



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE

OBTENÇÃO DE EXTRATOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS DE *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera (QUITOCO): PROCESSOS E ANÁLISES

Camila Pereira Grandini

Engenheira Agroindustrial Agroquímica

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**Porto Alegre
Março, 2017**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE
MATERIAIS

OBTENÇÃO DE EXTRATOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS DE *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera (QUITOCO): PROCESSOS E ANÁLISES

Camila Pereira Grandini

Engenheira Agroindustrial Agroquímica

ORIENTADOR: PROF. DR. Eduardo Cassel

Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Março, 2017**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS VOLÁTEIS E NÃO VOLÁTEIS DE
PLUCHEA SAGITTALIS (LAM.) CABRERA (QUITOCO):
PROCESSOS E ANÁLISES**

CANDIDATA: CAMILA PEREIRA GRANDINI

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DR. EDUARDO CASSEL - ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

DRA. MARLISE ARAUJO DOS SANTOS - DO PPGEE/FENG - PUCRS

DR. RUBEM MÁRIO FIGUEIRÓ VARGAS - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 103 - CEP: 90619-900

Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625

E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br

www.pucrs.br/feng

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Marcos e Marilú, e aos meus irmãos, Felipe e Miguel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família pela formação, incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial. Aos meus pais, Marcos e Marilú, por estar sempre ao meu lado encorajando e apoiando nas minhas decisões. Aos meus irmãos, Felipe e Miguel, que sempre estavam dispostos à colher quitoco. Aos meus avôs, pelo carinho e dedicação.

Ao meu namorado Marcos, pela compreensão nos momentos de ausência e por confiar na minha capacidade.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Operações Unitárias (PUCRS), pelo apoio e ajuda. Em especial a Ana Luísa, Aline e Júlia pelo conhecimento dividido e colaboração que foi fundamental para a elaboração do trabalho. Ao meu orientador Eduardo Cassel, pela paciência e disposição durante suas orientações.

Ao professor Prof. Dr. Arnaldo Bandoni da Cátedra de Farmacognosia da Universidade de Buenos Aires, pelo apoio na realização das análises olfatométricas.

Ao senhor Matias que permitiu as coletas do quitoco em sua propriedade e se prontificou a ajudar no que fosse necessário.

A CNPq pela oportunidade e bolsa de estudos.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	5
SUMÁRIO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
RESUMO	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. <i>Pluchea sagittalis</i> (Lam.) Cabrera	17
3.1.1. Utilização da <i>Pluchea sagittalis</i>	18
3.1.2. Composição do óleo essencial da <i>Pluchea sagittalis</i>	20
3.2. Métodos de extração – óleos essenciais	21
3.2.1. Extração por arraste a vapor	21
3.3. Métodos de extração – extratos voláteis e não voláteis	22
3.3.1. Extração com fluido supercrítico	23
3.4. Análises cromatográficas	24
3.4.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	24
3.4.2. Cromatografia em camada delgada	25
3.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência	25
3.5. Atividade antioxidante	26
3.5.1. Compostos fenólicos totais	27
3.6. Atividade antibacteriana e antifúngica	27
3.7 Análise sensorial olfatométrica	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Obtenção e preparo da matéria prima	30
4.2. Extrações	30
4.2.1. Extração por arraste a vapor	31

4.2.1.1 Arraste a vapor unidade laboratorial.....	31
4.2.1.2. Arraste a vapor em unidade piloto.....	33
4.3. Extração supercrítica.....	33
4.4. Cálculo do rendimento e densidade do óleo.....	35
4.5. Análise cromatográfica.....	35
4.5.1. Cromatografia gasosa/espectrometria de massas.....	36
4.5.2. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	36
4.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	38
4.6. Atividade Antimicrobiana.....	39
4.7. Determinação de compostos fenólicos totais.....	41
4.8. Atividade antioxidante.....	41
4.9. Análise sensorial – olfatométrica.....	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1 Rendimento.....	43
5.1.1. Extração das folhas e talos da planta.....	43
5.1.2. Extração das flores.....	45
5.2. Composição dos óleos.....	46
5.2.1. Composição química – folhas e talos.....	46
5.2.2. Composição química – flores.....	48
5.3. Cromatografia em camada delgada (CCD).....	50
5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	52
5.5. Atividade antibacteriana.....	56
5.6. Atividade antifúngica.....	58
5.7. Atividade antioxidante.....	59
5.8. Análise de compostos fenólicos totais.....	60
5.9. Análise sensorial – olfatométrica.....	61
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Flores da <i>P. sagittalis</i>	18
Figura 3.2 – Esquema do equipamento de extração por arraste a vapor. CA: caldeira (balão com resistência imersa); VE: vaso de extração; BT: banho termostático; CL: clevenger.....	22
Figura 4.1 - Unidade Laboratorial de Extração por Arraste a Vapor.....	32
Figura 4.2 - Unidade Piloto de Extração por Arraste a Vapor (1 – caldeira; 2 – vaso de extração; 3 – condensador; 4 – separador líquido-líquido).....	33
Figura 4.3 - Fluxograma da unidade piloto de extração supercrítica.	34
Figura 5.1 – Curva de rendimento do extrato por arraste a vapor <i>versus</i> tempo do óleo das folhas e talos do quitoco.	44
Figura 5.2 – Curva de rendimento do extrato por arraste a vapor <i>versus</i> tempo do óleo das flores do quitoco.....	46
Figura 5.3 – CCD dos extratos obtidos por extração supercrítica dos extratos (Tabela 4.1) das folhas e talos e das flores do quitoco revelado com DPPH.	51
Figura 5.4 – CCD dos extratos obtidos por extração supercrítica dos extratos (Tabela 4.1) das folhas e talos e das flores do quitoco revelado com vanilina.	51
Figura 5.5 – CLAE do extrato das flores do quitoco obtido por extração supercrítica a 120 bar de pressão.	52
Figura 5.6 – CLAE do extrato das folhas e talos do quitoco obtido por extração supercrítica a 120 bar de pressão.	53
Figura 5.7 – CLAE do padrão rutina e canferol.	53
Figura 5.8 – CLAE do padrão quercitina e ácido ferúlico.	54
Figura 5.9 – CLAE do padrão ácido ursólico e hesperidina.....	54
Figura 5.10 – CLAE do padrão ácido p-cumarino e ácido 5-cafeoilquínico.....	55
Figura 5.11 – Resultado da avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas e talos de quitoco frente <i>Staphylococcus aureus</i> (as regiões claras são as zonas em que houve inibição de crescimento).....	57

- Figura 5.12 – Resultado da avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas e talos frente *Escherichia coli*.....57
- Figura 5.13 – Resultado avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial das folhas e talos frente *Candida albicans*.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição de óleos essenciais de <i>Pluchea sagittalis</i>	20
Tabela 4.1 - Amostras dos extratos de quitoco obtidos por extração supercrítica que foram submetidas a análise CCD.	37
Tabela 4.2 – Amostras dos extratos de quitoco obtidas por extração supercrítica que foram submetidas por CLAE.	38
Tabela 4.3 – Extratos voláteis submetidos à análise sensorial olfatométrica.	42
Tabela 5.1 – Rendimentos dos extratos obtidos por extração supercrítica das folhas e talos do quitoco à 40° C de temperatura.	44
Tabela 5.2 – Rendimentos dos extratos obtidos por extração supercrítica das flores do quitoco.	45
Tabela 5.3 - Composição do óleo essencial das folhas e talos do quitoco extraído por arraste a vapor determinada por CG/EM.	47
Tabela 5.4 – Composição do óleo essencial das flores do quitoco extraído por arraste a vapor determinada por CG/EM.	49
Tabela 5.5 – Atividade antioxidante dos extratos obtidos por extração supercrítica, expressos em g de extrato por g de solução de DPPH (EC ₅₀).	59
Tabela 5.6 – Concentração de fenólicos totais, expressas em equivalentes de ácido gálico, dos extratos de quitoco obtidos por extração supercrítica.	60
Tabela 5.7 – Análise sensorial olfativa dos óleos essenciais e extratos voláteis de <i>P. sagittalis</i> obtidos por arraste a vapor e extração supercrítica.	61

RESUMO

GRANDINI, Camila Pereira. **Obtenção de extratos voláteis e não voláteis de *Pluchea sagittalis* (quitoco): processos e análises.** Porto Alegre. 2017. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A crescente preocupação de indústrias em encontrarem insumos naturais em substituição aos sintéticos na produção de produtos bioativos nas áreas farmacêutica, alimentícia e cosmética motivou esta pesquisa quanto ao estudo das atividades biológicas dos extratos voláteis e não voláteis da *Pluchea sagittalis*. Esta planta conhecida como quitoco, de crescimento espontâneo, é encontrada em regiões tropicais tendo sua origem no continente sul-americano. O objetivo deste estudo consistiu em obter extratos voláteis e não voláteis das partes aéreas do quitoco e avaliar a composição química e as atividades biológicas dos extratos obtidos. Para a obtenção dos extratos a partir de amostras das folhas e talos da *P. sagittalis*, sem as flores, e amostras de flores foram utilizados dois processos: extração por arraste a vapor, para a obtenção de extratos voláteis, e extração supercrítica, para a obtenção de extratos voláteis e não voláteis. A composição química dos extratos obtidos por arraste a vapor foi determinada através da análise por cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massa. A atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas e talos foi testada com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e também com o fungo *Candida albicans*, ambos os testes foram realizados através da técnica bioautografia indireta, onde o óleo essencial apresentou inibição do crescimento para *Staphylococcus aureus* e para o fungo *Candida albicans*. Os extratos voláteis das folhas e talos e das flores, obtidos através da extração por arraste a vapor e com fluido supercrítico a 90 bar de pressão, foram avaliados quanto ao seu potencial aromático por meio de análise sensorial (olfatométrica), tendo o extrato volátil das flores obtido por extração supercrítica um grande potencial para o uso em perfumaria.

Palavras-Chaves: quitoco, arraste a vapor, extração supercrítica, atividade antimicrobiana, potencial aromático.

ABSTRACT

GRANDINI, Camila Pereira. **Obtaining volatile and non-volatile extracts of *Pluchea sagittalis* (quitoco): processes and analyzes.** Porto Alegre. 2017. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

The growing concern of industries in finding natural inputs in place of synthetic ones in the production of bioactive products in the pharmaceutical, food and cosmetic areas motivated this research to the study of the biological activities of the volatile and non-volatile extracts of *Pluchea sagittalis*. This plant known as quitoco of spontaneous growth in nature is found in tropical regions having its origin in the South American continent. The goal of this study was to obtain volatile and non-volatile extracts from the aerial parts of the quitoco and to evaluate the chemical composition and the biological activities of the extracts obtained. In order to obtain extracts from leaf and stem samples of *P. sagittalis*, without flowers and flower samples, two processes were used: Extraction by steam drag, to obtain volatile extracts, and supercritical extraction, to obtain non-volatile extracts. The chemical composition of the extracts obtained by steam drag was analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometer. The antimicrobial activity of leaf and stem essential oil was tested with the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and also with the fungus *Candida albicans*, both tests were performed using the indirect bioautography technique where the oil showed growth inhibition for *Staphylococcus aureus* and for the fungus *Candida albicans*. Volatile extracts of leaves and stems and flowers obtained by steam extraction and supercritical fluid at 90 bar pressure were evaluated for their aromatic potential by means of sensorial (olfatometric) analysis, having as best evaluation the extract obtained by supercritical extraction of quitoco flowers.

Key words: Quitoco, steam distillation, supercritical extraction, antimicrobial activity, aromatic potential.

1. INTRODUÇÃO

Várias indústrias estão à procura de fontes alternativas de matéria-prima, para que possam produzir extratos naturais e sustentáveis com atividades antimicrobiana e antioxidante e protetores de alimentos (SIMIONATTO, 2004). É com esse intuito que o objetivo deste trabalho consiste em obter extratos voláteis e não voláteis das folhas e talos e das flores da *Pluchea sagittalis*, para investigar suas atividades biológicas como a ação antioxidante e antimicrobiana, identificar a composição química e verificar o potencial aromático dos extratos voláteis.

O quitoco, *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera, pertencente à família Asteraceae e ao gênero *Pluchea*, é uma planta de flores pequenas de cor lilás que florescem entre os meses de outubro a julho (ROSSATO, 2010). É uma planta de regiões tropicais, sendo encontrada em vários países da América Latina como, por exemplo, o Brasil. Esta planta é conhecida popularmente em função de suas flores serem utilizadas pelas abelhas para a produção de mel (BARROS et al., 2006).

A obtenção de extratos naturais tem sido uma ação de interesse da sociedade com o intuito de substituir compostos sintéticos usados frente a enfermidades, na suplementação de alimentos, pela indústria farmacêutica, de cosméticos e perfumaria. A demanda no mercado de extratos naturais tem crescido, o que remete a importância de se pesquisar sobre extratos de plantas e suas ações, assim como o método de extração mais viável, para que se produza da melhor forma o extrato (BARROSO, 2011).

É de uso comum como método de extração para a obtenção de óleos essenciais, o método de extração por arraste a vapor, o qual é utilizado nesta pesquisa para extrair óleos essenciais das folhas e talos e das flores do quitoco. Para a obtenção de extratos voláteis e não voláteis foi utilizada a extração supercrítica, um método considerado limpo ambientalmente e de alta eficiência. A utilização de ambos os métodos não somente extraem os compostos voláteis e não

voláteis do material vegetal, como também possibilita uma análise sobre a influência dos processos de extração na composição química, na atividade biológica e no potencial aromático dos extratos.

O quitoco é uma planta que pode ser encontrada facilmente e com crescimento espontâneo na natureza. Na literatura consultada não foram encontrados estudos relacionados aos extratos das flores do quitoco obtidos a partir de extração supercrítica e por arraste a vapor, podendo assim, vir a ser uma matéria-prima alternativa na produção de produtos bioativos. É com esse intuito que esta pesquisa aborda as características da planta, dos métodos utilizados para obtenção dos extratos, assim como analisa os extratos e suas atividades antimicrobiana e antioxidante, e o potencial aromático dos extratos voláteis a fim de verificar sua viabilidade como insumo para indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticas e perfumaria.

2. OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo obter extratos voláteis e não voláteis das folhas e talos e das flores do quitoco (*Pluchea sagittalis*), utilizando os processos de extração por arraste a vapor e extração supercrítica, respectivamente, e avaliar a composição química, as atividades biológicas e o potencial aromático dos extratos obtidos.

2.1. Objetivos Específicos

- Realizar a extração por arraste a vapor em escala laboratorial e piloto das flores e das folhas e talos do quitoco, respectivamente;
- Realizar a extração com CO₂ supercrítico das folhas e talos e das flores do quitoco;
- Analisar os extratos obtidos por cromatografia gasosa (extratos voláteis), cromatografia em camada delgada (extratos voláteis e não voláteis) e cromatografia líquida de alta eficiência (extratos não voláteis).
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos voláteis das folhas e talos do quitoco obtidos por arraste a vapor frente as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e ao fungo *Candida albicans*;
- Determinar a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais dos extratos não voláteis do quitoco obtidos por extração com fluido supercrítico;

- Avaliar o potencial aromático através de análise sensorial olfatométrica dos óleos essenciais obtidos por arraste a vapor e dos extratos voláteis obtidos por extração supercrítica (90 bar);

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera

P. sagittalis, é conhecida popularmente como quitoco, lucera, erva-lucera, tabacarana e madrecravo (LORENZI; MATOS, 2002) e possui sinonímia científica como *Gnaphalium suaveolens* Vell., *Pluchea quitoc* DC (BARROS et al.; 2006). Segundo Steffen (2010), a planta por muito tempo foi chamada popularmente de arnica, incluindo-se ao grupo de várias plantas com este mesmo nome popular, porém a mesma é mais conhecida como quitoco. O autor relata que a planta tem sua origem no continente sul-americano, não sendo encontrada na literatura europeia.

