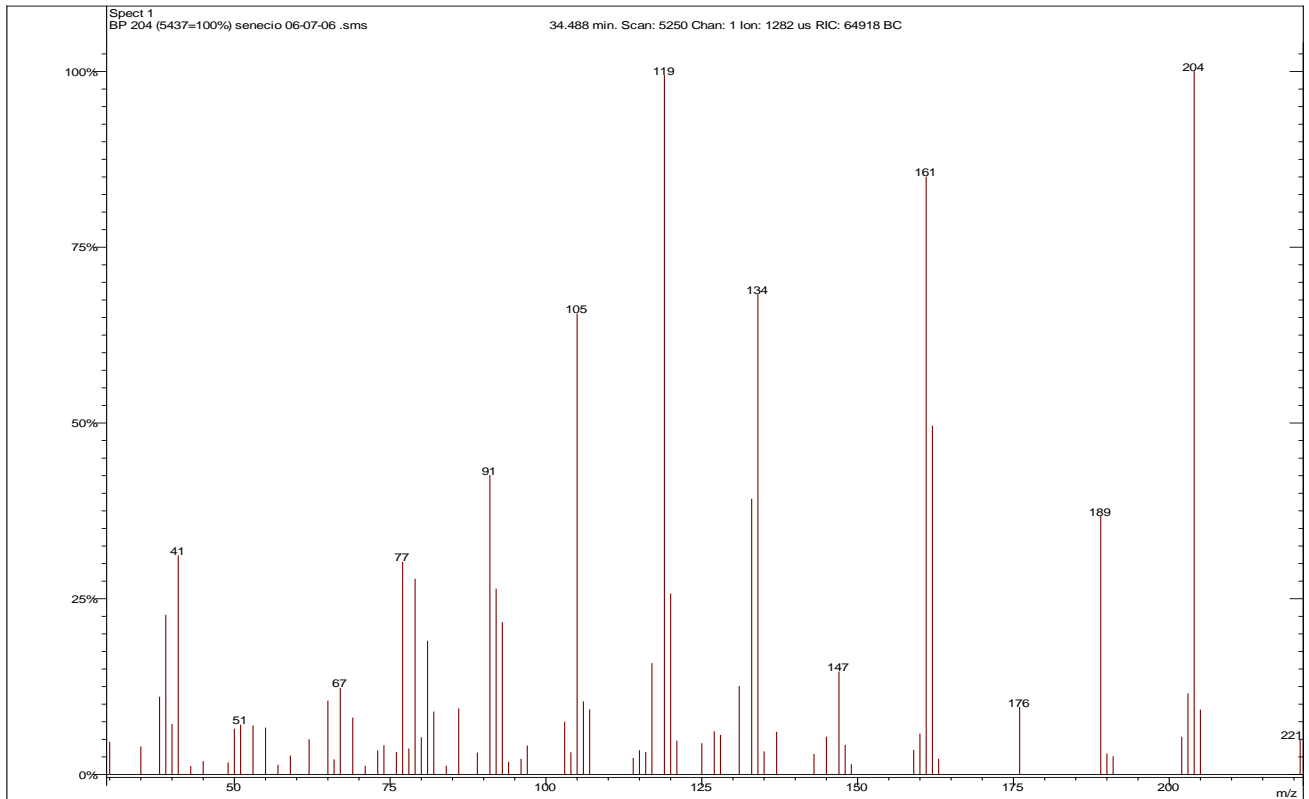


DB5-1632 KI-1494 **BICYCLOGERMACRENE**
 CAS# 24703-35-3 MF C₁₅H₂₄ FW 204 L0470
 CN Bicyclo[8.1.0]undeca-2,6-diene, 3,7,11,11-tetramethyl-,
 (1R*,2E,6E,10S*)-(9CI)
 SYNONYMS: None known.



Delta-Cadineno

Scan 5250 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

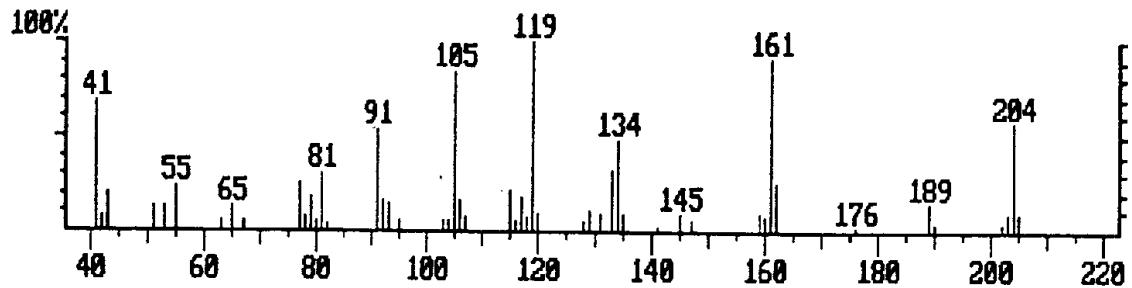
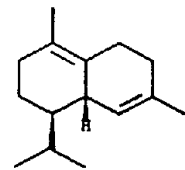


