

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Extração de cumarinas de *Pterocaulon balansae* (Asteraceae)**

Stéphanie Oliveira Baggio

Porto Alegre, novembro de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

**Extração de cumarinas de *Pterocaulon balansae* (Asteraceae)**

Stéphanie Oliveira Baggio

Orientadora: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser

Co-orientadora: Msc. Bruna Medeiros Neves

Porto Alegre, novembro de 2014.

## Resumo

O gênero *Pterocaulon* (Asteraceae) apresenta uma série de atividades biológicas que são atribuídas aos seus metabólitos secundários majoritários, as cumarinas. Considerando relatos da medicina popular, nos quais plantas deste gênero são utilizadas na forma de infusão ou decocto, procurou-se verificar se estes compostos majoritários seriam extraídos com a água. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi verificar a possibilidade de extração de cumarinas de *Pterocaulon balansae* em meio aquoso, avaliar a influência da temperatura neste processo de extração e ainda analisar o perfil químico e quantificar as cumarinas totais de *P. balansae* nos extratos *n*-hexano e diclorometano. Para a realização da extração aquosa, o material vegetal seco e triturado foi submetido à extração em banho de recirculação de água em diferentes temperaturas (15 °C, 25 °C, 40 °C, 60 °C, 80 °C e 100 °C). A proporção de planta:solvente foi de 1:30 e o tempo de extração foi de 1 hora. Já para as extrações com solventes orgânicos, o material vegetal seco e triturado foi submetido à maceração, sendo que a proporção planta:solvente foi de 1:30 e realizou-se a extração até o esgotamento. A caracterização dos extratos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em aparelho equipado com detector de arranjo de diodos que registra espectros de UV no intervalo de 230 - 400 nm. Dessa maneira, foi possível concluir que a água, sendo utilizada como solvente nas preparações de uso medicinal, mostrou-se capaz de extrair as cumarinas presentes nas partes aéreas de *Pterocaulon balansae* e observou-se que em temperaturas mais elevadas ocorre um aumento no teor de extrato seco e uma maior extração destes compostos. Em relação ao perfil químico dos extratos *n*-hexano e diclorometano, observou-se que ambos são semelhantes, com o predomínio de cumarinas mais apolares e o líquido extrator *n*-hexano foi o que extraiu maior quantidade de cumarinas.

Palavras-chave: Asteraceae, *Pterocaulon balansae*, cumarinas, extração aquosa, quantificação.

## SUMÁRIO

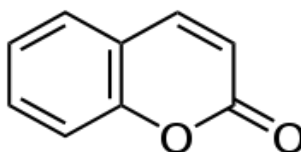
<b>1 Introdução</b> .....	5
1.1 Gênero <i>Pterocaulon</i> .....	7
1.1.1 <i>Pterocaulon balansae</i> .....	8
1.1.1.1 Aspectos Botânicos.....	8
1.1.1.2 Dados Químicos.....	9
1.1.1.3 Atividades Biológicas.....	11
1.2 Métodos Extrativos.....	11
<b>2 Objetivos</b> .....	14
2.1 Objetivos Específicos.....	15
<b>3 Materiais e Métodos</b> .....	16
3.1 Material Vegetal.....	17
3.2 Solventes.....	17
3.3 Extrações.....	17
3.3.1 Extração Aquosa.....	17
3.3.2 Extração via Solvente Orgânico.....	18
3.4 Caracterização dos Extratos.....	18
<b>4 Resultados e Discussão</b> .....	19
4.1 Extração Aquosa.....	20
4.2 Extração via Solvente Orgânico.....	25
<b>5 Conclusões</b> .....	29
<b>6 Referências</b> .....	31



Os benefícios advindos do uso de plantas medicinais têm levado à incessante busca por estruturas moleculares inéditas e conseqüentemente, novos fármacos. Muitos destes, com efeitos terapêuticos relevantes são provenientes da natureza ou são sintetizados a partir dos núcleos básicos de produtos naturais (PHILLIPSON, 2001). Entre as inúmeras espécies de plantas existentes, estima-se que apenas uma pequena parcela têm sido investigada quimicamente ou biologicamente. Sendo assim, essa área de pesquisa é extremamente relevante, pois relevante número de medicamentos contêm substâncias ativas de origem natural e somente na área de quimioterápicos, considerável parte dos medicamentos aprovados são provenientes de compostos naturais (VALLEJO, 2010).

Entre os compostos derivados de plantas, utilizados, atualmente, como medicamentos, destacam-se: vinblastina, vincristina, morfina, codeína, digoxina, atropina, escopolamina, paclitaxel, artemisinina, entre outros (PHILLIPSON, 2001; VALLEJO, 2010).

Estes compostos fazem parte de um extenso grupo de substâncias oriundas do metabolismo secundário vegetal, desempenhando a função de defesa frente às agressões externas. Essas substâncias, denominadas metabólitos secundários, estão divididas em diversas classes na natureza, de acordo com sua rota de síntese na planta e semelhanças estruturais. Uma das classes de metabólitos secundários vegetais são as cumarinas, lactonas do ácido *o*-hidroxicinâmico que apresentam espectro ultravioleta característico, o qual é influenciado notavelmente pela natureza e posição dos grupos substituintes. O núcleo básico das cumarinas está representado na **Figura 1** (SIMÕES *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Núcleo básico das cumarinas

Para as cumarinas têm sido descritas diversas atividades biológicas, tais como: antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, antimicrobiana, anticoagulante, anti-hipertensiva, antituberculostática, anticonvulsivante, hipoglicemiante e neuroprotetora. Esses dados são citados nos trabalhos de revisão de VENUGOPALA *et al.* (2013) e de SANDHU *et al.* (2014).

As cumarinas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em muitas espécies da família *Asteraceae*. Dentro desta família, encontra-se o gênero *Pterocaulon*, onde são os metabólitos secundários majoritários (BREMER, 1994; HEEMANN, 2002).

### 1.1 Gênero *Pterocaulon*

O gênero *Pterocaulon* pertence à família *Asteraceae*, considerada uma das mais numerosas e evoluídas do reino vegetal (OLIVEIRA, 1993). Segundo CABRERA (1963), a família *Asteraceae* é cosmopolita, com grande concentração de espécies em regiões subtropicais, temperado-frias e temperadas. Também são muito abundantes nas regiões montanhosas (HEEMAN, 2004).

Há três subfamílias que pertencem à família *Asteraceae*: *Barnadesioideae*, *Chichorioideae* e *Asteroideae*. Esta última abrangendo o gênero *Pterocaulon* e também sendo a subfamília com o maior número de espécies (BARROSO, 1991; JOLLY, 1991).

