

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANÁLISE QUÍMICA
DE ESPÉCIES DE
VALERIANA BRASILEIRAS

Andréia Loviane Silva

Orientadora: Dra Elina Bastos Caramão

Departamento de Química Inorgânica

Porto Alegre, janeiro de 2009.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Andréia Loviane Silva

Tese apresentada como requisito para a
obtenção do grau de Doutor em Química

Porto Alegre, janeiro de 2009.

A presente Tese foi realizada inteiramente pela autora no período entre novembro de 2003 e dezembro de 2008, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob a Orientação da Professora Doutora Elina Bastos Caramão. A Tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutor em Química pela seguinte banca examinadora:

Profa. Dra. Cláudia Sampaio de Andrade Lima

Prof. Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon

Profa. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues

Prof. Dr. Sílvio Luiz Pereira Dias

Prof^a. Dra. Elina B. Caramão

Orientadora

Profa. Dra. Nádyá Pesce da Silveira

Coordenadora do PPGQ

Ao meu filho Andréas Lorenzo

Aos meus pais Terezinha de Jesus e Antônio Baptista

Ao estimado impulsionador de meus sonhos científicos

Álvaro Luís Hilario

“Meus colaboradores....”

Esforçai-vos e **Ele** fortalecerá o vosso coração (Salmos 31.24)

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor Dr. Carlos Alexandre Netto pela oportunidade e possibilidade da realização do Curso de Pós-graduação em Química.

Às mulheres de garra, sim, mulheres da ciência, pelo apoio e viabilização do trabalho:

Profa. Dra. Elina Bastos Caramão e Profa. Dra. Cláudia Zini.

Aos colaboradores desta investigação: Ao Prof. Dr. Sérgio Bordignon, Profa. Dra. Sandra Beatriz Rech, Profa. Dra. Gilsane Lino Von Poser, Prof. Dr. Oleg Leontiev e Prof. Dr. Cláudio Dariva.

Aos insentivadores: Profa. MsC. Luíza Placidina da Luz, Profa. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues, Profa. Dra. Maria Inês Soares Melecchi, Profa. MsC. Noêmia Urruth Leão Tavares, Profa. MsC. Ana Paula Simões Menezes, Prof. MsC. Mário Mansur Filho e a estimada Profa. Dra. Rosângela Assis Jaques.

Aos professores da Pós-graduação, em especial aos responsáveis pela aceitação do trabalho e apoio até a finalização: Profa. Nádyá Silveira, Prof. Dr. Aloir Antonio Mello, Profa. Dra. Adriana Pohmann, Prof. Dr. Adriano Lisboa Monteiro e Prof. Dr. Edilson Valmir Benvenuti.

A todos os colegas de Mestrado e de Doutorado e aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Química Ambiental e Oleoquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em especial a colaboração e impenho de Renata, Nicole e Janine.

Aos familiares, em especial a minha irmã Salete Cunha dos Santos, minha mãe Terezinha de Jesus Silva e ao meu esposo o idealizador, financiador e promotor de meus projetos, o Químico, Álvaro Luís Hilário.

Ao meu filho Andréas Lorenzo Silva Hilário, pela persistência em sobreviver às adversidades impostas pela mesma “*Natureza*” que cria e modela medicamentos. O sorriso desta criança foi o motivo da renovação das forças e a conclusão desta tese.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS:

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
a.C.	Antes de Cristo
α	Em estatística significância do teste de hipótese
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
ASE	Extração acelerada por solventes (do inglês “ <i>Accelerated Solvent Extraction</i> ”)
atm	Atmosfera (unidade de pressão)
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
“clean up”	Limpeza
CCD	Cromatografia em camada delgada
CV	Coefficiente de variação
d	Densidade
δ_c	Densidade crítica
\emptyset	Diâmetro interno
EEG	Eletroencefalograma
EMAC	Extração por maceração dinâmica
ESOX	Extração por Soxhlet
<i>F</i>	Teste-F compara as variâncias de duas populações
<i>F_{calc}</i>	Valor de <i>F</i> calculado com os dados do ensaio
<i>F_{crit}</i>	Valor de <i>F</i> tabelado
gl	Graus de liberdade
°GL	Graus Gay Lussac
GC/FID	Cromatografia em Fase Gasosa com Detector de Ionização por Chama (do inglês “ <i>Gas Chromatography/Flame Ionization Detector</i> ”)
GABA	Ácido Gama Amino Butírico (do inglês “ <i>Gama Amino Butiric Acid</i> ”)
GC/MS	Cromatografia em Fase Gasosa acoplada ao Detector de Espectrometria de Massas (do inglês “ <i>Gas Chromatography/Mass Spectrometry</i> ”)
HD	Hidrodestilação
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês “ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ”)
HPTLC	Cromatografia em camada delgada de alto desempenho (do inglês “ <i>High Performance Thin Liquid Chromatography</i> ”)
LPTRI	Índice de retenção com programação linear de temperatura (do inglês “ <i>Linear Temperature Programmed Retention Index</i> ”)

®	Marca registrada
m	Massa
m/v	Massa por volume
m/z	Massa sobre carga
MAE	Extração assistida por microondas (do inglês " <i>Microwave Assisted Extraction</i> ")
MHB22P	Membrana hidrofóbica com 22 µm de poro
MQ	Mínimos quadrados
MS	Ministério da Saúde
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (do inglês " <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ")
OMS	Organização Mundial de Saúde
p.a.	Para análise
%	Percentual
P	Probabilidade
P _c	Pressão crítica
PCA	Análise dos Componentes Principais (do inglês " <i>Principal Compound Analysis</i> ")
PE	Ponto de ebulição
PLC	Cromatografia líquida preparativa (do inglês " <i>Preparation Liquid Chromatography</i> ")
PM	Peso molecular
RI	Índice de retenção (do inglês " <i>Retention Indice</i> ")
S	Desvio padrão
5-HT ₅	Serotonina
SCAN	Varredura de Íons
SEAASE	Soluções extrativas analíticas obtidas por extração acelerada por solvente
SEAEMAC	Soluções extrativas analíticas obtidas por maceração
SEAFR	Soluções extrativas analíticas fracionadas
SEASOX	Soluções extrativas analíticas obtidas por Soxhlet
SEAUSE	Soluções extrativas analíticas obtidas por ultrassom
SFE	Extração por Fluido Supercrítico (do inglês " <i>Supercritical Fluid Extraction</i> ")
SIM	Monitoramento de Íons Seleccionados (do inglês " <i>Single Ion Monitoring</i> ")
SNC	Sistema Nervoso Central
screening	Rastreamento
split	Com divisão de fluxo

SPE	Extração em fase sólida (do inglês “ <i>Solid Phase Extraction</i> ”)
SPME	Micro extração em fase sólida (do inglês “ <i>Solid Phase Micro Extraction</i> ”)
SQ	Soma dos quadrados
Teste “t”	Teste de “Student”
Teste de AMES	Teste de mutagenicidade de compostos químicos que usa linhagens especiais da bactéria <i>Salmonella typhimurium</i> .
TBDMS-Cl	Terc-butilclorodimetilsilano
T _c	Temperatura crítica
Tr _i	Tempo de retenção de literatura
Tr _e	Tempo de retenção experimental
Tr _x	Tempo de retenção do composto x
Tr _z	Tempo de retenção do alcano com n carbonos
Tr _{z+1}	Tempo de retenção do alcano com n+1 carbonos
“turn over”	Revolver, retornar – resposta a um estímulo.
USE	Extração por ultrassom
US\$	Unidade monetária norte americana – Dólar
v/v	Volume por volume
x	Média
Ward	Teste estatístico de análise multivariada para agrupamento em cluster

ÍNDICE GERAL

Declaração de Autoria	Pág. i
Dedicatória	iii
Agradecimentos	v
LISTA DE ABREVIações E SIGLAS	vi
ÍNDICE GERAL	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xv
GLOSSÁRIO	xvii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xviii
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
I Panorama geral	2
II Estudo direcionado a matéria-prima vegetal	4
III Objetivo geral	6
IV Objetivos específicos	7
V Desenvolvimento do trabalho	7
CAPÍTULO 1: REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	Pág. 9
1.1 FAMÍLIA VALERIANACEAE BATSCH	10
1.1.2 Taxonomia da família Valerianaceae	10
1.1.3 Estudos farmacológicos relacionados à família Valerianaceae	11
1.1.4 Toxicidade dos extratos de <i>Valeriana</i>	17
CAPÍTULO 2: ESTUDO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE SETE ESPÉCIES DE <i>VALERIANA</i>	Pág. 20
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1.1 Óleos voláteis em espécies de <i>Valeriana</i>	21
2.1.2 Métodos de extração de óleos voláteis	26
2.1.2.2 Hidrodestilação	26
2.1.2.3 Métodos de amostragem e análise de óleos voláteis	27
2.1.2.3.1 Técnicas de preparo de amostragem	27
2.1.2.3.2 Métodos de identificação e caracterização para óleos voláteis	28
2.1.2.3.3 Cromatografia em fase gasosa	29
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	29
2.2.1 Material vegetal	31
2.2.2 Local de coleta e a identificação das espécies de <i>Valeriana</i>	31
2.2.3 Critérios para a seleção de partes do material vegetal	32
2.2.4 Preparo do material vegetal	33
2.2.5 Estudos preliminares	33
2.2.5.1 Massa vegetal a ser utilizada na hidrodestilação	33
2.2.6 Metodologia da amostragem e seleção de material vegetal para hidrodestilação	34
2.2.7 Secagem do material vegetal pelo processo de liofilização	34
2.2.8 Perda por dessecação	34
2.2.9 Obtenção dos óleos voláteis de espécies de <i>Valeriana</i>	35
2.2.9.1 Preparo do homogeneizado vegetal	35
2.2.9.2 Método de hidrodestilação	35
2.2.9.3 Secagem sob Na ₂ SO ₄ anidro	35
2.2.10 Análise cromatográfica	36

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
2.3.1 O material vegetal	38
2.3.1.1 Caracterização botânica	38
2.3.1.2 Estabilização do material vegetal	38
2.3.1.3 Melhoramentos do rendimento da hidrodestilação para análise química	39
2.3.2 Os compostos voláteis	41
2.3.3 Análise da composição química dos óleos voláteis	41
2.3.4 Análises cromatográficas e interpretação de resultados	42
2.3.5 Análise estatística	58
2.4. CONCLUSÕES PARCIAIS	61

	Pág.
CAPÍTULO 3: EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO APLICADA AO ESTUDO DE <i>Valeriana tajuensis</i> Sobral	64
3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	65
3.1.1 Considerações iniciais	65
3.1.2 Fluidos supercríticos	67
3.1.2.1 CO ₂ – Dióxido de carbono	68
3.1.2.2 C ₃ H ₈ – Propano	68
3.1.3 Extração com fluido supercrítico (SFE)	69
3.1.4 SFE aplicada à extração de matérias-primas vegetais	71
3.1.5 Vantagens e desvantagens da extração com fluido supercrítico	71
3.1.6 SFE e espécies de <i>Valeriana</i>	72
3.1.7 Espécies de <i>Valeriana</i> do Rio Grande do Sul e estudos sobre processos de extração	73
3.1.8 Proposta de investigação	74
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	75
3.2.1 Preparação da amostra para análise	76
3.2.2 Reagentes e solventes	76
3.2.3 Extrações pelo fluidos supercríticos CO ₂ e C ₃ H ₈	76
3.2.3.1 Condições das variáveis de extração	78
3.2.4 Critérios para a seleção de partes do material vegetal	78
3.2.5 SFE – Funcionamento do Sistema de Extração	78
3.2.6 Variáveis de extração para CO ₂ e C ₃ H ₈	79
3.2.7 Cromatografia gasosa (GC/FID e GC/MS)	80
3.3 RESULTADOS	80
3.3.1 A Estabilização e o preparo do material vegetal	80
3.3.2 Procedimento de Extração com CO ₂ e C ₃ H ₈ supercríticos	83
3.3.2.1 estudo do efeito da pressão e temperatura na SFE de <i>V. tajuensis</i>	83
3.3.2.2 Análise da composição química dos compostos voláteis	87
3.4. CONCLUSÕES PARCIAIS	94

	Pág.
CAPÍTULO 4: EXTRAÇÃO POR MACERAÇÃO, SOXHLET, ULTRASSOM E LÍQUIDO PRESSURIZADO APLICADAS AO ESTUDO DE ESPÉCIES DE <i>VALERIANA</i>	97
4.1 REVISÃO DA LITERATURA	98
4.1.1 Considerações iniciais	98
4.1.2 Compostos presentes em Valerianaceae	99
4.1.3 Preparação para a extração do material vegetal	101
4.1.3.1 Seleção do material vegetal para preparação do preparado fitoterápico intermediário	102
4.1.3.2 Classificação de pós	102
4.1.3.3 Operação de classificação de pós	102

4.1.3.4 Extração e suas peculiaridades	103
4.1.4 Métodos extrativos para prospecção de fitoterápicos	103
4.1.4.1 Processos tecnológicos de extração para o preparado fitoterápico intermediário utilizados neste trabalho	105
4.1.4.1.1 Extração por maceração (EMAC)	105
4.1.4.1.2 Extração por Soxhlet (ESOX)	107
4.1.4.1.3 Extração com ultrassom (USE)	109
4.1.4.1.4 Extração com líquido pressurizado (PLE/ASE)	112
4.1.4.2 Critérios de escolha entre os processos de extração	115
4.1.4.3 Metodologia analítica aplicada a extratos vegetais	116
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	118
4.2.1 A investigação e o delineamento metodológico	118
4.2.2 Produtos químicos e equipamentos	119
4.2.3 O material vegetal para extração	121
4.2.4 Métodos de extração empregados	121
4.2.4.1 Extrações clássicas	121
4.2.4.1.1 Extração por maceração dinâmica (EMAC)	121
4.2.4.1.2 Extração por Soxhlet (ESOX)	122
4.2.4.2 Extrações modernas e tecnológicas	122
4.2.4.2.1 Extração com ultrassom (USE)	122
4.2.4.2.2 Extração com líquido pressurizado (ASE)	123
4.2.5 Fracionamento dos extratos	124
4.2.5.1 Cromatografia líquida preparativa (PLC)	124
4.2.6 Análise dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD)	125
4.2.7 Análise dos extratos por cromatografia gasosa (GC/MS)	125
4.3 RESULTADOS	126
4.3.1 Identificação e caracterização da matéria-prima vegetal	126
4.3.2 Critérios de seleção do material vegetal	127
4.3.3 Rendimento de extração – resíduo seco	127
4.3.4 Análise cromatográfica (GC/MS) dos extratos brutos	129
4.3.5 Fracionamento por PLC e CCD	135
4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS	139
	Pág.
CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS	142
5.1 DISCUSSÃO	143
5.2 CONCLUSÕES	146
	Pág.
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
	Pág.
7 PRODUÇÃO INTELECTUAL	155
	Pág.
8 ATIVIDADES PROPOSTAS PARA A CONTINUAÇÃO DO TEMA	156
	Pág.
9 ANEXOS	
9.1 Anexo I	158
9.2 Anexo II	176

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Fig. 2.1	Fotos das espécies de <i>Valeriana</i> nativas do Rio Grande do Sul e que foram estudadas neste trabalho.	32
Fig. 2.2	Representação esquemática do equipamento de Clevenger modificado usando na extração dos óleos voláteis de <i>Valeriana</i> .	36
Fig. 2.3	(a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>V. chamaedryfolia</i> . (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de <i>V. chamaedryfolia</i> .	44
Fig. 2.4	(a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>V. eichleriana</i> . (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de <i>V. eichleriana</i> .	46
Fig. 2.5	(a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>V. eupatoria</i> . (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de <i>V. eupatoria</i> .	48
Fig. 2.6	(a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>V. glechomifolia</i> . (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de <i>V. glechomifolia</i> .	49
Fig. 2.7	(a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>V. saricariifolia</i> . (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de <i>V. saricariifolia</i> .	50
Fig. 2.8	(a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>V. scandens</i> . (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de <i>V. scandens</i> .	52
Fig. 2.9	(a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>V. tajuensis</i> . (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de <i>V. tajuensis</i> .	54
Fig. 2.10	Percentuais de marcadores quimiotaxonômicos e farmacológicos encontrados nas espécies estudadas de <i>Valeriana</i> .	55
Fig. 2.11	Formação de grupos por hierarquização entre as espécies de <i>Valeriana</i> .	59
Fig. 2.12	Análise de compostos químicos principais (PCA) dos óleos voláteis de espécies de <i>Valeriana</i> .	60
Fig. 3.1	Diagrama pressão <i>versus</i> temperatura o CO ₂ .	66
Fig. 3.2	Local de coleta de <i>V. tajuensis</i> Sobral - localidade Tajuvas - município de Três Cachoeiras – RS.	74
Fig. 3.3	Fluxograma do processo extrativo para talos e folhas de <i>V. tajuensis</i> .	77
Fig. 3.4	Esquema representativo de um processo de extração supercrítica, composto por: cilindro sifonado do solvente, bomba de alta pressão, célula de extração, válvula de descompressão e frasco coletor.	79
Fig. 3.5	Fotografia com vista parcial da unidade de extração com CO ₂ .	79
Fig. 3.6	Curvas cumulativas de retenção e passagem obtidas após a moagem e tamisação dos talos de <i>V. tajuensis</i> .	83
Fig. 3.7	Curvas cumulativas de retenção e passagem obtidas após a moagem e tamisação das folhas de <i>V. tajuensis</i> .	83
Fig. 3.8	Efeito da temperatura e da pressão sob o rendimento da extração dos talos e <i>V. tajuensis</i> com CO ₂ supercrítico.	85
Fig. 3.9	Efeito da temperatura e da pressão sob o rendimento da extração das folhas de <i>V. tajuensis</i> com CO ₂ supercrítico.	84
Fig. 3.10	Efeito da temperatura e da pressão sob o rendimento da extração dos talos de <i>V. tajuensis</i> com C ₃ H ₈ supercrítico.	85

	Pág.
Fig. 3.11	Efeito da temperatura e da pressão sob o rendimento da extração das folhas de <i>V. tajuensis</i> com C ₃ H ₈ supercrítico. 86
Fig. 3.12	Cromatograma dos extratos supercríticos de talos de <i>V. tajuensis</i> com CO ₂ obtidos a 30 °C e 45 °C e 200 atm. 88
Fig. 3.13	Cromatograma dos extratos supercríticos de folhas de <i>V. tajuensis</i> com CO ₂ obtidos a 30 °C e 45 °C e 200 atm. 89
Fig. 3.14	Cromatograma dos extratos supercríticos de talos de <i>V. tajuensis</i> com propano obtidos a 30 °C, 45 °C, 60 °C e 200 atm. 89
Fig. 3.15	Cromatograma dos extratos supercríticos de folhas de <i>V. tajuensis</i> com propano obtidos a 30 °C, 45 °C, 60 °C e 100 atm. 90
Fig. 3.16	Estudo estatístico de formação de Clusters para a comparação dos extratos de SFE com o óleo essencial da <i>V. tajuensis</i> e de <i>V. officinalis</i> . 92
Fig. 3.17	Análise de compostos químicos principais (PCA) dos óleos voláteis de espécies de <i>V. tajuensis</i> e a literatura de HD e SFE de <i>V. officinalis</i> . 93
Fig. 4.1	Equipamento de Soxhlet. 108
Fig. 4.2	Esquema geral de sistemas de aplicação de ondas ultrassônicas no campo da química: (a) banho indireto, (b) banho direto e (c) sonda. 110
Fig. 4.3	(A) Esquema geral do Equipamento e (B) Etapas da extração com líquido pressurizado no sistema ASE. 114
Fig. 4.4	Organograma da condução dos procedimentos para eleição da espécie vegetal e para a seleção de metodologias de extração e análise aplicadas a <i>V. chamaedryfolia</i> , <i>V. glechomifolia</i> e <i>V. tajuensis</i> . 119
Fig. 4.5	Esquema do fracionamento dos extratos das partes aéreas de <i>V. chamaedryfolia</i> , <i>V. glechomifolia</i> e <i>V. tajuensis</i> . 125
Fig. 4.6	Cromatogramas (GC/MS) dos extratos brutos de <i>V. chamaedryfolia</i> originados de quatro formas diferentes de extração. 130
Fig. 4.7	Cromatogramas (GC/MS) dos extratos brutos de <i>V. glechomifolia</i> originados de quatro formas diferentes de extração. 130
Fig. 4.8	Cromatogramas (GC/MS) dos extratos brutos de <i>V. tajuensis</i> originados de quatro formas diferentes de extração. 131
Fig. 4.9	Cromatogramas (GC/MS) dos extratos brutos de <i>V. chamaedryfolia</i> , <i>V. glechomifolia</i> e <i>V. tajuensis</i> originados do modo de extração ultrassônico. 133
Fig. 4.10	Perfil cromatográfico obtido por CDD das frações obtidas por PLC do extrato ultrassônico de <i>V. chamaedryfolia</i> (a), <i>V. glechomifolia</i> (b) e <i>V. tajuensis</i> (c). 136
Fig. 4.11	Cromatogramas (GC/MS) das frações obtidas por PLC a partir do extrato ultrassônico de <i>V. chamaedryfolia</i> . 136
Fig. 4.12	Cromatogramas (GC/MS) das frações obtidas por PLC a partir do extrato ultrassônico de <i>V. glechomifolia</i> . 137
Fig. 4.13	Cromatogramas (GC/MS) das frações obtidas por PLC a partir do extrato ultrassônico de <i>V. tajuensis</i> . 137
Fig. 4.14	Distribuição das frações obtidas para as três espécies de <i>Valeriana</i> em estudo, por cromatografia líquida preparativa (PLC). 138
Fig. A1	Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>Valeriana chamaedryfolia</i> dividido em partes para melhor visualização em (a) Primeira parte; (b) Segunda parte e (c) Terceira parte. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela IV e Identificação dos picos na Tabela IX . 160
Fig. A2	Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>Valeriana eichleriana</i> dividido em partes para melhor visualização em (a) Primeira parte; (b) Segunda parte e (c) Terceira parte. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela IV e Identificação dos picos na Tabela All . 161

Fig. A3	Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>Valeriana eupatoria</i> dividido em partes para melhor visualização em (a) Primeira parte; (b) Segunda parte e (c) Terceira parte. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela IV e Identificação dos picos na Tabela AIII .	162
Fig. A4	Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>Valeriana glechomifolia</i> dividido em partes para melhor visualização em (a) Primeira parte; (b) Segunda parte e (c) Terceira parte. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela IV e Identificação dos picos na Tabela AIV .	163
Fig. A5	Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>Valeriana saricariifolia</i> dividido em partes para melhor visualização em (a) Primeira parte; (b) Segunda parte; (c) Terceira parte e (d) Quarta parte. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela IV e Identificação dos picos na Tabela AV .	164
Fig. A6	Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>Valeriana scandens</i> dividido em partes para melhor visualização em (a) Primeira parte; (b) Segunda parte e (c) Terceira parte. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela IV e Identificação dos picos na Tabela AVI .	165
Fig. A7	Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de <i>Valeriana tajuensis</i> dividido em partes para melhor visualização em (a) Primeira parte; (b) Segunda parte; (c) Terceira parte; (d) Quarta parte e (f) Quinta parte. Condições cromatográficas de acordo com a Tabela IV e Identificação dos picos na Tabela AVII .	166
Fig. A8	Distribuição dos compostos mais abundantes em extratos de SFE de folhas e talos de <i>V. tajuensis</i> comparada a HD e SFE <i>V. officinalis</i> .	176

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tab. 2.I	Constituintes (em peso seco) dos principais grupos de metabólitos secundários em espécies de <i>Valeriana</i> . 22
Tab. 2.II	Estruturas de alguns compostos comuns a óleos voláteis em Valerianaceae 23
Tab. 2.III	Resumo sobre os estudos recentes relacionados aos óleos voláteis obtidos de espécies de <i>Valeriana</i> . 24
Tab. 2.IV	Locais de coleta das espécies de <i>Valeriana</i> . 31
Tab. 2.V	Condições cromatográficas para a análise dos óleos voláteis. 37
Tab. 2.VI	Perda por dessecação da planta <i>in natura</i> e na planta liofilizada. 39
Tab. 2.VII	Massa de material vegetal <i>in natura</i> e liofilizado utilizado nas hidrodestilações. 40
Tab. 2.VIII	Rendimento de óleos voláteis por massa seca para espécies de <i>Valeriana</i> . 41
Tab. 2.IX	Densidades dos óleos voláteis de <i>Valeriana</i> (m/v). 42
Tab. 2.X	Distribuição das classes de compostos encontradas na análise cromatográfica de cada óleo volátil de <i>Valeriana</i> . 43
Tab. 3.I	Propriedades termodinâmicas de fluidos. 67
Tab. 3.II	Solventes mais utilizados na extração supercrítica. 68
Tab. 3.III	Aplicações da extração com fluido supercrítico em plantas medicinais. 70
Tab. 3.IV	Condições de extração para folhas e talos de <i>V. tajuensis</i> com os fluidos supercríticos CO ₂ e propano. 80
Tab. 3.V	Perda por dessecação da planta liofilizada. 81
Tab. 3.VI	Distribuição granulométrica do material vegetal de <i>V. tajuensis</i> . 82
Tab. 3.VI	Rendimento das extrações de <i>V. tajuensis</i> empregando CO ₂ como solvente. 84
Tab. 3.VII	Rendimento das extrações de <i>V. tajuensis</i> empregando C ₃ H ₈ como solvente. 84
Tab. 3.VIII	Compostos presentes nos extratos SFE de <i>V. tajuensis</i> . 91
Tab. 4.I	Resumo da literatura existente sobre a aplicação de ultrassom na extração de vegetais. 111
Tab. 4.II	Resumo da literatura existente sobre a aplicação da extração com líquido pressurizado (PLE/ASE) a plantas. 115
Tab. 4.III	Comparação entre métodos de extração para matrizes vegetais. 116
Tab. 4.IV	Resumo da literatura existente sobre a aplicação da cromatografia gasosa na quantificação de compostos em espécies de <i>Valeriana</i> . 117
Tab. 4.V	Descrição aparelhos e equipamentos. 120
Tab. 4.VI	Parâmetros e condições cromatográficas utilizadas na análise dos extratos por GC/MS. 126
Tab. 4.VII	Rendimento em percentual de massa seca para espécies de <i>Valeriana</i> . 128
Tab. 4.VIII	Diferença entre médias dos tratamentos extrativos aplicados às espécies de <i>Valeriana</i> , segundo a ANOVA. 128
Tab. 4.IX	Compostos identificados nos extratos de espécies de <i>Valeriana</i> nos extratos totais obtidos por USE. 131
Tab. 4.X	Rendimentos dos extratos obtidos por cromatografia líquida em coluna preparativa das espécies de <i>Valeriana</i> . 135
Tab. I A	Identificação dos picos apresentados na Figura A1 , para os óleos essenciais de ramos e folhas de <i>V. chamedryfololia</i> . Numeração apresentada na Figura A1 . 166
Tab. II A	Identificação dos picos apresentados na Figura A2 , para os óleos essenciais de ramos e folhas de <i>V. eichleriana</i> . Numeração apresentada na Figura A2 . 168

Tab. III A	Identificação dos picos apresentados na Figura A3 , para os óleos essenciais de ramos e folhas de <i>V. eupatoria</i> . Numeração apresentada na Figura A3 .	169
Tab. IV A	Identificação dos picos apresentados na Figura A4 , para os óleos essenciais de ramos e folhas de <i>V. glechomifolia</i> . Numeração apresentada na Figura A4 .	171
Tab. V A	Identificação dos picos apresentados na Figura A5 , para os óleos essenciais de ramos e folhas de <i>V. saricariifolia</i> . Numeração apresentada na Figura A5 .	172
Tab. VI A	Identificação dos picos apresentados na Figura A6 , para os óleos essenciais de ramos e folhas de <i>V. scandens</i> . Numeração apresentada na Figura A6 .	173
Tab. VII A	Identificação dos picos apresentados na Figura A7 , para os óleos essenciais de ramos e folhas de <i>V. tajuensis</i> . Numeração apresentada na Figura A7 .	174
Tab. VIII A	Identificação dos picos relacionados à composição dos extratos obtidos por SFE de talos e folhas de <i>V. tajuensis</i> em diferentes condições de T e P.	177

GLOSSÁRIO

Droga vegetal	Material vegetal <i>in natura</i> .
Extrato padronizado	Extrato padronizado em um composto quantificável.
Extrato fluido	È o extrato onde o solvente é evaporado até que a concentração do princípio ativo marcador seja similar aquele encontrado na droga vegetal de origem.
Extratos secos	São obtidos através da evaporação do solvente e tem uma consistência similar a um pó. Apresentam uma concentração muito superior de princípio ativo do que a droga vegetal original. Estabilidade na ausência de umidade.
Forma farmacêutica	È a forma com que se entrega o medicamento ao paciente (comprimidos, cápsulas, drágeas, loções...).
Fórmulas farmacêuticas de fitofármacos	Conhecimentos e técnicas de fabricação de medicamentos preparados a partir de substâncias ativas aplicáveis aos produtos naturais.
Farmacógeno	Parte do vegetal que contém a maior concentração dos princípios ativos.
Tintura mãe	São preparações líquidas resultantes da ação de dissolventes ou de extratores de um insumo inerte hidroalcoólico sobre uma droga vegetal. Sua representação gráfica é TM ou Δ .
Preparado fitoterápico intermediário	Extratos secos padronizados em um composto ou família de compostos marcadores químicos de qualidade.
Princípio ativo	Substância química ou conjunto de substâncias responsáveis pela atividade farmacológica.

RESUMO

A importância dos estudos sobre as espécies de *Valeriana* brasileiras tem sido estimulada para se obter quantidades viáveis de compostos fitoterápicos que possam ser economicamente explorados. Neste trabalho procedeu-se ao estudo da composição química de dos óleos voláteis obtidos por aparelho modificado de Clevenger de sete espécies de *Valeriana* (*V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. salicariifolia*, *V. scandens* e *V. tajuensis*.) usando-se a Cromatografia Gasosa (com detectores de ionização por chama e espectrometria de massas) aliada ao uso de padrões e dos Índices de Retenção de Kovatz. Foram identificados 243 compostos. Três espécies de *Valeriana* tiveram mais de 92 % dos compostos identificados e duas outras espécies, 86 %. Os resultados foram comparados com os dados apresentados para *V. officinalis* L. Foi estabelecida a separação em dois grupos pela correlação do conjunto de variáveis multivariadas e a análise de componentes principais (PCA) selecionou os compostos que contribuíram significativamente para o agrupamento ou dispersão de espécies *Valeriana*. Também foram realizadas extrações com fluido supercrítico (SFE) para a espécie *V. tajuensis*, usando dois solventes extratores (CO₂ e propano). O rendimento percentual obtido na SFE foi superior ao do hidrodestilado (cleavenger). Houve a detecção de compostos ainda não relatados para a espécie, como a vitamina E, o γ -tocoferol, esqualeno e estigmasterol. A partir do levantamento estatístico das espécies de maior similaridade química, foram estabelecidos estudos relacionados à extração por maceração (EMAC), extração por Soxhlet (ESOX), extração por ultra-som (USE) e a extração acelerada por solventes (ASE) empregando a mistura solvente etanol:água (70:30 - v/v) para três espécies (*V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis*) tendo o ultra-som apresentado melhores resultados, evidenciando a presença de 49 diferentes compostos entre eles polissacarídeos, aminoácidos, monoterpenos, sesquiterpenos, catequina, cumarina, flavona, valepotriato e amidas. A Cromatografia Gasosa foi a ferramenta fundamental na análise de óleos e extratos.

ABSTRACT

The importance of studies on the species of Brazilian *Valeriana* has been encouraged to obtain viable quantities of phytotherapeutic compounds that can be economically exploited. This work was carried out to study the chemical composition of volatile oils obtained by the modified Clevenger apparatus of seven species of *Valeriana* (*V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. salicariifolia*, *V. scandens* and *V. tajuvensis*) using the gas chromatography (with flame ionization and mass spectrometry detection) coupled with the use of standards and Kovatz Retention Indices. We identified 243 compounds. Three species of *Valeriana* had more than 92 % of the identified compounds and two other species, 86 %. The results were compared with data presented for *V. officinalis* L. Statistically, it was possible to separate them into two groups by correlating the set of variables and multivariate principal component analysis (PCA) selecting the compounds that contributed significantly to the clustering or dispersion of *Valeriana* species. It was also performed the supercritical fluid extraction (SFE) of the *V. tajuvensis* using two solvent extractors (CO₂ and propane). The yield obtained in SFE was higher than those obtained by hydro-distillation (cleavenger). In these extracts it was achieved some compounds that were not yet reported, such as vitamin E, α -tocopherol, squalene and stigmasterol. From the statistical evaluation of the chemical species, it was established studies on the extraction by maceration (EMAC), Soxhlet (ESOX), ultrasonic (USE) and accelerated solvent (ASE) using a mixture of solvents (ethanol:water - 70:30 v/v) for three species (*V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* and *V. tajuvensis*). The ultrasound extraction presented better results, showing the presence of 49 different compounds including polysaccharides, amino acids, monoterpenes, sesquiterpenes, catechines, coumarines, flavones, valepotriates and amides. The gas chromatography was the key tool in the analysis of these oils and extracts.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

I PANORAMA GERAL

A matriz que cria, modela, produz e acumula compostos orgânicos de estrutura inédita é sem dúvida “*A Natureza*”. Deste manancial pode-se então extrair substâncias com ações terapêuticas para o homem, mas que às vezes podem apresentar toxicidade sobre organismos vivos. As estruturas complexas, sofisticadas e especializadas devem ser testadas, nos dois âmbitos: “ação biológica e toxicidade”, a fim de serem selecionadas aquelas capazes de preencher os requisitos de “protótipos ou modelos” no desenvolvimento de fármacos eficazes e seguros [1;2; 3;4].

A contribuição do “*Reino Vegetal*” tem sido muito significativa na descoberta de novos medicamentos. Isto se dá porque existe uma grande diversidade de indivíduos que detêm capacidade de síntese e armazenamento de energia, transformando-a em metabólitos ativos. Portanto, o *material vegetal* é um biorreator capaz de realizar reações químicas à temperatura ambiente, utilizando energia natural (iluminação solar...), com maquinaria especializada (enzimas), precursores previamente selecionados (constituintes do solo), caminhos de reação (mecanismos adaptáveis) e em instalações renováveis: o próprio vegetal. Ele realiza reações basais para a manutenção da vida, mas também pode manter a síntese de metabólitos especializados [4;5;6].

A busca de substâncias inéditas tem como objetivo suprir a carência de medicamentos que amenizem ou levem a cura do câncer, da HIV/AIDS, da doença de Alzheimer, das doenças tropicais parasitárias como malária, doença de Chagas, além o alívio da dor. Atualmente existe um número considerável de medicamentos de origem vegetal submetidos a testes clínicos. Despontam compostos como o paclitaxel, os derivados e análogos da camptotecina, artiter, galantamina e tiotropium que se encontram sob investigação clínica em fases II e III [7;8]. As investigações em medicamentos de origem vegetal foram extremamente impulsionadas pela descoberta de medicamentos eficazes contra o câncer. O taxol, a vimblastina, a vincristina e a camptotecina têm atividade comprovada contra o câncer. O uso destas substâncias influencia positivamente a recuperação dos pacientes nos tratamentos de vários tipos de câncer.

O químico-farmacêutico procura nestas fontes naturais, quase inesgotáveis, compostos com potencial terapêutico e para isto, direciona seus estudos para as relações entre as formas e as condições de extração, os procedimentos para o isolamento, a caracterização e o desenvolvimento de métodos de síntese. Também desenvolve técnicas de qualificação e quantificação química que possuam capacidade de avaliar a presença de marcadores químicos a serem empregados como padrão de qualidade. Os compostos selecionados serão submetidos a testes para elucidação da ação farmacológica e seleção dos níveis terapêuticos e dos níveis tóxicos. Cumprida a etapa e aprovado o uso da substância, prossegue-se para a viabilização da produção do vegetal escolhido em maior escala, ou a investigação da síntese parcial ou total do composto ou conjunto de compostos, a fim de se estabelecer a forma farmacêutica para se prever a liberação deste novo princípio ativo no local de ação ^[1;4;9].

O investimento nestes novos fármacos determina a melhoria da qualidade de vida em doenças crônicas, ou, ainda, da própria sobrevivência do paciente afetado. Além disto, do ponto de vista ecológico, a descoberta de fármacos de origem vegetal é um forte argumento conservacionista para o reforço das políticas de proteção ao patrimônio de fauna e flora do planeta terra ^[4;5;9;10]. As florestas de climas tropicais e subtropicais, incluindo a floresta Amazônica e a Mata Atlântica estão em evidência nas pesquisas nacionais e internacionais, também são alvos da biopirataria de grupos inescrupulosos ^[11]. A exploração controlada dos recursos naturais abre inúmeras oportunidades de pesquisa. Modelos internacionais de estudos relacionados à biodiversidade de fauna e flora foram instituídos pela Índia, que detém recursos genéticos ricos, além de um amplo conhecimento popular tradicional sobre o emprego das plantas nativas ^[8].

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) ratificam a importância das pesquisas em fontes vegetais. Estes levantamentos descrevem que 30 % dos medicamentos prescritos são derivados ou foram inspirados em substâncias derivadas de plantas superiores e que 20 % dos 281 fármacos considerados essenciais originaram-se exclusivamente de vegetais ^[13].

Carvalho e colaboradores ^[14] relataram que no Brasil o mercado de fitoterápicos movimenta US\$ 160 milhões do faturamento da indústria farmacêutica crescendo numa proporção de 15 %. A cadeia produtiva envolvendo o setor fitoterápico movimenta anualmente cerca de R\$ 1 bilhão por ano. Em contraponto a estes números, apenas 8 % das espécies vegetais da flora brasileira foram estudados e 1.100 espécies vegetais submetidas à avaliação das propriedades medicinais ^[14;15], sendo registrados na MS-ANVISA (Ministério da Saúde – Agência Nacional de Vigilância Sanitária) 80 medicamentos fitoterápicos em associação e 432 na forma simples, ou seja, contendo somente uma planta com liberação para a exploração e a comercialização ^[16;17;19]. O Governo Federal Brasileiro através do MS estuda a viabilidade de empregar 71 espécies de vegetais, no SUS Sistema Único de Saúde a fim de estimular o desenvolvimento de fitofármacos pela indústria nacional ^[19].

II ESTUDO DIRECIONADO À MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

O estudo relacionado aos metabólitos vegetais se divide em dois grandes grupos: *metabólitos primários* e *metabólitos secundários*. Os primeiros são compostos essenciais à sobrevivência das espécies vegetais e animais e os últimos são substâncias resultantes da biossíntese especializada a partir dos próprios metabólitos primários. As funções dos metabólitos secundários nos vegetais são diversas e entre elas, está a função de defesa especializada contra predadores. Também podem exercer atividades alelopáticas na polinização ^[2;4;18-20]. Ressalta-se que a biossíntese do metabolismo secundário é específica para cada classe de compostos especializados e é estimulada ou ativada em função da adaptação do vegetal ao meio ambiente e às condições edáficas. A síntese e o acúmulo dos metabólitos são influenciados pela qualidade, diversidade e quantidade de substratos absorvidos, assim como os tipos de hormônios aplicados ao crescimento e ao desenvolvimento do vegetal ^[4;20;21].

Entre as diferentes estratégias adotadas para a seleção de compostos bioativos têm-se ^[9;22-25]:

- a) a escolha do vegetal a partir de relatos etnofarmacológicos populares;
- b) a escolha a partir da descrição da presença de uma substância “alvo” similar em outras espécies da família;
- c) através de um “*screening*” químico geral da planta empregando-se diferentes formas de extração.

Os estudos para a seleção do melhor método e as melhores condições de extração devem levar em conta a classe de composto alvo, a viabilidade econômica e a quantidade de resíduo seco enriquecido com o princípio ativo, assim como o impacto ambiental dos restos de extração [24;25].

A composição química das espécies de *Valeriana* tem sido estudada desde o final dos anos 60, visando à produção de medicamentos para o equilíbrio e manutenção das funções relacionadas ao SNC (Sistema Nervoso Central). Pesquisadores constataram a presença de óleos voláteis, valepotriatos (iridoides não glicosilados), iridoides glicosilados, alcaloides, flavonoides, taninos, entre outros constituintes [26-31]. A literatura relata a identificação de compostos pertencentes à classe dos aminoácidos, ácidos carboxílicos, carboidratos, entre outras substâncias de menor importância para o SNC [4;20;32-35].

O emprego medicinal dos rizomas e raízes de *Valeriana* sp é relatado desde o século V a.C., pois, na Grécia, essa espécie era empregada em problemas digestivos que incluíam flatulência e náuseas. Os extratos aquosos foram empregados em infecções do trato urinário, em cólicas menstruais, como antiperspirante, como antídotos para venenos e em infecções vaginais provocadas por fungos [36-38]. Os extratos também apresentaram atividades antiespasmódicas [39], hipnóticas, sedativas, tranquilizantes, tônicas e estimulantes e anticonvulsivantes. Atualmente o principal uso é como sedativo e ansiolítico leve [34;40-45]. Pesquisas recentes, realizadas por Circosta e colaboradores [46], chegaram à conclusão de que os extratos preparados com raízes de *V. officinalis* podem ser auxiliares empregados na prevenção e na cura de doenças cardiorrespiratórias. Os testes realizados demonstraram ações inibitórias sobre os espasmos em coronárias

e brônquios alveolares. Além destas ações farmacológicas controlaram o aumento da pressão arterial através do bloqueio dos canais de cálcio o que confere a estes extratos propriedades moduladoras sobre o sistema cardiovascular.

Os primeiros metabólitos secundários estudados na família Valerianaceae foram os óleos voláteis ^[47-58], seguidos dos iridoídeos não glicosilados (diterpenos - valepotriatos) ^[59-63], frequentemente citados como substâncias sedativas e ansiolíticas com vantagens de não causarem dependência química.

A estrutura química dos valepotriatos não têm semelhança alguma com compostos benzodiazepínicos que são medicamentos ansiolíticos e antidepressivos eleitos na terapêutica dessas enfermidades ^[40;64-72]. A literatura descreve ainda a efetividade do uso de medicamentos fitoterápicos de extratos de *V. officinalis* na substituição e retirada do uso de benzodiazepínicos. Vários pacientes relataram uma atenuação dos efeitos colaterais provocados pela retirada dos benzodiazepínicos pela diminuição da agitação excessiva, da boca seca, da ansiedade e da perda do sono ^[43;44; 67;68;73].

Dezessete espécies de Valerianaceae foram identificadas no Brasil. O estado do Rio Grande do Sul é aquele que conta com a maior diversidade de espécies, sendo contemplado com a presença de doze espécies ^[74].

No início dos anos 90 um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul se propôs a estudar a composição química das espécies de *Valeriana* a fim de tentar identificar aquela(s) que pudessem ser exploradas economicamente ^[75].

Os estudos de Salles e colaboradores ^[76] descreveram a presença de valepotriatos diênicos e monoênicos na espécie *V. glechomifolia* Meyer. Em seguida, Silva e colaboradores ^[75] propuseram a quantificação de quatro valepotriatos isolados de *V. glechomifolia*: acevaltrato, diavaltrato, dihidrovaltrato e valtrato em nove espécies rio-grandenses empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Salles e colaboradores ^[76] propuseram a viabilização do desenvolvimento biotecnológico de culturas de calos e de cultivos micropropagados (*in vitro*), a partir de *V. glechomifolia* Meyer. Foram selecionados os meios de cultivo e as condições edáficas que permitiram o acúmulo e manutenção da produção de valepotriatos, tanto pelo cultivo de calos como pelas plantas micropropagadas.

Recentemente foi proposta a adaptação de cultivos micropropagados de *V. glechomifolia* à terra ^[76]. Entretanto, a literatura especializada não traz nenhum estudo relacionado à constituição de compostos voláteis ou de qualquer outro composto nas espécies do Rio Grande do Sul.

III OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo estudar a composição química de espécies de *Valeriana* do Estado do Rio Grande do Sul (*V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. saricariifolia*, *V. scandens* e *V. tajuvensis*), empregando métodos extrativos e técnicas analíticas cromatográficas a fim de estabelecer comparações com a composição apresentada pela espécie *V. officinalis*, que tem o uso tradicional medicinal consagrado.

IV OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar, identificar e quantificar os principais componentes dos óleos voláteis de *V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. saricariifolia*, *V. scandens* e *V. tajuvensis*, obtidos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado comparando estatisticamente os dados com os da literatura para *V. officinalis*;
- Estabelecer as melhores condições extrativas para partes aéreas da espécie arbustiva *V. tajuvensis* Sobral, com fluido supercrítico (SFE: do inglês “*Supercritical Fluid Extraction*”) empregando-se os fluidos CO₂ e propano.

- Caracterizar os extratos obtidos quantitativamente e qualitativamente estabelecendo a composição de componentes químicos e os comparando com os dados da literatura para *V. officinalis*;
- Comparar o rendimento obtido e o tipo de constituintes obtidos das partes aéreas provenientes de *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis* quando extraídas pelos métodos clássicos: maceração e extração por Soxhlet e por ultrassom e com líquido pressurizado, empregando a mistura extratora etanol:água (70:30 v/v) como solvente extrator;
- Selecionar o melhor método de extração e proceder ao fracionamento do extrato de *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis* visando identificar compostos ou classes de compostos que possam ter alto valor comercial a ser agregado ao mesmo para a manufatura de medicamentos e ou de alimentos.

V DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Para facilitar a compreensão do trabalho e tornar mais didática a sua apresentação, esta Tese foi dividida em capítulos contendo aspectos teóricos, experimentais, resultados e conclusões a cerca do tema discutido em cada capítulo. Ao final faz-se uma conclusão geral do trabalho.

Os capítulos serão assim divididos:

Capítulo 1: Referencial Bibliográfico

Capítulo 2: Estudo dos Óleos Voláteis em Sete Espécies de *Valeriana*

Capítulo 3: Extração com Fluido Supercrítico Aplicada ao Estudo de Espécie *Valeriana tajuensis*.

Capítulo 4: Extração por Maceração, Soxhlet, Ultrassom e Líquidas Pressurizadas aplicadas ao Estudo de três Espécies de *Valeriana*.

Capítulo 5: Considerações Finais

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL

BIBLIOGRÁFICO

1.1 FAMÍLIA VALERIANACEAE BATSCH

Desde a Antiguidade os extratos de rizomas e raízes de *V. officinalis* L. têm sido empregados no tratamento de várias moléstias. A droga vegetal foi usada pela primeira vez como sedativo na metade do século XVIII. Atualmente dentre as inúmeras espécies da família Valerianaceae, a *V. officinalis* é aquela cultivada em grande escala e empregada industrialmente como matéria-prima no norte da Europa^[77].

As pesquisas relacionadas às substâncias ativas em *Valeriana* têm levado ao isolamento e identificação de várias classes de compostos que detêm ação farmacológica diferenciadas. Os relatos sobre as primeiras investigações químicas referem-se à extração e isolamento de óleos voláteis e são constituídos de sesquiterpenos e ácidos graxos^[68]. Logo após foram isolados os valepotriatos, substâncias de potencial sedativo, que pertencem ao grupamento dos iridoides não glicosilados^[76;77].

No Brasil a matéria-prima Valeriana, *V. officinalis*, é importada e distribuída como matéria-prima para a manipulação de fórmulas farmacêuticas e na fabricação de drágeas comercializadas como o nome de Valmane[®] e Valeriane[®]. As duas especialidades farmacêuticas são fabricadas com extratos padronizados em óleos voláteis e em valepotriatos^[75;76].

1.1.1 Taxonomia da família Valerianaceae

Cronquist^[78] e Gunn e colaboradores^[79] relataram que a família Valerianaceae Batsch possui entre 9 a 13 gêneros e abrangendo *Valerianella* Miller, *Centranthus* DC., *Nardostachys* DC. e *Valeriana* L. O número de espécies estimadas para este gênero está em torno de 350 (trezentas e cinquenta) espécies. Os indivíduos da família se distribuem em regiões temperadas e podem ocorrer no noroeste da América do Sul ao longo dos Andes, onde se apresentam em grande diversidade.

As três espécies *V. officinalis*, *V. wallichii* DC. e *V. edulis* Meyer são as mais importantes e tem um papel farmacológico consolidado^[20;35]. Dezessete espécies

brasileiras foram descritas e pertencem ao gênero *Valeriana* [74;80;81]. Há relatos da presença de doze (12) espécies nativas no estado do Rio Grande do Sul [74], entre essas *V. chamaedryfolia*, *V. catharinensis*, *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. saricariifolia*, *V. scandens*, *V. reitzania*, *V. tajuvensis* e *V. ullei* [74].

1.1.2 Estudos farmacológicos relacionados à família Valerianaceae

Na Grécia e Roma antigas os extratos aquosos de *V. officinalis* L. eram prescritos como analgésico, diurético e como antiespasmódico. No século XVII foram usados no tratamento da epilepsia. Nesta mesma época eram usados como digestivos por possuir ação carminativa e na redução da flatulência e da ocorrência de náuseas, além de relatarem o uso para a diminuição de cólicas menstruais, em infecções urinárias e vaginais (antifúngico). O uso desde antiperspirante até como antídotos para picadas de cobras [37]. Entretanto, o principal uso se difundiu no século XVIII como sedativo leve [47;82-84].

Os extratos preparados com os órgãos subterrâneos das espécies do gênero *Valeriana*, assim como os do gênero *Nardostachys*, são usados na medicina tradicional de culturas como a Chinesa, Mexicana e Alemã visando à sedação e à indução do sono. *V. officinalis* é a espécie mais comumente usada no norte da Europa. Detém o status de estar descrita em Farmacopeias Oficiais, sendo o principal ingrediente de muitos fitofármacos. Esta planta é consideravelmente pesquisada, no que tange a se estabelecer às bases da atividade farmacológica. O que tem sido demonstrado pelo grande número de estudos realizados com animais e em estudos clínicos em humanos [40; 42;45; 65; 68; 84;85].

De forma geral o uso terapêutico dos óleos voláteis tem sido descrito desde a “Antiguidade”. As misturas de ervas e de aromas são utilizadas na medicina chinesa, tendo como prerrogativa a ação bactericida, antioxidante, antiprotozoária e muitas vezes são relatadas ações ansiolíticas e miorelaxantes. O uso mais comum tem sido na forma de condimentos associados à higiene e conservação de alimentos. Atualmente os óleos voláteis são usados como aromatizantes, edulcorantes, odoríferos em perfumaria e indústrias alimentícias e farmacêuticas [2;33;86-88].

Cerca de um terço da atividade farmacológica de extratos de *Valeriana* tem sido atribuída diretamente aos compostos voláteis sendo imputada a planta tanto atividades sedativas e miorelaxantes ^[40;65;67;68;89-94].

Os constituintes dos óleos voláteis são variáveis devido às diferenças genéticas das populações e dos fatores ambientais e de cultivo. O constituinte majoritário, valeranol, era tido como o responsável pela atividade sedativa dos extratos de *V. officinalis* ^[95]. Como é característico desta espécie, há outros tipos de sesquiterpenos. Muitos compostos como quessano, quessanol, valeranol, valeranona, canocanol, criptofauronol têm demonstrado uma ação direta sobre as amídalas localizadas no sistema nervoso central (SNC) ^[51-54].

Hendriks e colaboradores ^[96] observaram que compostos voláteis como o ácido valerênico e o valeranal provocaram decréscimo na atividade motora e produziram ataxia em camundongos, o que sugere uma pretensa ação sedativa. Para o ácido valerênico foram descritos efeitos não específicos centrais, através da administração intraperitoneal em ratos, em doses de 100 mg kg⁻¹. Esses resultados foram obtidos a partir dos testes realizados no equipamento Rotarod[®] e do teste de tração animal. A atividade de locomoção espontânea destes ratos foi reduzida pela administração de dose de 50 mg kg⁻¹. A dose provocou um aumento do tempo de sono induzido por barbitúricos (BARB).

O ácido valerênico na dose de 60 mg kg⁻¹ reduziu a atividade locomotora. Nas doses acima de 400 mg kg⁻¹ causou hemorragia, convulsão e morte ^[41]. Hiller e Zetler ^[97] testaram o efeito antipicrotoxina do ácido valerênico contido em extratos aquosos de *V. officinalis*. Os resultados demonstraram a promoção do efeito anticonvulsivante em ratos pela antagonização à picrotoxina com doses de 0,5-0,8 mg kg⁻¹. O ácido valerênico tem demonstrado inibir a indução enzimática do GABA (do inglês *Gama Amine Butiric Acid*) sobre o SNC, resultando em sedação ^[73;96;98;99]. Estudos realizados no Japão mostraram que dois compostos isolados de *V. wallichii* (monoacetato de quessoglicol e diacetato de quessoglicol) aumentaram a anestesia induzida por hexobarbital ^[100;101]. A atividade do diacetato de quessoglicol foi atribuída ao efeito inibitório sobre o SNC, entretanto, o composto não inibiu a ação sobre a indução de úlcera por estresse.

Várias formas farmacêuticas têm sido padronizadas em ácido valerênico e demonstraram sedação com dose dependente em administração oral. A redução da motilidade e o aumento do sono induzido por tiopental foram parâmetros de avaliação do extrato que foi comparado com a ação do diazepam e a clorpromazina. Os extratos demonstraram somente poucas propriedades anticonvulsivantes ^[102].

Óleos voláteis de raízes de *Valeriana* e alguns compostos (isoborneol, acetato de bornila e acetato de isobornila) são usados em aromaterapia o que sugere um efeito sedativo pela inalação destes monoterpenos. A evidência formal foi comprovada somente em animais ^[103].

Estudos realizados com alguns compostos voláteis como a valeranona, extraídos de *V. officinalis* e de *Nardostachys jatamansii* DC., demonstraram ação hipotensora em ratos nas doses de 5 mg kg⁻¹. Nas doses maiores do que 100 mg kg⁻¹, verificou-se uma potencialização na queda da temperatura com perda de coordenação motora. Além disso, nesta dose, houve proteção contra úlceras provocadas por estresse ^[41;65].

Alguns alcaloides retirados de *V. officinalis* apresentaram o mesmo efeito dos óleos voláteis quando testados em ratos, entretanto, foram encontrados em baixa concentração nas plantas analisadas ^[26;27;104;105].

Os valepotriatos, monoterpenos não voláteis, foram um dos primeiros compostos a serem isolados em 1966. Konowa e colaboradores ^[60] descreveram quimicamente as propriedades quirais e óticas dos valepotriatos. Eles contribuem de forma global para a atividade farmacológica por possuírem ação sedativa sobre o SNC, entretanto os mecanismos fisiológicos ainda não estão totalmente esclarecidos.

Alguns estudos de Santos e colaboradores ^[98;99] e Dietz e colaboradores ^[105] começaram a esboçar os testes para mapear a ação dos valepotriatos como inibidores do GABA ^[106;107] ou agonistas parciais do receptor 5-HT_{5a}. Os valepotriatos têm sido aplicados nas desordens psicossomáticas e psicovegetativas especialmente no caso de inquietações, ansiedade e tensão ^[108].

Atualmente, as preparações contendo *Valeriana* têm sido usadas no tratamento de neurastenias leves e estresse emocional. Os valepotriatos agem como pró-fármacos e são transformados em homobaldrinal. Este último tem reduzido espontaneamente a motilidade de ratos ^[109]. Wagner e Jurcic ^[110] demonstraram a ação antiespasmódica de valepotriatos sobre o músculo liso de porcos da Índia. O decréscimo na mobilidade de ratos também foi relatado por colaboradores ^[111]. O efeito espasmolítico dos valepotriatos sobre músculos de porcos foi comprovado por Hazelhoff e colaboradores ^[70-72]. Kohnen e colaboradores ^[112] descreveram os efeitos farmacológicos da associação do propranolol com extratos de *Valeriana*.

Leathwood e colaboradores ^[84] realizaram estudos relacionados ao aumento da qualidade do sono em humanos com extratos aquosos de *V. officinalis*. Fink e colaboradores ^[113] evidenciaram as mudanças nos sinais do eletroencefalograma (EEG) quando submeteram ratos à presença de valepotriatos. A diminuição da atividade locomotora também foi constatada após a administração de valepotriatos ^[111;114]. Em um estudo neurofisiológico realizado com gatos foram administrados valepotriatos e extratos de *V. officinalis*. Não ocorreram mudanças nos sinais do EEG, entretanto, foi evidenciado efeito sedativo. O tônus muscular dos animais tratados tornou-se relaxado ^[115-116]. Contraditoriamente Grusla e colaboradores ^[117] e Krieglstein e Grusla ^[118] comprovaram que os valepotriatos, o ácido valerênico e a valeranona, assim como os óleos voláteis, não deprimem o SNC, isso porque as substâncias não foram encontradas para a indução da redução do “*turn over*” de glicose em cérebros de rato.

A mistura comercial de valepotriatos contendo 80 % de dihidrovaltrato, 15 % de valtrato e 5 % de acevaltrato produziu ação espasmolítica mais intensa do que a observada com doses semelhantes de papaverina. Estudos posteriores revelaram que o isovaltrato, valtrato e dihidrovaltrato possuem um mecanismo de ação que influencia a entrada ou a ligação de Ca^{+2} no músculo e, desta forma, foram classificados como agentes musculotrópicos. A mistura acima também tranquilizou camundongos, via oral, na dose de 31 mg kg⁻¹. Gatos tiveram um decréscimo na insônia, na ansiedade e na agressividade com doses similares ^[41; 65].

Estudos têm demonstrado que extratos aquosos de raízes e rizomas de *V. officinalis* contêm quantidade apreciável de GABA. Isto pode ser a causa direta da sedação. Contudo há muita controvérsia em torno da biodisponibilidade via oral deste aminoácido. No mesmo estudo foram descritas as presenças de lignanas e hidroxipinoresinol que têm habilidade de se ligar aos receptores benzodiazepínicos (BDZs) ^[41].

Oshima e colaboradores ^[119] descreveram a atividade antidepressiva dos extratos metanólicos de raízes de *V. faurei* em ratos. Os extratos fracionados foram monitorados para se saber qual o composto ativo, o álcool α -quessílico. Também foram avaliados os testes sobre a atividade antidepressiva dos sesquiterpenoides guaiano e valerano.

Stevinson e colaboradores ^[69] fizeram o levantamento sobre nove estudos realizados em humanos, empregando placebo como controle e triagem realizada por duplo cego, a partir da aplicação de preparações farmacêuticas simples de *V. officinalis*. Obtiveram resultados controversos no que tange a promoção do sono por esta planta quando os dados foram tratados de forma estatística. Não há evidências conclusivas da ação dos extratos de *Valeriana*, sendo necessário realizar-se uma triagem rigorosa com novos estudos para verificar se a induz ao sono.

Marder e colaboradores ^[30] isolaram o composto 6-metilapigenina de *V. wallichii*. Provaram que este composto se liga aos receptores dos benzodiazepínicos (BDZ), sugerindo ser este o flavonoide responsável pela ação ansiolítica. Fernández e colaboradores ^[31] testaram as propriedades ansiolíticas do flavonoide linarina isolado de extratos de raízes de *V. officinalis* atribuindo também a esse composto, parte da atividade farmacológica desta espécie. Em 2005 ^[121] os mesmos pesquisadores compararam o efeito da resperidina, flavonoide presente em extratos de *V. officinalis*, com o diazepam. Fernández e colaboradores ^[122] descreveram ação de flavonoides glicosilados sobre o SNC. Relacionaram os efeitos da resperidina e da lignarina, isolados de *V. officinalis*, com os obtido por 2S-neoresperidina, 2S-naringina, diosmina, gossipina e rutina que detêm efeito depressor sobre o SNC. Dietz e Mahady ^[105] estudaram a performance de extratos de *V. officinalis* contendo

metabólitos fixos e voláteis, contra o ácido valerênico, sobre os receptores melatonina, GABA_A e subtipos como a 8-serotonina. Descreveram a forte afinidade de extratos apolares (éter de petróleo e diclorometano), preparados com raízes de *V. officinalis*, com os receptores 5-HT_{5a} (serotonina) no núcleo supraquiasmático cerebral.

Simmen e colaboradores ^[107] estudaram as mudanças metabólicas ocorridas sobre hepatócitos quando incubados com extratos frescos de *V. officinalis* e *Hypericum perforatum* realizando o monitoramento fitoquímico e farmacológico através de HPLC. A análise quantitativa por HPLC dos extratos de hepatócitos contendo *Valeriana* revelou considerável atividade metabólica de sesquiterpenos e dos iridoides ocorrendo a O-acetilação. Testaram a ação inibitória sobre os receptores GABA *in vitro* com a forma ácida dos valepotriatos. Comprovaram que há uma extensa metabolização dos valepotriatos quando isolados, sem demonstrar uma inibição significativa sobre o GABA. Entretanto, ao serem testados juntos quando testados juntos, o ácido valerênico e os valepotriatos demonstraram atividade efetiva sobre a inibição dos efeitos cerebrais causados pelo GABA.

Hattesoehl e colaboradores ^[72] prepararam vários testes aplicados a camundongos e ratos, empregando três tipos diferentes de extratos comerciais de *V. officinalis* com a finalidade de dirimir os questionamentos sobre qual a verdadeira ação sobre o SNC dos extratos de *Valeriana*. Entre esses, a extração com os solventes: metanol 45 % (m/m) e etanol 70 % de (v/v), além extrato etanólico refinado 35 % (v/v) registrado como Phytofin Valerian 368. Os testes selecionados foram os de atividade sedativa, atividade locomotora e anestesia induzida por éter, para atividade ansiolítica - cruz elevada (plus-maze). Usou-se o nado forçado (Porsol) e o teste da armadilha horizontal para testar as propriedades antidepressivas e miorelaxantes. Nenhum dos extratos de *Valeriana* mostrou efeito sedativo nas doses 500 e 1000 mg kg⁻¹. Nenhuma atividade espontânea de locomoção foi reduzida e nenhum aumento na narcose induzida por éter foi evidenciado. Entretanto, numa dose em torno de 100–500 mg kg⁻¹, os resultados obtidos na cruz elevada revelaram um pronunciado efeito ansiolítico dos extratos metanólicos 45 % (m/m) e etanólicos 35 % (v/v), assim como com o Valerian 368.

Adicionalmente e diferente do extrato primário (35 % v/v) Phytofin Valerian 368 mostrou ação antidepressiva no teste de nado forçado depois de um tratamento subagudo. Os efeitos miorelaxantes não foram observados nas doses acima de 1000 mg kg⁻¹. Devido a esses dados, a proposta atual é a de que os extratos de *Valeriana* não sejam sedativos, mas sim, contenham atividade tanto ansiolítica e como antidepressiva, o que contribui para as propriedades de indução ao sono por *Valeriana*, em particular o extrato elaborado da Phytofin Valerian 368.

Bent e colaboradores ^[45] realizaram uma extensa revisão bibliográfica sobre a ação de extratos de *V. officinalis* no tratamento da insônia, pois há muitos relatos sobre a prescrição para a indução do sono e para aumento da qualidade do sono. Esta doença tem afetado um terço da população adulta aumentando as taxas de ausência permanente e de desestabilidade social. Revisões sistemáticas e randomizadas através da seleção de triagens controladas por placebo estabeleceram uma relação direta entre a administração e o uso de extratos de *Valeriana* com o aumento da qualidade do sono.