DB5-1700 KI-1524 CADINENE <DELTA->

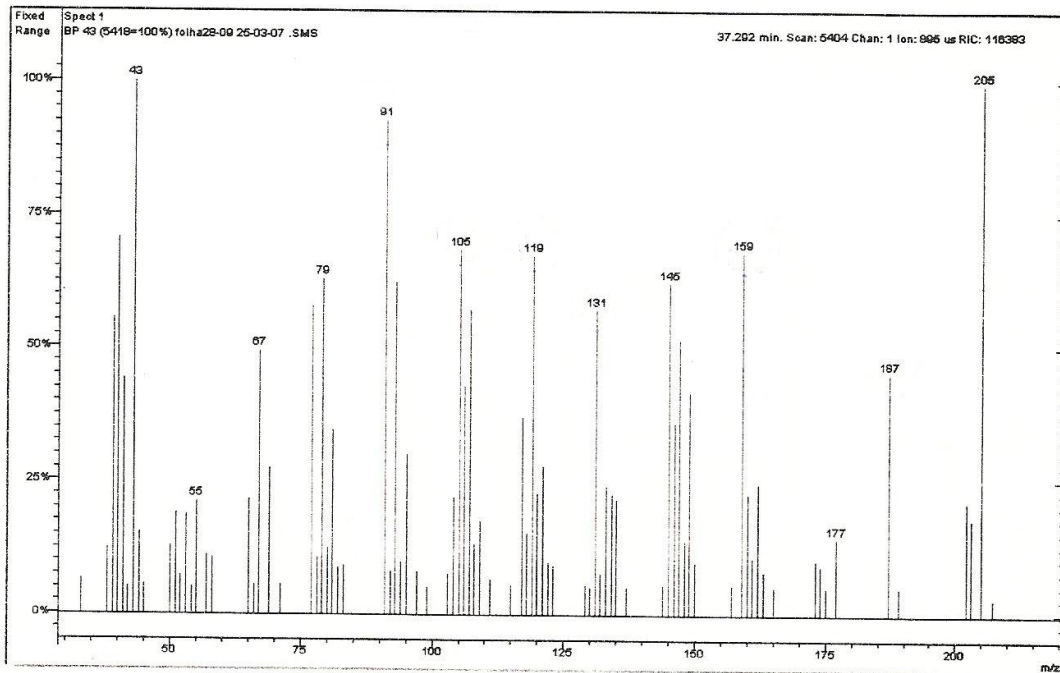
CAS# 483-76-1 MF C15 H24 FW 204 L0100

CN Naphthalene, 1,2,3,5,6,8a-hexahydro- 4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-(9CI)

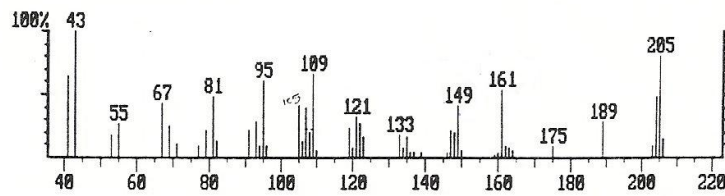
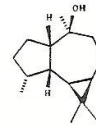
SYNONYMS: Cadina-1(10),4-diene.