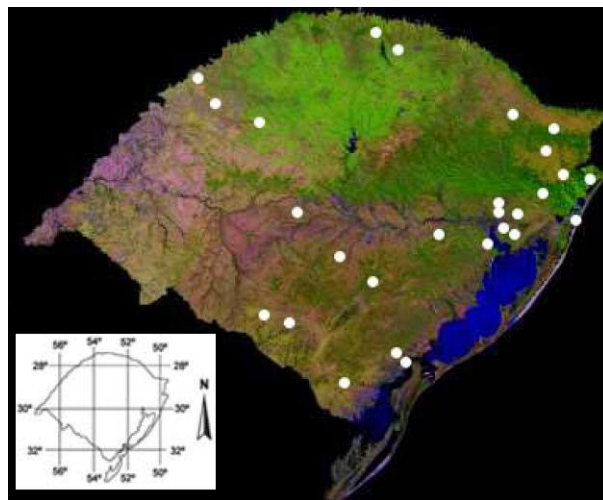
O gênero *Pterocaulon* apresenta uma área de distribuição geográfica bicêntrica, sendo que das dezoito espécies existentes, doze são americanas (*Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC.; *Pterocaulon angustifolium* DC.; *Pterocaulon balansae* Chodat; *Pterocaulon cordobense* Kuntze; *Pterocaulon lanatum* Kuntze; *Pterocaulon lorentzii* Malme; *Pterocaulon polypterum* (DC.) Cabrera; *Pterocaulon polystachyum* DC.; *Pterocaulon purpurascens* Malme; *Pterocaulon pycnostachyum* (Michx.) Elliott; *Pterocaulon rugosum* (Vahl) Malme; *Pterocaulon virgatum* (L.) DC.) e o restante, não americanas (*Pterocaulon niveum* Cabrera & Ragonese; *Pterocaulon redolens* (Willd.) Fern.-Vill.; *Pterocaulon serrulatum* (Montrouz.) Guillaumin; *Pterocaulon sphacelatum* (Labill) F.Muell.; *Pterocaulon spherantoides* De Candolle e *Pterocaulon*

*verbascifolium* (F.Muell. ex Benth.), Benth. & Hook. ex F.Muell.) (CABRERA & RAGONESE, 1978).

### 1.1.1 *Pterocaulon balansae*

*Pterocaulon balansae* Chodat é uma das espécies americanas e está distribuída de sul a sudeste do Brasil, Paraguai, Uruguai e norte, centro e nordeste da Argentina (LIMA, 2006; VALLEJO, 2010).

No Rio Grande do Sul, está amplamente distribuída, estando presente em todas as regiões fisiográficas do estado, como pode ser observado na **Figura 2**. A espécie *P. balansae* floresce no período de fevereiro a abril e frutifica de março a maio (LIMA, 2006).



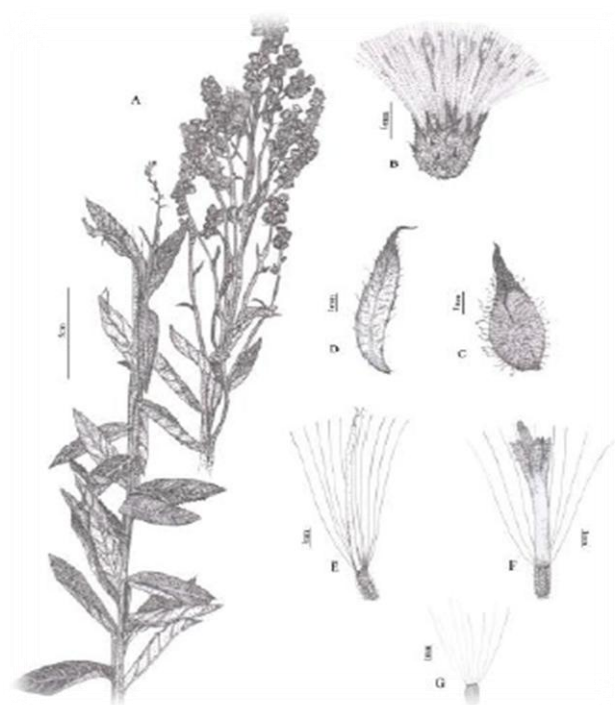
**Figura 2.** Distribuição geográfica de *P. balansae* Chodat no estado do Rio Grande do Sul. Figura apresentada com autorização do autor, Luis Fernando Paiva Lima (Apresentada em LIMA, 2006).

#### 1.1.1.1 Aspectos Botânicos

Esta espécie se evidencia por ser uma erva perene de 1 – 1,5 m de altura, com caule ereto, ramoso, alado, densamente tomentoso, folhoso até a inflorescência.



Apresenta folhas sésseis e decurrentes, elíptico-lanceoladas, agudas, de 80 – 120 mm de comprimento x 15 – 40 mm de largura. Capítulos numerosos, dispostos em forma de espiga. Invólucro comprimido de 5 mm de altura por 3 – 4 mm de diâmetro; brácteas involucrais exteriores lanceoladas, lanosas; as interiores glabras. Flores femininas numerosas, hermafroditas. Aquênios glandulosos-pubescentes e pappus branco (CABRERA & RAGONESE, 1978). Esta caracterização morfológica pode ser observada na **Figura 3**.



**Figura 3.** *Pterocaulon balansae* Chodat (L.F. Lima 125, ICN). **A.** Hábito. **B.** Capítulo. **C.** Bráctea involucral externa. **D.** Bráctea involucral interna. **E.** Flor pistilada. **F.** Flor estaminada. **G.** Cipsela. Ilustração apresentada com autorização do autor, Luis Fernando Paiva Lima (Apresentada em LIMA, 2006).

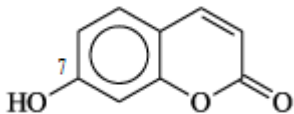
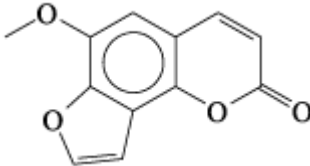
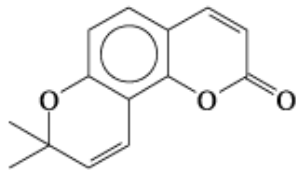
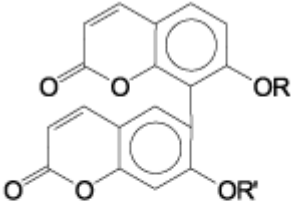
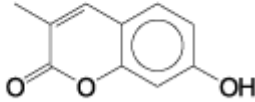
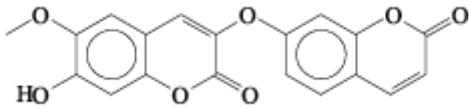
#### 1.1.1.2 Dados Químicos

Apesar de as cumarinas serem os metabólitos secundários majoritários nas espécies do gênero *Pterocaulon*, outros grupos de compostos também estão presentes em *Pterocaulon balansae*, como, por exemplo, ácidos fenólicos, poliacetilenos,

flavonoides, dentre outros (MARTINO *et al.*, 1979; MAGALHÃES *et al.*, 1981; DEBENEDETTI *et al.*, 1987; SEMPLE *et al.*, 1999; HEEMMAN *et al.*, 2004).