Além dos compostos químicos descritos e citados foram identificados: taninos, resinas, amido, açúcares, flavonas, ácidos como cafeico, clorogênico e málico, fitoesteroides (β -sistosterol), diversos ácidos graxos (palmítico, esteárico, oleico, linoleico, araquídico e benzênico) e ácidos aromáticos (benzoico, salicílico, isoferúlico, resperitínico ou 3-hidróxi-4-metóxi-cinâmico). Reconheceram-se dois terpenoides: ácidos valerênico e acetilvalerênico. Foram descritas as presenças do hidrocarboneto poliacetilênico, o trideca-1-eno-3,5,7,9,11-pentino e o ácido (-)-3 β , 4 β -epóxivalerênico ^[123].

Formas farmacêuticas contendo extratos aquosos de *V. officinalis* são empregados concomitante com bromatos,, hidrato de cloral e fenobarbital no tratamento de histeria e desordens nervosas ^[35]. A atividade farmacológica da *Valeriana* deve resultar do conjunto de ações determinadas pela presença de diversos compostos e não da atuação de um único constituinte ^[124].

1.1.3 Toxicidade dos extratos de *Valeriana*

Von der Hude e colaboradores ^[125] estudaram a decomposição dos produtos valtrato e isovaltrato aos metabólitos baldrinal e homobaldrinal, respectivamente. As decomposições dos produtos de dihidrovaltrato não incluem o baldrinal como metabólito. A purificação dos compostos valtrato, isovaltrato, dihidrovaltrato, baldrinal e homobaldrinal foi realizada a fim de ser investigada a genotoxicidade no teste microsomal com *Salmonella* sp. e o SOS cromo-teste. Os valepotriatos desenvolveram atividade mutagênica no sistema de teste somente na presença do “mix” ativador S9, enquanto que ambos baldrinalis mostraram efeitos mutagênicos em ambos os testes sem que houvesse a ativação metabólica.

A toxicidade de extratos de *Valeriana* também foi avaliada por Tufik e colaboradores ^[126]. Investigaram a substituição do tratamento realizado com BDZ pela utilização de extratos enriquecidos com valepotriatos para o tratamento de ratas gestas. Empreenderam esforços para estudar a utilização prolongada de valepotriatos (30 dias) por ratas grávidas. Chegaram à conclusão de que o uso dos extratos de *Valeriana* não altera o ciclo estral nem ao menos o número de fases estrais durante este período. Não houve alteração na fertilidade, sem nenhuma mudança na ninhada.

Yuanqiang e colaboradores ^[127] reportaram a descoberta de um novo iridoide glicosilado: 10-isovalerinal canancosídeo C e um novo sesquiterpeno que foram isolados de rizomas e raízes de *V. fauriei*. Suas estruturas foram elucidadas através de técnicas espectroscópicas. Esses compostos mostraram atividade de um fator de crescimento nervoso induzindo neurite e a diminuição do crescimento em células do tipo PC 12D.

A literatura sugere que os extratos de *Valeriana* induzem a genotoxicidade *in vitro* (células ECV304) através de mecanismos mediados por oxigênio. Contudo não há descrição sobre o mecanismo genotóxico e epigenético *in vivo*. Neste intuito, Al-Majed e colaboradores ^[128] determinaram os efeitos genotóxicos de *Valeriana*, em células somáticas e germinativas de camundongos, investigando o papel epigenético neste mecanismo. O protocolo incluiu o tratamento de camundongos com diferentes

doses do extrato (500, 1000 e 2000 mg kg⁻¹ dia⁻¹) pelo período de 7 dias. O experimento incluiu: (i) estudos citológicos com o teste de micronúcleos, (ii) análise citogenética por meiose cromossômica, (iii) análise citológica de anormalidade em espermatozoides, (iv) quantificação de proteína e ácidos nucleicos em células testiculares, (v) quantificação de malondialdeído (MDA) e a não proteína sulfidril (NP-SH) em células hepáticas e testiculares. O tratamento aumentou a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos e diminuiu a razão de eritrócitos policromáticos (PCE) para eritrócitos normocromáticos (NCE) no fêmur. Houve aberrações nos cromossomos do testículo e indução de anormalidades nos espermatozoides. A concentração dos ácidos nucleicos foi reduzida nas células testiculares. Essas mudanças podem ser atribuídas a mecanismos epigenéticos pelo aumento da concentração de MDA e pelo decréscimo dos níveis de NP-SH das células hepáticas e testiculares. As mudanças observadas podem ser atribuídas à presença dos valepotriatos e flavonoides (6-metil apigenina) e 2S(-)-(resperidina) presentes nos extratos de *V. officinalis*.

Deciga-Campos e colaboradores ^[129] realizaram o teste AMES. Os resultados revelaram que os extratos de *V. procera* induzem as mutações em *S. typhimurium* TA98 com ou sem a fração microssomal S9, e TA100, na presença da fração enzimática. Entretanto, a preparação tintura de *V. procera*, não apresentou mutagênica. Tradicionalmente os extratos de *V. officinalis* não são indicados para o uso de gestantes, entretanto, há poucos estudos que procuram estabelecer este risco.

Yao e colaboradores ^[130] propuseram um estudo com ratas fêmeas nas quais administrou-se, via oral, extratos de *Valeriana* numa concentração de 45 % (m/v) em etanol (fornecido pela MediHerb[®]) diariamente sobre os dias de gestação (DG) 1–8 ou 8–15. Sobre o 20^o DG, as ratas foram sacrificadas e os fetos, as placentas e os ovários foram coletados. Os fetos foram pesados e examinados quanto a malformações. Não havia sinais de toxicidade maternal evidentes. Os resultados indicaram que *Valeriana* não teve efeitos adversos sobre a fertilidade ou o desenvolvimento fetal. *Valeriana* induziu toxicidade em células embrionárias quando

foram adicionados $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato por 26 h, em soro de rata, 10,5 dias de gestação. Os resultados mostraram que o consumo de 65 vezes maior do que a dose em humanos parece não causar efeitos adversos reprodutivos em ratos. Isso pode ser um resultado do baixo pH do extrato que pode ter removido o potencial citotóxico das moléculas epoxidadas.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DOS ÓLEOS

ESSENCIAIS EM SETE

ESPÉCIES DE VALERIANA

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 Óleos voláteis em *Valeriana*

Os óleos voláteis são compostos orgânicos ou um conjunto de substâncias orgânicas de estrutura química heterogênea, que ocorrem em gêneros de plantas superiores e inferiores, assim como em microrganismos ^[4;131]. Apresentam-se na forma sólida e ou forma líquida. Os líquidos podem ser viscosos exalando ou não odores agradáveis ^[2;20;132].

A volatilidade do aroma de algumas espécies acaba por estabelecer uma relação estreita entre planta e o meio ambiente em que ela se desenvolve, conferindo, então, à constituição química, várias funções: entre elas a de atração de insetos e animais polinizadores, a proteção ou autodefesa contra predadores ou ainda a de modular algum tipo de ação tóxica (alelopatia) sobre as germinações da própria planta e de plantas vizinhas ^[2;23;132-134].

Gränicher e colaboradores ^[135] realizaram estudos histológicos por microscopia eletrônica de varredura localizando a presença de células oleaginosas de reserva em *V. officinalis* localizadas na epiderme e no parênquima contíguo ao córtex das raízes.

Os óleos voláteis foram os primeiros compostos a serem extraídos e identificados em espécies de *Valeriana* e *V. officinalis* assim como de suas subespécies. O rendimento é significativo para *V. officinalis* e *V. wallichii* ^[92;136-138], entretanto, a espécie *V. edulis* apresentou apenas traços de compostos voláteis ^[139].

Os óleos extraídos das raízes de *V. officinalis* são classificados como complexos, pois, em geral, apresentam mais de 150 compostos com grande diversidade de classe de compostos, entre essas, hidrocarbonetos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos derivados oxigenados: álcoois, aldeídos, cetonas, fenois, óxidos, ácidos e ésteres.

A **Tabela 2.I** apresenta os estudos de Bos e colaboradores^[140] e Hölztz^[141] os quais descreveram o rendimento obtido pela extração de óleos voláteis, ácido valerênico e valepotriatos, relacionado às três espécies mais utilizadas como matéria-prima vegetal em medicamentos fitoterápicos.

Tabela 2.I: Constituintes (em peso seco em g %) dos principais grupos de metabólitos secundários em espécies de *Valeriana*^[140;141].

Espécies	Ácido valerênico		Valepotriatos		Óleos voláteis	
	Bos	Hölztz	Bos	Hölztz	Bos	Hölztz
<i>V. officinalis</i>	0,05-0,9	0,08-0,3	0,8-1,7	0,5-2,0	0,5-2,0	0,3-0,7
<i>V. wallichii</i>	Ausência	Ausência	1,9-3,5	3,0-6,0	0,1-0,9	0,1-3,0
<i>V. edulis</i>	Ausência	Ausência	8,0-12,0	4,0-7,0	<0,1	<0,1

Segundo Bos e colaboradores,^[141] a composição dos óleos voláteis é altamente influenciada pela origem do material vegetal, no que tange ao genótipo, a composição do solo e ao clima no qual a espécie é submetida. Em *V. officinalis* quatro compostos podem ser classificados de quimiotipos: a valeranona, valerianol (elemol), criptofaurinol e valerenal.

Com o auxílio das técnicas de índice de retenção (RI) e co-injeção contra padrões foram identificadas as classes: monoterpenos (borneol, canfeno, geraniol, α -pineno, α -terpineol), os sesquiterpenos (azuleno, β -cariofileno, faurinona, pacifigorgiano, tamarisceno, valeranona, ((-)-pacifigorgiol) e os ácidos sequiterpênicos (ácido valerênico, isovalerênico). A última classe química desponta como aquela com compostos candidatos a marcadores quimiotaxonômico^[76;83;92; 136-140].

A **Tabela 2.II** apresenta as estruturas comuns dos componentes encontrados em óleos voláteis provenientes da família Valerianaceae^[83]. A **Tabela 2.III** apresenta o resumo sobre os estudos recentes relacionados aos óleos voláteis obtidos de espécies de *Valeriana* contendo rendimentos, técnicas de preparo e análise, assim como das condições de análise dos compostos voláteis.

Tabela 2.II: Estruturas de alguns compostos comuns a óleos voláteis em Valerianaceae^[83].

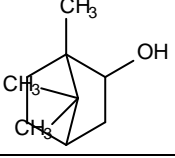
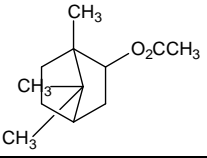
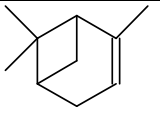
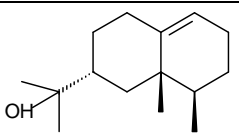
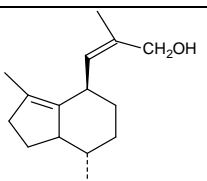
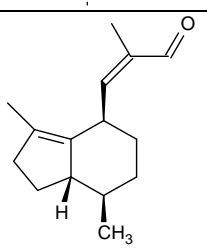
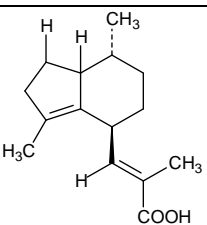
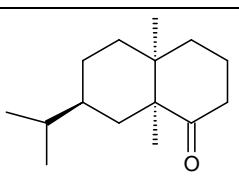
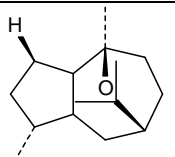
Classe	Substâncias	Estruturas Químicas
Monoterpeno Oxigenado	L- borneol	
Monoterpeno Oxigenado	Acetato de bornila	
Monoterpeno Oxigenado	Isoborneol	
Sesquiterpeno Oxigenado	Valerianol	
Sequiterpeno Oxigenado	Valerenol	
Sequiterpeno Oxigenado	Valerenal	
Sesquiterpeno Oxigenado	Ácido valerênico	
Sesquiterpeno Oxigenado	Valerenona	
Sesquiterpeno Oxigenado	Quessano	

Tabela 2.III: Resumo sobre os estudos recentes relacionados aos óleos voláteis obtidos de espécies de *Valeriana*.

Espécie	Local de coleta	Método Extração	Método Analítico	Nº de compostos identificados	Compostos Majoritários	Ref.
1. <i>V. celtica</i> ssp. <i>norica</i> 2. <i>V. celtica</i> ssp. <i>norica</i> 3. <i>V. céltica</i> ssp. <i>pennina</i>	1. Gleinalm 2. Schoberriegel (Austria) 3. Aosta (Itália)	HD	GC/FID GC/MS	17	α -patchouleno, viridiflorol, α -cadinol, álcool patchouli	[142]
<i>V. officinalis</i> L.	1. Cultivar Select 2. Cultivar Anthose (New Jersey-USA)	HD	GC/FID GC/MS	43 53	1. valeranal, acetato de bornila, 15-acetóxi valeranona, ácido valerênico, canfeno 2. valeranal, acetato de (-)-bornila, α -humuleno, canfeno, 15-acetóxi valeranona, ácido valerênico	[143]
<i>V. wallichii</i> DC.	Quimiotipos: I. e II. Nainital, Dwali, Bageshwa, Khati (India) Baitadi (Nepal)	HD	GC/FID GC/MS NMR (H^1 e C^{13})	-	I. maliol, viridiflorol II. álcool patchouli, viridiflorol, álcool 8-acetóxi-patchouli	[144]
<i>V. pyrolifolia</i> Dene	Folhas e Raízes (juntos)	HD	GC/FID GC/MS	45	valeranona, álcool patchouli, 2,6-dimetóxi-fenol	[145]
<i>V. wallichii</i> DC	1. Folhas 2. Raízes	HD	GC/FID GC/MS	1. 20 2. 23	1. ácido 3-metil valérico, maliol, 2. maliol, β -gurjuneno	[146]
<i>V. hardwickii</i> Wall. var. <i>arnottiana</i> Wight	Milão (Himalaya)	HD	GC/FID GC/MS	28	valeracetato acetato de bornila, linoleato de metila, cupareno, α -cedreno	[147]
<i>V. sisymbriifolia</i> Vahl	Irã	HD	GC/FID GC/MS	41	β -atlantona, 14-hidróxi-9-epi-(<i>E</i>)-cariofilleno, viridiflorol, ácido isovalérico, (Z)- α -bisaboleno, epóxido de alo-aromadendreno, borneol .	[148]

Continuação da **Tabela 2.III:**

Espécie	Local de coleta	Método Extração	Método Analítico	Nº de compostos identificados	Compostos Majoritários	ref.
1. <i>V. officinalis</i> L. 2. <i>V. pancicii</i> Halacsy & Bald. 3. <i>V. bertisceae</i> Pancic 4. <i>V. montana</i> L. 5. <i>V. braunii-blanquetii</i> Lakusic	Servia e Montenegro	HD	GC/FID GC/MS	1. 53 (89,5%) 2. 37 (88,3%) 3. NR 4.50 (93,6%) 5.60 (87,5%)	1: acetato de α -quessila, acetato de bornila, 2: álcool patchouli, 3. 4. e 5: ácido isovalérico, ácido 3-metil valérico	[149]
<i>V. officinalis</i> L.	Lituânia	HD	GC/FID GC/MS	93	canfeno, α -fecheno, acetato de mirtenila, δ -elemeno, β -felandreno, inesol, valerianol, valeranona, valerenal, acetato de α -quessila, ácido hexadecanoico	[150]
<i>V. officinalis</i> L.	Irã	HD e SFE	GC/FID GC/MS	HD: 47 SFE: 35	HD: acetato de bornila SFE: ácido isovalérico	[151]

HD= hidrodestilação; SFE= extração com fluido supercrítico.

Singh e colaboradores ^[152] propuseram um método de quantificação de ácido valerênico que foi aplicado a extratos de *V. jatomansi* e *V. officinalis*. A técnica utilizada foi a cromatografia em camada delgada de alto desempenho (HPTLC) método simples, rápido, de baixo custo e que se demonstrou efetiva. O composto é estável e por isto tem sido usado como um dos marcadores químicos para as espécies de *Valeriana*. O mesmo contribui substancialmente para a atividade sedativa e antiespasmódica dos óleos voláteis e dos extratos de *V. officinalis*. A separação e a quantificação do ácido valerênico foram realizadas por HPTLC (do inglês “*High Performance Thin Liquid chromatography*”) empregando-se a fase móvel ternária hexano: acetato de etila: ácido acético (80:20:0,5 v/v) e a fase estacionária sílica gel 60F₍₂₅₄₎ sob o suporte de alumínio. A concentração final do ácido valerênico foi determinada, após a derivatização com anisaldeído ácido sulfúrico, pela absorção por refletância. A medida densitométrica foi realizada a 700 nm e as curvas de calibração apresentaram linearidade em intervalos de 500 ng a 2,5 µg.

2.1.2 Métodos de extração de óleos voláteis

A aplicação de diferentes métodos de extração é realizada levando-se em conta a localização do óleo volátil na matéria-prima vegetal. Também considera a forma pela qual serão utilizados. Na literatura especializada encontram-se descritos os métodos de extração de óleos que empregam a enfloração, o arraste com vapor de água, a hidrodestilação, a extração com solventes orgânicos, a prensagem e a extração com fluido supercrítico ^[5:21]. Há um maior destaque para o método de hidrodestilação que é aceito como o padrão de extração segundo a Farmacopeia Brasileira IV ^[153].

2.1.2.2 Hidrodestilação

A hidrodestilação envolve duas substâncias imiscíveis: a água e a mistura de compostos voláteis a ser destilada. O método leva em conta a pressão de vapor dos óleos voláteis. A pressão de vapor dos óleos voláteis é mais elevada do que a da água e, portanto, arrastará os compostos voláteis.

O vapor saturado tem propriedades diferentes da água no estado líquido, ou seja, a polaridade do vapor é diferente, permitindo o transporte de várias substâncias de peso molecular e polaridade variadas sobre a sua superfície ^[21:153-155]. De acordo com a lei de

Dalton, a pressão total de vapor de uma mistura de duas fases é igual à soma da pressão de vapor dos i componentes puros individuais.

$$P_t = P_1 + P_2 + \dots + P_i$$

Desta forma, a hidrodestilação é o método de eleição clássico, preconizado pela Farmacopeia Brasileira IV ^[153] e pela OMS ^[154], para extração de compostos voláteis de plantas recentemente coletadas. O equipamento foi desenvolvido por Clevenger e sofreu modificações ao longo do tempo ^[155]. O vapor é separado dos compostos voláteis depois que sofre a condensação e por diferença de densidade se separa ora sobre a água ($d < 1$), ora sob essa ($d > 1$). O óleo é então coletado passando posteriormente pelo processo de secagem por Na_2SO_4 anidro. O uso desta técnica é indicado para substâncias termo-resistente ^[156]. É o método mais difundido industrialmente para obtenção de óleos voláteis. Todavia, apresenta o inconveniente de proporcionar a formação de artefatos químicos. Isto se dá em função das altas temperaturas a que o material vegetal é submetido ^[4;156].

O tempo padronizado para esta operação unitária – hidrodestilação ^[153] é o de 4 h. Entretanto, Charles e colaboradores ^[157], Jantan e colaboradores ^[158], Venskutonis ^[159] e Ehlert e colaboradores ^[160] demonstraram que a qualidade e a quantidade da fração volátil são afetadas pela variação do tempo de hidrodestilação dos óleos voláteis. O tempo deve ser estabelecido para cada matéria-prima vegetal e para as particularidades apresentadas por cada uma delas.

2.1.2.3 Métodos de amostragem e análise de óleos voláteis

2.1.2.3.1 Técnicas de preparo de amostra

Nikiforov e colaboradores ^[161] realizaram estudos qualitativos sobre a composição dos óleos voláteis de *V. officinalis* empregando a técnica “Headspace”. As amostras foram submetidas à análise cromatográfica por GC/FID e GC/MS. Foram caracterizados 40 compostos, entre esses, os monoterpenos canfeno, acetato de bornila, α -pineno, isovalerato de bornila, mirceno, borneol, terpinoleno e fencheno, além dos sesquiterpenos, β -cariofileno, valeranal, valeranona, α -gurjuneno, quessano e o ácido isovalérico com seus derivados. Os últimos compostos apresentam-se predominantes sobre os demais constituintes em concentrações acima de 2 %.

Bicchi e colaboradores ^[162] acoplaram a técnica de *headspace* à técnica de microextração em fase sólida (SPME), testaram cerca de 8 diferentes fibras comerciais. Selecionaram as fases de melhor performance extrativa considerando os componentes voláteis para *V. officinalis*. A fase líquida selecionada foi o polidimetilsiloxano e a fase sólida o carboxeno e o divinilbenzeno.

Com a finalidade de resolver os problemas de interferência da matriz, Schierffer ^[163] utilizou a extração em fase sólida (SPE) aplicando o ensaio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a quantificação em compostos nutracêuticos. A fase que proporcionou a remoção, a resina C-18 SPE, conseguiu remover os interferentes e promover o “*clean-up*” dos ácidos valerênicos provenientes de *V. officinalis*.

2.1.2.3.2 Métodos de identificação e caracterização para óleos voláteis

Os métodos cromatográficos empregados para a análise de óleos voláteis podem ser do tipo sólido/líquido (CSL) ou do tipo cromatografia em fase gasosa (GC), com identificação realizada por índices de retenção (RI) ou por técnicas espectroscópicas: espectrometria de massas (MS), ressonância magnética nuclear (RMN) ou infravermelho (IR).

A técnica de eleição para a análise de óleos voláteis é a GC/MS. Seu uso requer padrões e um banco de dados que contemple valores de tempo de retenção que devem ser confrontados com os dados obtidos experimentalmente. Alguns fatores provocam variação entre espectros obtidos em aparelhos diferentes que não condizem com dados bibliográficos. Certas substâncias podem apresentar grande número de isômeros que podem sofrer rearranjos originando espectros formados por fragmentos com relação massa/carga (m/z) iguais, diferindo na intensidade dos picos e no tempo de retenção ^[87].

Portanto, algumas técnicas vêm a suprir as deficiências do GC/MS, como espectroscopias adicionais (NMR ou IR) ou como colunas cromatográficas quirais para alcançar resultados confiáveis.

O NMR é a técnica indicada para a identificação dessas substâncias, entretanto, há escassez de dados disponíveis na literatura quando se trata de sesquiterpenos. Para essa análise ter sucesso, o constituinte desejado precisa estar presente em

concentrações superiores a 80 %, ou ainda ser possível seu isolamento por técnicas cromatográficas [143;144].

Fokialakis e colaboradores [164] estudaram a composição química dos óleos voláteis obtidos através da hidrodestilação de raízes, caules e inflorescências de *V. italica* e *V. tuberosa*. A técnica empregada foi GC/MS, a partir da qual foram identificados 73 e 41 constituintes, respectivamente. O composto majoritário obtido do óleo de raízes de *V. italica* L. foi isolado e estudado por espectroscopia de NMR e por modelagem molecular, sendo denominado de 15-acetóxi valeranona. A constituição do óleo obtido de *V. tuberosa* não mostrou a presença sesquiterpenos valeranona ou quessano.

2.1.2.3.3 Cromatografia em fase gasosa

Amostras complexas exigem métodos de preparação e análise com boa resolução e performance. A cromatografia é o método analítico utilizado para separação, identificação e determinação de componentes químicos nos óleos voláteis. A GC detém características especiais possibilitando a obtenção de resultados exatos, precisos e robustos. Ela é amplamente empregada na análise de compostos voláteis, distribuindo os componentes da amostra entre a fase estacionária, um líquido de alta densidade, e a fase móvel, um gás inerte. As interações da amostra com estas duas fases e o movimento da fase móvel, resultam na migração diferencial dos componentes da amostra proporcionando a sua separação. A natureza da fase móvel e da fase estacionária torna-se o ponto crucial de escolha, pois o sucesso na separação se correlaciona intimamente a eles.

A detecção das misturas voláteis é realizada por detectores de espectroscopia de massas (MS) e por ionização em chama (do inglês “*Flame Ionization Detector*”). Ambos permitem qualificar e quantificar os compostos voláteis através da análise contra padrões e contra bibliotecas comerciais, como a NIST[®]. Outra forma é a de utilizar a sistemática dos índices de retenção (RI), amplamente estudados por Adams, para que se compare a constituição das misturas complexas inéditas [87;165-167].

A cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas GC/MS propõe-se à identificação dos picos cromatográficos individuais proporcionando a diferenciação pela massa molecular que, ao se fragmentar, em fragmentos de massa característicos para

cada tipo de rompimento de ligação química, permitindo a coleta de informações sobre a função orgânica de cada composto. O padrão de fragmentação pode ser associado e comparado com os dados obtidos em bibliotecas espectrais comerciais. A comparação entre os dados experimentais e os dados apresentados pela biblioteca eletrônica é realizada por probabilidades ou percentuais de aproximação da identidade da substância analisada [87;168,169]. Entretanto, o método de identificação mais seguro é o proposto por Kovats [170] que considera os dados fornecidos por índices de retenção obtidos por GC/FID. Esta técnica propõe a comparação entre o tempo de retenção dos picos cromatográficos relativos (corrigidos) obtidos na amostra e em padrões de sequência homóloga de n-alcenos. Tais índices permitem uma comparação de dados entre diferentes laboratórios assim como com dados divulgados pela literatura especializada [166;169]. Na prática a comparação é feita através da sobreposição dos cromatogramas da amostra ao dos padrões de alcanos usando as mesmas condições de análise. A identificação obtida nessas condições é apenas uma sugestão quando realizada em uma única coluna. No entanto o resultado se torna mais seguro se as mesmas condições forem estabelecidas para colunas polares como para apolares. Quanto maior o número de fases polares e apolares testadas, maior será a especificidade do cálculo do índice de retenção.

A aceitação desse método só é dada através da injeção em ao menos duas colunas de polaridades diferentes. Exemplo disto tem-se a fase apolar de polidimetildifenilsiloxano (DB5, OV5) e a fase polar de polietilenoglicol (DBWax, - Carbowax) [169]. O cálculo do índice de Kovats empregado é feito através da seguinte fórmula:

$$I = 100z + \frac{100 (tr_x - tr_z)}{(tr_{z+1} - tr_z)}$$

Onde:

- z = número de átomos de carbono do alcano de menor peso molecular
- tr_x = tempo de retenção do composto "x" (intermediário a tr_z e tr_{z+1})
- tr_z = tempo de retenção do alcano com "n" carbonos
- tr_{z+1} = tempo de retenção do alcano com "n + 1".

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Espécies vegetais *V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. saricariifolia*, *V. scandens* e *V. tajuvensis* pertencentes à família Valerianaceae foram selecionadas e utilizadas neste estudo.

2.2.2 Coleta e a identificação das espécies de *Valeriana*

As espécies de *Valeriana* foram coletadas no estado do Rio Grande do Sul (Tabela 2.IV) e as amostras testemunhas das sete espécies foram depositadas no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS-ICN). Todos os materiais vegetais foram transportados à temperatura de 4 ° a 8 °C e armazenados a -20 °C. As espécies foram coletadas por Andréia Loviane Silva (UFRGS), identificadas por Marcos Sobral (UFRGS - UFMG) e Sérgio Bordignon (ULBRA-RS). O local, o coletor e o nº de depósito estão listadas na **Tabela 2.IV**:

Tabela 2.IV: Locais de coleta das espécies de *Valeriana*.

Espécies	Local de coleta	Coletador	Depósito Nº ICN	Data de coleta
<i>V. chamaedryfolia</i> Cham. & Schltld.	Parque Itapuã- Viamão-RS-BR	Bordignon, S. (ULBRA)	Sobral 8767	Dez. 2004
<i>V. eichleriana</i> (C. A. Mull.) Graebn.	RS 110 - São Francisco de Paula	Bordignon, S. (ULBRA)	Jarenkow & Bueno 1161	Jan. 2007
<i>V. eupatoria</i> Sobral	RS 110 – Jaquirana- RS-BR	Bordignon, S. (ULBRA)	Sobral & Miró 8604	Jan. 2007
<i>V. glechomifolia</i> Meyer	RS 110- São José dos Ausentes-RS-BR	Silva, A.L. (UFRGS)	Sobral 7733 ^a	Nov. 2004
<i>V. salicariifolia</i> Vahl	RS 41 – Áurea-RS-BR	Silva, A.L. (UFRGS)	Sobral et al. 8095	Dez. 2004
<i>V. scandens</i> L.	RS 110 – Jaquirana- RS-BR	Bordignon, S. (ULBRA)	Sobral et al. 8839	Jan. 2007
<i>V. tajuvensis</i> Sobral	Três Cachoeiras – Tajuvas-RS-BR	Silva, A.L. (UFRGS)	Sobral & Silva 9058	Dez. 2005

Na **Figura 2.1** estão apresentadas fotos das espécies de *Valeriana* estudadas nesse trabalho, nativas do Rio Grande do Sul.

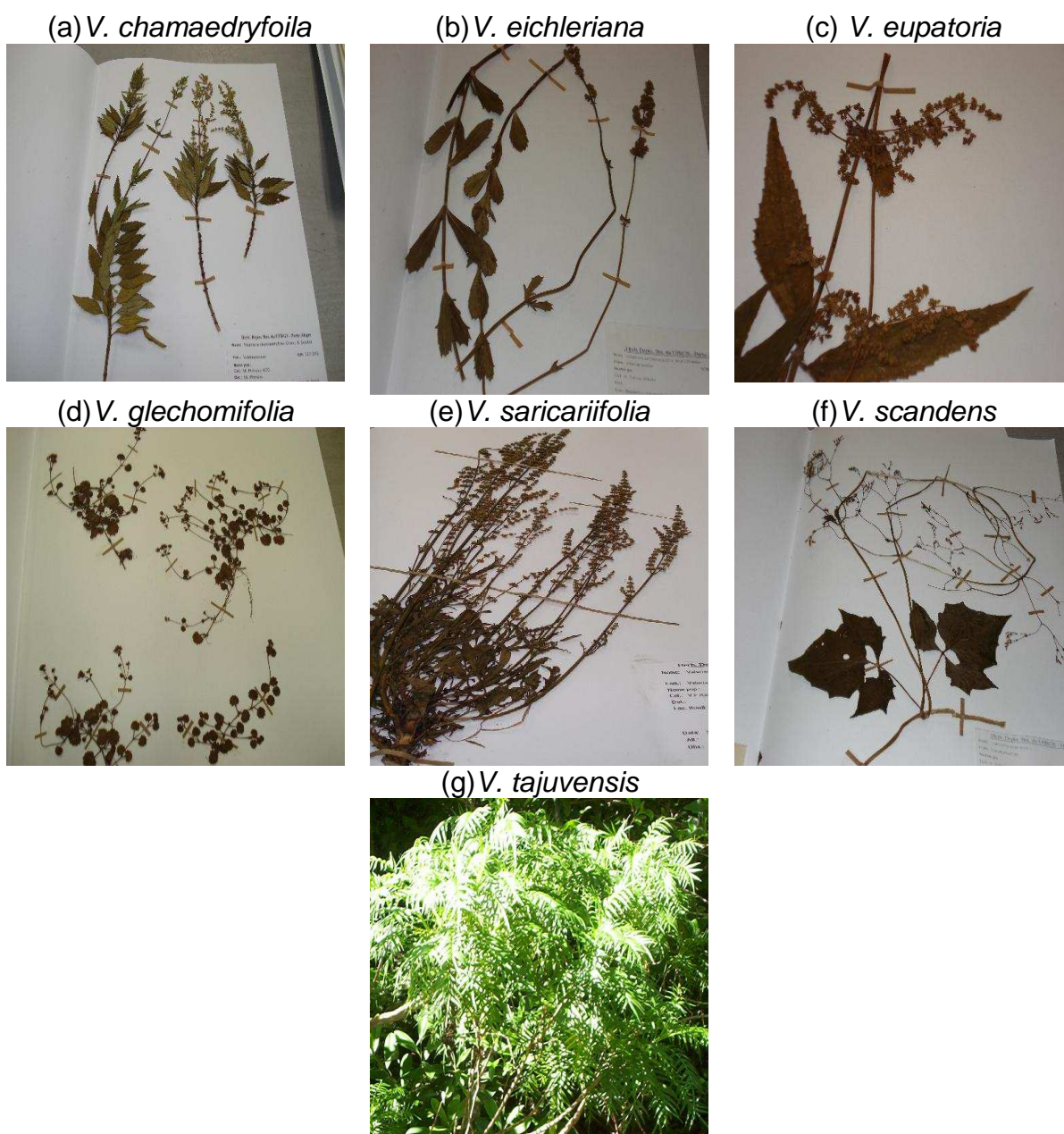


Figura 2.1: Fotos das espécies de *Valeriana* nativas do Rio Grande do Sul e que foram estudadas neste trabalho (SILVA, 2008).

2.2.3 Critérios para a seleção de partes do material vegetal

Os critérios adotados para a utilização total das partes aéreas ou em partes (separação em caules, talos, folhas, flores e rizomas) foram o tamanho das espécies vegetais, as quantidades colhidas e a viabilidade de separação em diferentes partes, após a secagem por liofilização.

Optou-se por não utilizar as raízes de todos os indivíduos vegetais com a finalidade de preservar estes indivíduos distribuídos em menor número ou em estado precário ou de difícil acesso.

2.2.4 Preparo do material vegetal

Duas maneiras de preparo do material vegetal foram estudadas, com intuito de selecionar àquela com os maiores rendimentos de extração. A primeira forma empregada foi aquela se empregando a planta congelada (- 20 °C) *in natura*. A segunda forma aplicada a liofilização do material vegetal.

O material vegetal liofilizado foi moído em moinho de facas (mod. Retsch Sk1-Retsch[®]), dotado de tamis com saída de 1 mm de abertura de malha. O material vegetal resultante foi armazenado a -4°C até que se procedesse a hidrodestilação.

2.2.5 Estudos preliminares

2.2.5.1 Massa vegetal a ser utilizada na hidrodestilação

A determinação da quantidade de material vegetal para a hidrodestilação foi realizada a partir de 100 g, como preconizado pela Farmacopeia Brasileira IV ^[153]. A fim de aperfeiçoar o processo de extração de voláteis optou-se por aumentar a quantidade de material vegetal. Testou-se um aumento progressivo da massa vegetal através da duplicação e da quadruplicação da massa vegetal, não foi necessário coletar o material novamente. O aparelho de hidrodestilação empregado foi o Clevenger modificado, sendo hidrodestilado foi recolhido em 1 mL de xilol e ressuspendido em hexano. A seleção vegetal levou em conta a quantidade de material coletado e o mínimo de rendimento para ser medido em Clevenger modificado. Testaram-se as duas alternativas: o material vegetal *in natura* e o material vegetal seco pelo processo de liofilização. A quantidade da massa vegetal foi estabelecida levando em conta:

- a) O volume máximo ocupado pelo material vegetal em um balão de fundo arredondo de 5 L (cinco litros), o qual propiciasse alguma espécie de rendimento em óleo assim como mantivesse um limite de segurança de trabalho (evita o refluxo);

- b) O volume máximo de material vegetal que pudesse ser empregado no triturador e homogeneizador;
- c) A quantidade de material vegetal que permitisse a aferição de medida de volume de óleo volátil extraído em Clevenger modificado.

2.2.6 Metodologia da amostragem e seleção de material vegetal para hidrodestilação

Os materiais vegetais *in natura* e liofilizados foram selecionados por catação manual. Estes foram misturados, quarteados e amostrados aleatoriamente até atingir a massa selecionada no **item 2.2.5.1**.

2.2.7 Secagem do material vegetal pelo processo de liofilização

Após o congelamento, freezer ($- 20^{\circ}\text{C}$), os materiais vegetais provenientes de sete espécies de *Valeriana* foram colocados em bandejas revestidas de papel alumínio, adaptadas a cuba do liofilizador (MODULAR MOD. 5260 MOD. 4K, EDWARDS[®], INGLATERRA). O sistema de vácuo foi mantido com o apoio de atmosfera inerte, pelo emprego de nitrogênio sob pressão durante 72 h.

2.2.8 Perda por dessecação

O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico, utilizando-se balança com sistema de secagem por radiação infravermelha. Cerca de 3,0 (+/- 0,50) g do material vegetal foi colocada em prato de alumínio próprio da balança, obedecendo às seguintes condições: 15 min e temperatura de 105°C até alcançar à estabilidade da leitura. Foi adotado o intervalo de 15 min entre cada determinação para que a balança resfriasse. A média obtida entre as triplicatas foi expressa em massa seca de material vegetal (g %). O equipamento utilizado foi um determinador de umidade com sistema de secagem por radiação infravermelha (BL-IR, MARTE[®], MOD. ID200, SÃO PAULO – BRASIL). O material vegetal seco foi triturado em moinho de facas adaptado com tamis com abertura de malha de 1 mm (MF, MARCONI[®], MOD.MA 048, SÃO PAULO - BRASIL).

2.2.9 Obtenção dos óleos voláteis de espécies de *Valeriana*

2.2.9.1 Preparo do homogeneizado vegetal

Quatrocentos gramas (400 g) de material vegetal proveniente das espécies, *V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. saricariifolia*, *V. scandens* e *V. tajuvensis* foram pesados em balança semi-analítica (BELL MARK[®] 2200), triturados e homogeneizados durante 20 min com o auxílio de triturador mecânico, (POLI[®] MODELO LS-04) para a abertura e cominuição dos tecidos vegetais. A seguir o homogeneizado vegetal foi transferido quantitativamente, com o auxílio de água deionizada, para um balão de vidro de 5 L (cinco litros).

2.2.9.2 Método de hidrodestilação

O homogeneizado obtido no item anterior, contido no balão de cinco litros, foi acoplado ao aparelho de Clevenger modificado ^[153] - **Figura 2.2-** a uma manta de aquecimento. Introduziu-se água deionizada ao sistema para o recolhimento dos óleos voláteis sobre 1 mL de xilol. A extração por Clevenger modificado durou cerca de 5 h (cinco horas). Transcorrido este tempo esperou-se 10 min para que o sistema resfriasse. Procedeu-se a leitura do volume de óleo recolhido sobre xilol no tubo graduado (calculado por diferença). O rendimento foi calculado relacionando a quantidade em massa do óleo volátil, em xilol, à massa seca vegetal obtida no **item 2.2.8**.

2.2.9.3 Secagem sob Na₂SO₄ anidro

O Na₂SO₄ p.a. (Quimex[®]) anidro foi utilizado como agente secante dos óleos extraídos por hidrodestilação. Este processo foi adotado a fim de evitar degradações dos compostos insaturados e a danificação à coluna cromatográfica ^[4]. A seguir está descrito o método empregado nesta preparação para a obtenção da secagem dos compostos voláteis:

Numa pipeta Pasteur colocou-se um anteparo (pedaço de algodão purificado) para segurar o Na₂SO₄ dessecado previamente em mufla (EDGCON MODELO 3P) a 450 °C por 8 h. A quantidade do agente secante varia de acordo com o diâmetro e a altura da coluna (2,0 g a 2,5 g para se obter uma coluna de 3 a 5 cm). É necessário que o sulfato de sódio passe por um empacotamento para formar uma coluna uniforme. Esse

empacotamento foi realizado adicionando-se o sulfato de sódio à pipeta de Pasteur aos poucos. A pipeta de Pasteur foi submetida à vibrações (vórtex) até que não houvesse diminuição na altura da coluna formada pelo NaSO_4 . O óleo recolhido em xilol foi aspergido sobre o sulfato de sódio anidro, sendo adicionado 1 mL de xilol destilado à coluna para ajudar a retirada do óleo da coluna. A solução xilênica seca foi recolhida e acondicionada em um frasco âmbar e conservada em freezer à temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$. O volume final desta solução foi reduzido com nitrogênio ultra-puro (White Martins[®]) para fazer a estimativa da densidade dos óleos voláteis extraídos.

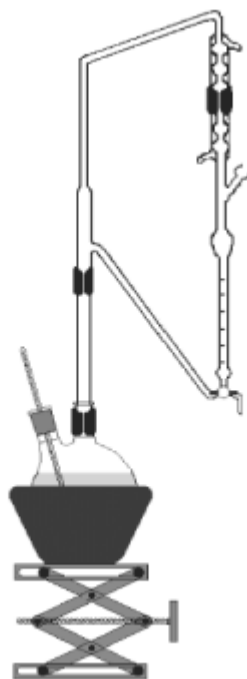


Figura 2.2: Representação esquemática do equipamento Clevenger (modificado) com temperatura controlada e aquecimento por manta elétrica. Montagem empregada na extração dos óleos voláteis de espécies de *Valeriana*.

2.2.10 Análise cromatográfica

Preparou-se uma solução hexânica (Merck[®]) de concentração $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ de óleo volátil seco. Procedeu-se à injeção em cromatógrafo gasoso acoplado ao detector de massas (GC/MS) com a finalidade de ter-se uma ideia da composição do óleo. O procedimento de derivatização de todos os óleos foi realizado adicionando-se o agente de esterificação BSTFA (*N,O*-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida) com 1% TBDMS-Cl (terc-butilclorodimetilsilano) [Sigma-Aldrich[®]] foi adotado, pois, o mesmo apresentou em sua primeira análise alguns ácidos carboxílicos. A quantidade preconizada para esterificação

foi de 0,1 % em relação à concentração em óleos voláteis. A técnica empregada para a derivatização está resumida a seguir:

Em um balão volumétrico contendo 1 mL de solução hexânica de óleos voláteis de *Valeriana* adicionou-se 10 μ L do agente esterificante. Procedeu-se à agitação em vórtex (Modelo 251-Fanem[®]) durante 1 min. Posteriormente submeteu-se a sonicação por mais 1 min. Desta forma foi obtida a amostra para injeção em cromatógrafo gasoso. Os óleos voláteis foram analisados por GC/MS (cromatógrafo gasoso acoplado ao detector de massas) (SHIMADZU[®] MODELO QP-5050, Japão, Tóquio) para análise qualitativa e por GC/FID (cromatógrafo gasoso acoplado a detector de ionização de chama) (SHIMADZU[®] MODELO GC-17A, Japão, Tóquio). Os índices de retenção foram calculados por comparação com n-alcenos (Fluka[®]) e confrontados com os índices de retenção obtidos na literatura ^[166] usando duas colunas cromatográficas: OV-5 (polimetil-siloxano com 5 % de grupamentos fenila) e Carbowax 20M (polietileno glicol). As condições cromatográficas estão listadas na **Tabela 2.V**.

Tabela 2.V: Condições cromatográficas para a análise dos óleos voláteis.

Coluna	Coluna: OV5	Coluna Carbowax 20M
Dimensões das colunas	30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro; 0,25 μ m de espessura de fase	
Volume injetado	0,5 μ L (da solução em hexano)	
Gás de arraste (fluxo)	He (1mL/min)	
Tipo de injeção	Split (1:10)	
Gases auxiliares (GC/FID)	Hidrogênio, Nitrogênio e Oxigênio	
Distribuição das massas (GC/MS)	41 a 550 D	
Temperatura do forno	40 °C – 280 °C	40 °C – 220 °C
Taxa de aquecimento	3 °C/min	3 °C/min
Temperatura do injetor	290 °C	220 °C
Temperatura do detector	280 °C	220 °C

A identificação dos compostos foi realizada pela comparação do tempo de retenção relativo da amostra contra padrões (Sigma-Aldrich[®]). Além disto, foi utilizado o cálculo do índice de Kovats ^[170] com segunda metodologia para se estabelecer a independência das variações ocorridas no tempo de retenção através da realização das análises cromatográficas sob condições diferentes de medida. Esse índice relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma serie de hidrocarbonetos homólogos permitindo uma comparação destes dados entre diferentes laboratórios.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O solvente receptor dos compostos voláteis foi o xilol [C₆H₄(CH₃)₂ – mistura de isômeros orto, meta e para - dimetil benzeno]. Por ser uma mistura de isômeros, possui faixa de ebulição que varia entre 138 e 144 °C. Nesta faixa de temperatura ocorreu a co-eluição deste solvente com uma boa parte dos compostos monoterpênicos e sesquiterpênicos, dos hidrodestilados de *Valeriana*, gerando distorções nas áreas dos picos cromatográficos.

A influência do xilol foi minimizada através do estabelecimento do processo de pré-concentração do hidrodestilado pela aplicação de um fluxo suave de gás nitrogênio na redução do volume da solução de xilol e de compostos voláteis. Posteriormente, o hidrodestilado foi ressuspenso em hexano [PE de 69 °C (342 K)], seco pela passagem em Na₂SO₄ e cromatografado. O hexano não provocou distorções cromatográficas na região de eluição dos compostos monoterpênicos e sesquiterpênicos, e foi o solvente selecionado para a preparação das soluções analíticas.

2.3.1 O material vegetal

2.3.1.1 Estabilização do material vegetal

Os procedimentos das coletas levaram em conta a manutenção e a integridade dos compostos voláteis. Para tanto o material vegetal empregado foi submetido à secagem através de dois métodos. O primeiro foi realizado em estufa sob circulação de ar a 40 °C e o segundo foi o de congelamento a - 20 °C com posterior liofilização. A comparação entre estes dois métodos de secagem visou minimizar as dificuldades de acesso aos locais de coleta do material vegetal *in natura* além de diminuir as perdas dos voláteis no transporte até o preparo do hidrodestilado.

A **Tabela 2.VI** descreve as médias dos resultados de triplicatas obtidas através dos dois processos de secagem após 72 h.

Tabela 2.VI: Perda por dessecação da planta *in natura* e na planta liofilizada.

Espécie	Partes da planta usadas	Média (S, CV%) <i>In natura</i>	Média (S, CV%) Liofilizada
<i>V. chamaedryfolia</i>	Raízes, rizomas e partes aéreas	46,95 (±3,25; 6,92)	4,40 (±0,14; 3,18)
<i>V. eichleriana</i>	Raízes, rizomas e partes aéreas	69,85 (±0,92; 1,32)	5,05 (±0,35; 6,93)
<i>V. eupatoria</i>	Raízes, rizomas e partes aéreas	60,20 (±1,18; 1,96)	7,10 (±0,28; 3,94)
<i>V. glechomifolia</i>	Raízes, rizomas e partes aéreas	55,60 (±1,70; 3,06)	2,45 (±0,07; 2,86)
<i>V. saricariifolia</i>	Raízes, rizomas e partes aéreas	68,80 (±3,25; 6,88)	4,40 (±0,17; 3,86)
<i>V. scandens</i>	Raízes, rizomas e partes aéreas	66,00 (±1,41; 2,14)	3,54 (±0,09; 2,54)
<i>V. tajuvensis</i>	Partes aéreas, folhas e ramos	60,10 (±0,74; 1,23)	2,55 (±0,21; 8,24)

X = média de três medidas; S=desvio padrão; CV%= coeficiente de variação percentual.

O processo de liofilização foi eleito como a forma de secagem a ser empregado neste trabalho, pois proporcionou os menores índices de umidade que permaneceram abaixo de 7,10 %. Esses valores estão de acordo com os indicativos preconizados na literatura para a inibição da atividade biológica de microorganismos e enzimas sobre materiais vegetais (raízes, caules, folhas e flores) que é de 14 % (v/m) ^[153]. Segundo ADAMS ^[166], a liofilização ajuda à preservação dos constituintes voláteis termolábeis pela manutenção das temperaturas baixas e pela rápida retirada da água, inibido danos maiores à estrutura vegetal armazenadora de compostos voláteis ^[165;166].

Os valores do desvio padrão da média dos materiais vegetais *in natura* demonstraram maiores valores do que dos materiais vegetais liofilizados, indicando a maior variabilidade biológica de composição quando a planta não sofre processos de estabilização por secagem. O coeficiente de variação percentual não manteve esta tendência e seu significado pode ser interpretado como a variação entre as amostragens e como influenciaram a composição da média de umidade.

2.3.1.2 Melhoramentos do rendimento da hidrodestilação para análise química

Os 100 g de material vegetal *in natura* proveniente das espécies de *Valeriana* ^[153] foram insuficientes para que se efetuassem os procedimentos de medidas volumétricas ou de peso e para que se detectassem os compostos voláteis por cromatografia. A proposta foi a de dobrar e quadruplicar a massa vegetal *in natura* assim como a massa vegetal liofilizada. A **Tabela 2.VII** mostra as massas empregadas para este estudo e a **Tabela 2.VIII** traz a correlação com os rendimentos, calculados em massa úmida e em

massa seca. O aumento de massa *in natura* para 400 g viabilizou o processo de extração dos compostos voláteis, assim como a diminuição do percentual de água no material vegetal pelo processo de liofilização. Sendo assim, para a realização deste trabalho foram selecionados 100 g de material vegetal liofilizado.

Tabela 2.VII: Massa de material vegetal *in natura* e liofilizado utilizado nas hidrodestilações.

Espécie estudada	Média em g (S, CV%)	Média em g (S, CV%)
	<i>In natura</i>	Liofilizada
<i>V. chamaedryfolia</i>	404,5 ($\pm 0,63$; 0,15)	101,6 ($\pm 0,36$; 0,35)
<i>V. eichleriana</i>	400,7 ($\pm 0,49$; 0,12)	103,1 ($\pm 0,32$; 0,31)
<i>V. eupatoria</i>	402,3 ($\pm 0,31$; 0,08)	102,3 ($\pm 0,15$; 0,15)
<i>V. glechomifolia</i>	402,3 ($\pm 0,43$; 0,11)	100,7 ($\pm 0,19$; 0,19)
<i>V. saricariifolia</i>	401,3 ($\pm 0,92$; 0,23)	102,7 ($\pm 1,30$; 1,27)
<i>V. scandens</i>	404,2 ($\pm 0,30$; 0,07)	100,5 ($\pm 0,38$; 0,37)
<i>V. tajuvensis</i>	402,6 ($\pm 0,27$; 0,07)	102,1 ($\pm 0,62$; 0,60)

M = média; S=desvio padrão; CV%= coeficiente de variação percentual.

Os resultados permitem inferir que o processo de secagem por liofilização do material viabiliza a utilização de uma menor quantidade de material vegetal obtendo-se um rendimento significativamente maior para todas as espécies. Além disto, o processo de liofilização afetou positivamente o rendimento de espécies de *Valeriana* que apresentaram rendimentos abaixo de 0,1 %. As médias apresentadas são os resultados referentes a triplicatas.

Tabela 2.VIII: Rendimento de óleos voláteis por massa seca para espécies de *Valeriana*.

Espécie estudada	Óleo (massa)		Rendimento	
	<i>in natura</i> (400g) (S, CV%)	Liofilizada (100g) (S, CV%)	Massa úmida (%)	Massa seca (%)
<i>V. chamaedryfolia</i>	0,12 ($\pm 0,03$; 0,20)	0,39 ($\pm 0,05$; 0,16)	0,06	0,29
<i>V. eichleriana</i>	0,14 ($\pm 0,01$; 0,07)	0,22 ($\pm 0,01$; 0,19)	0,09	0,19
<i>V. eupatoria</i>	0,24 ($\pm 0,01$; 0,05)	0,32 ($\pm 0,06$; 0,18)	0,14	0,34
<i>V. glechomifolia</i>	0,05 ($\pm 0,01$; 0,05)	0,22 ($\pm 0,04$; 0,20)	0,05	0,21
<i>V. saricariifolia</i>	0,17 ($\pm 0,03$; 0,20)	0,28 ($\pm 0,04$; 0,13)	0,14	0,29

<i>V. scandens</i>	0,18 ($\pm 0,04$; 0,23)	0,23 ($\pm 0,03$; 0,12)	0,10	0,24
<i>V. tajuensis</i>	0,20 ($\pm 0,05$; 0,23)	0,33 ($\pm 0,03$; 0,09)	0,12	0,36

X = média das triplicatas; S=desvio padrão; CV%= coeficiente de variação percentual.

O aumento na concentração dos compostos voláteis viabilizou a detecção dos compostos voláteis por cromatografia gasosa viabilizando a detecção da presença de monoterpenos. Esses não tinham sido detectados na análise química com 100 g de matéria prima vegetal *in natura*. A conservação do material vegetal foi mantida o que impediu a ação das cadaverinas e putrecinas sobre o mesmo até o momento da realização das triplicatas de hidrodestilação ^[21;43].

Adicionalmente foram realizados o controle da temperatura de ebulição, da temperatura do resfriamento do hidrodestilado e o estabelecimento de 5 horas para a realização do processo de extração por hidrodestilação.

2.3.2 Os compostos voláteis

O maior rendimento médio (média das três extrações realizadas para cada amostra) de óleos voláteis em massa seca foi o obtido na espécie *V. tajuensis* (0,36 %) e *V. eupatoria* que apresentou (0,34 %), seguido de *V. saricariifolia* (0,29 %), *V. chamaedryfolia* (0,29 %), *V. scandens* (0,24 %) e *V. glechomifolia* (0,21%). Portanto, o maior ganho em rendimento peso seco foi o obtido para as espécies *V. eupatoria* e *V. tajuensis*.

Os óleos obtidos das sete espécies de *Valeriana* apresentaram características físicas como cores diferenciadas, que variaram do amarelo claro ao amarelo esverdeado. A densidade de todos os óleos foi menor do que da água (0,997 a 25 °C), o que, segundo a literatura, indicativo da presença de terpenos, hidrocarbonetos aromáticos e substâncias oxigenadas aromáticas ^[4]. As densidades reais foram calculadas pela massa e volume obtidos dos hidrodestilados e estão apresentadas na **Tabela 2.IX**:

Tabela 2.IX: Densidades dos óleos voláteis de *Valeriana* (m/v).

Espécie de <i>Valeriana</i>	d (g mL ⁻¹)
<i>V. chamaedryfolia</i>	0,876
<i>V. eichleriana</i>	0,929
<i>V. eupatoria</i>	0,907
<i>V. glechomifolia</i>	0,899
<i>V. saricariifolia</i>	0,944
<i>V. scandens</i>	0,933
<i>V. tajuensis</i>	0,885

2.3.3 Análise da composição química dos óleos voláteis

A análise química dos óleos voláteis das sete amostras estudadas demonstrou a predominância da fração sesquiterpênica, de ácidos graxos e ésteres graxos, com teores superiores 40 %. Para fins de estabelecer uma comparação geral entre as sete espécies estudadas, a **Tabela 2.X** apresenta a composição de cada óleo em termos de concentração e das classes químicas, os rendimentos médios % (m/v) em óleos voláteis, o n° de compostos e o percentual de compostos elucidados tentativamente. Os dados completos, incluindo cada cromatograma dividido em porções para facilitar a visualização e identificação completa dos constituintes, assim como a **Tabela** de identificação estão no **Anexo I**.

Tabela 2.X: Distribuição das classes de compostos encontradas na análise cromatográfica de cada óleo volátil de *Valeriana*.

	Quantidades de compostos majoritários identificados													
	V. <i>chamaedryfolia</i>		V. <i>eichleriana</i>		V. <i>eupatoria</i>		V. <i>glechomifolia</i>		V. <i>saricariifolia</i>		V. <i>scandens</i>		V. <i>tajuvensis</i>	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Monoterpenos	7	3,40	6	26,72	14	Tr	3	1,05	-	--	7	3,47	10	0,38
Monoterpenos oxigenados	26	14,30	2	9,03	19	11,62	5	3,98	17	13,41	10	1,71	11	0,72
Sesquiterpenos	20	45,25	4	22,24	18	9,14	17	60,60	10		9	1,76	20	35,9
Sesquiterpenos oxigenados	32	22,75	11	6,18	40	19,37	13	7,1	21	24,67	21	47,78	29	16,04
Alcanos de cadeia longa	4	tr	4	tr	1	tr	1	tr	-	--	5	tr	1	2,03
Aldeído de cadeia longa	6	tr	1	tr	2	5,73	2	3,56	-	--	2	tr	1	1,19
Ácidos graxos de cadeia longa	3	tr	2	4,20	2	tr	1	7,94	5	tr	-	--	3	tr
Ésteres de ácidos graxos	8	7,65	4	21,27	7	tr	-	tr	3	tr	-	--	14	tr
Álcool de cadeia longa	-	--	2	tr	3	tr	1	tr	-	tr	2	tr	1	tr
Total	106	93,35	36	89,64	106	45,86	43	84,23	56	38,08	56	54,72	90	56,26
Rendimento	0,29		0,19		0,34		0,21		0,29		0,24		0,36	

Nº = número de picos no cromatograma; % percentual de área relativa a cada composto com área relativa superior a 1 %; tr=traços.

As **Figuras** a seguir, divididas em **a** e **b**, apresentam os cromatogramas dos óleos voláteis das espécies estudadas (**a**) e o histograma com a distribuição dos principais constituintes do óleo e suas concentrações relativas (**b**). A identificação dos compostos foi realizada através da comparação com espectros da biblioteca do equipamento GC/MS (Wiley e Nist) e de dados obtidos pela determinação dos índices de retenção de Kovats. A **Figura 2.3** ilustra os resultados obtidos para os hidrodestilados de *V. chamaedryfolia*.

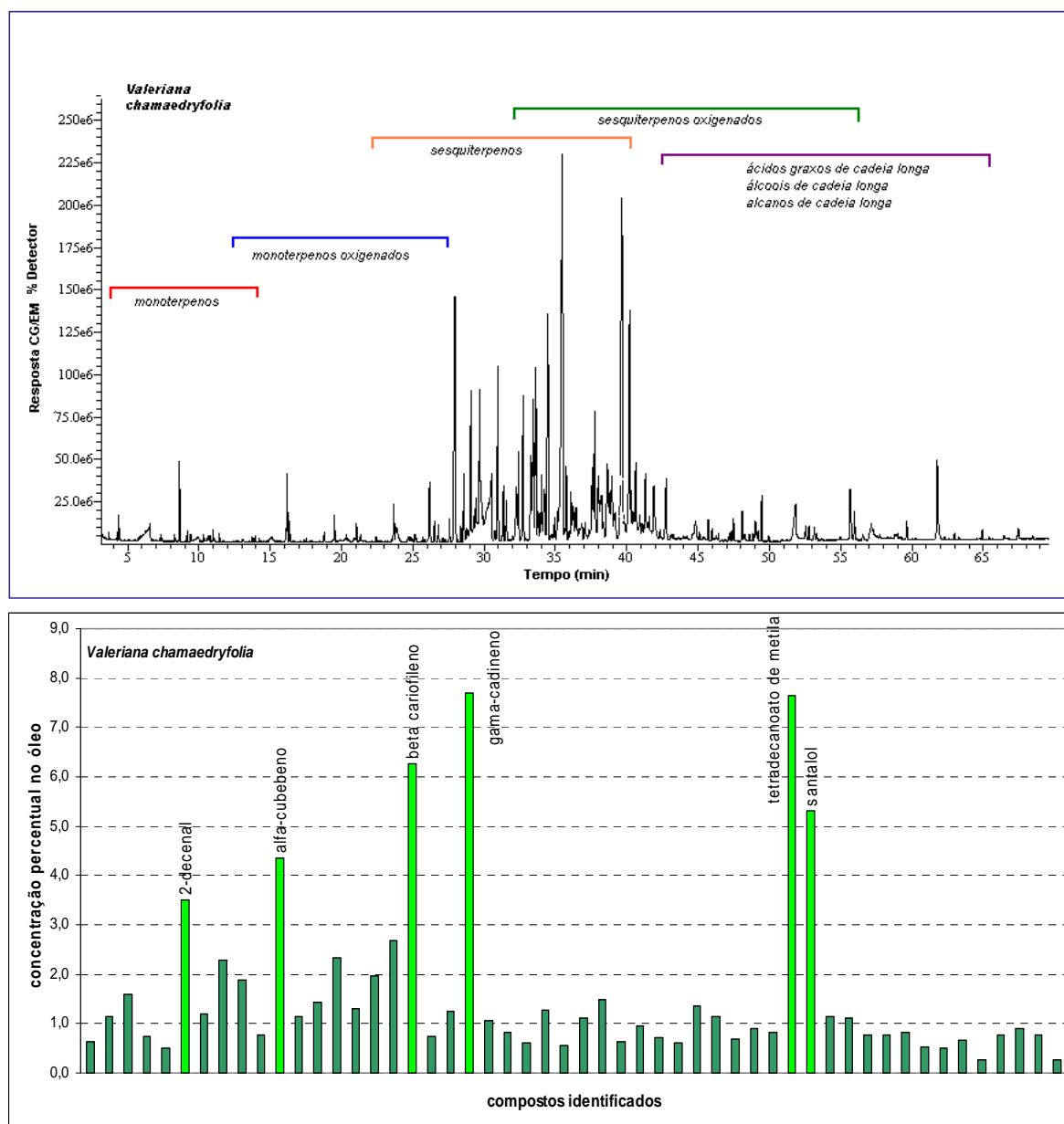


Figura 2.3: (a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *V. chamaedryfolia*. (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de *V. chamaedryfolia*. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela 2.V**.

A análise cromatográfica do óleo essencial de *V. chamedryfolia* cujo rendimento foi de 0,29 % (**Tabela 2.VIII**) revelaram a presença de 106 componentes sendo que 101 estes compostos tiveram sua identidade confirmada por GC/MS e por índice de retenção, o que corresponde a 95,79 % do total qualitativo. Os demais 4,21 % foram caracterizados por GC/MS, pela aferição da massa molecular sendo neste trabalho denominados de compostos não identificados (CNI).

Entre os compostos monoterpenos oxigenados destaca-se a presença de hexanal (0,22 %), ácido isovalérico (0,64 %), ácido 3-metil valérico (0,29 %) e 2-decenal (3,52 %). Nos sesquiterpenos hidrocarbonados os compostos majoritários presentes são α -cubebeno (4,35 %), β -cariofileno (6,25 %) e γ -cadineno (7,71 %). Nos sesquiterpenos oxigenados o composto majoritário é o (*E*)- β -santalol (5,31 %). Além destes compostos destacou-se a concentração do éster de ácido graxo de cadeia longa tetradecanoato de metila (7,65 %) [miristato de metila].

Alguns compostos tipicamente descritos para a família Valerianaceae foram encontrados entre estes os monoterpenos oxigenados borneol (0,74%) e acetato de bornila (1,19 %), os sesquiterpenos quessano (0,60 %), valerenal (0,60 %), valeranona (1,34 %) e o isômero do valerenal (0,90 %). Destaca-se a presença de o longiborneol (0,64 %) e o 8-isobutirilóxi isoborneol (0,73 %), não descritos para a família.

A **Figura 2.4** ilustra os resultados obtidos para os hidrodestilados de *V. eichleriana*. A análise cromatográficas do óleo de *V. eichleriana*, cujo rendimento foi de 0,19 % (**Tabela 2.VIII**), revelaram a presença de 36 componentes, destes foram confirmadas as identidades de 31 compostos, por GC/MS e por índice de retenção, o que corresponde a 96,73 % do total qualitativo. Os demais 3,27 % foram caracterizados por sua massa molecular como sesquiterpenos oxigenados, aldeídos de cadeia longa assim como ácidos graxos de cadeia longa, sendo relatados como compostos não identificados (CNI). Os espectros de massas destes compostos estão no **Anexo I**.

Para esta espécie foram encontrados compostos majoritários que se distribuíram em 26,72 % monoterpenos, 9,03 % de monoterpenos oxigenados, 22,24 % de sesquiterpenos, 6,18 % sesquiterpenos oxigenados e 21,27 % ésteres de ácidos graxos de cadeia longa e 4,20 % ácidos graxos de cadeia longa, representando um total de 89,56 %.