A planta pertence à família Asteraceae e ao gênero *Pluchea*, o qual apresenta mais de 80 espécies distribuídas pela América do Sul. A família Asteraceae compreende 1535 gêneros e aproximadamente 23 mil espécies de angiospermas, distribuídas em 3 subfamílias e 17 tribos (BREMER, 1994). Segundo Barros et al. (2006), *P. sagittalis* é comum da região tropical, podendo ser encontrada em diferentes países da América Latina, dentre esses o Brasil.

A *P. sagittalis* é uma planta perene, ereta, aromática, com odor suave característico, pouco ramificada, de caule herbáceo e com altura entre 30 cm a 90cm (LORENZI; MATOS, 2002). A planta possui flores pequenas em tons de lilás, como pode ser visto na Figura 3.1. O quitoco floresce nos meses de outubro a julho (ROSSATO, 2010).

Segundo descrição de Cancelli et al. (2006), o quitoco é uma erva que possui altura variável de 0,30 a 2,0 m. Seu caule é robusto, foliáceo, alado e piloso, e suas folhas são sésseis oblongo-lanceoladas, levemente denteadas e com base

decorrente. Pode se comportar como ruderal e floresce preferencialmente em março e abril.

Figura 3.1 - Flores da *P. sagittalis*



Fonte: RODRIGUES, 2011.

No Rio Grande do Sul pode-se encontrar *P. sagittalis*, além de mais duas espécies pertencentes à família Asteraceae e ao gênero *Pluchea*, as quais são: *Pluchea laxiflora* Hook. & Arn. ex Baker e *Pluchea oblongifolia* DC. (CANCELLI et al., 2006). No Estado a planta pode ser encontrada em várias regiões, sendo mais frequente na Depressão Central. Preferencialmente, esta habita campos úmidos e banhados ou em solos argilosos e arenosos úmidos. Normalmente se observa grande ocorrência em arrozais (CANCELLI et al., 2006).

3.1.1. Utilização da *Pluchea sagittalis*

Na literatura encontram-se registros do uso de infusão de folhas e talos de *P. sagittalis* para problemas de digestão, expectorantes, enfermidades estomacais e hepáticas, flatulências, dispepsias nervosas, inflamação uterina, renal e de bexiga, reumatismo, resfriados e bronquites. Também indicada em casos de histerismo e

como estimulante do crescimento capilar (LORENZI; MATOS, 2002; ROSSATO, 2010).

Segundo Burger (2000), o chá das folhas e talos é utilizado no tratamento de dores estomacais, náuseas, vômitos, distúrbios digestivos e hepáticos e também como estimulante intestinal. Quando misturada às flores de *Rosa banksiae* tem efeito laxativo e antiulcerativo e quando misturada às folhas de *Malva parvifolia* e galhos de *Anethum graveolens* possui efeito antirreumático.

Nas regiões de campo do Rio Grande do Sul, principalmente nas proximidades de cultivo de arroz é produzido mel de quitoco, sendo de coloração clara, aroma suave e tendo sabor diferenciado dos outros méis (AGAMEL, 2016).

Conforme Rossato (2010), diversos autores demonstram que extratos de *P. sagittalis* apresentam atividade antioxidante, antiinflamatório, anticancerígeno e antimicrobiano. A atividade analgésica e antiinflamatória pode ser explicada através da presença de substâncias triterpênicas encontradas em extratos etanólicos da *P. sagittalis*, sendo estas: estigmasterol, β -amirina, taraxasterol e pseudo-taraxasterol (BARROS et al., 2006).

Souza et al. (2004) relatam que o extrato aquoso de *P. sagittalis* possui efeitos antiinflamatórios, cicatrizantes e diarréicos. De acordo com Rodrigues (2011), testes realizados em animais evidenciaram também que o extrato etanólico de *P. sagittalis* apresenta atividade depressora do sistema nervoso central, diminuindo os sinais de ansiedade sem prejudicar as atividades motoras ou causar efeitos sedativos.

Monks et al. (2002) relatam que estudos farmacológicos evidenciaram atividade antiproliferativa em células tumorais. As atividades citotóxicas da planta atuam em células de tumor sólido humano de adenocarcinoma de cólon HT29 e em células de câncer de pulmão NCL-H460.

Para Steffen (2010), o uso da planta é bem variado. A infusão de folhas e raízes pode ser utilizada para digestões difíceis, gases intestinais, inapetência, inflamações do útero, reumatismo, artrismo, resfriados, tosses e bronquites.

3.1.2. Composição do óleo essencial da *Pluchea sagittalis*

A composição química dos óleos essenciais é muito diversificada e variável. Fatores como o tipo de cultivo, tipo de solo, temperatura, disponibilidade de água, exposição ao sol e até mesmo os ventos influenciam na sua composição e propriedades (SIMÕES e SPITZER, 1999; BANDONI e CZEPAK, 2008).

Segundo o estudo de Arriaga et al. (2006), os componentes químicos encontrados no óleo essencial da *P. sagittalis*, extraídos por hidrodestilação das folhas e do caule e analisados por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa foram δ -cadineno (25,3%), 1,8-cineol (17,3%), α -copaeno (6,5%), 10-epi- γ -eudesmol (5,5%), β -cariofileno (4,1%), α -terpineol (4%), espatulenol (3,4%), entre outros em menores quantidades.

Tabela 3.1 - Composição de óleos essenciais de *Pluchea sagittalis*.

Composto	Amostra A (%)	Amostra B (%)
Linalol	-	1,04
Terpineol	2,20	-
δ -elemeno	1,80	2,24
Undecanol	7,40	7,15
α -copaeno	3,50	3,60
α -gurguneno	20,5	20,0
Nerolidol	4,50	2,86
Espatulenol	6,50	1,95
E-sesquilavandulol álcool	24,3	8,16
α -cadinol	7,50	6,90
E-sesquilavandulol acetato	7,60	24,1

Fonte: SIMIONATTO, 2004.

Simionatto (2004) coletou amostras da planta nos municípios de Santana do Livramento (amostra A) e Fortaleza dos Valos (amostra B), ambos localizados no Rio Grande do Sul, e realizou hidrodestilação para obter o óleo essencial que apresentou rendimento de 0,24 para a amostra A e 0,19 para a amostra B. Os óleos essenciais foram submetidos à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa e foram encontradas composições e concentrações diferentes para as duas amostras estudadas. Segundo o autor esta diferença ocorre em função da

localização das coletas. A Tabela 3.1 apresenta as composições dos óleos essenciais de *P. sagittalis*.

3.2. Métodos de extração – óleos essenciais

Óleo essencial é o produto obtido através de métodos de extração como arraste a vapor e hidrodestilação, sendo que a definição do processo a ser utilizado depende do composto que se quer obter, a quantidade de óleo presente na planta e a localização do óleo na planta (raízes, flores, folhas cascas e rizomas). O método usual para a obtenção de óleos essenciais é destilação por arraste a vapor, porém também podem ser utilizados hidrodestilação, prensagem, extração com dióxido de carbono supercrítico, entre outros (SIMÕES, 1999). Cada método de extração é capaz de produzir um tipo diferente de extrato com composição química distinta, ainda que se utilize a mesma espécie vegetal (WOLFFENBUTTEL, 2010).

3.2.1. Extração por arraste a vapor

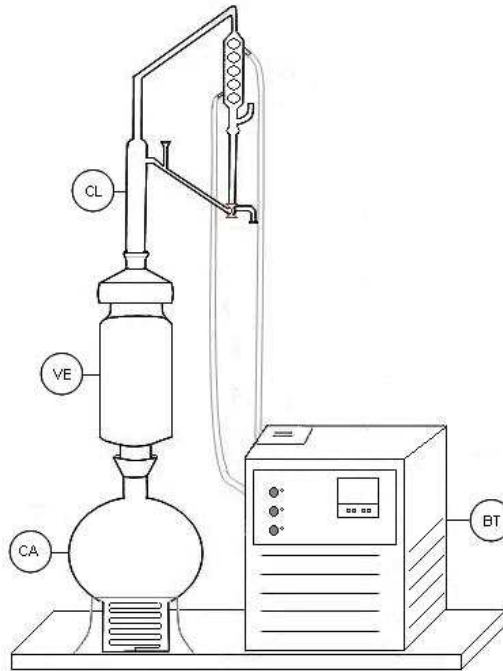
A extração por arraste a vapor é um método tradicional de obtenção de óleo essencial de plantas, sendo o mais utilizado industrialmente devido ao seu baixo custo, a possibilidade de processar quantidades significativas de material vegetal de uma única vez e sua simplicidade tecnológica em comparação com outras técnicas mais avançadas como, por exemplo, a extração por meio de fluido supercrítico (GARCEZ, 2016).

O método de extração de óleos essenciais por arraste a vapor consiste em passar vapor d'água à temperatura de aproximadamente 100°C, por um vaso extrator, que contém um leito fixo de massa de planta aromática. Os constituintes voláteis possuem uma pressão de vapor mais elevada que a da água, assim com o efeito da temperatura em fluxo ascendente de vapor, ocorre o rompimento das células odoríferas da planta. O óleo essencial, em contato com o vapor, é arrastado para a parte superior do vaso extrator até o condensador. A mistura água e óleo essencial são conduzidos por gravidade ao vaso de decantação/separação onde ocorre a separação das fases: fase oleosa e fase aquosa. Parte do óleo que se

mantém emulsionado na água forma o hidrolato (CASSEL et al., 2009; OLIVEIRA, 2015).

Este método é utilizado preferencialmente quando a planta possui grande quantidade de óleo, localizado na superfície da amostra (CASSEL; VARGAS, 2006). A Figura 3.2 apresenta um esquema de extração por arraste a vapor laboratorial.

Figura 3.2 – Esquema do equipamento de extração por arraste a vapor. CA: caldeira (balão com resistência imersa); VE: vaso de extração; BT: banho termostático; CL: clevenger.



Fonte: LUCAS, 2011.

3.3. Métodos de extração – extratos voláteis e não voláteis

Para a obtenção dos extratos voláteis e não voláteis, a partir de matéria prima vegetal, normalmente se realiza infusão e/ou maceração de partes da planta em solvente a baixas pressões, de acordo com a polaridade deste e dos compostos que se deseja obter (JANUÁRIO et al., 2005). Alguns extratos podem ser fracionados por cromatografia em coluna com o objetivo de isolar um composto de

interesse presente no extrato bruto (VIDARI et al., 2003). Outro método de se obter os extratos é através da extração com fluido supercrítico. Estudos mostram que este processo é mais seletivo para a extração de compostos fenólicos quando comparado a extratos preparados por maceração alcoólica (PIANTINO et al., 2008 apud LUCAS, 2015). Extratos obtidos a pressões até aproximadamente 100 bar e temperaturas entre 40°C a 60°C podem ser considerados voláteis. A partir de pressões mais elevadas os compostos extraídos apresentam elevados pesos moleculares (não voláteis) (GARCEZ et al., 2017).

3.3.1. Extração com fluido supercrítico

A extração com fluidos supercríticos é uma operação unitária por contato que se fundamenta na solubilidade e nas propriedades de transferência de massa: alto poder de extração, alto coeficiente de difusão, baixa tensão superficial e baixa viscosidade (BRUNNER, 1994). Dos vários solventes utilizados nas pesquisas envolvendo esta tecnologia, o dióxido de carbono é a escolha padrão para aplicação em processos envolvendo produtos naturais por ser inerte, ter baixa pressão crítica (73,4 bar), baixa temperatura crítica (31,2°C), baixo preço e sua grande disponibilidade (GARCEZ, 2016). Assim, além de utilizar um solvente atóxico e não deixar resíduos do mesmo no produto final, o processo pode ser operado a baixas temperaturas, evitando a degradação de possíveis compostos termolábeis presentes no extrato final (BRUNNER, 1994; MAUL, 1999).

A extração com CO₂ supercrítico é um método vantajoso em função de ser não poluente, pois além de não exigir uma etapa de separação é possível reaproveitar o solvente através de reciclo, tornando assim o processo mais sustentável e econômico. É indicado para extrair compostos a partir de material vegetal ou animal, como por exemplo, vitaminas, óleos essenciais, pigmentos, também para produção de café descafeinado, erva-mate descafeinada, extrato de lúpulo, entre outras aplicações (KNEZ ET al., 2014).

Há um grande crescimento da utilização da extração supercrítica nos últimos anos. Entre 2000 a 2014 mais de 300 plantas foram estudadas. Os estudos focaram em: substituição de solventes orgânicos, enriquecimento dos principais óleos

comerciais, utilização de resíduos vegetais e partes de vegetais ainda não explorados para agregação de valor ao processo (MELO et al., 2014).

3.4. Análises cromatográficas

Para análise de extratos voláteis e não voláteis são comumente utilizadas análises cromatográficas. A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem separar componentes muito semelhantes de misturas complexas. Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou em uma superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária. Os componentes, que são mais fortemente retidos na fase estacionária, movem-se muito lentamente no fluxo da fase móvel. Ao contrário, os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária, movem-se mais rapidamente. Através dessas diferenças na mobilidade, os componentes da amostra se separam em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa e/ou quantitativamente (SKOOG et al., 2002)

Dentre elas estão a cromatografia gasosa, a cromatografia em camada delgada e a cromatografia líquida de alta eficiência (OLIVEIRA et al., 2003).

3.4.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

De acordo com Barroso (2011), a cromatografia gasosa é uma técnica muito usada na identificação da composição química dos óleos essenciais. Sua importância tem aumentado nos últimos anos em função da evolução da tecnologia aplicada aos equipamentos, principalmente os detectores e as colunas cromatográficas que permitiram uma maior eficiência na separação, identificação e quantificação dos compostos dos óleos essenciais.

Nesse método os componentes da amostra são vaporizados no injetor e são inseridos da coluna cromatográfica. A separação da amostra é consequência de sua

partição e interação das moléculas entre uma fase móvel gasosa e outra fase estacionária líquida ou sólida (SKOOG, 2008).

O método mais eficiente para a identificação dos compostos de um óleo essencial é a cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG/EM), obtendo-se assim um espectro de massas para cada pico cromatográfico. O padrão de fragmentação é comparado com os existentes na biblioteca de espectros de massas, que está instalada no computador junto ao equipamento, logo, são fornecidas as probabilidades quanto à identificação da substância (SIMIONATTO, 2004).

3.4.2. Cromatografia em camada delgada

Para analisar os extratos não voláteis pode ser utilizada a cromatografia em camada delgada (CCD) que consiste na separação de compostos de uma mistura através da migração sobre uma camada de adsorvente, chamada de fase estacionária. O adsorvente mais utilizado é a sílica gel. Esta migração se dá por capilaridade com auxílio de um solvente, chamado fase móvel (COLLINS et al., 2007; SKOOG et al., 2008). Um exemplo de aplicação do uso desta técnica para análise de produtos naturais foi o uso da mesma para análise de extratos de própolis (FIANCO, 2014).

3.4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem sido a técnica analítica mais utilizada e apropriada para análises de polifenóis em infusões de vegetais (BENINCÁ, 2009). Dentre as vantagens apresentadas pela CLAE em comparação com outras técnicas destaca-se: a presença de duas fases cromatográficas (móvel e estacionária) de interação seletiva com as moléculas da amostra, contra somente uma em cromatografia gasosa; a maior variedade de fases estacionárias que atuam em diversos mecanismos de separação; e a possibilidade de separação de compostos termicamente instáveis (BENINCÁ, 2009).