As cumarinas podem ocorrer como cumarinas-simples, furanocumarinas, piranocumarinas, lignocumarinas e cumarinas diméricas. Na **Tabela 1**, estão mostrados os tipos de cumarinas, os quais apresentam diversos padrões de oxigenação no núcleo básico, sendo que o mais comum entre as cumarinas naturais é a oxigenação no carbono-7 (SIMÕES *et al.*, 2003; VALLEJO, 2010).

**Tabela 1.** Tipos de cumarinas

<p>Cumarinas-simples</p> 	<p>Furanocumarinas</p> 
<p>Piranocumarinas</p> 	<p>Lignocumarinas</p>  <p>R ou R' =</p>  <p>R ou R' = H</p>
<p>Cumarinas Diméricas</p> 	

BARROS (1981) foi responsável pelo isolamento de cinco cumarinas de *P. balansae*: 5-(3'-metil-2',3'-buteniloxi)-6,7-metilenodioxicumarina, 5-(3'-metil-2',3'-epoxibutiloxi)-6,7-metilenodioxicumarina, 5-(2',3'-di-hidroxi-3'-metilbutiloxi)-6,7-metilenodioxicumarina, 6-metoxi-7-(2',3'-epoxi-3'-metilbutiloxi)cumarina e 6-metoxi-7-(3'-metil-2',3'-di-hidroxi-3'-metilbutiloxi)cumarina. Após alguns anos, HEEMANN *et al.* (2004) isolaram mais uma cumarina, até então, inédita: 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina e mais recentemente, VALLEJO (2010) relatou outras duas: 5-(3-metil-2-oxobutiloxi)-6,7-metilenodioxicumarina e 6,7,8-trimetoxicumarina.

#### 1.1.1.3 Atividades Biológicas

Espécies do gênero *Pterocaulon*, conhecidas como “quitoco”, são usadas na medicina tradicional para tratamento de problemas de pele como, por exemplo, na cicatrização de feridas e tratamento de algumas infecções. Esse uso popular para o tratamento de micoses está relacionado com a atividade antimicrobiana destas plantas (AVANCINI, 2002).

Estudos desenvolvidos por STEIN *et al.* (2005) avaliaram *in vitro* a atividade antifúngica de diversos extratos de *Pterocaulon* frente a cepas de fungos patogênicos, demonstrando elevada atividade. Na mesma linha de estudo, em 2011, VIANNA *et al.* testaram *in vitro* diferentes extratos frente a cepas do fungo *Sporothrix schenckii*, onde observaram que todos os extratos avaliados demonstraram inibição do crescimento do fungo testado. Nestes estudos, os extratos utilizados foram hexano e diclorometano.

Recentemente, VIANNA *et al.* (2012) mostraram que cumarinas isoladas de plantas do gênero *Pterocaulon*, dentre elas *P. balansae*, apresentam citotoxicidade significativa contra linhagens de células de glioma.

#### 1.2 Métodos Extrativos

Existem vários métodos que podem ser utilizados para extrair os constituintes químicos de um material vegetal, sendo que estes podem ser: a frio (maceração,

percolação, turbolização ou turboextração e por imersão do material intacto em solventes orgânicos) ou a quente (infusão, decocção, arraste por vapor d'água e extração em aparelho de Soxhlet) (SIMÕES *et al.*, 2003).

Ao se utilizar a extração a quente ocorre uma dissolução facilitada dos compostos extraíveis devido ao aumento da temperatura. Porém, para os compostos termolábeis deve ser utilizada a extração a frio, por estes serem instáveis e sofrerem alterações com a elevação da temperatura (SHARAPIN, 2000).

Entre os principais métodos de extração a frio, tem-se a maceração que é uma das técnicas extrativas mais utilizadas devido a sua simplicidade e custo reduzido. Neste processo extrativo, o material vegetal fica em recipiente fechado, em temperatura ambiente por um longo período (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do solvente extrator, sendo, assim, um processo estático. Como ocorre a saturação do líquido extrator e o estabelecimento de um equilíbrio na difusão entre o meio extrator e o interior das células, este método não gera esgotamento do material vegetal. Para que ocorra o aumento da eficiência da extração, há variações que podem ser utilizadas, como: digestão (maceração realizada em sistema aquecido a 40 – 60 °C), maceração dinâmica (maceração realizada sob agitação mecânica constante) e remaceração (quando o solvente extrator é renovado, podendo levar ao esgotamento do material vegetal). Este processo apresenta limitações quando os compostos a serem extraídos são pouco solúveis (SHARAPIN, 2000; NAVARRO, 2005).

Já na percolação, o processo é dinâmico e leva ao esgotamento da planta devido à passagem contínua de solvente extrator através do material vegetal. Esta técnica extrativa permite obter maiores rendimentos de extrato e esta é indicada para compostos que estão presentes em pequena quantidade ou ainda, pouco solúveis (NAVARRO, 2005).

Na turbolização ou turboextração, a extração acontece ao mesmo tempo com a redução do tamanho de partícula do material vegetal, devido à aplicação de elevadas forças de cisalhamento. Esta técnica favorece a rápida dissolução dos compostos e o quase esgotamento do material vegetal (SIMÕES *et al.*, 2003; NAVARRO, 2005).

Na técnica extrativa de imersão do material intacto em solventes orgânicos, partes da planta são imersas, durante segundos, em solvente orgânico com o objetivo de obter compostos presentes na superfície foliar, com a interferência mínima de outros compostos indesejáveis (STEIN, 2005; RÓDIO, 2008).

Entre as técnicas de extração a quente, tem-se a infusão que é uma técnica extrativa na qual a extração ocorre devido à permanência, ao longo de determinado tempo, do material vegetal em água fervente em um recipiente fechado. É utilizada para o preparo de partes vegetais moles, que podem ser cortadas ou pulverizadas, para que sejam facilmente penetradas e extraídas pela água.

Na decocção, o material vegetal permanece em contato, durante certo tempo, com um solvente (geralmente água) em ebulição. É uma técnica pouco usada em nível laboratorial, pois muitos compostos podem sofrer alterações químicas na sua estrutura, devido ao aquecimento prolongado, mas é muito utilizada na medicina popular. Esta pode ser empregada principalmente para materiais vegetais duros e de natureza lenhosa (SIMÕES *et al.*, 2003).