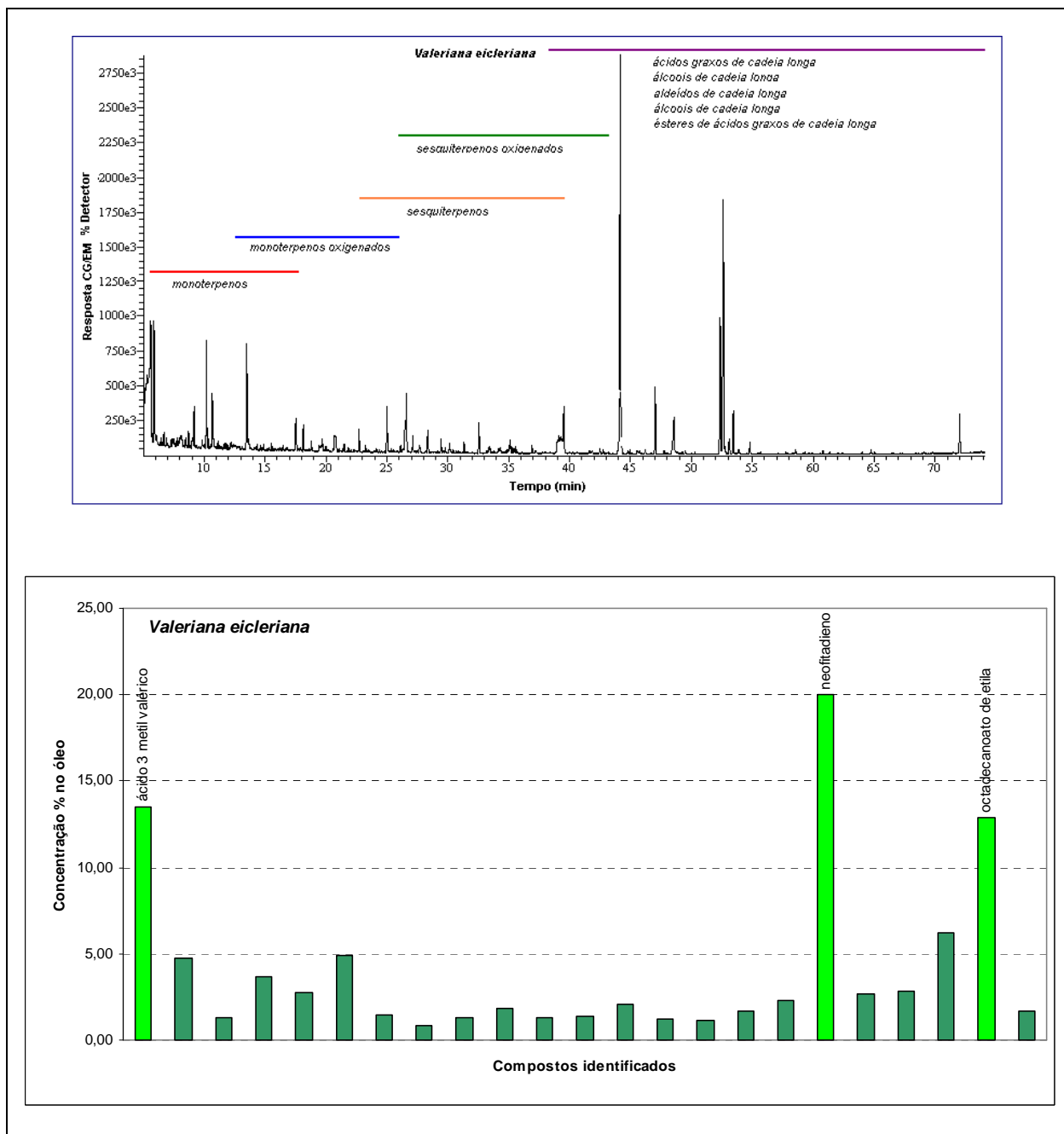


Figura 2.4: (a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *V. eichleriana*. (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de *V. eichleriana*. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela 2.V**.

Entre os monoterpenos hidrocarbonados destacou-se a presença do limoneno (3,67 %). Em evidência entre os monoterpenos oxigenados fica a presença de ácido 3-metil valérico (13,51 %), benzaldeído (4,78 %), fenil acetaldeído (2,78 %), linalool (4,90 %), α -terpineol (1,46 %) e do isovalerato de 3-cis hexenila (1,29 %). Os sesquiterpenos hidrocarbonados apresentaram como composto majoritário neofitadieno (19,99 %). Nos sesquiterpenos oxigenados destaca-se a presença de hidroxifarnesil acetona (2,71 %) e nos ésteres de ácidos graxos de cadeia longa o octadecanoato de metila – linoleato de metila (6,19 %) e octadecanoato de etila – linoleato de etila (12,88 %). Esses últimos são encontrados no processo de formação das paredes das cutículas de folhas jovens.

A análise cromatográfica do óleo de *Valeriana eupatoria* (**Figura 2.5**) cujo rendimento foi de 0,34 % (**Tabela 2.VIII**) revelou a presença de 106 componentes, tendo sido confirmada a identidade de 101 compostos por GC/MS e por índice de retenção, o que corresponde a 93,92 % do total. Os demais 6,08 % foram caracterizados por sua massa molecular e classificados como sesquiterpenos oxigenados, ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, álcool de cadeia longa, compostos não identificados (CNI). Entre os monoterpenos oxigenados destacaram-se as presenças do ácido isovalérico (5,12 %), ácido 3-metil valérico (1,82 %), isovalerato de isopentinila (2,66 %) e (2-*E*,4-*E*) decadial (2,02 %).

Os sesquiterpenos os majoritários foram α -copaeno (2,05 %), β -santaleno (1,62 %), biciclogermacreno (2,36 %), germacreno B (3,11 %). Os compostos majoritários entre os sesquiterpenos oxigenados foram acetato de geranila (3,18 %), isovalerato de benzila (1,68 %), β -ionona (1,21 %), (+) espatulenol (1,44 %), α -(*Z*)-bergamotol (1,23 %), (*E*)- β -santalol (3,06 %), isospatulenol (2,67 %) e acetato de etil fenila (4,90 %).

Nos ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, destacaram as presenças de octadecanoato de metila - linoleato de metila (5,89 %) e octadecanoato de etila – linoleato de etila (4,40 %). Entre os aldeídos de cadeia longa destacou-se o tetradecanal - miristaldeído (5,73 %).

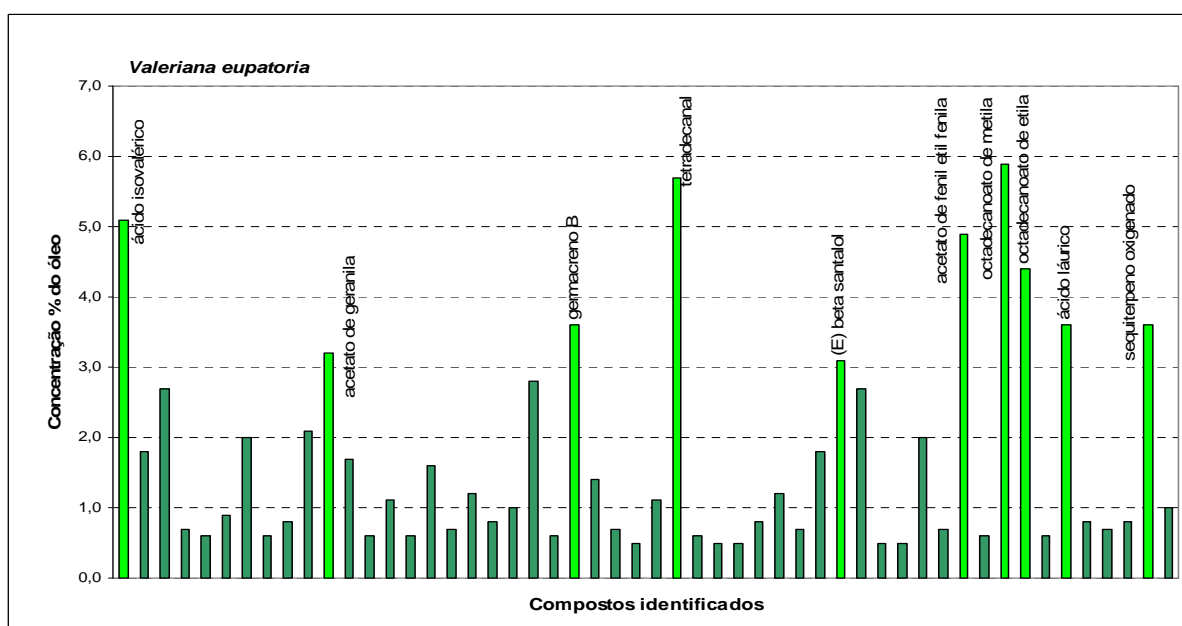
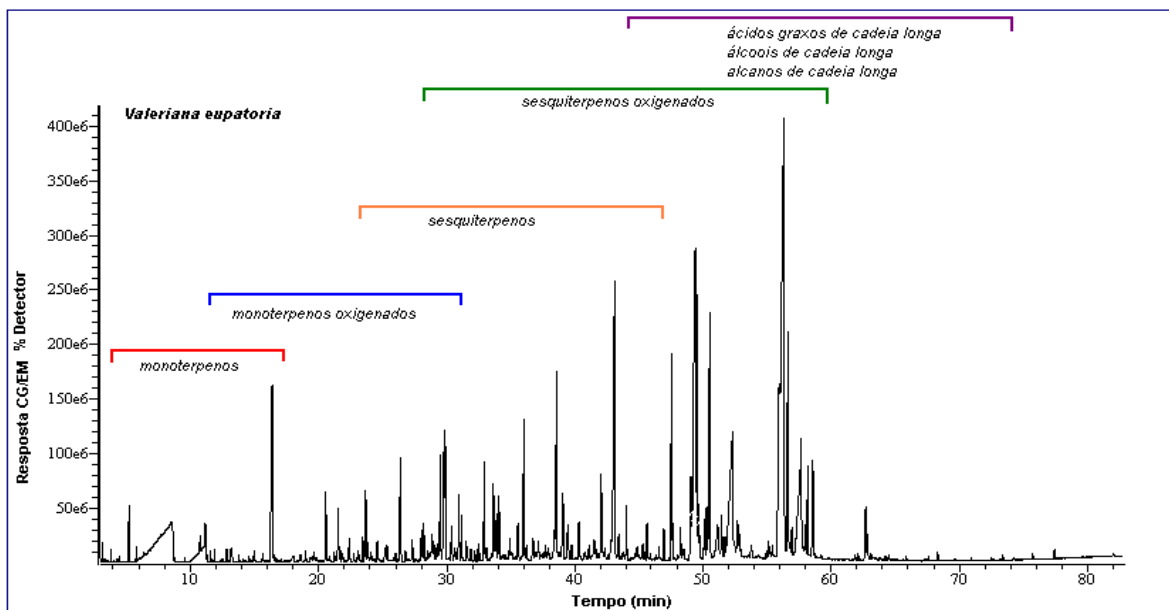


Figura 2.5: (a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *V. eupatoria*. (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de *V. eupatoria*. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela 2.V**.

Relata-se a presença de compostos típicos da família Valerianaceae como os traços de borneol (traços) e acetato de bornila (0,34 %), do sesquiterpeno quessano (0,39 %) e valerianol (0,61 %), dos sesquiterpenos oxigenados valerianol (0,30 %), valeranal (0,49 %), valeranona (0,13 %), ácido

valerênico (0,83 %), isômero valerenal (0,67 %), acetato de trans-valerenila (0,33 %) e isovalerato de cis-valerenila (0,27 %).

As **Figuras 2.6 e 2.7** ilustram os resultados obtidos para os hidrodestilados de *V. glechomifolia* e *V. tajuensis*, respectivamente.

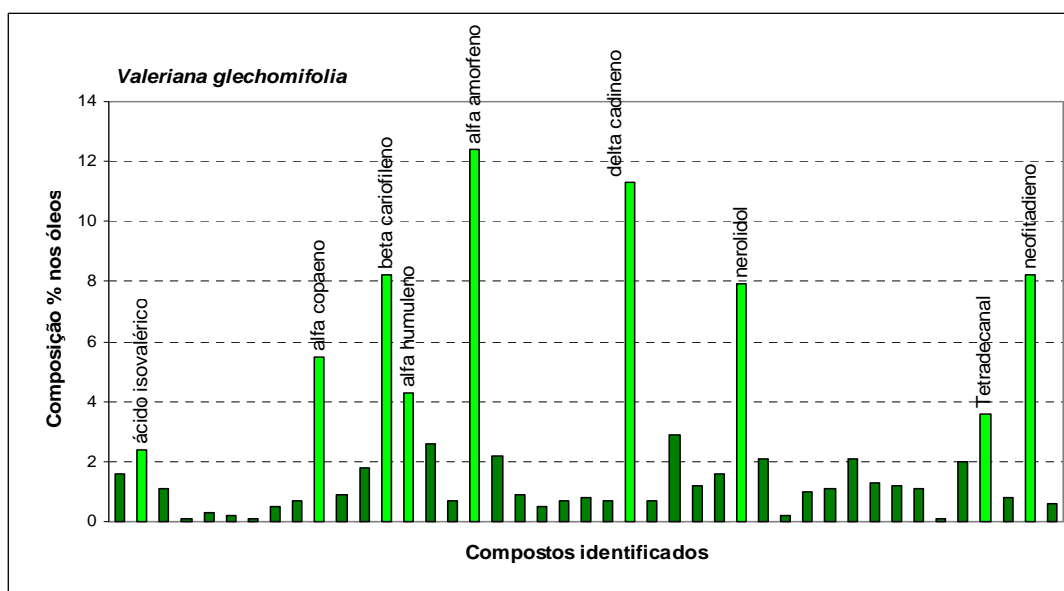
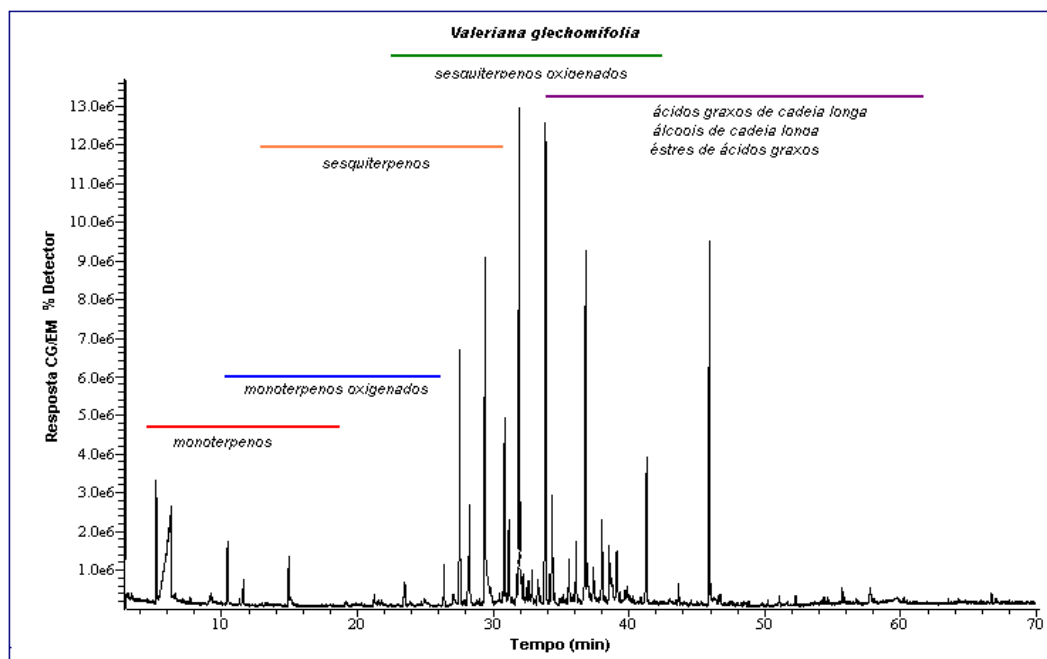


Figura 2.6: (a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *V. glechomifolia*. (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de *V. glechomifolia*. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela 2.V**.

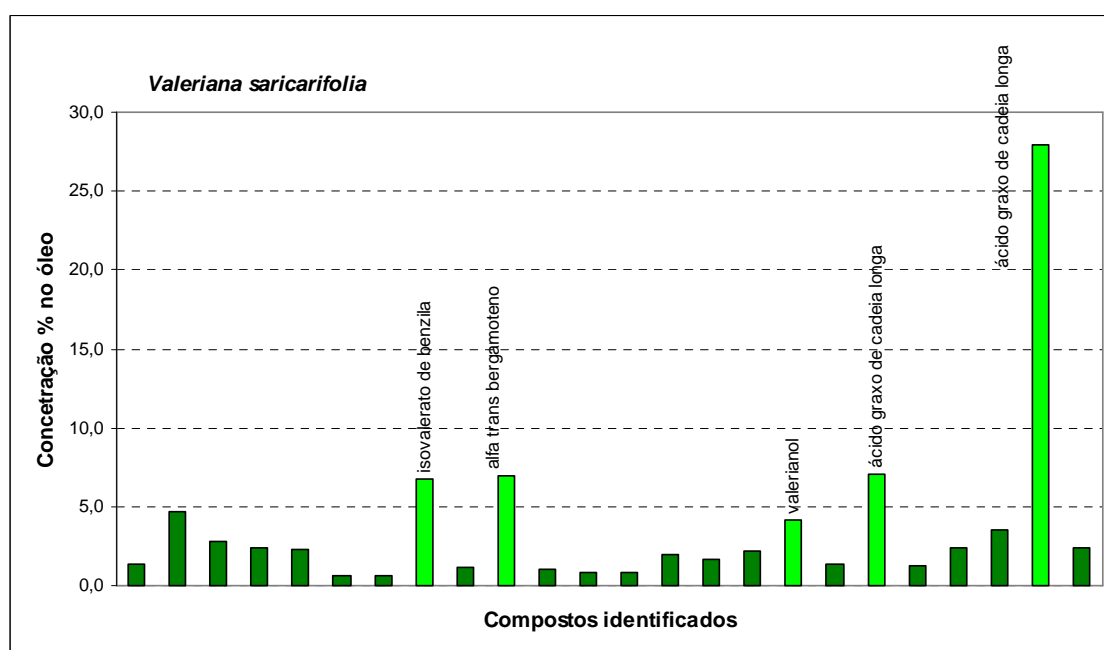
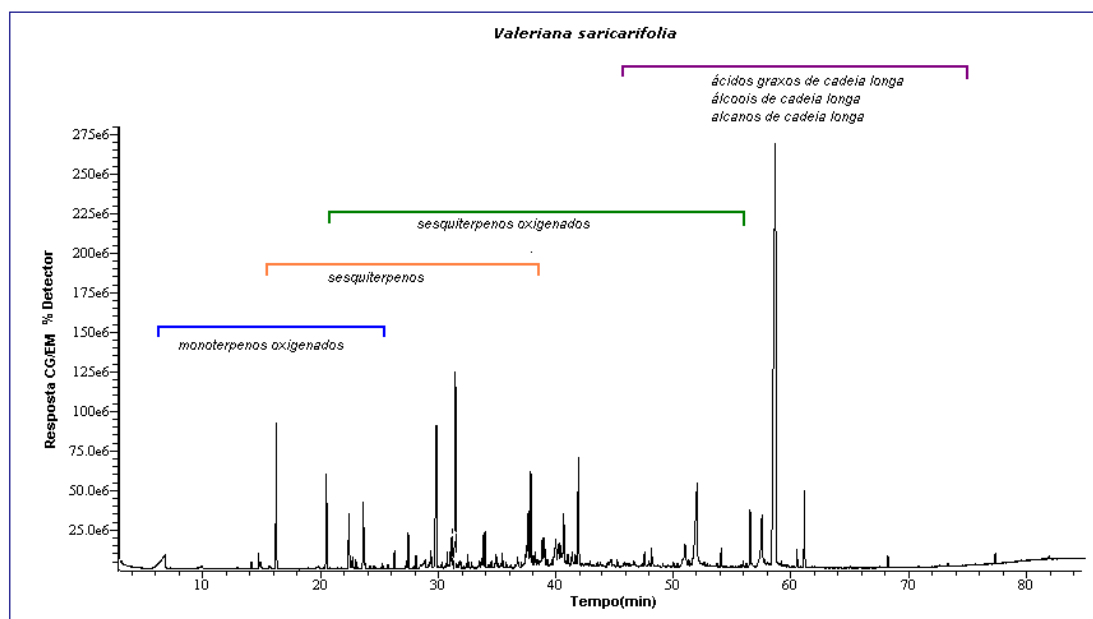


Figura 2.7: (a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *V. saricariifolia*. (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de *V. saricariifolia*. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela 2.V**.

A análise cromatográfica do óleo essencial de *V. glechomifolia* (**Figura 2.6**) cujo rendimento em óleo foi de 0,21 % (**Tabela 2.VIII**) revelou a presença de 43 componentes, sendo a identidade confirmada por GC/MS e por índice de retenção calculado segundo o método de Kovats.

Entre os monoterpenos oxigenados destacou-se a presença de ácido isovalérico (2,37 %) como majoritário e, entre os sesquiterpenos destacaram-se os compostos α -copaeno (5,51 %), β -elemeno (1,81 %), trans- β cariofileno (8,24 %), α -humuleno (4,28 %), β -santaleno (2,63 %), α -amorfenol (12,35 %), germacreno D (2,20 %), δ -cadineno (11,33 %), α -calacoreno (2,93 %), éter cis-cadineno (1,62 %) e neofitadieno (8,15%). Nos sesquiterpenos oxigenados destacaram-se as presenças de benzoato de 3-cis-hexenila (2,11 %), benzoato de hexila (2,11 %), óxido de cariofileno (1,33%), globulol (1,19 %), viridiflorol (1,07 %) e isovalerato de geranila (2,01 %). Nos aldeídos de cadeia longa destacou-se o tetradecanal-miristaldeído (3,56 %). Nos ácidos graxos de cadeia longa, identificou-se o ácido dodecanoico (7,94 %).

A análise cromatográfica do óleo essencial de *V. saricariifolia* (**Figura 2.7**) cujo rendimento em óleo foi de 0,21 % (**Tabela VIII**) revelou a presença de 56 componentes, sendo confirmada a identidade por GC/MS de 43 compostos, o que corresponde a 52,83 % do total. Os demais 47,17 % foram caracterizados por sua massa molecular sendo classificados como monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados e ácidos graxos de cadeia longa, não identificados (CNI).

Destacaram-se entre os monoterpenos oxigenados as presenças de ácido isovalérico (1,31 %), linalool (4,63 %), α -terpineol (2,82 %), nerol (2,37 %), geraniol (2,28 %). Entre os sesquiterpenos o composto majoritário foi α -(Z)-bergamotol (6,93 %). Nos sesquiterpenos oxigenados os compostos isovalerato de benzila (6,73 %), isovalerato de fenil etila (1,05 %), óxido de cariofileno (1,93 %), isovalerato de geranila (1,68 %) germacreno B (2,15 %) e valerianol (4,19 %).

Foram identificados os sesquiterpenos típicos da família Valerianaceae, encontrados na espécie e os monoterpenos oxigenados isovalerato de hexila e isovalerato de trans-2-hexenila e os sesquiterpenos oxigenados: valerianol, valeranona e valeranol.

A análise cromatográfica do óleo essencial de *V. scandens* (**Figura 2.8**) cujo rendimento em óleo foi de 0,24 % (**Tabela VIII**) revelou a presença de 56

componentes, sendo confirmada a identidade por GC/MS de 45 compostos, o que corresponde a 54,72 % do total qualitativo destes. Os demais foram caracterizados por sua massa molecular sendo classificados como monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados e ácidos graxos de cadeia longos, não identificados (CNI).

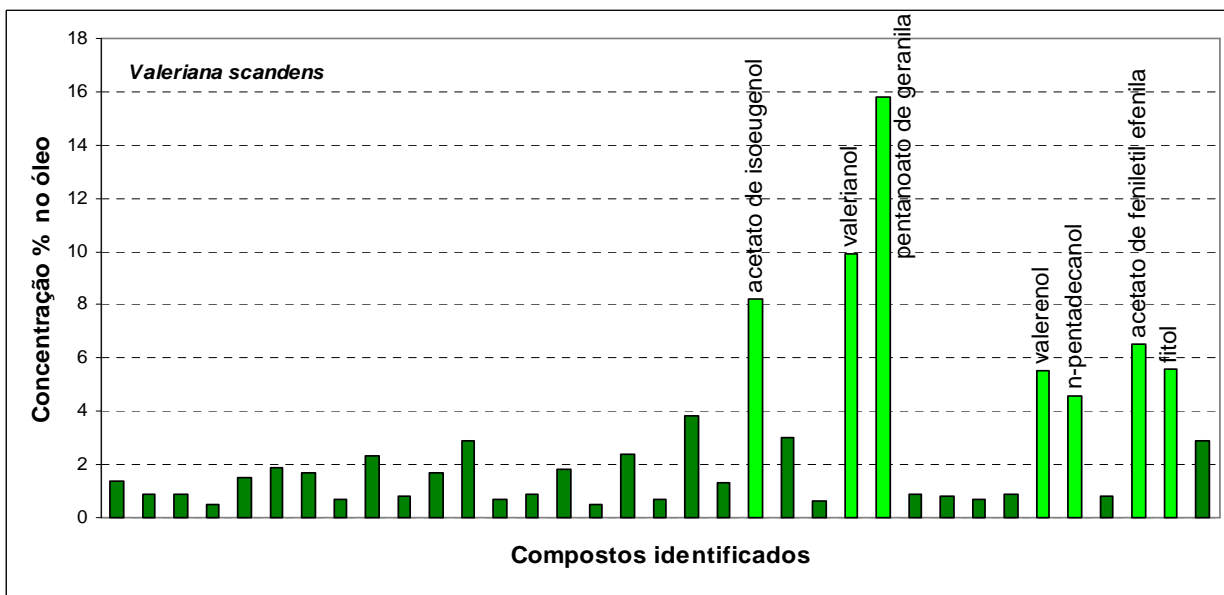
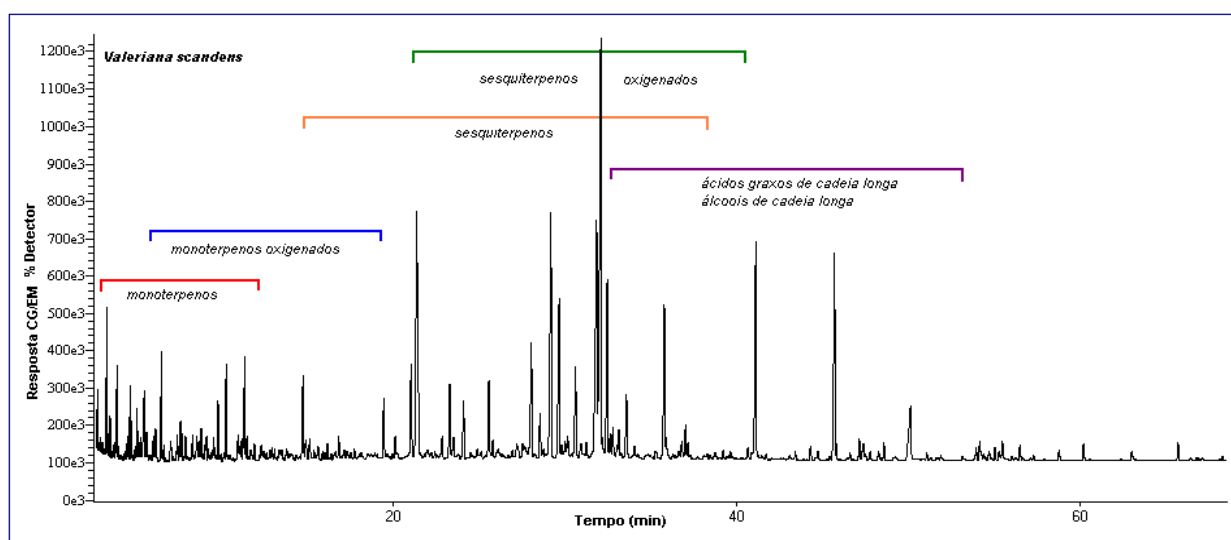


Figura 2.8: (a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *V. scandens*. (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de *V. scandens*. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela 2.V**.

Entre os compostos majoritários detectados entre os monoterpenos encontram-se a *m-menta-1(7) 8 dieno* (1,53 %) e o limoneno (1,94%). Nos monoterpenos oxigenados, o linalool (1,71%).

Entre os sesquiterpenos o β -selineno (1,76 %) e nos sesquiterpeno oxigenados os compostos isobutoanoato de isobornila (2,90 %), *cis-nerolidol* (2,37%), benzoato de (2-*Z*)-hexila (3,78%), pentanoato de geranila (15,78 %), valeranol (5,54 %), acetato de fenil etil fenila (6,54 %), fitol (5,62 %) e antranilato de citronelila (2,88 %). Também foram identificados alguns dos sesquiterpenos típicos da família Valerianaceae isobutanoato de isobornila, valerianol e valeranol.

A análise cromatográfica do óleo essencial de *V. tajuensis* (**Figura 2.9**) cujo rendimento em óleo foi de 0,36 % (**Tabela VIII**) revelou a presença de 90 componentes, sendo confirmada a identidade por GC/MS e índices de retenção de 75 compostos, o que corresponde a 69% do total qualitativo destes. Os demais 31 % foram caracterizados por sua massa molecular sendo classificados como monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados não identificados.

O monoterpeno α -pineno (0,38 %) e entre os monoterpenos oxigenados: ácido isovalérico (0,38 %) e 1,8 cineol (0,34 %) foram os compostos em destaque.

Entre os sesquiterpenos oxigenados destaca-se a presença de α -copaeno (4,14 %), β -bourboneno (1,72 %), *trans*-cariofileno (4,74 %), α -humuleno (2,36 %), alloaromadendreno (1,78 %), germacreno D (1,15 %), valenceno (6,36 %), biciclogermacreno (3,08 %), *trans*-calameneno (1,96 %), δ -cadineno (5,46 %), *trans*-isolongifolano (2,09 %) e diidromirceno (1,06 %).

Foram identificados os sesquiterpenos típicos da família Valerianaceae como o quessano e os sesquiterpenos oxigenados acetato de *cis*-valerenila, isovalerenato de *cis*-valerenila e isovalerato de *trans*-valerenila.

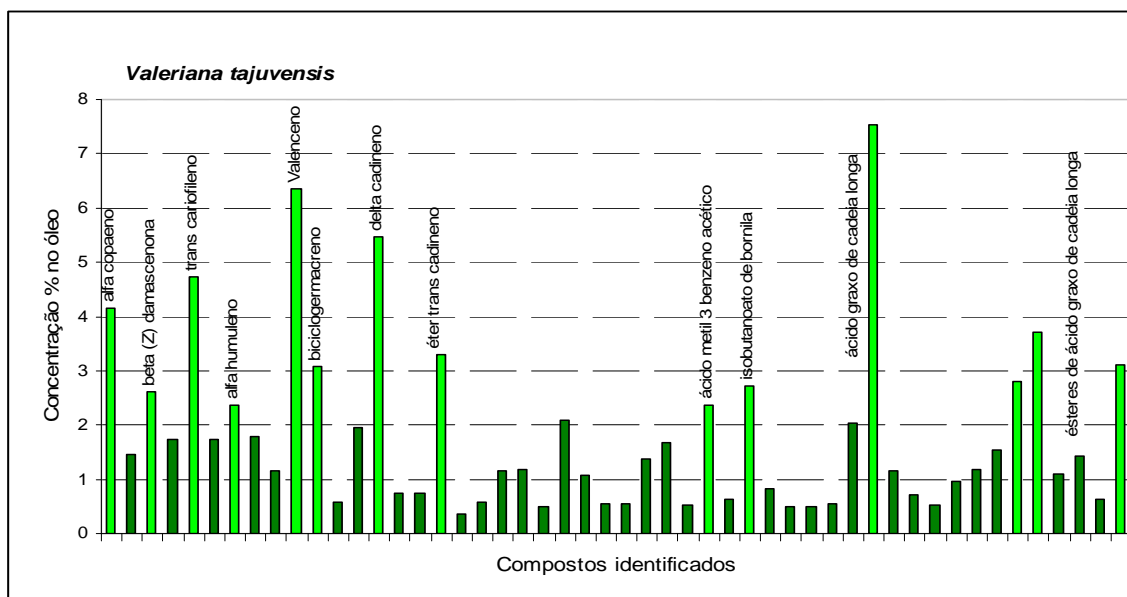
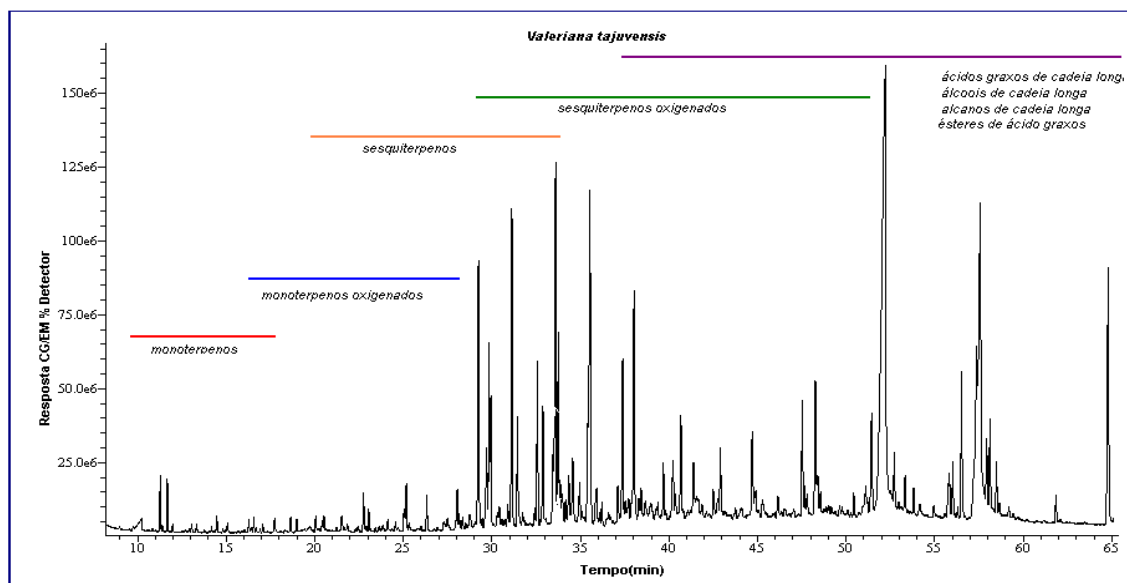


Figura 2.9: (a) Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *V. tajuvensis*. (b) Histograma representativo dos compostos com concentração acima de 0,5 % no óleo volátil de *V. tajuvensis*. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela 2.V**.

Os compostos tidos como marcadores quimiotaxonômicos e farmacológicos da família Valerianaceae foram identificados nas espécies estudadas em grande variabilidade. A espécie *V. eichleriana* foi à única que apresentou somente um dos marcadores o ácido 3-metil isovalérico.

A **Figura 2.10** mostra a distribuição percentual de alguns compostos candidatos a quimiomarcadores de *Valeriana*.

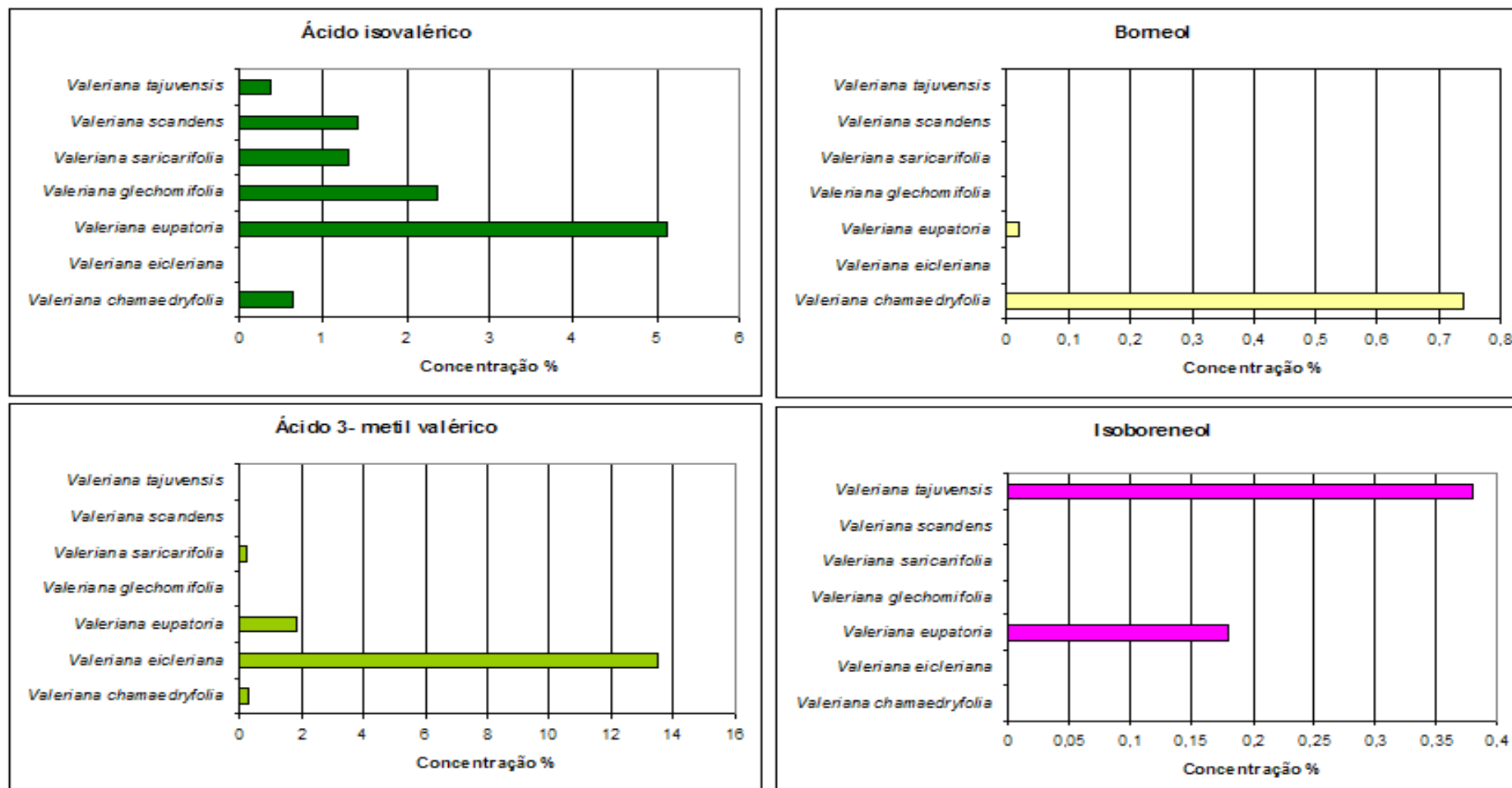


Figura 2.10: Percentuais de marcadores quimiotaxonômicos e farmacológicos encontrados nas espécies estudadas de *Valeriana*.

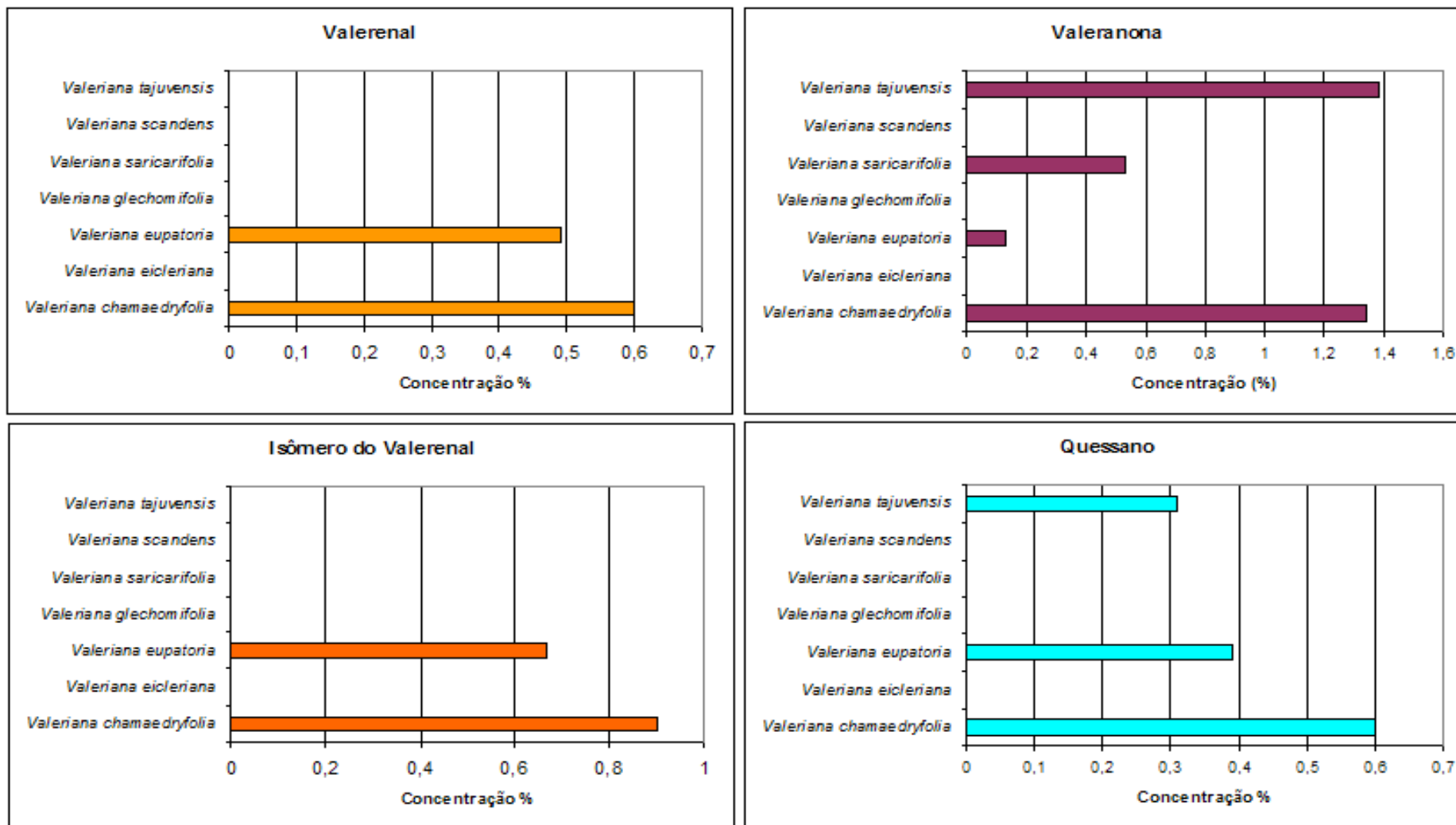


Figura 2.10 (continuação): Percentuais de marcadores quimiotaxonômicos e farmacológicos encontrados nas espécies estudadas de *Valeriana*.

Os hidrodestilados apresentaram um perfil cromatográfico rico em compostos do tipo sesquiterpenos hidrocarbonetos, sesquiterpenos oxigenados, ácidos graxos de cadeia longa e ésteres de ácidos graxos longa. As duas últimas classes químicas são de estruturas típicas encontradas na formação da cutícula de folhas ^[171]. A detecção da presença de ácido isovalérico e de ácido 3- metil isovalérico foi realizada em seis das sete espécies. A origem desses dois compostos pode ser justificada pela degradação das ligações éster dos valepotriatos relatados para estas espécies por Silva e colaboradores ^[75]. Salienta-se que, segundo literatura ambos compostos possuem ação sedativa e hipnótica. O ácido valérico "comum ou descrito como ordinário", de cadeia normal (chamado também de ácido baldrânico) é uma mistura de ácido isovalérico (ou ácido isopropilacético) e é opticamente ativo juntamente com o ácido metil-etil-acético. Ambos podem ser extraídos por fervura com água ^[36].

De forma geral dentro da classe dos monoterpenos foram detectados α -pineno e linalol. O α -pineno apresenta atividades antiinflamatórias, expectorantes, antimicrobianas frente a *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* e antifúngicas. Esse monoterpeno é precursor da semi-síntese da cânfora e também é empregado como material de partida para obtenção de mirceno e canfeno, os quais conferem o aroma amadeirado do vegetal vivo ^[40]. Por sua vez o linalool apresenta propriedades anticonvulsivantes, antiespasmódicas, antimicrobianas, acaricida e como repelente de insetos. Além disto, pode ser usado como reagente de partida na produção de Vitamina A e Vitamina E ^[36;171].

A fração sesquiterpênica apresentou como compostos principais o α -copaeno, α -cubebeno, β -cariofileno, δ -cadineno, γ -cadineno, acetato de geranila, germacreno D, germacreno B, α -amorfenol, (*Z*)-nerolidol, isovalerato de benzila, (*Z*)- α -bergamoteno, acetato de isoeugenol, valerianol, pentanoato de geranila e biciclogermacreno, neofitadieno e fitol. Todos possuem algum tipo de atividade biológica. Exemplo disto é o α -copaeno que possui pronunciada atividade antiinflamatória, além de ter sido relatada a atividade contra o câncer. O α -amorfenol e o α -cubebeno apresentam elevada atividade antimicrobiana ^[172].

O β -cariofileno possui ação antimicrobiana sobre *E. coli*, *Bacillus megaterium* e *Candida albicans*. Também apresenta ação espasmolítica antiedematogênicas, efeito citoprotetor da mucosa gástrica e moderada atividade antimalárica sobre as formas intra eritrocitárias do *Plasmodium falciparum*. δ -cadineno e γ -cadineno possuem atividade antimalárica [172].

O acetato de geranila apresenta atividade antimicrobiana contra *E. coli*, possui também atividade antioxidante. Esse composto se biotransforma em geraniol que tem atividade farmacológica. Germacreno D e germacreno B demonstraram atividade antiviral contra herpes (HV-1), atividade antibacteriana e antioxidante. Enquanto que (*Z*) e (*E*) nerolidol apresentam propriedades antimicrobianas, além de serem precursores de compostos como o gefarnato que possui atividade antiúlcera [172]. Fitol apresenta atividade antimicrobiana para bactérias Gram (-), Gram (+), atividade fúngica e atividade anticarcinogênica [172].

Os compostos marcadores característicos de Valerianaceae (**Figura 2.10**) têm sido relatados na literatura como componentes da ação farmacológica das espécies de *Valeriana* sobre o SNC, entretanto nenhum estudo até o momento foi relatado com os compostos isolados [30].

2.3.5 Análise Estatística

Procedeu-se à análise estatística com a finalidade de investigar se as composições químicas dos óleos voláteis das espécies de *Valeriana* brasileiras se assemelham à composição química descrita na literatura para *V. officinalis*. Para tanto, empregaram-se dois métodos de análise: Ward e a análise de compostos principais (PCA) através do emprego do programa SSPS®.

A primeira metodologia empregada foi à análise de variáveis multivariadas pelo método Ward e teve por finalidade estabelecer a hierarquização entre as espécies nativas de *Valeriana* e a espécie referência *V. officinalis*. A **Figura 2.11** mostra os resultados da hierarquização das espécies de *Valeriana* levando em conta a composição química elucidada pelo método cromatográfico.

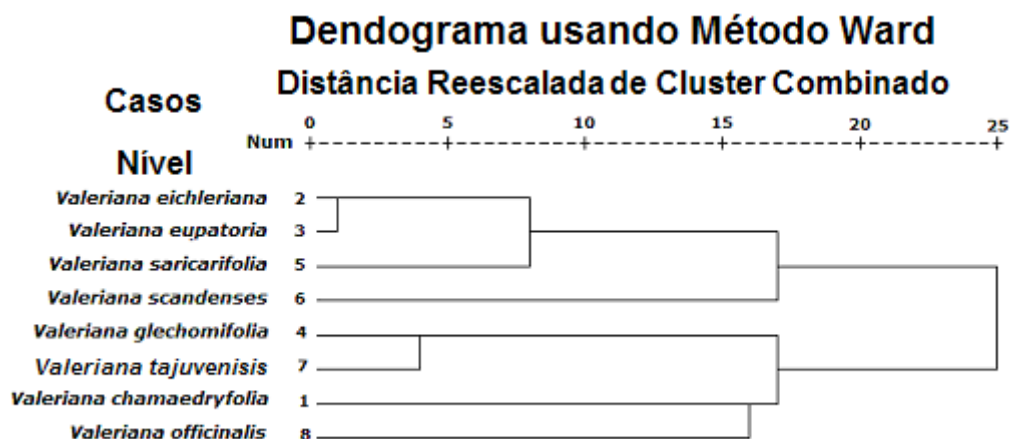


Figura 2.11: Formação de grupos por hierarquização entre as espécies de *Valeriana*.

As espécies de *Valeriana* podem ser agrupadas em dois grupos diferentes. O primeiro é composto das espécies *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. saricariifolia* e *V. scandens*. Dentro deste grupo há uma similaridade maior na composição química entre *V. eichleriana* e *V. eupatoria*. Por sua vez, *V. saricariifolia* se relaciona quimicamente com *V. eichleriana* e por fim *V. scandens* se relaciona com menor intensidade.

O segundo grupo composto de *V. chamaedryfolia*, *V. tajuensis* e *V. glechomifolia* é aquele que mais se parece quimicamente com a espécie referência *V. officinalis*.

Ressalta-se que as espécies de maior correlação dentro deste grupo foram *V. glechomifolia* e *V. tajuensis*, mas a espécie *V. chamaedryfolia* é a de maior similaridade a *V. officinalis*. Portanto, há indicativos que entre estas três espécies uma possa ser selecionada como a candidata à matéria-prima vegetal substitutiva à *V. officinalis*.

A aplicação do teste estatístico de análise de grupos principais (PCA), levou em conta dois fatores de variabilidade que explicam cerca de 63 % da correlação química entre as espécies de *Valeriana* brasileiras e *V. officinalis*.

A **Figura 2.12** apresenta a distribuição da proximidade ou da dispersão entre as espécies de *Valeriana*.

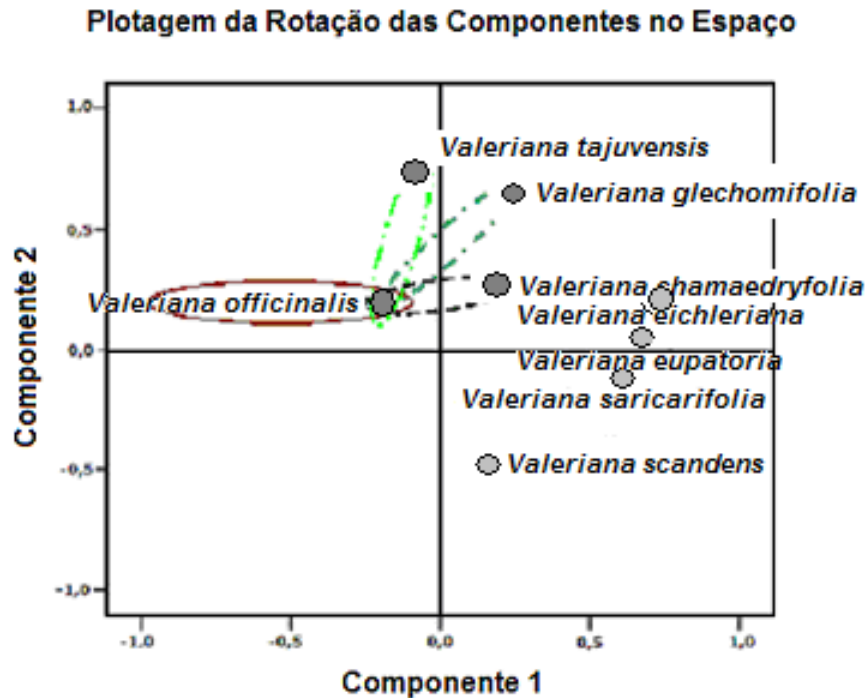


Figura 2.12: Análise de compostos químicos principais (PCA) dos óleos voláteis de espécies de *Valeriana*.

A análise de PCA confirmou as relações estabelecidas pelo método de variáveis multivariadas Ward. Há evidências estatísticas que mostram a maior proximidade da *V. chamaedryfolia* com a espécie referência, entretanto a que está no mesmo quadrante de correlação é *V. tajuensis* com uma distância um pouco maior. O inter-relacionamento entre *V. glechomifolia* e *V. tajuensis* também foi ratificado por estarem mais próximas, mesmo pertencendo a quadrantes diferentes.

As demais relações também foram visualizadas através do agrupamento das espécies *V. glechomifolia*, *V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana* e *V. eupatoria*. As espécies que mais se distanciam do grupo são *V. scandens* e *V. saricariifolia*.

Os estudos estatísticos estabeleceram matematicamente a correlação química entre os indivíduos coletados, sendo uma ferramenta fundamental para ser utilizada na confirmação da classificação quimiotaxonômica da família Valerianaceae.

2.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

As principais conclusões para esta etapa do trabalho podem ser resumidas nos tópicos seguintes:

- As sete espécies brasileiras de *Valeriana* estudadas acumulam compostos voláteis, confirmando o que é descrito para espécies da família Valerianaceae;
- A estabilização do material vegetal pela operação unitária de liofilização permitiu a otimização do processo de extração, melhorando, de forma significativa, o rendimento dos hidrodestilados, sendo a condição de secagem eleita tanto pelos baixos índices de umidade residuais como pela influência no rendimento de extração;
- O processo de liofilização contribuiu de forma decisiva para que os óleos das espécies *V. eichleriana* e *V. glechomifolia* pudessem ser analisados cromatograficamente por GC-FID e GC-MS, uma vez que, a fração monoterpênica só foi evidenciada nos hidrodestilados provenientes de material-vegetal liofilizado, o que é um forte indicativo do processo de conservação dos constituintes na matriz vegetal;
- Os óleos das sete espécies em estudo demonstraram um perfil pobre na região dos monoterpenos, mas rico em compostos do tipo sesquiterpenos hidrocarbonetos, sesquiterpenos oxigenados, ácidos graxos de cadeia longa e ésteres de ácidos graxos longa;
- O controle de temperatura de ebulição e condensação do hidrodestilado, associado à secagem através de Na_2SO_4 e a conservação em atmosfera de nitrogênio, propiciaram a manutenção das características relacionadas à cor, aos aspectos visuais e odoríferos dos hidrodestilados;
- Os compostos tentativamente identificados nos óleos essenciais de três espécies (*V. eichleriana*, *V. glechomifolia* e *V. scandens*) resultaram em mais de 92 % da área percentual do montante total dos componentes. *V. chamaedryfolia* e *V. eupatoria*, tiveram tentativamente identificados mais de 85 % dos compostos, enquanto *V. tajuvensis* e *V. eichleriana* mostraram uma alta

quantidade de ácidos carboxílicos de cadeia longa e ésteres, difíceis de identificar impedindo a elucidação de um número maior de compostos;

- O maior rendimento médio (média das três extrações realizadas para cada amostra) de óleos voláteis em massa seca foi o obtido na espécie *V. tajuensis* (0,36 %) e *V. eupatoria* que apresentou (0,34 %), seguido de *V. saricariifolia* (0,29 %), *V. chamaedryfolia* (0,29 %), *V. scandens* (0,24 %) e *V. glechomifolia* (0,21 %);
- A proporção de agente esterificante (0,1 % v/v) não foi suficiente para esterificar à totalidade dos ácidos, visto que houve a identificação da presença residual do ácido oleico e ácido palmítico entre os hidrodestilados analisados;
- Detectou-se a presença de ésteres do tipo etílico. O fato é um indício de que os mesmos se originam na própria matriz vegetal, pois o agente de esterificação não induz a reação do ácido com o grupamento etila;
- A composição química monoterpênica foi apreciável nas espécies *V. chamaedryfolia*, *V. eupatoria* e *V. tajuensis*;
- O ácido isovalérico e o ácido 3-metil valérico, também denominados de ácidos baldrinâmico, está presente nas sete plantas estudadas e podem ser usados como possíveis agentes químio-marcadores para as espécies de *Valeriana* brasileiras estudadas;
- Entre os monoterpenos detectados ressalta-se a presença quase constante de α -pineno e linalol;
- Na fração sesquiterpênica os principais compostos detectados e caracterizados foram α -copaeno, α -cubebeno, β -cariofileno, δ -cadineno, γ -cadineno, acetato de geranila, germacreno D, germacreno B, α -amorfenol, (Z)-nerolidol, isovalerato de benzila, (Z)- α -bergamoteno, acetato de isoeugenol, valerianol, pentanoato de geranila e biclogermacreno, neofitadieno e fitol;
- A presença de compostos borneol, isoborneol, valerenol, valerianol, valeranal, valeranona e quessano é um indício de que estes compostos possam ser usados na classificação quimiotaxonômica de espécies *Valeriana* brasileiras;

- O método estatístico Ward propiciou a hierarquização das relações químicas estabelecendo dois grupos com características diferenciadas;
- O grupo que mais se aproximou quimicamente, qualitativamente e quantitativamente, da espécie *V. officinalis* foi o composto por *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis*;
- A análise de PCA mostrou a proximidade e a dispersão entre as espécies brasileiras juntamente com a espécie referência *V. officinalis*;
- Os indícios colocam em evidência as espécies *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis* como as possíveis matérias-primas vegetais a serem usadas na substituição da *V. officinalis*, no que tange ao extrato enriquecido em óleos voláteis;
- A técnica cromatográfica gasosa foi capaz de separar a maior parte dos constituintes dos hidrodestilados (amostra complexa) obtidos das espécies de Valeriana;
- Os detectores FID e MS mostram boa sensibilidade para compostos em baixa concentração sendo capazes de fornecerem dados que contribuiram para o discernimento e elucidação estrutural dos compostos voláteis.

CAPÍTULO 3

EXTRAÇÃO COM FLUIDO
SUPERCRÍTICO APLICADA
AO ESTUDO DA ESPÉCIE
VALERIANA TAJUVENSIS Sobral

3.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1.1 Considerações iniciais

O grande poder de solubilização dos fluidos supercríticos foi desvendado no final do século XIX por Hannay e Hogarth em 1879 estudando a solubilidade do cloreto de cobalto (II), cloreto de ferro (II), brometo de potássio e iodeto de potássio em etanol supercrítico. Seu uso em química analítica foi verificado quase um século depois, no final do século XX. Após isto, os estudos com fluidos supercríticos foram intensificados, surgindo várias patentes para extração de diversos produtos naturais, como extração de cafeína do café, da nicotina do tabaco, obtenção de aromatizantes de diversas especiarias, além de aplicações que incluem extração de óleos vegetais, preparação de alimentos dietéticos (eliminação de gorduras), purificação de compostos, entre outras. Sem dúvida, a aplicação industrial de maior destaque é a obtenção do café descafeinado, que antes era obtido por extração com solventes orgânicos tóxicos. Mundialmente a extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês “*Supercritical Fluid Extraction*”) tem sido aplicada a várias áreas, entre elas a extração amostras ambientais (solo, água, ar, sedimentos, suspensões e tecidos animais), alimentos (frutas, vegetais, cereais, tecidos animais...), produtos naturais (óleos voláteis, aromas...), fármacos (drogas de abuso, hormônios) e polímeros [173;174].

No Brasil o uso da extração com fluidos supercríticos vem crescendo, mas, ainda é um uso modesto quando se relaciona a importância da técnica extrativa à química analítica e sua importância para o meio ambiente. Este fato não se justifica ao se considerar o enorme potencial de aplicação deste método a várias técnicas analíticas, destacando-se a cromatografia com fluido supercrítico (SFC, do inglês “*Supercritical Fluid Chromatography*”) [174;175].

O “estado supercrítico” acontece quando um gás é confinado em um espaço determinado e gás e líquido estão em equilíbrio entre si. Aquecendo-se o sistema, as propriedades intrínsecas de ambos convergem para um mesmo ponto até serem idênticas (por exemplo, densidade, viscosidade, índice de refração, condutividade térmica, etc...). Este ponto é denominado ponto

crítico ^[173], e nele termina a interface gás/líquido, pois a partir deste ponto encontra-se uma única fase, chamada supercrítica. Portanto, de forma geral o fluido supercrítico é toda substância que se encontra nas condições de pressão e temperatura superiores aos seus parâmetros críticos. Essa região é visualizada no diagrama de fases apresentado na **Figura 3.1**:

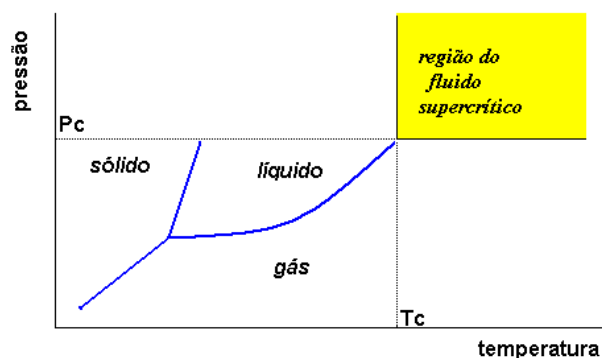


Figura 3.1: Diagrama Pressão versus Temperatura para o CO₂(Silva, 2008).

A temperatura crítica é a temperatura mais alta que o gás será convertido em líquido pelo aumento da pressão e, por sua vez, a pressão crítica é a pressão mais elevada, na qual o líquido pode ser convertido em gás pelo aumento da temperatura ^[175-177].

Quando comparamos o solvente no estado supercrítico a outros solventes comuns, tem-se que este apresenta coeficiente de difusão mais alto, viscosidade mais baixa e maior densidade do que os gases. Desta forma, as qualidades adquiridas pelo fluido supercrítico, como viscosidades mais baixas e taxas de difusão mais altas, tornam-o adequado para extração de compostos inseridos e fixados a matrizes sólidas, como ocorre no preparo de extratos de plantas medicinais ^[176-178].

A densidade, viscosidade e difusividade são propriedades físicas afetadas diretamente pelas mudanças na temperatura e/ou pressão. O aumento da pressão leva ao aumento da densidade, favorecendo o rendimento extrativo, por outro lado, acarretando menor difusividade e maior viscosidade o que prejudica o rendimento de extração ^[175]. Exemplos de propriedades supercríticas estão descritas na **Tabela 3.I**.

Tabela 3.I: Propriedades termodinâmicas de fluidos ^[175].

Estado do Fluido	Densidade (g cm ⁻³)	Difusividade (cm ² s ⁻¹)	Viscosidade (g cm ⁻¹ s ⁻¹)
Gás	(1-3) x 10 ⁻⁴	0,1-0,4	(0,6-2) x 10 ⁻³
Líquido	(0,2-3) x 10 ⁻²	(0,2-2) x 10 ⁻⁵	0,6-1,6
Supercrítico	(1-3) x 10 ⁻⁴	0,7 x 10 ⁻³	0,2-0,5

Outro fator a ser considerado é a temperatura. Aumentos na temperatura ocasionam a diminuição na densidade do fluido, diminuindo o rendimento extrativo. Nestas condições ainda ocorrem um aumento na difusividade e a diminuição da viscosidade o que, por outro lado, favorece o rendimento. Com o aumento da temperatura há aumento na pressão de vapor dos compostos voláteis, o que favorece o rendimento ^[177-179].

3.1.2 Fluidos supercríticos

Os solventes empregados como fluidos supercríticos devem ter atrativos para a extração de matrizes complexas. Precisam obedecer alguns critérios de escolha de solvente entre estes levar em conta a especificidade do composto alvo, risco e toxicidade de manipulação, assim como o impacto ao meio ambiente. Além disto, devem apresentar características que comprovem as habilidades de agirem como fluidos supercríticos a fim de que se justifique o custo do uso desta técnica. Existem muitos compostos com capacidade de agirem como fluidos supercríticos. A **Tabela 3.II** apresenta uma variedade de solventes para serem empregados como fluidos supercríticos. Também são apresentados os parâmetros críticos: P_c (pressão crítica), T_c (temperatura crítica) e δ_c (densidade crítica) ^[177-180].

Tabela 3.II: Solventes mais utilizados na extração supercrítica ^[174].