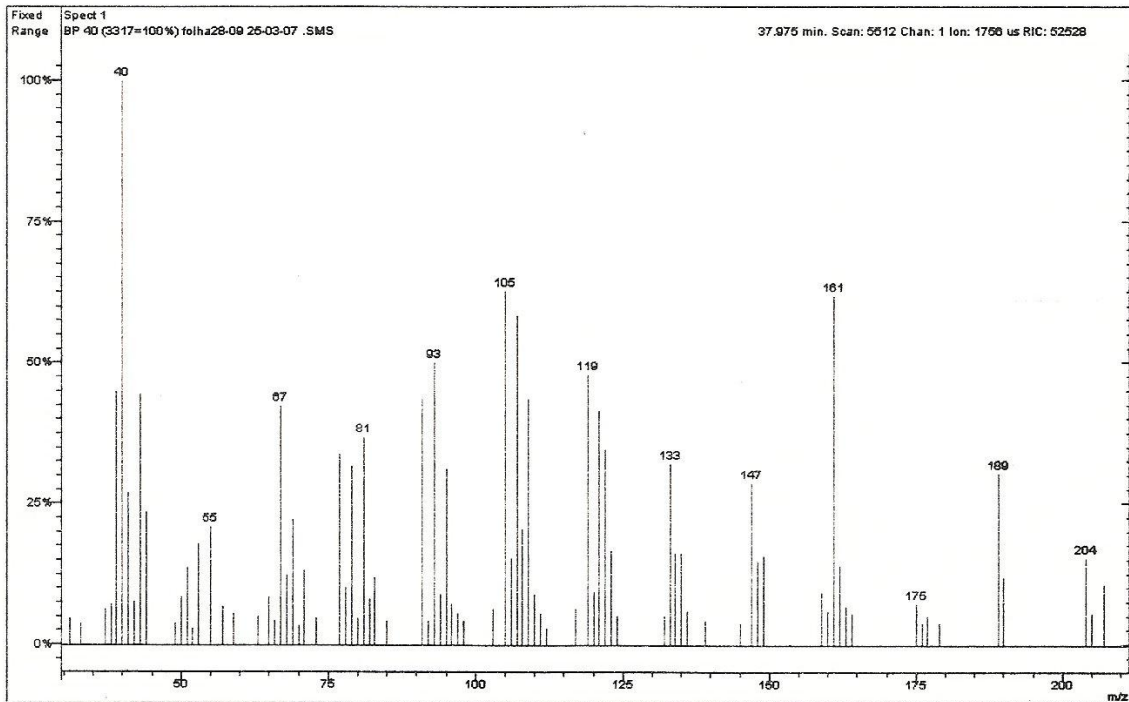
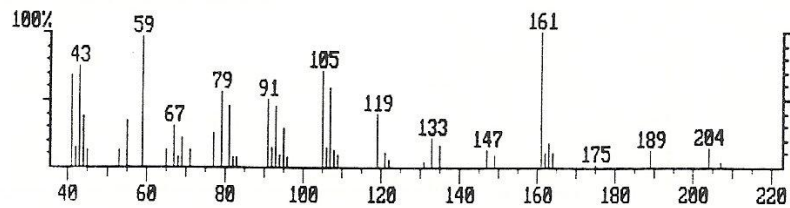
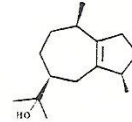
Viridiflorol



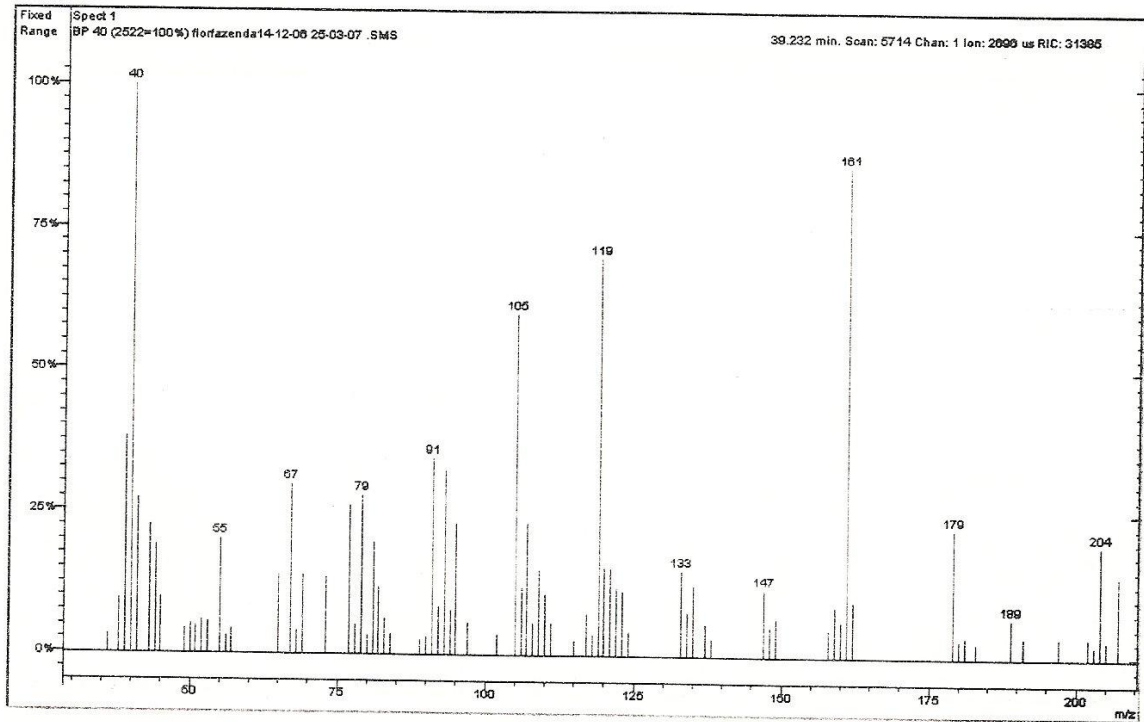
DB5-1859 KI-1590 **VIRIDIFLOROL**
 CAS# 552-2-3 MF C₁₅H₂₆O FW 222 L0434
 CN 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-
 tetramethyl-, [1aR-(1a.alpha.,4.beta.,4a.beta.,
 7.alpha.,7a.beta.,7b.alpha.)]-(9CI)
 SYNONYMS: Himbaccol.