A técnica de arraste por vapor d'água é usada para extração de óleos voláteis, sendo que estes possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo assim, arrastados pelo vapor d'água. É usado, preferencialmente, para plantas frescas e em pequena escala é utilizado o aparelho de Clevenger (SIMÕES *et al.*, 2003; NAVARRO, 2005).

Dentre as técnicas extrativas a quente, quando se deseja extrair compostos usando solventes voláteis, utiliza-se o aparelho de Soxhlet. Esta técnica extrativa possibilita uma extração muito eficiente, usando uma quantidade reduzida de solvente, pois a cada ciclo de operação o solvente é destilado para entrar em contato com o material vegetal (SIMÕES *et al.*, 2003).



Considerando o anteriormente exposto, o objetivo geral do presente trabalho foi investigar a extração de cumarinas.

## 2.1 Objetivos Específicos

- Investigar a possibilidade de extração de cumarinas de *P. balansae* utilizando água como líquido extrator.
- Avaliar a influência da temperatura na obtenção de cumarinas de *P. balansae* nos extratos aquosos.
- Analisar o perfil químico e quantificar as cumarinas totais de *P. balansae* nos extratos *n*-hexano e diclorometano, obtidos por maceração.





### 3.1 Material Vegetal

Partes aéreas de *P. balansae* Chodat foram coletadas no município de Canoas, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, em fevereiro de 2013. Posteriormente, a espécie foi identificada pelo botânico Prof. Dr. Sérgio A. L. Bordignon (Centro Universitário La Salle - Canoas, UNILASALLE, Brasil).

A exsicata está depositada no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN 157762). A coleta foi autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio. Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (número 38017-1).

### 3.2 Solventes

Os solventes utilizados nos experimentos do estudo foram das seguintes procedências: *n*-hexano (Synth, Brasil), diclorometano (Synth, Brasil), ácido acético glacial (Nuclear, Brasil), acetonitrila (Tedia, grau HPLC, EUA) e água ultrapura obtida de um equipamento Milli-Q<sup>®</sup> Plus (Millipore, Billerica, USA).

### 3.3 Extrações

#### 3.3.1 Extração Aquosa

O material vegetal seco e triturado foi submetido à extração aquosa em banho de recirculação de água em diferentes temperaturas (15 °C, 25 °C, 40 °C, 60 °C, 80 °C, 100 °C). A proporção de planta:solvente foi de 1:30, sendo que o tempo de extração foi de 1 hora. Para avaliar o rendimento, os extratos obtidos nas diversas temperaturas

foram filtrados com papel filtro, ajustado os volumes e retirado alíquotas de 10 mL, em triplicata, para liofilização.

### 3.3.2 Extração via Solvente Orgânico

O material vegetal seco e triturado foi submetido à técnica extrativa de maceração com *n*-hexano (em temperatura ambiente). A proporção de planta:solvente foi de 1:30 e ocorreu a extração até o esgotamento. O mesmo procedimento foi realizado com diclorometano.

Os extratos obtidos foram evaporados em evaporador rotatório até à secura e posteriormente, armazenados ao abrigo da luz e sob refrigeração. O rendimento do extrato foi determinado em relação à massa inicial de material vegetal seco e triturado utilizado na maceração.

### 3.4 Caracterização dos Extratos

A caracterização dos extratos (aquoso, *n*-hexano e diclorometano) foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), em aparelho equipado com detector de arranjo de diodos que registra espectros de UV no intervalo de 230 - 400 nm, utilizando-se uma coluna Phenomenex-C<sub>18</sub> Synergi (150 mm × 4.6 mm, 4 μm) acoplada a uma pré-coluna com sílica C<sub>18</sub>. Como fase móvel foi utilizado um sistema gradiente de 2% de ácido acético (A) e acetonitrila (B), filtrada e degaseificada. O gradiente de eluição foi de 17% de B em 0,01 min, 17 - 20% de B em 10 min, 20% de B em 15 min, 20 - 25% de B em 20 min, 25 - 27% de B em 22 min, 27 - 30% de B em 25 min, 30 - 35% de B em 30 min, 35% de B em 35 min, 35 - 17% de B em 40 min. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min durante 45 minutos, a 30 °C, com volume de injeção de 20 μL. A quantificação das cumarinas presentes nos extratos foi determinada por meio da equação da reta, gerada pela validação da metodologia em trabalho desenvolvido no grupo de pesquisa (MEDEIROS, 2014).

## **4 Resultados e Discussão**

---

#### 4.1 Extração Aquosa

Um dos objetivos elencados neste trabalho foi investigar a extração aquosa de cumarinas, sendo que a análise dos resultados confirmou esta possibilidade. A obtenção destes compostos por meio de solventes polares como a água, contradiz em parte o comportamento esperado para esses tipos de moléculas, que se caracterizam pelo caráter lipofílico. Uma das possíveis explicações para este fato pode ser a possibilidade de formação de micelas nas moléculas destes compostos lipofílicos, sendo assim a porção apolar da molécula ficaria orientada para o interior hidrofóbico e a porção polar estaria orientada para o exterior hidrofílico, possibilitando a extração aquosa (MANIASSO, 2001).

Outro fator que pode influenciar neste acontecimento é a alteração na constante dielétrica da água, sendo que à medida que a temperatura de um líquido se eleva ocorre a diminuição de sua densidade devido à expansão térmica e conseqüentemente ocorre uma diminuição da constante dielétrica da água permitindo assim uma maior possibilidade de extração de compostos com menor polaridade (SHAW *et al.*, 1991; SHARAPIN, 2000).

Além de verificar a possibilidade de extração dos compostos, também foi avaliada a influência da temperatura neste processo. Observou-se que o aumento da temperatura de extração proporcionou um aumento nas quantidades de cumarinas totais extraídas da planta, conforme apresentado na **Tabela 2**.