Um exemplo de uso do CLAE para analisar extratos de quitoco é o trabalho desenvolvido por Martino et al. (1984), que verificou a presença de ácido isoclorogênico em extratos metanólicos de plantas colhidas no Uruguai.

3.5. Atividade antioxidante

Segundo Rice-Evans (1997) a atividade antioxidante de um composto é resultante de diferentes fatores, como por exemplo, reatividade com o doador de elétrons, potencial em quelar metais de transição, reatividade perante compostos antioxidantes e destino de derivado radical antioxidante.

Há alguns grupos de compostos que contribuem para esta atividade como fenilpropanóis, flavonoides e ácidos fenólicos (CAO et al., 1997). As estruturas destes compostos determinam ações antioxidantes. Normalmente, quando há mais hidroxilas, maior é a atividade como agente doador de hidrogênio e elétrons. Conforme Rodrigues (2011), o extrato e frações da *P. sagittalis* apresentam compostos como alcaloides, cumarinas, flavonoides, taninos, saponinas e triterpenos.

Para determinar a atividade antioxidante da planta, há métodos baseados em captura de radicais e métodos baseados no poder da redução de metais e na quantificação dos produtos formados através da peroxidação de lipídeos (RUFINO et al., 2007). Um destes métodos de captura de radical é o DPPH.

O DPPH define-se por um radical livre estável em decorrência da localização de um elétron livre sobre toda a molécula. A localização deste elétron gera coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em etanol em cerca de $\lambda = 515$ nm. Quando é adicionado substrato, antioxidante ou uma espécie radicalar, na solução de DPPH, há doação de 1 átomo de hidrogênio que estabiliza a molécula de DPPH e gera um decréscimo na absorbância, definido pela mudança de cor violeta para amarela (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

3.5.1. Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA et al., 2007).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (MALACRIDA e MOTTA, 2005). Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais existem diferentes métodos de análise, entre eles, o método Follin-Ciocalteau (Follin e Ciocalteau, 1927) onde os compostos fenólicos são determinados em equivalência com ácido gálico (LUCAS, 2015).

Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (SOUSA et al., 2007).

3.6. Atividade antibacteriana e antifúngica

Os óleos voláteis são conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana. Esta atividade está relacionada à defesa das plantas ao ataque de patógenos, pois, desta forma, os compostos voláteis se transformam em uma barreira para a adaptação do microrganismo patogênico (SIMIONATTO, 2004).

Segundo Duarte (2006), não há consenso referente aos níveis de inibição aceitáveis de compostos de plantas quando estes são comparados com antibióticos

padrões. Entretanto, o autor assegura que extratos e óleos essenciais de plantas são eficientes no controle do crescimento de diversos microrganismos, como fungos filamentosos, leveduras e bactérias e o uso destes é indicado a humanos, animais, indústria de alimentos e outros.

Uma das infecções tratadas por óleos essenciais é a candidíase. A infecção, causado por fungos, ocorre com grande frequência e envolve um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas (PFALLER, 1989). Palombo e Semple (2001) ressaltam que cerca de 60% dos extratos e óleos essenciais de plantas possuem propriedades antifúngicas e 35% destes possuem propriedades antibacterianas.

Para avaliar a atividade antimicrobiana em produtos naturais há métodos variados, os quais são classificados em método de difusão em ágar, bioautográfico e diluição. São conhecidos como técnicas qualitativas os métodos de bioautografia e difusão porque apenas demonstram se há a presença ou ausência de substâncias com atividade antimicrobiana. Já os métodos de diluição são tidos como ensaios quantitativos (VALGAS et al., 2007).

No método de difusão e de diluição, há fatores que influem na suscetibilidade do método, carecendo de conhecimento de condições experimentais e padronização na execução dos métodos. Fatores como meios de cultura, disponibilidade de oxigênio, inóculo, pH e condições de incubação (OSTROSKY et al., 2008) devem ser ajustados para que o método forneça resultados confiáveis.

Para verificar a atividade antimicrobiana de um extrato pode-se, também, utilizar um método quantitativo que define a quantidade mínima de uma amostra necessária para inibir o crescimento de microrganismos, o qual é chamado de Concentração Inibitória Mínima (CIM). O processo se dá com a diluição seriada de uma amostra perante uma concentração constante de microrganismos (FALCÃO et al., 2012). Quadros et al. (2001) explica que a CIM representa a menor concentração de extrato que impede um visível crescimento de microrganismos durante o teste de sensibilidade através de diluição em ágar ou caldo sob condições conhecidas.

3.7. Análise sensorial olfatométrica

Análise sensorial consiste em um grupo de técnicas que apresentam resultados confiáveis com base em respostas obtidas por sentidos e estímulos. Montenegro et al. (2008) explica que este tipo de análise refere-se à medição e quantificação de produtos avaliados por sentidos humanos, estando, dentre as técnicas, a análise olfatométrica. Tal método de análise surgiu na década de 1960-1970, permitindo respostas sensoriais relacionadas aos produtos químicos voláteis (BAREN, 2008).

Vargas et al. (2013) relata que a análise é realizada com o auxílio de pessoas treinadas para avaliarem um produto, respondendo a perguntas específicas sobre os atributos aromáticos e sua intensidade, as respostas são preenchidas num formulário de avaliação organizado previamente. Tratando-se de compostos voláteis, a percepção pelo nariz humano varia conforme a extensão da liberação da matriz e de propriedades de odor dos compostos analisados (VAN RUTH, 2001).

Barroso (2011) utilizou da análise olfatométrica para descrever as propriedades aromáticas da *Achyrocline satureioides* (LAM), avaliando o desempenho qualitativo dos extratos, como o odor e o aspecto. Avaliadores experientes descreveram os extratos como resinosos, doce e com alto interesse para indústria de perfumaria.

Os resultados das análises olfatométricas são importantes para a indústria, porque a descoberta de fragrância nova é um alvo de constante interesse da indústria de perfumaria que é dependente do desenvolvimento de um novo produto (Vargas et al., 2013).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção e preparo da matéria prima

Para a realização das extrações foram utilizadas amostras das folhas e talos da planta *P. sagittalis* sem as flores, denominadas neste trabalho como partes aéreas, e amostras de flores, sendo ambas coletadas no município de Santo Antônio da Patrulha - RS no período de novembro de 2015 a março de 2016. Após a coleta, foi realizada a identificação da planta pelo botânico Pedro Ferreira, professor da Faculdade de Biociências da PUCRS. Logo, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Operações Unitárias (LOPE) da PUCRS, onde todos os experimentos foram realizados.

4.2. Extrações

Foram realizados dois procedimentos de extração para ambas as amostras (folhas com talos e flores): extração por arraste a vapor e extração com CO₂ supercrítico. Foram realizadas as extrações por arraste a vapor para a obtenção de óleo essencial a partir da planta *in natura*, ou seja, assim que coletada o material vegetal foi selecionado de modo a dividir em duas partes: as folhas com os talos e as flores. Já para a extração com CO₂ supercrítico, as flores e as folhas com talos foram secas em estufa com circulação de ar (Tecnal) à temperatura de 40°C durante 24 horas. Em relação às partes aéreas (folhas e talos), as mesmas foram moídas e posteriormente foram realizadas as extrações, enquanto que para as flores não foi necessária esta etapa, isto é, foram utilizadas a flores inteiras. O diâmetro médio da amostra moída foi calculado através de análise granulométrica realizada por meio de peneiramento em peneiras vibratórias (Bronzinox), com malhas variando de 0,00084

a 0,000105 m de diâmetro. O diâmetro médio superficial das partículas foi calculado utilizando diâmetro médio de Sauter (Equação 1).

$$\bar{d}_p = \frac{1}{\sum \frac{x_i}{d_{p_i}}} \quad (1)$$

onde \bar{d}_p é o diâmetro médio das partículas, x_i é a fração retida na peneira e d_{p_i} é o diâmetro da malha da peneira.

4.2.1. Extração por arraste a vapor

As extrações foram realizadas na unidade laboratorial de destilação por arraste a vapor para as flores do quitoco devido ao pouco material vegetal, e na unidade piloto de destilação por arraste a vapor para as folhas e talos. Ambos os equipamentos instalados no Laboratório de Operações Unitárias (LOPE), PUCRS.

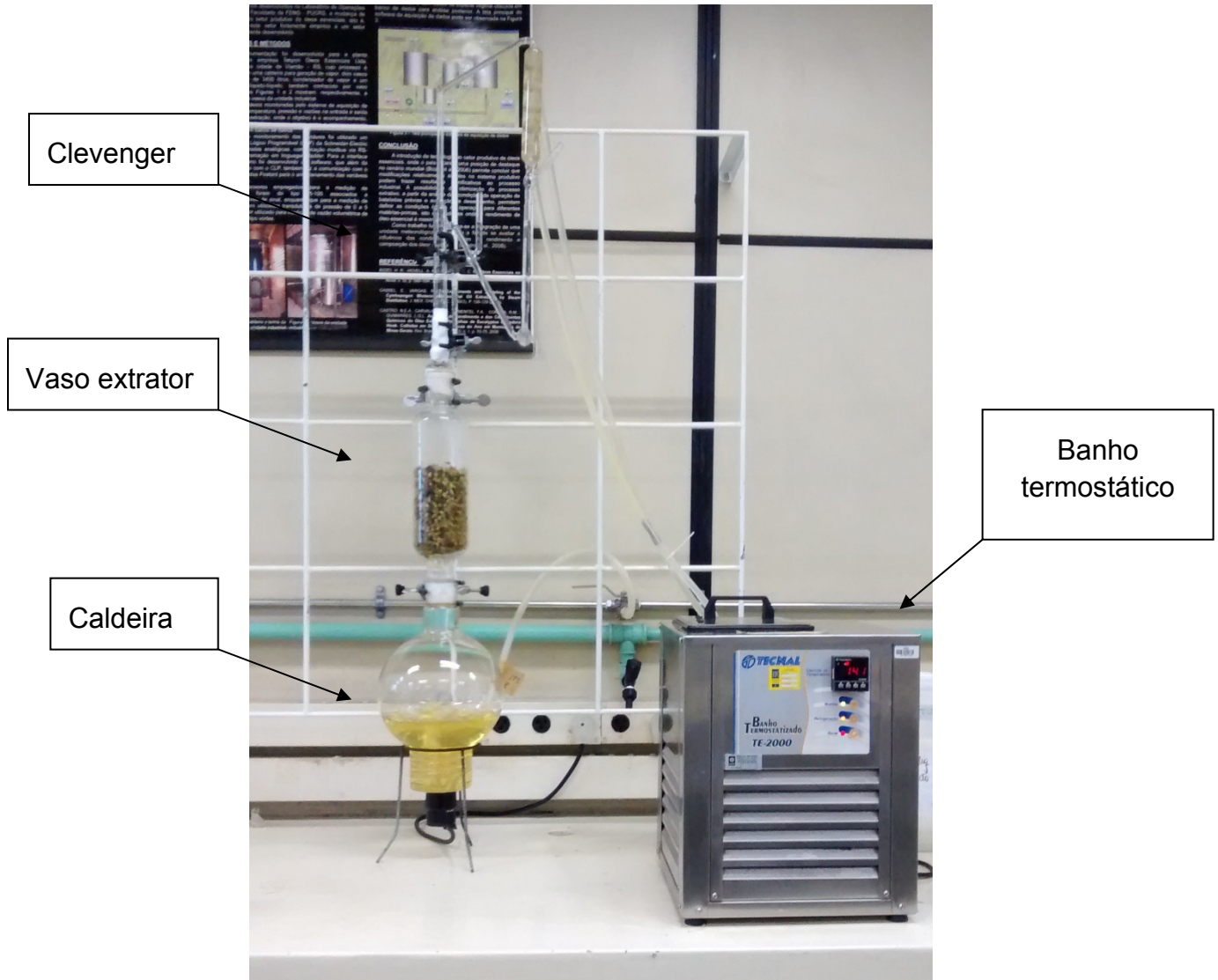
4.2.1.1 Arraste a vapor unidade laboratorial

O processo de extração dos óleos essenciais por arraste a vapor em escala laboratorial utilizado neste trabalho consiste em uma caldeira dotada de uma resistência elétrica e com volume de 4 L e um vaso extrator de capacidade de 2 L de volume. As etapas de condensação e separação das fases líquida são processadas em um clewenger. O resfriamento no condensador é realizado com o auxílio de um banho termostático com recirculação que mantém a água em torno de 2° C e o reciclo ocorre com o auxílio de uma bomba. O vapor permeia a matéria-prima e, nesse estado, a água tem maior capacidade de penetrar nos poros das folhas, solubilizando e arrastando os compostos voláteis presente nas partes aéreas do quitoco. A unidade de arraste a vapor laboratorial utilizada é apresentada na Figura 4.1 (STEFFENS, 2010).

As extrações foram realizadas em triplicatas para as flores de quitoco, utilizando 100g de massa *in natura* de material vegetal. Construíram-se as curvas de

rendimento do extrato *versus* tempo, determinando o volume de óleo essencial a cada 2,5 min. O processo foi finalizado com o esgotamento da amostra, isto é, em três intervalos seguidos não se observou variação no volume de extrato. O tempo médio das extrações foi de, aproximadamente, 15 minutos.

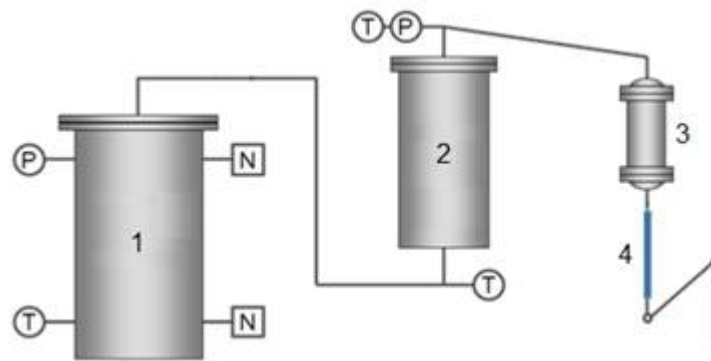
Figura 4.1 - Unidade Laboratorial de Extração por Arraste a Vapor.



4.2.1.2. Arraste a vapor em unidade piloto

O equipamento de extração por arraste a vapor em escala piloto utilizado neste estudo (Figura 4.2) consiste de uma caldeira equipada com uma resistência elétrica, para produzir o vapor, um vaso de extração de 10L equipado com sensores de pressão e temperatura e vazão, onde é submetido o material vegetal, um condensador multitubular para condensar a mistura óleo essencial água e um separador líquido-líquido que promove a formação de duas fases, fase óleo e fase água (BEDINOT et al., 2012).

Figura 4.2 - Unidade Piloto de Extração por Arraste a Vapor (1 – caldeira; 2 – vaso de extração; 3 – condensador; 4 – separador líquido-líquido).



Fonte: BEDINOT et al., 2012.