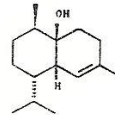
Guaiol

DB5-1873 KI-1595 **GUAIOL**CAS# 489-86-1 MF C₁₅H₂₆O FW 222 L0392CN 5-Azulenemethanol, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro- α ,
 α ,3,8-tetramethyl-, [3S-(3 α , 5 α , 8 α)]-(9CI)SYNONYMS: Champaca camphor. Champacol. Guai-1(5)-en-
11-ol. Guaiac alcohol.

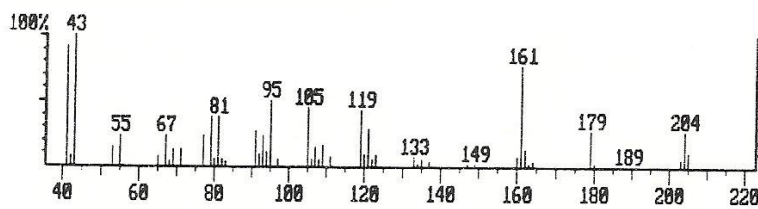
Cubenol

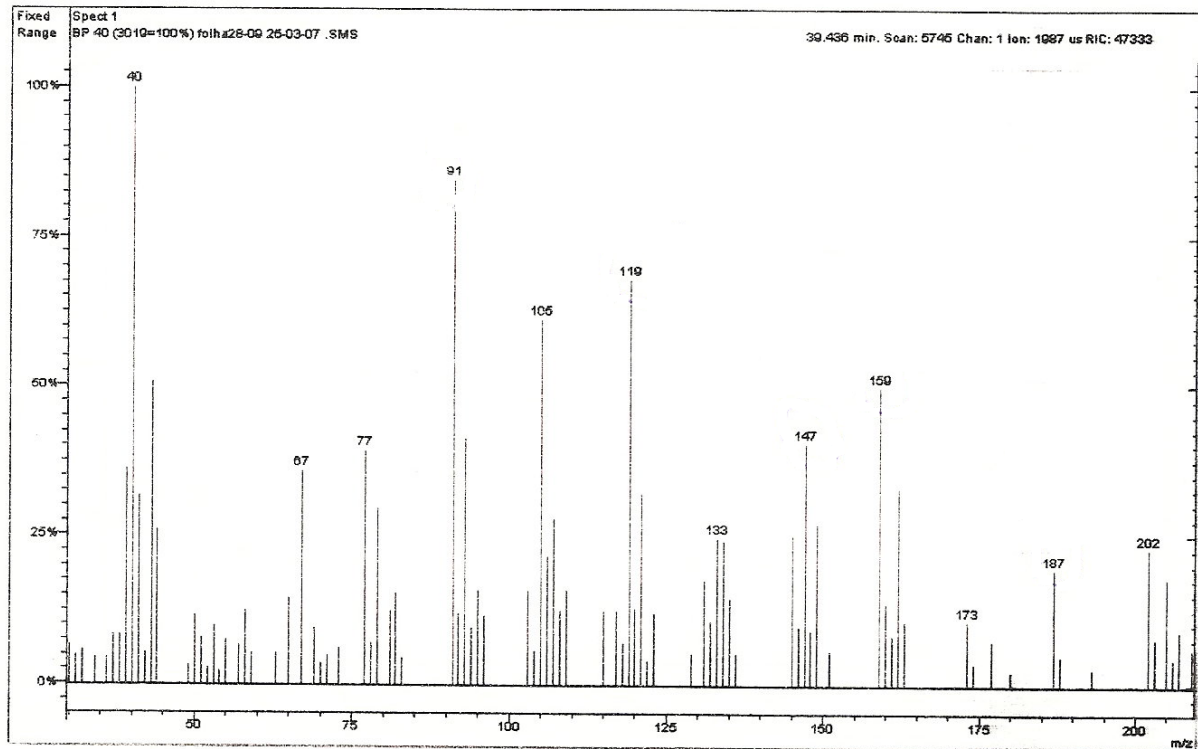


DB5-1977 KI-1642 **CUBENOL**
 CAS# 21284-22-0 MF C₁₅H₂₆O FW 222 L0366
 CN 4a(2H)-Naphthalenol, 1,3,4,5,6,8a-hexahydro- 4,7-dimethyl-
 1-(1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,4.beta.,4a.beta.,8a.alpha.)]-
 (9CI)

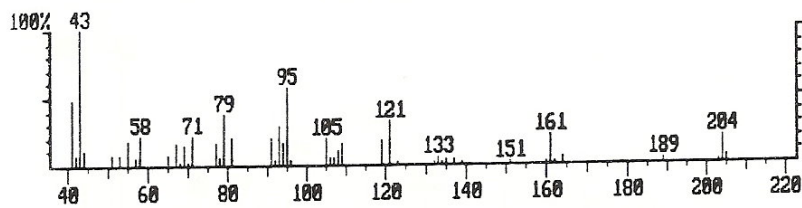
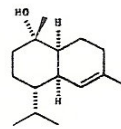


SYNONYMS: 10.beta.H-Cadin-4-en-1-ol.