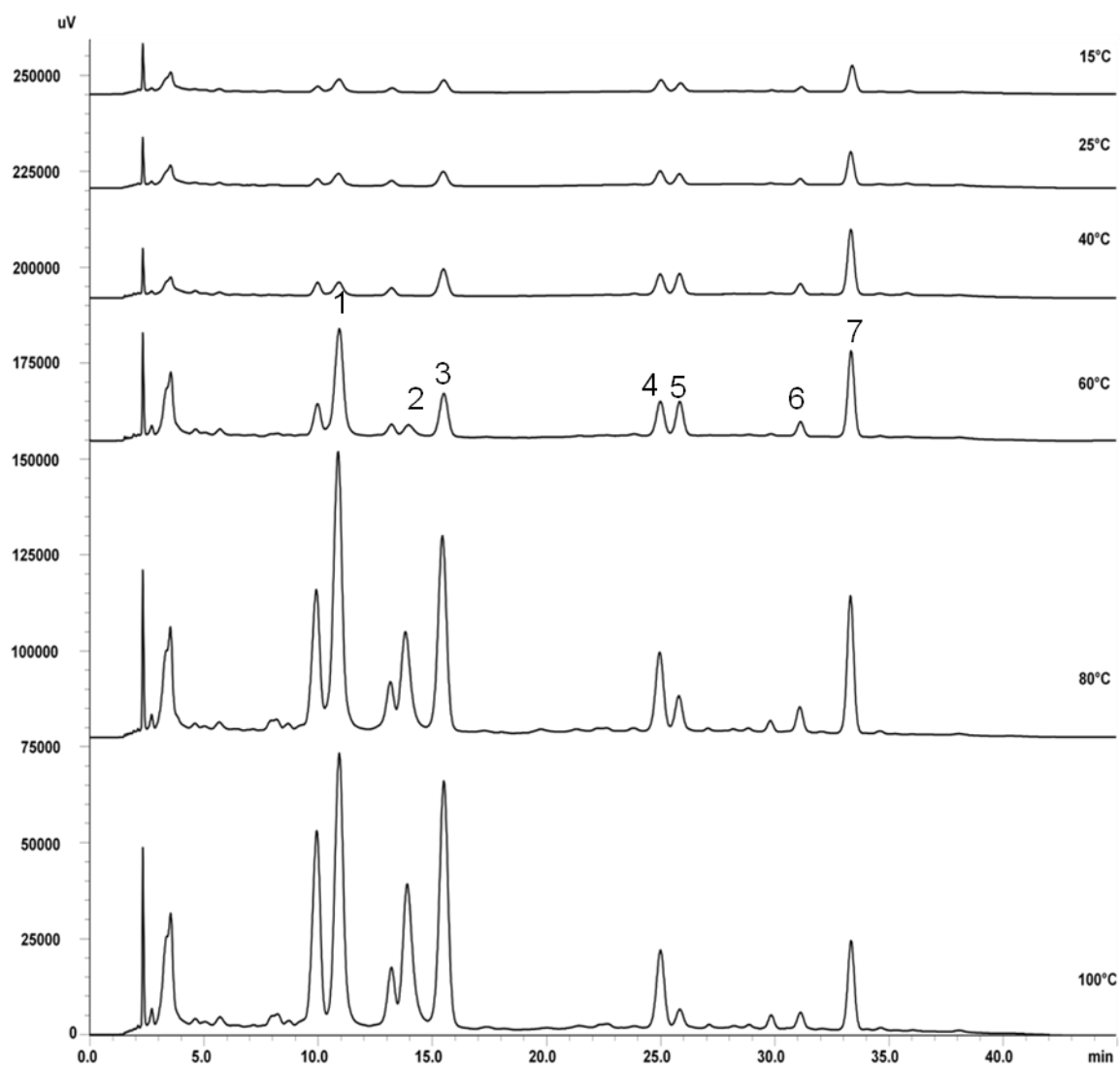
Nas temperaturas mais baixas, de 15 °C, 20 °C e 40 °C, a concentração de cumarinas foi menor, representada pelas menores áreas dos picos, indicando condições pouco eficazes na obtenção de um extrato rico em cumarinas. Enquanto que em temperaturas mais elevadas, ocorreu uma maior extração dos compostos, sendo que nas condições de 80 °C e 100 °C há maiores áreas dos picos quando comparado a temperatura de 60 °C. No entanto, observa-se a tendência na redução das áreas dos últimos picos com o aumento da temperatura e alteração nos picos iniciais do

cromatograma dos extratos obtidos. Além disso, a temperatura de 60 °C indica uma condição para extração mais reprodutível quando se trata de experimentos em escala laboratorial.

**Tabela 2.** Valores obtidos de cumarinas totais ( $\mu\text{g/mL}$ ) em relação aos extratos aquosos obtidos em diferentes temperaturas.

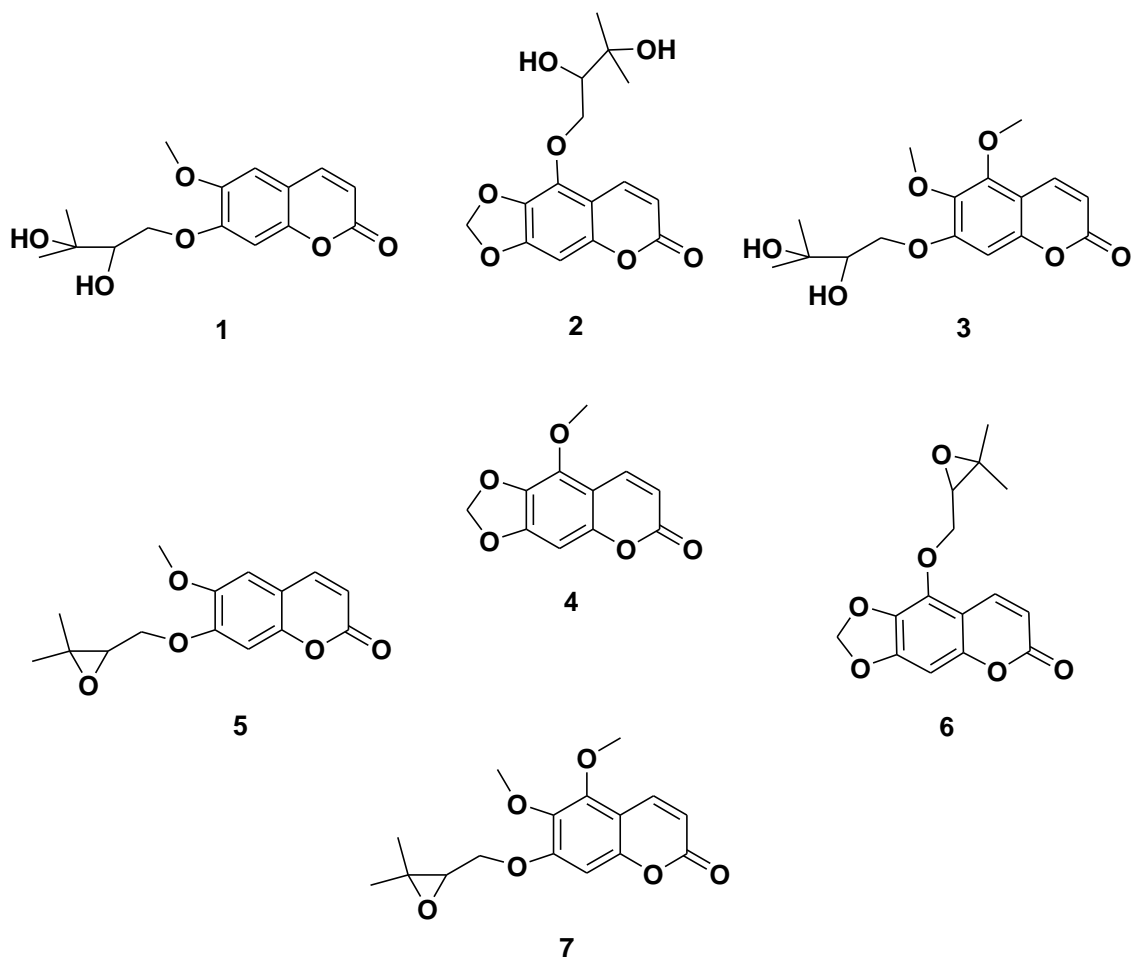
Temperatura da extração ( $^{\circ}\text{C}$ )	Cumarinas totais ( $\mu\text{g/mL}$ )
15	100,64
25	117,56
40	191,50
60	426,41
80	1214,79
100	1218,03