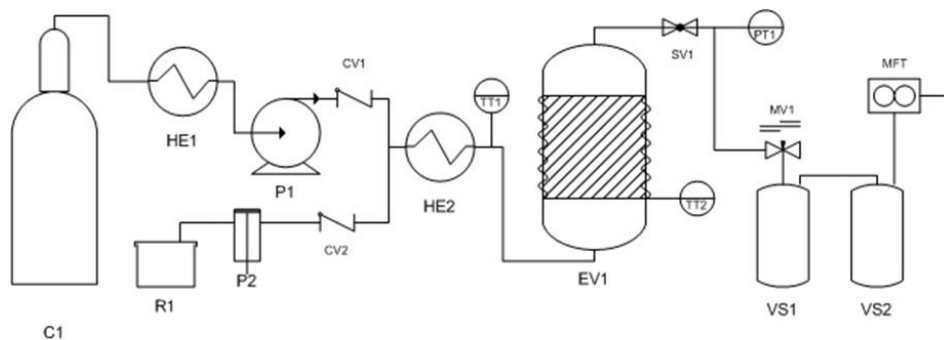
Nesta unidade se realizou em triplicata as extrações das folhas e talos do quitoco, utilizando 300 g de massa do material vegetal *in natura*. Construíram-se as curvas de rendimento do extrato *versus* tempo, determinando o volume de óleo essencial a cada 5 min. O processo foi finalizado com o esgotamento da amostra, isto é, em três intervalos seguidos não se observou variação no volume de extrato. O tempo médio das extrações foi de, aproximadamente, 40 minutos.

4.3. Extração supercrítica

As extrações com CO₂ supercrítico das folhas e talos e das flores de quitoco foram realizadas na unidade piloto de extração supercrítica instalada no LOPE. O fluxograma do equipamento é mostrado na Figura 4.3.

O processo de extração supercrítica se inicia com a pressurização do dióxido de carbono (CO_2) até suas condições de pressão e temperatura acima de seu ponto crítico, através de uma bomba de alta pressão e de um pré-aquecedor. O CO_2 líquido armazenado no cilindro (C1) é encaminhado para um trocador de calor (HE1), o qual impede a mudança de estado do solvente. Ainda líquido, o CO_2 é pressurizado em uma bomba de alta pressão (P1) e aquecido em um segundo trocador de calor (HE2), entrando na região supercrítica. Em seguida, o CO_2 em condições supercríticas percola o leito (EV1) onde está presente o material vegetal. Este, então, é parcialmente solubilizado e seus compostos são conduzidos até uma zona de baixa pressão (VS1 e VS2), na qual ocorre a expansão do fluido através de uma válvula (MV1), precipitando os compostos de interesse.

Figura 4.3 - Fluxograma da unidade piloto de extração supercrítica.



Fonte: SCOPEL, 2013.

As extrações foram realizadas com 65 g das amostras devidamente secas e trituradas, a uma temperatura constante de, aproximadamente, 40°C e foram submetidas a diferentes pressões de maneira sequencial: 90, 120, 150, 200, 250 e 300 bar, obtendo-se, assim, seis extratos de compostos voláteis e não voláteis para as folhas e talos do quitoco e seis extratos para as flores. A finalização do experimento ocorre com o esgotamento da amostra em determinada pressão, isto é, em três pesagens seguidas não se observou variação na massa de extrato.

4.4. Cálculo do rendimento e densidade do óleo

Para a obtenção da densidade de ambos os óleos essenciais, foi utilizada uma balança analítica de alta precisão e uma micropipeta de volume fixo, onde se pesou 0,1 mL de cada óleo e se realizou o cálculo da densidade através da Equação 2.

$$\text{Densidade} = \frac{m_{\text{óleo}}}{V_{\text{óleo}}} \quad (2)$$

O rendimento de óleo essencial é calculado relacionando a massa de óleo essencial e a massa de material vegetal. A partir da densidade foi possível realizar este cálculo, utilizando a Equação 3.

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{m_{\text{óleo}}}{m_{\text{planta}}} \right) \times 100 \quad (3)$$

Para os extratos obtidos através de extração supercrítica foi calculado o rendimento mássico, logo não necessita determinar as densidades dos extratos. Este rendimento foi calculado de acordo com a Equação 4.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{m_{\text{extraída}}}{m_{\text{planta}}} \times 100 \quad (4)$$

onde $m_{\text{extraída}}$ é a massa coletada no final do processo de extração; m_{planta} é a massa de planta adicionada inicialmente no vaso extrator.

4.5. Análise cromatográfica

Os óleos essenciais extraídos por arraste a vapor foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM) e os extratos

não voláteis obtidos por extração supercrítica foram analisados por cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.5.1. Cromatografia gasosa/espectrometria de massas

Os óleos essenciais obtidos a partir das folhas e talos e das flores do quitoco foram analisados por em cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (GC/EM). Para a remoção da água presente no óleo essencial foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e diluído em cicloexano na proporção 1:2 em volume.

O equipamento utilizado para a análise cromatográfica foi um CG marca Agilent Technologies, modelo 7890A. A coluna utilizada foi uma HP-5MS, 5% fenilmetilpolisiloxano, 30 m x 250 μm de diâmetro interno com espessura de filme de 0,25 μm . O gás de arraste utilizado foi Hélio ultra puro com fluxo de 0,8 mL/min, temperatura do injetor 250 °C, volume de injeção 1,0 μL , no modo split, razão de split 1:55. O método de análise iniciou a uma temperatura de 60 °C, que se manteve durante 08 min, aumentando 03 °C/min até 180 °C, mantendo esta temperatura por 1,0 min, aumentando a 20 °C/min até 250 °C e mantendo essa temperatura por 10 min. O espectrômetro de massas (EM) utilizado é da marca Agilent, modelo 5975C. A temperatura da interface entre o cromatógrafo e o EM foi de 230°C, a voltagem de ionização por impacto de elétrons foi 70 eV e a faixa de massa analisada foi de 40 a 450 u.

Os compostos foram identificados através dos seus índices de retenção, determinados a partir de uma série de n-alcenos (C8-C20), com aqueles reportados na literatura (ADAMS, 2007). A comparação dos espectros de massas também foi realizada para a confirmação da identidade dos compostos (LUCAS, 2015).

4.5.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos obtidos por extração supercrítica das amostras das folhas e talos e das flores foram analisados por CCD, a fim de observar, através dos tempos de retenção, a existência de alguma diferença significativa nas composições dos

extratos (FIANCO, 2014). Na Tabela 4.1 são identificadas as 12 amostras de extratos de quitoco obtidos por extração supercrítica que foram submetidas à análise por CCD.

Esta análise foi realizada em placas de sílica gel, usando como fase móvel o diclorometano PA, indicada para extratos não voláteis. A amostra foi aplicada a 1 cm da borda inferior com o auxílio de tubos capilares. Após a aplicação, as placas foram colocadas dentro de uma cuba de vidro fechada, onde permaneceram tempo suficiente até que a fase móvel atingisse a borda superior da placa.

As placas foram visualizadas com lanterna de luz UV (Boiton) nos comprimentos de onda de $\lambda = 264$ e $\lambda = 365$ nm. Após a visualização na luz, as placas cromatográficas foram reveladas com vanilina sulfúrica para avaliar a presença de compostos fenólicos e flavonoides (LUCAS, 2015). A vanilina sulfúrica foi preparada com 1 g de vanilina em 100 mL de etanol com 4 mL de ácido clorídrico e 5 mL de ácido sulfúrico. Um revelador específico para atividade antioxidante, solução de DPPH a 0,2% em metanol (VILA, 2006), também foi utilizado.

Tabela 4.1 - Amostras dos extratos de quitoco obtidos por extração supercrítica que foram submetidas à análise CCD.

Amostra	Parte da planta	Pressão da extração
1	Flores	90 bar
2	Flores	120 bar
3	Flores	150 bar
4	Flores	200 bar
5	Flores	250 bar
6	Flores	300 bar
7	Folhas e talos	90 bar
8	Folhas e talos	120 bar
9	Folhas e talos	150 bar
10	Folhas e talos	200 bar
11	Folhas e talos	250 bar
12	Folhas e talos	300 bar

4.5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extratos não voláteis obtidos por extração supercrítica, exceto os obtidos a 90 bar, por ser considerado volátil, foram analisados por CLAE, totalizando 10 amostras. Este método é indicado em decorrência das altas pressões em que os extratos são obtidos, pois, desta forma, pode-se identificar e quantificar o composto majoritário de cada amostra, sendo possível avaliar o perfil cromatográfico dos extratos (LUCAS, 2015). Ressalta-se que, neste estudo, foram utilizados padrões de flavonoides para identificar algum composto presente nos extratos supercríticos. Os padrões testados foram: rutina, canferol, quercitina, ácido ferúlico, ácido ursólico, hesperidina, ácido p-cumarínico e o ácido 5-cafeoilquínico. As amostras foram identificadas conforme a Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Amostras dos extratos de quitoco obtidas por extração supercrítica que foram submetidas por CLAE.

Amostra	Parte da planta	Pressão da extração
1	Flores	120 bar
2	Flores	150 bar
3	Flores	200 bar
4	Flores	250 bar
5	Flores	300 bar
6	Folhas e talos	120 bar
7	Folhas e talos	150 bar
8	Folhas e talos	200 bar
9	Folhas e talos	250 bar
10	Folhas e talos	300 bar

Logo, foi utilizado um sistema CLAE Agilent, modelo 1200 Series com detector UV, sendo empregada uma quantidade de, aproximadamente, 10 mg dos extratos supercríticos de quitoco. As amostras foram solubilizada em 1 mL de água Milli-Q e, seguidamente, foram filtrados em um filtro Millipore (0,22 μ , Whatman), sendo um volume de 15 μ L de cada amostra injetado no aparelho. A fase móvel utilizada constitui-se de água Milli-Q (Millipore) e acetonitrila, ambas com 2% de ácido acético glacial e um gradiente de 20-80% de água Milli-Q para acetonitrila, em

70 minutos com fluxo de 1 mL/min. A coluna utilizada foi um C18 (4,6 x 250 mm x 5 µm) e o comprimento de onda no detector foi de 345 nm (BENINCÁ, 2009).

4.6. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada através da metodologia de bioautografia indireta, que é uma variante do método de determinação de atividade antimicrobiana por difusão em ágar. É feito uma cromatografia em camada delgada (CCD) do óleo a ser testado e a placa cromatográfica é imersa em ágar. Após o tempo de incubação pode ser visto se o extrato testado possui ou não atividade antimicrobiana (FIANCO, 2014).

A cromatografia em camada delgada foi realizada em placas de sílica gel, onde foi aplicado o óleo essencial das folhas e talos do quitoco, empregando como fase móvel tolueno e acetato de etila (93:7 em volume). Sendo essa fase móvel indicada para óleos essenciais, após a fase de eluição, o restante da fase móvel foi evaporada em capela de exaustão de gases (FIANCO, 2014).

As bactérias testadas foram: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Estes foram padronizados pelo tubo 1 da escala de MacFarland4 ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL). Para cada 200 mL do meio de cultura Ágar Mueller Hinton, foram inoculados 5 mL da solução padronizada de cada microorganismo ($7,5 \times 10^6$ UFC/mL). O controle negativo foi feito com o solvente utilizado como fase móvel na CCD e o positivo com o antibiótico amoxicilina (LUCAS, 2011).

Após a preparação do inóculo, adicionou-se, em placas de Petry, uma camada base do meio de cultura inoculado, onde foram introduzidas as placas cromatográficas e, posteriormente, acrescentou-se uma segunda camada para formar uma fina película sobre a placa de CCD. As placas de Petry foram encubadas em estufa a 24 °C e 35% de umidade por 48 horas.

A atividade antifúngica do óleo essencial das folhas e talos do quitoco foi determinado pelo método da bioautografia indireta, o mesmo utilizado para a atividade antibacteriana. O fungo testado foi *Candida albicans*, utilizando o método de microdiluição segundo as recomendações do documento M27-A3 da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), CLSI (2008). A cepa foi cultivada em placas

de Petri estéreis com Agar Sabouraus acrescido de cloranfenicol à 32°C por 24 horas, logo a cepa foi suspensa em solução salina de 0,9% (m/v) e ajustadas até atingirem a escala número 0,5 de McFarland, corresponde à $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Posteriormente realizou-se a diluição 1:50 em solução salina e foi diluído 1:20 em caldo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 para obter-se o inóculo com concentração de 1×10^3 a 5×10^3 UFC por mililitro (FIANCO, 2014).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada utilizando a metodologia de diluição em microplaca (microdiluição). As concentrações utilizadas para o ensaio da cepa de *Staphylococcus aureus* foram obtidas através de diluições seriadas nas microplacas estéreis a partir de 200 µL caldo Mueller Hinton, adicionando-se após 100 µL das suspensões dos inóculos da cepa de *Staphylococcus aureus* solubilizada em Tween 20 a 10% em água, obtendo-se valores de 450 µg/mL, 225 µg/mL, 112,5 µg/mL, 56,25 µg/mL, 28,125 µg/mL, 14,06 µg/mL, 7,03 µg/mL e 3,51 µg/mL do óleo essencial das folhas e talos do quitoco. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C e, após o tempo de incubação necessário, a leitura macroscópica da placa foi realizada através de análise visual, verificando a formação ou não de aglomerados de células no fundo das cavidades da placa. A CIM foi determinada através da menor concentração capaz de inibir o desenvolvimento e o crescimento visível das cepas. A CIM é a menor concentração de amostra que inibe o crescimento do microrganismo testado (PEREIRA, 2010; STAVRI et al., 2009).

Para a determinação da CIM do óleo das folhas e talos do quitoco para a cepa do fungo *Candida albicans* foram realizadas diluições seriadas nas microplacas estéreis a partir de 200 µL do caldo Sabouraud, adicionando-se após 100 µL das suspensões dos inóculos da cepa de *Candida albicans*, utilizadas concentrações de 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL e 1,25 µg/mL do óleo essencial das folhas e talos do quitoco. As microplacas foram incubadas por 48 horas a 27°C e, após o tempo de incubação necessário, a leitura macroscópica da placa foi realizada através de análise visual, verificando a formação ou não de aglomerados de células no fundo das cavidades da placa.

4.7. Determinação de compostos fenólicos totais

Para a determinação da concentração de compostos fenólicos totais foi escolhido o método de Follin-Ciocalteau (FOLLIN e CIOCALTEAU, 1927 apud LUCAS, 2015), tendo como padrão o ácido gálico. Uma massa (0,02g) de cada extrato foi diluída em 10 mL de metanol 99,5%. Transferiu-se 1 mL dessa amostra para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água deionizada. Foi adicionado 0,4 mL desta solução em um tubo de fundo cônico, 0,6 mL de uma solução de metanol, 01 mL do reagente Folin-Ciocalteau (Polipur) 1N e logo se realizou a agitação. Adicionou-se 1 mL de uma solução de carbonato de sódio 17% e agitou-se novamente. O tubo foi completado com água destilada, até o volume final de 10 mL e, novamente, foi agitado.

O teste em branco foi realizado da mesma forma, porém, no lugar da amostra adicionou-se 0,4 mL da solução de metanol, deixando os tubos de ensaio reservados por 90 minutos para repousar. A quantificação foi realizada comparando as leituras em comprimento de onda de $\lambda = 725$ nm das amostras com uma curva de calibração de ácido gálico abrangendo as concentrações 0,00 a 0,07 mg/ML (LUCAS, 2015).

4.8. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos de *P. sagitalis* obtidos por extração supercrítica foi determinada pelo método da captura do radical livre DPPH, proposto por Brand-Williams et al. (1995) e modificado por Rufino et al. (2007). Este método é consiste na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por compostos antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a $\lambda = 515$ nm de comprimento de onda.

Primeiramente, foram preparadas soluções de extratos em metanol com diferentes concentrações, sendo 100%, 50% e 25% da amostra, assim como uma solução metanólica de DPPH 0,06 M. Protegidas da luz e em ambiente escuro, alíquotas das soluções foram colocadas em cubetas de vidro, juntamente com a solução de DPPH. Como branco, utilizou-se o metanol.