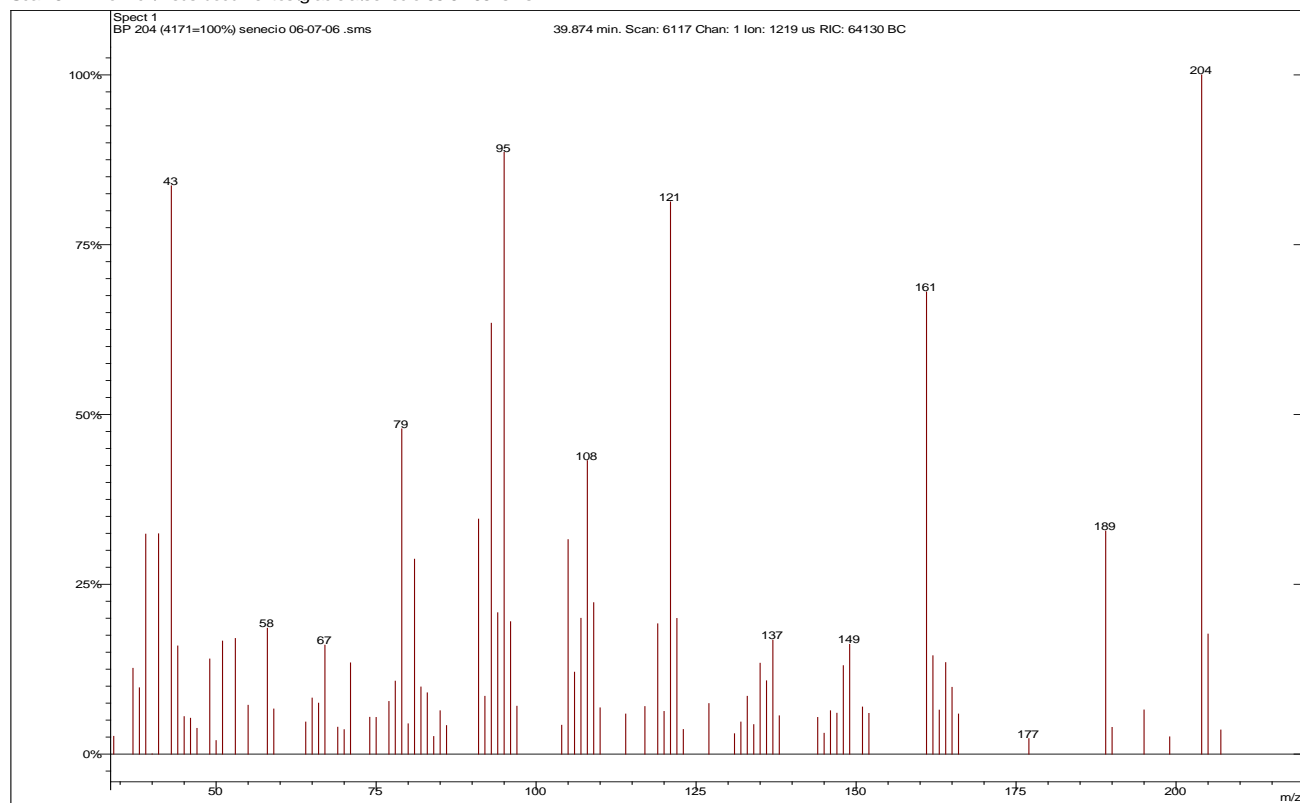
EPI- α -Murulol

DB5-1976 KI-1641 MUUROLLOL <EPI-ALPHA->
 CAS# 19912-62-0 MF C₁₅H₂₆O FW 222 L0128
 CN 1-Naphthalenol,1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1,6-dimethyl-4-
 (1-methylethyl)-, [1S-(1.alpha.,4.alpha.,4a.alpha.,8.alpha.)]-
 SYNONYMS: 1.beta.,10.beta.H-Cadin-4-en-10-ol. Muurolol,
 tau-



α -Cadinol

Scan 6117 from c:\meus documentos\graciela\senecio 06-07-06 .sms

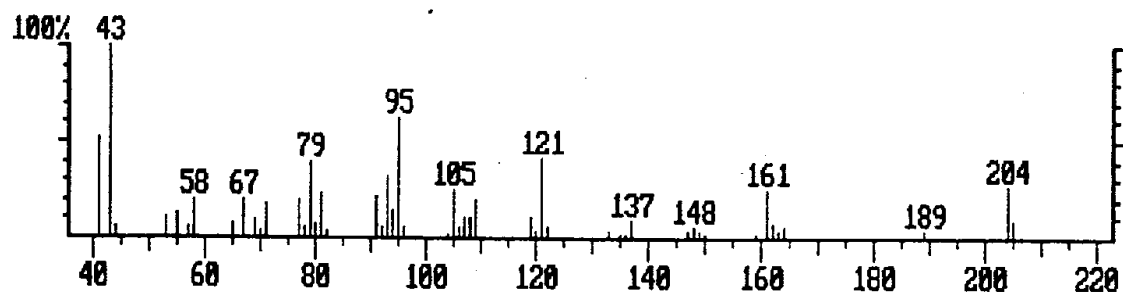
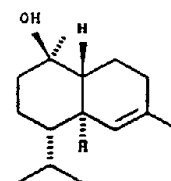