Tipo de fluido	Gases	T _c (°C)	P _c (atm)	δ _c (g/cm ³)
Compostos Inorgânicos	CO ₂	31	72,85	0,469
	NH ₃	133	111,54	0,236
	H ₂ O	374	217,17	0,323
	N ₂ O	36	71,50	0,452
Hidrocarbonetos	Metano	- 82	45, 41	0,169
	Etano	32	48, 17	0,203
	Propano	97	41,85	0,217
	Pentano	197	33,26	0,237
	Etileno	9	49,65	0,218
	Benzeno	289	48,27	0,302
	Tolueno	319	40,57	0,292
Compostos Oxigenados	Metanol	240	79,86	0,272
	Etanol	241	60,61	0,276
	Acetona	235	46,39	0,279
	Éter etílico	194	35,93	0,265
Composto Nitrogenado	Piridina	347	55,57	0,312

T_c= temperatura crítica; P_c = pressão crítica; δ_c = densidade crítica ^[174;180].

3.1.2.1 CO₂ - Dióxido de carbono

Há um particular interesse da indústria farmacêutica no emprego do CO₂. Este fluido atende às preocupações como a toxicidade do meio de extração, a forma de estocagem do solvente extrator e a estabilidade térmica ^[173].

De todos os fluidos possíveis o CO₂ é o mais usado por apresentar pressão crítica moderada, maior densidade e baixa temperatura crítica, ideal para muitos compostos termolábeis. Além disso, é facilmente separado do soluto, não é tóxico, não causa problemas ambientais, não é inflamável e tem um custo relativamente baixo ^[174].

O dióxido de carbono - CO₂ - alcança o ponto crítico a uma temperatura próxima à ambiente (31,3 °C) e pressão relativamente baixa de 73 atm. Estas propriedades de transporte são favoráveis, pois implicam em baixa viscosidade e alto coeficiente de difusão. Com seu baixo calor de vaporização, especialmente perto do ponto crítico, o consumo de energia em muitos processos é baixo ^[175]. No estado líquido, o CO₂ é miscível com todos os solventes líquidos comuns, do metanol ao pentano, e com hidrocarbonetos monoterpênicos puros, monoterpênicos aldeídicos e todos os ácidos carboxílicos líquidos ^[176]. O CO₂ supercrítico é completamente miscível com hidrocarbonetos de baixo peso molecular, assim como em compostos

orgânicos oxigenados. Este fluido pode também ser empregado para extração de compostos orgânicos em extratos aquosos já que sua solubilidade em água é baixa. Nestas condições possui alta volatilidade, quando comparado a qualquer composto orgânico facilitando sua separação da matriz complexa extraída e sua recuperação e reutilização como solvente ^[180].

3.1.2.2 C₃H₈ - propano

Uma alternativa ao CO₂ é o uso do propano que alcança o ponto crítico a uma temperatura próxima à ambiente (41,85 °C) e pressão relativamente baixa (91 atm). Estas propriedades de transporte também são favoráveis apresentando baixa viscosidade e alto coeficiente de difusão. Freitas e colaboradores ^[179] efetuaram extrações supercríticas sobre sementes de uva e os resultados apontam que a extração contendo propano supera os rendimentos alcançados com CO₂ puro e com solventes modificadores ^[180].

3.1.3 Extração com fluido supercrítico (SFE)

Há uma série de trabalhos apresentados na literatura relacionados ao emprego de fluidos supercríticos como solventes na extração de compostos naturais **Tabela 3.III**. Na maioria dos dados apresentados por estes estudos há indicação de aumento do rendimento extrativo, tendo a vantagem de que o processo extrativo previne a degradação dos compostos termolábeis. Também permitem elevada contratibilidade e alto poder de solvatação, com um processo simples e de baixo custo. A grande contribuição da extração supercrítica é a obtenção de produtos naturais agregando aos mesmos, alto valor comercial.

Tabela 3.III: Aplicações da extração com fluido supercrítico em plantas medicinais.

Amostra	Analito	Referência	Nº
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Ácido valerênico	Shohet & Wills	[182]
<i>Valeriana officinalis</i> L.	Óleos voláteis	Safaralie et al.	[150]
<i>Foeniculum vulgare</i>	Óleos voláteis	Moura et al.	[183]
<i>Patrinia villosa</i>	Óleos voláteis	Xie et al.	[184]
<i>Ilex paraguariensis</i>	metilxantinas	Saldaña et al.	[185]
<i>Ilex paraguariensis</i>	alcaloides	Saldaña et al.	[186]
<i>Ilex paraguariensis</i>	cafeína, teobromina, esqualeno, fitol, vitamina E, ácido palmítico, esteroides.	Esmelindro et al.	[187]
<i>Laurus nobilis</i> L.	cineol, linalool, metil eugenol	Caredda et al.	[188]
<i>Lupinus</i> spp	alcaloides	Nossack et al.	[189]
<i>Carum copticum</i>	timol, mirceno, limoneno	Khajeh et al.	[190]
<i>Mentha pulegium</i> L.	Menta	Aghel et al.	[191]
<i>Zataria multiflora</i> Boiss	timol, terpineno, p-cimeno	Ebrahimzadeh et al.	[192]
<i>Hypericum perforatum</i> L.	alcanos, ácidos orgânicos e ésteres	Seeger et al.	[193]
<i>Ginkgo biloba</i>	flavonoides e terpenoides	Yang et al.	[194]
<i>Majorana hortensis</i> Moench	cis-sabineno hidratado, acetato de cis-sabineno hidratado, terpineol-4 e α -terpineol.	Rodrigues et al.	[195]
<i>Origanum vulgare</i>	cis-trans-sabineno hidratado, timol	Rodrigues et al.	[196]
<i>Euphorbia macroclada</i>	hidrocarbonetos	Özcan et al.	[197]
<i>Tabernaemontana catharinensis</i>	alcaloides	Pereira et al.	[198]
<i>Pistachia Vera</i>	antioxidantes	Goli et al.	[199]
<i>Lupinus</i> spp, <i>Plinia pinnata</i>	alcaloides	Lanças et al.	[200]
Chá	catequinas	Chang et al.	[201]
<i>Ferula assafoetida</i>	α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno, β -ocimeno	Khajeh et al.	[202]
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill	ácido hexadecanoico, tetradecano, sabineno, α -pineno, mirceno	Khajeh et al.	[203]
<i>Juglans regia</i> L.	compostos fenólicos	Amaral et al.	[204]

3.1.4 SFE aplicada à extração de matérias-primas vegetais

As extrações por SFE de matérias-primas vegetais devem ser realizadas a partir do material vegetal previamente preparado. O material-vegetal deve ser introduzido no frasco extrator seco e comunido, a fim de evitar a influência da água na extração, além de aumentar a superfície de contato para a ação eficaz do fluido extrator.

O fluido supercrítico é impelido pela pressão a passar através da matéria-prima vegetal arrastando os compostos voláteis, os óleos e as demais substâncias até que se estabeleça o nível de solubilidade de equilíbrio em torno de 10%.

A solução extrativa resultante é direcionada para válvula redutora de pressão do CO₂, sendo diminuída a força de solubilização do CO₂ pela redução da pressão. Neste momento há a precipitação dos componentes extraídos no separador. O CO₂ é comprimido e retorna por recirculação para o frasco extrator. Os parâmetros: fluxo de gás, temperatura, pressão e o número de ciclos devem ser otimizados para cada matéria – prima vegetal.

3.1.5 Vantagens e desvantagens da extração supercrítica

Vantagens do uso da SFE ^[174-176]

- Os solventes são gasosos ou voláteis à temperatura e pressão normais (portanto fáceis de serem separados e recuperados);
- Ampla variação nas propriedades físicas através da modificação da T, P assim como na polaridade dos solventes;
- Adição de solventes modificadores aumenta a solubilidade;
- Extração multifase;
- Fracionamento de extratos;
- Ajuste da força do solvente através da compressão mecânica;
- Rapidez de extração.

Desvantagens do uso da SFE

- Custo elevado dos equipamentos;
- Produtos com baixo rendimento são economicamente inviáveis de serem extraídos por esta operação unitária;
- Inibição da extração de compostos muito polares quando não se usam solventes modificadores adequados.

3.1.6 SFE e espécies de *Valeriana*

A literatura apresenta dois estudos relacionados a condições de extração de alguns constituintes de raízes de *V. officinalis* L.

Shohet e Wills ^[182] propuseram a extração de ácidos valerênicos das raízes de *V. officinalis* L. O fluido supercrítico CO₂ foi utilizado puro e combinado com os modificadores etanol (5 %) e metanol (5 %). Diferentes combinações entre pressão (10-20 MPa) e temperatura (40 – 50 °C) foram realizadas e os resultados comparados aos da extração por percolação (etanol 70 °GL). A comparação de dados mostrou que a presença de modificadores contribui favoravelmente para o aumento do rendimento do processo de extração dos ácidos valerênicos, quando comparada ao processo de percolação. Além disto, foi estabelecido o tempo ideal para a extração supercrítica de 20 min.

Safaralie e colaboradores ^[151] compararam a composição dos óleos voláteis extraídos das raízes de *V. officinalis* cultivadas por hidroponia no Irã. Identificaram 47 compostos nos extratos hidrodestilados (HD) e 35 compostos no extrato de SFE, correspondendo respectivamente a 89,3 % e a faixa de 86,1 % a 95,1 % da composição química. Os rendimentos foram de 0,21 % m/m (HD) e de 1,84 % a 4,90 % (SFE), respectivamente. Os compostos majoritários apresentados na análise dos HD foram acetato de bornila (11,6 %), ácido valerênico (8,0 %), (Z)-acetato de valeranila (7,9 %) e acetóxivaleranona (7,6 %). A SFE apresentou como compostos majoritários: ácido isovalérico (18,7-41,8 %), ácido valerênico (8,2-11,8 %), acetoxivaleranona (5,6-6,5 %), acetato de bornila (2,3-7,7 %) e valerenol (7,6 %).

3.1.7 Espécies de *Valeriana* do Rio Grande do Sul e estudos sobre alguns processos de extração

Os primeiros estudos relacionados à composição química de extratos clorofórmicos ultrassônicos foram realizados com espécies do gênero *Valeriana* na década de 1990. A seguir Silva e colaboradores^[75] identificaram e quantificaram valepotriatos em nove espécies de *Valeriana*. O objetivo destes estudos foi o de identificar, entre as espécies vegetais, àquela que tivesse possibilidade por possuir atividade terapêutica assim como possibilidade de exploração econômica.

As coletas realizadas para a realização do estudo de Silva e colaboradores^[75] proporcionaram um olhar pormenorizado da equipe botânica sobre o estudo taxonômico da família Valerianaceae o que culminou na descoberta de duas novas espécies, entre elas, *V. tajuvensis* Sobral.

A maioria das espécies brasileiras pertencentes à família Valerianaceae, compostas de ervas ou subarbustos, tem sua ocorrência descrita em locais úmidos junto a charcos e grutas, no entanto, *V. tajuvensis* Sobral é a única espécie conhecida como arbustiva, no Leste da América do Sul, ou seja, até 3 m de altura, encontrada apenas em dois pontos da divisa entre os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, em escarpas quase verticais, de difícil acesso, em grupos contendo centenas de indivíduos (**Figura 3.2**).

Os estudos de Silva e colaboradores (2002)^[75] colocaram a referida espécie em evidência, pois as análises cromatográficas por HPLC evidenciaram a presença de concentrações de valepotriatos interessantes, do ponto de vista de exploração econômica, quando comparadas àquelas apresentadas pelas espécies *V. officinalis*, *V. wallichii* e *V. edulis*. Este fato justifica o estudo e a investigação da composição química dos compostos voláteis, pois a ação farmacológica da espécie padrão parece ser dada por sinergismo entre os óleos voláteis e os valepotriatos.

Considerando o fato exposto, a raridade desta espécie, pois se encontra na lista de plantas com alto risco de extinção, o objetivo deste capítulo foi de investigar o processo extrativo por dois fluidos supercríticos sobre talos e folhas liofilizados provenientes de *V. tajuvensis* Sobral e determinar a composição dos constituintes

voláteis dos extratos provenientes de talos e folhas de *V. tajuvensis* Sobral empregando a técnica de extração com fluido supercrítico.

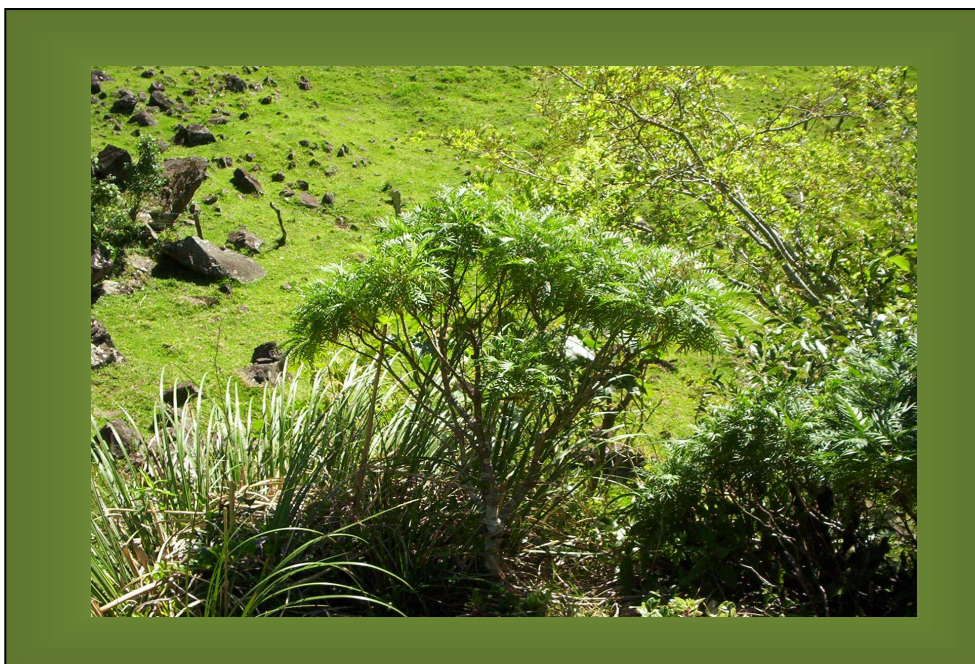


Figura 3.2: Local de coleta de *V. tajuvensis* Sobral - localidade Tajuvas - município de Três Cachoeiras –RS.

3.1.8 Proposta de investigação

Neste estudo foram testadas as influências da temperatura, da pressão e do uso de dois diferentes solventes extratores: dióxido de carbono e o propano sobre o rendimento de extração e a qualidade e quantidade dos compostos voláteis pelo emprego de técnicas cromatográficas gasosas que empregaram os detectores de ionização de chama (GC/FID) e de espectrometria de massas (GC/MS). Os dados obtidos foram comparados aos resultados da HD relacionados no **Capítulo 2**.

O presente estudo foi dividido em três proposições a fim de fornecer melhores subsídios à compreensão do estudo:

I- Estabelecer as condições extrativas com o fluido supercrítico CO₂, seguido por análise cromatográfica para caracterização qualitativa e quantitativa dos compostos voláteis de talos e folhas de *V. tajuvensis*;

II- Estabelecer condições extrativas para compostos voláteis, através do emprego do fluido supercrítico propano de talos e folhas de *V. tajuvensis*;

III- Estabelecer a comparação estatística entre os dados obtidos com extração supercrítica (SFE) com os dados de hidrodestilação fornecidos no **Capítulo 2**.

Salienta-se que as flores e as raízes desta espécie não foram utilizadas no estudo, pois a quantidade coletada de flores não foi suficiente para ser submetida às diferentes condições de extração. Por sua vez, as raízes não foram coletadas por que os indivíduos vegetais estão na lista de espécies em extinção e, portanto, devem ser preservados. Adiciona-se que estes estão distribuídos em pequeno número e seu estado de conservação é precário, além de serem de difícil acesso.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Preparação da amostra para análise

O material vegetal (*V. tajuensis*) foi coletado em dezembro de 2007 na localidade Tajuvas – município de Três cachoeiras – Rio Grande do Sul. O material vegetal foi congelado em freezer (– 20 °C) e submetido ao processo de secagem por liofilização (EDWARDS[®], MODELO CE-96, INGLATERRA) com atmosfera inerte através do emprego de nitrogênio sob pressão.

Talos e folhas de *V. tajuensis* foram liofilizados, misturados, triturados (moinho de facas, mod. Retsch Sk1- Retsch[®]), homogeneizados, tamisados em peneiras Tyler[®] (40 mesh), quarteados e, por fim, amostrados aleatoriamente até atingir a massa de $10,0 \pm 0,05$ g.

Todo o material vegetal foi colocado em ambiente inerte, dentro de frascos de vidro, sendo armazenados em refrigerador (6 °C a 8 °C) até o procedimento de extração. O teor de umidade foi determinado pelo método gravimétrico da mesma forma como está descrito no **Capítulo 2**.

3.2.2 Reagentes e solventes

O procedimento de extração supercrítica foi realizado com o fluido supercrítico CO₂ (White Martins[®] - São Paulo) de grau UP, com 99,99 % de pureza (cilindro com tubo pescador) e com o gás propano (White Martins[®] - São Paulo). Os padrões

vitamina E, estigmasterol, fitol e bifenila foram adquiridos da Sigma Aldrich (Palo Alto, CA, EUA).

Foram preparadas soluções estoques de cada padrão ($1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) em hexano, sendo posteriormente armazenadas sob refrigeração. Os solventes utilizados foram grau p.a. Merck[®], bidestilados.

3.2.3 Extrações pelo fluidos supercríticos CO₂ e C₃H₈

As extrações foram realizadas em uma unidade laboratorial, consistiu de cilindros contendo os gases de CO₂ e C₃H₈, dois banhos termostáticos (QUIMIS[®]), uma bomba de alta pressão (ISCO[®] 260D), um reator em aço inoxidável (capacidade 100 mL), um transdutor de pressão (SMAR[®] LD301) equipado com um controlador (SMAR[®] HT 201) com uma precisão de $\pm 0,012$ MPa e um tubo coletor de vidro, localizada no laboratório de processos industriais da Universidade Regional da Integrada - Campus Erechim

O fluxograma apresentado na **Figura 3.3** descreve os processos ao quais foram submetidos talos e folhas de *V. tajuensis* até a extração com fluido supercrítico (SFE).

As amostras de *V. tajuensis* ($10,0 \pm 0,05$ g) foram colocadas no extrator e, em seguida, o CO₂ (ou C₃H₈) foi bombeado até a pressão de extração deixando-o em contato com a amostra por 1 h para estabilização do sistema. Após, a válvula micrométrica foi aberta para a coleta do extrato solubilizado. O fluxo de CO₂ (ou C₃H₈) foi acompanhado através do registrador da bomba de alta pressão.

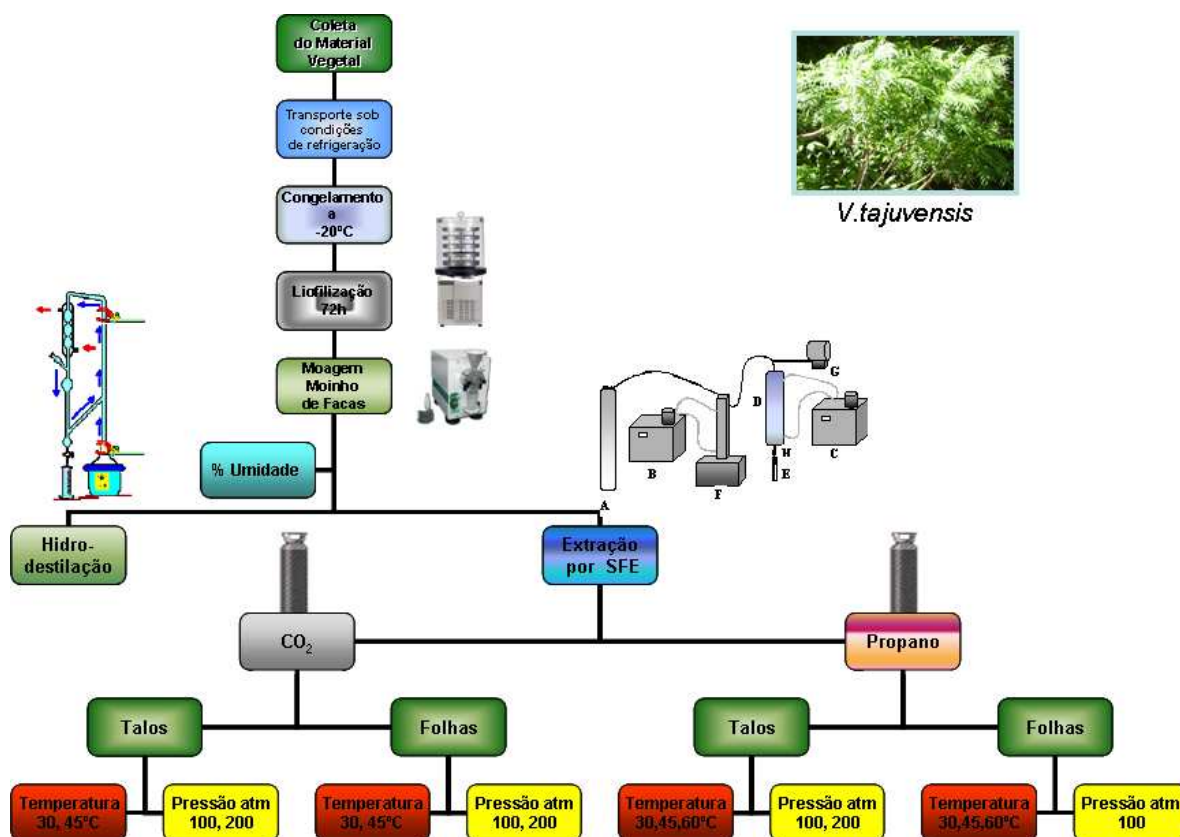


Figura 3.3: Fluxograma do processo extrativo para talos e folhas de *V. tajuensis*.

O extrato foi coletado e pesado em intervalos de tempo definidos (15 a 20 min). Outro tubo foi conectado ao equipamento e a extração continuou até que não se obtinha mais quantidade significativa de extrato no intervalo de tempo determinado. O tempo de extração em cada experimento foi estabelecido em aproximadamente 400 min, isotermicamente, à pressão constante.

Cada experimento consumiu em média 8 h, incluindo pesagem da amostra, carga do extrator, estabilização da temperatura do extrator e dos banhos, extração, depressurização e descarga do extrator. Um planejamento experimental fatorial 2^2 foi estabelecido para avaliar a influência das variáveis do processo no rendimento e na composição química do extrato. As extrações foram realizadas em triplicata, em todas as condições.

3.2.3.1 Condições das variáveis de extração

As condições de extração com CO₂ foram estabelecidas em dois níveis de temperatura (30 e 45 °C) e pressão (100 e 200 atm), onde foi avaliado o efeito destas variáveis sobre o rendimento de extrato de talos e folhas de *V. tajuensis*. As condições de extração com C₃H₈ foram estabelecidas em três níveis de temperatura (30, 45 e 60 °C) e dois níveis pressão (100 e 200 atm), onde foi avaliado o efeito destas variáveis sobre o rendimento de extrato de talos e folhas de *V. tajuensis*. Para folhas foi estabelecido somente um nível de pressão para extração por C₃H₈ por falta de material vegetal.

3.2.4 Critérios para a seleção de partes do material vegetal

Os critérios adotados para a utilização total das partes aéreas ou em partes (separação em caules, talos, folhas e flores) foram o tamanho das espécies vegetais, as quantidades colhidas e a viabilidade de separação, em diferentes partes, após a secagem por liofilização.

3.2.5 SFE – Funcionamento do sistema de extração

O sistema de extração por CO₂ supercrítico consiste basicamente de cinco componentes: (A) fonte de CO₂; (B) bomba de alta pressão; (C) cela de extração; (D) restritor de pressão e (E) coletor, além dos sistemas controladores de temperatura e pressão conforme pode ser visualizado nas **Figura 3.4 e 3.5**.

O CO₂ é fornecido ao sistema pressurizado através de cilindros sifonados (A). A pressão de operação, se superior a do cilindro, é obtida por uma bomba de alta pressão (B). A matriz do soluto é “lavada” pelo solvente no extrator (C), a mistura solvente soluto é submetida a uma descompressão usando uma válvula redutora de pressão (D). A mistura passa a ser, então, gás-soluto, sendo este recolhido no separador (E) para posterior análise. Em escala preparativa o gás que emana do separador pode ser recirculado.

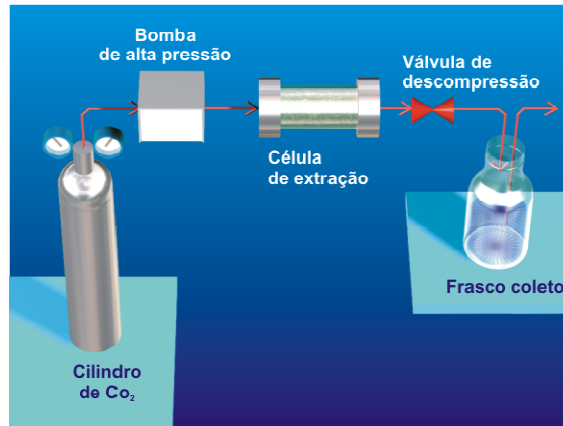


Figura 3.4: Esquema representativo de um processo de extração supercrítica, composto por: cilindro sifonado do solvente, bomba de alta pressão, célula de extração, válvula de decompressão e frasco coletor ^[179].



Figura 3.5: Fotografia com vista parcial da unidade de extração com CO₂ (Freitas, 2007).

3.2.6. Variáveis de extração para CO₂ e C₃H₈

Foram avaliados os efeitos das variáveis: temperatura e pressão sobre o rendimento de extrato dos talos e das folhas (secos por liofilização) e sua composição química. O intervalo de variáveis estudado foi estabelecido de forma a cobrir a região de interesse no que se refere às propriedades de transporte e poder solvente do dióxido de carbono e propano.

As condições de extração para folhas e talos de *V. tajuensis* com os fluidos supercríticos CO₂ e propano foram estabelecidas de acordo com a **Tabela 3.IV**.

Tabela 3.IV: Condições de extração para folhas e talos de *V. tajuensis* com os fluidos supercríticos CO₂ e propano.

<i>V. tajuensis</i>	Fluido	Experimento ^a	T[°C] ^b	P[MPa]
Talos	CO ₂	1	30	100
		2	45	100
		3	60	100
		4	30	200
		5	45	200
		6	60	200
Talos	C ₃ H ₈	7	30	100
		8	45	100
		9	60	100
		10	30	200
		11	45	200
		12	60	200
Folhas	CO ₂	13	30	100
		14	45	100
		15	30	200
		16	45	200
Folhas	C ₃ H ₈	17	30	100
		18	45	100
		19	60	100

^a(n)= 3, ^b Estimada por referências [179;180;205-208].

3.2.7 Cromatografia gasosa (GC/FID e GC/MS)

Os extratos obtidos na extração das amostras de *Valeriana tajuensis* com CO₂ e propano foram analisados por GC/MS nas mesmas condições dos óleos essenciais (**Capítulo 2, Tabela II.V**).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 A estabilização e o preparo do material vegetal

O material vegetal adotado para o desenvolvimento deste trabalho contou com talos e folhas de *V. tajuensis*. Os procedimentos das coletas levaram em conta a manutenção e a integridade dos compostos voláteis. Para tanto o material vegetal foi submetido aos procedimentos relatados no item 2.2.7, **Capítulo 2** mantendo-se as 72 h de liofilização. A **Tabela 3.V** descreve o percentual de umidade determinada

segundo a metodologia de perda por dessecação da Farmacopeia Brasileira^[153]. Além deste controle, após o término da secagem, estabeleceram-se os períodos de 3 e 6 meses para o acompanhamento da sorção de umidade durante o armazenamento. Todas as amostras analisadas apresentaram umidade percentual abaixo de 5 %.

Tabela 3.V: Perda por dessecação de talos e folhas de *V. tajuensis* liofilizada.

Espécie	Órgãos	X ± S (CV) n=5	X ± S (CV) n=5	X ± S (CV) n=5
		0 meses	3 meses	6 meses
<i>V. tajuensis</i>	Talos	2,14 (±1,41;0,66)	2,39 (±0,95;0,40)	2,56 (±1,22;0,48)
	Folhas	3,35 (±0,59;0,18)	3,57 (±0,43;0,12)	3,81 (±0,38;0,10)

X = média de triplicatas; S = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; n= número de testes.

Durante o período de estocagem avaliado, os teores médios de umidade percentual permaneceram abaixo de 5 % o que é abaixo do limite máximo de 14 % estabelecido para matérias-primas vegetais^[153]. As diferenças entre as médias dos teores de umidade, de um mesmo órgão vegetal não foram estatisticamente significativas. A maior variação de sorção de umidade ocorreu nas folhas, sem que o material fosse comprometido. Os resultados de umidade percentual obtido nos diferentes órgãos apresentaram diferenças significativas o que pode ser atribuído à composição estrutural dos tecidos vegetais. A efetividade da operação de secagem pôde proporcionar a estabilização do material vegetal, viabilizando a continuidade dos demais procedimentos.

Após a secagem, as amostras foram moídas e classificadas quanto à granulometria em peneiras Tyler[®]. Não há relatos na literatura sobre a distribuição granulométrica de pós dos diferentes órgãos de *V. tajuensis*, sendo este o segundo parâmetro analisado. A **Tabela 3.VI** apresenta a distribuição granulométrica do material vegetal de *V. tajuensis*.

Tabela 3.VI: Distribuição granulométrica do material vegetal de *V. tajuensis*.

LS μm	LI μm	AM μm	IA μm	Talos			Folhas		
				F(%)	Fr(%)	(FP)	F(%)	Fr(%)	(FP)
> 635	-	-	-	1,8	10,3	89,7	2,7	16,6	83,4
635	315	475	320	8,4	57,8	42,2	5,3	40,1	50,9
315	200	282,5	65	2,8	73,3	26,7	1,4	57,4	42,6
200	125	187,5	125	2,2	85,9	14,1	2,7	74,6	25,4
125	80	102,5	45	0,0	85,9	14,1	0,2	155	24,5
80	53	66,5	27	1,1	91,9	8,1	1,5	84,7	15,3
53	Col.	26,5	53	1,2	100	0,0	2,5	100	0,0

LS: Limite superior de classe; LI: Limite inferior de classe; AM: abertura média de malha; IA: Intervalo de abertura; F(%): fração retida; Fr (%) fração retida acumulada; FP: Fração de passagem; Col.: coletor.

A fração retida, a fração retida acumulada e a fração de passagem são valores empregados como base no cálculo da distribuição granulométrica a fim construir o gráfico de curvas cumulativas de retenção e passagem de pós. A fração retida (Fr) refere-se massa real retida no tamis em relação àquela pesada para a realização do experimento. A normalizar a técnica com os dados aceito na literatura, calcula-se a fração retida percentual (Fr %) que descreve este comportamento para a massa de 100 g. Os valores a serem empregados na construção da curva cumulativa que viabilizam a visualização da granulometria real do pó são Fr (%) pelo FP.

A classe granulométrica predominante em talos e folhas foi de diâmetro entre 315 e 635 nm, com abertura nominal correspondendo a 49 %, 63 % e 79,3 %, respectivamente para folhas foi de 200-635 nm 74,6 %. Os pós foram classificados como moderadamente finos em conformidade com as especificações da OMS ^[13]. As pequenas variações observadas na granulometria podem ser atribuídas às diferenças dos teores de umidade residual e à composição estrutural dos tecidos vegetais ^[21]. Para evitar o entupimento do equipamento de SFE foram empregados pós com 40 mesh. O material vegetal foi conservado em frascos de vidro em ambiente inerte (N₂), armazenados em freezer até o momento da extração, evitando a oxidação das amostras. As **Figuras 3.6** e **3.7** apresentam as curvas de retenção e passagem acumuladas, sendo o diâmetro das partículas calculado através do método de resolução gráfica a partir do ponto de intersecção das retas.

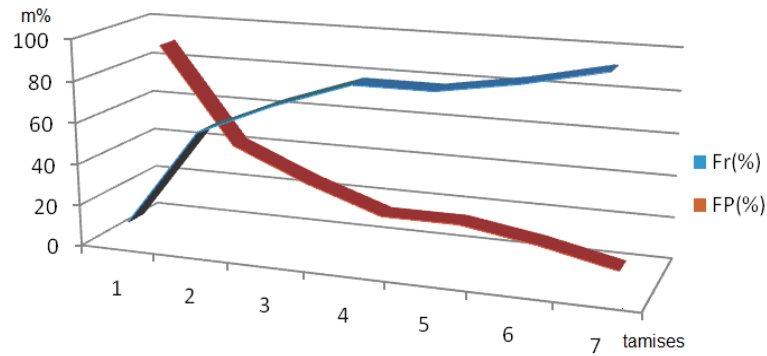


Figura 3.6: Curvas cumulativas de retenção e passagem obtidas após a moagem e tamisação dos talos de *V. tajuensis*. *FP* = fração de passagem e *Fr* = fração retida.

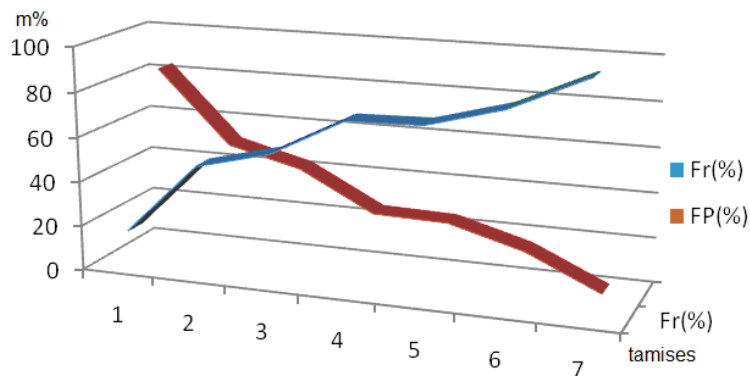


Figura 3.7: Curvas cumulativas de retenção e passagem obtidas após a moagem e tamisação das folhas de *V. tajuensis*. *FP* = fração de passagem e *Fr* = fração retida.

3.3.2 Procedimento de extração com CO₂ e C₃H₈ supercríticos

3.3.2.1 Estudo do efeito da pressão e temperatura sobre o processo na SFE de *V. tajuensis*

O rendimento médio (média das três extrações realizadas para cada amostra) tratamento extrativo em compostos voláteis em massa seca está representado na **Tabela 3.VII** para CO₂ e **Tabela 3.VIII** para C₃H₈.

Tabela 3.VII: Rendimento das extrações de *V. tajuensis* empregando CO₂ como solvente, planejamento 2².

Matéria-prima	T[°C]	P[atm]	Rendimento [%] (g _{extrato} /100 g <i>V. tajuensis</i>)
Talos	30	100	0,60
	45	100	0,50
	30	200	0,80
	45	200	0,92
Folhas	30	100	0,29
	45	100	0,75
	30	200	1,16
	45	200	1,72

Os rendimentos foram calculados com base na porcentagem dos compostos voláteis extraídos em relação à massa da amostra colocada no extrator. As variáveis: vazão do solvente e a massa de *V. tajuensis* foram mantidas constantes em 2 g min⁻¹ e 105 g, respectivamente.

Tabela 3.VIII: Rendimento das extrações de *V. tajuensis* empregando C₃H₈ como solvente.

Matéria-prima	T[°C]	P[atm]	Rendimento [%] (g _{extrato} /100g <i>V. tajuensis</i>)
Talos	30	100	0,67
	45	100	0,91
	60	100	1,25
	30	200	0,68
	45	200	1,02
	60	200	1,29
Folhas	30	100	1,17
	45	100	1,14
	60	100	1,85

A **Figura 3.8** apresenta o efeito da temperatura e da pressão sobre o rendimento da extração de talos de *V. tajuensis*, empregando CO₂ a alta pressão como solvente, enquanto a **Figura 3.9** apresenta o mesmo efeito para as folhas. As curvas experimentais de extração foram construídas através da massa total de extrato de *V. tajuensis*, em função da massa de CO₂ utilizada, que foi monitorada pelo decaimento no volume do solvente na bomba de seringa. Da mesma forma, as **Figuras 3.10 e 3.11** apresentam estes resultados para o uso do C₃H₈ supercrítico.

De forma geral os experimentos realizados com talos apresentaram um rendimento menor quando comparados com os das folhas tanto para CO_2 quanto para C_3H_8 . Possivelmente, tal fato é devido ao óleo (compostos voláteis) estar localizado mais superficialmente nas folhas quando comparado com os talos, tornando a sua solubilização mais acessível, além disto, a constituição estrutural dos tecidos destes órgãos é muito diferente.

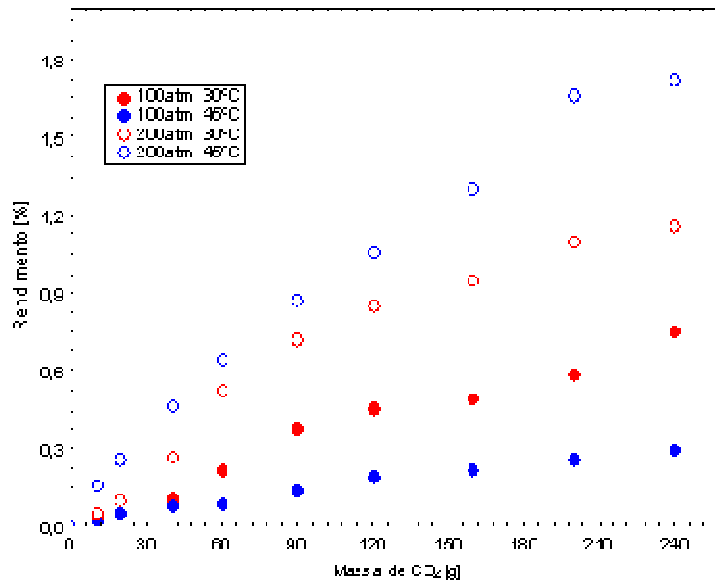


Figura 3.8: Efeito da temperatura e da pressão sob o rendimento da extração dos talos de *V. tajuensis* com CO_2 supercrítico.

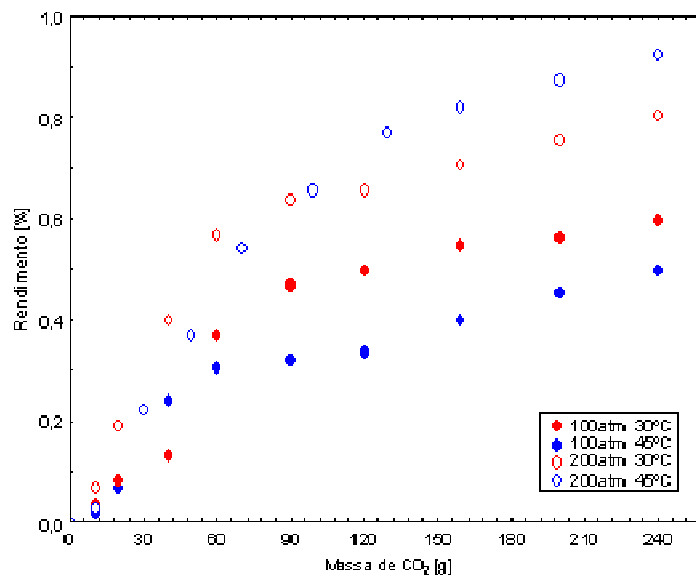


Figura 3.9: Efeito da temperatura e da pressão sob o rendimento da extração das folhas de *V. tajuensis* com CO_2 supercrítico.

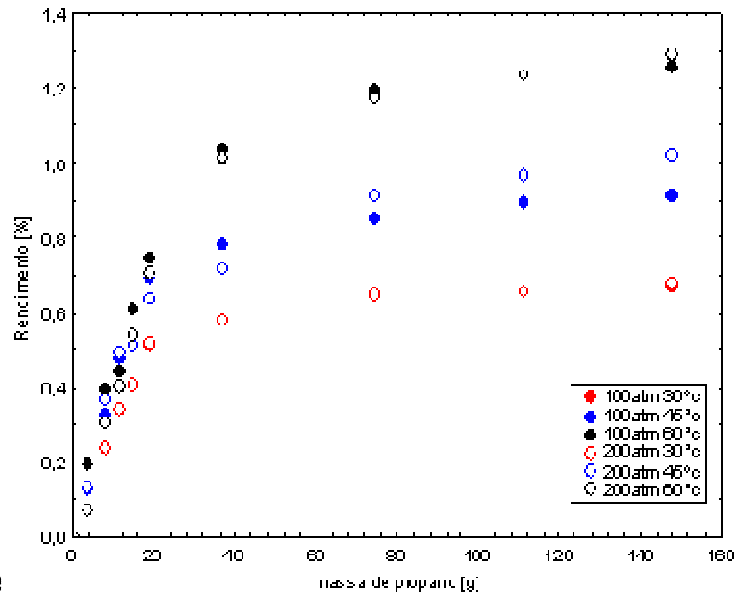


Figura 3.10: Efe da extração dos talos de *V. tajuensis* com C_3H_8 supercrítico.

da extração dos

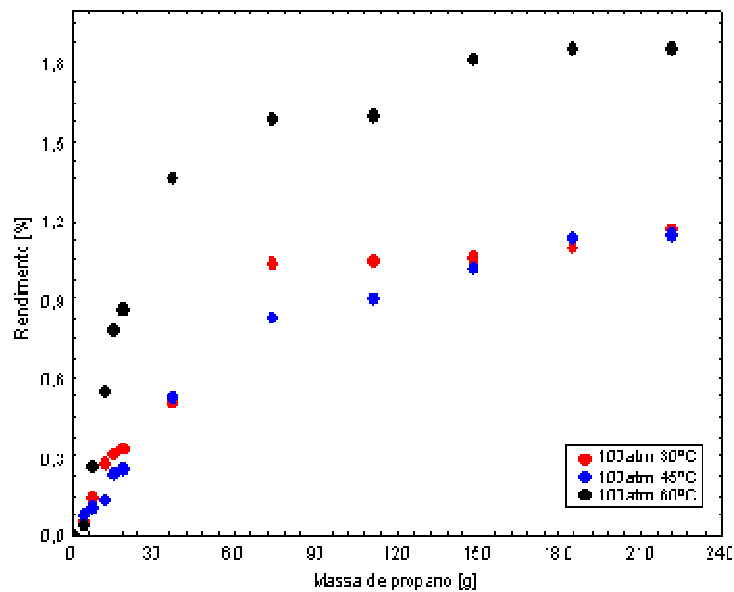


Figura 3.11: Efeito da temperatura e da pressão sob o rendimento da extração das folhas de *V. tajuensis* com C_3H_8 supercrítico.

Nos experimentos com CO_2 o efeito de temperatura é distinto dependendo da faixa de pressão empregada. Em pressões de 100 atm, o aumento da temperatura levou a um decréscimo do rendimento da extração. Apesar do efeito térmico favorável em temperaturas mais elevadas (aumento de pressão de vapor e propriedades de transporte mais favoráveis), o decréscimo de densidade nesta faixa de pressão é bastante pronunciado ocasionando a diminuição do rendimento da extração.

Por outro lado, na pressão de 200 atm a diminuição da densidade é menos pronunciada, o que faz com que predomine os efeitos térmicos positivos resultando no aumento do rendimento da extração. Nesta região, está claramente demonstrado que, apesar da densidade diminuir com o aumento da temperatura, a diminuição da viscosidade, o aumento do coeficiente de difusão do solvente e o aumento da pressão de vapor do óleo compensam este decréscimo. Isto faz com que o rendimento seja aumentado quando se altera a temperatura de 30 °C para 45 °C. As amostras de *V. tajuensis* analisadas a 200 atm e 45°C tiveram rendimentos de maior valor para talos cerca de 0,98 % e para folhas 1,72 %.

Nas extrações com C₃H₈ pode ser constatado que a pressão exerce efeito desprezível sobre o rendimento da extração. Tal fato pode ser explicado pelo C₃H₈ estar como líquido e, desta forma, a variação da pressão dentro da faixa investigada não acarreta em diferença significativa de densidade levando a rendimentos similares na mesma temperatura.

Em contrapartida, a variável temperatura demonstrou-se significativa, onde os rendimentos foram proporcionais ao aumento da temperatura em função dos efeitos térmicos positivos, pois há um aumento de pressão de vapor e as propriedades de transporte tornam-se mais favoráveis. Isso faz com que o rendimento seja aumentado quando se altera a temperatura de 30 °C para 60 °C em talos apresentando 1,25 % em peso. Para folhas o estudo foi realizado somente com a pressão 100 atm, pois o material vegetal não estava mais disponível, entretanto o efeito da temperatura foi observado pela obtenção do rendimento de 1,85 % similar aos obtidos em talos com a temperatura de 60 °C e 200 atm. Os rendimentos obtidos com C₃H₈ são superiores aos alcançados com CO₂.

3.3.2.2 Análise da composição química dos compostos voláteis

Após a definição dos efeitos das variáveis no processo de extração por SFE, cada extrato foi analisado separadamente por cromatografia gasosa (GC/MS e GC/FID).

O perfil cromatográfico dos compostos voláteis de *V. tajuensis* na maior parte das frações obtidas por CO₂ teve a predominância da fração sesquiterpênica, como

ocorreu na extração por hidrodestilação relatada no **Capítulo 2**. O número de compostos não sesquiterpênicos como ácidos graxos e ésteres graxos apresentaram teores superiores a 30 %.

A identificação dos compostos voláteis foi feita através da comparação com espectros da biblioteca do equipamento GC/MS e de dados obtidos pela determinação dos índices de retenção de Kovats. Outros compostos tiveram suas identidades elucidadas através da co-injeção contra padrões. As **Figura 3.12 a 3.15** apresentam os cromatogramas dos extratos obtidos via extração supercrítica com CO_2 e C_3H_8 para talos e folhas as condições de melhor rendimento percentual em massa.

De modo geral os extratos obtidos por SFE de *V. tajuensis* apresentaram uma mistura complexa de hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos, compostos oxigenados (álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres), ésteres de ácidos graxos, ésteres de cadeia longa e alcanos de cadeia longa. Estes tiveram em média 63 compostos elucidados que correspondem à cerca de 40-75 % da sua concentração, somente foram positivamente identificados quando a porcentagem de probabilidade apresentou-se superior a 90 %.

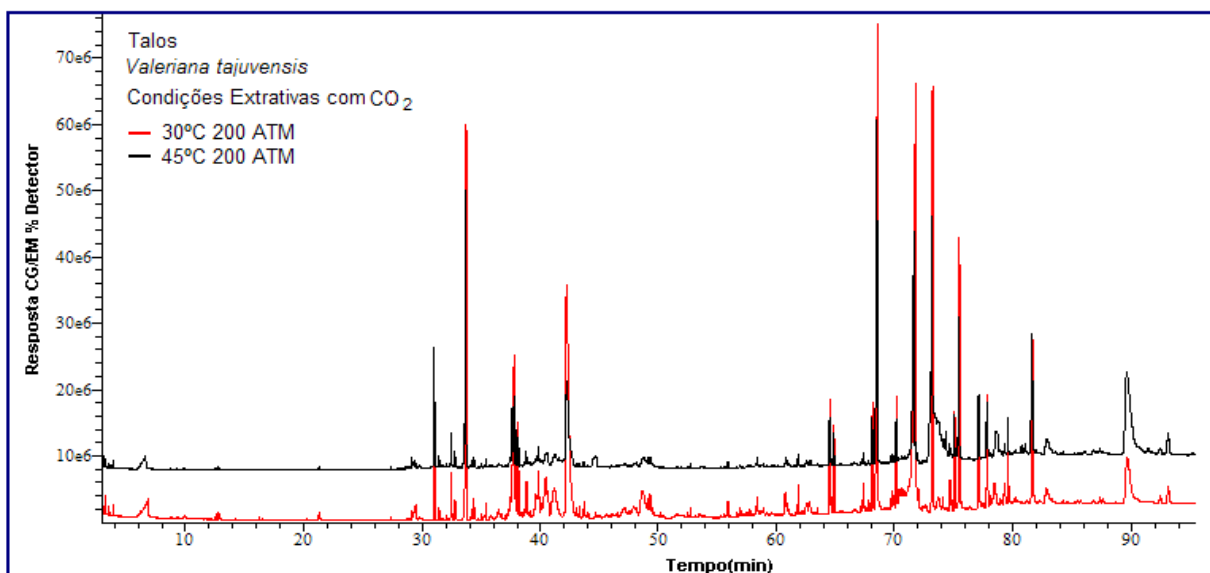


Figura 3.12: Cromatograma dos extratos supercríticos de talos de *V. tajuensis* com CO_2 obtidos a 30 °C e 45 °C e 200 atm. A identificação dos picos cromatográficos é apresentada no **Anexo II**.

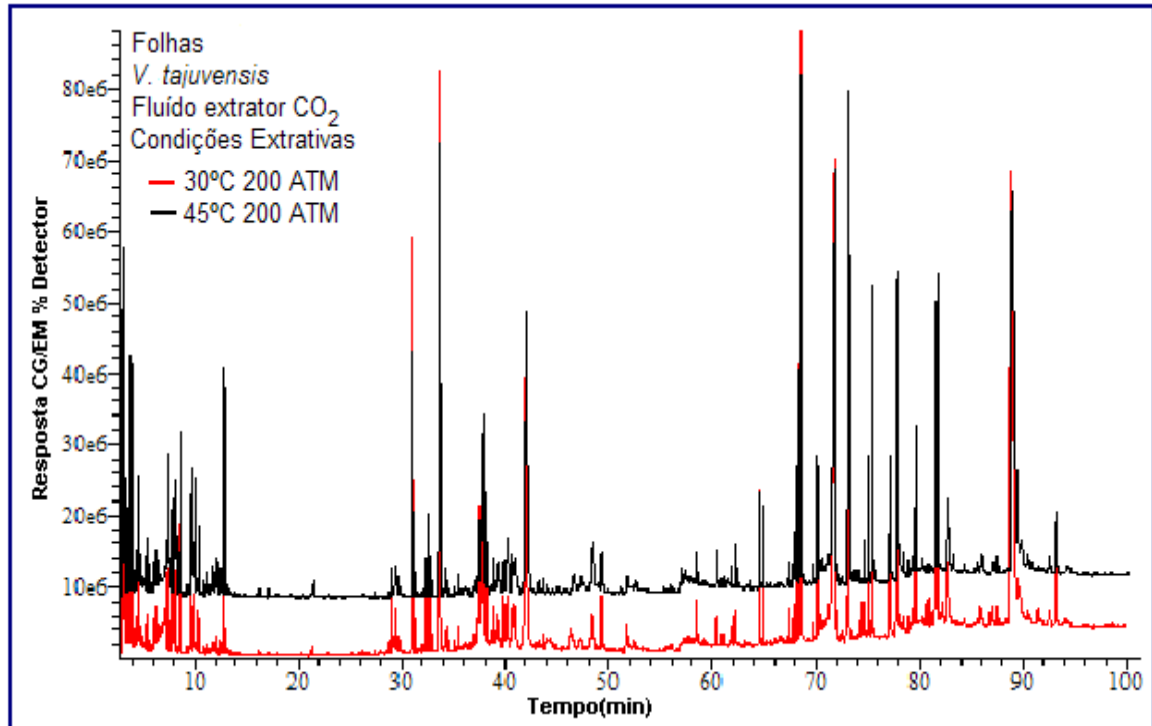


Figura 3.13: Cromatograma dos extratos supercríticos de folhas de *V. tajuensis* com CO_2 obtidos a 30 °C e 45 °C e 200 atm. A identificação dos picos cromatográficos é apresentada no **Anexo II**.

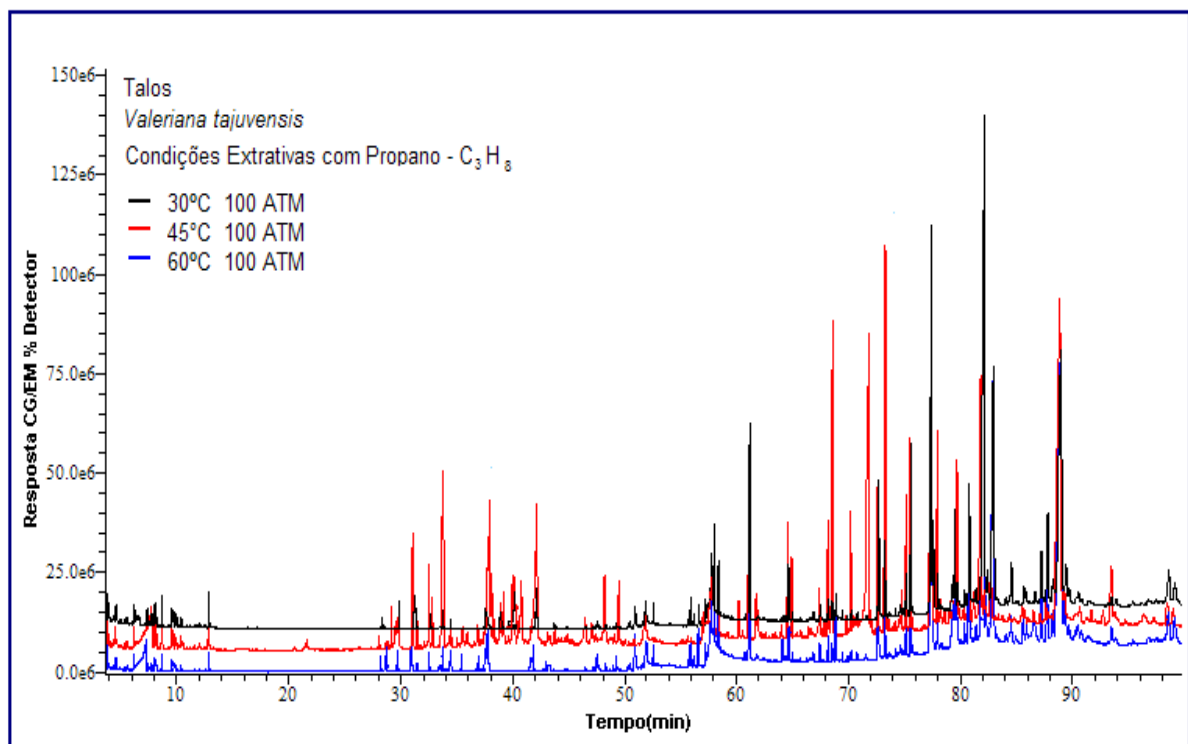


Figura 3.14: Cromatograma dos extratos supercríticos de talos de *V. tajuensis* com propano obtidos a 30 °C, 45 °C, 60 °C e 200 atm. A identificação dos picos cromatográficos é apresentada no **Anexo II**.

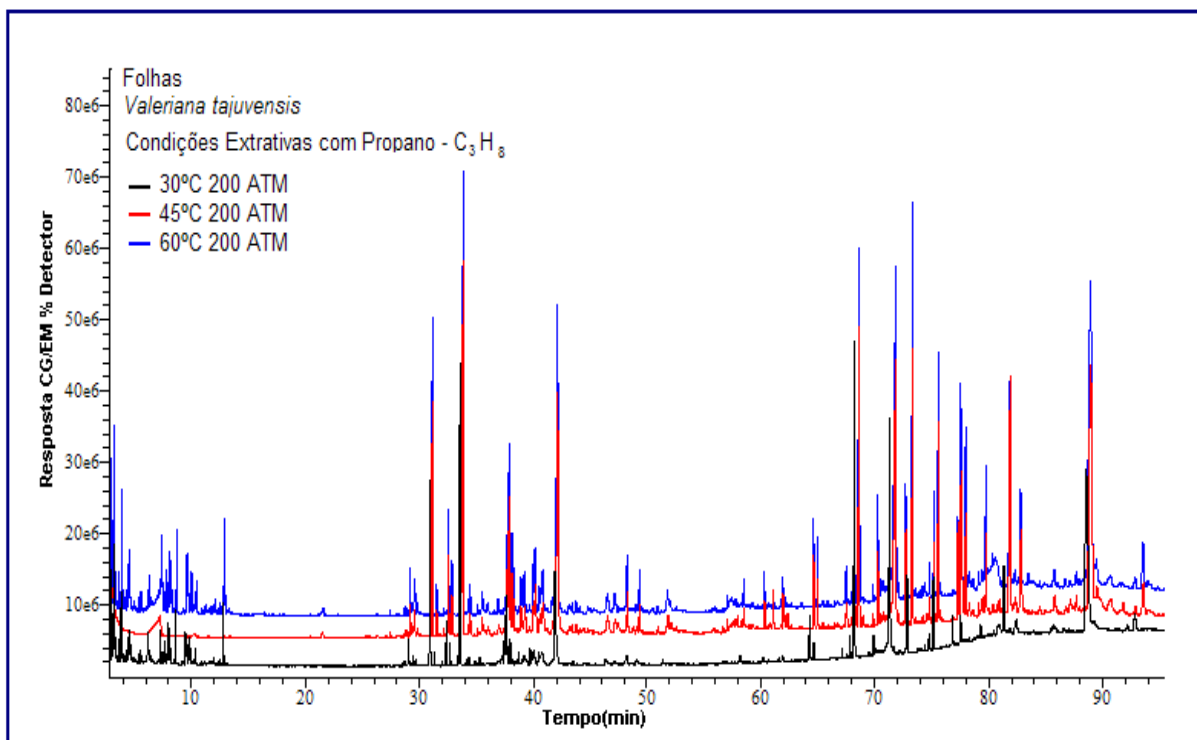


Figura 3.15: Cromatograma dos extratos supercríticos de folhas de *V. tajuensis* com propano obtidos a 30 °C, 45 °C, 60 °C e 100 atm. A identificação dos picos cromatográficos é apresentada no **Anexo II**.

A identificação total destes compostos está apresentada na **Tabela do Anexo II**. Os compostos mais abundantes estão representados na **Tabela 3.VIII**.

Estudos estatísticos estabeleceram matematicamente as correlações químicas entre as diferentes extrações aplicadas à matéria-prima vegetal *V. tajuensis* talos e folhas, sendo uma ferramenta fundamental para ser utilizada na seleção da melhor condição qualitativa e quantitativa. A **Figura 3.16** apresenta o dendograma obtido pelo estudo estatístico de formação de Clusters na comparação dos extratos de SFE com o óleo essencial da *V. tajuensis*. Para fins de comparação, acrescentou-se a este gráfico as informações sobre o óleo volátil de *V. officinalis*.

Tabela 3.IX: Compostos presentes nos extratos SFE de *V. tajuensis*.

COMPOSTOS	Nº do Pico	PM	Probabilidade (%)
Limoneno	12	136	94
α -Cubebeno	25	204	96
α -Copaeno	28	204	96
β -Bourboneno	31	204	92
(Z)- β -cariofileno	33	204	90
δ -Elemeno	39	204	92
α - Humuleno	40	204	92
Aloaromadendreno	41	204	96
Germacreno D	44	204	90
Biciclogermacreno	51	220	90
Éter do (E)-cadineno	60	220	90
Espatuleno	64	220	94
Óxido de cariofileno	65	220	94
Acetóxivalerana	73	220	94
Valerenal	79	220	96
Valerenol	82	220	90
Ácido valerênico	83	220	90
Valepotriato (AHD-Valtrato)	94	228	90
Acetato de (Z)-valerenila	101	220	90
Ácido oleico	110	284	96
n-Docosano	111	310	96
Docosanol	112	326	98
Tetracosano	113	338	96
Acetato de farnesila	114	290	94
Ácido tetracosanoico	115	470	96
Hexadecanol	116	298	96
γ - tocoferol	117	430	94
Vitamina E (α -tocoferol)	118	430	92
Esqualeno	119	410	90
Estigmasterol	120	484	96

As extrações supercríticas foram agrupadas em três grupos diferentes através do método Ward. O primeiro grupo foi formado pelas extrações de talos tanto com CO₂ como C₃H₈ excluindo-se as extrações realizadas com CO₂ nas condições 30 °C e 100 e 200 atm, que formaram um grupo em separado, portanto a temperatura fez o diferencial na quantidade e qualidade do extrato obtido por SFE. Os demais componentes se agruparam independentemente da pressão, da temperatura ou do tipo de fluidos extratores empregados na obtenção do extrato vegetal.

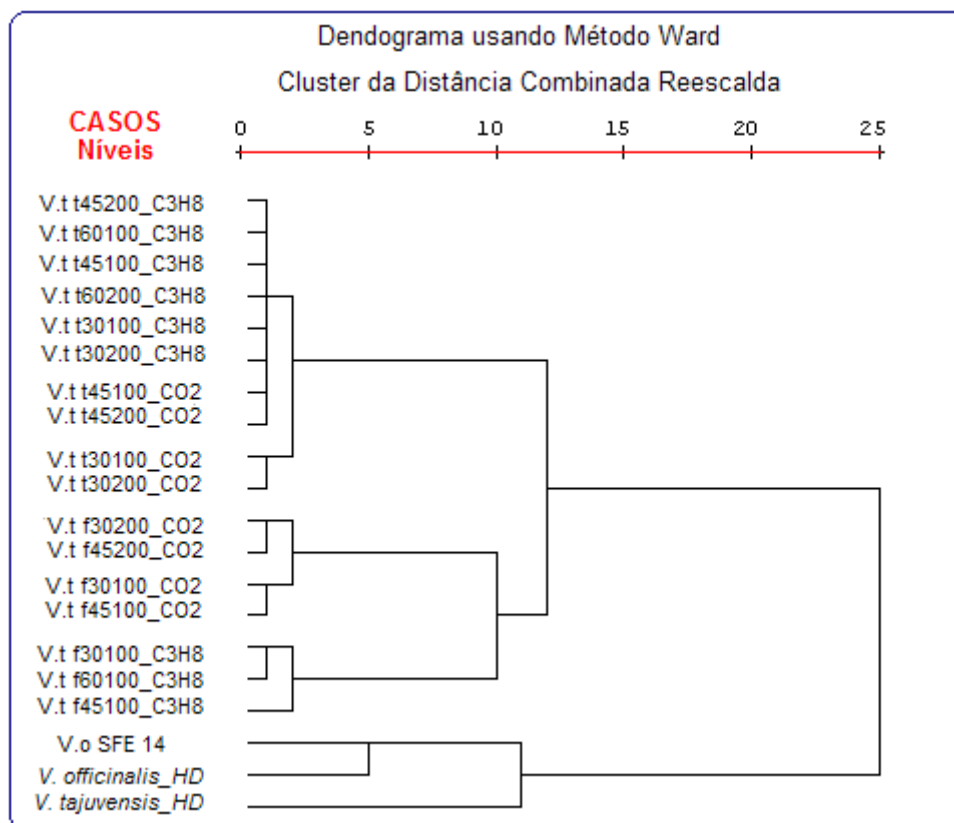


Figura 3.16: Estudo estatístico de formação de Clusters para a comparação dos extratos de SFE com o óleo essencial da *V. tajuvensis* e de *V. officinalis*.

O segundo grupo é composto das extrações supercríticas de folhas. Formaram dois subgrupos que se aproximaram pela influência da temperatura.

Ressalta-se que as espécies de maior correlação dentro destes grupos foram entre si distanciando-se da composição dos hidrodestilados de *V. tajuvensis* e *V. officinalis* ou por SFE. A maior similaridade com a *V. officinalis* ocorreu para o óleo essencial (HD) da *V. tajuvensis*. Portanto, há indicativos que os métodos de extração são cruciais na mudança do perfil quantitativo e qualitativo para *V. tajuvensis*. Entretanto, há uma boa diversidade de novos compostos extraídos pela técnica SFE entre eles a vitamina E, γ -tocoferol, esqualeno e estigmasterol. Todos estes compostos apresentam atividade farmacológica.