Através de um espectrofotômetro modelo SP-220 (Bioespectro em comprimento de onda de $\lambda = 515$ nm), as leituras das absorvâncias foram realizadas para cada concentração até que não houvesse mais variação do valor da absorvância, para a posterior construção da curva de absorvância *versus* tempo, a qual permite a verificação da existência de ação oxidante das amostras (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). A partir destes dados, foi possível determinar o IC₅₀, expresso em grama de extrato por grama de DPPH, que corresponde à concentração de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH. Os valores são dados em g de extrato por g de DPPH. Quanto menor for este valor, maior será o consumo de DPPH e, conseqüentemente, maior será sua atividade antioxidante (SOUZA et al., 2007).

4.9. Análise sensorial – olfatométrica

A determinação do potencial aromático dos extratos voláteis e dos óleos essenciais do quitoco foi realizado por um grupo de pesquisadores coordenado pelo Dr. Arnaldo Bandoni, da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de Buenos Aires, na Argentina. Foram, então, avaliados os óleos essenciais das folhas, talos e flores extraídos por arraste a vapor e, também, os extratos voláteis obtidos pela extração supercrítica realizada a 90 bar. A tabela 4.3 apresenta as amostras nomeadas conforme encaminhadas à Universidade de Buenos Aires, Argentina.

Tabela 4.3 – Extratos voláteis submetidos à análise sensorial olfatométrica.

Amostra	Parte da Planta	Método
1	Flores	Supercrítico 90 bar
2	Folhas e talos	Supercrítico 90 bar
3	Flores	Arraste a vapor
4	Folhas e talos	Arraste a vapor

Para a realização desta análise foram utilizados avaliadores experientes em análise olfatométrica que indicaram os atributos de cada amostra, sua intensidade e aspecto.

5. RESULTADOS

5.1 Rendimento

5.1.1. Extração das folhas e talos da planta

A partir da extração por arraste a vapor das folhas e talos do quitoco obteve-se um óleo essencial com tonalidade amarela e forte aroma característico da planta. O rendimento foi de $0,24 \pm 0,01\%$ m/m. Simionatto (2004) também obteve óleo essencial de quitoco, porém utilizando o processo de hidrodestilação aplicado às partes aéreas do quitoco coletado em dois pontos: Santana do Livramento e Fortaleza dos Vales. Os resultados obtidos foram 0,24% e 0,19%, respectivamente. Arriga et al. (2006) também realizaram a hidrodestilação de uma amostra de quitoco fresco cultivado em Fortaleza (CE), obtendo 0,20% de rendimento de óleo essencial. Logo, pode-se afirmar que o rendimento encontrado neste trabalho não difere da literatura, mesmo utilizando métodos de extração diferente em relação aos estudos citados.

São apresentadas na Figura 5.1 a curva de extração, rendimento do extrato *versus* tempo realizadas por arraste a vapor em escala piloto das folhas e talos do quitoco.

A partir da extração com CO₂ supercrítico das folhas e talos obteve-se um extrato volátil com tonalidade amarelada e sólido. Com o aumento da pressão da extração o extrato não volátil obtido apresentava escurecimento da tonalidade até verde escuro na pressão de 300 bar. O rendimento total obtido a partir de extração supercrítica das folhas e talos do quitoco 3,83% para partículas com $2,53 \times 10^{-4}$ m de diâmetro médio. A Tabela 5.1 apresenta os rendimentos das seis pressões utilizadas

na extração das folhas e talos do quitoco, podendo observar que o rendimento diminui conforme a pressão aumenta.

Figura 5.1 – Curva de rendimento do extrato por arraste a vapor *versus* tempo do óleo das folhas e talos do quitoco.

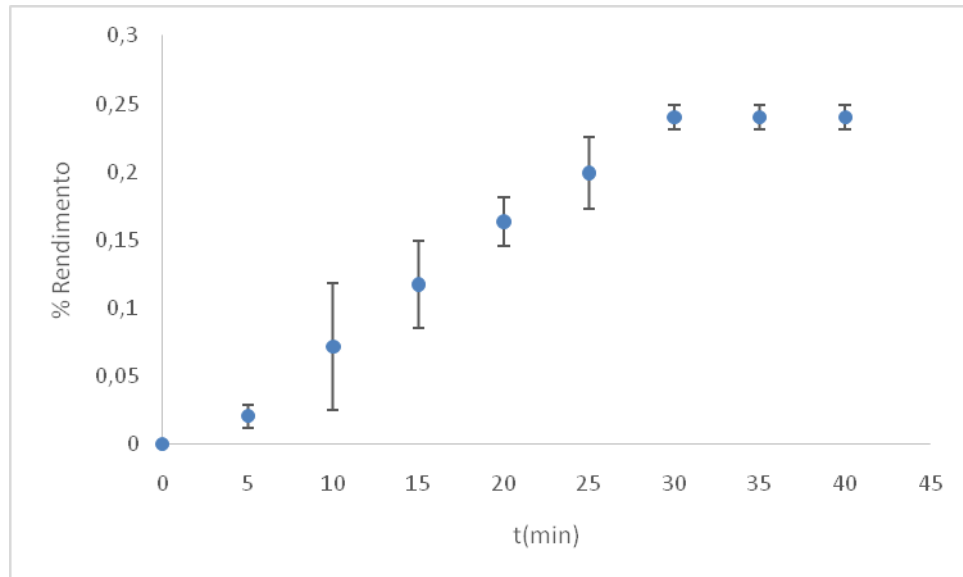


Tabela 5.1 – Rendimentos dos extratos obtidos por extração supercrítica das folhas e talos do quitoco à 40° C de temperatura.

Pressão (bar)	% rend (g/g)	t(min)
90	2,332	150
120	0,447	90
150	0,393	70
200	0,344	80
250	0,253	80
300	0,111	60

A partir dos dados experimentais da extração é possível realizar a modelagem matemática dos mesmos utilizando modelos de transferência de massas (VARGAS et al., 2013).

Através de uma revisão bibliográfica realizada neste trabalho não se encontrou dados de extração supercrítica de extratos voláteis e não voláteis das folhas e talos do quitoco, justificando assim a realização dos experimentos.

5.1.2. Extração das flores

A extração por arraste a vapor das flores do quitoco produziu um óleo essencial com tonalidade amarelada. Para as flores, obteve-se um rendimento maior comparado às folhas e talos da planta, chegando a $0,36 \pm 0,00\%$ em massa. Não foi encontrado na literatura trabalhos sobre a extração de óleo essencial das flores do quitoco, fato que impossibilita a comparação dos resultados obtidos com trabalhos realizados por outros pesquisadores, conseqüentemente, instigou a realização do trabalho, pois no Rio Grande do Sul é comum encontrar mel produzido a partir da flor desta planta.

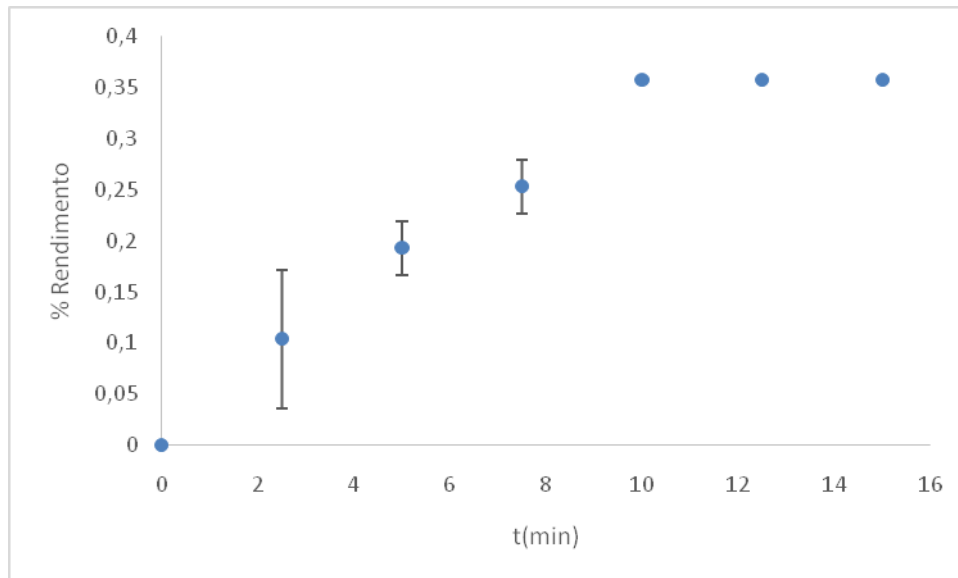
É apresentada na Figura 5.2 a curva de rendimento do extrato *versus* tempo para o óleo essencial das flores do quitoco obtido por arraste a vapor em escala laboratorial.

A partir da extração com CO₂ supercrítico das flores do quitoco obteve-se um extrato volátil com tonalidade amarelada e sólido, com o aumento da pressão da extração o extrato não volátil obtido apresentava escurecimento da tonalidade até verde escuro na pressão de 300 bar. O rendimento total obtido por extração supercrítica das flores do quitoco apresentou 7,59%, pode se observar que esse valor é eminentemente superior ao rendimento comparado a extração das folhas e talos. O mesmo acontece com a extração por arraste a vapor desta planta. A Tabela 5.2 apresenta os rendimentos das seis pressões utilizadas na extração supercrítica das flores do quitoco.

Tabela 5.2 – Rendimentos dos extratos obtidos por extração supercrítica das flores do quitoco.

Pressão (bar)	% rend (g/g)	t(min)
90	4,238	150
120	1,195	70
150	0,671	60
200	0,599	80
250	0,255	70
300	0,827	60

Figura 5.2 – Curva de rendimento do extrato por arraste a vapor *versus* tempo do óleo das flores do quitoco.



Segundo os resultados experimentais para 300 bar, obteve-se o maior rendimento de extratos de quitoco usando CO₂ supercrítico como solvente. Isso se justifica pelo fato que nessa condição (maior pressão) o solvente apresenta a maior densidade, quando comparado às demais condições estudadas.

5.2. Composição dos óleos

5.2.1. Composição química – folhas e talos

Os óleos essenciais obtidos por extração a arraste a vapor foram analisados em triplicata por cromatografia gasosa acoplada/espectrometria de massas, sendo identificados 46 compostos representando, aproximadamente, 90% da composição da amostra. Na Tabela 5.3 estão representados os compostos identificados, a composição do óleo essencial de quitoco e índice de retenção de cada componente.

Tabela 5.3 - Composição do óleo essencial das folhas e talos do quitoco extraído por arraste a vapor determinada por CG/EM.

Composição	%Area	IR
α - tujeno	0,36	926
α -pineno	7,63	933
Sabineno	3,74	973
β -pineno	5,48	977
3-octenol	0,48	983
Mirceno	0,56	993
Terpineno	0,23	1018
O-cimeno	1,00	1028
1,8 cineol	44,76	1036
E β -ocimeno	0,31	1050
γ -terpineno	0,41	1060
cis-hidrato sabineno	0,64	1069
trans- hidrato sabineno	0,25	1099
Linalool	0,32	1102
α -camfolenal	0,41	1127
trans-pinocarveol	0,22	1139
Pinocarvono	0,96	1164
δ -terpineol	1,18	1169
4 - terpinenol	0,71	1178
α -terpineol	0,81	1192
Mirtenal	0,18	1196
Mirtenol	0,15	1197
trans - carveol	0,09	1221
formato isobornilo	0,14	1227
Acetato bornil	0,55	1286
Acetato mirtenil	0,2	1327
ciclosativeno	0,61	1367
α -copaene	3,24	1376
E-cariofileno	1,32	1419
2,5 dimethoxi-para-cimeno	1,06	1426
β -copaeno	0,16	1429
α -humuleno	0,35	1454
alo-aromadendreno	1,31	1461
g-muuroleno	0,33	1477
Aristolocheno	0,53	1485
valenceno	0,50	1493
Biciclogemacremo	0,43	1495
α -muuroleno	0,56	1501
γ -cadineno	0,58	1515
δ -cadineno	1,06	1525

α –calacoreno	0,24	1544
espatulenol	1,63	1580
oxido cariofileno	2,24	1584
Viridiflorol	0,23	1604
α -epi-muurolol	0,58	1645
intermedeol	1,2	1660

Os compostos majoritários identificados foram 1,8 cineol, representando 44,7% da composição da amostra, α -pineno, representando 7,63%, e β -pineno com área de 5,48%.

Arriga et al. (2006), analisou o óleo essencial de *P. sagittalis* obtido por hidrodestilação e identificou 24 compostos na amostra, totalizando 93,1% da composição química do óleo. Os compostos majoritários identificados por Arriga et al. (2006) foram δ –cadinene, representando 25,3% da composição da amostra e 1,8 cineol com 17,3% de área, observando-se que este último é o mesmo composto majoritário identificado neste trabalho. Em função da composição do óleo essencial ser dependente de fatores como tipo de solo, temperatura, disponibilidade de água, exposição ao sol (CZEPAK e BANDONI, 2008), diferenças nas composições são comumente encontradas para os óleos essenciais.

5.2.2. Composição química – flores

Os óleos essenciais das flores do quitoco obtidos a partir de extração por arraste a vapor foram analisados em CG/EM, sendo identificados 45 compostos, representando 85% da composição da amostra. A Tabela 5.4 apresenta os compostos identificados, a composição do óleo essencial e os respectivos índices de retenção.

O composto majoritário identificado foi 1,8 cineol, o mesmo encontrado nas folhas e talos do quitoco, porém, em menor concentração, representando 33,6% da composição da amostra; o α -pineno e sabineno também foram identificados e representam um percentual na composição do óleo, 6,56% e 5,23%, respectivamente. Pode-se observar que os compostos presentes sugerem que os

óleos essenciais não se diferem em termo de compostos e em termos de composição.

Tabela 5.4 – Composição do óleo essencial das flores do quitoco extraído por arraste a vapor determinada por CG/EM.

Composição	%Area	IR
α –pineno	6,56	933
Sabineno	5,23	974
β –pineno	5,01	977
3-octenol	0,61	982
Mirceno	0,98	993
α –terpineno	0,29	1018
p-cimeno	0,71	1027
1,8 cineol	33,6	1036
E- β –ocimeno	0,17	1051
γ –terpineno	0,56	1060
Linalool	1,2	1102
cis-p-menth-2-em-1-ol	0,12	1122
Heptanoato de alilo	2,34	1164
4-terpineol	4,48	1170
α –terpineol	2,9	1179
Fenil acetato de etilo 2	0,14	1213
Acetato de isoborilo	0,45	1259
α –copaeno	0,99	1286
β –elemeno	0,71	1376
Sesquitiujeno	0,23	1392
α -cis-bergamoteno	0,37	1407
E-cariofileno	2,78	1416
2,5-dimetoxi-p-cimeno	1,69	1419
α -trans-bergamoteno	0,27	1426
α –humuleno	2,04	1437
Sesquisabineno	0,88	1454
9-epi-E-cariofileno	0,27	1458
γ –gurjuneno	0,2	1461
γ –curcumeno	0,13	1475
Aristolocheno	1,37	1481
Valenceno	0,64	1485
Biclogermacreno	0,64	1493
α –muuroleno	0,21	1497
germacreme A	0,96	1501
β -bisaboleno	0,34	1506
δ -cadineno	0,64	1510

eremofila cetona	0,3	1525
Espathulenol	0,71	1552
Óxido de cariofileno	1,24	1579
Epoxi humuleno II	0,33	1584
α -epi-muurolol	0,45	1610
β -eudesmol	0,12	1644
Intermedeol	1,5	1659

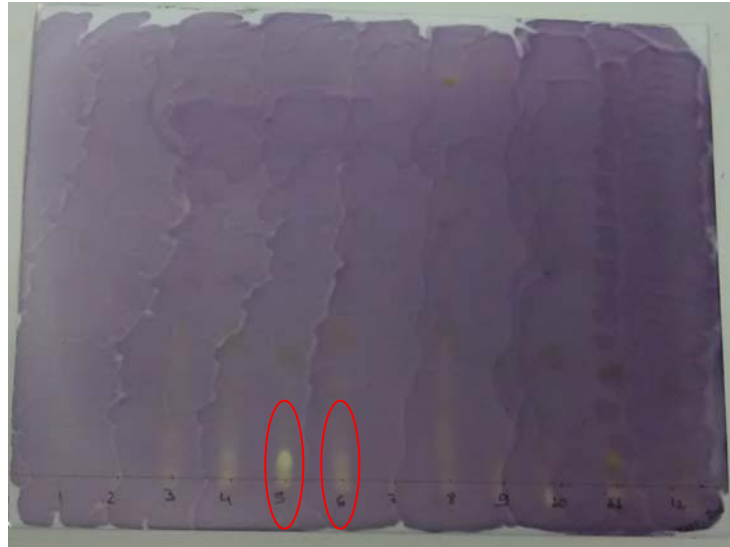
5.3. Cromatografia em camada delgada (CCD)

A utilização desta técnica analítica foi importante para avaliar qualitativamente a atividade antioxidante dos extratos voláteis e não voláteis obtidos por extração com CO₂ supercrítico através do revelador DPPH (2,2 – difenil – 1 picril – hidrazil). A vantagem do método é a rapidez e a possibilidade de identificar, entre diferentes extratos, aqueles que têm potencial antioxidante. A placa cromatográfica, adquire uma coloração roxa e os compostos com atividade antioxidante apresentam coloração amarelada.