DB5-2003 KI-1653 CADINOL <ALPHA->

CAS# 481-34-5 MF C₁₅H₂₆O FW 222 L0126

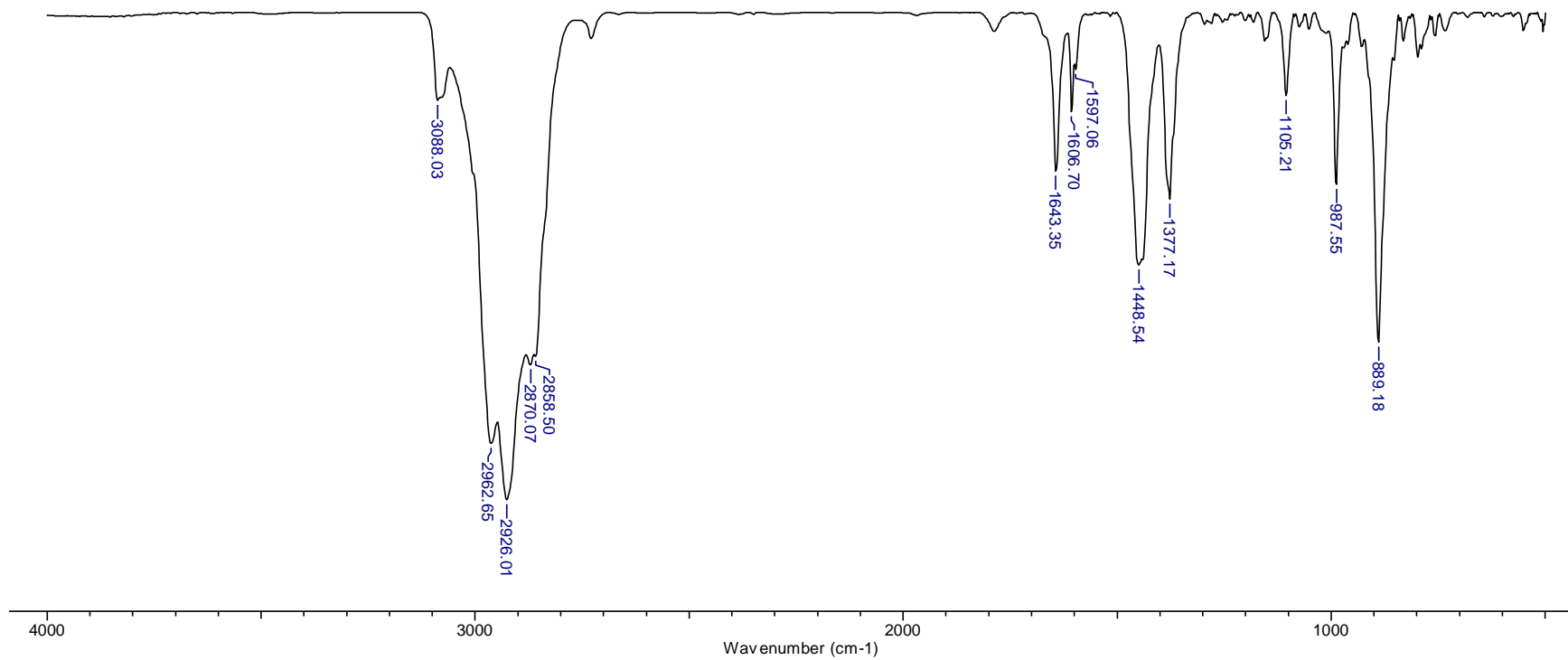
CN 1-Naphthalenol, 1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro- 1,6-dimethyl-4-(1-methylethyl)-, [1R-(1.alpha., 4.beta., 4a.beta., 8a.alpha.)]- (9CI)

SYNONYMS: Cadin-4-en-10-ol.