A aplicação do teste estatístico da análise de grupos principais (PCA), levou em conta quatro fatores de variabilidade que explicam cerca de 89 % da correlação química entre as diferentes formas de extração por SFE de

V. tajuensis e a composição do próprio hidrodestilado (HD), com a planta referência *V. officinalis* tanto por HD quanto por de SFE. A **Figura 3.17** apresenta a distribuição da proximidade ou da dispersão entre as diferentes extrações por SFE.

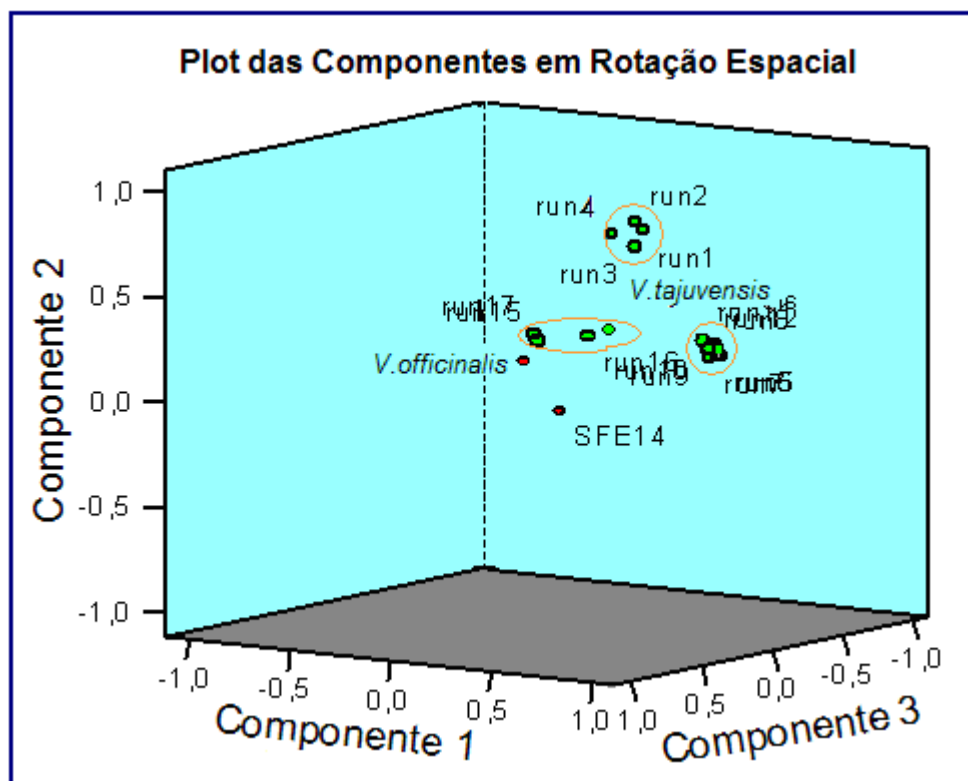


Figura 3.17: Análise de compostos químicos principais (PCA) dos óleos voláteis de espécies de *V. tajuensis* e a literatura de HD e SFE de *V. officinalis*, contendo 4 componentes (fatores) eleitas pelo próprio programa eletrônico estatístico.

A análise de PCA confirmou as relações estabelecidas pelo método de variáveis multivariadas Ward. Há evidências estatísticas que mostram a maior proximidade química entre os hidrodestilados de *V. tajuensis* com a espécie referência e este da condição SFE14 (37 °C 20,2 MPA e 330 µL de etanol como solvente modificador) ^[150].

Houve o agrupamento em três diferentes grupos A, B e C. O primeiro composto pelos extratos dos talos, obtidos com C₃H₈. O segundo formou-se em torno das extrações com CO₂ sobre folhas e o terceiro grupo pelos óleos essenciais (HD) tanto da *V. tajuensis* como com *V. officinalis*. Há uma aproximação maior da composição química das folhas de *V. tajuensis* com o HD obtido das partes aéreas.

Isso porque em volume de material vegetal total empregado para a hidrodestilação parece ter sido mais rico em folhas.

Assim, os rendimentos maiores em peso obtidos com as folhas coincidem com a maior diversidade em qualidade e quantidade dos compostos orgânicos extraídos desta matriz vegetal.

As extrações por SFE propiciaram à confirmação da presença de fitoesteróis nos extratos de SFE de *V. tajuensis* que torna os mesmos interessantes como redutores da osteoporose e no controle dos níveis de colesterol [207]. A presença do esqualeno pode ser um indicativo de que os extratos SFE de folhas possam ter propriedades de prevenção contra o câncer [208]. Por outro lado, as quantidades apresentadas de estigmasterol e seus derivados podem ser um indicativo para o uso dos extratos de *V. tajuensis* como antioxidantes [209].

Os indicativos qualitativos e quantitativos da presença de Vitamina E, e seus correlatos (produtos de decomposição), substâncias reconhecidas pelas suas propriedades medicinais (é o mais potente antioxidante nutricional lipossolúvel), podem indicar o possível emprego dos extratos obtidos pela técnica de SFE contra aproximadamente 80 doenças, tais como câncer, fibrose cística, insuficiência pancreática, doenças neurológicas como Alzheimer [206;210]. Por outro lado poderá ser empregada pela indústria alimentícia como um protetor contra a peroxidação lipídica em óleos comestíveis, auxiliando a conservação das propriedades físico-químicas.

3.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

- De forma geral o rendimento total obtido pela operação unitária de SFE produziu resultados superiores aos apresentados pela hidrodestilação;
- A estabilização do material vegetal coletado, a classificação granulométrica e as condições extrativas viabilizaram a extração de compostos voláteis de talos e folhas de *V. tajuensis* com as condições estabelecidas no planejamento experimental fatorial 2^2 para o fluido supercrítico CO_2 e para o fluido supercrítico C_3H_8 foi de 2^3

para folhas, entretanto, para talos este estudo não pode ser realizado por falta de material vegetal referente à mesma coleta do experimento;

- O processo de extração por SFE gerou extratos que puderam ser analisados diretamente por cromatografia gasosa (GC/MS, GC/FID) sem que houvesse a necessidade dos extratos serem fracionados previamente;
- Os resultados indicaram que o C_3H_8 é um melhor solvente para talos de *V. tajuensis* no que refere ao rendimento em massa;
- A extração de folhas propiciou um maior rendimento de extrato quando comparado aos rendimentos obtidos de talos;
- As estruturas de reserva dos compostos voláteis em rasurados de folhas (folhas cominuidas - trituradas) parecem estar localizadas mais superficialmente do que nos triturados de talos devido às diferenças entre a composição estrutural dos tecidos vegetais;
- Os óleos voláteis demonstraram um perfil pobre na região dos monoterpenos e rico na região dos sesquiterpenos; além destas duas regiões, houve um incremento em compostos de peso molecular mais alto;
- A fração monoterpênica teve uma maior diversidade nos extratos obtidos de folhas do que nos de talos; isto é um forte indicativo de que os processos de conservação e de extração conseguiram extrair e preservar os constituintes da matriz vegetal;
- Entre os monoterpenos detectados ressalta-se a presença constante de limoneno;
- O ácido isovalérico um dos ácidos baldrinâmicos está presente na maior parte dos extratos obtidos por SFE e pode ser empregado com agentes químico marcador de qualidade para *V. tajuensis*;
- Quando comparados aos óleos extraídos por HD, os extratos SFE, provenientes de *V. tajuensis* de talos e folhas apresentam um perfil cromatográfico menos diversificado, mas, também rico em compostos do tipo sesquiterpenos

hidrocarbonetos, sesquiterpenos oxigenados, ácidos graxos de cadeia longa e ésteres de ácidos graxos longa;

- Uma das principais vantagens apresentadas pelo processo de extrações supercríticas a obtenção de quantidades apreciáveis de compostos como: vitamina E, γ - tocoferol, esqualeno e estigmasterol que possuem emprego e grande importância tanto para indústrias alimentícias como farmacêuticas. A identidade destes compostos foi confirmada por co-injeção de padrões e dados da literatura;
- A composição qualitativa e semiquantitativa avaliada em extratos SFE de *V. tajuensis* mostrou uma alta quantidade de álcoois, alcanos, ácidos carboxílicos de cadeia longa e ésteres, difíceis de identificar o que diminuiu o índice de identificação de compostos. Os compostos tentativamente identificados nos óleos essenciais resultaram acima de 40 % e em alguns casos a 80 % dos compostos;
- O maior rendimento médio (média das três extrações realizadas para cada amostra) de óleos voláteis em massa seca foi o obtido da condição 45 °C e 200 atm para o fluido supercrítico CO₂;
- Para o C₃H₈ a condição mais favorável para talos foi a de 60 °C 200 atm e para folhas 60 °C 100 atm. As folhas foram analisadas somente em relação ao aumento da temperatura pela escassez da matéria-prima vegetal;
- Na fração sesquiterpênica os principais compostos detectados e caracterizados foram α -copaeno, α -cubebeno, β -cariofileno, δ -cadieneno, γ -cadineno, germacreno D, valeranal e biciclogermacreno. A presença de valeranal na maior parte das amostras analisadas é um forte indicativo para que seja empregado como marcador de qualidade fitoquímica;
- As condições empregadas neste estudo foram diferentes das publicadas na literatura visto que a SFE aplicada à espécie *V. officinalis* pode ser a justificativa para o afastamento da composição química geral do extrato de *V. tajuensis* obtidos por HD;
- O método estatístico Ward propiciou a hierarquização das relações químicas estabelecendo três grupos com características diferenciadas;

- O grupo que mais se aproximou quimicamente, qualitativamente e quantitativamente, da extração obtida por HD e por SFE da espécie *V. officinalis* foi aquele composto por folhas com o fluido CO₂ nas condições 45 °C 200 atm;
- O grupo que mais se aproximou quimicamente, qualitativamente e quantitativamente, da extração obtida por HD e por SFE da espécie *V. officinalis* foi aquele composto por folhas extraídas com o fluido supercrítico propano nas condições 45 °C 100 atm;
- A análise de PCA empregando quatro fatores demonstrou a proximidade e a dispersão dos dados com a espécie referência *V. officinalis* evidenciando a formação de três grupos. Portanto, há evidências de que o órgão (tecido vegetal) do qual se extrai os compostos voláteis influenciam na qualidade e na quantidade do extrato obtido;
- A técnica cromatográfica foi capaz de separar boa parte dos constituintes dos extratos e os detectores FID e MS mostraram boa sensibilidade para compostos em baixa concentração, sendo capazes de reproduzirem dados que proporcionaram o discernimento e elucidação estrutural dos óleos voláteis extraídos por SFE.

CAPÍTULO 4

EXTRAÇÃO POR
MACERAÇÃO, SOXHLET,
ULTRASSOM E LÍQUIDO
PRESSURIZADO
APLICADAS AO ESTUDO
DE ESPÉCIES DE VALERIANA

4.1 REVISÃO DA LITERATURA

4.1.1 Considerações iniciais

No Brasil a definição de medicamento fitoterápico é dada por legislações e pela Farmacopeia Brasileira ^[75] como: “*todo produto tecnicamente obtido e elaborado empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática e curativa ou para fins de diagnóstico*” ^[21].

O medicamento fitoterápico deve ser caracterizado quanto à sua eficácia, ao risco de seu uso (toxicidade), à reprodutibilidade na obtenção, assim como a manutenção da constância da qualidade, a fim de se obter um produto final passível de ser comercializado. Este deverá ter rótulo, embalagem e registros de acordo com a legislação sanitária vigente, ANVISA ^[21].

Define-se *droga vegetal* como a planta fresca ou suas partes após sofrerem o processo de coleta, secagem, estabilização e conservação ^[21].

O conceito de *preparado fitoterápico intermediário* é o produto triturado, rasurado, pulverizado, extrato, tintura, óleo fixo ou volátil, cera, suco e outros, obtido de plantas frescas ou de drogas vegetais através de operações de extração, fracionamento, concentração e purificação, com a finalidade de ser utilizado na fabricação do *produto fitoterápico* ^[21].

O *produto final fitoterápico* ou *produto acabado fitoterápico* é aquele que sofre modificações tecnológicas que viabilizam a sua administração sob ou na via de acesso a qual a ação farmacológica é preconizada.

Um medicamento *fitoterápico* passa por um longo processo de desenvolvimento. Não basta ter-se a comprovação da ação farmacológica preconizada, é necessário que se tenha o pleno conhecimento dos constituintes farmacologicamente ativos e dos marcadores químicos que serão empregados como indicadores de qualidade para o rastreamento do vegetal. Muitas vezes essas duas classes de compostos não são as mesmas. Portanto, é imprescindível que as demais classes de compostos existentes na droga vegetal sejam plenamente conhecidas, principalmente no que tange aos constituintes extraídos pelo processo

de extração que será adotado como o de referência para a preparação do preparado fitoterápico intermediário. Além disso, tais substâncias podem influenciar a liberação ou mesmo agir em sinergia aos princípios ativos.

A indústria fitofarmacêutica utiliza preferencialmente como matéria-prima o material vegetal seco. Este é submetido somente a processos de secagem e estabilização. O primeiro processo tem por finalidade interromper os processos enzimáticos desenvolvidos pelas células vegetais a partir da coleta e o segundo atua no intuito de dificultar o crescimento de bactérias, fungos e leveduras. Tanto um como outro viabilizam o transporte do material vegetal, o armazenamento, a preparação dos extratos enriquecidos em princípios ativos sem que haja riscos de deterioração e por consequência a formação de substâncias desconhecidas, que podem gerar efeitos adversos ^[212].

Diante deste panorama se faz necessário e imprescindível o estabelecimento de estudos que esclareçam a composição química presente nas espécies de *Valeriana* nativas do Rio Grande do Sul, principalmente no que tange àquelas que possam vir a demonstrar alguma possibilidade de uso terapêutico.

4.1.2 Compostos presentes em Valerianaceae

A presença de uma grande diversidade de compostos orgânicos e inorgânicos tem sido descrita em espécies de *Valeriana*. O caminho biossintético mais conhecido é aquele que acumula os terpenos gerando tanto os valepotriatos como os óleos voláteis. Existem outros caminhos biossintéticos descritos que levam ao acúmulo de derivados do ácido chiquímico e de seus precursores (substâncias C₆ – C₁), assim como dos compostos derivados do ácido pirúvico ^[21].

A primeira rota biossintética considerada foi a da transformação do ácido chiquímico em ácido pré-fênico ou ácido fenolpirúvico (C₆ – C₃) e em arilbenzenos ^[2;18;20]. A segunda rota biossintética é a dos derivados do ácido pirúvico e seus precursores que levam a formação, respectivamente, do ácido cinâmico e o ácido p-cumárico que são unidades essenciais para que o metabolismo secundário origine os alcaloides, os flavonoides e os fenilpropanoides ^[2;18].

A literatura especializada que descreve que a espécie *V. officinalis* é capaz de sintetizar alcaloides. Esta realidade foi comprovada pelo isolamento dos compostos: valtroxal, naftiridilmetilcetona, valerianina e actinidina [28; 29] a partir de extratos de raízes. Da espécie *V. wallichii* foi possível o isolamento dos alcaloides chantinina, n-p-hidróxi-fenitil, actinidina e 6,7-diidro-4-(hidróxi-metil)-2-(p-hidróxi-fenetil)-7-metil-5H-piridina [28].

Também há relatos de flavonoides quercetina, diosgenina, luteolina, apigenina, acacetina e camferol que foram isolados e identificados nas partes aéreas de diversas espécies de *Valeriana*: *V. ajanensis*, *V. fasciculata*, *V. eriophila*, *V. cardamines*, *V. rossica*, *V. tuberosa*, *V. palustris*, *V. grosheimi*, *V. fedtschenkoi*, *V. chionophila*, *V. ficariifolia*, *V. coreana*, *V. jacutica*, *V. turkestanica*, *V. capitata*, *V. stolonifera*, *V. nítida*, *V. amaurensis* [61;63;212-223].

Thies [224] relatou a presença do flavonoide isovalerianato de linarina em *V. wallichii* e, posteriormente, Waswski e colaboradores [225] isolaram e identificaram também a 6-metilapigenina. A última substância, linarina e resperidina foram identificadas em extratos hidroalcoólicos de raízes e rizomas de *V. officinalis* por Mader e colaboradores [30]. Estes as preconizam como as substâncias ativas responsáveis pela ação farmacológica sedativa de espécies de *Valeriana*. Até o momento não há descrição da ocorrência de diterpenoides nestas espécies, contudo, existem relatos da ocorrência de triterpenoides como o ursano e oleano que podem estar na forma glicosilada, formando a classe dos compostos das saponinas [220-221].

As classes de compostos farmacologicamente ativa em espécies de *Valeriana*, os valepotriatos, têm seu uso comprovado no tratamento medicamentoso das desordens psicovegetativas e psicossomáticas na ansiedade, na depressão, na agonia, na tensão e na falta de concentração [44; 108].

A espécie *V. officinalis* possui tanto valepotriatos diterpênicos: valtrato, isovaltrato e acevaltrato, como os valepotriatos monoênicos: diidrovaltrato, isovaleróxiidróxidiidrovaltrato, numa concentração que varia em torno de 0,5-2 % (m/m) quando correlacionado a massa seca [68;76;129]. O composto

majoritário nesta espécie é o valtrato ^[4]. Por este motivo são empregados como marcadores químicos e farmacológicos.

Wienschierz ^[224] realizou os primeiros estudos químicos relacionados à detecção da presença e a composição dos valepotriatos na espécie *V. wallichii* cultivada. Identificaram a presença de valtrato, isovaltrato e diidrovaltrato. Outros estudos descreveram os valepotriatos relacionados à espécie *V. edulis*. Citaram a presença de valtrato, isovaltrato, acevaltrato, diidrovaltrato e isovaleróxiidróxiididrovaltrato numa concentração em torno de 7 %. Os valepotriatos diterpênicos majoritários relatados entre estes os compostos foram isovaltrato e diidrovaltrato ^[20;195;196]. Os produtos de degradação destes compostos levam a formação de baldrinal e seus derivados que por sua vez também exercem ação farmacológica sobre o SNC tanto quanto os valepotriatos. Os valepotriatos parecem ser pró-fármacos.

Até o momento as espécies brasileiras, em especial as localizadas no Rio Grande do Sul, tiveram reportadas na literatura estudos relacionados somente à presença destes iridoides não glicosilados (valepotriatos) em extratos clorofórmicos. Não há outras publicações que descrevam quaisquer presenças de outros metabólitos secundários nestas espécies ou mesmo dos produtos de degradação ^[74;75].

4.1.3 Preparação para a extração do material vegetal

A extração de uma planta inteira ou dividida em fragmentos grosseiros será incompleta, devido o poder de penetração do solvente nos tecidos vegetais é muito lenta uma vez que as membranas celulares atuam como verdadeiras barreiras dificultando o processo extrativo. No caso da droga previamente dividida, tais membranas encontram-se parcialmente destruídas tornando mais fácil e eficiente a dissolução dos constituintes celulares no líquido exterior. Entretanto, a divisão excessiva, com a formação de pós muito finos, pode causar problemas no decorrer do processo de extração. No processo de maceração, as partículas muito finas podem passar para o extrato e conferir ao mesmo uma aparência turva. A filtração destes extratos é extremamente difícil, necessitando de adição de auxiliares de filtração com terra de diatomáceas, e lenta, com retenção de parte do extrato da

droga esgotada, que pode ser minorado pela prensagem ou centrifugação do resíduo ^[21].

4.1.3.1 Seleção do material vegetal para preparação do *preparado fitoterápico intermediário*

O processo de seleção visa à separação de impurezas orgânicas e inorgânicas da matéria-prima vegetal. Nesta operação se afastam manualmente materiais estranhos como pedaços grandes de vegetais, metais ou de materiais de outra natureza. Terra, areia e pós muito finos devem ser retiradas pela passagem em peneiras com aberturas que os deixem passar restando somente o material vegetal de interesse.

4.1.3.2 Classificação de pós

A droga vegetal moída deve ser classificada de acordo com o tamanho de partículas que devem ser adequadas para o processo de extração considerando o equipamento empregado. A operação pode ser realizada de acordo com o material. Os moinhos de facas, que atuam por corte são indicados para drogas vegetais como folhas, talos, cascas e raízes. A granulometria da droga moída é dada pela abertura das peneiras adaptadas ao moinho. Os moinhos que atuam pelo esmagamento são indicados para drogas friáveis e para as que contêm resina.

4.1.3.3 Operação de classificação de pós

O material vegetal moído deve ser classificado de acordo com o tamanho de partículas. Estas devem estar adequadas para o uso no processo de extração considerando o método e os equipamentos selecionados. Sendo assim, a operação de moagem deve ser acoplada a tamisação do material vegetal obtido, separando as partículas que excederem a faixa de granulometria escolhida que deverão voltar para o moinho para serem novamente cominuídas, sendo as partículas mais finas retiradas da mistura final do material vegetal. Nesta classificação empregam-se diferentes números de tamises, que são especificados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, e estes representam uma maneira prática para identificá-los. Industrialmente são utilizados pós de vegetais classificados como

moderadamente grosso ou o *semifino*. O primeiro corresponde à passagem da totalidade do material vegetal pelo tamis 22 (450 μm) e no máximo 40 % pelo tamis 60 (160 μm), o segundo pela passagem da totalidade pelo tamis 44 (224 μm) e no máximo 40 % pelo tamis 85 (125 μm) [21].

4.1.3.4 Extração e suas peculiaridades

Para que se possa propor um processo extrativo em escala piloto ou industrial deve-se definir a seletividade do solvente a ser empregado no processo extrativo primeiramente em bancada. A escolha do solvente extrator está diretamente ligada à constância na composição química do mesmo, sendo uma etapa crítica para implementação de qualquer processo de fabricação. Pode-se obter um extrato que contenha a maior parte dos constituintes químicos da planta ou um extrato que apresente somente constituintes químicos com uma determinada característica dependendo da finalidade a que se destina este extrato. No primeiro caso utilizam-se solventes não seletivos como no caso de etanol e metanol. No segundo caso emprega-se um solvente seletivo, de menor polaridade como o hexano para retirada de graxas, ceras e compostos apolares.

A penetração do solvente utilizado na célula vegetal induz um momento dipolar nas moléculas dos compostos a extrair fazendo com que ocorra a associação forte às moléculas dos solventes. Esta capacidade pode ser expressa pela constante dielétrica que é uma função derivada das propriedades do solvente. Quanto mais polar for o solvente maior será sua constante dielétrica, desta maneira compostos ionizáveis e ou altamente polares serão dissolvidos e por consequência, extraídos. O inverso também acontece, solventes apolares solubilizam compostos com constantes dielétricas baixas. A seleção destes solventes deve levar em conta além da seletividade, a facilidade de manipulação, preço, a segurança, a toxicidade e uma possível contaminação ambiental.

4.1.4 Métodos extrativos para prospecção de fitoterápicos

A escolha do solvente extrator e do método de extração pode influenciar de maneira determinante na composição química do extrato vegetal (fitoterápico). Pode-se obter um extrato que contenha a maior parte dos constituintes químicos da planta

(usando solventes não seletivos), ou um extrato que apresente somente constituintes químicos com uma determinada característica (solventes seletivos). Esta escolha se dá em relação à finalidade a que se destina este extrato vegetal. Uma destas finalidades é o preparo industrial de extratos secos padronizados (*preparado fitoterápico intermediário*) base do desenvolvimento das mais diversas formas farmacêuticas: drágeas, comprimidos, entre outros. Para se efetuar a padronização de um extrato seco é preciso que se eleja o composto químico marcador que ao longo do processo de extração possa ser monitorado.

Os processos de extração de bancada são muitas vezes a partida para o aperfeiçoamento de técnicas extrativas a serem escalonadas para a indústria. Portanto, o estudo relacionado a novas técnicas de desenvolvimento na preparação de amostras pode ser um bom início viabilizando a passagem do “nível de bancada” para o nível de produção industrial. Adicionado a este fato há um melhoramento nas técnicas de avaliação da qualidade dos produtos vegetais, com significantes vantagens sobre os métodos convencionais, também chamados oficiais farmacopéicos (maceração, percolação e hidrodestilação).

Um conjunto de novas técnicas de extração foi instituído nos últimos quinze anos. O objetivo foi o de tornar os processos extrativos mais rápidos, utilizando menor quantidade de solventes, diminuindo a degradação dos compostos ativos na amostra complexa, eliminando muitas vezes as várias etapas de “*clean-up*” e de concentração da amostra. Estes fatores melhoram as diminuições da concentração e perdas do analito (metabólito secundário) causadas pelos efeitos exercidos pela matriz complexa.

O desempenho de cada processo de extração é avaliado por técnicas analíticas. Os métodos de separação cromatográficos acoplados a detectores são capazes e robustos para comprovar a eficiência, seletividade e melhor cinética de extração com a vantagem de serem passíveis de automação.

A micro-extração em fase sólida (SPME), a extração em fase sólida (SPE), extração por fluido supercrítico (SFE) (*discutida no capítulo anterior*), a extração assistida por microondas (MAE) e a extração com líquidos pressurizados (PLE) (conhecida também como extração por fluido pressurizado – PFE, ou extração

acelerada com solventes – ASE[®]) despontam como as técnicas de preparação de amostra mais promissoras. A substituição dos métodos convencionais por métodos modernos de extração (validados) somente pode ser realizadas quando são comparados em termos de performance. Leva-se em conta o custo, o percentual (%) de resíduo seco, o percentual (%) de princípio ativo, a economia de tempo e a diminuição do uso de solventes.

4.1.4.1 Processos tecnológicos de extração para o preparado fitoterápico intermediário utilizados neste trabalho

4.1.4.1.1 Extração por Maceração (EMAC)

A definição da maceração, como processo, é a de ser um método extração o qual permite que a droga vegetal permaneça em contato com o solvente por vários dias, sob agitação ou não e à temperatura ambiente, para obtenção do extrato vegetal. Este processo resulta no equilíbrio da concentração entre a droga e o solvente, que depende de fatores ligados à droga vegetal (tais como sua natureza, a granulometria, o teor de umidade e a quantidade – relação droga/solvente) e dos fatores ligados ao solvente (tais como sua seletividade, quantidade, polaridade e viscosidade). O rendimento em extrato diminui quando a relação droga/solvente aumenta, indicando a saturação do solvente ^[21].

O processo tecnológico de maceração pode ser dividido em estático, dinâmico e por digestão. O processo clássico é conhecido como maceração simples ou estática e consiste em deixar a droga em contato com o solvente por vários dias, com agitação ocasional, sendo uma operação extremamente lenta. A segunda técnica de extração é a maceração dinâmica que consiste em movimentar o sistema extrativo constantemente, o que abrevia o tempo da operação de extração. O terceiro método de maceração é o emprego de temperatura, em torno de 40-50 °C, sendo denominado de processo de digestão e pode estar ou não associado à movimentação do solvente e da droga vegetal ^[21;155].

A desvantagem deste processo tecnológico, além da lentidão, é o fato de que não há o esgotamento do material vegetal. A fim de diminuir as perdas do extrato vegetal no resíduo de extração inserem-se outras técnicas à operação maceração. A

primeira é a de repetir o processo de maceração por duas a três vezes, depois de ser retirado o solvente da extração anterior. Este procedimento diminui a quantidade de extrato retida no resíduo, porém aumenta a quantidade de solvente a ser recuperado. Este inconveniente pode ser superado, adotando-se o esquema de processamento em série. Estas técnicas são utilizadas em preparações de pequena escala. O emprego industrial da maceração é limitado à fabricação de extratos a partir de drogas vegetais ricas em mucilagem. Isso porque o entumescimento da droga é um fator importante, porque aumenta a permeabilidade da parede celular, aumentando a difusão do solvente.

Os vegetais contendo mucilagem entumescem rapidamente podendo aumentar em até 4 vezes o seu volume original e dificultam a passagem do solvente o que contra-indica o uso de processo de percolação ou extração contracorrente. A etapa final do processo é a prensagem ou a centrifugação do resíduo para a recuperação da parte do extrato retido no resíduo. Portanto, como mencionado acima, a velocidade de obtenção do equilíbrio está em função da granulometria da droga, do grau de entumescimento das células e das propriedades do solvente [21;155].

O monitoramento da influência da granulometria foi realizado em *Hipericum perforatum*. O experimento foi realizado partindo-se de 20,0 g de material vegetal, em dois diferentes intervalos de tamanho de partículas (1-3 mm e < 0,25 mm). Os resultados da extração por maceração dinâmica evidenciaram que o equilíbrio da maceração é enriquecido mais rapidamente (1 a 3 min) quando o grau de cominuição aumenta. Os rendimentos finais e a quantidade de taninos não foram afetados pelo tamanho de partícula, contudo, o tempo gasto para o equilíbrio é sensivelmente menor. Há fatores que limitam a extrapolação destes resultados a uma grande escala de produção, pois, a separação dos sedimentos finos inchados se dá por centrifugação, sendo a filtração extremamente prejudicada como processo de separação pelo entupimento das membranas filtrantes, assim como pela passagem de partículas para o extrato vegetal [5;21;155].

A definição da maceração, como processo, é a de ser um método de extração que permite que a droga vegetal permaneça em contato com o solvente por vários dias, sob agitação ou não, e à temperatura ambiente, para obtenção do extrato

vegetal. Esse processo resulta no equilíbrio da concentração entre a droga e o solvente, que depende de fatores ligados à droga vegetal (tais como sua natureza, a granulometria, o teor de umidade e a quantidade – relação droga/solvente) e dos fatores ligados ao solvente (tais como sua seletividade, quantidade, polaridade e viscosidade).

O rendimento em extrato diminui quando a relação droga/solvente aumenta, indicando a saturação rápida do solvente. A desvantagem deste processo tecnológico, além da lentidão, é o fato de que não há o esgotamento do material vegetal e por consequência a dúvida se há ou não a presença do composto alvo ^[21;155].

4.1.4.1.2 Extração por Soxhlet (ESOX)

É um sistema de extração sólido-líquido contínua, em que a extração se faz num equipamento composto de um balão de fundo redondo, um corpo extrator e um corpo de refrigeração. É utilizada, sobretudo, para extrair sólidos com solventes voláteis. Em cada ciclo da operação o material vegetal entra em contato com o solvente renovado, assim o processamento possibilita uma extração eficiente em rendimento em massa assim como a manutenção de volumes reduzidos de solventes. Este processo extrativo demonstra um grande avanço quando comparados à qualidade e a quantidade extraída com as quantidades de solventes empregadas nos outros processos extrativos a **Figura 4.1** ilustra o equipamento Soxhlet ^[20].

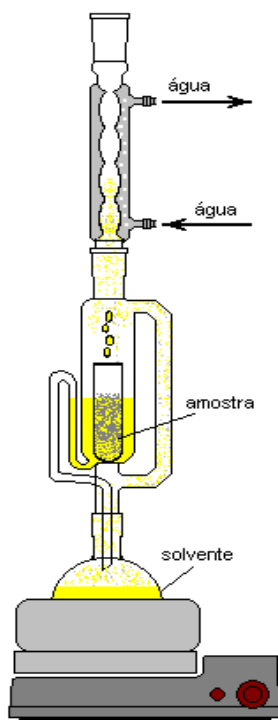


Figura 4.1: Equipamento de Soxhlet ^[227].

As vantagens da extração convencional Soxhlet incluem (1) o deslocamento do equilíbrio por transferência repetida de solvente fresco em contato com o sólido, a matriz complexa; (2) mantendo uma temperatura relativamente elevada extração com o calor do balão de destilação, e (3) não há exigência de filtração após lixiviação ^[153].

As principais desvantagens da extração convencional Soxhlet incluem (1) a extração é de longo prazo; (2) a utilização de uma grande quantidade de solvente; (3) agitação não pode ser prevista Soxhlet no dispositivo para acelerar o processo; (4) as grandes quantidades de solvente utilizado requerem o procedimento de evaporação / concentração; (5) a possibilidade de decomposição térmica dos compostos não pode ser ignorada como a extração geralmente ocorre no ponto de ebulição do solvente por um longo tempo. A necessidade de um longo tempo empregado no desenvolvimento desta técnica e de grandes quantidades de solvente são as grandes críticas ao método de extração Soxhlet ^[153].

4.1.4.1.3 Extração com ultrassom (USE)

O ultrassom é definido como uma onda sonora com frequências acima de 20.000 Hz. A extração ultrassônica é a técnica que emprega essa energia, na forma de ondas, que criam variações na pressão do solvente extrator e por consequência formando o fenômeno conhecido como “cavitação”. Esse se dá pela formação espontânea de bolhas no solvente, mesmo em temperaturas abaixo de seu ponto de ebulição. Essas bolhas rompem a tensão superficial e estouram gerando um forte stress dinâmico e mecânico fazendo com que a célula vegetal passe por uma interface poderosa de fricção, o que permite que o conteúdo intracelular seja extraído [21;155].

O aumento da permeabilidade das paredes celulares, produção de cavitações (formação espontânea de bolhas em um líquido abaixo do seu ponto de ebulição, resultando num forte estresse dinâmico) e aumento do estresse mecânico das células vegetais (fricção interfacial) são os principais episódios da extração por ultrassom [49].

A extração de metabólitos contidos em glândulas (externas ou internas) é justificada pela espessura fina das membranas (externas). Elas podem ser rompidas pelo colapso das bolhas de cavitação próxima às paredes das células vegetais, facilitando a penetração dos solventes nas células e a liberação do conteúdo [21;49;155].

O tamanho das partículas do material vegetal é fundamental para a retirada de constituintes internos. A diminuição do tamanho das partículas do material aumenta o número de células diretamente expostas à extração por solvente com ultrassom gerando um incremento em massa seca enriquecida com metabólitos secundários.

As propriedades exercidas pelo ultrassom facilitam a dilatação e hidratação do material vegetal causando a abertura poros da parede celular e conseqüentemente há a melhora da razão de transferência de massa, resultando no aumento da eficiência de extração e/ou redução do tempo de extração [58].

A ação do ultrassom no processo de extração tem influência direta da frequência, potência do aparelho e do tempo de extração. Desta forma, o aumento da transferência de massa, rompimento das células vegetais, o aumento na penetração do solvente, diminuição de efeitos capilares e custo viável colocam o ultrassom como uma técnica promissora na utilização industrial ^[155]. Existem dois tipos distintos de aparelhos geradores de ondas ultra-sonora: o banho de ultrassom e a sonda, que podem ser visualizados na **Figura 4.2**.

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

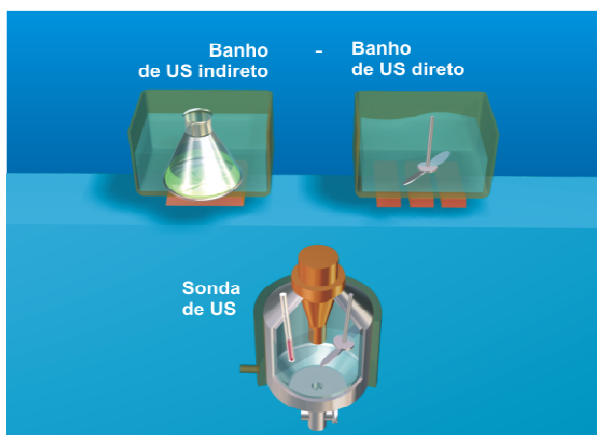


Figura 4.2: Esquema geral de sistemas de aplicação de ondas ultrassônicas no campo da química: (a) banho indireto, (b) banho direto e (c) sonda ^[179].

Na área de química analítica e em alguns processos industriais, a emissão de ultrassom tem sido usada no pré-tratamento de amostras sólidas, o que facilita e acelera operações, tais como a extração de compostos orgânicos e inorgânicos, dispersão, homogeneização, nebulização, lavagem e derivatização de amostras ácidas para cromatografia ^[228-235].

A técnica é de fácil execução. A amostra é misturada ao solvente, sendo colocada em um recipiente aberto que é parcialmente imerso em um banho de ultrassom. Esse procedimento pode ser realizado sucessivamente com o mesmo solvente até a exaustão do material vegetal, ou ainda, realizar extrações com solventes em ordem crescente de polaridade para retirar o material de proteção celular, entre estes lipídios e açúcares, para chegar até o metabólito secundário alvo. O tempo de extração deve ser determinado para cada matéria prima vegetal e dependerá das interações as quais o metabólito secundário está ligado à matriz vegetal. Exemplos de trabalhos publicados utilizando ultrassom como técnicas de extração de plantas estão apresentados na **Tabela 4.I**.

Tabela 4.I: Resumo da literatura existente sobre a aplicação de ultrassom na extração de vegetais.

Amostra	Analitos	Referência	Nº
<i>V. officinalis</i> L.	borneol	Valachovic et al.	[236]
<i>Hibiscus tiliaceus</i> L.	ésteres, ácidos carboxílicos	Melecchi et al.	[237]
<i>Mentha piperita</i>	mentol	Shotipruk et al.	[238]
<i>Chresta</i> spp	esteroides e triterpenos	Schinor et al.	[239]
<i>Macleaya cordata</i>	alcaloides	Zhang et al.	[240]
Manjerona e orégano	cis-sabineno hidratado, terpineol-4 e α -terpineol, timol e carvacrol	Rodrigues M.R.	[241]
<i>Panax ginseng</i>	saponinas	Wu et al.	[242]
<i>Rosmarinus officinalis</i>	vitamina E	Torre et al.	[243]
<i>V. chamaedryfolia</i> <i>V. eichleriana</i> <i>V. eupatoria</i> <i>V. glechomifolia</i> <i>V. saricarifolia</i> <i>V. scandens</i> <i>V. polystachia</i> <i>V. tajuvensis</i>	valepotriatos	Silva et al.	[75]

O primeiro estudo no preparo de tinturas de *V. officinalis* foi realizado por Valadovich e colaboradores [236] compararam o comportamento da extração ultrassônica contra a maceração estática. Foram aferidos os resíduos secos obtidos das amostras submetidas à extração ultrassônica, em intervalos regulares. Os marcadores químicos utilizados para o controle da extração foram borneol, cineol e a mistura de beta-tujonas. Os resultados demonstraram uma melhor eficiência da extração ultrassônica.

Hromádková e colaboradores ^[244] compararam o método clássico de extração alcoólica com a extração assistida por ultrassom na preparação de tinturas de *Valeriana*. Novamente foram estabelecidos controles sobre o resíduo seco e os marcadores eleitos foram os polissacarídeos: xilano, manano e glucano. Os resultados confirmaram que na extração ultrassônica há um aumento tanto do resíduo seco como na concentração de polissacarídeos (candidatos a marcadores químicos).

Silva e colaboradores ^[75] quantificaram cinco valepotriatos diavaltrato, acevaltrato, diidrovaltrato, diavaltrato e valtrato em nove espécies de *Valeriana* empregando a técnica de extração clorofórmica por ultrassom. A quantificação destes compostos foi realizada por HPLC.

Recentemente Kobuz ^[245] propôs um estudo sobre a extração de compostos bioativos (valepotriatos e óleos voláteis) de raízes secas de *V. officinalis* com o ultrassom. As condições de extração foram variadas quanto a intensidade de radiação e o tempo de exposição. O estudo também incluiu a avaliação do coeficiente de hidratação do material vegetal seco, o rendimento de extração e o conteúdo em resíduo seco. O pesquisador concluiu que o uso do ultrassom é mais eficiente que as técnicas convencionais extrativas.

4.1.4.1.4 Extração com líquido pressurizado (PLE/ASE)

A extração com líquidos pressurizados (do inglês “*Pressurized Liquid Extraction*” – PLE ou “*Accelerated Solvent Extraction*” – ASE[®]) é um método automatizado para a extração de amostras sólidas e semi-sólidas empregando solventes orgânicos sob elevada pressão e em temperaturas próximas ao ponto de ebulição.

Diferente do método da extração por solventes ele emprega solventes em temperaturas e pressões elevadas sobre as células de extração, as quais são mantidas sob aquecimento durante todo o tempo do processo. O extrato é liberado da extração sem que o solvente esteja saturado. A mesma célula é submetida novamente ao contato com um novo solvente aquecido (“*flushing*”). Após a extração, o extrato é liberado através da passagem de gás inerte (N₂ ultra-puro). Entretanto, o

extrato não é submetido ao aquecimento costumeiro que ocorre no balão da extração por Soxhlet.

Ressalta-se que a quantidade dos ciclos do solvente pode ser fixada até que o material vegetal possa ser esgotado. Dois produtos são formados nesta extração que podem ser fixos ou voláteis. Se houver interesse nos compostos voláteis segue-se o procedimento de destilação.

No sistema PLE a extração é realizada em temperaturas que excedem o ponto normal de ebulição do solvente. A pressão alta é mantida para que o solvente permaneça no estado líquido. Além disto, devido às altas pressões e temperaturas do processo há um incremento na capacidade de solubilização, na difusividade e na cinética de extração, com diminuição dos tempos de extração e nos volumes de solventes.

Desde o desenvolvimento do primeiro aparelho de extração acelerada com solvente, em 1995, poucas referências podem ser encontradas quanto à aplicação da mesma na extração de plantas ^[83;84].

Como todo o processo de extração há vantagens e desvantagens no uso da PLE. Entre as vantagens pode-se enumerar: exaustão da amostra, conservação de compostos termolábeis, a automatização que proporciona altos índices e reprodutibilidade dos parâmetros de extração (T, P, t: tempo estático, volume do “flush”), redução do tempo de extração e de solvente com extração de várias amostras em um ciclo. Entre as desvantagens o alto custo do equipamento e a frequente necessidade de um “clean-up” das amostras para análise cromatográfica. Na **Tabela 4.II** estão descritos métodos de extração acelerada por solventes aplicadas a plantas medicinais.

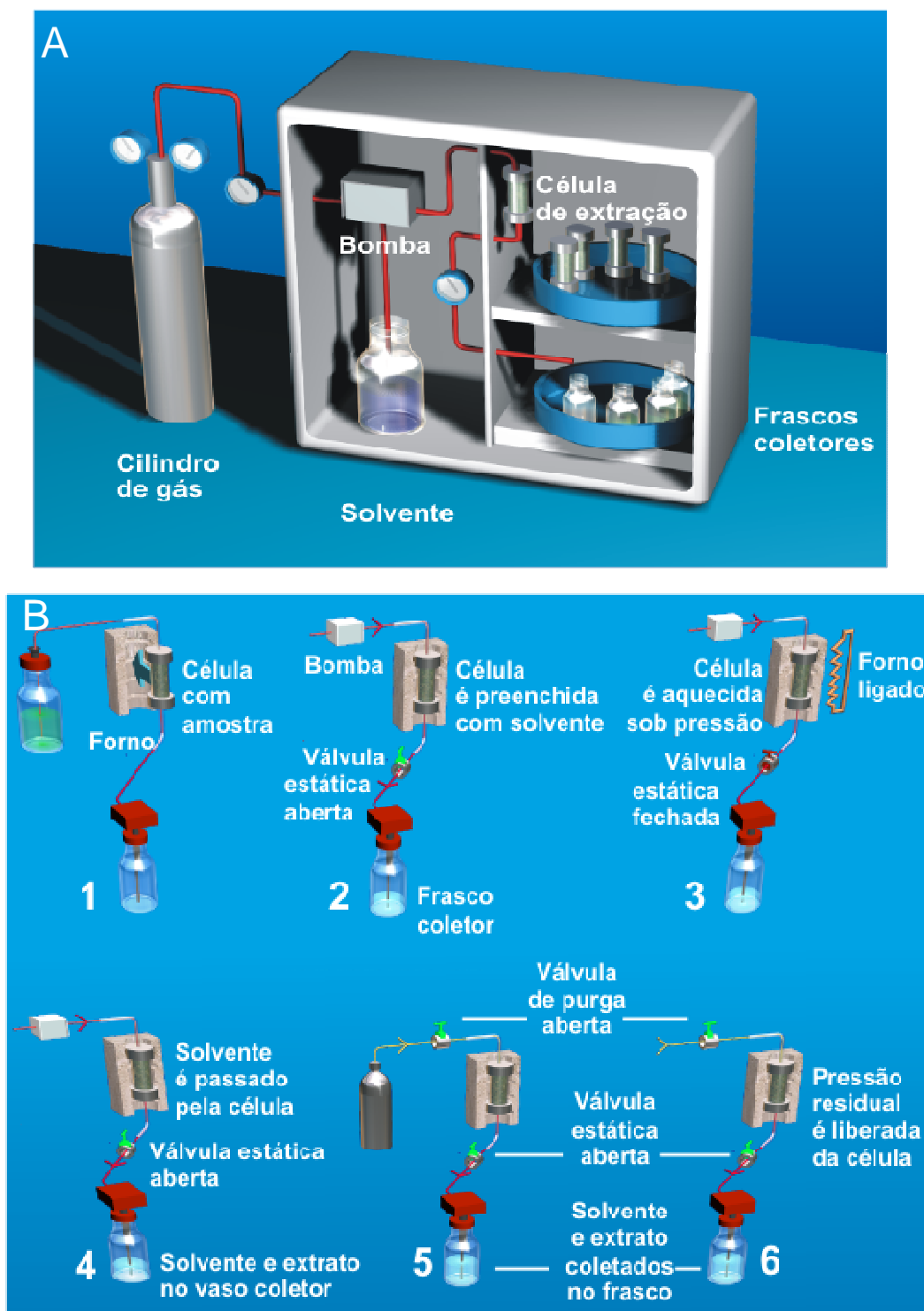


Figura 4.3: (A) Esquema geral do Equipamento e (B) Etapas da extração com líquido pressurizado no sistema ASE™: 1) colocação da célula no forno; 2) preenchimento da célula com solvente; 3) extração estática; 4) flushing com solvente novo; 5) purga do solvente do sistema com liberação da pressão residual e 6) esvaziamento da célula^[179].

Tabela 4.II: Resumo da literatura existente sobre a aplicação da extração com líquido pressurizado (PLE/ASE) à plantas.

Amostra	Analitos	Referência	Nº
<i>Calluna vulgaris</i> <i>Sambucus nigra</i> <i>Vaccinium myrtilus</i>	Compostos fenólicos	Rieger et al.	[246]
<i>Cyperus rotundus</i>	Óleos voláteis	Tam et al.	[247]
<i>Copis chinensis</i> Franch	Acaloides	Chen et al.	[248]
<i>Spirulina platensis</i>	Antioxidantes	Herrero et al.	[249]
<i>Juniperus virginiana</i>	Cedrol, cedreno	Eller et al.	[250]
<i>Angelica sinensis</i>	Ácido ferrúlico	Lao et al.	[251]
<i>Curcuma phaeocaulis</i>	Sesquiterpenos	Yang et al.	[252]
Plantas medicinais	Ginsenosídeos	Choi et al.	[253]
Plantas medicinais	Alcaloides	Ong et al.	[254]
Plantas medicinais	Timol, saponinas	Benthin et al.	[255]

4.1.4.2 Critérios de escolha entre os processos de extração

Leach ^[256] estabeleceu o primeiro estudo com dados comparativos entre as diferentes técnicas de extração sólido-líquido para metabólitos secundários. Os critérios empregados foram o custo, o tempo de extração e a quantidade de solvente necessário para a realização do processo. A **Tabela 4.III** descreve os resultados desta pesquisa.

Tabela 4.III: Comparação entre métodos de extração para matrizes vegetais ^[257].

Método de Extração	Soxhlet	USE	ASE	MAE	SFE
Custo	Baixo	Baixo	Alto	Médio	Alto
Tempo de extração	6–48 h	< 30 min	< 30 min	< 30 min	< 60 min
Quantidade de Solvente [mL]	200–600	< 50	< 100	< 40	< 10

Designação: USE – extração ultrassônica; ASE – extração acelerada por solvente; MAE – extração assistida por microondas -; SFE – extração por fluido supercrítico.

A comparação de diferentes métodos extração foi estudada também para nutracêuticos por Wang e Weller ^[257]. Para melhorar a efetividade e a qualidade dos extratos é necessário levar em conta as características constitucionais de cada vegetal, dos materiais empregados na confecção de produtos nutracêuticos e das

características químicas dos princípios ativos e de suas relações com a matriz nutracêutica. Além disto, deve-se levar em conta a natureza dos solventes e procedimento empregado de extração.

Às vezes, o elevado rendimento do extrato não irá garantir um alto rendimento de componentes bioativos no extrato. Alguns componentes bioativos tais como ácidos graxos livres e tocoferóis são muito sensíveis ao oxigênio e calor. Neste caso, mais cuidados devem ser tomados para evitar a oxidação e a degradação térmica dos componentes. Portanto, o rendimento e a qualidade dos componentes bioativos também devem ser considerados quando for selecionado um método de extração.

4.1.4.3 Metodologia analítica aplicada a extratos vegetais

A cromatografia em fase gasosa (GC) pode ser usada para compostos ditos fixos (semivoláteis), mas em alguns casos necessita-se de derivatização para reduzir a polaridade e aumentar a volatilidade dos compostos em análise. Metabólitos secundários de peso molecular (500 uma), com pontos de ebulição inferiores a 300 °C podem ser analisados por GC. A GC também pode ser usada para compostos semivoláteis de peso molecular um pouco mais elevado. Os demais que têm massa molecular elevada apresentam dificuldade de volatilização e podem apresentar degradações químicas a altas temperaturas.

Um dos artifícios para aumentar a volatilidade destas substâncias é a diminuição das interações químicas (ligações de hidrogênio, forças de van der Waals/forças de Keesom, forças de Debye, forças de dispersão de London) através da derivatização reduzindo a polaridade e aumentando a volatilidade para serem analisados cromatograficamente. Na cromatografia gasosa o analito é transportado por uma fase móvel gasosa conhecida como gás de arraste. A separação de analitos, em uma coluna apolar, ocorre segundo a ordem crescente do ponto de ebulição ^[60;62]. A detecção desses compostos é realizada por espectrômetros de massas que utilizam o mesmo princípio (PE, interações químicas e PM) para a ionização dos compostos.

Após a separação na coluna da matriz complexa os compostos orgânicos são fragmentados por bombardeio com uma fonte ionizante (geralmente impacto por

elétrons). A análise dos íons formados é realizada num analisador, quadrupolar, submetidos a um campo eletromagnético. Interações dos fragmentos iônicos com o campo eletromagnético fazem com que apenas íons de determinada relação massa/carga (m/z) passem intactos sem colidir com as barras do quadrupolo e sejam detectados. A técnica de GC é uma das mais sensíveis e versáteis para compostos orgânicos. O espectro de massas de cada composto (modo SCAN ou de varredura) permita a sua identificação. Além disso, há possibilidade de aumentar a sensibilidade e assim promover a quantificação e a seletividade do processo usando-se o método SIM (do inglês “*Single Ion Monitoring*” ou monitoramento seletivo de íons) no qual, alguns íons específicos de determinados compostos são monitorados.

Muitos métodos foram propostos para a análise de metabólitos secundários da família Valerianaceae. Entre estes do doseamento de valepotriatos, ácidos valerênicos e seus derivados. Estas técnicas são titulométricas, densitométricas (cromatografia de alta resolução - HPTLC) e cromatografia gasosa com detectores de massas e de ionização de chama^[60;62;203]. A **Tabela 4.IV** relaciona a espécie, os compostos e o tipo de amostras analisadas na caracterização química de compostos em *Valeriana* GC.

Tabela 4.IV. Resumo da literatura existente sobre a aplicação da Cromatografia Gasosa na quantificação de compostos em espécies de *Valeriana*.

Espécie estudada	Composto	Tipo de amostras	Referência	Nº
<i>V. officinalis</i>	Acevaltrato, diidrovaltrato, valtrato	Extratos de raízes e rizomas	Verzar-Petri et al	[257]
<i>V. officinalis</i>	Ésteres e isovaleratos e acetatos	Extratos de raízes e rizomas	Hendriks & Bruins	[258]

O emprego de técnicas e tecnologias economicamente e ecologicamente viáveis no preparo de extratos vegetais enriquecidos com princípios farmacologicamente ativos é o que se busca. Os métodos tradicionais de extração utilizam uma grande quantidade de solvente que não só aumenta os custos operacionais, mas também causam dos problemas ambientais adicionais.

O desenvolvimento das técnicas de extração tem sido uma das alternativas a extração realizada pelos métodos convencionais. Tem por finalidade oferecer vantagens em relação à extração tempo, solvente consumo, extração teores e reprodutibilidade. Contudo, as técnicas modernas extração só se encontram em um campo limitado de aplicações.

A fim de mudar este panorama devem-se criar estudos que esclareçam o funcionamento do mecanismo de extração, eliminando os entraves técnicos, melhorando a concepção e escala dos sistemas de extração e de suas aplicações industriais.

O objetivo deste estudo foi o de estabelecer o perfil qualitativo dos extratos alcoólicos obtidos por maceração, Soxhlet, ultrassom e extração acelerada por solvente sobre o material vegetal proveniente de *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis* a fim de eleger o método de melhor desempenho. De posse destes indícios, proceder-se à quantificação do extrato alcoólico total e das frações obtidas por fracionamento em coluna cromatográfica preparativa através do uso de solventes de polaridades crescentes.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos selecionados para este estudo comparativo de desempenho foram a maceração, Soxhlet, ultrassom e extração com líquido pressurizado. Este estudo teve por objetivo a eleição do melhor método de preparo do *preparado fitoterápico intermediário*. Para tanto se aperfeiçoou o processo de extração somente com o solvente extrator etanol:água (70:30 v/v) seguido de avaliação quantitativa por cromatografia gasosa, tanto do extrato hidroalcoólico total quanto das frações obtidas por fracionamento em coluna cromatográfica preparativa, usando solventes de polaridades crescentes. Para a seleção da metodologia extrativa levou-se em conta o custo, o rendimento em resíduo seco e em princípio ativo, a economia de tempo e a redução do uso de solventes.

4.2.1 A investigação e o delineamento metodológico

Os estudos extrativos foram realizados com três espécies de *Valeriana* nativas do estado do Rio Grande do Sul: *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis*. As três espécies vegetais foram selecionadas a partir da análise estatística multivariável aplicada aos compostos voláteis no **Capítulo 2** que demonstrou a aproximação química com a espécie *V. officinalis*. Os procedimentos extrativos, divididos em clássicos e modernos, e os métodos de análise (qualitativos e quantitativos) aplicados neste estudo estão resumidamente apresentados no organograma apresentado na **Figura 4.4**.

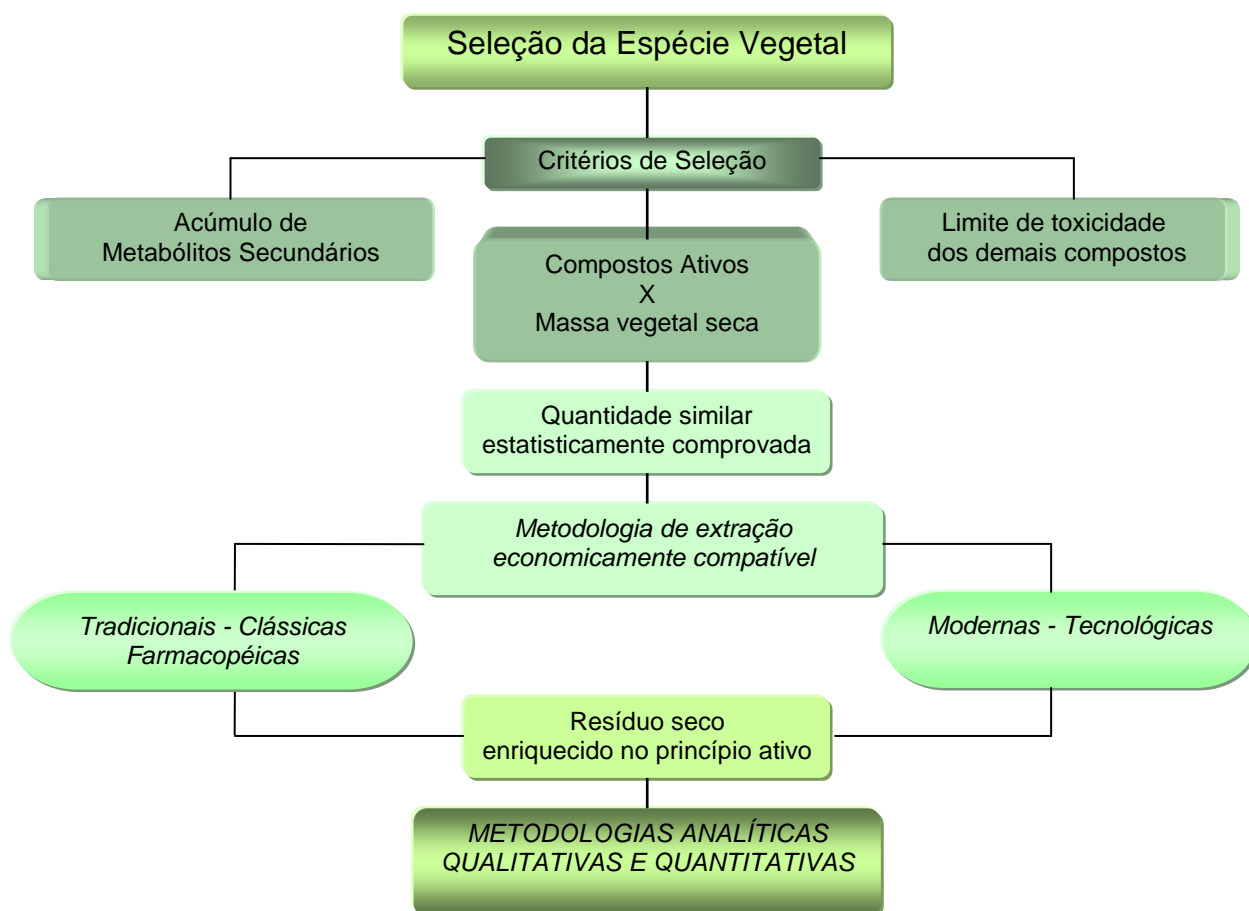


Figura 4.4: Organograma da condução dos procedimentos para eleição da espécie vegetal e para a seleção de metodologias de extração e análise aplicadas às espécies de *Valeriana* estudadas.

4.2.2 Produtos químicos e equipamentos

Todos os solventes empregados (água, etanol, éter de petróleo, metanol, acetato de etila, n-hexano e clorofórmio) foram de grau p.a. e submetidos à bidestilação, marca Merck® ou similar. Usou-se, quando necessário, água MilliQ®.

Além desses, foram usados os reagentes o ácido clorídrico, ácido fórmico, hidróxido de amônio, sulfato de sódio anidro, Gel de sílica 60 GF para cromatografia em camada delgada e Gel de sílica 60 mesh para cromatografia em coluna também grau p.a. da marca Merck ou similar.

Os reagentes específicos (reativo de Folin, reativo de Mayer, reativo de Dragendorff, reativo de Bertrand e iodo metálico) foram preparados a partir de seus reagentes originais, grau p.a. Merck ou similar.

Os padrões para a análise quantitativa foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich com aproximadamente 99,9 % de pureza (ácido mirístico, ácido hexadecanoico, ácido esteárico, esqualeno, eicosano, docosano, hexacosano, nonacosano, tricosano, heneicosano, heptacosano, triacontano, linolenato de metila, linoleato de metila, β -sitosterol, pentadecanoato de etila, hexadecanoato de metila, hexadecanoato de etila, estearato de metila, tetracosano, vitamina E, estigmasterol, fitol e bifenila).

Os equipamentos usados no desenvolvimento deste trabalho estão listados na **Tabela 4.V**.

Tabela 4.V: Descrição aparelhos e equipamentos.

Descrição	Marca [®]
Aparelho ultrassom	Ultrasonic
Balança analítica	Shimadzu
Balança semi-analítica	Bel
Evaporador rotatório	Fisatom
Lâmpada UV-VIS 254/356 nm	Boitton
Liofilizador	Edwards
Moinho de facas	Marconi
Placas cromatográficas analíticas 0,25mm gel de sílica GF254	Merck
Extrator por solvente acelerado	ASE 300 [®] – Dionex
Soxhlet	Vidrotec

4.2.3 O material vegetal para extração

A matéria-prima vegetal empregada nesta pesquisa foi coletada de acordo com a **Tabela 2.1** tendo as amostras testemunhas (exsicatas) depositadas em Herbário desta Universidade Federal do Rio Grande do Sul. As amostras utilizadas para realizar todos os processos extrativos foram as partes aéreas secas por liofilização das espécies *V. chamedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuvensis*.

Os procedimentos das coletas e estabilização do material vegetal foram os mesmos citados no **Capítulo 2** e levaram em conta a manutenção e a integridade dos compostos voláteis.

4.2.4 Métodos de extração empregados

4.2.4.1 Extrações clássicas

4.2.4.1.1 Extração por maceração dinâmica (EMAC)

Para as triplicatas de maceração dinâmica (EMAC) foram usadas porções de 10,0 g \pm 0,05 g de cada amostra vegetal com um volume de 100 mL de etanol:água (70:30 v/v) perfazendo a proporção de droga:solvente 1:10 (m/v) [83;153;154].

O solvente foi renovado a cada 7 dias num total de 21 dias de extração. A EMAC transcorreu a temperatura ambiente (temperaturas médias de 25 °C a 30 °C), com agitação uma vez ao dia, na ausência de luz. A cada troca de solvente, procedeu-se à filtração do extrato.

Os extratos foram recolhidos em balões levados à evaporação em rota-vapor (RV2 Buchi[®]), à temperatura inferior a 60 °C, posteriormente sendo transferidos para frascos âmbar, sendo submetidos a um fluxo de nitrogênio para a preservação até que fossem preparadas as SEAEMAC (Soluções Extrativas Analíticas obtidas por Maceração Dinâmica) para análise cromatográfica.

O rendimento percentual foi calculado a partir dos resíduos secos e da relação com a massa seca provenientes das partes aéreas das três espécies de *Valeriana*. O preparo das SEAEMACs foi realizado através da preparação de soluções clorofórmicas de concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.2.4.1.2 Extração por Soxhlet (ESOX)

As extrações com Soxhlet utilizaram como solvente a mistura etanol:água (70:30 v/v). A fim de evitar contaminantes os cartuchos extratores foram previamente extraídos (limpos) por extração em Soxhlet com solvente apolar (hexano) e polar (acetona), secos em estufa a 40 °C.

A extração do material vegetal foi realizada com 10,0 g \pm 0,05 g de amostra vegetal e 100 mL da mistura de solventes (medida de um sifonamento e meio). As

condições extrativas foram as preconizadas pela Farmacopeia Brasileira IV ^[153] com a ressalva de se realizar três ciclos extratores por minuto. O tempo de extração total empregado nesta técnica foi de 8 h.

Após, os extratos foram concentradas por evaporação em rota-vapor (RV2 Buchi [®]), à temperatura inferior a 60 °C, para preservação dos constituintes extraídos. O resíduo seco foi avaliado calculando-se o rendimento % em massa seca vegetal (liofilizada). Os extratos foram mantidos em frascos âmbar e submetidos a fluxo de nitrogênio para garantir a conservação até o procedimento cromatográfico, sendo armazenados em freezer a – 4 °C.

Os extratos foram filtrados e retomados em clorofórmio na concentração de 1000 µg mL⁻¹ e analisados por GC/MS. Estas soluções foram denominadas de SEASOX. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.4.2 Extrações modernas e tecnológicas

4.2.4.2.1 Extração com ultrassom (USE)

O equipamento de ultrassom (Ultrasonic Cleaner[®], mod. USC-4800), com potência de 120 W, frequência de 40 KHz e intensidade de radiação de 0,27 W cm⁻² foi o utilizado para as extrações ultrassônicas de partes aéreas de três espécies de *Valeriana*. As dimensões do banho de ultrassom usado foram de 24 cm X 14 cm X 10 cm. Utilizaram-se erlemeyers de 250 mL, com boca esmerilhada, conectados a um condensador de ar com 30 cm de altura. A água do banho do equipamento foi mantida, a uma temperatura de 25 °C ± 5 °C, para evitar possível influência desta variável no processo de extração.