Pode-se verificar na Figura 5.3 que somente as amostras 5 e 6 (extrato supercrítico de flores obtidos à 250 bar e 300 bar à 40°C) apresentaram uma pequena banda amarela na parte de baixo da placa. Segundo Lucas (2015), os compostos que se encontram próximos à linha de base são substâncias que não foram eluídas pelo solvente, isto é, compostos pouco solúveis na fase móvel, o diclorometano. Neste caso, é possível dizer que são compostos polares, provavelmente compostos fenólicos, visto que são compostos com reconhecida atividade antioxidante.

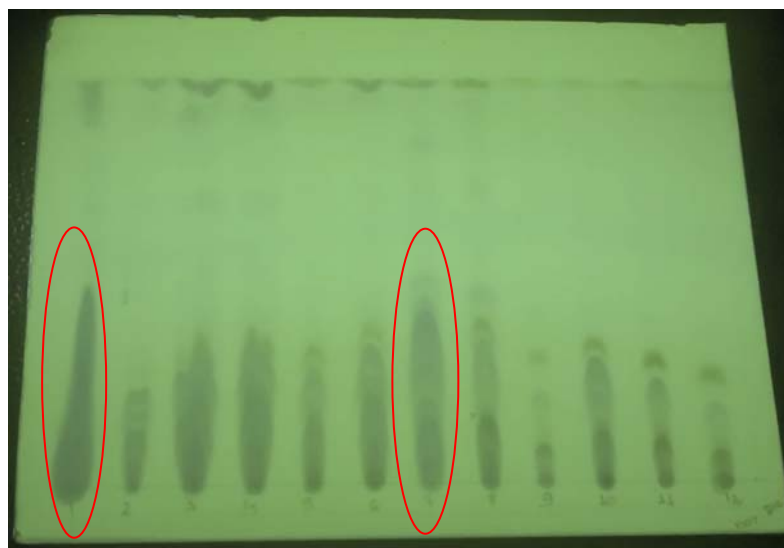
Outro revelador utilizado foi a vanilina sulfúrica para avaliar a presença de compostos fenólicos e flavonoides, na qual pode-se observar a separação dos compostos conforme o perfil cromatográfico.

Figura 5.3 – CCD dos extratos obtidos por extração supercrítica dos extratos (Tabela 4.1) das folhas e talos e das flores do quitoco revelado com DPPH.



Através da Figura 5.4 constatou-se que os extratos 1 e 7 são compostos voláteis em função do perfil cromatográfico (banda extensa e com coloração roxa) (LUCAS, 2015). Definiu-se, então, que essas duas amostras não seriam analisadas no CLAE, pois os óleos essenciais da planta já haviam sido analisados por CG/EM. Logo, a partir da CCD, decidiu-se realizar cromatografia líquida de alta eficiência nas demais amostras.

Figura 5.4 – CCD dos extratos obtidos por extração supercrítica dos extratos (Tabela 4.1) das folhas e talos e das flores do quitoco revelado com vanilina.



5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Todos os extratos não voláteis obtidos na extração supercrítica foram analisados por CLAE. O objetivo dessa análise nesse trabalho foi avaliar e comparar o perfil cromatográfico dos extratos com os padrões de compostos fenólicos e flavonoides disponível no LOPE, visando identificar a presença desses compostos nos extratos. Porém, nenhum dos padrões utilizados constava nos extratos das folhas e talos e das flores do quitoco.

Os perfis cromatográficos dos dez extratos de quitoco se mostraram bastante semelhantes, apresentando poucos picos e compostos majoritários que são praticamente comuns a todos as amostras, como por exemplo, o composto presente no tempo de 27 minutos. As Figuras 5.5 e 5.6 apresentam cromatogramas dos extrato das flores do quitoco e do extrato das folhas e talos do quitoco, respectivamente.

Figura 5.5 – CLAE do extrato das flores do quitoco obtido por extração supercrítica a 120 bar de pressão.

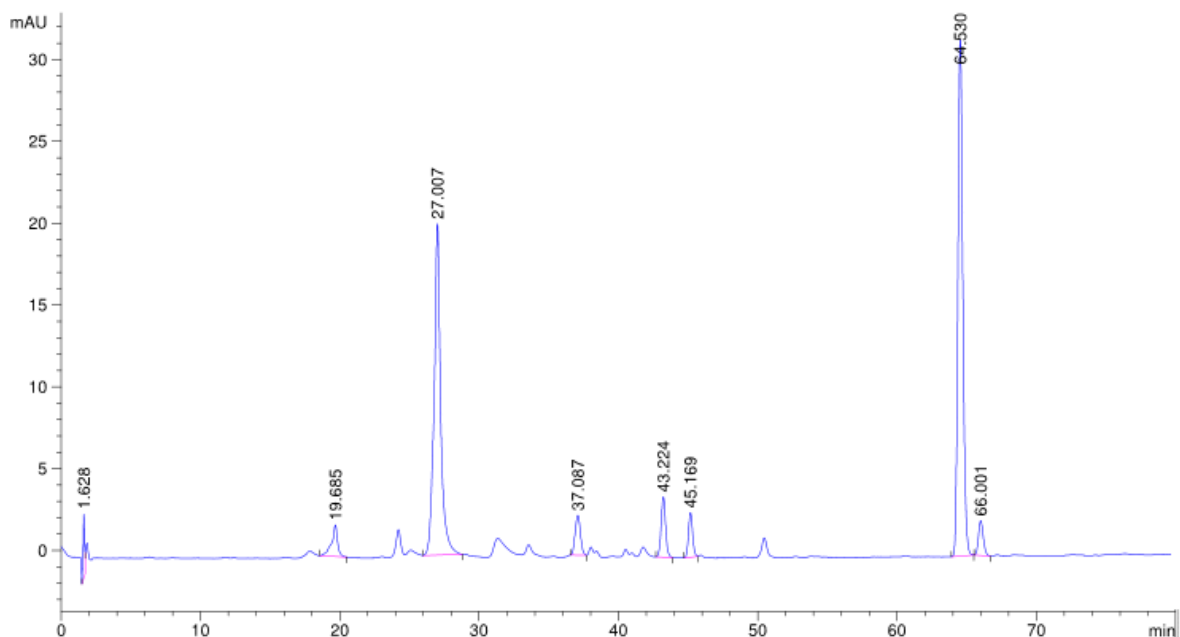


Figura 5.6 – CLAE do extrato das folhas e talos do quitoco obtido por extração supercrítica a 120 bar de pressão.

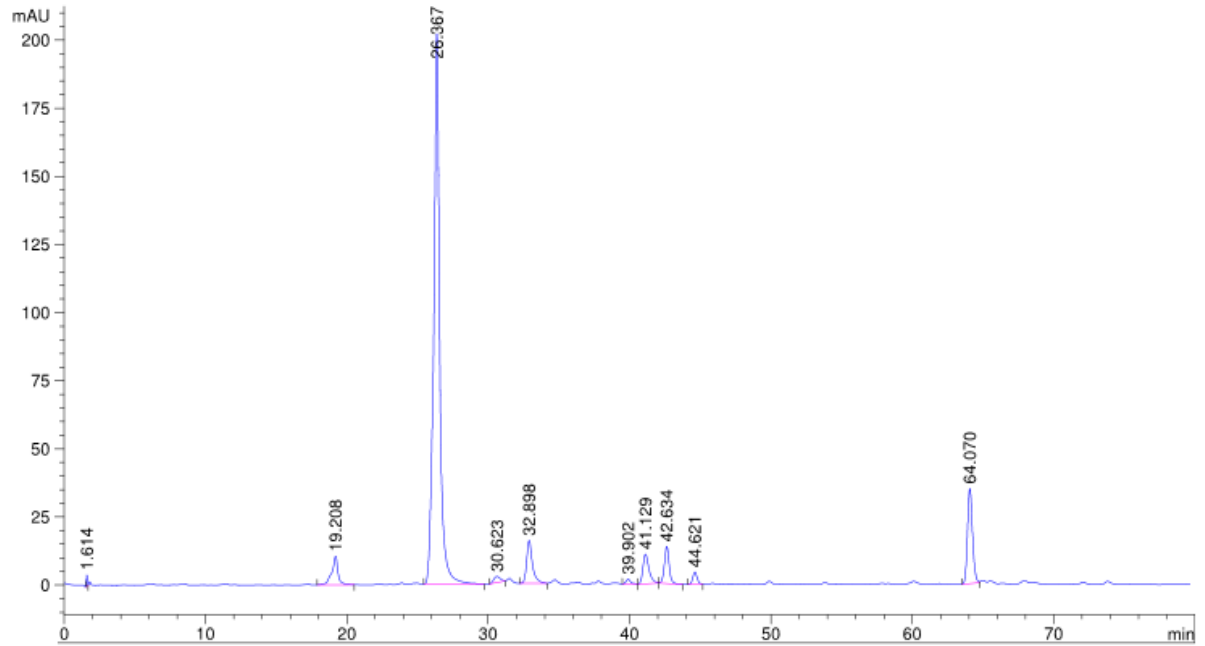


Figura 5.7 – CLAE do padrão rutina e canferol.

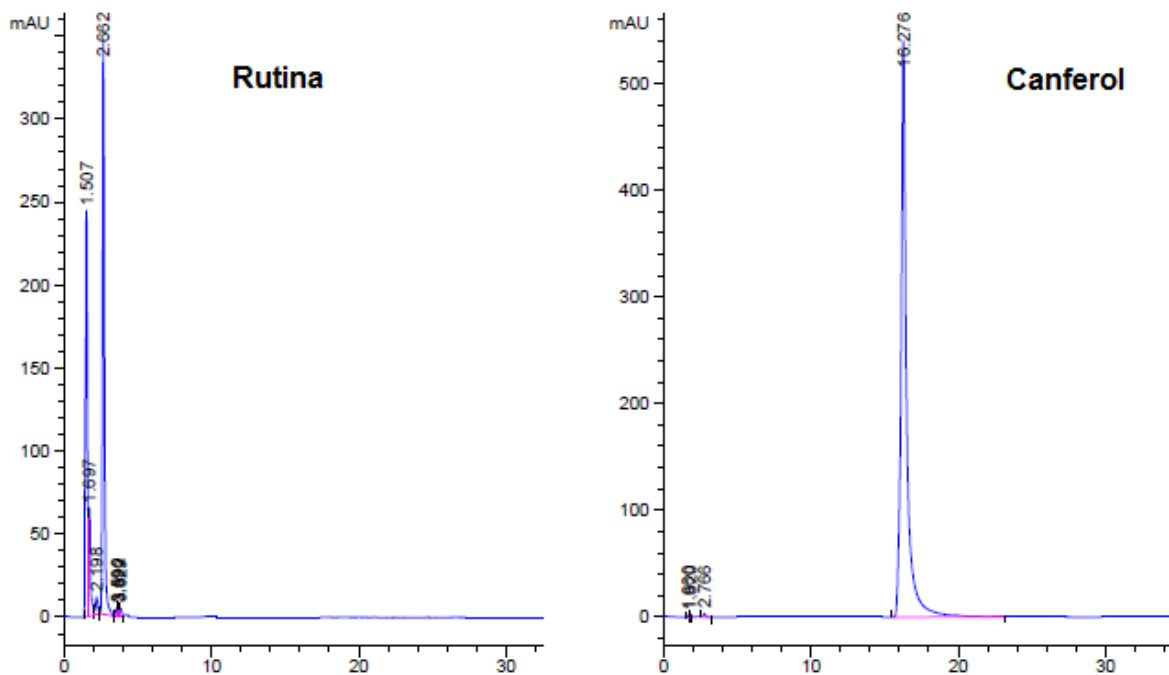


Figura 5.8 – CLAE do padrão quercitina e ácido ferúlico.

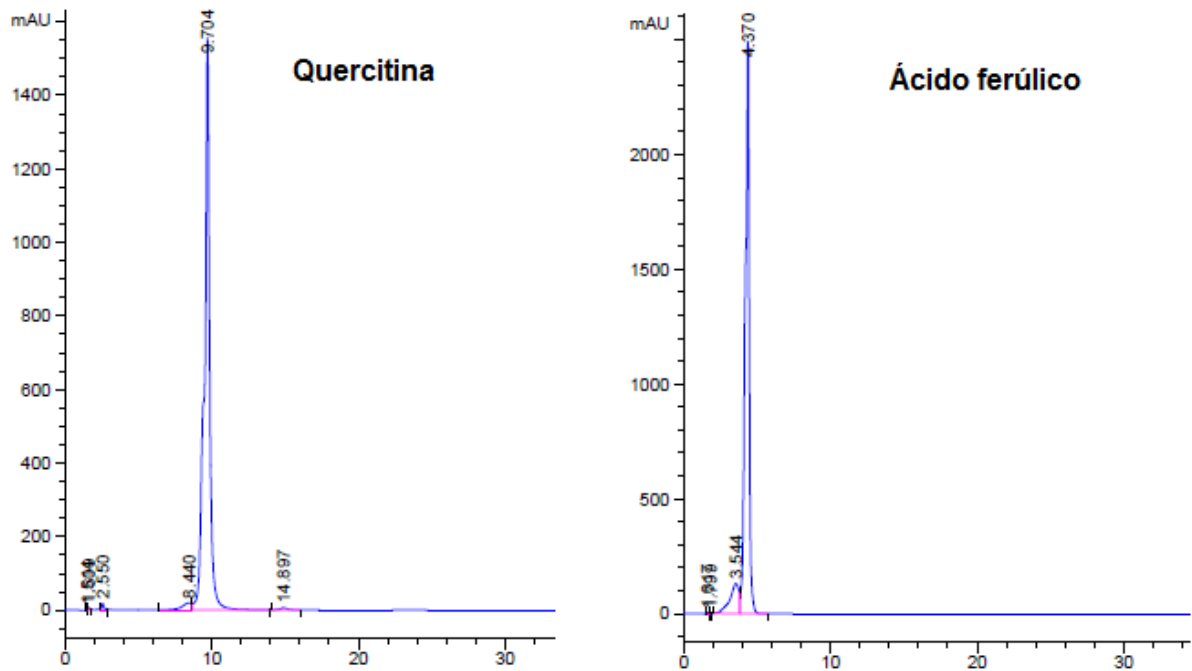


Figura 5.9 – CLAE do padrão ácido ursólico e hesperidina.