Pode-se observar que a partir da temperatura de 80 °C, os picos do cromatograma não ficaram bem resolvidos, fato este que prejudica, consideravelmente, a quantificação “confiável” destes compostos, mas algumas alterações nas condições cromatográficas podem ajudar a solucionar o problema, como: diminuição do fluxo, alteração no gradiente de eluição, entre outros. Isso tudo pode ser observado na **Figura 4**, na qual estão presentes os cromatogramas dos extratos aquosos.



**Figura 4.** Cromatogramas dos extratos aquosos de *P. balansae* obtidos em diferentes temperaturas.

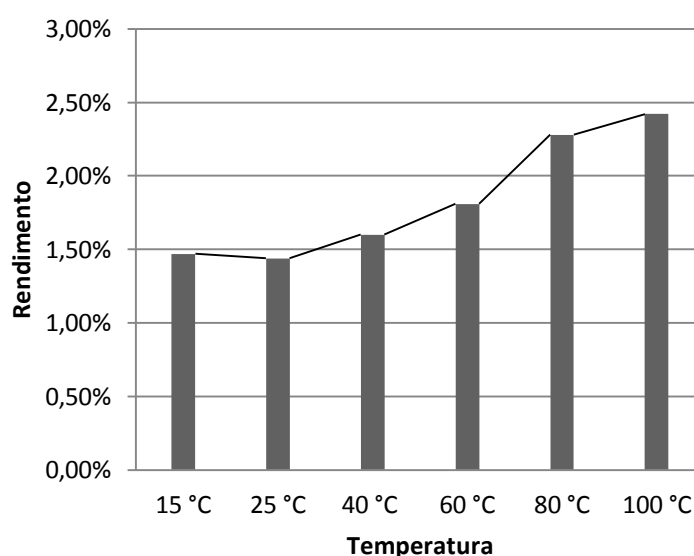
As cumarinas presentes em *P. balansae* estão indicadas na **Figura 5** e suas respectivas numerações referentes a cada pico do cromatograma estão indicadas na **Figura 4**.



**Figura 5.** Estruturas químicas de cumarinas encontradas no mesmo lote de *P. balansae*. A nomenclatura destes compostos está de acordo com a numeração que cada molécula apresenta, sendo: **1.** 6-metoxi-7-(3'-metil-2',3'-di-hidroxi-butiloxi)cumarina, **2.** 5-(2',3'-di-hidroxi -3'-metilbutiloxi)- 6, 7-metilenodioxícumarina, **3.** 5, 6-dimetoxi-7-(3- metil- 2', 3'- di-hidroxi-butiloxi) cumarina, **4.** 5-metoxi-6,7-metilenodioxícumarina, **5.** 6-metoxi- 7-(2', 3'-epoxi-3- metilbutiloxi) cumarina, **6.** 5-(2', 3'-epoxi- 3' - metilbutiloxi) - 6, 7-metilenodioxícumarina, **7.** 5, 6-dimetoxi- 7- (2', 3'-epoxi-3- metilbutiloxi) cumarina (Adaptado de MEDEIROS, 2014).

A liofilização realizada para avaliar o rendimento dos extratos, indicou que uma maior massa de extrato obtido está relacionada com uma obtenção maior de cumarinas. A exceção ocorreu com as temperaturas iniciais de 15 °C e 25 °C, sendo que na temperatura de 15 °C foi obtido uma maior quantidade de resíduo seco, mas originou uma menor quantidade de cumarinas, em comparação com a temperatura de 25 °C. Na

temperatura de 25 °C foi obtido uma menor quantidade de resíduo seco em relação à temperatura anterior, porém originou uma maior quantidade de cumarinas, isto pode ser observado na **Figura 6** e **Tabela 2**. Como este fato ocorreu apenas nas temperaturas iniciais, pode-se sugerir que baixas temperaturas possam influenciar na geração destes compostos, sendo que apesar de ocorrer uma maior quantidade de resíduo, a quantidade de cumarinas é menor. Todas essas hipóteses seriam válidas caso as diferenças tivessem sido consideradas significativas através de teste estatístico. Entretanto, a análise estatística não foi realizada devido ao fato de ter sido efetuada apenas uma triplicata no mesmo experimento. Mas de forma geral, temperaturas mais elevadas indicam a relação diretamente proporcional entre maior quantidade de resíduo com maior obtenção de cumarinas.



**Figura 6.** Gráfico referente ao rendimento da liofilização dos extratos aquosos em diferentes temperaturas.

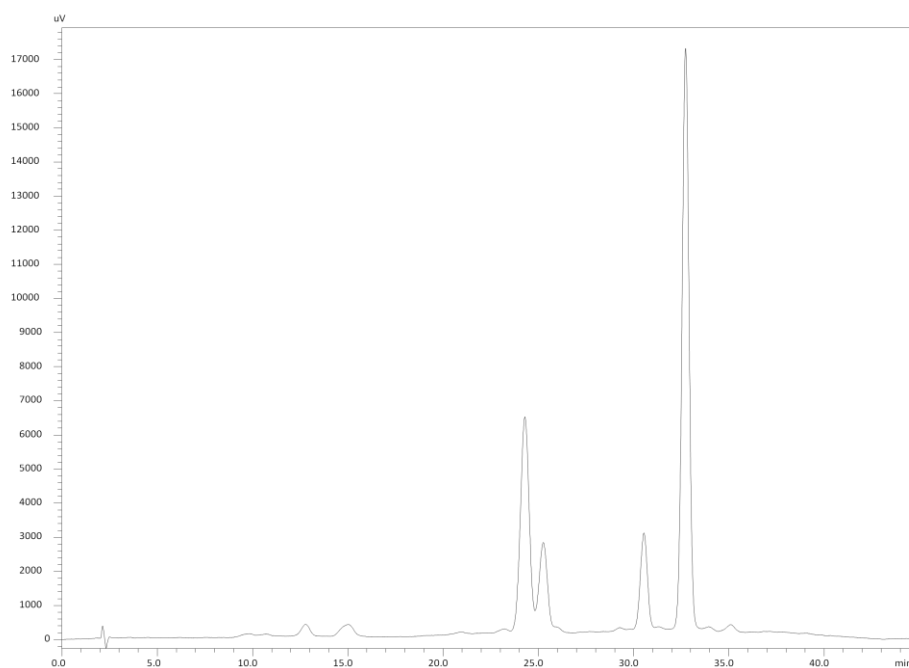
Outro fato interessante é que não há relatos na literatura quanto à extração de cumarinas de *P. balansae* realizada com água. As técnicas extrativas já utilizadas para este fim, até então, foram: maceração, extração em aparelho de Soxhlet e imersão do material intacto em solventes orgânicos (STEIN, 2005; RÓDIO, 2008, VIANNA *et al.*, 2011).