O procedimento de extração por ultrassom foi otimizado segundo o descrito por SILVA e colaboradores ^[82] trocando-se o solvente clorofórmio pela mistura extratora etanol:água (70:30 v/v). O parâmetro extra estudado foi o ganho de massa seca empregando-se a variável: tempo de extração (5, 10 e 15 min).

Os extratos foram submetidos à secagem por rota-vapor (T < 60 °C), sendo submetidos a fluxo de nitrogênio antes do armazenamento a – 4 °C. O rendimento de

extração foi calculado em relação à matéria-prima vegetal seca. A análise cromatográfica por GC/MS foi realizada com soluções clorofórmicas preparadas na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo denominadas de SEAUSE. Os procedimentos extrativos foram realizados em triplicata.

4.2.4.2.2 Extração com líquido pressurizado (ASE[®])

De forma geral a técnica de extração PLE usando o equipamento ASE[®] 300TM (Dionex) é constituído de 6 etapas: 1) colocação da célula no forno; 2) preenchimento da célula com solvente; 3) extração estática; 4) *flushing* com solvente novo; 5) purga do solvente do sistema com liberação da pressão residual e 6) esvaziamento da célula. Um esquema geral do equipamento assim como a descrição das principais etapas, pode ser visualizado na **Figura 4.3**.

O processo foi realizado empregando-se o equipamento de extração acelerada com solvente ASE[®] 300TM (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) equipado com células extratoras de aço inoxidável com capacidade de 34 mL, um frasco de lavagem (*rinse*) e frascos coletores (vidro transparente) com capacidade de 250 mL.

A quantidade de amostra de $10,0 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ foi misturada a pérolas de vidro com a finalidade de reduzir o volume do solvente empregado na extração ^[259] em cada célula extratora. Os seguintes fatores de influência sobre a extração foram definidos:

- a proporção da mistura etanol água: 70:30 v/v;
- a temperatura de extração: 80 °C;
- o tempo de extração: 30 min;
- o nº de ciclos de extração: 3;
- a pressão de extração constante: 1500 psi.

Após a extração o conteúdo da célula foi submetido ao processo de lavagem (“*flushing*”) com a mesma quantidade de solvente (100 % do volume de extração da célula), com purga de 60 s usando nitrogênio gasoso. A análise cromatográfica por

GC/MS foi realizada com soluções clorofórmicas preparadas na concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo denominadas de SEAASE. Os procedimentos extrativos foram realizados em triplicata.

4.2.5 Fracionamento dos extratos

4.2.5.1 Cromatografia líquida preparativa (PLC)

O extrato vegetal total de cada procedimento extrativo foi submetido ao fracionamento em coluna cromatográfica preparativa empregando-se como suporte sílica 60 G (Quimex[®]).

Pesaram-se cerca de $1,0 \text{ g} \pm 0,05$ do extrato bruto re-suspendido em metanol e procedeu-se a diluição geométrica em $10,0 \text{ g} \pm 0,05$ de sílica gel 60 G. Esta mistura foi colocada sobre a coluna cromatográfica preparativa (empacotada previamente com sílica gel 60 G) (Figura 4.5). Foram usados 250 mL de cada solvente para o fracionamento dos extratos usando-se o critério de redução de polaridade na seguinte ordem: metanol, acetato de etila e hexano.

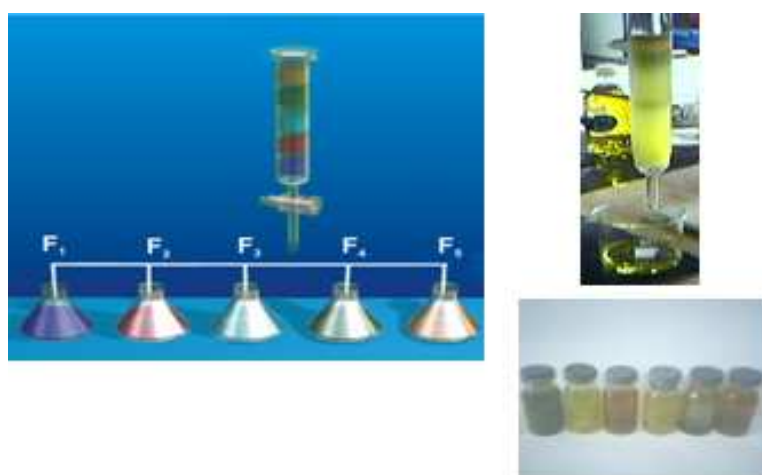


Figura 4.5: Esquema do fracionamento dos extratos das partes aéreas de *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis* (SILVA, 2008).

As frações obtidas foram evaporadas a uma temperatura inferior a 40 °C sendo submetidas a um fluxo de nitrogênio e conservadas a temperatura de 4 °C a 8 °C até a preparação das Soluções Extrativas Analíticas Fracionadas (SEAFR).

Estas soluções foram preparadas por dissolução do resíduo seco em clorofórmio (1000 µg mL⁻¹). Todas as SEAFR foram filtradas pela passagem por membrana hidrofóbica com 0,22 µm de diâmetro nominal de poro e 13 mm de diâmetro (MHB22P) a fim de evitar particulados no sistema cromatográfico.

4.2.6 Análise dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD)

A partir do fracionamento anterior, as frações obtidas provenientes do USE foram cromatografadas por CCD. O extrato bruto total também foi cromatografado contra as frações obtidas de acordo com o **item 4.2.5.1**.

A detecção dos constituintes separados foi realizada com o auxílio de uma lâmpada (UVGL-58 Mineral Light[®]) UV-Vis (254 nm e 365 nm) e posteriormente foram reveladas com o agente cromogênico Folin, que possui afinidade por compostos fenólicos, o que pode vir a ser o indicativo da presença de compostos do tipo flavonoides ou de precursores de biossíntese. Ressalta-se que o método analítico de eleição para flavonoides é a HLPC devido às interações químicas e o alto peso molecular, entretanto, neste trabalho optou-se pela GC/MS que teve por objetivo detectar voláteis presentes nas frações obtidas com os extratos USE das espécies em investigação. Desta forma, a caracterização por CCD foi adotada como critério preliminar de seleção das amostras a serem analisadas por GC/MS. O eluente usado na CCD foi uma mistura hexano/éter etílico na proporção 80:20 v/v.

4.2.7 Análise dos extratos por cromatografia gasosa (GC/MS)

Os extratos brutos obtidos foram analisados via GC/MS no modo SCAN (varredura de espectro total) que propiciou a qualificação de todas SEAs. A identificação dos compostos foi realizada com base na coinjeção de padrões, comparação com os espectros de massas e com dados de literatura. As condições cromatográficas empregadas nestas análises estão descritas na **Tabela 4.VI**.

Tabela 4.VI: Parâmetros e condições cromatográficas utilizadas na análise dos extratos por GC/MS.

Equipamento GC-MS: (SHIMADZU MODELO QP-5050 A)	
Coluna: OV5, 30 m; 0,25 mm de diâmetro; 0,25 µm de espessura de fase.	
Temperatura do forno: 100 °C – 280 °C (7 °C min ⁻¹)	
Temperatura do injetor e interface: 290 °C	
Volume injetado: 0,5 µL, modo de injeção: Split 1:10	
Gás de arraste: He (1 mL min ⁻¹)	
Modo de operação: SCAN	MS: 41 a 550

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Identificação e caracterização da matéria-prima vegetal

O material vegetal foi identificado como proveniente das espécies *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis*. Posteriormente, os vegetais foram submetidos aos processos de liofilização e moagem conforme descrito no **Capítulo 2**, sendo classificados como pó fino. Estes foram transferidos para frascos âmbar e conservados em temperatura em torno de - 20 °C até os processos extrativos.

4.3.2 Critérios de seleção do material vegetal

A matéria-prima vegetal foi selecionada segundo os critérios de similaridade química demonstrados pela análise estatística (Ward e PCA) relacionada aos compostos voláteis e aos estudos de Silva ^[82] que constataram a presença de valepotriatos nas três espécies: *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis*.

Logo após a estabilização do material vegetal, através da operação unitária de liofilização, as partes aéreas foram submetidas a quatro diferentes métodos de extração: maceração dinâmica (EMAC), Soxhlet (ESOX), ultrassom (USE) e extração acelerada por solventes (ASE – do inglês: “Accelerated Solvent Extraction”). Os métodos EMAC e ESOX foram capazes de produzir extratos com resíduo seco suficiente para o preparo das SEAEMAC e SEASOX na concentração de 1000 µg mL⁻¹.

O método de ultrassom (USE) foi realizado passando por testes preliminares relacionados ao tempo de exposição da matéria-prima vegetal e o solvente para obtenção de quantidade viável de resíduo seco.

Fixou-se a proporção droga/solvente e variou-se o tempo de selecionando-se 15 min como tempo de extração, pois foi o que viabilizou o preparo das triplicatas de preparação das SEASUSE (Soluções Extrativas Analíticas obtidas por Ultrassom).

As amostras obtidas pelos quatro métodos extrativos foram concentradas em evaporador rotatório (rota-vapor), submetidas a um fluxo de nitrogênio e conservadas a -4°C antes da preparação das SEAs.

Todas as SEAs foram filtradas através da passagem por membrana hidrofóbica com $0,22\ \mu\text{m}$ de diâmetro nominal de poro e $13\ \text{mm}\ \varnothing$ (MHB22P) a fim de evitar particulados para o sistema cromatográfico.

4.3.3 Rendimento de extração – resíduo seco

O estudo sobre o rendimento percentual em resíduo seco foi utilizado para selecionar o método de extração a ser adotado na preparação de extratos que foram submetidos ao fracionamento. Essas frações foram caracterizadas através da cromatografia em camada delgada (CCD). Testaram-se vários eluentes (clorofórmio:metanol 100:0,5 v/v; BAW 80:6:2 v/v; n-hexano: éter etílico [95:5; 90:10; 80:20...]) selecionando-se o eluente n-hexano: éter etílico na proporção 80:20 v/v com a de melhor separação e resolução para os três extratos de *Valeriana*. O agente cromogênico selecionado foi o Reagente de Folan.

A **Tabela 4.VII** descreve de forma geral o primeiro estudo de rendimento em massa seca (g % m/m) para as três espécies de *Valeriana*. Foram aplicados os testes estatísticos para verificação da diferença entre os percentuais de resíduos secos obtidos por cada método de extração através da Anova, descrita na **Tabela 4.VIII**.

Tabela 4.VII: Rendimento em percentual de massa seca para espécies de *Valeriana*.

Espécies estudadas (partes aéreas)	Rendimento (%m/m)		X±S (CV %); (n=3)	
	EMAC	SOX	USE	ASE
<i>V. chamaedryfolia</i>	6,43 ± 0,18 (0,28)	5,53 ± 0,15 (0,27)	10,92 ± 0,17 (0,16)	2,23 ± 0,04 (0,18)
<i>V. glechomifolia</i>	8,51 ± 0,07 (0,08)	6,83 ± 0,38 (0,56)	12,47 ± 0,05 (0,16)	5,09 ± 0,18 (0,35)
<i>V. tajuensis</i>	10,82 ± 0,28 (0,26)	5,25 ± 0,35 (0,67)	14,02 ± 0,09 (0,06)	4,98 ± 0,23 (0,46)

x = média; S = desvio padrão; CV (%) = coeficiente de variação percentual.

Tabela 4.VIII: Diferença entre médias dos tratamentos extrativos aplicados às espécies de *Valeriana*, segundo a ANOVA ^[169].

Espécie	Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F_{calc}	valor-P	F_{crit}
<i>V. chamaedryfolia</i>	Entre grupos	115,097	3	38,363	11684,021	6,67E-15	4,066
	Dentro dos grupos	0,026	8	0,003			
	Total	115,114	11				
<i>V. glechomifolia</i>	Entre grupos	88,482	3	29,493	197,425	7,72E-08	4,066
	Dentro dos grupos	1,195	8	0,149			
	Total	89,677	11				
<i>V. tajuensis</i>	Entre grupos	361,898	3	120,633	538,723	1,45E-09	4,066
	Dentro dos grupos	1,791	8	0,224			
	Total	363,689	11				

SQ: soma dos quadrados; gl: graus de liberdade; MQ: mínimo quadrado; P: Probabilidade; F_{calc} : calculado; F_{crit} : crítico.

Como os valores de F_{calc} são maiores do que F_{crit} para as três espécies vegetais, estatisticamente comprova-se que há diferenças entre os rendimentos em resíduos secos obtidos para os quatro métodos de extração. Além disto, as espécies vegetais apresentaram F_{calc} diferenciados, o que estatisticamente mostra a influência dos métodos de extração propostos sobre a matriz vegetal.

A granulometria média do material vegetal foi à mesma para as três espécies vegetais. A espécie que apresentou a maior variabilidade foi a matriz vegetal *V. chamaedryfolia*, seguida de *V. tajuensis* e depois por *V. glechomifolia*. Estes resultados são indicativos de que o material vegetal influencia de forma decisiva os resultados extrativos.

Os resultados demonstraram que o ultrassom (USE) foi o método que produziu a maior quantidade, seguindo-se da maceração dinâmica (EMAC), Soxhlet (ESOX) e da extração acelerada por solvente (ASE) para as três espécies vegetais submetidas à extração.

A literatura relata as vantagens do uso da USE sobre a maceração para extração clorofórmica de valepotriatos ^[75], extração hidroalcoólica de polissacarídeos ^[244] e para extração de valepotriatos e óleos voláteis ^[245] de espécies de *Valeriana*.

Os resultados apresentados na literatura sugerem o melhor desempenho da ultrassonicação sobre a maceração convencional sempre comparando a relação do resíduo seco e a massa seca. A justificativa relatada pelos autores é devida ao ataque efetivo à integridade das paredes celulares, pelos efeitos de pronunciados de cavitação, os quais não ocorrem com as outras técnicas extrativas.

4.3.4 Análise cromatográfica (GC/MS) dos extratos brutos

As SEAS obtidas pelos quatro modos de extração: EMAC, SOX, ASE e USE, foram preparadas em clorofórmio na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo analisadas por cromatografia gasosa (GC/MS), conforme as **Figuras 4.6 a 4.8**.

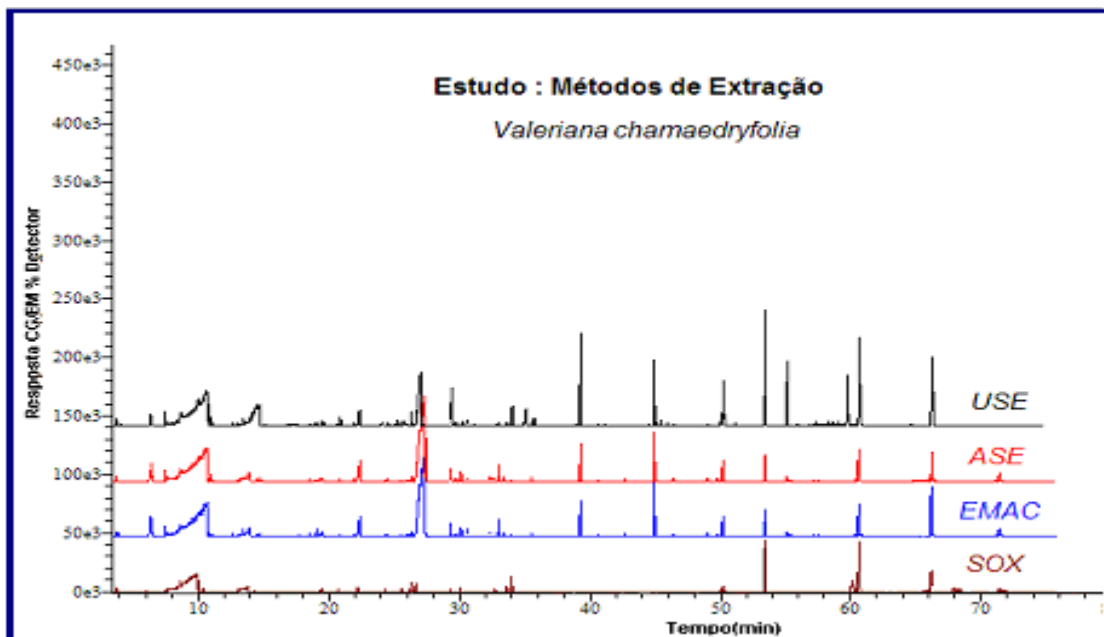


Figura 4.6: Cromatogramas (GC/MS) dos extratos brutos de *V. chamaedryfolia* originados de quatro formas diferentes de extração. Condições cromatográficas descritas na Tabela 4.VI.

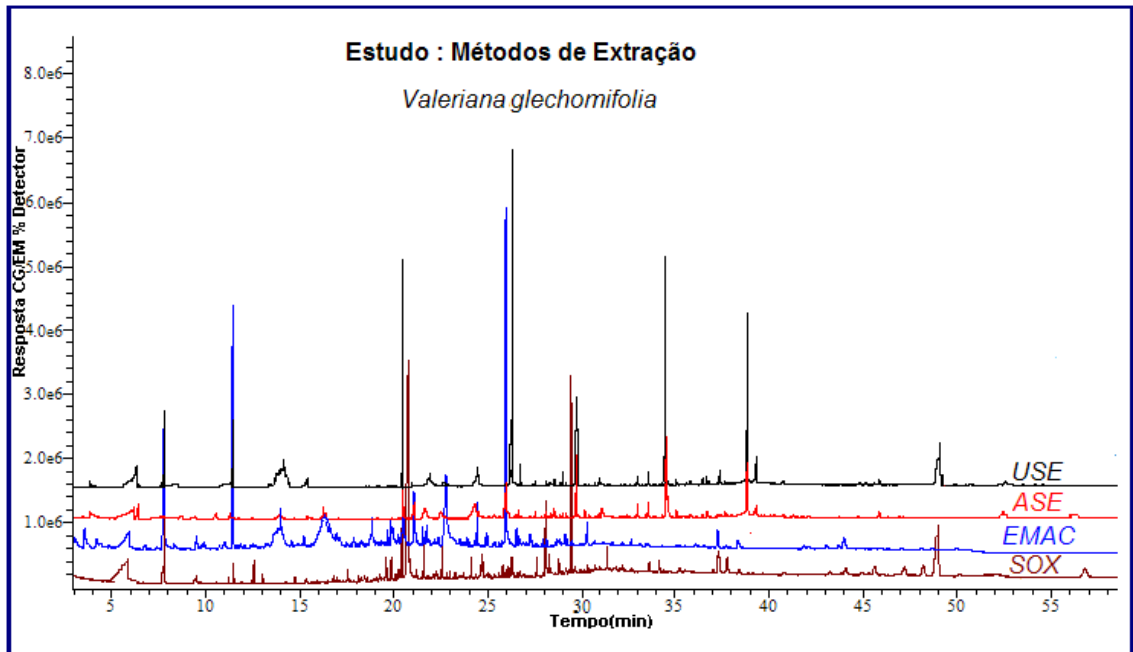


Figura 4.7: Cromatogramas (GC/MS) dos extratos brutos de *V. glechomifolia* originados de quatro formas diferentes de extração. Condições cromatográficas descritas na **Tabela 4.VI**.

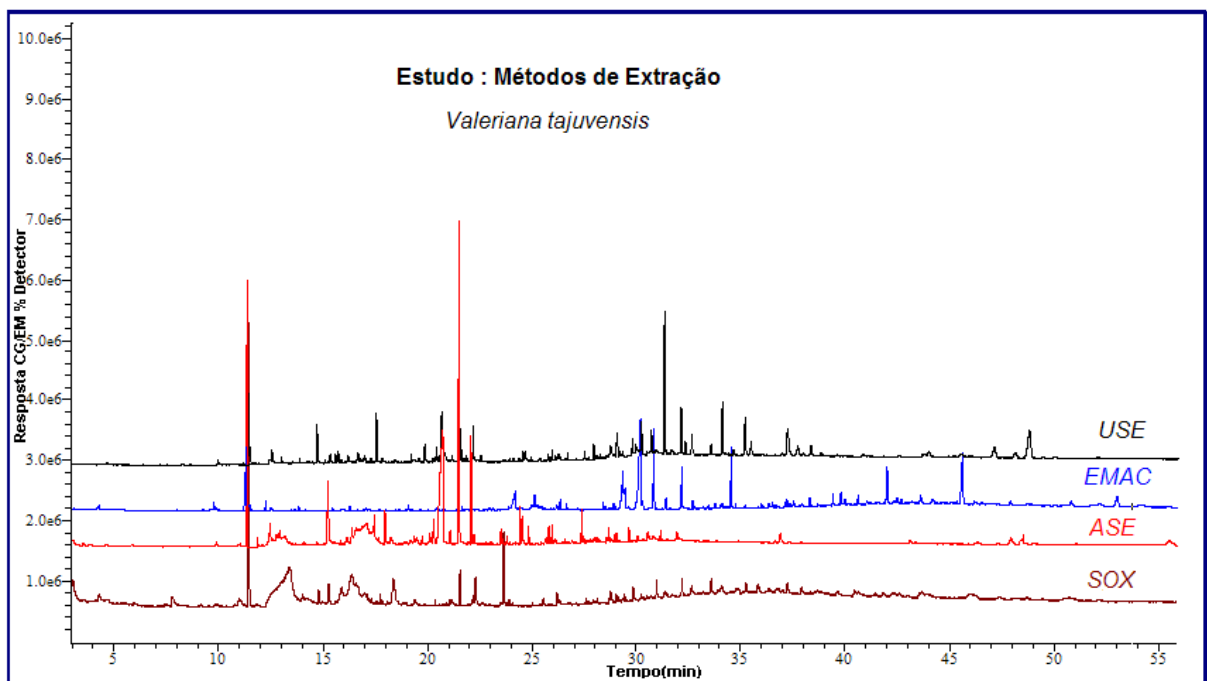


Figura 4.8: Cromatogramas (GC/MS) dos extratos brutos de *V. tajuensis* originados de quatro formas diferentes de extração. Condições cromatográficas descritas na **Tabela 4.VI**.

Os compostos qualitativamente identificados por espectrometria de massas e contra padrões estão relacionados na **Tabela 4.VIII**.

Tabela 4.VIII: Compostos identificados nos extratos de espécies de *Valeriana* nos extratos totais obtidos por USE.

Nº	Nome do composto	<i>V. chamaedryfolia</i>	<i>V. glechomifolia</i>	<i>V. tajuensis</i>
1	Ácido isovalérico	+	+	+
2	Ácido 3 –metil valérico	+	+	+
3	Ácido pentanoico	+	+	+
4	Limoneno	+	+	+
5	Acetofenona	+	+	
6	L-prolina			+
7	Benzocatequina	+		+
8	Cumarina	+	+	+
9	Neral	+		
10	Isoeugenol		+	+
11	Xantosina			+
12	Octadecano			+
13	Nondecano		+	
14	Ácido undecanoico			+
15	Epóxido de Aromadendreno			+
16	Miristaldeído			+
17	Germacreno B			+
18	Espatulenol			+
19	Globulol		+	+
20	Tetradecanoato de metila	+		+
21	Ácido mirístico (C14:0)	+		+
22	Guaiol	+		+
23	Ester metil hexanoico	+	+	+
24	Ácido palmítico (C16:0)	+	+	+
25	N,N-dimetilpalmitamida		+	+
26	Coniferol	+	+	
27	Longiborneol	+		+
28	Baldrinal	+	+	+
29	Linoleato de α -glicerila	+		+
30	Octadecanoato metila	+	+	+
31	Ácido oleico (C18:1)			+
32	Oleamida		+	+
33	Di-O-glicosideo flavona	+		+
34	2-benzoil Guaiazuleno			+
35	β -copaen-4 . α -ol		+	+
36	Octadecadienoato de metila (9,12)	+		+
37	Octadecatrienoato de metila	+	+	+
38	Oxo octadecanoatp de metila	+	+	+
39	Òxido de (-)-cariofileno		+	+
40	Tetracosanoato de metila	+		
41	Ácido tetracosanoico	+	+	
42	Octadecadienoato de metila (8.11)	+	+	+
43	Octadecadienoato de etila (8.11)		+	+
44	AHD-valtrato	+	+	+
45	Fitol	+	+	+
46	Hidroxifarnesilacetona	+	+	+
47	Esqualeno	+	+	+
48	Vitamima E (α -tocoferol)	+		+
49	Estigmasterol	+	+	+

+: presença em abundância superior a 85 % pelo GC/MS.

A **Figura 4.9** mostra os picos cromatográficos identificados por espectrometria de massas e pela literatura. Estes picos cromatográficos foram numerados de acordo com a **Tabela VIII**. Percebe-se que há vários compostos com tempo de retenção coincidentes. Por outro lado, a espécie mais rica nestes compostos parece ser *V. tajuensis*, seguida de *V. glechomifolia* e *V. chamaedryfolia*.

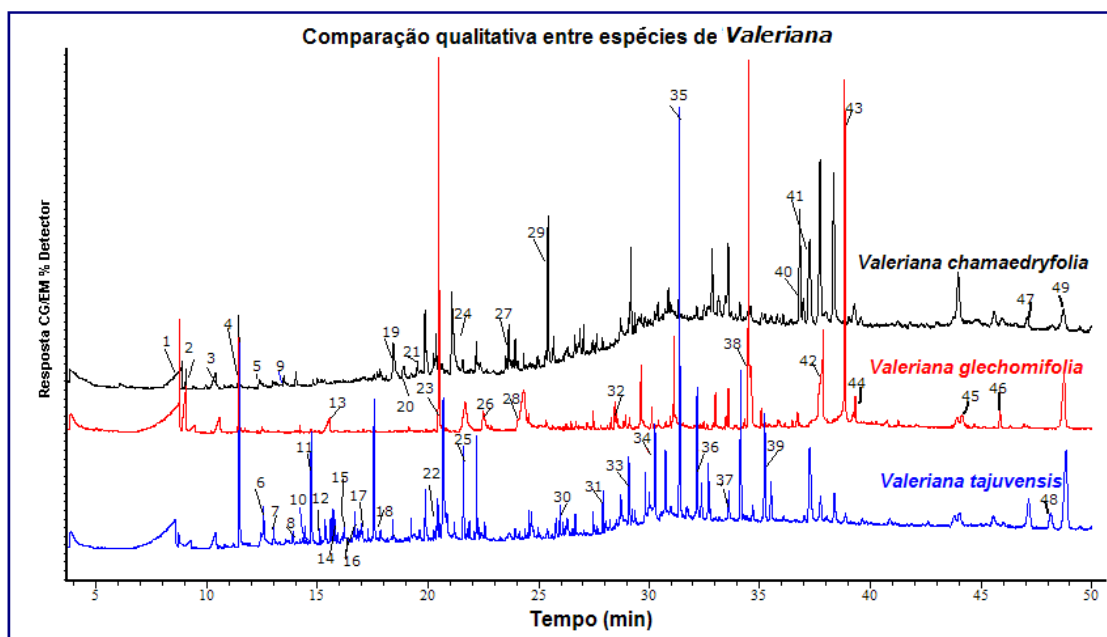


Figura 4.9: Cromatogramas (GC/MS) dos extratos brutos de *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis* originados do modo de extração ultrassônico. Condições cromatográficas descritas na **Tabela 4.VI**.

Os perfis dos compostos extraídos por ESOX, EMAC, USEM e ASE apresentaram certa similaridade. Os extratos que cromatograficamente apresentaram a maior variabilidade de compostos foram os provenientes de USE, sendo coincidente com o método que apresentou os maiores rendimentos percentuais em resíduo seco, um indicativo de que há uma relação entre variabilidade de constituintes e percentual em massa seca [21; 155]. A identificação de parte destes compostos foi realizada com base na co-injeção de padrões. Adicionalmente foi adotado o método da comparação dos espectros de massas e dos tempos de retenção para a elucidação da identidade dos compostos do extrato. Os demais compostos foram identificados por comparação com os espectros de massas da biblioteca Wiley do próprio equipamento. Foram considerados tentativamente identificados os picos quando as probabilidades de semelhança do espectro de massa foram superiores a 85 %.

Relata-se a presença marcante do ácido isovalérico (pico nº 1) que tem aparecido em maior ou menor quantidade desde a hidroddestilação no **Capítulo 2** como na SFE para a espécie *V. tajuvensis* podendo ser considerado um dos compostos com propriedades que detêm quimiomarcadoras para as espécies brasileiras de *Valeriana*.

A identificação da presença de baldrinal e AHD-valtrato, mesmo não sendo o método de eleição para sua caracterização, é um indício de que a espécies estudadas por Silva, Salles e colaboradores [75;76;82;83], mantém a capacidade de acumular valepotriatos que tem ação declarada sobre o SNC [4;33;82;83] além disto a técnica cromatográfica é capaz de identificá-los. Como o solvente de eleição para extração dos valepotriatos é o clorofórmio ou o diclorometano, os resultados apresentados aqui podem ser comparados qualitativamente. Entretanto, há possibilidade de otimização da técnica para que a mesma seja capaz de quantificar ao mesmo tempo os óleos voláteis e os valepotriatos em uma única análise cromatográfica.

Importante relatar que houve a detecção de três outras famílias de compostos, que possuem atividade farmacológica diferenciada dos valepotriatos e óleos voláteis [4;20], que tradicionalmente são analisadas por meio de HPLC: catequinas, cumarinas e flavonas. Mesmo que já relatado em literatura especializada [257; 258], o fato da técnica por GC/MS ser capaz de separar e detectar tais compostos é de suma importância na economia do tempo, materiais e analistas, além de ser uma alternativa para os locais que não possuem as sua disposição os dois equipamentos.

Os ésteres graxos (ésteres de ácidos carboxílicos de cadeias longas) formam uma das principais classes na composição das ceras epicuticulares. Essa classe é composta, principalmente, por derivados do ácido mirístico (C14), ácido palmítico (C16) e ácido oléico (C18:1). Também é evidente, em concentrações significativas, a presença de ésteres metílicos e etílicos de alto peso molecular, assim como dos respectivos ácidos. Estes compostos foram detectados assim como a presença de alcanos lineares, tanto nos hidroddestilados estudados no **Capítulo 2**, como nos extratos SFE de *V. tajuvensis* no **Capítulo 3** e novamente estão em destaque nos extratos hidro-alcóolicos por USE, o que demonstra é um forte indicativo para que os

extratos provenientes das espécies estudadas devam ser tratados previamente com algum tipo de processo de concentração e “clean up” para estes extratos.

Outro achado relevante foi constatação da presença de vitamina E e de estigmasterol nos extratos hidroalcolócos, confirmando os resultados descritos no **Capítulo 3** para os extratos de *V. tajuensis*. A vitamina E é declaradamente um agente antioxidante empregado na conservação de alimentos e de alguns nutracêuticos. Sua identificação e futura quantificação serão úteis para a agregação de valor ao extrato vegetal. Outra aplicação para a sua identificação e quantificação será na qualificação e padronização do *preparado fitoterápico intermediário*, principal alvo deste estudo. Além disto, os fitoesteróis ^[261] têm sido estudados como composto ativo na prevenção contra o câncer, portanto as três espécies estudadas poderão apresentar atividade inibidora contra o crescimento tumoral.

4.3.5 Fracionamento por PLC e CCD

Na **Tabela 4.IX** estão descritos os rendimentos das frações obtidas por PLC dos extratos brutos quando correlacionados a cada espécie de *Valeriana* em estudo.

Tabela 4.IX: Rendimentos dos extratos obtidos por cromatografia líquida em coluna preparativa das espécies de *Valeriana*.

Fração	Mistura/Eluente	Rendimento (% m/m)		
		<i>V. chamaedryfolia</i>	<i>V. glechomifolia</i>	<i>V. tajuensis</i>
1	Metanol	6,81	5,38	2,98
2	Metanol: Acetato de etila (50:50 v/v)	13,74	24,36	17,35
3	Acetato de etila	29,14	38,25	23,01
4	Acetato de etila: n-hexano (50:50 v/v)	19,81	20,54	31,27
5	n-hexano	30,5	11,47	25,39

A cromatografia líquida preparativa (PLC) de cada extrato bruto obtido por USE, gerou de 5 frações que foram submetidas à CCD e os perfis cromatográficos encontrados por CCD estão apresentados na **Figuras 4.10**, enquanto os perfis cromatográficos por GC/MS estão nas **Figuras 4.11 a 4.13**.

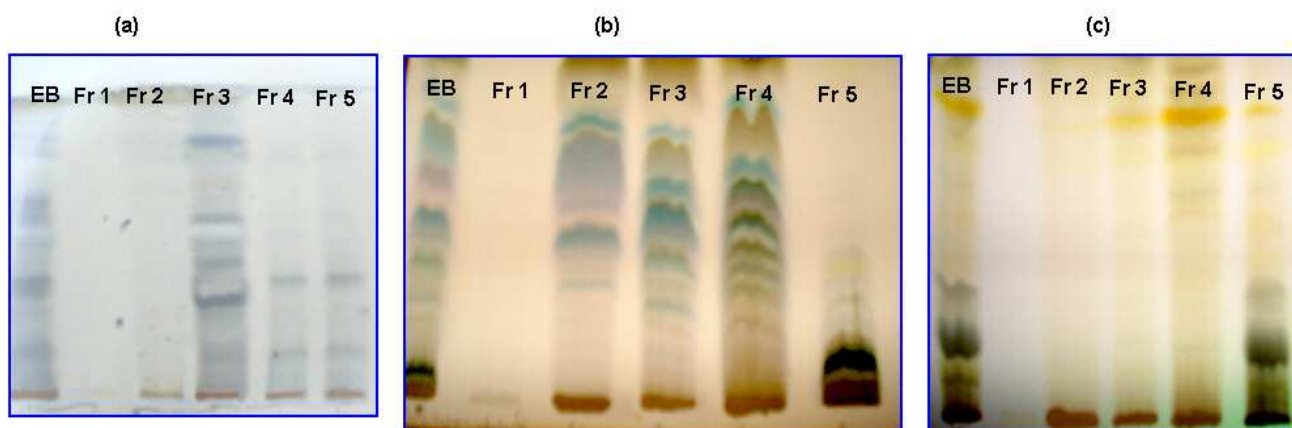


Figura 4.10: Perfil cromatográfico obtido por CCD (eluente hexano:éter etílico 80:20 v/v) das frações obtidas por PLC do extrato ultrassônico de *V. chamaedryfolia* (a), *V. glechomifolia* (b) e *V. tajuensis* (c) EB: extrato bruto hidroalcolóico USE. Fr: Frações por gradiente de polaridade.

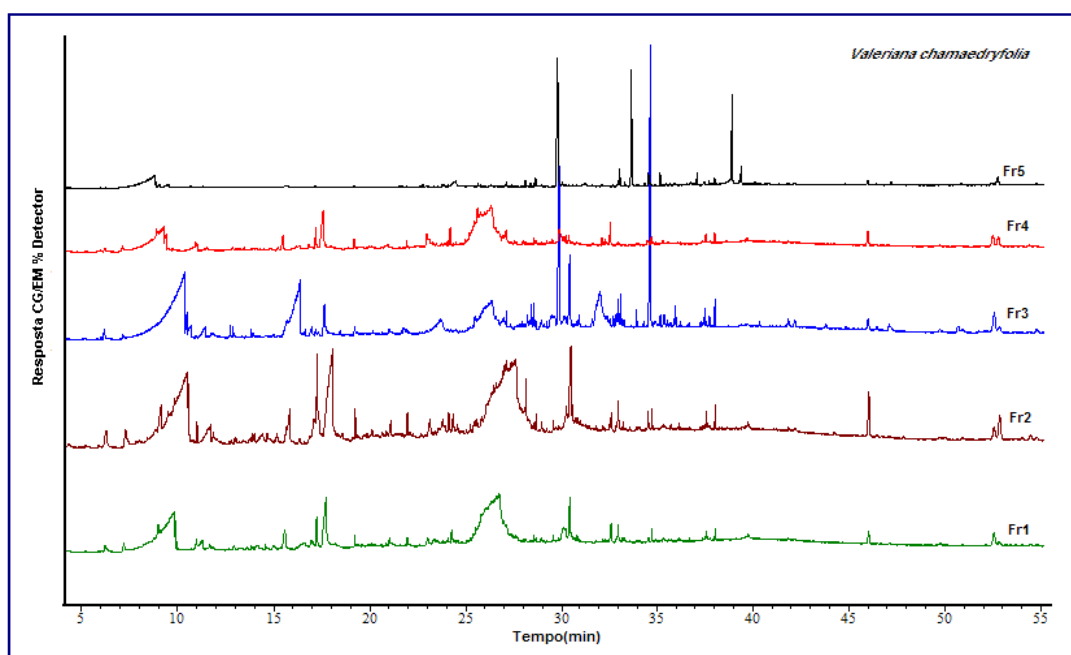


Figura 4.11: Cromatogramas (GC/MS) das frações obtidas por PLC a partir do extrato ultrassônico de *V. chamaedryfolia*. Condições cromatográficas descritas na **Tabela 4.VI**.

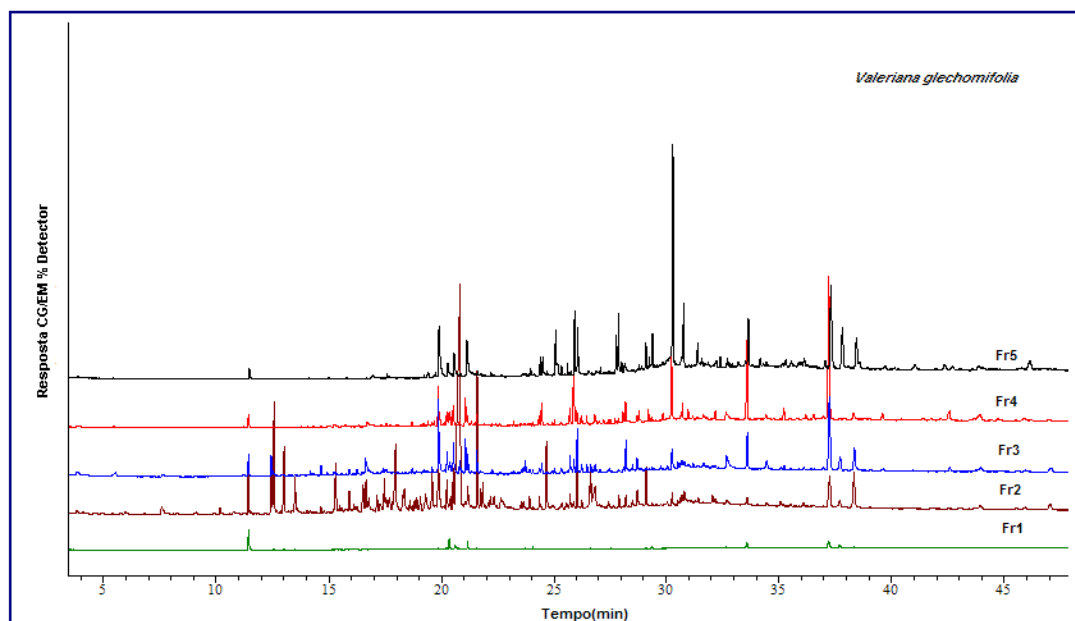


Figura 4.12: Cromatogramas (GC/MS) das frações obtidas por PLC a partir do extrato ultrassônico de *V. glechomifolia*. Condições cromatográficas descritas na **Tabela 4.VI**.

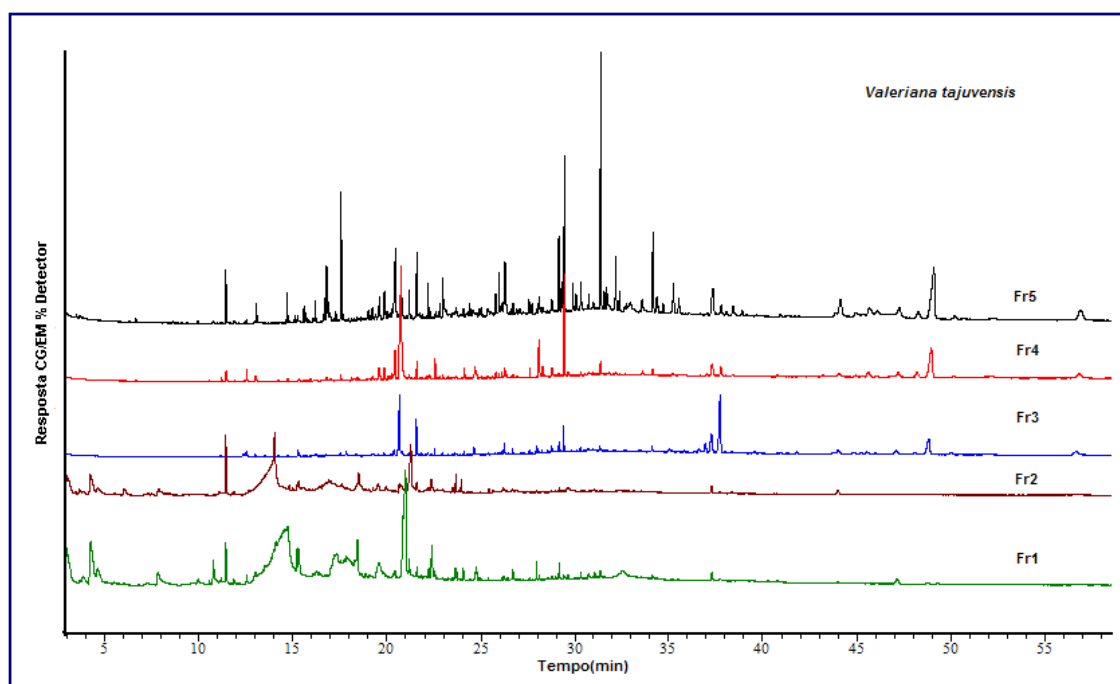
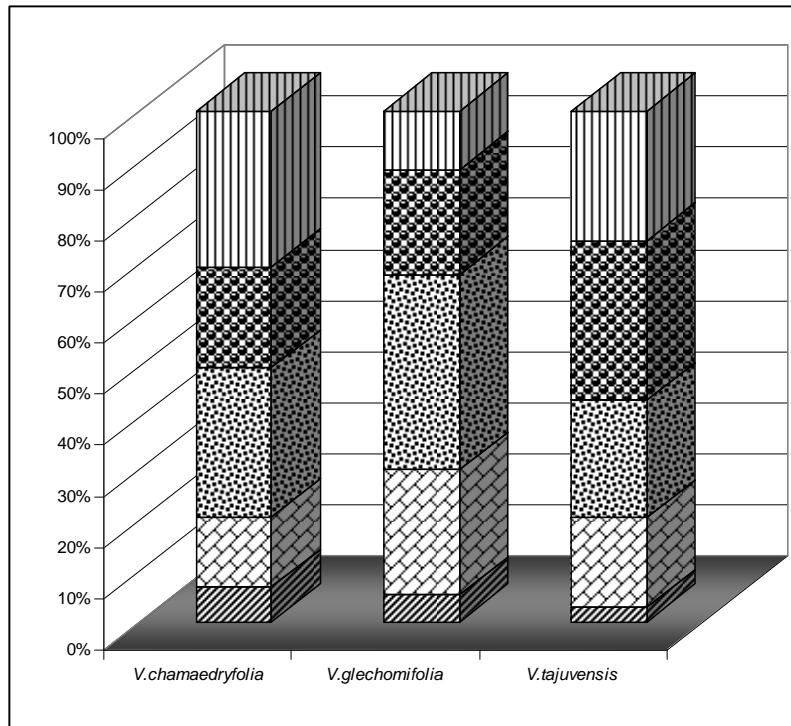


Figura 4.13: Cromatogramas (GC/MS) das frações obtidas por PLC a partir do extrato ultrassônico de *V. tajuensis*. Condições cromatográficas descritas na **Tabela 4.VI**.

Através destes resultados pode-se inferir que a espécie *V. chamaedryfolia* é a que apresenta maior quantidade de compostos apolares extraíveis, prováveis hidrocarbonetos e ácidos graxos e ésteres de cadeia longa, devido ao maior rendimento obtido para a Fr5, eluída com hexano.

O gráfico apresentado na **Figura 4.14** mostra o comportamento em relação ao rendimento obtido para cada fração.








Metanol  Metanol:Acetato de etila 50:50 v/v  Acetato de etila 
 Acetato de etila:n-Hexano 50:50 v/v  n-Hexano 

Figura 4.14: Distribuição das frações obtidas para as três espécies de *Valeriana* em estudo, por cromatografia líquida preparativa (PLC).

A fração de perfil mais complexo foi àquela obtida com o solvente acetato de etila que corresponde a 29,14 % da massa total do extrato bruto. As presenças de polissacarídeos foram confirmadas na Fr3 no $Tr_{\text{médio}}$ 26 min. Esse pico cromatográfico teve sua resolução prejudicada, pois a coluna OV-5 não é a mais adequada para análise de compostos polares ^[169]. Dois outros picos majoritários o nº 23 e o nº 38 correspondem a ésteres metílicos de ácido graxos provavelmente constituintes de cutícula foliar já que as amostras não foram derivatizadas.

Dois frações Fr2 e a Fr5 foram as mais abundantes e enriquecidas em compostos para *V. glechomifolia*. A Fr2 apresentou um perfil cromatográfico do tipo polar e de média polariidade apresentando compostos do tipo monoterpenos e sesquiterpenos, além de ésteres e ácidos de graxos de cadeia longa. O ácido

valerênico foi caracterizado, apresentando-se nesta fração em baixas concentrações. A Fr5 apresentou perfil de média polaridade a apolar ressaltando-se as presenças de ésteres metílicos e etílicos de cadeia longa, além de ácidos e alcanos lineares de cadeia longa.

V. *tajuvensis* foi a espécie que mostrou a maior influência dos solventes em relação ao fracionamento, tendo a maior parte dos compostos extraídos na fração hexânica (Fr5) rica em ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos de cadeia longa e alcanos lineares de cadeia longa, contendo o maior número destes compostos. A partir da Fr2 também foram evidenciadas as presenças de polissacarídeos e do ácido isovalérico.

A presença de vitamina E, estigmasterol nas três espécies analisadas foi evidenciada nas frações com características apolares e nas frações de média polaridade. As evidências de sua presença desapareceram por completo nas frações polares metanólicas. Este fato denota a influência da matriz complexa (ésteres metílicos e etílicos de cadeia longa, alcanos lineares de cadeia longa) proveniente das partes aéreas das três espécies analisadas comprovando as interações químicas existente entre os analitos e a matriz complexa vegetal.

4.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

- Os procedimentos de padronização da matéria-prima vegetal: secagem (liofilização), índices de umidade (perda por dessecação), aferição de granulométrica, conservação da matéria-prima vegetal e dos extratos vegetais sob refrigeração, além dos estudos sobre as variáveis de extração como temperatura e tempo de extração para os métodos modernos foram fundamentais para viabilizar todos os processos extrativos e, com isto, obter resíduos secos enriquecidos com compostos cromatografáveis por GC/MS e com possíveis empregos farmacêuticos;
- Os métodos de extração EMAC, ESOX, ASE e USE foram capazes de extrair resíduos secos em quantidade suficiente para serem analisados cromatograficamente;

- As condições cromatográficas propostas foram adequadas para a separação e a detecção dos compostos voláteis e semivoláteis provenientes dos quatro métodos de extração EMAC, ESOX, ASE e USE;
- Os extratos obtidos por USE demonstraram a maior diversidade de compostos e maiores percentuais de resíduos secos provenientes das três matérias-primas vegetais;
- O perfil cromatográfico dos extratos hidroalcoólicos obtidos pelos métodos EMAC, ESOX, ASE e USE demonstraram-se complexos, apresentando várias classes de metabólitos primários e secundários possíveis de serem localizados em sistemas vegetais de acumulação;
- Após análise cromatográfica por GC/MS foram identificados nos extratos brutos das três espécies de *Valeriana* 49 compostos com abundância maior que 85 %.
- A mistura etanol:água (70:30 v/v) mostrou-se capaz e adequada para extrair compostos de diferentes pesos moleculares e diferentes polaridades, entretanto, sem demonstrar seletividade por alguma classe de compostos;
- O método USE foi capaz de extrair estruturas químicas como as apresentadas iridoides não glicosilados AHD-valtrato e o por seu produto de decomposição, o baldrinal;
- O USE foi capaz de extrair monoterpenos, limoneno e acetofenona, assim como sesquiterpenos: longiborneol, coniferol, espatulenol, globulol e óxido de cariofileno;
- Houve a detecção de compostos catequínicos e da flavona glicosilada;
- Foi evidenciada a presença de compostos com características de cumarinas.
- Segundo a literatura presença de palmitamida e oleamida indica que os extratos obtidos por USE possam ter atividade sobre o SNC, sem que estejam presentes as classes de compostos óleos voláteis ou valepotriatos;
- O fracionamento dos três extratos brutos permitiu a melhor separação e visualização cromatográfica dos compostos proporcionando para

V. chamedryfolia o “clean-up” para compostos polares, e para a *V. glechomifolia*, a separação de duas frações enriquecidas uma apolar e outra polar, assim como ocorreu com *V. tajuvensis*;

- As frações das três espécies vegetais viabilizaram a melhor separação dos compostos, o que pode permitir a posterior quantificação, tanto dos compostos da matriz complexa, como dos alvos com possível atividade farmacológica;
- A presença de esqualeno e estigmasterol (fitosterol) é indicativo que a via acetil CoA-piruvato está ativada nas três espécies em estudo, indicando que estes extratos podem ser testados com a finalidade de provocar a apoptose de tumores malignos;
- A vitamina E nos extratos provenientes das três espécies vegetais foi evidenciada e confirmada indicando a ativação da via biossintética de formação de terpenoides;
- A técnica cromatográfica gasosa foi capaz de separar boa parte dos constituintes dos extratos e o detector MS mostraram boa sensibilidade para compostos em baixa concentração fornecendo dados elucidativos para discernimento várias classes de compostos incluindo polissacarídeos, aminoácidos, monoterpenos e sesquiterpenos, passando por precursores de flavonoides e cumarinas, os compostos do tipo iridoides não glicosilados (valepotriatos e produtos de degradação - baldrinal), chegando à detecção de compostos provenientes da formação das cutículas foliares das três espécies em estudo.

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 DISCUSÃO GERAL

As preparações de plantas do gênero *Valeriana* foram aprovadas pela *German Commission E* como calmante e como promotor do sono ^[38] sendo recomendada a administração de várias vezes ao dia na forma de infusão preparada com 2 a 3 g de raízes e rizomas secos ou través de quantidades equivalentes de tintura ou extrato. Nestas preparações devem ser usadas preferencialmente plantas frescas ou recém coletadas ou estas cuidadosamente secas em temperaturas inferiores a 40 °C, pois os princípios ativos descritos apresentam estruturas químicas instáveis. A variabilidade da composição dos extratos pode ser afetada pelas condições de crescimento, coleta, secagem e processamento, etapas fundamentais para a manutenção de teores e da qualidade dos metabólitos secundários ^[38;112].

Valeriana officinalis que detém ação sob o SNC, além de outras atividades farmacológicas relatadas em literatura ^[36;38;43-45] está sob vasta investigação química, farmacológica e toxicológica desde os anos 60. Os estudos para revelar a identidade da(s) substância(s) responsável pela ação farmacológica ainda são propostos, pois há muitas controvérsias sobre este tema. Vários autores propuseram que os valepotriatos e os óleos voláteis seriam os responsáveis diretos sobre os efeitos relacionados à ansiedade e a indução do sono ^[41;77;82;83;136-140].

Valeriana é comercializada sob a forma medicamentos licenciados pela MS-ANVISA, entre estes Valeriane[®] e Valmane[®] ou ainda em associação com *Passiflora* sp ^[33;36], preferindo-se o uso destes medicamentos fitoterápicos em relação ao uso da droga vegetal. Tal fato é relevante porque o cultivo e o processo de fabricação são padronizados, implantando-se métodos de controle de qualidade que garantem a qualidade e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica. Muitos métodos de investigação foram propostos tanto para o doseamento de valepotriatos como para óleos voláteis, entretanto, a forma de extração permanece praticamente a farmacopeica ou a atual metodologia de extração por ultrassom ^[82].

Os métodos cromatográficos empregados no desenvolvimento deste trabalho permitiram a qualificação e a quantificação de óleos voláteis de sete espécies de *Valeriana* brasileiras, nativas do Estado do Rio Grande do Sul, sendo estudadas as composições químicas dos compostos voláteis de *V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana*,

V. eupatoria, *V. glechomifolia*, *V. salicarifolia*, *V. scandens* e *V. tajuensis*. O processo de estabilização vegetal foi estabelecido assim como as condições de extração por aparelho de Clevenger modificado, através da seleção de parâmetros analíticos e da cromatografia a gás com detector de ionização de chama (GC/FID) e o detector de espectrometria de massas (GC/MS). Os compostos foram tentativamente identificados por co-injeção de alguns padrões, por comparação com os espectros de massas, índices de retenção e dados de literatura o que permitiu a identificação de 243 compostos. Três espécies de *Valeriana* tiveram mais de 92 % dos compostos identificados, duas outras espécies com 86 % e duas espécies restantes apresentaram índices mais baixos. Compostos químicos marcadores da atividade farmacológica foram identificados em baixa concentração em seis espécies, exceção do óleo volátil de *V. eichleriana*. Os resultados foram comparados com os dados apresentados para *V. officinalis* L. A análise hierárquica de agrupamentos de constituintes permitiu a separação em dois grupos pela correlação do conjunto de variáveis multivariadas. A análise de componentes principais (PCA) selecionou os compostos que contribuíram significativamente para o agrupamento ou dispersão de espécies de *Valeriana*.

Desta forma foram aplicados diferentes métodos extrativos para serem estudados no decorrer do **Capítulo 3** e **Capítulo 4** visando um estudo minucioso das influências de diferentes métodos sobre a qualidade e quantidade de compostos orgânicos retirados da matéria-prima vegetal que demonstrasse similaridade química com a espécie referência *V. officinalis* para a fabricação de fitoterápicos, com a finalidade de estudar sua possível substituição por uma espécie nacional adaptada às condições edáficas do Estado do Rio Grande do Sul.

A técnica de SFE foi estudada para partes aéreas (talos e folhas) de *V. tajuensis* no **Capítulo 3** através da ação de dois solventes extratores CO₂ e propano, em condições supercríticas, com diferentes condições de T e P, visando localizar o farmacógeno.

A estabilização do material vegetal e a classificação granulométrica permitiram a realização de testes estatísticos de comparação. Houve a possibilidade da eleição de condições extrativas tanto para o fluido CO₂ como para o propano.

Os resultados foram confrontados com os obtidos pela técnica de HD. O rendimento percentual da SFE com o fluido CO₂ foi superior ao do HD, apresentando maior rendimento médio para folhas a condição de 45 °C e 200 atm e para talos 45 °C e 100 atm.

Empregando-se o propano (C₃H₈), a condição mais favorável para talos foi a de 60 °C 200 atm e para folhas 60 °C 100 atm. Houve a possibilidade de detecção e quantificação de ácido isovalérico como o representante mais significativo na fração monoterpênica para a ação farmacológica, enquanto que na sesquiterpênica houve a possibilidade de caracterização de α -copaeno, α -cubebeno, β -cariofileno, δ -cadieneno, γ -cadineno, germacreno D, valeranal e biciclogermacreno, além de compostos ainda não relatados na técnica de HD como a vitamina E (α -tocoferol), γ -tocoferol, esqualeno e estigmasterol.

A partir do levantamento estatístico das espécies de maior similaridade química foram estabelecidos estudos relacionados à maceração (EMAC), Soxhlet (ESOX), ultrassom (USE) e a extração acelerada por solventes (ASE) empregando a mistura solvente etanol:água (70:30 v/v) sobre a qualidade dos componentes voláteis extraíveis de *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis*. O método extrativo selecionado levando em conta o perfil cromatográfico mais complexo, foi o USE. A análise cromatográfica evidenciou-se a presença de 49 diferentes compostos entre eles polissacarídeos, aminoácidos monoterpenos, sesquiterpenos, catequina, cumarina, flavona glicosilada, valepotriato e seu produto de decomposição baldrinal e duas amidas de cadeia longa;

Desta forma as técnicas cromatográficas foram capazes de separar boa parte dos constituintes dos extratos analisados e os detectores FID e MS mostraram boa sensibilidade para compostos em baixa concentração fornecendo dados que proporcionaram o discernimento e a elucidação estrutural dos compostos voláteis e semivoláteis.

5.2 CONCLUSÕES

- A estabilização do material vegetal através do processo de liofilização permitiu a otimização do processo de extração, melhorando, de forma significativa, o rendimento dos hidrodestilados das sete espécies de *Valeriana*, dos extratos obtidos por SFE de *V. tajuensis* e dos extratos de EMAC, ESOX, USE e ASE de *V. chamaedryfolia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis*, sendo a condição de secagem de liofilização a eleita por apresentar baixos índices de umidade residuais e influenciar de forma positiva os rendimentos de extração;
- O aumento da massa vegetal empregada nas hidrodestilações das sete espécies de *Valeriana* viabilizou a extração de compostos voláteis que foram caracterizados e quantificados por GC/MS e GC/FID, através da co-injeção de padrões, dos índices de retenção calculados pelo índice de Kovats experimental com aqueles publicados em literatura e pela identificação coincidente dos espectros de massas;
- As técnicas cromatográficas GC/MS e GC/FID aplicadas às diferentes etapas do processamento do material vegetal propiciaram a qualificação e a quantificação de óleos voláteis acumulados em *V. chamaedryfolia*, *V. eichleriana*, *V. eupatoria*, *V. glechomifolia*, *V. saricarifolia*, *V. scandens* e *V. tajuensis* (**Capítulo 2**);
- Os fluidos supercríticos CO₂ e C₃H₈ foram capazes de produzir extratos de talos e folhas de *V. tajuensis* (**Capítulo 3**), sob condições de temperatura e pressão, que apresentaram compostos conhecidamente voláteis: monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados, assim como compostos semivoláteis como ésteres e ácidos graxos de cadeia longa e alcanos lineares, além de permitirem a extração de vitamina E e derivados. Além disto, a técnica foi capaz de extrair fitoesteróis fitol e estigmasterol;
- O solvente etanol:água (70:30 v/v) quando atrelado às diferentes formas de extração propostas: maceração, Soxhlet, ultrassom e extração acelerada por solventes foi capaz de extrair várias classes de metabólitos que foram elucidados por GC/MS, co-injeção contra padrões e por dados da literatura;
- Os extratos obtidos de partes aéreas através de métodos clássicos (maceração e Soxhlet) e modernos (ultrassom e extração acelerada por solvente) (**Capítulo 4**) apresentaram perfis diferenciados, sendo o mais rico em resíduo seco e em variabilidade de compostos o produzido por ultrassom.
- Os diferentes óleos voláteis e os diferentes extratos provenientes de espécies de *Valeriana* apresentaram composições elucidadas por GC, as quais englobaram tanto metabólitos primários quanto secundários. Entre os metabólitos primários foram detectados polissacarídeos, aminoácidos, ácidos graxos de cadeia longa e alcanos lineares de cadeia longa. Entre os metabólitos secundários foram detectados compostos como monoterpenos, monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, sesquiterpenos oxigenados, catequinas, cumarinas, flavonas-glicosiladas, valepotriatos e seus produtos de decomposição, assim como amidas de cadeia longa.
- As técnicas cromatográficas aplicadas neste trabalho foram capazes de separar boa parte dos constituintes dos extratos analisados. Os detectores FID e MS

acoplados a esta técnica mostraram boa sensibilidade para compostos em baixa concentração e forneceram dados que proporcionaram o discernimento e a elucidação estrutural dos compostos voláteis e semivoláteis;

- Os testes estatísticos aplicados aos resultados obtidos no **Capítulo 2** e **Capítulo 3** foram essenciais para separação do material-vegetal candidato a substituir a matéria-prima *V. officinalis* como base do *preparado intermediário fitoterápico* desenvolvido no estudo do **Capítulo 4**;
- Os resultados demonstrados indicam que mesmo a matriz vegetal assim como os diferentes métodos extrativos (variáveis T, P, tempo de contato entre soluto e solvente, entre outros...) influenciam de forma marcante a qualidade e a quantidade de resíduo seco obtido e, por consequência, o nº de compostos voláteis e semivoláteis das espécies de *Valeriana*, alvo deste estudo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BARREIRO, E. J. **Rev. Bras. Farm.** v. 64, n. 4, p. 113, 1983.
- [2] BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1995.
- [3] PETROVICK, P. R. Development of new drugs from plant origin. In: WORLD CONGRESS ON MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS FOR HUMAN WELFARE, 2, 1997, Mendoza. **Anais...**Mendoza: ISHS, 1997. P. L-21.(1).
- [4] SIMÕES, O. C. M. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2003.
- [5] COSTA, A. **Farmacognosia**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.
- [6] PETROVICK, P. R.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V. L. **J. Bras. Assoc. Adv. Sci.**, v. 49, n. 5/ 6, 364–369, 1997.(2)
- [7] BASSO, L. A. et al. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 100, n. 6, p. 575-606, 2005.
- [8] JACHAK, S. M.; SAKLANI, A. **Cur. Sci.**, v. 92, n. 9, p. 1251-1257, 2007.
- [9] ELIZABETSKY, E. **J. Ethnobiol.**, v. 6, n. 1, p. 121-128, 1986.
- [10] FARNSWORTH, N. R. Screening plants for new medicines. In: Willson, E. O. (Ed.). **Biodiversity**. Washington: National Academy, 1989. Pt. 2, cap. 9, p. 83-97.
- [11] WAYLAND, C. **Med. Anthropol. Quart.**, v. 17, n. 4, p. 483-500, 2003.
- [12] FARNSWORTH, N. R.; MORRIS, R. W. **Am. J. Pharm. Educ.**, v. 148, n. 2, p. 46-52, 1976.
- [13] WHO. **Monographs on selected medicinal plants**. Geneva: WHO Graphics, 1999. v. 1.
- [14] GARCIA, E. S. et al. **Fitoterápicos**. Campinas: A. Tosello, 1996.
- [15] RATES, S. M. K. **Toxicon.**, v. 39, n. 5, p. 603–613, 2001.
- [16] ORTEGA, G. G. et al. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v. 129, n. 35, p. 1847-1848, 1989.
- [17] PETROVICK, P. R.; MARQUES, L. C.; PAULA, I. C. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, n. 1, p.51-55, 1999.
- [18] GUIGNARD, J. L. **Abrégé de biochimie végétale**. Paris: Massom et Cie, 1996.
- [19] DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudos interdisciplinar**. São Paulo: Unesp, 1996.
- [20] KUKLINSKI, C. **Farmacognosia: estudio de las drogas y substancias medicamentosas de origen natural**. Barcelona: Omega, 2000. p. 187-189.
- [21] SHARAPIN, N. et al. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Santa-fé de Bogotá: A. Bello (CAB); Programa Ibero-americano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento, 2000.
- [22] GROS, E. G. et al. **Introducción al estudio de los productos naturales**. Washington: Sec. General de OEA, 1985.
- [23] HARBORNE, J. B. **Introducción a la bioquímica ecológica**. Madrid: Alambra, 1985.
- [24] PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 3 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1981. v. 1.
- [25] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. (Coord.). **Introdução a métodos cromatográficos**. 3. ed. Campinas: Unicamp, 1988.
- [26] CIONGA, E. et al. **Adv. Mass. Spectr. Biochem. Med.**, v. 1, p. 1110-1112, 1961.
- [27] BORKOWSKI, B.; LUTOMSKI, J. **Pharm. Zentralhalle**, v. 100, p. 575-584, 1961.
- [28] JOHNSON, R. D.; WALTER, G. R. **Phytochemistry**, v. 10, n. 12, p. 3334-3335, 1971.
- [29] JANOT, M. M. et al. **Ann. Pharm. Fr.**, v. 37, n. 9-10, p. 413-420, 1979.
- [30] MARDER, M. et al. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 75, n. 3, p. 537-545, 2003.
- [31] FERNÁNDEZ, S. P. et al. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 77, n. 2, p. 399-404, 2004.
- [32] CORSI, G.; LOKAR, L.; PAGNI, A. M., **Biochem. System. Ecol.**, v. 12, n. 1, p. 57-62, 1984.