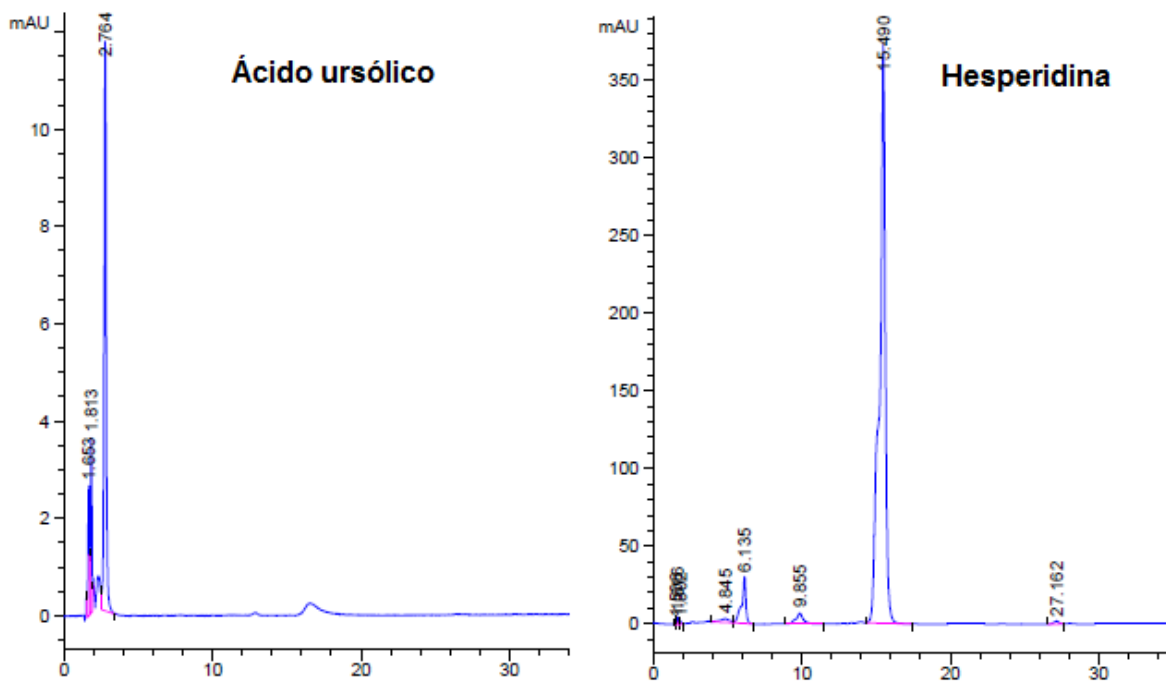
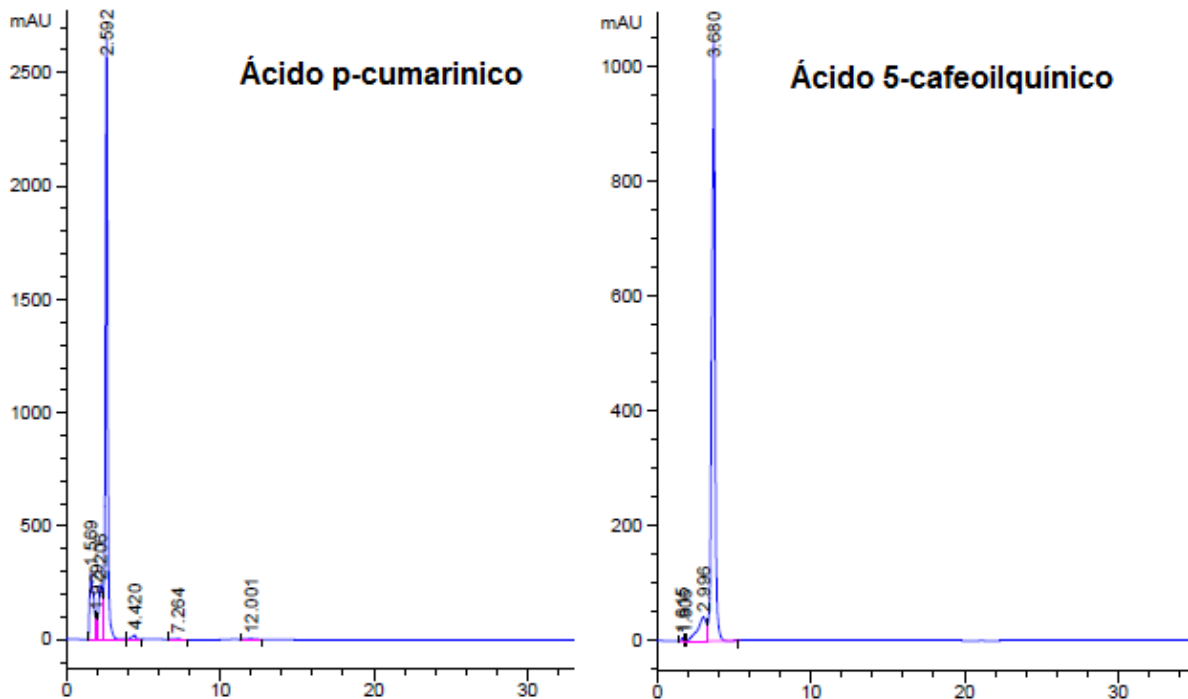


Figura 5.10 – CLAE do padrão ácido p-cumarínico e ácido 5-cafeoilquínico.



Os padrões testados foram: rutina, canferol, quercitina, ácido ferúlico, ácido ursólico, hesperidina, ácido p-cumarínico e o ácido 5-cafeoilquínico. Este último foi testado, pois de acordo com Martino et al. (1984), que realizou extração metanólica através de maceração de partes aéreas de quitoco, verificou a presença de ácido isoclorogênico em plantas colhidas no Uruguai. As Figuras 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10 apresentam os CLAE dos respectivos padrões testados, podendo assim verificar que nenhum padrão apresentou tempo de retenção igual ou similar às amostras testadas nesse método. Logo, os extratos de quitoco extraídos nas condições deste trabalho ($T=40^{\circ}\text{C}$; $P=90,120,150, 200, 250$ e 300 bar) não apresentaram nenhum tempo de retenção equivalente aos padrões testados. O fato de não ter sido utilizado cossolvente nas extrações pode ter influenciado para a não obtenção de extratos contendo flavonoides, pois sabe-se que pressões mais altas e o uso do cossolvente aumentam o rendimento de compostos polares, dentre eles os compostos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos, entre outros (Cassel et al., 2008).

5.5. Atividade antibacteriana

Em função da pequena quantidade de óleo essencial das flores obtida na unidade laboratorial de arraste a vapor e da utilização do mesmo nas demais análises (CG/EM e olfatométrica), não foi possível realizar os ensaios de atividade antimicrobiana para este extrato. Somente foram realizados testes antimicrobianos com o óleo essencial das folhas e talos extraído por arraste a vapor.

A atividade antibacteriana foi avaliada, primeiramente, pelo método qualitativo bioautografia, para verificar se o óleo essencial apresentava ou não ação antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados indicaram que o óleo essencial de quitoco apresentou atividade somente frente à bactéria *Staphylococcus aureus* (Figura 5.11). A partir da Figura 5.11 pode-se verificar que a análise apresentou uma pequena banda de inibição do crescimento da cepa de *Staphylococcus aureus*. Deve ser desconsiderada uma pequena banda na parte superior da segunda placa de CCD da Figura 5.11, pois ocorreu a formação de uma bolha de ar no Agar quando se realizou o teste.

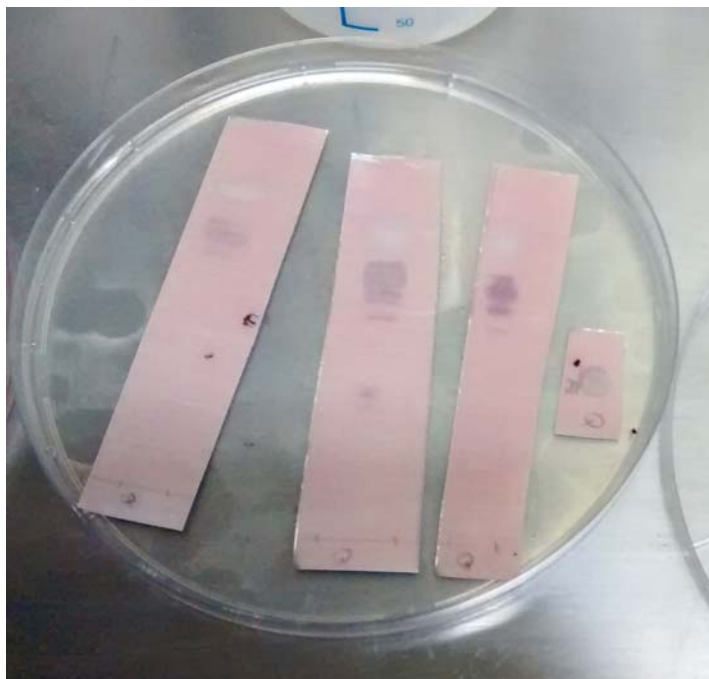
Em relação à atividade frente a bactéria *Escherichia coli* esta não foi observada (Figura 5.12). Resultado equivalente havia sido observado por Simionatto et al (2007).

De posse dos resultados da bioautografia, realizou-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial de quitoco somente para a bactéria *Staphylococcus aureus*. O óleo com concentração de 450 µL/mL (maior concentração testada) não apresentou inibição no crescimento da cepa de *Staphylococcus aureus*, assim como os resultados obtidos por Perez (1994) em relação à atividade antibacteriana dos extratos de quitoco.

Figura 5.11 – Resultado da avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas e talos de quitoco frente *Staphylococcus aureus* (as regiões claras são as zonas em que houve inibição de crescimento).



Figura 5.12 – Resultado da avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas e talos frente *Escherichia coli*.



5.6. Atividade antifúngica

Assim como para a atividade antibacteriana, foi utilizado o método de bioautografia para avaliar a ação antifúngica do óleo essencial das folhas e talos da *P. sagittalis*, para verificar se a amostra tinha ou não atividade frente ao fungo, *Candida albicans*. Pode-se observar na Figura 5.13 que o óleo essencial de quitoco apresentou uma banda significativa de ação antifúngica contra a cepa de *Candida albicans*.

Figura 5.13 – Resultado avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial das folhas e talos frente *Candida albicans*.



De posse dos resultados da bioautografia, realizou-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) exigida para que o óleo essencial de quitoco apresenta atividade antimicrobiana frente ao fungo *Candida albicans*. O óleo com concentração de 160 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (maior concentração testada) não apresentou inibição no crescimento da cepa de *Candida albicans*. Mesmo verificando que nessa concentração testada não apresentou resultado, foi possível observar qualitativamente atividade antifúngica no teste de bioautografia. Em função da

inexistência de literatura sobre a atividade antifúngica do óleo de quitoco frente à *Candida albicans*, observa-se a necessidade de realizar ensaios com concentrações maiores para determinar a CIM do óleo essencial do quitoco.

5.7. Atividade antioxidante

Na Tabela 5.5 são apresentados os valores da atividade antioxidante dos extratos obtidos por extração supercrítica das amostras de folhas e talos e das flores do quitoco. Pode se observar que as amostras 5 e 6 apresentaram o menor valor para o EC₅₀, as mesmas amostras que apresentaram uma banda amarela no teste de DPPH rápido (Figura 5.3), caracterizando presença de compostos com atividade antioxidante.

Tabela 5.5 – Atividade antioxidante dos extratos obtidos por extração supercrítica, expressos em g de extrato por g de solução de DPPH (EC₅₀).

Amostra	Parte da planta	Pressão da extração	EC ₅₀ (g de extrato/g de DPPH)
1	Flores	90 bar	55,71
2	Flores	120 bar	59,42
3	Flores	150 bar	62,65
4	Flores	200 bar	77,02
5	Flores	250 bar	31,59
6	Flores	300 bar	32,34
7	Folhas e talos	90 bar	78,89
8	Folhas e talos	120 bar	54,48
9	Folhas e talos	150 bar	67,86
10	Folhas e talos	200 bar	72,45
11	Folhas e talos	250 bar	83,28
12	Folhas e talos	300 bar	97,03

Comparando as amostras de folhas e talos e das flores, verifica-se que a atividade antioxidante dos extratos das flores é maior do que nas folhas e talos, pois sabe-se que quanto menor o valor do EC₅₀, maior será a atividade antioxidante do extrato analisado.

5.8. Análise de compostos fenólicos totais

Na Tabela 5.6 são apresentados os resultados obtidos para a concentração de compostos fenólicos totais em equivalentes de ácido gálico determinados pelo método de Follin-Ciocalteau (FOLLIN e CIOCALTEAU, 1927 apud LUCAS, 2014). Os resultados são expressos em % em massa de compostos fenólicos totais presentes nas amostras analisadas em equivalente de ácido gálico. Observa-se que os extratos apresentaram valores similares em % de compostos fenólicos totais, independente da pressão de extração e da parte da planta analisada.

Tabela 5.6 – Concentração de fenólicos totais, expressas em equivalentes de ácido gálico, dos extratos de quitoco obtidos por extração supercrítica.

Amostra	Parte da planta	Pressão da extração	% de compostos fenólicos totais
1	Flores	90 bar	3,14
2	Flores	120 bar	2,94
3	Flores	150 bar	3,40
4	Flores	200 bar	2,99
5	Flores	250 bar	3,59
6	Flores	300 bar	3,14
7	Folhas e talos	90 bar	2,80
8	Folhas e talos	120 bar	3,29
9	Folhas e talos	150 bar	3,19
10	Folhas e talos	200 bar	3,09
11	Folhas e talos	250 bar	2,99
12	Folhas e talos	300 bar	2,99

Verificou-se que a amostra 5 apresentou o maior valor do % de compostos fenólicos totais, a mesma amostra que apresentou os melhores resultados nos métodos de DPPH rápido e DPPH proposto por Brand-Williams et al. (1995) e modificado por Rufino et al. (2007), mostrando-se coerente com a literatura, pois, os compostos fenólicos, devido as suas estruturas, possuem uma reconhecida atividade antioxidante, o que explica o fato de quanto maior a quantidade destes compostos fenólicos presentes no extrato, maior será sua atividade antioxidante e, conseqüentemente, menor o valor do EC₅₀ (Simões *et al.*, 2007).

Como já citado antes, o fato de não ter sido utilizado cossolvente nas extrações pode ter influenciado para a não obtenção de extratos contendo compostos fenólicos, pois sabe-se que pressões mais altas e o uso do cossolvente aumentam o rendimento de compostos mais polares, dentre eles os compostos fenólicos, ácidos fenólicos, entre outros (Cassel et al., 2008).

5.9. Análise sensorial – olfatométrica

A análise sensorial olfatométrica dos óleos essenciais e dos extratos voláteis do quitoco foi realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Arnaldo Bandoni da Cátedra de Farmacognosia da Universidade de Buenos Aires. O grupo em questão é composto por pesquisadores treinados em análise sensorial olfatométrica (Vargas et al., 2013). Na Tabela 5.7 são apresentados os resultados da análise sensorial olfatométrica.

Tabela 5.7 – Análise sensorial olfativa dos óleos essenciais e extratos voláteis de *P. sagittalis* obtidos por arraste a vapor e extração supercrítica.