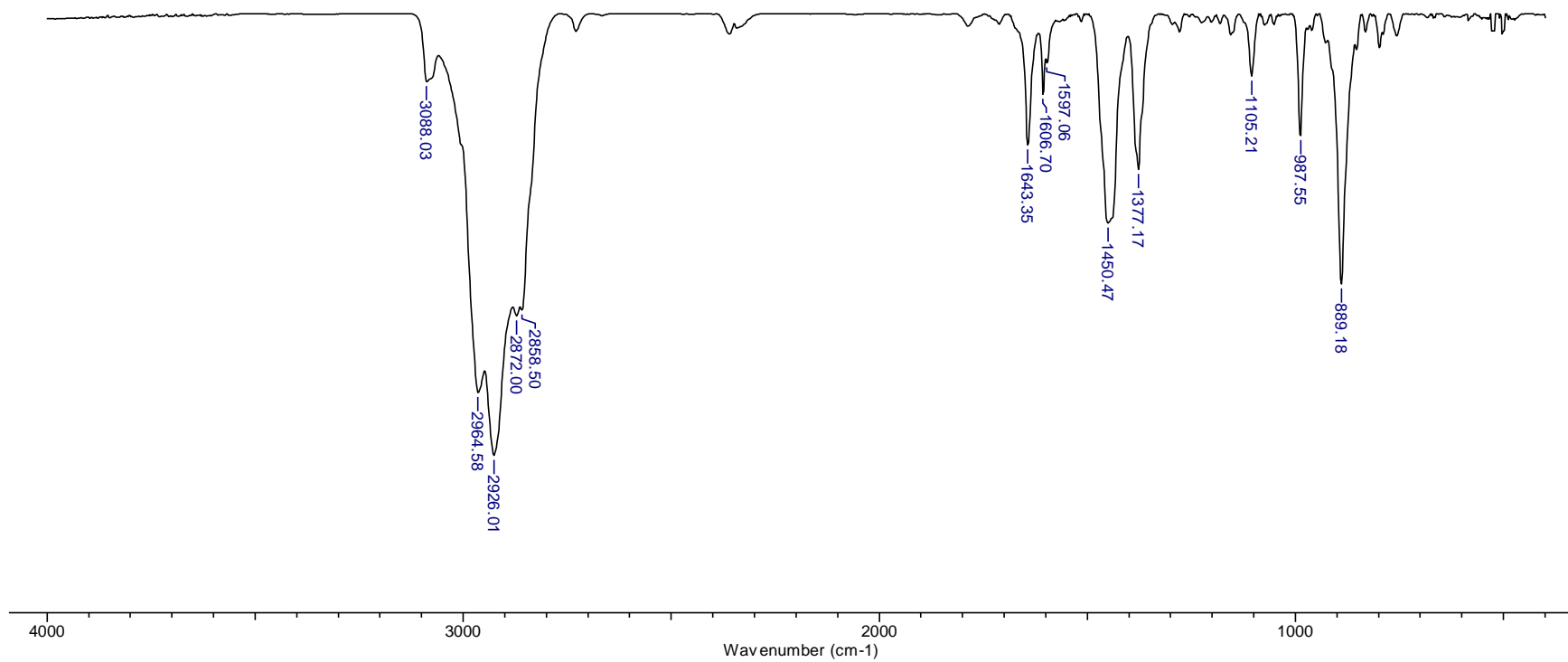


ANEXO 2**ESPECTROS NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER**

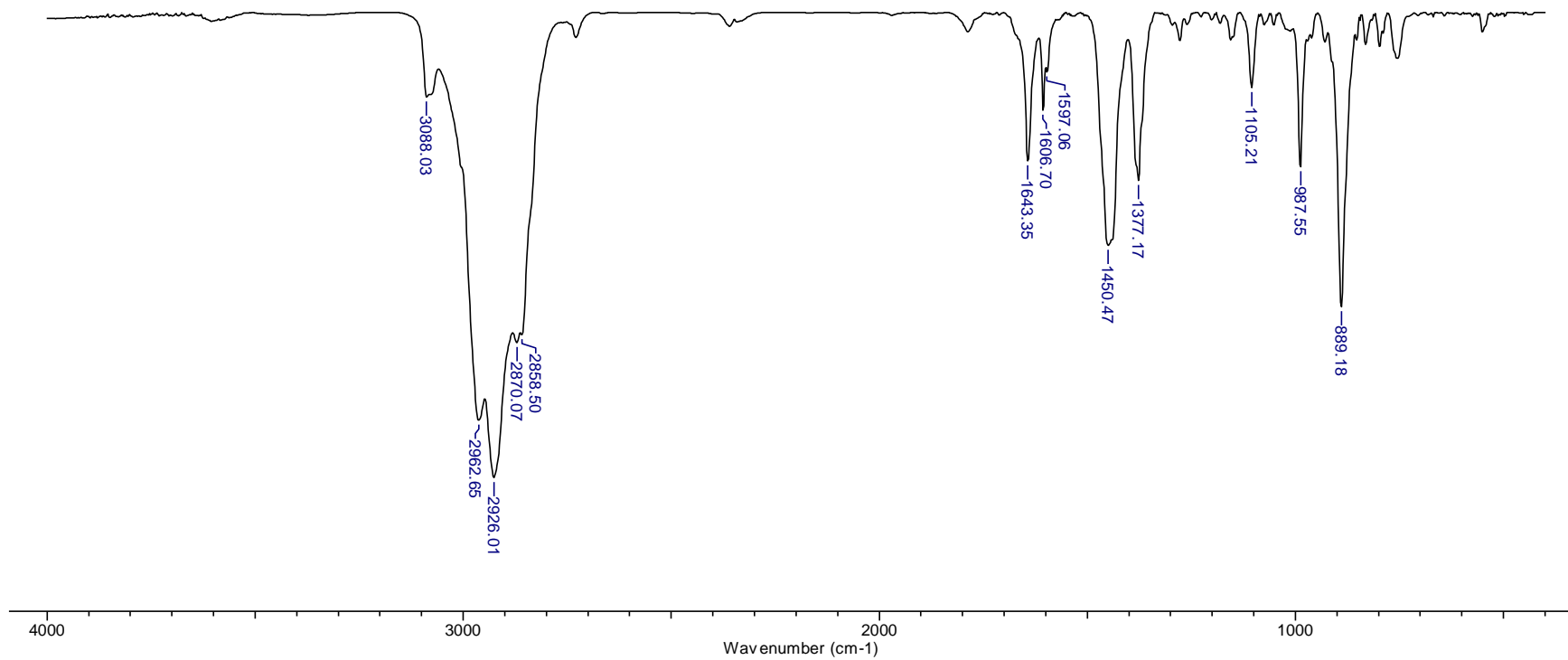
Espectro gerado a partir do óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis* coletado em junho de 2006.