- [33] TYLER, V. E.; ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. New York: Williams & Wilkins, 1996.
- [34] BOS, R.; WOERDENBAG, H. J.; van PUTTEN, F. M. S. **Planta Med.**, v. 64, n. 2, p. 143-147, 1998.
- [35] CARLINI, E. A. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 75, n. 3, p. 501-512, 2003.
- [36] REYNOLDS, J. E. F.; PRASAD, A. B., **Martindale the Extra Pharmacopoeia**. 28th ed. London: Pharmaceutical Press, 1982. p. 1768.
- [37] HOBBS, C. **Herbalgram**, v. 21, p. 19-34, 1989.
- [38] BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. (Ed.). **Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs**. Newton, Mass.: American Botanical Council, 2000. p. 226.
- [39] GILANI, A. H. et al. **Ethnopharmacol.**, v. 100, n. 3, p. 347-352, 2005.
- [40] DUKE, J. A. **CRC Handbook of medicinal herbs**. Boca Raton: CRC, 1985.
- [41] MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E. **Fitoterapia**, v. 66, n. 2, p. 99-112, 1995.
- [42] CERNY, A.; SCHMID, K. **Fitoterapia**, v. 70, n. 3, p. 221-228, 1999.
- [43] POYARES, D. R. et al. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, v. 26, n. 3, p. 539-545, 2002.
- [44] ANDREATINI, R. et al. **Phytother. Res.**, v. 16, n. 7, p. 650-654, 2002.
- [45] BENT, S. et al. **Am. J. Med.**, v. 119, n. 12, p. 1005-1012, 2006.
- [46] CIRCOSTA, C.; DE PASQUALE, R.; SAMPERI, S. **J. Ethnopharmacol.**, v. 112, n. 2, p.361-367, 2007.
- [47] STOLL, A.; SEEBECK, E.; STAUFFACHER, D. **Helv. Chim. Acta**, v. 40, n. 5, p. 1205-1229, 1957.
- [48] KREPINSKY, J.; HEROUT, V.; SORM, F. **Coll. Czech. Chem. Comm.**, v. 24, n. 6, p. 1884-1896, 1959.
- [49] BUCHI, G.; POPPER, T. L.; STAUFFACHER, D. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 82, n. 11, p. 2962-2963, 1960.
- [50] HIKINO, H. et al. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 11, n. 4, p. 547-548, 1963 (1).
- [51] HIKINO, H. et al. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 11, n. 7, p. 952-953, 1963 (2).
- [52] HIKINO, H. et al. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 11, n. 9, p. 1207-1210, 1963 (3).
- [53] HIKINO, H. et al. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 11, n. 9, p. 1210-1212, 1963 (4).
- [54] KLYNE, W. et al. **Tetrahedron Let.**, n. 23-24, p. 1443-1448, 1964.
- [55] NARAYANAN, C. S. et al. **Tetrahedron Let.**, v. 20, n. 4, p. 963-968, 1964.
- [56] KULKARNI, K. S.; BHATTACHARYA, S. C.; PAKNIKAR, S. K. **Tetrahedron Let.**, v. 20, n. 5, p. 1289-1300, 1964.
- [57] SOOD, V. K. **Ind. J. Chem.**, v. 2, n. 4, p. 170, 1964.
- [58] WITEK, S.; KREPINSK, J. **Coll. Czech. Chem. Comm.**, v. 31, n. 3, p. 1113-1123, 1966.
- [59] VERZAR-PETRI, G.; PEHES, E.; LEMBERKOVICS, E. **Herba Hung.**, v. 15, p. 79-91, 1976.
- [60] KONOWAL, A.; SNATZKE, G.; THIES, P. W. **Tetrahedron Let.**, v. 34, n. 2, p. 253-258, 1978.
- [61] KORNIEVSKII, Y. I. ET al. **Farm. Zh.**, n. 4, p. 71-72, 1979.
- [62] LIPTAK, J.; VERZAR-PETRI, G. **Sci. Pharm.**, v. 288, p. 203-206, 1980.
- [63] TRZHETSINSKY, S. D.; FURSA, N. S.; GOROVOL, P. G. **Khim. Prir. Soedin.** n. 2, p. 236-237, 1983.
- [64] BALDERER, G.; BORBÉLY, A. A. **Psychopharmacol.**, v. 87, n. 4, p. 406-409, 1985.
- [65] HOUGHTON, P. J. **J. Ethnopharm.**, v. 22, n. 2, p. 121-142, 1988.
- [66] LINDAHL, O.; LINDWALL, L. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 32, n. 4, p. 1065-1066, 1989.
- [67] ANDREATINI, R.; LEITE, J. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 260, n. 2-3, p. 233-235, 1994.
- [68] HOUGHTON, P. J. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 51, n. 5, p. 505-512, 1999.
- [69] STEVINSON, C.; ERNST, E. **Sleep Medic.**, v. 1, n. 2, p. 91-99, 2000.

- [70] HAZELHOLFF, B.; MALINGRÉ, T. M.; MEIJER, D. K. F. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 257, p. 274-287, 1982.
- [71] HATTESOHL, M. et al. **Planta Med.**, v. 72, n. 11, p. 1064, 2006.
- [72] HATTESOHL, M. et al. **Phytomed.**, v. 15, n. 1-2, p. 2-15, 2008.
- [73] MENNINI, T. et al. **Fitoterapia**, v. 44, n. 4, p. 291, 1993.
- [74] SOBRAL, M. **Bol. Inst. Biociênc.**, n. 58, p. 1-61, 1999.
- [75] SILVA, A. L.; RECH, S.; von POSER, G. L. **Planta Med.**, v. 68, n. 6, p. 570-572, 2002.
- [76] SALLES, L. D. et al. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 28, n. 1, p. 907-910, 2000.
- [77] BOS, R. et al. **Flavour Frag. J.**, v. 12, n. 5, p. 359-370; 1997.
- [78] CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants.** New York: Columbia Univ. Press, 1981. p.1262.
- [79] GUNN, C. R. et al. **U. S. Dep. Agric. Res. Serv. Tech. Bull.**, v. 1796, p. 1-499, 1992.
- [80] BORSINI, O. E. **Lilloa**, v. 31, p. 149-170, 1962.
- [81] BORSINI, O. E. **Sellowia**, v. 15, p. 123-136, 1963.
- [82] SILVA, A. L. **Quantificação de valepotriatos em espécies de *Valeriana* e em culturas de calos e suspensões celulares de *Valeriana glechomifolia* Meyer.** 2001. 173 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- [83] SALLES, L. D. **Estudo fitoquímico e estabelecimento de culturas de calos de *Valeriana glechomifolia* Meyer.** 1999. 88 p. Dissertação (Mestrado)-Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- [84] LEATHWOOD, P. D. et al. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 17, n. 1, p. 65-71, 1982.
- [85] DIAPER, A.; HINDMARCH, I. **Phytother. Res.**, v. 18, n. 10, p. 831-836, 2004.
- [86] BRAGA, H. C. **Os Óleos Essenciais do Brasil: estudo econômico.** Rio de Janeiro: Departamento Nacional de Pesquisas Pecuárias, 1971.
- [87] CRAVEIRO, A. A. et al. **Óleos essenciais de plantas do nordeste,** Fortaleza: Ed. UFC, 1981. p. 1-208.
- [88] ROGERS, J. A. Essential Oils. In: KIRK, R. E. **Encyclopedia of Modern Medicinal Uses.** Totowa: Humana Press, 1999.
- [89] HENDRIKS, H.; GEERTSMA, H. J.; MALINGRÉ, T. H. M. **Pharmaceutisch Weekblad- Scientific Edition**, v. 3, n. 5, p. 212-216, 1981.(1)
- [90] HENDRIKS, H. et al. **Planta Med.**, v. 42, n. 2, p. 131-131, 1981.(2)
- [91] HENDRIKS, H. et al. **Planta Med.**, v. 45, n. 3, p. 150-150, 1982.
- [92] HENDRIKS, H. et al. **Planta Med.**, v. 51, n. 1, p. 28-31, 1985.
- [93] BOS, R. et al. **Phytochem. Anal.**, v. 7, n. 3, p. 143-151, 1996. (2)
- [94] THE REVIEW of natural products – the most complete source of natural products information. In: **Facts and Comparisons.** Missouri: W. Kluwer, 2001.
- [95] GSTIRNER, F.; KLEINBAUER, E. **Pharmazie**, v. 13, p. 415-436, 1958.
- [96] HENDRIKS, H. et al. **Planta Med.**, v. 42, n. 1, p. 62-68, 1981.(3)
- [97] HILLER, K. O.; ZETLER, G. **Phytother. Res.**, v. 10, n. 2, p. 145-151, 1996.
- [98] SANTOS, M. S. et al. **Planta Med.**, v. 60, n. 5, p. 475-476, 1994.(1)
- [99] SANTOS, M. S.; FERREIRA, F.; CARVALHO, A. P. **Planta Med.**, v. 60, n. 3, p. 278-279, 1994.(2).
- [100] TAKAMURA, K.; KAWAGUCHI, M.; NABATA, H. **Yakugaku Zasshi.**, v. 95, n. 10, p. 1198-1204, 1975.
- [101] HIKINO, H. et al. **Shoyakugaku Zasshi.**, v. 34, n. 1, p. 19-24, 1980.
- [102] LEUSCHNER, J.; MULLER, J.; RUDMANN, M. **Arzneim. Forsch.**, v. 43, n. 6, p. 638-641, 1993.
- [103] BUSCHBAUER, G. et al. **Pharmazie**, v. 47, n. 6, p.620-622, 1992.
- [104] SANDOR, P. et al. **Arzneim. Forsch.**, v. 20, n. 1, p.29-32,1970.
- [105] DIETZ, B. M. et al. **Mol. Brain Res.**, v. 138, n. 2, p. 191-197, 2005.

- [106] ORTIZ, J. G.; NIEVES-NATAL, J.; CHAVEZ, P. **Neurochem. Res.**, v. 24, n. 11, p.1373–1378, 1999.
- [107] SIMMEN, U. et al. **Planta Med.**, v. 71, n. 7, p. 592-598, 2005.
- [108] STEINEGGER, E.; HÄNSEL, R. **Pharmacognosie**. 5. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1992. p. 162-163.
- [109] von EICKSTEDT, K. W.; RAHMAN, S. **Arzneim. Forsch.**, v. 19, n. 3, p. 316-319, 1969.
- [110] WAGNER, H.; JURCIC, K. **Planta Med.**, v. 37, n. 1, p. 84-95, 1979.
- [111] WAGNER, H. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v. 120, n. 17, p. 731, 1980.
- [112] KOHNEN, R.; OSVALD, W. D. **Pharmacopsych.**, v. 21, n. 6, p. 447-448, 1988.
- [113] FINK, C. et al. **Arzneim. Forsch.**, v. 34, p.170-174, 1984.
- [114] SCHIANO, T. D. **Clin. Liver Dis.**, v. 2, n. 3, p. 607-630, 1998.
- [115] HÖLTZ, J. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v. 13, p. 751-759, 1996.
- [116] HOLM, E. et al. **Med. Wel.**, v. 31, p. 982-990, 1980.
- [117] GRUSLA, D.; HÖLTZ, J.; KRIEGLSTEIN, J. **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v. 126, p. 415-436, 1986.
- [118] KRIEGLSTEIN, J.; GRUSLA, D., **Dtsch. Apoth. Ztg.**, v. 128, p. 2041-2046, 1988.
- [119] OSHIMA, Y.; MATSUOKA, S.; OHIZUMI, Y. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 43, n. 1, p. 169-170, 1995.
- [120] GU, J. Q. et al. **Planta Med.**, v. 70, n. 6, p. 509-514, 2004.
- [121] FERNÁNDEZ, S. P. et al. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 512, n. 2-3, p. 189-198, 2005.
- [122] FERNÁNDEZ, S. P. et al. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 539, n. 3, p. 168-176, 2006.
- [123] COSTA, A. **Farmacognosia**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.
- [124] DHARMARATNE, H. R. W.; NANAYAKKARA, N. P. D.; KHAN, I. A. **Planta Med.**, v. 68, n. 7, p. 661-662, 2002.
- [125] von der HUDE, W.; SCHEUTWINKEL-REICH, M.; BRAUN, R. **Mut. Res. Gen. Toxicol.**, v. 169, n. 1-2, p. 23-27, 1986.
- [126] TUFIK, S.; FUJITA, K.; SEABRA, M. L. V. **J. Ethnopharmacol.**, v. 41, n. 1-2, p. 39-44, 1994.
- [127] YUANQIANG, G. et al. **Chem. Pharm. Bull. Tokyo**, v. 54, n. 1, p. 123-125, 2006.
- [128] AL-MAJED, A. A. et al. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 44, n. 11, p. 1830-1837, 2006.
- [129] DECIGA-CAMPOS, M. et al. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, n. 2, p. 334-342, 2007.
- [130] YAO, M.; RITCHIE, H. E.; BROWN-WOODMAN, P. D. **J. Ethnopharmacol.**, v. 113, p. 204–209, 2007.
- [131] BELL, E. A.; CHARLWOOD, B. V. **Secondary plants products**. New York: Springer-Verlag, 1980.
- [132] ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**. 3. ed. Buenos Aires: Isis, 1998. p. 948-956.
- [133] HILL, A. F. **Economy botany**. 2. ed. Nova Delhi: Mc Graw Hill, 1952.
- [134] DOMINGUEZ, X. **Métodos de Investigación Fitoquímica**. México: Limusa, 1973.
- [135] GRÄNICHER, F.; CHRISTEN, P.; KAPETANIDIS, I. **Phytochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1421-1424, 1995.
- [136] BOS, R.; HENDRIKS, H.; KLOOSTERMAN, J. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1234-1235, 1986.(1)
- [137] BOS, R. et al. Variations in the essential oil content and composition in individual plants obtained after breeding experiment with a *Valeriana officinalis* strain. In: **Progress in Essential Oil Research**. Berlin: W. Gruter, 1986. p. 123-130.(2)
- [138] BOS, R. et al. **Phytochemistry**, v. 25, p. 133-135, 1986.(3)
- [139] BOS, R. et al. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A J. Biosci.**, v. 52, n. 11-12, p. 858-860, 1997.
- [140] BOS, R. et al. **Phyther.**, v. 13, p. 26-34, 1996.
- [141] HÖLZ, J.; FINK, C. **Arzneim. Forsch.**, v. 34, p. 44-47, 1984.
- [142] NOVAK, J. et al. **Flav. Fragr. J.**, v. 15, n. 1, p. 40-42, 2000.

- [143] LETCHAMO, W. et al. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 12, p. 3915-3919, 2004.
- [144] MATHELA, C. S.; CHANOTIYA, S. S.; SAMMAL, A. K. **Chem. Biodivers.**, v. 2, p. 1174, 2005.
- [145] MATHELA, C. S. et al. **J. Essent. Oil Res.**, v. 17, n. 6, p. 672-675, 2005.
- [146] SATI, S.; CHANOTIYA, C. S.; MATHELA, C. S. **J. Essent. Oil Res.**, v. 17, n. 4, p. 408-409, 2005.
- [147] SATI, S.; MATHELA, C. S. **Flav. Fragr. J.**, v. 20, n. 3, p. 299-301, 2005.
- [148] JAVIDNIA, K. et al. **Flav. Fragr. J.**, v. 21, n. 3, p. 516-518, 2006.
- [149] PAVLOVIC, M.; KOVACEVIC, N. **J. Essent. Oil Res.**, v. 19, p. 433-438, 2007.
- [150] BARANAUSKIENE, R. **Chem. Nat. Comp.**, v. 3, p. 331-333, 2007.
- [151] SAFARALIE A.; FATEMI, S.; SEFIDKON, F. **J. Chromatogr. A**, v. 1180, p. 159-164, 2008.
- [152] SINGH, M. et al. **Indian J. Exper. Biol.**, v. 45, n. 9; p. 764-769, 2007.
- [153] FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- [154] WORD HEALTH ORGANIZATION. **Quality controls methods for vegetables drugs**. Berlin: Springer, 1998.
- [155] LIST, P. H.; SCHIMIDT, P. C. **Phytopharmaceutical technology**. Boca Raton: CRC, 1989.
- [156] ZINI, C. A. et al. **J. Agr. Food Chem.**, v. 51, p. 2679-2686, 2003.
- [157] CHARLES, D. J.; SIMON, J. E. **J. Am. Soc. Horticult. Sci.**, v. 115, n. 3, p. 458-62, 1990.
- [158] JANTAN, I.; LING, Y. E.; ROMLI, S. **J. Essent. Oil Res.**, v. 15, p. 387-91, 2003.
- [159] VENSKUTONIS, P. R.; DAGYLITE, A. **J. Essent. Oil Res.**, v. 15, p. 313-318, 2003.
- [160] EHLERT, P. A. D. et al. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 8, n. 2, p. 79-80, 2006.
- [161] NIKIFOROV, A.; REMBERG, B.; JIROVETZ, L. **Sci. Pharm.**, v. 62, p. 331-335, 1994.
- [162] BICCHI, C.; DRIGO, S.; RUBIOLOP. **J. Chromatogr. A**, v. 892, p. 469-485, 2000.
- [163] SCHIEFFER, G. W. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, v. 28, n. 4, p. 581-592, 2005.
- [164] FOKIALAKIS, N.; MAGIATIS P.; MITAKU, S. **Z. Naturforsch.**, v. 57c, p. 791, 2002.
- [165] XU, Y. M.; MCLAUGHLIN, S. P; GUNATILAKA, A. A. L. **J. Nat. Prod.**, v. 70, n. 12, p. 2045-2048, 2007.
- [166] ADAMS R. P. **Identification of essential oils by Ion Trap Mass Spectrometry**. New York: Academic Press, [2003].
- [167] ASTA. **Official analytical methods of the American spice trade association**. Englewood Cliffs: ASTA, 1968. p. 8-11.
- [168] LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993.
- [169] SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookmann, 2002.
- [170] KOVATS, E. **Helv. Chim. Acta**, v. 41, p. 1915, 1958.
- [171] IKAN, R. **Natural products**. New York: Academic Press, 1991.
- [172] GROSS, D.; HENDER, G.; SCHUTTE H. R. **Arch. Pharm.**, v. 304, n. 1, p. 19-27, 1971.
- [173] CARRILHO, E.; TAVARES, M. C. H.; LANCAS, F. M. **Química Nova.**, v. 24, n. 4, p. 509-515, 2001.
- [174] TAYLOR, L. T. **Supercritical fluid extraction: techniques in analytical chemistry**. New York: J. Wiley & Sons, 1996.
- [175] BRUNNER, G. et al. **J. Supercrit. Fluids**, v. 8, n. 2, p. 162-166, 1995.
- [176] SALIMI, A. et al. **Chem. Eng. Technol.**, v. 31, n. 10, p. 1470-1480, 2008.
- [177] HAWTHORNE, S. B.; KIEGER, M. S.; MILLER, D. J. **Anal. Chem.**, v. 60, p. 472-477, 1988.
- [178] ROY, B. C. et al., **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 67, p. 21-26, 1996.
- [179] FREITAS L. S. et al. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 2558-2564, 2008.

- [180] DARIVA, C. **Extração supercrítica de compostos voláteis do carvão mineral utilizando solventes doadores de hidrogênio**. 1995. 144 p. Dissertação (Mestrado)-Curso de Pós-graduação em Engenharia Química, UFSC, Florianópolis, 1995.
- [181] ZIZOVIC, I. et al. **J. Supercrit. Fluids**, v. 39, p. 338–346, 2007.
- [182] SHOHET, D.; WILLS, R. B. H. **Int. J. Food Proper.**, v. 9, n. 2, p. 325-329, 2006.
- [183] MOURAL. S. et al. **J. Supercrit. Fluids**, v. 35, p. 212–219, 2005.
- [184] XIE, Y.; PENG, J.; FAN, G. **Pharm. Biomed. Anal.** Xxx. xxx–xxx, 2008.
- [185] SALDAÑA, M. D. A.; MOHAMED, R. S.; MAZZAFERA, P. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 17, n. 3, p. 1-13, 2000.
- [186] SALDAÑA, M. D. A. et al. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 3804-3808, 1999.
- [187] ESMELINDRO, M. C. et al. **J. Food Eng.**, v. 70, p. 588-592, 2005.
- [188] CAREDDA, A. et al. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 1492-1496, 2002.
- [189] NOSSACK, A. C. et al. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 11, n. 5, p. 495-501, 2000.
- [190] KHAJEH, M. et al. **Food Chem.**, v. 86, n. 4, p. 587-591, 2004.
- [191] AGHEL, N. Et al. **Talanta**, v. 62, p. 407-411, 2004.
- [192] EBRAHIMZADEH, H. et al. **Food Chem.**, v. 83, p. 357-361, 2003.
- [193] SEGER, C. ET al. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 21, n. 4, p. 453-463, 2002.
- [194] YANG, C.; XU, Y.; YAO, W. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 846-849, 2002.
- [195] RODRIGUESM. R. A. et al. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 453-456, 2003.
- [196] RODRIGUES, M. R. A. et al. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 3042-3047, 2004.
- [197] ÖZCAN, A., ÖZCAN, A. S. **Talanta**, v. 64, p. 491–495, 2004.
- [198] PEREIRA, C. G. et al. **J. Supercrit. Fluids**, v. 30, n. 1, p. 51-61, 2004.
- [199] GOLI, A. H.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M. A. **Food Chem.**, v. 92, p. 521-525, 2005.
- [200] LANÇAS, F. M. et al. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 17, p. 418-422, 1997.
- [201] CHANG, C. J. et al. **Food Chem.**, v. 68, p. 109-113, 2000.
- [202] KHAJEH, M. et al. **Food Chem.**, v. 86, p. 587-591, 2005.
- [203] DAMJANOVIĆ, B. et al. **Food Chem.**, v. 92, p. 143-149, 2005.
- [204] AMARAL, J. S. et al. **Food Chem.**, v. 88, p. 373–379, 2004.
- [205] CHING, L. C.; MOHAMED, S. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 3101-3105, 2004.
- [206] HE, H. et al. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 368-372, 2004.
- [207] SMITH, T., **J. Exp. Opin. Invest. Drugs**, v. 9, p. 1841-1848, 2000.
- [208] HOLSER, R. A.; BOST, G.; VAN BOVEN, M. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2546, 2004.
- [209] DUKE, J.A., **Handbook of Biologically Active Phytochemicals and Their Activities**, CRC, Press, London, 1992.
- [210] BRIGELIUS-FLOHE R.; SALONEN, J. T. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p. 703-716, 2002.
- [211] ZHI-CHEN, L. **General control methods for vegetable drugs**. Geneve: WHO, 1980.
- [212] PANDE, A.; SHUKLA, Y. N. **Fitoterapia**, v. 66, n. 5, p. 467, 1995.
- [213] FURSA, N. S. **Khim. Prir. Soedin.**, n. 3, p. 407, 1979.
- [214] FURSA, N. S. **Poll. Farm. Zh.**, n. 6, p. 60, 1980.
- [215] FURSA, N. S.; LITVINENKO, V. I. **Farm. Zh.**, n. 3, p. 74, 1981.(1)
- [216] FURSA, N. S.; BELYAEVA, L. E.; RYBAL'CHENKO, A. S. **Khim. Prir. Soedin.**, n. 1, p. 98, 1981.(2)
- [217] FURSA, N. S. **Farm. Zh.**, n. 5, p. 76, 1982.
- [218] FURSA, N. S. **Rastit. Resur.**, v. 19, n. 2, p. 216-218, 1983.
- [219] FURSA, N. S.; BELYAEVA, L. E. **Ukr. Bot. Zh.**, v. 10, n. 3, p. 36-38, 1983.
- [220] FURSA, N. S. et al. **Khim. Prir. Soedin.**, n. 2, p. 249, 1984.
- [221] THIES, P. W. **Planta Med.**, v. 16, n. 4, p. 363-371, 1968.
- [222] WASOWSKI, C. et al. **Planta Med.**, v. 68, n. 10, p. 934-936, 2002.
- [223] SAMPAIO, M. I. R.; CASTILHO, R. O. ; KAPLAN, M. A. C. **Rev. Bras. Farm.**, v. 74, n. 3, p. 54-76, 1993.

- [224] WIENSCHIERZ, H. J. **Acta Hortic.**, v. 73, p. 315-321, 1978.
- [225] THIES, P. W.; FUNKE, S. **Tetrahedron Let.**, v. 11, p. 1155-1162, 1966.
- [226] LORENZ, M. **Untersuchungen zur Domestikation der mexikanischen Medizinpflanze *Valeriana edulis* ssp. *procera* Meyer**. Thesis, Technical University of Munch, Germany., 1989.
- [227] LUQUE DE CASTRO, M. D.; DA SILVA, M. P. **Tr. Anal. Chem.**, v. 16, n. 1, p. 16-24, 1997.
- [228] KASPARY, R. **Efeitos de diferentes graus de sombreamento sobre o desenvolvimento e trocas gasosas de plantas jovens de erva-mate**. 2002. 231p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- [229] PRIEGO-CAPOTE, F.; LUQUE DE CASTRO, M. D. **Tr. Anal. Chem.**, v. 23, n. 9, p. 644-653, 2004.
- [230] CAMEL, V. **Analyst.**, v. 126, p. 1182-1193, 2001.
- [231] LUQUE DE CASTRO, M. D.; JIMÉNEZ-CARMONA, M. M.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, V. **Tr. Anal. Chem.**, v. 18, n. 11, p. 708-716, 1999.
- [232] AUGUSTO, F.; LOPES, A. L. E. ; ZINI, C. A. **Tr. Anal. Chem.**, v. 22, n. 3, p. 160-168, 2003.
- [233] LANG, Q.; WAI, C. M. **Talanta**, v. 53, p. 771-782, 2001.
- [234] FERRI, P.H. In: STASI, L. C. di (Org.). **Química de produtos naturais: métodos gerais: plantas Medicinais: arte e ciências**. São Paulo: Ed. UNESP, 1996. p. 129.
- [235] LUQUE-GARCÍA, J. L.; DUQUE DE CASTRO, M. D. **Tr. Anal. Chem.**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2003.
- [236] VALACHOVIC, P.; PECHOVA, A.; MASON, T. J. **Ultrason. Sonochem.**, v. 8, p. 111-117, 2001.
- [237] MELECCHI, M. I. S. et al. **Sep. Sci.**, v. 25, p. 86-90, 2002.
- [238] SHOTIPRUK, A.; KAUFMAN, P. B.; WANG, H. Y. **Biotechnol. Prog.**, v. 17, p. 924-928, 2001.
- [239] SCHINOR, E. C. et al. **Ultrason. Sonochem.**, v. 11, p. 415-421, 2004.
- [240] ZHANG, F. et al. **Separat. Purificat. Tech.**, v. 42, p. 283-290, 2005.
- [241] Rodrigues, M. R. A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 2002. Tese (Doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. p. 143.
- [242] WU, J.; LIN, L.; CHAU, F. **Ultrason. Sonochem.**, v. 8, p. 347-352, 2001.
- [243] TORRE, J. et al. **J. Chromatogr. A**, v. 919, p. 305-311, 2001.
- [244] HROMÁDKOVÁ, Z.; EBRINGEROVÁ, A. **Ultrason. Sonochem.**, v. 10, p. 127-133, 2003.
- [245] KOBUS, Z. **Intern. Agroph.**, v. 22, n. 2, p. 133-137, 2008.
- [246] RIEGER, G. et al. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 9080-9086, 2008.
- [247] TAM, C. U. et al. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 44, p. 444-449, 2007.
- [248] CHEN, J. et al. **Anal. Chim. Acta**, v. 613, p. 184-195, 2008.
- [249] HERRERO, M. et al. **J. Chromatogr. A**, v. 1084, p. 54-62, 2005.
- [250] ELLER, F. J.; TAYLOR, S. L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 2335-2338, 2004.
- [251] LAO, S. C. et al. **Anal. Chim. Acta**, v. 526, p. 131-137, 2004.
- [252] YANG, F. Q. et al. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 39, p. 552-558, 2005.
- [253] CHOI, M. P. K. et al. **J. Chromatogr. A**, v. 983, p. 153-162, 2003.
- [254] ONG, E.; WOO, S.; YONG, Y. **J. Chromatogr. A**, v. 313, p. 57-64, 2000.
- [255] BENTHIN, B.; DANZ, H.; HAMBURGER, M. **J. Chromatogr. A**, v. 837, p. 211-219, 1999.
- [256] LEACH, M. J. **Complement. Ther. Nurs.**, v. 10, n. 2, p. 97-109, 2004.
- [257] WANG, L.; WELLER, C. L. **Tr. Food Sci. Technol.**, v. 17, p. 300-312, 2006.
- [258] HENDRIKS, H.; BRUINS, A. P. **J. Chromatogr. A**, v. 190, n. 2, p. 321-330, 1980.
- [259] ASE300 Accelerated Solvent Extractor Operator's Manuals, Document N°031149, Revision 01, Dionex. Sunnyvale, CA, 1995. Sect. 3-5.

- [260] SIQUEIRA, D. S. et al. **Quím. Nova**, v. 26, n. 5, p. 633-640, 2003.
- [261] AWAD, A. B. et. al. **J. Nutr. Biochem.**, v. 16, p. 650-655, 2005.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Salles, Luisa Andrade; Silva, Andréia Loviane; Rech, Sandra: von Poser Gilsane. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Mayer. *Biochemical Systematic and Ecology*. V.8; p.907-910,2000.

Silva, Andréia Loviane; Quantificação de valepotriatos em espécies de *Valeriana* e em culturas de calos e suspensões celulares de *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Caderno de Farmácia*. V.17,n2 jul/dez. p.89-164,2001.

Salles, Luisa Andrade; Silva, Andréia Loviane; Rech, Sandra: von Poser Gilsane; Feet-Netto, Arthur. *Valeriana* in vitro propagation and production of valepotriates. *Plant Science*. V.163,(2002), p.165-168.

Silva, Andréia Loviane; Rech, Sandra: von Poser Gilsane; Feet-Netto, Arthur. Quantitative Determination of Valepotriates from *Valeriana* Native to South Brazil. *Planta Medica*. v.68; (2002), p.570-572.

Silva, Andréia Loviane; Rech, Sandra: von Poser Gilsane; Sobral, Marcos. Valerianas brasileiras: Potencial terapêutico das espécies do sul do país. *Ciência Hoje*. v.34, (2004), nº 204; p.34-38.

SILVA, Andréia Loviane; KIFFER, R ; BORDIGNON, Sérgio ; ZINI, C. A. ; CARAMÃO, Elina Bastos . Chemical Composition of the Essential Oil of *Valeriana tajuvensis* Sobral. In: 29th ISCCE 2006 - 29th International Symposium on Capillary Chromatography and 3rd GC´GC Symposium, 2006, Riva del Garda. Abstracts of the 29th ISCCE 2006 - 29th International Symposium on Capillary Chromatography and 3rd GC´GC Symposium. Kortrijk : Research Institute for Chromatography - RIC, 2006. p. P38.

Maurmann, N.; De Carvalho C.M.B., Silva Andréia Loviane, Fett-Netto, A.G, Von Poser G.L., Rech, S.B. Valepotriates accumulation in callus suspended cells and utranformed root cultures of *Valeriana glechomifolia*. IN VITRO CELL DEV-PL.42(1):50-53.JAN-FEV 2006.

SILVA, Andréia Loviane; KIFFER, Renata ; BORDIGNON, Sérgio ; ZINI, C. A. ; CARAMÃO, Elina Bastos. Chemical Composition of essential oil of Brazilian *Valeriana* species. In: **COLACRO XII** - Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, nov. 2008, Florianopolis-SC.

Freitas, L. S.; Jaques R. A.; Ritcher M.F.; Silva, A.L.; Caramão, E. B. Reassured liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape oil. *J. Chromatography A*, v.1200, p.80-83, 2008.

Silva, A. L.; Kiffer, R.; Bordignon, S.; Zini, C.A.,Caramão, E. B et al. Chemical Composition of the Essential Oil of seven *Valeriana* species. *Phytochemistry* (submitted)(2008).

8 ATIVIDADES PROPOSTAS PARA A CONTINUAÇÃO DO TEMA

- Promover a SFE de *V. glechomifolia* e *V. chamaedryfoilia* analisando partes aéreas quanto à presença de compostos voláteis;
- Analisar os extratos de SFE de *V. tajuensis* quanto aos compostos fixos por CCD contra padrões de valepotriatos;
- Analisar a presença de flavonoides (em especial hesperidin e hesperitin) nos extratos das três espécies de *Valeriana* já que as CCD indicaram à presença de compostos com estas características;
- Quantificação dos extratos obtidos por maceração, Soxhlet, ultrassom e extração acelerada por solvente pelo método cromatográfico GC/MS no modo SIM;
- Implementação de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência, a fim de caracterizar os compostos fixos presentes nestas amostras;
- Quantificação dos valepotriatos e dos produtos de degradação (baldrinal e homobaldrinal) nos extratos hidroalcoólico obtidos por USE e ASE das três espécies de *Valeriana* selecionadas como candidatas à substituir a matéria-prima referência ;
- Isolamento de substâncias com perfil alcaloídico como oleamida, palmitamida detectadas nos extratos USE das três espécies de *Valeriana* selecionadas como candidatas à substituir a matéria-prima referência *Valeriana officinalis*;
- Desenvolvimento dos processos de validação de metodologia por GC/MS e GC/FID para a quantificação de alcanos lineares, ésteres e ácidos graxos de cadeia longa provenientes das três espécies e *Valeriana*: *V. chamaedryfoilia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis*;
- Desenvolvimento de testes farmacológicos relacionados aos extratos hidroalcoólicos USE e ASE provenientes de *V. chamaedryfoilia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis*;
- Desenvolvimento de forma farmacêutica com os extratos USE hidroalcoólico de *V. chamaedryfoilia*, *V. glechomifolia* e *V. tajuensis* e a instituição do doseamento de óleos voláteis, compostos voláteis e semivoláteis por GC.

9. ANEXOS

9.1 Anexo I

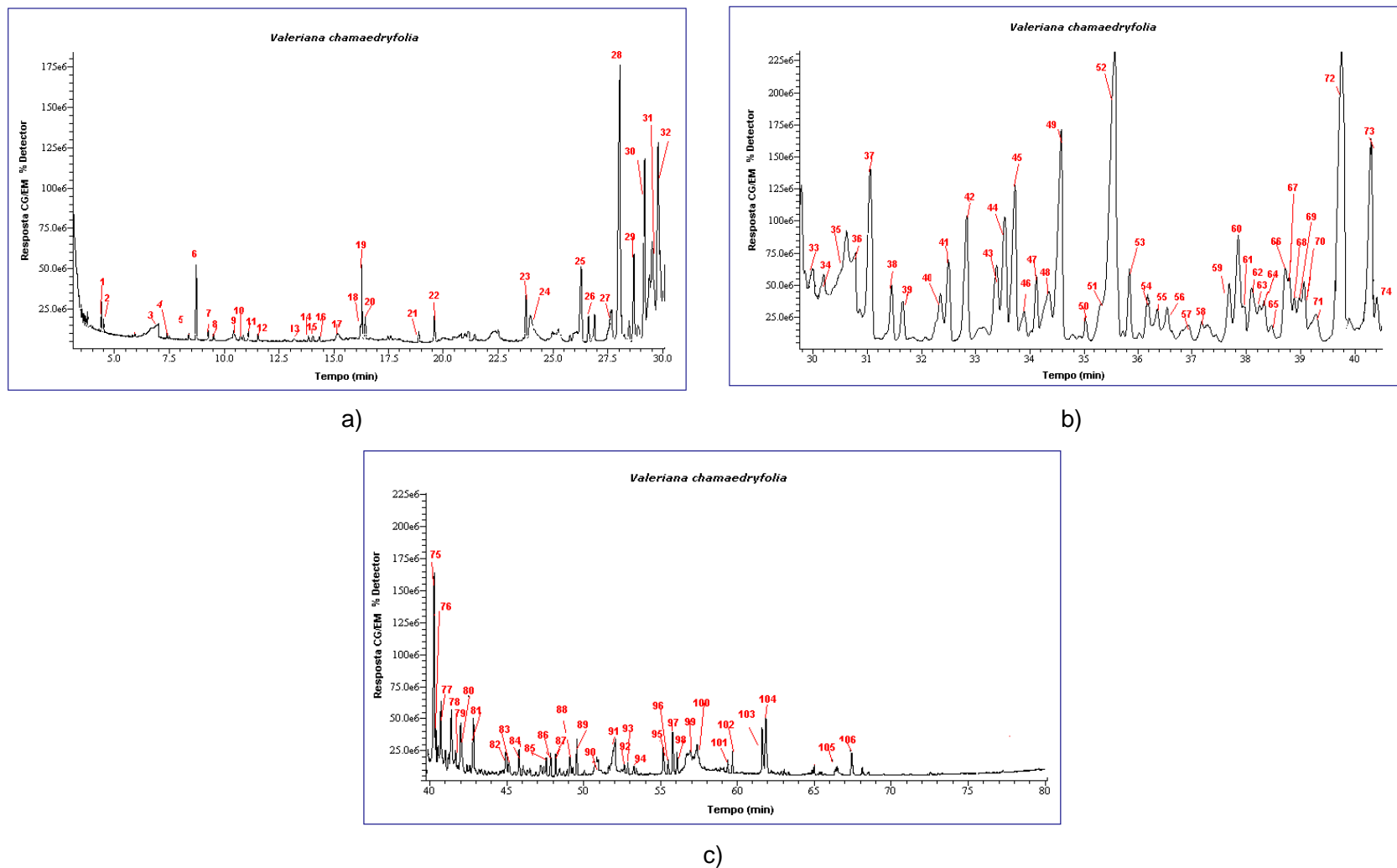


Fig. A1: Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *Valeriana chamaedryfolia* dividido em partes para melhor visualização em **(a)** Primeira parte; **(b)** Segunda parte e **(c)** Terceira parte. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela IV** e Identificação dos picos na **Tabela A I**.

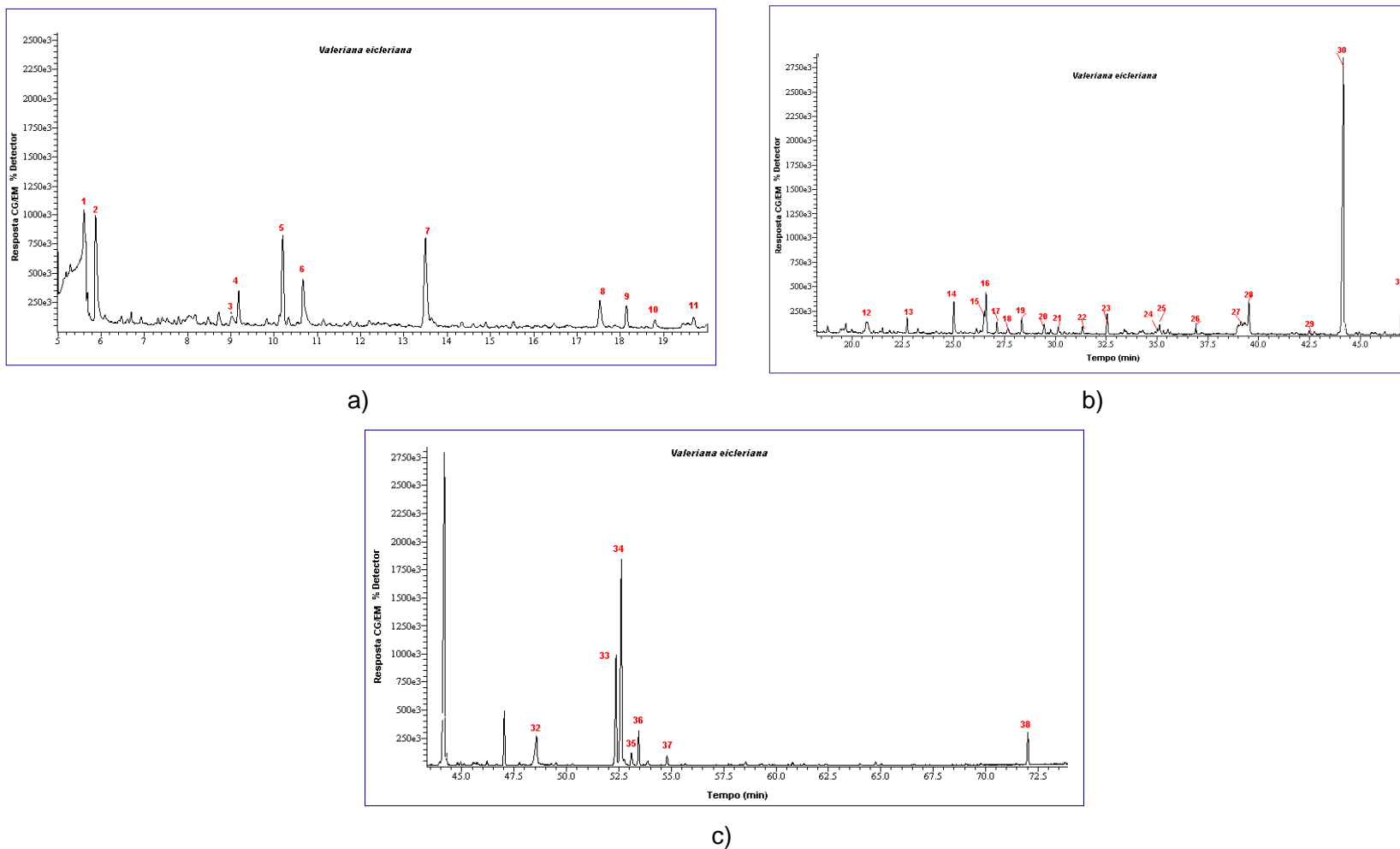


Fig. A2: Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *Valeriana eichleriana* dividido em partes para melhor visualização em **(a)** Primeira parte; **(b)** Segunda parte e **(c)** Terceira parte. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela IV** e Identificação dos picos na **Tabela All**.

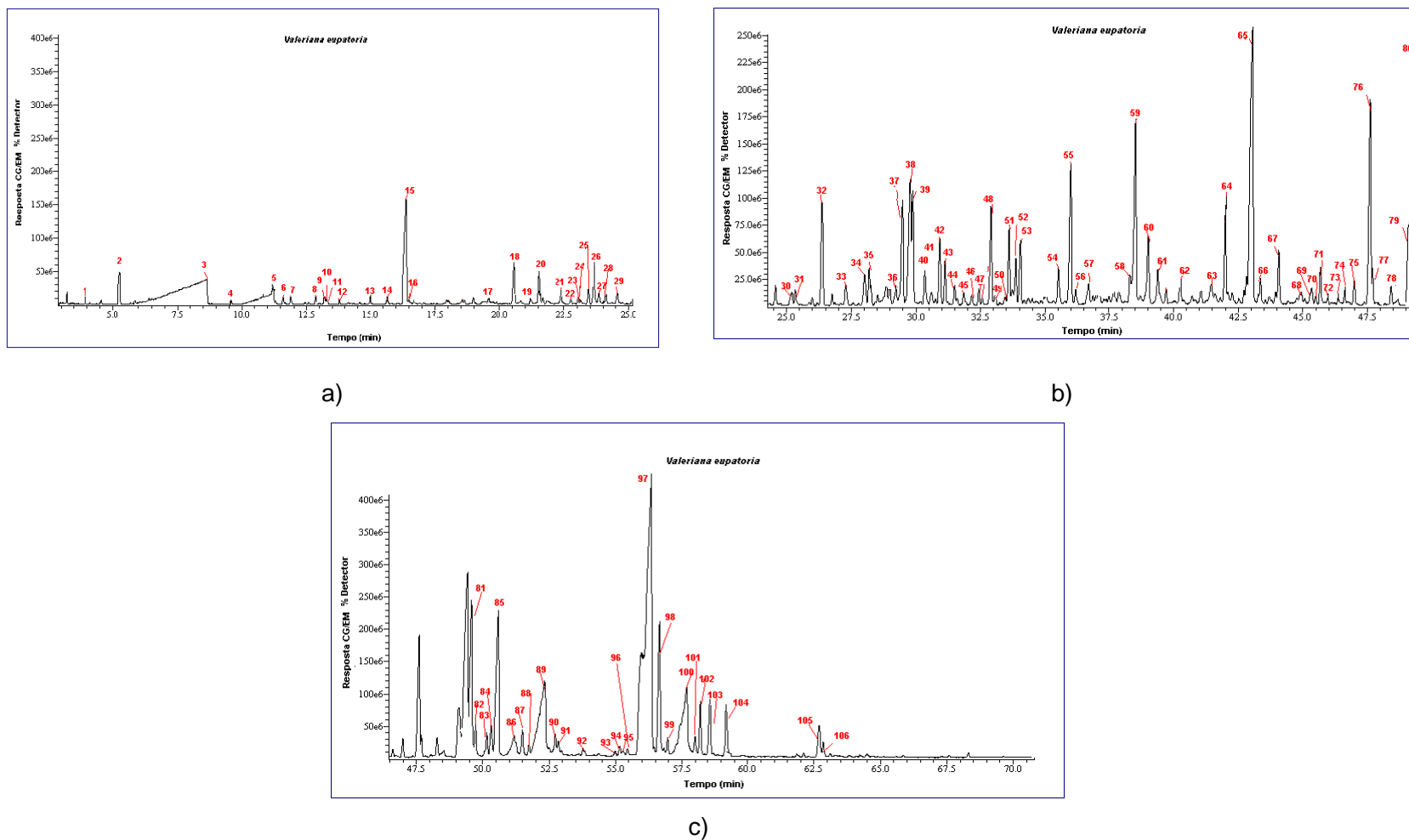


Fig. A3: Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *Valeriana eupatoria* dividido em partes para melhor visualização em **(a)** Primeira parte; **(b)** Segunda parte e **(c)** Terceira parte. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela IV** e Identificação dos picos na **Tabela AIII**.

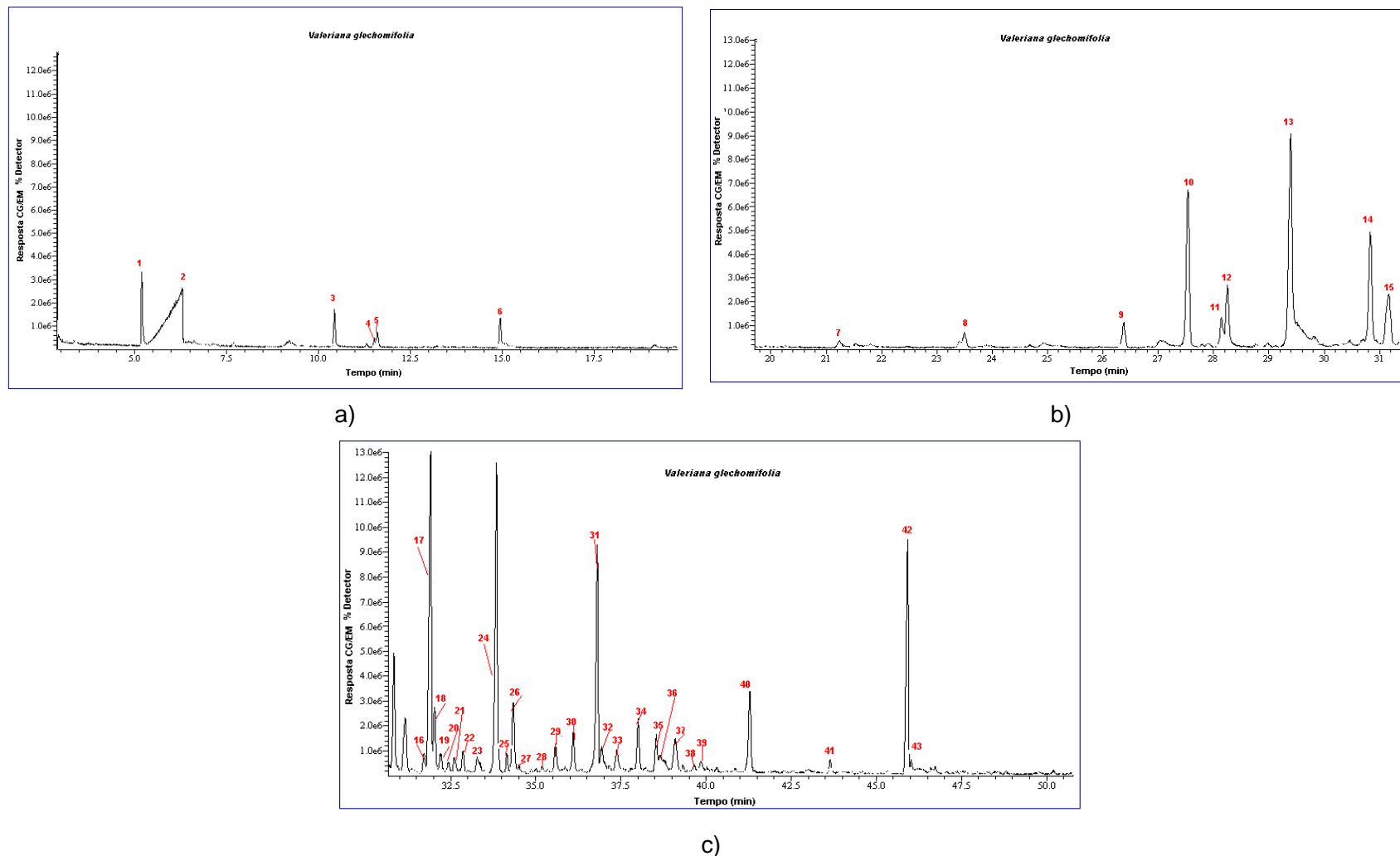
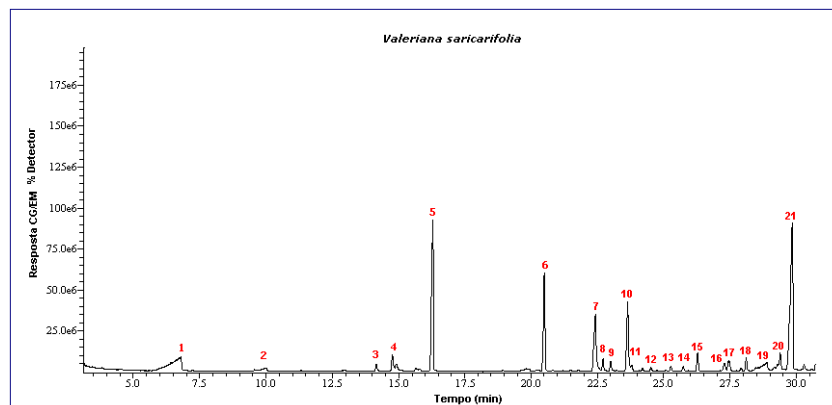
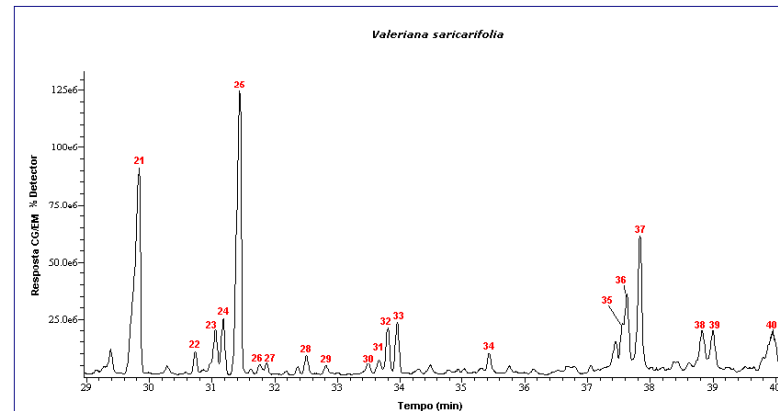


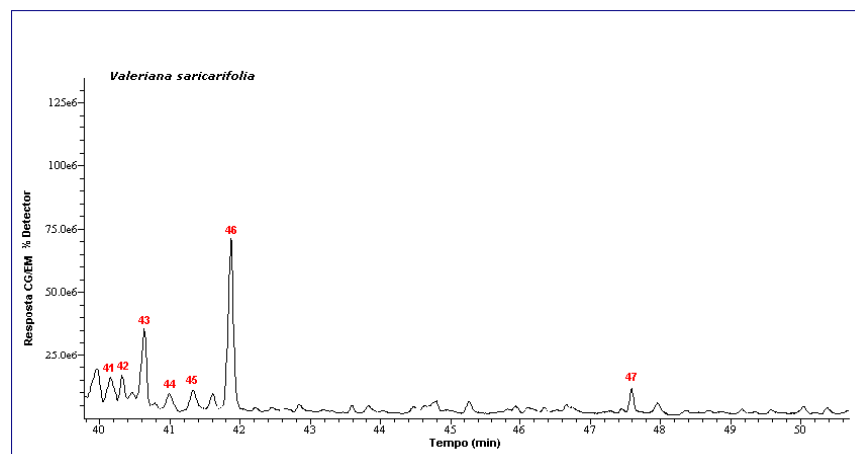
Fig. A4: Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *Valeriana glechomifolia* dividido em partes para melhor visualização em (a) Primeira parte; (b) Segunda parte e (c) Terceira parte. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela IV** e Identificação dos picos na **Tabela AIV**.



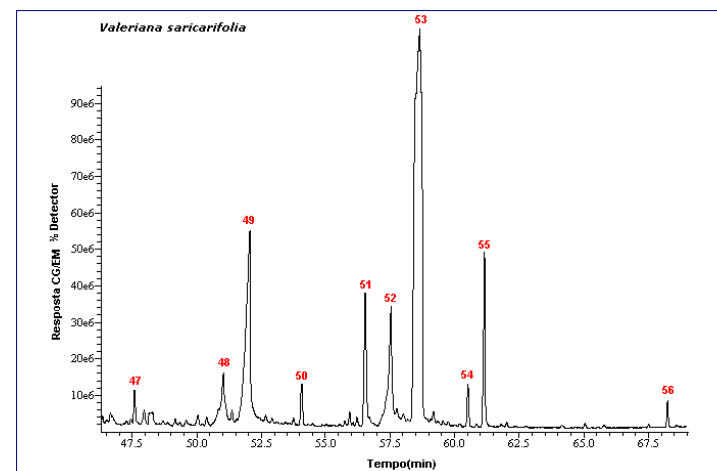
a)



b)

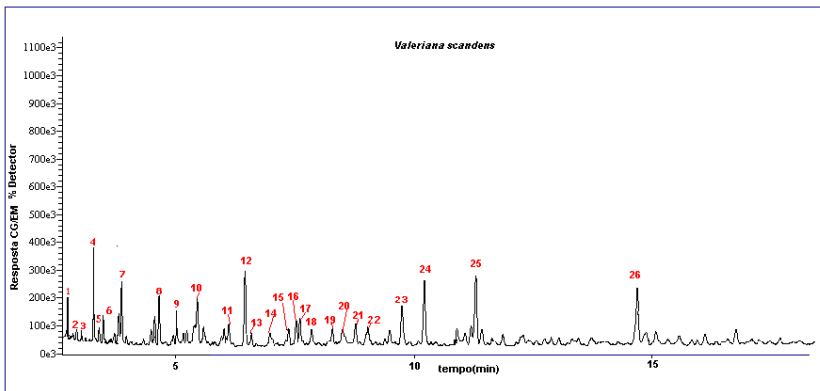


c)

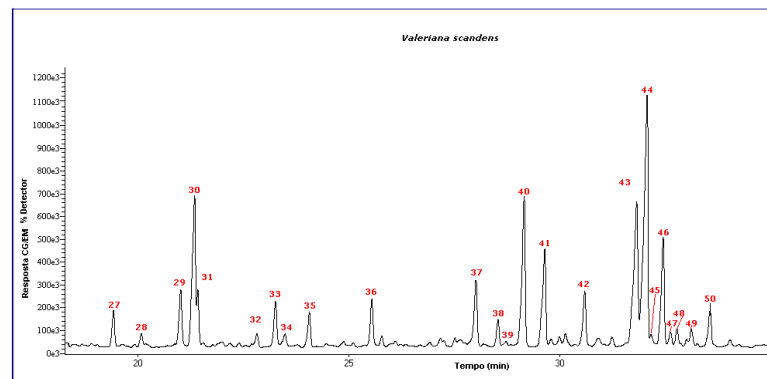


d)

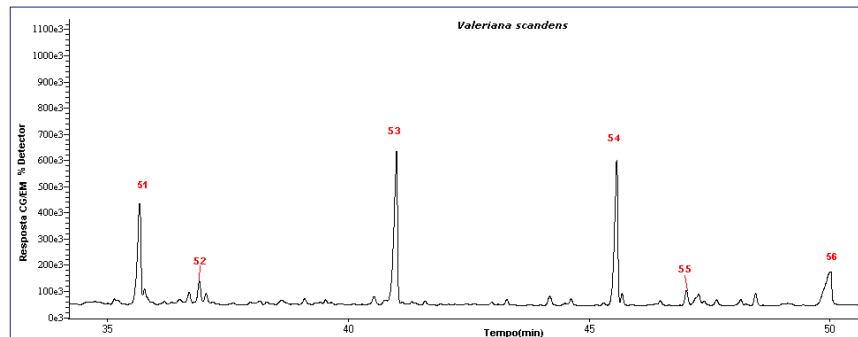
Fig.A5: Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *Valeriana saricarifolia* dividido em partes para melhor visualização em **(a)** Primeira parte; **(b)** Segunda parte; **(c)** Terceira parte e **(d)** Quarta parte. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela IV** e Identificação dos picos na **Tabela AV**.



a)



b)



c)

Fig.A6: Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *Valeriana scandens* dividido em partes para melhor visualização em **(a)** Primeira parte; **(b)** Segunda parte e **(c)** Terceira parte. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela IV** e Identificação dos picos na **Tabela AVI**.

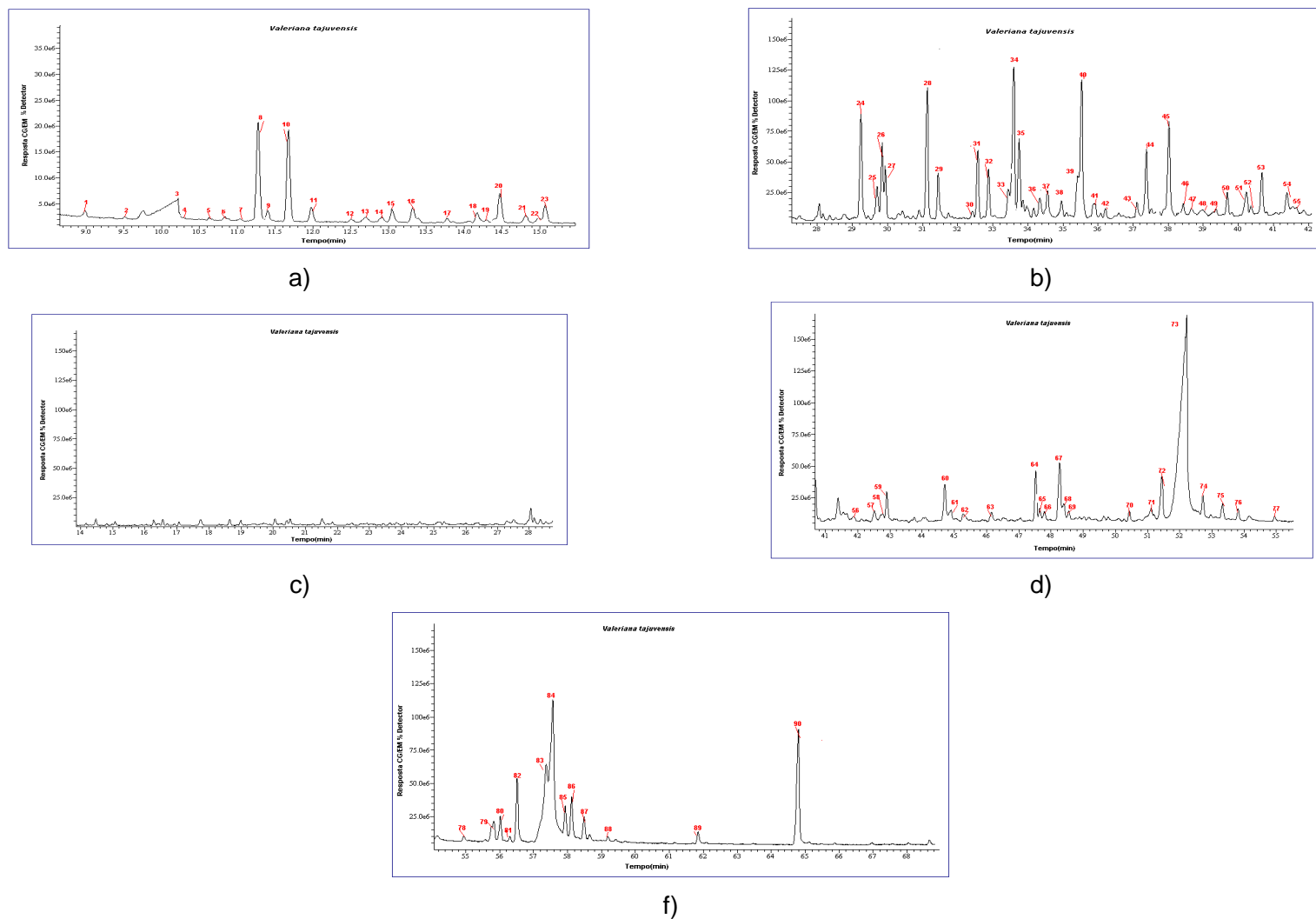


Fig.A7: Cromatograma do íon total para os compostos do óleo essencial dos ramos e folhas de *Valeriana tajovensis* dividido em partes para melhor visualização em **(a)** Primeira parte; **(b)** Segunda parte; **(c)** Terceira parte; **(d)** Quarta parte e **(f)** Quinta parte. Condições cromatográficas de acordo com a **Tabela IV** e Identificação dos picos na **Tabela AVII**.

Tabela IA: Identificação dos picos apresentados na **Figura A1**, para os óleos essenciais de ramos e folhas de *Valeriana chamedryfololia*. Numeração apresentada na **Figura A1**.