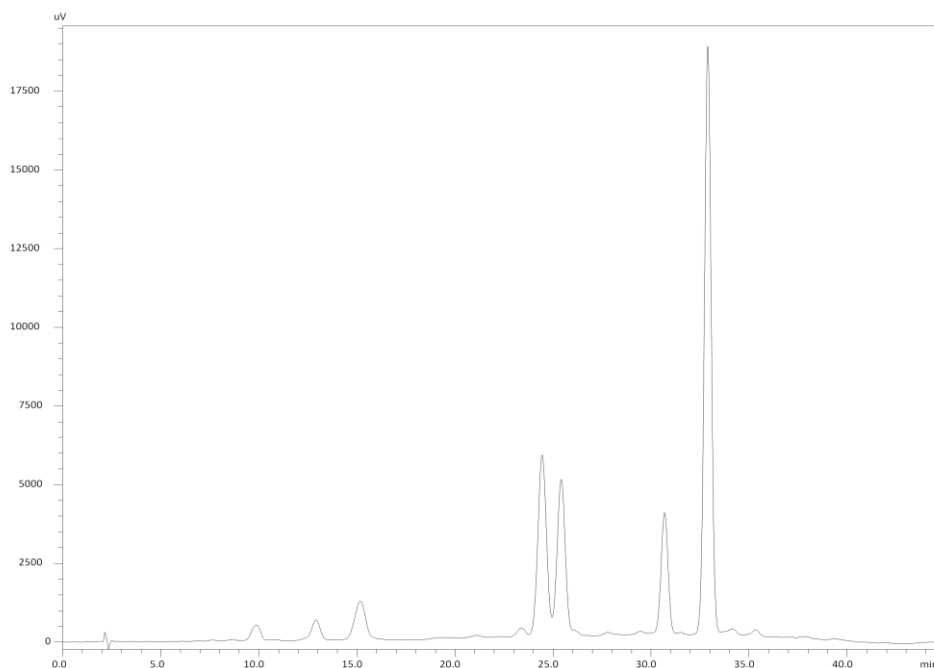
Além disso, para a escolha de um determinado líquido extrator devem ser observados aspectos, como: facilidade de manipulação, preço, segurança, seletividade, riscos quanto a uma possível contaminação ambiental e principalmente toxicidade, sendo que neste último aspecto, a água é o líquido extrator que melhor se enquadra para este propósito (SHARAPIN, 2000).

#### 4.2 Extração via Solvente Orgânico

Ao analisar os cromatogramas dos extratos *n*-hexano e diclorometano, pode-se perceber que ambos apresentaram um perfil químico qualitativamente semelhante, com o predomínio de cumarinas com características apolares (conforme pode ser observado na **Figura 7** e **Figura 8**).



**Figura 7.** Cromatograma do extrato *n*-hexano de *P. balansae* obtido por técnica extrativa de maceração.



**Figura 8.** Cromatograma do extrato diclorometano de *P. balansae* obtido por técnica extrativa de maceração.

Na **Tabela 3**, encontram-se os valores obtidos de rendimento e de cumarinas totais ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos obtidos por maceração com *n*-hexano e diclorometano. Observando-se os dados referentes às cumarinas totais obtidas destes extratos, pode-se perceber que o *n*-hexano foi o líquido extrator que conseguiu extrair maior quantidade de cumarinas, provavelmente, devido ao fato destes metabólitos secundários serem lipofílicos, ocorrendo assim maior afinidade química do líquido extrator apolar com estes compostos. E quanto aos valores de rendimentos destas extrações, o maior rendimento foi do extrato diclorometano, porém este extraiu uma menor quantidade de cumarinas, provavelmente devido ao fato de o diclorometano ser um líquido extrator menos seletivo que o *n*-hexano.

**Tabela 3.** Valores obtidos de rendimento e de cumarinas totais ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtidos com extratos *n*-hexano e diclorometano pela técnica de maceração.

Solvente	Cumarinas totais ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rendimento dos Extratos
<i>n</i> -hexano	121,80	7,12%
diclorometano	114,95	8,65%

Porém, o perfil fitoquímico destes extratos apresentou algumas diferenças quali e quantitativas em relação a um trabalho realizado na Argentina. No trabalho realizado por VALLEJO (2010), as cumarinas mais polares estão presentes em maior quantidade. Este fato pode estar relacionado com as diversas causas que interferem na produção de metabólitos secundários, tais como: época da coleta do material vegetal, composição do solo, entre outros fatores.

Em um trabalho de revisão de GOBBO-NETO & LOPES (2007), é enfatizado os fatores de influência na produção do conteúdo de metabólitos secundários das plantas medicinais, sendo que a síntese destes compostos é constantemente influenciada por condições ambientais.

Um dos fatores que mais afeta a produção destas substâncias é a época de coleta da planta e as variações sazonais podem alterar o conteúdo de produção destes compostos em quase todas as classes de metabólitos secundários, inclusive cumarinas (WILT & MILLER, 1992).

Além da sazonalidade, também há outros fatores que podem influenciar, diretamente, o conteúdo de metabólitos secundários das plantas, tais como:

- Variações circadianas;
- Idade e desenvolvimento da planta, segundo HARTMANN (1996) quanto mais jovem for o tecido, maior será a taxa biossintética de metabólitos;
- Temperatura;
- Disponibilidade hídrica, visto que o estresse hídrico pode alterar fatores fisiológicos, como: fotossíntese, expansão foliar e crescimento (BAAZ *et al.*, 1987);
- Radiação ultravioleta;
- Nutrientes no solo, macro e micronutrientes;
- Altitude;
- Poluição atmosférica;
- Indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos.