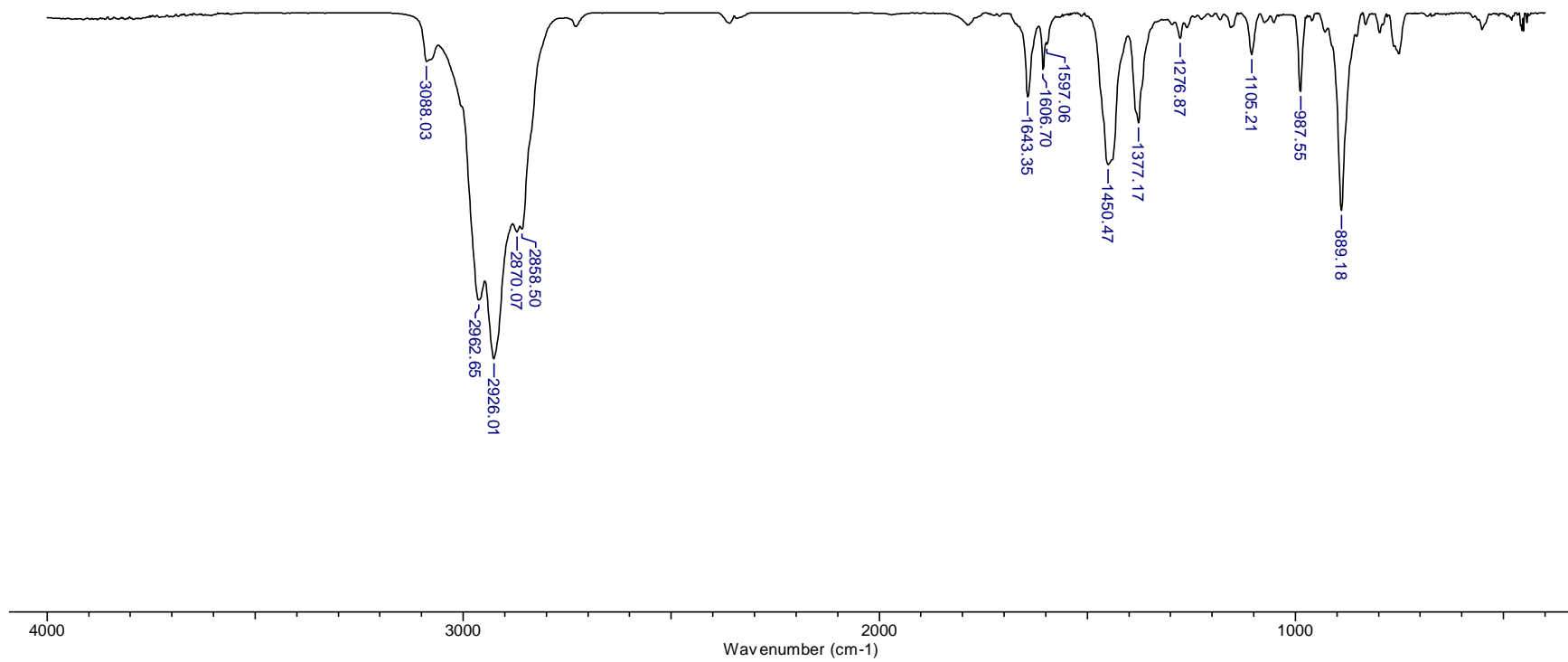
Espectro gerado a partir do óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis* coletado em setembro de 2006.



Espectro gerado a partir do óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis* coletado em dezembro de 2006.



Espectro gerado a partir do óleo essencial das folhas de *S. brasiliensis* coletado em março de 2007.



Espectro gerado a partir do óleo essencial das flores de *S. brasiliensis* coletado em setembro de 2006.