Nº	Nome do composto	Índice de retenção de Kovats (IR)				Conc (%)	Método de identificação
		a	b	c	D		
1	E-2-hexenal	804	802	1190	1192	0,22	1,2
2	Furfural	836	829	1452	1455	e	1,2
3	Ácido isovalérico	838	836	1664	1665	0,64	1,2
4	Butanoato de alila	887	886			Traço	1,2
5	Heptanal	900	902	1171	1174	Traço	1,2
6	β-pineno	929	939	1015	1014	1,15	1,2
7	Canfeno	937	954	1051	1050	0,13	1,2
8	Monoterpeno oxigenado	941	-			E	2
9	Ácido 3 metil valérico	945	947			0,29	1,2
10	Benzaldeído	962	960	1497	1495	0,13	1,2
11	2- β - pineno	981	979	1089	1088	0,14	1,2
12	3- octenol	982	979	1388	1386	Traço	1,2
13	2- pentil furano	983	984			Traço	1,2
14	Octanal	996	997	1277	1280	Traço	1,2
15	(Z)-β-ocimeno	1050	1051	1264	1263	Traço	1,2
16	γ terpineno	1061	1060	1176	1178	0,10	1,2
17	Terpinoleno	1089	1088	1192	1195	0,15	1,2
18	Linalol	1101	1097	1506	1508	0,22	1,2
19	Nonanal	1103	1118	1387	1385	1,60	1,2
20	Borneol	1166	1162	1662	1660	0,74	1,2
21	n-Nonanol	1167	1169	1500	1502	0,15	1,2
22	Terpinen-4- ol	1174	1177	1567	1568	0,26	1,2
23	2-metóxi-3-(1-metil propil) pirazina	1187	1183			0,38	1,2
24	Ácido graxo de cadeia longa	-	-	-	-	0,13	1,2
25	Mirtenol	1199	1196	1749	1750	0,51	1,2
26	Citronelol	1229	1226	1759	1762	0,26	1,2
27	Decanal	1254	1251	1507	1506	0,40	1,2
28	(2-Z) Decenal	1267	1264	1608	1611	3,52	1,2
29	Acetato de bornila	1287	1289	1549	1551	1,19	1,2
30	(2-E,4-Z) decadienal	1293	1293	1634	1632	2,28	1,2
31	Tridecano	1299	1300	1304	1300	0,68	1,2
32	2-Undecanal	1305	1307	1708	1712	1,89	1,2
33	(2-E,4-E) decadienal	1317	1319	1711	1710	0,77	1,2
34	Sesquiterpeno oxigenado	1320	-			1,09	2
35	Sesquiterpeno oxigenado	1335	-			1,15	2
36	Sesquiterpeno oxigenado	1340	-			0,90	2
37	α-cubebena	1346	1350	1438	1438	4,35	1,2
38	Eugenol	1354	1357	2143	2141	1,15	1,2
39	Aldeído de cadeia longa	-	-	-	-	0,84	2
40	(+)-clicloisativeno	1369	1371	1549	1549	1,44	1,2
41	α-copaeno	1373	1377	1479	1477	2,33	1,2
42	Acetato de geranila	1380	1381	1715	1711	1,30	1,2
43	β-bourbuneno	1386	1388	1524	1524	1,96	1,2
44	(+)-sativeno	1392	1392	1593	1595	2,67	1,2
45	β-elemeno	1395	1393	1566	1565	0,82	1,2
46	Ácido graxo de cadeia longa	-	-	-	-	1,24	2
47	Ácido graxo de cadeia longa	-	-	-	-	1,01	2
48	(E)-cariofileno	1408	1409	1579	1578	6,25	1,2
49	Germacreno D	1483	1485	1709	1712	0,74	1,2
50	Valenceno	1498	1496	1724	1724	1,24	1,2
51	γ-cadineno	1515	1514	1737	1736	7,71	1,2
52	Isovalerato de metila	1518	1517			1,07	1,2
53	δ-cadineno	1524	1523	1732	1732	0,82	1,2
54	Quessano	1540	1539			0,60	1,2
55	α-calacoreno	1549	1546	2207	2207	1,28	1,2
56	Germacreno B	1563	1560	1860	1864	0,55	1,2

Continuação da Tabela IA ...

Nº	Nome do composto	Índice de retenção de Kovats (IR)				Conc (%)	Método de identificação
		a	b	c	d		
57	Tridecen-1-al	1568	1569			0,47	1,2
58	(+)-spatulanol	1574	1578	1750	1755	1,13	1,2
59	Benzanoato de hexila	1597	1597			1,50	1,2
60	Longiborneol	1601	1599			0,64	1,2
61	γ -eudesmol	1630	1631	2179	2182	0,96	1,2
62	Isoborneol	1634	1634	1653	1661	0,73	1,2
63	Valerenal	1670	1668			0,60	1
64	Valeranona	1675	1673			1,34	1
65	(Z, E)- α - bergamotol	1689	1691	1509	1505	1,15	1,2
66	(Z,E) - farnesol	1697	1697	2042	2044	0,68	1,2
67	Valerenal – isômero	1711	1708			0,90	1
68	14-hidrôxi - α - humuleno	1714	1714	1978	1975	0,82	1,2
69	(E,E)- Acetato de farnesila	1726	1726	1755	1755	0,72	1,2
70	Tetradecanoato de metila	1728	1727			7,65	1,2
71	(E)- β -santalol	1737	1740			5,31	1,2
72	6S,7R bisaboleno	1752	1750			1,15	1,2
73	Benzotato de benzila	1759	1760			1,11	1,2
74	Drimenol	1766	1767	2525	2525	0,26	1,2
75	n-pentadecanol	1775	1774			0,77	1,2
76	Acetato de (Z)- α -santalol	1780	1777			0,64	1,2
77	Acetato de γ - eudesmol	1783	1784			0,32	1,2
78	Tetradecanoato de etila -	1796	1795			0,77	1,2
79	n-octadecano	1800	1800	1801	1800	0,83	1,2
80	Acetato de (Z) epi- β -santalol	1806	1806			0,40	1,2
81	Hexadecanal – Aldeído palmítico	1815	1813	2154	2153	0,13	1,2
82	Éster do ácido 3 metil fenil benzenoacético	1827	1828			0,38	1,2
83	Tetradecanoato de isopropila	1831	1830			0,12	1,2
84	7-hidrôxi coumarina	1836	1836			0,13	1,2
85	Neofitadieno	1841	1837			0,14	1,2
86	Octanoato de fenil etila	1848	1847			0,26	1,2
87	Acetato de (Z) lanceol	1858	1857			0,52	1,2
88	Salicilato de benzila	1863	1865			0,51	1,2
89	n-Hexadecanol	1875	1871	2221	2218	0,66	1,2
90	Laureno	1881	1880			Traço	1,2
91	(8- isobutirilóxi) isobutanoato de isobornila	1892	1890			Traço	1,2
92	Acetato de (Z) valerenila	1894	1896			Traço	1
93	8S, 13 Cedrenediol	1898	1898			0,31	1,2
94	Acetato de fenil etil fenila	1912	1914			0,14	1,2
95	Hexadecanoato de metila	1921	1922			0,42	1,2
97	Fitol	1943	1943	2570	2571	0,27	1,2
98	Rimuneno	1964	1962			0,51	1,2
99	n-Eicosano	1986	1988			0,77	1,2
100	Hexadecanoato de etila	1991	1993			0,90	1,2
101	Hexahidrofarnesil acetona	2012	2014			0,77	1,2
102	Hexadecanoato de isopropila	2025	2022			0,26	1,2
103	Manool	2066	2057			0,38	1,2
104	n-Octadecanol	2078	2078			Traço	1,2
105	n-Eneicosano	2104	2104	2104	2100	0,10	1,2
106	Éster de ácido graxo de cadeia longa	2198	-			0,85	1,2

RI=índice de retenção; -; não foi possível determinar RI experimentalmente; tr:traços.

Identificação ou tentativa de identificação: a-coinjeção com padrões; comparação com RI experimental OV-5; b - comparação com RI da literatura, comparação com RI experimental e dados de espectro de massas com dados da literatura.

Tabela II A: Identificação dos picos apresentados na **Figura A2**, para os óleos essenciais de ramos e folhas de *Valeriana eichleriana*. Numeração apresentada na **Figura A2**.

Nº	Nome do composto	Índice de retenção de Kovats (RI)				Conc. %	Método de Identificação
		a	b	c	d		
1	Ácido 3 metil valérico	949	947			13,51	1
2	Benzaldeído	960	959	1497	1495	4,78	1,2
3	3 - Octenol	982	979	1388	1386	0,66	1,2
4	n-decano	1000	1000	998	1000	1,32	1,2
5	Limoneno	1026	1029	1194	1195	3,67	1,2
6	Fenil acetaldeído	1042	1039			2,78	1,2
7	Linalol	1095	1097	1506	1508	4,90	1,2
8	α -terpineol	1189	1187	1657	1652	1,46	1,2
9	n-dodecano	1200	1199	1201	1200	0,87	1,2
10	Alcano de cadeia longa	-	-	-	-	0,51	1,2
11	Isovalerato de (E)-3-hexenila	1244	1247			1,29	1
12	Geraniol	1251	1253	1750	1748	1,82	1,2
13	n-tridecano	1302	1300	1304	1300	1,32	1,2
14	Eugenol	1357	1359	2139	2141	1,40	1,2
15	α -copaeno	1377	1374	1480	1479	0,83	1,2
16	Isovalerato de benzila	1388	1385			2,04	1,2
17	n-tetradecano	1400	1400	1405	1400	1,20	1,2
18	(E)- α -bergamoteno	1432	1435	1510	1507	0,68	1,2
19	Ester de ácido graxo de cadeia longa	-	-	-	-	1,19	2
20	Epi - β -santaleno	1447	1450	1642	1638	0,60	1,2
21	β -santaleno	1460	1458	1650	1653	0,14	1,2
22	Alcano de cadeia longa	-	-			0,12	2
23	Isovalerato de linalila	1478	1475			0,44	1
24	(E)-nerolidol	1563	1560	1605	1605	Traço	1,2
25	Óxido de cariofileno	1583	1578	1970	1966	0,12	1,2
26	Sequiterno oxigenado	-	-			0,15	2
27	Tetradecanal - Miristaldeído	1612	1613	1667	1665	1,68	1,2
28	Ácido (E)-2-hexenoico	1616	1614	1962	1962	2,31	1,2
29	n-Tetradecanol	1673	1671			Traço	1,2
30	Neofitadieno	1842	1843			19,99	1,2
31	Hexadecanoato metila	1921	1922			0,53	1,2
32	Hexahidrofarnesil acetona	2013	2021			2,71	1,2
33	Ácido oléico	2080	2082	2436	2430	2,84	1,2
34	Linoleato de metila	2097	2098	2434	2430	6,19	1,2
35	Linoleato de etila	2195	2193			12,88	1,2
36	Álcool de cadeia longa	-	-			0,77	2

RI=índice de retenção; -; não foi possível determinar RI experimentalmente; tr: traços.

Identificação ou tentativa de identificação: a-coinjeção com padrões; comparação com RI experimental OV-5; b - comparação com RI da literatura, comparação com RI experimental e dados de espectro de massas com dados da literatura.

Tabela III A: Identificação dos picos apresentados na **Figura A3**, para os óleos essenciais de ramos e folhas de *Valeriana eupatoria*. Numeração apresentada na **Figura A3**.

Nº	Nome do composto	Índice de retenção de Kovats (RI)				Conc. %	Método de Identificação
		a	b	c	d		
1	(E)-2-hexenal	804	802	1190	1192	0,09	1,2
2	Furfural	836	829	1452	1455	0,61	1,2
3	Ácido isovalérico	836	836	1664	1665	5,12	1,2
4	Heptanal	900	902	1171	1174	0,09	1,2
5	Ácido 3 metil valérico	949	947			1,82	1,2
6	Benzaldeído	950	960	1497	1495	0,09	1,2
7	2 - pentil furano	983	984			0,11	1,2
8	(2-Z,4-Z) heptadienal	1000	1000	1370	1373	0,11	1,2
9	Limoneno	1026	1029	1185	1187	0,11	1,2
10	O-cimeno	1026	1026	1222	1225	0,07	1,2
11	(E)-β-ocimeno	1037	1039	1259	1257	0,08	1,2
12	(Z)-β- ocimeno	1050	1051	1240	1238	0,09	1,2
13	γ-terpineno	1061	1060	1175	1178	0,07	1,2
14	Terpinoleno	1088	1088	1197	1195	0,07	1,2
15	Linalol	1095	1097	1506	1508	2,66	1,2
16	Isovalerato de isopentinila	1103	1103			0,06	1,2
17	Borneol	1164	1165	1659	1660	0,02	1
18	α terpineol	1188	1189	1650	1652	0,72	1,2
19	Mirtenol	1199	1196	1751	1750	0,05	1,2
20	Decanal	1200	1202	1505	1506	0,59	1,2
21	Citronelol	1226	1226	1760	1762	0,02	1,2
22	Nerol	1228	1230	1755	1757	0,29	1,2
23	Neral	1238	1238	1678	1680	0,06	1,2
24	Isovalerato de hexila	1244	1245			0,13	1,2
25	Isovalerato de (E)-3-hexenila	1244	1247			0,18	1,2
26	Geraniol	1251	1253	1838	1842	0,89	1,2
27	(2-Z) decenal	1264	1264	1587	1590	0,21	1,2
28	Diidro acetato de linalila	1275	1275			0,12	1,2
29	Acetato de bornila	1282	1285	1598	1599	0,34	1,2
30	(2-E,4-Z) Decadienal	1293	1295	1634	1632	0,29	1,2
31	Acetato de 4-terpineol	1300	1300			0,25	1,2
32	(2-E,4-E)-Decadienal	1317	1319	1712	1710	2,02	1,2
33	(E) Dimetóxi citral	1341	1341			0,42	1,2
34	α-cubebeno	1352	1350	1440	1438	0,63	1,2
35	α-longipineno	1353	1353	1539	1541	0,81	1,2
36	Eugenol	1357	1359	2143	2141	0,34	1,2
37	α-copaeno	1377	1378	1551	1549	2,05	1,2
38	Acetato de geranila	1380	1381	1708	1711	3,18	1,2
39	Isovalerato de benzila	1388	1389			1,68	1,2
40	(E)-α-damascona	1396	1393			0,59	1,2
41	β-longipineno	1401	1402	1608	1612	0,26	1,2
42	(Z) cariofileno	1413	1409	1580	1578	1,08	1,2
43	4,8-α-epóxi cariofilano	1416	1416			0,62	1,2
44	(E)-cariofileno	1419	1422	1530	1533	0,19	1,2
45	β-copaeno	1433	1432	1621	1626	0,14	1,2
46	γ-elemeno	1438	1437	1641	1642	0,22	1,2
47	α-patchuleno	1458	1457			0,09	1,2
48	β-santaleno	1459	1459	1649	1653	1,62	1,2
49	Deidro aromadendreno	1462	1465			0,21	1,2
50	Dodecen-1-ol	1474	1472			0,72	1,2
51	β-ionona	1480	1482	1910	1912	1,21	1,2
52	Isovalerato fenil etila	1492	1491			0,75	1,2
53	Valenceno	1496	1496	1724	1722	1,02	1,2
54	Biciclogermacreno	1499	1498	1742	1744	0,18	1,2
55	γ-cadineno	1514	1515	1792	1792	2,77	1,2
56	δ-cadineno	1523	1521	1781	1784	0,63	1,2

Continuação da Tabela III A ...

Nº	Nome do composto	Índice de retenção de Kovats (RI)				Conc. %	Método de Identificação
		a	b	c	D		
57	Quessano	1543	1539			0,39	1,2
58	Maaliol	1558	1558			0,27	1,2
59	Germacreno B	1561	1561	1867	1864	3,65	1,2
60	(+) spatulenol	1575	1578	2154	2153	1,44	1,2
61	Isovalerato de nerila	1586	1584			0,68	1,2
62	Viridiflorol	1593	1593	2104	2103	0,54	1,2
63	Carotol	1595	1594			0,36	1,2
64	Dodecanoato de etila	1595	1595			1,09	1,2
65	Tetradecanal – Aldeído mirístico	1612	1613	2152	2153	5,73	1,2
66	(E)-acetato de isoeugenol	1616	1618			0,36	1,2
67	Valerianol	1627	1625	2230	2231	0,61	1
68	δ -eudesmol	1631	1631	2178	2182	0,20	1,2
69	Isoborneol	1634	1634	1508	1506	0,18	1,2
70	Epóxi alloaromadendreno	1641	1641			0,08	1,2
71	β -eudesmol	1650	1651	2245	2248	0,52	1,2
72	Valerianol	1661	1658			0,30	1
73	Valeranal	1669	1668			0,49	1
74	Valeranona	1673	1673			0,13	1
75	Ácido valerênico	1684	1686			0,83	1
76	(Z,E)- α - bergamotol	1690	1691			1,23	1,2
77	(Z,E)-farnesol	1701	1697			0,45	1,2
78	Valeranal – isômero	1708	1711			0,67	1
79	Tetradecanoato de metila	1721	1724	1997	1999	1,79	1,2
80	(E)- β -santalol	1741	1740	1657	1660	3,06	1,2
81	Isospatulenol	1778	1777			2,67	1,2
82	Acetato de α -bisabolol	1798	1798			0,54	1,2
82	Isovalerato de isoeugenila	1810	1814			0,36	1,2
83	Hexadecanal- aldeído palmítico	1817	1816	2153	2153	0,32	1,2
84	(Z)- β -santalol	1820	1819			0,53	1,2
85	Neofitadieno	1843	1837			1,98	1,2
86	Salicilato de benzila	1866	1965			0,68	1,2
87	n-hexadecanol	1875	1876	2222	2218	0,35	1,2
88	(Z)-acetato de valerenila	1897	1896			0,33	1,2
89	Acetato de fenil etil fenila	1915	1914			4,90	1,2
90	Hexadecanoato metila	1922	1922			0,39	1,2
91	Fitol	1945	1943			0,13	1,2
92	Isovalerato de (Z) valerenila	1985	1984			0,18	1
93	Hexadecanoato de etila	1991	1993	2432	2430	0,56	1,2
94	Hexahidrofarnesil acetona	2013	2014			0,16	1,2
95	Isovalerato de (E) valerenila	2020	2021			0,27	1,2
96	Ácido oleico	2080	2082	2430	2430	0,11	1
97	Linoleato de metila	2097	2096	2430	2430	5,89	1,2
98	Linoleato de etila	2123	2125			4,40	1,2
99	Sequiteropeno oxigenado	2146	-			0,64	1,2
100	Ácido dodecanoico	2162	2159	2515	2517	3,55	1,2
101	Sequiteropeno oxigenado	2176	-			0,59	1,2
102	n-docoseno	2190	2190	2202	2200	0,83	1,2
103	Éster de ácido graxo de cadeia longa	2198	-			0,85	1,2
104	Sequiteropeno oxigenado	2297	-			3,61	1,2
105	Álcool de cadeia longa	2351	-			1,03	1,2
106	Maanol	2362	2360			0,27	1,2

RI=índice de retenção; -: não foi possível determinar RI experimentalmente; tr: traços.

Identificação ou tentativa de identificação: a-coinjeção com padrões; comparação com RI experimental OV-5; b - comparação com RI da literatura, comparação com RI experimental e dados de espectro de massas com dados da literatura.

Tabela IV A: Identificação dos picos apresentados na **Figura A4**, para os óleos essenciais de ramos e folhas de *Valeriana glechomifolia*. Numeração apresentada na **Figura A4**.

Nº	Nome do composto	Índice de retenção de Kovats (RI)				Conc. %	Método de Identificação
		a	b	c	d		
1	Butanoato de etila	804	804			1,61	1,2
2	Ácido isovalérico	836	836	1664	1665	2,37	1,2
3	Decano	1001	1000	1000	1000	1,05	1,2
4	Limoneno	1029	1027	1185	1187	0,12	1,2
5	1,8 cineol	1031	1031	1225	1228	0,33	1,2
6	Undecano	1100	1100	1105	1100	0,18	1,2
7	Isovalerato de (Z)-3-hexenila	1244	1245			0,11	1,2
8	Isovalerato de (E)-2-hexenila	1247	1249			0,46	1,2
9	α -cubebeno	1351	1349	1483	1481	0,72	1,2
10	α -copaeno	1377	1375	1552	1551	5,51	1,2
11	Isovalerato de benzila	1388	1386			0,95	1,2
12	β -elemeno	1391	1389	1605	1608	1,81	1,2
13	(E)- β -cariofileno	1409	1408	1534	1533	8,24	1,2
14	α -humuleno	1453	1455	1675	1672	4,28	1,2
15	β -santaleno	1460	1459	1655	1653	2,63	1,2
16	Aromadendreno	1463	1462	1648	1650	0,70	1,2
17	α -amorfeno	1485	1483	1690	1691	12,35	1,2
18	Germacreno D	1485	1486	1717	1712	2,20	1,2
19	(E)- β -ionona	1489	1490	1910	1912	0,88	1,2
20	Biciclogermacreno	1496	1497	1748	1744	0,46	1,2
21	α -muurulleno	1500	1499	1727	1730	0,68	1,2
22	γ -patchuleno	1501	1502			0,84	1,2
23	γ -cadineno	1514	1515	1792	1792	0,65	1,2
24	δ -cadineno	1523	1523	1781	1784	11,33	1,2
25	(E)-cadinina-1(2),4 dieno	1535	1532	1784	1786	0,65	1,2
26	α -calacoreno	1547	1547	1928	1926	2,93	1,2
27	(Z)-éter cadineno	1554	1552			1,17	1,2
28	(E)-nerolidol	1563	1561	2004	2000	1,62	1,2
29	Ácido dodecanoico	1567	1565			7,94	1,2
30	Benzoato de (Z)-3-hexenila	1567	1567			2,11	1,2
31	Tridecanol	1572	1573			0,19	1,2
32	α -epóxi cedreno	1575	1574	1950	1951	1,01	1,2
33	(+) spatulenol	1578	1579	2150	2153	1,07	1,2
34	Benzoato de hexila	1580	1581	1803	1805	2,11	1,2
35	(-) oxido de cariofileno	1583	1582	1996	2000	1,33	1,2
36	Globulol	1585	1586	2101	2104	1,19	1,2
37	Viridiflorol	1593	1594	2102	2103	1,07	1,2
38	Cedrol	1600	1600	2098	2100	0,06	1,2
39	Isovalerato de geranila	1607	1607	1820	1821	2,01	1,2
40	Tetradecanal - Adeído mirístico	1612	1613			3,56	1,2
41	Hexadecanal - Aldeído palmítico	1817	1815	2150	2153	0,77	1,2
42	Neofitadieno	1843	1837			8,15	1,2
43	Hexahidrofarnesil acetona	2018	2021			0,59	1,2

RI=índice de retenção; -: não foi possível determinar RI experimentalmente; tr: traços.

Identificação ou tentativa de identificação: a-coinjeção com padrões; comparação com RI experimental OV-5; b - comparação com RI da literatura, comparação com RI experimental e dados de espectro de massas com dados da literatura.

Tabela V A: Identificação dos picos apresentados na **Figura A5**, para os óleos essenciais de ramos e folhas de *Valeriana saricarifolia*. Numeração apresentada na **Figura A5**.

Nº	Nome do composto	Índice de retenção de Kovats (RI)				Conc. %	Método de Identificação
		a	b	c	d		
1	Ácido isovalérico	836	835	1664	1665	1,31	1,2
2	Ácido 3 metil valérico	947	945			0,20	1,2
3	Éster de ácido graxo	-	-			0,70	2
4	(E)-2- octenol	995	997			0,30	1,2
5	Linalol	1101	1099	1540	1556	4,63	1,2
6	Alfa-terpineol	1134	1134	1660	1687	2,82	1,2
7	Nerol	1226	1226	1769	1771	2,37	1,2
8	Isovalerato de (Z)-3-hexenila	1244	1244			0,27	1
9	Isovalerato de (E) -2-hexenila	1247	1246			0,24	1
10	Geraniol	1253	1250	1841	1842	2,28	1,2
11	2-(E)-decenal	1264	1262	1587	1590	0,15	1,2
12	Geranial	1267	1266	1729	1730	0,12	1,2
13	Formato de citronelila	1274	1272	1598	1600	0,12	1,2
14	(2-E,4-Z) decadienal	1293	1291	1707	1710	0,21	1,2
15	Formato de geranila	1298	1296	1687	1684	0,47	1,2
16	(2-E,4-E) decadienal	1317	1315	1630	1632	0,40	1,2
17	α -longipineno	1353	1352	1538	1541	0,24	1,2
18	(Z)- α -damascona	1358	1356			0,25	1,2
19	Eugenol	1361	1359	2137	2141	0,32	1,2
20	β -damascenona	1364	1365	1801	1801	0,60	1,2
21	Isovalerato de benzila	1388	1387			6,73	1,2
22	(E)- β -damascona	1387	1389	1802	1805	0,81	1,2
23	(Z) – cariofileno	1419	1418	1530	1533	0,33	1,2
24	β -gurjuneno	1424	1424	1654	1656	1,16	1,2
25	α -(E)-bergamoteno	1435	1435	1777	1779	6,93	1,2
26	Acetato de nerila	1436	1437	1740	1742	0,22	1,2
27	Éster de ácido graxo de cadeia longa	-	-	-	-	0,19	2
28	α -humuleno	1455	1455	1674	1672	0,37	1,2
29	Alloaromadendreno	1460	1458	1648	1650	0,18	1,2
30	α -amorfenol	1485	1483	1688	1691	0,22	1,2
31	Germacrene D	1486	1485	1696	1692	0,30	1,2
32	(E)- β – ionona	1489	1488	1910	1912	0,93	1,2
33	Isovalerato de fenil etil	1491	1490			1,03	1,2
34	δ -cadineno	1523	1523	1760	1760	0,41	1,2
35	Valerato de citronelila	1558	1556	1705	1705	0,78	1,2
36	(+)-spatuleno	1578	1576	2125	2129	0,84	1,2
37	Óxido de cariofileno	1586	1583	1864	1867	1,93	1,2
38	Dodecanoato de etila	1595	1595			0,32	1,2
39	Isovalerato de geranila	1607	1605	1794	1795	1,68	1,2
40	Germacrene B	1635	1633	1570	1572	2,15	1,2
41	Sesquiterpeno oxigenado	1637	1637			0,71	1,2
42	α -muurulol	1646	1641	2151	2148	0,62	1,2
43	α -cadinol	1654	1653	1895	1891	0,51	1,2

Continuação da Tabela V A ...

Nº	Nome do composto	Índice de retenção de Kovats (RI)				Conc. %	Método de Identificação
		a	b	c	d		
44	Valerianol	1658	1659	2228	2231	4,19	1
45	Valeranona	1673	1672			0,53	1
46	Valerenol	1734	1730			0,71	1
47	Ácido graxo de cadeia longa	-	-	-	--	0,43	2
48	Ácido graxo de cadeia longa	-	-	-	-	1,35	2
49	Ácido graxo de cadeia longa	-	-	-	-	7,08	2
50	Sesquiterpeno hidrocarbonado	-	-	-	-	0,66	2
51	Neofitadieno	1842	1837	-	-	1,25	2
52	Sesquiterpeno oxigenado	-	-	-	-	2,40	2
53	Ácido graxo de cadeia longa	-	-	-	-	3,55	2
54	Ácido graxo de cadeia longa	-	-	-	-	27,91	2
55	Éster de ácido graxo de cadeia longa	-	-	-	-	2,38	2
56	Fitol	1943	1943	2568	2571	0,57	1,2

RI=índice de retenção; -; não foi possível determinar RI experimentalmente; tr:traços.

Identificação ou tentativa de identificação: a-coinjeção com padrões; comparação com RI experimental OV-5; b - comparação com RI da literatura, comparação com RI experimental e dados de espectro de massas com dados da literatura.

Tabela A VI: Identificação dos picos apresentados na **Figura A6**, para os óleos essenciais de ramos e folhas de *Valeriana scandens*. Numeração apresentada na **Figura A6**.

Nº	Nome do composto	Índice Retenção de Kovats (IR)				C.onc %	Método de Identificação
		a	b	c	d		
1	Pentanoato de metila	827	827			0,07	1,2
2	Ácido isovalérico	836	836	1664	1665	1,41	1,2
3	Hexenol	865	865	1358	1360	0,90	1,2
4	Heptanal	903	903	1171	1174	0,12	1,2
5	2,5-dietil 2-metil tetrahydrofurano	916	921			0,11	1,2
6	α -pineno	939	933	1021	1020	0,90	1,2
7	Canfeno	954	954	1077	1075	0,32	1,2
8	Verbeno	968	968			0,48	1,2
9	β -pineno	979	977	1108	1109	0,08	1,2
10	m-menta -1(7)8 dieno	1001	1001			1,53	1,2
11	p-menta -1(7)8 dieno	1004	1004			0,23	1,2
12	Limoneno	1029	1029	1189	1190	1,94	1,2
13	Linalol	1097	1097	1549	1553	1,71	1,2
14	Undecano	1100	1100	1100	1100	0,24	1,2
15	Dodecano	1200	1200	1202	1200	0,66	1,2
16	Isovalerato de hexila	1240	1238			0,28	1,2
17	Isovalerato (E)-2-hexenila	1245	1242			0,37	1,2
18	Isovalerato (Z)-3-hexenila	1247	1247			0,27	1,2
19	Acetato de linalila	1257	1257	1519	1522	0,09	1,2
20	n-Tridecano	1300	1300	1304	1300	2,33	1,2
21	Undecenal	1308	1308			0,78	1,2
22	n-Tetradecano	1400	1400	1402	1400	1,68	1,2
23	Isoeugenol	1407	1407			0,11	1,2
24	α -gurjuneno	1410	1411	1591	1587	0,24	1,2
25	(E)-cariofileno	1409	1407	1617	1610	0,24	1,2
26	Isobutanoato de isobornila	1434	1434			2,90	1,2
27	Propanoato de citronelila	1446	1446			0,35	1,2
28	α -humuleno	1455	1455	1665	1664	0,70	1,2
29	Germacreno D	1485	1483	1696	1698	0,94	1,2
30	β -selineno	1490	1490	1715	1710	1,76	1,2
31	Biciclogermacreno	1500	1500	1731	1733	0,51	1,2
32	γ -patchuleno	1504	1504			0,17	1,2

Continuação da tabela A VI ...

Nº	Nome do composto	Índice Retenção de Kovats (RI)				Conc. %	Método de Identificação
		a	b	c	d		
33	(Z)-nerolidol	1533	1533	1961	1964	2,37	1,2
34	Diidroacetato de eugenol	1538	1538			0,67	1,2
35	Valerato de citronelila	1558	1556			0,07	1,2
36	Germacreno B	1561	1559	1572	1570	0,28	1,2
37	Benzoato de 2-(E) hexila	1588	1588			3,78	1,2
38	n-hexadecano	1600	1600	1604	1600	1,34	1,2
39	Tetradecanal – Aldeído mirístico	1613	1613	1663	1665	0,19	1,2
40	Acetato de isoeugenol	1615	1615			8,15	1,2
41	Cedranona	1630	1630			3,04	1,2
42	Amil cinamaldeído	1649	1649			0,55	1,2
43	Valerianol	1656	1656	2233	2231	9,89	1,2
44	Pentanoato de geranila	1657	1657			15,78	1,2
45	Acetato de (Z) nerolidol	1678	1678			0,91	1,2
46	Epi- α -bisabolol	1685	1684	2219	2217	0,20	1,2
47	Acetato de longiborneol	1686	1686			0,79	1,2
48	(E,E)- α - Bergamotol	1682	1681			0,72	1,2
49	Zinzal	1697	1697			0,85	1,2
50	Valerenol	1734	1731			5,54	1,2
51	n-Pentadecanol	1775	1775			4,55	1,2
52	n-Hexadecanol	1777	1778	2221	2218	0,78	1,2
53	Acetato de fenil etil fenila	1914	1914			6,54	1,2
54	Fitol	1943	1944	2568	2571	5,62	1,2
55	Isobergapteno	2035	2038			0,09	1,2
56	Antranilato de citronelila	2167	2167			2,88	1,2

RI=índice de retenção; -: não foi possível determinar RI experimentalmente; tr: traços.

Identificação ou tentativa de identificação: a-coinjeção com padrões; comparação com RI experimental OV-5; b - comparação com RI da literatura, comparação com RI experimental e dados de espectro de massas com dados da literatura.

Tabela VII A: Identificação dos picos apresentados na **Figura A7**, para os óleos essenciais de ramos e folhas de *Valeriana tajuensis*. Numeração apresentada na **Figura A7**.

Nº	Nome do composto	Índice Retenção de Kovats (RI)				Conc. %	Método de Identificação
		a	b	c	d		
1	Pentanal	706	706	934	935	0,04	1,2
2	(E)-Octeno	821	821			0,04	1,2
3	Ácido isovalérico	836	835	1664	1665	0,38	1,2
4	α -pineno	939	939	1033	1032	0,01	1,2
5	Canfeno	954	954	1083	1084	0,03	1,2
6	Heptanol	967	967	1271	1273	0,01	1,2
7	β -pineno	979	979	1124	1127	0,01	1,2
8	(Z)-pineno	986	989	1075	1078	0,38	1,2
9	Mirceno	991	984	1156	1154	0,04	1,2
10	Limonene + 1,8 cineol	1029	1029	1196	1206	0,04	1,2
11	1,8 cineol	1031	1031	1127	1129	0,34	1,2
12	Pentanoate de pentinila	1059	1058	1928	1929	0,06	1,2
13	Acetophenona	1065	1065	1642	1645	0,01	1,2
14	n-octanol	1067	1068	1387	1389	0,03	1,2
15	(Z)-Oxido de linalol	1071	1073	1417	1420	0,03	1,2
16	α -terpinoleno	1093	1089	1192	1195	0,06	1,2
17	Linalool	1101	1099	1540	1556	0,13	1,2
18	α -terpineol	1134	1134	1646	1647	0,09	1,2
19	Acetato de isobornila	1295	1286	1582	1587	0,03	1,2
20	Monoterpeno oxigenado	1334	-	-	-	0,25	1,2
21	α -cubebeno	1354	1351	1597	1626	0,06	1,2
22	Hidróxi eugenol	1367	1369	2137	2141	0,04	1,2

Continuação da tabela VII A...

N°	Nome do composto	Índice Retenção de Kovats (IR)				Conc. %	Método de Identificação
		a	b	c	d		
23	α -ylangeno	1374	1375	1500	1525	0,15	1,2
24	α -copaeno	1378	1377	1626	1627	4,14	1,2
25	Acetato de geranila	1380	1381	1754	1726	1,46	1,2
26	(Z)- β -damascenona	1387	1387	1801	1801	2,61	1,2
27	β -bourbuneno	1401	1388	1582	1585	1,72	1,2
28	(E)-cariofileno	1406	1409	1596	1594	4,74	1,2
29	Nerona	1414	1414			1,74	1,2
30	p - 2,5 dimetóxi cimeno	1427	1427	1270	1272	0,21	1,2
31	Butanoato isobornila	1435	1434	1676	1679	0,28	1,2
33	α - humuleno	1454	1455	1868	1874	2,36	1,2
34	Alloaromadrendeno	1469	1460	1662	1660	1,78	1,2
35	Germacreno D	1488	1485	1696	1692	1,15	1,2
36	Valenceno	1496	1496	1722	1718	6,36	1,2
37	Biciclogermacreno	1499	1500	1731	1731	3,08	1,2
38	α - muuruleno	1502	1500	1378	1389	0,57	1,2
39	(E)-calameneno	1516	1512	1837	1828	1,96	1,2
40	δ -cadineno	1528	1523	1760	1760	5,46	1,2
41	(Z)-nerolidol	1536	1533	2000	2000	0,46	1,2
42	Quessano	1541	1539			0,31	1,2
43	Elemol	1548	1550	2078	2081	0,74	1,2
44	Éter cadineno	1553	1554	1761	1760	0,74	1,2
45	(E) éter cadineno	1557	1559	1714	1718	3,30	1,2
46	β - ionona	1567	1567	1908	1912	0,41	1,2
47	Sequiterpeno oxigenado	1571	-			0,37	1,2
48	(-)-Óxido de cariofileno	1586	1583	1864	1867	0,59	1,2
49	Viridiflorol	1592	1593	2112	2115	0,46	1,2
50	Carotol	1599	1595			1,15	1,2
51	Tetradecanal -Aldeído mirístico	1610	1610	1665	1660	1,19	1,2
52	(Z) isolongifolano	1614	1613	1541	1544	0,50	1,2
53	(E) isolongifolano	1618	1627	1612	1619	2,09	1,2
54	Diidromirceno	1622	1621			1,06	1,2
55	Isoborneol	1631	1632	2182	2178	0,38	1,2
56	Epi- α -cadinol	1638	1640	2224	2223	0,56	1,2
57	α -cadinol	1656	1654	1895	1891	0,24	1,2
58	7-epi- α -eudesmol	1664	1664	2224	2223	0,56	1,2
59	Valeranona	1670	1673	1617	1619	1,38	1,2
60	Drimenol	1795	1793	2522	2525	1,69	1,2
61	Benzoato de (Z) 3-hexenila	1809	1811			0,52	1,2
62	Acetato de (Z)- β -santalol	1819	1819			0,35	1,2
63	Antranilato (Z) 3-hexenila	1822	1821	2260	2265	0,41	1,2
64	Éster do ácido 3 metil, etil benzenoacético	1828	1828			2,36	1,2
65	Salicilato de benzila	1868	1866			0,62	1,2
66	n-hexadecanol	1876	1876	2220	2218	0,46	1,2
67	Isobutanoato isobornila	1890	1890			2,71	1,2
68	Cubenol	1944	1944	2037	2035	0,82	1,2
69	Ácido palmítico	1948	1946			0,49	1,2
70	Acetato de (Z) valerenila	1975	1977			0,50	1,2
71	Isovalerato (Z) valerenila	1982	1984			0,56	1,2
72	Eicosano	1991	1988	2002	2000	2,03	1,2
73	Ácido graxo de cadeia longa	-	-			7,54	1,2
74	Palmitato de etila	-	-	2247	2250	1,15	1,2
75	7 hidróxi 4,8 dimetil coumarina	2011	2014			0,15	1,2
76	Isovalerato de (E) valerenila	2022	2024			0,72	1,2
77	Isopentanoato de isopropila	2028	2025			0,52	1,2
78	Santalol	2067	2062	1658	1660	0,44	2
79	Éster de ácido graxo de cadeia longa	-	-			0,96	2
80	Éster de ácido graxo de cadeia longa	-	-			1,18	2
81	Éster de ácido graxo de cadeia longa	-	-			0,40	2

RI=índice de retenção; -; não foi possível determinar RI experimentalmente; tr:traços.

Identificação ou tentativa de identificação: a-coinjeção com padrões; comparação com RI experimental OV-5; b - comparação com RI da literatura, comparação com RI experimental e dados de espectro de massas com dados da literatura.

9.2 Anexo II

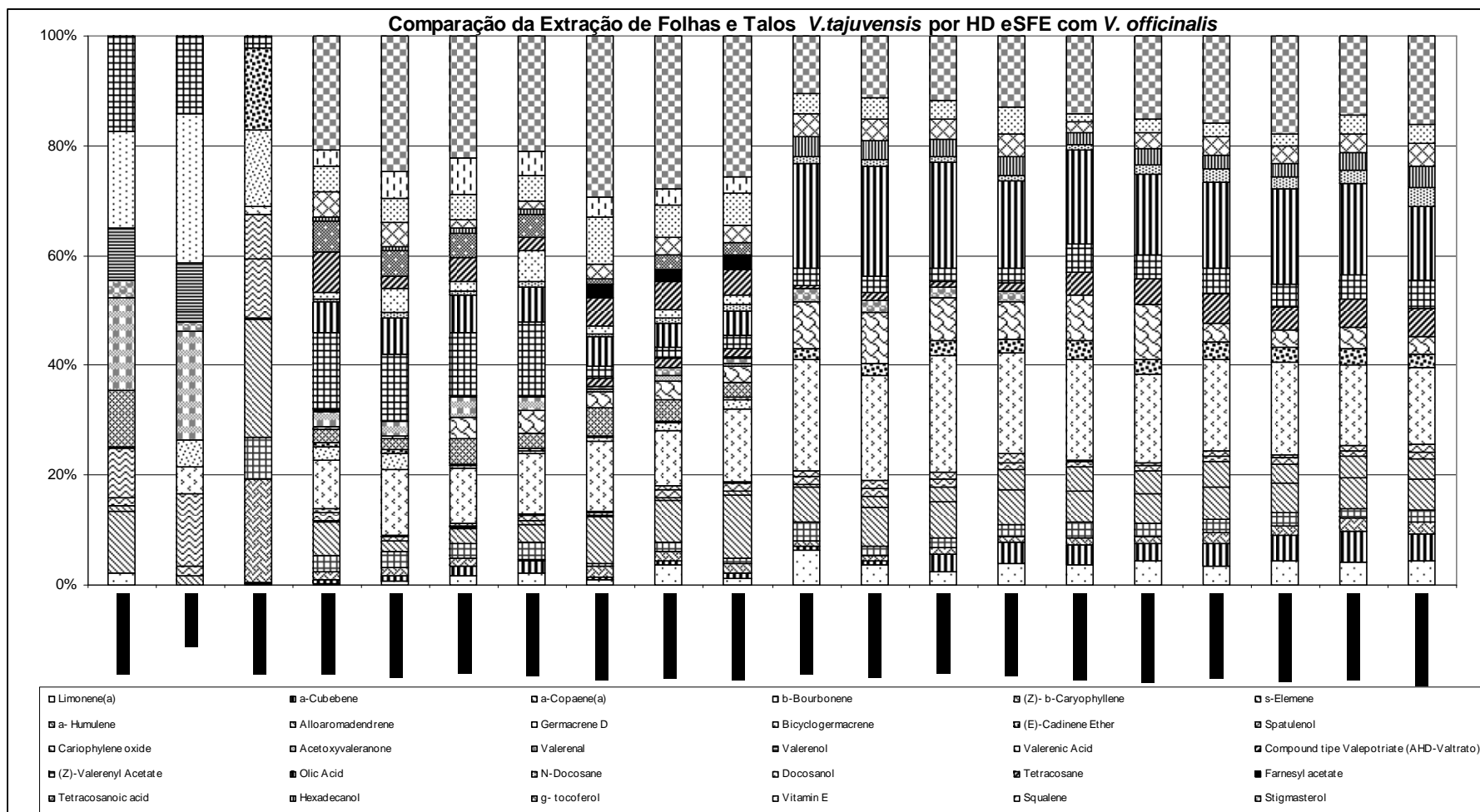


Figura A 8: Distribuição dos compostos mais abundantes em extratos de SFE de folhas e talos de *V. tajuensis* comparada a HD e SFE *V. officinalis*, * *Vt.* folhas ou talos + temperatura e pressão do solvente extrator = R1-R17.

Tabela VIII A: Identificação dos picos relacionados à composição dos extratos obtidos por SFE de talos e folhas de *V. tajuensis* em diferentes condições de T e P.

Compostos	RI OV5	RI Wax	V.o _HD	SFE 14	V. t _HD	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17
Pentanal	706	-	-	-	0,04	0,16	0,12	0,80	1,26	1,04	2,45	2,35	0,07	0,25	0,71	1,85	1,02	1,35	2,01	2,44	2,65	2,96
2-(E)-Octeno	821	-	-	-	0,04	0,34	0,21	0,35	0,45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido isovalérico ^(a)	836	1665	0,90	23,80	0,38	1,63	0,90	0,50	1,89	1,56	1,91	1,01	0,49	1,55	1,50	2,56	2,05	2,14	2,08	2,49	2,58	2,65
a-Pineno ^(a)	939	1014	1,40	0,01	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Camfeno ^(a)	954	1050	2,10	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-(Z)-Heptanol	944	-	-	-	0,01	0,14	0,12	0,45	1,26	-	-	-	1,07	1,25	1,30	1,42	-	-	-	-	-	-
B-Pineno ^(a)	979	1089	0,50	-	-	0,37	0,41	0,56	1,52	-	-	-	1,42	1,47	1,45	1,54	-	-	-	-	-	-
1-Octen-3-ol	991	1387	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n- Octanal	999	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
p-Cimeno ^(a)	1025	-	0,10	-	-	0,26	0,12	0,34	0,58	0,08	0,29	0,17	0,08	0,12	0,32	0,37	0,09	0,07	0,14	0,25	0,35	0,95
Limoneno ^(a)	1029	1187	1,00	-	0,04	0,18	0,35	1,05	1,41	0,35	1,91	0,66	1,45	0,93	0,72	1,50	0,89	1,32	0,98	1,49	1,51	2,01
1,8-Cineol ^(a)	1031	1129	0,30	-	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pentanoato de pentila	1056	-	-	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetofenona	1065	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxido de (Z)- linalool	1087	1438	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -terpinoleno ^(a)	1089	-	-	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalool ^(a)	1097	1540	-	-	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Borneol ^(a)	1169	1660	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Terpineol ^(a)	1177	1568	-	-	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citronellol ^(a)	1226	1597	0,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato bornila	1289	-	11,60	7,10	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato mirtenila	1327	-	1,30	0,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato a-terpinila	1349	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Cubebano	1350	1438	0,00	-	0,06	0,35	0,58	0,89	1,34	0,23	0,45	0,69	0,18	0,21	1,01	1,54	0,85	0,96	1,23	1,55	1,97	2,23
Eugenol ^(a)	1359	2141	0,00	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Ylangeno	1375	-	0,00	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Copaeno ^(a)	1377	1626	0,00	-	4,14	0,68	0,74	0,85	0,17	0,74	0,92	0,98	0,21	0,24	0,30	0,36	0,31	0,35	0,56	0,59	0,87	0,94
b-Elemeno	1391	1565	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato geranila	1381	1711	0,00	-	1,46	0,23	0,19	0,27	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b-Bourboneno	1388	1524	0,00	-	1,72	1,48	1,54	1,52	1,87	0,20	0,87	0,59	0,74	0,42	0,57	0,85	0,67	0,78	0,74	0,78	0,54	0,97
(Z)-b-Damascona	1387	1801	0,00	-	2,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Z)- b-Cariofileno	1409	1617	5,10	-	4,74	2,95	1,03	1,60	2,09	3,41	4,16	6,64	1,44	1,82	1,97	2,41	1,34	1,57	1,74	1,85	1,99	2,56
a-Gurjuneno	1410	1587	1,20	0,70	-	0,18	0,25	0,21	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Z)-Nerono	1414	-	-	-	1,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continuação ...Tabela VIII A.

Compostos	RI OV5	RI Wax	V.o _HD	SFE 14	V. t _HD	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	
2,5 Dimetóxi p-Cimeno	1427	1272	-	-	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isobutanoato Isobornila	1434	1679	-	-	0,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b-Gurjuneno	1434	1656	0,40	0,30	-	0,23	0,35	0,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
s-Elemeno	1437	1642	0,40	0,70	0,07	0,15	0,05	0,14	0,37	0,12	0,19	0,52	0,14	0,52	0,78	1,37	1,08	1,27	1,35	1,17	1,39	1,62	
a-Humuleno	1455	1672	0,70	0,60	2,36	0,78	0,35	0,13	0,59	0,12	0,81	0,77	0,31	0,39	0,45	0,52	0,21	0,27	0,30	0,34	0,36	0,54	
Allo aromadendreno	1460	1650	4,10	5,20	1,78	0,30	0,11	0,24	0,24	0,14	0,48	0,15	0,25	0,37	0,41	0,65	0,10	0,17	0,24	0,22	0,34	0,71	
Deidro Aromadendreno	1463	-	2,70	2,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b-Chamigreno	1478	-	0,40	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacreno D	1485	1715	0,00	1,90	0,30	4,37	6,25	5,83	6,84	4,98	5,29	7,85	4,61	4,89	6,37	6,97	4,37	4,85	4,91	5,64	5,21	6,33	
a-amorpheno	1485	1691	0,00	-	1,15	0,50	0,62	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-b-Ionona	1489	1912	0,40	-	-	-	-	tr	tr	0,16	0,25	0,20	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-
b-Selineno	1490	1710	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cis-b-guaieno	1493	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valenceno	1496	1718	-	-	6,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Muuruleno	1499	1714	-	-	0,57	0,25	0,41	0,11	0,17	0,05	0,22	0,10	0,98	1,04	1,28	2,31	2,07	2,15	2,18	2,20	2,67	2,91	
Biclogermacreno	1499	1731	0,10	1,90	3,08	1,23	1,52	0,23	0,31	0,32	0,77	0,95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
g-Cadineno	1514	1792	0,50	-	-	0,03	0,09	0,08	0,10	0,02	0,06	0,05	0,01	0,05	0,03	0,08	-	-	-	-	-	-	-
s-Cadineno	1523	1760	0,80	-	5,46	3,45	3,81	3,98	0,19	0,07	0,19	0,25	0,14	0,21	0,17	0,22	0,35	0,56	0,62	0,48	0,49	0,61	
(E)-Calameneno	1529	1828	-	-	1,96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b-bisaboleno	1506	1746	0,40	0,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(E)-Nerolidol	1533	2000	-	-	0,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quessano	1539	1927	3,30	0,70	0,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Elemol	1550	2078	0,40	-	0,74	0,14	0,29	0,41	0,56	0,17	0,29	0,32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Èter (Z)-Cadinene	1552	1761	-	-	0,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Èter (E)-Cadinene	1559	1714	-	-	3,30	0,33	0,38	0,19	0,22	0,14	0,22	0,27	0,40	0,59	0,85	0,99	0,78	0,81	0,89	0,92	1,00	1,03	
Germacreno B	1560	1570	1,00	2,00	-	-	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b-Ionono	1567	1912	-	-	0,41	-	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tridecen-1-al	1569	-	-	-	0,59	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espatuleno	1578	1750	4,70	-	-	1,24	1,01	2,65	1,74	1,96	2,09	1,61	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Óxido de cariofileno	1583	1966	-	-	-	0,23	0,27	2,20	2,56	1,15	1,81	1,69	1,98	2,35	2,33	2,56	2,01	2,97	1,04	1,06	1,39	1,47	
Globulol	1585	2104	2,10	0,80	-	0,58	0,69	0,78	0,83	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continuação ...Tabela VIII A

Compostos	RI OV5	RI Wax	V.o _HD	SFE 14	V. t _HD	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17
Copaen-4-ol	1591	-	-	-	-	4,60	4,50	8,03	5,95	5,21	7,94	7,35	4,28	4,92	5,87	5,93	5,69	5,86	5,91	5,77	5,99	6,75
Viridiflorol	1593	2112	-	-	0,46	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Guaiol	1601	-	-	0,40	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Tetradecanal	1610	1663	-	-	1,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-epi-g-Eudesmol	1624	-	0,60	0,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diidromirceno	1621	-	-	-	1,06	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetóxivaleranonona	1627	-	7,60	7,70	-	1,34	1,39	2,20	1,44	0,22	0,56	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-isobutirilóxi Isoborneol	1634	-	-	-	0,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-epi-a-Cadinol	1640	-	2,80	-	0,56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hinesol	1642	-	-	1,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
b-Eudesmol	1651	2248	1,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Cadinol	1653	1891	-	-	0,24	0,33	0,25	0,08	0,21	0,12	0,31	0,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valerenal	1658	-	1,50	0,60	-	0,16	0,05	0,07	0,23	0,21	0,78	0,62	0,51	0,57	0,60	0,76	-	-	-	-	-	-
Valeranonona	1675	-	1,70	-	1,38	0,33	0,10	1,56	1,23	0,91	1,51	1,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato elemol	1681	-	-	0,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Valerenol	1684	-	4,30	4,20	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido valerenico	1684	-	8,00	10,60	-	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Epi-a-Bisabolol	1685	-	0,60	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato (Z)-a- trans-bergamotol	1690	-	1,10	0,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Z)-Isolongifolano	1727	1719	-	-	0,50	0,58	0,71	1,10	0,73	0,14	0,12	0,19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14-Hidróxi-a- muuroloeno	1780	-	0,20	1,10	-	tr	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Drimenol	1767	2525	-	-	1,69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzoato de 3-(Z)- Hexenila	1811	-	-	-	0,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
(Z)-b-Santalol	1819	-	-	-	0,35	0,14	0,15	0,13	0,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antranilato de 3- (Z)-hexenila	1821	2260	-	-	0,41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetradecanoate de 3- metil fenil benzeneacético	1827	-	-	-	2,36	8,72	6,84	10,95	6,85	1,15	1,66	1,45	5,45	5,89	6,63	7,84	5,61	5,60	5,74	6,10	6,87	8,17
Tetradecanoato isopropila	1830	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	0,42	0,71	1,01	0,53	0,78	0,82	0,96	0,75	1,04
Valepotriato (AHD-Valtrato)	1835	-	-	-	-	-	-	-	-	0,51	0,87	0,98	0,14	0,41	0,29	0,53	0,97	1,41	1,52	1,38	1,84	2,37

Continuação ...Tabela VIII A.

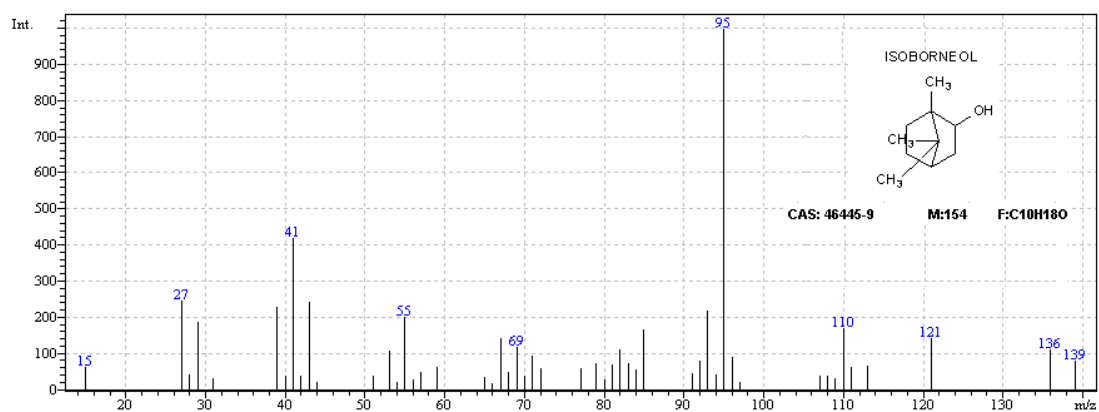
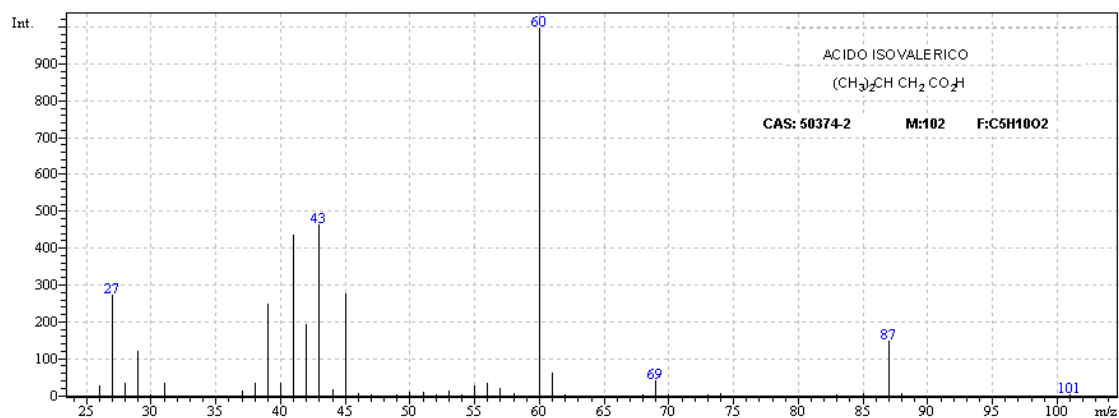
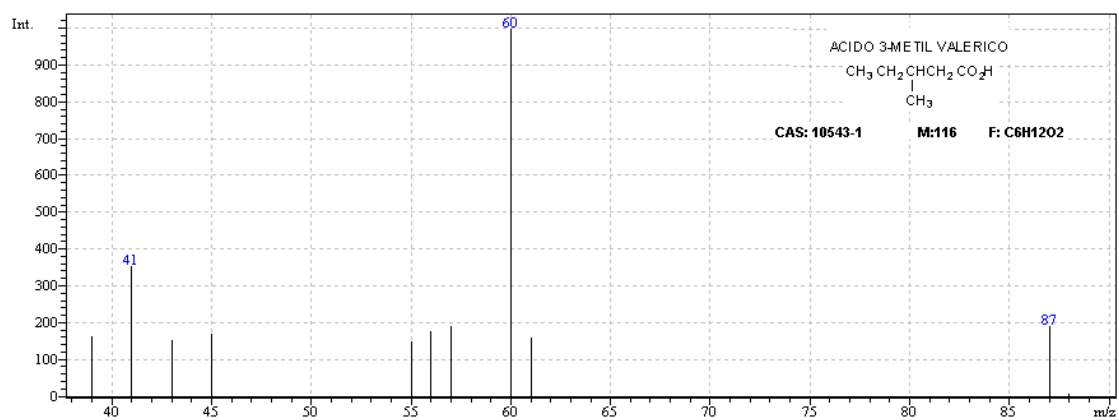
Compostos	RI OV5	RI Wax	V.o _HD	SFE 14	V. t _HD	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	
Fitol	1844	-	-	-	-	0,37	0,26	0,12	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato de (Z)- lanceol	1857	-	-	-	0,62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicilato de Benzila	1865	-	-	-	0,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-Isobutilóxi- isobutanoato de bornila	1890	-	-	-	2,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cubenol	1944	2037	-	-	0,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acido Palmítico	1946	-	-	-	0,49	0,47	0,49	0,41	0,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato (Z)- Valerenila	1977	-	7,90	5,50	0,50	6,95	6,37	6,68	8,27	0,95	1,08	1,36	0,69	0,74	0,78	1,08	1,23	1,37	1,39	1,44	1,58	2,30	-
Isovalerato (Z)-Valerenila	1984	-	-	-	0,56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecanoato Etila	1993	2430	-	-	2,03	1,21	2,10	1,53	6,73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n-Eicosano	1991	2000	-	-	-	1,04	1,29	1,43	1,51	0,05	0,08	0,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eicosanol	2004	2004	-	-	-	0,54	1,87	1,34	4,29	1,32	1,60	1,98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7-Hidróxi-4,8- Dimetil cumarina	2014	-	-	-	0,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isovalerato de (E)- Valerenila	2024	-	-	-	0,72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isopentanoato Isopropila	2025	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Santalol	2062	-	-	-	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Oleico	2087	-	-	-	-	2,81	3,52	3,89	4,01	2,03	2,37	2,56	4,37	5,15	5,81	6,03	4,10	4,38	4,59	5,78	5,81	6,01	-
N-Docosano	2190	-	-	-	-	0,21	0,52	0,47	0,58	0,21	0,45	0,83	0,23	0,27	0,30	0,41	0,21	0,55	0,69	0,71	0,93	1,57	-
Docosanol	2299	-	-	-	-	0,63	2,28	0,97	3,41	0,64	0,87	0,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tetracosano	2400	-	-	-	-	3,64	1,13	2,55	1,65	1,98	2,69	2,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acetato farnesila	2419	2422	-	-	-	-	-	-	-	1,02	1,23	1,54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido tetracosanoico	2430	-	-	-	-	2,68	2,45	2,48	2,52	0,35	1,42	1,22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecanol	2494	2494	-	-	-	0,39	0,34	0,55	0,59	0,02	0,05	0,08	0,87	0,88	0,97	1,36	0,55	0,88	0,74	0,89	1,06	1,79	-
γ- tocoferol	2518	-	-	-	-	2,33	2,36	0,86	0,96	1,02	1,74	1,81	0,91	1,02	1,11	1,55	0,49	0,84	0,97	1,01	1,25	1,90	-
Vitamina E	2528	-	-	-	-	2,24	2,33	2,65	2,82	3,38	3,12	3,46	0,85	0,99	1,01	1,90	0,34	0,71	0,72	0,79	1,21	1,46	-
Esqualeno	2660	-	-	-	-	1,45	2,45	3,83	2,75	1,45	1,58	1,70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estigmasterol	2721	-	-	-	-	10,31	12,99	12,79	13,04	11,58	14,95	15,11	2,38	2,91	3,54	4,93	3,37	4,59	4,66	5,97	5,10	7,32	-

RI=índice de retenção; OV5 –coluna apolar Wax coluna polar; -; não foi possível determinar RI experimentalmente; tr= traços.

Identificação ou tentativa de identificação: a - coinjeção com padrões; comparação com RI experimental OV-5 com Carbowax; b - comparação com RI da literatura, c - comparação com RI experimental e dados de espectro de massas com dados da literatura.

9.3 Anexo

Alguns espectros de massas – compostos candidatos a marcadores quimiotaxonômicos:



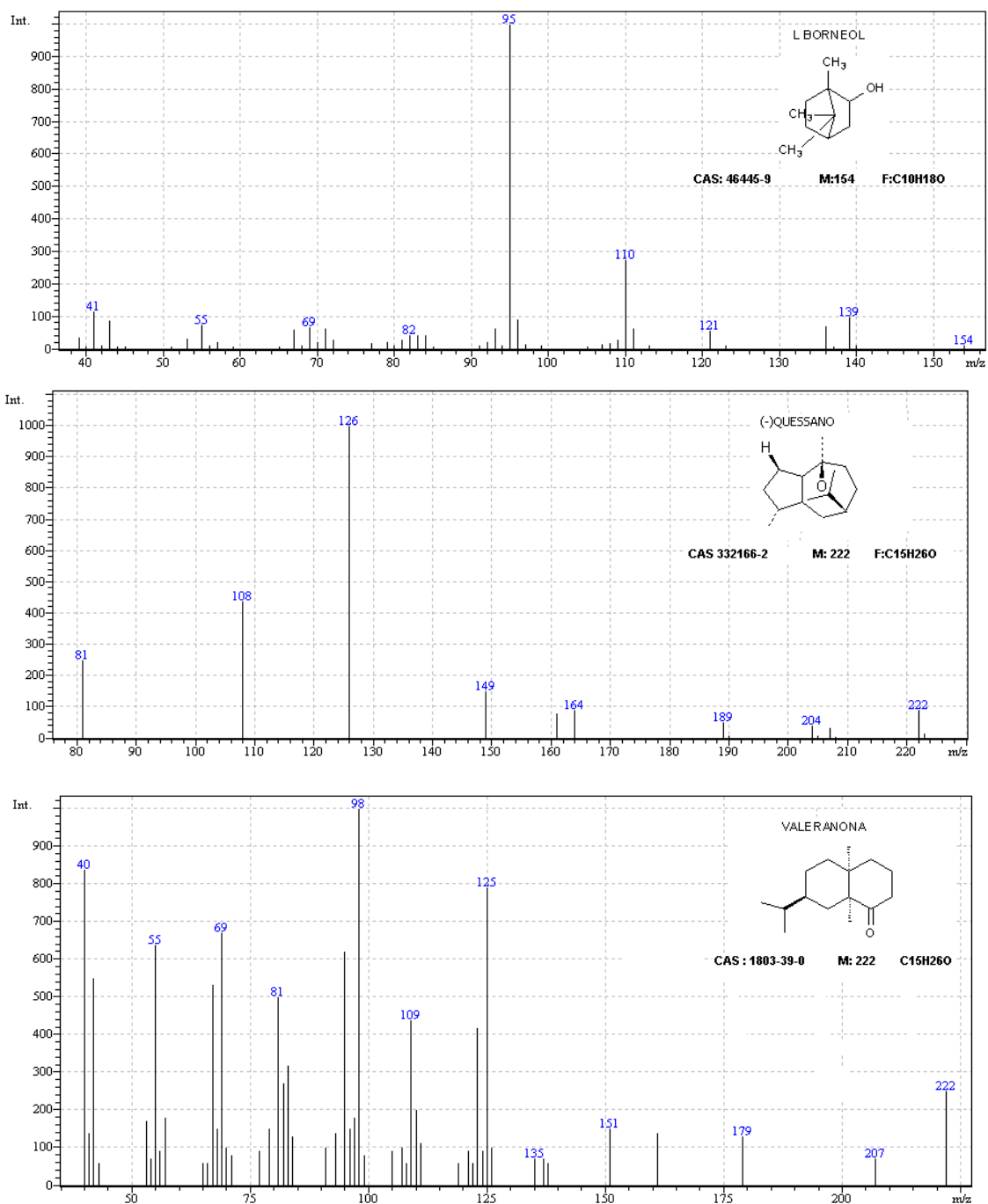


Figura A9: Espectro de massas dos compostos candidatos a marcadores quimiotaxonômicos da família *Valeriana* .