Com mesma, ou até maior, importância, ainda existem outros fatores que podem alterar a constituição química, como: condições de coleta, estabilização e estocagem do material vegetal, assim como, fatores operacionais (CALIXTO, 2000).

Entre os diversos fatores operacionais, um que possui significativa relevância é o referente ao processo de evaporação, sendo que uma temperatura muito elevada pode gerar o rompimento dos anéis epóxido das moléculas de cumarinas e conseqüentemente, tornar as moléculas mais polares, alterando, assim, o perfil fitoquímico.



A água, sendo utilizada como solvente nas preparações de uso medicinal, mostrou-se capaz de extrair as cumarinas presentes nas partes aéreas de *P. balansae*. A temperatura na qual ocorre o processo extrativo possui grande relevância, visto que a sua elevação ocasionou um aumento no teor de resíduo seco e na quantidade de cumarinas totais dos extratos aquosos, sendo assim, as temperaturas mais elevadas (60 °C, 80 °C e 100 °C) foram consideradas as mais apropriadas para a extração destes compostos em meio aquoso, proporcionando a obtenção de extratos ricos em cumarinas.

Já em relação à extração com solventes orgânicos, percebemos que tanto o extrato *n*-hexano quanto o extrato diclorometano apresentaram o mesmo perfil químico, mas com maior quantidade de cumarinas mais apolares. O líquido extrator *n*-hexano, por sua vez, extraiu uma maior quantidade destes compostos.



AVANCINI, C.A.M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem de atividade antibacteriana de plantas nativas do sul do Brasil.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

BAAZ, F.; CHIARIELLO, N.; COLEY, P.; PITELKA, L. Allocating resources to reproduction and defense. **Bioscience**, v.37, p. 58- 67, 1987.

BARROS, S.M.G. **As cumarinas do *Pterocaulon balansae* Chodat.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1981.

BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** v. 3, Ed. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1991.

BREMER, K. **Asteraceae: cladistics and classification.** Portland: Timber Press, 1994. 752p.

CABRERA, A.L. **Flora de la Provincia de Buenos Aires.** Buenos Aires: I.N.T.A., v. 6, 1963.

CABRERA, A.L.; RAGONESE, A.M. Revisión del género *Pterocaulon* (Compositae). **Darwiniana**, v. 21, p. 185-257, 1978.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

DEBENEDETTI, S.L.; NADINIC, E.L.; GÓMEZ, M.A.; COUSSIO, J.D. Polyphenols isolated from *Pterocaulon purpurascens*, I. 6-Hydroxyflavonoids. **Journal of Natural Products**, v. 50, p. 512-513, 1987.



GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

HARTMANN, T. Global harmonization of herbal health claims. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 80, p. 177-179, 1996.

HEEMANN, A.C.W. **Estudo fitoquímico, botânico e das propriedades antimicrobianas de *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae)**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Farmácia. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 104 p., 2002.

HEEMANN, A.C.W.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Revisão do gênero *Pterocaulon* - aspectos fitoquímicos e atividades biológicas **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 53-60, 2004.

JOLLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 10.ed. São Paulo: Nacional, 1991. 776p.

LIMA, L.F.P. **O gênero *Pterocaulon* ELL. (ASTERACEAE) no Rio Grande do Sul: aspectos taxonômicos, palinológicos e fitoquímicos**. 2006. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MAGALHÃES, A.F.; MAGALHÃES, E.G.; JUNIOR, V.N.; FILHO, H.F.L. Coumarins from *Pterocaulon balansae* and *P. lanatum*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 1369-1371, 1981.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, p. 87-93, 2001.

MARTINO, V.S.; DEBENEDETTI, S.L.; COUSSIO, J.D. Caffeoylquinic acids from *Pterocaulon virgatum* and *Pluchea sagittalis*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 2052, 1979.

MEDEIROS, B. N. **Nanoemulsões de uso tópico contendo extrato de *Pterocaulon balansae* (Asteraceae): estudos de formulação e permeação cutânea**. 2014.

Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NAVARRO, D. F. **Estudo químico, biológico e farmacológico das espécies *Allamanda blanchetti* e *Allamanda schottii* na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico.** 2005. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica.** São Paulo: Atheneu, 1993.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v.56, p. 237- 243, 2001.

RÓDIO, C. **Atividade de *Pterocaulon polystachyum* DC. (*Asteraceae*) frente a *Acanthamoeba castellanii*.** 2008. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SANDHU, S.; BANSAL, Y.; SILAKARI, O.; BANSAL, G. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.22, p.3806-3814, 2014.

SEMPLE, S.J.; NOBBS, S.F.; PYKE, S.M.; REYNOLDS, G.D.; FLOWER, R.L. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian Aboriginal medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 283-288, 1999.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos.** Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Belo, 2000.

SHAW, R.W.; THOMAS, B.B.; ANTONY, A.C.; CHARLES, A.E.; FRANCK, E.U. Supercritical water – a medium for chemistry. **Chemical & Engineering News**, p. 23-26, dez., 1991.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre / Florianópolis: Editora da Universidade, 2003. p. 221-224, 315, 1102.

STEIN, A.C. **Análise química de espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae) e determinação da atividade antifúngica**. 2005. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

STEIN, A.C.; SORTINO, M.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 211-214, 2005.

VALLEJO, S.B. **Identificación de cumarinas en especies autóctonas del género *Pterocaulon* ell.** 2010. Trabalho de conclusão de curso (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Carrera de Farmacia). Universidad de Belgrano, Buenos Aires, Argentina.

VENUGOPALA, K.N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research Internacional**, v. 2013, ID 963248, 2013.

VIANNA, D.R.; CORVELLO, F.; RÓDIO, C.; BRUXEL, F.; VELHO, A.; CARVALHO, E.S.; VON POSER, G.; TEIXEIRA, H.F. Spectrophotometric determination of coumarins incorporated into nanoemulsions containing *Pterocaulon balansae* extract. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p. 1487-1491, 2011.

VIANNA, D.R.; HAMERSKI, L.; FIGUEIRÓ, F.; BERNARDI, A.; VISENTIN, L.C.; PIRES, E.N.S.; TEIXEIRA, H.F.; SALBEGO, C.G.; EIFLER, V.L.; BATTASTINI, A.M.O.; VON POSER, G.L.; PINTO, A.C. Selective cytotoxicity and apoptosis induction in glioma cell lines by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon* species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.57, p. 268-274, 2012.

WILT, F.M.; MILLER, G.C. Seasonal variation of coumarin and flavonoid concentrations in persistent leaves of wyoming big sagebrush (*Artemisia tridentata* ssp. *wyomingensis*: Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, p. 53-67, 1992.