Amostra	Aspecto	Odor
1	Sólido e amarela	Resinosa, doce amadeirado, penetrante, algo floral e um pouco amargo
2	Sólido e amarela	Característico de plantas e ligeiramente queimado
3	Líquido	Doce, amadeirada, algo terroso
4	Líquido	Menos doce, uma nota de couro e algo amadeirado

Além dos resultados descritos na Tabela 5.5, os avaliadores da Universidade de Buenos Aires - Argentina concluíram que a amostra 1 (extrato volátil obtido por extração supercrítica das flores do quitoco) tem um grande potencial para aplicações na indústria de perfumaria, pois possui um aroma interessante, segundo critérios de profissionais que atuam nesse setor industrial e definem novos produtos. Verificaram também que as amostras 3 e 4, ambas obtidas por extração por arraste a vapor, possuem um aroma muito forte de queimado, sendo típico de óleos essenciais obtidos por este método. Este aroma pode ser eliminado através da lavagem do óleo com água 10% carbonato de sódio, porém em função de ter sido enviado para a

Universidade de Buenos Aires uma pequena quantidade de óleo não foi possível a realização desse procedimento.

Pode-se observar que os resultados foram significativamente diferentes para as diferentes partes da planta e os métodos de extração, tendo como melhor avaliação o extrato obtido por extração supercrítica das flores do quitoco.

6. CONCLUSÃO

A partir dos estudos realizados, pode se observar que o rendimento do óleo essencial obtido através de extração por arraste a vapor das flores do quitoco é maior que o rendimento do óleo das folhas e talos, sendo 0,35% e 0,24%, respectivamente. O mesmo se observa na extração com CO₂ supercrítico, onde o rendimento total dos extratos das flores foi de 7,59% e para as folhas e talos 3,83%.

Através da análise por CG/EM, foi identificado praticamente a mesma quantidade de compostos para o óleo das flores e o óleo das folhas e talos, podendo se observar a majoritariedade do mesmo composto para ambos os óleos essenciais, o 1,8 cineol, este sendo responsável por 44,7 % da composição das folhas e talos e 33,6% da composição identificada das flores do quitoco.

A partir das análises de DPPH pode se concluir que o extrato da flor de quitoco extraído a 250 bar e 40°C apresentou maior atividade antioxidante entre os extratos estudados. Observa-se que esta atividade tem uma relação direta com a concentração de fenólicos totais.

Em função dos resultados da análise antimicrobiana, conclui-se que o óleo essencial das folhas e talos do quitoco apresenta atividade antibacteriana para a cepa de *Staphylococcus aureus*, coerente com os estudos do Simionatto (2007), e também atividade antifúngica frente à cepa de *Candida albicans*. Porém, de acordo com Simionatto (2007), os extratos analisados por bioautografia e CIM demonstraram a baixa atividade do óleo essencial frente aos microrganismos testado, devido às altas concentrações necessárias para inibir o crescimento microbiano.

A análise olfatométrica permitiu concluir que o método de processo extrativo influi diretamente no aroma do extrato ou óleo, visto que a mesma amostra de planta foi testada na extração supercrítica e no arraste a vapor, sendo perceptível essa diferença por ensaios sensoriais. Logo, o processo de extração mais indicado para a

obtenção de extratos com potencial aromático para uso pela indústria de perfumaria é com CO₂ supercrítico à 90 bar e 40 °C. Por fim, conclui-se que o extrato volátil das flores da *P. sagittalis* obtido por extração supercrítica tem grande potencial para futuras aplicações em perfumaria, atendendo assim uma demanda internacional das indústrias por novas notas aromáticas.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry**. 4th ed. Allured Publishing Corporation. 2008.

ASSOCIAÇÃO GAÚCHA DE APICULTORES. **Sobre: floradas predominantes**. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.agamel.com.br/p/floradas-predominantes.html>>. Acesso em: 10 fev. 2017.

ARRIAGA, A.M.C.; CORDEIRO, F.C.V.; LIMA, J.Q.L.; VASCONCELOS, J.N.; FEITOSA, E.M.A.; NETO, M.A.; NASCIMENTO, R.F. Constituents of the Essential Oil of *Pluchea quitoc* DC. **Journal of Essential Oil Ressearch**, V.18: 693-694, nov/dez, 2006.

BANDONI, A.L.; CZEPAK, M.P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008. 623p.

BAREN, C. M. V. **Composición química y actividades biológicas de una espécie aromática y medicinal de la estepa patagónica con potencial interes industrial: *Mulinum spinosum* (Cav.) Persoon**. Tese de doutorado em Farmácia e Bioquímica. Cátedra de Farmacognosia. Universidade de Buenos Aires. Buenos Aires, 2008.

BARROS, I.M.C.; LOPES, L.D.G.; BORGES, A.C.R.; RIBEIRO, M.N.S. FREIRE, S.M.F. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Pluchea quitoc* (DC) ethanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, V.106:317-320, 2006.

BARROSO, M.S.T. **ESTUDO SOBRE PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *Achyrocline satureioides* (LAM) DC. E SUA POTENCIALIDADE NA PERFUMARIA**. Porto Alegre. 2011. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

BARROSO, M. S. T.; Villanueva, G.; Lucas, A. M.; Perez, G. P.; Vargas, R. M. F.; Brun, G. W; Cassel, E. Supercritical fluid extraction of volatile and non-volatile compounds from *Schinus molle* L. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 02, p. 305 - 312, 2011.

BEDINOT, C.; ROSSA, G. E.; FALCAO, M. A.; VARGAS, Rubem Mário Figueiró; CASSEL, E. **Protótipo de uma unidade piloto de destilação por arraste a vapor**. In: XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012, Búzios. Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2012. p. 7013-7022.

BEDINOT, C., VARGAS, R.M.F., CASSEL, E. Multi-Purpose Pilot Unit for Supercritical Fluid Extraction. In: **13th European Meeting on Supercritical Fluids**, 2011, The Hague. Anais of the 13th European Meeting on Supercritical Fluids. The Hague: Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. v. 1.

BENINCÁ, C. **Estabilidade do ácido 5-O-cafeoilquímico Relação entre a cinética química e o processamento de erva-mate**. 2009. 79p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2009.

BICALHO, B. **Prospecção de antibióticos e biocatalisadores (haloperoxidases e BaeyerVilliger monoxigenases) em microrganismos**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 2003.

BISPO E. S; et al. Perfil sensorial de pó de cacau (*Theobroma cacao* L.) alcalinizado. **Ciência de Tecnologia de Alimento**, Campinas, v. 25(2): 375-381, 200.

BRAND-WILLIAMS, W.; Cuvelier, M. E.; Bernet, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, n. 1, p.25-30, 1995.

BREMER, K. 1994. Asteraceae. Cladistics and Classification. Timber Press, Portland.

BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes**. Springer, Darmstadt, Steinkopff, New York, 1994.

BURGER, M. E.; et al. Action of the extracts of *Pluchea sagittalis* on the absorptive characteristics of the gastrointestinal tract. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 43(1), 2000.

CANCELLI, R.R.; SCHNEIDER, A.A.; BAUERMANN, S.G. Morfologia polínica do gênero *Pluchea* cass (Asteraceae), no Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Paleontologia**, V. 9:149-156, jan/abril, 2006.

CAO, G. H.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n.5, p.749-760, 1997.

CASSEL, E.; BEDINOT, C.; VARGAS, R.M.F. **Unidade Piloto de Extração Supercrítica**. 2011 Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PROV020110081175, data de depósito: 03/08/2011, título: "Unidade Piloto de Extração Supercrítica" . Instituição(ões) financiadora(s): PUCRS

CASSEL, E., VARGAS, R.M.F. Experiments and Modeling of the Cymbopogon winterianus Essential Oil Extraction by Steam Distillation. **J. Mex. Chem. Soc.**, v. 50(3), p. 126-129 (2006).

CASSEL, E; VARGAS, R.M.F. Proceso industrial de destilación por arrastre a vapor de aceite esencial de romero. **Revista de investigacion**, v. 01, p. 11-18, 2008.

CASSEL, E. VARGAS, R.M.F.; MARTINEZ, N; LORENZO, D; DELLACASSA, E. Modeling for essential oil extraction process. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 171-176, 2009.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1- 56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA. 2003.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1º ed. São Paulo: editora da UNICAMP, 2007. 456p.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química nova na escola**, n.7, maio 1998.

DUARTE, M.C.T. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil**. Construindo a história dos produtos naturais. Multiciência. v.7, 2006.

FALCÃO, M.; et al. Determination of antibacterial activity of vacuum distillation fractions of lemongrass essential oil. **Phytochemistry Review**, v.11, n.4, p. 405-412, 2012.

FIANCO, Ana Luisa B. Estudo sobre a atividade antifúngica e antioxidante de extratos de própolis obtidos com CO₂ supercrítico. Porto Alegre, 2014. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

GARCEZ, José Jacques. **Obtenção do extrato volátil de sementes de *Anethum graveolens* L. por diferentes técnicas extrativas.** Porto Alegre. 2016. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais,

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

GARCEZ, J. J. ; BARROS, F. ; LUCAS, A. M. ; XAVIER, V. B. ; FIANCO, A. L. B. ; CASSEL, E. ; Vargas, R. M. F. . Evaluation and mathematical modeling of processing variables for a supercritical fluid extraction of aromatic compounds from *Anethum graveolens*. **Industrial Crops and Products (Print)**, v. 95, p. 733-741, 2017

GOODNER, K.; ROUSEFF, R. Gas **Chromatography/Olfactometry** - GC/O Practical Analysis of Flavor and Fragrance Materials. 3 ed. Hoboken: Wiley, 2011. p. 228.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Fourth Edition; Oxford University Press; p. 268 – 340, 2007.

JANUÁRIO, A.H., SANTOS, S.L., MARCUSSI, S., MAZZI, M.V., PIETRO, R.C.L.R., SATO, D.N., ELLENA, J., SAMPAIO, S.V., FRANÇA, S.C., SOARES, A.M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, p. 434-438, 2005.

KNEZ, Ž.; et al. **Industrial applications of supercritical fluids:** A review. *Energy*, v. 77, p. 235243, 2014.

LEAL, P.F. **Estudo comparativo entre os custos de manufatura e as propriedades funcionais de óleos voláteis obtidos por extração supercrítica e destilação por arraste a vapor.**2008. 307p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil:** Nativas e exóticas. 2.ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LUCAS, A.M. **Estudo comparativo de extratos voláteis de Eucaliptos geneticamente modificados e não geneticamente modificados.** Porto Alegre. 2011. 76p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

LUCAS, A.M. **Estudo sistemáticos de obtenção e impregnação supercrítica de extração de *Baccharis***. Porto Alegre. 2015. 76p. Tese (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n.4, p.659-664, 2005.

MARTINO, V.S.; FERRARO, G.E.; DEBENEDETTI, S.L.; COUSSIO, J.D. Compuestos Polifenólicos aislados de *Pluchea sagittalis* (Compuestas). **Acta Farm. Bonaerense**, v.3, n. 2, p. 141-146, 1984.

MAUL, A. A. Fluidos Supercríticos: situação atual e futuro da extração supercrítica. **Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 2, n. 11, p.42-46, 1999.

MELO, M.M.R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 115-176, 2014.

MONKS, N.R.; et al. In vitro cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. **Pharmaceutical Biology**. 40(7):494-500.

MONTENEGRO, G.; et al. Implementación de un panel sensorial para mieles chilenas. **Ciencia e Investigacion Agraria**, 35(1):51-58, 2008.

MUJTABA, I. M. Batch distillation design and operation. 2004.

NAGAI, T.; Inoue, R.; Inoue, H.; Suzuki, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, n.1, p. 29-33, 2003.

OLIVEIRA, F. C. M.. **Caracterização dos resíduos industriais gerados no processo de extração de óleos essenciais por arraste a vapor**. Porto Alegre. 2015. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

OLIVEIRA, S. Q. Antioxidant activity of baccharis articulate extracts: isolation of a new compound with antioxidante activity. **Free Radical Research**, v.37, p. 555-559, 2003.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18, p. 301-307, 2008.

PALOMBO, E. A.; SEMPLE, S. J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 77, n. 2, p. 151–157, 2001.

PEREIRA, M. A. A. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica** (Dissertação de mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2010.

PFALLER, M. A. Infection control: oportunist fungal infections- the increasing importance of *Candida* species. **Infect Control and Hospital Epidemiology**, v.10, n.6, p. 270-3, 1989.

PIANTINO, C.R., et al. Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 209-214, 2008.

QUADROS, A. U. et al. Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE₂-dependent mechanism. **Folia Microbiol.**, v. 56, p.349-352, 2011.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 10(1), p. 01, 1997.

RICE, R. G.; DO, D.D. **Applied mathematics and modeling for chemical engineers**. 8. ed. New York: John Wiley and Sons, 1995.

RICE-EVANS, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n.4, p. 152-159, 1997.

RODRIGUES, S.A. **Efeito ansiolítico do extrato etanólico de *Pluchea sagittalis* (Lam.) Cabrera, Asteraceae, em modelos comportamentais**. 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, São Cristóvão, 2011.

ROSSATO, L.V. **Efeitos bioquímicos e fisiológicos do chumbo em plantas de quitoco (*Pluchea sagittalis*)**: possível papel fitorremediador. 2010. 83p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

RUFINO, M. S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S.; Morais, S. M.; Sampaio, C. G.; Péres-Giménez, J.; Saura-Calixto, F- Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. 4f. **Comunicado técnico** , Embrapa, Fortaleza, CE, 2007.

SCOPEL, R. S. **Incorporação de modelos termodinâmicos na modelagem matemática de processos de extração supercrítica**. 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

SIMIONATTO, E. **Estudo dos constituintes químicos de óleos voláteis de plantas medicinais do Rio Grande do Sul: isolamento, determinação e modificação estrutural e atividade biológica**. 2004. 232p. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, 2004.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1ª Ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed.UFSC, 1999. 821p.

SIMÕES, C.M.O. ; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6º ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 467-485.

SKOOG, D.A. **Fundamentos de química analítica**. 8ª Ed. São Paulo: Thomson, 2008. 999p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836p.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, G.C. de; *et al.* Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacological**, 90:135-43, 2004.

SOVOVA, H. H.; ALEKSOVSKI, S. Mathematical model for hydrodistillation of essential oils. **Flavour and fragrance Journal**, v.21, p.881-889, 2006.

STAVRI, M; PATON, A; SKELTON, BW; GIBBONS, S. Antibacterial Diterpenes from *Plectranthus ernstii*. **J. Nat. Prod.** 72(9): 1191–1194. 2009.

STEFFENS, A. H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010. 68p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

VARGAS, R. M. F.; BARROSO, M. S. ; NETO, R. G. ; SCOPEL, R ; FALCÃO, M. A. ; SILVA, C. F. ; CASSEL, E. Natural products obtained by subcritical and supercritical fluid extraction from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. using CO₂. **Industrial Crops and Products (Print)**, v. 50, p. 430-435, 2013.

VALGAS, C., SOUZA, S.M., SMÂNIA, E.F.A., SMÂNIA JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 369-380, 2007.

VAN RUTH, S. M. Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. **Biomolecular Engineering**, V. 17, I. 4-5, p. 121-128, 2001.

VIDARI, G., FINZI, P.V., ZARZUELO, A., GÁLVEZ, J., ZAFRA, C., CHIRIBOGA, X., BEREBGUER, B., LA CASA, C., DE LA LASTRA, C.A., MOTILVA, A., MARTIN, M.J. Antiulcer and antidiarrhoeic effect os *Baccharis teindalensis*. **Pharmaceutical**.

VILA, F.C. **Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante de cana-de-açúcar**. São Paulo. 2006. 68p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil.

WOLFFENBUTTEL, A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia: abordagem técnica e científica**. São Paulo: Roca, 2010.